

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 525611

(P2003 - 525611A)

(43)公表日 平成15年9月2日(2003.9.2)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 4
A 6 1 P 1/04		1/16	4 B 0 6 5
1/16		7/00	4 C 0 8 4

審査請求 有 予備審査請求 (全315数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 564368(P2001 - 564368)

(86)(22)出願日 平成13年3月2日(2001.3.2)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月30日(2002.8.30)

(86)国際出願番号 PCT/US01/06891

(87)国際公開番号 W001/064885

(87)国際公開日 平成13年9月7日(2001.9.7)

(31)優先権主張番号 60/186,462

(32)優先日 平成12年3月2日(2000.3.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アムジェン インコーポレーテッド
AMGEN INC.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9132
0 - 1799, サウザント オークス, ワン アム
ジェン センター ドライブ

(72)発明者 ザン, ケ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91362,
サウザンド オークス, ピーク プレイ
ス 2146

(74)代理人 弁理士 山本 秀策 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コルディン様 - 2 分子およびその使用

(57)【要約】

本発明は、コルディン様 - 2 (Chordin-Like - 2) (CHL2) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、CHL2 ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および方法を提供する。本発明はさらに、CHL2 ポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および/または予防のための薬学的組成物を提供する。本発明はさらに、CHL2 ポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および/または予防のための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列；
- (b) ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートのヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- (d) (a)～(c)のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および
- (e) (a)～(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項2】 単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号1もしくは配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートのヌクレオチド配列、または(a)の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；
- (c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサート、(a)または(b)の領域であって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；
- (d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサート、または(a)～

(c) いずれかの領域；

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(d)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a)～(d)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項3】 単離された核酸分子であって、以下；

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)～(e)のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)～(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項4】 請求項1、請求項2または請求項3のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】 請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】 真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】 原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】 C H L 2 ポリペプチドを産生するためのプロセスであって、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で請求項5に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。

【請求項9】 請求項8に記載のプロセスによって産生される、ポリペプチド。

【請求項10】 請求項8に記載のプロセスであって、ここで、前記核酸分子が、C H L 2 ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された、ネイティブなC H L 2 ポリペプチドに対するプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、プロセス。

【請求項11】 請求項2に記載の単離された核酸分子であって、ここで、同一性パーセントは、G A P、B L A S T N、F A S T A、B L A S T A、B L A S T X、B e s t F i t、およびS m i t h - W a t e r m a nアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離された核酸分子。

【請求項12】 化合物がC H L 2 ポリペプチド活性またはC H L 2 ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項5、請求項6、または請求項7のいずれかに記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞におけるC H L 2 ポリペプチド活性またはC H L 2 ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

【請求項13】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列；および

(b) ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項14】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号3または配列番号6のいずれかに示されており、必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号5のいずれかのオルソログに対するアミノ酸配列；

(c) 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該フラグメントは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列、ATCC受託番号PTA-1479もしくはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、または(a)~(c)のいずれかに記載のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項15】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する

、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項16】 請求項1、請求項2、または請求項3のいずれかに記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項17】 請求項14に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、同一性パーセントは、GAP、BLASTP、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離されたポリペプチド。

【請求項18】 請求項13、請求項14、または請求項15のいずれかに

記載のポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項19】 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する、請求項18に記載の選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項20】 抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項21】 ヒト化抗体である、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項22】 ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項23】 ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項24】 モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項25】 キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項26】 CDR移植抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項27】 抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項28】 可変領域フラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項29】 FabフラグメントまたはFab'フラグメントである、請求項28に記載の可変領域フラグメント。

【請求項30】 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異性を有する少なくとも1つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項31】 検出可能標識に結合される、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項32】 C H L 2 ポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項33】 C H L 2 ポリペプチド関連の疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための方法であって、請求項18に記載の選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項34】 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって産生される、選択的結合因子。

【請求項35】 請求項1、請求項2、または請求項3のいずれかに記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーム。

【請求項36】 請求項18に記載の選択的結合因子またはフラグメントを用いて、C H L 2 ポリペプチドの量を検出または定量する方法。

【請求項37】 請求項13、請求項14、または請求項15のいずれかに記載のポリペプチド、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項38】 前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、溶解剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項37に記載の組成物。

【請求項39】 前記ポリペプチドが、配列番号3または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む、請求項37に記載の組成物。

【請求項40】 請求項13、請求項14、または請求項15のいずれかに記載のポリペプチドの誘導体を含むポリペプチド。

【請求項41】 水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変された、請求項40に記載のポリペプチド。

【請求項42】 請求項41に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項43】 請求項1、請求項2または請求項3のいずれかに記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項44】 前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項43に記載の組成物。

【請求項45】 請求項1、請求項2または請求項3のいずれかに記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項46】 異種アミノ酸配列に融合された、請求項13、請求項14、または請求項15のいずれかに記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項47】 前記異種アミノ酸配列が、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項46に記載の融合ポリペプチド。

【請求項48】 医学的状態を、処置、予防、または改善するための方法であって、請求項13、請求項14、もしくは請求項15のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項1、請求項2、もしくは請求項3のいずれかに記載の核酸によってコードされるポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項49】 被験体において病的状態または病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) サンプル中の、請求項13、請求項14、もしくは請求項15のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項1、請求項2、もしくは請求項3のいずれかに記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの、発現の存在または発現量を決定する工程；および

(b) 該ポリペプチドの発現の存在または発現量に基づいて、病的状態または病的状態に対する感受性を診断する工程、を包含する、方法。

【請求項50】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適した膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞であって、該細胞は、請求項13、請求項14、もしくは請求項15のいずれかに記載のタンパク質を分泌する、細胞；を備え、

該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項51】 C H L 2 ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項13、請求項14、もしくは請求項15のいずれかに記載のポリペプチドを、化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該C H L 2 ポリペプチドの結合の程度を決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項52】 前記化合物に結合した場合に、前記ポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する、請求項51に記載の方法。

【請求項53】 動物においてポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項1、請求項2、または請求項3のいずれかに記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項54】 請求項1、請求項2、または請求項3のいずれかに記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項55】 化合物がC H L 2 ポリペプチド活性またはC H L 2 ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項54に記載のトランスジェニック哺乳動物を該化合物に曝露する工程、および該哺乳動物におけるC H L 2 ポリペプチド活性またはC H L 2 ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

【請求項56】 単離されたポリペプチドであって、以下：
2位のロイシンまたはメチオニン；5位のメチオニン；6位のリジン；7位のアラニン；8位のイソロイシン；14位のフェニルアラニン；15位のロイシン；23位のトレオニン；25位のロイシン；27位のバリン；30位のグルタミン酸；32位のチロシン；34位のメチオニン；36位のグルタミン；39位のリジン；41位のアラニン；45位のトレオニン；55位のバリン；59位のバリン；60位のアスパラギン；66位のプロリン；68位のアスパラギン；72位のセリンまたはトレオニン；74位のバリン；75位のアルギニン；94位のアルギニン；99位のアスパラギン；100位のセリン；105位のリジン；106位のバリン；113位のチロシン；116位のセリン；118位のセリン；1

20位のア르기ニン；123位のロイシン；125位のアラニン；129位のア
ラニン；139位のアラニン；142位のトレオニン；144位のセリン；14
7位のアスパラギン；148位のバリン；149位のセリン；159位のアラニ
ン；160位のアラニン；161位のアラニン；164位のバリン；166位の
バリン；173位のバリン；175位のア르기ニン；177位のアルパラギン酸
；190位のアラニン；191位のフェニルアラニン；192位のア르기ニン；
194位のロイシン；196位のアスパラギン；205位のロイシン；210位
のアラニン；212位のアラニン；213位のセリン；216位のアラニン；2
17位のセリン；218位のアラニン；219位のイソロイシン；222位のア
ラニン；225位のロイシン；226位のフェニルアラニン；230位のロイシ
ン；233位のグルタミンまたはア르기ニン；241位のグルタミン；242位
のロイシン；244位のイソロイシン；245位のグルタミンまたはアスパラギ
ン；249位のグルタミン；251位のロイシンまたはバリン；256位のアラ
ニン；257位のアスパラギン；259位のセリン；260位のアラニン；26
1位のグルタミン；265位のフェニルアラニン；268位のバリン；269位
のロイシン；272位のロイシン；275位のバリン；278位のバリン；28
4位のグルタミン酸；288位のグルタミン酸；292位のアラニンまたはイソ
ロイシン；300位のセリン；306位のイソロイシン；313位のバリン；3
14位のセリン；319位のロイシン；323位のグルタミン；324位のトレ
オニン；326位のアラニン；327位のアラニン；329位のセリン；331
位のセリン；334位のロイシン；337位のアルパラギン；339位のバリン
；340位のロイシン；342位のセリン；344位のフェニルアラニン；34
9位のグルタミン酸；354位のイソロイシンまたはバリン；356位のメチオ
ニン；366位のバリン；368位のメチオニンまたはバリン；371位のイソ
ロイシン；375位のロイシン；376位のロイシン；377位のグルタミン；
381位のフェニルアラニン；383位のアスパラギン；384位のイソロイシ
ン；393位のロイシン；395位のア르기ニン；398位のバリン；399位
のアラニンまたはバリン；403位のチロシン；406位のアスパラギン；40
9位のイソロイシン；415位のアラニンまたはバリン；417位のイソロイシ

ン；および421位のロイシンからなる群より選択される少なくとも1つの保存的なアミノ酸置換を有する配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号5に示されるポリペプチドの活性を有する、
単離されたポリペプチド。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、コルディン様 (Chordin-Like) - 2 (CHL2) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、CHL2 ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞および方法に関する。本発明はさらに、CHL2 ポリペプチドと関連する疾患、障害、および状態の診断、処置、改善、および/または予防のための薬学的組成物および方法に関する。

【0002】**(発明の背景)**

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療因子の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と結合されて、ゲノムの一部および全体への重複配列の集合ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および/または構造の目印に対して相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤としての使用に関して生成物に対して有利な特性を与え得る。

【0003】

過去10年間にわたるゲノム研究における有意な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に対する可能性は、未だ広く理解されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド(これらは、治療分子に対して「標的」として働き得る)は、未だ同定されていない。

【0004】

従って、診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよび

これらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【0005】

CHL2は、コルディン(CHD)として公知の骨形態発生タンパク質(BMP)インヒビター(Sasaiら、1994、Cell 79:779-90)、または短い原腸形成(SOG; Francoisら、1994、Genes Dev. 8:2602-16)に構造的に関連する。CHL2遺伝子は、CHD/SOGファミリーのメンバーであると考えられる。

【0006】

骨形態発生タンパク質(BMP)は、トランスフォーミング増殖因子ファミリーのメンバーであり、これは、本来、カートリッジインプラント(cartridge implant)から骨形成を促進する因子として同定された(Wozneyら、1988、Science 242:1528-34; Celesteら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9843-47)。BMPはまた、カエル、ハエの初期胚形成の間、および哺乳動物において不可欠の役割を果たすことが知られている。活性BMPの正確な濃度は、特定の細胞型の特異化のために重要なようである(Daleら、1992、Development 115:573-85; Doschら、1997、Development 124:2325-34)。BMP2/4の活性勾配は、例えば、Xenopus胚(ここでは、背面先端で、最も低い発現が検出され、そして腹側先端で、最も高い発現が観察される)において観察され、胚において、背腹側軸決定を確立する。別の例において、組織発生の特定の部位でのBMP濃度の制御は、器官形成におけるBMPについての役割を示唆する。BMP発現の制御は、BMP遺伝子産物の局在化した発現によってか、またはBMPインヒビターコルディン(CHD)(Sasaiら、1994、Cell 79:779-90) - または短い原腸形成(SOG)(Francoisら、1994、Genes Dev. 8:2602-16)の影響によってのいずれかで、達成される。

【0007】

CHD/SOGは、Spemann形成体(Xenopus胚形成の原腸形成

段階での背腹側軸特異化のためのマスターコントロール (master - controlling) 領域) から産生された大きな分泌タンパク質である。CHD / SOGは、Noggin (SmithおよびHarland、1992、Cell 70:829-40) (これもまた、形成体から分泌される) が機能するように、背方化因子として機能する。Drosophila SOGは、そのアミノ末端に膜貫通ドメインを有し、それがII型膜貫通タンパク質であり得ることを示唆する (Francoisら、1994、Genes Dev. 8:2602-16)。Drosophila SOGのカルボキシル末端側 (細胞外ドメイン) は、切断されることが提案された。しかし、Xenopus CHD (Sasaiら、1994、Cell 79:779-90)、ゼブラフィッシュCHD (Schulte-Merkerら、1997、Nature 387:862-63) およびマウスCHD (Pappanoら、1998、Genomics 52:236-39) は、膜貫通ドメインを含まない。代わりに、これらのタンパク質は、シグナルペプチドを有し、そして直接分泌される。CHD / SOGポリペプチドは、システインリッチなドメインの4つの繰り返し (CR1-4) を含み、このドメインはまた、コラーゲンおよびトロンボスポンジンのような種々の細胞外マトリックスタンパク質において見いだされる。

【0008】

CHD / SOGは、腹方化因子の1つであるBMP4に結合することが知られている (Piccoloら、1996、Cell 86:589-98)。BMP4は、マウスにおいて、後方腹側中葉胚の胚発生のために不可欠であることが示された (Winnierら、1995、Genes Dev. 9:2105-16)。CHD / SOGのBMP4への結合は、BMP4がそのレセプターへ結合することを妨げることによって、BMP4活性を阻害する (Piccoloら、1996、Cell 86:589-98)。この点において、CHD / SOGとBMP4との間の機能的関係は、OPGとOPGLとの間の機能的関係と類似するが、CHD / SOGは、構造的にはBMPレセプターに関連しない。CHD / SOGのBMP4への結合親和性は、特異的かつ密接であり ($K_d = 3 \times 10^{-10} M$) (Piccoloら、1996、Cell 86:589-98))

、そして結合したBMP4の放出を達成するためにタンパク質分解を必要とするようである。このタンパク質分解は、特定のメタロプロテアーゼ(Tolloid(TLD)またはBMP1)によって達成され、これは、第1のCRモチーフ(CR1)および最後のCRモチーフ(CR4)のいずれか、あるいは両方を遊離させるためにCHD/SOGを切断する(Piccolora, 1997, Cell 91:407-16)。CHD/SOGが、それ自身のレセプターによって他の機能または独立した機能を有するか否かは、なお決定されるべきである。

【0009】

CHD/SOGの最も重要な役割の1つは、BMP4モルフォゲン勾配を確立することである(JonesおよびSmith, 1998, Dev. Biol. 194:12-17)。BMP4それ自体は、短い距離を移動するのみで、そして細胞上で自律的に基本的に作用するようである(Jonesら, 1996, Curr. Biol. 6:1468-75)。対照的に、BMP4インヒビターNogginおよびCHD/SOGは、遠大な効果を及ぼすようであり、それによってBMP4の活性勾配を形成する。

【0010】

BMPはまた、初期胚形成の外に、例えば、肺、腸、腎臓、皮膚、心臓および歯の器官形成において、ならびに胚形成の後期段階において、重要な役割を果たす(Hogan, 1996, Genes Dev. 10:1580-94)。いくつかのBMPは、非常に局在化した形態で発現するが、他は、組織に広く発現する。器官形成におけるBMPの局在化した作用の重要性は、構築物(これによって、BMP濃度は、標的組織中で人工的に増強される)を用いたトランスジェニックマウス実験によって支持された。肺の場合、BMP4は、発生している肺の上皮の遠位端で発現し、そしてサーファクタント(surfactant)タンパク質Cプロモーターによって過剰発現される場合、構造的組織化(すなわち、分枝形成)が激しく崩壊された小肺の発生が観察される(Belluscioら, 1996, Development 122:1693-702)。推定のBMP活性勾配はまた、導入遺伝子発現によって崩壊され得るので、組織に広く発

現したBMPはまた、組織の構造的組織化の決定において役割を果たし得る。

【0011】

Nogginは、Spemann形成体から分泌された別のBMP2/4インヒビターである(Zimmermanら、1996、Cell 86:599-606)。Nogginの生物学的役割およびその作用様式は、XenopusにおけるCHD/SOGと類似する。Nogginの最も顕著な機能は、CHD/SOGのように、背方化であるが、Nogginがヌルの変異体(null-mutant)マウスは、初期の胚表現型の代わりに骨表現型(軟骨細胞の過形成)を示した(McMahonら、1998、Genes Dev. 12:1438-52; Brunetら、1998、Science 280:1455-57)。これは、CHL2またはCHDさえも、胚形成の後期段階において、必要な機能を有し得ることを示唆する。

【0012】

(発明の要旨)

本発明は、新規CHL2の核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0013】

本発明は、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下：

- (a) 配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列；
- (b) ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートのヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- (d) (a)~(c)のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および
- (e) (a)~(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0014】

本発明はまた、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1もしくは配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートのヌクレオチド配列、または(a)の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサート、(a)または(b)の領域であって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；

(d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサート、または(a)~(c)いずれかの領域；

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)~(d)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a)~(d)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0015】

本発明はさらに、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下；

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号5の

いずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)~(e)のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)~(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)~(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0016】

本発明は、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列；および

(b) ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0017】

本発明はまた、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、以下：

(a) 配列番号3または配列番号6のいずれかに記載されており、必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号5のいずれかのオルソログに対するアミノ酸配列；

(c) 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該フラグメントは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドセットの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列、ATCC受託番号PTA-1479もしくはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、または(a)~(c)のいずれかに記載のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【0018】

本発明はさらに、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号5の

いずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0019】

本発明はさらに、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、以下：

2位のロイシンまたはメチオニン；5位のメチオニン；6位のリジン；7位のアラニン；8位のイソロイシン；14位のフェニルアラニン；15位のロイシン；23位のトレオニン；25位のロイシン；27位のバリン；30位のグルタミン酸；32位のチロシン；34位のメチオニン；36位のグルタミン；39位のリジン；41位のアラニン；45位のトレオニン；55位のバリン；59位のバリン；60位のアスパラギン；66位のプロリン；68位のアスパラギン；72位のセリンまたはトレオニン；74位のバリン；75位のアルギニン；94位のアルギニン；99位のアスパラギン；100位のセリン；105位のリジン；106位のバリン；113位のチロシン；116位のセリン；118位のセリン；1

20位のア르기ニン；123位のロイシン；125位のアラニン；129位のア
ラニン；139位のアラニン；142位のトレオニン；144位のセリン；14
7位のアスパラギン；148位のバリン；149位のセリン；159位のアラニ
ン；160位のアラニン；161位のアラニン；164位のバリン；166位の
バリン；173位のバリン；175位のア르기ニン；177位のアスパラギン酸
；190位のアラニン；191位のフェニルアラニン；192位のア르기ニン；
194位のロイシン；196位のアスパラギン；205位のロイシン；210位
のアラニン；212位のアラニン；213位のセリン；216位のアラニン；2
17位のセリン；218位のアラニン；219位のイソロイシン；222位のア
ラニン；225位のロイシン；226位のフェニルアラニン；230位のロイシ
ン；233位のグルタミンまたはア르기ニン；241位のグルタミン；242位
のロイシン；244位のイソロイシン；245位のグルタミンまたはアスパラギ
ン；249位のグルタミン；251位のロイシンまたはバリン；256位のアラ
ニン；257位のアスパラギン；259位のセリン；260位のアラニン；26
1位のグルタミン；265位のフェニルアラニン；268位のバリン；269位
のロイシン；272位のロイシン；275位のバリン；278位のバリン；28
4位のグルタミン酸；288位のグルタミン酸；292位のアラニンまたはイソ
ロイシン；300位のセリン；306位のイソロイシン；313位のバリン；3
14位のセリン；319位のロイシン；323位のグルタミン；324位のトレ
オニン；326位のアラニン；327位のアラニン；329位のセリン；331
位のセリン；334位のロイシン；337位のアスパラギン；339位のバリン
；340位のロイシン；342位のセリン；344位のフェニルアラニン；34
9位のグルタミン酸；354位のイソロイシンまたはバリン；356位のメチオ
ニン；366位のバリン；368位のメチオニンまたはバリン；371位のイソ
ロイシン；375位のロイシン；376位のロイシン；377位のグルタミン；
381位のフェニルアラニン；383位のアスパラギン；384位のイソロイシ
ン；393位のロイシン；395位のア르기ニン；398位のバリン；399位
のアラニンまたはバリン；403位のプロリン；406位のアスパラギン；40
9位のイソロイシン；415位のアラニンまたはバリン；417位のイソロイシ

ン；および421位のロイシンからなる群より選択される少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号5に示されるポリペプチドの活性を有する。

【0020】

CHL2アミノ酸配列を含む融合ポリペプチドがまた、提供される。

【0021】

本発明はまた、本明細書中に示されるような単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示されるような組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、およびCHL2ポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、この宿主細胞を培養する工程、必要に応じてそのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する。

【0022】

CHL2ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物がまた、本発明に含まれる。CHL2核酸分子は、CHL2ポリペプチドの発現およびCHL2ポリペプチドの増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、CHL2核酸分子は、内因性CHL2ポリペプチドの発現を阻害する様式で動物に導入される（すなわち、CHL2ポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するトランスジェニック動物を作製する）。トランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはげっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。

【0023】

本発明のCHL2ポリペプチドの誘導体がまた、提供される。

【0024】

本発明のCHL2ポリペプチドに特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が、さらに提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニストのものであってもアンタゴニストのものであってもよい。

【0025】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、もしくは選択的結合因子ならびに1つ以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物がまた、本発明によって含まれる。薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0026】

本発明のCHL2ポリペプチドおよびCHL2核酸分子は、疾患および障害（本明細書中に列挙されるものを含む）を処置、予防、改善、および/または検出するための使用され得る。

【0027】

本発明はまた、CHL2ポリペプチドに結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、CHL2ポリペプチドを試験分子と接触させて、この試験分子のこのポリペプチドに対する結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、CHL2ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する工程を包含する。本発明はさらに、CHL2ポリペプチドの発現またはCHL2ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【0028】

CHL2ポリペプチドの発現を調整する方法およびCHL2ポリペプチドのレベルを調節する（すなわち、増加するか、または減少する）方法がまた、本発明によって含まれる。1つの方法は、CHL2ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、CHL2ポリペプチドの発現を調整または調節するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるように、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

【0029】

本発明の別の局面において、CHL2ポリペプチドは、そのレセプター（「CHL2ポリペプチドレセプター」）を同定するために使用され得る。種々の形態の「発現クローニング」は、タンパク質リガンドに対するレセプターをクローン

化するために広範囲に使用されている。例えば、SimonsenおよびLodish、1994、Trends Pharmacol. Sci. 15:437-41ならびにTartagliaら、1995、Cell 83:1263-71を参照のこと。CHL2ポリペプチドレセプターの単離は、CHL2ポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストの同定または開発に有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性CHL2ポリペプチドレセプター、抗CHL2ポリペプチドレセプター選択的結合因子（例えば、抗体またはその誘導体）、小分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらのうちのいずれかは、1つ以上の疾患または障害（本明細書中に開示されるものを含む）の処置のために使用され得る。

【0030】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の表題は、組織的な目的のみのためであり、そして記載される内容を限定するようには解釈されるべきではない。本願において列挙される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される。

【0031】

（定義）

用語「CHL2遺伝子」または「CHL2核酸分子」あるいは「CHL2ポリヌクレオチド」とは、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれかにおけるDNA挿入物のヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むか、またはこれらからなる核酸分子をいう。

【0032】

用語「CHL2ポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替的な形態のうちの1つをいう。

【0033】

用語「CHL2ポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2または配列

番号5のいずれかに示されるC H L 2ポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子(通常はRNA)をいう。

【0034】

用語「単離された核酸分子」とは、(1)総核酸が供給源細胞から単離される場合に、これが天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50パーセントから分離された本発明の核酸分子、(2)「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、(3)天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、あるいは(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在しない本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、任意の他の混入核酸分子、またはその天然の環境において見出される他の混入物(これらは、ポリペプチド産生におけるその使用、またはその治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる)を実質的に含まない。

【0035】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNAまたはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない: 4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン(pseudoisocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシ-メチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソ-ペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルキューオシン(

- D - mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボニル - メチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシブトキソシン (oxybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、および 2, 6 - ジアミノプリン。

【0036】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。

【0037】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切であり、そして挿入された異種核酸配列の発現を、指示および/または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0038】

用語「作動可能に連結された」は、本明細書中で、隣接配列の配置をいうために使用され、ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように構成または構築される。従って、コード配列に作動可能に連結した隣接配列は、このコード配列の複製、転写および/または翻訳を行うことが可能であり得る。例えば、コード配列は、プロモーターがこのコード配列の転写を指示し得る場合に、このプロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、これが正確に機能する限り、コード配列と連続する必要はない。従って、例えば、介在する非翻訳性であるが転写される配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、なおこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。

【0039】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたか、または形質転換され得、

次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞をいうために使用される。この用語は、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。

【0040】

用語「CHL2ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連するポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、CHL2ポリペプチドフラグメント、CHL2ポリペプチドオルソログ、CHL2ポリペプチド改変体、およびCHL2ポリペプチド誘導体が挙げられ、これらは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有する。CHL2ポリペプチドは、本明細書中で定義される成熟ポリペプチドであり得、そしてこれらが調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

【0041】

用語「CHL2ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）での短縮化および/またはカルボキシル末端での短縮化を含むポリペプチドをいう。用語「CHL2ポリペプチドフラグメント」はまた、CHL2ポリペプチドオルソログ、CHL2ポリペプチド誘導体、またはCHL2ポリペプチド改変体のアミノ末端および/またはカルボキシル末端短縮化、あるいはCHL2ポリペプチド対立遺伝子改変体またはCHL2ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシル末端短縮化をいう。CHL2ポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシング、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。CHL2ポリペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮化および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約20

0 アミノ酸、または約200より多くのアミノ酸を含む。このようなCHL2ポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、CHL2ポリペプチドに対する抗体を生成するために使用され得ることが理解される。

【0042】

用語「CHL2ポリペプチドオルソログ」は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるCHL2ポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのCHL2ポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0043】

用語「CHL2ポリペプチド改変体」は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるCHL2ポリペプチドアミノ酸配列（リーダー配列を有するかまたは有さない）と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および/またはCHL2ポリペプチドフラグメント）、および/または付加（例えば、内部付加および/またはCHL2融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むCHL2ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する（例えば、CHL2ポリペプチド対立遺伝子改変体、CHL2ポリペプチドオルソログ、およびCHL2ポリペプチドスプライス改変体）か、または、人工的に構築され得る。このようなCHL2ポリペプチド改変体は、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるDNA配列から変化するDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、1~3、または1~5、または1~10、または1~15、または1~20、または1~25、または1~50、または1~75、または1~100、または100より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および/または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

【0044】

用語「CHL2ポリペプチド誘導體」は、本明細書中で定義される、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド、CHL2ポリペプチド

フラグメント、C H L 2 ポリペプチドオルソログ、またはC H L 2 ポリペプチド
改変体をいい、これらは、化学的に改変されている。用語「C H L 2 ポリペプチ
ド誘導体」はまた、本明細書中で定義されるC H L 2 ポリペプチド対立遺伝子改
変体またはC H L 2 ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペ
プチドをいい、これは化学的に改変されている。

【0045】

用語「成熟C H L 2 ポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したC H L 2 ポリ
ペプチドをいう。成熟C H L 2 ポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ
末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および/またはカルボキシ末端
のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプ
チドの切断、N連結および/またはO連結グリコシル化など）を含み得る。例示
的な成熟C H L 2 ポリペプチドは、配列番号3および配列番号6のアミノ酸配列
によって示される。

【0046】

用語「C H L 2 融合ポリペプチド」は、本明細書中で定義される、配列番号2
または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド、C H L 2 ポリペプチドフ
ラグメント、C H L 2 ポリペプチドオルソログ、C H L 2 ポリペプチド改変体、
またはC H L 2 誘導体のアミノ末端またはカルボキシ末端での、1つ以上のアミ
ノ酸の融合（例えば、異種タンパク質またはペプチド）をいう。用語「C H L 2
融合ポリペプチド」はまた、本明細書中で定義されるC H L 2 ポリペプチド対立
遺伝子改変体またはC H L 2 ポリペプチドスプライス改変体によってコードされ
るポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端での、1つ以上のアミノ酸
の融合をいう。

【0047】

用語「生物学的に活性なC H L 2 ポリペプチド」とは、配列番号2または配列
番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドの、少なくとも1つの活性
特徴を有するC H L 2 ポリペプチドをいう。さらに、C H L 2 ポリペプチドは、
免疫原として活性であり得る；すなわち、このC H L 2 ポリペプチドは、抗体が
惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。

【0048】

用語「単離されたポリペプチド」とは、(1)供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるポリペプチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50%から単離された本発明のポリペプチド、(2)「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に連結しない(共有結合的または非共有結合的相互作用によって)、本発明のポリペプチド、(3)天然には連結しないポリペプチドに作動可能に連結(共有結合的または非共有結合的相互作用によって)する、本発明のポリペプチド、あるいは(4)天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、任意の他の混入ポリペプチドまたは天然の環境において見出される他の混入物(これは、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる)を実質的に含まない。

【0049】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、2つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定されるように、核酸分子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、2つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム(すなわち、「アルゴリズム」)によって焦点をあてられたギャップ整列(存在する場合)との間の一致の同一パーセントを評価する。

【0050】

用語「類似性」は、概念に関するが、「同一性」とは対照的に、「類似性」は、同一的一致および保存的置換の一致の両方を含む関連性の基準をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば10/20個同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、どちらも50%である。同じ例において、保存的置換であるさらに5つの位置が存在する場合、同一性パーセントは50%のままであるが、類似性パーセントは75%(15/20)である。従って、保存的置換が存在する場合、2つのポリペ

プチド間の類似性パーセントは、これらの2つのポリペプチド間の同一性パーセントよりも高い。

【0051】

用語「天然に存在する」または「ネイティブの」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的材料と関連して使用される場合、天然において見出され、そしてヒトによって操作されていない材料をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」は、本明細書中で使用される場合、天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成された材料をいう。

【0052】

用語「有効量」および「治療有効量」は、各々、本明細書中に示されるCHL2ポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるCHL2ポリペプチドまたはCHL2核酸分子の量をいう。

【0053】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのCHL2ポリペプチド、CHL2核酸分子、またはCHL2選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な1つ以上の処方材料をいう。

【0054】

用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得、そしてさらに動物において使用されて、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し得る分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

【0055】

用語「選択的結合因子」とは、CHL2ポリペプチドに特異性を有する分子（単数または複数）をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子の、ヒトCHL2ポリペプチドに結合し、かつヒト非CHL2ポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるようなポリペプチ

ドのオルソログ(すなわち、その種間変形(例えば、マウスCHL2ポリペプチドおよびラットCHL2ポリペプチド))に結合し得ることが、理解される。

【0056】

用語「形質導入」とは、通常はファージによる1つの細菌から別の細菌への遺伝子の伝達をいうように使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および伝達をいう。

【0057】

用語「トランスフェクション」は、細胞による異種または外因性DNAの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性DNAが細胞膜内に導入された場合には「トランスフェクトされ」ている。多数のトランスフェクション技術は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Grahamら, 1973, *Virology* 52:456; Sambrookら, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); および Chuら, 1981, *Gene* 13:197を参照のこと。このような技術を使用して、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入し得る。

【0058】

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含有するように改変された場合に形質転換されている。例えば、細胞は、それがそのネイティブな状態から遺伝的に改変される場合に形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、DNAの形質転換は、物理的に細胞の染色体に組み込むことにより細胞のDNAと組換わり得るか、複製されることなしにエピソームエレメントとして一時的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立的に複製し得る。DNAが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたとみなされる。

【0059】

(核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

関連した核酸分子が、配列番号1または配列番号4のいずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を包含すること、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を包含することが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかにおけるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および/または欠失を含むかまたは本質的にこれらからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。このような関連したCHL2ポリペプチドは、例えば、1以上のN結合型もしくはO結合型のグリコシル化部位の付加および/もしくは欠失、または1以上のシステイン残基の付加および/もしくは欠失を含み得る。

【0060】

関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかのCHL2ポリペプチドの少なくとも約25個連続したアミノ酸、または約50個のアミノ酸、または約75個のアミノ酸、または約100個のアミノ酸、または約150個のアミノ酸、または約200個のアミノ酸、または200個より多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、CHL2核酸分子のフラグメントを含む。

【0061】

さらに、関連したCHL2核酸分子はまた、本明細書中で定義した中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1または配列番号4のいずれかのCHL2核酸分子またはポリペプチドをコードする分子の完全に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子を含み、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5、あるいは本明細書中に定義した核酸フラグメント、または本明細書中に定義したポリペプチドをコードする核酸フラグメントのいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。ハイブリダイゼーションプローブは、関連した配列についてcDNA、ゲノムDNAライブラリーまたは合成DNAライブラリーをスクリーニングするための本明細書中に提供されるCHL2配列を用いて、調製され得る。CHL2ポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して有意な同一性を示す領域は、本明細書中に記載される配列アライメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれ

らの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

【0062】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ有意に不一致のDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68℃での0.015M塩化ナトリウム(sodium chloride)、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは42℃での0.015M塩化ナトリウム(sodium chloride)、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである。Sambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章(IRL Press Limited)を参照のこと。

【0063】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度が影響を受ける。他の薬剤は、非特異的および/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、 NaDodSO_4 、(SDS)、フィコール(ficoll)、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーシ

オン実験は通常、pH 6.8 ~ 7.4で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHからほぼ無関係である。Andersonら, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* 第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0064】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対の不一致程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって推定され得る：

$$T_m () = 81.5 + 16.6 (\log [Na +]) + 0.41 (\% G + C) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、[Na+]は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中でのナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中での(グアニン+シトシン)塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度は、1%の不一致毎に約1 低下する。

【0065】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50 ~ 65 での0.015M塩化ナトリウム (sodium chloride)、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは37 ~ 50 での0.015M塩化ナトリウム (sodium chloride)、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例示として、0.015Mナトリウムイオンにおける50 という「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を可能にする。

【0066】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって理解される。例えば、0.015 M ナトリウムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71 である。65 で（同じイオン強度で）の洗浄を用いると、これは、約6%の不一致を可能にする。より遠く関連した配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。

【0067】

約20 ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについての1M NaCl*中での融解温度の良好な推定は、以下によって与えられる：

$$T_m = A - T \text{塩基対あたり} 2 + G - C \text{塩基対あたり} 4$$

* 6 × 塩クエン酸ナトリウム (SSC) 中でのナトリウムイオン濃度は、1 M である。Suggsら, *Developmental Biology Using Purified Genes* 683 (BrownおよびFox編, 1981) を参照のこと。

【0068】

オリゴヌクレオチドについての高ストリンジェンシー洗浄条件は、通常、6 × SSC、0.1% SDS中でのそのオリゴヌクレオチドのT_mよりも0 ~ 5 低い温度においてである。

【0069】

別の実施形態では、関連した核酸分子は、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号2または配列番号5のいずれかに示すポリペプチドに対して少なくとも約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一で

あるか、またはヌクレオチド配列は、配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連した核酸分子は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有するポリペプチドをコードする。

【0070】

核酸配列における相違は、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的改変および/または非保存的改変をもたらし得る。

【0071】

配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対する、対応する改変）は、CHL2ポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生じる。対照的に、CHL2ポリペプチドの機能的特徴および/または化学的特徴における実質的な改変は、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得、これは以下の維持におけるその影響が有意に異なる：（a）例えば、シート状コンホメーションもしくは螺旋状コンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、（b）標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖のかさ高さ。

【0072】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性または電荷にほとんどまたは全く影響がないような、非ネイティブ残基によるネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンによって置換され得る。

【0073】

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるのではなく、化学

的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態が挙げられる。

【0074】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、複数のクラスに分割され得る：

- 1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；
- 3) 酸性：Asp、Glu；
- 4) 塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- 5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro；および
- 6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0075】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーとの交換を含み得る。このような置換された残基は、非ヒトCHL2ポリペプチドと相同なヒトCHL2ポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同領域に導入され得る。

【0076】

このような変化を行う際に、アミノ酸のヒドロパシー指数 (hydrophobic index) が考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて、ヒドロパシー指数を割り当てられている。ヒドロパシー指数は、以下である：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5)。

【0077】

タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能を確認する際の、ヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該分野において一般的に理解されている (Kyteら、1982, J. Mol. Biol. 157: 105-31)。特定のアミノ酸が類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに使用され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ヒドロパシー指数に基づいて変化を起こす際に、ヒドロパシー指数が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。

【0078】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る (特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合においてと同様に、免疫学的実施形態における使用に関して意図される場合) こともまた、当該分野において理解されている。タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される場合に、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に相関する。

【0079】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0 \pm 1)；グルタミン酸 (+3.0 \pm 1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 \pm 1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；およびトリプトファン (-3.4)。類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。一次アミノ酸配列から、エピトープをまた、親水性に基づいて同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」といわれる。

【0080】

所望のアミノ酸置換（保存的であれ非保存的であれ）は、当業者によって、このような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、CHL2ポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載されるCHL2ポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換は、表Iに記載される。

【0081】

【表1】

最初の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-ジアミノ酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

当業者は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない、C H L 2 分子の領域における変化が、C H L 2 ポリペプチドの生物学的活性および/または構造にさほど不利に影響を与えるようではないことが、理解される。当業者にはまた、比較的保存された領域においてさえ、化学的に類似のアミノ酸を、活性を維持ながら天然に存在する残基と置換し得ることが公知である（保存的アミノ酸残基の置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に不利に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0082】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造 - 機能研究を再調査し得る。このような比較の観点において、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応するC H L 2 ポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、C H L 2 ポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に対する化学的に類似のアミノ酸置換を、選択し得る。

【0083】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造に関して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。このような情報の観点において、当業者は、C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面に存在すると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このよ

うな残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を各アミノ酸残基に含む、試験改変体を生成し得る。これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が破壊を生じるか、所望でなく減少するか、または所望でない活性であることを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独でかまたは他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【0084】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。Moult, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 422 - 27; Chouら、1974, *Biochemistry* 13: 222 - 45; Chouら、1974, *Biochemistry* 113: 211 - 22; Chouら、1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47: 45 - 48; Chouら、1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47: 251 - 276; およびChouら、1979, *Biophys. J.* 26: 367 - 84を参照のこと。さらに、コンピュータプログラムが、二次構造の推定を補助するために、現在利用可能である。二次構造を推定する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%より大きな配列同一性または40%より大きな類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長は、二次構造(ポリペプチドまたはタンパク質の構造中の潜在的な折り畳みの数を含む)の増強された推定性を提供してきた。Holmら、1999, *Nucleic Acids Res.* 27: 244 - 47を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質において制限された数の折り畳みが存在すること、および一旦、重要な数の構造が解析されると、構造推定は劇的により正確となることが、示唆されてきた(Brennerら、1997, *Curr. O*

pin. Struct. Biol. 7:369-76)。

【0085】

二次構造を推定するさらなる方法は、「スレッディング (threading)」(Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:377-87; Sipplら、1996, Structure 4:15-19)、「プロフィール分析」(Bowieら、1991, Science, 253:164-70; Gribskovら、1990, Methods Enzymol. 183:146-59; Gribskovら、1987, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84:4355-58)、および「進化的連鎖」(Holmら、前出、およびBrennerら、前出を参照のこと)を包含する。

【0086】

好ましいCHL2ポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および/または型が配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、CHL2ポリペプチド改変体は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN連結グリコシル化部位を含む。N連結グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと示されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N連結炭水化物鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN連結炭水化物鎖を除去する。1つ以上のN連結グリコシル化部位(代表的に、天然に存在するグリコシル化部位)が排除され、そして1つ以上の新たなN連結部位が作製される、N連結炭水化物鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいCHL2改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、CHL2ポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な

立体配座にリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には同数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【0087】

別の実施形態において、関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸挿入を有し、そしてポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはこの配列からなるか、あるいは少なくとも1つのアミノ酸欠失を有し、ここでポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはこの配列からなる。関連する核酸分子はまた、ポリペプチドがカルボキシル末端および/またはアミノ末端の短縮を有し、そしてさらにここで、このポリペプチドが、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはこの配列からなる。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端短縮、およびアミノ末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を含み、そしてここで、ポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはこの配列からなる。

【0088】

さらに、配列番号2または配列番号5、あるいは他のCHL2ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、同種ポリペプチドに融合してホモダイマーを形成し得るか、あるいは異種ポリペプチドに融合してヘテロダイマーを形成し得る。異種ペプチドおよび異種ポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：CHL2融合ポリペプチドの検出および/また

は単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその部分；触媒的に活性である、酵素またはその部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のC H L 2ポリペプチドとは異なる治療活性を有するポリペプチド。

【0089】

融合は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のC H L 2ポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、作製され得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いない直接的融合であってもよいし、リンカーもしくはアダプター分子を介してであってもよい。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基であり得、代表的に、約20～約50アミノ酸残基である。リンカーまたはアダプター分子はまた、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼに対する切断部位を有して設計されて、融合した部分の分離を可能にし得る。一旦構築されると、この融合ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

【0090】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のC H L 2ポリペプチドは、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインに融合する。抗体は、以下の2つの機能的に独立した部分を含む；抗原を結合する「Fab」として公知の変域ドメイン、ならびに補体活性化および食作用細胞による攻撃のようなエフェクター機能に参与する、「Fc」として公知の定常ドメイン。Fcは、長い血清半減期を有し、一方でFabは、短寿命である。Caponら、1989, Nature 337: 525-31。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテ

ンA結合、補体固定、およびおそらく、胎盤移入さえものような機能を組み込み得る。同書。表IIは、当該分野において公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

【0091】

【表2】

Fcの形態	治療タンパク質との融合		参考文献
	融合パートナー	治療関連	
IgG1	CD30-LのN末端	ホジキン病；未分化リンパ腫；T細胞白血病	米国特許第5,480,981号
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症性；移植拒絶	Zheng et al., 1995 <i>Immunol.</i> 154:555
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisher et al., 1996 <i>Engl. J. Med.</i> 334:1702; Van Zee et al., 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, 又はIgE (第1のドメインを除く)	TNFレセプター	炎症、自己免疫障害	米国特許第5,808,029号
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Capon et al., 1989 <i>Nature</i> 337: 525-
IgG1, IgG3	IL-2のN末端	抗癌、抗ウイルス	Harvill et al., 1995 <i>Immunotech.</i> 1:95
IgG1	OPGのC末端	変形性関節症；骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプテンのN末端	抗肥満	PCT/US 97/2318; December 11, 1997
ヒト Ig Cγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Med.</i> , 174:561-69

一例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域は、当業者に公知の方法を使用して、CHL2ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合し得る。別の例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域は、CHL2ポリペプチドフラグメント（例えば、CHL2ポリペプチドの推定細胞外部分）のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合し得る。

【0092】

得られるCHL2融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって、精製され得る。Fc領域に融合したペプチドおよびタンパク質は

、融合していない対応物より実質的に長いインビボでの半減期を示すことが見出された。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化/多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または治療品質、循環時間、もしくは減少した凝集のような特定の品質を改善するよう変更され得る。

【0093】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology (A.M. Lesk編、Oxford University Press 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D.W. Smith編、Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A.M. GriffinおよびH.G. Griffin編、Humana Press 1994); G.von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987); Sequence Analysis Primer (M. GribskovおよびJ. Devereux編、M. Stockton Press 1991); ならびにCarilloら、1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0094】

同一性および/または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の適合を与えるように、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための、好ましいコンピュータプログラム方法としては、GCGプログラムパッケージ(GAP (Devereuxら、1984, Nucleic Acids Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of

Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschulら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-10)を含む)が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information(NCBI)および他の供給源(Altschulら、BLAST Manual(NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschulら、1990、前出)から公に利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【0095】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のアライメントスキームは、これら2つの配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、2つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態において、選択された整列方法(GAPプログラム)は、特許請求されるポリペプチドの少なくとも50の連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0096】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)を使用して、パーセント配列同一性が決定されるべき2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合(アルゴリズムによって決定される「適合したスパン」)のために、整列される。ギャップオープニングペナルティ(gap opening penalty)(これは、平均対角の3倍として計算される:「平均対角」とは、使用される比較行列(comparison matrix)の対角の平均である;「対角」とは、特定の比較行列によって各完全なアミノ酸適合に対して割り当てられたスコアまたは数である)およびギャップエクステンションペナルティ(gap extension penalty)(これは通常、ギャップオープニングペナルティの0.1倍である)、ならびにPAM 250またはBLOSUM 62のような比較

行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もまた、このアルゴリズムによって使用される (Dayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure (補遺 3 1978) (PAM250比較行列); Henikoffら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19 (BLOSUM 62比較行列) を参照のこと)。

【0097】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53;

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoffら、前出)；

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Threshold of Similarity: 0

このGAPプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、GAPアルゴリズムを用いるポリペプチド比較 (末端ギャップに対してはペナルティーがないこととともに) のためのデフォルトパラメータである。

【0098】

核酸分子配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Algorithm: Needleman and Wunsch, 前出；

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

このGAPプログラムはまた、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【0099】

Program Manual, Wisconsin Package, Ve

rsion 9, September, 1997に記載されるものを含む、他の例示的なalgorithm、gap opening penalty、gap extension penalty、comparison matrix、およびthreshold of similarityが使用され得る。なされるべき特定の選択は、当業者に明らかであり、そしてなされるべき特定の比較（例えば、DNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNA）；ならびにさらに、その比較が所定の対の配列間（この場合には、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい）であるか、1つの配列と大きなデータベースの配列との間（この場合には、FASTAまたはBLASTAが好ましい）であるかに依存する。

【0100】

（核酸分子）

CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の様式（化学合成、cDNAもしくはゲノムのライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および/またはcDNAのPCR増幅が挙げられるが、これらに限定されない）で容易に得られ得る。

【0101】

本明細書中において使用される組換えDNA法は、一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) および/またはCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、Green Publishers Inc. およびWiley and Sons 1994) に記載されている。本発明は、本明細書中に記載され得ような核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。

【0102】

CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が1つの種から同定された場合には、この遺伝子の全てまたは一部を、同じ種由来のオーソログまたは関連する遺伝子を同定するためのプローブとして使用し得る。このプローブま

たはプライマーを使用して、C H L 2 ポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来の c D N A をスクリーニングし得る。さらに、配列番号 1 または配列番号 4 のいずれかに記載されるような配列を有する核酸分子の部分または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的に、中程度または高いストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用されて、このスクリーニングから得られる誤った陽性の数を最小にする。

【0103】

C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子もまた、発現されたタンパク質の特性に基づいて陽性クローンの検出を使用する発現クローニングによって、同定され得る。代表的に、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）を、宿主細胞表面において発現および提示されたクローンタンパク質に結合させることによって、スクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

【0104】

以下に記載される説明に従って実施される組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを産生し得、そしてコードされたポリペプチドを発現し得る。例えば、C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望のヌクレオチド配列を容易に生成し得る。次いで、これらの配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを生成し得る。あるいは、C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされたC H L 2 ポリペプチドが、多量に生成され得る。

【0105】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）である。この方法において、c D N A は、酵素逆転写酵素を使用して、p o l y (A) + R N A または全 R N A から調製される。次いで、2つのプライマー（代表

的には、CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの別個の領域に対して相補的である)が、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこのcDNAに付加され、そしてこのポリメラーゼが、このcDNAのこれら2つのプライマー間の領域を増幅する。

【0106】

CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら、1989, *Angew. Chem. Intl.* 編. 28 : 716 - 34によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントが一緒に連結されて、CHL2遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATGを有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されるか否かに依存して、CHL2ポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0107】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるCHL2ポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択されるCHL2ポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって(例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって)実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先性のための「Eco_high.Cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピュータアル

ゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI) によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、「Celegans_high.cod」、「Celegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、および「Yeast_high.cod.」が挙げられる。

【0108】

いくつかの場合において、CHL2ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望であり得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点変異を有する部位特異的変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して生成され得る(変異誘発技術の記載に関しては、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出を参照のこと)。Engelsら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0109】

(ベクターおよび宿主細胞)

CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される(すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である)。CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫(バキュロウイルス系)宿主細胞および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、CHL2ポリペプチドが翻訳後修飾(例えば、グリコシル化および/またはホスホリル化)されるか否かに一部依存する。そうである場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、Meth.Enz., 第185巻(D.V.Goeddel, 編, Academic Press 1990)を参照のこと。

【0110】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のためならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」と呼ばれる）は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む：プロモータ、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタープライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

【0111】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、CHL2ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；オリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、または別の「タグ」（例えば、FLAG、HA（赤血球凝集素（hemagglutinin）インフルエンザウイルス））または市販の抗体が存在するmycをコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、CHL2ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとしてタグに対して抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたCHL2ポリペプチドから除去される。

【0112】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、CHL2ポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。

このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0113】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、CHL2遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

【0114】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、PCRを使用して、そして/あるいは適切なオリゴヌクレオチドならびに/または同じもしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が公知でない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子を含み得る大きな片のDNAから単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatsworth, CA）、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【0115】

複製起点は、代表的に、市販から購入された原核生物発現ベクターの一部であり、そしてこの起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数に対するベクターの増幅は、いくつかの場合において、CHL2ポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まな

い場合、公知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミド pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起点 (例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、または HPV または BPV のようなパピローマウイルス) は、哺乳動物細胞におけるベクターのクローニングのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクター (例えば、SV40 起点は、ただそれが初期プロモータを含むので、しばしば、使用される) のために必要ではない。

【0116】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の 3' 側に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-C リッチフラグメント、続いてポリ-T 配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化され得るか、またはベクターの一部として市販で購入され、これは、本明細書中上記のような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0117】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素 (例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン) に対する耐性を与えるか；(b) 細胞の栄養要求性の欠損を補うか；あるいは、(c) 複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0118】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生により大きく要求される遺伝子が、組換え細胞

の連続的な生成の染色体内でタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子の効果によって生存するように独特に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子とCHL2ポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量のCHL2ポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

【0119】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてShine-Dalgarno配列(原核生物)またはKozak配列(真核生物)によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現されるCHL2ポリペプチドのプロモータの3'側およびコード配列の5'側に配置される。Shine-Dalgarno配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン(すなわち、高いA-G含有量を有する)である。多くのShine-Dalgarno配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して容易に合成され得、そして原核生物ベクターにおいて使用され得る。

【0120】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞からCHL2ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、CHL2核酸分子のコード領域に位置するか、または直接CHL2ポリペプチドコード領域の5'側に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、そして選択された宿主細胞において機能性である任意のシグナル配列が、CHL2核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、CHL2核酸分子に対して同種(天然)または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。大部分において、シグナルペプチドの存在によって宿主細胞からのCHL2ポリペプチドの分泌は、分泌されたCHL2ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を

生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入されたC H L 2核酸分子の一部であり得る。

【0121】

C H L 2ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなC H L 2ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列またはC H L 2ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が本発明の範囲内である。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、そしてプロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなC H L 2ポリペプチドシグナル配列を認識せず、かつプロセスしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌について、ネイティブなC H L 2ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列が満足であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0122】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましい、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のシグナルペプチド（*pre sequence*）が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列（*pro-sequence*）を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最後のタンパク質産物は、1位に（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）、発現に付随して1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に除去されないかもしれない。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断される場合、所望のC H L 2ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

【0123】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合、C H L 2 遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない（大部分のc D N Aについて）場合、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列およびC H L 2 遺伝子に関してイントロンの位置は、イントロンが効果的に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、C H L 2 c D N A分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側で、p o l y - A転写終止配列の5'側である。好ましくは、イントロンは、コード配列を妨害しないように、c D N Aの1つの側面または他の側面（すなわち、5'側または3'側）に配置される。任意の供給源（ウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまた本明細書中に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

【0124】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、そしてC H L 2 ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモータを含む。プロモータは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子（一般的に、約100～1000bp）の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）に配置される非転写配列である。プロモータは、通常、2つのクラス（誘導プロモータおよび構成プロモータ）の1つにグループ化される。誘導プロモータは、培養条件におけるいくらかの変化（例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答してそれらの制御下で、D N Aからの転写の増加したレベルを開始する。他方、構成プロモータは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対して遺伝子をほとんど制御しないかまたは制御しない。多数のプロモータ（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモータは、供給源のD N Aからプロモータを制限

酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモータ配列をベクターに挿入することによって、C H L 2 ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなC H L 2 プロモータ配列は、C H L 2 核酸分子の増幅および/または発現に指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモータと比較して大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能であり、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモータが好ましい。

【0125】

原核生物宿主との使用に適切なプロモータとしては、 λ -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン（trp）プロモータ系；およびハイブリッドプロモーター（例えば、tacプロモータ）が挙げられる。他の公知の細菌プロモータもまた、適切である。これらの配列は、公開されており、その結果、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNA配列にそれらの配列を連結し得る。

【0126】

酵母宿主との使用に適切なプロモータはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモータとの使用に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモータは周知であり、限定しないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましいシミアンウイルス40（SV40）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモータが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモータとしては、異種哺乳動物プロモータ（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0127】

C H L 2 遺伝子発現を制御する際に関心があり得るさらなるプロモータとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40初期プロモータ領域（Bernois and Chambon, 1981, Nature 290:304

- 10) ; CMVプロモータ ; ラウス肉腫ウイルスの3'側の長い終末反復に含まれるプロモータ (Yamamotoら, 1980, Cell 22 : 787-97) ; ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagnerら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 : 1444-45) ; メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinsterら, 1982, Nature 296 : 39-42) ; β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター (Villa-Kamaroffら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 75 : 3727-31) ; またはtacプロモータ (DeBoerら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 80 : 21-25) 。 組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている以下の動物転写制御領域もまた関心がある : 膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼI遺伝子制御領域 (Swiftら, 1984, Cell 38 : 639-46 ; Ornitzら, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50 : 399-409 (1986) ; MacDonald, 1987, Hepatology 7 : 425-515) ; 膵臓細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域 (Hanahan, 1985, Nature 315 : 115-22) ; リンパ球において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedlら, 1984, Cell 38 : 647-58 ; Adamesra, 1985, Nature 318 : 533-38 ; Alexanderら, 1987, Mol. Cell. Biol. , 7 : 1436-44) ; 精巢、乳房、リンパ球、および肥満細胞において活性なマウス哺乳動物腫瘍ウイルス制御領域 (Lederら, 1986, Cell 45 : 485-95) ; 肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkertら, 1987, Genes and Devel. 1 : 268-76) ; 肝臓において活性な α -フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlaufら, 1985, Mol. Cell. Biol. , 5 : 1639-48 ; Hammerら, 1987, Science 235 : 53-58) ; 肝臓において活性な α 1-抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら, 1987, Genes and Devel. 1 : 161-71) ; 骨

髄性細胞において活性化 - グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら, 1985, Nature 315:338-40; Kolliasら, 1986, Cell 46:89-94); 脳の稀突起神経膠細胞において活性化ミエリンベースのタンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら, 1987, Cell 48:703-12); 骨格筋において活性化ミオシン軽鎖 - 2 遺伝子制御領域 (Sani, 1985, Nature 314:283-86); ならびに視床下部において活性化ゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら, 1986, Science 234:1372-78)。

【0128】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明のCHL2ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモータに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシスに作用するエレメントである。エンハンサーは、相対的な方向および位置に独立する。これらは、転写ユニットに対して5'側および3'側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である(例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 β -フェトプロテインおよびインシュリン)。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモータの活性化について例示的に増強するエレメントである。エンハンサーは、CHL2核酸分子に対して5'位または3'位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモータから5'位側に配置される。

【0129】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。本明細書中に記載される隣接配列の1つ以上がすでにベクター内がない場合、これらは、個々に得られ得、そしてベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0130】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen、San Diego、CA)、pBSII (Stratagene、La Jolla、CA)、pET15 (Novagen、Madison、WI)、pGEX (Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)、pEGFP-N2 (Clontech、Palo Alto、CA)、pETL (BlueBacII、Invitrogen)、pDSR-alpha (PCT公開番号WO 90/14363)ならびにpFastBacDual (Gibco-BRL、Grand Island、NY)が挙げられる。

【0131】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1-ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems、La Jolla CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPO™ TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA)、ならびにバキュロウイルス発現系のような哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター (pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA)が挙げられる。

【0132】

ベクターが構築され、そしてCHL2ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅発現および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。CHL2ポリペプチドに対する発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクシヨ

ン、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクチン、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、一部、使用される宿主細胞の種類に依る。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら、上記に記載される。

【0133】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞（例えば、E. coli）または真核生物宿主細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞）であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合、CHL2ポリペプチドを合成し、これは、続いて、培養培地から（宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合）収集され得るか、直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される（そのポリペプチドが分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性（例えば、グリコシル化またはホスホリル化）に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾、および生物学的に活性な分子に折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0134】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAから入手可能である。例としては、限定しないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、CHO DHFR(-)細胞 (Urlaubら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 4216-20)、ヒト胚性腎臓 (HEK) 293または293T細胞、あるいは3T3細胞のような哺乳動物細胞が挙げられる。適切な哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1およびCOS-7細胞株、およびCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびゲッ歯類動物細胞株（形質転換細胞株を含む）が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞株、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、

選択遺伝子を遺伝子型的に欠き得るか、または優先的に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、限定しないが、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swissから誘導された3T3株、Balb-cまたはNIHマウス、BHKまたはHakハムスター細胞株が挙げられる。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現の当業者によって公知であり入手可能である。

【0135】

同様に、細菌細胞が、本発明に適切な宿主細胞として有用である。例えば、E. coli (例えば、HB101、DH5、DH10、およびMC1061)の種々の菌株は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp.、他のBacillus spp.、Streptomyces spp.などの種々の菌株がまた本方法において使用され得る。

【0136】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明のポリペプチドの発現のため宿主細胞として入手可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0137】

さらに、望ましい場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら、1993、Biotechniques、14:810-17; Lucklow、1993、Curr. Opin. Biotechnol. 4:564-72; およびLucklowら、1993、J. Virol.、67:4566-79に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (Invitrogen)である。

【0138】

グリコシル化CHL2ポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳産生動物(例えば、雌ウシまたはヤギ)を使用し、本発明のグリコシル化ポリペプチドを動物の乳に得ること

ができる。CHL2ポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、しかし、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0139】

(ポリペプチド産生)

CHL2ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養分を含む。E.coli細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Luria Broth (LB) および/または Terrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM) および/または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要な血清および/または増殖因子を補充され得る。昆虫細胞についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および/または胎仔ウシ血清を補充したグレース培地である。

【0140】

代表的に、トランスフェクトされた細胞または形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物質として加えられる。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカースタメントによって検出可能である。例えば、選択マーカースタメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に加えられる化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

【0141】

宿主細胞によって産生されるCHL2ポリペプチドの量は、当該分野において

公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分離、免疫沈降、および/またはDNA結合ゲル移動アッセイのような活性アッセイが挙げられる。

【0142】

CHL2ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計される場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、CHL2ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および/または核（真核宿主細胞について）に、あるいは、細胞質ゾル（グラム陰性細菌宿主細胞について）に存在する。

【0143】

宿主細胞細胞質および/または核（真核生物宿主細胞について）に位置するかまたは細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に位置するCHL2ポリペプチドについて、細胞内物質（グラム陰性細菌についての封入体を含む）は、当業者に公知の任意の標準的な技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、均質化、および/または超音波処理、続く遠心分離によって、ペリプラズム/細胞質の含有量を放出するように溶解され得る。

【0144】

CHL2ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、内部および/または外部細胞膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後にペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、pH極限值で処理され得るか、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性のpHで、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性のpHで、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理して、封入体を放出させ、分断させ、そして溶解させ得る。次いで、溶解されたCHL2ポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。CHL2ポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中およびMarstonら, 1990, Meth. En

z . , 1 8 2 : 2 6 4 - 7 5 に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

【0145】

いくつかの場合、C H L 2 ポリペプチドは、単離の際、生物学的に活性でなくとも良い。「再折り畳みする」、つまり、ポリペプチドをその三次構造に変換し、ジスルフィド連結を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、溶解されたポリペプチドをある pH (通常7より上) および特定の濃度のカオトロピック剤 (c h a o t r o p e) の存在に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、封入体溶解に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤は低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み / 酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン / シスタミン、グルタチオン (G S H) / ジチオビス G S H、塩化銅 (I I)、ジチオトレイトール (D T T) / ジチアン D T T、および 2 , 2 -メルカプトエタノール (b M E) / ジチオ - b (M E) が挙げられる。多くの場合において、共溶媒が使用され得るか、または再折り畳みの効率を増加するのに必要であり得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

【0146】

封入体が C H L 2 ポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

【0147】

溶液からの C H L 2 ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン (C H L 2 ポリペプチド / h e x a H i

s)のようなタグまたは他の小さなペプチド(例えば、FLAG(Eastman Kodak Co., New Haven, CT)またはmyc(Invitrogen, Carlsbad, CA))をそのカルボキシ末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがタグについて高い親和性を有するアフィニティーカラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

【0148】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性を有して結合する。従って、ニッケルのアフィニティーカラム(例えば、Qiagen(登録商標)ニッケルカラム)は、CHL2ポリペプチド/polyHisの精製のために使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8(Ausubelら, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993)を参照のこと。

【0149】

さらに、CHL2ポリペプチドは、CHL2ポリペプチドを特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。

【0150】

精製のための他の適切な手段としては、限定しないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動(ネイティブなゲル電気泳動を含む)、続くゲル溶出、および分取用等電集束法(「アイソプライム(Isoprime)」機械/技術、Hoefler Scientific, San Francisco, CA)が挙げられる。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術を、増加した純度を達成するために組み合わせられ得る。

【0151】

CHL2ポリペプチドはまた、Merrifieldら, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghtenら, 1985, Pro

c Natl Acad. Sci. USA 82:5132; および Stewart および Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984) に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法(例えば、固相ペプチド合成)によって調製され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さないで合成され得る。化学的に合成された CHL2 ポリペプチドは、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化され得て、ジスルフィド架橋を形成し得る。化学的に合成された CHL2 ポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製される対応する CHL2 ポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると期待され、従って、組換えまたは天然の CHL2 ポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

【0152】

CHL2 ポリペプチドを得る別の手段は、CHL2 ポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および/または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、CHL2 ポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生された CHL2 ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体を使用してモニターされ得る。

【0153】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、CHL2 ポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-303を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Roberts, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol 3:268-73もまた参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、それぞれが、5'無作為化配列、中心予備選択配

列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的活性を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0154】

米国特許第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,723,323号；および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、確率論的遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主細胞は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0155】

ペプチドまたはポリペプチドの産生するための別の方法は、Athersys, Inc.によって出願されたPCT/US98/20094 (WO99/15650) (「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られている)に記載されており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同性組換えまたは異常な組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的DNAは、まず、放射線に供せられ、そして遺伝子プロモーターに挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方に最終的に配置され、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現より生じる。

【0156】

これらの方法は、包括的なCHL2ポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ(例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび全生物アッセイ(例えば、植物、マウスなど))におい

て、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0157】

(合成)

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子は、組換えおよび他の手段によって産生され得ることは、当業者によって理解される。

【0158】

(選択的結合因子)

用語「選択的結合因子」は、1以上のCHL2ポリペプチドに対して特異性を有する分子を言及する。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに小分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なCHL2ポリペプチド選択的結合因子は、CHL2ポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、ポリペプチドのCHL2ポリペプチドレセプターへの結合を阻害する。

【0159】

CHL2ポリペプチドと結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異的なポリクローナルを含むポリクローナル；モノクローナル(MAb)；組換え；キメラ；ヒト化(例えば、CDR移植化)；ヒト；単鎖；および/または二特異的；ならびにフラグメント；改変体；またはそれらの誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、CHL2ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体のこれらの一部を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって産生されたFabおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術(例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現)によって産生されたフラグメントが挙げられる。

【0160】

CHL2ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、一般に、CHL2ポ

リペプチドおよびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物（例えば、ウサギまたはマウス）において産生される。CHL2ポリペプチドをキャリアタンパク質に結合させることは、有用であり得、このタンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターのように、免疫化される種において免疫原性である。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、この動物は採血され、そして血清を、抗CHL2抗体タイターについてアッセイする。

【0161】

CHL2ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、培地中の連続的細胞株によって抗体分子を産生するために提供される、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するために適切な方法の例は、Kohlerら、1975、Nature 256:495-97のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor、1984、J. Immunol. 133:3001; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987)）が挙げられる。CHL2ポリペプチドと反応する、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株がまた、本発明によって提供される。

【0162】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。1実施形態は、「キメラ」抗体であり、この重鎖（H）および/または軽鎖（L）の一部が、特定の種から誘導されるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスの属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である一方で、この鎖の残りは、別の種から誘導されるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である。抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、これらの抗体のフラグメントも含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-5

5を参照のこと。

【0163】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化した抗体は、非ヒトである供給源から導入された1以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野(Jonesら、1986、Nature 321:522-25; Riechmannら、1998、Nature 332:323-27; Verhoeyenら、1988、Science 239:1534-36)で記載される方法を使用して、鋸状相補的決定領域(CDR)の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域と置換することによって、実施される。

【0164】

CHL2ポリペプチドと結合するヒト抗体がまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリンの産物の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物(例えば、マウス)を使用して、このような抗体は、CHL2ポリペプチド抗原(すなわち、少なくとも6個の連続アミノ酸を有する)を用いて免疫化することによって産生され、必要に応じて、キャリアに結合される。例えば、Jakobovitsら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551-55; Jakobovitsら、1993、Nature 362:255-58; Bruggermannら、1993、Year in Immuno. 7:33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、本明細書中の重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重鎖および軽鎖タンパク質をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物(この動物は、改変体の完全相補体未満を有する)は、所望の免疫系の改変体の全てを得るためにクロスブレッドされる。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト(例えば、マウスではない)アミノ酸配列(このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である改変領

域を含む)を有する抗体を産生する。例えば、PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807、PCT出願番号PCT/US91/245およびPCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1および546073A1に記載される。ヒト抗体はまた、宿主細胞中の組換えDNAの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0165】

代替の実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリから産生され得る(Hoogenboomら, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marksら, 1991, J. Mol. Biol. 222:581)。これらにより、糸状のバクテリオファージの表面上の抗体レポーターのディスプレイを介した模倣免疫選択、および選択した抗原への結合によるファージの続く選択を処理する。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これには、このようなアプローチを使用して、MPL-レセプターおよびmsk-レセプターについて、高い親和性および機能的なアンタゴニスト抗体の単離が記載される。

【0166】

キメラ抗体、CDR移植化抗体、およびヒト化抗体は、代表的に組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載される物質および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞(例えば、CHO細胞)中で処理される。モノクローナル(例えば、ヒト)抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0167】

本発明の抗-CHL2抗体は、CHL2ポリペプチドの検出および定量のために、任意の公知のアッセイ方法(例えば、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイ)において使用され得る(S

ola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。この抗体は、使用されるアッセイ方法に対して、適切である親和性でCHL2ポリペプチドと結合する。

【0168】

診断適用のために、特定の実施形態において、抗-CHL2抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、または ^{67}Ga ）；蛍光化合物または化学的蛍光化合物（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）、または酵素（アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくはホースラディッシュペルオキシダーゼ）であり得る（Bayerら, 1990, Meth. Enz. 184: 138-63）。

【0169】

競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、CHL2ポリペプチド、またはその免疫学的に活性な部分）の能力に依存し、限定された量の抗-CHL2抗体との結合に関して、試験サンプル検体（CHL2ペプチド）と競合する。試験サンプル中のCHL2ポリペプチドの量は、抗体と結合する標準の量と反比例する。結合する標準の量を決定するのを容易にするために、この抗体は、競合前または後に、代表的に免疫化され、この抗体と結合する標準および検体は、結合しないままの標準および検体から好都合に分離され得る。

【0170】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用に代表的に関連し、各々は、決定および/または定量されるべきタンパク質の異なる免疫部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル検体は、固体支持体上に免疫化される一次抗体によって代表的に結合され、その後、二次抗体が、この検体に結合され、可溶の3部の複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110を参照のこと。二次抗体自体は、検出可能な部分で標識される

か（直接的なサンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識される抗 - 免疫グロブリン抗体を使用して（間接的なサンドイッチアッセイ）測定され得る。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベント検定法（E L I S A）（この場合、検出可能な部分は、酵素である）である。

【0171】

抗 - C H L 2 抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボイメージングのために有用である。検出可能な部分で標識した抗体は、動物に、好ましくは、血流に投与され得、宿主中で標識した抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物中で検出可能である任意の部分で標識され得る。

【0172】

抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらは、少なくとも1つのC H L 2 ポリペプチドの生物学的活性を、それぞれ増強または減少させるかのいずれかである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、C H L 2 ポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでC H L 2 ポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る、C H L 2 ポリペプチドと特異的に結合し得る抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、この選択的結合因子（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約50%、および好ましくは、少なくとも約80%によって、C H L 2 ポリペプチドの機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合アッセイは、C H L 2 ポリペプチド結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得る抗 - C H L 2 ポリペプチド抗体であり、これにより、インビトロまたはインビボにおいてC H L 2 ポリペプチド活性を阻害または排除する。アゴニストおよびアンタゴニスト抗体 - C H L 2 ポリペプチド抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

【0173】

本発明はまた、C H L 2 選択的結合因子（例えば、抗体）を含むキットおよび

生物学的サンプル中でC H L 2 ポリペプチドレベルを検出するために有用である他の試薬に関する。このような試薬はまた、血清を遮断する検出可能な標識、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、および検出試薬を含み得る。

【0174】

(マイクロアレイ)

DNAマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体(例えば、ガラス)上に配置された核酸の小型高密度アレイである。このアレイ内の各細胞またはエレメントは、相補的核酸配列(mRNA)とハイブリダイゼーションするための標識として作用する、単一の核酸種の複数のコピーを含む。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロフィールにおいて、mRNAは、最初に細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、酵素的に蛍光標識されたcDNAに変換される。この材料は、マイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAは、洗浄により除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各々核酸分子を標的するために特異的に結合される、標識されたcDNAの量を定量することによって視覚化される。このようにして、数千もの遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットの並行様式で定量され得る。

【0175】

このハイスループット発現プロフィールは、本発明のC H L 2分子に関連して広範の適用を有し、これには、以下が挙げられるが、これに限定されない：治療のための標的として、C H L 2疾患関連遺伝子の同定および確認；関連するC H L 2分子およびそのインヒビターの分子毒性；臨床試験のための代替マーカーの集団および産生の階層化；およびハイスループットスクリーニングにおいて、選択化合物の同定を援助することによって、関連するC H L 2ポリペプチド小分子薬物発見を増強すること。

【0176】

(化学的誘導体)

C H L 2ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、この開示が、本明細書中に記載された場合、当業者によって調製され得る。C H L 2ポリペプチド誘導

体は、このポリペプチドに天然で結合した分子の型または位置のいずれかで、異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の天然で結合した化学的な基の除去によって形成される分子を含み得る。配列番号2、配列番号5、または他のCHL2ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、結合するタンパク質は、水環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、目的産物の調製の治療学的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0177】

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2kDaと約100kDaとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、上記の分子量より多い、いくらか少ない重量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5kDaと約50kDaの間、より好ましくは、約12kDaと約40kDaとの間、そして最も好ましくは、約20kDaと約35kDaとの間である。

【0178】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-連結またはO-連結炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレングリコール（PEG）（これは、モノ-（ $C_1 - C_{10}$ ）、アルコキシ-、またはアリーロキシ-ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導するために使用されたPEGの形態を含む）、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約6kD）のデキストラン）、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-（N-ビニルピロリジン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシ/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびビニルアルコール。共有結合したCHL2ポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本

発明に含まれる。

【0179】

一般に、化学的誘導は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、以下の工程を包含する：(a) 配列番号2、配列番号5、または他のCHL2ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドが、1以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）とポリペプチドを反応させる工程、ならびに(b) 反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子のタンパク質に対する比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。1実施形態において、CHL2ポリペプチド誘導体は、アミノ末端の単一ポリマー分子部分を有する。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

【0180】

ポリペプチドのペギル化(pegylation)は、当該分野で公知の任意のペギル化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Francisら, 1992, Focus on Growth Factors 3:4-10; 欧州特許第0154316号および0401384号; ならびに米国特許第4,179,337号。例えば、ペギル化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有する。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有する。例えば、反応性アルデヒド、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであり、これは、水溶性、またはモノC₁-C₁₀アルコキシもしくはそのアリアルコキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

【0181】

別の実施形態において、C H L 2 ポリペプチドは、ビオチンに化学的に連結され得る。次いで、このビオチン / C H L 2 ポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、その結果、4 価のアビジン / ビオチン / C H L 2 ポリペプチド分子が得られる。C H L 2 ポリペプチドはまた、ジニトロフェノール (D N P) またはトリニトロフェノール (T N P) に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗 - D N P または抗 - T N P - I g M と共に沈殿し、10 価の十量体の結合体を形成する。

【0182】

一般に、本発明のC H L 2 ポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る条件は、C H L 2 ポリペプチドについて本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示されるC H L 2 ポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強または減少した生物学的活性、または他の特性 (例えば、増加または減少した半減期) を有し得る。

【0183】

(遺伝子操作した非ヒト動物)

マウス、ラット、または他のげっ歯類 ; ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれ、ここで、天然のC H L 2 ポリペプチドをコードする遺伝子は中断 (すなわち「ノックアウト」) され、C H L 2 ポリペプチドの発現レベルは、有意に減少するか、または完全に破壊される。このような動物は、米国特許第5,557,032号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

【0184】

本発明は、マウス、ラット、または他のげっ歯類 ; ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物をさらに含み、この動物のC H L 2 遺伝子の天然の形態または非相同性C H L 2 遺伝子のいずれかが、動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,743号およびPCT公開番号W O 9 4 / 2 8 1 2 2 号に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

【0185】

本発明は、非ヒト動物をさらに含み、ここで、本発明の1以上のCHL2ポリペプチドのプロモーターは、(例えば、相同的な組換え方法を使用することによって)活性化されるか、または活性化されず、1以上の天然CHL2ポリペプチドの発現のレベルを改変する。

【0186】

これらの非ヒト動物は、薬物候補物スクリーニングのために使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物での薬物候補物の影響が測定され得る。例えば、薬物候補物は、CHL2遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生されるCHL2ポリペプチドの量は、動物を薬物候補物に曝露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物での薬物候補物の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現により、疾患状態または病理学的状態を生じるか、または関連する。このような場合において、遺伝子の発現を減少させるための薬物候補物の能力または病理学的状態を防止または阻害するための能力を試験し得る。別の例において、ポリペプチドのフラグメントのような、特定の代謝産物の産生により、疾患状態または病理学的状態を生じるか、または関連する。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少させるための薬物候補物の能力または病理学的状態を防止または阻害するための能力を試験し得る。

【0187】

(CHL2ポリペプチド活性の他の調節因子についてのアッセイ)

いくつかの状態において、CHL2ポリペプチドの活性の修飾因子である分子(例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト)を同定することが所望され得る。CHL2ポリペプチドを調節する天然または合成分子は、本明細書中に記載されるように、1以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、インビトロ様式またはエキソビボ様式のいずれかで、注射、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。

【0188】

「試験分子」とは、CHL2ポリペプチドの活性を調節する(すなわち、増加または減少させる)ための能力について評価する分子を言う。最も一般的に、試

験分子は、CHL2ポリペプチドと直接的に相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、CHL2遺伝子発現に影響を与えることによって、またはCHL2ポリペプチド結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって、CHL2ポリペプチド活性を間接的に調節し得る。1実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは、約 10^{-8} M、より好ましくは、約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数（affinity constant）でCHL2ポリペプチドと結合する。

【0189】

CHL2ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、CHL2ポリペプチドは、試験分子とCHL2ポリペプチドとの相互作用が可能な条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相互作用の範囲が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物中でスクリーニングされ得る。

【0190】

特定の実施形態において、CHL2ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得、これは、CHL2ポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する。CHL2ポリペプチドの発現を調節する分子は、CHL2ポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、またはCHL2ポリペプチドの発現を指向または制御する核酸配列に対して相補的である核酸分子、および発現のアンチセンス制御因子として作用する核酸分子を含む。

【0191】

一旦、CHL2ポリペプチドと相互作用する場合に、試験化合物が、同定されると、この分子は、CHL2ポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とCHL2ポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形態で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、CHL2ポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてC

H L 2 ポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。

【0192】

試験分子とC H L 2 ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むC H L 2 ポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0193】

C H L 2 ポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのC H L 2 ポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、結合パートナーに対するC H L 2 ポリペプチドの結合の速度および/または速度を増加または減少させるために、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1アッセイにおいて、C H L 2 ポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中に固定化される。次いで、放射標識したC H L 2 ポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化したC H L 2 ポリペプチド結合パートナー）および試験化合物は、このウェルに、一時に一方を（いずれかの順序で）または同時に添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射活性を計数し、結合パートナーがC H L 2 ポリペプチドに結合する範囲を決定する。代表的に、分子は、濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1以上を欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代わりは、タンパク質の「位置」を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対してC H L 2 ポリペプチド結合パートナーを固定化し、試験分子および放射標識したC H L 2 ポリペプチドをインキュベートし、そしてC H L 2 ポリペプチド結合の範囲を決定する工程）を包含する。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、第18章（Ausubelら編、Green Publishers Inc.ならびにW

ileyおよびSons 1995)を参照のこと。

【0194】

放射性標識に対する代替として、CHL2ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素(例えば、わさびペルオキシダーゼ(HRP)またはアルカリホスファターゼ(AP)) (これらは、比色定量的に検出される)に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。CHL2ポリペプチドまたはCHL2ポリペプチド結合パートナー(これらは、ビオチンに結合されている)に対する抗体はまた、APまたはHRPに連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーションに続いて、検出の目的のために使用され得る。

【0195】

CHL2ポリペプチドまたはCHL2ポリペプチド結合パートナーは、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固体相基材への付着によって固定化され得る。基材-タンパク質複合体は、相補タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そしてCHL2ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材-タンパク質複合体は、カラムを通過する、試験分子および相補タンパク質を用いてカラム内に固定化され得る。CHL2ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術(例えば、放射性標識または抗体結合)のいずれかを使用して評価され得る。

【0196】

CHL2ポリペプチド結合タンパク質とCHL2ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム(例えば、BIAcoreアッセイシステム(Pharmacia, Piscataway, NJ))である。BIAcoreシステムは、製造業者によって特定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、CHL2ポリペプチドまたはCHL2

ポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（これは、検出器に存在する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側面に物理的に関係する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定される。

【0197】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、CHL2ポリペプチドとCHL2ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に記載される。

【0198】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、CHL2ポリペプチドとCHL2ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0199】

CHL2ポリペプチドとCHL2ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少される化合物はまた、CHL2ポリペプチドまたはCHL2ポリペプチド結合パートナーFのいずれかを発現する細胞および細胞システムを使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞システムは、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌ類またはげっ歯類の供給源由来である。CHL2ポリペプチドの、CHL2ポ

リペプチド結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験化合物の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、CHL2ポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0200】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、CHL2遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるCHL2ポリペプチドまたはCHL2ポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物への薬物候補の実質的な影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物への特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメントなど）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

【0201】

（内部移行タンパク質）

tatタンパク質配列（HIV由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、Falwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:664-68を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸の配列（Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号10）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT-PDTを称される）は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら、1999、Science 285:1569-72；およびNagaharaら、1998、Nat

. Med . 4 : 1 4 4 9 - 5 2 を参照のこと。これらの手順において、FITC 構築物 (FITC 標識 G - G - G - G - Y - G - R - K - K - R - R - Q - R - R - R ; 配列番号 1 1) (これは、腹腔内投与に続いて組織を貫通する) が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光細胞分析分離 (fluorescence activated cell sorting ; FACS) 分析によって検出される。tat - gal 融合タンパク質で処置された細胞は、gal 活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現が、多くの組織 (肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織) において検出され得る。このような構築物は、細胞に入るためにある程度の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への移入に続いて、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

【0202】

従って、tat タンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。例えば、tat タンパク質配列を使用して、CHL2 アンタゴニスト (例えば、抗 IL - 1ra - R 選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド) は、CHL2 分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「CHL2 分子」は、本明細書中に定義されるような、CHL2 核酸分子および CHL2 ポリペプチドの両方をいう。所望ならば、CHL2 タンパク質自体はまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Straus , 1999 , Science 285 : 1466 - 67 をまた参照のこと。

【0203】

(CHL2 ポリペプチドを使用する細胞供給源の同定)

本発明の特定の実施形態に従って、CHL2 ポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定することを可能することが有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病的状態の起源を決定することが有用であり得る。特定の実施形態において、CHL2 ポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載の細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗 CHL2 ポリペプチド抗体を使用して、細胞における CHL2

ポリペプチドの存在について試験し得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞か否かを決定し得る。

【0204】

(C H L 2 ポリペプチド組成物および投与)

治療組成物は、本発明の範囲内である。このようなC H L 2 ポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量のC H L 2 ポリペプチドまたはC H L 2 核酸分子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の1以上のC H L 2 ポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。

【0205】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0206】

薬学的組成物は、例えば、pH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、において、無菌性、安定性、解離または放出の速度、吸着、または組成物の浸透を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム（sodium hydrogen-sulfite））、緩衝液（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、バルキング剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、複合体化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン）、フィラー、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色剤、味付け剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペ

ブチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、表面活性剤または湿潤剤（例えば、プルオニック（pluronic）；PEG；ソルビタンエステル；ポリソルビテート（例えば、polysorbate 20またはpolysorbate 80）；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロールまたはチロキサポール（tyloxapal））、安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）、張度増強剤（例えば、ハロゲン化アルカリ金属（好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、またはマンニトール、ソルビトール）、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences（第18版，A.R.Gennaro，編，MacK Publishing Company 1990を参照のこと。

【0207】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences，前出を参照のこと。このような組成物は、CHL 2分子の、物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【0208】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、本来水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理学的な生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり、おそらく非経口投与のための組成物において一般的な他の材料で補充されている。中性の緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH 7.0 - 8.5のTris緩衝液または約pH 4.0 - 5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、

ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、CHL2ポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出)と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、CHL2ポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

【0209】

このCHL2ポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達(例えば、経口的に)のために、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術内にある。

【0210】

処方成分が、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたは多少より低いpH(典型的に、約5~約8のpH範囲内)にこの組成物を維持するために使用される。

【0211】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望のCHL2分子を含む発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ここで、CHL2分子が、滅菌で、等張溶液として処方され、適切に保存される。なお、別の調製は、所望の分子と、薬剤(例えば、注入可能なマイクロスフィア、生体侵食(bio-erodible)薬剤、ポリマー化合物(ポリ乳酸またはポリグリコール酸)、ビーズまたはリポソーム)との処方物に関係し得、これは、次いで蓄積注射を介して送達され得る産物の制御されたまたは持続された放出を提供する。ヒアルロン酸がまた、使用され得、そしてこれは、循環において、維持された持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

【0212】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、CHL2ポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。CHL2ポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧体と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与が、PCT公開番号WO94/20069にさらに記載され、これは化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

【0213】

特定の処方物が、経口投与されることがまた意図される。本発明の1つの実施形態において、このよう様式で投与されるCHL2ポリペプチドが、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、そして前全身分解が最小化される場合、胃腸管内での点で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、CHL2ポリペプチドの吸収を容易にするために含まれる。希釈剤、味付け剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、およびバインダーがまた、使用され得る。

【0214】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のCHL2ポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤は以下を含むが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

【0215】

さらなるCHL2ポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続または制御送達処方物中にCHL2ポリペプチドを含む処方物を含む。種々の

他の持続または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体侵食マイクロスフィアあるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術はまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性マイクロ粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。

【0216】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリックスを含む。徐放性マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, 1983, Biopolymers 22:547-56）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langerら, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277およびLanger, 1982, Chem. Tech. 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（Langerら, 前出）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Eppsteinら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-92; および欧州特許第036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

【0217】

インビボ投与のために使用されるCHL2の薬学的組成物は、代表的に滅菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が、凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前に、またはそれに続いてのいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル）内に配置

される。

【0218】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水和粉末または凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態（凍結乾燥された形態）のいずれかで保存され得る。

【0219】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（lyosyringe））を含むキットが含まれる。

【0220】

治療的に使用されるCHL2の薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、従って、送達される分子、CHL2分子が使用されている指標、投与の経路、および患者のサイズ（体重、体表面、または器官の大きさ）および状態（年齢および一般的な健康）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量の力価（titer）を決定し、投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ 以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までの範囲であり得る。

【0221】

投薬の頻度は、使用される処方物中でのCHL2分子の薬物動態学のパラメーターに依存する。典型的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。組成物は、従って、組成物は、経時的な単一用量として、2以上の用量（これは、同量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）とし

て、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そしてそれらによって慣用的に実施される課題の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量 - 応答データの使用を介して確認され得る。

【0222】

薬学的組成物の投与の経路は、以下のような公知の方法と一致する：経口的に；静脈内、腹腔内、脳内（実質内の）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注入を介して；徐放性系によって；または移植デバイスによって。所望される場合、これらの組成物は、ボラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

【0223】

あるいはまたはさらに、組成物は、その上に所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化される膜、スポンジ、または他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ボラスまたは連続的な投与を介し得る。

【0224】

いくつかの場合において、エキソビゴ様式において、CHL2ポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から除去された細胞、組織、または器官は、これらの細胞、組織、または器官が引き続いて患者に移植して戻された後にCHL2ポリペプチドに曝露される。

【0225】

他の場合において、CHL2ポリペプチドは、本明細書中に記載される方法を使用して、遺伝的に操作されて、CHL2ポリペプチドを発現および分泌する特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。必要に応じて、細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。カプセル化材料

は、典型的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子によって細胞の破壊を防止する。

【0226】

本明細書中において議論されるように、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を1つ以上のCHL2ポリペプチドで処理することが、望ましくあり得る。このことは、細胞膜に対して透過性の形態である場合には、単離された細胞をこのポリペプチドに直接曝露することによって達成され得る。

【0227】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび/または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写に対してサイレントなCHL2遺伝子（すなわち、過少発現される遺伝子）を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のCHL2ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

【0228】

相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である。Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301。基本的な技術が、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するため(Thomasら、1986, *Cell* 44:419-28; ThomasおよびCapecchi, 1987, *Cell* 51:503-12; Doetschmanら、1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8583-87)、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するため(Doetschmanら、1987, *Nature* 330:576-78)の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号;欧州特許第9193051号および

同第505500号；PCT/US90/07642、ならびにPCT公開番号WO 91/09955)に記載されている。

【0229】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的DNAに付着させることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的(相同)であるヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に対して相補的な標的DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、細胞に挿入されてハイブリダイズしたDNAの一般的な特性であり、そして従って、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組み換わる。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに付着される場合には、これはまた、この組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれる。ブルーフリーディング機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして働くことが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。

【0230】

CHL2ポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るDNAの領域(例えば、隣接配列)が、標的DNAのこれらの断片に付着する。例えば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サプレッサ、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムに、所望のCHL2ポリペプチドをコードするDNAの近位に、このDNAの転写に影響を与えるに十分な配向で、挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在するDNAの部分を制御する。従って、所望のCHL2ポリペプチドの発現は、CHL2遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、むしろ、CHL2遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合した標的DNA(目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む)の使用によって、達成され得る。

【0231】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子(すなわち、所望の内

因性細胞遺伝子)の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライドナー部位を含むDNAの導入によって、変更される。これらの構成成分は、新たな転写ユニットの産生を実際に生じるような様式で、染色体(ゲノム)DNAに導入される(ここで、DNA構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結する)。染色体DNAへのこれらの構成成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化する。

【0232】

本明細書中で記載されるように、変化された遺伝子発現は、通常は得られたままの細胞においてサイレントな(発現されていない)遺伝子の活性化(または発現させる)、ならびに得られたままの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加を包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンを変化させる工程を包含し、その結果、これは、得られたままの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そして得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を減少(排除を含む)させる。

【0233】

細胞の内在性CHL2遺伝子からのCHL2ポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同定組換えが使用され得る1つの方法は、最初に、相同性組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列(例えば、Cre/loxP、FLP/FRT)(Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-2; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900)を、細胞の内在性CHL2ポリペプチドコード領域の上流(すなわち、5')に配置する工程を包含する。ゲノムCHL2ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された領域に対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼによって、プラスミドは、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノムCHL2ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込み得る(Baubonis および Sauer, 1993, Nucleic Acids Res. 21:

2025-29; O'Garmanら、1991, *Science* 251:1351-55)。転写を増加させることが知られている任意の側方配列(例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー)は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内在性CHL2遺伝子からの新たなまたは増加したCHL2ポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で一体化する。

【0234】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノムCHL2ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株のゲノムの他の位置に第2の組換え部位を導入するために相同性組換えを使用することである。適切な組換え酵素は、次いで、二組換え部位細胞株に導入され、組換え減少(欠失、転化、および転移)を生じ(Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900)、これは、細胞の内在性CHL2遺伝子からの新規なまたは増加したCHL2ポリペプチド産生を生じる新しいかまたは改変された転写ユニットを作製する。

【0235】

細胞の内在性CHL2遺伝子からのCHL2ポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性CHL2遺伝子からの新たなまたは増加したCHL2ポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子(単数または複数)(例えば、転写因子)の発現を増加するかまたは引き起こし、そして/または遺伝子(単数または複数)(例えば、転写リプレッサ)の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド(例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的DNA結合ドメインを含むポリペプチド)を、細胞の内在性CHL2遺伝子からの新たなまたは増加したCHL2ポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

【0236】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なDNA構築物に関する。特定の実施形態において、代表的なDNA構築物は、以下を含む

：(a) 1つ以上の標的配列、(b) 制御配列、(c) エキソン、および(d) 対スプライドナー部位。DNA構築物中の標的配列は、エレメント(a)～(d)の細胞中の標的遺伝子への組込みを指向し、その結果、これらのエレメント(b)～(d)は、内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、DNA構築物は、以下を含む：(a) 1つ以上の標的配列、(b) 制御配列、(c) エキソン、(d) スプライドナー部位、(e) イントロン、および(f) スプライスアクセプター部位。ここで、標的配列は、エレメント(a)～(f)の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント(b)～(f)は、内在性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同性組換えが生じる細胞染色体DNAの予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エキソンは、一般的に、制御配列の3'であり、そしてスプライドナー部位は、このエキソンの3'である。

【0237】

特定の遺伝子の配列(例えば、本明細書中で記載されるCHL2ポリペプチドの核酸配列)が公知である場合、遺伝子の選択された領域に対して相補的なDNAの部分は、合成されるか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブのDNAの適切な制限等によって得られ得る。この部分は、細胞に挿入された際に、標的配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA複製の間に生じる場合、このDNAの部分、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、Okazakiフラグメントとして作用し、そしてDNAの新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、CHL2ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的配列として使用され得る。

【0238】

CHL2ポリペプチド細胞治療(例えば、CHL2ポリペプチドを産生する細胞の移植)もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態のCHL2ポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このようなCHL2ポリペプチド産生細胞は、CHL2ポリペプチドの天然産物である

細胞であり得るか、または組換え細胞であって、そのC H L 2ポリペプチドを産生する能力が、所望のポリペプチドをコードする遺伝子またはC H L 2ポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、その発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。C H L 2ポリペプチドを投与されている患者における強力な免疫学的反応を最小化するために、異種のポリペプチドの投与と共に生じる場合、C H L 2ポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒトC H L 2ポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、C H L 2ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトC H L 2ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【0239】

移植細胞は、周辺組織の浸透を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、C H L 2ポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）の形態で患者に移植され得る。あるいは、C H L 2ポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしで、患者に直接移植され得る。

【0240】

生きた細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびそれらの患者への移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgeら（PCT公開WO95/05452およびPCT/US94/09299）は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に取り出し可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インビボで下方制御に供されないプロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、生きた細胞由来の分子のレシピエント内の特定の部位への送達を提供する。さらに、米国特許第4

, 892, 538号; 同第5, 011, 472号; および同第5, 106, 627号を参照のこと。生きた細胞をカプセル化するためのシステムは、PCT公開WO91/10425 (Aebischerら) に記載される。PCT公開を91//10470 (Aebischerら); Winnら、1991, *Exper. Neurol.* 113: 322-29; Aebischerら、1991, *Exper. Neurol.* 111: 269-75; およびTrescoら、1992, *ASAIO* 38: 17-23もまた参照のこと。

【0241】

CHL2ポリペプチドのインビボおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的または誘発性プロモーターに作動可能に連結され得るCHL2ポリペプチドをコードするCHL2遺伝子(ゲノムDNA、cDNAおよび/または合成DNAのいずれか)を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内在性CHL2遺伝子に対してホモ接合性またはヘテロ接合性であるが、ただし、これは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分としては、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されるDNA分子(例えば、相同性組換えのために有用な内在性配列)、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を越える選択的優性を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子(例えば、細胞標的化について)が挙げられる。細胞特異的内部移行、ベクターからの発現を増大する転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含む。

【0242】

遺伝子治療DNA構築物は、次いで、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して細胞に導入され得る(エキソビボまたはインビボのいずれか)。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの方法は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターの使用による。特定のベクター(例えば、レトロウイルスベクター)は、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機

能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質に残る。

【0243】

さらに他の実施形態において、制御エレメントが、標的細胞におけるCHL2遺伝子の制御された発現のために含まれ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答して刺激される。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性タンパク質）を二量化する低分子二量化剤またはラパログ（rapalog）の使用を包含する（PCT公開WO96/41865、WO97/31898およびWO97/31899を参照のこと）。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【0244】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、内在性小網における凝集タンパク質の保持を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを破壊し、その結果、このタンパク質は細胞から分泌され得る。Aridorら、2000, Science 287:816-17およびRiveraら、2000, Science 287:826-30を参照のこと。

【0245】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中で記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。Mifepristone（RU486）は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2つの転写因子のダイマーを形成することによって、転写を活性化し、次いで、核に至り、DNAに結合する。このリガンド結合ドメインは、天然のリ

グンドに結合するレセプターの能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第5,364,791号、ならびにPCT公開WO96/40911およびWO97/10337に記載される。

【0246】

さらに別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこれを活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは核に転移し、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、およびリグンド結合ドメインを含み、転写を開始する。エクジソン系はさらに、米国特許第5,514,578、およびPCT公開WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162に記載される。

【0247】

別の制御手段は、陽性テトラシクリン制御可能トランス活性化因子を使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異したtetレプレッサタンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン制御トランス活性化因子タンパク質を生じた変異したtetR-4アミノ酸の変化、すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号、および同第5,654,168号に記載される。

【0248】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号（Innovir Laboratories Inc.）に記載される。

【0249】

インビボ遺伝子治療は、CHL2ポリペプチドをコードする遺伝子を、CHL2核酸分子の局所注射によって、または適切なウイルスもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。Hefti, 19

94, *Neurobiology* 25:1418-35。例えば、CHL2ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに含まれ得る(例えば、Johnson, PCT公開WO95/34670; PCT出願PCT/US95/07178を参照のこと。組換えAAVゲノムは、典型的に、機能的プロモーターに作動可能に連結したCHL2ポリペプチドをコードするDNA配列およびポリアデニル化配列に隣接するAAV逆末端反復を含む。

【0250】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、および乳頭腫ウイルスベクターが挙げられる。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含むインビボウイルス媒介遺伝子転移系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するためにインビトロで処置されたヒト細胞の送達によって、治療タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号(アデノウイルスベクターを含む)、同第5,672,510号(レトロウイルスベクターを含む)、同第5,635,399号(サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む)に記載される。

【0251】

非ウイルス送達法としては、リポソーム媒介送達、裸のDNA送達(直接注射)、レセプター媒介送達(リガンド-DNA複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃)が挙げられるがこれらに限定されない。遺伝子治療材料および方法はまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサー-プロモーター、部位特異的組込みのために設計されたDNA配列、親細胞を越える選択的優性を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブな選択系および発現

制御系（安全性の指標）、細胞特異的結合因子（細胞ターゲティングのため）、細胞特異的内部移行因子、およびベクターならびにベクター製造の方法による発現を増大する転写因子を含み得る。遺伝子治療技術の実施のためのこのようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号（エレクトロポレーション技術を含む）、同第5,679,559号（遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する）、同第5,676,954号（リポロームキャリアを含む）、同第5,593,875号（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する）、および同第4,945,050号（生物学的に活性な粒子がある速度で細胞に噴霧され、それによりこの粒子がこの細胞の表面に浸透し、そしてこの細胞の内側に組み込まれるプロセスを記載する）、およびPCT公開WO96/40958（核リガンドを含む）に記載される。

【0252】

CHL2 遺伝子治療または細胞治療はさらに、同じか異なる細胞（単数または複数）における1つ以上のさらなるポリペプチドの送達を含み得ることもまた企図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、この細胞は、単一の移植可能デバイス（例えば、上記のカプセル化膜）に含められ得るか、あるいはこの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0253】

遺伝子治療による細胞における内在性CHL2ポリペプチドの発現を増加する手段は、CHL2ポリペプチドプロモーターに1つ以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここでエンハンサーエレメントは、CHL2遺伝子の転写活性を増加させるように働き得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することを所望する組織に基づいて選択される。エンハンサーエレメントは、組織が選択されるという点で、プロモーター活性化を与えることが知られている。例えば、CHL2ポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「オンに変わる」場合、1ckプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。従って、付加される転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、CHL2ポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターおよび/または5'お

よび/または3'隣接配列に挿入される)。「相同性組換え構築物」として公知のこの構築物は、次いで、エキソビボまたはインビボのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0254】

遺伝子治療はまた、内在性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、CHL2ポリペプチド発現を増加するために使用され得る。このような改変は、典型的に、相同性組換え方法によって達成される。例えば、不活性化のために選択されたCHL2遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーターの断片を除去および/または置換するように操作され得る。例えば、プロモーターの転写活性化因子のTATAボックスおよび/または結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、それにより対応するCHL2遺伝子の転写を阻止し得る。プロモーターにおけるTATAボックスまたは転写活性化因子結合部位の欠失は、CHL2ポリペプチドプロモーター(調節されるCHL2遺伝子と同じかまたは関連の種由来)のすべてまたは関連の部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のTATAボックスおよび/または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、および/または挿入によって変異される。結果として、TATAボックスおよび/または活性化因子結合部位は、活性を減少するか、または完全に不活性にされる。この構築物(これはまた、典型的に、改変されたプロモーターセグメントに隣接したネイティブの(内在性)5'および3'DNA配列に対応する少なくとも約500塩基のDNAを含む)は、直接または本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介してのいずれかで、適切な細胞に(エキソビボまたはインビボのいずれかで)導入され得る。典型的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組込みは、相同性組換えによってであり、ここで、このプロモーター構築物の5'および3'DNA配列は、内在性染色体DNAへのハイブリダイゼーションによって、改変プロモーター領域を一体化するのを助けるように働き得る。

【0255】

(治療的使用)

CHL2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストを使用して、本明細書中に列挙される疾患、障害または状態を含む、多くの疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防し得る。

【0256】

CHL2ポリペプチドアゴニストおよびアンタゴニストとしては、CHL2ポリペプチド活性を調節しそしてこのCHL2ポリペプチドの成熟形態の少なくとも1つの活性を増加させるかまたは減少させるかのいずれかである分子が挙げられる。アゴニストまたはアンタゴニストは、CHL2ポリペプチドと相互作用しそしてこれによってその活性を調節する補因子(例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子)であり得る。潜在的なポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストとしては、CHL2タンパク質の細胞外ドメインの一部または全てを含むCHL2ポリペプチドの可溶性形態または膜結合形態のいずれかと反応する抗体が挙げられる。CHL2ポリペプチド発現を調節する分子としては、代表的に、発現のアンチセンスレギュレーターとして作用し得る、CHL2ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。

【0257】

成体において、BMPファミリーの遺伝子産物(特に、BMP2およびBMP4)の主要な役割の1つは、骨重量の調節である。BMP1は、CHDを切断および不活性化することが示されており、そしてBMP2およびBMP3と共に骨から単離されているので(Wozneyら、1988、Science 242:1528-34; Celesteら、1990、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:9843-47)、CHL2ポリペプチドは、骨形成における重要な調節の役割を果たし得る。従って、CHL2核酸分子、ポリペプチドならびにそのアゴニストおよびアンタゴニスト(抗CHL2選択的結合因子が挙げられるが、これらに限定されない)は、骨密度に影響する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、骨線維症および骨粗しょう症が挙げられるが、これらに限定されない。骨密度に影響する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれる。

【0258】

血流を介する再生中の骨へのBMP 4または他のBMPファミリーメンバーの直接送達は、骨線維症の処置についての直結する治療的概念であるようである。しかし、BMP 4は、インビボで短い距離しか移動しないことが知られているので(Jonesら、1996、Curr. Biol. 6:1468-75)、これは、達成が困難であり得る。胚発生の中のCHDの場合、BMPとCHLIIポリペプチドとの間の複合体の形成は、BMPのさらなる移動およびBMP 4の濃度勾配の形成を生じ得る(JonesおよびSmith、1998、Dev. Biol. 194:12-17)。

【0259】

関節軟骨の表面でのCHL 2遺伝子発現の空間的に厳密な調節に基づき(ここで、軟骨損傷の最初の兆候が、変形性関節症の病原の間に検出される)、CHL 2ポリペプチドの発現レベルの変化は、変形性関節症またはリウマチ様関節炎の病原において役割を果たし得る。従って、CHL 2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストは、変形性関節症の早期の間に軟骨の線維症を予防し、変形性関節症またはリウマチ様関節炎の後期において一旦破壊された表層領域を再生し、または移植された軟骨において適切な表層領域(すなわち、表面)を生成することにおいて、有用であり得る。

【0260】

BMPポリペプチドは、後期胚発生の中の器官形成において機能することが示されている。胚性の腎臓、肺および消化管における器官形成は、BMP 4発現によって影響されることが示されている(Hogan 1996、Genes Dev. 10:1580-94)。BMP 4とCHL 2ポリペプチドとの組み合わせは、これらの組織中の前駆細胞の増殖および分化を制御し、それによってインビボでの組織再生または創傷治癒の調節を可能にするために有用であり得る。したがって、CHL 2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストは、組織再生または創傷治癒の促進において、有用であり得る。

【0261】

CHL 2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニ

ストはまた、造血幹細胞の発生および展開において使用され得る。BMP / CHL 2 ポリペプチド複合体を使用して始原造血幹細胞を調節し、そしてそれによって成体骨髄の再増殖性の幹細胞を制御することが可能であり得る。あるいは、中胚葉幹細胞由来の幹細胞の発生を制御することが可能であり得る。従って、本発明のCHL 2 ポリペプチドおよび核酸は、BMPと共に、造血幹細胞のエキソビラの展開およびこのような細胞を介して実行される遺伝子治療のために有用であり得る。

【0262】

BMP 4 は、マウスES細胞から造血前駆細胞を生成するための必須の因子である。しかし、BMP 4の有効濃度は、狭い範囲(0.5 ng/ml ~ 5 ng/ml)にあり、これは、BMPの活性濃度における差異が、全能性原外胚葉から生じる細胞型の差異に相関するという考えと一致する。ES細胞からの造血幹細胞の再現性のあるインビトロ生成のためのシステムは、まだ開示されていない。しかし、これは、BMP 4の濃度の正確な制御によって達成され得る。本発明のCHL 2核酸分子およびポリペプチドは、ES細胞からの造血幹細胞のインビトロ生成のための培養条件を最適化することにおいて有用であり得る。

【0263】

始原造血幹細胞は、マウス卵黄嚢において近年明らかにされている(Yoderら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6776-80)。この造血幹細胞の下位分類は、成体における骨髄再増殖活性を示さない。しかし、新生肝臓の環境に曝された場合、この始原幹細胞は、長期の骨髄再増殖性の幹細胞に変換される(すなわち、二次(definitive)幹細胞)。これはまた、特定の間質細胞株上で始原幹細胞を培養することによって達成され得る。培養物中のこの二次幹細胞の長期間の生存と、自然に二次幹細胞に分化する始原幹細胞の長期の維持は、いまだ確立されていない。BMPとCHL 2ポリペプチドとの間の相互作用は、二次幹細胞の調節において機能し得る。本発明の組換えCHL 2ポリペプチドおよびCHL 2抗体は、インビトロでの長期間の造血幹細胞の維持およびインビトロでの始原幹細胞からの二次幹細胞の生成のための、有用なツールであり得る。あるいは、BMP 4または推定の新規

CHL2相互作用分子は、これらのプロセスを制御するために有用であり得る。

【0264】

さらに、始原造血幹細胞は、まだ十分に特徴付けられていない。始原幹細胞は、リンパ球性の細胞型のものであり得るが、このような細胞はまた、造血細胞型および他の中胚葉子孫を生成し得る、中胚葉前駆体であり得る。この考えの支持において、成体の骨髄は、内皮前駆細胞、肝臓を再生する細胞 (Peterse nら、1999、Science 284:1168-70)、ならびに内皮細胞、筋細胞および造血細胞をインビボで誘導する能力を有する一般的な幹細胞を含むことが、近年示されている (Ferrariら、1998、Science 279:1528-30)。さらに、骨芽細胞系統 (これは、骨髄間質からなる) は、骨髄に存在する中胚葉幹細胞から誘導されることが公知である。一般的な中胚葉幹細胞が、間質細胞および造血細胞の両方の生成を担う可能性もまた、以前に推測されている。

【0265】

CHL2ポリペプチドの発現が、骨格筋において検出されたことから、CHL2ポリペプチドはまた、骨格筋の発達および機能において役割を果たし得る。従って、CHL2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストは、骨格筋に影響する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、悪液質および筋ジストロフィーが挙げられるが、これらに限定されない。骨格筋の発達および機能に関連する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれる。

【0266】

CHL2ポリペプチドの発現が、心臓において検出されたことから、CHL2ポリペプチドは、心臓の発達および機能において役割を果たし得る。従って、CHL2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストはまた、心臓に影響する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、不整脈、狭心症、高血圧、心筋梗塞および鬱血性心不全が挙げられるが、これらに限定されない。心臓に関連する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれる。

【0267】

C H L 2 ポリペプチドの発現が、胃において検出されたことから、C H L 2 ポリペプチドは、胃の発達および機能において役割を果たし得る。従って、C H L 2 核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストはまた、胃に関する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、胃癌および胃潰瘍が挙げられるが、これらに限定されない。胃に関連する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれる。

【0268】

C H L 2 ポリペプチドの発現が、肝臓において検出されたことから、C H L 2 ポリペプチドは、肝臓の発達および機能において役割を果たし得る。従って、C H L 2 核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストはまた、肝臓に関する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、肝炎および肝癌が挙げられるが、これらに限定されない。肝臓に関連する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれる。

【0269】

C H L 2 ポリペプチド機能のアゴニストまたはアンタゴニストは、その処置される状態に適切であるようなサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および/または化学療法剤の1以上と組み合わせて(同時にまたは連続的に)使用され得る。

【0270】

所望でないレベルのC H L 2 ポリペプチドによって引き起こされるかまたは媒介される他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。所望されないレベルとしては、C H L 2 ポリペプチドの過剰なレベルおよびC H L 2 ポリペプチドの正常下のレベルが挙げられる。

【0271】

(C H L 2 核酸およびポリペプチドの使用)

本発明の核酸分子(それ自体が生物学的に活性なポリペプチドをコードしない

核酸分子を含む)を使用して、染色体上に、C H L 2 遺伝子および関連する遺伝子の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術(例えば、P C R 増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション)によって行われ得る。

【0272】

C H L 2 核酸分子(それ自体が生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む)は、哺乳動物の組織または体液サンプルにおけるC H L 2 核酸分子の存在について定性的にかまたは定量的にかのいずれかで試験するための診断アッセイにおける、ハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0273】

他の方法もまた、1以上のC H L 2 ポリペプチドの活性を阻害することが所望である場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列(三重らせん構造)またはC H L 2 m R N A に対して相補的でありそしてハイブリダイズする核酸分子によって、もたらされ得る。例えば、C H L 2 遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有するアンチセンスD N A またはR N A 分子が、細胞に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるC H L 2 遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術によって設計され得る。代表的には、各々のこのようなアンチセンス分子は、各選択されたC H L 2 遺伝子の開始部位(5'末端)に相補的である。次いで、このアンチセンス分子が、対応するC H L 2 m R N A にハイブリダイズする場合に、このm R N A の翻訳が、阻止または減少される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物中のC H L 2 ポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供する。

【0274】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1以上のC H L 2 ポリペプチドのドミナントネガティブなインヒビターを作製し得る。この状況において、各々の選択されたC H L 2 ポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするD N A を調製し、そして本明細書中に記載のようなウイルス性または非ウイルス性の方法を使用して、患者の細胞に導入し得る。各々のこのような変異体は、代表的に、その生物学的役割において内在性ポリペプチドと競合するように設計される。

【0275】

さらに、C H L 2 ポリペプチド（生物学的に活性であるか否かにかかわらず）は、免疫原（つまり、このペプチドは、少なくとも1つのエピトープを含み、それに対して、抗体が惹起され得る）として使用され得る。C H L 2 ポリペプチド（本明細書中に記載されるような）に結合する、選択的な結合剤が、インビボおよびインビトロでの診断目的（体液または細胞サンプルにおけるC H L 2 ポリペプチドの存在を検出するための、標識された形態での使用が挙げられるが、これらに限定されない）に使用され得る。これらの抗体はまた、本明細書中に列挙した疾患および障害を含む、多くの疾患および障害を、予防、処置または診断するために使用され得る。これらの抗体は、C H L 2 ポリペプチドに結合し、C H L 2 ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を減少またはブロックし得るか、あるいはポリペプチドに結合して、C H L 2 ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を増加し得る（C H L 2 ポリペプチドの薬物動態を増加することによることを含む）。

【0276】

本発明のC H L 2 ポリペプチドは、発現クローニングストラテジーを使用して、C H L 2 ポリペプチドレセプターをクローニングするために使用され得る。放射性標識した（¹²⁵ヨウ素）C H L 2 ポリペプチドまたはアフィニティー/活性タグ化C H L 2 ポリペプチド（例えば、F c 融合体またはアルカリホスファターゼ融合体）が、C H L 2 ポリペプチドレセプターを発現する細胞型または細胞株または組織を同定するための結合アッセイにおいて使用され得る。このような細胞または組織から単離されたRNAを、cDNAに変換し、哺乳動物発現ベクターにクローニングし、そして哺乳動物細胞（例えば、COSまたは293細胞）にトランスフェクトして、発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射標識化またはタグ化C H L 2 ポリペプチドを、親和性リガンドとして使用して、このライブラリーから、C H L 2 ポリペプチドレセプターをその表面上で発現する細胞のサブセットを同定および単離し得る。次いで、DNAを、これらの細胞から単離しそして哺乳動物細胞にトランスフェクトして、二次発現ライブラリーを作製し得る。このライブラリーでは、C H L 2 ポリペプチドレセプターを発現する細胞の割合が、元のライブラリーにおける割合よりも、数倍高い。この富化プロ

セスは、CHL2ポリペプチドレセプターを含む単一の組換えクローンが単離されるまで、反復的に繰り返され得る。このCHL2ポリペプチドレセプターの単離は、CHL2ポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性CHL2ポリペプチドレセプター、抗CHL2ポリペプチドレセプター抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、そしてこれらは、本明細書中に記載の疾患または障害の1以上を処置、予防または診断するために使用され得る。

【0277】

本発明のマウスおよびヒトのCHL2核酸はまた、その対応する染色体CHL2ポリペプチド遺伝子を単離するための有用なツールである。例えば、CHL2配列を含むマウス染色体DNAを使用して、ノックアウトマウスを構築し得、これによって、CHL2ポリペプチドについてのインビボでの役割の試験を可能にする。ヒトCHL2ゲノムDNAを使用して、遺伝的な組織変性疾患を同定し得る。

【0278】

マウスおよびヒトCHL2ポリペプチドをコードするcDNAの寄託物はまた、pSPORT1(Gibco BRL)にサブクローニングされ、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、VA 20110-2209によって2000年3月14日に作製された受託番号PTA-1479およびPTA-1480を有する。

【0279】

以下の実施例は、例示目的のみであることが意図され、そして決して本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0280】

(実施例1：マウスCHL2ポリペプチド遺伝子のクローニング)

一般的に、Sambrookら(前出)に記載されるような材料および方法を、マウスCHL2ポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析する

ために使用した。

【0281】

マウスCHL2ポリペプチドをコードする配列を単離するために、2つのマウス胎盤cDNAライブラリーを調製した。標準的な抽出および単離技術を使用して、総RNAをマウス胎盤から抽出し、そしてポリ-A+RNAを選択した。次いで、ランダムプライムされた(random-primed)cDNAを、Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis(Gibco-BRL、Rockville、MD)を使用して、ポリ-A+RNAから合成した。生じたcDNAを、NotIで消化し、そして0.8%アガロースゲルで分画した。電気泳動された300~1000bpのcDNAを単離して、シグナルトラップベクターkFGF7中に連結し、そして1.5kbより大きいcDNAを単離して、pSPORT1中に連結した。連結反応物を、標準的な形質転換技術を使用してE.coliに導入し、これらの形質転換体をアンピシリン含有培地上で選択し、そして2つのcDNAライブラリーを作製するためにこれらの形質転換体を回収した。

【0282】

シグナルペプチド配列を含むクローンを、kFGFシグナルトラッピング技術を使用して、kFGFに基づいたライブラリーから富化した(米国特許出願番号09/026,959)。このcDNAライブラリー由来のプラスミドDNAを、各100,000コロニーの10個のプールから、標準的な技術を使用して調製した。このDNAを、リン酸カルシウムトランスフェクションによってNIH 3T3細胞中に導入し、次いで、トランスフェクトされた細胞を、0.5%ウシ胎仔血清を補充した選択培地中で14日間増殖させた。シグナルペプチド配列を有するプラスミドを含む形質転換体だけが、コロニーを生成した。これらのコロニーを、トリプシン処理によって回収し、そして、これらのコロニー由来の総RNAを、製造業者の薦めるプロトコールに従って、TRIzol試薬(Gibco-BRL)を使用して単離した。ポリ-A+RNAを、mRNA Purification Kit(Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)を使用して、この総RNAから単離した

。

【0283】

シグナルペプチド配列を含む分子を富化されたcDNAライブラリーを生成するため、第一鎖のcDNAを、SuperScript™前増幅(preamplification)システム(Gibco-BRL)を使用して、上で単離されたポリ-A+RNAから最初に調製した。この第一鎖のcDNA反応を、全体容積15µL中の1µgのポリ-A+RNAと2pmolのプライマー1605-21

【0284】

【化1】

(5'-A-A-T-C-C-G-A-T-G-C-C-C-A-

C-G-T-T-G-C-A-G-T-A-3'; 配列番号(2)

とを組み合わせ、そしてこの鋳型-プライマー混合物を70℃で10分間加熱することによって実行した。この鋳型-プライマー混合物を、50℃に移し、そして2.5µLの10×緩衝液、2.5µLの25mM MgCl₂、1.3µLの10mM dNTPおよび2.5µLの0.1Mのジチオスレイトールを含む反応前混合物(premixture)を添加した。次いで、逆転写酵素(250U)を添加し、そしてこの反応物を50℃で1時間インキュベートした。第一鎖cDNA反応を、70℃で15分間加熱することによって停止させ、そして2UのRNase Hによって37℃で20分間処理することによってRNAを消化した。

【0285】

第一鎖cDNA合成に続いて、100µLの容積中に各々0.5µMの最終濃度で2µLの第一鎖cDNA、プライマー1239-08

【0286】

【化2】

(5'-A-A-A-A-T-C-T-T-A-G-A-C-C-G-A-C-G-A-C-
T-G-T-G-T-T-T-3'; 配列番号13)

および1605-22

【0287】

【化3】

(5'-C-G-T-A-A-A-A-G-A-T-
C-C-T-G-C-G-C-T-A-G-A-T-G-C-G-3'; 配列番号14)

を含み、200 μMのdNTP、および2.5 UのPfuポリメラーゼ (PE Biosystems、Norwalk、CT) を含む反応物において、二本鎖cDNAを、PCR増幅によって生成した。このPCR反応を、95 °Cで1分間を1サイクル; 95 °Cで30秒間、66 °Cで45秒間、および72 °Cで2分間を30サイクル; そして72 °Cで10分間を1サイクルで実行した。増幅産物を、Not IおよびSal Iで消化し、そしてkFGF7中に連結した。この連結反応物を、標準的な形質転換技術を使用してE. coliに導入して、シグナルが富化されたcDNAライブラリーを生成した。プラスミドDNAを、400個の選択されたクローンから調製し、配列決定によって分析した。

【0288】

1つのクローン (ymkz5-00011-c10と名付けた) の配列が、Xenopus (GenBank登録番号Q91713) 由来のコルディン (chordin) 前駆体と有意な相同性を共有することが見出された。この同定されたクローンは、マウスCHL2のN末端の115アミノ酸をコードする418 bpの挿入を含むことが見出された。全長のcDNAクローンを、ymkz5-00011-c10クローンをプローブとして使用して、pSPORT1中にクローニングされたcDNAライブラリーから単離した。

【0289】

pSPORT1ライブラリーをスクリーニングするため、 1×10^6 クローンを、1プレート当たり約 5×10^4 クローンで150mmプレートにプレートし、次いで、これらのクローンをプレートからニトロセルロース膜上に乗せた。フィルターを、68 で30分間、ExpressHybハイブリダーゼーション溶液(Clontech)中でプレハイブリダイズし、次いで、 ^{32}P -dCTP標識されたプローブを含む同じハイブリダーゼーション溶液中で68 で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたフィルターを、 $2 \times \text{SSC}$ および0.1%SDS中で、室温で10分間、2回洗浄し、そして $0.1 \times \text{SSC}$ および0.1%SDS中で65 で30分間、2回洗浄した。洗浄後、フィルターを、強化されたスクリーンの存在下で、-80 で一晩オートラジオグラフィーに供した。陽性クローンを、再びスクリーニングした。二次スクリーニングに従って、2つの陽性クローンを同定し、そしてこれら2つのクローン由来のDNAを、単離し、そして配列決定した。1つのクローン(pSPORTmCHL2と名付けた)は、約1.8kbの挿入を含み、これは、完全なマウスCHL2ポリペプチドをコードした。

【0290】

マウスCHL2ポリペプチドについての全長cDNAの配列分析は、この遺伝子が426アミノ酸のタンパク質をコードする1278bpのオープンリーディングフレームを含む遺伝子であることを示した。図1A~1Cは、マウスCHL2遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)およびマウスCHL2ポリペプチドの予測されたアミノ酸配列(配列番号2)を例示する。図1Aにおいて、von Heijneアルゴリズムによって予測されたシグナルペプチド配列に、下線を付す。

【0291】

マウスCHL2アミノ酸配列のコンピューター分析は、このポリペプチドが、CHL(CHL1)ポリペプチドおよびCHLd5ポリペプチド(同時係属中かつ共有に係る米国特許出願番号09/724,915)のように、3つのプロコラーゲンリピート(CRモチーフ)を有することを示した(対照的に、CHDにおいては4つのリピートが観察される)(図5)。CHL2のアミノ酸配列は、

マウスのコルディンと24.4%の同一性を共有する(またはGAP調査では28%の同一性を共有する)ことが見出された。図2は、マウスCHL2ポリペプチド(マウスCHL2;配列番号2)とマウスコルディン(Af069501;配列番号7)のアミノ酸配列のアラインメントを例示する。マウスCHL2ポリペプチドのアミノ酸配列はまた、CHL1と50%の同一性を共有し、そしてBMPおよびSOGと構造的類似性を共有し、この類似性は特にCRドメインにおいて高い。CelerahitゲノムデータベースのBLAST調査は、CHL2遺伝子が、CHL1遺伝子と最大の同一性を共有することを示した。これらの結果は、CHL2遺伝子がCHD/SOG遺伝子ファミリーの新規メンバーであることを示唆する。

【0292】

(実施例2:ヒトCHLポリペプチド遺伝子のクローニング)

一般的に、Sambrookら(前出)に記載されるような材料および方法を、ヒトCHL2ポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析するために使用した。

【0293】

ヒトCHL2ポリペプチドをコードする配列を単離するために、ヒト胎盤cDNAライブラリーを調製した。標準的な抽出および単離技術を使用して、総RNAをヒト胎盤から抽出し、そしてポリ-A+RNAを選択した。次いで、オリゴd(T)プライムされた(Origod(T)-primed)cDNAを、Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis(Gibco-BRL)を使用してポリ-A+RNAから合成した。生じたcDNAを、NotIで消化し、そして0.8%アガロースゲルで分画した。電気泳動された1.5kbより大きいcDNAを単離し、pSPORT1中に連結した。連結反応物を、標準的な形質転換技術を使用してE.coliに導入し、これらの形質転換体をアンピシリン含有培地上で選択し、そしてこれらの形質転換体をヒト胎盤cDNAライブラリーを作製するために回収した。

【0294】

³²P - d C T P 標識されたマウス C H L 2 c D N A フラグメントを使用して、ヒト胎盤 c D N A ライブラリーをスクリーニングした。プラスミド D N A を、各 1 0 0 , 0 0 0 クローンの 1 2 個のプールから単離し、各プール由来の 1 μ g のプラスミド D N A を、N o t I および S a l I で消化して、0 . 8 % のアガロースゲルで電気泳動し、次いで、ニトロセルロース膜に転移させた。フィルターを、6 0 ° で 3 0 分間、E x p r e s s H y b ハイブリダーゼーション溶液 (C l o n t e c h) 中でプレハイブリダイズし、次いで、マウス C H L 2 c D N A プローブを含む同じハイブリダーゼーション溶液中で 6 0 ° で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたフィルターを、2 × S S C および 0 . 1 % S D S 中で、室温で 1 0 分間、2 回洗浄し、そして 0 . 5 × S S C および 0 . 1 % S D S 中で 6 0 ° で 3 0 分間、2 回洗浄した。洗浄後、フィルターを、強化されたスクリーンの存在下で、- 8 0 ° で一晩オートラジオグラフィーに供した。陽性 c D N A フラグメントを、1 2 個のプラスミドプールのうち 2 個において同定した。

【 0 2 9 5 】

ヒト C H L 2 ポリペプチドをコードする配列を含む個々のクローンを、1 5 0 mm プレートに各プール由来の 3 × 1 0 ⁵ のクローンを 1 プレート当たり約 5 × 1 0 ⁴ でプレートすることによって、上で同定した 2 個のプラスミドプールから単離した。次いで、これらのクローンを、プレートからニトロセルロースフィルター上に乗せ、そしてこのフィルターを、上記のように分析した。2 つの陽性クローンを同定し、そして各々を配列決定分析に供した。1 つのクローン (p S P O R T h C H L 2 と名付けた) は、完全なヒト C H L 2 ポリペプチドをコードする、約 1 . 5 k b の挿入を含んだ。

【 0 2 9 6 】

ヒト C H L 2 ポリペプチドの全長 c D N A の配列分析によって、この遺伝子が、4 2 9 アミノ酸のタンパク質をコードする 1 2 8 7 b p のオープンリーディングフレームを含むことが示された。図 3 A ~ 3 C は、ヒト C H L 2 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号 4) およびヒト C H L 2 ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号 5) を図示する。C H L 2 のアミノ酸配列は、ヒトコルディンと 2

6.7%の同一性を共有することが発見された。図4は、ヒトVHL2ポリペプチドのアミノ酸配列アラインメント(ヒトCHL2;配列番号5)およびヒトコルディン(Af076612;配列番号8)を図示する。

【0297】

(実施例3:CHL2 mRNA発現)

複数のヒト組織ノーザンブロットまたはマウス組織ノーザンブロット(Clontech)を、それぞれ、 ^{32}P -dCTP標識したヒトまたはマウスのCHL2 cDNAフラグメントを用いてプローブした。ノーザンブロットを、Express Hybridization溶液(Clontech)中で30分間、68°Cでプレハイブリダイズし、次いで、標識プローブを添加した同じ溶液中で、一晩、68°Cでハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、フィルターを、 $2\times\text{SSC}$ および0.1% SDS中、10分間室温で2回、 $0.1\times\text{SSC}$ および0.1% SDS中、30分間68°Cで2回洗浄した。洗浄後、このブロットを、増感スクリーンの存在下で、80°Cで72時間、オードラジオグラフィに供した。

【0298】

ヒト組織ブロットのノーザンブロット分析は、前立腺、精巣、子宮(非常に豊富な発現)、結腸、小腸、心臓、骨格筋および平滑筋において、約2 kbの優勢なCHL2転写物を表した。弱い発現が、気管、胎盤および骨髄で検出され、そして非常に弱い発現が肝臓で検出された。マウス組織ブロットのノーザンブロット分析は、肝臓および腎臓において、約1.8 kbの優勢なCHL2転写物を表した。非常に弱い発現が心臓で検出された。約2 kbの転写物の弱い発現が、精巣および骨格筋で検出された。マウスの胃の組織においてCHL2の発現は分析されなかった。非常に弱い発現が、7日、11日、15日および17日目の胚のマウス胚組織において検出された。

【0299】

ノーザンブロット分析によって、CHD/SOGとCHL2ポリペプチドとの間の関係が強化される。CHD/SOGは、E7胚で比較的高レベルで発現され、より低いレベルでE11、E15およびE17胚で発現される(Pappan

ら、1998、Genomics 52:236-39)。CHL2 mRNAは、E7、E11、E15およびE17胚において同様に検出されたが、CHD/SOG転写物よりも低いレベルであった。CHD/SOG発現は、脾臓、肝臓、および腎臓で検出された(Pappanoら、1998)。CHL2 mRNAは、肝臓および腎臓で同様に検出された。発現パターンにおける類似性は、構造における類似性と組み合わせて、CHL2およびCHD/SOGが、類似の生物学的活性を有すること、ただしこれらのタンパク質は、異なる発生段階で機能し得ることを示唆する。

【0300】

CHL2 mRNAの発現は、インサイチュハイブリダイゼーションによって局在化された。胚および成体マウス組織の切片に対するインサイチュハイブリダイゼーションを、記載(Wilcox, 1993, J. Histochem. Cytochem. 41:1725~33)されるように、実施した。マウスCHL2プローブを、最初にpSPORTmCHL2から1.2kbのNcoI-SacIフラグメントを除去することによって調製して、pSPmCHL2OOHを生成し、これを次いでEcoRIで直線化した。さらに、HindIIIフラグメントを取り出して、pSPmCHL2NH2を得た。アンチセンスRNAをSP6 RNAポリメラーゼを用いて合成した。これらのプラスミドから合成したRNAは、非重複配列を含んだ。

【0301】

インサイチュハイブリダイゼーション分析によって、CHL2 mRNA発現が、マウスにおいて約12.5日目の胚で胸骨において開始され、そして成体の関節軟骨の限定された領域に存続することが明らかになった。CHL2 mRNA発現は、10.5日目の胚で試験した切片では検出されなかった。13.5日の胚において、強力なCHL2 mRNA発現が、四肢の骨(図6および7)および胸骨における軟骨細胞にわたって、ならびに発達中の関節に隣接する軟骨周囲間葉細胞において検出された。強力だが非常に限定されたCHL2 mRNA発現が、椎骨および長骨の骨端軟骨の発達中の関節軟骨内の表面的領域の軟骨細胞でも検出された(図6~8)。18.5日の胚まで、および成人期まで、CH

L2 mRNAの骨格発現は、関節軟骨における表皮的領域の軟骨細胞の単層に限定されていた。骨端の成長板は、マウス発生のいずれの時点でもCHL2 mRNA発現を示さなかった。

【0302】

非軟骨性組織のなかでは、有意なCHL2 mRNA発現が、雌性マウスの卵巣、卵管および子宮で、ならびに雄性マウスの精巣、精巣上体および可能性として他の付属腺（例えば、精嚢、凝固腺、および前立腺）で観察された。子宮壁で観察された強力なシグナルは、子宮で検出されたCHL1 mRNA発現にある程度類似していた。CHL2 mRNAの弱い発現がまた、結腸表面で検出された。しかし、結腸におけるCHL2発現の位置は、CHL1の位置とは明白に異なっており、ここでCHL2 mRNAは、粘膜下と粘膜を分ける線維芽細胞/結合組織において検出された（Nakayamaら、2001）。CHL1遺伝子と対照的に、CHL2 mRNA発現は、胃または小腸では検出されなかった。従って、軟骨組織のなかでも、CHL2遺伝子は、生殖器官において特に発現された。

【0303】

（実施例4：マウスCHL2ポリペプチド遺伝子の染色体マッピング）

蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）分析を使用して、マウスCHL2遺伝子の染色体局在化を決定する（Shira、1997、Genomics 45:42-47）。FISHプローブを、標準技術およびマウスCHL2遺伝子の5'非翻訳領域に対応するプライマー（5'-TCCTCTCATCCTCACCTTAG-3'；配列番号15および5'-GGAGAAAGTGAGATAAGGACAC-3'；配列番号16）を使用するPCRによって、マウスES-129/SvJ II BAC染色体DNAライブラリー（Genome Systems）から単離したBACクローン（F1067）から調製した。マウスCHL2遺伝子は、同時ハイブリダイゼーションプローブとして第7染色体セントロメア特異的P1クローンを用いて、第7染色体に局在した（Shira、1997）。全部で80個の分裂中期細胞を分析し、そして特定の標識を示した77個のうち10個の細胞を同時ハイブリダイゼーション実験のた

めに使用した。結果として、CHL2遺伝子は、第7染色体のテロメアに対する異質染色質 - 真性染色質境界から66%の距離である位置(バンド7E2 - E3に対応する領域)に局在した。従って、CHL2遺伝子は、CHL1遺伝子とは異なり、すなわち、CHL2遺伝子は常染色体である。

【0304】

(実施例5: CHL2ポリペプチドの生成)

(A. 細菌におけるCHL2ポリペプチドの発現)

PCRを用いて、CHL2ポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。このPCRには、この配列の5'および3'末端に対応するプライマーを用いる。増幅したDNA産物を制限酵素部位を含むように改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするようにし得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的組み換えDNA方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。luxプロモーターおよびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含むpAMG21(ATCC番号98113)のような代表的ベクターを、挿入したDNAの方向性クローニングのために、BamHIおよびNdeIを用いて消化する。連結した混合物を、エレクトロポレーションによってE. coli宿主株中に形質転換し、そして形質転換体をカナマイシン耐性について選択する。選択したコロニー由来のプラスミドDNAを、単離し、そしてDNA配列決定に供してインサート(挿入物)の存在を確認する。

【0305】

形質転換した宿主細胞を、導入前に、30 µg/mL カナマイシンを含有する2 × YT培地中で30°Cでインキュベートする。最終濃度30 ng/mLへのN-(3-オキソヘキサノイル)-d,l-ホモセリンラク톤の添加、それに続く30°Cまたは37°Cでの6時間のインキュベーションによって、遺伝子発現を誘導する。CHL2ポリペプチドの発現を、培養物、細菌ペレットの再懸濁および溶解物の遠心分離、ならびに、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価する。

【0306】

CHL2ポリペプチドを含有する封入体を、以下の通り精製する。細菌細胞を

遠心分離によってペレット化し、そして水中に再懸濁する。この細胞懸濁液を超音波処理によって溶解し、そして $195,000 \times g$ での5～10分間の遠心分離によってペレット化する。この上清を廃棄し、そしてペレットを洗浄してホモジナイザーに移す。このペレットを、均一に懸濁されるまで、5mLのPercoll溶液(75%液体Percollおよび0.15M NaCl)中にホモジナイズし、次いで希釈して $21,600 \times g$ で30分間遠心分離する。封入体を含む勾配画分を回収してプールする。単離した封入体をSDS-PAGEによって分析する。

【0307】

E. coliが産生したCHL2ポリペプチドに相当する、SDSポリアクリルアミドゲル上の単一のバンドを、ゲルから切り出し、そしてN末端アミノ酸配列を、本質的にMatsudairaら、1987, J. Biol. Chem. 262:10～35に記載のように決定する。

【0308】

(B. CHL2ポリペプチド哺乳動物発現ベクターの構築)

マウスCHL2は、pSR-mCHL2ベクターを用いて一過性に発現したが、このベクターは以下のように調製した。CHL2ポリペプチドのオープンリーディングフレームを、標準的技術、ならびにプライマー2360～40(5'-GCTATCTAGAGCCACCATGGTTCCCGGGGTGAGGATCATC-3'; 配列番号17)および2360-41(5'-GCTAGTCGACCTATAATGTCTTGGTCACTTTGTCTG-3'; 配列番号18)を使用するPCRによってまず増幅した。増幅されたPCR産物をXbaIおよびSalIを用いて消化し、次いで、SR-ベースの発現プラスミド(Takebeら、1988、Mol. Cell. Biol. 8:466～72)中に挿入して、pSR-mCHL2を生成した。

【0309】

FLAGタグマウスCHL2ポリペプチド発現構築物を以下のように調製した。全長マウスCHL2 DNAフラグメント(ここで終止コドンがSalI部位で置換されている)を、テンプレートとして全長マウスcDNAクローンなら

びにプライマー5' - GCTAGCGGCCGCGCCACCATGGTTCCCGGGGTGAGGATCATC - 3' ; 配列番号19) および5' - GCTAGTCGACTAATGTCTTGGTCACTTTGTCTGGGC - 3' ; 配列番号20) を使用して、PCRによって得た。増幅されたPCR産物をNotIおよびSalIを用いて消化し、次いで、pFLAG-CMV-5a発現ベクター(Sigma)に、そのカルボキシ末端でCHL2配列とインフレームで結合されたFLAG配列とともに挿入した。得られたmCHL2-FLAG発現プラスミドをpFLAGmCHL2と名づけた。

【0310】

mCHL2-FLAGポリペプチドの発現を、5% (w/v) の脱脂粉乳(Trader Joe's, Thousand Oaks CA)を、3% (w/v) ウシ血清アルブミンの代わりに用いた以外は、製造業者の推奨に従って、10 µg/mlの抗FLAGマウスモノクローナル抗体、M2(Sigma)を使用して、直接ウエスタンブロットによって検出した。マウスCHL2に対するウサギポリクローナル抗体を、HarlowおよびLane、Using Antibodies: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)に記載のように、カルボキシ末端配列CPEDEAEDDHSEVISTR(配列番号21)に基づく合成ペプチドを用いて惹起した。得られた抗血清を、直接用いるか、または対応するペプチドを用いるアフィニティー(親和性)精製に供した。

【0311】

mCHL2-FLAGを安定して発現し得るクローンを生成するために、直鎖状のpFLAGmCHL2を用いて、293細胞をトランスフェクトした。安定な形質転換体を選択し、そして無血清順化培地および細胞溶解物の両方における対応するFLAGタグ化タンパク質の発現レベルを、ウエスタンブロット分析によって比較した(Nakayamaら、2001, Dev. Biol. 印刷中)。順化培地をウエスタンブロットの前に濃縮し、次いでこのタンパク質を可視化した。一過性形質転換に基づく発現を、293T細胞を用いて実行した。そして10倍に濃縮した順化培地を上記のように分析した。

【0312】

中規模の調製のために、安定なクローンをCL 1000フラスコ(Integra Biosciences, Ijamsville, MD)において、293 SFM II無血清培地中で培養し、そして順化培地を2~3日ごとに回収した。約3~4 µg/mlの発現レベルを得た。FLAGタグ化タンパク質を高塩条件下(Piccoloら、1997, Cell 91:407~16)で抗FLAG M2アフィニティーゲル(Sigma)を用いて、単一工程のアフィニティークロマトグラフィーによって500mlの収集した上清から精製した。各調製物のタンパク質濃度を、M2を用いたウエスタンブロット分析によって決定し、そしてFLAG細菌アルカリフォスファターゼ標準(Sigma)と比較した。

【0313】

(実施例6:抗CHL2ポリペプチド抗体の生成)

CHL2ポリペプチドに対する抗体を、生物学的合成または化学的合成によって生成した、精製タンパク質またはCHL2ペプチドを用いて免疫することによって獲得し得る。抗体を生成するための適切な手順は、HudsonおよびBay、Practical Immunology(第二版、Blackwell Scientific Publication)に記載の手順を含む。

【0314】

抗体生成のための1つの手順において、動物(代表的には、マウスまたはウサギ)に、CHL2抗原(例えば、CHL2ポリペプチド)を注射し、そして、ハイブリドーマ産生のため、ELISAによって決定した十分な血清力価を有する動物を、選択する。免疫した動物の脾臓を回収し、そして単一細胞懸濁液として調製し、これから脾臓細胞を回収する。脾臓細胞をマウスミエローマ細胞(例えば、Sp2/0-Ag14細胞)に融合し、DMEM(200U/mlペニシリン、200 µg/ml硫酸ストレプトマイシン、および4mMグルタミン含有)中でまずインキュベートし、次いで、HAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)中でインキュベートする。選択後、組織培養上清を各融合ウェルから取り出し、そしてELISAによって、抗CHL2抗体産生につ

いて試験する。

【0315】

抗CHL2抗体を得るため、別の手順をまた、使用し得る。この手順は例えば、ヒト抗体の生成のためのヒトIg遺伝子座を保有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリー（例えば、抗体可変ドメインの変異誘発によって生成されるライブラリーなど）のスクリーニングである。

【0316】

（実施例7：Xenopus胚におけるマウスCHL2の生物学的活性）

コルディンは、BMP4の活性を阻害することによって原腸形成しているXenopus胚を背方化することが公知である。Xenopus胚の発達に対するCHL2の効果を以下のとおり試験した。pSPORTmCHL2のEcoRI-NotIフラグメントを、最初に、pCS2+（Ruppら、1994、Genes Dev. 8:1311~23）にクローニングし、NotIを用いて直鎖化し、そしてキャッピングしたmRNAを、SP6ポリメラーゼで合成して、定量した（Nishinakamuraら、1999、Dev. Biol. 216:481~90）。このpSPORTmCHL2プラスミドをまた、NotIで直鎖化し、T7ポリメラーゼで転写した。両方の構築物は、二次的軸形成を誘導した。陰性コントロールとして、伸長因子1（EF1）RNAを合成した。

【0317】

各RNAサンプルを4細胞期のXenopus胚の2つの腹側割球に注射した。注入後、胚を10% Steinberg溶液中で48時間培養し、そして胚を異所性軸についてスコア付けした（Nishinakamuraら、1999；図9）。割球に1pgのマウスCHL2 RNAを注射した場合、軸複製速度は、77~87%にわたったが、一方注射していないコントロール胚およびEF1 RNA注射胚での速度は0%であった。陽性コントロールとして、マウスCHL1 RNAを用いた実験も実施した。これらの実験では、10~30pgのCHL1 RNAを用いた場合、83%の軸複製速度が得られた。従って、マウスCHL2 RNAは、内因性の腹方化因子（おそらく、BMP4）に拮抗（ア

ンタゴナイズ)する活性がある。

【0318】

(実施例8：マウスCHL2ポリペプチドによるBMP4作用の阻害)

コルディン-CHL1複合体の形成は、BMP4機能を阻害することが公知である。CHL2ポリペプチドについて観察された類似の軸複製活性(実施例7)によって、CHL2ポリペプチドがまたBMP4作用を直接阻害したことが示唆された。CD34⁺/CD31^{hi}リンパ球造血性前駆細胞、CD34⁺/CD31^{lo}赤血球-骨髄前駆細胞、およびCD45⁺骨髄単球性細胞は、マウス胚性幹細胞(ES)細胞の分化の間の0.15~2ng/mlのBMP4の存在に依存することが示されている(Nakayamaら、2000, Blood 95:2275:83)。

【0319】

CHL2ポリペプチドがBMP4の活性を阻害する能力を、以下のように直接試験した。Rosa26 ES細胞をフィブロネクチンコーティングプレートに移し、無血清培地で2日間調節し、次いで0.9ng/mlのBMP4の存在下で、無血清メチルセルロース培地中で分化させた(Nakayamaら、2000)。0.9ng/mlのBMP4濃度が、ほぼ最大のレベルを生じた。胚様体(EB)を7日目に回収して、コレゲナーゼで分離させた。この細胞を、CD31およびCD34のような造血性前駆細胞マーカーのモノクローナル抗体で染色した。そして染色したサンプルをFACSscan(Becton Dickinson, San Jose, CA)で分析した。

【0320】

アフィニティー精製したmCHL2-FLAGを100ng/ml以上加えた場合、CD34⁺/CD31⁺細胞集団およびCD34⁺/CD31⁺細胞集団は、バックグラウンドのレベル(すなわち、BMP4なしで達成されたレベル; 図10を参照のこと)まで減少した。これらの結果は、FLAGタグ化mCHL2タンパク質がインビトロにおいてBMP4の作用を阻害できたことを示唆する。

【0321】

(実施例9：BMP2作用およびBMP4作用のマウスCHL2ポリペプチドによる阻害)

BMP2およびBMP4の両方ともC2C12筋芽細胞においてアルカリホスファターゼ発現を誘導することが公知である。BMP2作用およびBMP4作用のCHL2ポリペプチド阻害は、C2C12アルカリホスファターゼアッセイにおいて実証された。

【0322】

前筋芽細胞株C2C12(ATCC登録番号CRL-1722)を、10%ウシ胎仔血清(FBS)および抗生物質を含有するDMEM中で、37℃で5%CO₂の湿潤雰囲気において維持した。レセプター感度は、非常に継代された細胞では減少し得るので、10~15回継代したら細胞を破棄した。C2C12細胞を、100μlのDMEM(2%ウシ血清および抗生物質を含有する)を含む、96ウェルマイクロタイタープレート中に、3×10⁴細胞/ウェルの密度で、プレートした。過剰な乾燥を回避するため、マイクロタイタープレートの最も外側のウェルには200μlのDMEMのみを充填した。次いで細胞を37℃で5%CO₂の湿潤雰囲気において一晩インキュベートした。

【0323】

プレート後、C2C12細胞を、909ng/ml(35nM)BMP2または566ng/ml(22nM)BMP4のいずれかの存在下で、マウスCHL2-FLAGの階段希釈(1.47、2.93、5.9、11.7、23.4、46.9、93.8、187.5、375、750、および1500ng/ml)に曝露した。次いで細胞を37℃で5%CO₂の湿潤雰囲気において3日間インキュベートした。インキュベーション後、培地を除去し、この細胞を0.1M Tris、pH7.4を用いてリンスし、そして150μlのグリシン緩衝液(0.1Mグリシン、1mM MgCl₂、pH10.5)(0.1%IGEPAL CA-630(Sigma)含有)をウェルに添加した。次いで、この細胞を-80℃で凍結して、融解し、50μlの細胞上清をBradfordタンパク質アッセイにおける使用のために取り出し、そして100μlのリン酸p-ニトロフェニル二ナトリウム(Sigma;グリシン緩衝液中で4mg/mlに

希釈)を残りの細胞上清に添加した。この混合物を、37℃で30分間インキュベートし、そして50 μ lの0.5N NaOHを加えて反応を停止した。次いで、このプレートを405~410nmで読み取った。CHL2-FLAGは、用量依存性の様式でBMP2およびBMP4の両方を阻害することが見出された(図11)。

【0324】

(実施例10: CHL2ポリペプチドとBMPとの直接的相互作用)

マウスCHL1ポリペプチドとヒトBMP4、BMP5、BMP6およびTGF β 2との直接的相互作用は以前に実証されている(Nakayamaら、2001)。mCHL2-FLAGタンパク質を600ng/mlで用いた以外は、同様の免疫沈降実験を、マウスCHL2ポリペプチドを用いて行った。mCHL2-FLAGタンパク質は、BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、GDF5(BMP14)またはアクチビンAを用いて同時免疫沈降することが見出された(図12)。しかし、高濃度のBMP5は、mCHL2-FLAGと検出可能なレベルの相互作用を示すことが必要であった。CHL2は、他のBMPとよりもBMP5との親和性が弱いようであった。mCHL1と同様、アクチビンA(別のTGF β スーパーファミリーメンバー)は、いずれの設定された条件でもCHL2と相互作用の兆候を示さなかった。しかし、マウスCHL1と比べて、TGF β 相互作用は、全く観察されなかった。BMP2およびBMP4は、BMP5、BMP6およびBMP7から別々のサブファミリーを形成する(Celesteら、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 9843~47)。従って、CHL1ポリペプチドおよびCHL2ポリペプチドの両方とも、全てのBMPに結合するタンパク質(pan-BMP binding protein)であり得る。

【0325】

(実施例11: トランスジェニックマウスにおけるCHL2ポリペプチドの発現)

CHL2ポリペプチドの生物学的活性を評価するため、肝臓特異的ApoEプロモーターの制御下で、CHL2ポリペプチド/Fc融合タンパク質をコードす

る構築物を調製する。この構築物の送達により、CHL2ポリペプチドの機能に関して参考となる、病理的变化を生じることが期待される。同様に、アクチンプロモーターの制御下で、全長CHL2ポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達により、遍在性発現を生じることが期待される。

【0326】

これらの構築物を生成するために、PCRを用いて、CHL2ポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。このPCRには、所望の配列の5'末端および3'末端に対応するプライマーを用いる。そしてこのプライマーは、発現ベクター内への増幅産物の挿入を可能にする制限酵素部位を組み込む。増幅後、PCR産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的組み換えDNA技術を用いて発現ベクター中に連結する。例えば、増幅したCHL2ポリペプチド配列を、Grahamら、1997、Nature Genetics, 17: 272~74およびRayら、1991 Genes Dev. 5: 2265~73に記載のように、ヒトアクチンプロモーターの制御下で発現ベクター中にクローニングし得る。

【0327】

連結後、反応混合物を用いて、E. coli 宿主株をエレクトロポレーションによって形質転換し、そして形質転換体を、薬物耐性で選択する。選択したコロニー由来のプラスミドDNAを単離して、DNA配列決定に供し、適切なインサートが存在することおよび変異が存在しないことを確認する。CHL2ポリペプチド発現ベクターを、2回のCsCl密度勾配遠心分離を通じて精製し、適切な制限酵素で切断し、そして、CHL2ポリペプチド導入遺伝子を含有する直鎖化フラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。精製したフラグメントを、5 mM Tris (pH 7.4) および0.2 mM EDTA中で、2 mg/mLの濃度で、再懸濁する。

【0328】

BDF1 × BDF1 交配マウス由来の単一細胞胚に、記載 (PCT 公開番号 WO 97/23614) のように注射する。胚を、CO₂ インキュベーター中で一晩培養し、そして15~20の2細胞胚を偽妊娠CD1 雌性マウスの卵管に移す

。マイクロインジェクションした胚の着床から得た子孫を、以下のように、ゲノムDNAサンプル中に取り込んだ導入遺伝子のPCR増幅でスクリーニングする。耳切片を20mLの耳緩衝液(20mM Tris, pH8.0, 10mM EDTA, 0.5% SDS、および500mg/mL プロテイナーゼK)中で、55℃で一晩消化する。次いで、このサンプルを200mLのTEで希釈し、そして2mLの耳サンプルを、適切なプライマーを用いるPCR反応中で用いる。

【0329】

8週齢で、トランスジェニック創始動物およびコントロール動物を、剖検および病理分析のため、屠殺する。脾臓の一部を取り出し、そしてTotal RNA Extraction Kit(Qiagen)を用いて、脾臓から、総細胞RNAを単離し、そして導入遺伝子発現を、RT-PCRによって決定する。脾臓から回収したRNAを、以下のように、SuperScript™ Pre amplification System(Gibco-BRL)を用いてcDNAに変換する。適切なプライマー(発現ベクター配列に位置し、そしてCHL2ポリペプチド導入遺伝子の3'側である)を用いて、導入遺伝子転写物からのcDNA合成をプライムする。トランスジェニック創始動物およびコントロール由来の10mgの総脾臓RNAを、1mMのプライマーとともに、10分間70℃でインキュベートし、そして氷上に置く。次いで、反応物に、10mM Tris-HCl、pH8.3、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、10mMの各dNTP、0.1mM DTT、および200UのSuperScript II逆転写酵素を補充する。42℃で50分間のインキュベーション後、72℃で15分間加熱することによって反応を停止し、2UのRNase Hを用いて20分間37℃で消化する。次いで、サンプルをCHL2ポリペプチドに特異的なプライマーを用いるPCRによって増幅する。

【0330】

(実施例12:トランスジェニックマウスにおけるCHL2ポリペプチドの生物学的活性)

安楽死の前に、トランスジェニック動物を計量し、イソフルランによって麻酔

し、そして心臓穿刺によって採血する。サンプルを、血液学分析および血清化学分析に供する。X線撮影を、最終的な放血後に行う。肉眼での解剖の際に、主な内臓器官を、重量分析に供する。

【0331】

肉眼での解剖後、組織（すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節および骨格筋）を取出し、そして10%緩衝化Zn-ホルマリン中で組織学的検査のために固定する。固定後、組織をパラフィンブロック中で処理し、そして3mmの切片を得る。全ての切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、次いで組織学的分析に供する。

【0332】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節およびパイアー斑を、以下の通りにB細胞特異的抗体およびT細胞特異的抗体についての免疫組織学的分析に供する。ホルマリンで固定したパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し、そして脱イオン水中で水和する。切片を3%過酸化水素でクエンチし、Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA) でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウスB220およびCD3 (Harlan, Indianapolis, IN) 中でインキュベートする。抗体結合を、色素原 (chromagen) としてDAB (BioTek, Santa Barbara, CA) を用いて、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンおよびペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン (BioGenex, San Ramon, CA) によって検出する。切片を、ヘマトキシリンで対比染色する。

【0333】

剖検後、トランスジェニック動物およびコントロールの同腹仔由来の脾臓および胸腺のMLNおよび切片を取出す。シリンジの平らな末端を用いて100mmナイロン性細胞ストレーナー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) の底に対してこの組織を穏やかに粉砕することによって単細胞懸濁物を調製する。細胞を2回洗浄し、計数し、次いで各組織由来の

約 1×10^6 細胞を、 $20 \mu\text{L}$ 容量において $0.5 \mu\text{g}$ CD16/32 (Fc III/II) Fc ブロックで10分間インキュベートする。次いで、サンプルを、FITCまたはPEに結合体化した、CD90.2 (Thy-1.2)、CD45R (B220)、CD11b (Mac-1)、Gr-1、CD4またはCD8に対するモノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA) の $0.5 \mu\text{g}$ 抗体を有する、 $100 \mu\text{L}$ 容量のPBS (Ca^+ および Mg^+ を欠く)、 0.1% ウシ血清アルブミンおよび 0.01% アジ化ナトリウム中で2~8で30分間染色する。抗体結合後、細胞を洗浄し、次いでFACSscan (Becton Dickinson) でのフローサイトメトリーによって分析する。

【0334】

本発明を好ましい実施形態に関して記載してきたが、改変および修飾が当業者に思い浮かぶことが理解される。それゆえ、添付の特許請求の範囲が、本願発明の範囲内に入る全てのこのような均等な改変物を包含することが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A~1Cは、マウスCHL2遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号1) およびマウスCHL2ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号2) を示す。予測されたシグナル配列を示す (下線)。

【図2】

図2は、マウスCHL2ポリペプチド (マウスCHL2; 配列番号2) とマウスコルディン (Af069501; 配列番号7) のアミノ酸配列整列を示す。

【図3】

図3A~3Cは、ヒトCHL2遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号4) およびヒトCHL2ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号5) を示す。予測されたシグナル配列を示す (下線)。

【図4】

図4は、ヒトコルディン (huCHD; 配列番号8)、ヒトCHL1ポリペプチド (huCHL; 配列番号9)、およびヒトCHL2ポリペプチド (huCH

L 2 ; 配列番号 5) のアミノ酸配列整列を示す。

【図 5】

図 5 は、マウスコルディン (Chordin)、CHL 1 ポリペプチド、および CHL 2 ポリペプチドの模式図を示す。プレコラーゲン反復 (CR ; 相同の CR ドメインを、灰色の四角で示す)、シグナルペプチド (SP)、推定 BMP 1 / Toll o i d 切断部位 (*)、および CHL 1 中のアミノ酸配列バリエーションの部位 (d E および d 5) を示す。

【図 6】

図 6 は、E 1 7 . 5 のマウス股関節 (パネル A および B) ならびに肋骨 - 軟骨関節 (パネル C ; 関節の両部位上での関節軟骨細胞におけるシグナルを示す) におけるインサイチュハイブリダイゼーションによって検出されたマウス CHL 2 mRNA の発現を示す。

【図 7】

図 7 は、正常な成体の脊椎関節 (パネル A、B、および C ; 関節突起の両側での関節軟骨の表面の関節軟骨細胞または隣接する脊椎の突起間の関節突起間関節におけるシグナルを示す) および脊椎の椎間板の線維化輪 (a n u l u s f i b r o s u s) の線維軟骨 (パネル D) におけるインサイチュハイブリダイゼーションによって検出されたマウス CHL 2 mRNA の発現を示す。

【図 8】

図 8 は、E 1 8 . 5 マウスの胸骨および胎盤ならびに正常な成体マウスの子宮、結腸、および小腸におけるインサイチュハイブリダイゼーションによって検出されたマウス CHL 2 mRNA の発現を示す。

【図 9】

図 9 は、マウス CHL 2 ポリペプチドの 2 次的軸形成活性を示す。

【図 1 0】

図 1 0 は、CD 3 4 ⁺ / CD 3 1 ⁺ 赤骨髄 (e r y t h r o - m y e l o i d) 前駆細胞 (R 7) および CD 3 4 ⁻ / CD 3 1 ⁺ 細胞 (R 3) の BMP 4 依存性生成に対する、CHL 2 ポリペプチドの影響を示す。

【図 1 1】

図11は、C2C12筋芽細胞におけるBMP2依存性アルカリホスファターゼの誘導に対する、CHL2ポリペプチドの影響を示す。

【図12】

図12は、mCHL2-FLAGタンパク質を用いたウエスタンブロットの結果を示す。パネルAにおいて、mCHL2-FLAGは、BMP5またはアクチビンAと混合され、抗mCHL2抗血清で処理され、そしてプロテインAアガロースビーズを用いて沈降された。パネルBにおいて、mCHL2-FLAGは、BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、GDF5(BMP14)、またはアクチビンAと混合され、抗mCHL2抗血清で処理され、そしてプロテインAアガロースビーズを用いて沈降された。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Zhang, Ke
Cam, Linh
Nakayama, Naoki

<120> Chordin-Like-2 Molecules and Uses Thereof

<130> 01-005

<140> 60/186,462
<141> 2000-03-02

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1839
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (471)..(1748)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (471)..(530)

<400> 1
cctgcccagg cgtgcacagc ggcagcgtc aacctcccc gcgccccac cgaggggttt 60
gtgcgccac cgcgccccag acccgcgcgc gacccgcgc gcgccgcgc ccgccagcca 120
gcgccacagg gacactgcac cccggtgacc gcaccccgca gatcccggtt ctctagctag 180
caccttctcc ctctctgcca tagccttttt ctccatttcc ccaactaatt tctctctctc 240
tctctctctc tctctctctc tctcactcac tctctctctc ttctcctcgt ccctcccca 300
ccgtcctctc atcctcaact tagacctctc ctgtccttgg ctctcttca tctttgcttt 360
tccgactcct caagcagcgg tctacttgg tctctgagg acttacttgt gtccttctt 420
cactttctcc cggctcatcc cggggttgtc tgaccttggg acaaggaagg atg gtt 476
Met Val
1
ccc ggg gtg agg atc atc ccc tct ttg ctg gga ctc gtg atg ttc tgg 524
Pro Gly Val Arg Ile Ile Pro Ser Leu Leu Gly Leu Val Met Phe Trp
5 10 15
ctc ccg ttg gac tcg caa gca cta tcc cgc tcg ggc aaa gtc tgc ctt 572
Leu Pro Leu Asp Ser Gln Ala Leu Ser Arg Ser Gly Lys Val Cys Leu
20 25 30
ttc ggt gaa aag ata tat acc ccc ggc cag agc tgg cac ccc tac ttg 620
Phe Gly Glu Lys Ile Tyr Thr Pro Gly Gln Ser Trp His Pro Tyr Leu
35 40 45 50

gaa cca caa ggc acg ata tac tgc gtg cgc tgt acc tgc tct gag aat	668
Glu Pro Gln Gly Thr Ile Tyr Cys Val Arg Cys Thr Cys Ser Glu Asn	
55 60 65	
gga cat gtg aat tgt tac cgc ctc cgc tgc cca ccc ctt cac tgc tca	716
Gly His Val Asn Cys Tyr Arg Leu Arg Cys Pro Pro Leu His Cys Ser	
70 75 80	
cag cct gtg atg gag cca cag caa tgc tgt ccc agg tgt gtg gat cct	764
Gln Pro Val Met Glu Pro Gln Gln Cys Cys Pro Arg Cys Val Asp Pro	
85 90 95	
cat gtc ccc tct ggc ctc cga gtt ccc cta aag tcc tgc cag ctc aat	812
His Val Pro Ser Gly Leu Arg Val Pro Leu Lys Ser Cys Gln Leu Asn	
100 105 110	
gag acc aca tac caa cat gga gag atc ttc agt gcc cag gag ctg ttc	860
Glu Thr Thr Tyr Gln His Gly Glu Ile Phe Ser Ala Gln Glu Leu Phe	
115 120 125 130	
cct gcc cgc ctg tcc aac cag tgt gtc ctg tgt agc tgt att gaa ggc	908
Pro Ala Arg Leu Ser Asn Gln Cys Val Leu Cys Ser Cys Ile Glu Gly	
135 140 145	
cac act tac tgt ggt ctc atg acc tgt cct gaa ccc agc tgc ccc acc	956
His Thr Tyr Cys Gly Leu Met Thr Cys Pro Glu Pro Ser Cys Pro Thr	
150 155 160	
aca ctc cct ctg cct gat tcc tgc tgt cag acc tgc aaa gac agg aca	1004
Thr Leu Pro Leu Pro Asp Ser Cys Cys Gln Thr Cys Lys Asp Arg Thr	
165 170 175	
act gag agt tcc aca gaa gaa aac ttg aca cag ctg cag cat gga gag	1052
Thr Glu Ser Ser Thr Glu Asn Leu Thr Gln Leu Gln His Gly Glu	
180 185 190	
aga cat tcc cag gat cca tgc tcg gag agg aga ggc ccc agc acg cca	1100
Arg His Ser Gln Asp Pro Cys Ser Glu Arg Arg Gly Pro Ser Thr Pro	
195 200 205 210	
gcc ccc acc agc ctc agc tcc cct ctg ggc ttc atc cct cgc cac ttc	1148
Ala Pro Thr Ser Leu Ser Ser Pro Leu Gly Phe Ile Pro Arg His Phe	
215 220 225	
cag tca gta gga atg ggc agc aca acc atc aag att atc ttg aag gag	1196
Gln Ser Val Gly Met Gly Ser Thr Thr Ile Lys Ile Ile Leu Lys Glu	
230 235 240	
aaa cat aaa aaa gct tgc aca cac aat ggg aag aca tac tcc cat ggg	1244
Lys His Lys Lys Ala Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Tyr Ser His Gly	
245 250 255	
gag gtg tgg cac ccc act gtg ctc tcc ttt ggc ccc atg ccc tgc atc	1292
Glu Val Trp His Pro Thr Val Leu Ser Phe Gly Pro Met Pro Cys Ile	
260 265 270	
ctg tgc aca tgt att gat ggc tac cag gac tgc cac cgt gtg acc tgc	1340
Leu Cys Thr Cys Ile Asp Gly Tyr Gln Asp Cys His Arg Val Thr Cys	
275 280 285 290	
ccc acc caa tat ccc tgc agt caa ccc aag aaa gtg gct ggg aag tgc	1388

Pro Thr Gln Tyr Pro Cys Ser Gln Pro Lys Lys Val Ala Gly Lys Cys
 295 300 305

tgc aag atc tgc cca gag gac gag gcg gaa gat gac cac agt gag gtc 1436
 Cys Lys Ile Cys Pro Glu Asp Glu Ala Glu Asp Asp His Ser Glu Val
 310 315 320

att tcc acc cgg tgt ccc aag gta cca ggc cag ttc cag gtg tac acg 1484
 Ile Ser Thr Arg Cys Pro Lys Val Pro Gly Gln Phe Gln Val Tyr Thr
 325 330 335

ttg gca tct cda agc cca gac agc cta cac cgc ttt gtc ctg gag cat 1532
 Leu Ala Ser Pro Ser Pro Asp Ser Leu His Arg Phe Val Leu Glu His
 340 345 350

gaa gcc tct gac cag gta gag atg tac att tgg aag ctg gtg aaa gga 1580
 Glu Ala Ser Asp Gln Val Glu Met Tyr Ile Trp Lys Leu Val Lys Gly
 355 360 365 370

atc tac cac ttg gtt cag atc aag aga gtc agg aag caa gat ttc cag 1628
 Ile Tyr His Leu Val Gln Ile Lys Arg Val Arg Lys Gln Asp Phe Gln
 375 380 385

aaa gag gct cag aac ttc cgg ctg ctc acc ggc acc cat gaa ggt tac 1676
 Lys Glu Ala Gln Asn Phe Arg Leu Leu Thr Gly Thr His Glu Gly Tyr
 390 395 400

tgg acc gtc ttc cta gcc cag act cca gag ctg aaa gtt aca gcc agc 1724
 Trp Thr Val Phe Leu Ala Gln Thr Pro Glu Leu Lys Val Thr Ala Ser
 405 410 415

cca gac aaa gtg acc aag aca tta tagcaaggac ctaaagagtt gcagatacga 1778
 Pro Asp Lys Val Thr Lys Thr Leu
 420 425

gttttattgg ttttattatt atatattaat aaagaagtgc cattaccctc tccccccac 1838

t 1839

<210> 2

<211> 426

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Val Pro Gly Val Arg Ile Ile Pro Ser Leu Leu Gly Leu Val Met
 1 5 10 15

Phe Trp Leu Pro Leu Asp Ser Gln Ala Leu Ser Arg Ser Gly Lys Val
 20 25 30

Cys Leu Phe Gly Glu Lys Ile Tyr Thr Pro Gly Gln Ser Trp His Pro
 35 40 45

Tyr Leu Glu Pro Gln Gly Thr Ile Tyr Cys Val Arg Cys Thr Cys Ser
 50 55 60

Glu Asn Gly His Val Asn Cys Tyr Arg Leu Arg Cys Pro Pro Leu His
 65 70 75 80

Cys Ser Gln Pro Val Met Glu Pro Gln Gln Cys Cys Pro Arg Cys Val
 85 90 95
 Asp Pro His Val Pro Ser Gly Leu Arg Val Pro Leu Lys Ser Cys Gln
 100 105 110
 Leu Asn Glu Thr Thr Tyr Gln His Gly Glu Ile Phe Ser Ala Gln Glu
 115 120 125
 Leu Phe Pro Ala Arg Leu Ser Asn Gln Cys Val Leu Cys Ser Cys Ile
 130 135 140
 Glu Gly His Thr Tyr Cys Gly Leu Met Thr Cys Pro Glu Pro Ser Cys
 145 150 155 160
 Pro Thr Thr Leu Pro Leu Pro Asp Ser Cys Cys Gln Thr Cys Lys Asp
 165 170 175
 Arg Thr Thr Glu Ser Ser Thr Glu Glu Asn Leu Thr Gln Leu Gln His
 180 185 190
 Gly Glu Arg His Ser Gln Asp Pro Cys Ser Glu Arg Arg Gly Pro Ser
 195 200 205
 Thr Pro Ala Pro Thr Ser Leu Ser Ser Pro Leu Gly Phe Ile Pro Arg
 210 215 220
 His Phe Gln Ser Val Gly Met Gly Ser Thr Thr Ile Lys Ile Ile Leu
 225 230 235 240
 Lys Glu Lys His Lys Lys Ala Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Tyr Ser
 245 250 255
 His Gly Glu Val Trp His Pro Thr Val Leu Ser Phe Gly Pro Met Pro
 260 265 270
 Cys Ile Leu Cys Thr Cys Ile Asp Gly Tyr Gln Asp Cys His Arg Val
 275 280 285
 Thr Cys Pro Thr Gln Tyr Pro Cys Ser Gln Pro Lys Lys Val Ala Gly
 290 295 300
 Lys Cys Cys Lys Ile Cys Pro Glu Asp Glu Ala Glu Asp Asp His Ser
 305 310 315 320
 Glu Val Ile Ser Thr Arg Cys Pro Lys Val Pro Gly Gln Phe Gln Val
 325 330 335
 Tyr Thr Leu Ala Ser Pro Ser Pro Asp Ser Leu His Arg Phe Val Leu
 340 345 350
 Glu His Glu Ala Ser Asp Gln Val Glu Met Tyr Ile Trp Lys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Ile Tyr His Leu Val Gln Ile Lys Arg Val Arg Lys Gln Asp
 370 375 380
 Phe Gln Lys Glu Ala Gln Asn Phe Arg Leu Leu Thr Gly Thr His Glu
 385 390 395 400
 Gly Tyr Trp Thr Val Phe Leu Ala Gln Thr Pro Glu Leu Lys Val Thr

ccc tac ttg gag cca caa ggc ctg atg tac tgc ctg cgc tgt acc tgc	372
Pro Tyr Leu Glu Pro Gln Gly Leu Met Tyr Cys Leu Arg Cys Thr Cys	
50 55 60	
tca gag ggc gcc cat gtg agt tgt tac cgc ctc cac tgt ccg cct gtc	420
Ser Glu Gly Ala His Val Ser Cys Tyr Arg Leu His Cys Pro Pro Val	
65 70 75	
cac tgc ccc cag cct gtg acg gag cca cag caa tgc tgt ccc aag tgt	468
His Cys Pro Gln Pro Val Thr Glu Pro Gln Gln Cys Cys Pro Lys Cys	
80 85 90 95	
gtg gaa cct cac act ccc tct gga ctc cgg gcc cca cca aag tcc tgc	516
Val Glu Pro His Thr Pro Ser Gly Leu Arg Ala Pro Pro Lys Ser Cys	
100 105 110	
cag cac aac ggg acc atg tac caa cac gga gag atc ttc agt gcc cat	564
Gln His Asn Gly Thr Met Tyr Gln His Gly Glu Ile Phe Ser Ala His	
115 120 125	
gag ctg ttc ccc tcc cgc ctg ccc aac cag tgt gtc ctc tgc agc tgc	612
Glu Leu Phe Pro Ser Arg Leu Pro Asn Gln Cys Val Leu Cys Ser Cys	
130 135 140	
aca gag ggc cag atc tac tgc ggc ctc aca acc tgc ccc gaa cca ggc	660
Thr Glu Gly Gln Ile Tyr Cys Gly Leu Thr Thr Cys Pro Glu Pro Gly	
145 150 155	
tgc cca gca ccc ctc ccg ctg cca gac tcc tgc tgc caa gcc tgc aaa	708
Cys Pro Ala Pro Leu Pro Leu Pro Asp Ser Cys Cys Gln Ala Cys Lys	
160 165 170 175	
gat gag gca agt gag caa tcg gat gaa gag gac agt gtg cag tcg ctc	756
Asp Glu Ala Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Asp Ser Val Gln Ser Leu	
180 185 190	
cat ggg gtg aga cat cct cag gat cca tgt tcc agt gat gct ggg aga	804
His Gly Val Arg His Pro Gln Asp Pro Cys Ser Ser Asp Ala Gly Arg	
195 200 205	
aag aga ggc ccg ggc acc cca gcc ccc act ggc ctc agc gcc cct ctg	852
Lys Arg Gly Pro Gly Thr Pro Ala Pro Thr Gly Leu Ser Ala Pro Leu	
210 215 220	
agc ttc atc cct cgc cac ttc aga ccc aag gga gca ggc agc aca act	900
Ser Phe Ile Pro Arg His Phe Arg Pro Lys Gly Ala Gly Ser Thr Thr	
225 230 235	
gtc aag atc gtc ctg aag gag aaa cat aag aaa gcc tgt gtg cat ggc	948
Val Lys Ile Val Leu Lys Glu Lys His Lys Lys Ala Cys Val His Gly	
240 245 250 255	
ggg aag acg tac tcc cac ggg gag gtg tgg cac ccg gcc ttc cgt gcc	996
Gly Lys Thr Tyr Ser His Gly Glu Val Trp His Pro Ala Phe Arg Ala	
260 265 270	
ttc ggc ccc ttg ccc tgc atc cta tgc acc tgt gag gat ggc cgc cag	1044
Phe Gly Pro Leu Pro Cys Ile Leu Cys Thr Cys Glu Asp Gly Arg Gln	
275 280 285	

WO 01/64885 **PCT/US01/06891**
 gag Lys Cag cgt gtg acc tgt ccc acc gag tac ccc tgc cgt cac ccc 1092
 Asp Cys Gln Arg Val Thr Cys Pro Thr Glu Tyr Pro Cys Arg His Pro
 290 295 300

gag aaa gtg gct ggg aag tgc tgc aag att tgc cca gag gac aaa gca 1140
 Glu Lys Val Ala Gly Lys Cys Cys Lys Ile Cys Pro Glu Asp Lys Ala
 305 310 315

gac cct ggc cac agt gag atc agt tct acc agg tgt ccc aag gca ccg 1188
 Asp Pro Gly His Ser Glu Ile Ser Ser Thr Arg Cys Pro Lys Ala Pro
 320 325 330 335

ggc egg gtc ctc gtc cac aca tgc gta tcc cca agc cca gac aac ctg 1236
 Gly Arg Val Leu Val His Thr Ser Val Ser Pro Ser Pro Asp Asn Leu
 340 345 350

cgt cgc ttt gcc ctg gaa cac gag gcc tgc gac ttg gtg gag atc tac 1284
 Arg Arg Phe Ala Leu Glu His Glu Ala Ser Asp Leu Val Glu Ile Tyr
 355 360 365

ctc tgg aag ctg gtg aaa gga atc ttc cac ttg act cag atc aag aaa 1332
 Leu Trp Lys Leu Val Lys Gly Ile Phe His Leu Thr Gln Ile Lys Lys
 370 375 380

gtc agg aag caa gac ttc cag aaa gag gca cag cac ttc cga ctg ctc 1380
 Val Arg Lys Gln Asp Phe Gln Lys Glu Ala Gln His Phe Arg Leu Leu
 385 390 395

gct ggc ccc cac gaa ggt cac tgg aac gtc ttc cta gcc cag acc ctg 1428
 Ala Gly Pro His Glu Gly His Trp Asn Val Phe Leu Ala Gln Thr Leu
 400 405 410 415

gag ctg aag gtc acg gcc agt cca gac aaa gtg acc aag aca 1470
 Glu Leu Lys Val Thr Ala Ser Pro Asp Lys Val Thr Lys Thr
 420 425

taacaaagac ctaacagttg cagatatgag ctgtataatt gttgttatta tatattaata 1530

aataagaagt tgcattacc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1570

<210> 5
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Met Val Pro Glu Val Arg Val Leu Ser Ser Leu Leu Gly Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Trp Phe Pro Leu Asp Ser His Ala Arg Ala Arg Pro Asp Met Phe
 20 25 30
 Cys Leu Phe His Gly Lys Arg Tyr Ser Pro Gly Glu Ser Trp His Pro
 35 40 45
 Tyr Leu Glu Pro Gln Gly Leu Met Tyr Cys Leu Arg Cys Thr Cys Ser
 50 55 60
 Glu Gly Ala His Val Ser Cys Tyr Arg Leu His Cys Pro Pro Val His
 65 70 75 80

Cys Pro Gln Pro Val Thr Glu Pro Gln Gln Cys Cys Pro Lys Cys Val
 85 90 95
 Glu Pro His Thr Pro Ser Gly Leu Arg Ala Pro Pro Lys Ser Cys Gln
 100 105 110
 His Asn Gly Thr Met Tyr Gln His Gly Glu Ile Phe Ser Ala His Glu
 115 120 125
 Leu Phe Pro Ser Arg Leu Pro Asn Gln Cys Val Leu Cys Ser Cys Thr
 130 135 140
 Glu Gly Gln Ile Tyr Cys Gly Leu Thr Thr Cys Pro Glu Pro Gly Cys
 145 150 155 160
 Pro Ala Pro Leu Pro Leu Pro Asp Ser Cys Cys Gln Ala Cys Lys Asp
 165 170 175
 Glu Ala Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Asp Ser Val Gln Ser Leu His
 180 185 190
 Gly Val Arg His Pro Gln Asp Pro Cys Ser Ser Asp Ala Gly Arg Lys
 195 200 205
 Arg Gly Pro Gly Thr Pro Ala Pro Thr Gly Leu Ser Ala Pro Leu Ser
 210 215 220
 Phe Ile Pro Arg His Phe Arg Pro Lys Gly Ala Gly Ser Thr Thr Val
 225 230 235 240
 Lys Ile Val Leu Lys Glu Lys His Lys Lys Ala Cys Val His Gly Gly
 245 250 255
 Lys Thr Tyr Ser His Gly Glu Val Trp His Pro Ala Phe Arg Ala Phe
 260 265 270
 Gly Pro Leu Pro Cys Ile Leu Cys Thr Cys Glu Asp Gly Arg Gln Asp
 275 280 285
 Cys Gln Arg Val Thr Cys Pro Thr Glu Tyr Pro Cys Arg His Pro Glu
 290 295 300
 Lys Val Ala Gly Lys Cys Cys Lys Ile Cys Pro Glu Asp Lys Ala Asp
 305 310 315 320
 Pro Gly His Ser Glu Ile Ser Ser Thr Arg Cys Pro Lys Ala Pro Gly
 325 330 335
 Arg Val Leu Val His Thr Ser Val Ser Pro Ser Pro Asp Asn Leu Arg
 340 345 350
 Arg Phe Ala Leu Glu His Glu Ala Ser Asp Leu Val Glu Ile Tyr Leu
 355 360 365
 Trp Lys Leu Val Lys Gly Ile Phe His Leu Thr Gln Ile Lys Lys Val
 370 375 380
 Arg Lys Gln Asp Phe Gln Lys Glu Ala Gln His Phe Arg Leu Leu Ala
 385 390 395 400

Gly Pro His Glu Gly His Trp Asn Val Phe Leu Ala Gln Thr Leu Glu
 405 410 415
 Leu Lys Val Thr Ala Ser Pro Asp Lys Val Thr Lys Thr
 420 425
 <210> 6
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Asp Ser His Ala Arg Ala Arg Pro Asp Met Phe Cys Leu Phe His Gly
 1 5 10 15
 Lys Arg Tyr Ser Pro Gly Glu Ser Trp His Pro Tyr Leu Glu Pro Gln
 20 25 30
 Gly Leu Met Tyr Cys Leu Arg Cys Thr Cys Ser Glu Gly Ala His Val
 35 40 45
 Ser Cys Tyr Arg Leu His Cys Pro Pro Val His Cys Pro Gln Pro Val
 50 55 60
 Thr Glu Pro Gln Gln Cys Cys Pro Lys Cys Val Glu Pro His Thr Pro
 65 70 75 80
 Ser Gly Leu Arg Ala Pro Pro Lys Ser Cys Gln His Asn Gly Thr Met
 85 90 95
 Tyr Gln His Gly Glu Ile Phe Ser Ala His Glu Leu Phe Pro Ser Arg
 100 105 110
 Leu Pro Asn Gln Cys Val Leu Cys Ser Cys Thr Glu Gly Gln Ile Tyr
 115 120 125
 Cys Gly Leu Thr Thr Cys Pro Glu Pro Gly Cys Pro Ala Pro Leu Pro
 130 135 140
 Leu Pro Asp Ser Cys Cys Gln Ala Cys Lys Asp Glu Ala Ser Glu Gln
 145 150 155 160
 Ser Asp Glu Glu Asp Ser Val Gln Ser Leu His Gly Val Arg His Pro
 165 170 175
 Gln Asp Pro Cys Ser Ser Asp Ala Gly Arg Lys Arg Gly Pro Gly Thr
 180 185 190
 Pro Ala Pro Thr Gly Leu Ser Ala Pro Leu Ser Phe Ile Pro Arg His
 195 200 205
 Phe Arg Pro Lys Gly Ala Gly Ser Thr Thr Val Lys Ile Val Leu Lys
 210 215 220
 Glu Lys His Lys Lys Ala Cys Val His Gly Gly Lys Thr Tyr Ser His
 225 230 235 240
 Gly Glu Val Trp His Pro Ala Phe Arg Ala Phe Gly Pro Leu Pro Cys
 245 250 255

Ile Leu Cys Thr Cys Glu Asp Gly Arg Gln Asp Cys Gln Arg Val Thr
 260 265 270

Cys Pro Thr Glu Tyr Pro Cys Arg His Pro Glu Lys Val Ala Gly Lys
 275 280 285

Cys Cys Lys Ile Cys Pro Glu Asp Lys Ala Asp Pro Gly His Ser Glu
 290 295 300

Ile Ser Ser Thr Arg Cys Pro Lys Ala Pro Gly Arg Val Leu Val His
 305 310 315 320

Thr Ser Val Ser Pro Ser Pro Asp Asn Leu Arg Arg Phe Ala Leu Glu
 325 330 335

His Glu Ala Ser Asp Leu Val Glu Ile Tyr Leu Trp Lys Leu Val Lys
 340 345 350

Gly Ile Phe His Leu Thr Gln Ile Lys Lys Val Arg Lys Gln Asp Phe
 355 360 365

Gln Lys Glu Ala Gln His Phe Arg Leu Leu Ala Gly Pro His Glu Gly
 370 375 380

His Trp Asn Val Phe Leu Ala Gln Thr Leu Glu Leu Lys Val Thr Ala
 385 390 395 400

Ser Pro Asp Lys Val Thr Lys Thr
 405

<210> 7

<211> 283

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Asn Gly Glu Ala Ala Thr Ser Pro Met Leu Pro Ala Gly Pro Gly Pro
 1 5 10 15

Glu Ala Pro Val Pro Ala Lys His Gly Ser Pro Gly Arg Pro Arg Asp
 20 25 30

Pro Asn Thr Cys Phe Phe Glu Gly Gln Gln Arg Pro His Gly Ala Arg
 35 40 45

Trp Ala Pro Asn Tyr Asp Pro Leu Cys Ser Leu Cys Ile Cys Gln Arg
 50 55 60

Arg Thr Val Ile Cys Asp Pro Val Val Cys Pro Pro Pro Ser Cys Pro
 65 70 75 80

His Pro Val Gln Ala Leu Asp Gln Cys Cys Pro Val Cys Pro Glu Lys
 85 90 95

Gln Arg Ser Arg Asp Leu Pro Ser Leu Pro Asn Leu Glu Pro Gly Glu
 100 105 110

Gly Cys Tyr Phe Asp Gly Asp Arg Ser Trp Arg Ala Ala Gly Thr Arg
 115 120 125

Trp His Pro Val Val Pro Pro Phe Gly Leu Ile Lys Cys Ala Val Cys
 130 135 140
 Thr Cys Lys Gly Ala Thr Gly Glu Val His Cys Glu Lys Val Gln Cys
 145 150 155 160
 Pro Arg Leu Ala Cys Ala Gln Pro Val Arg Ala Asn Pro Thr Asp Cys
 165 170 175
 Cys Lys Gln Cys Pro Val Gly Ser Gly Thr Asn Ala Lys Leu Gly Asp
 180 185 190
 Pro Met Gln Ala Asp Gly Pro Arg Gly Cys Arg Phe Ala Gly Gln Trp
 195 200 205
 Phe Pro Glu Asn Gln Ser Trp His Pro Ser Val Pro Pro Phe Gly Glu
 210 215 220
 Met Ser Cys Ile Thr Cys Arg Cys Gly Ala Gly Val Pro His Cys Glu
 225 230 235 240
 Arg Asp Asp Cys Ser Pro Pro Leu Ser Cys Gly Ser Gly Lys Glu Ser
 245 250 255
 Arg Cys Cys Ser His Cys Thr Ala Gln Arg Ser Ser Glu Thr Arg Thr
 260 265 270
 Leu Pro Glu Leu Glu Lys Glu Ala Glu His Ser
 275 280

<210> 8
 <211> 955
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Met Pro Ser Leu Pro Ala Pro Pro Ala Pro Leu Leu Leu Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Gly Ser Arg Pro Ala Arg Gly Ala Gly Pro Glu Pro Pro
 20 25 30
 Val Leu Pro Ile Arg Ser Glu Lys Glu Pro Leu Pro Val Arg Gly Ala
 35 40 45
 Ala Gly Cys Thr Phe Gly Gly Lys Val Tyr Ala Leu Asp Glu Thr Trp
 50 55 60
 His Pro Asp Leu Gly Glu Pro Phe Gly Val Met Arg Cys Val Leu Cys
 65 70 75 80
 Ala Cys Glu Ala Pro Gln Trp Gly Arg Arg Thr Arg Gly Pro Gly Arg
 85 90 95
 Val Ser Cys Lys Asn Ile Lys Pro Glu Cys Pro Thr Pro Ala Cys Gly
 100 105 110
 Gln Pro Arg Gln Leu Pro Gly His Cys Cys Gln Thr Cys Pro Gln Glu
 115 120 125

Arg Ser Ser Ser Glu Arg Gln Pro Ser Gly Leu Ser Phe³⁰⁰Glu³⁰¹Tyr³⁰²Pro³⁰³
 130 135 140
 Arg Asp Pro Glu His Arg Ser Tyr Ser Asp Arg Gly Glu Pro Gly Ala
 145 150 155 160
 Glu Glu Arg Ala Arg Gly Asp Gly His Thr Asp Phe Val Ala Leu Leu
 165 170 175
 Thr Gly Pro Arg Ser Gln Ala Val Ala Arg Ala Arg Val Ser Leu Leu
 180 185 190
 Arg Ser Ser Leu Arg Phe Ser Ile Ser Tyr Arg Arg Leu Asp Arg Pro
 195 200 205
 Thr Arg Ile Arg Phe Ser Asp Ser Asn Gly Ser Val Leu Phe Glu His
 210 215 220
 Pro Ala Ala Pro Thr Gln Asp Gly Leu Val Cys Gly Val Trp Arg Ala
 225 230 235 240
 Val Pro Arg Leu Ser Leu Arg Leu Leu Arg Ala Glu Gln Leu His Val
 245 250 255
 Ala Leu Val Thr Leu Thr His Pro Ser Gly Glu Val Trp Gly Pro Leu
 260 265 270
 Ile Arg His Arg Ala Leu Ala Ala Glu Thr Phe Ser Ala Ile Leu Thr
 275 280 285
 Leu Glu Gly Pro Pro Gln Gln Gly Val Gly Gly Ile Thr Leu Leu Thr
 290 295 300
 Leu Ser Asp Thr Glu Asp Ser Leu His Phe Leu Leu Leu Phe Arg Gly
 305 310 315 320
 Leu Leu Glu Pro Arg Ser Gly Gly Leu Thr Gln Val Pro Leu Arg Leu
 325 330 335
 Gln Ile Leu His Gln Gly Gln Leu Leu Arg Glu Leu Gln Ala Asn Val
 340 345 350
 Ser Ala Gln Glu Pro Gly Phe Ala Glu Val Leu Pro Asn Leu Thr Val
 355 360 365
 Gln Glu Met Asp Trp Leu Val Leu Gly Glu Leu Gln Met Ala Leu Glu
 370 375 380
 Trp Ala Gly Arg Pro Gly Leu Arg Ile Ser Gly His Ile Ala Ala Arg
 385 390 395 400
 Lys Ser Cys Asp Val Leu Gln Ser Val Leu Cys Gly Ala Asp Ala Leu
 405 410 415
 Ile Pro Val Gln Thr Gly Ala Ala Gly Ser Ala Ser Leu Thr Leu Leu
 420 425 430
 Gly Asn Gly Ser Leu Ile Tyr Gln Val Gln Val Val Gly Thr Ser Ser
 435 440 445
 Glu Val Val Ala Met Thr Leu Glu Thr Lys Pro Gln Arg Arg Asp Gln

Tyr Phe Asp Gly Asp Arg Ser Trp Arg Ala Ala Gly Thr Arg Trp His
 785 790 795 800
 Pro Val Val Pro Pro Phe Gly Leu Ile Lys Cys Ala Val Cys Thr Cys
 805 810 815
 Lys Gly Gly Thr Gly Glu Val His Cys Glu Lys Val Gln Cys Pro Arg
 820 825 830
 Leu Ala Cys Ala Gln Pro Val Arg Val Asn Pro Thr Asp Cys Cys Lys
 835 840 845
 Gln Cys Pro Val Gly Ser Gly Ala His Pro Gln Leu Gly Asp Pro Met
 850 855 860
 Gln Ala Asp Gly Pro Arg Gly Cys Arg Phe Ala Gly Gln Trp Phe Pro
 865 870 875 880
 Glu Ser Gln Ser Trp His Pro Ser Val Pro Pro Phe Gly Glu Met Ser
 885 890 895
 Cys Ile Thr Cys Arg Cys Gly Ala Gly Val Pro His Cys Glu Arg Asp
 900 905 910
 Asp Cys Ser Leu Pro Leu Ser Cys Gly Ser Gly Lys Glu Ser Arg Cys
 915 920 925
 Cys Ser Arg Cys Thr Ala His Arg Arg Pro Ala Pro Glu Thr Arg Thr
 930 935 940
 Asp Pro Glu Leu Glu Lys Glu Ala Glu Gly Ser
 945 950 955

<210> 9

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Gly Gly Met Lys Tyr Ile Phe Ser Leu Leu Phe Phe Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Gly Gly Lys Thr Glu Gln Val Lys His Ser Glu Thr Tyr Cys Met
 20 25 30
 Phe Gln Asp Lys Lys Tyr Arg Val Gly Glu Arg Trp His Pro Tyr Leu
 35 40 45
 Glu Pro Tyr Gly Leu Val Tyr Cys Val Asn Cys Ile Cys Ser Glu Asn
 50 55 60
 Gly Asn Val Leu Cys Ser Arg Val Arg Cys Pro Asn Val His Cys Leu
 65 70 75 80
 Ser Pro Val His Ile Pro His Leu Cys Cys Pro Arg Cys Pro Glu Asp
 85 90 95
 Ser Leu Pro Pro Val Asn Asn Lys Val Thr Ser Lys Ser Cys Glu Tyr
 100 105 110

Asn Gly Thr Thr Tyr Gln His Gly Glu Leu Phe Val Ala Glu Gly Leu
 115 120 125
 Phe Gln Asn Arg Gln Pro Asn Gln Cys Thr Gln Cys Ser Cys Ser Glu
 130 135 140
 Gly Asn Val Tyr Cys Gly Leu Lys Thr Cys Pro Lys Leu Thr Cys Ala
 145 150 155 160
 Phe Pro Val Ser Val Pro Asp Ser Cys Cys Arg Val Cys Arg Gly Asp
 165 170 175
 Gly Glu Leu Ser Trp Glu His Ser Asp Gly Asp Ile Phe Arg Gln Pro
 180 185 190
 Ala Asn Arg Glu Ala Arg His Ser Tyr His Arg Ser His Tyr Asp Pro
 195 200 205
 Pro Pro Ser Arg Gln Ala Gly Gly Leu Ser Arg Phe Pro Gly Ala Arg
 210 215 220
 Ser His Arg Gly Ala Leu Met Asp Ser Gln Gln Ala Ser Gly Thr Ile
 225 230 235 240
 Val Gln Ile Val Ile Asn Asn Lys His Lys His Gly Gln Val Cys Val
 245 250 255
 Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Ser His Gly Glu Ser Trp His Pro Asn Leu
 260 265 270
 Arg Ala Phe Gly Ile Val Glu Cys Val Leu Cys Thr Cys Asn Val Thr
 275 280 285
 Lys Gln Glu Cys Lys Lys Ile His Cys Pro Asn Arg Tyr Pro Cys Lys
 290 295 300
 Tyr Pro Gln Lys Ile Asp Gly Lys Cys Cys Lys Val Cys Pro Gly Lys
 305 310 315 320
 Lys Ala Lys Glu Glu Leu Pro Gly Gln Ser Phe Asp Asn Lys Gly Tyr
 325 330 335
 Phe Cys Gly Glu Glu Thr Met Pro Val Tyr Glu Ser Val Phe Met Glu
 340 345 350
 Asp Gly Glu Thr Thr Arg Lys Ile Ala Leu Glu Thr Glu Arg Pro Pro
 355 360 365
 Gln Val Glu Val His Val Trp Thr Ile Arg Lys Gly Ile Leu Gln His
 370 375 380
 Phe His Ile Glu Lys Ile Ser Lys Arg Met Phe Glu Glu Leu Pro His
 385 390 395 400
 Phe Lys Leu Val Thr Arg Thr Thr Leu Ser Gln Trp Lys Ile Phe Thr
 405 410 415
 Glu Gly Glu Ala Gln Ile Ser Gln Met Cys Ser Ser Arg Val Cys Arg
 420 425 430

Thr Glu Leu Glu Asp Leu Val Lys Val Leu Tyr Leu Glu Arg Ser Glu
 435 440 445

Lys Gly His Cys
 450

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 10
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: internalizing
 domain derived from HIV tat protein

<400> 11
 Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide; primer 1605-21

<400> 12
 aatccgatgc ccacgttgca gta 23

<210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide; PCR primer 1239-08

<400> 13
 aaaatcttag accgacgact gtgttt 26

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide; PCR primer

<400> 14
 cgtaaaagat cctgcgctag atgcg 25

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide; PCR primer

<400> 15
 tcctctcatc ctcaccttag 20

<210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide; PCR primer

<400> 16
 ggagaaagtg agataaggac ac 22

<210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide; PCR primer 2360-40

<400> 17
 gctatctaga gccacatgg ttcccggggt gaggatcatc 40

<210> 18
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide; PCR primer 2360-41

<400> 18
 gctagtcgac ctataatgtc ttggtcactt tgtctg 36

<210> 19
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide; PCR primer

<400> 19
 gctagcggcc gcgccacccat ggttcccggg gtgaggatca tc 42

<210> 20
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 oligonucleotide; PCR primer

<400> 20
 gctagtcgac taatgtcttg gtcactttgt ctgggc 36

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 21
 Cys Pro Glu Asp Glu Ala Glu Asp Asp His Ser Glu Val Ile Ser Thr
 1 5 10 15

Arg

【図 1 A】

FIG. 1A

```

cctgcccagg cgtgcacagc ggcagcgtc aacctcccc gcgcccacc cgagggtctt 60
gtcgcaccac cgcgccccag acccgcgccg gaccocgcgc cgcgcgcgcg ccgcccagcca 120
gcgccacagg gacactgcac cccggtgacc gcaccccgca gatcccgtt ctctagctag 180
caccttctcc ctctctgcca tagccttttt cttcatttcc ccaactaatt tctctctctc 240
tctctctctc tctctctctc tctcactcac tctctctctc ttctctctgt ccctcicca 300
ccgtcctctc atcctcacct tagacctctc ctgtccttgg ctctcttca tctttgcttt 360
tccgactcct caagcagcgg tctacttgg tctctgagg acttacttgt gtccttatct 420
cactttctcc cggctcatcc cggggttgtc tgaccttggg acaaggaagg atg gtt 476
                                         Met Val
                                         1

ccc ggg gtg agg atc atc ccc tct ttg ctg gga ctc gtg atg ttc tgg 524
Pro Gly Val Arg Ile Ile Pro Ser Leu Leu Gly Leu Val Met Phe Trp
      5              10              15

ctc cgg ttg gac tgc caa gca cta tcc cgc tgc ggc aaa gtc tgc ctt 572
Leu Pro Leu Asp Ser Gln Ala Leu Ser Arg Ser Gly Lys Val Cys Leu
      20              25              30

ttc ggt gaa aag ata tat acc ccc ggc cag agc tgg cac .ccc tac ttg 620
Phe Gly Glu Lys Ile Tyr Thr Pro Gly Gln Ser Trp His Pro Tyr Leu
      35              40              45              50

gaa cca caa ggc acg ata tac tgc gtg cgc tgt acc tgc tct gag aat 668
Glu Pro Gln Gly Thr Ile Tyr Cys Val Arg Cys Thr Cys Ser Glu Asn
              55              60              65

gga cat gtg aat tgt tac cgc ctc cgc tgc cca ccc ctt cac tgc tca 716
Gly His Val Asn Cys Tyr Arg Leu Arg Cys Pro Pro Leu His Cys Ser
              70              75              80

cag cct gtg atg gag cca cag caa tgc tgt ccc agg tgt gtg gat cct 764
Gln Pro Val Met Glu Pro Gln Gln Cys Cys Pro Arg Cys Val Asp Pro
      85              90              95

cat gtc ccc tct ggc ctc cga gtt ccc cta aag tcc tgc cag ctc aat 812
His Val Pro Ser Gly Leu Arg Val Pro Leu Lys Ser Cys Gln Leu Asn
      100              105              110

gag acc aca tac caa cat gga gag atc ttc agt gcc cag gag ctg ttc 860
Glu Thr Thr Tyr Gln His Gly Glu Ile Phe Ser Ala Gln Glu Leu Phe
      115              120              125              130

cct gcc cgc ctg tcc aac cag tgt gtc ctg tgt agc tgt att gaa ggc 908
Pro Ala Arg Leu Ser Asn Gln Cys Val Leu Cys Ser Cys Ile Glu Gly
              135              140              145

```

【図1B】

FIG. 1B

cac act tac tgt ggt ctc atg acc tgt cct gaa ccc agc tgc ccc acc	956
His Thr Tyr Cys Gly Leu Met Thr Cys Pro Glu Pro Ser Cys Pro Thr	
150 155 160	
aca ctc cct ctg cct gat tcc tgc tgt cag acc tgc aaa gac agg aca	1004
Thr Leu Pro Leu Pro Asp Ser Cys Cys Gln Thr Cys Lys Asp Arg Thr	
165 170 175	
act gag agt tcc aca gaa gaa aac ttg aca cag ctg cag cat gga gag	1052
Thr Glu Ser Ser Thr Glu Glu Asn Leu Thr Gln Leu Gln His Gly Glu	
180 185 190	
aga cat tcc cag gat cca tgc tgc gag agg aga ggc ccc agc acg cca	1100
Arg His Ser Gln Asp Pro Cys Ser Glu Arg Arg Gly Pro Ser Thr Pro	
195 200 205 210	
gcc ccc acc agc ctc agc tcc cct ctg ggc ttc atc cct cgc cac ttc	1148
Ala Pro Thr Ser Leu Ser Ser Pro Leu Gly Phe Ile Pro Arg His Phe	
215 220 225	
cag tca gta gga atg ggc agc aca acc atc aag att atc ttg aag gag	1196
Gln Ser Val Gly Met Gly Ser Thr Thr Ile Lys Ile Ile Leu Lys Glu	
230 235 240	
aaa cat aaa aaa gct tgc aca cac aat ggg aag aca tac tcc cat ggg	1244
Lys His Lys Lys Ala Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Tyr Ser His Gly	
245 250 255	
gag gtg tgg cac ccc act gtg ctc tcc ttt ggc ccc atg ccc tgc atc	1292
Glu Val Trp His Pro Thr Val Leu Ser Phe Gly Pro Met Pro Cys Ile	
260 265 270	
ctg tgc aca tgt att gat ggc tac cag gac tgc cac cgt gtg acc tgc	1340
Leu Cys Thr Cys Ile Asp Gly Tyr Gln Asp Cys His Arg Val Thr Cys	
275 280 285 290	
ccc acc caa tat ccc tgc agt caa ccc aag aaa gtg gct ggg aag tgc	1388
Pro Thr Gln Tyr Pro Cys Ser Gln Pro Lys Lys Val Ala Gly Lys Cys	
295 300 305	
tgc aag atc tgc cca gag gac gag gcg gaa gat gac cac agt gag gtc	1436
Cys Lys Ile Cys Pro Glu Asp Glu Ala Glu Asp Asp His Ser Glu Val	
310 315 320	
att tcc acc cgg tgt ccc aag gta cca ggc cag ttc cag gtg tac acg	1484
Ile Ser Thr Arg Cys Pro Lys Val Pro Gly Gln Phe Gln Val Tyr Thr	
325 330 335	
ttg gca tct cca agc cca gac agc cta cac cgc ttt gtc ctg gag cat	1532
Leu Ala Ser Pro Ser Pro Asp Ser Leu His Arg Phe Val Leu Glu His	
340 345 350	

【図1C】

1C

gaa gcc tct gac cag gta gag atg tac att tgg aag ctg gtg aaa gga	1580
Glu Ala Ser Asp Gln Val Glu Met Tyr Ile Trp Lys Leu Val Lys Gly	
355	360 365 370
atc tac cac ttg gtt cag atc aag aga gtc agg aag caa gat ttc cag	1628
Ile Tyr His Leu Val Gln Ile Lys Arg Val Arg Lys Gln Asp Phe Gln	
	375 380 385
aaa gag gct cag aac ttc cgg ctg ctc acc ggc acc cat gaa ggt tac	1676
Lys Glu Ala Gln Asn Phe Arg Leu Leu Thr Gly Thr His Glu Gly Tyr	
	390 395 400
tgg acc gtc ttc cta gcc cag act cca gag ctg aaa gtt aca gcc agc	1724
Trp Thr Val Phe Leu Ala Gln Thr Pro Glu Leu Lys Val Thr Ala Ser	
	405 410 415
cca gac aaa gtg acc aag aca tta tagcaaggac ctaaagagtt gcagatacga	1778
Pro Asp Lys Val Thr Lys Thr Leu	
	420 425
gttttattgg ttttggtatt atatattaat aaagaagtcg cattaccctc tccccccac	1838
t	1839

【図2】

FIG. 2

マウス CHLII 10 20 30 40 50
 M V P G V R I I P S L L G L V M F W L P L D S Q A L S R S G K V C L F G E K I Y T P G Q S W H P X L E P Q G T I Y
 Af069501.Pep N G E A A T S P M L P A G P G P E A P V P A K H G S P G R P R D P N T C F F E G Q Q R P H G A R W A P N Y D P -----L
 670 680 690 700 710 720

マウス CHLII 60 70 80 90 100 110
 C V R C T C S E N G H V N C Y R L R C F P L H C S Q F V M E P Q C C P R C V D P H -----V P S G L E V - P L K S C Q
 Af069501.Pep C S L C I C Q R R T - V I C D F V V C F P P S C P H P V Q A L D Q C C P V C P E K Q R S R D L P S L E N L E P G E G C Y
 730 740 750 760 770 780

マウス CHLII 120 130 140 150 160 169
 L N E T T Y Q H G E I P S A Q E L F P A R L S N Q C V L C S C -- I E G H T Y C G L M T C P E P S C P T T L P L - P D S
 Af069501.Pep F D G D R S W R A A G T R W E P V V P P F G L I K C A V C T C K G A T G E V H C E K V Q C P R I A C A Q P V R A N P T D
 790 800 810 820 830 840

マウス CHLII 170 180 190 200 210 220 229
 C Q T C K D R T T B S S T E N L T Q L O H G E R H S Q D P C S E R R G P S T P A P T S L S S P L G F I P R H F Q S V
 Af069501.Pep C C K Q C ----- P V ----- G S G T N A -- K L G D P M ----- Q A D
 850 860

マウス CHLII 230 240 250 260 270 280 289
 G M G S T T I K I L L K E K H K A C T H N G K T Y S H G E V W H E P T V L S F G P M P C I L C I C I D G Y Q D C H R V T
 Af069501.Pep G ----- P R G C R F A G Q W F P E N Q S W H P S V P P F G E M S C I T C R C G A G V P H C E R D D
 870 880 890 900

マウス CHLII 290 300 310 320 330
 C P T Q V P C S Q P K K V A G K C C K I C ----- P E D E A E D D R S E V I S T R C P K V P G Q F Q V Y T
 Af069501.Pep C S P P L S C G S G K E -- S R C C S H C T A Q R S S E T R T L P E L E K E A E H S
 910 920 930 940

マウス CHLII 340 350 360 370 380 390
 L A S P S P D S L H R F V L E H E A S D Q V E M Y I W K L V K G I Y H L V Q I K R V R K Q D F Q K E A Q N F R L L T G T

スコア Init1: 113 Initn: 313 Opt: 150
 Smith-Waterman スコア: 340, 3/2 アミノ酸重複中 24.4%の同一性

【図 3A】

FIG. 3A

```

agacctccct tectgccctc ctttctctgcc caccgctgct tectggccct tctccgacc 60
cgctctagca gcagacctcc tggggctctgt gggttgatct gtggcccttg tgctccctg 120
tcctttctgt ctcccttctc cccgactccg ctcccggacc agcggcctga cctggggaa 180
agg atg gtt ccc gag gtg agg gtc ctc tcc tcc ttg ctg gga ctc gcg 228
  Met Val Pro Glu Val Arg Val Leu Ser Ser Leu Leu Gly Leu Ala
    1           5           10           15
ctg ctc tgg ttc ccc ctg gac tcc cac gct cga gcc cgc cca gac atg 276
  Leu Leu Trp Phe Pro Leu Asp Ser His Ala Arg Ala Arg Pro Asp Met
    20           25           30
ttc tgc ctt ttc cat ggg aag aga tac tcc ccc ggc gag agc tgg cac 324
  Phe Cys Leu Phe His Gly Lys Arg Tyr Ser Pro Gly Glu Ser Trp His
    35           40           45
ccc tac ttg gag cca caa ggc ctg atg tac tgc ctg cgc tgt acc tgc 372
  Pro Tyr Leu Glu Pro Gln Gly Leu Met Tyr Cys Leu Arg Cys Thr Cys
    50           55           60
tca gag ggc gcc cat gtg agt tgt tac cgc ctc cac tgt ccg cct gtc 420
  Ser Glu Gly Ala His Val Ser Cys Tyr Arg Leu His Cys Pro Pro Val
    65           70           75
cac tgc ccc cag cct gtg acg gag cca cag caa tgc tgt ccc aag tgt 468
  His Cys Pro Gln Pro Val Thr Glu Pro Gln Gln Cys Cys Pro Lys Cys
    80           85           90           95
gtg gaa cct cac act ccc tct gga ctc cgg gcc cca cca aag tcc tgc 516
  Val Glu Pro His Thr Pro Ser Gly Leu Arg Ala Pro Pro Lys Ser Cys
    100           105           110
cag cac aac ggg acc atg tac caa cac gga gag atc ttc agt gcc cat 564
  Gln His Asn Gly Thr Met Tyr Gln His Gly Glu Ile Phe Ser Ala His
    115           120           125
gag ctg ttc ccc tcc cgc ctg ccc aac cag tgt gtc ctc tgc agc tgc 612
  Glu Leu Phe Pro Ser Arg Leu Pro Asn Gln Cys Val Leu Cys Ser Cys
    130           135           140
aca gag ggc cag atc tac tgc ggc ctc aca acc tgc ccc gaa cca ggc 660
  Thr Glu Gly Gln Ile Tyr Cys Gly Leu Thr Thr Cys Pro Glu Pro Gly
    145           150           155
tgc cca gca ccc ctc ccg ctg cca gac tcc tgc tgc caa gcc tgc aaa 708
  Cys Pro Ala Pro Leu Pro Leu Pro Asp Ser Cys Cys Gln Ala Cys Lys
    160           165           170           175
gat gag gca agt gag caa tcg gat gaa gag gac agt gtg cag tcg ctc 756
  Asp Glu Ala Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Asp Ser Val Gln Ser Leu
    180           185           190

```

【図 3 B】

FIG. 3B

cat ggg gtg aga cat cct cag gat cca tgt tcc agt gat gct ggg aga	804
His Gly Val Arg His Pro Gln Asp Pro Cys Ser Ser Asp Ala Gly Arg	
195 200 205	
aag aga ggc ccg ggc acc cca gcc ccc act ggc ctc agc gcc cct ctg	852
Lys Arg Gly Pro Gly Thr Pro Ala Pro Thr Gly Leu Ser Ala Pro Leu	
210 215 220	
agc ttc atc cct cgc cac ttc aga ccc aag gga gca ggc agc aca act	900
Ser Phe Ile Pro Arg His Phe Arg Pro Lys Gly Ala Gly Ser Thr Thr	
225 230 235	
gtc aag atc gtc ctg aag gag aaa cat aag aaa gcc tgt gtg cat ggc	948
Val Lys Ile Val Leu Lys Glu Lys His Lys Lys Ala Cys Val His Gly	
240 245 250 255	
ggg aag acg tac tcc cac ggg gag gtg tgg cac ccg gcc ttc cgt gcc	996
Gly Lys Thr Tyr Ser His Gly Glu Val Trp His Pro Ala Phe Arg Ala	
260 265 270	
ttc ggc ccc ttg ccc tgc atc cta tgc acc tgt gag gat ggc cgc cag	1044
Phe Gly Pro Leu Pro Cys Ile Leu Cys Thr Cys Glu Asp Gly Arg Gln	
275 280 285	
gac tgc cag cgt gtg acc tgt ccc acc gag tac ccc tgc cgt cac ccc	1092
Asp Cys Gln Arg Val Thr Cys Pro Thr Glu Tyr Pro Cys Arg His Pro	
290 295 300	
gag aaa gtg gct ggg aag tgc tgc aag att tgc cca gag gac aaa gca	1140
Glu Lys Val Ala Gly Lys Cys Cys Lys Ile Cys Pro Glu Asp Lys Ala	
305 310 315	
gac cct ggc cac agt gag atc agt tct acc agg tgt ccc aag gca ccg	1188
Asp Pro Gly His Ser Glu Ile Ser Ser Thr Arg Cys Pro Lys Ala Pro	
320 325 330 335	
ggc ccg gtc ctc gtc cac aca tcg gta tcc cca agc cca gac aac ctg	1236
Gly Arg Val Leu Val His Thr Ser Val Ser Pro Ser Pro Asp Asn Leu	
340 345 350	
cgt cgc ttt gcc ctg gaa cac gag gcc tcg gac ttg gtg gag atc tac	1284
Arg Arg Phe Ala Leu Glu His Glu Ala Ser Asp Leu Val Glu Ile Tyr	
355 360 365	
ctc tgg aag ctg gtg aaa gga atc ttc cac ttg act cag atc aag aaa	1332
Leu Trp Lys Leu Val Lys Gly Ile Phe His Leu Thr Gln Ile Lys Lys	
370 375 380	
gtc agg aag caa gac ttc cag aaa gag gca cag cac ttc cga ctg ctc	1380
Val Arg Lys Gln Asp Phe Gln Lys Glu Ala Gln His Phe Arg Leu Leu	
385 390 395	

【図3C】

FIG. 3C

```

gct ggc ccc cac gaa ggt cac tgg aac gtc ttc cta gcc cag acc ctg 1428
Ala Gly Pro His Glu Gly His Trp Asn Val Phe Leu Ala Gln Thr Leu
400                405                410                415

gag ctg aag gtc acg gcc agt cca gac aaa gtg acc aag aca 1470
Glu Leu Lys Val Thr Ala Ser Pro Asp Lys Val Thr Lys Thr
                420                425

taacaaagac ctaacagttg cagatatgag ctgtataatt gttgttatta tatattaata 1530

aataagaagt tgcattacc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1570

```

【図 4 A】

FIG. 4A

```

1                               50
huCHD  MPSLDPAPPAPLILLGLLLGSRPARGAGPEPPVLPISRSEKEPLPVRGAAG
huCHL  ---MGGMKYEFSLFFFLLEG-----GKTEQVKHSETY
huCHL2 --MVPEVRVLSSTLEGLALLWFP-----LDSHARARPDMP

51                               100
huCHD  CTFGCKVYALDETHEDLGEFFGVMRCLGACEAPQWRRTRGPGGRVSCK
huCHL  CMFQDKKYRVGERWHPYL-EFYGLVYCVNCLCSENGNVLCSF-----
huCHL2 CLFHGKRYSPGESWHPYL-EFQGLMYGRCTCSEGAHVSCYR-----

101                              150
huCHD  NIKPEOPTPACGQPROLDGHCOTCPQERSSESRQPSGLSFEYPRDPEHR
huCHL  ---VRCPNVHCLSEVHIFHLCCPRCPEDSLPPVN----NKVTSKSCEYNG
huCHL2 ---LHCQPVHCQPVTEPOCCPKVEPHHPSG----LRAPPKSCQING

151                              200
huCHD  SYSDRGEFGAERARGDHTDFVALLTGPRSQAVARARVSLRSSLRFSI
huCHL  TTYQHGEIFVAEGLFQNRQPNQCTQCSCEG-----
huCHL2 TMYQHGEIFSAHELFP SRLPNQCVLCSCTEG-----

201                              250
huCHD  SYRRLDRPTRIRFSDSNQSVLFEHPAAPTQDGLVCGVWRAVPRLSLRLLR
huCHL  -----NVYCGLKTCPKLTCAFPVSPDSCCRVCRGDG-ELSW
huCHL2 -----QIYCGLTTCPEEGCPAPLPLPDSCCQACKDASEQSD

251                              300
huCHD  AEQLHVALVTLTHPSGEVWGFLIRHRALAAETFSAILTLEGPPQOGVGGI
huCHL  EHSDDGDI FRQPANREARHSYHRSHYDPPPSRQAGGLSRFP-----
huCHL2 EEDSVQSLHGVRHPQDPCSSDAGRKRGPPTPAFTGLS-----

301                              350
huCHD  TLLTLDSTEDSLHFLLLFRGLLEPRSSGLTOVPERLQILEQGQLRELQA
huCHL  -----GARSHRGALMDSQOASGTIYQIVNNKHKHGQVCVSNQ
huCHL2 -----APLSFI PRHFRPKGAGSTTVKIVLKEKHKK--ACVHGG

351                              400
huCHD  NVSAQEPGFAEVLNLTIQEMDWLVGELQMALEWAGRPGLRISGHIAAR
huCHL  KTYSHGESWHPNLRAFGTVECVLCTCNVTKECKEHLCPNRYPCKYPOKI
huCHL2 KTYSHGEVWHPAFRAFGLPCILCTCEEGRODCQRVTCPTTEYPCRHPKVI

401                              450
huCHD  KSCDVLQSVLCGADALTEVQI GAAGSASLTLGNGSLIYQVQVVGTSSEV
huCHL  DGKCKKVC PGKKAKEELPGQSF DNKGYFCGEETMPVYESVFMEDGETTRK
huCHL2 AGKCKKICP---EDKADPGHSEIESTRCPKAPGRVLVHTSVSPDNLRR

451                              500
huCHD  VAMTLETKPQRDRQRTVLCHEMAGLQPGGHTAVGICPGLGARGAHMLQNE
huCHL  IALETERPPQ-----VEVHVWTKK-----ILQHF
huCHL2 FALEHEASDL-----VEIYLWKLVKG-----IFHLT

```

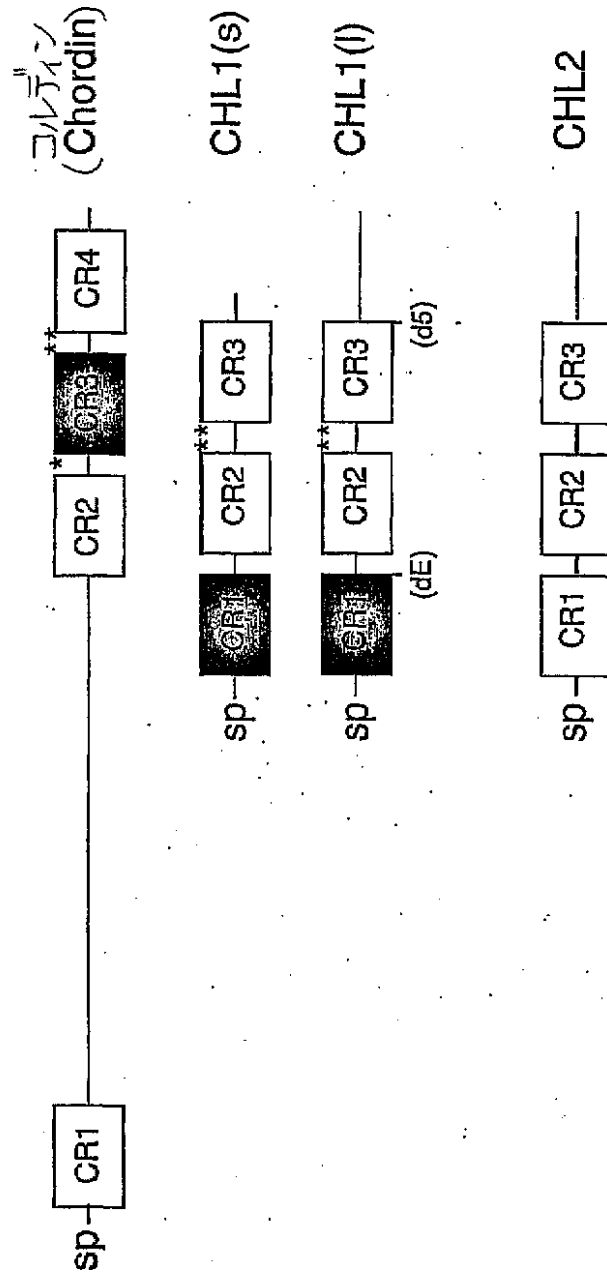
【図 4 B】

FIG. 4B

	501	550
huCHD	LFLNVGTRKDFPDGELRGHVAALPYCGHSARHDTLPVPLAGALVLEPPVKIQ	
huCHL	HI EKTSKR-MFRELPHFKLVIRTTLSQWKLFTEGEAQISOMCSSRVCRTE	
huCHL2	QIKKVRKQDFQKEAQHFRLLAGPHEGHWNVFLAQTLLELKVITASPKVTKT	
	551	600
huCHD	AAGHAWLSLDTHCHLHYEVLLAGLGGSEQGTVTAHLLGPPGTPGPRRLK	
huCHL	LEDLVKVLVLERSEKHC-----	
huCHL2	-----	
	601	650
huCHD	GFYGSSEAQGVVKDLEPELLRHLAKGMASLLITTKGSPRGELRGQVHIANQ	
huCHL	-----	
huCHL2	-----	
	651	700
huCHD	CEVGGRLREAGAEGVRALGAPDTASAAPVVPGLPALAPAKPGGPRPR	
huCHL	-----	
huCHL2	-----	
	701	750
huCHD	DFNTCFFEGQQRPHGARWAPNYDPLCSLCTCQRRTVICDPVVCPPPSCPH	
huCHL	-----	
huCHL2	-----	
	751	800
huCHD	PVQAPDQCCPVCPEKQDVRDLPGLPRSRDPGEGCYFDGDRSWRAAGTRWH	
huCHL	-----	
huCHL2	-----	
	801	850
huCHD	FVVPPFGLIKCAVCTCKGGTGEVHCEKVQCPRLLCAQPVRVNPDCCKQC	
huCHL	-----	
huCHL2	-----	
	851	900
huCHD	PVSGAHPQLGDPMQADGPRGCRFAGQWFPESQSWHPSVPPFGEMSCITC	
huCHL	-----	
huCHL2	-----	
	901	950
huCHD	RCGAGVPHCERDDCSLPLSCGSGKESRCCSRCTAHRRPAPETRTDPELEK	
huCHL	-----	
huCHL2	-----	
	951	
huCHD	EAEGS	
huCHL	-----	
huCHL2	-----	

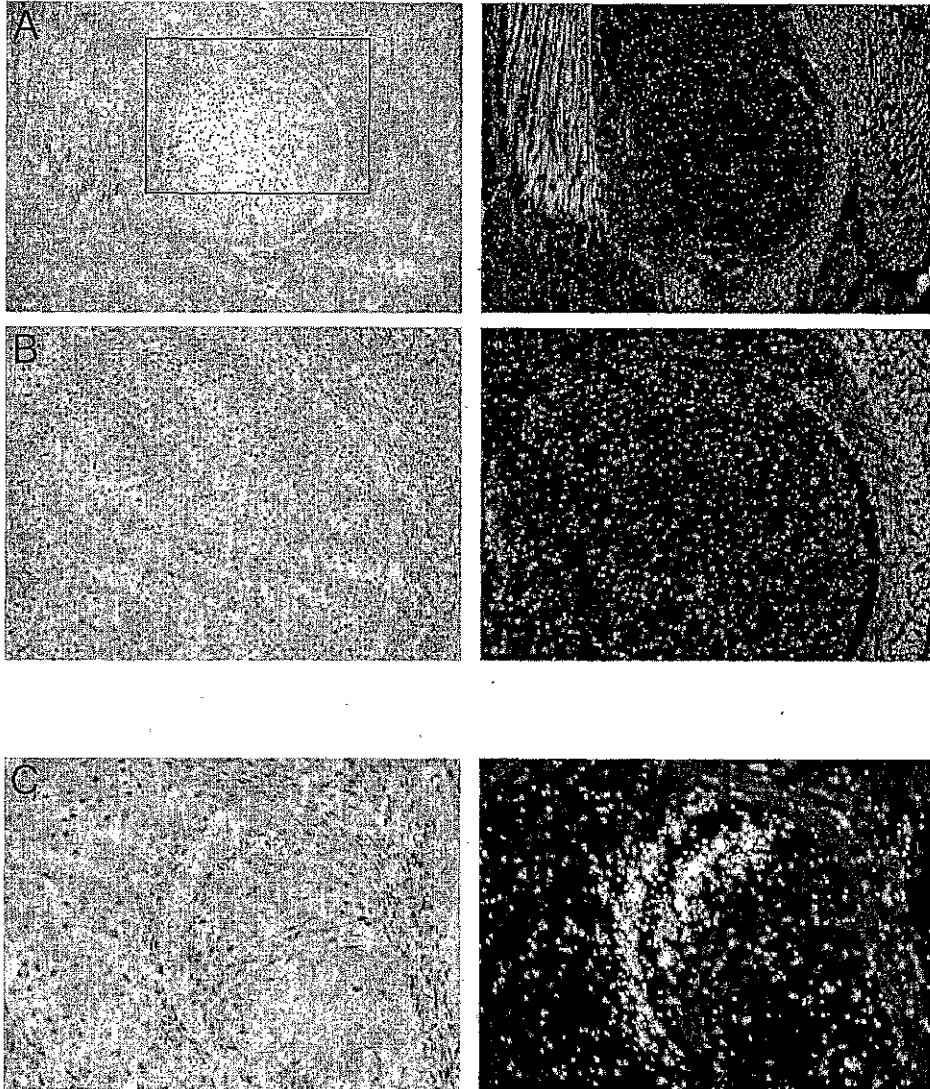
【図5】

FIG. 5



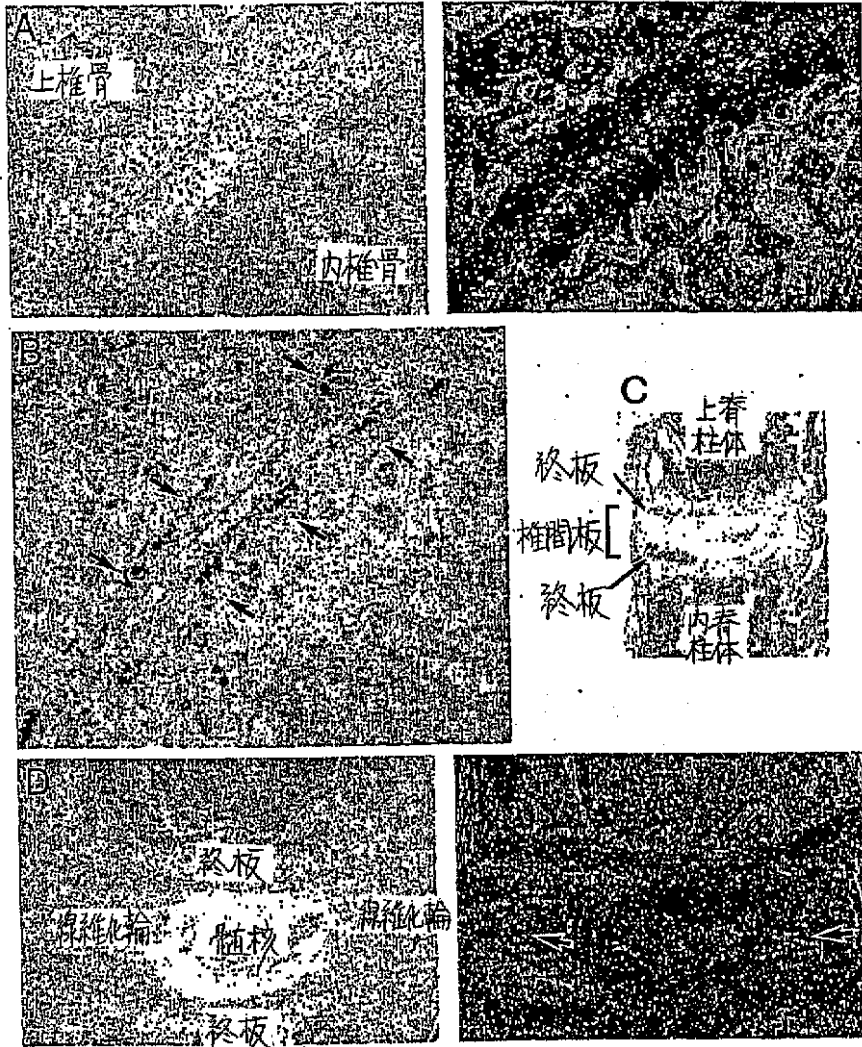
【図6】

FIG. 6



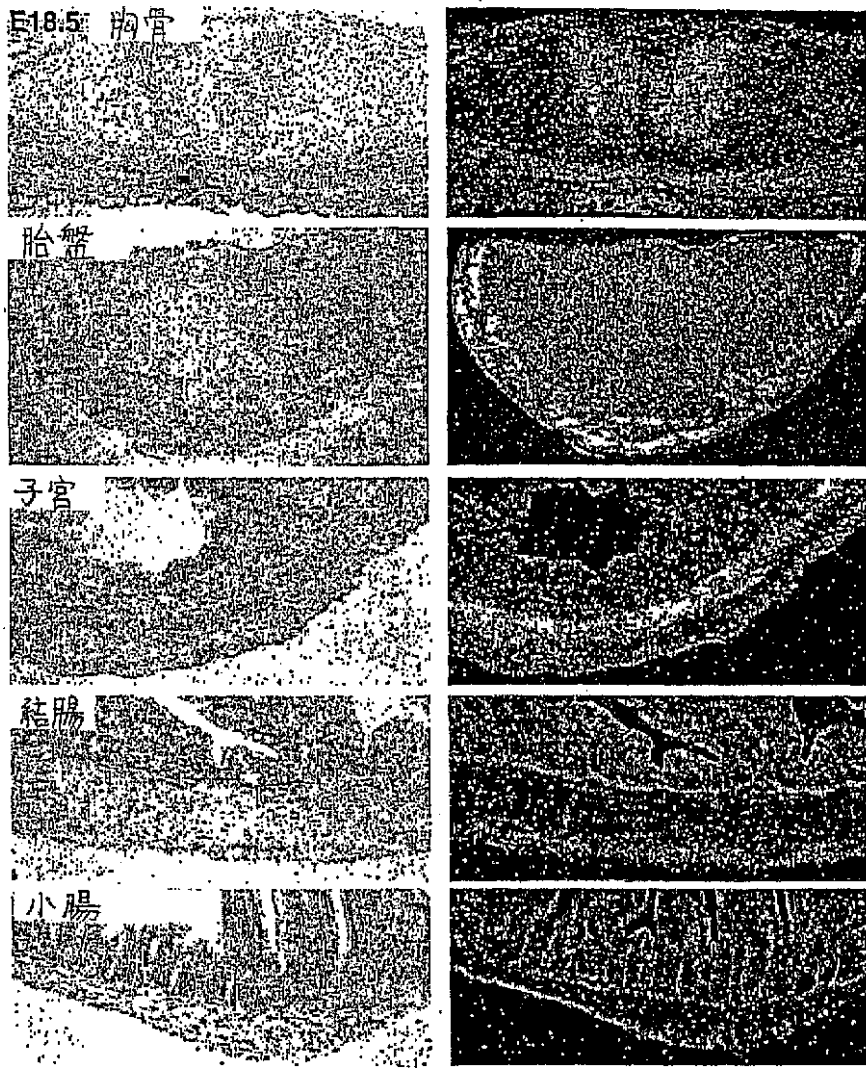
【图7】

FIG. 7



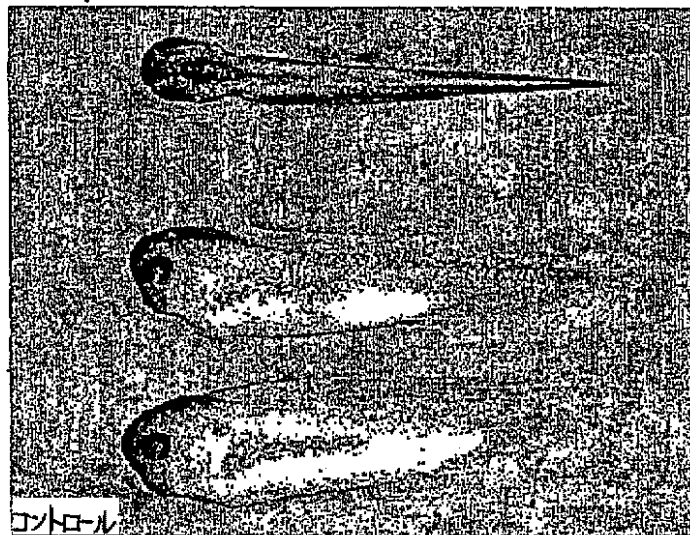
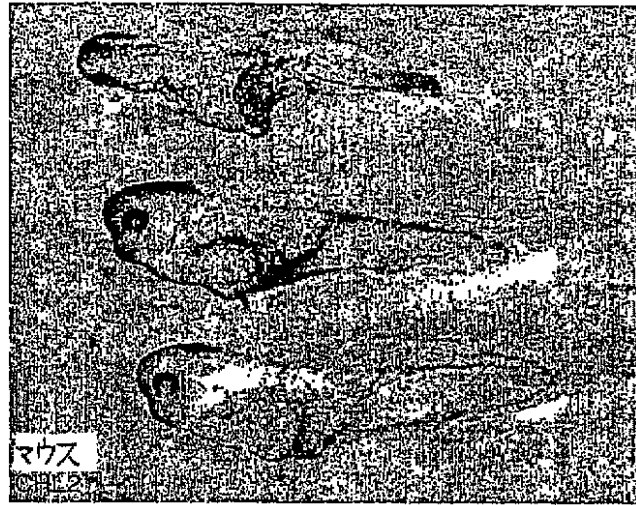
【圖8】

FIG. 8



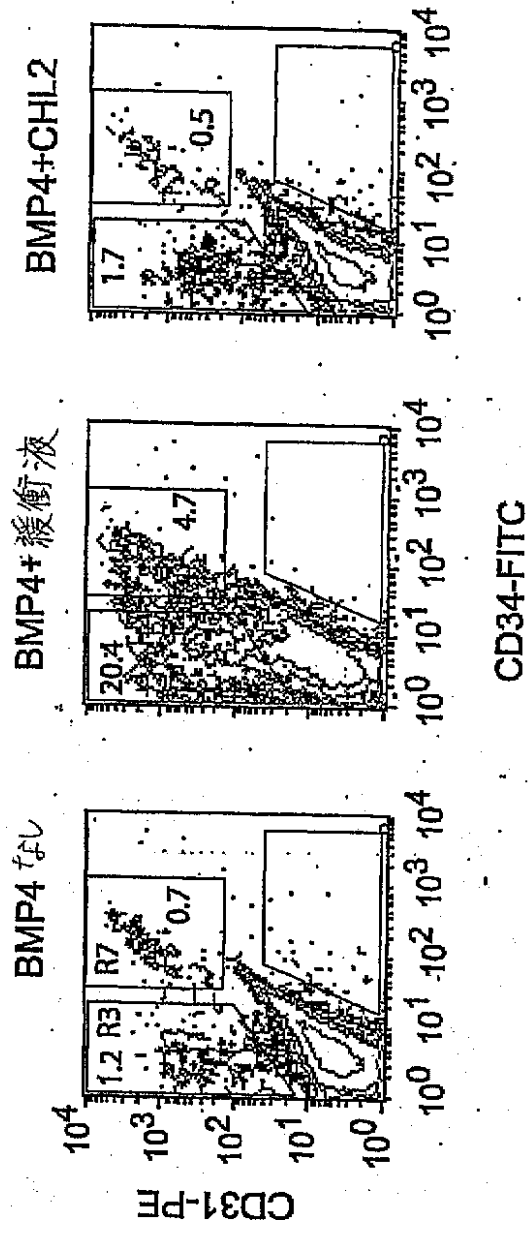
【図9】

FIG. 9



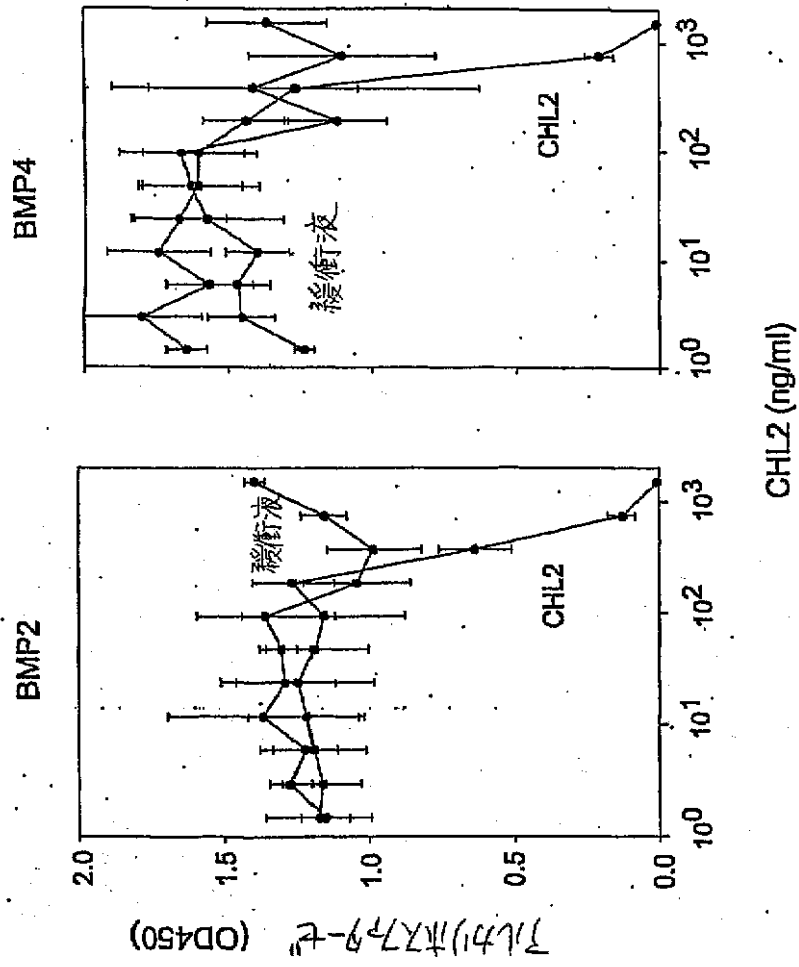
【図10】

FIG. 10



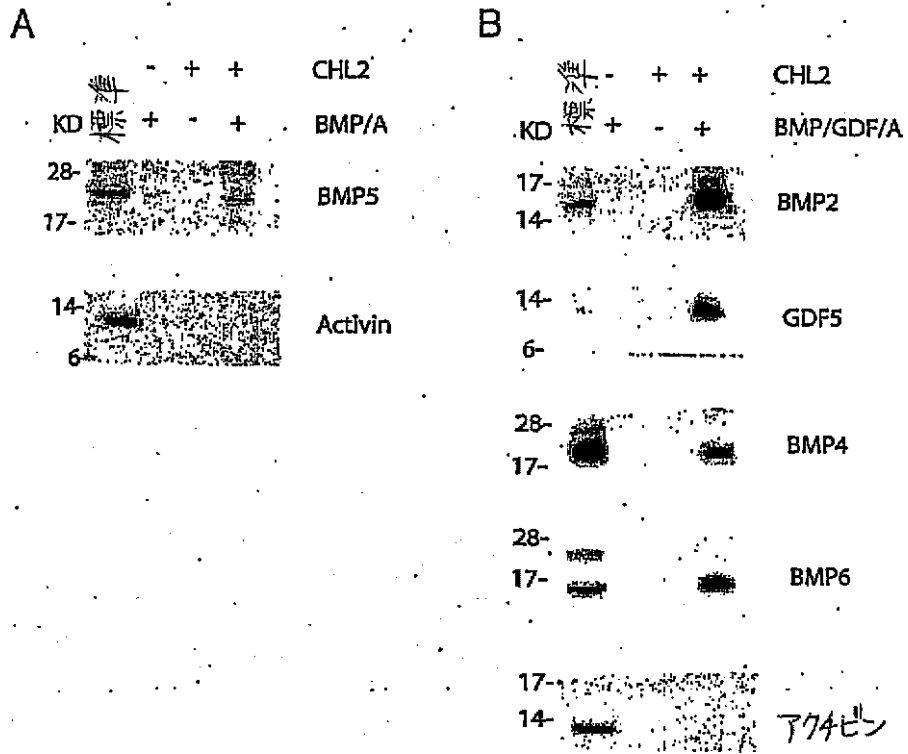
【図11】

FIG. 11



【図12】

FIG. 12



【手続補正書】

【提出日】平成14年9月19日(2002.9.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、コルディン様(Chordin-Like)-2(CHL2)ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、CHL2ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞および方法に関する。本発明はさらに、CHL2ポリペプチドと関連する疾患、障害、および状態の診断、処置、改善、および/または予防のための薬学的組成物および方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療因子の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と結合されて、ゲノムの一部および全体への重複配列の集合ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較によって、以前に同定された配列および/または構造の目印に対して相同性の程度を決定することが可能になる。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤としての使用に関して生成物に対して有利な特性を与え得る。

【0003】

過去10年間にわたるゲノム研究における有意な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に対する可能性は、未だ広く理解されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド(これらは、治療分子に対して「標的」として働き得る)は、未だ同定されていない。

【0004】

従って、診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【0005】

CHL2は、コルディン(CHD)として公知の骨形態発生タンパク質(BMP)インヒビター(Sasaiら、1994、Cell 79:779-90)、または短い原腸形成(SOG; Francoisら、1994、Genes Dev. 8:2602-16)に構造的に関連する。CHL2遺伝子は、CHD/SOGファミリーのメンバーであると考えられる。

【0006】

骨形態発生タンパク質(BMP)は、トランスフォーミング増殖因子ファミリーのメンバーであり、これは、本来、カートリッジインプラント(cartridge implant)から骨形成を促進する因子として同定された(Wozneyら、1988、Science 242:1528-34; Celesteら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9843-47)。BMPはまた、カエル、ハエの初期胚形成の間、および哺乳動物において不可欠の役割を果たすことが知られている。活性BMPの正確な濃度は、特定の細胞型の特異化のために重要なようである(Daleら、1992、Development 115:573-85; Doschら、1997、Development 124:2325-34)。BMP2/4の活性勾配は、例えば、Xenopus胚(ここでは、背面先端で、最も低い発現が検出され、そして腹側先端で、最も高い発現が観察される)において観察され、胚において、背腹側軸決定を確立する。別の例において、組織発生の特定の部位でのBMP濃度の制御は、器官形成におけるBMPについての役割を示唆する。BMP発

現の制御は、BMP遺伝子産物の局在化した発現によってか、またはBMPインヒビターコルディン(CHD)(Sasaiら、1994、Cell 79:779-90) - または短い原腸形成(SOG)(Francoisら、1994、Genes Dev. 8:2602-16)の影響によってのいずれかで、達成される。

【0007】

CHD/SOGは、Spemann形成体(Xenopus胚形成の原腸形成段階での背腹側軸特異化のためのマスターコントロール(master-controlling)領域)から産生された大きな分泌タンパク質である。CHD/SOGは、Noggin(SmithおよびHarland、1992、Cell 70:829-40)(これもまた、形成体から分泌される)が機能するように、背方化因子として機能する。Drosophila SOGは、そのアミノ末端に膜貫通ドメインを有し、それがII型膜貫通タンパク質であり得ることを示唆する(Francoisら、1994、Genes Dev. 8:2602-16)。Drosophila SOGのカルボキシル末端側(細胞外ドメイン)は、切断されることが提案された。しかし、Xenopus CHD(Sasaiら、1994、Cell 79:779-90)、ゼブラフィッシュCHD(Schulte-Merkerら、1997、Nature 387:862-63)およびマウスCHD(Pappanoら、1998、Genomics 52:236-39)は、膜貫通ドメインを含まない。代わりに、これらのタンパク質は、シグナルペプチドを有し、そして直接分泌される。CHD/SOGポリペプチドは、システインリッチなドメインの4つの繰り返し(CR1-4)を含み、このドメインはまた、コラーゲンおよびトロンボスポンジンのような種々の細胞外マトリックスタンパク質において見いだされる。

【0008】

CHD/SOGは、腹方化因子の1つであるBMP4に結合することが知られている(Piccolloら、1996、Cell 86:589-98)。BMP4は、マウスにおいて、後方腹側中葉胚の胚発生のために不可欠であることが示された(Winnierら、1995、Genes Dev. 9:2105-

16)。CHD/SOGのBMP4への結合は、BMP4がそのレセプターへ結合することを妨げることによって、BMP4活性を阻害する(Piccoloら、1996、Cell 86:589-98)。この点において、CHD/SOGとBMP4との間の機能的関係は、OPGとOPGLとの間の機能的関係と類似するが、CHD/SOGは、構造的にはBMPレセプターに関連しない。CHD/SOGのBMP4への結合親和性は、特異的かつ密接であり($K_d = 3 \times 10^{-10} M$ (Piccoloら、1996、Cell 86:589-98))、そして結合したBMP4の放出を達成するためにタンパク質分解を必要とするようである。このタンパク質分解は、特定のメタロプロテアーゼ(Tolloid (TLD) またはBMP1)によって達成され、これは、第1のCRモチーフ(CR1)および最後のCRモチーフ(CR4)のいずれか、あるいは両方を遊離させるためにCHD/SOGを切断する(Piccoloら、1997、Cell 91:407-16)。CHD/SOGが、それ自身のレセプターによって他の機能または独立した機能を有するか否かは、なお決定されるべきである。

【0009】

CHD/SOGの最も重要な役割の1つは、BMP4モルフォゲン勾配を確立することである(JonesおよびSmith、1998、Dev. Biol. 194:12-17)。BMP4それ自体は、短い距離を移動するのみで、そして細胞上で自律的に基本的に作用するようである(Jonesら、1996、Curr. Biol. 6:1468-75)。対照的に、BMP4インヒビターNogginおよびCHD/SOGは、遠大な効果を及ぼすようであり、それによってBMP4の活性勾配を形成する。

【0010】

BMPはまた、初期胚形成の外に、例えば、肺、腸、腎臓、皮膚、心臓および歯の器官形成において、ならびに胚形成の後期段階において、重要な役割を果たす(Hogan、1996、Genes Dev. 10:1580-94)。いくつかのBMPは、非常に局在化した形態で発現するが、他は、組織に広く発現する。器官形成におけるBMPの局在化した作用の重要性は、構築物(これによって、BMP濃度は、標的組織中で人工的に増強される)を用いたトランスジェ

ニックマウス実験によって支持された。肺の場合、BMP4は、発生している肺の上皮の遠位端で発現し、そしてサーファクタント(surfactant)プロテインCプロモーターによって過剰発現される場合、構造的組織化(すなわち、分枝形成)が激しく崩壊された小肺の発生が観察される(Belluscìら、1996、Development 122:1693-702)。推定のBMP活性勾配はまた、導入遺伝子発現によって崩壊され得るので、組織に広く発現したBMPはまた、組織の構造的組織化の決定において役割を果たし得る。

【0011】

Nogginは、Spemann形成体から分泌された別のBMP2/4インヒビターである(Zimmermanら、1996、Cell 86:599-606)。Nogginの生物学的役割およびその作用様式は、XenopusにおけるCHD/SOGと類似する。Nogginの最も顕著な機能は、CHD/SOGのように、背方化であるが、Noggin無発現変異(null-mutant)マウスは、初期の胚表現型の代わりに骨表現型(軟骨細胞の過形成)を示した(McMahonら、1998、Genes Dev. 12:1438-52; Brunetら、1998、Science 280:1455-57)。これは、CHL2またはCHDさえも、胚形成の後期段階において、必要な機能を有し得ることを示唆する。

【0012】

(発明の要旨)

本発明は、新規CHL2の核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0013】

本発明は、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下：

- (a) 配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列；
- (b) ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートのヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(d) (a) ~ (c) のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および

(e) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0014】

本発明はまた、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1もしくは配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートのヌクレオチド配列、または(a)のヌクレオチド配列の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサート、(a)または(b)のヌクレオチド配列の領域であって、ここで、このポリペプチドフラグメントは、配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；

(d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサート、または(a) ~ (c) ใดれかのヌクレオチド配列の領域；

(e) 中程度または高度にストリンジエントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a) ~ (d) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0015】

本発明はさらに、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下；

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)~(e)のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)~(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)~(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0016】

本発明は、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列；および

(b) ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0017】

本発明はまた、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、以下：

(a) 配列番号3または配列番号6のいずれかに記載されており、必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号5のいずれかのオルソログに対するアミノ酸配列；

(c) 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、このフラグメントは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドセットの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列、ATCC受託番号PTA-1479もしくはPTA-1480のいずれか中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、または(a)~(c)のいずれかに記載のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【0018】

本発明はさらに、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、以

下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0019】

本発明はなおさらに、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、以下：

2位のロイシンまたはメチオニン；5位のメチオニン；6位のリジン；7位のアラニン；8位のイソロイシン；14位のフェニルアラニン；15位のロイシン；23位のトレオニン；25位のロイシン；27位のバリン；30位のグルタミン

酸； 32位のチロシン； 34位のメチオニン； 36位のグルタミン； 39位のリジン； 41位のアラニン； 45位のトレオニン； 55位のバリン； 59位のバリン； 60位のアスパラギン； 66位のプロリン； 68位のアスパラギン； 72位のセリンまたはトレオニン； 74位のバリン； 75位のアルギニン； 94位のアルギニン； 99位のアスパラギン； 100位のセリン； 105位のリジン； 106位のバリン； 113位のチロシン； 116位のセリン； 118位のセリン； 120位のアルギニン； 123位のロイシン； 125位のアラニン； 129位のアラニン； 139位のアラニン； 142位のトレオニン； 144位のセリン； 147位のアスパラギン； 148位のバリン； 149位のセリン； 159位のアラニン； 160位のアラニン； 161位のアラニン； 164位のバリン； 166位のバリン； 173位のバリン； 175位のアルギニン； 177位のアスパラギン酸； 190位のアラニン； 191位のフェニルアラニン； 192位のアルギニン； 194位のロイシン； 196位のアスパラギン； 205位のロイシン； 210位のアラニン； 212位のアラニン； 213位のセリン； 216位のアラニン； 217位のセリン； 218位のアラニン； 219位のイソロイシン； 222位のアラニン； 225位のロイシン； 226位のフェニルアラニン； 230位のロイシン； 233位のグルタミンまたはアルギニン； 241位のグルタミン； 242位のロイシン； 244位のイソロイシン； 245位のグルタミンまたはアスパラギン； 249位のグルタミン； 251位のロイシンまたはバリン； 256位のアラニン； 257位のアスパラギン； 259位のセリン； 260位のアラニン； 261位のグルタミン； 265位のフェニルアラニン； 268位のバリン； 269位のロイシン； 272位のロイシン； 275位のバリン； 278位のバリン； 284位のグルタミン酸； 288位のグルタミン酸； 292位のアラニンまたはイソロイシン； 300位のセリン； 306位のイソロイシン； 313位のバリン； 314位のセリン； 319位のロイシン； 323位のグルタミン； 324位のトレオニン； 326位のアラニン； 327位のアラニン； 329位のセリン； 331位のセリン； 334位のロイシン； 337位のアスパラギン； 339位のバリン； 340位のロイシン； 342位のセリン； 344位のフェニルアラニン； 349位のグルタミン酸； 354位のイソロイシンまたはバリン； 356位のメチオ

ニン；366位のバリン；368位のメチオニンまたはバリン；371位のイソロイシン；375位のロイシン；376位のロイシン；377位のグルタミン；381位のフェニルアラニン；383位のアスパラギン；384位のイソロイシン；393位のロイシン；395位のア르기ニン；398位のバリン；399位のアラニンまたはバリン；403位のチロシン；406位のアスパラギン；409位のイソロイシン；415位のアラニンまたはバリン；417位のイソロイシン；および421位のロイシンからなる群より選択される少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号5に示されるポリペプチドの活性を有する。

【0020】

CHL2アミノ酸配列を含む融合ポリペプチドがまた、提供される。

【0021】

本発明はまた、本明細書中に示されるような単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示されるような組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、およびCHL2ポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、この宿主細胞を培養する工程、必要に応じてそのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する。

【0022】

CHL2ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物がまた、本発明に含まれる。CHL2核酸分子は、CHL2ポリペプチドの発現およびCHL2ポリペプチドの増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、CHL2核酸分子は、内因性CHL2ポリペプチドの発現を阻害する様式で動物に導入される（すなわち、CHL2ポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するトランスジェニック動物を作製する）。トランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはげっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。

。

【0023】

本発明のC H L 2ポリペプチドの誘導体がまた、提供される。

【0024】

本発明のC H L 2ポリペプチドに特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が、さらに提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニストのものであってもアンタゴニストのものであってもよい。

【0025】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、もしくは選択的結合因子ならびに1つ以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物がまた、本発明によって含まれる。薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0026】

本発明のC H L 2ポリペプチドおよびC H L 2核酸分子は、疾患および障害（本明細書中に列挙されるものを含む）を処置、予防、改善、および/または検出するための使用され得る。

【0027】

本発明はまた、C H L 2ポリペプチドに結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、C H L 2ポリペプチドを試験分子と接触させて、この試験分子のこのポリペプチドに対する結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、C H L 2ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する工程を包含する。本発明はさらに、C H L 2ポリペプチドの発現またはC H L 2ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【0028】

C H L 2ポリペプチドの発現を調整する方法およびC H L 2ポリペプチドのレベルを調節する（すなわち、増加するか、または減少する）方法がまた、本発明によって含まれる。1つの方法は、C H L 2ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、C H L 2ポリペプチドの発現を調整または調節するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これら

の方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるように、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

【0029】

本発明の別の局面において、CHL2ポリペプチドは、そのレセプター（「CHL2ポリペプチドレセプター」）を同定するために使用され得る。種々の形態の「発現クローニング」は、タンパク質リガンドに対するレセプターをクローニングするために広範囲に使用されている。例えば、SimonsenおよびLodish、1994、Trends Pharmacol. Sci. 15:437-41ならびにTartagliaら、1995、Cell 83:1263-71を参照のこと。CHL2ポリペプチドレセプターの単離は、CHL2ポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストの同定または開発に有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性CHL2ポリペプチドレセプター、抗CHL2ポリペプチドレセプター選択的結合因子（例えば、抗体およびその誘導体）、低分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらのうちのいずれかは、1つ以上の疾患または障害（本明細書中に開示されるものを含む）の処置のために使用され得る。

【0030】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の表題は、組織的な目的のみのためであり、そして記載される内容を限定するようには解釈されるべきではない。本願において列挙される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される。

【0031】

（定義）

用語「CHL2遺伝子」または「CHL2核酸分子」あるいは「CHL2ポリヌクレオチド」とは、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1479またはPTA-1480のいずれかにおけるDNA挿入物のヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むか、またはこれらからなる核酸分子をいう。

【0032】

用語「CHL2ポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替的な形態のうちの1つをいう。

【0033】

用語「CHL2ポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるCHL2ポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常はRNA）をいう。

【0034】

用語「単離された核酸分子」とは、(1)総核酸が供給源細胞から単離される場合に、これが天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50パーセントから分離された本発明の核酸分子、(2)「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、(3)天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、あるいは(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在しない本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、任意の他の混入核酸分子、またはその天然の環境において見出される他の混入物（これらは、ポリペプチド産生におけるその使用、またはその治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる）を実質的に含まない。

【0035】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNAまたはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン(pseudoisocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシ-メチ

ルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6 - イソ - ペンテニルアデニン、1 - メチルアデニン、1 - メチルプソイドウラシル、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチル - グアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノ - メチル - 2 - チオウラシル、 β - D - マンノシルキューオシン (β - D - mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボニル - メチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシブトキソシン (oxybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、および2 , 6 - ジアミノプリン。

【0036】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。

【0037】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切であり、そして挿入された異種核酸配列の発現を、指示および/または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0038】

用語「作動可能に連結された」は、本明細書中で、隣接配列の配置をいうために使用され、ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように構成または構築される。従って、コード配列に作動可能に連結した隣接配列は、このコード配列の複製、転写および/または翻訳を行うことが可能であり得る。例えば、コード配列は、プロモーターがこのコード配列の転写を指示し得る場合に、このプロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、これが

正確に機能する限り、コード配列と連続する必要はない。従って、例えば、介在する非翻訳性であるが転写される配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、なおこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。

【0039】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたか、または形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞をいうために使用される。この用語は、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。

【0040】

用語「CHL2ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連するポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、CHL2ポリペプチドフラグメント、CHL2ポリペプチドオルソログ、CHL2ポリペプチド改変体、およびCHL2ポリペプチド誘導体が挙げられ、これらは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有する。CHL2ポリペプチドは、本明細書中で定義される成熟ポリペプチドであり得、そしてこれらが調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

【0041】

用語「CHL2ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）での短縮化および/またはカルボキシル末端での短縮化を含むポリペプチドをいう。用語「CHL2ポリペプチドフラグメント」はまた、CHL2ポリペプチドオルソログ、CHL2ポリペプチド誘導体、またはCHL2ポリペプチド改変体のアミノ末端および/またはカルボキシル末端短縮化、あるいはCHL2ポリペプチド対立遺伝子改変体またはCHL2ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシル末端短縮化をいう。CHL2ポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシング、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。CHL2ポリ

ペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮化および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸、または約200より多くのアミノ酸を含む。このようなCHL2ポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、CHL2ポリペプチドに対する抗体を生成するために使用され得ることが理解される。

【0042】

用語「CHL2ポリペプチドオルソログ」は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるCHL2ポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのCHL2ポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0043】

用語「CHL2ポリペプチド改変体」は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるCHL2ポリペプチドアミノ酸配列（リーダー配列を有するかまたは有さない）と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および/またはCHL2ポリペプチドフラグメント）、および/または付加（例えば、内部付加および/またはCHL2融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むCHL2ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する（例えば、CHL2ポリペプチド対立遺伝子改変体、CHL2ポリペプチドオルソログ、およびCHL2ポリペプチドスプライス改変体）か、または、人工的に構築され得る。このようなCHL2ポリペプチド改変体は、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるDNA配列から変化するDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、1~3、または1~5、または1~10、または1~15、または1~20、または1~25、または1~50、または1~75、または1~100、または100よ

り多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および/または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

【0044】

用語「CHL2ポリペプチド誘導体」は、本明細書中で定義される、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド、CHL2ポリペプチドフラグメント、CHL2ポリペプチドオルソログ、またはCHL2ポリペプチド改変体をいい、これらは、化学的に改変されている。用語「CHL2ポリペプチド誘導体」はまた、本明細書中で定義されるCHL2ポリペプチド対立遺伝子改変体またはCHL2ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドをいい、これは化学的に改変されている。

【0045】

用語「成熟CHL2ポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したCHL2ポリペプチドをいう。成熟CHL2ポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および/またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N連結および/またはO連結グリコシル化など）を含み得る。例示的な成熟CHL2ポリペプチドは、配列番号3および配列番号6のアミノ酸配列によって示される。

【0046】

用語「CHL2融合ポリペプチド」は、本明細書中で定義される、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド、CHL2ポリペプチドフラグメント、CHL2ポリペプチドオルソログ、CHL2ポリペプチド改変体、またはCHL2誘導体のアミノ末端またはカルボキシ末端での、1つ以上のアミノ酸の融合（例えば、異種タンパク質またはペプチド）をいう。用語「CHL2融合ポリペプチド」はまた、本明細書中で定義されるCHL2ポリペプチド対立遺伝子改変体またはCHL2ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端での、1つ以上のアミノ酸の融合をいう。

【0047】

用語「生物学的に活性なC H L 2ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドの、少なくとも1つの活性特徴を有するC H L 2ポリペプチドをいう。さらに、C H L 2ポリペプチドは、免疫原として活性であり得る；すなわち、このC H L 2ポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。

【0048】

用語「単離されたポリペプチド」とは、(1)供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるポリペプチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50%から単離された本発明のポリペプチド、(2)「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に連結しない(共有結合的または非共有結合的相互作用によって)、本発明のポリペプチド、(3)天然には連結しないポリペプチドに作動可能に連結(共有結合的または非共有結合的相互作用によって)する、本発明のポリペプチド、あるいは(4)天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、任意の他の混入ポリペプチドまたは天然の環境において見出される他の混入物(これは、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる)を実質的に含まない。

【0049】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、2つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定されるように、核酸分子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、2つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム(すなわち、「アルゴリズム」)によって焦点をあてられたギャップ整列(存在する場合)との間の一致の同一パーセントを評価する。

【0050】

用語「類似性」は、概念に関するが、「同一性」とは対照的に、「類似性」は

、同一的一致および保存的置換の一致の両方を含む関連性の基準をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば10/20個同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、どちらも50%である。同じ例において、保存的置換であるさらに5つの位置が存在する場合、同一性パーセントは50%のままであるが、類似性パーセントは75%(15/20)である。従って、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド間の類似性パーセントは、これらの2つのポリペプチド間の同一性パーセントよりも高い。

【0051】

用語「天然に存在する」または「ネイティブの」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的材料と関連して使用される場合、天然において見出され、そしてヒトによって操作されていない材料をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」は、本明細書中で使用される場合、天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成された材料をいう。

【0052】

用語「有効量」および「治療有効量」は、各々、本明細書中に示されるCHL2ポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるCHL2ポリペプチドまたはCHL2核酸分子の量をいう。

【0053】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのCHL2ポリペプチド、CHL2核酸分子、またはCHL2選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な1つ以上の処方材料をいう。

【0054】

用語「抗原」とは、選択的結合因子(例えば、抗体)により結合され得、そしてさらに動物において使用されて、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し得る分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

【0055】

用語「選択的結合因子」とは、CHL2ポリペプチドに特異性を有する分子（単数または複数）をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子の、ヒトCHL2ポリペプチドに結合し、かつヒト非CHL2ポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間変形（例えば、マウスCHL2ポリペプチドおよびラットCHL2ポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。

【0056】

用語「形質導入」とは、通常はファージによる1つの細菌から別の細菌への遺伝子の伝達をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および伝達をいう。

【0057】

用語「トランスフェクション」は、細胞による異種または外因性DNAの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性DNAが細胞膜内に導入された場合には「トランスフェクトされ」ている。多数のトランスフェクション技術は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、1973、Virology 52:456；Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989)；Davisら、Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, 1986)；およびChuら、1981、Gene 13:197を参照のこと。このような技術を使用して、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入し得る。

【0058】

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含有するように改変された場合に形質転換されている。例えば、細胞は、それがそのネイティブな状態から遺伝的に改変される場合に形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入に

続いて、DNAの形質転換は、物理的に細胞の染色体に組み込むことにより細胞のDNAと組換わり得るか、複製されることなしにエピソームエレメントとして一時的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立的に複製し得る。DNAが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたとみなされる。

【0059】

(核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

関連した核酸分子が、配列番号1または配列番号4のいずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を包含すること、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を包含することが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかにおけるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および/または欠失を含むかまたは本質的にこれらからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。このような関連したCHL2ポリペプチドは、例えば、1以上のN結合型もしくはO結合型のグリコシル化部位の付加および/もしくは欠失、または1以上のシステイン残基の付加および/もしくは欠失を含み得る。

【0060】

関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかのCHL2ポリペプチドの少なくとも約25個連続したアミノ酸、または約50個のアミノ酸、または約75個のアミノ酸、または約100個のアミノ酸、または約150個のアミノ酸、または約200個のアミノ酸、または200個より多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、CHL2核酸分子のフラグメントを含む。

【0061】

さらに、関連したCHL2核酸分子はまた、本明細書中で定義した中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1または配列番号4のいずれかのCHL2核酸分子、またはポリペプチド(このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む)をコードする分子、または本明細書中に定義した核酸フラグメント、または本明細書中に定義したポリペプチドをコードする核酸フラグメントの完全に相補的な配列とハイブリダイ

ズするヌクレオチド配列を含む分子を含む。ハイブリダイゼーションプローブは、関連した配列についてcDNAライブラリー、ゲノムDNAライブラリーまたは合成DNAライブラリーをスクリーニングするための本明細書中に提供されるCHL2配列を用いて、調製され得る。CHL2ポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して有意な同一性を示す領域は、本明細書中に記載される配列アライメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

【0062】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ有意に不一致のDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68 °Cでの0.015 M塩化ナトリウム(sodium CHL2 oride)、0.0015 Mクエン酸ナトリウムまたは42 °Cでの0.015 M塩化ナトリウム(sodium CHL2 oride)、0.0015 Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである。Sambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章(IRL Press Limited)を参照のこと。

【0063】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度が影響を受ける。他の薬剤は、非特異的および/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイ

ゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、 NaDodSO_4 、(SDS)、フィコール(ficoll)、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA(または別の非相補的DNA)および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH6.8~7.4で実施される;しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHからほぼ無関係である。Andersonら, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* 第4章(IRL Press Limited)を参照のこと。

【0064】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対の不一致程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって推定され得る:

$$T_m(\text{ }) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 600/N - 0.72(\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中でのナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中での(グアニン+シトシン)塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度は、1%の不一致毎に約1 低下する。

【0065】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、5

0 ~ 65 での0.015 M塩化ナトリウム (sodium chloride)、0.0015 Mクエン酸ナトリウムまたは37 ~ 50 での0.015 M塩化ナトリウム (sodium chloride)、0.0015 Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例示として、0.015 Mナトリウムイオンにおける50 という「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を可能にする。

【0066】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって理解される。例えば、0.015 Mナトリウムイオン (ホルムアミドなし) では、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71 である。65 で (同じイオン強度で) の洗浄を用いると、これは、約6%の不一致を可能にする。より遠く関連した配列を捕獲するために、当業者は、単に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。

【0067】

約20 ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについての1 M NaCl*中での融解温度の良好な推定は、以下によって与えられる：

$$T_m = A - T \text{塩基対あたり} 2 + G - C \text{塩基対あたり} 4$$

* 6 × 塩クエン酸ナトリウム (SSC) 中でのナトリウムイオン濃度は、1 Mである。Suggsら, Developmental Biology Using Purified Genes 683 (BrownおよびFox編, 1981) を参照のこと。

【0068】

オリゴヌクレオチドについての高ストリンジェンシー洗浄条件は、通常、6 × SSC、0.1% SDS中でのそのオリゴヌクレオチドのT_mよりも0 ~ 5 低い温度においてである。

【0069】

別の実施形態では、関連した核酸分子は、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列に対して少なくとも約70パーセント同一であ

るヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号2または配列番号5のいずれかに示すポリペプチドに対して少なくとも約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるか、またはヌクレオチド配列は、配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連した核酸分子は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有するポリペプチドをコードする。

【0070】

核酸配列における相違は、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的改変および/または非保存的改変をもたらし得る。

【0071】

配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対する、対応する改変）は、CHL2ポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生じる。対照的に、CHL2ポリペプチドの機能的特徴および/または化学的特徴における実質的な改変は、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得、これは以下の維持におけるその影響が有意に異なる：（a）例えば、シート状コンホメーションもしくは螺旋状コンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、（b）標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖のかさ高さ。

【0072】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性または電荷にほとんどまたは全く影響がないような、非ネイティブ残基によるネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンによって置換され得る。

【0073】

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるのではなく、化学的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態が挙げられる。

【0074】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、複数のクラスに分割され得る：

- 1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；
- 3) 酸性：Asp、Glu；
- 4) 塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- 5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro；および
- 6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0075】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーとの交換を含み得る。このような置換された残基は、非ヒトCHL2ポリペプチドと相同なヒトCHL2ポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同領域に導入され得る。

【0076】

このような変化を行う際に、アミノ酸のヒドロパシー指数 (hydrophobic index) が考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて、ヒドロパシー指数を割り当てられている。ヒドロパシー指数は、以下である：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3

. 8) ; フェニルアラニン (+ 2 . 8) ; システイン / シスチン (+ 2 . 5) ;
 メチオニン (+ 1 . 9) ; アラニン (+ 1 . 8) ; グリシン (- 0 . 4) ; スレ
 オニン (- 0 . 7) ; セリン (- 0 . 8) ; トリプトファン (- 0 . 9) ; チロ
 シン (- 1 . 3) ; プロリン (- 1 . 6) ; ヒスチジン (- 3 . 2) ; グルタミ
 ン酸 (- 3 . 5) ; グルタミン (- 3 . 5) ; アスパラギン酸 (- 3 . 5) ; ア
 スパラギン (- 3 . 5) ; リジン (- 3 . 9) ; およびアルギニン (- 4 . 5)

。

【0077】

タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与する際の、ヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該分野において一般的に理解されている (K y t e ら、1982, J. Mol. Biol. 157: 105 - 31)。特定のアミノ酸が類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸で置き換えられ得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ヒドロパシー指数に基づいて変化を起こす際に、ヒドロパシー指数が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0 . 5 以内であるものが、なおより特に好ましい。

【0078】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る (特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合においてと同様に、免疫学的実施形態における使用に関して意図される場合) こともまた、当該分野において理解されている。タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される場合に、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に相関する。

【0079】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン (+ 3 . 0) ; リジン (+ 3 . 0) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0 ± 1) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0 ± 1) ; セリン (+ 0 . 3) ; アスパラギン (+ 0 . 2) ; グルタミン (+ 0 . 2) ; グリシン (0) ; スレオニン (- 0 . 4) ; プロリン (- 0 . 5 ± 1) ; アラニン (- 0 . 5) ; ヒスチジン (- 0 . 5) ; システイン (

- 1.0) ; メチオニン (- 1.3) ; バリン (- 1.5) ; ロイシン (- 1.8) ; イソロイシン (- 1.8) ; チロシン (- 2.3) ; フェニルアラニン (- 2.5) ; およびトリプトファン (- 3.4) 。類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。一次アミノ酸配列から、エピトープをまた、親水性に基づいて同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」といわれる。

【0080】

所望のアミノ酸置換（保存的であれ非保存的であれ）は、当業者によって、このような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、CHL2ポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載されるCHL2ポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換は、表Iに記載される。

【0081】

【表1】

表 I
アミノ酸置換

最初の残基	例外的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, /ルロイシン	Leu
Leu	/ルロイシンの Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-ジアミノ酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, /ルロイシン	Leu

当業者は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対し

て保存されていない、C H L 2分子の領域における変化が、C H L 2ポリペプチドの生物学的活性および/または構造にさほど不利に影響を与えるようではないことが、理解される。当業者にはまた、比較的保存された領域においてさえ、化学的に類似のアミノ酸を、活性を維持ながら天然に存在する残基と置換し得ることを知っている(保存的アミノ酸残基の置換)。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に不利に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0082】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造-機能研究を再調査し得る。このような比較の観点において、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応するC H L 2ポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、C H L 2ポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に対する化学的に類似のアミノ酸置換を、選択し得る。

【0083】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造に関して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。このような情報の観点において、当業者は、C H L 2ポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面に存在すると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を各アミノ酸残基に含む、試験改変体を生成し得る。これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が破壊を生じるか、所望でなく減少するか、または所望でない活性であることを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独でかまたは他の変

異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【0084】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。Moult, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27; Chouら、1974, *Biochemistry* 13:222-45; Chouら、1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chouら、1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chouら、1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; および Chouら、1979, *Biophys. J.* 26:367-84を参照のこと。さらに、コンピュータプログラムが、二次構造の推定を補助するために、現在利用可能である。二次構造を推定する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%より大きな配列同一性または40%より大きな類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長は、二次構造(ポリペプチドまたはタンパク質の構造中の潜在的な折り畳みの数を含む)の増強された推定性を提供してきた。Holmら、1999, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質において制限された数の折り畳みが存在すること、および一旦、重要な数の構造が解析されると、構造推定は劇的により正確となることが、示唆されてきた(Brennerら、1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76)。

【0085】

二次構造を推定するさらなる方法は、「スレッディング(threading)」(Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sipplら、1996, *Structure* 4:15-19)、「プロフィール分析」(Bowieら、1991, *Science*, 253:164-70; Gribskovら、1990, *Methods Enzymol.* 183:146-59; Gribskovら、1987, *Proc.*

Nat. Acad. Sci. U. S. A. 84: 4355 - 58)、および「進化学的連鎖」(Holmら、前出、およびBrennerら、前出を参照のこと)を包含する。

【0086】

好ましいCHL2ポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および/または型が配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、CHL2ポリペプチド改変体は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN連結グリコシル化部位を含む。N連結グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと示されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N連結炭水化物鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN連結炭水化物鎖を除去する。1つ以上のN連結グリコシル化部位(代表的に、天然に存在するグリコシル化部位)が排除され、そして1つ以上の新たなN連結部位が作製される、N連結炭水化物鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいCHL2改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、CHL2ポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な立体配座にリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には偶数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【0087】

他の実施形態において、関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸挿入を有し、そしてこのポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記

載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはこの配列からなるか、あるいは少なくとも1つのアミノ酸欠失を有し、ここでこのポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはこの配列からなる。関連する核酸分子はまた、ポリペプチドがカルボキシル末端および/またはアミノ末端の短縮を有し、そしてさらにここで、このポリペプチドが、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはこの配列からなる。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端短縮、およびアミノ末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を含み、そしてここで、ポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはこの配列からなる。

【0088】

さらに、配列番号2または配列番号5、あるいは他のCHL2ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、相同なポリペプチドに融合してホモダイマーを形成し得るか、あるいは異種ポリペプチドに融合してヘテロダイマーを形成し得る。異種ペプチドおよび異種ポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：CHL2融合ポリペプチドの検出および/または単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその部分；触媒的に活性である、酵素またはその部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のCHL2ポリペプチドとは異なる治療活性を有するポリペプチド。

【0089】

融合は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のCHL2ポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいてなされ得る。融合は、リンカーもしくはアダプター分子を用いない直接的融合であってもよいし、リンカーもしくはアダプター分子を介してであってもよい。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基であり得、代表的に、約20～約50アミノ酸残基である。リンカーまたはアダプター分子はまた、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼに対する切断部位を有して設計されて、融合した部分の分離を可能にし得る。一旦構築されると、この融合ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

【0090】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のCHL2ポリペプチドは、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインに融合する。抗体は、以下の2つの機能的に独立した部分を含む；抗原を結合する「Fab」として公知の変域ドメイン、ならびに補体活性化および食作用細胞による攻撃のようなエフェクター機能に關与する、「Fc」として公知の定常ドメイン。Fcは、長い血清半減期を有し、一方でFabは、短寿命である。Caponら、1989, Nature 337: 525-31。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテインA結合、補体固定、およびおそらく、胎盤移入さえものような機能を組み込み得る。同書。表IIは、当該分野において公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

【0091】

【表2】

表Ⅱ
治療タンパク質とのFcの融合

Fcの形態	融合パートナー	治療関連	参考文献
IgG1	CD30-Lの N末端	ホジキン病;未分化 リンパ腫;T細胞白血病	米国特許第 5,480,981号
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症性;移植拒絶	Zheng et al., 1995 <i>Immunol.</i> 154:555
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisher et al., 1996 <i>Engl. J. Med.</i> 334 1702; Van Zee et 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, またはIgE (第1のドメイン を除く)	TNFレセプター	炎症, 自己免疫 障害	米国特許第 5,808,029号
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Capon et al., 1981 <i>Nature</i> 337: 525-3
IgG1, IgG3	IL-2の N末端	抗癌, 抗ウイルス	Harvill et al., 199 <i>Immunotech.</i> 1:95
IgG1	OPGの C末端	変形性関節症;骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプタン N末端	抗肥満	PCT/US 97/2318: December 11, 199
ヒト IgGγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Med.</i> , 174:561-69

一例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域は、当業者に公知の方法を使用して、CHL2ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。別の例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域は、CHL2ポリペプチドフラグメント（例えば、CHL2ポリペプチドの推定細胞外部分）のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。

【0092】

得られるCHL2融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって、精製され得る。Fc領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物より実質的に長いインビボでの半減期を示すことが見出された。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化/多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または治療品質、循環時間、もしくは減少した凝集のような特定の品質を改善するよう変更され得る。

【0093】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology (A.M. Lesk編、Oxford University Press 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D.W. Smith編、Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A.M. GriffinおよびH.G. Griffin編、Humana Press 1994); G.von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987); Sequence Analysis Primer (M. GribskovおよびJ. Devereux編、M. Stockton Press 1991); ならびにCarilloら、1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0094】

同一性および/または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の一致を与えるように、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための、好ましいコンピュータプログラム方法としては、GCGプログラムパッケージ (GAP (Devereuxら、1984, Nucleic Acids Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschulら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-10) を含む) が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源 (A

ltschulら、BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschulら、1990、前出)から公に利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【0095】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のアライメントスキームは、これら2つの配列の短い領域のみの一致を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、2つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態において、選択された整列方法(GAPプログラム)は、特許請求されるポリペプチドの少なくとも50の連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0096】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)を使用して、パーセント配列同一性が決定されるべき2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な一致(アルゴリズムによって決定される「一致したスパン」)のために、整列される。ギャップオープニングペナルティー(gap opening penalty)(これは、平均対角の3倍として計算される:「平均対角」とは、使用される比較行列(comparison matrix)の対角の平均である;「対角」とは、特定の比較行列によって各完全なアミノ酸一致に対して割り当てられたスコアまたは数である)およびギャップエクステンションペナルティー(gap extension penalty)(これは通常、ギャップオープニングペナルティーの0.1倍である)、ならびにPAM 250またはBLOSUM 62のような比較行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もまた、このアルゴリズムによって使用される(Dayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure (補遺3 1978)(PAM250比較行列);Henikoffら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:10915-19(BL

OSUM 62比較行列)を参照のこと)。

【0097】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970
, J. Mol. Biol. 48: 443 - 53 ;

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff
ら、前出) ;

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Threshold of Similarity: 0

このGAPプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、GAPアルゴリズムを用いるポリペプチド比較(末端ギャップに対してはペナルティーがないこととともに)のためのデフォルトパラメータである。

【0098】

核酸分子配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Algorithm: Needleman and Wunsch, 前出 ;

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

このGAPプログラムはまた、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【0099】

Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを含む、他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較行列、および類似性閾値(threshold of similarity)が使用され得る。なされるべき特定の選択は、当業者に明らかであり、そしてなされるべき特定の比較(例えば、DNA対DNA、

タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNA) ; ならびにさらに、その比較が所定の対の配列間(この場合には、GAPまたはBestFitが一般的に好ましい)であるか否か、1つの配列と大きなデータベースの配列との間(この場合には、FASTAまたはBLASTAが好ましい)であるか否かに依存する。

【0100】

(核酸分子)

CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の様式(化学合成、cDNAもしくはゲノムのライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および/またはcDNAのPCR増幅が挙げられるが、これらに限定されない)で容易に得られ得る。

【0101】

本明細書中において使用される組換えDNA法は、一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)および/またはCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、Green Publishers Inc. およびWiley and Sons 1994)に記載されている方法である。本発明は、本明細書中に記載され得ような核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。

【0102】

CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が1つの種から同定された場合には、この遺伝子の全てまたは一部を、同じ種由来のオーソログまたは関連する遺伝子を同定するためのプローブとして使用し得る。このプローブまたはプライマーを使用して、CHL2ポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来のcDNAをスクリーニングし得る。さらに、配列番号1または配列番号4のいずれかに記載されるような配列を有する核酸分子の部分または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的に、中程度または高いストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用されて

、このスクリーニングから得られる誤った陽性の数を最小にする。

【0103】

C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子もまた、発現されたタンパク質の特性に基づいて陽性クローンの検出を使用する発現クローニングによって、同定され得る。代表的に、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）を、宿主細胞表面において発現および提示されたクローンタンパク質に結合させることによって、スクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

【0104】

以下に記載される説明に従って実施される組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを産生し得、そしてコードされたポリペプチドを発現し得る。例えば、C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望のヌクレオチド配列を容易に生成し得る。次いで、これらの配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを生成し得る。あるいは、C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされたC H L 2 ポリペプチドが、多量に生成され得る。

【0105】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法において、cDNAは、酵素逆転写酵素を使用して、poly(A)+RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー（代表的には、C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの別個の領域に対して相補的である）が、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこのcDNAに付加され、そしてこのポリメラーゼが、このcDNAのこれら2つのプライマー間の領域を増幅する。

【0106】

C H L 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手

段は、Engelsら、1989, *Angew. Chem. Intl.* 編. 28 : 716 - 34 によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントと一緒に連結されて、CHL2遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATGを有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されるか否かに依存して、CHL2ポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0107】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるCHL2ポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択されるCHL2ポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先性のための「Eco_high.Cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピュータアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI) によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、「Celegans_high.cod」、「Celegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、およ

び「Yeast_high.cod.」が挙げられる。

【0108】

いくつかの場合において、CHL2ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望であり得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点変異を有する部位特異的変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して生成され得る（変異誘発技術の記載に関しては、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出を参照のこと）。Engelsら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0109】

（ベクターおよび宿主細胞）

CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である）。CHL2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫（バキュロウイルス系）宿主細胞および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、CHL2ポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および/またはホスホリル化）されるか否かに一部依存する。そうである場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、Meth.Enz., 第185巻(D.V.Goeddel, 編, Academic Press 1990)を参照のこと。

【0110】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のためならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」と呼ばれる）は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む：プロモータ、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプ

タースプライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

【0111】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、CHL2ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；オリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、または別の「タグ」（例えば、FLAG、HA（赤血球凝集素（hemagglutinin）インフルエンザウイルス））または市販の抗体が存在するmycをコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、CHL2ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとしてタグに対して抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたCHL2ポリペプチドから除去される。

【0112】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、CHL2ポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0113】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のい

くつかの方法によって得られ得る。代表的には、CHL2 遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

【0114】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、PCRを使用して、そして/あるいは適切なオリゴヌクレオチドならびに/または同じもしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が公知でない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子を含み得る大きな断片のDNAから単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen (登録商標) カラムクロマトグラフィー (Chatsworth, CA)、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【0115】

複製起点は、代表的に、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、そしてこの起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数に対するベクターの増幅は、いくつかの場合において、CHL2 ポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、公知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドpBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) 由来の複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起点 (例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、またはHPVもしくはBPVのようなパピローマウイルス) は、哺乳動物細胞におけるベクターのクローニングのために有用である。一

般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクター（例えば、SV40起点は、ただそれが初期プロモータを含むので、しばしば、使用される）のために必要ではない。

【0116】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の3'側に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメント、続いてポリ-T配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化され得るか、またはベクターの一部として市販され、これは、本明細書中上記のような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0117】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a)原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるか；(b)細胞の栄養要求性の欠損を補うか；あるいは、(c)複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0118】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生により大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の連続的な生成の染色体内でタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子の効果によって生存するように独特に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子とCHL2ポリペプチドをコード

するDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量のCHL2ポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

【0119】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてShine-Dalgarno配列（原核性物）またはKozak配列（真核生物）によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現されるCHL2ポリペプチドのプロモータの3'側およびコード配列の5'側に配置される。Shine-Dalgarno配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン（すなわち、高いA-G含有量を有する）である。多くのShine-Dalgarno配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して容易に合成され得、そして原核生物ベクターにおいて使用され得る。

【0120】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞からCHL2ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、CHL2核酸分子のコード領域に位置するか、または直接CHL2ポリペプチドコード領域の5'側に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、そして選択された宿主細胞において機能性である任意のシグナル配列が、CHL2核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、CHL2核酸分子に対して同種（天然に存在する）または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。大部分において、シグナルペプチドの存在によって宿主細胞からのCHL2ポリペプチドの分泌は、分泌されたCHL2ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入されたCHL2核酸分子の一部であり得る。

【0121】

CHL2ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなCHL2ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列またはCHL2ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれ

かの使用が本発明の範囲内である。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、そしてプロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなCHL2ポリペプチドシグナル配列を認識せず、かつプロセスしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌について、ネイティブなCHL2ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列が満足であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0122】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましい、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のシグナルペプチド（*presequence*）が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列（*pro-sequence*）を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最後のタンパク質産物は、1位に（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）、発現に付随して1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に除去されないかもしれない。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断される場合、所望のCHL2ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

【0123】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合、CHL2遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない（大部分のcDNAについて）場合、イントロンは、別の供給源から得

られ得る。隣接配列およびCHL2遺伝子に関してイントロンの位置は、イントロンが効果的に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、CHL2 cDNA分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側で、poly-A転写終止配列の5'側である。好ましくは、イントロンは、コード配列を妨害しないように、cDNAの1つの側面または他の側面(すなわち、5'側または3'側)に配置される。任意の供給源(ウイルス、原核生物および真核生物(植物または動物)を含む)由来の任意のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまた本明細書中に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

【0124】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、そしてCHL2ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモータを含む。プロモータは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子(一般的に、約100~1000bp)の開始コドンに対して上流(すなわち、5'側)に配置される非転写配列である。プロモータは、通常、2つのクラス(誘導プロモータおよび構成プロモータ)の1つにグループ化される。誘導プロモータは、培養条件におけるいくらかの変化(例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化)にตอบสนองしてそれらの制御下で、DNAからの転写の増加したレベルを開始する。他方、構成プロモータは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する;すなわち、遺伝子発現に対して遺伝子をほとんど制御しないかまたは制御しない。多数のプロモータ(種々の潜在的な宿主細胞によって認識される)が周知である。適切なプロモータは、供給源のDNAからプロモータを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモータ配列をベクターに挿入することによって、CHL2ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなCHL2プロモータ配列は、CHL2核酸分子の増幅および/または発現に指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモータと比較して大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能であり、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモータが好

ましい。

【0125】

原核生物宿主との使用に適切なプロモータとしては、 λ -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン (trp) プロモーター系；およびハイブリッドプロモーター（例えば、tacプロモーター）が挙げられる。他の公知の細菌プロモータもまた、適切である。これらの配列は、公開されており、その結果、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNA配列にそれらの配列を連結し得る。

【0126】

酵母宿主との使用に適切なプロモータはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモータとの使用に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモータは周知であり、限定しないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましいシミアンウイルス40 (SV40) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモータが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモータとしては、異種哺乳動物プロモータ（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0127】

CHL2 遺伝子発現を制御する際に関心があり得るさらなるプロモータとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40 初期プロモータ領域 (Bernois and Chambon, 1981, Nature 290:304-10)；CMVプロモータ；ラウス肉腫ウイルスの3'側の長い終末反復に含まれるプロモータ (Yamamotoら, 1980, Cell 22:787-97)；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagnerら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-45)；メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinsterら, 1982, Nature 296:39-42)； λ -ラクタマーゼプロモーターのような原核

生物発現ベクター (Villa-Kamaroffら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31); またはtacプロモータ (DeBoerら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25)。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている以下の動物転写制御領域もまた関心がある: 膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼI遺伝子制御領域 (Swiftら, 1984, Cell 38:639-46; Ornitzら, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); 膵臓細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域 (Hanahan, 1985, Nature 315:115-22); リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedlら, 1984, Cell 38:647-58; Adamesら, 1985, Nature 318:533-38; Alexanderら, 1987, Mol. Cell. Biol., 7:1436-44); 精巣、乳房、リンパ球、および肥満細胞において活性なマウス乳腺癌ウイルス制御領域 (Lederら, 1986, Cell 45:485-95); 肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkertら, 1987, Genes and Devel. 1:268-76); 肝臓において活性な α -フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlaufら, 1985, Mol. Cell. Biol., 5:1639-48; Hammerら, 1987, Science 235:53-58); 肝臓において活性な α 1-抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら, 1987, Genes and Devel. 1:161-71); 骨髄性細胞において活性な β -グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら, 1985, Nature 315:338-40; Kolliasら, 1986, Cell 46:89-94); 脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリンベースのタンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら, 1987, Cell 48:703-12); 骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (Sani, 1985, Nature 314:283-86); ならびに視床下部に

において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら, 1986, Science 234:1372-78)。

【0128】

エンハンサー配列は、高等真核生物によって本発明のCHL2ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモータに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシス作用エレメントである。エンハンサーは、相対的に方向および位置に独立する。これらは、転写ユニットに対して5'側および3'側に見出されている。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である(例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインシュリン)。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモータの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、CHL2核酸分子に対して5'側または3'側の位置でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモータから5'側に配置される。

【0129】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。本明細書中に記載される隣接配列の1つ以上がすでにベクター内がない場合、これらは、個々に得られ得、そしてベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0130】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen、San Diego、CA)、pBSII (Stratagene、La Jolla、CA)、pET15 (Novagen、Madison、WI)、pGEX (Pharmacia Biotech、Piscataway、N

J)、pEGFP-N2(Clontech、Palo Alto、CA)、pETL(BlueBacII、Invitrogen)、pDSR-_(PCT公開番号WO 90/14363)ならびにpFastBacDual(Gibco-BRL、Grand Island、NY)が挙げられる。

【0131】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、Bluescript(登録商標)プラスミド誘導体(高コピー数ColEI-ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド(例えば、TOPO™ TA Cloning(登録商標)Kit、PCR2.1(登録商標)プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA)、ならびにバキュロウイルス発現系のような哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター(pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA)が挙げられる。

【0132】

ベクターが構築され、そしてCHL2ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅発現および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。CHL2ポリペプチドに対する発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、一部、使用される宿主細胞の型の機能である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら、前出に記載される。

【0133】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞(例えば、E. coli)または真核生物宿主

細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞）であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合、CHL2ポリペプチドを合成し、これは、続いて、培養培地から収集され得るか（宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合）、直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される（そのポリペプチドが分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性（例えば、グリコシル化またはホスホリル化）に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾、および生物学的に活性な分子に折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0134】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAから入手可能である。例としては、限定しないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、CHO DHFR (-) 細胞 (Urlaubら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 4216-20)、ヒト胚性腎臓 (HEK) 293または293T細胞、あるいは3T3細胞のような哺乳動物細胞が挙げられる。適切な哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1およびCOS-7細胞株、およびCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびゲッ歯類動物細胞株（形質転換細胞株を含む）が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞株、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠き得るか、または優先的に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、限定しないが、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swissから誘導された3T3株、Balb-cまたはNIHマウス、BHKまたはHakハムスター細胞株が挙げられる。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現の当業者によって公知であり入手可能である。

【0135】

同様に、細菌細胞が、本発明に適切な宿主細胞として有用である。例えば、*E. coli* (例えば、HB101、DH5⁺、DH10、およびMC1061)の種々の菌株は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。*B. subtilis*、*Pseudomonas spp.*、他の*Bacillus spp.*、*Streptomyces spp.*などの種々の菌株がまた本方法において使用され得る。

【0136】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明のポリペプチドの発現のため宿主細胞として入手可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*および*Pichia pastoris*が挙げられる。

【0137】

さらに、望ましい場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら、1993、*Biotechniques*、14:810-17; Lucklow、1993、*Curr. Opin. Biotechnol.* 4:564-72; およびLucklowら、1993、*J. Virol.*、67:4566-79に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (Invitrogen)である。

【0138】

グリコシル化CHL2ポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳産動物(例えば、雌ウシまたはヤギ)を使用し、本発明のグリコシル化ポリペプチドを動物の乳に得ることができる。CHL2ポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、しかし、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0139】

(ポリペプチド産生)

CHL2ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的

な培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養分を含む。E. coli細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Luria Broth (LB) および/または Terrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM) および/または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要な血清および/または増殖因子を補充され得る。昆虫細胞についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および/または胎仔ウシ血清を補充したグレース培地である。

【0140】

代表的に、トランスフェクトされた細胞または形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物質として加えられる。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカージェメントによって検出可能である。例えば、選択マーカージェメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に加えらるる化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

【0141】

宿主細胞によって産生されるCHL2ポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、および/またはDNA結合ゲル移動アッセイのような活性アッセイが挙げられる。

【0142】

CHL2ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計される場合、ポリ

ペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、C H L 2 ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および/または核（真核宿主細胞について）に、あるいは、細胞質ゾル（グラム陰性細菌宿主細胞について）に存在する。

【0143】

宿主細胞細胞質および/または核（真核生物宿主細胞について）に位置するかまたは細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に位置するC H L 2 ポリペプチドについて、細胞内物質（グラム陰性細菌についての封入体を含む）は、当業者に公知の任意の標準的な技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、均質化、および/または超音波処理、続く遠心分離によって、ペリプラズム/細胞質の含有量を放出するように溶解され得る。

【0144】

C H L 2 ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、内部および/または外部細胞膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後にペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、p H 極限値で処理され得るか、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性のp Hで、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性のp Hで、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理して、封入体を放出させ、分断させ、そして溶解させ得る。次いで、溶解されたC H L 2 ポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。C H L 2 ポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中およびMarstonら, 1990, Meth. Enz., 182: 264-75に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

【0145】

いくつかの場合、C H L 2 ポリペプチドは、単離の際、生物学的に活性でなくても良い。「再折り畳みする」、つまり、ポリペプチドをその三次構造に変換し、ジスルフィド連結を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、溶解されたポリペプチドをあるp H（通常7より

上) および特定の濃度のカオトロピック剤 (chaotropic) の存在に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、封入体溶解に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤は低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み / 酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン / シスタミン、グルタチオン (GSH) / ジチオビスGSH、塩化銅 (II)、ジチオトレイトール (DTT) / ジチアンDTT、および 2, 2 -メルカプトエタノール (bME) / ジチオ - b (ME) が挙げられる。多くの場合において、共溶媒が使用され得るか、または再折り畳みの効率を増加するのに必要であり得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

【 0 1 4 6 】

封入体がCHL2ポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

【 0 1 4 7 】

溶液からのCHL2ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン (CHL2ポリペプチド / hexaHis) のようなタグまたは他の小さなペプチド (例えば、FLAG (Eastman Kodak Co. , New Haven , CT) またはmyc (Invitrogen , Carlsbad , CA)) をそのカルボキシ末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがタグについて高い親和性を有するアフィニティーカラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

【 0 1 4 8 】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性を有して結合する。従って、ニッケルのアフィニティーカラム（例えば、Qiagen（登録商標）ニッケルカラム）は、CHL2ポリペプチド/polyHisの精製のために使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8 (Ausubelら, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993)を参照のこと。

【0149】

さらに、CHL2ポリペプチドは、CHL2ポリペプチドを特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。

【0150】

精製のための他の適切な手段としては、限定しないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動（ネイティブなゲル電気泳動を含む）、続くゲル溶出、および分取用等電集束法（「アイソプライム(Isoprime)」機械/技術、Hoefler Scientific, San Francisco, CA)が挙げられる。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術を、増加した純度を達成するために組み合わせられ得る。

【0151】

CHL2ポリペプチドはまた、Merrifieldら, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghtenら, 1985, Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132; およびStewartおよびYoung, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984)に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）によって調製され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さないで合成され得る。化学的に合成されたCHL2ポリペプチドは、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化され得て、ジスル

フィド架橋を形成し得る。化学的に合成されたC H L 2ポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製される対応するC H L 2ポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると期待され、従って、組換えまたは天然のC H L 2ポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

【0152】

C H L 2ポリペプチドを得る別の手段は、C H L 2ポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および/または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、C H L 2ポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたC H L 2ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体を使用してモニターされ得る。

【0153】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、C H L 2ポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-303を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Roberts, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73もまた参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、それぞれが、5'無作為化配列、中心予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的活性を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0154】

米国特許第5,763,192号;同第5,814,476号;同第5,723,323号;および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチ

ドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、確率論的遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主細胞は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0155】

ペプチドまたはポリペプチドの産生するための別の方法は、Athersys, Inc. によって出願されたPCT/US98/20094 (WO99/15650) (「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られている)に記載されており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同性組換えまたは異常な組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的DNAは、まず、放射線に供せられ、そして遺伝子プロモーターに挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方に最終的に配置され、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現より生じる。

【0156】

これらの方法は、包括的なCHL2ポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ(例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび全生物アッセイ(例えば、植物、マウスなど))において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0157】

(合成)

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子は、組換えおよび他の手段によって産生され得ることは、当業者によって理解される。

【0158】

(選択的結合因子)

用語「選択的結合因子」は、1以上のC H L 2ポリペプチドに対して特異性を有する分子を言及する。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導體、ポリペプチド、ならびに小分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なC H L 2ポリペプチド選択的結合因子は、C H L 2ポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、ポリペプチドのC H L 2ポリペプチドレセプターへの結合を阻害する。

【 0 1 5 9 】

C H L 2ポリペプチドと結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異的なポリクローナルを含むポリクローナル；モノクローナル(M A b)；組換え；キメラ；ヒト化(例えば、C D R移植化)；ヒト；単鎖；および/または二特異的；ならびにフラグメント；改変体；またはそれらの誘導體であり得る。抗体フラグメントとしては、C H L 2ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体のこれらの一部を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって產生されたF a bおよびF (a b ')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術(例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現)によって產生されたフラグメントが挙げられる。

【 0 1 6 0 】

C H L 2ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、一般に、C H L 2ポリペプチドおよびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物(例えば、ウサギまたはマウス)において產生される。C H L 2ポリペプチドをキャリアタンパク質に結合させることは、有用であり得、このタンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターのように、免疫化される種において免疫原性である。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、この動物は採血され、そして血清を、抗C H L 2抗体タ

イターについてアッセイする。

【0161】

CHL2ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、培地中の連続的細胞株によって抗体分子を産生するために提供される、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するために適切な方法の例は、Kohlerら、1975、Nature 256:495-97のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor、1984、J. Immunol. 133:3001; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987))が挙げられる。CHL2ポリペプチドと反応する、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株がまた、本発明によって提供される。

【0162】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。1実施形態は、「キメラ」抗体であり、この重鎖(H)および/または軽鎖(L)の一部が、特定の種から誘導されるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスの属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である一方で、この鎖の残りは、別の種から誘導されるか、または別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である。抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、これらの抗体のフラグメントも含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55を参照のこと。

【0163】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化した抗体は、非ヒトである供給源から導入された1以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野(Jonesら、1986、Nature 3

21:522-25; Riechmannら、1998、Nature 332:323-27; Verhoeyenら、1988、Science 239:1534-36)で記載される方法を使用して、鋸状相補的決定領域(CDR)の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域と置換することによって、実施される。

【0164】

CHL2ポリペプチドと結合するヒト抗体がまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリンの産物の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物(例えば、マウス)を使用して、このような抗体は、CHL2ポリペプチド抗原(すなわち、少なくとも6個の連続アミノ酸を有する)を用いて免疫化することによって産生され、必要に応じて、キャリアに結合される。例えば、Jakobovitsら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551-55; Jakobovitsら、1993、Nature 362:255-58; Bruggermannら、1993、Year in Immuno. 7:33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、本明細書中の重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重鎖および軽鎖タンパク質をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物(この動物は、改変体の完全相補体未満を有する)は、所望の免疫系の改変体の全てを有する動物を得るためにクロスブレッドされる。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト(例えば、マウスではない)アミノ酸配列(このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である改変領域を含む)を有する抗体を産生する。例えば、PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807、PCT出願番号PCT/US91/245およびPCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1および546073A1に記載される。ヒト抗体はまた、宿主細胞中の組換えDNAの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0165】

代替の実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリから産生され得る (Hoogenboomら, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marksら, 1991, J. Mol. Biol. 222:581)。これらにより、糸状のバクテリオファージの表面上の抗体レポーターのディスプレイを介した模倣免疫選択、および選択した抗原への結合によるファージの続く選択を処理する。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これには、このようなアプローチを使用して、MPL-レセプターおよびmsk-レセプターについて、高い親和性および機能的なアンタゴニスト抗体の単離が記載される。

【0166】

キメラ抗体、CDR移植化抗体、およびヒト化抗体は、代表的に組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載される物質および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞(例えば、CHO細胞)中で処理される。モノクローナル(例えば、ヒト)抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0167】

本発明の抗-CHL2抗体は、CHL2ポリペプチドの検出および定量のために、任意の公知のアッセイ方法(例えば、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイ)において使用され得る(Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。この抗体は、使用されるアッセイ方法に対して、適切である親和性でCHL2ポリペプチドと結合する。

【0168】

診断適用のために、特定の実施形態において、抗-CHL2抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれか

で、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、または ^{67}Ga ）；蛍光化合物または化学的蛍光化合物（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）、または酵素（アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくはホースラディッシュペルオキシダーゼ）であり得る（Bayerら，1990，Meth. Enz. 184：138-63）。

【0169】

競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、CHL2ポリペプチド、またはその免疫学的に活性な部分）の能力に依存し、限定された量の抗-CHL2抗体との結合に関して、試験サンプル検体（CHL2ペプチド）と競合する。試験サンプル中のCHL2ポリペプチドの量は、抗体と結合する標準の量と反比例する。結合する標準の量を決定するのを容易にするために、この抗体は、競合前または後に、代表的に免疫化され、この抗体と結合する標準および検体は、結合しないままの標準および検体から好都合に分離され得る。

【0170】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用に代表的に関連し、各々は、決定および/または定量されるべきタンパク質の異なる免疫部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル検体は、固体支持体上に免疫化される一次抗体によって代表的に結合され、その後、二次抗体が、この検体に結合され、可溶の3部の複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110を参照のこと。二次抗体自体は、検出可能な部分で標識されるか（直接的なサンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識される抗-免疫グロブリン抗体を使用して（間接的なサンドイッチアッセイ）測定され得る。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）（この場合、検出可能な部分は、酵素である）である。

【0171】

抗-CHL2抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボイメージングのために有用である。検出可能な部分で標識した抗体は、動物に、好ましくは、血流

に投与され得、宿主中で標識した抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物中で検出可能である任意の部分で標識され得る。

【0172】

抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらは、少なくとも1つのCHL2ポリペプチドの生物学的活性を、それぞれ増強または減少させるかのいずれかである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、CHL2ポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでCHL2ポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る、CHL2ポリペプチドと特異的に結合し得る抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、この選択的結合因子（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約50%、および好ましくは、少なくとも約80%によって、CHL2ポリペプチドの機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合アッセイは、CHL2ポリペプチド結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得る抗-CHL2ポリペプチド抗体であり、これにより、インビトロまたはインビボにおいてCHL2ポリペプチド活性を阻害または排除する。アゴニストおよびアンタゴニスト抗体-CHL2ポリペプチド抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

【0173】

本発明はまた、CHL2選択的結合因子（例えば、抗体）を含むキットおよび生物学的サンプル中でCHL2ポリペプチドレベルを検出するために有用である他の試薬に関する。このような試薬はまた、血清を遮断する検出可能な標識、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、および検出試薬を含み得る。

【0174】

（マイクロアレイ）

DNAマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置された核酸

の小型高密度アレイである。このアレイ内の各細胞またはエレメントは、相補的核酸配列(mRNA)とハイブリダイゼーションするための標識として作用する、単一の核酸種の複数のコピーを含む。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロフィールにおいて、mRNAは、最初に細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、酵素的に蛍光標識されたcDNAに変換される。この材料は、マイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAは、洗浄により除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各々核酸分子を標的するために特異的に結合される、標識されたcDNAの量を定量することによって視覚化される。このようにして、数千もの遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットの並行様式で定量され得る。

【0175】

このハイスループット発現プロフィールは、本発明のCHL2分子に関連して広範の適用を有し、これには、以下が挙げられるが、これに限定されない：治療のための標的として、CHL2疾患関連遺伝子の同定および確認；関連するCHL2分子およびそのインヒビターの分子毒性；臨床試験のための代替マーカーの集団および産生の階層化；およびハイスループットスクリーニングにおいて、選択化合物の同定を援助することによって、関連するCHL2ポリペプチド小分子薬物発見を増強すること。

【0176】

(化学的誘導体)

CHL2ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、この開示が、本明細書中に記載された場合、当業者によって調製され得る。CHL2ポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然で結合した分子の型または位置のいずれかで、異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の天然で結合した化学的な基の除去によって形成される分子を含み得る。配列番号2、配列番号5、または他のCHL2ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、結合するタンパク質は、水環境(例えば、生理学的な環境)下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含ま

れる。好ましくは、目的産物の調製の治療学的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0177】

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2 kDaと約100 kDaとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、上記の分子量より多い、いくらか少ない重量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5 kDaと約50 kDaの間、より好ましくは、約12 kDaと約40 kDaとの間、そして最も好ましくは、約20 kDaと約35 kDaとの間である。

【0178】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-連結またはO-連結炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレングリコール（PEG）（これは、モノ-（C₁-C₁₀）、アルコキシ-、またはアリアルコキシ-ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導するために使用されたPEGの形態を含む）、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約6 kD）のデキストラン）、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-（N-ビニルピロリジン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシ/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびビニルアルコール。共有結合したCHL2ポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【0179】

一般に、化学的誘導は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に以下の工程を包含する：（a）配列番号2、配列番号5、または他のCHL2ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドが、1以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリ

マー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）とポリペプチドを反応させる工程、ならびに（b）反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子のタンパク質に対する比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。1実施形態において、CHL2ポリペプチド誘導体は、アミノ末端の単一ポリマー分子部分を有する。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

【0180】

ポリペプチドのペギル化（*pegylation*）は、当該分野で公知の任意のペギル化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：*Francisら, 1992, Focus on Growth Factors 3:4-10*；欧州特許第0154316号および0401384号；ならびに米国特許第4,179,337号。例えば、ペギル化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有する。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有する。例えば、反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであり、これは、水溶性、またはモノC₁-C₁₀アルコキシもしくはそのアリアルオキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

【0181】

別の実施形態において、CHL2ポリペプチドは、ビオチンに化学的に連結され得る。次いで、このビオチン/CHL2ポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、その結果、4価のアビジン/ビオチン/CHL2ポリペプチド分子が得られる。CHL2ポリペプチドはまた、ジニトロフェノール（DNP）またはトリニトロフェノール（TNP）に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗-DNPまたは抗-TNP-IgMと共に沈殿し、10価の十量体の結合体を形成する。

【0182】

一般に、本発明のCHL2ポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る条件は、CHL2ポリペプチドについて本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示されるCHL2ポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強または減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加または減少した半減期）を有し得る。

【0183】

（遺伝子操作した非ヒト動物）

マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれ、ここで、天然のCHL2ポリペプチドをコードする遺伝子は中断（すなわち「ノックアウト」）され、CHL2ポリペプチドの発現レベルは、有意に減少するか、または完全に破壊される。このような動物は、米国特許第5,557,032号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

【0184】

本発明は、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物をさらに含み、この動物のCHL2遺伝子のネイティブの形態または非相同性CHL2遺伝子のいずれかが、動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,743号およびPCT公開番号WO94/28122号に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

【0185】

本発明は、非ヒト動物をさらに含み、ここで、本発明の1以上のCHL2ポリペプチドのプロモーターは、（例えば、相同的な組換え方法を使用することによって）活性化されるか、または活性化されず、1以上のネイティブCHL2ポリペプチドの発現のレベルを改変する。

【0186】

これらの非ヒト動物は、薬物候補物スクリーニングのために使用され得る。こ

のようなスクリーニングにおいて、動物での薬物候補物の影響が測定され得る。例えば、薬物候補物は、CHL2遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生されるCHL2ポリペプチドの量は、動物を薬物候補物に曝露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物での薬物候補物の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現により、疾患状態または病理学的状態を生じるか、または関連する。このような場合において、遺伝子の発現を減少させるための薬物候補物の能力または病理学的状態を防止または阻害するための能力を試験し得る。別の例において、ポリペプチドのフラグメントのような、特定の代謝産物の産生により、疾患状態または病理学的状態を生じるか、または関連する。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少させるための薬物候補物の能力または病理学的状態を防止または阻害するための能力を試験し得る。

【0187】

(CHL2ポリペプチド活性の他の調節因子についてのアッセイ)

いくつかの状態において、CHL2ポリペプチドの活性の修飾因子である分子(すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト)を同定することが所望され得る。CHL2ポリペプチドを調節する天然または合成分子は、本明細書中に記載されるように、1以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、インビトロ様式またはエキソビボ様式のいずれかで、注射、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。

【0188】

「試験分子」とは、CHL2ポリペプチドの活性を調節する(すなわち、増加または減少させる)ための能力について評価する分子を言う。最も一般的に、試験分子は、CHL2ポリペプチドと直接的に相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、CHL2遺伝子発現に影響を与えることによって、またはCHL2ポリペプチド結合パートナー(例えば、レセプターまたはリガンド)に結合することによって、CHL2ポリペプチド活性を間接的に調節し得ることが考えられる。1実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは、約 10^{-8} M、より好ましくは、約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは

約 10^{-10} Mの親和性定数 (a f f i n i t y c o n s t a n t) で C H L 2 ポリペプチドと結合する。

【0189】

C H L 2 ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、C H L 2 ポリペプチドは、試験分子とC H L 2 ポリペプチドとの相互作用が可能な条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相互作用の範囲が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物中でスクリーニングされ得る。

【0190】

特定の実施形態において、C H L 2 ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得、これは、C H L 2 ポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する。C H L 2 ポリペプチドの発現を調節する分子は、C H L 2 ポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、またはC H L 2 ポリペプチドの発現を指向または制御する核酸配列に対して相補的である核酸分子、および発現のアンチセンス制御因子として作用する核酸分子を含む。

【0191】

一旦、C H L 2 ポリペプチドと相互作用する場合に、試験化合物が、同定されると、この分子は、C H L 2 ポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とC H L 2 ポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形態で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、C H L 2 ポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてC H L 2 ポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。

【0192】

試験分子とC H L 2 ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むC H L

2 ポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0193】

CHL2ポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（例えば、選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのCHL2ポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、結合パートナーに対するCHL2ポリペプチドの結合の速度および/または速度を増加または減少させるために、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1アッセイにおいて、CHL2ポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中に固定化される。次いで、放射標識したCHL2ポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化したCHL2ポリペプチド結合パートナー）および試験化合物は、このウェルに、一時に一方を（いずれかの順序で）または同時に添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射活性を計数し、結合パートナーがCHL2ポリペプチドに結合する範囲を決定する。代表的に、分子は、濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの要素の1以上を欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代わりは、タンパク質の「位置」を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対してCHL2ポリペプチド結合パートナーを固定化し、試験分子および放射標識したCHL2ポリペプチドをインキュベートし、そしてCHL2ポリペプチド結合の範囲を決定する工程）を包含する。例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*、第18章（Ausubelら編、Green Publishers Inc. ならびにWileyおよびSons 1995）を参照のこと。

【0194】

放射性標識に対する代替として、CHL2ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP））（これらは、比色定量的に検出される）に結合し

たストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。C H L 2 ポリペプチドまたはC H L 2 ポリペプチド結合パートナー（これらは、ビオチンに結合されている）に対する抗体はまた、A P またはH R P に連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーションに続いて、検出の目的のために使用され得る。

【0195】

C H L 2 ポリペプチドまたはC H L 2 ポリペプチド結合パートナーは、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固体相基材への付着によって固定化され得る。基材 - タンパク質複合体は、相補タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そしてC H L 2 ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材 - タンパク質複合体は、カラムを通過する、試験分子および相補タンパク質を用いてカラム内に固定化され得る。C H L 2 ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。

【0196】

C H L 2 ポリペプチド結合タンパク質とC H L 2 ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、B I A c o r e アッセイシステム（P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N J ））である。B I A c o r e システムは、製造業者によって特定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、C H L 2 ポリペプチドまたはC H L 2 ポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（これは、検出器に存在する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側面に物理的に関係する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって

測定される。

【0197】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、CHL2ポリペプチドとCHL2ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に記載される。

【0198】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、CHL2ポリペプチドとCHL2ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0199】

CHL2ポリペプチドとCHL2ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少される化合物はまた、CHL2ポリペプチドまたはCHL2ポリペプチド結合パートナーFのいずれかを発現する細胞および細胞システムを使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞システムは、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌ類またはげっ歯類の供給源由来である。CHL2ポリペプチドの、CHL2ポリペプチド結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験化合物の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、CHL2ポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0200】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、CHL2遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるCHL2ポリペプチドまたはCHL2ポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物への薬物候補の実質的な影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物への特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメントなど）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

【0201】

（内部移行タンパク質）

tatタンパク質配列（HIV由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、Falwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:664-68を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸の配列（Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号10）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT PDTを称される）は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら、1999、Science 285:1569-72；およびNagaharaら、1998、Nat. Med. 4:1449-52を参照のこと。これらの手順において、FITC構築物（FITC標識G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号11）（これは、腹腔内投与に続いて組織を貫通する）が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光細胞分析分離（fluorescence activated cell sorting；FACS）分析によって検出される。tat-gal融合タンパク質で処置された細

胞は、*tat*活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現が、多くの組織（肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織）において検出され得る。このような構築物は、細胞に入るためにある程度の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への移入に続いて、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

【0202】

従って、*tat*タンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。例えば、*tat*タンパク質配列を使用して、CHL2アンタゴニスト（例えば、抗CHL2選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、CHL2分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「CHL2分子」は、本明細書中に定義されるような、CHL2核酸分子およびCHL2ポリペプチドの両方をいう。所望ならば、CHL2タンパク質自体はまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Straus, 1999, Science 285:1466-67をまた参照のこと。

【0203】

（CHL2ポリペプチドを使用する細胞供給源の同定）

本発明の特定の実施形態に従って、CHL2ポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定することを可能することが有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病的状態の起源を決定することが有用であり得る。特定の実施形態において、CHL2ポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載の細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗CHL2ポリペプチド抗体を使用して、細胞におけるCHL2ポリペプチドの存在について試験し得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞か否かを決定し得る。

【0204】

（CHL2ポリペプチド組成物および投与）

治療組成物は、本発明の範囲内である。このようなCHL2ポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量のCHL2ポリペプチドまたはCHL2核酸分子を、投

与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の1以上のCHL2ポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。

【0205】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0206】

薬学的組成物は、例えば、pH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、において、無菌性、安定性、解離または放出の速度、吸着、または組成物の浸透を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム（sodium hydrogen-sulfite））、緩衝液（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、バルキング剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、複合体化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン）、フィラー、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色剤、味付け剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、表面活性剤または湿潤剤（例えば、プルオニック（pluronic

); PEG; ソルビタンエステル; ポリソルビテート (例えば、poly sorbate 20 または poly sorbate 80); トリトン; トロメタミン; レシチン; コレステロールまたはチロキサポール (tyloxapal))、安定性増強剤 (例えば、スクロースまたはソルビトール)、張度増強剤 (例えば、ハロゲン化アルカリ金属 (好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム)、またはマンニトール、ソルビトール)、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版, A. R. Gennaro, 編, Mack Publishing Company 1990を参照のこと)。

【0207】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、CHL2分子の、物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【0208】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、本来水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理学的な生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり、おそらく非経口投与のための組成物において一般的な他の材料で補充されている。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH7.0-8.5のTris緩衝液または約pH4.0-5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、CHL2ポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出) と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、CHL2ポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

。

【0209】

このCHL2ポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達（例えば、経口的に）のために、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術内にある。

【0210】

処方成分が、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたは多少より低いpH（典型的に、約5～約8のpH範囲内）にこの組成物を維持するために使用される。

【0211】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望のCHL2分子を含む発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ここで、CHL2分子が、滅菌で、等張溶液として処方され、適切に保存される。なお、別の調製は、所望の分子と、薬剤（例えば、注入可能なマイクロスフィア、生体侵食（bio-erodible）薬剤、ポリマー化合物（ポリ乳酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソーム）との処方物に関係し得、これは、次いで蓄積注射を介して送達され得る産物の制御されたまたは持続された放出を提供する。ヒアルロン酸がまた、使用され得、そしてこれは、循環において、維持された持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

【0212】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、CHL2ポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。CHL2ポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧体と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与が、PCT公開番号WO94/20069にさらに記載され、これは化学

的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

【0213】

特定の処方物が、経口投与され得ることがまた意図される。本発明の1つの実施形態において、このよう様式で投与されるCHL2ポリペプチドが、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、そして前全身分解が最小化される場合、胃腸管内での点で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、CHL2ポリペプチドの吸収を容易にするために含まれうる。希釈剤、味付け剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、およびバインダーがまた、使用され得る。

【0214】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のCHL2ポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤は以下を含むが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

【0215】

さらなるCHL2ポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続または制御送達処方物中にCHL2ポリペプチドを含む処方物を含む。種々の他の持続または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体侵食マイクロスフィアあるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術はまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性マイクロ粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。

【0216】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリックスを含む。徐放性マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, 1983, *Biopolymers* 22:547-56）、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）（Langerら, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277およびLanger, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（Langerら, 前出）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Eppsteinら, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-92；および欧州特許第036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

【0217】

インビボ投与のために使用されるCHL2の薬学的組成物は、代表的には、滅菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が、凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前に、またはそれに続いてのいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル）内に配置される。

【0218】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水和粉末または凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態（凍結乾燥された形態）のいずれかで保存され得る。

【0219】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（*lyosyringe*））を含むキットが含まれる。

【0220】

治療的に使用されるCHL2の薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、従って、送達される分子、CHL2分子が使用されている指標、投与の経路、および患者のサイズ（体重、体表面、または器官の大きさ）および状態（年齢および一般的な健康）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量の力価（*titer*）を決定し、投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ まで；または $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ まで；または $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ までの範囲であり得る。

【0221】

投薬の頻度は、使用される処方物中でのCHL2分子の薬物動態学のパラメーターに依存する。典型的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。組成物は、従って、組成物は、経時的な単一用量として、2以上の用量（これは、同量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そしてそれらによって慣用的に実施される課題の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量 - 応答データの使用を介して確認され得る。

【0222】

薬学的組成物の投与の経路は、以下のような公知の方法と一致する：経口的に

；静脈内、腹腔内、脳内（実質内の）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注入を介して；徐放性系によって；または移植デバイスによって。所望される場合、これらの組成物は、ポーラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

【0223】

あるいはまたはさらに、組成物は、その上に所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化される膜、スポンジ、または他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ポーラスまたは連続的な投与を介し得る。

【0224】

いくつかの場合において、エキソビゴ様式において、CHL2ポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から除去された細胞、組織、または器官は、これらの細胞、組織、または器官が引き続いて患者に移植して戻された後にCHL2ポリペプチドに曝露される。

【0225】

他の場合において、CHL2ポリペプチドは、本明細書中に記載される方法を使用して、遺伝的に操作されて、CHL2ポリペプチドを発現および分泌する特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。必要に応じて、細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子によって細胞の破壊を防止する。

【0226】

本明細書中において議論されるように、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を1つ以上のCHL2ポリペ

プチドで処理することが、望ましくあり得る。このことは、細胞膜に対して透過性の形態である場合には、単離された細胞をこのポリペプチドに直接曝露することによって達成され得る。

【0227】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび/または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写に対してサイレントなCHL2遺伝子（すなわち、過少発現される遺伝子）を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のCHL2ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

【0228】

相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である。Kucherlapati, 1989, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 36:301。基本的な技術が、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するため(Thomasら、1986, Cell 44:419-28; ThomasおよびCapecchi, 1987, Cell 51:503-12; Doetschmanら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8583-87)、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するため(Doetschmanら、1987, Nature 330:576-78)の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号;欧州特許第9193051号および同第505500号;PCT/US90/07642、ならびにPCT公開番号WO 91/09955)に記載されている。

【0229】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的DNAに付着させることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的(相同)であるヌクレオチド配列で

ある。ゲノムの特定の領域に対して相補的な標的DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、細胞に挿入されてハイブリダイズしたDNAの一般的な特性であり、そして従って、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組み換わる。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに付着される場合には、これはまた、この組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれる。ブルーフリーディング機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして働くことが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。

【0230】

CHL2ポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るDNAの領域（例えば、隣接配列）が、標的DNAのこれらの断片に付着する。例えば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サプレッサ、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムに、所望のCHL2ポリペプチドをコードするDNAの近位に、このDNAの転写に影響を与えるに十分な配向で、挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在するDNAの部分を制御する。従って、所望のCHL2ポリペプチドの発現は、CHL2遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、むしろ、CHL2遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合した標的DNA（目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む）の使用によって、達成され得る。

【0231】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライドナー部位を含むDNAの導入によって、変更される。これらの構成成分は、新たな転写ユニットの産生を実際に生じるような様式で、染色体（ゲノム）DNAに導入される（ここで、DNA構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結する）。染色体DNAへのこれらの構

成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化する。

【0232】

本明細書中で記載されるように、変化された遺伝子発現は、通常は得られたままの細胞においてサイレントな（発現されていない）遺伝子の活性化（または発現させる）、ならびに得られたままの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加を包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンを変化させる工程を包含し、その結果、これは、得られたままの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そして得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を減少（排除を含む）させる。

【0233】

細胞の内在性CHL2遺伝子からのCHL2ポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同定組換えが使用され得る1つの方法は、最初に、相同性組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列（例えば、Cre/loxP、FLP/FRT）（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5:521-2; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225:890-900）を、細胞の内在性CHL2ポリペプチドコード領域の上流（すなわち、5'）に配置する工程を包含する。ゲノムCHL2ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された領域に対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼによって、プラスミドは、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノムCHL2ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込み得る（BaubonisおよびSauer, 1993, Nucleic Acids Res. 21:2025-29; O'Garmanら、1991, Science 251:1351-55）。転写を増加させることが知られている任意の側方配列（例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内在性CHL2遺伝子からの新たなまたは増加したCHL2ポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で一体化する。

【0234】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノムC H L 2ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株のゲノムの他の位置に第2の組換え部位を導入するために相同性組換えを使用することである。適切な組換え酵素は、次いで、二組換え部位細胞株に導入され、組換え減少（欠失、転化、および転移）を生じ（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）、これは、細胞の内在性C H L 2遺伝子からの新規なまたは増加したC H L 2ポリペプチド産生を生じる新しいかまたは改変された転写ユニットを作製する。

【0235】

細胞の内在性C H L 2遺伝子からのC H L 2ポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性C H L 2遺伝子からの新たなまたは増加したC H L 2ポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増加するかまたは引き起こし、そして/または遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサ）の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的DNA結合ドメインを含むポリペプチド）を、細胞の内在性C H L 2遺伝子からの新たなまたは増加したC H L 2ポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

【0236】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なDNA構築物に関する。特定の実施形態において、代表的なDNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）制御配列、（c）エキソン、および（d）不对スプライドナー部位。DNA構築物中の標的配列は、エレメント（a）～（d）の細胞中の標的遺伝子への組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（d）は、内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、DNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）制御配列、（c）エキソン、（d）スプライドナー部位、（e）イントロ

ン、および(f)スプライスアクセプター部位。ここで、標的配列は、エレメント(a)~(f)の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント(b)~(f)は、内在性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同性組換えが生じる細胞染色体DNAの予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エキソンは、一般的に、制御配列の3'であり、そしてスプライドナー部位は、このエキソンの3'である。

【0237】

特定の遺伝子の配列(例えば、本明細書中で記載されるCHL2ポリペプチドの核酸配列)が公知である場合、遺伝子の選択された領域に対して相補的なDNAの部分は、合成されるか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブのDNAの適切な制限等によって得られ得る。この部分は、細胞に挿入された際に、標的配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA複製の間に生じる場合、このDNAの部分、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、Okazakiフラグメントとして作用し、そしてDNAの新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、CHL2ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的配列として使用され得る。

【0238】

CHL2ポリペプチド細胞治療(例えば、CHL2ポリペプチドを産生する細胞の移植)もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態のCHL2ポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このようなCHL2ポリペプチド産生細胞は、CHL2ポリペプチドの天然のプロデューサーである細胞であり得るか、または組換え細胞であって、そのCHL2ポリペプチドを産生する能力が、所望のポリペプチドをコードする遺伝子またはCHL2ポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、その発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。CHL2ポリペプチドを投与されている患者における強力な免疫学的反応を最小化するために、

異種のポリペプチドの投与と共に生じる場合、CHL2ポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒトCHL2ポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、CHL2ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトCHL2ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【0239】

移植細胞は、周辺組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、CHL2ポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）の形態で患者に移植され得る。あるいは、CHL2ポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしで、患者に直接移植され得る。

【0240】

生きた細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびそれらの患者への移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgeら（PCT公開WO95/05452およびPCT/US94/09299）は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に取り出し可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インビボで下方制御に供されないプロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、生きた細胞由来の分子のレシピエント内の特定の部位への送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同第5,106,627号を参照のこと。生きた細胞をカプセル化するためのシステムは、PCT公開WO91/10425（Aebischerら）に記載される。PCT公開を91//10470（Aebischerら）；Winnら、1991, *Exper. Neurol.* 113:322-29；Aebischerら、1991, *Exper. Neurol.* 111:269-75；およびTrescoら、1

992, ASAI O 38:17-23もまた参照のこと。

【0241】

CHL2ポリペプチドのインビボおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的または誘発性プロモーターに作動可能に連結され得るCHL2ポリペプチドをコードするCHL2遺伝子(ゲノムDNA、cDNAおよび/または合成DNAのいずれか)を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内在性CHL2遺伝子に対してホモ接合性またはヘテロ接合性であるが、ただし、これは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分としては、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されるDNA分子(例えば、相同性組換えのために有用な内在性配列)、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を越える選択的優性を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子(例えば、細胞標的化について)が挙げられる。細胞特異的内部移行、ベクターからの発現を増大する転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含む。

【0242】

遺伝子治療DNA構築物は、次いで、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して細胞に導入され得る(エキソビボまたはインビボのいずれか)。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの方法は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターの使用による。特定のベクター(例えば、レトロウイルスベクター)は、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質に残る。

【0243】

さらに他の実施形態において、制御エレメントが、標的細胞におけるCHL2遺伝子の制御された発現のために含まれ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答して刺激される。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインお

よび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性タンパク質）を二量化する低分子二量化剤またはラパログ（rapalog）の使用を包含する（PCT公開WO96/41865、WO97/31898およびWO97/31899を参照のこと）。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【0244】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、小胞体における凝集タンパク質の保持を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを破壊し、その結果、このタンパク質は細胞から分泌され得る。Aridorら、2000, Science 287:816-17およびRiveraら、2000, Science 287:826-30を参照のこと。

【0245】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中で記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。Mifepristone（RU486）は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2つの転写因子（これは、次いで、核に至り、DNAに結合する）のダイマーを形成することによって、転写を活性化する。このリガンド結合ドメインは、天然のリガンドに結合するレセプターの能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第5,364,791号、ならびにPCT公開WO96/40911およびWO97/10337に記載される。

【0246】

さらに別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、

そしてこれを活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは核に転移し、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、およびリガンド結合ドメインを含み、転写を開始する。エクジソン系はさらに、米国特許第5,514,578、およびPCT公開WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162に記載される。

【0247】

別の制御手段は、陽性テトラシクリン制御可能トランス活性化因子を使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異したtetレプレッサタンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン制御トランス活性化因子タンパク質を生じた変異したtetR-4アミノ酸の変化、すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号、および同第5,654,168号に記載される。

【0248】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号（Innovir Laboratories Inc.）に記載される。

【0249】

インビボ遺伝子治療は、CHL2ポリペプチドをコードする遺伝子を、CHL2核酸分子の局所注射によって、または適切なウイルスもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。Hefti, 1994, Neurobiology 25:1418-35。例えば、CHL2ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターに含まれ得る（例えば、Johnson, PCT公開WO95/34670；PCT出願PCT/US95/07178を参照のこと。組換えAAVゲノムは、典型的に、機能的プロモーターに作動可能に連結したCHL2ポリペプチドをコードするDNA配列およびポリアデニル化配列に隣接す

るAAV逆末端反復を含む。

【0250】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、および乳頭腫ウイルスベクターが挙げられる。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含むインビボウイルス媒介遺伝子転移系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するためにインビトロで処置されたヒト細胞の送達によって、治療タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号(アデノウイルスベクターを含む)、同第5,672,510号(レトロウイルスベクターを含む)、同第5,635,399号(サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む)に記載される。

【0251】

非ウイルス送達法としては、リポソーム媒介送達、裸のDNA送達(直接注射)、レセプター媒介送達(リガンド-DNA複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃)が挙げられるがこれらに限定されない。遺伝子治療材料および方法はまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサー-プロモーター、部位特異的組込みのために設計されたDNA配列、親細胞を越える選択的優性を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブな選択系および発現制御系(安全性の指標)、細胞特異的結合因子(細胞ターゲティングのため)、細胞特異的內部移行因子、およびベクターならびにベクター製造の方法による発現を増大する転写因子を含み得る。遺伝子治療技術の実施のためのこのようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号(エレクトロポレーション技術を含む)、同第5,679,559号(遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する)、同第5,676,954号(リポソームキャリア

を含む)、同第5, 593, 875号(リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する)、および同第4, 945, 050同第(生物学的に活性な粒子がある速度で細胞に噴霧され、それによりこの粒子がこの細胞の表面に浸透し、そしてこの細胞の内側に組み込まれるプロセスを記載する)、およびPCT公開WO96/40958(核リガンドを含む)に記載される。

【0252】

CHL2遺伝子治療または細胞治療はさらに、同じか異なる細胞(単数または複数)における1つ以上のさらなるポリペプチドの送達を含み得ることもまた企図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、この細胞は、単一の移植可能デバイス(例えば、上記のカプセル化膜)に含められ得るか、あるいはこの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0253】

遺伝子治療による細胞における内在性CHL2ポリペプチドの発現を増加する手段は、CHL2ポリペプチドプロモーターに1つ以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここでエンハンサーエレメントは、CHL2遺伝子の転写活性を増加させるように働き得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することを所望する組織に基づいて選択される。エンハンサーエレメントは、組織が選択されるという点で、プロモーター活性化を与えることが知られている。例えば、CHL2ポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「オンに変わる」場合、1ckプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。従って、付加される転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、CHL2ポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る(そして必要に応じて、ベクターおよび/または5'および/または3'隣接配列に挿入される)。「相同性組換え構築物」として公知のこの構築物は、次いで、エキソビボまたはインビボのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0254】

遺伝子治療はまた、内在性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、CHL2ポリペプチド発現を増加するために使用され得る。このような

改変は、典型的に、相同性組換え方法によって達成される。例えば、不活性化のために選択されたCHL2遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーターの断片を除去および/または置換するように操作され得る。例えば、プロモーターの転写活性化因子のTATAボックスおよび/または結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、それにより対応するCHL2遺伝子の転写を阻止し得る。プロモーターにおけるTATAボックスまたは転写活性化因子結合部位の欠失は、CHL2ポリペプチドプロモーター（調節されるCHL2遺伝子と同じかまたは関連の種由来）のすべてまたは関連の部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のTATAボックスおよび/または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、および/または挿入によって変異される。結果として、TATAボックスおよび/または活性化因子結合部位は、活性を減少するか、または完全に不活性にされる。この構築物（これはまた、典型的に、改変されたプロモーターセグメントに隣接したネイティブの（内在性）5'および3'DNA配列に対応する少なくとも約500塩基のDNAを含む）は、直接または本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介してのいずれかで、適切な細胞に（エキソビボまたはインビボ/いずれかで）導入され得る。典型的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組込みは、相同性組換えによってであり、ここで、このプロモーター構築物の5'および3'DNA配列は、内在性染色体DNAへのハイブリダイゼーションによって、改変プロモーター領域を一体化するのを助けるように働き得る。

【0255】

（治療的使用）

CHL2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストを使用して、本明細書中に列挙される疾患、障害または状態を含む、多くの疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防し得る。

【0256】

CHL2ポリペプチドアゴニストおよびアンタゴニストとしては、CHL2ポ

リペプチド活性を調節しそしてこのCHL2ポリペプチドの成熟形態の少なくとも1つの活性を増加させるかまたは減少させるかのいずれかである分子が挙げられる。アゴニストまたはアンタゴニストは、CHL2ポリペプチドと相互作用しそしてこれによってその活性を調節する補因子（例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子）であり得る。潜在的なポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストとしては、CHL2タンパク質の細胞外ドメインの一部または全てを含むCHL2ポリペプチドの可溶性形態または膜結合形態のいずれかと反応する抗体が挙げられる。CHL2ポリペプチド発現を調節する分子としては、代表的に、発現のアンチセンスレギュレーターとして作用し得る、CHL2ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。

【0257】

成体において、BMPファミリーの遺伝子産物（特に、BMP2およびBMP4）の主要な役割の1つは、骨重量の調節である。BMP1は、CHDを切断および不活性化することが示されており、そしてBMP2およびBMP3と共に骨から単離されているので（Wozneyら、1988、Science 242:1528-34; Celesteら、1990、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:9843-47）、CHL2ポリペプチドは、骨形成における重要な調節の役割を果たし得る。従って、CHL2核酸分子、ポリペプチドならびにそのアゴニストおよびアンタゴニスト（抗CHL2選択的結合因子が挙げられるが、これらに限定されない）は、骨密度に影響する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、骨線維症および骨粗しょう症が挙げられるが、これらに限定されない。骨密度に影響する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれる。

【0258】

血流を介する再生中の骨へのBMP4または他のBMPファミリーメンバーの直接送達は、骨線維症の処置についての直結する治療的概念であるようである。しかし、BMP4は、インビボで短い距離しか移動しないことが知られているので（Jonesら、1996、Curr. Biol. 6:1468-75）、これは、達成が困難であり得る。胚発生の際のCHDの場合、BMPとCHLII

ポリペプチドとの間の複合体の形成は、BMPのさらなる移動およびBMP4の濃度勾配の形成を生じ得る(JonesおよびSmith、1998、Dev. Biol. 194:12-17)。

【0259】

関節軟骨の表面でのCHL2遺伝子発現の空間的に厳密な調節に基づき(ここで、軟骨損傷の最初の兆候が、変形性関節症の病原の間に検出される)、CHL2ポリペプチドの発現レベルの変化は、変形性関節症またはリウマチ様関節炎の病原において役割を果たし得る。従って、CHL2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストは、変形性関節症の早期の間に軟骨の線維症を予防し、変形性関節症またはリウマチ様関節炎の後期において一旦破壊された表層領域を再生し、または移植された軟骨において適切な表層領域(すなわち、表面)を生成することにおいて、有用であり得る。

【0260】

BMPポリペプチドは、後期胚発生の中の器官形成において機能することが示されている。胚性の腎臓、肺および消化管における器官形成は、BMP4発現によって影響されることが示されている(Hogan 1996、Genes Dev. 10:1580-94)。BMP4とCHL2ポリペプチドとの組み合わせは、これらの組織中の前駆細胞の増殖および分化を制御し、それによってインビボでの組織再生または創傷治癒の調節を可能にするために有用であり得る。したがって、CHL2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストは、組織再生または創傷治癒の促進において、有用であり得る。

【0261】

CHL2核酸分子、ポリペプチド、そのアゴニストおよびアンタゴニストはまた、造血幹細胞の発生および展開において使用され得る。BMP/CHL2ポリペプチド複合体を使用して始原造血幹細胞を調節し、そしてそれによって成体骨髄の再増殖性の幹細胞を制御することが可能であり得る。あるいは、中胚葉幹細胞由来の幹細胞の発生を制御することが可能であり得る。従って、本発明のCHL2ポリペプチドおよび核酸は、BMPと共に、造血幹細胞のエキソビボの展開およびこのような細胞を介して実行される遺伝子治療のために有用であり得る。

【0262】

BMP4は、マウスES細胞から造血前駆細胞を生成するための必須の因子である。しかし、BMP4の有効濃度は、狭い範囲(0.5 ng/ml ~ 5 ng/ml)にあり、これは、BMPの活性濃度における差異が、全能性原外胚葉から生じる細胞型の差異に相関するという考えと一致する。ES細胞からの造血幹細胞の再現性のあるインビトロ生成のためのシステムは、まだ開示されていない。しかし、これは、BMP4の濃度の正確な制御によって達成され得る。本発明のCHL2核酸分子およびポリペプチドは、ES細胞からの造血幹細胞のインビトロ生成のための培養条件を最適化することにおいて有用であり得る。

【0263】

始原造血幹細胞は、マウス卵黄嚢において近年明らかにされている(Yoderら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6776-80)。この造血幹細胞の下位分類は、成体における骨髄再増殖活性を示さない。しかし、新生肝臓の環境に曝された場合、この始原幹細胞は、長期の骨髄再増殖性の幹細胞に変換される(すなわち、二次(definitive)幹細胞)。これはまた、特定の間質細胞株上で始原幹細胞を培養することによって達成され得る。培養物中のこの二次幹細胞の長期間の生存と、自然に二次幹細胞に分化する始原幹細胞の長期の維持は、いまだ確立されていない。BMPとCHL2ポリペプチドとの間の相互作用は、二次幹細胞の調節において機能し得る。本発明の組換えCHL2ポリペプチドおよびCHL2抗体は、インビトロでの長期間の造血幹細胞の維持およびインビトロでの始原幹細胞からの二次幹細胞の生成のための、有用なツールであり得る。あるいは、BMP4または推定の新規CHL2相互作用分子は、これらのプロセスを制御するために有用であり得る。

【0264】

さらに、始原造血幹細胞は、まだ十分に特徴付けられていない。始原幹細胞は、リンパ球性の細胞型のものであり得るが、このような細胞はまた、造血細胞型および他の中胚葉子孫を生成し得る、中胚葉前駆体であり得る。この考えの支持において、成体の骨髄は、内皮前駆細胞、肝臓を再生する細胞(Petersenら、1999、Science 284:1168-70)、ならびに内皮細

胞、筋細胞および造血細胞をインビボで誘導する能力を有する一般的な幹細胞を含むことが、近年示されている (Ferrariら、1998、Science 279:1528-30)。さらに、骨芽細胞系統 (これは、骨髄間質からなる) は、骨髄に存在する中胚葉幹細胞から誘導されることが公知である。一般的な中胚葉幹細胞が、間質細胞および造血細胞の両方の生成を担う可能性もまた、以前に推測されている。

【0265】

CHL2ポリペプチドの発現が、骨格筋において検出されたことから、CHL2ポリペプチドはまた、骨格筋の発達および機能において役割を果たし得る。従って、CHL2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストは、骨格筋に影響する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、悪液質および筋ジストロフィーが挙げられるが、これらに限定されない。骨格筋の発達および機能に関連する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれる。

【0266】

CHL2ポリペプチドの発現が、心臓において検出されたことから、CHL2ポリペプチドは、心臓の発達および機能において役割を果たし得る。従って、CHL2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストはまた、心臓に影響する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、不整脈、狭心症、高血圧、心筋梗塞および鬱血性心不全が挙げられるが、これらに限定されない。心臓に関連する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれる。

【0267】

CHL2ポリペプチドの発現が、胃において検出されたことから、CHL2ポリペプチドは、胃の発達および機能において役割を果たし得る。従って、CHL2核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストはまた、胃に関する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、胃癌および胃潰瘍が挙げられるが、これらに限定されない。胃に関連する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれ

る。

【0268】

C H L 2 ポリペプチドの発現が、肝臓において検出されたことから、C H L 2 ポリペプチドは、肝臓の発達および機能において役割を果たし得る。従って、C H L 2 核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストはまた、肝臓に関する疾患および状態の診断または処置において有用であり得る。このような疾患および状態の例としては、肝炎および肝癌が挙げられるが、これらに限定されない。肝臓に関連する他の疾患および状態は、本発明の範囲内に含まれる。

【0269】

C H L 2 ポリペプチド機能のアゴニストまたはアンタゴニストは、その処置される状態に適切であるようなサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および/または化学療法剤の1以上と組み合わせて(同時にまたは連続的に)使用され得る。

【0270】

所望でないレベルのC H L 2 ポリペプチドによって引き起こされるかまたは媒介される他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。所望されないレベルとしては、C H L 2 ポリペプチドの過剰なレベルおよびC H L 2 ポリペプチドの正常下のレベルが挙げられる。

【0271】

(C H L 2 核酸およびポリペプチドの使用)

本発明の核酸分子(それ自体が生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む)を使用して、染色体上に、C H L 2 遺伝子および関連する遺伝子の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術(例えば、P C R 増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション)によって行われ得る。

【0272】

C H L 2 核酸分子(それ自体が生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む)は、哺乳動物の組織または体液サンプルにおけるC H L 2 核酸分子の存在について定性的にかまたは定量的にかのいずれかで試験するための診

断アッセイにおける、ハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0273】

他の方法もまた、1以上のCHL2ポリペプチドの活性を阻害することが所望である場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列（三重らせん構造）またはCHL2 mRNAに対して相補的でありそしてハイブリダイズする核酸分子によって、もたらされ得る。例えば、CHL2遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有するアンチセンスDNAまたはRNA分子が、細胞に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるCHL2遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術によって設計され得る。代表的には、各々のこのようなアンチセンス分子は、各選択されたCHL2遺伝子の開始部位（5'末端）に相補的である。次いで、このアンチセンス分子が、対応するCHL2 mRNAにハイブリダイズする場合に、このmRNAの翻訳が、阻止または減少される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物中のCHL2ポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供する。

【0274】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1以上のCHL2ポリペプチドのドミナントネガティブなインヒビターを作製し得る。この状況において、各々の選択されたCHL2ポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするDNAを調製し、そして本明細書中に記載のようなウイルス性または非ウイルス性の方法を使用して、患者の細胞に導入し得る。各々のこのような変異体は、代表的に、その生物学的役割において内在性ポリペプチドと競合するように設計される。

【0275】

さらに、CHL2ポリペプチド（生物学的に活性であるか否かにかかわらず）は、免疫原（つまり、このペプチドは、少なくとも1つのエピトープを含み、それに対して、抗体が惹起され得る）として使用され得る。CHL2ポリペプチド（本明細書中に記載されるような）に結合する、選択的な結合剤が、インビボおよびインビトロでの診断目的（体液または細胞サンプルにおけるCHL2ポリペプチドの存在を検出するための、標識された形態での使用が挙げられるが、これらに限定されない）に使用され得る。これらの抗体はまた、本明細書中に列挙し

た疾患および障害を含む、多くの疾患および障害を、予防、処置または診断するために使用され得る。これらの抗体は、C H L 2 ポリペプチドに結合し、C H L 2 ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を減少またはブロックし得るか、あるいはポリペプチドに結合して、C H L 2 ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を増加し得る（C H L 2 ポリペプチドの薬物動態を増加することによることを含む）。

【0276】

本発明のC H L 2 ポリペプチドは、発現クローニングストラテジーを使用して、C H L 2 ポリペプチドレセプターをクローニングするために使用され得る。放射性標識した（¹²⁵ヨウ素）C H L 2 ポリペプチドまたはアフィニティー/活性タグ化C H L 2 ポリペプチド（例えば、Fc融合体またはアルカリホスファターゼ融合体）が、C H L 2 ポリペプチドレセプターを発現する細胞型または細胞株または組織を同定するための結合アッセイにおいて使用され得る。このような細胞または組織から単離されたRNAを、cDNAに変換し、哺乳動物発現ベクターにクローニングし、そして哺乳動物細胞（例えば、COSまたは293細胞）にトランスフェクトして、発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射標識化またはタグ化C H L 2 ポリペプチドを、親和性リガンドとして使用して、このライブラリーから、C H L 2 ポリペプチドレセプターをその表面上で発現する細胞のサブセットを同定および単離し得る。次いで、DNAを、これらの細胞から単離しそして哺乳動物細胞にトランスフェクトして、二次発現ライブラリーを作製し得る。このライブラリーでは、C H L 2 ポリペプチドレセプターを発現する細胞の割合が、元のライブラリーにおける割合よりも、数倍高い。この富化プロセスは、C H L 2 ポリペプチドレセプターを含む単一の組換えクローンが単離されるまで、反復的に繰り返され得る。このC H L 2 ポリペプチドレセプターの単離は、C H L 2 ポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性C H L 2 ポリペプチドレセプター、抗C H L 2 ポリペプチドレセプター抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、そしてこれらは、本明細書中に記載の疾患または障害の1以上を処置、

予防または診断するために使用され得る。

【0277】

本発明のマウスおよびヒトのCHL2核酸はまた、その対応する染色体CHL2ポリペプチド遺伝子を単離するための有用なツールである。例えば、CHL2配列を含むマウス染色体DNAを使用して、ノックアウトマウスを構築し得、これによって、CHL2ポリペプチドについてのインビボでの役割の試験を可能にする。ヒトCHL2ゲノムDNAを使用して、遺伝的な組織変性疾患を同定し得る。

【0278】

マウスおよびヒトCHL2ポリペプチドをコードするcDNAの寄託物はまた、pSPORT1(Gibco BRL)にサブクローニングされ、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、VA 20110-2209によって2000年3月14日に作製された受託番号PTA-1479およびPTA-1480を有する。

【0279】

以下の実施例は、例示目的のみであることが意図され、そして決して本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0280】

(実施例1：マウスCHL2ポリペプチド遺伝子のクローニング)

一般的に、Sambrookら(前出)に記載されるような材料および方法を、マウスCHL2ポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析するために使用した。

【0281】

マウスCHL2ポリペプチドをコードする配列を単離するために、2つのマウス胎盤cDNAライブラリーを調製した。標準的な抽出および単離技術を使用して、総RNAをマウス胎盤から抽出し、そしてポリ-A+RNAを選択した。次いで、ランダムプライムされた(random-primed)cDNAを、Superscript Plasmid System for cDNA S

ynthesis (Gibco - BRL, Rockville, MD) を使用して、ポリ - A + RNA から合成した。生じた cDNA を、Not I で消化し、そして 0.8% アガロースゲルで分画した。電気泳動された 300 ~ 1000 bp の cDNA を単離して、シグナルトラップベクター kFGF7 中に連結し、そして 1.5 kb より大きい cDNA を単離して、pSPORT1 中に連結した。連結反応物を、標準的な形質転換技術を使用して E. coli に導入し、これらの形質転換体をアンピシリン含有培地上で選択し、そして 2 つの cDNA ライブラリーを作製するためにこれらの形質転換体を回収した。

【0282】

シグナルペプチド配列を含むクローンを、kFGF シグナルトラッピング技術を使用して、kFGF に基づいたライブラリーから富化した (米国特許出願番号 09/026,959)。この cDNA ライブラリー由来のプラスミド DNA を、各 100,000 コロニーの 10 個のプールから、標準的な技術を使用して調製した。この DNA を、リン酸カルシウムトランスフェクションによって NIH 3T3 細胞中に導入し、次いで、トランスフェクトされた細胞を、0.5% ウシ胎仔血清を補充した選択培地中で 14 日間増殖させた。シグナルペプチド配列を有するプラスミドを含む形質転換体だけが、コロニーを生成した。これらのコロニーを、トリプシン処理によって回収し、そして、これらのコロニー由来の総 RNA を、製造業者の薦めるプロトコールに従って、TRIzol 試薬 (Gibco - BRL) を使用して単離した。ポリ - A + RNA を、mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を使用して、この総 RNA から単離した。

【0283】

シグナルペプチド配列を含む分子を富化された cDNA ライブラリーを生成するため、第一鎖の cDNA を、SuperScript™ 前増幅 (preamplification) システム (Gibco - BRL) を使用して、上で単離されたポリ - A + RNA から最初に調製した。この第一鎖の cDNA 反応を、全体容積 15 μ L 中の 1 μ g のポリ - A + RNA と 2 pmol のプライマー 1605 - 21

【0284】

【化1】

(5'-A-A-T-C-C-G-A-T-G-C-C-C-A-

C-G-T-T-G-C-A-G-T-A-3'; 配列番号12)

とを組み合わせ、そしてこの鋳型 - プライマー混合物を70℃で10分間加熱することによって実行した。この鋳型 - プライマー混合物を、50℃に移し、そして2.5μLの10×緩衝液、2.5μLの25mM MgCl₂、1.3μLの10mM dNTPおよび2.5μLの0.1Mのジチオスレイトールを含む反応前混合物 (premixture) を添加した。次いで、逆転写酵素 (250U) を添加し、そしてこの反応物を50℃で1時間インキュベートした。第一鎖cDNA反応を、70℃で15分間加熱することによって停止させ、そして2UのRNase Hによって37℃で20分間処理することによってRNAを消化した。

【0285】

第一鎖cDNA合成に続いて、100μLの容積中に各々0.5μMの最終濃度で2μLの第一鎖cDNA、プライマー1239-08

【0286】

【化2】

(5'-A-A-A-A-T-C-T-T-A-G-A-C-C-G-A-C-G-A-C-

T-G-T-G-T-T-T-3'; 配列番号13)

および1605-22

【0287】

【化3】

(5'-C-G-T-A-A-A-A-G-A-T-
C-C-T-G-C-G-C-T-A-G-A-T-G-C-G-3'; 配列番号/4)

を含み、200 μ MのdNTP、および2.5 UのPfuポリメラーゼ (PE Biosystems、Norwalk、CT) を含む反応物において、二本鎖cDNAを、PCR増幅によって生成した。このPCR反応を、95 で1分間を1サイクル; 95 で30秒間、66 で45秒間、および72 で2分間を30サイクル; そして72 で10分間を1サイクルで実行した。増幅産物を、Not IおよびSal Iで消化し、そしてkFGF7中に連結した。この連結反応物を、標準的な形質転換技術を使用してE. coliに導入して、シグナルが富化されたcDNAライブラリーを生成した。プラスミドDNAを、400個の選択されたクローンから調製し、配列決定によって分析した。

【0288】

1つのクローン (ymkz5-00011-c10と名付けた) の配列が、Xenopus (GenBank登録番号Q91713) 由来のコルディン (chordin) 前駆体と有意な相同性を共有することが見出された。この同定されたクローンは、マウスCHL2のN末端の115アミノ酸をコードする418bpの挿入を含むことが見出された。全長のcDNAクローンを、ymkz5-00011-c10クローンをプローブとして使用して、pSPORT1中にクローニングされたcDNAライブラリーから単離した。

【0289】

pSPORT1ライブラリーをスクリーニングするため、 1×10^6 クローンを、1プレート当たり約 5×10^4 クローンで150mmプレートにプレートし、次いで、これらのクローンをプレートからニトロセルロース膜上に乗せた。フィルターを、68 で30分間、ExpressHybハイブリダーゼーション溶液 (Clontech) 中でプレハイブリダイズし、次いで、 32 P-dCTP標識されたプローブを含む同じハイブリダーゼーション溶液中で68 で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたフィルターを、 $2 \times$ SSCおよび

0.1% SDS中で、室温で10分間、2回洗浄し、そして0.1×SSCおよび0.1% SDS中で65℃で30分間、2回洗浄した。洗浄後、フィルターを、強化されたスクリーンの存在下で、-80℃で一晩オートラジオグラフィーに供した。陽性クローンを、再びスクリーニングした。二次スクリーニングに従って、2つの陽性クローンを同定し、そしてこれら2つのクローン由来のDNAを、単離し、そして配列決定した。1つのクローン(pSPORTmCHL2と名付けた)は、約1.8kbの挿入を含み、これは、完全なマウスCHL2ポリペプチドをコードした。

【0290】

マウスCHL2ポリペプチドについての全長cDNAの配列分析は、この遺伝子が426アミノ酸のタンパク質をコードする1278bpのオープンリーディングフレームを含む遺伝子であることを示した。図1A~1Cは、マウスCHL2遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)およびマウスCHL2ポリペプチドの予測されたアミノ酸配列(配列番号2)を例示する。図1Aにおいて、von Heijneアルゴリズムによって予測されたシグナルペプチド配列に、下線を付す。

【0291】

マウスCHL2アミノ酸配列のコンピューター分析は、このポリペプチドが、CHL(CHL1)ポリペプチドおよびCHLd5ポリペプチド(同時係属中かつ共有に係る米国特許出願番号09/724,915)のように、3つのプロコラーゲンリピート(CRモチーフ)を有することを示した(対照的に、CHDにおいては4つのリピートが観察される)(図5)。CHL2のアミノ酸配列は、マウスのコルディンと24.4%の同一性を共有する(またはGAP調査では28%の同一性を共有する)ことが見出された。図2は、マウスCHL2ポリペプチド(マウスCHL2;配列番号2)とマウスコルディン(Af069501;配列番号7)のアミノ酸配列のアラインメントを例示する。マウスCHL2ポリペプチドのアミノ酸配列はまた、CHL1と50%の同一性を共有し、そしてBMPおよびSOGと構造的類似性を共有し、この類似性は特にCRドメインにおいて高い。CeleraヒトゲノムデータベースのBLAST調査は、CHL2

遺伝子が、CHL1遺伝子と最大の同一性を共有することを示した。これらの結果は、CHL2遺伝子がCHD/SOG遺伝子ファミリーの新規メンバーであることを示唆する。

【0292】

(実施例2：ヒトCHLポリペプチド遺伝子のクローニング)

一般的に、Sambrookら(前出)に記載されるような材料および方法を、ヒトCHL2ポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析するために使用した。

【0293】

ヒトCHL2ポリペプチドをコードする配列を単離するために、ヒト胎盤cDNAライブラリーを調製した。標準的な抽出および単離技術を使用して、総RNAをヒト胎盤から抽出し、そしてポリ-A+RNAを選択した。次いで、オリゴd(T)プライムされた(Origo d(T)-primed)cDNAを、Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis(Gibco-BRL)を使用してポリ-A+RNAから合成した。生じたcDNAを、NotIで消化し、そして0.8%アガロースゲルで分画した。電気泳動された1.5kbより大きいcDNAを単離し、pSPORT1中に連結した。連結反応物を、標準的な形質転換技術を使用してE.coliに導入し、これらの形質転換体をアンピシリン含有培地上で選択し、そしてこれらの形質転換体をヒト胎盤cDNAライブラリーを作製するために回収した。

【0294】

³²P-dCTP標識されたマウスCHL2cDNAフラグメントを使用して、ヒト胎盤cDNAライブラリーをスクリーニングした。プラスミドDNAを、各100,000クローンの12個のプールから単離し、各プール由来の1μgのプラスミドDNAを、NotIおよびSalIで消化して、0.8%のアガロースゲルで電気泳動し、次いで、ニトロセルロース膜に転移させた。フィルターを、60℃で30分間、ExpressHybハイブリダーゼーション溶液(Clontech)中でプレハイブリダイズし、次いで、マウスCHL2cDNA

プローブを含む同じハイブリダーゼーション溶液中で60℃で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたフィルターを、2×SSCおよび0.1%SDS中で、室温で10分間、2回洗浄し、そして0.5×SSCおよび0.1%SDS中で60℃で30分間、2回洗浄した。洗浄後、フィルターを、強化されたスクリーンの存在下で、-80℃で一晩オートラジオグラフィーに供した。陽性cDNAフラグメントを、12個のプラスミドプールのうち2個において同定した。

【0295】

ヒトCHL2ポリペプチドをコードする配列を含む個々のクローンを、150mmプレートに各プール由来の 3×10^5 のクローンを1プレート当たり約 5×10^4 でプレートすることによって、上で同定した2個のプラスミドプールから単離した。次いで、これらのクローンを、プレートからニトロセルロースフィルター上に乗せ、そしてこのフィルターを、上記のように分析した。2つの陽性クローンを同定し、そして各々を配列決定分析に供した。1つのクローン(pSPORThCHL2と名付けた)は、完全なヒトCHL2ポリペプチドをコードする、約1.5kbの挿入を含んだ。

【0296】

ヒトCHL2ポリペプチドの全長cDNAの配列分析によって、この遺伝子が、429アミノ酸のタンパク質をコードする1287bpのオープンリーディングフレームを含むことが示された。図3A~3Cは、ヒトCHL2遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号4)およびヒトCHL2ポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号5)を図示する。CHL2のアミノ酸配列は、ヒトコルディンと26.7%の同一性を共有することが見出された。図4は、ヒトVHL2ポリペプチド(ヒトCHL2;配列番号5)とヒトコルディン(Af076612;配列番号8)とのアミノ酸配列アラインメントを図示する。

【0297】

(実施例3:CHL2 mRNA発現)

複数のヒト組織ノーザンブロットまたはマウス組織ノーザンブロット(Clontech)を、それぞれ、 ^{32}P -dCTP標識したヒトまたはマウスのCH

L2 cDNAフラグメントを用いてプローブした。ノーザンプロットを、ExpressHybハイブリダイゼーション溶液(Clontech)中で30分間、68℃でプレハイブリダイズし、次いで、標識プローブを添加した同じ溶液中で、一晩、68℃でハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、フィルターを、2×SSCおよび0.1% SDS中、10分間室温で2回、0.1×SSCおよび0.1% SDS中、30分間68℃で2回洗浄した。洗浄後、このプロットを、増感スクリーンの存在下で、80℃で72時間、オードラジオグラフィに供した。

【0298】

ヒト組織プロットのノーザンプロット分析は、前立腺、精巣、子宮(非常に豊富な発現)、結腸、小腸、心臓、骨格筋および胃において、約2 kbの優勢なCHL2転写物を表した。弱い発現が、気管、胎盤および骨髄で検出され、そして非常に弱い発現が肝臓で検出された。マウス組織プロットのノーザンプロット分析は、肝臓および腎臓において、約1.8 kbの優勢なCHL2転写物を表した。非常に弱い発現が心臓で検出された。約2 kbの転写物の弱い発現が、精巣および骨格筋で検出された。マウスの胃の組織においてCHL2の発現は分析されなかった。非常に弱い発現が、7日、11日、15日および17日目の胚のマウス胚組織において検出された。

【0299】

ノーザンプロット分析によって、CHD/SOGとCHL2ポリペプチドとの間の関係が強化される。CHD/SOGは、E7胚で比較的高レベルで発現され、そしてより低いレベルでE11、E15およびE17胚で発現される(Pappanoら、1998、Genomics 52:236-39)。CHL2 mRNAは、E7、E11、E15およびE17胚において同様に検出されたが、CHD/SOG転写物よりも低いレベルであった。CHD/SOGは、脾臓、肝臓、および腎臓で発現された(Pappanoら、1998)。CHL2 mRNAは、肝臓および腎臓で同様に検出された。発現パターンにおける類似性は、構造における類似性と組み合わせて、CHL2およびCHD/SOGが、類似の生物学的活性を有するが、これらのタンパク質が、異なる発生段階で機能し得

ることを示唆する。

【0300】

CHL2 mRNAの発現は、インサイチュハイブリダイゼーションによって局在化された。胚および成体マウス組織の切片に対するインサイチュハイブリダイゼーションを、記載されるように、実施した(Wilcox, 1993, J. Histochem. Cytochem. 41: 1725~33)。マウスCHL2プローブを、最初にpSPORTmCHL2から1.2kbのNcoI-SacIフラグメントを除去することによって調製して、pSPmCHL2COOHを生成し、これを次いでEcoRIで直線化した。さらに、HindIIIフラグメントを取り出して、pSPmCHL2NH2を得た。アンチセンスRNAを、SP6 RNAポリメラーゼを用いて合成した。これらのプラスミドから合成したRNAは、非重複配列を含んだ。

【0301】

インサイチュハイブリダイゼーション分析によって、CHL2 mRNA発現が、マウスにおいて約12.5日目の胚で胸骨において開始され、そして成体の関節軟骨の限定された領域に存続することが実証された。CHL2 mRNA発現は、10.5日目の胚で試験した切片では検出されなかった。13.5日の胚において、強力なCHL2 mRNA発現が、四肢の骨(図6および7)および胸骨における軟骨細胞にわたって、ならびに発達中の関節に隣接する軟骨膜の間葉細胞において検出された。強力だが非常に限定されたCHL2 mRNA発現が、椎骨の発達中の関節軟骨および長骨の骨端内の表面的領域の軟骨細胞でも検出された(図6~8)。18.5日の胚まで、および成人期まで、CHL2 mRNAの骨格発現は、関節軟骨における表面的領域の軟骨細胞の単層に限定された。骨端の成長板(growth plate)は、マウス発生のいずれの時点でもCHL2 mRNA発現を示さなかった。

【0302】

非軟骨性組織のなかでは、有意なCHL2 mRNA発現が、雌性マウスの卵巣、卵管および子宮で、ならびに雄性マウスの精巣、精巣上体およびおそらく他の副腺(例えば、精囊、凝固腺(coagulating gland)、およ

び前立腺)で観察された。子宮壁で観察された強力なシグナルは、子宮で検出されたCHL1 mRNA発現にいくらか類似していた。CHL2 mRNAの弱い発現がまた、結腸表面で検出された。しかし、結腸におけるCHL2発現の位置は、CHL1の位置とは明白に異なっており、ここでCHL2 mRNAは、粘膜下と筋層とを分ける線維芽細胞/結合組織細胞において検出された(Nakayamaら、2001)。CHL1遺伝子と対照的に、CHL2 mRNA発現は、胃または小腸では検出されなかった。従って、軟性組織のなかでも、CHL2遺伝子は、生殖器官において特に発現された。

【0303】

(実施例4：マウスCHL2ポリペプチド遺伝子の染色体マッピング)

蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)分析を使用して、マウスCHL2遺伝子の染色体局在を決定する(Shira、1997、Genomics 45:42-47)。FISHプローブを、標準技術およびマウスCHL2遺伝子の5'非翻訳領域に対応するプライマー(5'-TCCTCTCATCCTCACCTTAG-3';配列番号15および5'-GGAGAAAGTGAGATAAGGACAC-3';配列番号16)を使用するPCRによって、マウスES-129/SvJ II BAC染色体DNAライブラリー(Genome Systems)から単離したBACクローン(F1067)から調製した。マウスCHL2遺伝子を、同時ハイブリダイゼーション(co-hybridization)プローブとして第7染色体セントロメア特異的P1クローンを用いて、第7染色体に局在化した(Shira、1997)。全部で80個の分裂中期細胞を分析し、そして特異的な標識を示した77個のうち10個の細胞を、同時ハイブリダイゼーション実験のために使用した。結果として、CHL2遺伝子は、第7染色体のテロメアに対する異質染色質-真正染色質境界から66%の距離である位置(バンド7E2-E3に対応する)に位置した。従って、CHL2遺伝子は、CHL2遺伝子が常染色体である点でCHL1遺伝子とは異なる。

【0304】

(実施例5：CHL2ポリペプチドの生成)

(A. 細菌におけるCHL2ポリペプチドの発現)

PCRを用いて、CHL2ポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。このPCRには、この配列の5'および3'末端に対応するプライマーを用いる。増幅したDNA産物を制限酵素部位を含むように改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするようにし得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的組み換えDNA方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。luxプロモーターおよびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含むpAMG21(ATCC番号98113)のような例示的ベクターを、挿入したDNAの方向性クローニングのために、BamHIおよびNdeIを用いて消化する。連結した混合物を、エレクトロポレーションによってE. coli宿主株中に形質転換し、そして形質転換体をカナマイシン耐性について選択する。選択したコロニー由来のプラスミドDNAを単離し、そしてDNA配列決定に供してインサート(挿入物)の存在を確認する。

【0305】

形質転換した宿主細胞を、導入前に、30 µg/mL カナマイシンを含有する2 × YT培地中で30 でインキュベートする。最終濃度30 ng/mLへのN-(3-オキソヘキサノイル)-dL-ホモセリンラク톤の添加、それに続く30 または37 のいずれかでの6時間のインキュベーションによって、遺伝子発現を誘導する。CHL2ポリペプチドの発現を、培養物の遠心分離、細菌ペレットの再懸濁および溶解、ならびに、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価する。

【0306】

CHL2ポリペプチドを含有する封入体を、以下の通り精製する。細菌細胞を遠心分離によってペレット化し、そして水中に再懸濁する。この細胞懸濁液を超音波処理によって溶解し、そして195,000 × gでの5~10分間の遠心分離によってペレット化する。この上清を廃棄し、そしてペレットを洗浄してホモジナイザーに移す。このペレットを、均一に懸濁されるまで、5 mLのPercoll溶液(75%液体Percollおよび0.15M NaCl)中にホモジナイズし、次いで希釈して21,600 × gで30分間遠心分離する。封入体

を含む勾配画分を回収してプールする。単離した封入体をSDS-PAGEによって分析する。

【0307】

E. coli が産生したCHL2ポリペプチドに相当する、SDSポリアクリルアミドゲル上の単一のバンドを、ゲルから切り出し、そしてN末端アミノ酸配列を、本質的にMatsudairaら、1987, *J. Biol. Chem.* 262:10~35に記載のように決定する。

【0308】

(B. CHL2ポリペプチド哺乳動物発現ベクターの構築)

マウスCHL2は、pSR mCHL2ベクターを用いて一過性に発現したが、このベクターは以下のように調製した。CHL2ポリペプチドのオープンリーディングフレームを、標準的技術、ならびにプライマー2360~40(5'-GCTATCTAGAGCCACCATGGTTC CCGGGGTGAGGATCATC-3';配列番号17)および2360-41(5'-GCTAGTCGACCTATAATGTCTTGGTCACTTTGTCTG-3';配列番号18)を使用するPCRによってまず増幅した。増幅された産物をXba IおよびSal Iを用いて消化し、次いで、SR-ベースの発現プラスミド(Takebeら、1988、*Mol. Cell. Biol.* 8:466~72)中に挿入して、pSR mCHL2を生成した。

【0309】

FLAGタグ付マウスCHL2ポリペプチド発現構築物を以下のように調製した。全長マウスCHL2 DNAフラグメント(ここで終止コドンがSal I部位で置換されている)を、テンプレートとして全長マウスcDNAクローンならびにプライマー5'-GCTAGCGGCCGCGCCACCATGGTTC CCGGGGTGAGGATCATC-3';配列番号19)および5'-GCTAGTCGACTAATGTCTTGGTCACTTTGTCTGGGC-3';配列番号20)を使用して、PCRによって得た。増幅されたPCR産物をNot IおよびSal Iを用いて消化し、次いで、pFLAG-CMV-5a発現ベクター(Sigma)に、そのカルボキシ末端でCHL2配列とインフレ

ームで結合されたFLAG配列とともに挿入した。得られたmCHL2-FLAG発現プラスミドを、pFLAGmCHL2と名づけた。

【0310】

mCHL2-FLAGポリペプチドの発現を、5% (w/v) の脱脂粉乳 (Trader Joe's, Thousand Oaks CA) を、3% (w/v) ウシ血清アルブミンの代わりに用いた以外は、製造業者の推奨に従って、10 µg/ml の抗FLAGマウスモノクローナル抗体、M2 (Sigma) を使用して、直接ウエスタンブロット分析によって検出した。マウスCHL2に対するウサギポリクローナル抗体を、HarlowおよびLane、Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) に記載のように、カルボキシ末端配列CPEDEAEDDHSEVISTR (配列番号21) に基づく合成ペプチドを用いて惹起した。得られた抗血清を、直接用いるか、または対応するペプチドを用いるアフィニティー (親和性) 精製に供した。

【0311】

mCHL2-FLAGを安定して発現し得るクローンを生成するために、直鎖状のpFLAGmCHL2を用いて、293細胞をトランスフェクトした。安定な形質転換体を選択し、そして無血清順化培地および細胞溶解物の両方における対応するFLAGタグ付タンパク質の発現レベルを、ウエスタンブロット分析によって比較した (Nakayamaら、2001, Dev. Biol. 印刷中)。順化培地をウエスタンブロットの前に濃縮し、次いでこのタンパク質を可視化した。一過性形質転換に基づく発現を、293T細胞を用いて実行した。そして10倍に濃縮した順化培地を上記のように分析した。

【0312】

中規模の調製のために、安定なクローンをCL 1000フラスコ (Integra Biosciences, Ijamsville, MD) において、293 SFM II無血清培地中で培養し、そして順化培地を2~3日ごとに回収した。約3~4 µg/ml の発現レベルを得た。FLAGタグ付タンパク質を

高塩条件下 (Piccoloら、1997, Cell 91:407~16) で抗FLAG M2アフィニティーゲル (Sigma) を用いて、単一工程のアフィニティークロマトグラフィーによって500mlの収集した上清から精製した。各調製物のタンパク質濃度を、M2を用いたウエスタンブロット分析によって決定し、そしてFLAG細菌アルカリフォスファターゼ標準 (Sigma) と比較した。

【0313】

(実施例6：抗CHL2ポリペプチド抗体の生成)

CHL2ポリペプチドに対する抗体を、精製タンパク質または生物学的合成または化学的合成によって生成したCHL2ペプチドを用いて免疫することによって獲得し得る。抗体を生成するための適切な手順は、HudsonおよびBay、Practical Immunology (第二版、Blackwell Scientific Publication) に記載の手順を含む。

【0314】

抗体生成のための1つの手順において、動物 (代表的には、マウスまたはウサギ) に、CHL2抗原 (例えば、CHL2ポリペプチド) を注射し、そして、ハイブリドーマ産生のため、ELISAによって決定した十分な血清力価を有する動物を、選択する。免疫した動物の脾臓を回収し、そして単一細胞懸濁液として調製し、これから脾臓細胞を回収する。脾臓細胞をマウスミエローマ細胞 (例えば、Sp2/0-Ag14細胞) に融合し、DMEM (200U/mLペニシリン、200µg/mL硫酸ストレプトマイシン、および4mMグルタミン含有) 中でまずインキュベートし、次いで、HAT選択培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン) 中でインキュベートする。選択後、組織培養上清を各融合ウェルから取り出し、そしてELISAによって、抗CHL2抗体産生について試験する。

【0315】

抗CHL2抗体を得るため、別の手順をまた、使用し得る。この手順は例えば、ヒト抗体の生成のためのヒトIg遺伝子座を保有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリー (例えば、抗体可変ドメインの変異誘発

によって生成されるライブラリーなど)のスクリーニングである。

【0316】

(実施例7: *Xenopus* 胚におけるマウスCHL2の生物学的活性)

コルディンは、BMP4の活性を阻害することによって原腸形成している *Xenopus* 胚を背方化することが公知である。*Xenopus* 胚の発達に対するCHL2の効果を以下のとおり試験した。pSPORTmCHL2のEcoRI-NotIフラグメントを、最初に、pCS2+(Ruppら、1994、*Genes Dev.* 8:1311~23)にクローニングし、NotIを用いて直鎖化し、そしてキャッピングしたmRNAを、SP6ポリメラーゼで合成して、定量した(Nishinakamuraら、1999、*Dev. Biol.* 216:481~90)。このpSPORTmCHL2プラスミドをまた、NotIで直接直鎖化し、T7ポリメラーゼで転写した。両方の構築物は、二次的軸形成を誘導した。陰性コントロールとして、伸長因子1(EF1)RNAを合成した。

【0317】

各RNAサンプルを、4細胞期の *Xenopus* 胚の2つの腹側割球に注射した。注射後、この胚を10% Steinberg 溶液中で48時間培養し、次いで、異所的な軸についてスコア付けした(Nishinakamuraら、1999; 図9)。割球に1pgのマウスCHL2 RNAを注射した場合、軸複製率は、77~87%にわたったが、一方注射していないコントロール胚およびEF1 RNA注射胚での比率は0%であった。陽性コントロールとして、マウスCHL1 RNAを用いた実験もまた実施した。これらの実験では、10~30pgのCHL1 RNAを用いた場合、83%の軸複製率が得られた。従って、マウスCHL2 RNAは、内因性の腹方化因子(おそらく、BMP4)に拮抗(アンタゴナイズ)する活性がある。

【0318】

(実施例8: マウスCHL2ポリペプチドによるBMP4作用の阻害)

コルディン-CHL1複合体の形成は、BMP4機能を阻害することが公知である。CHL2ポリペプチドについて観察された類似の軸複製活性(実施例7)

によって、CHL2ポリペプチドがまたBMP4作用を直接阻害したことが示唆された。CD34⁺/CD31^{hi}リンパ球造血性前駆細胞、CD34⁺/CD31^{lo}赤血球-骨髄前駆細胞、およびCD45⁺骨髄単球性細胞は、マウス胚性幹細胞(ES)細胞の分化の間の0.15~2ng/mlのBMP4の存在に依存することが示されている(Nakayamaら、2000, Blood 95:2275:83)。

【0319】

CHL2ポリペプチドがBMP4の作用を阻害する能力を、以下のように直接試験した。Rosa26 ES細胞をフィブロネクチンコーティングプレートに移し、無血清培地で2日間調節し、次いで0.9ng/mlのBMP4の存在下で、無血清メチルセルロース培地中で分化させた(Nakayamaら、2000)。0.9ng/mlのBMP4濃度が、ほぼ最大のレベルを生じた。胚様体(EB)を7日目に回収して、コラゲナーゼで分離させた。これらの細胞を、CD31およびCD34のような造血性前駆細胞マーカーのモノクローナル抗体で染色した。そして染色したサンプルをFACScan(Becton Dickinson, San Jose, CA)で分析した。

【0320】

アフィニティー精製したmCHL2-FLAGを100ng/mlを超えて添加した場合、CD34⁺/CD31⁺細胞集団およびCD34⁺/CD31⁺細胞集団は、バックグラウンドのレベル(すなわち、BMP4なしで達成されたレベル; 図10を参照のこと)まで減少した。これらの結果は、FLAGタグ付mCHL2タンパク質がインビトロにおいてBMP4の作用を阻害できたことを示唆する。

【0321】

(実施例9: BMP2作用およびBMP4作用のマウスCHL2ポリペプチドによる阻害)

BMP2およびBMP4の両方とも、C2C12筋芽細胞においてアルカリホスファターゼ発現を誘導することが公知である。BMP2作用およびBMP4作用のCHL2ポリペプチドによる阻害は、C2C12アルカリホスファターゼア

ッセイにおいて実証された。

【0322】

前筋芽細胞株C2C12(ATCC登録番号CRL-1722)を、10%ウシ胎仔血清(FBS)および抗生物質を含有するDMEM中で、37℃で5%CO₂の湿潤雰囲気において維持した。レセプター感度は、非常に継代された細胞では減少し得るので、10~15回継代した後細胞を破棄した。C2C12細胞を、96ウェルマイクロタイタープレート中の、100μlのDMEM(2%ウシ血清および抗生物質を含有する)中に、3×10⁴細胞/ウェルの密度で、プレートした。過剰な乾燥を回避するため、マイクロタイタープレートの最も外側のウェルには200μlのDMEMのみを充填した。次いで細胞を、37℃で5%CO₂の湿潤雰囲気において一晩インキュベートした。

【0323】

プレート後、C2C12細胞を、909ng/ml(35nM)BMP2または566ng/ml(22nM)BMP4のいずれかの存在下で、マウスCHL2-FLAGの階段希釈(1.47、2.93、5.9、11.7、23.4、46.9、93.8、187.5、375、750、および1500ng/ml)に曝露した。次いで細胞を、37℃で5%CO₂の湿潤雰囲気において3日間インキュベートした。インキュベーション後、培地を除去し、この細胞を0.1M Tris、pH7.4を用いてリンスし、そして150μlのグリシン緩衝液(0.1Mグリシン、1mM MgCl₂、pH10.5)(0.1%IGEPAL CA-630(Sigma)含有)をウェルに添加した。次いで、この細胞を-80℃で凍結して、融解し、50μlの細胞上清をBradfordタンパク質アッセイにおける使用のために取り出し、そして100μlのリン酸p-ニトロフェニル二ナトリウム(Sigma;グリシン緩衝液中で4mg/mlに希釈)を、残りの細胞上清に添加した。この混合物を、37℃で30分間インキュベートし、そして50μlの0.5N NaOHを添加して反応を停止した。次いで、このプレートを405~410nmで読み取った。CHL2-FLAGは、用量依存性の様式でBMP2作用およびBMP作用の両方を阻害することが見出された(図11)。

【0324】

(実施例10: CHL2ポリペプチドとBMPとの直接的相互作用)

マウスCHL1ポリペプチドとヒトBMP4、BMP5、BMP6およびTGF β 2との直接的相互作用は以前に実証されている(Nakayamaら、2001)。mCHL2-FLAGタンパク質を600ng/mlで用いた以外は、同様の免疫沈降実験を、マウスCHL2ポリペプチドを用いて行った。mCHL2-FLAGタンパク質は、BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、GDF5(BMP14)またはアクチビンAと共に共同免疫沈降する(c o - i m m u n o p r e c i p i t a t e)ことが見出された(図12)。しかし、高濃度のBMP5は、mCHL2-FLAGと検出可能なレベルの相互作用を示すことが必要であった。CHL2は、他のBMPとよりもBMP5との親和性が弱いようであった。mCHL1と同様、アクチビンA(別のTGF β スーパーファミリーメンバー)は、いずれの設定された条件でもCHL2との相互作用の兆候を示さなかった。しかし、マウスCHL1と対照的に、TGF β 相互作用は、全く観察されなかった。BMP2およびBMP4は、BMP5、BMP6およびBMP7とは別々のサブファミリーを形成する(Celesteら、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:9843~47)。従って、CHL1ポリペプチドおよびCHL2ポリペプチドの両方とも、全てのBMPに結合するタンパク質(pan-BMP binding protein)であり得る。

【0325】

(実施例11: トランスジェニックマウスにおけるCHL2ポリペプチドの発現)

CHL2ポリペプチドの生物学的活性を評価するため、肝臓特異的ApoEプロモーターの制御下で、CHL2ポリペプチド/Fc融合タンパク質をコードする構築物を調製する。この構築物の送達により、CHL2ポリペプチドの機能に関して参考となる、病理的变化を生じることが期待される。同様に、アクチンプロモーターの制御下で、全長CHL2ポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達により、遍在性の発現を生じることが期待される。

【0326】

これらの構築物を生成するために、PCRを用いて、CHL2ポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。このPCRには、所望の配列の5'末端および3'末端に対応するプライマーを用いる。そしてこのプライマーは、発現ベクター内への増幅産物の挿入を可能にする制限酵素部位を組み込む。増幅後、PCR産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的組み換えDNA技術を用いて発現ベクター中に連結する。例えば、増幅したCHL2ポリペプチド配列を、Grahamら、1997、Nature Genetics, 17: 272~74およびRayら、1991 Genes Dev. 5: 2265~73に記載のように、ヒトアクチンプロモーターの制御下で発現ベクター中にクローニングし得る。

【0327】

連結後、反応混合物を用いて、E. coli 宿主株をエレクトロポレーションによって形質転換し、そして形質転換体を、薬物耐性で選択する。選択したコロニー由来のプラスミドDNAを単離して、DNA配列決定に供し、適切なインサートが存在することおよび変異が存在しないことを確認する。CHL2ポリペプチド発現ベクターを、2回のCsCl密度勾配遠心分離を通じて精製し、適切な制限酵素で切断し、そして、CHL2ポリペプチド導入遺伝子を含む直鎖化フラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。精製したフラグメントを、5 mM Tris (pH 7.4) および0.2 mM EDTA中で、2 mg/mLの濃度で、再懸濁する。

【0328】

BDF1 × BDF1 交配マウス由来の単一細胞胚に、記載のように注射する (PCT公開番号WO97/23614)。胚を、CO₂インキュベーター中で一晩培養し、そして15~20の2細胞胚を偽妊娠CD1雌性マウスの卵管に移す。マイクロインジェクションした胚の着床から得た子孫を、以下のように、ゲノムDNAサンプル中に取り込んだ導入遺伝子のPCR増幅でスクリーニングする。耳切片を、20 mLの耳緩衝液 (20 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS、および500 mg/mL プロテイナーゼK)

中で、55℃で一晩消化する。次いで、このサンプルを200mLのTEで希釈し、そして2mLの耳サンプルを、適切なプライマーを用いるPCR反応中で用いる。

【0329】

8週齢で、トランスジェニック創始動物およびコントロール動物を、剖検および病理分析のため、屠殺する。脾臓の一部を取り出し、そしてTotal RNA Extraction Kit (Qiagen)を用いて、脾臓から、総細胞RNAを単離し、そして導入遺伝子発現を、RT-PCRによって決定する。脾臓から回収したRNAを、以下のように、SuperScript™ Pre amplification System (Gibco-BRL)を用いてcDNAに変換する。適切なプライマー（発現ベクター配列に位置し、そしてCHL2ポリペプチド導入遺伝子の3'側である）を用いて、導入遺伝子転写物からのcDNA合成をプライムする。トランスジェニック創始動物およびコントロール由来の10mgの総脾臓RNAを、1mMのプライマーとともに、10分間70℃でインキュベートし、そして氷上に置く。次いで、反応物に、10mM Tris-HCl、pH8.3、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、10mMの各dNTP、0.1mM DTT、および200UのSuperScript II逆転写酵素を補充する。42℃で50分間のインキュベーション後、72℃で15分間加熱することによって反応を停止し、2UのRNase Hを用いて20分間37℃で消化する。次いで、サンプルをCHL2ポリペプチドに特異的なプライマーを用いるPCRによって増幅する。

【0330】

（実施例12：トランスジェニックマウスにおけるCHL2ポリペプチドの生物学的活性）

安楽死の前に、トランスジェニック動物を計量し、イソフルランによって麻酔し、そして心臓穿刺によって採血する。サンプルを、血液学分析および血清化学分析に供する。X線撮影を、最終的な放血後に行う。肉眼での解剖の際に、主な内臓器官を、重量分析に供する。

【0331】

肉眼での解剖後、組織（すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節および骨格筋）を取出し、そして10%緩衝化Zn-ホルマリン中で組織学的検査のために固定する。固定後、組織をパラフィンブロック中で処理し、そして3mmの切片を得る。全ての切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、次いで組織学的分析に供する。

【0332】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節およびパイアー斑を、以下の通りにB細胞特異的抗体およびT細胞特異的抗体での免疫組織学的分析に供する。ホルマリンで固定したパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し、そして脱イオン水中で水和する。切片を3%過酸化水素でクエンチし、Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA) でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウスB220およびCD3 (Harlan, Indianapolis, IN) 中でインキュベートする。抗体結合を、色素原 (chromagen) としてDAB (BioTek, Santa Barbara, CA) を用いて、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンおよびペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン (BioGenex, San Ramon, CA) によって検出する。切片を、ヘマトキシリンで対比染色する。

【0333】

剖検後、トランスジェニック動物およびコントロールの同腹仔由来の脾臓および胸腺のMLNおよび切片を取出す。シリンジの平らな末端を用いて、100mmナイロン性細胞ストレーナー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) の底に対してこの組織を穏やかに粉砕することによって、単細胞懸濁物を調製する。細胞を2回洗浄し、計数し、次いで各組織由来の約 1×10^6 細胞を、20 μ L容量において0.5 μ g CD16/32 (Fc III/II) Fcブロックで10分間インキュベートする。次いで、サンプルを、FITCまたはPEに結合体化した、CD90.2 (Thy-1.2)、CD45R (B220)、CD11b (Mac-1)、Gr-1、CD4ま

たはCD8に対するモノクローナル抗体(PharMingen, San Diego, CA)の0.5 μ g抗体を有する、100 μ L容量のPBS(Ca⁺およびMg⁺を欠く)、0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.01%アジ化ナトリウム中で2~8で30分間染色する。抗体結合後、細胞を洗浄し、次いでFACScan(Becton Dickinson)でのフローサイトメトリーによって分析する。

【0334】

本発明を好ましい実施形態に関して記載してきたが、改変および修飾が当業者に思い浮かぶことが理解される。それゆえ、添付の特許請求の範囲が、請求されるような本発明の範囲内に入る全てのこのような等価な改変物を包含することが意図される。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A~1Cは、マウスCHL2遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)およびマウスCHL2ポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。予測されたシグナル配列を示す(下線)。

【図2】

図2は、マウスCHL2ポリペプチド(マウスCHL2;配列番号2)とマウスコルデン(Af069501;配列番号7)のアミノ酸配列アラインメント(整列)を示す。

【図3】

図3A~3Cは、ヒトCHL2遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号4)およびヒトCHL2ポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号5)を示す。予測されたシグナル配列を示す(下線)。

【図4】

図4は、ヒトコルディン(huCHD; 配列番号8)、ヒトCHL1ポリペプチド(huCHL; 配列番号9)、およびヒトCHL2ポリペプチド(huCHL2; 配列番号5)のアミノ酸配列アラインメント(整列)を示す。

【図5】

図5は、マウスコルディン(Chordin)、CHL1ポリペプチド、およびCHL2ポリペプチドの模式図を示す。プレコラーゲン反復(CR; 相同のCRドメインを、灰色の四角で示す)、シグナルペプチド(SP)、推定BMP1/Toiloid切断部位(*)、およびCHL1中のアミノ酸配列バリエーションの部位(dEおよびd5)を示す。

【図6】

図6は、E17.5のマウス股関節(パネルAおよびB)ならびに肋骨-軟骨関節(パネルC; 関節の両部位上での関節軟骨細胞におけるシグナルを示す)におけるインサイチュハイブリダイゼーションによって検出されたマウスCHL2 mRNAの発現を示す。

【図7】

図7は、正常な成体の脊椎関節(パネルA、B、およびC; 関節突起の両側での関節軟骨の表面の関節軟骨細胞または隣接する脊椎の突起間の関節突起間関節におけるシグナルを示す)および脊椎の椎間板の線維化輪(anulus fibrosus)の線維軟骨(パネルD)におけるインサイチュハイブリダイゼーションによって検出されたマウスCHL2 mRNAの発現を示す。

【図8】

図8は、E18.5マウスの胸骨および胎盤ならびに正常な成体マウスの子宮、結腸、および小腸におけるインサイチュハイブリダイゼーションによって検出されたマウスCHL2 mRNAの発現を示す。

【図9】

図9は、マウスCHL2ポリペプチドの2次的軸形成活性を示す。

【図10】

図10は、CD34⁺/CD31⁺赤血球-骨髄(erythro-myel

oid) 前駆細胞 (R7) および CD34⁺/CD31⁺ 細胞 (R3) の BMP 4 依存性生成に対する、CHL2 ポリペプチドの影響を示す。

【図11】

図11は、C2C12筋芽細胞における BMP 2 依存性アルカリホスファターゼの誘導に対する、CHL2 ポリペプチドの影響を示す。

【図12】

図12は、mCHL2-FLAGタンパク質を用いたウエスタンブロットの結果を示す。パネルAにおいて、mCHL2-FLAGは、BMP5またはアクチビンAと混合され、抗mCHL2抗血清で処理され、そしてプロテインAアガロースビーズを用いて沈降された。パネルBにおいて、mCHL2-FLAGは、BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、GDF5 (BMP14)、またはアクチビンAと混合され、抗mCHL2抗血清で処理され、そしてプロテインAアガロースビーズを用いて沈降された。

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

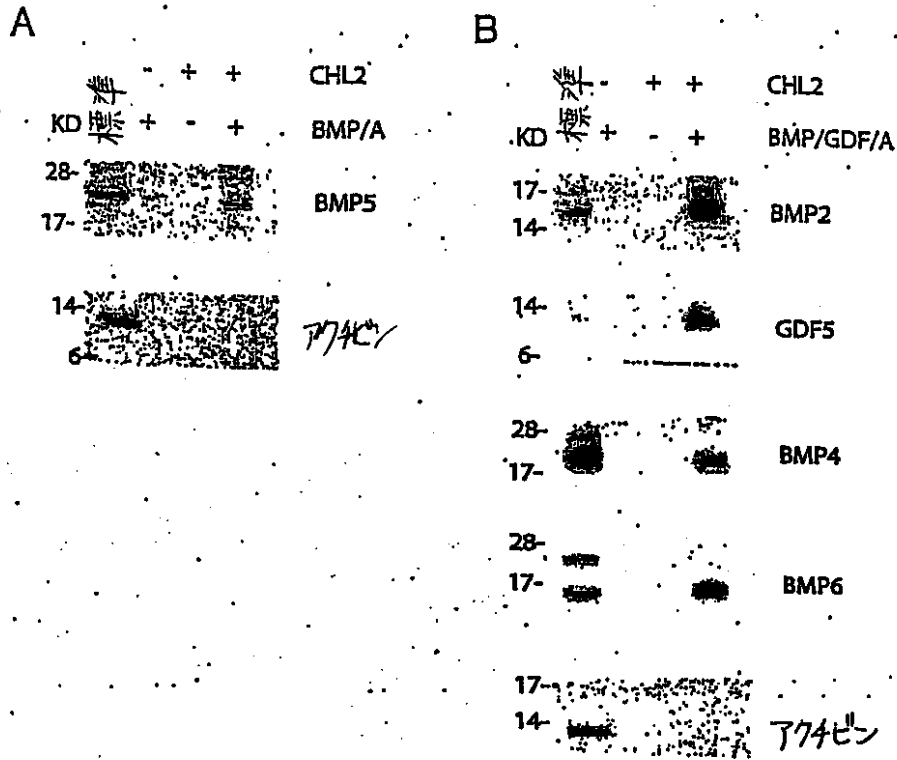
【補正対象項目名】図12

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図12】

FIG. 12



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/06891
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K14/705 C12N15/62 C07K16/18 C07K16/28 G01N33/53 A61K38/17 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N A61K C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 09551 A (GENETICS INST) 24 February 2000 (2000-02-24) * see passages relating to clone dw665_4 * the whole document	1-12, 14-18, 20-29, 31-33, 35-38, 40-56
X	WO 99 54353 A (SCHMITT ARMIN ;SPECHT THOMAS (DE); DAHL EDGAR (DE); HINZMANN BERND) 28 October 1999 (1999-10-28) * see seqID's 4, 19, 72 and 113 * --- -/--	1-12, 14-32, 34, 35, 37, 38, 40, 43, 46, 56
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 August 2001		21/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Smalt, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/06891
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 12708 A (BAKER KEVIN ; GENENTECH INC (US); GODDARD AUDREY (US); GURNEY AUSTI) 9 March 2000 (2000-03-09) * see PRO1557 (43rd cloned seq.) * ---	1-12, 14-40, 43-56
E	WO 01 29084 A (LEXICON GENETICS INC) 26 April 2001 (2001-04-26) the whole document ---	1-40, 43-55
E	WO 01 34796 A (SAVITZKY KINNERET ; TOPORODIK AMIR (IL); BITON SHARON (IL); COMPUGEN) 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document ---	1-12, 14-40, 43-56
T	NAKAYAMA NAOKI ET AL: "A novel chordin-like protein inhibitor for bone morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 232, no. 2, 15 April 2001 (2001-04-15), pages 372-387, XP002174073 ISSN: 0012-1606 the whole document -----	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 18, 19, 31, 32 and 34 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its affinity for the polypeptide(s) of the invention.

The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies directed at the polypeptide(s) of the invention, as they can to some extent be characterized by the protein to which they bind.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT/US 01/06891

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0009551 A	24-02-2000	AU 4071199 A	23-11-1999
		AU 5475199 A	06-03-2000
		EP 1077991 A	28-02-2001
		EP 1112285 A	04-07-2001
		WO 9957132 A	11-11-1999
WO 9954353 A	28-10-1999	DE 19817946 A	21-10-1999
		EP 1071777 A	31-01-2001
WO 0012708 A	09-03-2000	AU 5590899 A	21-03-2000
		AU 6041399 A	10-04-2000
		EP 1115863 A	18-07-2001
		WO 0017353 A	30-03-2000
WO 0129084 A	26-04-2001	NONE	
WO 0134796 A	17-05-2001	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/06891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC 7	C12N15/12 C07K16/28	C07K14/47 G01N33/53										
	C07K14/705 A61K38/17	C12N15/62 C12Q1/68										
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)												
IPC 7 C12N C07K G01N A61K C12Q												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	WO 00 09551 A (GENETICS INST) 24 February 2000 (2000-02-24) * see passages relating to clone dw665_4 * the whole document	1-12, 14-18, 20-29, 31-33, 35-38, 40-56										
X	WO 99 54353 A (SCHMITT ARMIN ;SPECHT THOMAS (DE); DAHL EDGAR (DE); HINZMANN BERND) 28 October 1999 (1999-10-28) * see seqID's 4, 19, 72 and 113 * -/-	1-12, 14-32, 34, 35, 37, 38, 40, 43, 46, 56										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents:												
<table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report										
7 August 2001		21/08/2001										
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentamt 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-21143, Tx. 31 851 spohl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Small, R										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/06891

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 12708 A (BAKER KEVIN ; GENENTECH INC (US); GODDARD AUDREY (US); GURNEY AUSTI) 9 March 2000 (2000-03-09) * see PRO1557 (43rd cloned seq.) *	1-12, 14-40, 43-56
E	WO 01 29084 A (LEXICON GENETICS INC) 26 April 2001 (2001-04-26) the whole document	1-40, 43-55
E	WO 01 34796 A (SAVITZKY KINNERET ; TOPOROIK AMIR (IL); BITON SHARON (IL); COMPUGEN) 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document	1-12, 14-40, 43-56
J	NAKAYAMA NAOKI ET AL: "A novel chordin-like protein inhibitor for bone morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 232, no. 2, 15 April 2001 (2001-04-15), pages 372-387, XP002174073 ISSN: 0012-1606 the whole document	

Form PCT/ISA210 (continuation of PCT/ISA) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/06891**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 33, 48, and 53 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 18, 19, 31, 32 and 34 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its affinity for the polypeptide(s) of the invention.

The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies directed at the polypeptide(s) of the invention, as they can to some extent be characterized by the protein to which they bind.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/06891

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0009551 A	24-02-2000	AU 4071199 A	23-11-1999
		AU 5475199 A	06-03-2000
		EP 1077991 A	28-02-2001
		EP 1112285 A	04-07-2001
		WO 9957132 A	11-11-1999
NO 9954353 A	28-10-1999	DE 19817946 A	21-10-1999
		EP 1071777 A	31-01-2001
NO 0012708 A	09-03-2000	AU 5590899 A	21-03-2000
		AU 6041399 A	10-04-2000
		EP 1115863 A	18-07-2001
		WO 0017353 A	30-03-2000
NO 0129084 A	26-04-2001	NONE	
NO 0134796 A	17-05-2001	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	7/00	A 6 1 P	9/06	4 H 0 4 5
	9/06		9/10	
	9/10		9/12	
	9/12		19/02	
	19/02		19/08	
	19/08		19/10	
	19/10		21/00	
	21/00		29/00	1 0 1
	29/00	1 0 1	35/00	
	35/00		43/00	1 1 1
	43/00	1 1 1	C 0 7 K	
C 0 7 K	14/47		14/47	
	16/18		16/18	
	16/46		16/46	
	19/00		19/00	
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	1/15	
	1/19		1/19	
	1/21		1/21	
	5/10	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/02		21/08	
	21/08	G 0 1 N	33/15	Z
			33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A
				B

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 リン, キャム
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 93065,
 スルミ バレー, ハイゼルウッド ウ
 ェイ 605, ユニット ディー

(72)発明者 中山 直樹
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91360 ,
サウザンド オークス , プライアー
ブラフ サークル 325

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA40 BA13 BB03
BB20 CB01 CB17 CB21 DA12
DA13 DA14 DA36 DA77 FB03
FB04
4B024 AA01 AA11 BA41 BA58 BA80
CA04 DA01 DA02 DA05 DA06
DA11 EA04 GA01 GA11 HA08
4B064 AG26 AG27 CA02 CA05 CA10
CA11 CA19 CA50 CC21 CC24
DA01 DA13
4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X
AA91Y AB01 AB02 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA17 NA14 ZA362 ZA402
ZA422 ZA512 ZA662 ZA752
ZA942 ZA962 ZA972 ZB152
ZC022 ZC542
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09
BA41 BA42 BA56 CA40 DA75
DA76 EA20 EA50 FA72 FA73
FA74

专利名称(译)	Cordin样分子及其用途		
公开(公告)号	JP2003525611A	公开(公告)日	2003-09-02
申请号	JP2001564368	申请日	2001-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	ザンケ リンキヤム 中山直樹		
发明人	ザン, ケ リン, キヤム 中山 直樹		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P7/00 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/475 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P7/00 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/475 C07K14/705 C07K2319/00 C12N2799/021		
FI分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P7/00 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 2G045/FB04 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA58 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA50 4B064/CC21 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA512 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB152 4C084/ZC022 4C084/ZC542 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/BA42 4H045/BA56 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
优先权	60/186462 2000-03-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了Chordin-Like-2 (CHL2) 多肽和编码该多肽的核酸分子。 本发明还提供选择性结合剂, 载体, 宿主细胞和产生CHL2多肽的方法。 本发明进一步提供了用于诊断, 治疗, 改善和/或预防与CHL2多肽有关的疾病, 病症和病状的药物组合物。 本发明进一步提供了用于诊断, 治疗, 改善和/或预防与CHL2多肽有关的疾病, 病症和病状的方法。

最初の残基	アミノ酸置換 有り無の位置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, / ヒロイシン	Leu
Leu	/ ヒロイシン Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 - アミノ酸 , Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe