

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-535297

(P2005-535297A)

(43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)	
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027		4 B O 2 9
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088		4 B O 5 0
<b>A 6 1 K 35/76</b>	A 6 1 K 35/76		4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 45/00		4 B O 6 4
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 102 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-584282 (P2003-584282)	(71) 出願人	500203709 アムジェン インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 913 20, サウザンド オークス, ワン アムジェン センター ドライブ
(86) (22) 出願日	平成15年4月11日 (2003. 4. 11)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月30日 (2004. 11. 30)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/011392	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02003/087338	(72) 発明者	タタレウィズ, スザンナ アメリカ合衆国 カリフォルニア 913 20 ニューバリー パーク, ブルック ロード 281
(87) 国際公開日	平成15年10月23日 (2003. 10. 23)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/371, 912		
(32) 優先日	平成14年4月11日 (2002. 4. 11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 HER-2 レセプターチロシンキナーゼ分子およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、HER-2 レセプターチロシンキナーゼポリペプチドおよび、HER-2 レセプターチロシンキナーゼコードする核酸分子を提供する。特に、本発明は、HER-2 のスプライス改変体 (HER-2 s v) に関する。本発明はまた、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、およびHER-2 s v ポリペプチドを産生する方法を提供する。本発明はさらに、薬学的組成物さらにHER-2 s v ポリペプチドに関連する疾患、障害ならびに状態の診断、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、該核酸分子は、以下：

(a) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、または配列番号 9 のいずれかに記載のヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 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；

(c) (a) または (b) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体に少なくとも中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；または

(d) (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む、

核酸分子。

## 【請求項 2】

単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：

(a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載の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、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載の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、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、または配列番号 9 のいずれかに記載のヌクレオチド配列領域であって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、もしくは抗原性である、ヌクレオチド配列領域；

(c) 配列番号 2 の残基 261 ~ 262 を含む少なくとも約 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 に記載のヌクレオチド配列領域であって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2 に記載のポリペプチドの活性を有し、または抗原性である、ヌクレオチド配列領域；

(d) 配列番号 4 の残基 383 ~ 384 を含む少なくとも約 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 3 に記載のヌクレオチド配列領域であって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 4 に記載のポリペプチドの活性を有し、または抗原性である、ヌクレオチド配列領域；

(e) 配列番号 6 の残基 384 ~ 422 を含む少なくとも約 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 5 に記載のヌクレオチド配列領域であって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 6 に記載のポリペプチドの活性を有し、または抗原性である、ヌクレオチド配列領域；

(f) 配列番号 10 の残基 580 ~ 613 を含む少なくとも約 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 9 に記載のヌクレオチド配列領域であって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 10 に記載のポリペプチドの活性を有し、または抗原性である、ヌクレオチド配列領域；

(g) (a) ~ (f) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体に少なくとも中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；または

(h) (a) ~ (g) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む、

核酸分子。

## 【請求項 3】

10

20

30

40

50

単離された核酸分子であって、該核酸分子は、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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10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であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 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に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号2に記載のポリペプチドの活性を有し、さらに該ポリペプチドは、配列番号2の残基261~262を含む、ヌクレオチド配列；

10

(c) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号4に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号4に記載のポリペプチドの活性を有し、そして該ポリペプチドは、配列番号4の残基383~384を含む、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6に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号6に記載のポリペプチドの活性を有し、そして該ポリペプチドは配列番号6の残基384~422を含む、ヌクレオチド配列；

(e) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号10に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号10に記載のポリペプチドの活性を有し、そして該ポリペプチドは配列番号10の残基580~613を含む、ヌクレオチド配列；

20

(e) アミノ酸置換、C末端短縮またはN末端短縮である改変を少なくとも1つ有する配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10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であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有し、そして該ポリペプチドは、配列番号2の残基261~262、配列番号4の残基383~384、配列番号6の残基384~422、または配列番号10の残基580~613を含む、ヌクレオチド配列；

(f) (a)~(e)のいずれかのヌクレオチド配列の相補体に少なくとも中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；または

30

(g) (a)~(f)のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項4】

請求項1、2または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。

40

【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】

HER-2svポリペプチドを産生するプロセスであって、請求項5に記載の宿主細胞を該ポリペプチドを発現するのに適切な条件下で培養する工程；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た、ポリペプチド。

50

## 【請求項 10】

請求項 8 に記載のプロセスであって、前記核酸分子は、ネイティブ HER - 2 s v ポリペプチドについてのプロモーター DNA 以外のプロモーター DNA を含み、該プロモーターは、該 HER - 2 s v ポリペプチドをコードする DNA に作動可能に連結されている、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、前記同一性パーセントが、GAP、BLASTN、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プログラムを使用して決定される、核酸分子。

10

## 【請求項 12】

化合物が、HER - 2 s v ポリペプチド活性または HER - 2 s v ポリペプチド産生を阻害するかを決定するためのプロセスであって、該プロセスは、請求項 5、6 または 7 のいずれかに記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞での HER - 2 s v ポリペプチド活性または HER - 2 s v 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、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載のアミノ酸を含む、ポリペプチド。

20

## 【請求項 14】

単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：

(a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかのオルソログのアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載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；

(c) 配列番号 2 の残基 261 ~ 262 を含む少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2 に記載のポリペプチドの活性を有し、または抗原性である、フラグメント；

(d) 配列番号 4 の残基 383 ~ 384 を含む少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 4 に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 4 に記載のポリペプチドの活性を有し、または抗原性である、フラグメント；

30

(e) 配列番号 6 の残基 384 ~ 422 を含む少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 6 に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 6 に記載のポリペプチドの活性を有し、または抗原性である、フラグメント；  
あるいは、

(f) 配列番号 10 の残基 580 ~ 613 を含む少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 10 に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 10 に記載のポリペプチドの活性を有し、または抗原性である、フラグメント；

40

を含む、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、該ポリペプチドは、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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 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 に記載のアミノ酸配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 に記載のポリペプチドの活性を有し、そして該ポリペプチドは、配列番号 2 の残基 261 ~ 262 を含む、アミノ酸配列；

50

(c) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号4に記載のアミノ酸配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号4に記載のポリペプチドの活性を有し、そして該ポリペプチドは、配列番号4の残基383~384を含む、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6に記載のアミノ酸配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号6に記載のポリペプチドの活性を有し、そして該ポリペプチドは、配列番号6の残基384~422を含むポリペプチドである、アミノ酸配列；

(e) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号10に記載のアミノ酸配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号10に記載のポリペプチドの活性を有し、そして該ポリペプチドは、配列番号10の残基580~613を含む、アミノ酸配列；

10

(e) アミノ酸置換、C末端短縮およびN末端短縮である改変を少なくとも1つ有する配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有し、そして該ポリペプチドは配列番号2の残基261~262、配列番号4の残基383~384、配列番号6の残基384~422、または配列番号10の残基580~613を含む、アミノ酸配列；  
を含む、ポリペプチド。

【請求項16】

20

請求項1、2、または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、該ポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、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、前記同一性パーセントが、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プログラムを使用して決定される、ポリペプチド。

【請求項18】

30

請求項13、14、または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】

請求項18に記載の選択的結合因子または該選択的結合因子のフラグメントであって、該選択的結合因子または該選択的結合因子のフラグメントが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列を包含するポリペプチドまたは該ポリペプチドのフラグメントに特異的に結合する、選択的結合因子または選択的結合因子のフラグメント。

【請求項20】

抗体もしく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。

40

【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。

50

## 【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 グラフト化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。

10

## 【請求項 29】

F a b または F a b ' 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】

選択的結合因子または該選択的結合因子のフラグメントであって、該選択的結合因子または該選択的結合因子のフラグメントが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する特異性を有する、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選択的結合因子のフラグメント。

## 【請求項 31】

検出可能な標識が結合されている、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

20

## 【請求項 32】

HER - 2 s v ポリペプチドの生物学的活性をアンタゴナイズする、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

## 【請求項 33】

HER - 2 s v ポリペプチドに関連する疾患、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、該方法が、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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 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た、選択的結合因子。

30

## 【請求項 35】

請求項 13、14 または 15 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、ハイブリドーマ。

## 【請求項 36】

前記抗 HER - 2 s v 抗体または請求項 18 に記載のフラグメントを使用して HER - 2 s v 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 18 に記載の選択的結合因子を含む生物学的サンプル中の HER - 2 s v ポリペプチドの量を検出または定量する、キット。

40

## 【請求項 38】

請求項 13、14 または 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 39】

請求項 38 に記載の組成物であって、前記薬学的受容可能な処方剤は、キャリア、アジュバント、可溶化剤、安定化剤または抗酸化剤である、組成物。

## 【請求項 40】

請求項 13、14 または 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】

50

水溶性ポリマーで共有結合的に改変されている、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、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、またはポリビニルアルコールである、ポリペプチド。

【請求項 43】

請求項 1、2 または 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。

10

【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、2 または 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、14 または 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。

20

【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、該方法が、請求項 13、14 または 15 のいずれかに記載のポリペプチドあるいは請求項 1、2 または 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】

被験体における病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、該方法が、以下：

(a) サンプル中の請求項 13、14 または 15 のいずれかに記載のポリペプチドあるいは請求項 1、2 または 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量を決定する工程；および

30

(b) ポリペプチドの発現の存在または量に基いて、病理学的状態または病理学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、該デバイスが、以下：

(a) 移植に適切な膜；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、14、または 15 のいずれかに記載のタンパク質を分泌する、細胞；  
を含み、そして該膜は、該タンパク質に対して透過性でありかつ該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

40

【請求項 51】

HER-2sv 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、該方法が、以下：

(a) 請求項 13、14 または 15 のいずれかに記載のポリペプチドに化合物を接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該 Her2-sv 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】

請求項 51 に記載の方法であって、前記方法が、前記化合物に結合した際の前記ポリペ

50

チドの活性を決定する工程をさらに包含する、方法。

【請求項 5 3】

動物におけるポリペプチドのレベルを調節する方法であって、該方法が、請求項 1、2 または 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 5 4】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、遺伝子組換え非ヒト哺乳動物。

【請求項 5 5】

化合物が HER-2 s v ポリペプチドの活性または HER-2 s v ポリペプチドの産生を阻害するかを決定するプロセスであって、請求項 5 4 に従う遺伝子組換え哺乳動物を該化合物に暴露する工程、および該哺乳動物内での HER-2 s v ポリペプチド活性または HER-2 s v 産生を測定する工程、を包含する、プロセス。

10

【請求項 5 6】

固体支持体に付着する、請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 5 7】

請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の核酸分子を少なくとも 1 つは含む、核酸分子のアレイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2002年4月11日付けで出願された米国仮特許出願番号第60/371,912号からの優先権の利益を主張する。これらの全開示は、本明細書中で参考として明示的に援用される。

20

【0002】

(発明の背景)

(1. 発明の分野)

本発明は、HER-2 レセプターチロシンキナーゼ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。特に、本発明は、Her-2 のスプライシング改変体 (HER-2 s v) に関する。本発明はまた、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および HER-2 s v ポリペプチドを産生するための方法に関する。本発明はさらに HER-2 s v ポリペプチドが関与する疾患、障害ならびに状態の診断、処置、改善、および防御のための薬学的組成物および方法に関する。

30

【背景技術】

【0003】

(2. 発明の背景)

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作ならびにヒトゲノムの解読における技術的進歩は、新規の治療剤の発見を大きく加速した。現在では、高速の核酸配列決定技術により、前例のない速度で配列情報が作製され得、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と重複する配列をアSEMBLすることが可能であり、そしてポリペプチドコード領域の同定が可能である。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する相同性の程度を決定することを可能にし得る。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、治療剤として使用するために有利な特性を産物に付与し得る。

40

【0004】

過去10年間にわたるゲノム研究における著しい技術的進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づいた新規の治療剤の開発に対する可能性は、未だ広範には実現されていない。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、治療的分子に対して「標的」として機能し得る)は、依然として同

50

定されていない。従って、診断的または治療的な利点を有する、新規な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】

HER-2 (erbB-2、c-neu、またはHER-2/neuとしても公知)プロトオンコジーンは、上皮増殖因子(EGF)ファミリーのメンバーである。EGFファミリーの他のメンバーとしては、上皮増殖因子レセプター(EGFRまたはHER-1)、ErbB-3/HER-3、およびErbB-4/HER-4が挙げられる。HER-2は、チロシンキナーゼ活性を有する膜貫通レセプター(p185)をコードし、これは、複数のシグナル伝達経路に関連する。異常なHER-2発現は、多くの異なる型のヒト癌において検出されており、ヒト癌としては、乳癌、卵巣癌、胃癌、肺癌、および口腔癌が挙げられる。HER-2は、乳癌における重要な予後かつ予測的な因子であり、ここで、乳癌におけるHER-2過剰発現は、全体的に不良な生存率に関連し、悪性腫瘍を増大させることが示されている。この悪性腫瘍表現型は、HER-2抑制を介して抑制されるので、HER-2は、抗癌剤の開発に対する重要な標的である。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、新規のHER-2 s v核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0007】

本発明は、以下を含む単離された核酸分子を提供する：

(a) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかに記載のヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10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；

(c) 少なくとも中程度にストリンジентな条件下で、(a)または(b)のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；  
または

(d) (a)~(c)のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列。

20

30

【0008】

本発明はまた、以下を含む単離された核酸分子を提供する：

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドに対して、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、コードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のコード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、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかに記載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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性であるヌクレオチド配列の領域；

(c) 配列番号2の残基261~残基262を含む、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に記載のヌクレオチド配列の領域であって、このポリペプチドフラグメントは、配列番号2に記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性であるヌクレオチド配列の領域；

(d) 配列番号4の残基383~残基384を含む、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3に記載のヌクレオチド配列の領域で

40

50

あって、このポリペプチドフラグメントは、配列番号 4 に記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性であるヌクレオチド配列の領域；

( e ) 配列番号 6 の残基 3 8 4 ~ 残基 4 2 2 を含む、少なくとも約 2 5 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 5 に記載のヌクレオチド配列の領域であって、このポリペプチドフラグメントは、配列番号 6 に記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性であるヌクレオチド配列の領域；

( f ) 配列番号 1 0 の残基 5 8 0 ~ 残基 6 1 3 を含む、少なくとも約 2 5 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 9 に記載のヌクレオチド配列の領域であって、このポリペプチドフラグメントは、配列番号 1 0 に記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性であるヌクレオチド配列の領域；

( g ) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、( a ) ~ ( f ) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 1 0 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；または

( h ) ( a ) ~ ( g ) のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列。

10

#### 【 0 0 0 9 】

本発明はさらに、以下を含む単離された核酸分子を提供する：

( 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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 1 0 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であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 1 0 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

20

( b ) C 末端および / または N 末端の短縮を有する、配列番号 2 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号 2 に記載のポリペプチドの活性を有し、ここでポリペプチドは、配列番号 2 の残基 2 6 1 ~ 残基 2 6 2 を含む、ヌクレオチド配列；

( c ) C 末端および / または N 末端の短縮を有する、配列番号 4 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号 4 に記載のポリペプチドの活性を有し、ここでポリペプチドは、配列番号 4 の残基 3 8 3 ~ 残基 3 8 4 を含む、ヌクレオチド配列；

30

( d ) C 末端および / または N 末端の短縮を有する、配列番号 6 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号 6 に記載のポリペプチドの活性を有し、ここでポリペプチドは、配列番号 6 の残基 3 8 4 ~ 残基 4 2 2 を含む、ヌクレオチド配列；

( e ) C 末端および / または N 末端の短縮を有する、配列番号 1 0 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号 1 0 に記載のポリペプチドの活性を有し、ここでポリペプチドは、配列番号 1 0 の残基 5 8 0 ~ 残基 6 1 3 を含む、ヌクレオチド配列；

( e ) アミノ酸置換、C 末端および N 末端の短縮の少なくとも 1 つの変更を有する、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 1 0 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であって、ここでこのコードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 1 0 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有し、このポリペプチドは配列番号 2 の残基 2 6 1 ~ 残基 2 6 2、配列番号 4 の残基 3 8 3 ~ 残基 3 8 4、配列番号 6 の残基 3 8 4 ~ 残基 4 2 2、または配列番号 1 0 の残基 5 8 0 ~ 残基 6 1 3 を含む、ヌクレオチド配列；

40

( f ) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、( a ) ~ ( e ) のいずれかに記載のヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここでコードされるポリペプチドは配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 1 0 のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ま

50

たは

(g)(a)~(f)のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列。

【0010】

本発明は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0011】

本発明はまた、以下を含む単離されたポリペプチドを提供する：

(a)配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかのオルソログ(ortholog)についてのアミノ酸配列；

(b)配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかのアミノ酸配列に対して少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列；

(c)配列番号2の残基261~残基262を含む、少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、このポリペプチドフラグメントは、配列番号2に記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性であるアミノ酸配列フラグメント；

(d)配列番号4の残基383~残基384を含む、少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号4に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、このポリペプチドフラグメントは、配列番号4に記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性であるアミノ酸配列フラグメント；

(e)配列番号6の残基384~残基422を含む、少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号6に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、このポリペプチドフラグメントは、配列番号6に記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性であるアミノ酸配列フラグメント；

(f)配列番号10の残基580~残基613を含む、少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号10に記載のアミノ酸配列のフラグメントであって、このポリペプチドフラグメントは、配列番号10に記載のポリペプチドの活性を有するか、または抗原性であるアミノ酸配列フラグメント。

【0012】

本発明はまた、以下を含む単離されたポリペプチドを提供する：

(a)少なくとも1つの保守的アミノ酸置換を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここでポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b)C末端および/またはN末端の短縮を有する、配列番号2に記載のアミノ酸配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2に記載のポリペプチドの活性を有し、ここでポリペプチドは、配列番号2の残基261~残基262を含む、アミノ酸配列；

(c)C末端および/またはN末端の短縮を有する、配列番号4に記載のアミノ酸配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号4に記載のポリペプチドの活性を有し、ここでポリペプチドは、配列番号4の残基383~残基384を含む、アミノ酸配列；

(d)C末端および/またはN末端の短縮を有する、配列番号6に記載のアミノ酸配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号6に記載のポリペプチドの活性を有し、ここでポリペプチドは、配列番号6の残基384~残基422を含む、アミノ酸配列；

(e)C末端および/またはN末端の短縮を有する、配列番号10に記載のアミノ酸配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号10に記載のポリペプチドの活性を有し、ここでポリペプチドは、配列番号10の残基580~残基613を含む、アミノ酸配列；または

10

20

30

40

50

(f) アミノ酸置換、C末端短縮およびN末端短縮の少なくとも1つの改変を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有し、このポリペプチドは配列番号2の残基261～残基262、配列番号4の残基383～残基384、配列番号6の残基384～残基422、または配列番号10の残基580～残基613を含む、アミノ酸配列。

【0013】

また、HER-2svアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドも提供される。

【0014】

本発明はまた、本明細書中に記載の単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に記載の組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、およびこの宿主細胞を培養する工程、および必要に応じてそのようにして産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する、HER-2svポリペプチドを産生する方法を提供する。発現したポリペプチドの単離を、必要に応じてとして記載したのは、HER-2sv活性のアンタゴニストの同定のためのスクリーニング方法を使用するために細胞表面または細胞膜上でポリペプチドを発現することが望ましい場合があり得るからである。

【0015】

HER-2sv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もまた、本発明によって包含される。HER-2sv核酸分子は、HER-2svポリペプチドの発現およびレベルの増加（これは、循環レベルの増加を含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、HER-2sv核酸分子は、内因性のHER-2svポリペプチドの発現を防ぐ様式で動物に導入される（すなわち、HER2-svポリペプチド遺伝子のノックアウトを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、さらに好ましくは、ラットまたはマウスといったげっ歯類である。

【0016】

また、本発明のHER-2svポリペプチドの誘導体が提供される。

【0017】

さらに、本発明のHER-2svポリペプチドを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）が提供される。

【0018】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチドまたは選択的結合因子、および1以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物もまた、本発明によって包含される。この薬学的組成物は、治療的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ように使用される。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。

【0019】

本発明のHER-2svポリペプチドおよび核酸分子は、本明細書中に列挙された疾患および障害を含む疾患および障害を処置、予防、改善、診断、および/または検出するために使用され得る。

【0020】

本発明はまた、HER-2sv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、ポリペプチドへの試験分子の結合程度を決定するために、HER-2svポリペプチドを試験分子と接触させる工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、HER-2svポリペプチドの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、HER-2svポリペプチドの発現に対する分子の影響、またはHER-2sv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。

【0021】

10

20

30

40

50

HER-2svポリペプチドの発現を調節する方法およびレベルを調整（すなわち、増加または減少）する方法もまた、本発明によって包含される。1つの方法は、HER-2sv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。別の方法は、HER-2svポリペプチドの発現を調節または調整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な、遺伝子治療、細胞療法、およびアンチセンス療法が挙げられる。

【0022】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の見出しは、構成上の目的のためのみであり、そしてそこに記載される内容を限定するように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が、明確に、本明細書中に参考として援用される。 10

【0023】

（1.定義）

用語「HER-2sv遺伝子」もしくは「HER-2sv核酸分子」または「HER-2svポリヌクレオチド」は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかに記載のヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる核酸分子；配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10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；および本明細書中で定義される核酸分子をいう。

【0024】

用語「HER-2svポリペプチド対立遺伝子改変体」は、生物体または生物体の集団の染色体上の所定の遺伝子座に存在する遺伝子のいくつかの可能な天然に存在する代替の形態の1つをいう。 20

【0025】

用語「単離された核酸分子」とは、（1）総DNA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、または（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、任意の他の夾雑核酸分子、またはその天然の環境において見出される他の夾雑物（これらは、ポリペプチド産生におけるその用途、またはその治療的用途、診断的用途、予防的用途、または研究的用途を阻害する）を実質的に含まない。 30

【0026】

「核酸配列」または「核酸分子」は、本明細書中で使用される場合、DNAまたはRNA配列をいう。この用語は、例えば、以下であるがこれらに限定されない、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む：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-エ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、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、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシ 40 50

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。

【0027】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移入する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。

【0028】

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、指向および/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。

10

【0029】

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アセンブルされる。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、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を可能にし得る。例えば、コード配列は、このプロモーターがコード配列の転写を指示し得る場合に、プロモーターに作動可能に連結される。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。したがって、例えば、介在する翻訳されないが転写される配列は、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「

20

【0030】

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ように使用される。この用語には、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。

【0031】

用語「HER - 2 s v ポリペプチド」は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載のアミノ酸を含むポリペプチドポリペプチドおよび関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドには、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載のポリペプチドの活性の少なくとも 1 つを有する HER - 2 s v ポリペプチドフラグメント、HER - 2 s v オルソログ (ortholog), HER - 2 s v ポリペプチド改変体、および HER - 2 s v 誘導体が挙げられる。HER - 2 s v ポリペプチドは、本明細書中で記載されるように、成熟ポリペプチドであり得て、それらが調整された方法に依存して、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。

30

【0032】

用語「HER - 2 s v ポリペプチドフラグメント」は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 のいずれかに記載のポリペプチドのアミノ酸末端での短縮（リーダー配列を含むかまたは含まない）または/およびカルボキシ末端での短縮を含むポリペプチドをいう。用語「HER - 2 s v ポリペプチドフラグメント」はまた、HER - 2 s v ポリペプチドオルソログ、HER - 2 s v ポリペプチド誘導体、または HER - 2 s v ポリペプチド改変体のアミノ末端での短縮および/またはカルボキシ末端での短縮、あるいは HER - 2 s v 対立遺伝子改変体によってコードされているポリペプチドのアミノ末端での短縮および/またはカルボキシ末端での短縮をいう。HER - 2 s v ポリペプチドフラグメントは、インビボプロテアーゼ活性から生じ得る。HER - 2 s v 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

40

50

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HER-2sv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、HER-2svポリペプチドに対する抗体を生成するために使用されることが理解される。

【0033】

用語「HER-2svポリペプチドオルソログ」は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のHER-2svポリペプチドアミノ酸配列に対応する他の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスHER-2svポリペプチドとヒトHER-2svポリペプチドは、互いにオルソログであると考えられる。

10

【0034】

用語「HER-2svポリペプチド改変体」は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のHER-2sv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、内部の欠失および/またはHER-2svポリペプチドフラグメント）および/または付加（例えば、内部の付加および/またはHER-2sv融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むHER-2svポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在し得る（例えば、HER-2svポリペプチド対立遺伝子改変体およびHER-2svポリペプチドオルソログ）か、または、人工的に構築され得る。このようなHER-2svポリペプチド改変体は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかに記載の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、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。

20

【0035】

用語「HER-2svポリペプチド誘導体」は、本明細書中で定義されたように、化学的に改変された配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10または配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかに記載のポリペプチド、HER-2svポリペプチドフラグメント、HER-2svポリペプチドオルソログ、またはHER-2svポリペプチド改変体をいう。用語「HER-2svポリペプチド誘導体」はまた、本明細書中で定義されたように、化学的に改変されるHER-2svポリペプチド対立遺伝子改変体によってコードされるポリペプチドをいう。

30

【0036】

用語「成熟HER-2svポリペプチド」は、リーダー配列を欠いたHER-2svポリペプチドをいう。成熟HER-2svポリペプチドは、他の修飾（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分解性のプロセッシング、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結合グリコシル化および/またはO結合グリコシル化など）もまた含み得る。

40

【0037】

用語「HER-2sv融合ポリペプチド」は、本明細書中で、定義されたように、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチド、HER-2svポリペプチドフラグメント、HER-2svポリペプチドオルソログ、またはHER-2svポリペプチド改変体、またはHER-2sv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（例えば異種性のタンパク質またはペプチド）の融合をいう。用語「HER-2svポリペプチド融合ポリペプチド」はまた、本明細書中で定義されたように、HER-2svポリペプチド対立遺伝子改変体

50

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末端での1つ以上のアミノ酸の融合をいう。

【0038】

用語、「生物学的に活性なHER-2svポリペプチド」は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を有するHER-2svポリペプチドをいう。さらに、HER-2svポリペプチドは、免疫原として活性であり得る；すなわち、HER-2svポリペプチドは、抗体を惹起し得る少なくとも1つのエピトープを含む。

【0039】

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、天然と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、または(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、または研究的使用に干渉する)を実質的に含まない。

【0040】

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、一列の2つ以上のヌクレオチド配列間または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配列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、特定の数値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」)によってアドレス指定されるギャップ整列(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。

【0041】

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類似性の測定値をいう。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、パーセント同一性および類似性は、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、パーセント同一性は50%のままであるが、パーセント類似性は75%(15/20)である。したがって、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド配列間のパーセント類似性は、これら2つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

【0042】

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物質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物質をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない(非ネイティブ)」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物質をいう。

【0043】

用語「有効量」および「治療有効量」は、本明細書中に示されるHER-2sv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、HER-2svポリペプチドまたはHER-2sv核酸分子の量をいう

本明細書において使用される用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理的に受容可能なキャリア」とは、薬学的組成物としてのHER-2svポリペプチド、核酸分子

10

20

30

40

50

または選択結合因子の送達を達成または増強するために適切な、1つ以上の処方物材料をいう。

【0044】

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。

【0045】

用語「選択的結合因子」は、HER-2svポリペプチドに対して特異性を有する分子をいう。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HER-2svポリペプチドに結合し、かつヒト非HER-2sv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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドのHER-2svポリペプチドのオルソログ（すなわち、HER-2svポリペプチドの種間バージョン（例えば、マウスHER-2svポリペプチドおよびラットHER-2svポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。

10

【0046】

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。「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。

【0047】

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)；and 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。

20

30

【0048】

用語「形質転換」とは、本明細書中で使用される場合、細胞の遺伝子特性の変化をいい、そしてこの細胞が新たなDNAを含むように改変されている場合、この細胞は形質転換されている。例えば、細胞がそのネイティブの状態から遺伝子的に改変されている場合、この細胞は形質転換されている。トランスフェクションまたは形質転換の後、形質転換DNAは、細胞の染色体への物理的組込みによって、この細胞のDNAと組換えられ得るか、または複製されることなく、エピトープソームエレメントとして一過的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立して複製し得る。DNAが細胞分裂によって複製される場合、この細胞は安定に形質転換されたとみなされる。

【0049】

(2. 核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

関連の核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかに記載されている核酸分子の対立遺伝子改変体、および上のヌクレオチド配列のいずれかに相補的な配列も含むと理解される。関連の核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載されているポリペプチドと比べて、1つ以上のアミノ酸残基の置換、修飾、付加および/または欠損を主に含むかまたはそ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含む。このような関連したHER-2svポリペプチドは、例えば、1つ以上のN-グリコシル化またはO-グリコシル化位置の付加および/または欠損、もしくは1つ以上のシステイン残基の付加および/または欠損を含み得る。

40

50

## 【0050】

関連の核酸分子はまた、HER-2sv核酸分子のフラグメントを含み、このフラグメントは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載されているHER-2svポリペプチドの少なくとも約25個の連続しアミノ酸、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のポリペプチドをコードする。

## 【0051】

さらに、関連のHER-2sv核酸分子はまた、本明細書中に規定される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、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかに記載されているHER-2sv核酸分子；または配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかで示されているアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子；あるいは本明細書中で定義される核酸フラグメント、または本明細書中で定義されるポリペプチドをコードする核酸フラグメントの、完全相補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、本明細書中に提供されるHER-2sv配列を用いて、関連配列に関してcDNAライブラリ、ゲノムライブラリまたは合成DNAライブラリースクリーニングして調製され得る。既知配列に対して顕著な同一性を示すHER-2svポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列の領域は、本明細書中に記載されるような配列アライン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が設計され得る。

## 【0052】

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、かつ顕著に不一致の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、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、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。

## 【0053】

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される。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緩衝液および洗浄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<sub>4</sub>、(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）およびデキストラン硫酸であるが、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ずに変更され得る。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からほぼ独立する。Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

## 【0054】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、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評価され得る：

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

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、 $\% \text{G} + \text{C}$ は、ハイブリッド中の（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℃下げられる。

10

## 【0055】

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、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、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ナトリウムイオン中での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。

20

## 【0056】

「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認識される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長さの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、このことは、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。

## 【0057】

約20nt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評価は、以下によって与えられる：

30

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

\* 6x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、1Mである。Suggsら, Developmental Biology Using Purified Genes 683 (BrownおよびFox編, 1981)を参照のこと。

## 【0058】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェンシー洗浄条件は通常、6xSSC、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。

## 【0059】

別の実施形態において、関連する核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかで示されているヌクレオチド配列に少なくとも約70%同一であるヌクレオチド配列を含むか、もしくはこれらからなる。好ましい実施形態において、ヌクレオチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかで示されているヌクレオチド配列に約75%、もしくは約80%、もしくは約85%、もしくは約90%、もしくは約95%、96%、97%、98%、または99%同一である。関連する核酸分子は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するポリペプチドをコードする。

40

## 【0060】

核酸配列における違いは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または

50

配列番号10のいずれかのアミノ酸配列に関して、アミノ酸配列の保存的または/および非保存的修飾を生じ得る。

【0061】

配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかのアミノ酸配列への保存的な修飾（およびコードヌクレオチドへの対応する修飾）は、HER-2svポリペプチドに類似した機能および化学的特徴を有するポリペプチドを生成する。対照的に、HER-2svポリペプチドの機能的特徴および/または化学的特長における実質的な修飾は、(a)置換領域内での分子の骨格構造（例えば、シート高次構造またはらせん状の高次構造）(b)標的部位における分子の電荷はまた疎水性、もしくは(c)側鎖のバルク、の維持における効果が有意に異なる、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10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り達成し得る。

10

【0062】

例えば、「保存的なアミノ酸置換」は、結果として、その位置でのアミノ酸残基の極性または電荷においてほとんど、もしくは全く影響がない、非天然残基での天然のアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチドにおける任意の天然の残基はまた、以前に「アラニン走査突然変異」として記載されているように、アラニンで置換され得る。

【0063】

保存的なアミノ酸置換はまた、代表的には、生物学的系での合成よりも化学ペプチド合成によって組み入れられている天然に存在しないアミノ酸残基を包含する。これらには、ペプチド擬態および他のアミノ酸部分の逆転形態または反転形態が挙げられる。

20

【0064】

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。

【0065】

例えば、非保存的な置換には、他のクラス由来のメンバーに対するこれらクラスの1つのメンバーの交換が挙げられ得る。このような置換残基は、非ヒトHER-2svポリペプチドと相同なヒトHER-2svポリペプチド領域へ、もしくはその分子の非相同性領域へと導入され得る。

30

【0066】

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)。

40

【0067】

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と置換され得、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

50

ドロパシー指数が $\pm 2$ 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 $\pm 1$ 以内であるものが特に好ましく、そして $\pm 0.5$ 以内であるものが、なおより特に好ましい。

【0068】

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考慮される場合）こともまた、当該分野において理解されている。近接するアミノ酸の親水性により支配されるように、タンパク質の最も大きな局所的な平均親水性は、免疫原性および抗原性（すなわち、タンパク質の生物学的特徴に）に関する。

【0069】

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ている：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 $\pm 2$ 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 $\pm 1$ 以内であるものが特に好ましく、そして $\pm 0.5$ 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」と呼ばれる。

10

20

【0070】

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、HER-2 s v 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HER-2 s v 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が表Iで記載されている。

【0071】

（表I）

（アミノ酸置換）

30

【0072】

【表 1】

元々の残基	典型的な置換基	好ましい置換基
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 ジアミノ酪酸, 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

10

20

30

40

50

当業者は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、または配列番号 10 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適切な分子領域の同定のために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられていない領域を標的とし得る。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、HER-2sv 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、HER-2sv ポリペプチドの領域における変化が、HER-2sv 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、活性を維持し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。

【0073】

さらに、当業者は、活性または構造に重要である、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HER-2sv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、HER-2sv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。

【0074】

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、HER-2sv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参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。

【0075】

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(2): 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、2次構造を推定するのを補助するために、コンピュータプログラムが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における可能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、決定的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、示唆されている(Brennerら, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 369-76)

【0076】

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」(Bowle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「evolutionary linkage」(Holmら(前出)、およびBrennerら(前出)を参照のこと)を包含する。

10

20

30

40

50

## 【0077】

好ましいHER-2sv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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10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、HER-2svポリペプチド改変体は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列に比べて多いかまたはより少ない数のN結合グリコシル化部位を含む。N結合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と印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糖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結合糖鎖を除去する。1つ以上のN結合グリコシル化部位(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結合部位が作製される、N結合糖鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいHER-2sv改変体としては、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して、1つ以上のシステイン残基が、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、HER-2sv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置に再折り畳み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。

10

20

## 【0078】

別の実施形態において、HER-2svポリペプチド改変体は、少なくとも1つのアミノ酸の挿入を伴う配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸であって、そのポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するアミノ酸配列または、少なくとも1つのアミノ酸の欠失を伴う配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸であって、そのポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するアミノ酸配列を含む。HER-2svポリペプチド改変体はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸を含み、そのポリペプチドが、カルボキシ末端の短縮および/またはアミノ末端の短縮を有し、さらにポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するアミノ酸配列を含む。HER-2svポリペプチド改変体はさらに、少なくとも1つの改変(すなわち、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシ末端の短縮、またはアミノ末端の短縮)を伴う配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸であって、ここで、ポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

## 【0079】

さらなる実施形態において、HER-2svポリペプチド改変体は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態において、HER-2svポリペプチド改変体は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%または約99%、同一のアミノ酸配列を含む。HER-2svポリペプチド改変体は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有する。

50

## 【0080】

さらに、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、もしくは配列番号10のいずれかのアミノ酸配列または他のHER-2svポリペプチドを含むポリペプチドは、ホモ二量体を形成するために相動的なポリペプチドに融合、またはヘテロ二量体を形成するために異種的なポリペプチドに融合し得る。異種性のペプチドおよびポリペプチドとしては以下が挙げられるが、これらに限定されない：HER-2sv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れらの一部（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）；リガンドまたは膜貫通レセプタータンパク質に結合するリガンドの一部；酵素または触媒的に活性な酵素の一部；オリゴマー形成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）；安定性を高め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）；および配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のHER-2svポリペプチドとは異なる治療的活性を有するポリペプチド。

10

## 【0081】

融合は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ末端もしくはカルボキシ末端、または他のHER-2svポリペプチドで作製され得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いない直接的であっても、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用いて設計されて、融合した部分の分離を可能にし得る。一旦構築されると、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。

20

## 【0082】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、もしくは配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、または他のHER-2sv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される。抗体は、抗原を結合する「Fab」として公知の変域ドメイン、ならびに相補的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の2つの機能的に独立した部分を含む。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、またはこのような機能（Fcレセプター結合、プロテインA結合、補体結合、およびおそらく、胎盤移入さえも）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。

30

## 【0083】

【表 2】

Fcの形態	融合パートナー	治療上の関係	参考文献
IgG1	CD30-L のN-末端	ホジキン病； 退性リンパ腫； T細胞白血病	U.S. Patent No. 5,480,981
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症性； 移植拒絶反応	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697- 1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, または IgE (第1のドメイン を除外する)	TNFレセプター	炎症、自己免疫疾患	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2のN末端	抗癌、抗ウイルス性	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPGのC末端	変形性関節症； 骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプチン(leptin) のN末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
ヒト Ig Cγ1	CTLA-4	自己免疫疾患	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

10

20

## (表 I I 治療的タンパク質とのFc融合)

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、HER-2svポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに融合され得る。別の例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域が、HER-2svポリペプチドフラグメントのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれか（例えば、HER-2svポリペプチドの予想された細胞外部分）に融合され得る。

30

## 【0084】

得られるHER-2sv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ピグ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。

40

## 【0085】

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,

50

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。

#### 【0086】

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ために、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、公共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、GC G プログラムパッケージ (GAP (Devereux ら、1984, Nucl. Acid. Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を含む)、BLASTP、BLASTN、および FASTA (Altschul ら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) 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。

#### 【0087】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定の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、特許請求の範囲の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。

#### 【0088】

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、配列同一性の百分率が決定される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) (PAM 250 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)。

#### 【0089】

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 および Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453;

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff ら、前

10

20

30

40

50

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。

【0090】

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およびWunsch, 前出；

10

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。核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【0091】

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、および類似性の閾値が使用され得る。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、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。

20

【0092】

（3. 核酸分子）

HER-2sv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もしくはゲノムライブラリのスクリーニング、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。

30

【0093】

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るような核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。

40

【0094】

HER-2sv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、その遺伝子の全てもしくは一部が、同じ種からのオルソログ (ortholog) または関連した遺伝子を同定するためのプローブとして使用され得る。プローブまたはプライマーは、HER-2svポリペプチドを発現すると考えられている種々の組織源からのcDNAライブラリをスクリーニングするために使用され得る。さらに、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9のいずれかに記載の配列を有する一部または全ての核酸分子を使用して、HER-2sv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するためのゲノムライブラリをスクリーニングし得る。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、スクリーニングに使

50

用されて、このスクリーニングから得られる偽陽性の数を最小にする。

【0095】

HER-2sv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、宿主細胞表面に発現され、そして提示される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。

【0096】

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、HER-2sv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、HER-2sv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HER-2svポリペプチドが、多量に生成され得る。

【0097】

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、HER-2sv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。

【0098】

HER-2sv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. Ed. 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-ホスホネート方法が挙げられる。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、ポリマー支持される合成である。代表的に、HER-2sv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、HER-2sv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、HER-2sv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。

【0099】

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HER-2sv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HER-2sv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」のようなコドン度数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

。他の有用なコドン度数表としては、「C e l e g a n s \_ h i g h . c o d」、「C e l e g a n s \_ l o w . c o d」、「D r o s o p h i l a \_ h i g h . c o d」、「H u m a n \_ h i g h . c o d」、「M a i z e \_ h i g h . c o d」、および「Y e a s t \_ h i g h . c o d .」が挙げられる。

#### 【0100】

いくつかの場合において、HER-2sv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し得る（変異誘発技術の記載に関しては、S a m b r o o kら、前出、およびA u s u b e lら、前出を参照のこと）。E n g e l s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。

10

#### 【0101】

（4．ベクターおよび宿主細胞）

HER-2sv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）。HER-2sv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、HER-2sv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、M e t h . E n z . , v o l . 1 8 5 ( D . V . G o e d d e l , 編 , A c a d e m i c P r e s s 1 9 9 0 ) を参照のこと。

20

#### 【0102】

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の配列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：プロモーター、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。

30

#### 【0103】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列を含み得る。この「タグ」コード配列は、すなわち、HER-2sv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であって、このオリゴヌクレオチド配列は、p o l y H i s（例えば、h e x a H i s）、別の「タグ」（例えば、F L A G、H A（赤血球凝集素インフルエンザウイルス））または市販の抗体が存在するm y c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、HER-2sv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HER-2svポリペプチドから除去され得る。

40

#### 【0104】

隣接配列は、同種隣接配列（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または同じ系統由来）であり得るか、異種隣接配列（すなわち、宿主細胞種または系統以外の種由来）であり

50

得るか、ハイブリッド隣接配列（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、または合成隣接配列であり得るか、あるいは隣接配列は、HER-2sv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。

#### 【0105】

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、HER-2sv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、核酸合成または核酸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。

10

#### 【0106】

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すら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。

20

#### 【0107】

複製起点は、代表的に、購入された市販の原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数までのベクターの増幅は、いくつかの場合において、HER-2sv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に必要なではない（例えば、SV40起点は、初期プロモーターを含むためだけに、しばしば、使用される）。

30

#### 【0108】

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から容易にクローン化されるか、またはベクターの一部として市販で購入すらされる一方、これはまた、本明細書中に記載される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。

40

#### 【0109】

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；細胞の栄養要求性の欠損を補うか；あるいは複合培地から入手不能な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

50

核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0110】

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に生成される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HER-2sv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HER-2svポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

【0111】

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HER-2svポリペプチドのプロモーターの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、ポリプリンである (すなわち、高いA-G含有量を有する)。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、原核生物ベクターを使用して容易に合成され得る。

【0112】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞からHER-2sv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、HER-2sv核酸分子のコード領域に位置するか、または直接HER-2sv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、選択された宿主細胞において機能性であるシグナル配列のいずれかが、HER-2sv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、HER-2sv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を介した宿主細胞からのHER-2svポリペプチドの分泌は、分泌されたHER-2sv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HER-2sv核酸分子の一部であり得る。

【0113】

HER-2svポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなHER-2sv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HER-2sv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、本発明の範囲内に含まれる。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、処理される (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HER-2svポリペプチドシグナル配列を認識せず、処理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リーダー、ペニシリナーゼリーダー、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HER-2svポリペプチドシグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、因子リーダー、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申し分ないが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0114】

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 (presequen

10

20

30

40

50

c e ) 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 ( p r o - s e q u e n c e ) ( これもまた、グリコシル化に影響し得る ) を加え得る。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、このアミノ酸は、完全に除去されていなくともよい。例えば、最終タンパク質産物は、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の使用は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合、所望の H E R - 2 s v ポリペプチドの僅かに短縮した形態を生じ得る。

#### 【 0 1 1 5 】

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、H E R - 2 s v 遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが天然で遺伝子内に ( 大部分の c D N A について ) 存在しない場合、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 H E R - 2 s v 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ゆえに、一般的に重要である。従って、H E R - 2 s v 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 ( 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 ) を使用して、本発明を実行し得る。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。

#### 【 0 1 1 6 】

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、H E R - 2 s v 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ーを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子 ( 一般的に、約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 b p の範囲内 ) 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。プロモーターは、従来、2 つのクラス ( 誘導プロモーターおよび構成プロモーター ) の 1 つに分類される。誘導プロモーターは、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、制御下で、D N A からの転写のレベルの上昇を開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する ; すなわち、遺伝子発現に対する制御がほとんど存在しないかまたは全く存在しない。多数のプロモーター ( 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。適切なプロモーターは、供給源の D N A からプロモーター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ー配列をベクターに挿入することによって、H E R - 2 s v ポリペプチドをコードする D N A に作動可能に連結される。ネイティブな H E R - 2 s v プロモーター配列は、H E R - 2 s v 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ーと比較して多量の転写および発現タンパク質のより高い収率を可能にし、そして使用のために選択されている宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

#### 【 0 1 1 7 】

原核生物宿主との使用に適切なプロモーターとしては、- ラクタマーゼプロモーター系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プロモーター系 ; トリプトファン ( t r p ) 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、t a c プロモーター ) が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた、適切である。これらの配列は、公開されており、それにより、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 D N A にそれらの配列を連結

10

20

30

40

50

し得る。

【0118】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターもまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーター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ーは周知であり、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くはシミアンウイルス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ーが挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（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。

【0119】

HER-2sv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ーとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40初期プロモーター領域（Bernois t and Chambon, 1981, Nature 290:304-10）；CMVプロモーター；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ー（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）； $\beta$ -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プロモーター（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興味深い：膵臓腺房細胞において活性なエラストラーゼ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（Groschedlら, 1984, Cell 38:647-58）；Adamesら, 1985, Nature 318:533-38）；Alexanderら, 1987, Mol. Cell Biol., 7:1436-44）；精巢細胞、乳房細胞、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 $\alpha$ -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 $\alpha$ 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 $\beta$ -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）。

【0120】

10

20

30

40

50

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HER-2sv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ーに作用する、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、相対的な方向および位置に依存しない。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、エラストラーゼ、アルブミン、 $\alpha$ -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ー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、HER-2sv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、プロモーターから5'位側に配置される。

10

#### 【0121】

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、全ての所望の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にない場合、これらは、個々に得られ得、ベクター内に連結され得る。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。

#### 【0122】

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-(PCT公開番号WO 90/14363)ならびにpFastBacDual(Gibco-BRL、Grand Island、NY)が挙げられる。

20

#### 【0123】

さらなる適切なベクターとしては、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ぬことが理解される。このようなベクターとしては、Bluescript(登録商標)プラスミド誘導體(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、TOPOTM TA Cloning(登録商標)Kit、PCR2.1(登録商標)プラスミド誘導體、Invitrogen)、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはバキュロウイルス発現系のようなウイルスベクター(pBacPAKプラスミド誘導體、Clontech、Palo Alto、CA)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0124】

ベクターが構築され、そしてHER-2sv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。HER-2sv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、塩化カルシウム法、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技術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。

50

## 【0125】

宿主細胞は、原核宿主細胞（例えば、*E. coli*）または真核宿主細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、脊椎動物細胞）であり得る。適切な条件下で培養された場合、宿主細胞は、後に培養培地から（宿主細胞が培地中にHER-2svポリペプチドを分泌する場合）、もしくはHER-2svポリペプチドを産生する宿主細胞から直接（分泌されない場合）収集され得るHER-2svポリペプチドを合成する。適切な宿主細胞の選択は、種々の因子（例えば、所望する発現レベル、活性のために所望されるかまたは必要なポリペプチドの改変（例えば、グリコシル化またはリン酸化）および生物学的に活性な分子への折り畳みの容易さ）に依存する。

## 【0126】

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、チャ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細胞または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が、これらに限定されない。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、サルのCOS-1細胞株および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として欠損し得るか、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、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マウス細胞株またはNIHマウス細胞株、BHKまたはHakハムスター細胞株が挙げられる（これらは、ATCCから入手可能である）が、これらに限定されない。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。

## 【0127】

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。

## 【0128】

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。

## 【0129】

さらに、所望される場合、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。

## 【0130】

グリコシル化HER-2sv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中に得られ得る。HER-2sv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

10

20

30

40

50

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、ヒトの治療的使用に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0131】

(5. ポリペプチド産生)

HER-2sv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)、最小培地 (MEM) および/またはダルベッコの改変イーグル培地 (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。

10

【0132】

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エレメントによって検出される。例えば、選択マーカーエレ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。

20

【0133】

宿主細胞によって産生されるHER-2sv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、高性能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。

【0134】

HER-2sv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、HER-2sv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。

30

【0135】

宿主細胞の細胞質および/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HER-2sv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/細胞質の含有物を放出するように溶解され得る。

40

【0136】

HER-2sv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、可溶化されたHER-2sv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。HER-2sv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, 19

50

90, 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。

【0137】

いくつかの場合、HER-2sv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、可溶化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(chao trope)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、封入体可溶化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。

10

【0138】

封入体がHER-2sv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。

20

【0139】

溶液からのHER-2sv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。そのポリペプチドがそのカルボキシル末端もしくはアミノ末端のいずれかに、ヘキサヒスチジンのようなタグを含む(HER-2svポリペプチド/ヘキサHis)かまたはFLAG(Eastman Kodak Co., New Haven, CT)もしくはmyc(Invitrogen)のような他の小さいペプチドを含むように合成されている場合、そのポリペプチドは、カラムマトリックスがそのタグにまたはそのポリペプチドに直接高い親和性を有するアフィニティークラムにその溶液を通すことによって、1工程のプロセスで精製され得る。

30

【0140】

例えば、ポリヒスチジンはニッケルに大きな親和性および特異性で結合し、従ってニッケルのアフィニティークラム(例えば、Qiagen(登録商標)ニッケルカラム)が、HER-2SVポリペプチド/ポリHisの精製に使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology, 10.11.8節(Ausubelら編、Green Publishers Inc.およびWiley & Sons 1993)を参照のこと。

40

【0141】

さらに、HER-2svポリペプチドは、HER-2svポリペプチドを特異的に認識し得るモノクローナル抗体の使用を介して、精製され得る。

【0142】

精製のための他の適した方法には、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動(ネイティブゲル電気泳動を含む)と続くゲル溶出、ならびに調製的等電収束法(「Isoprime」マシーン/技術、Hoefler Scientific, San Francisco, CA)が挙げられるがこれら限定されない。いくつかの場合、2つ以上の精製技術が、純度の増加を達成するために組み合わせられ得る

50

。

## 【0143】

HER-2svポリペプチドは、当該分野で公知の技術を使用して化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）により調製され得、その公知技術は、Merrifieldら（J. Am. Chem. Soc. 85:2149、1963）、Houghtenら（Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132、1985）、ならびにStewartおよびYoung（Solid Phase Peptide Synthesis、Pierce Chemical Co.、1984）に示される技術である。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含んで合成され得るし、または含まずに合成され得る。化学合成されたHER-2svポリペプチドは、これらの参考文献に示される方法を使用して、ジスルフィド架橋を形成するように酸化され得る。化学合成されたHER-2svポリペプチドは、組換え産生されるかもしくは天然の供給源から精製された対応するHER-2svポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると予測され、従って、組換えHER-2svポリペプチドもしくは天然のHER-2svポリペプチドと互換可能に使用され得る。

10

## 【0144】

HER-2svポリペプチドを得る別の手段は、HER-2sv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、HER-2svポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたHER-2sv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。

20

## 【0145】

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、HER-2sv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。

30

## 【0146】

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。

40

## 【0147】

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WO99/15650に記載されている。「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」（RAGE-GD）として知られている、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

50

、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を生じる。

**【0148】**

これらの方法は、包括的なHER-2svポリペプチド発現ライブラリを作製するためにも使用され得、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と理解される。

10

**【0149】****（6．合成）**

本明細書中で記載された核酸およびポリペプチド分子は、組換え方法および他の方法によって産生され得ると当業者によって理解される。

**【0150】****（7．選択的結合因子）**

用語「選択的結合因子」は、1以上のHER-2sv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、ならびに低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HER-2SVポリペプチド選択的結合因子は、HER-2SVポリペプチドの特定の部分に結合し得、これにより、ポリペプチドのHER-2svレセプターへの結合を阻害する。

20

**【0151】**

HER-2sv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、相補性決定領域（CDR）グラフト化）；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、HER-2SV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')<sub>2</sub>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。

30

**【0152】**

HER-2svポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、一般に、HER-2SV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。HER-2SV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、HER-2svポリペプチド抗体力価についてアッセイする。

40

**【0153】**

HER-2sv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、

50

Inc., 1987))が挙げられる。HER-2sv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。

【0154】

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。

10

【0155】

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、当該分野で記載される方法(Jonesら、1986、Nature 321:522-25; Reichmannら、1998、Nature 332:323-27; Verhoeyenら、1988、Science 239:1534-36)を使用して、げっ歯類の相補性決定領域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。

20

【0156】

HER-2sv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、HER-2sv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コードする遺伝子座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。国際出願番号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、国際出願番号PCT/US91/245およびPCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1および同第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。

30

40

【0157】

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)。これらのプロセスは、糸状のバクテリオファージの表面上の抗体レパートリーのディスプレイを介した免疫選択を模倣し、選択した抗原への結合によってファージを続いて選択する。1つのこの

50

ような技術は、国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 1 7 3 6 4 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、M P L - および m s k - レセプターについて、高い親和性および機能的なアゴニスト抗体の単離が記載される。

【 0 1 5 8 】

キメラ抗体、C D R グラフト化抗体、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、C H O 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 D N A 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。

10

【 0 1 5 9 】

本発明の抗 - H E R - 2 s v ポリペプチド抗体は、H E R - 2 s v ポリペプチドの検出および定量的のために、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 o l a , M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : A M a n u a l o f T e c h n i q u e s 1 4 7 - 1 5 8 ( C R C P r e s s , I n c . , 1 9 8 7 ) ）。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 H E R - 2 s v ポリペプチドと結合する。

【 0 1 6 0 】

診断適用のために、特定の実施形態において、抗 - H E R - 2 s v 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、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、または<sup>67</sup>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、 $\alpha$ -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（B a y e r , 1 9 9 0 , M e t h . E n z . 1 8 4 : 1 3 8 - 6 3 ）。

20

【 0 1 6 1 】

競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、H E R - 2 s v ポリペプチド、またはその免疫学的に活性な部分）の、限定された量の抗 - H E R - 2 s v 抗体との結合に関して、試験サンプル検体（H E R - 2 s v ポリペプチド）と競合する能力に依存する。試験サンプル中の H E R - 2 s v 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、代表的に不溶化され、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。

30

【 0 1 6 2 】

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、固体支持体上に固定される第1抗体によって代表的に結合され、その後、第2抗体が、この検体に結合され、不溶性の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。第2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測定され得る（間接的なサンドイッチアッセイ）。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。

40

【 0 1 6 3 】

抗 H E R - 2 s v 抗体を含む選択的結合因子はまた、インビボでの画像化に有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物、好ましくは血流に投与され得、そして宿主中の標識された抗体の存在および位置は、アッセイされる。抗体は、核磁気共鳴、放射線医学、または当該分野において公知の他の検出手段によって、動物中において検出可能な

50

部分のいずれかで標識され得る。

【0164】

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。好ましい実施形態において、選択的結合因子は、HER-2svポリペプチドに特異的に結合可能であり、その結果としてインビボまたはインビトロにおいてHER-2svポリペプチドの機能活性を阻害または排除するアンタゴニスト抗体である。好ましい実施形態において、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、HER-2sv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、選択的結合因子は、HER-2sv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-HER-2sv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HER-2svポリペプチド活性を阻害または排除する。アンタゴニスト抗HER-2sv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。

10

【0165】

本発明はまた、生物学的サンプル中のHER-2sv選択可能な結合因子（例えば、抗体）およびHER-2svポリペプチドのレベルを検出するために有用な他の試薬を含むキットに関する。このような試薬は、検出可能な標識、ブロッキング血清、ポジティブコントロールサンプルおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬を含み得る。

【0166】

（8．マイクロアレイ）

DNAマイクロアレイ技術が、本発明に従って利用され得ることは明らかである。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、核酸の微小の高密度アレイである。このアレイ内の各セルまたはエレメントは、単一種の核酸の多くのコピーを有し、この核酸は、相補的な核酸配列（例えば、mRNA）とのハイブリダイゼーションのための標的として作用する。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、最初に、mRNAが、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素的に変換される。この材料を、マイクロアレイにハイブリダイズさせ、そして未結合cDNAを洗浄により除去する。次いで、アレイ上に提示される別々の遺伝子の発現を、各標的核酸分子に特異的に結合された標識cDNAの量を定量することによって可視化する。このようにして、数千の遺伝子の発現を、生物学的材料の単一のサンプルから、高スループットの並行様式で定量し得る。

20

30

【0167】

この高スループット発現プロファイリングは、本発明のHER-2sv分子に関する広範な適用を有する。これらの適用としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：治療用標的としてのHER-2sv疾患関連遺伝子の同定および確証；関連HER-2sv分子およびそのインヒビターの分子毒性研究；集団の層別化および臨床試験用の代理マーカーの作製；ならびに高スループットスクリーニングにおける選択的な化合物の同定を補助することによるHER-2sv関連低分子薬物発見の増大。

【0168】

（9．化学的誘導体）

HER-2sv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。HER-2sv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4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列または他のHER-2svポリペプチド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。

40

50

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。

【0169】

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。

【0170】

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<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>）、アルコキシ-、またはアリアルオキシ-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る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（例えば、グリセロール）、およびポリビニルアルコール。共有結合したHER-2 sv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。

10

20

【0171】

一般に、化学的誘導体化は、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4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のHER-2 sv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、HER-2 sv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。

30

【0172】

ポリペプチドのペグ化（pegylation）は、当該分野で公知の任意のペグ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、ペグ化は、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は、選択されるポリマーは、単一の反応性エステル基を有する。還元的アルキル化のためには、選択されるポリマーは、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（これは、水溶性である）、またはそのモノC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルコキシ誘導体もしくは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）。

40

【0173】

別の実施形態において、HER-2 sv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/HER-2 sv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/HER-2 svポリペプチド分子が得られる

50

。HER-2sv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。

【0174】

一般に、本発明のHER-2sv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、HER-2sv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HER-2sv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。

【0175】

(10. 遺伝子操作された非ヒト動物)

非ヒト動物(例えば、マウス、ラット、もしくは他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、またはヒツジ、あるいは、他の家畜動物)は、本明細書の範囲にさらに含まれる。これらの動物において、ネイティブなHER-2svポリペプチドをコードする遺伝子は、破壊されている(「ノックアウトされている」)ので、これらの遺伝子の発現レベルは、顕著に減少しているかまたは完全に除外されている。このような動物は、例えば、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。

【0176】

本発明はさらに、非ヒト動物(例えば、マウス、ラット、もしくは他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、またはヒツジ、あるいは、他の家畜動物)を含み、これらの動物において、これらの動物に対してネイティブな形態のHER-2sv遺伝子または異種性HER-2sv遺伝子は、これらの動物によって過剰発現され、これにより、「トランスジェニック」動物が作製される。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国際公開番号WO94/28122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。

【0177】

本発明はさらに、非ヒト動物を含み、これらの動物において、本発明の1つ以上のHER-2svポリペプチドについてのプロモーターは、活性化されるかまたは不活性化されるかのいずれか(例えば、相同組換え法を使用することによって)であり、1つ以上のネイティブなHER-2svポリペプチドの発現レベルを変更する。

【0178】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングに用いられ得る。このようなスクリーニングにおいて、動物における薬物候補の影響は、測定され得る。例えば、薬物候補は、HER-2sv遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生されるHER-2svポリペプチドの量は、動物をその薬物候補に暴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、動物に対する薬物候補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は、疾患または病理学的状態を生じ得るかあるいは疾患または病理学的状態に関し得る。このような場合において、この遺伝子の発現を減少するための薬物候補の能力、あるいは病理学的状態を予防または阻害するための能力を試験し得る。他の実施例において、特定の代謝産物(例えば、ポリペプチドのフラグメント)の産生は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、あるいは疾患または病理学的状態に関連し得る。このような場合において、薬物候補がこのような代謝産物の産生を減少させる能力、またはその病理学的状態を予防もしくは阻害する能力が、試験され得る。

【0179】

(11. HER-2svポリペプチド活性の他の調節因子についてのアッセイ)

いくつかの状況において、HER-2svポリペプチドの活性の調節因子(例えば、アンタゴニスト)である分子を同定することが所望され得る。HER-2svポリペプチドを調節する天然の分子または合成分子は、本明細書中に記載されるもののような1つ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、エキソビボ様式でか、または注射によるインビボ様式でか、あるいは経口投与、移植デバイスなどによっ

10

20

30

40

50

でのいずれかで投与され得る。

【0180】

「試験分子」は、HER-2svポリペプチドの活性を調節（すなわち、増加または減少）する能力についての評価下である分子をいう。最も一般的には、試験分子は、HER-2svポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまたHER-2svポリペプチド活性を例えば、HER-2sv遺伝子発現に影響を与えることによってかまたはHER-2sv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、間接的に調節し得ることもまた意図される。1つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 $10^{-6}$  M、好ましくは約 $10^{-8}$  M、もっとも好ましくは約 $10^{-9}$  M、そしてさらにもっとも好ましくは約 $10^{-10}$  Mの親和性定数でHER-2svポリペプチドに結合する。

10

【0181】

HER-2sv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、試験分子のHER-2svポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で、HER-2svポリペプチドは、試験分子とインキュベートされ、そして相互作用の程度が測定され得る。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製混合物においてスクリーニングされ得る。

【0182】

特定の実施形態において、HER-2svアンタゴニストは、HER-2svポリペプチドの活性を調節するようHER-2svポリペプチドと相互作用するタンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量分子であり得る。HER-2svポリペプチドの発現を調節する分子には、HER-2svポリペプチドをコードする核酸と相補的な核酸、またはHER-2svポリペプチドの発現を指示もしくは制御する核酸配列と相補的な核酸、ならびに発現のアンチセンス調節因子として働く核酸が挙げられる。

20

【0183】

一旦、試験分子がHER-2svポリペプチドと相互作用するとして同定されると、この分子はさらに、HER-2svポリペプチド活性を増加または減少するその能力について評価され得る。試験分子のHER-2svポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの型（細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、溶液相アッセイおよび免疫アッセイを含む）において実施され得る。一般には、試験分子は、HER-2svポリペプチドと特定の時間にわたってインキュベートされ、そして、HER-2svポリペプチド活性は、生物学的活性を測定するための1つ以上のアッセイによって決定される。

30

【0184】

試験分子のHER-2sv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エピトープタグを含有するHER-2svポリペプチドの改変形態は、溶液中および免疫アッセイにおいて使用され得る。

【0185】

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HER-2svポリペプチドが生物学的活性を示す場合、種々のインビトロアッセイは、HER-2svポリペプチドのその対応する結合パートナー（例えば、選択的な結合因子、もしくはレセプターまたはリガンド）との結合を測定するために使用され得る。このようなアッセイは、HER-2svポリペプチドのその結合パートナーとの結合の割合および/または程度を増加または減少するこれらの能力について試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1つのアッセイにおいて、HER-2svポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェルにおいて固定化される。次いで、放射標識されたHER-2svポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨード化されたHER-2svポリペプチド結合パートナー）、および試験分子は、ウェルに一度に一方（どちらの順番でも）または同時にかのいずれかで添加され得る。インキュベート後ウェルを、洗浄し、そして、結合した結合パートナーがHER-2svポリペプチドに程度を決定するためにシンチレーションカ

40

50

ウンターを使用して放射能について計数し得る。代表的には、これらの分子は、濃度の範囲にわたって試験され、そして、試験アッセイの1つ以上の要素を欠く一連のコントロールウェルは、これらの結果の評価における正確さについて使用され得る。本方法の代替は、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にHER-2svポリペプチド結合パートナーを固定化する工程）、試験分子を放射標識されたHER-2svポリペプチドとインキュベートする工程、ならびにHER-2svポリペプチド結合の程度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. およびWiley and Sons 1995)を参照のこと。

10

## 【0186】

放射標識の代替として、HER-2sv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、次いで、ビオチン化タンパク質の存在は、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP））に連結されたストレプトアビジンを使用して検出され得、これは、比色定量により（colorometrically）、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化により、検出され得る。HER-2svポリペプチドまたはHER-2sv結合パートナーに対する、ビオチンに結合体化された抗体はまた、APまたはHRPと連結され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ト後に検出の目的で使用され得る。

## 【0187】

HER-2svポリペプチドまたはHER-2sv結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズまたはこのような不活性な固相基質の他の型への接着によって固定化され得る。基質-タンパク質複合体は、相補的タンパク質および試験化合物を含む溶液に入れられ得る。インキュベート後、ビーズは、遠心分離によって沈殿され得、そしてHER-2svポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量は、本明細書中に記載される方法によって評価され得る。あるいは、基質-タンパク質複合体は、カラムに固定化され得、そして試験分子および相補的タンパク質は、このカラムを通過される。次いで、HER-2svポリペプチドとその結合パートナーとの複合体の形成は、本明細書中に記載の技術のいずれか（例えば、放射性標識、または抗体結合）を使用して評価され得る。

20

30

## 【0188】

HER-2svポリペプチド結合タンパク質とHER-2svポリペプチド結合パートナーとの複合体の形成を増加または減少す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、例えば、BIACoreアッセイシステム（Pharmacia, Piscataway, NJ）のような表面プラズモン共鳴検出器システムである。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得る。このアッセイは、HER-2svポリペプチドまたはHER-2sv結合パートナーのいずれかの、検出器に位置するデキストランコートされたセンサーチップとの共有結合を必ず含む。次いで、試験化合物および他の相補的タンパク質は、センサーチップを含むチャンバーへと同時または順次いずれかで注入され得る。結合する相補的タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコートされた側に物理的に結合する分子量における変化に基づいて評価され得、そして分子量における変化は、検出器システムによって測定され得る。

40

## 【0189】

いくつかの場合において、HER-2svポリペプチドとHER-2sv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する能力について、2つ以上の試験化合物と一緒に評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載されるアッセイは、このようなさらなる試験化合物の添加（第一の試験化合物と同時に、または第一の試験化合物に引き続いてかのいずれか）によって容易に改変され得る。このアッセイにおけるこの工程の残りは、本明細書中に記載されるとおりである。

## 【0190】

50

本明細書中に記載されるもののようなインビトロアッセイは、HER-2svポリペプチドとHER-2svポリペプチド結合パートナーとの間の複合体形成に対する影響について、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ライブラリ、合成ペプチドライブラリー、および化学合成ライブラリにおいて作製される化合物をスクリーニングするために自動化され得る。

【0191】

HER-2svポリペプチドとHER-2sv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する化合物はまた、HER-2svポリペプチドまたはHER-2svポリペプチド結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用する細胞培養においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物より取得され得るが、好ましくは、ヒトもしくは他の霊長類、イヌ、またはげっ歯類の供給源由来である。HER-2svポリペプチドの、表面でHER-2svポリペプチド結合パートナーを発現する細胞への結合は、試験分子の存在下または非存在下において評価され、そして結合の程度は、例えば、HER-2sv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測定され得る。細胞培養アッセイはさらに、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ポジティブにスコアリングされる化合物を評価するために有利に使用され得る。

10

【0192】

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、HER-2sv遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生されるHER-2svポリペプチドまたはHER-2svポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物を薬物候補に暴露した後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補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は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合において、この遺伝子の発現を増加または減少する薬物候補の能力、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薬物候補の能力を試験し得る。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）の産生は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、あるいは疾患または病理学的状態に関し得る。このような場合において、細胞培養物におけるこのような代謝産物の産生を減少する薬物候補の能力を試験し得る。

20

【0193】

(12. 内部移行 (internalize) タンパク質)

tatタンパク質配列 (HIV由来) は、細胞にタンパク質を内部移行するために使用され得る。例えば、Falwellら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91:664-68 (1994) を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸配列 (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; 配列番号12) (「タンパク質伝達ドメイン」、またはTAT PDTと呼ばれる) は、細胞の細胞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、Science, 285:1569-1572 (1999); およびNagaharaら、Nat. Med., 4:1449-52 (1998) を参照のこと。これらの手順において、FITC-構築物 (FITC標識化G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; 配列番号13) (これらの構築物は、腹腔内投与後に組織を貫く) は、調製され、そしてこのような構築物の、細胞への結合は、蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) 分析によって観察される。tat-gal融合タンパク質で処理された細胞は、-gal活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現は、多くの組織 (肝臓、腎臓、肺、心臓、および脳組織を含む) は、において検出され得る。これらの構築物は、細胞への侵入のためにある程度のアンフォールディングを受け; 細胞への侵入後にリフォールディングが必要とされ得ると考えられる。

30

40

【0194】

従って、tatタンパク質配列が所望のポリペプチドを細胞内へ内部移行するために使用され得ることは明白である。例えば、tatタンパク質配列を使用して、HER-2sv

50

v アンタゴニスト（例えば、抗HER-2sv選択的な結合因子、小分子、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、細胞内へ投与されてHER-2sv分子の活性を阻害し得る。本明細書中で使用される場合、用語「HER-2sv分子」は、本明細書中で規定されるようなHER-2sv核酸分子およびHER-2svポリペプチドの両方をいう。所望の場合、HER-2svタンパク質自身はまた、これらの手順を使用して細胞内部に投与され得る。Strauss, 1999, Science, 285: 1466-67をまた参照のこと。

【0195】

（13. HER-2svポリペプチドを使用する細胞供給源同定）

本発明の特定の実施形態に従って、HER-2svポリペプチドに結合する特定の細胞型の供給源を決定し得ることは有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する補助として疾患または病理学的状態の起源を決定することは、有用であり得る。特定の実施形態において、HER-2sv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得て、このようなプローブでの細胞の核酸のスクリーニングによって本明細書中で記載される細胞を同定するためのプローブである。別の実施形態において、細胞中でのHER-2svポリペプチドの存在について試験をするよう抗HER-2svポリペプチド抗体が使用され得る。従って、このような細胞が、本明細書中で記載された型であるか否かが決定され得る。

10

【0196】

（14. HER-2svポリペプチド組成物および投与）

治療組成物は、本発明の範囲内にある。このようなHER-2svポリペプチドの薬学的組成物は、HER-2svポリペプチドまたはHER-2sv核酸分子の治療有効量を、投与の様式に適合するように選択された薬学的または生理的に受容可能な処方因子と混合して含み得る。薬学的組成物は、1つ以上のHER-2svポリペプチド選択的結合因子の治療有効量を、投与の様式に適合するように選択された薬学的または生理的に受容可能な処方因子と混合して含み得る。

20

【0197】

受容可能な処方材料は、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。

【0198】

薬学的組成物には、例えば、その組成物のpH、浸透圧、粘度、明澄度、色調、等張性、匂い、滅菌性、安定性、溶解速度または放出速度、吸収または浸透を改変、維持または保存のための、処方物材料を含み得る。適切な処方物材料には、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、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム）、緩衝薬（例えば、ホウ酸塩、重炭酸塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、充填剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 $\beta$ -シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン）、充填剤（filler）、単糖、二糖、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、香料添加剤、および希釈剤（diluting agent）、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）、防腐剤（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、界面活性剤もしくは湿潤剤（例えば、プルロニック；PEG；ソルビタンエステル；ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20またはポリソルベート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

30

40

50

ロキサポール)、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、アルカリ金属ハロゲン化物 - 好ましくは塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム - 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(excipient)、および/または薬学的アジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版、A. R. Gennaro編, Mack Publishing Company 1990)を参照のこと。

#### 【0199】

最適な薬学的組成物は、例えば、投与の意図された経路、送達形式、および所望する投与量に依存して当業者によって決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、前出を参照のこと。このような組成物は、HER-2sv分子の物理的な状態、安定性、インビボでの放出速度、およびインビボでの排除の速度に影響し得る。

10

#### 【0200】

薬学的組成物中の主なビヒクルまたはキャリアはその性質が水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注射のために適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理的食塩水溶液または人工の脳脊髄液であり得、これらには、非経口投与のための組成物中に一般的な他の材料が補充されていてもよい。中性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緩衝剤、または約pH4.0-5.5の酢酸緩衝剤を含む。これは、ソルビトールまたは適切なその代替物をさらに含み得る。本発明の1つの実施形態において、HER-2svポリペプチド組成物は、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、任意の処方剤(Remington's Pharmaceutical Sciences、前出)で所望の程度の純度を有する選択された組成物と混合することによって、保存用に調製され得る。さらに、HER-2svの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用いた凍結乾燥物として処方され得る。

20

#### 【0201】

HER-2svポリペプチド薬学的組成物は、非経口的送達のために選択され得る。あるいは、その組成物は、吸入もしくは消化管を通じての送達(例えば、経口的)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、当業者の技術の範囲内にある。

30

#### 【0202】

この処方物成分は、投与部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝剤は、生理的pHまたはわずかにより低いpH(代表的には約5と約8との間のpH範囲内)でその組成物を維持するために使用され得る。

#### 【0203】

非経口投与が検討される場合、本発明における使用のための治療的組成物は、発熱物質を含まない、非経口的に受容可能な水溶液(薬学的に受容可能なビヒクル中に所望のHER-2sv分子をふ組む)の形態であり得る。非経口注射に特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水である。この中に、所望するHER-2sv分子は、滅菌等張性溶液として、処方され、適切に保存される。さらに別の調製物は、その産物の制御されたまたは維持された放出を提供し、次いでデポー注射として送達され得る薬剤(例えば、注射可能なマイクロスフェア、生体分解性粒子、ポリマー化合物(例えば、ポリ乳酸もしくはポリグリコール酸)、ビーズ、またはリポソーム)を用いた所望の分子の処方物を包含し得る。ヒアルロン酸もまた使用され得、これは、循環中でも持続時間を促進する効果を有し得る。所望される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包含する。ヒアルロン酸もまた、使用され得て、そしてこれは、血液循環の間維持される促進効果を有し得る。所望する分子導入のための他の適した方法は、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

40

#### 【0204】

50

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、HER-2sv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。HER-2svポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアゾール送達のためのプロペラントを用いて、液化されたプロペラントを用いて処方され得る。さらに別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与は、国際公開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。

#### 【0205】

特定の処方物は、経口投与され得ることもまた企図される。本発明の一つに実施形態において、この様式で投与されるHER-2svポリペプチドは、錠剤およびカプセルのような固体投薬形態の処方において慣例的に使用されるそれらのキャリアとともにまたはそれを含まずに処方され得る。例えば、カプセルは、胃腸管において、バイオアベイラビリティが最大化され、そして全身前分解が最小化される時点で処方物の活性部分が放出されるように設計され得る。さらなる薬剤が、HER-2svポリペプチドの吸収を容易にするように含まれ得る。希釈剤、矯味矯臭剤、低融点ろう、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合因子もまた使用され得る。

10

#### 【0206】

別の薬学的組成物は、HER-2svポリペプチドの有効量を、錠剤の製造のために適切な非毒性賦形剤と混合して含み得る。滅菌水または他の適切なビヒクル中にその錠剤を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。適切な賦形剤としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：不活性希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、ラクトース、またはリン酸カルシウム；あるいは結合因子（例えば、デンプン、ゼラチン、アラビアゴム）；あるいは滑沢剤（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）。

20

#### 【0207】

さらなるHER-2svポリペプチド薬学的組成物は、当業者に明らかであり、これには、HER-2svポリペプチドを、徐放送達処方物または制御された送達処方物中のHER-2svポリペプチドを含む組成物が包含される。種々の他の徐放手段または制御された送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体分解性微粒子または多孔性ビーズおよびデポー（depot）注射）を処方するための技術もまた、当業者に公知である。例えば、以下を参照のこと：国際出願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微粒子の制御された放出を記載する。

30

#### 【0208】

徐放調製物のさらなる例としては、成型された物品の形態（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クスを包含する。徐放マトリクスとしては以下が挙げられ得る：ポリエステル、ヒドロゲル、ポリ乳酸（米国特許第3,773,919号、欧州特許第058,481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, 22:547-556）、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）。徐放組成物はまた、リポソームを含み得る。このリポソームは、当該分野において公知のいくつかの方法のいずれかにより調製され得る。例えば、以下を参照のこと：Eppsteinら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-92；欧州特許第036676号；欧州特許第088046号；欧州特許第143949号。

40

#### 【0209】

インビボ投与のために使用されるHER-2sv薬学的組成物は、代表的に無菌でなくてはならない。これは、滅菌ろ過膜を通してのろ過によって達成され得る。その組成物が凍結乾燥されている場合、この方法を用いた滅菌は、凍結乾燥および再構築の前またはそ

50

の後のいずれかで行われ得る。非経口的投与のための組成物は、凍結乾燥形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口的組成物は、一般的に、滅菌アクセス口を有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有するバイアル）に配置される。

#### 【0210】

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、乳濁液、固体または脱水粉末もしくは凍結乾燥粉末として保存され得る。そのような処方物は、直ぐ使用可能な形態または投与前に再構成を必要とする形態（例えば、凍結乾燥）のいずれかで保存され得る。

#### 【0211】

特定の実施形態において、本発明は、単回用量投与単位を産生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備え得る。本発明の範囲内に含まれるのはまた、単回および複数のチャンパー付きの予備充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよびリオシジンジ（lyosyringe））を備えるキットである。

#### 【0212】

治療に使用される、有効量のHER-2sv薬学的組成物は、例えば、治療背景および治療対象に依存する。当業者は、治療のための適切な投与量のレベルは、このように、送達される分子、どのHER-2sv分子が使用されるかの指示、投与の経路および大きさ（体重、体表面、または器官の大きさ）ならびに患者の状態（年齢および一般的な健康状態）に部分的に依存して変化すると理解する。従って、臨床医は、投薬量を力価測定し、そして最適な治療効果を得るために投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上述の因子に依存して、約0.1μg/kgから約100mg/kgの範囲、またはそれを超える範囲であり得る。別の実施形態において、投薬量は、0.1μg/kgから約100mg/kgまでの範囲であり得るか；または1μg/kgから約100mg/kgの範囲であり得るか；あるいは5μg/kgから約100mg/kgの範囲であり得る。

#### 【0213】

投与の頻度は、使用される処方物における、HER-2sv分子の薬物動態的パラメータに依存する。代表的には、臨床医は、投薬量が所望の効果を達成するに達するまで、その組成物を投与する。従って、その組成物は、単回用量として、または経時的な2もしくははそれを超える用量（これは、所望の分子の同じ量を含んでいても含んでいなくてもよい）として、あるいは移植可能なデバイスまたはカテーテルを介した連続注入として投与され得る。適切な投与量のさらなる精妙は、当業者により慣用的に作製され、当業者による慣用的に実施されている仕事の範囲である。適切な投与量は、適切な投与量-応答データの使用を通して確認され得る。

#### 【0214】

薬学的組成物の投与経路は、公知の方法に従って行われる（例えば、経口（静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内または創傷内経路への注射による）；徐放系システムによる；または移植デバイスによる）。所望の場合、その組成物は、ポラス注射により、または注入により連続的に、または移植デバイスにより投与され得る。

#### 【0215】

あるいはまたは加えて、その組成物は、所望の分子が吸収またはカプセル化された膜、スポンジまたは他の適切な材料の罹患領域へ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とき、そのデバイスは、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、時間放出ポラスによって、または連続投与によってであり得る。

#### 【0216】

いくつかの症例では、HER-2svポリペプチド薬学的組成物をエキソビボ様式で使用することも好ましくあり得る。そのような場合、患者から取り出された細胞、組織また

10

20

30

40

50

は器官は、HER-2svポリペプチド薬学的組成物に暴露され、その後、その細胞、組織および/または器官は、続いてその患者に移植して戻される。

【0217】

他の症例において、HER-2svポリペプチドは、本明細書において記載されるもののような方法を用いて遺伝子操作された特定の細胞を移植してHER-2svポリペプチドを発現および分泌させることによって送達され得る。そのような細胞は、動物またはヒトの細胞であり得、そして自己、異種(heterologous)または異種(xenogeneic)であり得る。必要に応じて、その細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、その細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。カプセル化された材料は、代表的に、生体適合性で、半透過性のポリマー封入物または膜であり、これは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系によるかまたは周囲組織からの他の悪性因子による細胞の破壊を予防することを可能にする。

10

【0218】

本明細書中で考察したように、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種以上のHER-2svポリペプチドで処置することが所望され得る。これは、ポリペプチドが、細胞膜に対して透過性の形態である場合、単離された細胞を、ポリペプチドに直接暴露することにより達成され得る。

【0219】

本発明のさらなる実施形態は、治療的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。通常は転写的にサイレントなHER-2sv遺伝子または下方に発現する遺伝子を含む細胞を改変するよう、相同組換えまたは他の組換え方法が使用され得る。その結果、HER-2svポリペプチドの治療有効量を発現する細胞を産生し得る。

20

【0220】

相同組み換えは、転写的に活性化遺伝子における変異を誘導または矯正するために遺伝子を標的化するためにもともと開発された技術である。Kucherlapati, 1989, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 36: 301。基本的な技術は、哺乳動物ゲノムの特定の領域に特定の变異を導入するための方法として開発された(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)か、または欠損遺伝子内の特定の变異を矯正するための方法として開発された(Doetschmanら, 1987, Nature, 330: 576-578)。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071(欧州特許第9193051号, 欧州特許第505500号; 国際特許出願PCT/US90/07642、国際公開WO91/09955)に記載されている。

30

【0221】

相同組換えにより、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、目的の遺伝子を標的化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。標的化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。標的化DNAの小片であって、ゲノムの特定の領域に相補的であるものは、DNA複製プロセスの間に親の鎖と接触するようにおかれる。これは、ハイブリダイズしてそれゆえ共通の相同領域を通じて内因性DNAの他の片と組換わるように細胞中に挿入されたDNAの一般的特性である。この相補的鎖が、変異あるい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、この相補的鎖もまた、組み換えの結果として、新たに合成される鎖へと組み込まれる。プ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機能することが可能となる。従って、移入されたDNAがゲノムに組み込まれる。

40

【0222】

50

標的化DNAのこれらの片に付着されるのは、HER-2svポリペプチドの発現と相互作用し得るかまたは制御し得るDNAの領域である（例えば、隣接配列）。例えば、プロモーター/エンハンサーの要素、サプレッサー、または外因性の転写調節要素は、意図される宿主細胞のゲノムに、所望のHER-2svポリペプチドをコードするDNAの転写に影響するに十分近位および方向において挿入される。制御要素は、宿主細胞ゲノムに存在するDNAの一部を制御する。従って、所望のHER-2svポリペプチドの発現は、HER-2sv遺伝子自身をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、むしろHER-2sv遺伝子の転写のために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調節セグメントと組み合わせられた標的化DNA（目的の内因性遺伝子と同一性の領域を含む）の使用によって達成され得る。

10

## 【0223】

例示方法において、細胞における所望される標的化遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、少なくとも制御配列、エキソンおよびスプライスドナー部位を含むDNAの、導入によって予備選択された部位において細胞ゲノム中への相同組換えを介して変更される。これらの成分は、染色体（ゲノム）DNAに、実際これが新たな転写単位の生産を生じるような様式で導入される（ここで、そのDNA構築物に存在する調節配列、エキソンおよびスプライスドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結されている）。これらの成分の染色体DNAへの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更される。

## 【0224】

20

本明細書において記載される変更された遺伝子発現は、得られた細胞において通常サイレント（発現されていない）な遺伝子を活性化すること（または発現されるように生じさせること）、ならびに得られる細胞において生理学的に有意なレベルで発現されない遺伝子の発現を増強することを包含する。この実施形態は、さらに、得られる細胞において生じる調節または導入のパターンとは異なるような調節または導入のパターンを変化させること、ならびに得られる細胞において発現される遺伝子の発現を減少させる（消去することを含む）ことを包含する。

## 【0225】

相同組換えを使用して、細胞の内因性HER-2sv遺伝子から、HER-2svポリペプチド生産を増強または生じさせ得る1つの方法は、第一に、相同組換えを用いて部位特異的組換え系からの組換え配列（例えば、Cre/loxP, FLP/FRT）（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-527; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）を、細胞の内因性ゲノムHER-2svポリペプチドコード領域の上流（すなわち5'側）に配置することを包含する。ゲノムHER-2svポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位と相同な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ともに改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼは、細胞株においてゲノムHER-2svポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置される組換え部位に、プラスミドの組換え部位を介して、プラスミドが組み込まれるようにさせる（Baubonis および Sauer, 1993, Nucleic Acids Res., 21: 2025-2029; O'Gormanら, 1991, Science, 251: 1351-1355）。転写を増強することが知られる任意の隣接配列（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、このプラスミドに適切に配置されるとき、細胞の内因性HER-2sv遺伝子から、デノボでまたは増強されたHER-2sv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組み込まれる。

30

40

## 【0226】

部位特異的組換え配列が細胞の内因性ゲノムHER-2svポリペプチドコード領域の直ぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株ゲノムにおいてその他の場所で第二の組換え部位に導入するように相同組換えを用いることである。次いで、適

50

切なりコンビナーゼ酵素は、2つの組換え部位の細胞株へと導入され、組換え事象が生じ（欠失、反転、トランスロケーション）（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-527; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）、これは、細胞の内因性のHER-2sv遺伝子からデノボのまたは増強されたHER-2sv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生じる。

#### 【0227】

細胞の内因性のHER-2sv遺伝子からのHER-2svポリペプチドの発現を増強させるためまたは生じるためのさらなるアプローチは、細胞の内因性HER-2sv遺伝子からデノボまたは増強されたHER-2svポリペプチド産生を生じるような様式で、  
10 遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増強または生じさせることおよび/または遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサー）の発現を減少させることを包含する。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された部位特異的DNA結合ドメインを含むポリペプチド）を、細胞に導入し、その結果、細胞の内因性のHER-2sv遺伝子からデノボまたは増強されたHER-2svポリペプチドの産生が、生じることを包含する。

#### 【0228】

本発明は、標的遺伝子の発現を変更する方法において有用なDNA構築物にさらに関する。特定の実施形態において、例示のDNA構築物は、（a）1つ以上の標的化配列；（b）調節配列；（c）エキソン；および（d）対でないスプライドナー部位を含む。DNA構築物における標的化配列は、エレメント（a）-（d）を細胞内の標的遺伝子に組み込み、その結果、エレメント（b）-（d）が内因性標的遺伝子の配列に作動可能に連結されるようになることを指向する。別の実施形態において、このDNA構築物は、（a）1つ以上の標的化配列、（b）調節配列、（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）スプライドアクセプター部位を含む。ここで、標的配列は、エレメント（a）-（f）を組み込んで、その結果、（b）-（f）のエレメントが内因性遺伝子に作動可能に連結されるようになる。標的化配列は、相同組換え生じる細胞の染色体DNAにおいて予備選択される部位と相同である。この構築物において、そのエキソンは、概して調節配列の3'側にあり、そしてスプライドナー部位は、エキソンの3'側にある。  
20  
30

#### 【0229】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書において提示されるHER-2svポリペプチドの核酸配列）が知られている場合、その遺伝子の選択された領域に相補的なDNAの片を合成または他の方法で入手し得る（例えば、目的の領域と境界を接する特定の認識部位で、ネイティブDNAの適切な制限による）。この片は、その細胞への挿入の際に標的化配列として作用し、そしてそのゲノム内のその相同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の片およびそれに付随する任意の他のさらなる配列は、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中に取り込まれる。従って本発明は、HER-2svポリペプチドコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る  
40

#### 【0230】

HER-2svポリペプチド細胞治療（例えば、HER-2sv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、HER-2svポリペプチドの生物学的に活性な形態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。そのようなHER-2svポリペプチド産生細胞は、HER-2sv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、あるいはそれがHER-2svポリペプチドを産生する能力が、所望のHER-2svポリペプチドをコードする遺伝子またはHER-2svポリペプチドの発現を増強する遺伝子で形質転換されることによって増強された、組換え細胞であり得る。このような改変は、その遺伝子の送達のために、ならびにその遺伝子の発  
50

現および分泌を促進するために適切なベクターの手段により達成され得る。外来種のポリペプチドの投与とともに生じ得るような、HER-2svポリペプチドが投与される患者において可能な免疫学的反応を最小化するために、HER-2svポリペプチドを産生する天然の細胞がヒト起源のものであって、そしてヒトHER-2svポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、HER-2svポリペプチドを産生する組換え細胞は、ヒトHER-2sv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。

#### 【0231】

移植された細胞は、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。ヒトまたは非ヒト動物の細胞は、HER-2sv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囲組織からの他の悪性因子による細胞の破壊を予防する生体適合性の半透過性ポリマー封入物または膜中で、患者に移植され得る。あるいは、HER-2svポリペプチドをエキソビポで産生するように形質転換された患者自身の細胞は、そのようなカプセルなしで患者に直接移植され得る。

10

#### 【0232】

生存細胞のカプセル化のための技術は、当該分野において公知であり、そして患者におけるカプセル化された細胞の調製およびそれらの移植は、慣用的に行われ得る。例えば、Baetgeら(国際公開WO95/05452;国際出願PCT/US94/09299)は、生物学的に活性な分子の有効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。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。カプセルは、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。この分子は、哺乳動物宿主中に移植される際にインビポ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。このデバイスは、レシピエント内の特定の部位に生存する細胞からの分子の送達を提供する。さらに、以下を参照のこと:米国特許第4,892,538号、同第5,011,472号および同第5,106,627号。生存する細胞をカプセル化するための系は、以下に記載される:国際公開WO91/10425(Aebischerら)。以下もまた参照のこと:国際公開WO91/10470(Aebischerら)、Winnら,Exper.Neurol.,113:322-29(1991)、Aebischerら,Exper.Neurol.,111:269-275(1991);およびTrescoら,ASAIO,38:17-23(1992)。

20

30

#### 【0233】

HER-2svポリペプチドのインビポおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた、企図される。遺伝子治療技術の一つの例は、HER-2svポリペプチドをコードするHER-2sv遺伝子(ゲノムDNA、cDNAおよび/または合成DNAのいずれか)を使用することである。この遺伝子は、構成的または誘導性のプロモーターと作動可能に連結されて、「遺伝子治療DNA構築物」を形成し得る。このプロモーターは、構築物が挿入される細胞または組織の型においてそれが活性である限り、内因性HER-2sv遺伝子に対して同種であってもよく、異種であってもよい。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組み込みのために設計されたDNA分子(例えば、相同組換えのために有用な内因性配列)、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、親の細胞よりも選択的利点を提供し得る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)、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによって発現を増強する転写因子、ならびにベクター製造を可能にする因子が挙げられる。

40

#### 【0234】

遺伝子治療DNA構築物は、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(エキソビポまたはインビポのいずれかで)に導入され得る。遺伝子治療DNA構築物を導入するための一つの手段は、本明細書において記載されるウイルスベクターの手段による。特定のベクター(例えば、レトロウイルスベクター)は、細胞の染色体DNAに

50

対してこの遺伝子治療DNA構築物を送達し、そしてその遺伝子は、染色体DNA中に組み込まれ得る。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、細胞質に残存する。

**【0235】**

さらに他の実施形態において、調節エレメントは、標的細胞中にHER-2sv遺伝子の制御された発現のために包含され得る。そのようなエレメントは、適切なエフェクターに対する応答においてスイッチオンされる。このようにして、治療ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの慣用される制御手段は、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化タンパク質）をダイマー化するための低分子ダイマー化剤またはラパ

10

**【0236】**

代替調節技術は、凝集物またはクラスターとして細胞内に目的の遺伝子から発現されるタンパク質を格納する方法を使用する。目的の遺伝子は、従来の凝集ドメインを含む誘導タンパク質として発現され、これは、小胞体内での凝集タンパク質の保持を生じる。格納されたタンパク質は、細胞内で安定かつ不活性である。しかし、そのタンパク質は、条件つき凝集ドメインを除き、それにより凝集物またはクラスターから離れて特異的に破壊する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与し、その結果そのタンパク質がその細胞から分

20

**【0237】**

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中に記載される系が挙げられるがそれらに限定されない。ミフェプリストン（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が、2つの転写因子のダイマーを形成し、次いでこれが核に入りDNAに結合することによって、転写を活性化する。このリガンド結合ドメインは、天然のリガンドへそのレセプターが結合する能力を除去するように改変

30

**【0238】**

さらに別の制御系は、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。これは、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、活性化する。次いで、このレセプターは、核に移行し、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答遺伝子からのプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するための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む。エクジソン系は、さらに、米国特許第5,514,578号、国際公開WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162で記載される。

40

**【0239】**

別の制御手段は、陽性のテトラサイクリン制御可能なトランスアクチベーターを使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された、変異されたtetリプレッサータンパク質DNA結合ドメイン（変異されたtetR-4アミノ酸変異を含み、これは、反転テトラサイクリン制御されたトランスアクチベータータンパク質を生じる。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。そのような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号および同第5,654,168号で記載されている。

**【0240】**

さらなる発現制御系および核酸構築物は、Innovir Laboratories

50

In c に対する米国特許第 5, 741, 679 号および同第 5, 834, 186 号で記載されている。

【0241】

インビボ遺伝子治療は、HER-2svポリペプチドをコードする遺伝子を、HER-2sv核酸分子の局所注入または他の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、細胞中に導入することによって行われ得る。Hef ti, Neurobiology, 25:1418-1435。例えば、HER-2svポリペプチドをコードする核酸分子は、標的化された細胞に送達するためにアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)中に含まれ得る(例えば、Johnson, 国際公開WO95/34670、国際出願PCT/US95/07178を参照)。組換えAAVゲノムは代表的に、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結された、HER-2svポリペプチドをコードするDNA配列に隣接するAAV反転末端反復を含む。

10

【0242】

代替の適切なウイルスベクターは、以下が挙げられるがそれらに限定されない：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、ラドウイルス、パラミクソウイルスおよびパピローマウイルスのベクター。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移入系を記載する。米国特許第5, 399, 346号は、インビトロで治療タンパク質をコードするDNAセグメントが挿入されるように処理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。遺伝子治療の実施のためのさらなる方法および材料は、以下に記載されている：米国特許第5, 631, 236号(これは、アデノウイルスベクターを含む)；米国特許第5, 672, 510号(これは、レトロウイルスを含む)；および米国特許第5, 635, 399号(これは、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)。

20

【0243】

非ウイルス送達方法としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：リポソーム媒介性移入、裸のDNA送達(直接注射)、レセプター媒介性移入(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)。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、部位特異的組み込みのために設計されたDNA配列、親の細胞よりも選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系(安全手段)、細胞特異的結合因子(細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子ならびにベクター製造の方法をも包含し得る。遺伝子治療技術の実施のためのそ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(これは、エレクトロポレーション技術を含む)、米国特許第5, 679, 559号(これは、遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する)、米国特許第5, 676, 954号(これは、リポソームキャリアを含む)、米国特許第5, 593, 875号(これは、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含む)、米国特許第4, 945, 050号(ここでは、生物学的に活性な粒子は、その粒子が細胞の表面に浸透し、そしてその細胞の内部へと取り込まれるようになる速度で細胞に噴霧される)、ならびに国際公開WO96/40958(核リガンドを含む)で記載される。

30

40

【0244】

HER-2sv遺伝子治療または細胞治療は、さらに同じ細胞もしくは異なる細胞における1種以上のさらなるポリペプチドの送達を含むことが、企図される。そのような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはその細胞は、単一の移植可能なデバイス(例えば、上述のカプセル化膜)中に含まれ得るか、またはその細胞はウイルスベクター手段によって別個に改変され得る。

【0245】

50

遺伝子治療を介した、細胞における内因性HER-2svポリペプチド発現を増強するための手段は、HER-2svポリペプチドプロモーター中に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る。ここで、このエンハンサーエレメントは、HER-2sv遺伝子の転写活性を増強するように働き得る。このエンハンサーエレメントは、その遺伝子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される。その組織中でのプロモーター活性化を付与することが知られるエンハンサーエレメントが選択される。例えば、HER-2svポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「スイッチオン」されるべき場合、lckプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、加えられるべき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用いてHER-2svポリペプチドプロモーターを含むDNAフラグメント中に挿入され得る（そして、必要に応じて、ベクターならびに/または5'および/もしくは3'隣接配列など中に挿入される）。次いで、「相同組換え構築物」として知られるこの構築物は、エキソビボまたはインビボでのいずれかで所望の細胞中に導入され得る。

10

#### 【0246】

遺伝子治療は、内因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HER-2svポリペプチド発現を減少するために使用され得る。そのような改変は、代表的に、相同組換え法を介して行われる。例えば、不活化することについて選択されたHER-2sv遺伝子のプロモーターのすべてまたは一部を含むDNA分子は、操作されて、転写を調節するプロモーターの片を除去および/または置き換えることができる。例えば、TATAボックスおよび/またはプロモーターの転写アクチベーターの結合部位は、標準的な分子生物学的技術を用いて欠失され得る。そのような欠失は、プロモーター活性を阻害し、それにより対応するHER-2sv遺伝子の転写を抑制することができる。プロモーターにおけるTATAボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、HER-2svポリペプチドプロモーター（制御されるべきHER-2sv遺伝子と同じまたは関連する種からの）のすべてまたは関連する部分を含むDNA構築物を作製することによって達成され得る。ここでは、TATAボックスおよび/または転写アクチベーター結合部位のヌクレオチドの1つ以上が、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ている。結果として、TATAボックスおよび/またはアクチベーター結合部位は、活性が減少しているか、または完全に不活化されている。この構築物はまた、代表的に、改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブの（内因性の）5'および3'のDNA配列に対応するDNAの少なくとも約500塩基を含み、この構築物は、直接または本明細書に記載されるウイルスベクターを介してのいずれかで、適切な細胞中に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）導入され得る。代表的に、その構築物のその細胞のゲノムDNAへの組み込みは、相同組み換えを介する。ここで、プロモーター構築物における5'および3'のDNA配列は、内因性染色体DNAに対するハイブリダイゼーションを介して改変されたプロモーター領域への組み込みを補助するように働き得る。

20

30

#### 【0247】

（15．治療的使用）

HER-2sv核酸分子、ポリペプチド、それらのアンタゴニストは、本明細書中で記載されたものを含む、多数の疾患、障害または状態の処置、診断、改善または予防するために使用され得る。

40

#### 【0248】

HER-2svポリペプチドアンタゴニストは、HER-2svポリペプチドの成熟形態の少なくとも1つの活性を減少させることにより、HER-2svポリペプチド活性を調節する分子を含む。アンタゴニストは、Her-2svペプチドと相互作用し、その結果、Her-2svポリペプチドの活性を調節するコファクター（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ンタゴニストは、所定のタンパク質の一部または全ての細胞外ドメインを含むHER-2sv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を含む。HE

50

R - 2 s v ポリペプチドの発現を調節する分子は、代表的には、発現のアンチセンスレギュレーターとして働き得る H E R - 2 s v ポリペプチドをコードする核酸を含む。

【 0 2 4 9 】

異常な H E R - 2 発現が、多数のヒトの癌（乳癌、卵巣癌、胃癌、肺癌および口腔癌を含む）において検出されたことから、H E R - 2 s v 核酸分子、ポリペプチド、およびそれらのアンタゴニストは、疾患（乳癌、卵巣癌、胃癌、肺癌および口腔癌を含む）の診断または処置において有用であり得る。H E R - 2 s v ポリペプチドを含む他のヒト癌腫は、本発明の範囲内に含まれる。

【 0 2 5 0 】

H E R - 2 s v ポリペプチド機能のアンタゴニストは、処置される状態に適合させて、1 種以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤、または化学療法薬との組み合わせで使用され得る（同時にまたは順次に）。

【 0 2 5 1 】

H E R - 2 s v ポリペプチドの望ましくないレベルに起因するまたは媒介される他の疾患または障害は、本発明の範囲内に含まれる。好ましくは、望ましくないレベルは、H E R - 2 s v ポリペプチドの過剰なレベルを含む。

【 0 2 5 2 】

（ 1 6 . H E R - 2 s v 核酸およびポリペプチドの使用 ）

本発明の核酸分子（それら自身は、生物学的に活性なポリペプチドをコードしないものを含む）は、染色体上の H E R - 2 s v 遺伝子および関連遺伝子の位置をマッピングするために使用され得る。マッピングは、当該分野において公知の技術（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。

【 0 2 5 3 】

H E R - 2 s v 核酸分子（それら自身は、生物学的に活性なポリペプチドをコードしないものを含む）は、哺乳動物の組織または体液のサンプル中での H E R - 2 s v 核酸分子の存在を、定性的にもしくは定量的に、試験するための診断アッセイにおいて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。

【 0 2 5 4 】

1 種以上の H E R - 2 s v ポリペプチドの活性を阻害することが、所望される場合、他の方法もまた、使用され得る。そのような阻害は、発現制御配列（3 重らせん構造）もしくは H E R - 2 s v m R N A に対し相補的であり、ハイブリダイズする核酸分子によって、影響され得る。例えば、H E R - 2 s v 遺伝子の少なくとも 1 部と相補的な配列を有するアンチセンス D N A 分子またはアンチセンス R N A 分子は、細胞へ導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中で開示されている H E R - 2 s v 遺伝子の配列を使用した利用可能な技術によって設計され得る。代表的に、そのようなアンチセンス分子各々は、選択された H E R - 2 s v 遺伝子各々の出発部位（5 ' 末端）に対して相補的である。次いで、アンチセンス分子が、対応する H E R - 2 s v m R N A にハイブリダイズする場合、この m R N A の翻訳は、妨げられるもしくは減少させられる。アンチセンスインヒビターは、細胞または器官における H E R - 2 s v ポリペプチドの減少または欠損に関する情報を提供する。

【 0 2 5 5 】

あるいは、遺伝子治療は、1 種以上の H E R - 2 s v 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するために使用され得る。この場合、選択された H E R - 2 s v ポリペプチドの各々の変異体ポリペプチドをコードする D N A は、調製され、本明細書中で記載されるように、ウイルス方法または非ウイルス方法のいずれかを使用して、患者の細胞へと導入され得る。そのような変異体の各々は、代表的に生物学的役割において、内因性のポリペプチドと競合するように設計される。

【 0 2 5 6 】

さらに、生物学的に活性か活性でないかに関わらず、H E R - 2 s v ポリペプチドは、免疫原（少なくとも 1 つのエピトープを含むポリペプチドであり、このエピトープに対し

10

20

30

40

50

て抗体は惹起させられ得る)として使用され得る。HER-2svポリペプチドに結合する選択的結合因子(本明細書中で記載するように)は、インビボおよびインビトロでの診断目的に使用され得る。これには、体液サンプルまたは細胞サンプル中のHER-2svポリペプチドの存在を検出するための標識化された形態での使用が挙げられるが、これに限定されない。本明細書中で列挙したものを含む、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抗体もまた使用され得る。抗体は、HER-2svポリペプチドの少なくとも1つの活性の特徴を減少または妨げるために、HER-2svポリペプチドに結合し得る。もしくは、抗体は、HER-2svポリペプチドの少なくとも1つの活性の特徴を増加させるために(HER-2svポリペプチドの薬物動態を上昇させることが含まれる)、ポリペプチドに結合し得る。

10

## 【0257】

本発明のヒトHER-2sv核酸はまた、対応する染色体HER-2svポリペプチド遺伝子を単離するために有用な道具である。ヒトHER-2svゲノムDNAは、遺伝性の組織変性疾患を同定するために、使用され得る。

## 【0258】

以下の実施例は、説明目的のみを意図するのであって、本発明の範囲を制限するとしていかなるようにも解釈されるべきでない。

## 【0259】

(実施例1:HER-2スプライス改変体のクローニング)

一般的に、Sambrookら、前出において記載されるような材料および方法を、ラットHER-2svポリペプチドをコードする遺伝子のクローニングおよび分析に使用した。

20

## 【0260】

HER-2スプライス改変体cDNA配列を単離するために、アンプリマー2771-31(5'-C-G-G-T-C-G-A-C-G-A-G-C-T-C-G-A-G-G-G-T-C-3';配列番号14)およびアンプリマー2771-33(5'-C-A-G-T-C-T-C-C-G-C-A-T-C-G-T-G-T-A-C-T-T-C-C-G-3';配列番号15)を使用したPCRによって所有のヒト組織cDNAライブラリをスクリーニングした。PCR増幅は、50μlの最終容量中で100ngのヒト組織cDNAテンプレート、10ngのClontech MarathonヒトcDNAテンプレート、または10ngのClontech Marathonヒト異種移植片cDNAテンプレートのいずれか;10pmolのアンプリマー;Advantage-HF2 PCRキット(Clontech);および2μlのGC-Melt(Clontech)を使用して調製された。反応は、94で2分間を1サイクル;94で30秒間、65で30秒間および72で3分間を40サイクル、次いで72で7分間を1サイクルで実行した。

30

## 【0261】

この第1のPCRにより産生される生成物を第1のPCRからの生成物を1mlおよびアンプリマー2771-32(5'-G-A-G-C-C-G-C-A-G-T-G-A-G-C-A-C-C-A-T-G-G-A-G-3';配列番号16)ならびにアンプリマー2771-34(5'-G-C-T-G-C-C-G-T-C-G-C-T-T-G-A-T-G-A-G-G-A-T-C-3';配列番号17)、そして最初のPCRにおいて使用された同じ条件を使用したネスト化されたPCR増幅において再び増幅した。ネスト化されたPCR増幅において産生されたPCR生成物をゲル電気泳動により分析した。以下のcDNAライブラリにおいて種々の大きさの産物が検出された:胎児胃、胎児脾臓、胎児腎臓、胎児肺、胎児心臓、子宮、精巣、胎盤、胎児頭皮、胎児頭蓋冠、脊柱、気管、肺腫瘍、T1543乳腫瘍、卵巣腫瘍、結腸腫瘍、前立腺腫瘍、胎児の小腸、および、単核循環リンパ球。これら、生成物を、ベクターpGEM-T EASYに結合し、E.coliを形質転換するために使用した。プラスミドDNAを各々の形質転換から単離された6個の個々のコロニーから単離し、その挿入物の配列を決定した。

40

50

## 【0262】

PCRスクリーニングにおいて、HER-2レセプターチロシキナーゼ遺伝子の細胞外ドメインの5種のスプライス改変体が、同定された。図6A~6Cは、ヒトHER-2(配列番号11)の細胞外部分のアミノ酸配列アラインメントおよび5種のスプライス改変体によってコードされているポリペプチドを描写する。これら、スプライス改変体は、HER-2sv形態97(配列番号4)、HER-2sv184(配列番号10)、HER-2sv119(配列番号6)、HER-2sv68(配列番号2)、およびHER-2sv156(配列番号8)を含んでいた。

## 【0263】

図7は、HER-2sv遺伝子およびヒトHER-2sv形態119、184、97、68、156の細胞外ドメインの公知の形態の構造の概略図を示す。HER-2sv細胞外ドメインの公知の形態は、17のエキソンからなる。構造的に、2つのLレセプタードメイン、フリン様ドメイン、および膜貫通ドメインを有する。レセプターLドメインはリガンド結合ドメインである。そのようなドメインの各々は、1本鎖右手ヘリックスからなる。フリン様ドメインは、シグナル伝達に関わる種々のタンパク質において見出されるシステインリッチ領域である。

10

## 【0264】

HER-2sv形態119において、HER-2sv細胞外ドメインの公知の形態のエキソン9とエキソン10との間のさらなるエキソンは、さらなる39アミノ酸をコードする。このさらなる配列は、HER-2の第2のLドメインを妨害する。形態119の配列は、頭皮cDNAライブラリにおいて検出された。

20

## 【0265】

HER-2sv形態184において、HER-2sv細胞外ドメインの公知の形態のエキソン14とエキソン15との間のさらなるエキソンは、さらなる34アミノ酸をコードする。このさらなる配列は、HER-2のLドメインまたはフリン様ドメインを妨害しない。形態184の配列は、気管cDNAライブラリにおいて検出された。

## 【0266】

HER-2sv形態97は、HER-2sv細胞外ドメインの公知の形態のエキソン16を欠いている。エキソン16の欠損は、HER-2のLドメインまたはフリン様ドメインを妨害しない。形態97の配列は、頭蓋冠cDNAと気管cDNAライブラリとの両方で検出された。

30

## 【0267】

HER-2sv形態68は、HER-2sv細胞外ドメインの公知の形態のエキソン7およびエキソン12内に異常なスプライシング部位を有し、187アミノ酸の欠損を生じる。HER-2のこの部分の欠損は、フリン様ドメインのほとんど、および第2のレセプターLドメインのほとんどを除去する。形態68の配列は、胎児腎臓のcDNAライブラリ、精巣のcDNAライブラリ、結腸腫瘍のcDNAライブラリ、およびT1543乳癌のcDNAライブラリにおいて検出された。

## 【0268】

HER-2sv形態156は、HER-2細胞外ドメインの公知の形態のエキソン4およびエキソン15内に異常なスプライシング部位を有し、187アミノ酸の欠損を生じる。エキソン4における異常なスプライシング部位は、フレームシフトおよび成熟前終止コドンをもたらす。このスプライス改変体は、フリン様ドメインと第2のレセプターLドメインとの両方を欠く。形態156の配列は、T1543乳癌のcDNAライブラリにおいて検出された。

40

## 【0269】

(実施例2: HER-2sv mRNA発現)

HER-2sv mRNAの発現は、ノーザンブロット分析によって検査された。多数のヒト組織ノーザンブロット(Colontech)をヒトHER-2svポリペプチドcDNAクローンから単離された適切な制限フラグメントで調べる。プローブを標準的な

50

技術を使用して<sup>32</sup>P-dCTPで標識する。

【0270】

ノーザンブロットを、42℃で2時間、ハイブリダイゼーション溶液中(5X SSC, 50%脱イオン化ホルムアミド、5X Denhardt溶液、0.5% SDSおよび100mg/ml変性サケ精子DNA)でプレハイブリダイズし、水で、42℃で一晩、1ng/mlの標識されたプローブを含む新しいハイブリダイゼーション溶液中でハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション後、フィルターを室温で10分間、0.1% SDSを含む2xSSC中で2回洗浄し、次いで、65℃で30分間0.1% SDSを含む0.2xSSC中で2回洗浄した。そして、ブロットを、オートラジオグラフィーに暴露する。

10

【0271】

HER-2sv 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る。正常な胚組織およびマウスの成体組織のパネルを、4%のパラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン中に包埋し、5μmで切り出す。切り出された組織は、0.2M HCl中で透過処理され、プロテイナーゼKで切断し、トリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化する。切片を60℃で1時間、ハイブリダイゼーション溶液中(300mM HCl、20mM Tris-HCl(pH8.0)、5mM EDTA、1X Denhardt溶液、0.2% SDS、10mM DTT、0.25mg/ml tRNA、25μg/ml polyA、25μg/ml polyCおよび50%ホルムアミド)でプレハイブリダイズする。次いで、60℃で一晩、10%デキストランおよび2x10<sup>4</sup>cpm/μlのヒトHER-2sv遺伝子に対して相補的な<sup>32</sup>P-標識化アンチセンスリボプローブを含む同じ溶液中でハイブリダイズする。リボプローブは、標準的な技術を使用した、ヒトHER-2sv cDNA配列を含むクローンのインビトロでの転写によって得る。

20

【0272】

ハイブリダイゼーションの後、切片をハイブリダイゼーション溶液中でリンスし、ハイブリダイズしなかったプロ-ズを背一断するためにRNaseAで処理し、次いで、55℃で30分間、0.1X SSC中で洗浄する。そして、切片を、NTB-2エマルジョン(Kodak, Rochester, NY)中に浸し、4℃で3週間、露光し、現像し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色した。組織形態学およびハイブリダイゼーションシグナルを、脳(1つの矢状切片2つの冠状切片)、消化管(食道、胃、十二指腸、回腸、近位結腸および遠位結腸)、下垂体、肝臓、肺、心臓、脾臓、胸腺、リンパ節、腎臓、副腎、膀胱、膵臓、唾液腺、オスおよびメスの生殖器官(メスにおける卵巣、卵管および子宮;ならびにオスにおける精巣、精巣上体、前立腺、精囊、および輸精管)、BATおよびWAT(皮下、表皮)、骨(大腿骨)、皮膚、乳、および骨格筋に対するダークフィールド(darkfield)および標準的なイルミネーション(illumination)によって同時に分析する。

30

【0273】

(実施例3:HER-2svポリペプチドの産生)

(A.細菌におけるHER-2svポリペプチドの発現)

PCRを用いて、HER-2sv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産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。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配列決定に供して挿入物の存在を確認

40

50

する。

【0274】

形質転換した宿主細胞を、誘導前に、30 g/mLカナマイシンを含有する2×YT培地中、30 でインキュベートする。N-(3-オキソヘキサノイル)-dL-ホモセリンラク톤の最終濃度の30 ng/mLまでの添加、それに続く30 かまたは37 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。HER-2svポリペプチドの発現を、細菌ペレットの培養物、再懸濁物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。

【0275】

HER-2sv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にし、そして水に再懸濁する。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。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、0.15M NaCl)中でホモジナイズし、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。

【0276】

E.coliが産生したHER-2sv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、J.Biol.Chem.262:10~35(1987)に記載のように決定する。

【0277】

(B.哺乳動物細胞におけるHER-2svポリペプチドの発現)

PCRを用いて、HER-2sv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。5'および3'末端に対応するプライマー配列は上述される。増幅したDNA産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。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。Epstein-Barrウイルス複製起点を含む代表的な発現ベクターであるpCEP4(Invitrogen, Carlsbad, CA)を、293-EBNA-1(Epstein-Barrウイルス核抗原)細胞におけるHER-2svの発現のために用い得る。増幅およびゲル精製したPCR産物を、pCEP4ベクターに連結し、そしてリポフェクチンによって293-EBNA細胞中に導入する。トランスフェクトした細胞を、100g/mLのハイグロマイシン中で選択し、そして得られた薬物耐性培養物をコンフルエンスになるまで増殖する。次いで、この細胞を無血清培地中で72時間培養する。馴化培地を取り出し、HER-2svポリペプチド発現をSDS-PAGEによって分析する。

【0278】

HER-2svポリペプチド発現は、銀染色によって検出し得る。あるいは、HER-2svポリペプチドを、タグペプチドに対する抗体を用いるウエスタンブロット分析によって検出可能である、エピトープタグ(例えば、IgG定常ドメインまたはFLAGエピトープ)を有する融合タンパク質として生成する。

【0279】

HER-2svポリペプチドを、SDS-ポリアクリルアミドゲルから切り出し得る、またはHER-2sv融合タンパク質を、エピトープタグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして本明細書に記載のようなN末端アミノ酸配列分析に供する。

【0280】

10

20

30

40

50

(C. 哺乳動物細胞におけるHER-2svポリペプチドの発現および精製)

HER-2svポリペプチド発現構築物は、リポフェクションプロトコルまたはリン酸カルシウムプロコルのいずれかを用いて293 EBNAまたはCHO細胞に導入される。

【0281】

産生されるHER-2svポリペプチドでの機能的研究を実施するために、ハイグロマイシンで選択された293 EBNAクローンのプールから大量の調製された条件培地が産生される。培地を収集する1週間前に血清を含まない培地へと変える以前に、細胞を500 cm Nunc Triple Flask中で80%のコンフルーエンスになるまで培養する。条件培地は、収集され、精製まで-20 で凍結される。

10

【0282】

以下に記載するように、条件培地を親和性クロマトグラフィーによって精製する。培地を解凍し、次いで0.2 μmフィルターに通す。タンパク質Gカラムを、PBS (pH 7.0)で平衡化し、次いでろ過した培地で充填する。カラムをA<sub>280</sub>での吸収がベースラインに到達するまでPBSで洗浄する。HER-2svポリペプチドを0.1 M Glycine-HCl (pH 2.7)でカラムから溶出し、そして直ぐに1 M Tris-HCl (pH 8.5)で中性化する。HER-2svポリペプチドを含む画分を、プールし、PBS中で透析し、さらに-70 で保存する。

【0283】

ヒトHER-2svポリペプチド-Fc融合ポリペプチドの第Xa因子切断のために、アフィニティークロマトグラフィーで精製されたタンパク質を50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、2 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8.0)中で透析する。制限プロテアーゼ第Xa因子を透析されたタンパク質に1/100 (重量/重量)で加え、室温で一晩、サンプルを消化する。

20

【0284】

(実施例4: 抗HER2-svポリペプチド抗体の産生)

Her-2svポリペプチドに対する抗体は、精製されたタンパク質または生物学的合成もしくは化学的合成により産生されたHER-2svタンパク質で免疫することによって得られ得る。抗体を産生するための適切な手順には、HudsonおよびBay, Practical Immunology (第2版、Blackwell Scientific Publications)で記載されているものが挙げられる。

30

【0285】

抗体産生の1つの手順では、動物(代表的には、マウスまたはウサギ)をHer-2sv抗原(例えば、Her-2svポリペプチド)で注射し、そしてELISAによって決定されるように十分に血清力価レベルを有する動物をハイブリドーマ産生のために選択する。免疫された動物の脾臓を収集し、単一細胞懸濁液として調製する。単一細胞懸濁液から、脾細胞を回収する。脾細胞を、マウスの骨髄細胞(例えば、Sp2/0-Ag14細胞)へと融合し、まず200 U/mLペニシリン、200 μg/mL硫酸ストレプトマイシン、および4 mMグルタミンを含むDMEM中でインキュベートし、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。選択の後、各融合ウェルから組織培養懸濁液から取り出し、抗HER-2sv抗体産生のためにELISAによって試験をする。

40

【0286】

抗HER-2sv抗体を得るための代替的な手順もまた使用され得る。例えば、ヒト抗体産生のためのヒトIg遺伝子座を有する遺伝子組換えマウスの免疫、および合成抗体ライブラリのスクリーニング(例えば、抗体可変ドメインの突然変異により産生されたもの)。

【0287】

(実施例5: 遺伝子組換えマウスでのHER-2svポリペプチドの発現)

HER-2svポリペプチドの生物学的活性を評価するために、肝臓特異的ApoE

50

ロモーターの制御下にあるHER-2svポリペプチド/Fc融合タンパク質を含む構築物が調製される。この構築物の送達は、Her-2svポリペプチドの機能にとって有益な情報となる病理学的変化を生じると期待される。同様に、アクチンプロモーターの制御下にあるHER-2svポリペプチド全長を含む構築物が調製される。この構築物の送達により、普遍的発現が生じるものと考えられる。

#### 【0288】

これらの構築物を産生するために、HER-2svポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅するようPCRを使用する。このPCRには、所望する配列の5'末端および3'末端に対応し、増幅された生成物を発現ベクターへと挿入することを可能にするよう制限酵素部位を組み入れたプライマーを使用する。増幅の後、PCR産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、標準的な組換えDNA技術を用いて発現ベクターに結合した。例えば、Grahamら, 1997, Nature Genetics, 17: 272-74およびRayら, Genes Dev. 5: 2265-73で記載されているように、増幅されたHER2-svポリペプチド配列は、ヒトアクチンプロモーターの制御下でクローニングされ得る。

10

#### 【0289】

結合の後、反応混合物をエレクトロポレーションによる大腸菌の形質転換のために使用し、形質転換体を薬物抵抗性に対して選択する。選択されたコロニー由来のプラスミドベクターを単離し、適切な挿入断片の存在および変異が無いことを確認するためにDNA配列決定に供する。HER-2sv発現ベクターを2回のCsCl密度勾配遠心を介して精製し、適切な制限酵素で切断し、そしてHER-2svポリペプチド導入遺伝子を含む直線的なフラグメントをゲル電気泳動によって精製する。精製されたフラグメントを5mM Tris (pH 7.4) および0.2mM EDTA に濃度2mg/mLで最懸濁する。

20

#### 【0290】

BDF1 x BDF1 支給マウス由来の単細胞胚を記載されているように(国際公開WO 97/23614)注射する。CO<sub>2</sub> 培養器において一晚、胚を培養し、15~20個の2細胞胚を偽妊娠のCD1メスマウスの卵管へと移す。微量注入された胚の移植から得られた子孫を、以下に示すようにゲノムDNAサンプル中の組み込まれた導入遺伝子のPCR増幅によってスクリーニングする。耳の一部が、55 で一晚、20mLの耳緩衝液(20mM Tris (pH 8.0)、10mM EDTA、0.5% SDS、および500mg/mLプロテイナーゼK)中で消化する。次いで、サンプルを200mLのTEで希釈し、2mLの耳のサンプルを適切なプライマーを用いたPCR反応に使用する。

30

#### 【0291】

8週齢で、遺伝子組換え創始動物およびコントロール動物を、犬歯および病理学の分析のために屠殺する。脾臓の一部を除去し、Total RNA Extraction Kit (Qiagen)を用いて脾臓から総細胞RNAを単離し、そしてRT-PCRにより導入遺伝子の発現を決定する。以下に示すように、脾臓から回収されたRNAを、SuperScript<sup>TM</sup> Preamplification System (Gibco-BRL)を用いてcDNAに変換する。発現ベクターの配列内およびHER-2svポリペプチド導入遺伝子の3'に位置する適切なプライマーを、導入遺伝子の転写物からcDNA合成を開始するために使用する。70 で10分間、遺伝子組換え創始動物およびコントロール由来の総脾臓RNAの10mgを1mMのプライマーと共にインキュベートする。次いで、反応に10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、10mMの各dNTP、0.1mM DTT、および200UのSuperScript II逆転写酵素を補う。42 で50分間インキュベートした後、72 で15分間、加熱することで反応を止め、さらに37 で20分間、2UのRNAase Hで消化する。次いで、サンプルをHER-2svポリペプチドに対する特異的なプライマーを用いたPCRにより増幅する。

40

#### 【0292】

50

(実施例6：組換えマウスにおけるHER-2svポリペプチドの生物学的活性)

安楽死の前に、組換え動物の重さを量り、イソフルランにより麻酔をし、そして心臓穿刺により採血する。サンプルを血液学分析および血清化学分析に供する。全採血終了の後、X線撮影を行う。総解剖において、主な内臓器官は、重量分析に供される。

【0293】

総解剖の後、組織(すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、全体的な消化管、腎臓、生殖器、皮膚および乳房、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ球および骨格筋)を除去し、組織学的な分析のために10%緩衝化Znホルマリンで固定する。

【0294】

組換えマウスとコントロールマウスとの両方の脾臓、リンパ球、およびバイエル板を、以下のように、B細胞およびT細胞特異的な抗体と共に免疫組織学の分析に供する。ホルマリン固定されたパラフィン包埋切片を、脱パラフィン化し、脱イオン水中で水分補給する。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、さらに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。抗体結合をビオチン標識したラビットの抗ラット免疫グロブリンおよび色素であるDAB (BioTek, Santa Barbara, CA)を伴うペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン (Biogenex, San Ramon, CA)により検出する。切片をヘマトキシリンで対比染色する。

【0295】

検死の後、MLN、および組換え動物ならびにコントロールの同原仔の脾臓の切片ならびに胸腺の切片を除去する。単一細胞懸濁液を、100mmナイロン細胞ろ過器 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)に対して、シリンジの平らな端で組織を優しく粉碎することにより調製する。細胞を2回洗浄し、数え、次いで各組織由来の約 $1 \times 10^6$ 細胞を10分間、20 $\mu$ Lの容積中0.5 $\mu$ g CD16/32 (Fc III/II) Fcブロックと共にインキュベートする。次いで、2~8で30分間、CD90.2 (Thy-1.2)、CD45R (B220)、CD11b (Mac-1)、Gr-1、CD4またはCD (PharMingen, San Diego, CA)に対する0.5 $\mu$ gのFITCもしくはPE結合モノクローナル抗体の抗体を含む100 $\mu$ L容積のPBS (Ca<sup>+</sup>およびMg<sup>+</sup>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サンプルを染色する。抗体結合の後、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り分析する。

【0296】

本発明は好ましい実施形態の面から説明されたが、当業者により変更および改良が加えられることが理解される。従って、添付の特許請求の範囲は、本発明の範囲内で生じる全てのこのような等価な改良を網羅することを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0297】

【図1A】図1A-1Cは、ヒトHER-2sv形態68遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)およびヒトHER-2sv形態68ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図1B】図1A-1Cは、ヒトHER-2sv形態68遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)およびヒトHER-2sv形態68ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図1C】図1A-1Cは、ヒトHER-2sv形態68遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)およびヒトHER-2sv形態68ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図2A】図2A-2Dは、ヒトHER-2sv形態97遺伝子のヌクレオチド配列(配

10

20

30

40

50

列番号3)およびヒトHER-2sv形態97ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図2B】図2A-2Dは、ヒトHER-2sv形態97遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号3)およびヒトHER-2sv形態97ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図2C】図2A-2Dは、ヒトHER-2sv形態97遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号3)およびヒトHER-2sv形態97ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図2D】図2A-2Dは、ヒトHER-2sv形態97遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号3)およびヒトHER-2sv形態97ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

10

【図3A】図3A~3Dは、ヒトHER-2sv形態119遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号5)およびヒトHER-2sv形態119ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号6)を示す。

【図3B】図3A~3Dは、ヒトHER-2sv形態119遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号5)およびヒトHER-2sv形態119ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号6)を示す。

【図3C】図3A~3Dは、ヒトHER-2sv形態119遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号5)およびヒトHER-2sv形態119ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号6)を示す。

20

【図3D】図3A~3Dは、ヒトHER-2sv形態119遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号5)およびヒトHER-2sv形態119ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号6)を示す。

【図4】図4は、ヒトHER-2sv形態156遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号7)およびヒトHER-2sv形態156ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号8)を示す。

【図5A】図5A~5Dは、ヒトHER-2sv形態184遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号9)およびヒトHER-2sv形態184ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号10)を示す。

【図5B】図5A~5Dは、ヒトHER-2sv形態184遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号9)およびヒトHER-2sv形態184ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号10)を示す。

30

【図5C】図5A~5Dは、ヒトHER-2sv形態184遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号9)およびヒトHER-2sv形態184ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号10)を示す。

【図5D】図5A~5Dは、ヒトHER-2sv形態184遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号9)およびヒトHER-2sv形態184ポリペプチドの推測されるアミノ酸配列(配列番号10)を示す。

【図6A】図6A~6Cは、ヒトHER-2svの細胞外部分のアミノ酸配列整列(配列番号11)およびヒトHER-2sv形態97(配列番号4)、184(配列番号10)、119(配列番号6)、68(配列番号2)、および156(配列番号8)の細胞外部分のアミノ酸配列整列を示す。

40

【図6B】図6A~6Cは、ヒトHER-2svの細胞外部分のアミノ酸配列整列(配列番号11)およびヒトHER-2sv形態97(配列番号4)、184(配列番号10)、119(配列番号6)、68(配列番号2)、および156(配列番号8)の細胞外部分のアミノ酸配列整列を示す。

【図6C】図6A~6Cは、ヒトHER-2svの細胞外部分のアミノ酸配列整列(配列番号11)およびヒトHER-2sv形態97(配列番号4)、184(配列番号10)、119(配列番号6)、68(配列番号2)、および156(配列番号8)の細胞外部分のアミノ酸配列整列を示す。

50

【図7】図7は、HER-2遺伝子およびヒトHER-2sv形態119、184、97、68および156の細胞外ドメインの既知の形態構造の概略図である。HER-2遺伝子の細胞外ドメイン中の機能的ドメイン(2つのL-ドメインおよび1つのフリン様ドメイン)を示す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Jing, Shuqian  
Tatarewicz, Suzanna

<120> HER-2 Receptor Tyrosine Kinase Molecules and Uses  
Thereof 10

<130> 01-1624-B

<140>

<141>

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1479

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS 20

<222> (1)..(1479)

<400> 1

atg gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc ctc ctc gcc ctc ttg	48
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu	
1 5 10 15	
ccc ccc gga gcc gcg agc acc caa gtg tgc acc ggc aca gac atg aag	96
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys	
20 25 30	
ctg cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg gac atg ctc cgc cac	144
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His	
35 40 45	
ctc tac cag ggc tgc cag gtg gtg cag gga aac ctg gaa ctc acc tac	192
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr	
50 55 60	
ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat atc cag gag gtg	240
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val	
65 70 75 80	
cag ggc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg agg cag gtc cca ctg	288
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu	
85 90 95	
cag agg ctg cgg att gtg cga ggc acc cag ctc ttt gag gac aac tat	336
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr	
100 105 110	
gcc ctg gcc gtg cta gac aat gga gac cgg ctg aac aat acc acc cct	384
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro	
115 120 125	
gtc aca ggg gcc tcc cca gga ggc ctg cgg gag ctg cag ctt cga agc	432
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser	

30

40

130	135	140		
ctc aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc cag cgg aac ccc cag			480	
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln				
145	150	155	160	
ctc tgc tac cag gac acg att ttg tgg aag gac atc ttc cac aag aac			528	
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn				
	165	170	175	
aac cag ctg gct ctc aca ctg ata gac acc aac cgc tct cgg gcc tgc			576	
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys				
	180	185	190	
cac ccc tgt tct ctg atg tgt aag ggc tcc cgc tgc tgg gga gag agt			624	10
His Pro Cys Ser Leu Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser				
	195	200	205	
tct gag gat tgt cag agc ctg acg cgc act gtc tgt gcc ggt ggc tgt			672	
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys				
	210	215	220	
gcc cgc tgc aag ggg cca ctg ccc act gac tgc tgc cat gag cag tgt			720	
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys				
	225	230	235	240
gct gcc ggc tgc acg ggc ccc aag cac tct gac tgc ctg gcc tgc ctc			768	
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu				
	245	250	255	
cac ttc aac cac agt ggc atc agc tgg ctg ggg ctg cgc tca ctg agg			816	20
His Phe Asn His Ser Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg				
	260	265	270	
gaa ctg ggc agt gga ctg gcc ctc atc cac cat aac acc cac ctc tgc			864	
Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys				
	275	280	285	
ttc gtg cac acg gtg ccc tgg gac cag ctc ttt cgg aac ccg cac caa			912	
Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln				
	290	295	300	
gct ctg ctc cac act gcc aac cgg cca gag gac gag tgt gtg ggc gag			960	
Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu				
	305	310	315	320
ggc ctg gcc tgc cac cag ctg tgc gcc cga ggg cac tgc tgg ggt cca			1008	30
Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro				
	325	330	335	
ggg ccc acc cag tgt gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg ggc cag gag			1056	
Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu				
	340	345	350	
tgc gtg gag gaa tgc cga gta ctg cag ggg ctc ccc agg gag tat gtg			1104	
Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val				
	355	360	365	
aat gcc agg cac tgt ttg ccg tgc cac cct gag tgt cag ccc cag aat			1152	
Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn				
	370	375	380	40

ggc tca gtg acc tgt tnn gga ccg gag gct gac cag tgt gtg gcc tgt 1200  
 Gly Ser Val Thr Cys Xaa Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys  
 385 390 395 400

gcc cac tat aag gac cct ccc ttc tgc gtg gcc cgc tgc ccc agc ggt 1248  
 Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly  
 405 410 415

gtg aaa cct gac ctc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca gat gag 1296  
 Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu  
 420 425 430

gag ggc gca tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc tgt gtg 1344  
 Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val  
 435 440 445

gac ctg gat gac aag ggc tgc ccc gcc gag cag aga gcc agc cct ctg 1392  
 Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu  
 450 455 460

acg tcc atc atc tct gcg gtg gtt ggc att ctg ctg gtc gtg gtc ttg 1440  
 Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu  
 465 470 475 480

ggg gtg gtc ttt ggg atc ctc atc aag cga cgg cag caa 1479  
 Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln  
 485 490

<210> 2  
 <211> 493  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
 20 25 30  
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
 35 40 45  
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
 50 55 60  
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
 65 70 75 80  
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu  
 85 90 95  
 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr  
 100 105 110  
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro  
 115 120 125  
 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser

10

20

30

40

130	135	140	
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln			
145	150	155	160
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn			
	165	170	175
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys			
	180	185	190
His Pro Cys Ser Leu Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser			
	195	200	205
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys			
	210	215	220
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys			
225	230	235	240
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu			
	245	250	255
His Phe Asn His Ser Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg			
	260	265	270
Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys			
	275	280	285
Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln			
	290	295	300
Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu			
305	310	315	320
Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro			
	325	330	335
Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu			
	340	345	350
Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val			
	355	360	365
Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn			
	370	375	380
Gly Ser Val Thr Cys Xaa Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys			
385	390	395	400
Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly			
	405	410	415
Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu			
	420	425	430
Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val			
	435	440	445
Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu			
	450	455	460

10

20

30

40

Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu  
465 470 475 480

Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln  
485 490

<210> 3  
<211> 2132  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (78)..(2132)

10

<400> 3  
acgcggttggg agctctccca tatggctgac ctgcaggcgg ccgcgaattc actagtgatt 60  
gagccgcagtg gagcacc atg gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc 110  
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu  
1 5 10  
ctc ctc gcc ctc ttg ccc ccc gga gcc gcg agc acc caa gtg tgc acc 158  
Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr  
15 20 25  
ggc aca gac atg aag ctg egg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg 206  
Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu  
30 35 40  
gac atg ctc cgc cac ctc tac cag gcc tgc cag gtg gtg cag gga aac 254  
Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn  
45 50 55  
ctg gaa ctc acc tac ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag 302  
Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln  
60 65 70 75  
gat atc cag gag gtg cag gcc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg 350  
Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val  
80 85 90  
agg cag gtc cca ctg cag agg ctg egg att gtg cga ggc acc cag ctc 398  
Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu  
95 100 105  
ttt gag gac aac tat gcc ctg gcc gtg cta gac aat gga gac ccg ctg 446  
Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu  
110 115 120  
aac aat acc acc cct gtc aca ggg gcc tcc cca gga ggc ctg cgg gag 494  
Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu  
125 130 135  
ctg cag ctt cga agc ctc aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc 542  
Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile  
140 145 150 155  
cag cgg aac ccc cag ctc tgc tac cag gac acg att ttg tgg aag gac 590

20

30

40



400	405	410		
atc tca gca tgg cgg gac agc ctg cct gac ctc agc gtc ttc cag aac			1358	
Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn				
415	420	425		
ctg caa gta atc cgg gga cga att ctg cac aat ggc gcc tac tcg ctg			1406	
Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu				
430	435	440		
acc ctg caa ggg ctg ggc atc agc tgg ctg ggg ctg cgc tca ctg agg			1454	
Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg				
445	450	455		
gaa ctg ggc agt gga ctg gcc ctc atc cac cat aac acc cac ctc tgc			1502	10
Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys				
460	465	470		
ttc gtg cac acg gtg ccc tgg gac cag ctc ttt cgg aac ccg cac caa			1550	
Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln				
480	485	490		
gct ctg ctc cac act gcc aac cgg cca gag gac gag tgt gtg ggc gag			1598	
Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu				
495	500	505		
ggc ctg gcc tgc cac cag ctg tgc gcc cga ggg cac tgc tgg ggt cca			1646	
Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro				
510	515	520		
ggg ccc acc cag tgt gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg ggc cag gag			1694	20
Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu				
525	530	535		
tgc gtg gag gaa tgc cga gta ctg cag ggg ctc ccc agg gag tat gtg			1742	
Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val				
540	545	550		
aat gcc agg cac tgt ttg ccg tgc cac cct gag tgt cag ccc cag aat			1790	
Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn				
560	565	570		
ggc tca gtg acc tgt ttt gga ccg gag gct gac cag tgt gtg gcc tgt			1838	
Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys				
575	580	585		
gcc cac tat aag gac cct ccc ttc tgc gtg gcc cgc tgc ccc agc ggt			1886	30
Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly				
590	595	600		
gtg aaa cct gac ctc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca gat gag			1934	
Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu				
605	610	615		
gag ggc gca tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc cct ctg			1982	
Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Pro Leu				
620	625	630		
acg tcc atc gtc tct gcg gtg gtt ggc att ctg ctg gtc gtg gtc ttg			2030	
Thr Ser Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu				
640	645	650		40

ggg gtg gtc ttt ggg atc ctc atc aag cga cgg cag caa tcg aat tcc 2078  
 Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Ser Asn Ser  
 655 660 665  
  
 cgc ggc cgc cat ggc ggc cgg gag cat gcg acg tcg ggc cca att cgc 2126  
 Arg Gly Arg His Gly Gly Arg Glu His Ala Thr Ser Gly Pro Ile Arg  
 670 675 680  
  
 cct ata 2132  
 Pro Ile  
 685

<210> 4  
 <211> 685  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 4  
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
 1 5 10 15  
  
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
 20 25 30  
  
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
 35 40 45  
  
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
 50 55 60  
  
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
 65 70 75 80  
  
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu  
 85 90 95  
  
 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr  
 100 105 110  
  
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro  
 115 120 125  
  
 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser  
 130 135 140  
  
 Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln  
 145 150 155 160  
  
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn  
 165 170 175  
  
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys  
 180 185 190  
  
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser  
 195 200 205  
  
 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys  
 210 215 220

20

30

40

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys  
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu  
 245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val  
 260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg  
 275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu  
 290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln  
 305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys  
 325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu  
 340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys  
 355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp  
 370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe  
 385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro  
 405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg  
 420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu  
 435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly  
 450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val  
 465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr  
 485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His  
 500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys  
 515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys  
 530 535 540

10

20

30

40

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys  
545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys  
565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp  
580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu  
595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln  
610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser  
625 630 635 640

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly  
645 650 655

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Ser Asn Ser Arg Gly Arg His Gly  
660 665 670

Gly Arg Glu His Ala Thr Ser Gly Pro Ile Arg Pro Ile  
675 680 685

10

<210> 5  
<211> 2164  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

20

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(2160)

<400> 5  
atg gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc ctc ctc gcc ctc ttg 48  
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
1 5 10 15

ccc ccc gga gcc gcg agc acc caa gtg tgc acc ggc aca gac atg aag 96  
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
20 25 30

ctg cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg gac atg ctc cgc cac 144  
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
35 40 45

ctc tac cag ggc tgc cag gtg gtg cag gga aac ctg gaa ctc acc tac 192  
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
50 55 60

ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat atc cag gag gtg 240  
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
65 70 75 80

cag ggc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg agg cag gtc cca ctg 288  
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu  
85 90 95

30

40

cag agg ctg cgg att gtg cga ggc acc cag ctc ttt gag gac aac tat	336	
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr		
100 105 110		
gcc ctg gcc gtg cta gac aat gga gac ccg ctg aac aat acc acc cct	384	
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro		
115 120 125		
gtc aca ggg gcc tcc cca gga ggc ctg cgg gag ctg cag ctt cga agc	432	
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser		
130 135 140		
ctc aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc cag cgg aac ccc cag	480	
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln		10
145 150 155 160		
ctc tgc tac cag gac acg att ttg tgg aag gac atc ttc cac aag aac	528	
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn		
165 170 175		
aac cag ctg gct ctc aca ctg ata gac acc aac cgc tct cgg gcc tgc	576	
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys		
180 185 190		
cac ccc tgt tct ccg atg tgt aag ggc tcc cgc tgc tgg gga gag agt	624	
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser		
195 200 205		
tct gag gat tgt cag agc ctg acg cgc act gtc tgt gcc ggt ggc tgt	672	
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys		20
210 215 220		
gcc cgc tgc aag ggg cca ctg ccc act gac tgc tgc cat gag cag tgt	720	
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys		
225 230 235 240		
gct gcc ggc tgc acg ggc ccc aag cac tct gac tgc ctg gcc tgc ctc	768	
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu		
245 250 255		
cac ttc aac cac agt ggc atc tgt gag ctg cac tgc cca gcc ctg gtc	816	
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val		
260 265 270		
acc tac aac aca gac acg ttt gag tcc atg ccc aat ccc gag ggc cgg	864	
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg		30
275 280 285		
tat aca ttc ggc gcc agc tgt gtg act gcc tgt ccc tac aac tac ctt	912	
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu		
290 295 300		
tct acg gac gtg gga tcc tgc acc ctc gtc tgc ccc ctg cac aac caa	960	
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln		
305 310 315 320		
gag gtg aca gca gag gat gga aca cag cgg tgt gag aag tgc agc aag	1008	
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys		
325 330 335		

ccc tgt gcc cga gtg tgc tat ggt ctg ggc atg gag cac ttg cga gag	1056	
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu		
340 345 350		
gtg agg gca gtt acc agt gcc aat atc cag gag ttt gct ggc tgc aag	1104	
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys		
355 360 365		
aag atc ttt ggg agc ctg gca ttt ctg ccg gag agc ttt gat gga gtc	1152	
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Val		
370 375 380		
tca ctc tgt cag cag gct gga gtg cag tgg tac gat ctt ggc tca ctg	1200	
Ser Leu Cys Gln Gln Ala Gly Val Gln Trp Tyr Asp Leu Gly Ser Leu		10
385 390 395 400		
caa cct ctg cct cct gga ttc aag caa ttc tcc tgc ctc agt ctc ctg	1248	
Gln Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Gln Phe Ser Cys Leu Ser Leu Leu		
405 410 415		
agt agc tgg gac tac agg gac cca gcc tcc aac act gcc ccg ctc cag	1296	
Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln		
420 425 430		
cca gag cag ctc caa gtg ttt gag act ctg gaa gag atc aca ggt tac	1344	
Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr		
435 440 445		
cta tac atc tca gca tgg ccg gac agc ctg cct gac ctc agc gtc ttc	1392	
Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe		20
450 455 460		
cag aac ctg caa gta atc cgg gga cga att ctg cac aat ggc gcc tac	1440	
Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr		
465 470 475 480		
tcg ctg acc ctg caa ggg ctg ggc atc agc tgg ctg ggg ctg cgc tca	1488	
Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser		
485 490 495		
ctg agg gaa ctg ggc agt gga ctg gcc ctc atc cac cat aac acc cac	1536	
Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His		
500 505 510		
ctc tgc ttc gtg cac acg gtg ccc tgg gac cag ctc ttt cgg aac ccg	1584	
Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro		30
515 520 525		
cac caa gct ctg ctc cac act gcc aac cgg cca gag gac gag tgt gtg	1632	
His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val		
530 535 540		
ggc gag ggc ctg gcc tgc cac cag ctg tgc gcc cga ggg cac tgc tgg	1680	
Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp		
545 550 555 560		
ggt cca ggg ccc acc cag tgt gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg ggc	1728	
Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly		
565 570 575		
cag gag tgc gtg gag gaa tgc cga gta ctg cag ggg ctc ccc agg gag	1776	
		40

Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu  
 580 585 590  
 tat gtg aat gcc agg cac tgt ttg ccg tgc cac cct gag tgt dag ccc 1824  
 Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro  
 595 600 605  
 cag aat ggc tca gtg acc tgt ttt gga ccg gag gct gac cag tgt gtg 1872  
 Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val  
 610 615 620  
 gcc tgt gcc cac tat aag gac cct ccc ttc tgc gtg gcc cgc tgc ccc 1920  
 Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro  
 625 630 635 640  
 agc ggt gtg aaa cct gac ctc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca 1968  
 Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro  
 645 650 655  
 gat gag gag ggc gca tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc 2016  
 Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser  
 660 665 670  
 tgt gtg gac ctg gat gac aag ggc tgc ccc gcc gag cag aga gcc agc 2064  
 Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser  
 675 680 685  
 cct ctg acg tcc atc atc tct gcg gtg gtt ggc att ctg ctg gtc gtg 2112  
 Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val  
 690 695 700  
 gtc ttg ggg gtg gtc ttt ggg atc ctc atc agc gac ggc agc aat cac 2160  
 Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Ser Asp Gly Ser Asn His  
 705 710 715 720  
 tagt 2164  
  
 <210> 6  
 <211> 720  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 6  
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu 30  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
 20 25 30  
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
 35 40 45  
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
 50 55 60  
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
 65 70 75 80  
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu  
 85 90 95 40

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr  
 100 105 110  
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro  
 115 120 125  
 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln  
 145 150 155 160  
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn  
 165 170 175  
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys  
 180 185 190  
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser  
 195 200 205  
 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys  
 210 215 220  
 Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu  
 245 250 255  
 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val  
 260 265 270  
 Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg  
 275 280 285  
 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu  
 290 295 300  
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln  
 305 310 315 320  
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys  
 325 330 335  
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu  
 340 345 350  
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys  
 355 360 365  
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Val  
 370 375 380  
 Ser Leu Cys Gln Gln Ala Gly Val Gln Trp Tyr Asp Leu Gly Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Gln Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Gln Phe Ser Cys Leu Ser Leu Leu  
 405 410 415

10

20

30

40

Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln  
420 425 430

Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr  
435 440 445

Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe  
450 455 460

Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr  
465 470 475 480

Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser  
485 490 495

Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His  
500 505 510

Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro  
515 520 525

His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val  
530 535 540

Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp  
545 550 555 560

Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly  
565 570 575

Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu  
580 585 590

Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro  
595 600 605

Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val  
610 615 620

Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro  
625 630 635 640

Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro  
645 650 655

Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser  
660 665 670

Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser  
675 680 685

Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val  
690 695 700

Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Ser Asp Gly Ser Asn His  
705 710 715 720

<210> 7  
<211> 884  
<212> DNA

10

20

30

40

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (77)..(568)

<400> 7

```

acgcgctggg agctctccat atggtcgacc tgcaggcggc cgcgaattca ctagtattg 60
agccgcagtg agcacc atg gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc ctc 112
      Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu
      1              5              10

ctc gcc ctc ttg ccc ccc gga gcc gcg agc acc caa gtg tgc acc ggc 160
Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly
      15              20              25
10

aca gac atg aag ctg cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg gac 208
Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp
      30              35              40

atg ctc cgc cac ctc tac cag gcc tgc cag gtg gtg cag gga aac ctg 256
Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu
      45              50              55
60

gaa ctc acc tac ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat 304
Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp
      65              70              75

atc cag gag gtg cag gcc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg agg 352
Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg
      80              85              90
20

cag gtc cca ctg cag agg ctg cgg att gtg cga gcc acc cag ctc ttt 400
Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe
      95              100              105

gag gac aac tat gcc ctg gcc gtg cta gac aat gga gac ccg ctg aac 448
Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn
      110              115              120

aat acc acc cct gtc aca ggg gcc tcc cca gga gcc ctg cgg gag ctg 496
Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu
      125              130              135              140

cag ctt cga agc ctc aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc cag 544
Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln
      145              150              155
30

cgg aac ccc cag cgg tgt gaa acc tgacctctcc tacatgccca tctggaagtt 598
Arg Asn Pro Gln Arg Cys Glu Thr
      160

tccagatgag gagggcgcac gccagccttg ccccatcaac tgcacccact cctgtgtgga 658
cctggatgac aagggctgcc ccgccgagca gagagccagc cctctgacgt ccacatctc 718
tgcggtgggt ggcattctgc tggctgtggt cttgggggtg gtctttggga tccatcaaa 778
gcgacggcag caatcgaatt cccggggcgg ccattggcggc cgggagcatg cgacgtcggg 838

```

10

20

30

40

cccaattcgc cctatagtga gtcgtattac aattcactgg ccgctcg

884

<210> 8  
 <211> 164  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8  
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
 20 25 30  
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
 35 40 45  
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
 50 55 60  
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
 65 70 75 80  
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu  
 85 90 95  
 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr  
 100 105 110  
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro  
 115 120 125  
 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln  
 145 150 155 160  
 Arg Cys Glu Thr

10

20

<210> 9  
 <211> 2149  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

30

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2145)

<400> 9  
 atg gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc ctc ctc gcc ctc ttg 48  
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
 1 5 10 15  
 ccc ccc gga gcc gcg agc acc caa gtg tgc acc ggc aca gac atg aag 96  
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
 20 25 30

40



Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg		
		275					280					285					
tat	aca	ttc	ggc	gcc	agc	tgt	gtg	act	gcc	tgt	ccc	tac	aac	tac	ctt	912	
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu		
	290					295					300						
tct	acg	gac	gtg	gga	tcc	tgc	acc	ctc	gtc	tgc	ccc	ctg	cac	aac	caa	960	
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln		
305					310					315					320		
gag	gtg	aca	gca	gag	gat	gga	aca	cag	cgg	tgt	gag	aag	tgc	agc	aag	1008	
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys		
			325						330					335			
ccc	tgt	gcc	cga	gtg	tgc	tat	ggg	ctg	ggc	atg	gag	cac	ttg	cga	gag	1056	
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu		
			340					345						350			
gtg	agg	gca	ggt	acc	agt	gcc	aat	atc	cag	gag	ttt	gct	ggc	tgc	aag	1104	
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys		
		355					360						365				
aag	atc	ttt	ggg	agc	ctg	gca	ttt	ctg	cgg	gag	agc	ttt	gat	ggg	gac	1152	
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp		
	370					375					380						
cca	gcc	tcc	aac	act	gcc	cgg	ctc	cag	cca	gag	cag	ctc	caa	gtg	ttt	1200	
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe		
385					390					395				400			
gag	act	ctg	gaa	gag	atc	aca	ggg	tac	cta	tac	atc	tca	gca	tgg	cgg	1248	
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro		
			405						410					415			
gac	agc	ctg	cct	gac	ctc	agc	gtc	ttc	cag	aac	ctg	caa	gta	atc	cgg	1296	
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg		
			420					425						430			
gga	cga	att	ctg	cac	aat	ggc	gcc	tac	tgg	ctg	acc	ctg	caa	ggg	ctg	1344	
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu		
		435					440						445				
ggc	atc	agc	tgg	ctg	ggg	ctg	cgc	tca	ctg	agg	gaa	ctg	ggc	agt	gga	1392	
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly		
	450					455					460						
ctg	gcc	ctc	atc	cac	cat	aac	acc	cac	ctc	tgc	ttc	gtg	cac	acg	gtg	1440	
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val		
	465				470					475					480		
ccc	tgg	gac	cag	ctc	ttt	cgg	aac	cgg	cac	caa	gct	ctg	ctc	cac	act	1488	
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr		
				485					490					495			
gcc	aac	cgg	cca	gag	gac	gag	tgt	gtg	ggc	gag	ggc	ctg	gcc	tgc	cac	1536	
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His		
			500					505					510				
cag	ctg	tgc	gcc	cga	ggg	cac	tgc	tgg	ggg	cca	ggg	ccc	acc	cag	tgt	1584	
Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys		

10

20

30

40

515	520	525		
gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg ggc cag gag tgc gtg gag gaa tgc			1632	
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys				
530	535	540		
cga gta ctg cag ggg ctc ccc agg gag tat gtg aat gcc agg cac tgt			1680	
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys				
545	550	555	560	
ttg ccg tgc cac cct gag tgt cag ccc cag aat ggc tca gtg acc tgt			1728	
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys				
	565	570	575	
ttt gga ccg gta atg cgt ttt cct ctc tgg gtg cct ccc att ttc tgg			1776	10
Phe Gly Pro Val Met Arg Phe Pro Leu Trp Val Pro Pro Ile Phe Trp				
	580	585	590	
ctc aag tcc ctg ccc agg atc aag ctt gga gga ggg ccc cga ggg agg			1824	
Leu Lys Ser Leu Pro Arg Ile Lys Leu Gly Gly Gly Pro Arg Gly Arg				
	595	600	605	
ggc cac aga gac tgg gag gct gac cag tgt gtg gcc tgt gcc cac tat			1872	
Gly His Arg Asp Trp Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr				
	610	615	620	
aag gac cct ccc ttc tgc gtg gcc cga tgc ccc agc ggt gtg aaa cct			1920	
Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro				
	625	630	635	640
gac ctc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca gat gag gag ggc gca			1968	20
Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala				
	645	650	655	
tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc tgt gtg gac ctg gat			2016	
Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp				
	660	665	670	
gac aag ggc tgc ccc gcc gag cag aga gcc agc cct ctg atg tcc atc			2064	
Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Met Ser Ile				
	675	680	685	
atc tct gcg gtg gtt ggc att ctg ctg gtc gtg gtc ttg ggg gtg gtc			2112	
Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val				
	690	695	700	
ttt ggg atc ctc ata agc gac ggc agc aat cac tagt			2149	30
Phe Gly Ile Leu Ile Ser Asp Gly Ser Asn His				
	705	710	715	
<210> 10				
<211> 715				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 10				
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu				
1	5	10	15	
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys				40

20	25	30	
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His 35 40 45			
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr 50 55 60			
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val 65 70 75 80			
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu 85 90 95			
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr 100 105 110			10
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro 115 120 125			
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser 130 135 140			
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln 145 150 155 160			
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn 165 170 175			
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys 180 185 190			20
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser 195 200 205			
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys 210 215 220			
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys 225 230 235 240			
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu 245 250 255			
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val 260 265 270			30
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg 275 280 285			
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu 290 295 300			
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln 305 310 315 320			
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys 325 330 335			
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu 340 345 350			40

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys  
 355 360 365  
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp  
 370 375 380  
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe  
 385 390 395 400  
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro  
 405 410 415  
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg  
 420 425 430  
 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu  
 435 440 445  
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly  
 450 455 460  
 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val  
 465 470 475 480  
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr  
 485 490 495  
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His  
 500 505 510  
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys  
 515 520 525  
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys  
 530 535 540  
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys  
 545 550 555 560  
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys  
 565 570 575  
 Phe Gly Pro Val Met Arg Phe Pro Leu Trp Val Pro Pro Ile Phe Trp  
 580 585 590  
 Leu Lys Ser Leu Pro Arg Ile Lys Leu Gly Gly Gly Pro Arg Gly Arg  
 595 600 605  
 Gly His Arg Asp Trp Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr  
 610 615 620  
 Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro  
 625 630 635 640  
 Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala  
 645 650 655  
 Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp  
 660 665 670

10

20

30

40

Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Met Ser Ile  
675 680 685

Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val  
690 695 700

Phe Gly Ile Leu Ile Ser Asp Gly Ser Asn His  
705 710 715

<210> 11  
<211> 690  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<400> 11  
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
65 70 75 80

20

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu  
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr  
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro  
115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser  
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln  
145 150 155 160

30

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn  
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys  
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser  
195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys  
210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys  
225 230 235 240

40

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu  
245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val  
260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg  
275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu  
290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln  
305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys  
325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu  
340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys  
355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp  
370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe  
385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro  
405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg  
420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu  
435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly  
450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val  
465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr  
485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His  
500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys  
515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys  
530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys  
545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys

10

20

30

40



<210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

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

<400> 15  
cagtctccgc atcgtgtact tccg 24

<210> 16  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

10

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

<400> 16  
gagccgcagt gaggaccatg gag 23

<210> 17  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

20

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

<400> 17  
gctgccgctcg cttgatgagg atc 23

【 図 1 A 】

FIG. 1A

atg gag ctg ggc gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc ctc ctc gcc ctc ttg 48  
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
1 5 10 15

ccc ccc gga gcc ggc agc acc caa gtg tgc acc ggc aca gcc atg aag 96  
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
20 25 30

ctg egg ctc cct gcc agt ccc gag acc caa ctc gac atg ctc cgc cac 144  
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
35 40 45

ctc tac cag ggc tgc cag gtg gtg cag gga sac ctg gaa ctc acc tac 192  
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
50 55 60

ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat atc cag gag gtg 240  
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
65 70 75 80

cag ggc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg aag cag gtc cca cts 288  
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu  
85 90 95

cag agg ctg egg att gtg cga gcc acc cag ctc ttt gag gac sac tat 336  
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr  
100 105 110

gcc ctg gcc gtg cta gac aat gga cag ccg ctg aac aat acc acc cct 384  
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro  
115 120 125

gtc aca ggg gcc tcc caa gga gcc ctg egg gag ctg cag ctt cga agc 432  
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser  
130 135 140

ctc aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc cag cgg aac ccc cag 480  
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln  
145 150 155 160

ctc tgc tac cag gac acc att ttg ttg aag gac atc ttc cac aac aac 528  
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Thr Lys Asp Ile Phe His Lys Asn  
165 170 175

aac cag ctg gct ctc aca ctg ala gac acc aac cgc tct cgg gcc tgc 576  
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys  
180 185 190

cac ccc tgt tct ctg atg tgt aag agc tcc cgc tgc tgg gga gag agt 624  
His Pro Cys Ser Leu Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser  
195 200 205

tot gag gat tgt cag agc ctg acc cgc act gtc tgt gcc agt ggc tgt 672  
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Ala Cys Ala Gly Gly Cys  
210 215 220

【 図 1 B 】

FIG. 1B

gcc cgc tgc aag ggg cca ctg ccc acc gac tgc tgc cat gag cag tgt 720  
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys  
225 230 235 240

gct gcc gcc tgc agc ggc ccc aag cac tct gac tgc ctg gcc tgc ctc 768  
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu  
245 250 255

cac ttc aac cac agt gcc atc agc tgg ctg ggg ctg ggc tca ctg agg 816  
His Phe Asn His Ser Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg  
260 265 270

gaa ctg ggc agt gga ctg gcc ctc atc cac cat aac acc cac ctc tgc 864  
Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys  
275 280 285 290

ttc gtg cac aag gtg ccc tgg sac cag ctc ttt cgg sac ccg cac caa 912  
Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln  
295 300 305

gct ctg ctc cac act gcc aac cgg cca gag gac gag tgt gtg ggc gag 960  
Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu  
305 310 315 320

gcc ctg gcc tgc cac cag ctg tgc gcc cga ggg cac tgc tgg ggt cca 1008  
Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro  
325 330 335

ggg ccc acc cag tgc gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg gcc cag gag 1056  
Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu  
340 345 350

tgc gtg gag gaa tgc cga gta ctg cag ggg ctc ccc agg gag tat gtg 1104  
Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val  
355 360 365

aat gcc agg cac tgt ttg cgg tgc cac cct gag tgc cag ccc cag aat 1152  
Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Glu Pro Gln Asn  
370 375 380

ggc tca gtg acc tgc tnn gga ccc gag gct gac cag tgt atg gcc tgt 1200  
Gly Ser Val Thr Cys Xaa Gly Dro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys  
385 390 395 400

gcc cac tat aag gac cct ccc ttc tgc gtg gcc cgc tgc ccc agc ggt 1248  
Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly  
405 410 415

gtg aaa cct gac ctc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca gat gag 1296  
Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu  
420 425 430 435

gag ggc gca tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc ccc tcc tgt gtg 1344  
Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val  
440 445 450

【 図 1 C 】

FIG. 1C

gac ctg gat gac aag ggc tgc ccc gcc gag cag aga gcc agc cct ctg 1392  
Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu  
450 455 460

acg tcc atc atc tet gcg gtg gtt gcc att ctg ctg gtc gtg gtc ttg 1440  
Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu  
465 470 475 480

ggg gtg gtc ttt ggg atc ctc atc aag cga cgg cag caa 1479  
Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln  
485 490

【 図 2 A 】

FIG. 2A

acgcggtggg agctotoccaa tatggtogac ctgocaggcgg cocogpattc actagtgatt 60

gagcgcagat ggcgacac atg gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc 110  
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu  
1 5 10

ctc ctc gcc ctc ttg ccc ccc gga gcc gcg agc acc caa gtg tgc acc 158  
Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr  
15 20 25

ggc aca gac atg aag ctg cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg 206  
Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu  
30 35 40

gac atg ctc cgc cac ctc tac cag gcc tgc cag gtg gtg cag gga aac 254  
Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn  
45 50 55

ctg gaa ctc acc tac ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag 302  
Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln  
60 65 70 75

gat atc cag gag gtg cag ggc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg 350  
Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val  
80 85 90

agg cag gtc cca ctg cag agg ctg cgg att gtg cga gcc acc cag ctc 398  
Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu  
95 100 105

ttt gag gac aac tat gcc ctg gcc gtg cta gac aat gga gac ccg ctg 446  
Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu  
110 115 120

aac aat acc acc cct gtc aca ggg gcc tcc cca gga gcc ctg cgg gag 494  
Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu  
125 130 135

ctg cag ctt cga agc ctc aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc 542  
Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile  
140 145 150 155

cag cgg aac ccc cag ctc tgc tac cag gac acc atc ttg tgg aag gac 590  
Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp  
160 165 170

atc ttc cac aag aac aac cag ctg gct ctc aca ctg ata gac acc aac 638  
Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn  
175 180 185

cgc tct cgg gcc tgc cac ccc tgt tct ccc atg tgt aag gcc tcc cgc 686  
Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg  
190 195 200

tgc tgg gga gag agt tct gag gat tgt cag agc ctg acc cgc act gtc 734  
Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val  
205 210 215

【 2 B 】

FIG. 2B

tgt gcc ggt ggc tgt gcc ggc tgc aag ggg cca ctg ccc act gac tgc 782  
 Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys 235  
 220 225 230

tgc cat gag cag tgt gct gcc ggc tgc acg ggc ccc aag cac tct gac 830  
 Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp 250  
 240 245 250

tgc ctg gcc tgc ctc cac ttc aac cac agt ggc atc tgt gag ctg ccc 878  
 Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His 265  
 255 260 265

tgc cca gcc ctg gtc acc tac aac aca gac agc ttt gag tcc atg ccc 926  
 Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro 280  
 270 275 280

aat ccc gag ggc cgg tat aca ttc gcc gcc agc tgt gtg act gcc tgt 974  
 Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys 295  
 285 290 295

ccc tan aac tac ctt tct acg gac glg gga tcc tgc acc cts gtc tgc 1022  
 Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys 315  
 300 305 310 315

ccc ctg gcc aac cca gag gtg aca gca gag gat gga aca cag cgg tgt 1070  
 Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Glu Arg Cys 330  
 320 325 330

gag aag tgc agc aag ccc tgt gcc cga gtg tgc tat ggt ctg ggc atg 1118  
 Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met 345  
 335 340 345

gag cac ttg cga gag gtg aag gca gtt acc agt gcc aat atc cag gag 1166  
 Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu 360  
 350 355 360

ttt gct ggc tgc aag aag atc ttt ggg agc ctg gca ttt ctg ccc gag 1214  
 Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu 375  
 365 370 375

agc ttt gat ggg gac cca gcc tcc aac act gcc ccc ctg cag cca gag 1262  
 Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu 395  
 380 385 390 395

cag ctg cca gta ggt ttt gag act ctg gaa gag atc aca ggt tac cta tac 1310  
 Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr 410  
 400 405 410

atc tca gca tgg ccc gac agc ctg cct gac ctc agc gtc ttc cag aac 1358  
 Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn 425  
 415 420 425

ctg caa gta atc cgg gga cga att ctg cca aat gcc gcc tac tcc ctg 1406  
 Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu 440  
 430 435 440

【 2 C 】

FIG. 2C

acc ctg caa ggg ctg ggc atc agc tgg ggg ctg cgc tca ctg agg 1454  
 Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg 455  
 445 450 455

gaa ctg ggc agt gga ctg gcc ctc atc cac cat aac acc cac ctg tgc 1502  
 Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys 475  
 460 465 470 475

ttc gtg cac aac gtc ccc tgg gac cag ctc ttt cgg aac ccc cac caa 1550  
 Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln 490  
 480 485 490

gct ctg ctc cac act gcc aac cgg cca gag gac gag tgt gtg ggc gag 1598  
 Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu 505  
 495 500 505

ggc ctg gcc tgc cac cag ctg tgc gcc cga ggg aac tgc tgg ggt cca 1646  
 Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro 520  
 510 515 520

ggg ccc acc cag tgt gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg ggc cag ggg 1694  
 Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu 535  
 525 530 535

tgc gtg gag gaa tgc cga gta ctg cag ggg ctc ccc agg gag tat gtg 1742  
 Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val 555  
 540 545 550 555

aat gcc agg aac tgt tgg ccc tgc cac cct agg tgt cag ccc cag aat 1790  
 Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn 570  
 560 565 570

ggc tca gtg acc tgt ttt gga ccc gag gct gac gag tgt gtg gcc tgt 1838  
 Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys 585  
 575 580 585

gcc aac tat aag gac cct ccc ttc tgc gtg gcc cgc tgc acc agc ggt 1886  
 Phe His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly 600  
 590 595 600

gtg aaa cct gac ctc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca gat gag 1934  
 Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu 615  
 605 610 615

gag ggc gca tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc cct ctg 1982  
 Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Pro Leu 635  
 620 625 630 635

acg tcc atc gtc tct ggg gtg gtt ggc att ctg ctg gtc gtg gtc ttg 2030  
 Thr Ser Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu 650  
 640 645 650

ggg gtg gtc ttt ggg atc ctc atc aag cga cgg cag caa tcc aat tcc 2078  
 Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Ser Asn Ser 665  
 655 660 665

【 2 D 】

FIG. 2D

cgc ggc cgc cat ggc ggc cgg gag cat gcc agc tgg ggc cca att cgc 2126  
 Arg Gly Arg His Gly Gly Arg Glu His Ala Thr Ser Gly Pro Ile Arg 680  
 670 675 680

ccc ata 2132  
 Pro Ile 685

【 3 A 】

FIG. 3A

atg gag ctg ggc gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc ctc ctc gcc ctg 48  
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Ala Leu 15  
 1 5 10 15

ccc ccc gga gcc ggc agc acc caa gtg gtc acc gcc aca gac atg aag 96  
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys 30  
 20 25 30

ctg cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg gac atg ctc cgc cac 144  
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His 45  
 35 40 45

ctc tac cag ggc tgc cag gtg gtg cag gga aac ctg gaa ctc acc tac 192  
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr 60  
 50 55 60

ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat atc cag gag gtg 240  
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val 80  
 65 70 75 80

cag ggc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg agg cag gtc cca ctg 288  
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu 95  
 85 90 95

cag agg ctg cgg att gtg cga ggc acc cag ctc ttt gag gac aac tat 336  
 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr 110  
 100 105 110

gcc ctg gcc gtc cta gac aat gga gac ccc ctg aac aat acc acc cct 384  
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro 125  
 115 120 125

gtc aca ggg gcc tcc cca gga ggc ctg cgg gag ctg cag ctt cga agc 432  
 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser 140  
 130 135 140

ctc aca gag atc ttg aag gga ggg gtc ttg atc cag cgg aac ccc cag 480  
 Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln 160  
 145 150 155 160

ctc tgc tac cag gac acc att ttg tgg aag gac atc ttc cac aag aac 528  
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn 175  
 165 170 175

aac cag ctg gct ctc aca ctg ata gac acc aac cgc tct cgg gcc tgc 576  
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys 190  
 180 185 190

aac ccc tgt tct ccc atg tgt aag gcc tcc cgc tgc tgg gga gag agt 624  
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser 205  
 195 200 205

tct gag gat tgt cag agc ctg acc cgc act gtc tgt gcc ggt gcc tgt 672  
 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys 220  
 210 215 220

【 3 B 】

FIG. 3B

gcc cgc tgc aag ggg cca ctg ccc act gac tgc tgc cat gag cag tgt 720  
 Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys  
 225 230 235 240

gct gcc ggc tgc acg ggc ccc aag cac tct gac tgc ctg gcc tgc ctc 768  
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu  
 245 250 255

cac ttc aac cac agt ggc abc tgt gag ctg cac tgc cca gcc ctg gtc 816  
 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val  
 260 265 270

acc tac aac aca gac acg ttt gag tcc atg ccc aat ccc gag ggc cgg 864  
 Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg  
 275 280 285

tat aca ttc ggc gcc agc tgt gtc act gcc tgt ccc tac aac tac ctt 912  
 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu  
 290 295 300

tct acg gac gtc gca tcc tgc acc ctc gtc tgc ccc ctg cac aac caa 960  
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln  
 305 310 315 320

gag gtc aca gca gag gat gga aca cag cag tgt gag aag tgc agc aag 1008  
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys  
 325 330 335

ccc tgt gcc cga gtc tgc tat ggt ctg ggc atg gag cac ttc cga gag 1056  
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu  
 340 345 350

gtg agg gca gtt acc agt gcc aat atc cag gag ttt gct ggc tgc aag 1104  
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Phe Ala Gly Cys Lys  
 355 360 365

aag atc ttt ggg agc ctc gca ttt ctg ccc gag agc ttt gat gga gtc 1152  
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Val  
 370 375 380

toa ctc tgt cag cag gct gga gtc cag tgg tac gat ttt gcc toa ctg 1200  
 Ser Leu Cys Gln Gln Ala Gly Val Gln Trp Tyr Asp Leu Gly Ser Leu  
 385 390 395 400

caa cct ctg cct cct gga ttc aac caa ttc tcc tgc ctc agt ctc ctg 1248  
 Gln Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Gln Phe Ser Cys Leu Ser Leu Leu  
 405 410 415

agt agc tgg gac tac agg gac cca gcc tcc aac act gcc ccc ctc cag 1296  
 Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln  
 420 425 430

cca gag cag ctc caa gtc ttt gag act ctg gaa gag atc aca ggt tac 1344  
 Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Ile Thr Gly Tyr  
 435 440 445

【 3 C 】

FIG. 3C

cta tac abc tca gca tgg ccg gac agc ctg cct gcc etc agc gtc ttc 1392  
 Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe  
 450 455 460

cag aac ctg cca gta abc ccg gga cga att ctg cac aat ggc gcc tac 1440  
 Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr  
 465 470 475 480

tcg ctg acc ctg caa ggg ctg ggc abc agc tgg ctg ggg ctg cgc tca 1488  
 Ser Leu Thr Leu Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser  
 485 490 495

ctg agg gaa ctg ggc agt gga ctg gcc etc atc cac cat aac acc cac 1536  
 Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His  
 500 505 510

etc tgc ttc gtc cac acg gtc ccc tgg gac cag ctc ttt cga aac ccg 1584  
 Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro  
 515 520 525

cac caa gct ctg ctc cac act gcc aac ccg cca gag gac gag tgt gtc 1632  
 His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val  
 530 535 540

ggc gag ggc ctg gcc tgc cac cag ctg tgc gcc cga ggg cac tgc tgg 1680  
 Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp  
 545 550 555 560

ggt cca ggg ccc acc cag tgt gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg ggc 1728  
 Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly  
 565 570 575

cag gag tgc gtc gaa gaa tgc cga gta ctg cag ggc ccc ccc agg gag 1776  
 Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu  
 580 585 590

tat gtc aat gcc agc cac tgt ttg ccg tgc cac cct gcc tgt cag ccc 1824  
 Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Glu Pro  
 595 600 605

cag aat gcc toa gtc aac tgt ttt gga ccg gag gcc cac cag tgt gtc 1872  
 Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val  
 610 615 620

gcc tgt gcc cac tat aag gac cct ccc ttc tgc ctg gcc cgc tgc ccc 1920  
 Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro  
 625 630 635 640

agc ggt gtc aaa cct gac ctc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca 1968  
 Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro  
 645 650 655

gat gag gag ggc gca tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc 2016  
 Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser  
 660 665 670

【 3 D 】

FIG. 3D

tgc gtc gac ctg gat gac aag ggc tgc ccc gcc gag cag gca gcc agc 2064  
 Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser  
 675 680 685

cct ctg acg tcc atc atc tct gcc gtc gtt gcc att ctg ctg gtc gtc 2112  
 Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val  
 690 695 700

gtc tgc ggg gtc gtc ttt ggg atc etc atc agc gac ggc agc aat cac 2160  
 Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Ser Asp Gly Ser Asn His  
 705 710 715 720

tagt 2164

【 4 】

FIG. 4

agccgctggg agctctccat atggtgacc tgcaggcgc cgcgaattca ctagtattg 60  
 agcccgactg agcaacc atg gag ctg gca gcc ttg tgc cgc tgg agc etc ctc 112  
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu  
 1 5 10

ctc gcc etc ttc ccc ccc gga gcc ggc agc acc caa gly tgc acc gcc 160  
 Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly  
 15 20 25

aca gac atg aag ctg cgg ctc cct gcc acc gcc gag acc cac ctg gac 208  
 Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp  
 30 35 40

atg ctc cgc cac ctc tac cag gcc tgc cag gly gtc cag gga aac ctg 256  
 Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Gln Val Gly Asn Leu  
 45 50 55 60

gaa ctc acc tac ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat 304  
 Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp  
 65 70 75

atc cag gag gtc cag gcc tac gtc ctc atc gct cac aac caa gtc agg 352  
 Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg  
 80 85 90

cag gtc cca ctg cag agg ctg cgg att gtc gca ggc acc cag ctc ttt 400  
 Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe  
 95 100 105

gag gac aac tat gcc ctg gcc gtc cta gac aat gga gac ccg ctg aac 448  
 Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn  
 110 115 120

aat acc acc cct ctc aca ggg gcc tcc cca gga gcc ctg cgg gag ctg 496  
 Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu  
 125 130 135 140

cag ctt cga agc ctc aca gag atc ttg aaa gga ggc gtc ttg atc cag 544  
 Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln  
 145 150 155

cgg aac ccc cag cgg tgt gaa acc tgcactctcc tacatgcccc tatggaagt 598  
 Arg Asn Pro Gln Arg Cys Glu Thr  
 160

tccagatgag gagggcgcac gccagccttg ccccatcaac tgcaccacct cctgtgtgga 658  
 cctggatgac aagggctgccc ccgcccagca gagagccagc cctctgact ccatcctc 718  
 tgggtggtt ggcattctgc tggctggtt cttgggggtg gtccttgga tccatcaca 778  
 ggcagcagc caatcgaatt ccccgagccg ccattggcgc cgggagcagc cagctggg 838  
 cccaatctgc cctatgta gtcgtattac aattcactgg ccgtcg 884

【 5 A 】

FIG. 5A

atg gag ctg gcg gcc tgg tgc cgc tgg ggg ctc etc etc gcc etc ttg 48  
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Ala Leu Leu 15

ccc ccc gga gcc gcg agc acc caa gtt tgc acc ggc aca gac atg aag 96  
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys 20

ctg cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg gac atg etc cgc cac 144  
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His 35

ctc tac cag ggc tgc cag gtt gtt gca gga aac ctg gaa etc acc tac 192  
Leu Tyr Gln Gln Cys Gln Val Val Gln Gln Asp Leu Glu Leu Thr Tyr 50

ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat atc cag gag gtt 240  
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Asp Ile Gln Glu Val 65

cag gcc tac gtt ctc atc gct cac aac caa gtt agg cag gtc cca ctg 288  
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu 85

cag agt ctg cgg att gtt cga gcc acc cac ctc ttt gag gac aac tat 336  
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr 100

gcc ctg gcc gtt cta gac aat gga gac ccg ctg aac aat acc acc cct 384  
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro 115

gtc aca ggg gcc tcc cca gga ggc ctg ggg gag ctg cag ttt cga agc 432  
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gln Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser 130

ctc aca gag atc ttg aan gga ggg tgc ttg atc cag cgg aac ccc cag 460  
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gln Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln 145

ctc tgc tac cag gac acy att ttg tgg aag gac atc ttc cac aag aac 528  
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn 165

aac cag ctg gct ctc aca ctg ata gac acc aac cgc tct cgg gcc tgc 576  
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Tyr 180

cac ccc tgt tct ccg atg tgt aag gcc tcc cgc tgc tgg gga gag agt 624  
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Thr Gly Glu Ser 195

tct gag gat gct cag agc ctg acg gcc atc gtc tgt gcc ggt gcc tgt 672  
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys 210

【 5 B 】

FIG. 5B

gcc cgc tgc aag ggg cca ctg ccc act gac tgc tgc cat gag cag tgt 720  
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys 225

gct gcc ggc tgc acg ggc ccc aag cac tct gac tgc ctg gcc tgc ctc 768  
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu 245

cac ttc aac cac agt ggc atc tgt gag ctg cac tgc cca gcc ctg gtc 816  
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val 260

acc tac aac aca gac acy ttt gag tcc acc ccc aat ccc gag ggc cgg 864  
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg 275

tat aca ttc gcc gcc agc tgt gtt act gcc tgt ccc tac aac tac ctt 912  
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu 290

tct acg gac gtt gga tcc tgc acc ctc gtc ccc ctg cac aac caa 960  
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln 305

gag gtt aca gca gag gat gga aca cag cgg tgt gag aag tgc agc aag 1008  
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Gln Lys Cys Ser Lys 325

ccc tgt gcc cga gtt tgc tat ggt ctg gcc atg gag cac ttg cga gag 1056  
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu 340

ggt agt gca gtt acc agt gcc aat acc cag gag ttt gcc gcc tgc aag 1104  
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys 355

aag atc ttt ggg agc ctg gca ttt ctg ccg gag agc ttt gat ggg gac 1152  
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Ile Ser Ala Trp Pro 370

cca gcc tcc aac act gcc ccg ctg cag cca gag cag ctc caa gtt ttt 1200  
Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe 385

gag act ctg gaa gag atc aca ggt tac cta tac atc tca gca tgg ccg 1248  
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro 405

gac agc ctg cct gac ctc agc gtc ttc cag aac ctg caa gta atc cgg 1296  
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg 420

gga cga att ctg cca aat ggc gcc tac tgg ctg acc ctg caa ggg ctg 1344  
Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu 435

【 5 C 】

FIG. 5C

ggc atc agc tgg ctg ggg ctg cgc tca ctg agg gaa ctg ggc agt gga 1392  
Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly 450

ctg gcc ctc atc cac cat aac acc cac ctc tgc ttc gtt cac acy gtt 1440  
Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val 465

ccc tgg gac cag etc ttt cgg aac ccg cac caa gct ctg ctc cac act 1488  
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr 485

gcc aac cgg cca geg nac gag tgt gtt ggc gag ggc ctg gcc tgc cac 1536  
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His 500

cag ctg tgc gcc cga ggg cac tgc tgg ggt cca ggg ccc acc cag tgt 1584  
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys 515

gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg ggc cag gag tgc gtt gag gaa tgc 1632  
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Gln Glu Cys 530

cga gta ctg cag ggg ctc ccc agt gag tat gtt aat gcc agt cac tgt 1680  
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys 545

tgt ccg tgc cac cct gag tgt cag ccc cag aat gcc tca gtt acc tgt 1728  
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val His Cys 565

ttt gga ccg gta atg cgt ttt cct ctc tgg gtt cct ccc att ttc tgg 1776  
Phe Gly Pro Val Met Arg Phe Pro Leu Trp Val Pro Pro Ile Phe Trp 580

ctc aag tcc ctg ccc agt atc aag ctt gga gga ggg ccc cga ggg agg 1824  
Leu Lys Ser Leu Pro Arg Ile Lys Leu Gly Gly Gly Pro Arg Gly Arg 595

ggc cac aga gac tgg gag gct gac cag tgt gtt gcc tgt gcc cac tat 1872  
Gly His Arg Asp Trp Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr 610

asg gac cct ccc ttc tgc gtt gcc cga tgc ccc agc ggt gtt aaa cct 1920  
Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro 625

gac etc tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca gat cag gag ggc gca 1968  
Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala 645

tgc cag cct tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc tgt gtt gac ctg gat 2016  
Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp 660

【 5 D 】

FIG. 5D

gac aag gcc tgc ccc gcc gag cag aga gcc agc cct ctg atg tcc atc 2064  
Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Met Ser Ile 675

atc tct ccg gtt gtt gcc att ctg ctg gtc gtc gtc tgg ggg gtt gtc 2112  
Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val 690

ttt ggg atc etc ata agc gac ggc agc aat cac tagt 2149  
Phe Gly Ile Leu Ile Ser Asp Gly Ser Asn His 705



【手続補正書】

【提出日】平成17年6月24日(2005.6.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2005535297000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 7
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/34	Z
C 1 2 M 1/34	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/12	
C 1 2 N 5/06	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 N 9/12	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 N 15/02	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 Q 1/48	G 0 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 N 15/00	F
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00	C
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	B
	C 1 2 N 5/00	E
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, MA, MD, MG, MK, MN, M W, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ジン, シュークイアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 6 2 サウザンド オークス, ボーデロ レーン,  
3 2 5 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA19 BA10 BA53 BA61 BA63 BA80 CA04 CA07  
CA09 CA12 CA20 DA02 DA03 DA06 EA04 FA02 GA03 GA11  
GA12 GA13 GA27 HA11 HA13 HA14 HA15 HA17  
4B029 AA07 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15  
4B050 CC01 CC03 CC05 DD11 EE01 GG03 GG04 GG05 LL01 LL03  
4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ27 QQ41 QQ53 QQ61  
QQ79 QQ89 QQ91 QQ95 QR07 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42  
QR48 QR56 QR62 QR72 QR77 QR80 QR84 QS16 QS25 QS33  
QS34 QS36 QX01 QX02  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA87X AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01  
AB05 AC14 AC20 BA02 BA04 BA05 BA08 BC50 CA24 CA25  
CA29 CA43 CA44 CA45 CA46

4C084	AA02	AA07	AA13	AA18	BA01	BA08	BA22	BA23	DC50	NA14
	ZB261	ZB262	ZC021	ZC022						
4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA04	NA14	ZB26	ZC02		
4C087	AA01	AA02	AA03	BC83	CA12	NA14	ZB26	ZC02	ZC20	
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	BA53	BA56	BA57	CA40
	DA50	DA75	DA76	DA86	DA89	EA20	EA50	FA71	FA72	FA74

专利名称(译)	HER-2受体酪氨酸激酶分子及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005535297A</a>	公开(公告)日	2005-11-24
申请号	JP2003584282	申请日	2003-04-11
[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	タタレウィズスザンナ ジンシュークイアン		
发明人	タタレウィズ, スザンナ ジン, シュークイアン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/71 C07K16/40 C07K19/00 C12M1/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N9/12 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/71		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/76 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43 /00.111 C07K16/40 C07K19/00 C12M1/00.A C12M1/34.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.F C12N5 /00.A C12N15/00.C C12N15/00.B C12N5/00.E A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/BA10 4B024/BA53 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024 /BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA12 4B024/GA13 4B024 /GA27 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024/HA17 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B050 /CC01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/GG03 4B050/GG04 4B050/GG05 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063 /QQ21 4B063/QQ27 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QQ95 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063 /QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064 /CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA04 4B065/BA05 4B065 /BA08 4B065/BC50 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA29 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA18 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084 /BA22 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC021 4C084 /ZC022 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZC02 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087 /ZB26 4C087/ZC02 4C087/ZC20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA53 4H045/BA56 4H045/BA57 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045 /DA76 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/371912 2002-04-11 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了HER-2受体酪氨酸激酶多肽和编码该多肽的核酸分子。具体而言，本发明涉及HER-2 ( HER-2sv ) 的剪接变体。本发明还提供选择性结合剂，载体，宿主细胞和产生HER-2sv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HER-2sv多肽有关的疾病，病症和病状的药物组合物和方法。

元々の残基	典型的な置換基	好ましい置換基
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 ジアミノ酪氨酸, 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