

(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2007-526248

(P2007-526248A)

(43) 公表日 平成19年9月13日(2007.9.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 161 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-551541 (P2006-551541)
 (86) (22) 出願日 平成17年1月27日 (2005. 1. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年9月21日 (2006. 9. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/002996
 (87) 国際公開番号 W02005/072419
 (87) 国際公開日 平成17年8月11日 (2005. 8. 11)
 (31) 優先権主張番号 60/539, 605
 (32) 優先日 平成16年1月27日 (2004. 1. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/619, 241
 (32) 優先日 平成16年10月15日 (2004. 10. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

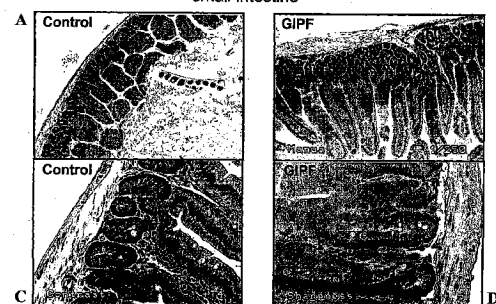
(71) 出願人 506258028
 ヌベロ インコーポレーティッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
 カルロス スイート 310 インダスト
 リアル ロード 201
 (71) 出願人 000253503
 キリンホールディングス株式会社
 東京都中央区新川二丁目10番1号
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胃腸増殖因子およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、胃腸増殖因子 (GIPF) ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを含む薬学的組成物に関する。本発明は、さらに、上皮粘膜の変性に関連する状態または疾患を予防または治療するためのGIPFの治療的使用に関する。

Intestinal epithelial cell proliferation after protein injection:
small intestine

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療上有効量のGIPFポリペプチド、その断片またはアナログ、および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 2】

GIPFの生物学的に活性な断片を含むポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

【請求項 3】

GIPFがヒトGIPFである、請求項2記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

ポリペプチドが、SEQ ID NO: 4のポリペプチドの生物学的に活性な断片を含む、請求項2記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 4のポリペプチド断片を含むポリペプチドを含む薬学的組成物であって、該ポリペプチド断片は、SEQ ID NO: 10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、および178からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、薬学的組成物。

【請求項 6】

ポリペプチドがグリコシル化されている、請求項1～5のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

ポリペプチドがグリコシル化されていない、請求項1～5のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

ポリペプチドが上皮細胞増殖を刺激する、請求項1～6のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

GIPFポリペプチド、その断片またはアナログ、および担体を含む組成物を、対象に投与する段階を含む、対象において上皮細胞増殖を刺激する方法。

【請求項 11】

GIPFポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む治療上有効量の組成物を、治療を必要とする哺乳動物対象に投与する段階を含む、治療方法。

【請求項 12】

GIPFポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む治療上有効量の組成物を、治療を必要とする哺乳動物対象に投与する段階を含む、粘膜炎、炎症性腸疾患、または短腸症候群を治療する方法。

【請求項 13】

GIPDポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む治療上有効量の組成物を投与する段階を含む、患者の胃腸管における上皮細胞増殖を刺激するための方法。

【請求項 14】

食道における上皮細胞増殖が刺激される、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

小腸における上皮細胞増殖が刺激される、請求項13記載の方法。

【請求項 16】

大腸における上皮細胞増殖が刺激される、請求項13記載の方法。

【請求項 17】

胃における上皮細胞増殖が刺激される、請求項13記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

GIPFポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む治療上有効量の組成物を投与する段階を含む、胃腸管の少なくとも一部をライニングする上皮細胞に損傷の危険性がある患者を治療するための方法。

【請求項 19】

患者が放射線療法を受けたことがある、または受けるであろう、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

患者が化学療法を受けたことがある、または受けるであろう、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

GIPFポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む治療上有効量の組成物を投与する段階を含む、放射線療法または化学療法を受けたことがある患者を治療するための方法。 10

【請求項 22】

哺乳動物対象がヒトである、請求項10～13、18、および21のいずれか一項記載の方法。

【請求項 23】

発現制御配列に操作可能に付随したGIPFコード遺伝子を含む、アデノウイルスベクター。

【請求項 24】

請求項23記載のアデノウイルスベクターを含む薬学的組成物。

【請求項 25】

対象に請求項24記載の薬学的組成物を投与する段階を含む、対象において上皮細胞増殖を刺激する方法。 20

【請求項 26】

GIPFタンパク質をコードする核酸を含む導入遺伝子構築物であって、該核酸は、B細胞における該タンパク質の発現を指令する転写調節配列に操作可能に付随している、導入遺伝子構築物。

【請求項 27】

B細胞特異的プロモーターを含む、請求項26記載の導入遺伝子構築物。

【請求項 28】

検出可能なレベルの天然ヒトGIPFタンパク質をB細胞中で産生するトランスジェニックマウスであって、該タンパク質の発現をB細胞に指令する転写調節配列に操作可能に付随したGIPFタンパク質をコードする核酸配列が、ゲノムに安定に組み込まれているトランスジェニックマウス。 30

【請求項 29】

転写調節配列がB細胞プロモーターを含む、請求項28記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 30】

以下の段階を含む、粘膜炎、炎症性腸疾患、または短腸症候群の治療用の薬物候補を同定する方法：

(a) B細胞において組換えGIPFポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスであって、組換えGIPFポリペプチド腸上皮細胞増殖を発現しないこと以外は同一であるマウスと比較して増大した腸上皮細胞増殖を示す該トランスジェニックマウスに、試験化合物を投与する段階；および 40

(b) 腸細胞増殖の増大によって、該試験化合物が、粘膜炎、炎症性腸疾患、または短腸症候群の治療のための薬物候補として同定される、腸の上皮細胞増殖に対する該試験化合物の効果を評価する段階。

【請求項 31】

腸の上皮細胞が陰窩細胞である、請求項30記載の方法。

【請求項 32】

SEQ ID NO：9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、および104からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。 50

【請求項 3 3】

生物学的活性を持つポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、請求項32記載のポリヌクレオチドとの約95%よりも高い配列同一性を有する、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3 4】

SEQ ID NO: 12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、および105からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 3 5】

SEQ ID NO: 12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、および105からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。 10

【請求項 3 6】

SEQ ID NO: 5、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、および104からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列に操作可能に付随した発現調節エレメントを含む発現ベクター。

【請求項 3 7】

SEQ ID NO: 5、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177のポリヌクレオチドで形質転換したまたはトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項 3 8】

原核細胞または真核細胞である、請求項37記載の形質転換されたまたはトランスフェクトされた宿主細胞。 20

【請求項 3 9】

以下の段階を含む、SEQ ID NO: 12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、または105のアミノ酸配列を含むポリペプチドを産生するための方法：

(a) 該ポリペプチドの発現に適した条件下、培地中で、SEQ ID NO: 12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、または105のポリペプチドをコードする核酸分子を含む単離された細胞を培養する段階；および

(b) 該細胞または該培地から該ポリペプチドを精製する段階。

【請求項 4 0】

以下の段階を含む、SEQ ID NO: 12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む薬学的組成物を産生するための方法： 30

(a) 該ポリペプチドの発現に適した条件下、培地中で、SEQ ID NO: 12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のポリペプチドをコードする核酸分子を含む単離された細胞を培養する段階；

(b) 該細胞または該培地からポリペプチドを精製する段階；および

(c) 該精製されたポリペプチドを薬学的に許容される担体と組み合わせる段階。

【請求項 4 1】

以下の段階を含む、SEQ ID NO: 12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む薬学的組成物を産生するための方法： 40

(a) SEQ ID NO: 12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のアミノ酸配列を含むポリペプチドを合成する段階；

(b) 該ポリペプチドを精製する段階；および

(c) 該精製されたポリペプチドを薬学的に許容される担体と組み合わせる段階。

【請求項 4 2】

GIPFタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクター構築物であって、該核酸は、腸の上皮細胞におけるGIPFタンパク質の発現を指令する転写調節配列に操作可能に付随している、発現ベクター構築物。

【請求項 4 3】

検出可能なレベルのGIPFタンパク質を腸の上皮細胞において産生するトランスジェニックマウスであって、腸の上皮細胞におけるGIPFタンパク質の発現を指令する転写調節配列に操作可能に付随したGIPFタンパク質をコードする核酸配列が、ゲノムに安定に組み込まれているトランスジェニックマウス。

【請求項 4 4】

GIPFタンパク質およびWnt3aタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクター構築物であって、該核酸は、腸の上皮細胞における該タンパク質の発現を指令する転写調節配列に操作可能に付随している、発現ベクター構築物。

【請求項 4 5】

検出可能なレベルの天然GIPFおよびWnt3aタンパク質を腸の上皮細胞において産生するトランスジェニックマウスであって、腸の上皮細胞におけるGIPFタンパク質の発現を指令する転写調節配列に操作可能に付随したGIPFタンパク質をコードする核酸配列が、ゲノムに安定に組み込まれているトランスジェニックマウス。 10

【請求項 4 6】

腸拡張を示す、請求項43または45記載のトランスジェニックマウス。

【請求項 4 7】

粘膜炎の治療に用いるための、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 4 8】

炎症性腸疾患の治療に用いるための、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 4 9】

短腸症候群の治療に用いるための、請求項1記載の薬学的組成物。 20

【請求項 5 0】

化学療法または放射線療法によって引き起こされる胃腸管に対する損傷の治療に用いるための、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 5 1】

口腔中の上皮細胞増殖が刺激される、請求項13記載の方法。

【請求項 5 2】

アミノ酸50位におけるバリンがイソロイシンで置き換えられた、SEQ ID NO: 4の変種を含む、ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0 0 0 1】

1. 背景

1.1 発明の分野

本発明は、一般に、胃腸増殖因子ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを含む組成物、ならびにそれらの使用方法に関する。

【0 0 0 2】

1.2 配列表

配列表を提供する。

【背景技術】

40

【0 0 0 3】

1.3 背景

電離放射線療法および細胞傷害性化学療法は口腔粘膜および胃腸粘膜に対する損傷を生じさせ、これは、依然として、抗腫瘍薬治療を受けている患者にとって重大な問題である。粘膜炎は粘膜の炎症であって、治癒または軽減を意図して用いられる化学療法および放射線療法の使用のため、この患者の集団において特に共通する問題である。（これらの領域に対する）放射線および化学療法で見られる胃腸管に対する粘膜損傷は、陰窩細胞の破壊、絨毛の高さの減少、および胃腸上皮の潰瘍および壊死を含み（Berthrong M, World J Surg 10: 155-170 (1986)（非特許文献1））、これは胃腸粘膜炎および全腸炎を含む障害の基礎となる。患者にとっては、これは腹痛、血の混じった下痢、吸収不良、および、 50

ある場合には、細菌の移動を意味し得る（Guzman et al., J Surg Res 46:104-107 (1989)）（非特許文献2））。加えて、化学療法および電離放射線は、口腔咽頭部および唇の粘膜、および食道の粘膜を含む他の粘膜に影響し得る。同時の放射線および化学療法の組合せ様式療法は、頭部および頸部癌を有する患者において高度に兆候的な口内炎、および小細胞肺癌を持つ患者において食道炎を生じ得ることは周知である。化学療法および放射線療法は、直接的および間接的毒性を通じて口腔粘膜および胃腸粘膜に対する損傷を引き起こす。直接的粘膜炎のメカニズムは、上皮の低粘稠化、炎症、細胞再生の減少、および最終的には潰瘍をもたらす、迅速に分裂する基底上皮細胞の非特異的細胞殺傷である。これらの疼痛病巣もまた、局所的感染および全身感染に対する増大した危険性を生じる。間接的な粘膜傷害性は、直接的粘膜損傷部位における細菌およびウイルス感染を許容する、化学療法誘導骨髄抑制の副産物である。これらの影響の重大さは用量の上昇を妨げ、治療を遅延させ、および用量低下の根拠となり、したがって、癌療法の有効性を制限する。 10

【0004】

化学療法および放射線療法により誘導される（粘膜）胃腸損傷（粘膜炎）に対する予防および治療は、通常、化学療法または放射線療法の最適以下の用量の処方、毒性に続く引き続いての治療コースにおける下方への用量の修正、または中程度の用量または高用量のメトトレキセート後のロイコボリンのような特定の解毒剤の使用を必要とする（Allegra CJ. Antifolates. In: Chabner and Collins, eds. Cancer Chemotherapy: Principles and Practice. Philadelphia, Pa. JP Lippincott Co; 1990:110-153（非特許文献3））。 20

【0005】

胃腸粘膜に対する損傷は、一括して炎症性腸疾患といわれる、胃腸管の慢性炎症性障害にも関連する。サイトカインベースの療法は炎症性腸疾患の治療に利用できる（Bouma and Strober Nature Rev 3:521-533 (2003)）（非特許文献4））。しかしながら、小腸の切除は、しばしば、クローン病のような炎症性腸疾患を有する患者において必要とされる。小腸の外科的切除もまた外傷性損傷、血管のアクシデント、および癌に続いて必要であろう。200cm未満の生存可能な小腸を残す外科的切除は、患者を短腸症候群（SBS）を発症する危険性に曝す。SBSは吸収不良、下痢、体液および電解質の乱れ、および栄養不良によって臨床的に規定される障害である。SBSを有する患者の管理は、しばしば、長期の、一生の長さではないにせよ、非経口栄養補給を必要とする（DiBaise et al., Am J Gastroenterol 99:1823-1832 (2004)）（非特許文献5））。 30

【0006】

したがって、抗腫瘍薬治療に対する許容性を増大させ、炎症性腸疾患を治療する現在の療法を進行させ、および腸の外科的切除後に危険にさらされる消化および吸収プロセスを回復するために、予防的にまたは治療的に用い得る物質を見出す必要がある。

【0007】

【非特許文献1】 Berthrong M, World J Surg 10:155-170 (1986)

【非特許文献2】 Guzman et al., J Surg Res 46:104-107 (1989)

【非特許文献3】 Allegra CJ. Antifolates. In: Chabner and Collins, eds. Cancer Chemotherapy: Principles and Practice. Philadelphia, Pa. JP Lippincott Co; 1990:110-153 40

【非特許文献4】 Bouma and Strober Nature Rev 3:521-533 (2003)

【非特許文献5】 DiBaise et al., Am J Gastroenterol 99:1823-1832 (2004)

【発明の開示】

【0008】

2. 発明の概要

本発明は、部分的には、胃腸増殖因子（GastroIntestinal Proliferative Factor）（GIPF）が胃腸管の上皮細胞の増殖を誘導するという発見に基づく。したがって、GIPF、その断片またはアナログを含む組成物は、化学療法および放射線療法により誘導される粘膜炎を含む胃腸疾患、口腔咽頭部、唇、および食道の粘膜炎、炎症性腸疾患、および創傷、火傷、眼の疾患を含むその他の状態、および上皮細胞の増殖または再生の刺激が望まれる 50

任意の疾患の治療のような、上皮化が望ましい状態の治療に用いることができる。

【0009】

従って、1つの態様において、本発明は治療上有効量のGIPFポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む組成物を対象とする。

【0010】

本発明の組成物は組換えDNA分子、およびそのクローン化遺伝子または縮重変種、特に、対立遺伝子変種のような天然に生じる変種を含むGIPFポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを含む。具体的には、本発明のポリヌクレオチドは、ヒト胎児皮膚mRNAから調製されたcDNAライブラリーから単離されたGIPFポリヌクレオチドに基づく（SEQ ID NO: 2）。

10

【0011】

本発明の組成物はまた、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターのようなベクター、そのようなポリヌクレオチドを含有するように遺伝学的に設計された細胞、およびそのようなポリヌクレオチドを発現するように遺伝学的に設計された細胞も含む。

【0012】

本発明の組成物は、限定されるものではないが、

GIPFポリヌクレオチド、その断片または変種；

SEQ ID NO: 2または3の配列をコードする全長タンパク質を含むポリヌクレオチド（例えば、SEQ ID NO: 4；GIPFwt）；

SEQ ID NO: 5の配列をコードするV5-His-標識したタンパク質を含むポリヌクレオチド（例えば、SEQ ID NO: 6；GIPFt）；

20

SEQ ID NO: 9の支配的成熟（dominant mature）タンパク質コード配列のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（例えば、SEQ ID NO: 10）；

SEQ ID NO: 11の成熟タンパク質コード配列のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（例えば、SEQ ID NO: 12）；

SEQ ID NO: 13のトロンボスポンジンドメインのヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（例えば、SEQ ID NO: 14）；

フューリン（furin）切断部位を欠く支配的成熟タンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を含むSEQ ID NO: 15のポリヌクレオチド（例えば、SEQ ID NO: 16）；

突然変異させたフューリン切断部位を含むGIPFポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むSEQ ID NO: 17のポリヌクレオチド（SEQ ID NO: 18）；および、

30

種々の長さの全長GIPFを含むGIPFポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（SEQ ID NO: 84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、および177）を含む、単離されたポリヌクレオチドを含む。本発明のポリヌクレオチド組成物は、限定されるものではないが、

(a) SEQ ID NO: 2、3、5、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177に記載されたヌクレオチド配列のいずれかの相補体；

(b) SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のいずれかをコードするヌクレオチド配列；

該ポリヌクレオチドに対して少なくとも70%（例えば、75%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、または99%）ポリヌクレオチド配列同一性を有する前記引用のいずれかのポリヌクレオチドの変種（例えば、対立遺伝子変種）であるポリヌクレオチド；

40

前記引用のポリペプチドのいずれかの種ホモログ（例えば、オルソログ）をコードするポリヌクレオチド；または

SEQ ID NO: 4もしくは6のポリペプチドの特異的ドメインまたは切断ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

に対してストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【0013】

本発明は、さらに、前記のポリヌクレオチドの少なくとも断片を含むクローニングまた

50

は発現ベクター、およびこれらの発現ベクターで形質転換された宿主細胞または生物を提供する。有用なベクターは、当技術分野において周知の、プラスミド、コスミド、入ファージ誘導体、ファージミド等を含む。従って、本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、およびポリヌクレオチドを含有する宿主細胞も提供する。一般に、ベクターは少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、都合のよい制限エンドヌクレアーゼ部位、および宿主細胞についての選択マーカーを含有する。本発明によるベクターは発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、および配列決定ベクターを含む。本発明による宿主細胞は原核生物細胞または真核生物細胞であり得、単細胞生物、または多細胞生物の一部であり得る。

【0014】

本発明の薬学的組成物は、限定されるものではないが、SEQ ID NO: 4、6、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のアミノ酸配列を含む群から選択される単離されたポリペプチドを含むポリペプチドを含む。また、本発明のポリペプチドはまた、

(a) 前記SEQ ID NO: 2、3、5、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、177において記載されたヌクレオチド配列を有する任意のポリヌクレオチド；または、

(b) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で (a) のポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチド

によってコードされる生物学的活性を有するポリペプチドも含む。SEQ ID NO: 4、6、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178に列挙された任意のタンパク質配列の生物学的にまたは免疫学的に活性なアナログ、および生物学的等価性を保持するその実質的等価物もまた企図される。本発明のポリペプチドは全体が、または部分的に化学的に合成されたものでよいが、好ましくは本発明の遺伝学的に設計された細胞（例えば、宿主細胞）を用いて組換え手段によって産生される。本発明はSEQ ID NO: 4、6、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、および178のいずれかと少なくとも85%、90%、92%、94%、96%、98%、または99%同一であるポリペプチドを含む。本発明はまた、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸残基がSEQ ID NO: 4、6、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、および178のいずれかの配列と異なるポリペプチドも含む。アミノ酸変化は保存的または非保存的であり得る。

【0015】

また、本発明は、所望のポリペプチドの発現を可能とする条件下で適当な培地中で本発明のGIPFポリペプチドをコードするGIPFポリヌクレオチドの少なくとも断片を含有する発現ベクターを含む宿主細胞を培養する段階、および、培養物から、または宿主細胞からタンパク質またはペプチドを精製する段階を含む、GIPFポリペプチドを産生するための方法に関する。好ましい態様は、そのようなプロセスによって産生されたタンパク質がタンパク質の成熟型または支配的成熟形態を含む。

【0016】

本発明によるポリペプチドは、現在他のタンパク質に適用される種々の慣用的手法および方法で用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドを用いて、ポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生することができる。そのような抗体、特にモノクローナル抗体は、組織中のポリペプチドを検出、または定量するのに有用である。

【0017】

さらなる態様において、本発明は上皮細胞増殖を刺激する方法を対象とする。その方法は、上皮細胞を、治療上有効量のGIPFポリペプチド、その断片またはアナログ、および薬学的に許容される担体を含む組成物と接触させる段階を含む。具体的には、上皮細胞の（細胞保護作用、増殖、および/または分化を含む）刺激を必要とする対象に、治療上有効量の、または予防上有効量のGIPFタンパク質、その断片またはアナログが投与されるであろう。

10

20

30

40

50

【0018】

記載した全ての方法において、上皮細胞をインビトロまたはインビボでGIPFポリペプチドと接触させることができる。

【0019】

哺乳動物対象に、本発明のペプチドと薬学的に許容される担体とを含む治療上有効量の組成物を投与する段階を含む、医学的状态を予防し、治療または緩和する方法もまた提供される。

【0020】

特に、本発明のGIPFポリペプチドを用いて、胃腸陰窩細胞の増殖および/または分化を誘導して、消化管の上皮層を再生することができる。したがって、本発明のGIPFポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、化学療法または放射線療法により誘発される粘膜炎および全腸炎、および炎症性腸疾患の治療に用いることができる。それらは疾病、および、創傷、火傷、眼の疾患を含む状態、および上皮細胞の増殖または再生の刺激が望まれる任意の疾患の治療に用いることもできる。

【0021】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドはまた、胃腸上皮の分化および発生のマーカーとして用いることもできる。

【0022】

本発明の方法はまた、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、および薬学的に許容される担体を含む治療上有効量の組成物を、本明細書に列挙した疾患に関連する症状または傾向を示す哺乳動物対象に投与することを含む、本明細書に列挙した疾患の治療方法も提供する。加えて、本発明は、標的遺伝子産物の全活性を変調する化合物および他の物質、ならびに薬学的に許容される担体を含む組成物を投与する段階を含む、本明細書に列挙した疾病または疾患を治療する方法を包含する。化合物および他の物質は、標的遺伝子/タンパク質の発現レベルまたは標的タンパク質の活性レベルのいずれかにおいて、そのような変調をもたらし得る。具体的には、ヒトを含むがこれに限定されない哺乳動物対象に、本発明のポリペプチドを含む治療上有効量の組成物、または、本発明のGIPFポリペプチドの結合パートナーを含む治療上有効量の組成物を投与する段階を含む、粘膜炎および炎症性腸疾患、創傷を含む医学的状态を予防、治療、または緩和する方法が提供される。特定の疾患または病理のメカニズムは、本発明のポリペプチドまたはこれらの結合パートナーが治療を必要とする個体に有益であるか否かを決めるであろう。

【0023】

本発明は、さらに、前記の方法において有用な薬剤を製造する方法を提供する。

【0024】

本発明は、さらに、試料（例えば、組織または試料）中の本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの存在を検出する方法に関する。そのような方法は、例えば、本明細書に列挙した疾患の予後の評価および診断上の評価の一部として、およびそのような状態に対する素因を示す対象の同定のために利用することができる。

【0025】

本発明は、試料に、ポリペプチドに結合し複合体を形成する化合物を、複合体を形成するのに十分な条件下で、かつ十分な時間接触させる段階、複合体が形成された場合、ポリペプチドが検出されるように、複合体の形成を検出する段階を含む、試料中の本発明のポリペプチドを検出する方法を提供する。

【0026】

本発明はまた、本発明の方法を実行するための、ポリヌクレオチドプローブおよび/またはモノクローナル抗体、ならびに任意で定量標準を含むキットも提供する。さらに、本発明は、薬物の効果を評価し、次いで、上で列挙した疾患の治療のための臨床試験に関連する、患者の進行をモニターするための方法を提供する。

【0027】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの発現または活

性を変調する（すなわち、増加または減少させる）化合物の同定方法も提供する。そのような方法は、例えば、GIPFポリペプチドの治療活性を増強させ、本明細書に列挙した疾患の症状を緩和することができる化合物の同定のために利用することができる。そのような方法は、限定されるものではないが、本発明のポリペプチドと相互作用する（例えば、それに結合する）化合物および他の物質を同定するアッセイ法を含むことができる。

【0028】

本発明は、化合物にポリペプチドを、ポリペプチド/化合物複合体を形成するのに十分な条件下で、および十分な時間接触させる段階、ポリペプチド/化合物複合体が検出された場合、ポリペプチドに結合した化合物が同定されるように、複合体を検出する段階を含む、化合物を同定する方法を提供する。

10

【0029】

化合物に細胞中のポリペプチドを、細胞中のレポーター遺伝子配列の発現を駆動するポリペプチド/化合物複合体を形成するのに十分な時間接触させる段階、および、ポリペプチド/化合物複合体が検出された場合、ポリペプチドに結合する化合物が同定されるように、レポーター遺伝子配列の発現を検出することによって複合体を検出する段階を含む、ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法もまた、提供される。

【0030】

本発明のもう1つの態様は、本明細書に列挙した状態または疾患の治療用のGIPFポリペプチドの送達による遺伝子治療を提供する。

【0031】

関連する態様において、本発明は、本明細書に列挙した疾患を治療するための薬剤の製造における、GIPFポリペプチドの発現を提供する発現制御配列と操作可能に付随したGIPFポリペプチドをコードする遺伝子を含むベクターの使用を対象とする。より詳しくは、本発明は、粘膜炎または炎症性腸疾患を治療するための薬剤の製造における、例えば、以下に記載するような本発明のアデノウイルスベクターの使用を提供する。

20

【0032】

前述の方法および使用に加えて、本発明は、発現制御配列に操作可能に付随したGIPFポリペプチドをコードする遺伝子を含む新規なウイルスベクターを提供する。好ましい態様において、ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである。本発明のウイルスベクターは、前記の任意のGIPFポリペプチドをコードする遺伝子を提供することができる。

30

【0033】

本発明は、さらに、本発明の任意のウイルスベクター、および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。

【0034】

さらに別の局面において、本発明は、B細胞に対してその発現を指令する転写調節配列の制御下にある、天然ヒトGIPFタンパク質、そのアナログまたは断片をコードする核酸を含む導入遺伝子構築物に関する。該導入構築物は、好ましくは、免疫グロブリンκ鎖プロモーターのようなB細胞特異的プロモーターを含む。

【0035】

別の局面において、本発明は、検出可能なレベルの天然ヒトGIPFタンパク質、そのアナログまたは断片をB細胞において産生するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に関し、トランスジェニック哺乳動物はそのゲノム中に安定に組み込まれた、B細胞に対してその発現を指令する転写調節配列に操作可能に連結した天然ヒトGIPFタンパク質、天然ヒトGIPFの生物学的活性を有するそのアナログまたは断片をコードする核酸配列を有する。該転写調節配列は、好ましくは、免疫グロブリンκ鎖プロモーターのようなB細胞特異的プロモーターを含む。限定されるものではないが、非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギまたはウシであってもよい。

40

【0036】

別の局面において、本発明は、（a）B細胞においてGIPFポリペプチドを発現し、かつ上皮細胞の過剰増殖に関連する腸拡張を発症するトランスジェニックマウスに薬物候補を投

50

与する段階、(b) 上皮細胞の過剰増殖に対する候補薬物の効果を評価する段階を含む、本明細書に列挙した疾病または疾患の治療用の薬物候補をスクリーニングする方法に関する。該薬物候補は本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの発現または活性を変調（すなわち、増加または減少させる）し得る。

【0037】

本発明はまた、限定されるものではないが、ヒトを含む哺乳動物対象に、サイトカインと共に、治療上有効量のGIPFポリペプチドを投与する段階を含む、粘膜炎および炎症性腸疾患、および創傷を含む医学的状态を治療、または軽減する方法も含む。

【0038】

別の局面において、本発明は、本発明のポリペプチド、第二の治療剤、例えば、サイトカイン、および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を含む。 10

【0039】

本発明のさらなる局面および利点は、本発明の実施を詳細に説明する以下の記載を考慮すると当業者に明らかであろう。

【0040】

4. 発明の詳細な記載

本発明のポリペプチドを図3に示し、以下で詳細に記載する。

【0041】

SEQ ID NO: 4のGIPFポリペプチドは、未グリコシル化の、ほぼ29kDaの予測される分子質量を有する263アミノ酸タンパク質である。SEQ ID NO: 2はGIPFポリペプチドをコードするcDNAである。最初のメチオニンはSEQ ID NO: 2の位置603で開始し、推定停止コドンはSEQ ID NO: 2の位置1392で始まる。BLASTアルゴリズムでのタンパク質データベースサーチ（参照として本明細書に組み入れられる、Altschul S.F.et al., J.Mol.Evol.36: 290-300 (1993) およびAltschul S.F.et al., J.Mol.Biol.21: 403-10 (1990)）は、SEQ ID NO: 4がSEQ ID NO: 23の幹細胞成長因子A-1 (PCT WO 01/77169 A2からのSEQ ID NO: 10)（図4A）、およびヒトトロンスポンジン1 (SEQ ID NO: 28)（図4B）と相同であることを示す。 20

【0042】

予測されるほぼ20残基のシグナルペプチド (SEQ ID NO: 8) は、SEQ ID NO: 4の残基1から残基20まで延びる。細胞外部分はそれ自体に対して有用である。シグナルペプチド領域は神経ネットワークシグナル (Neural Network Signal) P VI.Iプログラム（参照として本明細書に組み入れられるNielsen et al., Int.J.Neural Syst.8: 581-599 (1997)）を用い、および/または神経ネットワークシグナル (Neural Network Signal) P VI.1プログラム (Nielsen et al., (1997) Int.J.Neural Syst.8, 581-599) を用いて予測された。当業者であれば、現実の切断部位はコンピュータープログラムによって予測されるものとは異なり得ることを認識するであろう。SEQ ID NO: 10は、推定シグナルペプチド (SEQ ID NO: 8) を欠くSEQ ID NO: 4のGIPFポリペプチドである。 30

【0043】

SEQ ID NO: 4に由来するポリペプチドの2つの種はクローン化し、哺乳動物細胞培養で精製されている。SEQ ID NO: 10は、SEQ ID NO: 3のヌクレオチド配列を含むベクター構築物でトランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞の培地から精製されたポリペプチド形態である。SEQ ID NO: 10のポリペプチドは、本明細書においては、GIPFの支配的成熟形態として知られている。SEQ ID NO: 9はSEQ ID NO: 10のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。このポリペプチド形態についてのN末端配列はエドマン分解配列決定を介して決定された (Speicher, D.W.. Methods 6: 248-261 (1994) ; Tempst et al., Methods 6: 248-261 (1994))。SEQ ID NO: 12は、SEQ ID NO: 3を含むベクター構築物でトランスフェクトされたヒト胚腎臓293細胞の培地から単離された成熟ポリペプチド形態である。SEQ ID NO: 11は、SEQ ID NO: 12のポリペプチドをコードする対応するヌクレオチド配列である。エドマン分解配列決定を通じて、SEQ ID NO: 12のポリペプチドはSEQ ID NO: 4の最初の31アミノ酸残基を欠くと判断された。31アミノ 40 50

酸ペプチドはフューリンプロテアーゼ切断のためのコンセンサス部位 (SEQ ID NO: 20) を含む (参照としてその全体を本明細書に組み入れられる、Zhou et al., J Biol Chem 274: 20745-20748 (1999))。

【0044】

Pfamソフトウェアプログラム (参照として本明細書に組み入れられる、Sonnhammer et al., Nucleic Acids Res., Vol.26 (1) pp.320-322 (1998)) を用い、GIPFポリペプチド (SEQ ID NO: 4) は、公知のペプチドドメインに対する相同性を有するドメインにつき調べられた。SEQ ID NO: 4のGIPFポリペプチドはトロンボスポンジタイプ1ドメインを有すると予測される (SEQ ID NO: 13のヌクレオチド配列によってコードされたSEQ ID NO: 14)。SEQ ID NO: 4に含まれるトロンボスポンジタイプ1ドメインに対するPfamスコアは0.0034であり、SEQ ID NO: 4のアミノ酸残基151~206からのものであると予測される。トロンボスポンジドメインはそれ自体に対して有用でありうる。

10

【0045】

eMATRIXソフトウェアパッケージ (Stanford University, Stanford, CA) (参照として本明細書に組み入れられる、Wu et al., J.Comp.Biol., vol.6, pp.219-235 (1999)) を用いることで、SEQ ID NO: 4のGIPFポリペプチドは以下の表に概説されるドメインを有すると予測される、A=アラニン、C=システイン、D=アスパラギン酸、E=グルタミン酸、F=フェニルアラニン、G=グリシン、H=ヒスチジン、I=イソロイシン、K=リシン、L=ロイシン、M=メチオニン、N=アスパラギン、P=プロリン、Q=グルタミン、R=アルギニン、S=セリン、T=スレオニン、V=バリン、W=トリプトファン、Y=チロシン。

20

SEQ ID NO:	p 値	識別番号	eMATRIX ドメインの名称	アミノ酸配列 (位置)
24	8.63e-10	IPB001862A	膜攻撃複合体成分/ パーフォリン/補体C9	PAQCEMSEWSPWG PCS (145-160)
25	9.03e-10	IPB002174A	フューリン様 システインリッチ領域	GKRQRRISAEGSQA CAKGCELCSEVNG CLKCS (26-57)
26	9.80e-08	IPB000433	ZZジンクフィンガー シグニチャー	IEHCEACFSHNFCT KCKP (99-115)

30

【0046】

CHOおよび/または293細胞によって主として産生される支配的成熟または成熟ポリペプチド形態 (各々、SEQ ID NO: 10およびSEQ ID NO: 12) のいずれかの産生を制御するために、合成構築物が作製された。SEQ ID NO: 16は、ベクター系に含まれたヌクレオチド配列であり、その結果、予測シグナルペプチド (SEQ ID NO: 8) と293細胞で産生される主成熟形態 (SEQ ID NO: 10) とが隣接したポリペプチド (SEQ ID NO: 16) が発現される。SEQ ID NO: 17はフューリン-プロテアーゼ切断コンセンサス部位 (SEQ ID NO: 22) に突然変異を含むように部位特異的突然変異誘発 (Weiner et al., Gene 126: 35-41 (1993)) によって産生されたヌクレオチド構築物である。この突然変異は、SEQ ID NO: 20の最初のアルギニン (R) 残基をグルタミン (Q) に変化させる。アルギニンからグルタミンへの突然変異は、293細胞によるGIPFの支配的成熟形態 (SEQ ID NO: 10) の産生を可能とする。

40

【0047】

トロンボスポンジンは、細胞と細胞の間および細胞とマトリックスの間の連絡に関与す

50

る細胞外マトリックスタンパク質のファミリーである (Lawler et al., Curr.Opin.Cell Bio.12: 634-640 (2000))。5を超える異なるトロンボスポンジンが、別個の組織分布パターンで知られている。心臓、軟骨および脳のようないくつかの組織はトロンボスポンジン遺伝子産物の大多数を発現する。トロンボスポンジン-1は血液血小板の主な構成要素である。トロンボスポンジン-1は細胞表面において膜タンパク質およびサイトカインおよび他の可溶性因子と一緒にするように機能するらしい。トロンボスポンジン-1に結合する膜タンパク質はインテグリン、インテグリン関連タンパク質 (CD47)、CD36、プロテオグリカンを含む。トランスフォーミング成長因子 β (TGF β) および血小板由来成長因子もまたトロンボスポンジン-1に結合する。

【0048】

10

トロンボスポンジン-1は多くの異なるドメインを有する大きなタンパク質である。それはアミノおよびカルボキシ末端双方における球状ドメイン、プロコラーゲンと相同の領域、およびトロンボスポンジン (TSP) タイプ1リピート、タイプ2リピート、およびタイプ3リピートと呼ばれる3つのタイプの反復配列モチーフを含有する。TSP1リピートは、補体成分 (C6、C7、C8Aなど)、ADAMTSのような細胞外マトリックスタンパク質、ミンジン、軸索ガイダンス分子様F-スポンジンセマフォリン、およびSC0-スポンジン、およびマラリア原虫 (Plasmodium) のTRAPタンパク質を含む種々の異なるタンパク質で見出されてきた。

【0049】

トロンボスポンジンタイプ1 (TSP1) リピートは細胞増殖、分化、接着、移動および死滅の調節に関与するTGF β 上皮組織を活性化することができる。TSP1は、さらに、タンパク質結合、ヘパリン結合、細胞付着、神経突起成長、増殖の阻害、脈管形成の阻害、およびアポトーシスの活性化に関与する。マラリア原虫スポロゾイト周囲 (CS) タンパク質およびTRAPタンパク質のTSP1ドメインは胞子小体による唾液腺侵入に関係する。

20

【0050】

TSP1配列は保存されたシステイン、密接な間隔のトリプトファン、および塩基性残基のクラスターによって特徴付けられる。TSP1配列の空間的立体配置は、ヘパリンに結合することが示されている2つの β -シートドメインを示す (参照として本明細書に組み入れられる、Kilpelainen et al. (200) J.Biol.Chem.275,13564-13570)。同様な空間的折り畳みがヘパリン結合成長関連分子 (HB-GAM) につき記載されている。HB-GAMは細胞分裂誘起性および神経突起成長促進タンパク質プレイトロフィン；骨芽細胞特異的因子-1；ヘパリン結合神経栄養因子；およびヘパリンアフィン調節ペプチドと同一である。HB-GAMの発現は、軸索管およびシナプスの細胞外マトリックスに、また脳の外側の基底膜に関連し、軟骨マトリックスにあることが示されていた。最近、N-シンデカン脳におけるHB-GAMに対する受容体であることが示されており、海馬長期増強の調節において、記憶および学習に関連する脳可塑性の形態で役割を演じていると提唱されている。従って、TSP1含有タンパク質は成長プロモーターとして作用することができ、GIPF活性を示しうる。

30

【0051】

加えて、骨髄で合成され、細胞外マトリックスに沈積するトロンボスポンジンは、一次多能性前駆細胞に対する、ならびに赤血球、顆粒球、および巨核球細胞系に委ねられた造血系前駆細胞に対する細胞接着分子として機能する。したがって、トロンボスポンジンは血液細胞の発生で重要であり得る (参照として本明細書に組み入れられる、Long and Dixit (1990) Blood 75,2311-2318)。

40

【0052】

本発明のGIPFポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いて、胃腸陰窩細胞の増殖または分化を誘導することができる。それらは、化学療法および放射線療法誘発粘膜炎症を含む胃腸障害、口腔咽頭部、唇および食道の粘膜炎症、炎症性腸疾患、および創傷、火傷、眼の疾患、ならびに上皮細胞の増殖または再生の刺激が望まれるいずれかの障害を含む他の疾患の治療のような、上皮化が必要とされる疾患の治療で用いることもできる。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、さらに、移植された組織を必要とする患者を助け

50

ることができる新しい組織および器官を作り出すのに利用することができる。

【0053】

4.1 定義

本発明を記載するには、以下の用語を使用し、かつ用語を次のように定義することを意図する。

【0054】

本明細書において、および添付の特許請求の範囲において用いるように、単数形「1つの (a, an)」および「その (the)」は、文脈が明瞭にそうでないことを指示しない限り、複数の参照を含むことに注意しなければならない。

【0055】

用語「GIPF」とは、上皮細胞に対して特に活性である「胃腸増殖因子」をいう。

【0056】

本発明によると、用語「GIPFタンパク質」または「GIPFポリペプチド」とは、アミノ酸 Met¹~Ala²⁶³によって規定される全長タンパク質 (SEQ ID NO: 4)、その断片およびアナログをいう。

【0057】

本明細書において用いる用語「全長GIPF」、「GIPFの長い形態」、「野生型GIPF」、または「天然GIPF」は、全て、図1Bに示したように、263アミノ酸残基 (SEQ ID NO: 4) を含有するポリペプチドをいう。

【0058】

用語「GIPFwt」または「hGIPF」とはヒト野生型全長GIPFポリペプチド (SEQ ID NO: 4) をいい；用語「GIPFt」とはヒトGIPFのV5His6-標識したポリペプチド (SEQ ID NO: 6) をいい；および「mGIPFt」とはマウスからのV5His6-標識したGIPF形態 (SEQ ID NO: 69) をいう。変種GIPFポリペプチドはSEQ ID NO: 4の位置50におけるバリンよりもイソロイシンを有する。

【0059】

用語「断片」とは、GIPFの全配列を含まない天然GIPFに由来するポリペプチドをいう。そのような断片は全長分子の切断型バージョン、例えば、SEQ ID NO: 9および12、ならびに内部欠失ポリペプチド、例えば、SEQ ID NO: 16であり得る。GIPF断片は、本明細書において記載のように、インビトロおよび/またはインビボでの上皮細胞の増殖に対するGIPFの効果によって決定されるGIPF生物活性を有し得る。

【0060】

用語「アナログ」とは参照分子の誘導体をいう。アナログは前記のように生物学的活性を保有し得る。一般に、用語「アナログ」とは、該修飾が活性を消失させない限り、天然分子に対して一つまたは複数のアミノ酸の付加、置換（一般には、天然では保存的）および/または欠失を有する天然ポリペプチドの配列および構造を有する化合物をいう。SEQ ID NO: 18はGIPFアナログの例である。好ましくは、アナログは少なくとも親分子と同一の生物学的活性を有し、親分子よりも増強された活性さえ示し得る。ポリペプチドアナログを作製する方法は当技術分野において公知である。特に好ましいアナログは天然で保存的である置換、すなわち、それらの側鎖に関連するアミノ酸のファミリー内で起こる置換を含む。具体的には、アミノ酸は、一般には、4つのファミリーに分けられる：（1）酸性：アスパルテートおよびグルタメート；（2）塩基性：リシン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および（4）非荷電極性：グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時々、芳香族アミノ酸として分類される。例えば、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの単独の置換、グルタメートによるアスパルテートの単独の置換、セリンによるスレオニンの単独の置換、あるいはアミノ酸の構造的に関連するアミノ酸での同様な保存的置換はGIPFの生物学的活性を保持するであろうと合理的に予測できる。

10

20

30

40

50

【0061】

対象となる活性を無くすことなく、どのアミノ酸残基を置換、付加、または欠失させ得るか決定する際の指標は、特定のポリペプチドの配列を相同ペプチドの配列と比較し、次いで、高相同性の領域（保存された領域）でなされたアミノ酸配列の変化の数を最小化することによって、あるいはアミノ酸をコンセンサス配列で置き換えることによって見出すことができる。

【0062】

または、これらの同一または同様なポリペプチドをコードする組換えアナログは遺伝子コードにおける「冗長性」を利用することによって合成し、または選択することができる。種々の制限部位を生じるサイレント変化のような種々のコドン置換を導入して、プラスミドまたはウイルスベクターへのクローニング、あるいは特定の原核生物または真核生物系における発現を最適化することができる。ポリヌクレオチド配列における突然変異は、ポリペプチドに反映されることも、あるいはポリペプチドのいずれかの部分の特性を修飾するポリペプチドに付加された他のペプチドのドメインに反映されることもあり、リガンド結合アフィニティー、鎖間アフィニティー、または分解/代謝回転率のような特徴を変化させる。

【0063】

好ましくは、アミノ酸「置換」は、1つのアミノ酸の、同様な構造および/または化学的特性を有するもう1つのアミノ酸での置換、すなわち、保存的アミノ酸置換の結果である。「保存的」アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および/または両親媒性といった性質の類似性に基づいてなすことができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸はアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンを含み；極性中性アミノ酸はグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含み；正に荷電した（塩基性）アミノ酸はアルギニン、リシン、およびヒスチジンを含み；および負に荷電した（酸性）アミノ酸はアスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。「挿入」または「欠失」は、好ましくは、約1~20アミノ酸、より好ましくは1~10アミノ酸の範囲にある。許容される変動は、組換えDNA技術を用いてポリペプチド分子におけるアミノ酸の挿入、欠失、または置換を系統的に行い、次いで、得られた組換え変種を活性につきアッセイすることによって実験的に決定することができる。

【0064】

または、機能の改変が望まれる場合、挿入、欠失または非保存的改変を作製して、改変されたポリペプチドを作り出すことができる。そのような改変は、例えば、本発明のポリペプチドの生物学的機能または生化学的特徴の一つまたは複数を改変することができる。例えば、そのような改変により、リガンド結合親和性、鎖間親和性、または分解/代謝回転率のようなポリペプチド特徴を変化させてもよい。さらに、そのような改変は、発現に関して選択された宿主細胞における発現、スケールアップなどに良好に適したポリペプチドを作り出すように選択することができる。例えば、ジスルフィドブリッジを排除するためには、システイン残基を欠失させてもよく、あるいは別のアミノ酸残基で置換してもよい。

【0065】

用語「誘導体」とは、通常はヒトタンパク質で起こらない、ユビキチン化、（例えば、放射性核種または種々の酵素での）標識、ペグ化（ポリエチレングリコールでの誘導体化）のような共有結合によるポリマー付着、およびオルニチンのようなアミノ酸の化学合成による挿入または置換のような技術によって化学的に修飾されたポリペプチドをいう。

【0066】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」とは、アミノ酸残基のポリマーをいい、産物の最小長に制限されない。該用語は、特に断りのない限り、アミノ酸の配列を変化させないポリペプチドの修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、およびリン酸化形態を含む。ポリペプチドまたはタンパク質は、本発明の目的では、合成によりまたは組換えによ

10

20

30

40

50

り產生することができ、かつ天然源から単離することができる。

【0067】

「精製された」および「単離された」とは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに言及する場合、示された分子が同一タイプの他の生物学的高分子の実質的非存在下で存在することを意味する。本明細書において用いる用語「精製された」は、好ましくは、同一タイプの生物学的高分子の少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、なおより好ましくは少なくとも95重量%、および最も好ましくは少なくとも98重量%が試料に存在することを意味する。1つの態様において、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それが存在する示された生物学的高分子の少なくとも95重量%を構成するように精製されるが、水、緩衝液、および他の小分子、特に、1000ダルトン未満の分子量を有する分子が存在し得る。 10

【0068】

「特定のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド」とは、本ポリペプチドをコードしない他の核酸分子を実質的に含まない核酸分子をいい；しかしながら、該分子は組成の基本的特徴に有害に影響しないいくつかのさらなる塩基または部分を含むことができる。

【0069】

用語「天然に生じるポリペプチド」とは、遺伝子的に作製されなかった細胞によって生じたポリペプチドをいい、特に、限定されるものではないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化を含むポリペプチドの翻訳後修飾から生起する種々のポリペプチドが考えられる。 20

【0070】

用語「翻訳されたタンパク質のコーディング部分」とは、いずれのリーダー配列またはプロセッシング配列も含み得る全長タンパク質にコードする配列を意味する。

【0071】

用語「支配的成熟タンパク質コード配列」とは、いずれのリーダー/シグナル配列のないペプチドまたはタンパク質をコードする配列をいう。「支配的成熟タンパク質部分」とは、リーダー/シグナル配列のないタンパク質のその部分をいう。「成熟」形態とは、リーダー/シグナル配列およびフューリン切断部位を欠くGIPFポリペプチドをいう。ペプチドは細胞におけるプロセッシングの間に除去されたリーダー配列および/またはフューリン切断部位を有することができるか、あるいはタンパク質は合成により、あるいは成熟タンパク質コード配列についてのみコードするポリヌクレオチドを用いて產生されたものであってよい。成熟または支配的成熟タンパク質部分は最初のメチオニン残基を含んでも含まなくてもよいと考えられる。最初のメチオニンは、しばしば、ペプチドのプロセッシングの間に除去される。 30

【0072】

本明細書において用いる用語「単離された」とは、天然源において核酸またはポリペプチドと共に存在する少なくとも1つの他の成分（例えば、核酸またはポリペプチド）から分離された核酸またはポリペプチドをいう。1つの態様において、核酸またはポリペプチドは溶媒、緩衝液、鉄、またはその溶液に通常存在する他の成分のみの（もしあれば）存在下で見出される。用語「単離された」および「精製された」は、それらの天然源に存在する核酸またはポリペプチドを含まない。 40

【0073】

用語「組換え」とは、ポリペプチドまたはタンパク質をいうのに本明細書において用いる場合、ポリペプチドまたはタンパク質が組換え（例えば、微生物、昆虫、または哺乳動物）発現系に由来することを意味する。「微生物」とは、細菌または真菌（例えば、酵母）発現系で作製された組換えポリペプチドまたはタンパク質をいう。生成物として、「組換え微生物」とは、天然内因性物質を実質的に含まず、かつ関連天然グリコシル化を伴わないポリペプチドまたはタンパク質を規定する。ほとんどの細菌培養、例えば、大腸菌（E.coli）で発現されたポリペプチドまたはタンパク質はグリコシル化修飾を含まず；酵母 50

で発現されたポリペプチドまたはタンパク質は哺乳動物細胞で発現されたものとは一般に異なるグリコシル化パターンを有するであろう。

【0074】

「組換えポリペプチド」は、本明細書において記載の組換えDNA技術によって調製されたポリペプチドを意図する。一般には、後にさらに記載するように、所望のポリペプチドにつきコードする遺伝子をクローン化し、次いで、形質転換された生物で発現させる。宿主生物は外来性遺伝子を発現して、発現条件下でポリペプチドを産生する。または、内因性ポリペプチドのプロモーター制御発現は、組換えポリペプチドを与えるよう改変することができる。

【0075】

用語「活性な」とは、いずれかの天然に生じるポリペプチドの生物学のおよび/または免疫学的活性を保有するポリペプチドの形態をいう。本発明によると、用語「生物学に活性な」または「生物学活性」とは、天然に生じる分子の構造的、調節的または生化学的機能を有するタンパク質またはペプチドをいう。同様に、「生物学に活性な」または「生物学活性」とは、適当な動物または細胞において特異的生物学の応答を誘導し、特異的抗体に結合する、天然、組換えまたは合成GIPFペプチド、またはそのいずれかのペプチドの能力をいう。

【0076】

用語「分泌された」は、膜をまたがって、または膜を通して輸送されるタンパク質を含み、輸送には、アミノ酸が適当な宿主細胞で発現する場合の、そのアミノ酸配列中のシグナル配列による輸送が含まれる。「分泌された」タンパク質は、非限定的に、それらが発現される細胞から全部（例えば、可溶性タンパク質）または部分的に（例えば、受容体）分泌されたタンパク質を含む。「分泌された」タンパク質は、非限定的に、小胞体の膜をまたがって輸送されるタンパク質も含む。「分泌された」タンパク質は非典型的シグナル配列（例えば、インターロイキン-1 β 、Krasney, P.A. and Young, P.R. (1992) Cytokine 4 (2) : 134-143参照）および損傷した細胞から放出された因子（例えば、インターロイキン-1受容体アンタゴニスト、Arend, W.P. et al. (1998) Annu. Rev. Immunol. 16 : 27-55参照）を含有するタンパク質を含むことも意図する。

【0077】

本明細書において用いる用語「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」とは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを問わず、いずれの長さのヌクレオチドのポリマー形態もいう。この用語は分子の一次構造のみをいい、したがって、二本鎖および一本鎖DNAおよびRNAを含む。それは公知のタイプの修飾、例えば、当技術分野において公知の標識、メチル化、「キャップ」、一つまたは複数の天然のヌクレオチドのアナログによる置換、ポリヌクレオチド内修飾、例えば、非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど）および荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）によるもの、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシンなどを含む）のようなペンドント部分を含むもの、インターカレーター（例えば、アクリジン、プソラレンなど）によるもの、キレート（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属など）を含むもの、アルキレーターを含むもの、修飾された結合によるもの（例えば、 α アノマー核酸など）、ならびにポリヌクレオチドの非修飾形態を含む。一般に、本発明によって提供される核酸セグメントはゲノムおよび短いオリゴヌクレオチドリンカーの断片から、または一連のオリゴヌクレオチドから、または個々のヌクレオチドから組み立てることができ、微生物もしくはウイルスオペロンまたは真核生物遺伝子に由来する調節エレメントを含む組換え転写ユニットで発現され得る合成核酸を提供する。

【0078】

用語「オリゴヌクレオチド断片」または「ポリヌクレオチド断片」、「部分」、または「セグメント」または「プローブ」または「プライマー」は互換的に用いられ、少なくとも約5ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約7ヌクレオチド、より好ましくは少なく

10

20

30

40

50

とも約9ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約11ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも約17ヌクレオチドであるヌクレオチド残基の配列をいう。断片は好ましくは約50ヌクレオチド未満、好ましくは約200ヌクレオチド未満、より好ましくは約100ヌクレオチド未満、より好ましくは約50ヌクレオチド未満、最も好ましくは約30ヌクレオチド未満である。好ましくは、プローブは約6ヌクレオチド～約200ヌクレオチド、好ましくは約15～約50ヌクレオチド、より好ましくは約17～30ヌクレオチド、最も好ましくは約20～25ヌクレオチドである。好ましくは、断片はポリメラーゼ鎖反応（PCR）、種々のハイブリダイゼーション手法またはマイクロアレイ手法で用いることができ、mRNAまたはDNA分子の同一または関連部分を同定または増幅する。断片またはセグメントは本発明の各ポリヌクレオチド配列を一意的に同定することができる。好ましくは、断片はSEQ ID NO: 1、2、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177の部分に実質的に同様な配列を含む。 10

【0079】

プローブは、例えば、Walsh et al. (Walsh, P.S. et al., 1992, PCR Methods Appl 1: 241-250) によって記載されているように、特定のmRNA分子が細胞または組織に存在するかどうかを決定するために、あるいは染色体DNAからの同様な核酸配列を単離するのに用いることができる。それらはニックトランスレーション、クレノウフィルイン反応、PCR、または当技術分野において周知の他の方法によって標識することができる。本発明のプローブ、それらの調製および/または標識は、参照として共にその全体を本明細書に組み入れられる、Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; または Ausbel, F.M. et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY に詳しく述べられている。 20

【0080】

本発明の核酸配列はSEQ ID NO: 1、2、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177の核酸配列のいずれかからの配列情報も含む。配列情報は、SEQ ID NO: 1、2、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177の配列情報を一意的に同定し、または表すSEQ ID NO: 1、2、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177のセグメントであり得る。1つのそのようなセグメントは20量体核酸分子であり得る。なぜならば、20量体がヒトゲノムに十分にマッチする確率は1/300だからである。ヒトゲノムにおいて、染色体の1つの組には30億塩基対がある。 4^{20} の可能性がある20量体が存在するので、ヒト染色体の1組に存在する塩基対よりも300倍多い20量体が存在する。同一分析を用い、17量体がヒトゲノムに十分にマッチする確率はほぼ1/5である。これらのセグメントを発現実験のためにアレイで用いる場合、15量体セグメントを用いることができる。15量体が、発現された配列に十分にマッチする確率もまたほぼ1/5である。なぜならば、発現される配列が含む配列は、全ゲノム配列の約5%未満だからである。 30

【0081】

同様に、単一ミスマッチを検出するための配列情報を用いる場合、セグメントは25量体であり得る。25量体が単一ミスマッチにてヒトゲノムに出現するであろう確率は、全マッチ ($1 \div 4^{25}$) についての確率 $\times$ 各ヌクレオチド位置 (3×25) におけるミスマッチの増大した確率の乗算によって計算される。単一ミスマッチを有する18量体が発現実験用のアレイで検出できる確率はほぼ1/5である。単一ミスマッチを有する20量体がヒトゲノムで検出できる確率はほぼ1/5である。 40

【0082】

用語「オープンリーディングフレーム」、「ORF」は、いずれの停止コドンも持たないアミノ酸をコードする一連のヌクレオチドトリプレットを意味し、タンパク質へ翻訳可能な配列である。

【0083】

用語「操作可能に連結した」または「操作可能に付随した」とは、核酸配列に機能的に関連することをいう。例えば、プロモーターがコード配列の転写を制御するならば、該プ 50

ロモーターはコード配列に操作可能に付随し、または操作可能に連結している。操作可能に連結した核酸配列は連続的であり、かつ同一リーディングフレームに存在し得るが、ある種の遺伝子エレメント、例えば、リプレッサー遺伝子はコード配列に連続的に連結しないが、依然として、コード配列の転写/翻訳を制御する。

【0084】

用語「組換えDNA分子」または「組換えポリヌクレオチド」は、本明細書において、その起源または操作により（1）天然ではそれが付随するポリヌクレオチドの全てまたは部分に付随しない、（2）天然ではそれが連結するもの以外のポリヌクレオチドに連結した（3）天然では生じない、ゲノム、cDNA、半合成または合成起源のポリヌクレオチドをいう。したがって、この用語は「合成により誘導された」核酸分子を含む。

10

【0085】

用語「相補的」または「相補性」とは、塩基対合によるポリヌクレオチドの天然結合をいう。例えば、配列5'-AGT-3'は相補的配列3'-TCA-5'に結合する。2つの一本鎖分子の間の相補性は、核酸の一部のみが結合するように「部分的」であってもよく、あるいは、全相補性が一本鎖分子の間に存在するように「完全」であってもよい。核酸ストランド間の相補性の程度は、核酸ストランド間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して有意な効果を有する。

【0086】

用語「ストリンジェント」は、当技術分野においてストリンジェントとして共通に理解されている条件をいうのに用いる。ストリンジェントな条件は高度にストリンジェントな条件（すなわち、65℃における0.5M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、1mM EDTAにおけるフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーション、および68℃における0.1×SSC/0.1% SDS中での洗浄）、および中程度にストリンジェントな条件（すなわち、42℃における0.2×SSC/0.1% SDS中での洗浄）を含み得る。他の例示的なハイブリダイゼーション条件は実施例において本明細書に記載される。

20

【0087】

デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの場合において、さらなる例示的なストリンジェントハイブリダイゼーション条件は37℃における（14塩基オリゴヌクレオチド用）、48℃における（17塩基オリゴヌクレオチド用）、55℃における（20塩基オリゴヌクレオチド用）、および60℃における（23塩基オリゴヌクレオチド用）6×SSC/0.05%ピロ硫酸ナトリウム中での洗浄を含む。

30

【0088】

本明細書において用いるように、「実質的に同等な」は、一つまたは複数の置換、欠失、または付加によって参照配列から変化した、ヌクレオチドおよびアミノ酸双方の配列、例えば、突然変異体配列をいうことができ、その正味の効果は参照および本配列の間で有害な機能的非類似性をもたらさない。典型的には、そのように実質的に同等な配列は約35%以下（すなわち、対応する参照配列と比較して実質的に同等な配列における個々の残基の置換、付加、および/または欠失の数は、実質的に同等な配列における残基の合計数で割ると約0.35以下である）だけ本明細書において列挙されたものの1つから変化する。そのような配列は列挙された配列に対して65%配列同一性を有するといわれる。1つの態様において、本発明の実質的に同等な、例えば、突然変異体配列は30%以下だけ（70%配列同一性）；この態様の変形においては、25%以下だけ（75%配列同一性）；およびこの態様のさらなる変形においては、20%以下だけ（80%配列同一性）、およびこの態様のさらなる変形においては、10%以下だけ（90%配列同一性）、およびこの態様のさらなる変形においては、5%以下だけ（95%配列同一性）列挙された配列から変化する。本発明による実質的に同等な、例えば、変異体アミノ酸配列は、好ましくは、列挙されたアミノ酸配列に対して少なくとも80%配列同一性、より好ましくは少なくとも90%配列同一性を有する。本発明の実質的に同等なヌクレオチド配列は、例えば、遺伝子コードの冗長性または縮重を考慮し、より低い割合（%）の配列同一性を有してもよい。好ましくは、ヌクレオチド配列は少なくとも約65%同一性、より好ましくは少なくとも約75%同一性、最も好まし

40

50

くは少なくとも約95%同一性を有する。本発明の目的では、実質的に同等な生物学的活性および実質的に同等な発現特徴を有する配列は実質的に同等であると考えられる。同等性を決定する目的では、（例えば、偽停止コドンを作り出す突然変異を介する）成熟配列の切断型は無視すべきである。配列同一性は、例えば、Jotun Hein方法（Hein, J. (1990) Methods Enzymol. 183: 626-645）を用いて決定することができる。配列の間の同一性は、例えば、ハイブリダイゼーション条件を変化させることによって、当技術分野において公知の他の方法によって決定することもできる。

【0089】

用語「ベクター」とは、それに連結されているもう1つの核酸を輸送することができる核酸分子をいう。用語「発現ベクター」は、ベクターによって運ばれた各組換え遺伝子によってコードされるGIPFタンパク質を合成することができるプラスミド、コスミドまたはファージを含む。好ましいベクターは、それらに連結される核酸の自律複製および発現が可能なるものである。

【0090】

用語「形質転換」とは、DNAが、染色体外エレメントとして、または染色体組込みによってのいずれかにより複製可能であるように、DNAを適当な宿主細胞に導入することを意味する。

【0091】

用語「トランスフェクション」とは、どのコード配列も実際に発現されるか否かを問わず、適当な宿主細胞による発現ベクターの取り込みをいう。用語「感染」とは、ウイルスまたはウイルスベクターの使用による適当な宿主細胞への核酸の導入をいう。

【0092】

用語「転写調節エレメント」および「転写調節配列」は、特定の生物における操作可能に連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列をいうために互換的に用いられる。原核生物に適した制御配列は、例えば、プロモーター、任意で、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核生物細胞はプロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナルおよびポリアデニル化シグナルを利用することが公知である。これらの用語は、プロモーター、RNAポリメラーゼの基本的相互作用に必要なコアエレメント、および転写因子、上流エレメント、エンハンサー、および応答エレメントを含む、転写を促進または調節する全てのエレメントを包含することを意図する（Lewin, 「Genes V」 (Oxford University Press, Oxford) pages 847-873）。

【0093】

RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写し、次いで任意でトランス-RNAスプライスされ、コード配列によってコードされるタンパク質へ翻訳される場合に、コード配列は転写および翻訳制御配列の「制御下」にある。

【0094】

用語「組織特異的プロモーター」とは、プロモーターとして供される、すなわち、プロモーターに操作可能に連結した選択されたDNA配列の発現を調節し、B細胞のような特異的細胞において選択されたDNA配列の発現をもたらすヌクレオチド配列を意味する。例示的な態様において、B細胞特異的プロモーターを利用する遺伝子構築物を用いて、B細胞においてGIPFタンパク質またはタンパク質断片の発現を優先的に指令することができる。

【0095】

用語「発現変調断片」、EMFは、操作可能に連結されたORF、または別のEMFの発現を変調する一連のヌクレオチドを意味する。

【0096】

本明細書において用いるように、配列は、該配列の発現がEMFの存在によって改変される場合に、「操作可能に連結された配列の発現を変調する」と言われる。EMFは、限定されるものではないが、プロモーター、およびプロモーター変調配列（誘導性エレメント）を含む。あるEMFのクラスは、特異的調節因子または生理学的事象に応答して、操作可能に連結されたORFの発現を誘導する核酸断片である。

【0097】

用語「組換え発現ビヒクルまたはベクター」とは、DNA（RNA）配列からポリペプチドを発現するための、プラスミドまたはファージまたはウイルスまたはベクターをいう。発現ビヒクルは以下のアセンブリーを含む転写単位を含むことができる：（1）遺伝子発現において調節役割を有する遺伝子エレメント、例えば、プロモーターまたはエンハンサー、（2）mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される構造またはコード配列、および（3）適当な転写開始および終止配列。酵母または真核生物発現系で用いることを意図した構造単位は、好ましくは、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能とするリーダー配列を含む。または、組換えタンパク質がリーダー配列または輸送配列なしで発現される場合、それはアミノ末端メチオニン残基を含むことができる。この残基は、最終産物を提供するために、引き続いて、発現された組換えタンパク質から切断されることもあり、されないこともある。

【0098】

用語「組換え発現系」とは、染色体DNAに安定に組み込まれた組換え転写単位を有するか、または組換え体転写単位を染色体外に運ぶ、宿主細胞を意味する。本明細書において規定される組換え発現系は、発現させるべきDNAセグメントまたは合成遺伝子に連結された調節エレメントの誘導に際して、異種ポリペプチドまたはタンパク質を発現するであろう。この用語は、安定に組み込まれ、遺伝子発現において調節役割を有する組換え遺伝子エレメント、例えば、プロモーターまたはエンハンサーを有する宿主細胞も意味する。本明細書において規定される組換え発現系は、発現させるべき内因性DNAセグメントまたは遺伝子に連結された調節エレメントの誘導に際して、細胞に対して内因性であるポリペプチドまたはタンパク質を発現するであろう。細胞は原核生物または真核生物であり得る。

【0099】

用語「導入遺伝子」とは、それが導入されるトランスジェニック動物または細胞に対して部分的にまたは全部が異種である、すなわち、外来性である、あるいはそれが導入されるトランスジェニック動物または細胞の内因性遺伝子に対して相同であるが、それが挿入される（例えば、それが天然遺伝子とは異なる位置に挿入される）細胞のゲノムを改変するように動物のゲノムに挿入されるよう設計された、または挿入された核酸配列をいう。導入遺伝子は、一つまたは複数の転写調節配列、および選択された核酸の最適な発現に必要であり得るイントロンのようないずれかの他の核酸に操作可能に連結できる。

【0100】

従って、「導入遺伝子構築物」とは、導入遺伝子を含む、および、任意で、宿主生物のゲノムへの挿入用の導入遺伝子の一般的操作で有用であり得る、転写により調節される配列、ポリアデニル化部位、複製起点、マーカー遺伝子などのような他の核酸配列を含む核酸をいう。

【0101】

用語「トランスジェニック」は、本明細書において、例えば、動物または構築物の、導入遺伝子を保有する特性を記載する形容詞として用いられる。例えば、本明細書において用いるように、「トランスジェニック生物」は、動物の細胞の一つまたは複数が、当技術分野において公知のトランスジェニック技術によるなどして、ヒト介入によって導入された異種核酸を含有するいかなる動物、好ましくは非ヒト哺乳動物である。核酸は、細胞の前駆体への導入によって、マイクロインジェクションによるなどの慎重な遺伝子操作によって、あるいは組換えウイルスの感染によって直接的にまたは間接的に細胞に導入される。核酸は、染色体内に組み込んでもよく、あるいは染色体外で複製するDNAであってもよい。本明細書において記載するトランスジェニック動物においては、導入遺伝子は細胞にGIPFタンパク質を発現させ、または過剰発現させる。

【0102】

用語「多能性」とは、成体生物に存在する、多数の分化細胞型に分化する細胞の能力をいう。多能性細胞は、全能性細胞と比較してその分化能力が制限されている。

【0103】

10

20

30

40

50

用語「胚性幹細胞（ES）」とは、生殖細胞を含む、胚または成体において多くの分化細胞型を生み出すことができる細胞をいう。用語「生殖系幹細胞（GSC）」とは、配偶子の産生のための生殖細胞の定常的かつ連続的源を提供する原始的な幹細胞に由来する幹細胞をいう。用語「原始的な生殖細胞（PGC）」とは、特に、生殖細胞および他の細胞に分化する能力を有する胚形成の間における卵黄包、腸間膜、または生殖隆起からの他の細胞系とは別の、細胞セットの小さな集団をいう。PGCは、GSCおよびES細胞が由来する源である。PGC、GSCおよびES細胞は自己再生が可能である。したがって、これらの細胞は、生殖細胞を集団化し、成体特殊化器官を含む複数の終期分化細胞を生み出すだけでなく、それら自体を再生させることができる。用語「全能性」とは、成体生物の細胞型の全てに分化する細胞の能力をいう。用語「多能性」とは、成体生物に存在する多数の分化細胞型に分化する細胞の能力をいう。多能性細胞は、全能性細胞と比較してその分化能力が制限されている。

10

【0104】

用語「創始系統」および「創始動物」とは、導入遺伝子が加えられた胚の成熟産物である動物、すなわち、DNAが挿入された胚から成長し、一つまたは複数の代用宿主に移植された動物をいう。

【0105】

用語「子孫」および「トランスジェニック動物の子孫」とは、元来形質転換された哺乳動物に引き続く各世代のいずれかの子孫および全ての子孫をいう。

【0106】

20

用語「非ヒト哺乳動物」とは、ヒトを除いた哺乳類の全てのメンバーをいう。「哺乳動物」とは、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシおよび高等霊長類のような、ヒト、家畜および農場動物、および動物園の動物、競技用動物、またはペットの動物を含む哺乳動物として分類されるいずれの動物もいう。

【0107】

用語「処置する」または「処置」とは、治療的手段とともに予防的または防止的手段をいい、目的は、化学療法または放射線療法誘発粘膜炎のような望まない生理学的変化または疾患を防止する、または緩和することである。本発明の目的では、有益なまたは望まれる臨床的結果は、限定されるものではないが、検出可能であるかまたは検出不能であるかを問わず、疾病の症状の軽減、疾病の程度の減少、疾病の安定化された状態を含む。

30

【0108】

「障害」とは、本発明のトランスジェニック動物モデルを用いて同定された分子での処置により利益を受けるであろう任意の状態である。これは、問題とされる障害に対して動物に素因となる病理学的状態を含む慢性および急性障害または疾患を含む。本明細書において処置すべき障害の非限定的例は粘膜炎、炎症性腸疾患および皮膚病巣を含む。本発明に従って治療すべき好ましい障害は粘膜炎である。

【0109】

「炎症性腸疾患（IBD）」は、本明細書において、小腸および大腸のいずれかまたは双方の特発性または慢性の炎症性疾患をいい、クローン病、潰瘍性結腸炎、感染物質によって引き起こされたIBD、および抗生物質関連IBDをいう。

40

【0110】

「粘膜炎」とは、本明細書において、口腔咽頭部および唇、食道、および大腸および小腸を含む消化管の粘膜の炎症をいう。

【0111】

「短腸症候群」または「SBS」は、本明細書において、有意な長さの小腸の解剖学的または機能的喪失に由来する栄養吸収不良の状態をいう。

【0112】

用語「有効量」または「薬学的に有効な量」とは、非毒性であるが、所望の生物学的結果を提供するのに十分な薬剂量をいう。その結果は疾病の症状、疾患または原因の低下および/または軽減、あるいは生物学的系のいずれかの他の所望の改変であり得る。例えば

50

、本発明の方法で用いられるGIPF断片の有効量は、上皮細胞の刺激または増殖を刺激するのに十分な量、好ましくは、化学療法または放射線療法により誘発された粘膜炎、炎症性腸疾患、または上皮細胞増殖が望まれる他の障害に罹った対象において胃腸上皮の再生増大を引き起こすのに十分な量である。そのような量は後述する。いかなる個々の場合における適当な「有効」量も、慣例の実験を用いて当業者によって決定され得る。

【0113】

「薬学的に許容される」または「薬理学的に許容される」とは、生物学的にまたはそうでなければ望ましくないものではない物質を意味し、すなわち、該物質は、いずれかの望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、あるいはそれが含まれる組成物の成分のいずれかと有害に相互作用することなく個体に投与することができる。

10

【0114】

「生理学的pH」または「生理学的範囲のpH」とは、約7.0～8.0（両端を含む）の範囲のpHを意味する。好ましい生理学的pHは約7.2～7.6（両端を含む）の範囲である。

【0115】

本明細書において用いるように、用語「対象」は哺乳動物および非哺乳動物を包含する。哺乳動物の例は、限定されるものではないが、哺乳類のいずれかのメンバー：ヒト、チンパンジーのような非ヒト霊長類、および他の類人猿およびサル種；ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタのような農場動物；ウサギ、イヌおよびネコのような家畜動物；ラット、マウスおよびモルモットなどのようなげっ歯類を含む実験動物を含む。非哺乳動物の例は、限定されるものではないが、鳥類、魚類などを含む。該用語は特定の年齢または性を示さない。

20

【0116】

4.2 本発明の組成物

4.2.1 核酸組成物

本発明は、上皮細胞成長因子ポリペプチド、GIPF、およびGIPFポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物が、陰窩細胞を含む腸上皮細胞の成長および増殖を刺激するという発見に基づく。従って、上皮細胞の増殖または再生の刺激が望まれる疾患の診断および処置のためのこれらの組成物の使用が考えられる。

【0117】

本発明の単離されたポリヌクレオチドは、限定されるものではないが、
SEQ ID NO：2、3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177のヌクレオチド配列のいずれかを含むポリヌクレオチド；

30

（例えば、SEQ ID NO：4、6、8、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178をコードする）SEQ ID NO：3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177の全長タンパク質コード配列を含むポリヌクレオチド；および、

SEQ ID NO：4のポリペプチドの成熟および支配的成熟タンパク質コード配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

を含む。また、本発明のポリヌクレオチドは、限定されるものではないが、

（a）SEQ ID NO：2、3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177のヌクレオチド配列のいずれかの相補体；

40

（b）SEQ ID NO：4、6、8、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のポリペプチドのいずれか1つをコードするポリヌクレオチド；

（c）前記引用のいずれかのポリヌクレオチドの対立遺伝子変種であるポリヌクレオチド；

（d）前記引用のタンパク質のいずれかの種ホモログをコードするポリヌクレオチド；または、

（e）SEQ ID NO：4、6、8、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のポリペプチドの特定のドメインまたは切断ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

50

に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも含む。対象となるドメインは細胞外、膜貫通、または細胞質ドメイン、またはそれらの組合せ、ならびに触媒および基質結合ドメインを含む。

【0118】

本発明のポリヌクレオチドは天然に生じる、あるいは全体または部分的な合成DNA、例えば、cDNAおよびゲノムDNA、およびRNA、例えば、mRNAを含む。ポリヌクレオチドはcDNAのコーディング領域の全てを含むことができるか、あるいはcDNAのコーディング領域の部分を表すことができる。

【0119】

また、本発明は、本明細書に開示されたcDNA配列に対応する遺伝子を含む組成物を提供 10
する。対応する遺伝子は、本明細書に開示された配列情報を用いて公知の方法に従って単離することができる。そのような方法は、適当なゲノムライブラリーまたはゲノム物質の他の源における遺伝子の同定および/または増幅のための開示された配列情報からのプローブまたはプライマーの調製を含む。さらなる5'および3'配列は当技術分野において公知の方法を用いて得ることができる。例えば、SEQ ID NO: 2のポリヌクレオチドのいずれかに対応する全長cDNAまたはゲノムDNAは、SEQ ID NO: 2、3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177のポリヌクレオチドのいずれか、またはプローブとしてその部分を用いて適当なハイブリダイゼーション条件下で適当なcDNAまたはゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。または、SEQ ID NO: 2、3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、 20
96、98、100、102、104、または177のポリヌクレオチドは、適当なゲノムDNAまたはcDNAライブラリーにおける遺伝子の同定および/または増幅を可能とする適当なプライマーの基礎として用いることができる。

【0120】

本発明の核酸配列はEST、およびdbEST、gbpriおよびUniGeneのような一つまたは複数の公のデータベースから得られた（cDNAおよびゲノム配列を含む）配列から組み立てることができる。EST配列は配列情報、代表的な断片またはセグメントの情報、または全長遺伝子についての新規なセグメント情報の同定を提供することができる。

【0121】

また、本発明のポリヌクレオチドは、上に列挙されたポリヌクレオチドと実質的に同等 30
であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明によるポリヌクレオチドは、上に列挙されたポリペプチドに対して、例えば、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または89%、より典型的には少なくとも約90%、91%、92%、93%、または94%、なおより典型的には少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し得る。

【0122】

本発明の核酸配列の範囲内には、SEQ ID NO: 1、6、8、10、12、14、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177のいずれかのヌクレオチド配列、または 40
その相補体に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列断片が含まれ、その断片は約5ヌクレオチドを上回る、好ましくは7ヌクレオチド、より好ましくは9ヌクレオチドを上回る、最も好ましくは17ヌクレオチドを上回る。選択的な（すなわち、本発明のポリヌクレオチドのいずれか1つに特異的にハイブリダイズする）例えば15、17、または20ヌクレオチド、またはそれを上回る断片が意図される。ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズできるプローブは、遺伝子の同一ファミリーにおける他のポリヌクレオチド配列から本発明のポリヌクレオチド配列を識別できるか、あるいは他の種の遺伝子からヒト遺伝子を識別でき、好ましくは、一意的なヌクレオチド配列に基づく。

【0123】

本発明の範囲内に入る配列はこれらの特別な配列に制限されず、その対立遺伝子および 50
種変異（species variation）も含む。対立遺伝子および種変異は、SEQ ID NO: 2、3、5

、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177に提供される配列、その代表的な断片、あるいはSEQ ID NO: 2、3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177に対して少なくとも90%同一、好ましくは95%同一のヌクレオチド配列を、同一種のもう1つの単離体からの配列と比較することによって慣例的に決定することができる。さらに、コドン変動を収容するためには、本発明は本明細書に開示された特異的ORFのように、同一アミノ酸配列をコードする核酸分子を含む。換言すれば、ORFのコード配列において、同一アミノ酸をコードするもう1つのコドンに代えての1つのコドンの置換が明示的に考えられる。

【0124】

本発明の核酸についての最も近い隣接結果 (neighbor result) は、アルゴリズムまたはプログラムを用いてデータベースをサーチすることによって得ることができる。好ましくは、Basic Local Alignment Search Toolを表すBLASTを用いて、局所的配列の整列についてサーチする (Altshul, S.F. J. Mol. Evol. 36: 290-300 (1993) および Altschul S.F. et al. J. Mol. Biol. 21: 403-410 (1990)) 。

【0125】

開示されたポリヌクレオチドおよび種ホモログ (またはオルソログ) も本発明によって提供される。種ホモログを単離し、本明細書において提供された配列から適当なプローブまたはプライマーを作製し、次いで、所望の種からの適当な核酸源をスクリーニングすることによって同定することができる。

【0126】

本発明は開示されたポリヌクレオチドまたはタンパク質の対立遺伝子変種も包含し、すなわち、ポリヌクレオチドによってコードされたものと同一、相同または関連するタンパク質をやはりコードする単離されたポリヌクレオチドの天然に生じる別の形態を包含する。

【0127】

本発明の核酸配列は、さらに、記載された核酸のアナログをコードする配列を対象とする。これらのアミノ酸配列アナログは、天然または変種ポリヌクレオチドへ適当なヌクレオチド変化を導入することによって当技術分野において公知の方法によって調製することができる。アミノ酸配列変種の構築には2つの可変性がある。突然変異の位置および突然変異の性質。アミノ酸配列アナログをコードする核酸は、好ましくは、天然に生じないアミノ酸配列をコードするようにポリヌクレオチドを突然変異させることによって構築される。これらの核酸改変は、異なる種由来の核酸 (可変位置) が、または高度に保存された領域 (定常領域) の異なる部位でなすことができる。そのような位置の部位は、例えば、まず保存的選択で置換 (例えば、異なる疎水性アミノ酸に対する疎水性アミノ酸)、次いで、より距離がある選択で置換 (例えば、荷電アミノ酸に対する疎水性アミノ酸) そして、標的部位で欠失または挿入がなされるように、典型的には連続して修飾される。アミノ酸欠失は、一般には、約1~30残基、好ましくは約1~10残基の範囲であって、典型的には連続している。アミノ酸挿入は、長さが、1~100以上の残基の範囲のアミノ-および/またはカルボキシ末端融合、ならびに単一または複数アミノ酸残基の配列内挿入を含む。配列内挿入は、一般には、約1~10アミノ残基、好ましくは1~5残基の範囲であり得る。末端挿入の例は、異なる宿主細胞における分泌、または細胞内標的化に必要な異種シグナル配列、および発現されたタンパク質を精製するのに有用なポリ-ヒスチジン配列のような配列を含む。

【0128】

好ましい方法において、新規なアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは部位特異的突然変異誘発を介して変化する。この方法は所望のアミノ酸変種をコードするようにポリヌクレオチドを改変するためのオリゴヌクレオチド配列、ならびに変化させるべき部位のいずれか側に安定な二重鎖を形成するための荷電アミノ酸の両側の十分に隣接したヌクレオチドを用いる。一般には、部位特異的突然変異誘発の技術は当業者に周知であり、この技術はEdelman et al., DNA 2: 183 (1983) のような刊行物によって例示される。ポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列において部位特異的变化を生じさせるための多様なかつ有効な方法はZoller and Smith, Nucleic Acids Res.10: 6487-6500 (1982) によって公開された。また、PCRを用いて、新規な核酸のアミノ酸配列変種を作り出すこともできる。少量の鋳型DNAを出発物質として用いる場合、鋳型DNAにおける対応する領域とは配列がわずかに異なるプライマーは所望のアミノ酸変種を作り出すことができる。PCR増幅の結果、プライマーによって特定される位置におけるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド鋳型とは異なる産物DNA断片の集団が得られる。産物DNA断片はプラスミドにおける対応する領域を置き換え、これは、所望のアミノ酸変種をコードするポリヌクレオチドを与える。

【0129】

アミノ酸変種を作り出すためのさらなる技術はWells et al., Gene 34: 315 (1985) に記載されたカセット突然変異誘発技術；および当技術分野において周知の他の突然変異誘発技術、例えば、Sambrook et al., 前記、およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al.における技術である。遺伝子コードの固有の縮重のため、実質的に同一または機能的に同等なアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を、これらの新規な核酸のクローニングおよび発現のために本発明の実施で用いることができる。そのようなDNA配列は、ストリンジェントな条件下で適当な新規な核酸配列にハイブリダイズすることができるものを含む。

【0130】

本発明の好ましいポリペプチド切断型をコードするポリヌクレオチドを用いて、本発明の一つまたは複数のドメインを含むキメラまたは融合タンパク質、および異種タンパク質配列をコードするポリヌクレオチドを作り出すことができる。

【0131】

本発明のポリヌクレオチドは、加えて、上に列挙されたポリヌクレオチドのいずれかの相補体を含む。該ポリヌクレオチドはDNA（ゲノム、cDNA、増幅されたもの、または合成）またはRNAであり得る。そのようなポリヌクレオチドを得るための方法およびアルゴリズムは当業者に周知であり、例えば、所望の配列同一性のポリヌクレオチドを慣例的に単離することができるハイブリダイゼーション条件を決定するための方法を含むことができる。

【0132】

本発明によると、SEQ ID NO: 6または8のいずれか1つ、またはその機能的等価物をコードする支配的成熟または成熟タンパク質コード配列を含むポリヌクレオチド配列を用いて、適当な宿主細胞において、その核酸、またはその機能的等価物の発現を指令する組換えDNA分子を作り出すことができる。また、本明細書において同定されるクローンのいずれかのcDNAインサートも含まれる。

【0133】

本発明によるポリヌクレオチドは、よく確立された組換えDNA技術によって種々の他のヌクレオチド分子のいずれかに連結させることができる（Sambrook J et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY参照）。ポリヌクレオチドに接合させるための有用なヌクレオチド配列は、当技術分野において周知の、ベクターの分類、例えば、プラスミド、コスミド、λファージ誘導体、ファージミドなどを含む。従って、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含めたベクター、および該ポリヌクレオチドを含有する宿主細胞も提供する。一般に、ベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、都合の良い制限エンドヌクレアーゼ部位、および宿主細胞についての選択マーカーを含有する。本発明によるベクターは発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、および配列決定ベクターを含む。本発明による宿主細胞は原核生物細胞または真核生物細胞であり得、単細胞生物、または多細胞生物の部分であり得る。

【0134】

本発明は、さらに、SEQ ID NO: 2、3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177のヌクレオチド配列のいずれか、またはその断

片、またはいずれかの他のGIPFポリヌクレオチドを有する核酸を含む組換え構築物を提供する。1つの態様において、本発明の組換え構築物は、その中にSEQ ID NO: 2、3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177のヌクレオチド配列のいずれか、またはその断片を有する核酸が挿入されたプラスミドまたはウイルスベクターのようなベクターを含む。本発明のORFの1つを含むベクターの場合、ベクターは、さらに、例えば、ORFに操作可能に連結されたプロモーターを含めた調節配列を含むことができる。多数の適当なベクターおよびプロモーターが当業者に公知であり、本発明の組換え構築物を作製するのに市販されている。以下のベクターがその例として提供される。細菌: pBs、ファージスクリプト (phagescript)、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene); pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)。真核生物: pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXTI、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVL (Pharmacia)。1つの態様において、SEQ ID NO: 3の核酸は、実施例に記載されたように、本発明のCκ P2KIベクターに挿入される。

【0135】

本発明の単離されたポリヌクレオチドを、タンパク質を組換えにより産生するために、Kaufman et al., Nucleic Acids Res.19, 4485-4490 (1991) に開示されたpMT2またはpED発現ベクターのような発現制御配列に操作可能に連結することができる。多くの適当な発現制御配列が当技術分野において知られている。組換えタンパク質を発現させる一般的な方法も知られており、R.Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566 (1990) に例示される。本明細書において規定されるように、「操作可能に連結した」は、本発明の単離されたポリヌクレオチドおよび発現制御配列が、タンパク質が、連結されたポリヌクレオチド/発現制御配列で形質転換されている (トランスフェクトされている) 宿主細胞によって発現されるように、ベクターまたは細胞内に位置させることを意味する。

【0136】

プロモーター領域はCAT (クロラムフェニコールトランスフェラーゼ) ベクターまたは選択マーカーを有する他のベクターを用いていずれかの所望の遺伝子から選択することができる。2つの適当なベクターはpKK232-8およびpCM7である。特定の指名された細菌プロモーターはlacI、lacZ、T3、T7、gpt、λ PR、およびtrcを含む。真核生物プロモーターはCMV最初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスメタロチオネイン-Iを含む。適当なベクターおよびプロモーターの選択は十分に当業者のレベル内のものである。一般には、組換え発現ベクターは、宿主細胞の形質転換を可能とする複製起点および選択マーカー、例えば、大腸菌のアンプシリン耐性遺伝子、および酵母 TRP1遺伝子、および下流構造配列の転写を指令するための高度に発現された遺伝子に由来するプロモーターを含むと考えられる。そのようなプロモーターは、とりわけ、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、α因子、酸ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質のような解糖酵素をコードするオペロンに由来し得る。異種構造配列は翻訳開始および終止配列および、好ましくは、ペリプラズム空間または細胞外媒体への翻訳されたタンパク質の分泌を指令することができるリーダー配列と適当な段階で組み立てられる。任意で、異種配列は所望の特徴、例えば、発現された組換え産物の安定化または単純化された精製を付与するアミノ末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。細菌への使用で有用な発現ベクターは、適当な翻訳開始および終止シグナルと共に所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を機能的プロモーターを有する操作可能なリーディング相に挿入することによって構築される。該ベクターは、ベクターの維持を確保し、所望であれば、宿主内での増幅を提供するために一つまたは複数の表現型選択マーカーおよび複製起点を含むであろう。形質転換のための適当な原核生物宿主は大腸菌、枯草菌、サルモネラ菌、およびシュードモナス属 (Pseudomonas)、ストレプトマイセス属 (Streptomyces)、およびスタフィロコッカス属 (Staphylococcus) 内の種々の種を含むが、他のものも選択事項として使用してもよい。

【0137】

代表的であるが非限定的な例として、細菌用の有用な発現ベクターは周知のクローニン

グベクターpBR322 (ATCC 37017) の遺伝子エレメントを含む、市販されているプラスミドに由来する選択マーカーおよび細菌複製起点を含むことができる。そのような市販のベクターは、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) およびGEM 1 (Promega Biotech, Madison, WI, USA) を含む。これらのpBR322「骨格」セクションを適当なプロモーターおよび発現すべき構造配列と組み合わせる。適当な宿主株の形質転換および宿主株の適当な細胞密度までの増殖後、適当な手段（例えば、温度シフトまたは化学的誘導）によって選択されたプロモーターを誘導し、または抑制し、細胞をさらなる期間培養する。細胞は典型的には遠心によって回収され、物理的または化学的手段によって破壊し、得られた粗抽出物はさらなる精製のために保存する。

【0138】

10

本発明の実施における発現ベクターの使用に加えて、本発明は、さらに、対象となるタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列に操作可能に連結されたプロモーターエレメントを含む新規な発現ベクターを含む。そのようなベクターの1つの例はpcDNA/ベクターであり、これは実施例8に記載される。

【0139】

4.2.2 宿主

本発明は、さらに、例えば、本発明のポリヌクレオチドを含有するクローニングベクターまたは発現ベクターであり得る本発明のベクターで遺伝学的に設計された宿主細胞を提供する。例えば、そのような宿主細胞は、公知の形質転換、公知のトランスフェクションまたは感染方法を用いて宿主細胞に導入された本発明の核酸を含むことができる。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であり得る。作製された宿主細胞は、プロモーターを活性化し、形質転換体を選択し、またはGIPF遺伝子を増幅するのに適したように修飾された慣用的栄養培地中で培養することができる。温度、pHなどのような培養条件は、発現用に選択された宿主細胞で以前用いられたものであり、当業者に明らかであろう。本発明はなお、本発明のポリヌクレオチドを発現するように遺伝学的に設計された宿主細胞をさらに提供し、そのようなポリヌクレオチドは、細胞におけるポリヌクレオチドの発現を駆動する宿主細胞に対して異種である調節配列と操作可能に付随している。

20

【0140】

宿主細胞は哺乳動物細胞のような高等真核生物宿主細胞、酵母細胞のような下等真核生物宿主細胞とすることができ、あるいは宿主細胞は細菌細胞のような原核生物細胞であり得る。宿主細胞への組換え構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE、デキストラン修飾トランスフェクション、またはエレクトロポレーションによって行うことができる (Davis, L. et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986))。本発明のポリヌクレオチドの1つを含有する宿主細胞を慣用的方法で用いて、単離された断片 (ORFの場合) によってコードされる遺伝子産物を生じさせることができるか、あるいはそれを用いて、EMFの制御下にある異種タンパク質を産生することができる。

30

【0141】

いずれかの宿主/ベクター系を用いて、一つまたは複数のGIPFポリペプチドを発現させることができる。これらは、限定されるものではないが、HeLa細胞、Cv-1細胞、COS細胞、およびSf9細胞のような真核生物宿主、ならびに大腸菌および枯草菌のような原核生物宿主を含む。最も好ましい細胞は、特定のポリペプチドまたはタンパク質を通常は発現しない、あるいはポリペプチドまたはタンパク質を低い天然レベルで発現するものである。成熟タンパク質は適当なプロモーターの制御下で哺乳動物細胞、酵母、細菌または他の細胞で発現させることができる。また、無細胞翻訳系を使用して、本発明のDNA構築物に由来するRNAを用いてそのようなタンパク質を産生することもできる。原核生物および真核生物宿主で用いられる適当なクローニングおよび発現ベクターは、その開示を参照として本明細書に組み入れられる、Sambrook, et al.によってMolecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York (1989) に記載されている。

40

【0142】

50

種々の哺乳動物細胞培養系を使用して、組換えタンパク質を発現させることができる。哺乳動物発現系の例はGluzman, Cell 23:175 (1981) によって記載されたサル腎臓線維芽細胞のCOS-7系、および適合するベクターを発現することができる他の細胞系、例えば、C127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞系を含む。哺乳動物発現ベクターは複製起点、適当なプロモーター、およびいずれかの必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終止配列、および5'フランキング非転写配列を含むであろう。SV40ウイルスゲノムに由来するDNA配列、例えば、SV40起点、初期プロモーター、エンハンサー、スプライス、およびポリアデニル化部位を用いて、必要な非転写遺伝子エレメントを提供することができる。細菌培養で産生された組換えポリペプチドおよびタンパク質は、通常、細胞ペレットからの最初の抽出、引き続いての、一つまたは複数の脱塩、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィー段階によって単離される。タンパク質リフォールディング段階を、必要であれば、成熟タンパク質の立体配置を完成させるのに用いることができる。最後に、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) を最終精製段階で使うことができる。タンパク質の発現で使われる微生物細胞は、凍結融解サイクリング、音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含むいずれかの慣用的方法によって破壊することができる。

10

【0143】

多数の細胞型はタンパク質の発現用の適当な宿主細胞として働くことができる。哺乳動物宿主細胞は、例えば、サルCOS細胞、ヒト表皮A431細胞、ヒトColo205細胞、3T3細胞、CV-1細胞、他の形質転換された霊長類細胞系、正常な二倍体細胞、一次組織、一次外植体 (primary explant) のインビトロ培養に由来する細胞株、HeLa細胞、マウスL細胞、BHK、HL-60、U937、HaKまたはジャーカット細胞を含む。好ましくは、GIPFタンパク質はチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、およびヒト肺腎臓293細胞で発現される。

20

【0144】

または、酵母のような下等真核生物、または細菌のような原核生物においてタンパク質を産生するのは可能である。潜在的に適当な酵母株はサッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 株、カンジダ (*Candida*)、ピチア パストリス (*Pichia pastoris*)、または異種タンパク質を発現することができるいずれかの酵母株を含む。潜在的に適当な細菌株は大腸菌、枯草菌、サルモネラ菌、または異種タンパク質を発現することができるいずれかの細菌株を含む。タンパク質が酵母または細菌で作製されれば、機能的タンパク質を得るために、例えば、適当な部位のリン酸化またはグリコシル化によってそこで産生されたタンパク質を修飾する必要がある。そのような共有結合付着は公知の化学的または酵素的方法を用いて達成することができる。

30

【0145】

4.2.3 キメラおよび融合タンパク質

本発明はGIPFキメラまたは融合タンパク質も提供する。本明細書において用いるように、GIPF「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は非GIPFポリペプチドに操作可能に連結されたGIPFポリペプチドを含む。「GIPFポリペプチド」とは、GIPFタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、他方、「非GIPFポリペプチド」とは、GIPFタンパク質に対して実質的には相同でないタンパク質、例えば、GIPFタンパク質とは異なり、または異なる生物に由来するタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。GIPF融合タンパク質内で、GIPFポリペプチドはGIPFタンパク質の全てまたは部分に対応することができる。1つの態様において、GIPF融合タンパク質はGIPFタンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。もう1つの態様において、GIPF融合タンパク質はGIPFタンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。なおもう1つの態様において、GIPF融合タンパク質はGIPFタンパク質の少なくとも3つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質内では、用語「操作可能に連結した」は、GIPFポリペプチドおよび非GIPFポリペプチドが相互にインフレームにて融合することを示すことを意図する。非GIPFポリペプチドはGIPFポリペプチドのN末端またはC末端に融合させることが

40

50

できる。

【0146】

1つの態様において、融合タンパク質はGST-GIPF融合タンパク質であり、ここに、GIPF配列はGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）配列のC末端に融合している。そのような融合タンパク質は組換えGIPFポリペプチドの精製を容易にすることができる。もう1つの態様において、融合タンパク質は、そのN末端において異種シグナル配列を含有するGIPFタンパク質である。ある種の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）においては、GIPFの発現および/または分泌は異種シグナル配列の使用を介して増大させることができる。好ましくは、抗V5抗体での容易な検出のために、および実施例に記載されたような迅速な精製のために、GIPFポリペプチドはV5-Hisタグに融合される。

10

【0147】

本発明のGIPFキメラまたは融合タンパク質は標準的な組換えDNA技術によって產生することができる。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片は、例えば、連結のための平滑末端または付着末端、適当な末端を提供するための制限酵素消化、適切には粘着末端のフィリングイン（filling-in）、望ましくない連結を回避するためのアルカリ性ホスファターゼ処理、および酵素連結を使用することによって、慣用的技術に従って一緒にインフレイムにて連結される。もう1つの態様において、融合遺伝子は自動DNAシンセサイザーを含む慣用的技術によって合成することができる。または、遺伝子断片のPCR増幅は、引き続いてアニールし、再度アニールして、キメラ遺伝子配列を作製することができる2つの連続遺伝子断片の間に相補的突出を生起させるアンカープライマーを用いて行うことができる（例えば、Ausubel, et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992参照）。さらに、既に融合部位（例えば、GSTポリペプチド）をコードする多くの発現ベクターが市販されている。融合部分がGIPFタンパク質にインフレイム連結されるように、GIPF-コーディング核酸をそのような発現ベクターにクローン化することができる。

20

【0148】

4.2.4 ポリペプチド組成物

本発明の薬学的組成物は、限定されるものではないが、SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のいずれか1つとして記載されたアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 2、3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177のヌクレオチド配列のいずれか1つによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む単離されたGIPFポリペプチドを含む。本発明のポリペプチドは、（a）SEQ ID NO: 2、3、5、7、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、または104に記載されるヌクレオチド配列のいずれか1つを有するポリヌクレオチド、または（b）SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178として記載されるアミノ酸配列のいずれか1つをコードするポリヌクレオチドまたは（c）ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で（a）または（b）いずれかのポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる生物学的または免疫学的活性を好ましくは有するポリペプチドも含む。本発明はSEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178として記載されるアミノ酸配列のいずれかの生物学的に活性なまたは免疫学的に活性な変種；および生物学的活性を保有する（少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または89%、より典型的には少なくとも約90%、91%、92%、93%、または94%、なおより典型的には少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%、最も典型的には少なくとも約99%のアミノ酸同一性を有する）その「実質的等価物」も提供する。対立遺伝子変種によってコードされるポリペプチドはSEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178を含むポリペプチドと比較して同様な、増大した、または減少した活性を有し得る。

30

40

50

【0149】

生物学的活性を示すことができる本発明のタンパク質の断片もまた本発明に含まれる。該タンパク質の断片は線状形態とすることができるか、あるいはそれらは、例えば、その双方が参照として本明細書に組み入れられるH.U.Saragovi, et al., Bio/Technology 10, 773-778 (1992) およびR.S.McDowell, et al., J.Amer.Chem.Soc.114, 9245-9253 (1992) に記載されたように公知の方法を用いて環化することができる。そのような断片を、タンパク質結合部位の価数の増加を含む多くの目的で免疫グロブリンのようなキャリアー分子に融合させることができる。

【0150】

また、本発明は、開示されたタンパク質の（例えば、シグナル配列または前駆体配列がない）全長および支配的成熟形態または（例えば、シグナル配列およびフューリン切断部位を欠く）成熟形態を共に提供する。タンパク質コード配列は、開示されたヌクレオチド配列の翻訳によって配列表で同定される。そのようなタンパク質の成熟形態は、適当な哺乳動物細胞または他の宿主細胞における全長ポリヌクレオチドの発現によって得ることができる。タンパク質の成熟形態の配列もまた全長形態のアミノ酸配列から決定できる。

【0151】

本発明のタンパク質組成物は、さらに、親水性のような許容される担体、例えば、薬学的に許容される担体を含むことができる。

【0152】

本発明は、さらに、本発明の核酸断片によって、あるいは本発明の核酸断片の縮重変種によってコードされる単離されたポリペプチドを提供する。「縮重変種」は、ヌクレオチド配列によって本発明の核酸断片（例えば、ORF）とは異なるが、遺伝子コードの縮重のため、同一のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド断片を意図する。本発明の好ましい核酸断片はタンパク質をコードするORFである。

【0153】

当技術分野において公知の種々の方法を利用して、本発明の単離されたポリペプチドまたはタンパク質のいずれか1つを得ることができる。最も単純なレベルにおいて、アミノ酸配列は市販されているペプチドシンセサイザーを用いて合成することができる。合成により構築されたタンパク質配列は、一次、二次または三次構造および/または立体配座特徴をタンパク質と共有することによって、タンパク質活性を含むそれと共通する生物学的特性を保有することができる。この技術は小さなペプチド、およびより大きなポリペプチドの断片を産生するのに特に有用である。断片は、例えば、天然ポリペプチドに対する抗体を生じさせるのに有用である。したがって、それらは、治療化合物のスクリーニングにおいて、および抗体の開発のための免疫学的プロセスにおいて、天然の精製されたタンパク質に対する、生物学的に活性な代替物または免疫学的代替物として使用することができる。

【0154】

または、本発明のポリペプチドおよびタンパク質は、所望のポリペプチドまたはタンパク質を発現するように改変されている細胞から精製することができる。本明細書において用いられるように、遺伝子操作を通じて、細胞が、それが通常産生しない、あるいは該細胞が通常低レベルで産生するポリペプチドまたはタンパク質を産生するようにされている場合、細胞は所望のポリペプチドまたはタンパク質を発現するように改変されていると言われる。当業者であれば、真核生物または原核生物細胞に組換えまたは合成いずれかの配列を導入し、それを発現させて、本発明のポリペプチドまたはタンパク質の1つを産生する細胞を作製するための手法を容易に適合させることができる。

【0155】

本発明はまた、本発明の宿主細胞の培養を適当な培地中で成長させ、細胞から、または細胞が成長する培養からタンパク質を精製することを含む、ポリペプチドを産生する方法にも関する。例えば、本発明の方法はポリペプチドを産生する方法を含み、本発明のポリヌクレオチドを含む適当な発現ベクターを含有する宿主細胞を、コードされたポリペプチ

ドの発現を可能とする条件下で培養する。該ポリペプチドは培養物から、便宜には培地から、あるいは宿主細胞から調製された溶解物から回収し、さらに精製することができる。好ましい態様は、そのような方法によって産生されたタンパク質がタンパク質の全長または成熟形態であるものを含む。

【0156】

または、ポリペプチドまたはタンパク質を、該ポリペプチドまたはタンパク質を産生するようにGIPF-コーディングDNAで形質転換された細菌細胞から精製する。当業者であれば、ポリペプチドおよびタンパク質を単離して、本発明のポリペプチドまたはタンパク質の1つを得るための公知の方法に容易に従うことができる。これらは、限定されるものではないが、免疫クロマトグラフィー、HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、およびイムノアフィニティークロマトグラフィーを含む。例えば、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag (1994) ; Sambrook, et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology参照。生物学的/免疫学的活性を保有するポリペプチド断片は、約100を超えるアミノ酸、または約200を超えるアミノ酸を含む断片、および特異的タンパク質ドメインをコードする断片を含む。

10

【0157】

精製されたポリペプチドは、当技術分野において周知のインビトロ結合アッセイを用いて、ポリペプチドに結合する分子を同定することができる。これらの分子は、限定されるものではないが、例えば、小分子、コンビナトリアルライブラリーからの分子、抗体または他のタンパク質を含む。次いで、結合アッセイで同定された分子を、当技術分野において周知のインビボ組織培養または動物モデルにおいてアンタゴニストまたはアゴニスト活性につき試験する。簡単に述べれば、分子を複数の細胞培養または動物に力価測定し、次いで、細胞/動物の死滅または動物/細胞の延長された生存いずれかにつき試験する。

20

【0158】

本発明のタンパク質は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する体細胞または生殖細胞によって特徴付けられる、例えば、トランスジェニックウシ、ヤギ、ブタまたはヒツジの乳の成分として、トランスジェニック動物の産物として発現させることもできる。

【0159】

本明細書において提供されたタンパク質は、精製されたタンパク質のそれと同様であるが、修飾が天然で提供され、または慎重に作製されたアミノ酸配列によって特徴付けられるタンパク質も含む。例えば、ペプチドまたはDNA配列における修飾は、公知の技術を用いて当業者によってなすことができる。タンパク質配列における対象となる修飾はコード配列における選択されたアミノ酸残基の改変、置換、置き換え、挿入または欠失を含むことができる。例えば、システイン残基の一つまたは複数を欠失し、またはもう1つのアミノ酸で置き換えて、分子の立体配座を改変することができる。そのような改変、置換、置き換え、挿入または欠失のための技術は当業者に周知である（例えば、米国特許第4,518,584号参照）。好ましくは、そのような改変、置換、置き換え、挿入または欠失はタンパク質の所望の活性を保持する。タンパク質の機能で重要なタンパク質の領域は、単一または一連のアミノ酸のアラニンでの系統的置換、続いての、生物学的活性についての得られたアラニン含有変種の試験を含むアラニンスキャンニング方法を含む当技術分野において周知の種々の方法によって決定することができる。このタイプの分析は生物学的活性における置換されたアミノ酸の重要性を決定する。タンパク質機能で重要なタンパク質の領域はeMATRIXプログラムによって決定することができる。

30

40

【0160】

全体的にまたは部分的にタンパク質活性を保有することが期待されるタンパク質の配列の他の断片および誘導体はスクリーニングで有用であるか、あるいは他の免疫学的方法は本明細書中における開示を仮定すれば、当業者によって容易になすこともできる。そのような修飾は本発明によって包含される。

50

【0161】

タンパク質は、本発明の単離されたポリヌクレオチドを一つまたは複数の昆虫発現ベクター中の適当な制御配列に操作可能に連結し、次いで、昆虫発現系を使用することによって産生することもできる。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料および方法は、例えば、Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A.からのキット形態で市販されており（MaxBat（商標）キット）、そのような方法は、参照として本明細書に組み入れられる、Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555 (1987)に記載されたように当技術分野において周知である。本明細書において用いられるように、本発明のポリヌクレオチドを発現することができる昆虫細胞は「形質転換」されている。

10

【0162】

本発明のタンパク質は、組換えタンパク質を発現するのに適した培養条件下で形質転換された宿主細胞を培養することによって調製することができる。次いで、得られた発現タンパク質を、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーのような公知の精製プロセスを用いてそのような培養から（すなわち、培地または細胞抽出物から）精製することができる。タンパク質の精製は、タンパク質に結合するであろう物質を含有するアフィニティークラム；コンカナバリンA-アガロース、ヘパリン-toyopearl（商標）またはCibacrom blue 3GA Sepharose（商標）のようなアフィニティークラム樹脂上の一つまたは複数のカラム段階；フェニルエーテル、ブチルエーテル、またはプロピルエーテルのような樹脂を用いる疎水相互作用クロマトグラフィーを含む一つまたは複数の段階；またはイムノアフィニティークロマトグラフィーも含むことができる。

20

【0163】

または、本発明のタンパク質は、精製を容易とする形態で発現させることもできる。例えば、それは、マルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）またはチオレドキシン（TRX）のそのような融合タンパク質として、あるいはHisタグとして発現させることもできる。そのような融合タンパク質の発現および精製のキットは、各々、New England BioLab (Beverly, Mass.)、Pharmacia (Piscataway, N.J.) およびInvitrogenから市販されている。タンパク質は、エピトープで標識することもでき、引き続いて、そのようなエピトープに向けられた特異的抗体を用いることによって精製することもできる。1つのそのようなエピトープ（「FLAG（登録商標）」）はKodak (New Haven, Conn.) から市販されている。

30

【0164】

最後に、疎水性RP-HPLC媒体、例えば、ペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用する一つまたは複数の逆相高性能液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）段階を使用して、さらにタンパク質を精製することができる。種々の組合せにおいて、前記精製段階のいくつかまたは全てを使用して、実質的に均質な単離された組換えタンパク質を提供することもできる。このようにして精製されたタンパク質は、他の哺乳動物タンパク質を実質的に含まず、「単離されたタンパク質」として本発明に従って定義される。

【0165】

本発明のポリペプチドはGIPFアナログを含む。これは、GIPFポリペプチドの断片、ならびに一つまたは複数の欠失され、挿入され、または置換されたアミノ酸を含むGIPFポリペプチドを含む。また、本発明のGIPFポリペプチドのアナログはGIPFポリペプチドの融合、またはGIPFポリペプチドの修飾を含み、GIPFポリペプチドまたはアナログをもう1つの部分または複数部分、例えば、標的化部分またはもう1つの治療剤に融合させる。そのようなアナログは活性および/または安定性のような改良された特性を示すことができる。GIPFポリペプチドまたはアナログに融合させることができる部分の例は、例えば、小腸へのポリペプチドの送達を提供する標的化部分、例えば、小腸に対する抗体、または胃腸細胞で発現される受容体およびリガンドに対する抗体を含む。GIPFポリペプチドに融合させることができる他の部分は、治療で用いられる治療剤、例えば、サイトカイン、あるいは胃腸障害、および本明細書に列挙した他の疾患の他の投薬を含む。

40

50

【0166】

4.2.5 遺伝子治療

本発明は、本明細書に列挙した疾病を治療するための遺伝子治療を提供する。適当な細胞への、本発明のポリペプチドをコードする機能的遺伝子の送達はベクター、より具体的にはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、アデノ関連ウイルスまたはレトロウイルス）のエキスピボ、インサイチュー、またはインビボでの使用によって、あるいは物理的DNA移動方法（例えば、リボソームまたは化学的処置）のエキスピボの使用によって行われる。例えば、Anderson, Nature, supplement to vol.392, no.6679, pp.25-20 (1998) 参照。遺伝子治療技術のさらなる総説については、Friedmann, Science, 244:1275-1281 (1989) ; Verma, Scientific American: 68-84 (1990) ; および Miller, Nature, 357 : 455-460 (1992) 参照。 10

【0167】

上で議論したように、「ベクター」は、本発明による核酸の宿主細胞への伝達のためのいずれかの手段である。好ましいベクターは、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスのようなウイルスベクターである。したがって、GIPFタンパク質またはそのポリペプチドドメイン断片をコードする遺伝子または核酸配列は、ウイルスベクターを用いて、あるいはDNAの直接的な導入を介してインビボ、エキスピボ、またはインビトロで導入される。標的化組織における発現は、ウイルスベクターまたは受容体リガンドでのような、トランスジェニックベクターを特異的細胞へ標的化することによって、あるいは組織特異的プロモーターを用いることによって、あるいは双方によって行うことができる。 20

【0168】

インビボまたはエキスピボ標的化および治療手法で通常用いられるウイルスベクターはDNAベースのベクターおよびレトロウイルスベクターである。ウイルスベクターを構築し、使用する方法は当技術分野において公知である [例えば、Miller and Rosman, BioTechniques 7: 980-990 (1992) 参照]。好ましくは、ウイルスベクターは複製欠陥があり、すなわち、それらは標的細胞において自律的に複製することができない。一般に、本発明の範囲内で用いられる複製欠陥ウイルスベクターのゲノムは、感染された細胞におけるウイルスの複製に必要な少なくとも1つの領域を欠く。これらの領域は（全部がまたは一部が）排除でき、当業者に公知のいずれかの技術によって非機能的とすることができる。これらの技術は全部の除去、（他の配列による、特に、挿入された核酸による）置換、部分的欠失または（複製に）必須の領域への一つまたは複数の塩基の付加を含む。そのような技術は、遺伝子操作の技術を用いて、あるいは突然変異誘発剤での処理によって（単離されたDNA）でインビトロにて、あるいはインサイチューで行うことができる。好ましくは、複製欠陥ウイルスは、ウイルス粒子のカプセル化に必要なそのゲノムの配列を保有する。 30

【0169】

DNAウイルスベクターは、限定されるものではないが、単純疱疹ウイルス（HSV）、パピローマウイルス、エプスタイン-バールウイルス（EBV）、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス（AAV）等のような減弱化または欠陥DNAウイルスを含む。全くまたはほとんど全くウイルス遺伝子を欠く欠陥ウイルスが好ましい。欠陥ウイルスは細胞への導入後は感染性ではない。欠陥ウイルスベクターの使用は、ベクターが他の細胞を感染できるという心配せずに、特異的な局所化領域における細胞への投与を可能とする。したがって、特異的な組織は特異的に標的化することができる。特別なベクターの例は、限定されるものではないが、欠陥ヘルペスウイルス1（HSV1）ベクター「Kaplitt et al., Molec.Cell.Neurosci.2 : 320-330 (1991)」、糖タンパク質L遺伝子を欠く欠陥ヘルペスウイルスベクター [特許公開RD371005A]、または他の欠陥ヘルペスウイルスベクター [国際特許公開番号W0 94/21807、1994年9月29日公開；国際特許公開番号W0 92/05263、1994年4月2日公開]；Stratford-Perricaudet et al.によって記載されたベクターのような減弱化アデノウイルスベクター [J.Clin.Invest.90: 626-630 (1992)；またLa Salle et al., Science 259: 988-99 40

0 (1993)] ; および欠陥アデノ関連ウイルスベクター [Samulski et al., J.Virol.61: 3096-3101 (1987) ; Samulski et al., J.Virol.63: 3822-3828 (1989) ; Lebkowski et al., Mol.Cell.Biol.8: 3988-3996 (1988)] を含む。

【0170】

好ましくは、インビボでの投与では、適当な免疫抑制処置を、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターと組み合わせて使用して、ウイルスベクターおよびトランスフェクトされた細胞の免疫脱活性化を回避する。例えば、インターロイキン-12 (IL-12)、インターフェロン- γ (IFN- γ)、または抗CD4抗体のような免疫抑制サイトカインを投与して、ウイルスベクターに対する体液性または細胞性免疫応答をブロックすることができる [例えば、Wilson, Nature Medicine (1995) 参照]。加えて、最小数の抗原を発現するように作製されたウイルスベクターを使用するのが有利である。 10

【0171】

好ましい態様において、ベクターはアデノウイルスベクターである。実施例に示すように、アデノウイルスベクターは、陰窩上皮過形成による粘膜の顕著な散漫な厚化、および陰窩の長さおよび複合体分岐の顕著な増加をもたらす腸上皮細胞増殖を刺激する予期せぬ有効な効果によって示されるように、GIPFポリペプチドの送達で特に効果的であることがそれ自体示されている。アデノウイルスは、本発明の核酸を種々の細胞型へ効果的に送達するように修飾することができる真核生物DNAウイルスである。アデノウイルスの種々の血清型が存在する。これらの血清型のうち、本発明の範囲内では、タイプ2またはタイプ5ヒトアデノウイルス (Ad2またはAd5) または動物起源のアデノウイルスを用いるのが好まれる (W094/26914参照)。本発明の範囲内で用いることができる動物起源のアデノウイルスはイヌ、ウシ、ネズミ (例: Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81)、ヒツジ、ブタ、鳥類および類人猿 (例: SAV) 起源のアデノウイルスを含む。 20

【0172】

好ましくは、本発明の複製欠陥アデノウイルスベクターはITR、カプセル化配列および対象となる核酸を含む。なお、より好ましくは、アデノウイルスベクターの少なくともE1領域は非機能的である。他の領域、特に、E3領域 (W095/02697)、E2領域 (W094/28938)、E4領域 (W094/28152、W094/12649およびW095/02697)、あるいは後期遺伝子L1~L5のいずれかにおいて修飾することもできる。

【0173】

好ましい態様において、アデノウイルスベクターはE1およびE3領域に欠失を有する。E1-欠失アデノウイルスの例はEP185,573に開示されており、その内容を参照として本明細書に組み入れられる。 30

【0174】

本発明による複製欠陥組換えアデノウイルスは当業者に公知のいずれかの技術によって調製することができる (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMB 0 J.3 (1984) 2917)。特に、それらはアデノウイルス、およびとりわけ対象となるDNA配列を運ぶプラスミドの間の相同組換えによって調製することができる。相同組換えは該アデノウイルスおよびプラスミドの適当な細胞系への共トランスフェクションに従って行われる。使用される細胞系は、好ましくは (i) 該エレメントによって形質転換可能であって、および (ii) 好ましくは、組換えの危険性を回避するために組み込まれた形態の複製欠陥アデノウイルスのゲノムの一部を補うことができる配列を含有すべきである。使用できる細胞系の例は、そのゲノムに組み込まれたAd5アデノウイルス (12%) のゲノムの左側部分を含有するヒト胚腎臓細胞系293 (Graham et al., J.Gen.Virol.36 (1977) 59)、および出願W094/26914およびW095/02697に記載された、E1およびE4機能を補うことができる細胞系である。当業者に周知の標準的な分子生物学的技術を用いて、組換えアデノウイルスを回収し、精製する。 40

【0175】

本発明で用いることができるプロモーターは構成的プロモーターおよび調節された (誘導性) プロモーターを共に含む。プロモーターは、天然では、核酸の発現を担うことがで 50

きる。それは異種源からのものであってもよい。特に、それは真核生物またはウイルス遺伝子のプロモーター配列であってもよい。例えば、それは、感染するのが望まれる細胞のゲノムに由来するプロモーター配列であってもよい。同様に、それは、使用されるアデノウイルスを含むウイルスのゲノムに由来するプロモーター配列であってもよい。この点に関して、例えば、E1A、MLP、CMVおよびRSV遺伝子等のプロモーターを挙げることができる。

【0176】

加えて、プロモーターは、活性化または調節配列、または組織特異的または支配的発現を可能とする配列の付加によって修飾することができる（エノラーゼおよびGFAPプロモーター等）。さらに、核酸がプロモーター配列を含有しない場合、それを、そのような配列の下流のウイルスゲノム等へ挿入することができる。

10

【0177】

本発明の実施で有用ないくつかのプロモーターは普遍的プロモーター（例えば、HPRT、ビメンチン、アクチン、チューブリン）、中間径フィラメントプロモーター（例えば、デスミン、ニューロフィラメント、ケラチン、GFAP）、治療遺伝子プロモーター（例えば、MDR型、CFTR、第VIII因子）、組織特異的プロモーター（例えば、平滑筋細胞におけるアクチンプロモーター）、分裂する細胞において優先的に活性化されるプロモーター、刺激体（例えば、ステロイドホルモン受容体、レチノイン酸受容体）に応答するプロモーター、テトラサイクリン調節転写モジュレーター、サイトメガロウイルス即時型、レトロウイルスLTR、メタロチオネイン、SV-40、E1a、およびMLPプロモーターである。テトラサイクリン調節転写モジュレーターおよびCMVプロモーターはW096/01313、米国特許第5,168,062号および第5,385,839号に記載されており、その内容を参照として本明細書に組み入れられる。

20

【0178】

したがって、遺伝子発現を制御するのに使用できるプロモーターは、限定されるものではないが、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SV40初期プロモーター領域（Benioist and Chambon, 1981, Nature 290: 304-310）、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復に含まれるプロモーター（Yamamoto et al., 1980, Cell 22: 787-797）、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster et al., 1982, Nature 296: 39-42）；b-ラクタマーゼプロモーター（Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727-3731）、またはtacプロモーター（DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21-25）のような原核生物発現ベクター；またScientific American 1980, 242: 74-94における「Useful proteins from recombinant bacteria」；Gal 4プロモーター、ADC（アルコールデヒドロゲナーゼ）プロモーター、PGK（ホスホグリセロールキナーゼ）プロモーター、アルカリ性ホスファターゼプロモーターのような酵母または他の真菌からのプロモーターエレメント；および組織特異性を呈し、トランスジェニック動物で利用されてきた動物転写制御領域；膵臓腺房細胞で活性なエラスターゼI遺伝子制御領域（Swift et al., 1984, Cell 38: 639-646；Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409；MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515）；膵臓β細胞で活性なインスリン遺伝子制御領域（Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122）、リンパ系細胞で活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl et al., 1984, Cell 38: 647-658；Adames et al., 1985, Nature 318: 533-538；Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444）、精巣、乳房、リンパ系および肥満細胞で活性なマウス乳癌ウイルス制御領域（Leder et al., 1986, Cell 45: 485-495）、肝臓で活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268-276）、肝臓で活性なα-フェトプロテイン遺伝子制御領域（Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648；Hammer et al., 1987, Science 235: 53-58）、肝臓で活性なα1-抗トリプシン遺伝子制御領域（Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161-171）、骨髄細胞で活性なβ-グロビン遺伝子制御領域（Mogam et al., 1985, Nature 315: 338-340；Kollias et al., 1986, Cell 46: 89-94）、脳中の乏突起神経膠細胞で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Readhead et al.

30

40

50

.,1987,Cell 48:703-712)、骨格筋で活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Sani,1985,Nature 314:283-286)、および海馬で活性な性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al.,1986,Science 234:1372-1378)を含む。

【0179】

本発明のヌクレオチドのいずれか1つ、または本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の導入は、染色体外基質(一過性発現)または人工染色体(安定な発現)で達成することができる。また、細胞を本発明のタンパク質の存在下でエクスピボにて培養して、増殖させ、あるいはそのような細胞における活性に対する所望の効果を生じさせることもできる。次いで、処理した細胞を治療目的でインスピボにて導入することができる。本発明の実施におけるウイルスベクターの使用に加えて、本発明は、さらに、対象となるタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列に操作可能に連結されたオペレーターおよびプロモーターエレメントを含む新規なベクターを含む。新規なアデノウイルスベクターは、実施例で詳細に記載される、pAdeno Vator-CMV5-Intronベクターである。

【0180】

4.2.6 トランスジェニック動物

本発明のポリヌクレオチドは、B細胞においてGIPFポリペプチドを特異的に発現するキメラ動物の開発も可能とする。そのような動物はポリペプチドのインスピボ活性を研究するために、ならびに、本発明のポリペプチドのモジュレーターを研究するためのモデルとして有用である。本発明の好ましい態様は、迅速な様式でGIPFの生物学的機能を決定するように設計されたトランスジェニックノックイン(KI)マウスモデルに関する。トランスジェニックKI動物モデルは、W02003/041495として公開された国際出願PCT/JP02/11236に記載されている。トランスジェニックモデルは、免疫グロブリンκ軽鎖プロモーターの制御下にあるGIPFのB細胞特異的発現をコードするGIPF導入遺伝子に関する。導入遺伝子は、無傷免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座を含有するTT2F ES細胞に導入され、GIPF導入遺伝子を含有するES細胞は、抗体重鎖につき双方の対立遺伝子を欠くマウスに移植される(IgH-KOΔH^{-/-}) (参照としてその全体が本明細書に組み入れられる、Kitamura et al.,Nature 350:423-426 (1991))。したがって、免疫グロブリンκ軽鎖の発現は、IG鎖を発現するES細胞に由来する機能的B細胞でのみ起こり得る(WO 00/10383; EP 1106061A1)。同様に、B細胞によるGIPFの発現は、GIPF-KIキメラマウスのみで起こる。したがって、本発明のトランスジェニック動物モデルは、生殖系を通じて伝達される導入遺伝子を含有するヘテロ接合性またはホモ接合性動物よりはむしろ、キメラ動物のスピーディーな表現型分析を可能とする。加えて、導入遺伝子の発現は、GIPFタンパク質を動物の循環系に分泌し、したがって、各組織をGIPFに曝露し、GIPF、またはいずれかの他のコードされたポリペプチドの生物学的効果の迅速な評価を可能とするB細胞に制限される。本発明の導入遺伝子系はいずれかのポリペプチドの生物学的機能を発現し、評価するのに用いることができることが意図される。本発明のトランスジェニックモデルのもう1つの利点は導入遺伝子の一時的発現に関する。κ軽鎖プロモーターの活性は妊娠からほぼ14日後に開始し、循環免疫グロブリン濃度の顕著な上昇が離乳後に観察され、したがって、マウスの初期発生に対してGIPFが有し得るいずれの潜在的有害な効果も回避する。本発明のトランスジェニック動物の例示的な態様は実施例に記載される。

【0181】

4.2.6.1 トランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製する一般的方法

本発明のトランスジェニック動物は、全て、複数のそれらの細胞内に本発明の導入遺伝子を含み、その導入遺伝子は、GIPFポリペプチドをトランスジェニック動物の循環系に分泌によってB細胞によるGIPFの特異的発現に関して「宿主細胞」の表現型を改変する。トランスジェニック動物技術の種々の局面は当技術分野において周知であり、Hogan et al.,Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., [1986])のような文献に詳細に記載されている。トランスジェニック動物の作製はトランスジェニックマウスを参照して本明細書においては説明されるが、これは説明目的のためだけであり、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。この具

体的開示は、以下に記載する方法および材料を利用していずれかの非ヒト哺乳動物へGIPF導入遺伝子配列を取り込むように当業者によって容易に適合させることができる。トランスジェニック実験に適した動物はTaconic (Germantown, N.Y.) のような標準的な商業的源から得ることができる。

【0182】

A. 導入遺伝子の構築物

導入遺伝子の構築は、非限定的に、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., (1989)) に記載されているような制限エンドヌクレアーゼ消化、連結、形質転換、プラスミド精製、DNA配列決定等を含む、当技術分野において周知のいずれかの適当な遺伝子工学技術を用いて達成することができる。 10

【0183】

本発明の導入遺伝子は、典型的には、プロモーターおよび/またはエンハンサーのような転写調節配列に操作可能に連結させて、特別な方法により導入遺伝子の発現を制御する。ある態様において、有用な転写調節配列は、時間的かつ空間的に活性に関して大いに調節されるものである。したがって、選択されたプロモーターは、特定の組織または細胞型でのみ活性なものであり得る。インビボにて導入遺伝子の発現を制御するのに用いることができるプロモーター/エンハンサーは、限定されるものではないが、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター/エンハンサー (Karasuyama et al., *J. Exp. Med.* 169: 13 [1989])、ヒト β -アクチンプロモーター (Gunning et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4831-4835 [1987])、マウス乳癌ウイルス末端反復 (MMTV LTR) に存在するグルココルチコイド誘導性プロモーター (Kiessig et al., *Mol. Cell Biol.* 4: 1354-1362 (1984))、モロニーネズミ白血病ウイルスの末端反復配列 (MuLV LTR) (Weiss et al., [1985] *RNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)、SV40初期または後期領域プロモーター (Benoist et al., *Nature* 290: 304-310 [1981]; Templeton et al., *Mol. Cell Biol.*, 4: 817 [1984]; および Sprague et al., *J. Virol.*, 45: 773 [1983])、ラウス肉腫ウイルス (RSV) の3'末端反復に含まれるプロモーター (Yamamoto et al., *Cell* 22: 787-797 [1980])、単純疱疹ウイルス (HSV) チミジンキナーゼプロモーター/エンハンサー (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3567-71 [1981])、メタロチオネイン (MT) プロモーター (Palmiter et al., *Nature* 300: 611-615 [1982])、および単純疱疹ウイルスLATプロモーター (Wolfe et al., *Nature Genetics* 1: 379-384 [1992]) を含む。好ましくは、プロモーターは免疫グロブリン κ 軽鎖 (REF) のP2プロモーターである。 20 30

【0184】

導入遺伝子および転写調節配列に加えて、本発明の導入遺伝子を調製するのに有用なベクターは、典型的には、宿主動物における導入遺伝子の発現を最適化するのに有用な一つまたは複数の他のエレメントを含有する。したがって、導入遺伝子構築物は、mRNA転写物のポリアデニル化を指令する等のための転写終止エレメント、ならびにイントロン配列を含むことができる。例えば、導入遺伝子は、転写終止およびポリアデニル化シグナルを導入遺伝子転写物に加えるSV40配列 (SV40イントロン/pA) によってその3'末端に近接することができる。なお他の態様において、導入遺伝子はイントロン配列を含むことができる。多くの場合において、導入遺伝子の発現は、コード配列中の一つまたは複数のイントロンの存在によって増加される。 40

【0185】

なお他の態様において、導入遺伝子構築物は、意図された受容体細胞への挿入に先立って、細胞において (例えば、細菌細胞において) その操作を容易とするさらなるエレメントを含むことができる。例えば、ベクターは原核生物細胞における増幅用の複製起点エレメントを含むことができる。さらに、導入遺伝子構築物は、受容体動物、またはトランスジェニック動物の作製における中間体として生じさせた細胞から細胞を単離するための選択マーカーを含有することができる (すなわち、構築物を増幅させるのに用いられる細菌 50

細胞、あるいは導入遺伝子を導入するのに用いられるES細胞)。選択マーカー遺伝子は、選択的培養条件下でトランスフェクトされた細胞の生存および/または増殖に必要なタンパク質をコードすることができる。典型的な選択マーカー遺伝子は、例えば：(i) 抗生物質または他のトキシン、例えば、原核生物の宿主細胞についてはアンピシリン、テトラサイクリンまたはカナマイシン、また、および哺乳動物細胞についてはネオマイシン、ヒグロマイシンまたはメトトレキセートに対する耐性を付与し；または(ii) 細胞の栄養素要求性欠乏を補うタンパク質をコードする。

【0186】

B. 導入遺伝子の導入で用いられる細胞

例示的な態様において、本発明の「トランスジェニック非ヒト哺乳動物」は、非ヒト哺乳動物の生殖系にGIPF導入遺伝子を導入することによって産生される。種々の発生段階における胚標的細胞を用いて、GIPF導入遺伝子を導入することができる。異なる方法を、胚標的細胞の発生の段階に依存して用いる。本発明を実施するのに用いられるいずれかの動物の特異的系は、一般的な良好な健康、良好な胚収率、胚における良好な前核可視性、および良好な生殖系適合性につき選択される。

【0187】

1つの態様において、導入遺伝子構築物は単一段階の胚に導入される。一般に、雌動物をホルモン処理によって過排卵し、接合させ、受精卵を回収する。例えば、マウスの場合には、6週齢の雌を、妊娠雌馬血清ゴナドトロピン(PMSG Sigma)の5IU注射(0.1 ml, i.p.)、続いて、48時間後に、ヒト絨毛ゴナドトロピン(hCG; Sigma)の5IU注射(0.1 ml, i.p.)で過排卵するよう誘導する。マウスのFVB株をこの場合に用いる。次いで、雌を一晩種馬雄と直ちに接合させる。次にそのような雌を接合プラグにつき調べる。接合したものをCO₂窒息または頸部脱臼によって安楽死させ、胚を切開した卵管から回収し、0.5%ウシ血清アルブミン(BSA; Sigma)を含むダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水に入れる。周囲の卵丘細胞をヒアルロニダーゼ(1mg/ml)で回収する。次いで、前核胚を洗浄し、注射の時間まで、5%CO₂、95%空気の湿潤化雰囲気をもつ37.5°Cインキュベーター中で0.5%BSA(EBSS)を含有するアール平衡塩溶液に入れる。

【0188】

通常、受精胚を前核が出現するまで適当な培地中でインキュベートする。ほぼこの時点において、導入遺伝子を後に記載するように雌または雄前核に導入する。マウスのようないくつかの種においては、雄前核が好ましい。例えば、外因性遺伝子物質を、雄および雌前核がよく分離され、双方が細胞膜近くに位置する場合である雄前核の形成から可能な限り素早く、初期雄前核に加える。または、外因性遺伝子物質を、それが脱凝集を受けるよう誘導された後に精子の核に加えることができよう。次いで、外因性遺伝子物質を含有する精子を卵子に加えることができるか、あるいは脱凝集した精子を卵子に加え、導入遺伝子構築物はその後できる限り早く加える。

【0189】

同様な生物学的考慮に加えて、物理的なものもまた、接合体の核に、または接合体核の一部を形成する遺伝子物質に加えることができる外因性遺伝子物質の量(例えば、容量)を支配する。一般には、挿入された外因性遺伝子物質の容量は約10ピコリットルを超えない。添加の物理的効果は、余りにも大きくて、接合体の生存性を物理的に破壊するものであってはならない。DNA配列の数および多様性の生物学的制限は、特定の接合体および外因性遺伝子物質の機能に依存して変化し、これは当業者に容易に明らかであろう。なぜならば、得られた接合体の外因性遺伝子物質を含む遺伝子物質は、接合体の機能的生物への分化および発生を生物学的に開始し、維持できなければならないからである。

【0190】

接合体に加えられる導入遺伝子構築物のコピー数は加える外因性遺伝子物質の合計量に依存し、これは、遺伝的形質転換が起こるのを可能とする量であろう。理論的には、ただ1つのコピーが必要であり；しかしながら、一般には、1つのコピーが機能的であることを確実にするためには、多数のコピー、例えば、導入遺伝子構築物の1,000~20,000コピー

が利用される。

【0191】

C. 導入遺伝子を導入する方法

細胞に挿入すべき各導入遺伝子構築物は、まず、線状形態でなければならない。というのは、組換えの頻度は環状分子と比較してDNAの線状分子でより高いからである。従って、構築物がベクターに挿入されているならば、導入遺伝子配列内ではなくベクター配列内のみ切断するよう選択された適当な制限エンドヌクレアーゼでDNAを消化することによって線状化が達成される。

【0192】

導入遺伝子の胚への導入は、それが細胞、核膜または他の存在する細胞または遺伝子構造に対して破壊的でない限り、当技術分野において公知のいずれかの手段によって達成することができる。広く用いられる方法のいくつかはマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、またはリポフェクションを含む。導入遺伝子の導入に続き、胚を種々の量の時間の間インビトロでインキュベートすることができるか、あるいは代理宿主に再度移植することができるか、あるいは双方が可能である。1つの通常の方法は、種に依存して約1～7日の間インビトロにて胚をインキュベートし、次いで、代理宿主にそれを再度移植することである。

【0193】

接合体は、マイクロインジェクション方法によって導入遺伝子構築物を導入するための最良の標的である。マウスにおいては、雄前核は直径がほぼ20マイクロメートルのサイズに到達し、これは、1～2plのDNA溶液の再現可能な注射を可能とする。遺伝子導入のための標的としての接合体の使用は、ほとんどの場合、注入されたDNAが最初の切断前に宿主遺伝子に組み込まれるであろうという主な利点を有する (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 (1985))。結果として、トランスジェニック動物の全ての細胞は組み込まれた導入遺伝子を運ぶであろう。これは、一般には、導入遺伝子の創始体の子孫への効果的な伝達に反映されるであろう。というのは、生殖細胞の50%が導入遺伝子を保有するからである。

【0194】

また、レトロウイルス感染を用いて、導入遺伝子を非ヒト哺乳動物に導入することもできる。発生する非ヒト胚は胞胚期までインビトロで培養することができる。この時間の間、割球は、レトロウイルス感染に対する標的となり得る (Jaenich, R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1260-1264 (1976))。割球の効果的な感染は、透明帯を除去するための酵素処理によって得られる (Manipulating the Mouse Embryo, Hogan eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, (1986))。導入遺伝子を導入するのに用いられるウイルスベクター系は、典型的には、導入遺伝子を運ぶ複製欠陥レトロウイルスである (Jahner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6927-6931 (1985), Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152 (1985))。トランスフェクションは容易であり、ウイルス産生細胞の単層上で割球を培養することによって効果的に得られる (Van der Putten, 前記; Stewart et al., EMBO J. 6: 383-388 (1987))。または、感染はより後の段階で行うことができる。ウイルスまたはウイルス産生細胞を割腔に注入することもできる (Jahner et al., Nature 298: 623-628 (1982))。創始体のほとんどは導入遺伝子につきモザイクであろう。というのは、取り込みは、トランスジェニック動物を形成した細胞のサブセットでのみ起こるからである。さらに、創始体は、一般に、子孫において分離するゲノム中の異なる位置における導入遺伝子の種々のレトロウイルス挿入を含むことができる。加えて、妊娠中期胚の子宮内レトロウイルス注入によって導入遺伝子を生殖系に導入することも可能である (Jahner et al., (1982) 前記)。

【0195】

導入遺伝子構築物のES細胞への挿入は、例えば、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、およびリン酸カルシウム処理を含む当技術分野において周知の種々の方法を用いて達成することができる。挿入の好ましい方法はエレクトロポレーションであり

、ES細胞および導入遺伝子構築物DNAを、エレクトロポレーションマシンを用いて、かつ使用のための製造業者のガイドラインに従って、電気パルスに曝露する。エレクトロポレーションの後、ES細胞は、典型的には、適当なインキュベーション条件下で回収される。次いで、導入遺伝子の存在に対して細胞をスクリーニングする。

【0196】

D. 胚の移植

偽妊娠仮親または代理母を、導入遺伝子を導入することによって修飾されている胚を移植する目的で調製する。そのような仮親は、典型的には、同一種の精管切除雄と接合させることによって調製される。偽妊娠仮親の段階は、成功する移植で重要であり、それは種依存性である。マウスでは、この段階は約2～3日偽妊娠である。受容体雌はドナー雌と同時期に接合させる。以下の記載はマウスに関するが、当業者によっていずれかの他のヒト哺乳動物につきそれを適合させることができる。胚導入の時点において、受容体雌を体重1グラム当たり2.5%アベルチンの0.015mlの腹腔内注射で麻酔する。卵管は単一中線背側切開によって露出する。次いで、卵管にわたって直接的に体壁を通じて切開を行う。次いで、時計屋のピンセットで卵巣包を切り裂く。伝達すべき胚をDPBS（ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水）および伝達ピペットの先端に入れる（約10～12胚）。ピペット先端を卵管漏斗に挿入し、胚を伝達する。伝達の後、切開を2回の縫合によって閉じる。特定の宿主に移植された胚の数は種によって変化するが、通常、種が天然で生じる子孫の数と匹敵すると考えられる。

【0197】

ES細胞を用いて導入遺伝子を導入した場合、形質転換されたES細胞を前記のように胚に取り込み、胚を妊娠中の偽妊娠仮親の子宮に移植することができる。

【0198】

E. 導入遺伝子の存在または発現についてのスクリーニング

代理宿主のトランスジェニック子孫は、いずれかの適当な方法によって導入遺伝子の存在および/または発現につきスクリーニングすることができる。仮親に生まれた子孫は、最初に、モザイク毛色（coat color）につきスクリーニングすることができ、（前記のように）毛色選択戦略が使用されてきた。または、あるいは加えて、スクリーニングは、しばしば、導入遺伝子の少なくとも一部に相補的なプローブを用い、尾組織から調製したDNAのサザンブロットまたはPCRによって達成される。導入遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体を用いるウェスタンブロット分析または免疫組織化学を、導入遺伝子産物の存在につきスクリーニングするための別法またはさらなる方法として使用することができる。または、導入遺伝子を最高レベルで発現すると信じられる組織または細胞を、ノーザン分析またはRT-PCRを用いて導入遺伝子のRNA発現につき試験する。

【0199】

導入遺伝子の存在を評価するための別法またはさらなる方法は、非限定的に、酵素および/または免疫学的アッセイ、特定のマーカーまたは酵素活性についての組織学的染色、フローサイトメトリー分析等のような適当な生化学アッセイを含む。血液の分析も、血液中の導入遺伝子産物の存在を検出し、ならびに種々のタイプの血液細胞および他の血液構成要素のレベルに対する導入遺伝子の効果を評価するのに有用であり得る。

【0200】

F. トランスジェニック動物の育種

トランスジェニック動物の子孫は、トランスジェニック動物を適当なパートナーと接合させることによって、またはトランスジェニック動物から得られた卵および/または精子のインビトロ受精によって得ることができる。パートナーとの接合を行うべき場合、パートナーはトランスジェニックであってもなくてもよく；それがトランスジェニックである場合、それは同一または異なる導入遺伝子、または双方を含有することができる。または、パートナーは親系であり得る。インビトロ受精を用いる場合、受精胚を代理宿主に移植することができるが、またはインビトロでインキュベートすることができ、またはその双方を行うことができる。いずれかの方法を用い、前記の方法、または他の適当な方法を用

10

20

30

40

50

いて子孫を導入遺伝子の存在につき評価することができる。典型的には、交配および戻し交配は、育種プロセスにおける各特定の段階の目標に応じて、同胞または親株を子孫と接合させることによって達成される。

【0201】

本発明の好ましい態様は、抗体重鎖についての両方の対立遺伝子を欠き ($\text{IgH-KO}\Delta\text{H}^{-/-}$)、非常に低レベルの循環抗体を有するマウスに関する (Kitamura et al., Nature 350: 423-426 (1991))。1つの局面において、本発明は、そのB細胞においてGIPFタンパク質またはその断片を産生するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に関する。トランスジェニック哺乳動物はそのゲノムに安定に組み込まれた、B細胞におけるその発現を指令する転写調節配列に操作可能に連結された、GIPF、または天然タンパク質の生物学的活性を有するその断片をコードする核酸配列を有する。転写調節配列は、好ましくは、免疫グロブリンκ鎖プロモーターのようなB細胞特異的プロモーターを含む。非限定的に、非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヤギ、またはウシであり得る。

10

【0202】

4.2.7 陰窩細胞および組織の成長活性

本発明のGIPFポリペプチドは成長因子活性を呈し、腸陰窩細胞の増殖および分化に関与する。GIPFは胃腸管の他の上皮細胞に対する成長因子活性を示すこともできる。本発明のポリペプチドの陰窩細胞へのインビボまたはエクシボ投与は、全能状態に細胞集団を維持し、拡大することができ、これは、損傷されたまたは疾病となった組織の再設計、移植、生物薬剤の製造、およびバイオセンサーの開発で有用であろう。大量のヒト細胞を産生する能力は、現在、非ヒト源またはドナーから得なければならないヒトタンパク質の産生、そのような胃腸細胞を移植するための組織を処理するための細胞の移植用の重要な現実的適用を有する。

20

【0203】

本明細書において列挙された成長因子のいずれか、具体的には幹細胞因子 (SCF)、白血病阻害因子 (LIF)、Flt-3リガンド (Flt-3L)を含む他の幹細胞維持因子、インターロイキンのいずれか、IL-6に融合した組換え可溶性IL-6受容体、マクロファージ炎症性プロテイン1-α (MIP-1-α)、G-CSF、GM-CSF、トロンボポエチン (TPO)、血小板第4因子 (PF-4)、血小板由来成長因子 (PDGF)、神経成長因子、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、ケラチノサイト成長因子-2 (KGF2)、およびグルカゴン様ペプチド2 (GLP-2)を含む、複数の異なる外因性成長因子および/またはサイトカインを本発明のポリペプチドと組み合わせ投与して、所望の効果を達成することができると考えられる。

30

【0204】

陰窩細胞を含む腸上皮細胞は、本発明のポリヌクレオチドでトランスフェクトして、本発明のポリペプチドのオートクリン発現を誘導することができる。これは、それ自体有用であるか、あるいは次いで所望の成熟細胞型に分化させることができる未分化細胞系の作製を可能とするであろう。また、これらの安定な細胞系は、ポリメラーゼ鎖反応実験用のcDNAライブラリーおよび鋳型を作製するための未分化mRNAの源として供することもできる。これらの実験は、陰窩増殖および/または維持を調節する陰窩細胞集団における分化により発現された遺伝子の単離および同定を可能とするであろう。

40

【0205】

上皮幹細胞集団の拡大および維持は、多くの病理学的疾患の治療で有用であろう。例えば、本発明のポリペプチドを用いて、培養中の陰窩細胞を操作し、胃腸上皮細胞を生じさせることができ、これを用いて、疾病、自己免疫疾患、事故による損傷または遺伝的疾患、電離放射線、化学療法によって引き起こされた炎症、感染および炎症によって損傷された細胞を増加させ、または置き換えることができる。

【0206】

本発明のポリペプチドの発現および陰窩細胞に対するその効果を操作して、陰窩細胞のより分化細胞型への制御した分化を達成することもできる。未分化幹細胞集団から特定の

50

分化細胞型の純粋な集団を得る広く適用可能な方法は、選択マーカーを駆動する細胞型特異的プロモーターの使用を含む。

【0207】

陰窩細胞を含む腸上皮細胞のインビトロ培養を用いて、本発明のポリペプチドが増殖因子活性を示すかを判断することができる。陰窩細胞はヒトおよびネズミ結腸粘膜からの分離した結腸陰窩から単離され、参照としてその全体を本明細書に組み入れられる、Whitehead et al., *Gastroenterology* 117: 858-865 (1999) によって記載された方法を用いて、GIPFのクローン原性活性を評価することができる。成長因子活性は、単独、または他の成長因子または他のサイトカインと組み合わせた本発明のポリペプチドの存在下で評価することができる。

10

【0208】

本発明の組成物は、陰窩細胞を含む腸上皮細胞の増殖で、および口腔および胃腸組織の再生で、すなわち、上皮陰窩細胞に対する変性、死滅または外傷に関与する上皮層によって維持された損傷の治療でやはり有用であり得る。より具体的には、組成物が、本明細書に列挙した胃腸管の疾病の治療で有用であり得る。

【0209】

本発明の組成物は、非限定的に、圧力潰瘍、血管不全に関連する潰瘍、外科的および外傷創傷等を含む非創傷治癒の良好なまたはより速い閉鎖を促進するのにも有用であり得る。創傷治癒活性についてのアッセイは、非限定的に、Eaglststein and Mertz, *J. Invest. Dermatol* 71: 382-84 (1978) によって修飾された、Winter, *Epidermal Wound Healing*, pp. 71-112 (Maibach, H. I. and Rovee, D. T., eds), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicagoに記載されたものを含む。

20

【0210】

4.2.8 免疫変調活性

本発明のポリペプチドは、限定されるものではないが、サイトカインの産生および/または活性、および/または免疫系の細胞を含む免疫系構成要素の調節に関連する活性を示すことができる。本発明のポリヌクレオチドはそのような属性を示すポリペプチドをコードすることができる。サイトカインの調節および/または免疫系の細胞は増大および/または減少するレベルのサイトカイン、または免疫系の特定の細胞の数を含むことができる。

【0211】

そのような免疫変調活性によって、本発明のポリペプチドを用いて、種々の免疫障害を治療することができる。これらの障害は、限定されるものではないが、潰瘍性大腸炎および/またはクローン病、および放射線治療および/または化学療法を含む抗癌療法の結果としての粘膜炎を含む、炎症性腸疾患 (IBD) を含む。これらの免疫障害の原因は、例えば、特発性 (すなわち、未知の原因) のもの、遺伝的なもの、感染剤 (例えば、ウイルス、細菌、真菌) によるもの、および/または抗癌療法 (例えば、放射線療法および/または化学療法) によって誘導された損傷によるものであり得る。

30

【0212】

免疫応答および/または免疫系の成分の変調は多数の方法で達成することができる。ダウンレギュレーションは、既に進行している免疫応答を阻害またはブロックする形態であり得、あるいは免疫応答の誘導を防止することを含み得る。活性化されたT細胞の機能は、T細胞応答を抑制することによって、あるいはT細胞における特異的許容性を誘導することによって、あるいは双方によって阻害することができる。T細胞応答の免疫抑制は、一般には、T細胞の抑制剤への継続的曝露を必要とする活性で非抗原特異的なプロセスである。T細胞において非応答性またはアネルギーを誘導することを含む許容性は、それが、一般には、抗原特異的であって、許容剤への曝露が終わった後にも執拗に存在する点で免疫抑制から区別できる。操作では、許容性は、許容剤の非存在下における特異的抗原への再度の曝露に際してT細胞応答の欠如によって示すことができる。

40

【0213】

炎症性腸疾患は、ほとんど常に、2つの経路：高レベルのIL-12、IFN- γ と関連した過剰

50

Tヘルパー1 (Th1) -細胞応答、および/または高レベルのIL-4、IL-5、および/またはIL-13と関連したTNFまたは過剰Tヘルパー2 (Th2) -細胞応答のうちの1つによって媒介される (Bouma et al., 参照としてその全体を本明細書に組み入れられる)。従って、本発明のポリペプチドが疾病治療において免疫変調活性を媒介できるメカニズムはTh1および/またはTh2細胞集団の数をダウンレギュレートすることであろう。または、もう1つの活性は、炎症応答に関連するおよび/またはそれを媒介するサイトカイン (例えば、IL-12、IFN- γ 、TNF、IL-4、IL-5、および/またはIL-13) のレベルを減少させることであろう。

【0214】

本発明のポリペプチドの活性は、とりわけ、以下の方法によって測定することができる。

10

【0215】

T細胞または胸腺細胞増殖についてのアッセイは、非限定的に、Current Protocols in Immunology, Ed. by J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bertagnolli et al., J. Immunol. 145: 1706-1712, 1990; Bertagnolli et al., Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Bertagnolli, et al., I. Immunol. 149: 3778-3783, 1992; Bowman et al., I. Immunol. 152: 1756-1761, 1994に記載されたものを含む。

【0216】

サイトカインの産生および/または脾臓細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞の増殖についてのアッセイは、非限定的に: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A.M. and Shevach, E.M. In Current Protocols in Immunology. J.E. et al. Coligan eds, Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto. 1994; および Measurement of mouse and human interferon- γ , Schreiber, R.D. In Current Protocols in Immunology. J.E. et al. Coligan eds, Vol 1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994に記載されたものを含む。

20

【0217】

(とりわけ、増殖およびサイトカインの産生を測定することによってAPC-T細胞相互作用に影響し、ならびにT細胞効果に導くタンパク質を同定する) 抗原に対するT細胞クロン応答についてのアッセイは、非限定的に: Current Protocols in Immunology, Ed by J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function: Chapter 6, Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6091-6095 (1980); Weinberger et al., Eur. J. Immunol. 11: 405-411, 1981; Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140: 508-512, 1988)に記載されたものを含む。

30

【0218】

4.2.9 化学走性/化学運動性活性

40

本発明のポリペプチドは、例えば、単球、線維芽細胞、好中球、T細胞、肥満細胞、好酸球、上皮および/または内皮細胞を含む哺乳動物細胞についての化学走性または化学運動性活性に関与し得る。本発明のポリヌクレオチドはそのような属性を示すポリペプチドをコードすることができる。化学走性および化学運動性受容体活性化を用いて、所望の細胞集団を所望の作用部位へ動因または誘因することができる。化学走性または化学運動性組成物 (例えば、本発明のタンパク質、抗体、結合パートナー、またはモジュレーター) は、創傷および組織に対する他の外傷の治療、ならびに局所化感染の治療において特別な利点を提供する。例えば、リンパ球、単球、または好中球の腫瘍または感染の部位への誘因の結果、腫瘍または感染剤に対する改良された免疫応答が得られる。

【0219】

50

もしそれがそのような細胞集団の指向された配向または移動を直接または間接的に刺激できるならば、タンパク質またはペプチドは特定の細胞集団に対して化学走性活性を有する。好ましくは、タンパク質またはペプチドは細胞の方向付けされた移動を直接的に刺激する能力を有する。特定のタンパク質が細胞の集団に対して化学走性活性を有するか否かは、細胞化学走性についてのいずれかの公知のアッセイにおいてそのようなタンパク質またはペプチドを使用することによって容易に測定することができる。

【0220】

(化学走性を誘導または防止するタンパク質を同定する) 化学走性活性についてのアッセイは、膜を横切った細胞の移動を誘導するタンパク質の能力、ならびに1つの細胞集団のもう1つの細胞集団への接着を誘導するタンパク質の能力を測定するアッセイからなる。移動および接着についての適当なアッセイは、非限定的に：Current Protocols in Immunology, Ed. by J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marguiles, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 6.12, Measurement of alpha and beta Chemokines 6.12.1-6.12.28; Taub et al., J. Clin. Invest. 95 : 1370-1376, 1995; Lind et al., APMIS 103 : 140-146, 1995; Muller et al., Eur. J. Immunol. 25 : 1744-1748; Gruber et al., J. of Immunol. 152 : 5860-5867, 1994; Johnston et al., J. of Immunol. 153 : 1762-1768, 1994に記載されたものを含む。

10

【0221】

4.2.10 薬物スクリーニング

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物およびそれらの子孫は、当業者に容易に明らかであるいくつかの重要な用途を提供する。トランスジェニック動物はGIPFポリペプチドの活性を変調する(すなわち、増加または減少させる)化合物をスクリーニングするのに特に有用である。有用な化合物についてのスクリーニングは、ある範囲の用量にわたって候補化合物をトランスジェニック動物に投与し、次いで、GIPFタンパク質の活性に対する該化合物の効果について種々の時点でアッセイすることを含む。該化合物は腹部拡張に先立ってまたはその開始において投与することができる。投与は、評価すべき化合物の化学的性質に応じて、経口とすることができるか、あるいは適当な注射によることができる。該化合物に対する細胞応答は、適当な生化学および/または組織学アッセイを用いて経時的に評価される。

20

【0222】

本発明のポリペプチドに結合し、または該ポリペプチドの活性を変調する(すなわち、増加または減少させる)能力についてスクリーニングすることができる試験化合物の源は、(1) 無機および有機化学ライブラリー、(2) 天然産物ライブラリー、および(3) ランダムまたはミメティックペプチド(mimetic peptide)、オリゴヌクレオチドまたは有機分子いずれかからなるコンビナトリアルライブラリーを含む。

30

【0223】

化学ライブラリーは容易に合成することができるか、あるいは多数の商業的供給源から購入することができ、公知の化合物の構造的アナログ、または天然産物スクリーニングを紹介する「ヒット(hit)」または「リード(lead)」と同定される公知の化合物を含むことができる。

40

【0224】

天然産物ライブラリーの源は微生物(細菌および真菌を含む)、動物、植物または他の野菜、または海洋生物であり、スクリーニングのための混合物のライブラリーは、(1) 土壌、植物または海洋微生物からのブ罗斯の発酵および抽出または(2) 生物それ自体の抽出によって作製することができる。天然産物ライブラリーはポリケチド、非リボソームペプチド、およびその(天然に生じない)変種を含む。総説については、Science 282 : 63-68 (1998)を参照されたい。

【0225】

コンビナトリアルライブラリーは非常に多数のペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機化合物からなり、伝統的な自動合成方法、PCR、クローニングまたは専用の合成方法に

50

よって容易に調製することができる。特に関心対象であるのは、ペプチドおよびオリゴヌクレオチドコンビナトリアルライブラリーである。対象となるさらに他のライブラリーはペプチド、タンパク質、ペプチドミメティック、マルチパラレル合成コレクション、レコンビナトリアル、およびポリペプチドライブラリーを含む。コンビナトリアル化学およびそこから作製されたライブラリーの総説については、Myers, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 701-707 (1997) を参照されたい。ペプチドミメティックライブラリーの総説および例については、Al-Obeidi et al., Mol. Biotechnol. 9 (3) : 205-23 (1998) ; Hruby et al., Curr. Opin. Chem Biol. 1 (1) : 114-19 (1997) ; Dorner et al., Bioorg Med Chem. 4 (5) : 709-15 (1996) (アルキル化ジペプチド) を参照されたい。

【0226】

10

4.3 GIPF療法に適応できる疾病

1つの局面において、本発明は上皮形成が望まれる疾病および状態を治療するための薬剤および方法を提供する。GIPFポリペプチドは口腔および胃腸管の上皮細胞の細胞保護、増殖および/または分化を増加させるのに有用である。具体的には、GIPFポリペプチドは、限定されるものではないが、胃腸病、胃腸管の粘膜炎、口腔咽頭部、唇および食道（口腔粘膜炎）、炎症性腸疾患、短腸症候群、胃および十二指腸潰瘍、糜爛性胃炎、食道炎、食道反射を含む胃腸管の糜爛、および創傷、火傷、眼の疾患、および上皮細胞の増殖または再生の刺激が望まれるいずれかの障害を含む他の疾患を含む疾病または疾患を治療または予防するのに有用である。口腔および胃腸管にわたる粘膜の不十分な産生をもたらす疾病の治療もまた企図される。

20

【0227】

口腔および胃腸粘膜炎を含む粘膜炎は、消化系の管壁が炎症状態となるいくつかの癌療法の合併症である。GIPFは、癌の治療に対して患者に与えられた化学療法および/または放射線療法によって引き起こされる消化管の粘膜の変性を予防および/または軽減するのに有用であり、腫瘍の除去に続いて補助的療法として与えられる。例示的化学療法剤は、非限定的に、BCNU、ブスルファン、カルボプラチン、シクロホスファミド、タンノルビン、ドキシソルビン、エトポシド、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、イフォファミド、イリノテカン、メルファラン、メトトレキセート、ナベルピン、トポテカン、およびタキソールを含み、例示的な治療計画は、非限定的に、BEAM（ブスルファン、エトポシド、サイトシン、アラビノシド、メトトレキセート）；シクロホスファミドおよび全身照射；シクロホスファミド、全身照射およびエトポシド；シクロホスファミドおよびブスルファン；およびロイコボリンまたはレバミソールと5-フルオロウラシルを含む。GIPFでの治療、治療前または治療後は、小腸および結腸の粘膜の、例えば、細胞保護効果または再生または双方を生じさせ、その潜在的副作用を低下させつつ療法の増大した投与量を可能とする。

30

【0228】

GIPFで治療することができる炎症性腸疾患は未知の起源の慢性、再発性、炎症性障害、クローン病、炎症性腸疾患に伴う形成異常、中間大腸炎（intermediate colitis）、潰瘍性大腸炎によって特徴付けられる一般的炎症性腸疾患；活動的大腸炎、抗生物質関連大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、転換大腸炎、好酸球性大腸炎、移植片対宿主病、肉芽腫性大腸炎、虚血性大腸炎、出血性大腸炎、マラコプラキア、壊死性腸炎、放射線腸炎、盲腸炎を含む非感染性大腸炎；アデノウイルスおよびアメーバ大腸炎、バランチジウム症、HSV/AIDS関連大腸炎、およびトリパノソーマ、大腸菌、細胞内の鳥結核菌（Mycobacterium avium intracellulare）、ソタウイルス（Sotavirus）、サルモネラ菌、赤痢菌、カンピロバクター ジェジュニ（Campylobacter jejuni）、クロストリジウム属（Clostridium）、ボツリヌス菌（Botulinum）によって引き起こされる大腸炎、および住血吸虫症、スピロヘータ症、梅毒、鞭虫症、結核チフス様熱、ビブリオコレラ、およびエルギニアに関連する大腸炎を含む。

40

【0229】

短腸症候群は、半分以上の小腸が除去された人々に影響する問題の群である。小腸の一

50

部を除去する最も普通の理由はクローン病を治療することである。加えて、小腸の一部の外科的切除が癌増殖を除去するのに必要であろう。下痢は、短腸症候群の主な症状である。他の症状は痙攣、鼓脹、および胸焼けを含む。短腸症候群を有する多くの人々は栄養不良である。なぜならば、彼らの残りの小腸は十分な水、ビタミンおよび他の栄養素を食物から吸収できないからである。彼らは脱水状態ともなり兼ねず、これは生命を脅かしかねない。脱水および栄養不良を伴う問題は、虚弱、疲労、鬱病、体重減少、細菌感染、および食品過敏症を含む。短腸症候群はダイエット、静脈内フィーディング、ビタミンおよびミネラルサプリメント、および症状を軽減するための薬剤の変化を通じて治療される。GIPFポリペプチドは未切除腸組織の増殖を増大させるのに有用であり、それにより、腸の吸収表面積を増加させ、および短腸症候群に関連する症状を軽減する。

10

【0230】

GIPFポリペプチドの細胞保護および/または再生活性は、放射線誘発粘膜炎のインビボモデルにおいて (Withers and Elkind, *Int J Radiat* 17: 261-267 (1970)、参照として本明細書に組み入れられる)、インビボ化学療法誘発粘膜炎において (参照としてその全体を本明細書に組み入れられる *Soris et al., Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 69: 437-443 (1990); *Moore, Cancer Chemother Pharmacol* 15: 11-15 (1985); *Farell et al., Cell Prolif* 35: 78-85 (2002)) ; 大腸炎および小腸潰瘍または炎症のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) モデルにおいて (*Jeffers et al., Gastroenterology* 123: 1151-1162 (2002), *Han et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G1011-G1022 (2000)) ; および短腸症候群 (SBS) の外科的モデルにおいて (参照としてその全体を本明細書に組み入れられる *Scott et al. Am J Physiol* G911-G921 (1998); *Helmrath et al., J Am Coll Surg* 183: 441-449 (1996)) 試験することができる。

20

【0231】

疾病となった細胞、組織および対応する正常な試料の間のGIPF mRNAおよびタンパク質発現レベルの比較を行って、対象がGIPF療法に対して応答性であるかを判断する。GIPFポリペプチドmRNAまたはタンパク質の発現を検出し、定量する方法は、当技術分野において周知であり、共に参照としてその全体を本明細書に組み入れられる、*Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989) または *Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY (1989) に記載された標準的な核酸およびタンパク質の検出および定量技術を用いる。GIPF mRNAの検出および定量のための標準的な方法は標識されたGIPFリボプローブを用いるインサイチュアハイブリダイゼーション (参照としてその全体を本明細書に組み入れられる、*Gemou-Engesaeth, et al., Pediatrics* 109: E24-E32 (2002))、GIPFポリヌクレオチドプローブを用いるノーザンブロットおよび関連技術 (参照としてその全体を本明細書に組み入れられる、*Kunzli, et al., Cancer* 94: 228 (2002))、GIPF特異的プライマーを用いるRT-PCR分析 (*Angchaiskisir, et al., Blood* 99: 130 (2002))、および分岐鎖DNA溶液ハイブリダイゼーションアッセイのような他の増幅検出方法 (参照としてその全体を本明細書に組み入れられる、*Jardi, et al., J. Viral Hepat.* 8: 465-471 (2001))、転写媒介増幅 (*Kimura, et al., J. Clin. Microbiol.* 40: 439-445 (2002))、オリゴ、cDNA、およびモノクローナル抗体、およびリアルタイムPCRのようなマイクロアレイ産物 (参照としてその全体を本明細書に組み入れられる、*Simpson, et al., Molec. Vision*, 6: 178-183 (2000)) を含む。GIPFタンパク質の検出および定量のための標準的な方法はウェスタンブロット分析 (*Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989), *Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY (1989))、免疫細胞化学 (*Racila, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4589-4594 (1998) 前記)、および酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、および特異的酵素イムノアッセイ (EIA) を含む種々のイムノアッセイ (*Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989), *Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York

30

40

50

NY (1989)) を含む。

【0232】

本発明の方法によって治療可能な疾病および状態は好ましくは哺乳動物で起こる。哺乳動物は、例えば、ヒトおよび他の霊長類、ならびにイヌおよびネコのようなペットまたは愛玩動物、ラット、マウスおよびウサギのような実験動物、およびウマ、ブタ、ヒツジおよびウシのような農場動物を含む。

【0233】

4.3.1 治療方法

本発明の組成物（ポリペプチド断片、アナログ、変種および抗体またはアンチセンスポリヌクレオチドを含む他の結合パートナーまたはモジュレーターを含む）は種々の治療方法において多数の適用を有する。治療的適用の例は、限定されるものではないが、本明細書において例示したものを含む。 10

【0234】

本発明の1つの態様は、有効量の本発明のGIPFポリペプチドまたは他の組成物の、本発明のペプチドで治療できる疾病または疾患に罹患した個体への投与である。投与の様態は特に重要ではないが、非経口投与が好ましい。投与の例示的な様態は皮下または静脈内ボラスを送達することである。本発明のGIPFポリペプチドまたは他の組成物の投与量は、通常、処方箋医師によって決定されるであろう。投与量は個々の患者の年齢、体重、状態および応答に応じて変化するであろう。典型的には、用量当たり投与されるポリペプチドの量は約0.01 $\mu\text{g/kg}$ ~ 100mg/kg体重の範囲であり、好ましい用量が約0.1 $\mu\text{g/kg}$ ~ 10mg/kg患者体重である。非経口投与では、本発明のGIPFポリペプチドは、薬学的に許容される非経口ビヒクルと組み合わせた注射形態で処方される。そのようなビヒクルは当技術分野において周知であり、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および少量のヒト血清アルブミンからなる溶液を含む。ビヒクルは、ポリペプチドまたは他の有効成分の等張性および安定性を維持する微量の添加剤を含有することができる。そのような溶液の調製は当業者の技術内のものである。 20

【0235】

4.3.2 薬剤製剤

（いずれの源に由来するかは問わず、非限定的に、組換えおよび非組換え源を含む、かつ本発明のポリペプチドの抗体および他の結合パートナーを含む）本発明のタンパク質または他の組成物は、それ自体、またはそれを適当な担体または賦形剤と混合した薬学的組成物にて種々の障害を治療または軽減する用量でそれを必要とする患者に投与することができる。そのような組成物は、任意で、（タンパク質または他の有効成分および担体に加えて）、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定化剤、可溶化剤、および当技術分野において周知の他の物質を含むことができる。用語「薬学的に許容される」は、有効成分の生物学的活性の有効性に干渉しない非毒性物質を意味する。担体の特徴は、投与の経路に依存するであろう。本発明の薬学的組成物はサイトカイン、リンホカイン、またはFGF、表皮成長因子（EGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、トランスフォーミング成長因子（TGF- α および TGF- β ）、インスリン様成長因子（IGF）、ケラチノサイト成長因子（KGF）などのいずれかのような他の造血因子および種々の成長因子、ならびに本明細書において記載のサイトカインを含有することもできる。 30 40

【0236】

薬学的組成物は、さらに、タンパク質または他の有効成分の活性を増強させ、あるいは治療においてその活性または使用を補充する他の物質を含有することもできる。そのようなさらなる因子および/または物質を薬学的組成物に含めて、本発明のタンパク質または他の有効成分との相乗効果を生じさせ、あるいは副作用を最小化することができる。逆に、本発明のタンパク質または他の有効成分を特定のサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解、または抗血栓因子、または抗炎症剤の処方を含めて、凝固因子、サイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解または抗血栓因子、または（IL-1Ra、IL-1 Hy1、IL-1 Hy2、抗TNF、コルチコステロイド、免疫抑制剤のような）抗炎症剤の副 50

作用を最小化することができる。本発明のタンパク質はマルチマー（例えば、ヘテロダイマーまたはホモダイマー）またはそれ自体または他のタンパク質との複合体にて活性であり得る。その結果、本発明の薬学的組成物はそのようなマルチマーまたは複合体形態の本発明のタンパク質を含むことができる。

【0237】

第一のタンパク質、第二のタンパク質または治療剤を含む本発明の薬学的組成物に含めるべき代替物は（例えば同時に、あるいは剤の組合せの治療濃度が治療部位で達成されることを条件とした異なる時点で）第一のタンパク質と共に同時に投与することができる。本出願の化合物の処方および投与の技術は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」, Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版に見出すことができる。治療上有効用量は、さらに、症状の軽減、例えば、関連医学的疾患の治療、治癒、予防または軽減、あるいはそのような疾患の治療、治癒、予防または軽減の割合の増加をもたらすのに十分な化合物の量をいう。単独で投与される、個々の有効成分に適用する場合、治療上有効用量とはその成分単独をいう。組合せに適用する場合、治療上有効量とは、組み合わせて、系列的に、または同時に投与されるかを問わず、治療効果をもたらす有効成分の組み合わせた量をいう。

【0238】

本発明の治療または使用の方法を実行するにおいて、治療上有効量の本発明のタンパク質または他の有効成分を治療すべき疾患を有する哺乳動物に投与する。本発明のタンパク質または他の有効成分は、単独、あるいはサイトカイン、リンホカインまたは造血因子を使用する治療のような他の療法と組み合わせて本発明の方法に従って投与することができる。一つまたは複数のサイトカイン、リンホカインまたは他の造血因子と共投与する場合、本発明のタンパク質または他の有効成分はサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解または抗血栓因子と同時、あるいは順次に投与することができる。もし順次に投与するのであれば、主治医はサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解因子抗血栓因子と組み合わせて本発明のタンパク質または他の有効成分を投与する適当な順番を決めるであろう。

【0239】

4.3.3 投与の経路

適当な投与の経路は、例えば、経口、直腸、経粘膜、または腸投与；筋肉内、皮下、骨髄内注射、ならびにクモ膜下腔内、直接的心室、静脈内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注射を含む非経口送達を含むことができる。薬学的組成物で用いる、または本発明の方法を実行するための本発明のタンパク質または他の有効成分の投与は、経口摂取、吸入、局所適用または皮内、皮下、腹腔内（IP）、非経口または静脈内注射のような種々の慣用的方法で行うことができる。患者への静脈内投与が好ましい。

【0240】

または、しばしば、デポまたは徐放処方にて、例えば、化合物の組織への直接的注射を介した、全身よりはむしろ局所で化合物を投与することができる。

【0241】

もう1つの態様において、上皮細胞の増殖および/または刺激が必要な対象へのGIPFを産生する細胞（細胞療法）の移植が考えられる。通常GIPFを発現しない、あるいは低レベルのGIPFを発現する細胞を修飾して、GIPFをコードするポリヌクレオチドでの形質転換によって治療レベルのGIPFを産生することができる。該細胞は対象と同一の種とすることができるか、あるいは異なる種に由来するものであってもよい。好ましくは、細胞はGIPF療法を必要とする対象に由来する。ヒトまたは非ヒト細胞は、生体適合性、半透性ポリマーエンクロージャーを用いて対象に移植して、GIPFタンパク質の放出を可能とすることができるか、あるいはカプセル化なしで直接移植することができる。

【0242】

もう1つの態様において、インビボ遺伝子療法が考えられる。GIPFをコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の分泌のために対象に直接導入して、本明細書に列挙した疾病

を予防または治療する。GIPFをコードするヌクレオチドは治療すべき組織に直接注射することができるか、あるいはそれはウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターによって冒された組織の細胞に送達することができる。GIPF-コーディング核酸を含有する適当なベクターの物理的導入もまた、リポソーム媒介伝達、裸のDNAの直接的注入、受容体媒介導入、または微粒子衝撃を含む方法によって達成することもできる。

【0243】

本発明のポリペプチドは、有効投与量を所望の作用部位に送達するいずれの経路によっても投与される。特定の症例に対する投与の適当な経路および有効投与量の決定は当業者の技術のレベル内のものである。好ましくは、創傷治療では、治療化合物を直接的に部位に投与する。本発明のポリペプチドに対する適当な投与量範囲は、これらの投与量から、あるいは適当な動物モデルでの同様な試験から推定することができる。次いで、必要であれば、臨床化によって投与量を調整して、最高治療利益を得ることができる。

【0244】

4.3.4 組成物/製剤

したがって、本発明に従って使用される薬学的組成物は、薬学的に使用できる製剤への活性化合物のプロセッシングを容易とする賦形剤および補助剤を含む一つまたは複数の生理学的に許容される担体を用いて慣用的な方法で処方することができる。これらの薬学的組成物はそれ自体公知の方法で、例えば、慣用的な混合、溶解、顆粒化、糖衣錠作製、混練、乳化、カプセル化、捕獲または凍結乾燥プロセスによって製造することができる。適当な処方を選択された投与の経路に依存する。治療上有効量の本発明のタンパク質または他の有効成分を経口投与する場合、本発明のタンパク質または他の有効成分は、錠剤、カプセル剤、粉末、溶液またはエリキシルの形態とされるであろう。錠剤形態で投与する場合、本発明の薬学的組成物は、加えて、ゼラチンまたはアジュバントのような固体担体を含有することができる。錠剤、カプセル、および粉末は約5~95%の本発明のタンパク質または他の有効成分、好ましくは約25~90%の本発明のタンパク質または他の有効成分を含有する。液体形態で投与する場合、水、石油のような液体担体、落花生油、鉱油、大豆油、または胡麻油のような動物または植物起源の油、あるいは合成油を加えることができる。薬学的組成物の液体形態は、さらに、生理食塩水、デキストロースまたは他の糖溶液、あるいはエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのようなグリコールを含有することができる。液体形態で投与する場合、薬学的組成物は約0.5~90重量%の本発明のタンパク質または他の有効成分、および好ましくは約1~50%の本発明のタンパク質または他の有効成分を含有する。

【0245】

治療上有効量の本発明のタンパク質または他の有効成分を静脈内、皮内または皮下注射によって投与する場合、本発明のタンパク質または他の有効成分はパイロジェンなしの、非経口的に許容される水溶液の形態とされるであろう。pH、等張性、安定性などに関する要件を有する、そのような非経口的に許容されるタンパク質または他の有効成分溶液の調製は当業者の技術内のものである。静脈内、皮膚または皮下注射のための好ましい薬学的組成物は、本発明のタンパク質または他の有効成分に加えて、塩化ナトリウム注射、リンゲル注射、デキストロース注射、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射、乳酸加リンゲル注射、または当技術分野において公知の他のビヒクルのような等張ビヒクルを含有すべきである。本発明の薬学的組成物は安定化剤、保存剤、緩衝液、抗酸化剤、または当業者に公知の他の添加剤も含有することができる。注射では、本発明の剤は水溶液、好ましくは、ハンクス溶液、リンゲル液、または生理学的生理食塩水緩衝液のような生理学的に適合する緩衝液中で処方することができる。経粘膜投与では、浸透すべきバリアーに適当な浸透剤を処方用いる。そのような浸透剤は一般には当技術分野において公知である。

【0246】

経口投与では、化合物は、活性化合物を当技術分野において周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に処方することができる。そのような担体は本発明

の化合物が、治療すべき患者による経口摂取のための、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方されるのを可能とする。経口使用用の薬剤調整物は、固形賦形剤を得、任意で、得られた混合物を粉碎し、次いで、顆粒の混合物を処理し、その後、もし必要であれば適当な補助剤を加えて、錠剤または糖衣錠コアを得ることができる。適当な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトールを含む糖；例えば、トウモロコシ澱粉、小麦澱粉、米澱粉、ジャガイモ澱粉、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、および/またはポリビニルピロリドン（PVP）のようなセルロース調製物のような充填剤である。所望ならば、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸、またはアルギン酸ナトリウムのような、その塩のような崩壊剤を加えることができる。この目的では、濃縮された糖溶液を用いることができ、これは、任意で、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポリゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含有することができる。染料または色素を同定のために、あるいは活性化化合物用量の異なる組合せを特徴付けるために、錠剤または糖衣錠コーティングに加えることができる。

10

【0247】

経口使用できる薬剤製剤はゼラチンで作製された押し込み型カプセル、ならびにグリセロールまたはソルビトールのような、ゼラチンおよび可塑剤で作製された柔軟なシールされたカプセルを含む。押し込み型カプセルはラクトースのような充填剤、澱粉のような結合剤、および/またはタルクまたはステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤および、任意で、安定化剤と混合した有効成分を含有することができる。ソフトカプセルにおいては、活性化化合物は脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールのような適当な液体に溶解させ、または懸濁させることができる。加えて、安定化剤を加えることができる。経口投与用の全ての製剤はそのような投与に適した投与量とすべきである。バツカル投与では、組成物は慣用的方法で製剤化された錠剤またはロゼンジの形態を取ることができる。

20

【0248】

吸入による投与では、本発明に従って使用される化合物は、適当な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当なガスを用いて、圧縮パックまたはネビュライザーからのエアロゾルスプレー提示の形態で都合良く送達される。圧縮エアロゾルの場合には、該投与単位はバルブを提供して計量された量を送達することによって決定できる。例えば、インヘーラーまたはインサフレーターで用いられるゼラチンのカプセルおよびカートリッジを処方することができ、これは、該化合物およびラクトースまたは澱粉のような適当な粉末ベースの粉末混合を含有する。該化合物は、注射によって、例えば、ボーラス注射または継続的注入によって非経口投与用に処方できる。注射用の処方単位投与形態にて、例えば、保存剤を加えたアンプルまたはマルチ用量容器中で提供することができる。組成物は油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンとしてそのような形態を取ることができ、懸濁化剤、安定化剤および/または分散剤のような製剤物質を含有すること

30

40

【0249】

非経口投与用の薬剤製剤は水溶性形態の活性化化合物の水溶液を含む。加えて、活性化化合物の懸濁液は、適当な油性注射懸濁液として調製することができる。適当な親油性溶媒またはビヒクルは胡麻油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、あるいはリポソームを含む。水性注射懸濁液は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランのような懸濁液の粘度を増加させる物質を含有することができる。任意で、懸濁液は化合物の溶解性を増大させて、高度に濃縮された溶液の調製を可能とする化合物の溶解度を増加させる適当な安定化剤または物質を含有することもできる。または、有効成分は、使用前に、適当なビヒクル、

50

例えば、滅菌パイロジェンなしの水での構成のために粉末形態とすることができる。

【0250】

該化合物は、例えば、カカオバターまたは他のグリセリドのような慣用的坐薬基剤を含有する、坐薬または保持浣腸のような直腸組成物に製剤化することもできる。先に記載した製剤に加えて、該化合物はデポ製剤として処方することもできる。そのような長期作用処方移植によって（例えば、皮下または筋肉内）、または筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、該化合物は適当なポリマーまたは疎水性物質（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）、またはイオン交換樹脂にて、あるいは貧溶性誘導体として、例えば、貧溶解性塩として処方することができる。

【0251】

本発明の疎水性化合物のための薬学的担体はベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機ポリマーおよび水相を含む共溶媒系である。共溶媒系はVPD共溶媒系であってよい。VPDは、無水エタノールで容量が作製された、3% w/vベンジルアルコール、8% w/vの非極性界面活性剤ポリソルベート80、および65% w/vポリエチレングリコール300の溶液である。VPD共溶媒系（VPD：5W）は水溶液中の5%デキストロールで1：1希釈したVPDからなる。この共溶媒系は疎水性化合物をよく溶解させ、それ自体は全身投与に際して低毒性を生じる。天然では、共溶媒系の割合は、その溶解性および毒性特徴を破壊することなく大きく変化させることができる。さらに、共溶媒成分の同一性は変化させることができ、例えば、他の低毒性非極性界面活性剤をポリソルベート80の代わりに用いることができ；ポリエチレングリコールの分率サイズを変化させることができ；他の生体適合性ポリマーはポリエチレングリコールを置き換えることができ、例えば、ポリビニルピロリドン；および他の糖または多糖がデキストロースに代えて置き換えることができる。または、疎水性薬学的化合物のための他の送達系を使用することができる。リポソームおよびエマルジョンは疎水性薬物のための送達ビヒクルまたは担体の周知の例である。ジメチルスルホキシドのようなある種の有機溶媒を使用することもできるが、通常、より大きな毒性を犠牲とする。加えて、該化合物は、治療剤を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスのような徐放系を用いて送達することができる。種々のタイプの徐放物質が確立されており、当業者に周知である。徐放カプセルは、それらの化学的性質に依存して、当該化合物を数週間～100日を超えるまで放出することができる。治療剤の化学的性質および生物学的安定性に応じて、タンパク質または他の有効成分の安定化のためのさらなる戦略を使用することができる。

【0252】

薬学的組成物は適当な固体またはゲル相担体または賦形剤を含むこともできる。そのような担体または賦形剤の例は、限定されるものではないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、澱粉、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールのようなポリマーを含む。本発明の有効成分の多くは薬学的に適合される対イオンとの塩として提供することができる。そのような薬学的に適合される塩基付加塩は、遊離酸の生物学的有効性および特性を保有し、水酸化ナトリウム、水酸化マグネシウム、アンモニア、トリアルキルアミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、二塩基性アミノ酸、酢酸ナトリウム、安息香酸カリウム、トリエタノールアミンなどのような無機または有機塩基との反応によって得られる塩である。

【0253】

本発明の薬学的組成物は、本発明のタンパク質または他の有効成分とタンパク質またはペプチド抗原との複合体の形態とすることができる。タンパク質および/またはペプチド抗原は刺激シグナルをBおよびTリンパ球双方に送達するであろう。Bリンパ球はそれらの表面免疫グロブリン受容体を通じて抗原に応答するであろう。Tリンパ球はMHCタンパク質による抗原の提示に続いてT細胞受容体（TCR）を通じて抗原に応答するであろう。宿主細胞上のクラスIおよびクラスII MHC遺伝子によってコードされるものを含むMHCおよび構造的に関連するタンパク質は、ペプチド抗原をTリンパ球に提示するよう働くであろう。抗原成分は、単独、あるいは直接的にT細胞にシグナルを送ることができる共刺激分子との

10

20

30

40

50

精製されたMHC-ペプチド複合体として供することもできる。または、表面免疫グロブリンおよびB細胞上の他の分子に結合することができる抗体、ならびにTCRおよびT細胞上の他の分子に結合することができる抗体は本発明の薬学的組成物と組み合わせることができる。

【0254】

本発明の薬学的組成物はリポソームの形態とすることができ、そこでは、本発明のタンパク質が、他の薬学的に許容される担体に加えて、ミセル、不溶性単層、液晶、またはラメラ層として水溶液中の凝集した形態で存在する脂質のような両親媒性剤と組み合わせられる。リポソーム処方用の適当な脂質は、非限定的に、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リソレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などを含む。そのようなリポソーム処方の調製は、例えば、その全てを参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,235,871号；第4,501,728号；第4,837,028号；および第4,737,323号に開示されているように、当業者の技術のレベル内のものである。

10

【0255】

本発明の薬学的組成物中の本発明のタンパク質または他の有効成分の量は、治療すべき疾患の性質および重症度、および患者が受けた以前の治療の性質に依存するであろう。結局は、主治医が各個々の患者をそれで治療すべき本発明のタンパク質または他の有効成分の量を決定するであろう。最初に、主治医は低用量の本発明のタンパク質または他の有効成分を投与し、患者の応答を観察するであろう。最適な治療効果が患者で得られ、その時点で、用量がさらに増大されなくなるまで、本発明のタンパク質または他の有効成分のより大きな用量を投与することができる。本発明の方法を実施するのに用いられる種々の薬学的組成物は約0.01 μ g～約100mg（好ましくは、約0.1 μ g～約10mg、より好ましくは約0.1 μ g～約1mg）の体重1kg当たりの本発明のタンパク質または他の有効成分を含有すべきである。骨、軟骨、腱、または靱帯再生で有用な本発明の組成物では、治療方法は該化合物をインプラントまたはデバイスとして局所、全身または局所的に投与することを含む。投与する場合、本発明で用いられる治療組成物は、勿論、パイロジェンなしの生理学的に許容される形態である。さらに、組成物は、望ましくは、骨、軟骨または組織の損傷の部位への送達のために粘性形態でカプセル化し、または注射することができる。局所投与は創傷治癒および組織修復に適しているであろう。任意で、前記の組成物に含めることもできる本発明のタンパク質または他の有効成分以外の治療上有用な剤は、または、あるいは加えて、本発明の方法において該組成物と同時にまたは順次に投与することができる。好ましくは、骨および/または軟骨の形成では、組成物はタンパク質含有または他の有効成分含有組成物を骨および/または軟骨損傷の部位へ送達し、骨および軟骨を発生させるための構造を提供し、最適には、身体に吸収され得るマトリックスを含むであろう。そのようなマトリックスは他の移植された医学的適用で現在用いられる物質で形成することができる。

20

30

【0256】

マトリックス物質の選択は生体適合性、生分解性、機械的特性、化粧品的外観および界面特性に基づく。組成物の特別な適用は適当な処方を規定するであろう。組成物のための潜在的マトリックスは生分解性であって、化学的にはっきりとして硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびポリアンヒドリドであり得る。骨または皮膚コラーゲンのような他の潜在的物質は生分解性であって、生物学的によく規定されている。さらなる物質は純粋なタンパク質または細胞外マトリックス成分からなる。焼結されたヒドロキシアパタイト、生体ガラス、アルミナ、または他のセラミックスのような他の潜在的マトリックスは非生分解性であって、化学的に規定されている。マトリックスが、ポリ乳酸およびヒドロキシアパタイトまたはコラーゲンおよびリン酸三カルシウムのような前記のタイプの物質のいずれかの組合せからなることができる。バイオセラミックはカルシウム-アルミネート-ホスフェートのような組成、およびポアサイズ、粒子サイズ、粒子形状および生分解性を変化させるための処理が変化し得る。現在好ましいのは、150～800ミクロンの範囲の直径を有する多孔性粒子の形態である

40

50

乳酸およびグリコール酸の50:50(モル重量)コポリマーである。いくつかの適用において、カルボキシメチルセルロースまたは自家血液血餅のような隔離剤を利用して、タンパク質組成物をマトリックスから解離するのを妨げるのが有用であろう。

【0257】

隔離剤の好ましいファミリーはメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピル-メチルセルロース、およびカルボキシメチルセルロースを含む(ヒドロキシアルキルセルロースを含む)アルキルセルロースのようなセルロース物質であり、最も好ましいのはカルボキシメチルセルロース(CMC)のカチオン塩である。他の好ましい隔離剤はヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、ポリ(エチレングリコール)、ポリオキシエチレンオキサイド、カルボキシビニルポリマーおよびポリ(ビニルアルコール)を含む。本明細書において有用な隔離剤の量は、合計処方重量に基づいて0.5~20wt%、好ましくは1~10wt%であり、これは、ポリマーマトリックスからのタンパク質の脱着を妨げ、組成物の適当な取り扱いを提供するのに必要な量を表し、前駆細胞がマトリックスに浸潤するのを妨げ、それにより、タンパク質に前駆細胞の骨形成活性を助ける機会を提供するようにあまり多くはない。さらなる組成物において、本発明のタンパク質または他の有効成分は、問題となる骨および/または軟骨の欠損、創傷、組織の治療に有益な他の剤と組み合わせることができる。これらの物質は表皮成長因子(EGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、トランスフォーミング成長因子(TGF- α およびTGF- β)、およびインスリン様成長因子(IGF)のような種々の成長因子を含む。

10

20

【0258】

治療組成物は動物適用にも現在価値がある。特に、ヒトに加えて、家畜動物およびサラブレッドウマは、本発明のタンパク質または他の有効成分でのそのような治療のための望まれる患者である。組織再生で用いるべきタンパク質含有薬学的組成物の投与計画は、タンパク質の作用を修飾する種々の因子、例えば、形成するのが望まれる組織重量の量、損傷の部位、損傷した組織の状態、創傷のサイズ、損傷した組織(例えば、骨)のタイプ、患者の年齢、性別およびダイエット、いずれかの感染の重症度、投与の時間、および他の臨床的因子を考慮して主治医によって決定されるであろう。該用量は復元で用いられるマトリックスのタイプ、および薬学的組成物中の他のタンパク質の包含と共に変化し得る。例えば、IGFI(インスリン様成長因子I)のような他の公知の成長因子の最終組成物への添加もまた用量に影響し得る。進行は組織/骨の成長および/または修復の周期的評価、例えば、X線、組織形態学的決定およびテトラサイクリン標識によってモニターすることができる。

30

【0259】

また、本発明のポリヌクレオチドは遺伝子治療で用いることもできる。そのようなポリヌクレオチドは哺乳動物対象における発現のためにインビボまたはエキスビボいずれかにて細胞に導入することができる。本発明のポリヌクレオチドは(非限定的に、ウイルスベクターまたは裸のDNA形態にて)、核酸を細胞または生物に導入するための他の公知の方法によって投与することもできる。細胞は、増殖させまたはそのような細胞において所望の効果、またはそのような細胞における活性を生じさせるために、本発明のタンパク質の存在下でエキスビボにて培養することもできる。次いで、処理した細胞を治療目的でインビボにて導入することができる。

40

【0260】

4.3.5 効果的な用量

本発明で用いるのに適した薬学的組成物は、有効成分がその意図した目的を達成するのに十分な量で含まれる組成物を含む。より具体的には、治療上有効量は、治療すべき対象の存在する症状の発生を妨げ、または軽減するのに効果的な量を意味する。有効量の決定は、特に、本明細書において提供される詳細な開示に照らして、当業者の十分に能力の範囲内である。本発明の方法で用いるいずれの化合物についても、治療上有効用量は適当なインビトロアッセイから最初に見積もることができる。例えば、用量は、動物モデルにお

50

いて、より正確にヒトにおける有用な用量を決定するように用いることができる循環濃度範囲を達成するよう処方することができる。例えば、用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定された IC_{50} （すなわち、タンパク質の生物学的活性の半最大阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環濃度範囲を達成するように処方することができる。そのような情報を用いて、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。

【0261】

治療上有効用量とは、患者における症状の軽減、または生存の延長をもたらす化合物のその量をいう。そのような化合物の毒性および治療効果は、例えば、 LD_{50} （集団の50%にとって致死的な用量）および ED_{50} （集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するための細胞培養または実験動物における標準的薬学的手法によって決定することができる。毒性および治療効果の間の用量の比率は治療指標であり、それは LD_{50} および ED_{50} の間の比率として表すことができる。高い治療指標を示す化合物が好ましい。これらの細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータは、ヒトで用いられる用量の範囲を処方するのに用いることができる。そのような化合物の用量は、好ましくは、毒性がほとんどまたは全くなしで、 ED_{50} を含む循環濃度の範囲内にある。該用量は、使用される投与形態および利用される投与の経路に依存してこの範囲内で変化し得る。正確な処方、投与経路および用量は患者の状態を考慮して個々の医師によって選択され得る。例えば、Fingl et al., 1975, in 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch.1p.1を参照されたい。投与量および間隔を個々に調整して、所望の効果、または最小有効濃度（MEC）を維持するのに十分な活性部分の血漿レベルを提供することができる。MECは各化合物で変化するが、インビトロデータから見積もることができる。MECを達成するのに必要な用量は、個々の特徴および投与の経路に依存するであろう。しかしながら、HPLCアッセイまたはバイオアッセイを用いて、血漿中濃度を決定することができる。

10

20

【0262】

また、投与間隔はMEC値を用いて決定することもできる。化合物は、10～90%の時間、好ましくは30～90%、より好ましくは50～90%の時間、MECを超える血漿レベルを維持する計画を用いて投与すべきである。局所投与または選択的摂取の場合には、薬物の有効局所濃度は血漿中濃度に関連しないであろう。

【0263】

本発明のポリペプチドまたは他の組成物のための例示的用量計画は、毎日、約 $0.01\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重の範囲であり、好ましい用量は約 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $25\text{mg}/\text{kg}$ 患者体重であり、成人および子供で変化する。投与は毎日1回とすることができるか、あるいは同等な用量をより長いまたはより短い間隔で送達することができる。

30

【0264】

投与される組成物の量は、勿論、治療すべき対象、対象の年齢および体重、病気の重症度、投与の方法、および処方する医師の判断に依存するであろう。

【0265】

4.3.6 診断アッセイ法およびキット

本発明は、さらに、任意で、適当な標識を結合させて、またはそうでなければ該標識を付随させた本発明の核酸プローブまたは抗体を用い、試験試料中での本発明のORFのうちの1つ、またはそのホモログの存在または発現を同定するための方法を提供する。

40

【0266】

一般に、本発明のポリヌクレオチドを検出する方法は、ポリヌクレオチドに結合し、それとで複合体を形成する化合物と試料とを該複合体を形成するのに十分な時間接触させる段階、および、複合体が検出された場合、本発明のポリヌクレオチドが試料中で検出されるように、複合体を検出する段階を含むことができる。そのような方法は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で試料をそのような条件下で本発明のポリヌクレオチドにアニールする核酸プライマーと接触させる段階、および、ポリヌクレオチドが増幅された場合、本発明のポリヌクレオチドが試料で検出されるように、アニールされたポリヌクレオチドを増幅する段階を含むことができる。

50

【0267】

一般に、本発明のポリペプチドを検出する方法は、ポリペプチドに結合し、それとで複合体を形成する化合物を試料と、該複合体を形成するのに十分な時間接触させる段階、および、複合体が検出された場合、本発明のポリペプチドが試料中で検出されるように、複合体を検出する段階を含むことができる。

【0268】

詳細には、そのような方法は、試験試料を、本発明の一つまたは複数の抗体または一つまたは複数の核酸プローブと共にインキュベートし、次いで、該核酸プローブまたは抗体の試験試料内の成分への結合につきアッセイすることを含む。

【0269】

核酸プローブまたは抗体を試験試料と共にインキュベートするための条件は変化する。インキュベーションの条件はアッセイで使用するフォーマット、使用される検出方法、およびアッセイ法で用いる核酸プローブまたは抗体のタイプおよび性質に依存する。当業者であれば、通常に利用可能なハイブリダイゼーション、増幅または免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つが、本発明の核酸プローブまたは抗体を使用するのに容易に適合させることができるのを認識するであろう。そのようなアッセイ法の例はChard, T., An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986) ; Bullock, G.R. et al., Techniques in Immunocytochemistry, Academic Press, Orlando, FL Vol.1 (1982) , Vol.2 (1983) , Vol.3 (1985) ; Tijssen, P., Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985)に見出すことができる。本発明の試験試料は細胞のタンパク質または膜抽出物、または痰、血液、血清、血漿または尿のような生体液を含む。前記方法で用いられる試験試料はアッセイフォーマット、検出方法の性質、およびアッセイすべき試料として用いられる組織、細胞または抽出物に基づいて変化するであろう。タンパク質抽出物または細胞の膜抽出物を調製するための方法は当業者に周知であり、利用される系に適合する試料を得るように容易に適合させることができる。

【0270】

本発明のもう1つの態様において、本発明のアッセイを行うための必要な試薬を含有するキットが提供される。具体的には、本発明は (a) 本発明のプローブまたは抗体の1つを含む第一の容器；および (b) 以下の、洗浄試薬、結合したプローブまたは抗体の存在を検出することができる試薬の一つまたは複数を含む一つまたは複数の他の容器を含む一つまたは複数の容器を閉じ込めて受容するための区画キットを提供する。

【0271】

詳細には、区画キットは試薬が別々の容器に含まれるいずれのキットも含む。そのような容器は小さなガラス容器、プラスチック容器、またはプラスチックまたは紙のストリップを含む。そのような容器は、試料および試薬が交差汚染せず、各容器の物質または溶液が1つの区画からもう1つの区画へ定量的方法で加えることができるように、試薬を1つの区画からもう1つの区画へ効果的に移動させることを可能とする。そのような容器は試験試料を受容する容器、アッセイで用いられる抗体を含有する容器、(リン酸緩衝化生理食塩水、トリス-緩衝液等のような) 洗浄試薬を含有する容器、および結合した抗体またはプローブを検出するのに用いられる試薬を含有する容器を含むであろう。検出試薬のタイプは標識された核酸プローブ、標識された二次抗体、あるいはまたは、一次抗体が標識されていれば、標識された抗体と反応することができる酵素または抗体結合試薬を含む。当業者であれば、本発明の開示されたプローブおよび抗体が、当技術分野において周知の確立されたキットフォーマットの1つに容易に取り込むことができるのを容易に認識するであろう。

【0272】

4.3.7 スクリーニングアッセイ法

本発明の単離されたタンパク質およびポリヌクレオチドを用い、本発明は、さらに、SE 50

Q ID NO: 2、3、5、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、または177に記載されたヌクレオチド配列に対応するORFによってコードされるポリペプチドに結合する、あるいは該核酸によってコードされたポリペプチドの特異的ドメインに結合する変調剤を得、同定する方法を提供する。詳細には、該方法は、

(a) 物質を、本発明のORF、または本発明の核酸によってコードされた単離されたタンパク質と接触させる段階；および

(b) 該物質が該タンパク質または該核酸に結合するか否かを測定する段階を含む。

【0273】

変調剤は上皮細胞上のGIPFの増殖活性を増加または減少させることができる。

【0274】

一般に、本発明のポリヌクレオチドに結合する化合物を同定するそのような方法は、化合物を本発明のポリヌクレオチドと、ポリヌクレオチド/化合物複合体を形成するのに十分な時間接触させる段階、および、ポリヌクレオチド/化合物複合体が検出された場合、本発明のポリヌクレオチドに結合する化合物が同定されるように、該複合体を検出する段階を含むことができる。

【0275】

従って、同様に一般に、本発明のポリペプチドに結合する化合物を同定するためのそのような方法は、化合物を本発明のポリペプチドと、ポリペプチド/化合物複合体を形成するのに十分な時間接触させる段階、および、ポリペプチド/化合物複合体が検出された場合、本発明のポリヌクレオチドに結合する化合物が同定されるように、該複合体を検出する段階を含むことができる。

【0276】

本発明のポリペプチドに結合する化合物を同定する方法はまた、化合物を細胞中の本発明のポリペプチドと、ポリペプチド/化合物複合体を形成するのに十分な時間接触させ、ここで該複合体が細胞中の標的遺伝子配列の発現を駆動する段階、および、ポリペプチド/化合物複合体が検出された場合、本発明のポリペプチドに結合する化合物が同定されるように、レポーター遺伝子配列発現を検出することによって該複合体を検出する段階を含むこともできる。

【0277】

そのような方法を介して同定された化合物は、本発明のポリペプチドの活性を変調する（すなわち、化合物の非存在下で観察される活性に対してその活性を増加させまたは減少させる）化合物を含むことができる。または、そのような方法を介して同定された化合物は、本発明のポリヌクレオチドの発現を変調する（すなわち、該化合物の非存在下で観察された発現レベルに対して発現を増加させまたは減少させる）化合物を含むことができる。本発明の方法を介して同定された化合物のような化合物は、活性/発現を変調するそれらの能力につき、当業者に周知の標準的アッセイ法を用いて試験することができる。

【0278】

前記アッセイ法でスクリーニングされた物質は、限定されるものではないが、ペプチド、炭水化物、ビタミン誘導体、または他の薬剤であり得る。物質はランダムに選択し、スクリーニングすることができるか、あるいはタンパク質モデリング技術を用いて合理的に選択し、または設計することができる。

【0279】

ランダムスクリーニングでは、ペプチド、炭水化物、薬剤等のような物質をランダムに選択し、本発明のORFによってコードされたタンパク質に結合するそれらの能力につきアッセイする。または、物質は合理的に選択し、または設計することができる。本明細書において用いるように、剤が特定のタンパク質の立体配置に基づいて選択される場合、物質は「合理的に選択され、または設計された」と言われる。例えば、当業者であれば、特異的なペプチド配列に結合することができるペプチド、薬剤等を作製するように現在利用可能な手法を容易に適合させて、合理的に設計された抗ペプチドペプチド（例えば、Hurby et al., 「Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides」, In Synthetic

10

20

30

40

50

Peptides, A User's Guide, W.H. Freeman, NY (1992), pp.289-307, および Kaspczak et al., Biochemistry 28: 9230-8 (1989) を参照されたい)、または薬剤等を作製することができる。

【0280】

前述に加えて、広く記載された本発明の物質の1つのクラスを用いて、本発明のORFまたはEMFの1つへの結合を介して遺伝子発現を制御することができる。前記のように、そのような物質はランダムにスクリーニングし、または合理的に設計/選択することができる。ORFまたはEMFの標的化により、当業者は、発現制御につき同一EMFに頼る単一ORFまたは複数ORFいずれかの発現を変調する、配列特異的またはエレメント特異的物質を設計することができる。DNA結合剤の1つのクラスは、DNAまたはRNAへの結合によって三重らせん形成にハイブリダイズするか、またはそれを形成する塩基残基を含有する物質である。そのような物質は、古典的なホスホジエステル、リボ核酸骨格に基づくことができるか、あるいは塩基付着能力を有する種々のスルフヒドリルまたはポリマー誘導体であり得る。

【0281】

これらの方法で用いるのに適した物質は、通常、20~40塩基を含有し、転写に関与する遺伝子の領域（三重らせん-Lee et al., Nucl. Acids Res. 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241: 456 (1988); および Dervan et al., Science 251: 1360 (1991)）に対して、あるいはmRNAそれ自体（アンチセンス-Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)）に対して相補的であるように設計される。三重らせん形成は、最適には、DNAからのRNA転写のシャットオフをもたらし、他方、アンチセンスRNAハイブリダイゼーションがmRNA分子のポリペプチドへの翻訳をブロックする。双方の技術はモデル系で効果的であることが証明されている。本発明の配列に含まれる情報は、アンチセンスまたは三重らせんオリゴヌクレオチドおよび他のDNA結合剤の設計で必要である。

【0282】

本発明のORFの1つによってコードされたタンパク質に結合する物質は診断剤として用いることができる。本発明のORFの1つによってコードされたタンパク質に結合する物質は、薬学的組成物を作製するための公知の技術を用いて製剤化することができる。

【0283】

5. 実施例

実施例1

ヒトcDNAライブラリーからのSEQ ID NO: 1の単離

SEQ ID NO: 1の新規な核酸は、ハイブリダイゼーション配列シグニチャー分析、およびSanger配列決定技術によって配列決定する、標準的なPCRを用い、胎児皮膚から調製されたヒトcDNAライブラリー（Invitrogen）から得た。ライブラリーのインサートは、インサートに近接するベクター配列に特異的なプライマーを用いてPCRで増幅した。これらの試料をナイロン膜にスポットし、オリゴヌクレオチドプローブで調べて、配列シグニチャーを得た。クローンを同様なまたは同一配列の群にクラスター形成し、単一の代表的なクローンをゲル配列決定のために各群から選択した。次いで、典型的なSanger配列決定プロトコルにおける逆M13配列決定プライマーを用いて、増幅されたインサートの5'配列を推定した。PCR産物を精製し、蛍光色素ターミネーターサイクル配列決定に供した。単一パスゲル配列決定は、377 Applied Biosystems (ABI) シーケンサーを用いて行った。SEQ ID NO: 1のインサートは、国際公開W0 03/ (029405) において新規な配列として記載されていた。

【0284】

実施例2

SEQ ID NO: 2の集合

本発明の核酸（SEQ ID NO: 2）は、前記実施例1に記載された方法によってcDNAライブラリーから得られた、ある場合には、一つまたは複数の公のデータベースから得られた配列から組み立てた。最終配列は、播種としてのEST配列を用いて組み立てた。次いで、再

帰的アルゴリズムを用いて、この集合に属する異なるデータベース（すなわち、EST配列、dbESTバージョン124、gbpri 124、およびUniGeneバージョン124を含有するNuveloのデータベース）からのさらなる配列を引き出すことによって、該播種を拡大された集合に拡大した。集合を拡大する前記データベースからのさらなる配列がなくなれば、該アルゴリズムは終止した。成分配列を集合に含ませるのは、300を超えるBLASTスコア、および95%よりも大きな同一性の割合（%）を有する拡大集合に対するBLASTNヒットに基づくものであった。

【0285】

PHRAP (Univ.of Washington) またはCAP4 (Paracel) を用い、全長遺伝子cDNA配列およびその対応するタンパク質配列は集合から作製した。いずれのフレームシフトおよび正しくない停止コドンも手での編集によって修正した。編集の間に配列はGenbankに対するFASTYおよびBLAST（すなわち、dbESTバージョン124、gbpri124、UniGeneバージョン124、Genpeptリリース124）を用いてチェックした。編集プロセスで用いることができたであろう他のコンピュータプログラムはphredPhrapおよびConsed (University of Washington) およびed-ready、ed-extおよびcg-zip2 (Hyseq, Inc.) であった。全長ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、各々、SEQ ID NO: 2および4として配列表に示す。

【0286】

GIPF (SEQ ID NO: 4) を発現させるために、全長GIPF DNAをMarathon-ready cDNAライブラリー (Clontech) からPCR増幅した。後に記載するように、適当な細胞系で発現されるとGIPFポリペプチドを作製したネステッドPCRプライマーを用いて一次PCR産物をさらに増幅した。

【0287】

実施例3

ネズミおよびヒト組織におけるGIPFの発現

A. GIPF mRNAの組織分布：

図2はヒト (A) およびネズミ (B) 組織に由来するGIPF mRNAの相対的発現を示す。

【0288】

全mRNAは製造業者 (Qiagen, Valencia, CA) によって提供されるプロトコルに従って図2に示された組織から得られた。該RNAは定量的リアルタイムPCR (TaqMan) (Simpson et al., Molec Vision 6: 178-183 (2000)) に供し、示された組織におけるGIPFの相対的発現を測定した。ヒトRNAのPCR反応で用いたフォワードおよびリバースプライマーは、各々、5' GACCATGCTGCCTGCTCTGACAC 3' (フォワード; SEQ ID NO: 29), および5'

CACCCGCCTCCTTGCTCTCC 3' (リバース; SEQ ID NO: 30)

であり；ネズミRNAのPCR反応で用いたフォワードおよびリバースプライマーは、各々、5' GGGGGAGACCACACCACCTGCT 3' (SEQ ID NO: 31), および5'

TTGGACCTCGGCTCCTTGCTGTTC 3' (SEQ ID NO: 32)

であった。延長因子1、 β -アクチンおよび、ATPシンターゼ6をコードするDNA配列を、全ての試料において、陽性対照および正規化因子として用いた。全てのアッセイは、三連で行い、得られた結果を平均した。

【0289】

Y軸は、各細胞が1.2Kbのメジアン長さの400,000 mRNA転写物を有し、細胞中の全RNAの2%がmRNAであると仮定して、細胞当たりのGIPF mRNAのコピー数を示す。図2は、GIPF mRNAが試験した全ての組織において低レベルで発現されることを示す。GIPF mRNAの最高レベルはマウスの皮膚、肺、卵巣および脳、およびヒト小腸、皮膚、皮膚、卵巣、精巣および乳房で見られた。

【0290】

B. GIPFタンパク質の組織分布：

ヒト組織試料中でのGIPFの発現は、ウサギポリクローナル抗GIPF抗体を用いて検出した

(表1)。ウサギポリクローナル抗体は、免疫原性であると予測され、かつアミノ酸配列Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln (SEQ ID NO: 67) を有するペプチドでウサギを免疫化することによって作製した。抗GIPF抗体は、Affi-Gel 10 (Bio-Rad) にカップリングしたGIPFペプチドを用いてウサギ血清からアフィニティー精製し、0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝化生理食塩水中に保存した。副腎、膀胱、乳房、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、胎盤、前立腺、皮膚、小腸、脾臓、胃、精巣、甲状腺、扁桃および子宮の組織試料は、組織を10%ホルマリン中に固定し、パラフィンに包埋し、次いで、標準的な技術を用いて切出すことによって、免疫組織化学分析 (IHC) (LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, WA) のために調製した。切片は、GIPF特異的抗体を用いてプローブし、AECを基質として用いてビオチン結合抗ウサギ二次で可視化した。 10

【0291】

ヒト組織におけるGIPFの細胞局所化を表1に示す。最も強い染色は膵臓島細胞のサブセットの細胞質において、および腸および胃の上皮内神経内分泌細胞の細胞質で見られた。顕著な染色が副腎、胃小窩上皮、および腎臓管上皮にも存在した。リンパ球は頻繁に陽性であり、圧倒的な核染色を示した。皮膚においては、病巣陽性が、顆粒層および毛包脂腺単位に存在した。呼吸器系上皮、II型肺細胞、前立腺上皮、乳房上皮を含む少数の細胞型は、より低い強度の細胞質および核染色を示した。病巣の弱い核染色は肝細胞、結腸上皮、胎盤栄養膜、乳房上皮、卵巣、および甲状腺小胞上皮に存在した。神経節細胞は赤染色を示し、他方、試験した腺上皮、平滑筋、内皮、血管内好中球、および線維芽細胞を含む他の細胞はGIPFにつき陰性であった。 20

【0292】

(表1)

器官/組織	細胞内局在	染色
副腎、上皮	核および細胞基質	局所性、中程度
膀胱、上皮	核および細胞基質	明るい
乳房、上皮	核および細胞基質	中程度
結腸、上皮	核および細胞基質	中程度
結腸、神経内分泌細胞	核および細胞基質	弱い
腎臓皮質、糸球体	核	明るい
腎臓皮質、上皮	細胞基質	中程度
腎臓髓質、糸球体	核	強い
腎臓髓質、上皮	細胞基質	中程度
肝臓、肝細胞	核	中程度
肺、呼吸上皮	核および細胞基質	中程度
肺、II型肺細胞	主に核	中程度
肺、肺泡マクロファージ	主に核	中程度
卵巣、上皮	核	中程度
膵臓、 ランゲルハンス島	細胞基質	強い
胎盤、栄養膜	核	明るい
前立腺、上皮	核	中程度
皮膚、表皮層	細胞基質	局所性
小腸、神経内分泌細胞	細胞基質、斑点状核	強い
小腸、炎症細胞	主に核	中程度
脾臓、リンパ球	主に核	強い
胃、神経内分泌細胞	核および細胞基質	局所性、中程度～強い
胃、上皮	核および細胞基質	中程度～強い
精巣、ライディッヒ細胞	細胞基質	明るい、散在性
胸腺、リンパ球	核および細胞基質	中程度
甲状腺、濾胞上皮	核	明るい
扁桃、リンパ球	核および細胞基質	中程度
子宮、子宮内膜間質	核	中程度、散在性

10

20

30

40

【0293】

実施例4

トランスジェニックGIPF動物

A. GIPF-KIベクターの構築

導入遺伝子GIPF-ノックイン (GIPF-KI) ベクターの構築 (図5A) は、後に記載する方法に従って行い、これは図5B～5Rに示す。

【0294】

マウス免疫グロブリンκ定常領域 (IgCκ) および近位領域をコードするDNAは以下のよう2つの断片の増幅によって得られた。

【0295】

図5B. IgCκ断片1の調製

PCR用のフォワード (igkc1; SEQ ID NO: 34) およびリバース (igkc2; SEQ ID NO: 35) プライマーは、GenBank (gi: V00777; SEQ ID NO: 33) から得られたマウス免疫グロブリンκ定常領域 (IgCκ) および近位領域の配列に基づいて合成し、これを用いて、IgCκ断片1の断片1をコードするDNAを増幅した。

igkc1: ATCTCGAGGAACCACTTTCCTGAGGACACAGTGATAGG (SEQ ID NO: 34)

はXho I認識配列を5'末端部位に付加することによって調製し、
igkc2: ATGAATTCCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGAC (SEQ ID NO: 35)

はEcoR I認識配列を5'末端部位に付加することによって調製した。PCRは、マウス定常および接合領域を含有し(WO 00/10383)、鋳型として供した25ngのpBluescript SK II (+)のクローンを用いて行った。PCR産物を制限酵素EcoR IおよびXho Iで消化し、制限酵素EcoR IおよびXho Iで予め消化したpBluescript II KS (-)ベクター(Stratagene)に連結した。得られたプラスミドpIgCκ Aは、マウスIgCκ断片1の示されたcDNA配列を含む、Xho IおよびEcoR Iの間の領域内にはヌクレオチド配列において置換はなかった。

【0296】

図5C. IgCκ断片2の調製

PCR用のフォワード(igkc3; SEQ ID NO: 36)およびリバース(igkc4; SEQ ID NO: 37)プライマーはGenBank(gi: V00777; SEQ ID NO: 33)から得られた免疫グロブリンκ定常領域(IgCκ)のマウス下流領域の配列に基づいて合成し、これを用いて、IgCκ断片2をコードするDNAを増幅した。

Igkc3: ATGAATTCAGACAAAGGTCCTGAGACGCCACC (SEQ ID NO: 36)

は、EcoR I認識配列を5'末端部位に付加することによって調製し、
igkc4: ATGGATCCTCGAGTCGACTGGATTTCAGGGCAACTAAACATT (SEQ ID NO: 37)

は、BamH I、Xho I、およびSal I認識配列を5'末端部位に付加することによって調製した。PCRは、マウス定常および接合領域を含有し、鋳型として供した25ngのpBluescript SK II (+)のクローン(WO 00/10383)を用いて行った。PCR産物を制限酵素EcoR IおよびBamH Iで消化し、制限酵素EcoR IおよびBamH Iで予め消化したpIgCκ Aベクター(前記参照)に連結した。得られたプラスミドpIgCκ ABは、マウス免疫グロブリン定常領域に由来する示されたcDNA断片1および2を含み、EcoR IおよびBamH Iの間の領域内にはヌクレオチド配列において置換はなかった。

【0297】

図5D. ピューロマイシン遺伝子のpIgCκ ABへの挿入

Lox-P Puroプラスミド(WO 00/10383)を制限酵素EcoR IおよびXho Iで消化し、T4DNAポリメラーゼで処理した。得られた断片を、制限酵素Sal Iで予め消化したpIgCκ ABベクター(前記参照)に連結し、T4DNAポリメラーゼで処理した。pIgCκ ABおよびLox-P Puro断片の間の連結領域を確認した後、プラスミドpIgCκ ABPが得られた。

【0298】

図5E. IRES cDNAのpIgCκ ABPへの挿入

PCR用の以下のフォワード(iresfw; SEQ ID NO: 38)およびリバース(iresrv; SEQ ID NO: 39)プライマーを、pIRESHygプラスミド(Clontech)のIRES領域の配列に基づいて合成した。

iresfw: ATGAATTCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTA (SEQ ID NO: 38)

は、EcoR I認識配列を5'末端部位に付加することによって調製し、
iresrv: ATGAATTCGTCGACTTGTGGCAAGCTTATCATCGTGTT (SEQ ID NO: 39)

はEcoR IおよびSal I認識配列を5'末端部位に付加することによって調製した。PCRは鋳型として150ngのpIRESHygプラスミド(Clontech)を用いて行った。PCR産物を制限酵素EcoR

Iで消化し、予め制限酵素EcoR Iで消化してあるpGEM-Tベクター（Promega）に連結した。示されたcDNA配列を含有し、ヌクレオチド配列には置換がないプラスミドIRES-Sal/pGEMが得られた。IRES-Sal/pGEMプラスミドを制限酵素EcoR Iで消化し、予め制限酵素EcoR Iで消化してあるpIgCκ ABPプラスミド（前記参照）に連結した。pIgCκ ABPおよびIRES-Salの間の連結領域の配列を確認した後、プラスミドpIgCκ ABP IRESが得られた。

【0299】

図5F. pΔCκ Salプラスミドの構築

IgCκ K0ベクター（W000/10383）を制限酵素Sac IIで消化し、次いで、制限酵素EcoRIで部分的に消化した。LoxP-PGK Puro領域を欠く14.6Kbバンドを単離し、以下の2つのオリゴヌクレオチド（Sal IプラスおよびSal Iマイナス）をアニールすることによって作製されたSacII/EcoRI適合性リンカーで連結した、LoxP-PGKPuro領域をSal I制限部位で置き換えた。配列確認の後、pΔCκ Salプラスミドが得られた。

10

SalIプラス: 5' AGTCGACA 3' (SEQ ID NO: 40) および

SalIマイナス: 5' AATTTGTCGACTGC 3' (SEQ ID NO: 41)

【0300】

図5G. pKIκ プラスミドの構築

pIgCκ ABP IRESプラスミドを制限酵素Xho Iで消化し、C領域、IRESおよびloxP-ピューロマイシンからなる得られた断片を、予め制限酵素Sal Iで消化してあるpΔCκ Salベクター（前記参照）と連結した。配列確認の後、pKIκ プラスミドが得られた。

20

【0301】

図5H. pIgCκ Δ IRES断片の調製

pIgCκ ABPIRESプラスミドを制限酵素EcoR IおよびBgl IIで部分的に消化し、IRES遺伝子の部分を欠く得られたpIgCκ Δ IRES断片を単離した。

【0302】

図5I. PCRによるマウスP2プロモーター断片の調製

PCR用の以下のプライマーは、GenBank (gi: aj231225; SEQ ID NO: 42) から得られたマウス免疫グロブリンκプロモーターの配列に基づいて合成した。

P2F: CCCAAGCTTTGGTGATTATTCAGAGTAGTTTATAGATGAGTGCAT (SEQ

ID NO: 43)

30

は、Hind III認識配列を5'末端部位に付加することによって調製し、

P2R: ACGCGTCGACTTTGTCTTTGAACCTTGGTCCCTAGCTAATTACTA (SEQ

ID NO: 44)

は、Sal I認識配列を5'末端部位に付加することによって調製した。PCRは、鋳型として25 ngのマウスゲノムDNA（TT2F ES細胞からのゲノムDNA）を用いて行った。PCR産物を制限酵素Hind IIIおよびSal Iで消化し、予め制限酵素Hind IIIおよびSal Iで消化してあるpBluescript II KS-ベクター（Stratagene）に連結した。配列確認の後、得られたプラスミドを制限酵素Hind IIIおよびSal Iで消化し、マウスP2プロモーター断片を含有するHind III-Sal I断片が単離された。

40

【0303】

図5J. PCRによる部分的CκポリA断片の調製

PCR用の以下のプライマーはGenBank (gi: v00777) から得られたマウス免疫グロブリンκポリA領域の配列に基づいて合成した。

PPF: ACGCGTCGACGCGGCCGCGCGCTAGCAGACAAAGGTCCTGAGACG

CCACCACCAGCTCCCC (SEQ ID NO: 45)

は、Sal I、Fse IおよびNhe I認識配列を5'末端部位に付加することによって調製し、

PPR: GAAGATCTCAAGTGCAAAGACTCACTTTATTGAATATTTTCTG (SEQ ID

NO: 46)

は、Bgl II認識配列を5'末端部位に付加することによって調製した。PCRは鋳型として25ngのマウスゲノムDNA (TT2F ES細胞からのゲノムDNA) を用いて行った。PCR産物を制限酵素Sal IおよびBgl IIで消化し、予め制限酵素Sal IおよびBgl IIで消化してあるpsp72ベクター (Promega KK) に連結した。配列の確認の後、精製したプラスミドを制限酵素Sal IおよびBgl IIで消化して、「部分的CkポリA断片」を得た。

【0304】

図5K. PCRによる全CkポリA断片の調製

10

PCR用の以下のプライマーはGenBank (gi: v00777) から入手したマウス免疫グロブリンκポリA領域の配列に基づいて合成した。

TPF: GGAATTCAGACAAAGGTCCTGAGACGCCACCACCAGCTCCCC (SEQ ID

NO: 47)

は、EcoR I認識配列を5'末端部位に付加することによって調製し、

TPR: CCCAAGCTTGCCCTCCTCAAACCTACCATGGCCCAGAGAAATAAG (SEQ

ID NO: 48)

は、Hind III認識配列を5'末端部位に付加することによって調製した。PCRは鋳型として25ngのマウスゲノムDNA (TT2F ES細胞からのゲノムDNA) を用いて行った。PCR産物は制限酵素EcoR IおよびHind IIIで消化し、予め制限酵素EcoR IおよびHind IIIで消化してあるpBluescript II KS-ベクター (Stratagene) に連結した。配列確認の後、プラスミドを制限酵素EcoR IおよびHind IIIで消化して、「全CkポリA断片」を得た。

【0305】

図5L. 全CkポリA断片、P2プロモーター断片、および部分的CkポリA断片からなるDNA断片Aの構築

前記のようにして作製した「全CkポリA断片」、「P2プロモーター断片」および「部分的CkポリA断片」を、予め制限酵素EcoR IおよびBgl IIで消化してあるpBluescript II KS-ベクター (Stratagene) に記載した順序で連結した。配列確認の後、精製されたプラスミドを制限酵素EcoR IおよびBgl IIで消化して、「DNA断片A」を得た。

【0306】

図5M. pIgCκ Δ IRES ProAプラスミドの構築

「DNA断片A」を、前記のように単離された「pIgCκ Δ IRES断片」に連結した。配列確認の後、プラスミドpIgCκ Δ IRES ProAが得られた。

【0307】

図5N. Ck P2 Hプラスミドの構築

pIgCκ Δ IRES ProAプラスミドをXho Iで消化し、このようにして単離されたマウスIgCκの上流ゲノム領域、マウスIgCκ、DNA断片AおよびLox-P Puroを含有する主要断片を、予め制限酵素Sal Iで消化してあるpΔCκ Salと連結した。配列確認の後、プラスミドCκ P2 Hが得られた。

【0308】

図50. Cκ 5'ゲノムプラスミドの構築

PCR用の以下のプライマーは、GenBank (gi: v00777) から入手したマウス免疫グロブリンκ JおよびC領域遺伝子を含有するDNAセグメントの配列に基づいて合成した。

5GF:

ATAAGAATGCGGCCGCCTCAGAGCAAATGGGTTCTACAGGCCTAACAACCT

(SEQ ID NO: 49)

は、Not I制限配列を5'末端部位に付加することによって調製し、

50

5GR: CCGGAATTCCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACAATGG, (SEQ ID NO: 50)

は、EcoR I 認識配列を5'末端部位に付加することによって調製した。PCRは25ngのマウスゲノムDNA（鋳型としてのTT2F ES細胞からのゲノムDNA）を用いて行った。PCR産物は制限酵素Not I およびEcoR Iで消化し、予め制限酵素Not IおよびEcoR Iで消化してあるpBlue-script II KS-ベクター（Stratagene）と連結した。配列確認の後、Cκ 5'ゲノムプラスミドが得られた。

【0309】

図5P. Cκ P2 KIΔ DTプラスミドの構築

Cκ P2 HプラスミドをEcoR IおよびXho Iで消化し、11Kbが得られ、予め制限酵素EcoR IおよびXho Iで消化してあるCκ 5'ゲノムプラスミドに連結した。配列確認の後、Cκ P2 KIΔ DTプラスミドが得られた。

【0310】

図5Q. Cκ P2 KIベクターの構築

制限酵素Xho IおよびKpn Iを用い、DT-A断片をpKIκ プラスミドから単離し、予め制限酵素Xho IおよびKpn Iで消化してあるCκ P2 KIΔ DTプラスミドに連結した。配列確認の後、Cκ P2 KIベクターが得られた。

【0311】

図5R. GIPF-KIベクターの組立

GIPF cDNA断片は、ヒトGIPF cDNAの配列（SEQ ID NO: 2）に基づいて合成した、PCR用の以下のプライマーを用いて増幅した。

SA3F: ACGCGTCGACCCACATGCGGCTTGGGCTGTGTGT (SEQ ID NO: 51)

は、Sal I 認識配列およびコザック配列を5'末端部位に付加することによって調製し、

SA3R: ACGCGTCGACGTCGACCTAGGCAGGCCCTG (SEQ ID NO: 52)

は、Sal I 認識配列を5'末端部位に付加することによって調製した。PCRは、鋳型としてMarathon-Ready cDNA（胎児皮膚および胎児肺、BD Biosciences CLONETECH）のプールを用いて行った。PCR産物を制限酵素Sal Iで消化し、予め制限酵素Sal Iで消化してあるpBlue-script II KS-ベクター（Stratagene）と連結した。配列確認の後、クローンが得られ、正しいGIPF cDNA配列を含有し、ヌクレオチド配列に置換はないことが確認された。該クローンを制限酵素Sal Iで消化し、GIPF cDNA断片を精製し、予め制限酵素Sal Iで消化してあるCκ P2 KIベクターに連結した。配列確認の後、GIPF-KIベクターが得られた（図5A）。

【0312】

B. GIPF-KIトランスジェニックマウスの作製

マウス胚の入手、培養、ES細胞の胚への注入、仮親の子宮への移植のための一般的な手法は、Yodoshaによって1995年に公表されたAizawa Shinichi, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」に記載された方法に従って行った。

【0313】

GIPF-KIベクターをNot Iで線状化し、Yodoshaによって1995年に公表されたShinichi Aizawa, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」によって記載された方法に従って、エレクトロポレーションによってC57BL/6 X CBA F1由来マウスTT2F ES細胞（Uchida, 1995, Lifetech oriental）、へ移動した。電気穿孔したES細胞を20mlのES培地〔DMEM（GIBCO）、18% FCS（GIBCO）、0.1mM 2-メルカプトエタノール（GIBCO）、1000U/ml LIF（白血病阻害因子、CHEMICON International, Inc.）〕に懸濁し、予めフィーダー細胞（Invitrogen）が播種されている2つの100mm組織培養プラスチックプレート（Corning）に接種した。1日後、該培地を、0.75g/mlのピューロマイシン（Sigma）を含有する培地と交換した。7～9日後、形成された合計119のコロニーを拾った。各コロニーを12ウェルプレート中で密集するまで増殖させ、次いで、培養の4/5を0.2mlの低温保存培地〔ES培地+10% DMSO

10

20

30

40

50

(Sigma)] に懸濁し、-80℃で凍結保存した。残りの1/5を12ウェルのゼラチン被覆プレートに接種し、2日間培養した。次いで、Puregene DNA単離キット (Gentra System) を用いてゲノムDNAを単離した。ピューロマイシン耐性TT2F細胞から単離されたゲノムDNAを制限酵素EcoR I (Takara Shuzo) で消化し、次いで、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。分離したDNA断片を膜 (GeneScreen, NEN (商標) Life Science Products) に移し、次いで、IgJκ-CκゲノムDNA (Xho I-EcoR I, 1.3Kb (SEQ ID NO: 67) : W0 00/10383, 実施例番号48) の3'領域から調製したDNA断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った。未標的化ESクローンのバンドパターンは約15KbのMWの1つのバンドを示し、標的化ESクローンは約15Kbおよび13.4KbのMWの2つのバンドを示す (図6)。48標的化ESクローン#10,12からの2つをサザン分析後に選択した (相同組換え率は約4.2%であった) 。選択されたESクローンを、Yodoshaによって1995年に公表されたShinichi Aizawa, 「B iomanual Series 8, Gene Targeting」によって記載された方法に従って核型分析によって試験した。正常な核型を示した2つのESクローン#10,12を胚への移植で用いた。 10

【0314】

標的化ES細胞クローン#10,12の凍結ストック中の細胞を解凍し、培養を開始し、免疫グロブリン重鎖ノックアウトマウス株 (Tomizuka et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 97: 722-727, 2000) の雄および雌マウスを交配させることによって得られた8細胞段階の胚に注入した; 注入率は胚当たり10~12細胞であった。胚をES細胞用の培地中で一晚培養して、胚盤胞まで発生させた後、約10のTT2F細胞注入胚を、2.5日間の偽妊娠処理に供してある仮親ICRマウス (CREA JAPAN, INC.) の子宮の各側に移植した。合計120の注入した胚の移植の結果、24匹の子孫マウスが生まれた。子孫におけるキメリズムは、宿主胚 (ICR) 由来アルビノ毛色におけるTT2F細胞由来アグーチ毛色 (暗い茶色) の程度によって判断した。24の子孫のうち、11匹のマウス (ノックインマウス) は、部分的アグーチ毛色を有すると認められ、これは、ES細胞の寄与を示す。ノックインマウスの尾から単離したゲノムDNAをPCR分析用に用いた。PCR用の以下の2つのプライマーはGIPF-KIベクター: 20

SACF:CTGACTAGACTCTATCTTGC (SEQ ID NO: 53)

および

SACR: CCACGGAGACCACTCGCTCATT (SEQ ID NO: 54)

の配列に基づいて合成した。PCRは、鋳型として25ngのマウス尾ゲノムDNAを用いて行った。得られた反応溶液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、606bpバンドを検出した。正常なTT2F細胞クローンを対照キメラマウスの産生で用いた。 30

【0315】

マウスを12/12-時間暗/明サイクル (午前8:00に照明をつける) 下に維持し、5μm濾過水およびCE-2食料 (CLEA JAPAN, INC.) を自由に受領させた。雄マウスを離乳期後に個々に収容した。

【0316】

実施例5

トランスジェニックGIPF-KIマウスを用いるGIPFの生物学的活性の評価

前記のトランスジェニックマウスからの小腸および結腸の肉眼での病理学的変化および組織学的変化を以下のように評価した。 40

【0317】

GIPFトランスジェニックKIマウスは、4週齢で出発する小腸の肥大成長、および発生の間の有意な腹部拡張を示した。図7は、15週齢GIPFトランスジェニックKIマウスは、対応する対照KIマウスと比較して、顕著な腸拡張および増大した小腸質量を有したことを示す。ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 染色 (Issacson, P.G., and Wright, D.H., 1983) を用いる組織病理学的評価を、肝臓、脾臓、肺、腎臓、心臓、小腸および大腸を含む種々の組織のパラフィン胞埋切片 (5μmの厚み) で行った。小腸のH&E切片は図8 (低倍率) および図9 (高倍率) に示した。組織病理学報告はIDEXX Laboratories, Inc.によって提供され、後に記載する。

【0318】

対照およびノックインマウス由来の組織の組織学的外観の間の唯一の有意な差は小腸で見られた。この変化は、陰窩の長さおよび分岐の複雑性が顕著に増大した陰窩上皮過形成による粘膜の顕著な散漫な厚化からなるものであった。陰窩は頻繁に有糸分裂する、好塩基性細胞質および基底に位置した大きな卵型ヘテロクロマチン核を有する膨らんだ円柱状上皮細胞によってライニングされた。多数のアポトーシス体が陰窩上皮全体に散らばっており、これは、細胞代謝回転率の増大を示唆する。陰窩上皮細胞もまた通常に陰窩の長さにわたってパネート細胞および粘膜分泌杯細胞双方に分化した。絨毛上皮は有意には変化しなかった。同様な変化がパイエル板に関連する小腸粘膜で見られた。腸粘膜は正常に外部にライニングし、パイエル板のリンパ様組織へ小さな陥入を形成することができる。GIPF-KIマウスにおいては、表面および陥入で過形成変化も見られ、そこでは、それらは、陰窩、すなわち、陰窩微小膿瘍内の温和な急性炎症および壊死細胞の蓄積に関連していた。このパイエル板は接線方向に切断され、従って、リンパ様組織の量および特徴は評価するのが困難であった。しかしながら、少数の形質細胞があり、これは、Bリンパ球の抗体産生細胞への形質転換を示す。腸および他の組織におけるリンパ様または炎症細胞集団において他の目に見える変化はなかった。

10

20

30

40

50

【0319】

KIマウスにおける腸上皮細胞増殖を測定するために、製造業者の指示および従前に記載された方法 (Scholzen, T. et al. 2000) に従い、モノクローナルラット抗マウスKi67抗原 (Dako Ltd., High Wycombe, UK) を用いる免疫組織化学を、対照およびGIPF KIマウスの小腸のパラフィン包埋切片で行った。図10に示すように、GIPF KIマウスは、小腸において増大したKi67陽性上皮細胞を示し、これは、GIPFタンパク質発現による増大した増殖を示唆する。

【0320】

GIPF-KIマウスの3匹は12ヶ月で得た。これらの12月齢マウスは、より若い動物で見られる典型的な腹部拡張および増大した腸質量を示した。H&E切片は脾臓、肝臓、副腎、腎臓、胸腺、心臓、肺、小腸、大腸、胃および脳を含む種々の組織で調製した。

【0321】

12月齢GIPF-KIマウスの小腸からの切片の組織学は、GIPFが、15週齢GIPF-KI動物で見られたのと同程度の、陰窩長さの顕著な増大を誘導したことを示した。加えて、他の器官からの切片の組織学的分析は、12ヶ月の長い期間にわたって、GIPFがいずれの明らかな腫瘍形成活性を示さなかったことを明らかにした。自然発生腫瘍形成は、時々、マウスが正常であるかまたはKIトランスジェニック動物であるかとは拘らずいくつかのマウスで時々観察された。肝臓腺癌の低い発生率が12月齢の対照マウスで観察された。

【0322】

実施例6

GIPFアデノウイルスベクター

マルチクロニング部位 (MCS) においてNheIおよびXbaI部位を用い、GIPF cDNA (SEQ ID NO: 2) をpAdeno VatorCMV5-Intronにクローン化して、V5His6標識したGIPF組換えアデノウイルスを得た。pAdeno Vator-CMV5-Intronは、pAdeno VatorCMV5-IRES-GFP (Qbiogene, Carlsbad, CA, U.S.A.) の修飾によって得られた。pAdeno Vator-CMV5-IRES-GFPをSpeIで消化して、そのMCS、IRESおよびGFPを除去し、プライマー

5'-CACCCCTAGGTCAATATTGGCCATTAGC-3' (SEQ ID NO: 55) および 5'-

CACCCCT-AGGTAGGCATCCCCAGCATGC-3' (SEQ ID NO: 56)

を用い、pcDNA/IntronベクターからのPCR増幅されたIntron-MCS-V5His-BGHポリAと連結した。

【0323】

アデノウイルス-5ゲノム (E1/E3欠失) をコードするAdEasy-1プラスミドを運ぶ細菌細胞BJ5183 (Qbiogene, Carlsbad, CA, U.S.A.) への線状化導入ベクターの形質転換は、製造業者の指示に従って、エレクトロポレーションによって行った。組換えアデノウイルスを

作製し、QBI-293A細胞 (Qbiogene, Carlsbad, CA, U.S.A.) にて増幅し、従前に記載されているように、CsClバンディングによって精製した (Garnier, A., J. Cote et al. 1994)。組換えアデノウイルスに感染している293A細胞による組換えタンパク質の発現は、抗V5抗体 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) を用いるウェスタン分析によって測定した。CsCl精製組換えウイルスの力価は、製造業者のプロトコルに従って、Adeno-X迅速力価キット (BD biosciences, Palo Alto, U.S.A.) を用いて測定した。簡単に述べれば、293A細胞を組換えアデノウイルスストックの系列希釈で感染させ、続いて、感染から48時間後における、マウス抗ヘキソン抗体での形質導入細胞の固定および染色によってウイルスストックを試験した。西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したヤギ抗マウス抗体でシグナルを検出し、金属増強3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロ-クロライド (DAB) で発色させた。

10

【0324】

実施例7

GIPFの生物学的活性を評価するためのモデルとしてのGIPFアデノウイルスの投与

GIPF組換えアデノウイルスを正常マウスに投与して、腸および結腸上皮に対するGIPFの効果を測定し、GIPFトランスジェニックマウスで観察された表現型が非トランスジェニック動物で確立し得ることを確認した。アデノウイルスの注入に先立って、6~8週齢のBALB/Cマウスをイソフルランを用いて麻酔した。マウス当たり 1×10^{10} ウイルス粒子を後眼窩静脈を通じて注入した。対照ウイルス (空ウイルス) またはPBS単独の同一力価を対照として用いた。ウイルス注入 (全ての群について $n=3$) から3日または5日後にマウスを屠殺した。屠殺する4時間前に、1mgのプロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内 (IP) 注入して、上皮細胞のインビボ増殖を測定した。小腸、結腸、脾臓、肝臓および骨髄を含む種々の組織を収集し、ホルマリン中で固定した。パラフィン包埋切片を組織学的評価のためにヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で染色した。従前に記載されているように (McKinley, J.N. et al. 2000)、製造業者の指示に従って (Oncogene Research product, Boston, U.S.A.)、BrdU免疫組織化学のために切片も同様に処理した。モノクローナルラット抗マウスKi67抗原 (Dako Ltd., High Wycombe, UK) を用いる免疫組織化学もまた実施し、製造業者の指示および従前に記載された方法 (Scholzen, T. et al. 2000) に従って腸上皮細胞の増殖を評価した。

20

【0325】

アデノウイルス注射から3日後に屠殺した小腸からの切片のH&E染色 (図11) は、GIPFアデノウイルスを受容したマウスの小腸が有意に変化し、GIPFトランスジェニックマウスで見られたのと同じ組織学的特徴を示した (図8および9)。GIPFによって引き起こされた組織学的変化は、陰窩の長さおよび分岐の複雑性が顕著に増大した陰窩上皮過形成による粘膜の顕著な散漫な厚化を含んだ。陰窩は、頻繁に有糸分裂する、好塩基性細胞質および基底に位置する大きな卵型ヘテロクロマチン核を有する膨らんだ円柱状上皮細胞によってライニングされていた。また、陰窩上皮細胞は陰窩の長さにわたってパネート細胞および粘膜分泌杯細胞双方に通常に分化した。陰窩上皮増殖に対するGIPFの効果はさらにウイルス注射から5日後に増強され、これは図12に示した。腸上皮細胞の増殖に対するGIPFの効果を評価するために、BrdUの取り込みおよびKi67免疫染色を、対照、およびGIPFアデノウイルスを受けたマウスの小腸切片で行った。図13および14に示すように、GIPFアデノウイルスを受けたマウスは、各々、有意によりBrdUおよびKi67陽性の細胞を有した小腸で陰窩を有した。陰窩上皮細胞の増殖に対するGIPFの生物学的効果もまたマウス当たり 1×10^9 ウイルス粒子のより低いウイルス用量で観察された (図15)。小腸で見られる効果に加えて、GIPFは陰窩上皮過形成も誘導し、陰窩の長さの顕著な増大、および結腸における杯細胞の数およびサイズの増大を伴った (図16)。

30

40

【0326】

実施例8

GIPFおよびGIPFアナログをコードする発現ベクター

KpnIおよびXbaI部位を用い、GIPFをコードするcDNA (SEQ ID NO: 3) をpcDNA/Intronベクターにクローン化して、野生型およびカルボキシ末端V5His6-標識したGIPFを得た (SEQ

50

ID NO: 5)。哺乳動物発現ベクターpcDNA/Intronは、pCI哺乳動物発現ベクター (Promega, Madison, WI) に由来する作製されたキメライントロンを導入することによりpcDNA3.1TOPOベクター (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) を遺伝子的に修飾することによって得られた。pCIをBglIIIおよびKpnIで消化し、イントロン配列を、BglIIIおよびKpnIで消化してあるpcDNA3.1にクローン化した。以下の
 フォワード 5' CACCATGCGGCTTGGGCTGTCTC 3' (SEQ ID NO: 57) リバース 5'

GGCAGGCCCTGCAGATGTGAGTG 3' (SEQ ID NO: 58)

を用いるPCRによって、SEQ ID NO: 2のGIPF ORF (SEQ ID NO: 3) をまずpcDNA3.1/V5His-TOPO (Invitrogen) にクローン化し、完全なGIPF ORFを含有するpcDNA 3.1/V5His-TOPOからのKpnI-XbaIインサートを修飾されたpcDNA/Intronベクターに連結して、pcDNA/Intron構築物を得た。 10

【0327】

全長GIPFタンパク質のアナログは以下のようにして得た。pcDNA/IntronにおけるGIPFの予測されたコンセンサスフェーリン切断部位 (アミノ酸28R/Q) の突然変異は、プライマー

5'-GATCAAGGGGAAACAGCAGAGGCGGATCAG-3' (SEQ ID NO: 59) および 5'-

CTGATCCGCCTCTGCTGTTTCCCCTTGATC-3' (SEQ ID NO: 60)

を用いる部位特異的突然変異誘発によって行った。GIPF欠失変異体 (アミノ酸残基21~31欠失) (SEQ ID NO: 16) をスイッチング方法を用いて作製した。該欠失はプライマー組1 20

5'-CACCGCTAGCCTCGAGAATTCACGCGTG-3'

(SEQ ID NO: 61) およびホスホ 5'-GCTGATGGTGAGGTGCGTC-3' (SEQ ID NO: 62)

、

組2:

ホスホ 5'-ATCAGTGCCGAGGGGAGCCAG-3' (SEQ ID NO: 63) および

5'-GCCCTCTAGAGCGGCAGGCCCTGCAGATG-3' (SEQ ID NO: 64) 30

を用いる2つの断片のPCR増幅、続いての、2つの断片の連結によって導入した。アミノ酸21~31の欠失を運ぶGIPF cDNAは、各々、SEQ ID NO: 61および64のフォワードおよびリバースプライマーを用いるPCRによって増幅し、NheIおよびXbaIで消化し、そのマルチクローニング部位において、NheIおよびXbaI部位を用いてpcDNA/Intronベクターにサブクローン化した。配列は双方の変異体につき確認した。

【0328】

また、トロノスポンジン (TSP) ドメイン (GIPFのORFのnt451~nt618 (SEQ ID NO: 13)) を哺乳動物発現のためにpcDNA/Intronベクターにクローン化した。TSPドメインをコードするcDNAは、NheIフォワードプライマー

CCGGCTAGCCACCATGGCGCAATGTGAAATGA (SEQ ID NO: 65) 40

およびNotIリバースプライマー

CCATGCGGCCGCCCTCCTCACTGTGCACCT (SEQ ID NO: 66)

を用いるPCRによって増幅した。NheIおよびNotI制限酵素消化PCR産物をNheIおよびNotI消化pcDNA/Intronベクターに連結した。組換えアデノウイルスを作製するために、前記のPCR増幅からのTSPドメインを、NheIおよびNotI制限酵素を用いてpAdeno Vator-CMV5-Intronにクローン化した。PCR-増幅TSPドメインの配列を確認した。

【0329】

GIPFのフェーリン様システインに富む領域の種々の部分を欠く他のアナログを実施例19に記載する。

【0330】

後の実施例に記載する方法を用い、前記のGIPFアナログの生物学的活性をインビボおよびインビトロで評価した。GIPFアナログの生物学的活性はGIPFトランスジェニックモデルを用いて評価する。

【0331】

実施例9

組換えGIPFの精製

A. 真核生物細胞におけるGIPFtの発現および精製

V5-His-標識したGIPF (GIPFt) (SEQ ID NO: 5) をHEK293およびCHO細胞で発現させ、以下のように精製した。

【0332】

V5-His-標識したGIPFポリペプチド (SEQ ID NO: 5) をコードするDNAを含むGIPF pcDNA/Intron構築物でトランスフェクトされているHEK293細胞の安定な細胞培養を無血清293フリースタイル培地 (GIBCO) 中で増殖させた。懸濁培養を100万細胞/mlの細胞密度にて播種し、4~6日後に回収した。培地に分泌されたV5-His-標識したGIPFのレベルをELISAによってアッセイした。

【0333】

V5-His-標識したGIPF (SEQ ID NO: 5) をコードするヌクレオチド配列を含むpDEF2Sベクターで形質転換されているCHO細胞の安定な細胞培養を無血清EX-CELL302培地 (JRH) 中で増殖させた。発現ベクターは、メトトレキサート (MTX) の存在下での陽性選択および増幅を可能とする、DHFRをコードするDNA配列を含有する。培地へ分泌されたV5-His-標識したGIPFのレベルはELISAによってアッセイした。

【0334】

分泌されたGIPFタンパク質を含有する培地を回収し、-80℃にて凍結した。培地を4℃で解凍し、プロテアーゼ阻害剤、EDTAおよびPefabloc (Roche, Basel, Switzerland) を各々1 mMの最終濃度で加えて、GIPFの分解を妨げた。培地を0.22 μm PESフィルター (Corning) を通して濾過し、10kDa分子量カットオフ膜にてTFFシステム (Pall Filtron) を用いて10倍濃縮した。濃縮した培地の緩衝液を20mMリン酸ナトリウム、0.5M NaCl、pH7と交換した。リン酸緩衝液中への0.5M NaClの添加は、精製の間におけるpH7でV5-His標識したGIPFの十分な溶解性を維持するのに非常に重要である。限外濾過および透析濾過に続いて、哺乳動物プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) を1:500 (v/v) の最終希釈まで加えた。

【0335】

HiTrap Ni²⁺-キレート化アフィニティーカラム (Pharmacia) を20mMリン酸ナトリウム、pH7、0.5M NaClで平衡化した。緩衝液交換培地を0.22 μmのPESフィルターで濾過し、Ni²⁺-キレート化アフィニティーカラムにロードした。Ni²⁺ カラムを、10カラム容量のための10カラム容量 (CV) の20mMイミダゾールで洗浄し、35CVにわたる20mM~300mMイミダゾールのグラジエントでタンパク質を溶出させた。画分をSDS-PAGEおよびウェスタンブロットによって分析した。V5-His標識したGIPFを含有する画分を分析し、プールして、GIPFタンパク質溶液が得られ、これは75~80%純度の間であった。

【0336】

Ni²⁺ カラムを用いて単離したGIPFタンパク質を含有する緩衝液を20mMリン酸ナトリウム、0.3Mアルギニン、pH7と交換して、NaClを除去した。NaClをリン酸緩衝液中の0.3M Argで交換して、引き続いての精製段階の間にV5-His標識したGIPFタンパク質の十分な溶解性を維持した。Ni²⁺ カラムを用いて単離したGIPFタンパク質を20mMリン酸ナトリウム、0.3Mアルギニン、pH7で平衡化してあるSP Sepharose高性能カチオン交換カラム (Pharmacia, Piscataway, NJ) にロードした。カラムを8CVの間、0.1M NaClで洗浄し、30CVの間、0.1M~1M NaClのグラジエントで溶出させた。V5-His標識したGIPFを含有する画分をプールして、タンパク質溶液が得られ、これは90~95%純度の間であった。

【0337】

プールされた画分の緩衝液を20mMリン酸ナトリウム、pH7、0.15M NaClで交換し、タンパク質を1または2mg/mLまで濃縮し、滅菌0.22 μmフィルターを通した。純粋なGIPF調製物

10

20

30

40

50

を-80℃で保存した。

【0338】

各精製段階の最後に得られたタンパク質収率を分析し、ELISA、タンパク質BradfordアッセイおよびHPLCによって定量した。GIPFタンパク質の回収率(%)を精製プロセスの各段階で測定し、以下の表2に示す。

【0339】

(表2)

工程	工程回収率	全回収率
媒体濃度/ 透析濾過	100 %	100 %
Niキレート化アフィニティー	65 %	65 %
SPカチオン交換	80 %	52 %
最終処方およびフィルター	95 %	49 %

10

【0340】

精製されたGIPFタンパク質のSDS-PAGE分析を還元および非還元条件下で行い、これは、CHOおよび293細胞双方に由来するV5-His標識したGIPFタンパク質がモノマーとして存在することを示した。GIPFタンパク質をグリコシル化し、ほぼ42kDaの分子量(MW)での非還元条件下でSDS-PAGEを移動させる。CHO細胞から精製したGIPFタンパク質のMWおよびHEK293細胞から精製されたそれにおける僅かな差がある。この差は、GIPFが異なった細胞型においてグリコシル化される程度によって説明することができる。N末端配列分析は、HEK293細胞がポリペプチドの2つの形態を生じたことを示した。シグナル配列を欠くSEQ ID NO: 4のGIPFタンパク質に対応するドメイン成熟形態(SEQ ID NO: 10)、およびシグナルペプチドおよびフューリン切断配列を共に欠くSEQ ID NO: 4のGIPFタンパク質に対応する成熟形態(SEQ ID NO: 12)。2つの形態はSPカラムでよく分離され、これは、ほぼ1:2の支配的成熟形態に対する成熟の比率で発現された。

20

【0341】

pH7におけるGIPFタンパク質の溶解性に対するNaClおよびアルギニン(Arg)の効果を測定し、これを図17Aに示す。0.3M Argの非存在下では、精製の間にタンパク質の50%減少が引き起こされたと判断された。図17Bは、PBS(20mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7)中の精製されたタンパク質の溶解性を示す。GIPFタンパク質は4℃、pH7において7日間、8mg/mLの濃度で溶液のままである。

30

【0342】

まとめると、HEK293またはCHO細胞のV5-His-標識したGIPFの精製は、1) 培地に存在するGIPFタンパク質を濃縮し、透析濾過し、2) Ni^{2+} -キレート化アフィニティークロマトグラフィーを行い、次いで、3) SPカチオン交換クロマトグラフィーによって行った。該精製プロセスによりGIPFタンパク質が得られ、これは>90%純度である。現在の精製プロセスの全回収はほぼ50%である。媒体透析濾過およびNiカラムの精製プロセスの間における0.5M NaClの緩衝液への添加は、pH7においてGIPFを十分に溶解性に保持するのに非常に重要である。SPカラムへGIPFを結合させるにはNaClを除去し、0.3M Argを加えて、高い溶解性を維持し、タンパク質回収を増大させた。第一および第二の精製段階の間における0.5M NaClおよび0.3M Argの添加は、少なくとも25%~50%だけの全回収を増加させることが示された。

40

【0343】

V5His-標識したGIPFの支配的成熟および成熟形態を用いて、実施例10に記載されたインビトロの設定にてGIPFの生物学的活性を試験した。本実施例の方法によって精製されたタンパク質は腸陰窩上皮細胞の有意な増殖を一貫して誘導し、これは、精製されたGIPFタン

50

パク質が投与されたマウスの小腸の拡張の基礎となる。

【0344】

B. 真核生物細胞におけるGIPFwtの発現および精製

未標識野生型GIPFタンパク質 (GIPFwt; SEQ ID NO: 4) を、標識したGIPFタンパク質について記載したのと同様な方法で発現させ、精製した。全長GIPFポリペプチド (GIPFwt) (SEQ ID NO: 4) をコードするDNA (SEQ ID NO: 3) を含むpcDNA/IntronベクターでトランスフェクトされているHEK293細胞の安定な細胞培養を、懸濁液で増殖するように適合させ、25 μ g/mlジェネテシンの存在下で無血清293フリースタイル培地 (GIBCO) 中で増殖させた。

【0345】

スピナーにおける細胞培養増殖：スピナーにおける小規模産生のため、細胞の凍結ストックのアリコットを、0.5%胎児ウシ血清 (FBS) を加えた293フリースタイル培地中で増殖させ、拡大した。細胞を播種し、各継代につき300,000~500,000/mLの細胞密度にてスピナーにおいて拡大した。十分な細胞が蓄積され、細胞密度が産生のため1,000,000細胞/mLに到達すれば、培地を無血清293フリースタイル培地と交換して、0.5%FBSを除去し、6日後に回収した。最初の細胞生存率は80~90%の間であり、それは回収の時点で30%まで減少した。培地に分泌されていたGIPFwtのレベルはELISAおよびウェスタンによってアッセイした。スピナーにおけるGIPFwtの増殖は1.2~1.5mg/lを生じた。

【0346】

バイオリアクター供給バッチモードの細胞培養増殖を、バイオリアクターにおける大規模産生で用いた。HEK293細胞の無血清適合懸濁培養を、細胞の継代の場合に、200,000~400,000/mlの細胞密度にて播種した。細胞を無血清293フリースタイル培地中で増殖させ、2001および5001バイオリアクターの接種のため、50~500ml振盪フラスコから20~50攪拌タンクに拡大した。十分な細胞が蓄積すると、細胞を200,000~400,000細胞/mlの密度にてバイオリアクターに接種した。細胞密度が1,000,000細胞/mlに到達すると、ビタミンおよびMEMアミノ酸 (GIBCO) を加えて、増殖をブーストし、支持した。細胞生存率が25~30%まで低下すると、6~7日後に細胞をバイオリアクターから回収した。培地へ分泌されているGIPFwtのレベルはELISAおよびウェスタンによってアッセイした。分泌されたGIPFのウェスタン分析は、タンパク質の分解は起きなかったことを示した。精製された抗GIPFポリクローナル抗体を用いてウェスタン分析を行い、捕獲抗体として精製されたニワトリ抗GIPFポリクローナル抗体および検出抗体としてウサギ抗GIPFポリクローナル抗体を用い、ELISAによるタンパク質の検出を行った。ウサギおよびニワトリポリクローナル抗体は、全タンパク質に対して生起させた。バイオリアクター中のGIPFwtの増殖は2.6~3mg/lを生じた。

【0347】

限外濾過-透析濾過分泌されたGIPFwtタンパク質を含有する培地を遠心によって回収した。タンパク質阻害剤1mM EDTAおよび0.2mM Pefabloc (Roche, Basel, Switzerland) を加え、GIPFの分解を妨げた。培地を0.22 μ mのPESフィルター (Corning) を通して濾過し、10kDaカットオフ膜にてTFFシステム (Pall Filtron) または中空繊維システム (Spectrum) を用いて10倍濃縮した。濃縮された培地の緩衝液を20mMリン酸ナトリウム、0.3M Arg、pH 7と交換した。リン酸緩衝液中の0.3M Argの添加は、精製の間においてpH7でGIPFwtを十分に溶解性に維持するのに非常に重要である。限外濾過および透析濾過の後に、哺乳動物プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) を1:500 (v/v) 希釈で加えた。

【0348】

Qアニオン交換クロマトグラフィー-アニオン交換Q sepharose HPカラム (Amersham) を、pH7.0の、0.3M Argを含有する20mMリン酸ナトリウム (NaP) 緩衝液で平衡化した。10倍濃縮し、緩衝液交換した培地を0.22 μ m PESフィルターで濾過しQ sepharoseカラムにロードし、不純物および核酸を結合させた。

【0349】

SPカチオン交換クロマトグラフィー：GIPFwtを含有するQ-sepharoseフロースルーを集

10

20

30

40

50

め、GIPFタンパク質に結合したカチオン交換SP sepharose HP (Amersham) にロードした。SP sepharoseカラムを15カラム容量 (CV) の20mM NaP、0.3M Arg、0.1M NaCl、pH7で洗浄し、GIPFを40カラム容量にわたって0.1M~0.7MのNaClのグラジエントで溶出させた。画分をSDS-PAGEおよびウェスタンブロットによって分析した。GIPFwtを含有する画分を分析し、プールした。プールした画分の緩衝液を、20mMリン酸ナトリウム、pH7、0.15M NaClと交換した。精製されたタンパク質の純度が、SDS-ゲルのクーマシー染色によって分析すると、92~95%であると断定された。タンパク質を1mg/mlまで濃縮し、滅菌0.22 μ mフィルターを通して通過させ、-80℃で保存した。

【0350】

精製プロセスにおいて各段階の最後に得られた収率はELISAおよびBradfordアッセイによって定量し、GIPFタンパク質の回収率 (%) は表3に示されるように計算された。

10

【0351】

(表3)

工程	工程回収率	全回収率
媒体濃度/ 透析濾過	100 %	100 %
Qアニオン交換	95 %	95 %
SPカチオン交換	75 %	71 %
最終処方およびフィルター	98 %	70 % 48% (支配的成熟形態のみ)

20

【0352】

最終製剤化のGIPFタンパク質溶液のエンドトキシンレベルは発色源LAL (Limulus Amebocyte溶解物) アッセイキット (Charles River) を用いて分析し、GIPFのmg当たり0.24EUであると決定された。

【0353】

30

C. 酵母におけるGIPFtの発現および精製

GIPFtを酵母培養物から発現させ、精製し、生物学的活性を、前記のHEK293細胞培養物から精製されたGIPFtのそれと比較した。

【0354】

GIPFtをコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 5) を、酵母 α -因子分泌シグナル配列を含有するPichia発現ベクターpPICZ α Aにクローン化した。ピチア パストリス (Pichia Pastoris) 野生型X-33株を用いて、GIPFtを発現させた。ピチア属ベクターの使用、組換えタンパク質の発現および精製のためのプロトコルはInvitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から入手可能であり、これは、「Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology」(D.R.Higgins and J.Cregg eds, The Humana Press, Totowa, NJ 1998) にも記載されている。

40

【0355】

簡単に述べれば、SPカチオン交換クロマトグラフィー、続いて、IMAC Ni²⁺ カラムでのアフィニティークロマトグラフィーを用いてGIPFtを精製した。Ni²⁺ カラムを20mMイミダゾールで洗浄し、30カラム容量にわたって20~300mMイミダゾールグラジエントにてGIPFを溶出させた。精製された産物のSDS-PAGEは約50kDaの広くかつスミアーのタンパク質バンドを示し、これはGIPFtが種々の程度にグリコシル化されることを示す。生物学的活性は、各々、実施例17および20に記載されたようにインビトロおよびインビボで分析した。

【0356】

ピチア パストリス (Pichia Pastoris) において発現されたGIPFtタンパク質は、HEK29

50

3細胞から精製されたGIPFタンパク質で得られたもの（データは示さず）よりも低いにもかかわらず、マウス腸上皮の増殖を誘導し、 β -カテニンを安定化した。

【0357】

D. GIPF-mGIPFtのネズミオルソログの精製

ヒトGIPFのマウスオルソログをコードするSEQ ID NO: 68をpcDNA/Intronベクターにクローン化して、V5-His標識したタンパク質mGIPFtを発現させた。標識したマウスタンパク質をHEK293細胞で発現させ、ヒトGIPFタンパク質の精製につき前記の方法に従って精製した。タンパク質は80%純度まで精製され、PBS中で製剤化された。mGIPFtの生物学的活性をインビボおよびインビトロで分析し、ヒトGIPFと同一の増殖特性を保有することが示された（実施例20）。

10

【0358】

E. 精製された組換えGIPFの特徴付け

精製されたGIPFタンパク質（GIPFtおよびGIPFwt）のSDS-PAGE分析は還元および非還元条件下で行い、293細胞に由来するV5-His標識したGIPFタンパク質はモノマーとして存在することを示した。GIPFtおよびGIPFwtタンパク質はグリコシル化され、各々、ほぼ42kDaおよび38kDaの分子量（MW）にて非還元条件下でSDS-PAGEを移動する。マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析法（MALDI）は、GIPFtおよびGIPFwtについての各分子量が37.8kDaおよび32.9kDaであり、他方、シグナルペプチドを欠くGIPFtおよびGIPFwtについての理論分子量が、各々、30.2kDaおよび26.8kDaであることを示した。分子量における矛盾は、それがタンパク質のグリコシル化によって説明できるであろうことを示唆した。引き続き、製造業者の指示に従って、N-およびO-グルカナーゼ（Prozyme, San Leandro, CA, USA）を用いてN結合およびO結合オリゴ糖の完全な脱グリコシル化を行った。脱グリコシル化タンパク質のSDS-PAGE分析の結果、4~5kDaの見掛けの分子量の減少がもたらされた。脱グリコシル化は、各々、実施例17および20に記載されたようにインビトロおよびインビボでアッセイするとGIPFの生物学的活性に影響しなかった（データは示さず）。

20

【0359】

タンパク質の安定性-変性後のGIPFの活性を試験するために、GIPFを5分間煮沸し、氷上で迅速に冷却した。十分な活性を保持したGIPFをインビトロ（実施例17参照）およびインビボ（実施例21参照）で測定した。これらの知見は、GIPFが安定なタンパク質であることを示す。

30

【0360】

システイン残基のキャッピング-システイン残基の還元およびアルキル化を行って、GIPFの活性をなくした。GIPF（1mg/ml）のジスルフィド結合の還元は、30mM DTT、pH8中でGIPFを37°Cで1時間インキュベートすることによって得られた。引き続き、遊離スルフヒドリルは、暗所にて37°Cにおける30分間の20mMヨードアセトアミドでのS-カルボキシメチル化に供した（Crestfield A M; Moore S; Stein W H. J. Biol. Chem. 1963; 238, 622）。凍結によって反応を停止させ、PBSに対する透析によって過剰のDTTおよびヨードアセトアミドを除去した。インビトロおよびインビボアッセイを共に用い、キャップされたGIPFの生物学的活性を分析した。GIPFの生物学的活性は、キャッピングによって消滅した（実施例17および20参照）。

40

【0361】

N末端配列分析は、HEK293細胞がGIPFtまたはGIPFwtポリペプチドいずれかの2つの形態を生じたことを示した。シグナル配列を欠くSEQ ID NO: 4のGIPFタンパク質に対応する支配的成熟形態（SEQ ID NO: 10）、およびシグナルペプチドおよびフューリン切断配列を共に欠くSEQ ID NO: 4のGIPFタンパク質に対応する成熟形態（SEQ ID NO: 12）。SPカラムでよく分離された2つの形態は、ほぼ1:2の支配的成熟形態に対する成熟の比率で発現された。GIPFtの支配的成熟および成熟形態は共にインビボにて腸陰窩細胞の増殖を誘導するが、支配的成熟形態を用いて、実施例11、12、13、および14に記載された疾病の動物モデルにおいてGIPFの治療効果を試験した。CHO細胞はGIPFの支配的成熟形態のみを発現する。

50

【0362】

フューリン切断部位の突然変異誘発 ($\text{Arg}^{28} \rightarrow \text{Gln}$) -HEK293細胞から生じたGIPFの成熟形態がフューリンプロテアーゼによる天然プロセッシングから起こることを示すために、フューリン切断部位の保存された配列を突然変異させて、 $\text{Arg}^{28}\text{QRR}$ を $\text{Gln}^{28}\text{-QRR}$ によって置き換えた。変異体タンパク質 (SEQ ID NO:18) をHEK293細胞において発現させ、GIPFtの精製で用いた方法に従って精製した (実施例9A)。精製されたタンパク質のN末端配列決定により、支配的成熟形態のみが培養で発現されることが確認された。この知見により、成熟形態は細胞フューリンプロテアーゼ活性によるタンパク質分解切断の結果として生じることが確認される。加えて、精製された支配的成熟形態の全回収は50%から68%へ増大した。

10

【0363】

まとめると、精製プロセスは>90%純度であるGIPFtタンパク質、および92~95%純度であるGIPFwtを生じる。いずれかの精製プロセスを用いるGIPFの支配的成熟形態の全回収はほぼ50%である。しかしながら、収率は、突然変異したフューリン切断部位を有するタンパク質を発現させることによって増加させることができる。媒体透析濾過およびNiカラムの精製プロセスの間における0.5M NaClの緩衝液への付加は、pH7においてGIPFを十分に可溶性に維持するのに非常に重要である。GIPFをSPカラムに結合させるために、NaClを除去し、0.3M Argを加えて、高い溶解性を維持し、タンパク質回収を増加させた。

【0364】

GIPFtおよびGIPFwtの支配的成熟および成熟形態を用いて、インビボにてGIPFの生物学的活性を試験した。本実施例の方法によって精製されたタンパク質は、腸陰窩上皮細胞の有意な増殖を一貫して誘導し、これは、精製されたGIPFタンパク質を投与されたマウスの小腸の拡張の基礎となる。

20

【0365】

GIPFの生物学的活性は脱グリコシル化または煮沸によって影響されなかったが、システイン残基のヨードアセトアミドでのキャッピングによって消滅した。

【0366】

実施例10

HEK293およびCHO細胞で発現された組換えGIPFタンパク質のインビボ生物学的試験

HEK293およびCHO細胞に由来するGIPFtタンパク質のインビボ生物学的効果を正常なマウスにおいて以下のように評価した。

30

【0367】

組換えGIPF V5His6-標識したタンパク質 (GIPFt) の薬物動態 (PK) をマウスにおいて測定した。6~8週齢BALB/cマウスに尾静脈を介して、40mg/kg GIPFtタンパク質または対照としての製剤緩衝液いずれかの単一容量を静脈内注射した。血液を注射から0、30分、1時間、3時間、6時間および24時間後に吸い取り、抗V5抗体 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) を用いるウェスタン分析によって、各時点における血清中タンパク質レベルを分析した (図18A)。図18Aは、血清GIPFタンパク質の有意な分解が検出されなかったことを示す。血清中のGIPFタンパク質の半減期は、標準V5標識したタンパク質としてPositope (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) を用いて注射後にタンパク質濃度の半対数プロットによって計算し、5.3時間と見積もられた (図18B)。

40

【0368】

精製された組換えGIPFtタンパク質がGIPFノックインマウス、および組換えアデノウイルスを注射されたマウスにおいて観察されるのと同様な表現型を生じ得るか否かを調べるために、6~8週齢BALB/cマウスに尾静脈を通じて4mg/kg GIPFtタンパク質または対照としての製剤緩衝液いずれかを毎日7日間注射した。8日目、最後の注射から24時間後に、マウスを屠殺した。屠殺する4時間前に、1mgのブロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内注射して、GIPFのインビボ増殖活性を測定した。小腸、結腸、脾臓、肝臓および骨髄を含む種々の組織を収集し、ホルマリン中で固定した。パラフィン包埋切片を組織学的評価のためにヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。また、製造業者の指示に従い (Oncogene R

50

research product, Boston, U.S.A)、かつ従前に記載されているように (McKinley, J.N. et al. 2000)、切片をBrdU免疫組織化学のために処理した。全ての実験において、少なくとも群当たり3匹の動物を分析し、実験は少なくとも2回反復した。

【0369】

胃腸切片のH&E染色は、小腸および大腸における腸陰窩上皮細胞の有意な増殖が、GIPFを受けたマウスで見られることを示した (各々、図19および21)。この結果は、トランスジェニックGIPFノックインマウス、およびGIPFアデノウイルスを受けたマウスにおいて得られた結果と合致する (前記実施例参照)。GIPFタンパク質の増殖効果は、小腸 (図20)、および結腸 (図22) 双方においてBrdU取り込みをアッセイすることによって確認された。

10

【0370】

実施例11

放射線誘発粘膜炎に対するGIPFの予防的効果

予防および治療剤としてのGIPFの効果を、放射線誘発粘膜炎の動物モデルで試験した。

【0371】

10~12週齢の48匹の成体雄BDF1マウスを用いた。供給業者からの配布に際して、および実験に先立って、動物を、12時間明：暗サイクルにての個々に通風されるケージに2週間収容して、日周期リズムを安定化させた。動物は食料および水を自由に与えられた。6匹の動物を8群に分け、以下のように処理した。

1. 13Gy X線 (全身) に曝露させる72、48、および24時間前に2mg/kg GIPFを静脈内注射する；
2. 13Gy X線 (全身) に曝露させる72、48、および24時間前に5mg/kg GIPFを静脈内注射する；
3. 13Gy X線 (全身) に曝露させる72、48、および24時間前に125 μg KGFを静脈内注射する；
4. 13Gy X線 (全身) に曝露させる72、48、および24時間前に生理食塩水ビヒクルを静脈内注射する；
5. 未処理、非照射対照；
6. 13Gy X線の照射から (全身) に曝露させるに24、48、および72時間後に2mg/kg GIPFを静脈内注射する；
7. 13Gy X線の照射から (全身) に曝露させるに24、48、および72時間後に5mg/kg GIPFを静脈内注射する；
8. 13Gy X線の照射から (全身) に曝露させるに24、48、および72時間後に生理食塩水を静脈内注射する。

20

30

【0372】

全ての注射は15:00の時間に与えた。腸損傷は、15:00において、13Gy X線照射 (0.7Gy/分にて送達) の単一用量を用いて誘発した。

【0373】

照射から4日後に、動物を殺した。小腸を摘出し、組織学的分析のための処理に先立ってカルノア固定液で固定した。横方向切片3 μm厚みを切断し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。屠殺した直後に、十二指腸、中央大腸、肝臓、肺、舌、脾臓、胃および膵臓もまた摘出し、70%エタノール中での保存に先立って一晩ホルマル生理食塩水で固定した。

40

【0374】

各動物では、10の腸周囲を分析した (1群当たり60) -周囲は腸の所与の長さ、したがって、長さ当たりのベースラインユニットと同等である。周囲当たり生存する陰窩の数をスコア取りし、群当たりの平均を決定した (表4)。10以上の強くH&E染色細胞 (パネート細胞を除く) を含有する陰窩のみ、およびパイエル板を含有しない無傷周囲のみをスコア取りした。

【0375】

50

(その最も広い点において測定した) 平均陰窩幅も測定して、陰窩サイズの差によるスコアリングエラーに対して修正した。したがって、修正が適用される。

修正した陰窩数 / 周囲 =

未処理対照における平均陰窩幅 X 処理群における生存陰窩の平均数

処理動物における平均陰窩幅

全ての動物は処理で生き残り、明白な有害効果は呈さなかった。図23A～Dは、動物、未処理群5 (A)、生理食塩水予備処理群4 (B)、KGF処理群3 (C) およびGIPF処理群2 (D) からの小腸からの切片を示す。再生の病巣 (一つまたは複数のクローン原性細胞の性質を有する生存陰窩) は生理食塩水処理動物 (群4) からの組織切片で明瞭に目に見える (図23B)。これらの病巣以外に、間葉は完全に剥ぎ取られ、これらの動物は下痢を発生し、もしそれらが照射から4日を超えて生存した場合、粘膜炎のため死亡するであろう。GIPFは、KGFによって提供されたもの (図23C) と匹敵するように腸人工物 (図23D) の保護を与えた。

【0376】

(表4)

実験群	陰窩の数/周囲 (平均±SD)	陰窩幅 (μm) (平均±SD)	修正した陰窩/ 周囲 (平均±SD)
1.	12.96 ± 4.9	51.98 ± 5.4	7.4 ± 3.3
2.	15.4 ± 4.9	45.03 ± 2.8	10.1 ± 3.3
3.	22.1 ± 3.8	54.46 ± 2.1	12.0 ± 1.2
4.	7.2 ± 2.6	55.27 ± 6.4	3.8 ± 1.2
5.	109.1 ± 5.3	29.56 ± 3.0	
6.	10.7 ± 4.5	57.16 ± 3.9	5.5 ± 2.3
7.	10.6 ± 4.1	55.50 ± 4.7	5.6 ± 2.1
8.	9.4 ± 1.9	56.85 ± 6.9	5.0 ± 1.4

【0377】

GIPFでの予備処理が、13Gy照射で生き残った陰窩の数をかなり増大させたのは直ちに明らかである。2mg/kgの用量 (群1) におけるGIPFでの予備処理は (保護因子としても知られている) 未処理群4からの陰窩の1.95倍だけ生存を増加させ、5mg/kgのGIPF用量 (群2) は、さらに、2.66倍だけ陰窩生存を増大させた。これは極端に印象深く、3.16倍だけ陰窩生存を増大させた、KGFの公知の最適用量 (群3) での処理で見られた効果とほとんど匹敵する。

【0378】

従って、GIPFは、照射の損傷効果から小腸の上皮を保護することが示され、放射線療法が示された患者において優れた予防剤として用いることができよう。

【0379】

実施例12

化学療法誘発粘膜炎モデル

化学療法誘発粘膜炎の治療における組換えヒトGIPF (GIPFwt) の効果を健康および担癌マウスで評価した。実験プロトコルはBoushey et al. (Cancer Res 61: 687-693 (2001)) によって従前に記載されたものをベースとした。

10

20

30

40

50

【0380】

1000000個のCT26ネズミ結腸癌種細胞(ATCC, Manassas, VA, USA)を同系雌BALB/cマウスに皮下注射し、腫瘍を5日間発生させた。健康および担癌動物を各々6匹の実験群に分け以下のように処理した。

1. 担癌マウス、1日目～5日目にビヒクル(50%、DMSO)を腹腔内注射、0日目～7日目に生理食塩水を静脈内注射(TVS)；
2. 担癌マウス、1日目～5日目にビヒクル(50% DMSO)を注射、0日目～7日目に100 μ l生理食塩水中の50 μ g GIPFを毎日静脈内注射(TVG)；
3. 担癌マウス、1日目～5日目に50mg/kgの5-FUを腹腔内注射、0日目～7日目に生理食塩水を静脈内注射(TDS)；
4. 担癌マウス、1日目～5日目に50mg/kgの5-FUを腹腔内注射、0日目～7日目に100 μ l生理食塩水中の50 μ g GIPFを静脈内注射(TDG)；
5. 健康なマウス、1日目～5日目に50mg/kgの5-FUを腹腔内注射、0日目～7日目に生理食塩水を静脈内注射(NDS)；
6. 健康なマウス、1日目～5日目に50mg/kgの5-FUを腹腔内注射、0日目～7日目に100 μ l生理食塩水中の50 μ g GIPFを静脈内注射(NDG)。

10

【0381】

0、2、4、6、および8日目に、動物体重、下痢の重篤度、および腫瘍のサイズの測定を記録した。0～3の下痢スコアは症状の対応する悪化を反映し、0は正常であり、3は重篤である。体重の変化を未処理群の体重との割合(%)として計算した。腫瘍の長さ、幅および高さはキャリパーで測定し、腫瘍の容量は(長さ×幅×高さ)/2として計算した。

20

【0382】

全ての動物は8日目に安楽死させた。大腸および小腸を摘出し、秤量し、それらの長さを測定し、中央空腸の直径を記録した。中央空腸のセグメント(1cm)を幽門から約14～15cm切除し、横方向結腸のセグメント(1cm)を回盲接合部から約4cm切除した。組織学的分析のために、腸セグメントをフラッシュし、10%中性緩衝化ホルマリンを用いて固定した。粘膜の組織学的調査および形態計測を、ImageProソフトウェア(Imagepro, Ltd., Ashford, Middlesex, UK)を用いて組織切片で行った。

【0383】

下痢の重篤度、体重、および腫瘍サイズに対するGIPFwtの効果を以下にまとめる。

30

下痢スコア(平均±SD)： 体重(未処理の割合(%))

群3	TDS	2.83 ± 0.41	74.7 ± 5.2
群4	TDG	0.33 ± 0.52	85.1 ± 5.7
群5	NDS	3 ± 0	73.2 ± 4.3
群6	NDG	0.5 ± 0.55	87.0 ± 6.0

腫瘍容量(平均±SD；mm³)：

群1	TVS	95.8 ± 8.1
群2	TVG	95.1 ± 4.2
群3	TDS	21.8 ± 3.0; p<0.05
群4	TDG	16.7 ± 8.6; p<0.05

40

【0384】

GIPFは、GIPFを受けなかった群5および3の正常および担癌マウスについてのスコアと比較した場合、各々、群6および4の健康および担癌マウスにおいて5-FUによって引き起こされた下痢の重篤度を有意に低下させた。同様に、GIPFは、5-FU処理動物が経験した体重の減少を低下させた。

【0385】

50

未処理担癌マウス（群1）からの腫瘍は、サイズが、GIPF処理担癌マウス（群2）からのものと同様であった。したがって、GIPFは腫瘍の増殖に影響しなかった。予測されるように、5-FUは群3のマウスにおいて腫瘍のサイズを低下させ、それは群4のマウスの腫瘍のサイズも低下させた。したがって、GIPFは腫瘍のサイズを低下させる際に5-FUの活性を妨げなかった（図24）。

【0386】

腸の肉眼での外観に対するGIPFの効果を図25に示し、腸の直径、重量および長さの対応する測定値を表5に与える。5-FUを受けた正常および担癌マウスの腸は萎縮し（図25E）、出血を伴う多数の病巣が観察され、一方で、GIPFを受けたマウスからの腸の外観は明白に正常であり、腸上皮に対するGIPFの増殖効果のため典型的な拡張を伴っていた（図25B、C、DおよびF）。

【0387】

（表5）

CT26担癌マウス	群1	群2	群3	群4
直径	2.66±0.15	3.65±0.21*	2.53±0.15	3.58±0.14 [#]
中央空腸 (mm)				
重量				
小腸 (g)	1.16±0.09	1.47±0.14*	0.90±0.01	1.51±0.13 [#]
大腸 (g)	0.32±0.02	0.38±0.02*	0.25±0.03	0.39±0.02 [#]
長さ				
小腸 (cm)	35.2±2.0	40.5±1.0*	30.2±1.3	39.7±2.1 [#]
大腸 (cm)	8.7±0.3	9.7±0.3*	6.3±0.3	9.5±0.5 [#]
正常マウス	群5	群6		
直径	2.38±0.13	3.44±0.13**		
中央空腸 (mm)				
重量				
小腸 (g)	0.88±0.08	1.43±0.13**		
大腸 (g)	0.25±0.02	0.38±0.04**		
長さ				
小腸 (cm)	30.3±1.9	39.3±1.0**		
大腸 (cm)	6.9±0.9	9.7±1.0**		

* P<0.05 (ANOVA、群2対群1)

[#] P<0.05 (ANOVA、群4対群3)

** P<0.05 (ANOVA、群6対群4)

【0388】

全ての実験群の小腸および結腸の腸切片の組織学的分析は、GIPFが、5-FUによって引き起こされた腸粘膜の絨毛および陰窩区画に対する実質的な損傷を妨げることによって、5-FUを受けたマウスの腸人工物を維持することを示し（図26）、図26Aは小腸に対する5-FU

の効果を示し、および図26Bは結腸に対する5-FUの効果を示す。中央空腸における絨毛の高さおよび陰窩の深さのミクロ形態計測による測定により、GIPFの効果があることが確認される（図27）。

【0389】

GIPFは5-FUの有害効果から小腸および結腸を保護し、それは5-FUの治療効果を妨げない。従って、GIPFは化学療法剤と組み合わせて用いて、抗腫瘍薬療法の有害な副作用を低下させることができる。

【0390】

実施例13

化学療法誘発および放射線誘発口腔粘膜炎に対するGIPFの予防効果

10

舌の背側（頬）および腹側上皮の増殖に対するGIPFの効果、各々、実施例11および12に記載したように、X線照射に供され、または5-FUを投与したマウスで調べた。

【0391】

非照射および照射マウス（実施例11において群1、2、および3）からの舌のパラフィン包埋切片に対して、製造業者の指示および従前に記載された方法（Scholzen, T. et al. 2000）に従い、モノクローナルラット抗マウスKi67抗原（Dako Ltd., High Wycombe, UK）を用いる免疫組織化学を行った。

【0392】

GIPFは、GIPFを与えられなかった動物からのそれと比較して、照射された動物の腹側および背側舌上皮においてKi67にて染色された核の数を視覚的に増加させた（図28および29）。Ki67につき陽性に染色された腹側上皮細胞の割合（%）として計算される上皮増殖指標により、GIPFが、腹側舌上皮に対して放射線によって引き起こされた細胞性の喪失を有意に低下させることが確認された（図30）。5-FUで処理されていた動物（実施例12において群2〜6）の舌からの切片の組織学的分析は、GIPFが、5-FUで処理されていた正常および担癌動物における背側および腹側上皮層の形態を維持することを示す（図31）。

20

【0393】

GIPFで処理された全ての動物からの舌の上皮層は、GIPFを受けなかった実験動物のそれよりも5-FUによる損傷が顕著により少なかった。

【0394】

従って、GIPFは、化学療法および放射線療法誘発口腔粘膜炎の治療および/または予防のための治療剤として用いることができる。口腔粘膜炎の定量的動物モデル（例えば、Wardly et al., Arch Oral Biol 43: 567-577 (1998) ; Potten et al., Cell Prolif 35: 32-47 (2002)）を用いて、他の細胞傷害剤と組み合わせて投与して、細胞枯渇の重篤度を低下させる際のGIPFの潜在的役割を評価し、かつ口腔および腸上皮の上皮層の再生率を増加させた場合に、GIPFの治療特性をさらに研究することができる。

30

【0395】

実施例14

デキストラン硫酸ナトリウム誘発結腸炎に対するGIPFの治療効果

結腸炎の治療における組換えヒトGIPF（GIPFwt）の効果をデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発結腸炎のマウスモデルで試験し、GLP-2の効果と比較した（L'Heureux and Brubaker J Pharmacol Exp Ther 306: 347-354 (2003) ; Krieglstein et al., J Clin Invest 110: 1773-1782 (2002) ; Siegmund et al., J Pharmacol Exp Ther 296: 99-105 (2001)）。

40

【0396】

6〜8週齢雌BALB/cマウス（Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA）を換気ケージに収容し、1週間〜12時間の明：暗サイクルに順応させた。同様な体重（ほぼ20g；＜5%偏差）を有する24匹のマウスを4ケージに収容し、4% DSS（v/w）飲用溶液で7日間自由に与えた。

【0397】

7日目に、各動物の体重を記録し、体重の減少についてのスコア、糞便粘稠度、および

50

肛門の出血を以下の表6に示すように測定した。

【0398】

(表6)

スコア	体重の減少 (%)	糞便粘稠度	肉眼では見えない/肉眼で見える 直腸出血
0	なし	正常	正常
1	0-5%		
2	5-10%	緩い	潜血 (Hemoccult)
3	10-20%		
4	>20%	下痢	肉眼で見える

10

【0399】

該スコアを用いてIBD活性指標 (IBDAI) を計算し、これを結腸炎の重篤度のインジケータとして用い、表にまとめたパラメーターに対して与えられたスコアの平均として計算される。体重減少、糞便粘稠度、および直腸出血に対するスコアを毎日測定し、IBDAIを実験の持続の間毎日記録した。

【0400】

20

7日目に、4% (v/w) DSS飲用溶液を1% (v/w) DSS溶液で置き換えて、DSSの効果を悪化することなく疾病活性を維持した。DSSを与えた動物のうち16匹を一致したおよび匹敵する疾病活性につき選択し、4匹の動物群に分け、以下のように処理した。

1. 水、生理食塩水を毎日 (10am) 7日間静脈注射
2. 7日間DSS (1%)、生理食塩水を毎日 (10am) 7日間静脈注射
3. DSS (1%) を7日間、100 μ gのGIPFを毎日 (10am) 7日間静脈注射
4. DSS (1%) を7日間、50 μ gのGIPFを毎日 (10am) 7日間静脈注射
5. DSS (1%) を7日間、10 μ gのGLP-2を毎日2回 (10amおよび6pm) 7日間皮下注射

【0401】

これらの実験で用いたGIPFタンパク質はヒト組換えGIPFタンパク質 (SEQ ID NO: 4; GIPFwt) であり、これは実施例9に記載した方法に従って発現させ、精製した。GLP-2、アナログ、h [Gly²] GLP-2を合成し、Biosource International (Camarillo, CA, USA) から購入した。

30

【0402】

14日目に、食物をケージから取り出して、腸のパージングを行い、動物を頸部脱臼によって殺した。屠殺する2時間前に、全ての動物に4mg/0.1mlのBrdUを注射した。大腸および小腸を摘出し、秤量し、それらの長さを測定し、中央空腸の直径を記録した。中央空腸のセグメント (1cm) を幽門から約14~15cm切除し、横方向結腸のセグメント (1cm) を回盲接合部から約4cmにおいて切除した。組織学的分析のために、腸セグメントをフラッシュし、10%中性緩衝化ホルマリンを用いて固定した。粘膜の組織学的調査および形態計測を、ImageProソフトウェア (Imagepro, Ltd., Ashford, Middlesex, UK) を用いてこれらの切片について行った。実験群2~5のマウスについてのIBDIAを図32に示し、体重減少、糞便粘稠度および直腸出血における対応するスコアを、各々、図33、34、および35に示す。これらのデータは、GIPFが、結腸炎の重篤度を11日と早く低下させることによって治療効果を供したことを示す。14日目までに、群3および4のGIPF-マウス処理は群2の未処理マウス (3.75) よりも有意に低いIBDIAを有した (各々、1.75および1.83)。GLP-2は結腸炎の重篤度に対して中程度の効果を有し、14日目まで、それはDSS処理マウスのIBDAIを3.25まで低下させた。

40

【0403】

群1、2、3、および5からのマウスの腸および結腸の肉眼的病理の例を図36に示す。生理

50

食塩水と共にDSSを受ける動物は重篤な結腸炎を発症し、これは、典型的には対照群と比較すると、萎縮、充血および下痢に関連していた。GIPFで処理した動物の小腸および大腸はいくらか拡張を示し、対照群のそれと顕著に同様であった。これらの知見は、GIPFを炎症性腸疾患の治療用の効果的な治療剤として用いることができることを示す。GLP-2はいくらか治療効果を供するが、この群からの小腸および大腸は、対照群における動物からのそれよりも僅かに低い損傷のようであった。変化の有意性は、表7にて以下に示した小腸および大腸の測定によって反映される。

【0404】

(表7)

	群1	群2	群3	群4	群5
中央空腸直径 (mm)	2.25±0.09	1.72 ± 0.05*	2.50 ± 0.18 [#]	2.23 ± 0.10 [#]	1.97± 0.04**
重量					
小腸 (g)	0.94 ±	0.78 ±	0.91 ± 0.09 [#]	0.89 ± 0.05 [#]	0.88± 0.07
大腸 (g)	0.06 0.26 ± 0.02	0.05* 0.18 ± 0.01*	0.23 ± 0.01 [#]	0.22 ± 0.01 [#]	0.18± 0.01
長さ					
小腸 (cm)	32.0 ± 1.4 7.3± 0.3	26.6 ± 0.9* 4.9± 0.5*	31.1 ± 0.9 [#] 6.6± 0.5 [#]	30.3± 0.6 [#] 6.4 ± 0.3 [#]	28.9± 0.8**
大腸 (cm)					5.4± 0.6

* P<0.05 (ANOVA、群2対群1)

[#] P<0.05 (ANOVA、群3または4対群2)

** P<0.05 (ANOVA、群5対群2)

【0405】

パラフィン包埋切片のH&E染色は、DSSが、炎症細胞による実質的浸潤および小腸および結腸の粘膜の絨毛および陰窩の区画の崩壊を引き起こしたことを示した(図37)。前記の肉眼的病理の観察と合致して、GIPFはDSSによって引き起こされた効果を逆行させ、陰窩および絨毛の腸人工物を回復させた。GIPF処理動物の陰窩は、対照群からのものと比較すると、拡張していた。GLP-2は、GIPFよりもかなり低レベルであるにもかかわらず、いくらか治療効果を供した(データは示さず)。絨毛および陰窩のミクロ形態計測(図38)により、GIPFの治療効果は、結腸炎によって重篤に破壊された絨毛の高さおよび陰窩の深さの有意な回復によって反映されることが確認された。GIPFによる粘膜人工物の修復は、陰窩細胞の有意な増殖によって強調された(図39および40)。BrdUに対して陽性に染色された陰窩細胞の割合(%)として計算される陰窩増殖指標は、生理食塩水を注射されたDSS処理マウスにおけるよりもGIPFwtを受けたDSS処理マウスにおいて有意に高かった(P<0.05)(図40)。

【0406】

実施例15

実質的腸切除に続いてのGIPFの治療効果

実質的腸切除に対する適合性応答を増大させる際のGIPFの効果をも、短腸症候群(SBS)

のラット動物モデルで試験した。エンテロロフィック (enterorophic) 剤の効果の実験で用いた動物モデルは記載されており (Scott et al., Am J Physiol G911-G921 (1998) ; Helmrath et al., J Am Coll Surg 183: 441-449 (1996))、該実験プロトコルは参照として本明細書に組み入れられる。

【0407】

動物を、中央空回腸の75%外科的切除を有する切除群、腸が区分化され、再吻合される偽切除手術対照群、および未手術対照群に分ける。動物に生理食塩水またはGIPFを2mg/kgの用量で投与する。75%腸切除はいずれの適合応答も最大化するように選択され、近位空腸および遠位回腸の同等部分の切除は、ビタミンB12および胆汁酸についての末端回腸、および回腸ブレイキの、特殊化された吸収能力を除去する栄養的関連に基づくものである。ラットにおいては、遠位回腸の部分を含めた小腸の切除25%は、切除された動物が、対照動物と同一の成長速度を達成するのを可能とするのに十分である。 10

【0408】

切除およびGIPFでの処理に対する腸の代謝、形態学、組織学、および機能的応答を、実験のコースの間に、また、10日目における終点分析として評価する。食料の摂取および成長、肉眼によるおよび顕微鏡的小腸形態、および粘膜吸収特徴の機能的評価は記載されたように評価する (Scott et al., 前記)。

【0409】

GIPFは食糧消費を有意に増加させ、典型的には、小腸の切除に伴う体重の減少を低下させる。GIPFは反芻動物腸の長さ、その直径、湿潤重量、および粘膜湿潤重量を増加させ、反芻動物小腸の吸収能力を増加させる。小腸の断面のH&E染色は、GIPFが絨毛の高さおよび陰窩の深さを共に延長し、切除された小腸を有する動物の腸における陰窩細胞の増殖を増大させることを示す。したがって、GIPFは、腸適合を増大させることによって腸切除の効果を低下させる。 20

【0410】

実施例16

腫瘍細胞の増殖に対するGIPFの効果

GIPFは、インビボにて腸陰窩上皮細胞に対する強力な増殖効果を誘導する。インビトロにおける増殖効果を調べるために、組換えGIPFwtの効果をインビトロにて種々の腫瘍および正常細胞系の増殖につき試験した。以下の細胞系 (ATCC) の細胞増殖の速度を、³H-チミジンの取り込みをアッセイすることによって測定した。 30

Caco-2	ヒト結腸直腸腺癌；上皮
COLO205	転移性結腸直腸腺癌からのヒト腹水；上皮
HCC70	ヒト乳腺管癌腫；上皮
HCT116	ヒト結腸直腸癌腫；上皮
HT-29	ヒト結腸直腸腺癌；上皮
IEC-18	ラット回腸；上皮
IEC-6	ラット小腸；上皮
LS513	ヒト盲腸；結腸直腸癌腫；上皮
MCF7	転移性乳腺腺癌からのヒト腹腔滲出液；上皮
NCI-H1373	ヒト肺腺癌
PC-3	前立腺腺癌からのヒト骨転移；上皮
SCC-25	ヒト舌扁平細胞癌腫
SCC-4	ヒト舌扁平細胞癌腫
SK-BR-3	転移性結腸腺癌からのヒト腹腔滲出液；上皮
SK-MES-1	転移性扁平細胞肺癌腫からのヒト腹腔滲出液；上皮
SW620	結腸直腸腺癌からのヒトリンパ節転移；上皮
T84	結腸直腸癌腫からのヒト肺転移；上皮
293	ヒト胎児腎臓；上皮

10

20

30

【0411】

細胞をウェル当たり10,000～50,000細胞にて播種し、細胞系に応じて、GIPFwtのスケールド用量で処理した（1.37～1000ng/ml）。GIPF処理細胞の増殖の速度を未処理細胞、または10%完全培地（増殖培地、2.5%透析FBS、およびペニシリン/ストレプトマイシン）中で増殖させた細胞のそれと比較した。細胞を37℃にて48時間インキュベートし、インキュベーションの最後の20～24時間の間、0.5 μ Ci ^{3} H-チミジンでパルスした。細胞を回収し、取り込まれた ^{3} H-チミジンの量を測定し、反復実験の二連試料から結果を測定した。

40

【0412】

GIPFwtは試験した腫瘍細胞のほとんどの増殖の速度に影響しなかった。増殖の速度の増大は、IEC28、T84、HCT116、およびHT29細胞におけるより高い用量のGIPFにおいてのみ誘導された。増殖の程度は未処理細胞の速度の40%未満であった。

【0413】

従って、これらの知見は、GIPFがインビボで存在する腫瘍の増殖の速度を亢進できず、GIPFは、抗腫瘍薬療法によって引き起こされた粘膜炎に罹った癌患者を治療するのに用いることができることを示す。

【0414】

実施例17

50

細胞内シグナル伝達に対するGIPFの効果

wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は発生およびホメオスタシスにおいて中枢的な役割を演じる。小腸においては、引き続いてT細胞因子(TCF)標的遺伝子のトランス活性化を誘導する β -カテニンを安定化することによって、wntシグナル伝達は、腸陰窩増殖のレギュレーターとして非常に重要な役割を演じることが公知である(Wetering et al., Cell 111: 241-250 (2002); Batle et al., Cell, 111: 251-263, (2002); Perreault et al., J Biol Chem 276: 43328-43333 (2001); Booth et al., Nat Med 8: 1360-1361 (2002))。

【0415】

wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に対するGIPFの効果を評価するために、 β -カテニンの安定化を種々の培養された細胞系で測定した。細胞を、10%FBSを補足したダルベッコの変法イーグル培地中にて6ウェルプレートに対し1000000細胞/ウェルで播種した。翌日、細胞を無血清培地中で増殖させ、低血清条件(0.1%FBS)において、50ng/mlのGIPFまたは10mMのLiCl₂(陽性対照)いずれかで処理した。細胞質画分はHaertel-Weismann et al., (J Biol Chem 175: 32046-32051 (2000))によって記載されたように調製した。タンパク質はグラジエント(4~20%)SDS-PAGEによって解像し、 β -カテニンのレベルを、ペルオキシダーゼ結合二次抗体(Cell Signaling)を用いて可視化された、 β -カテニンウサギ抗体(Abcam)を用いて評価した。

【0416】

試験した細胞系のうち、GIPFはヒト内分泌L細胞系(NCI-H716、データは示さず)において、およびHEK293細胞において、用量依存のかつ時間関連的に β -カテニンの安定化を誘導した(各々、図41AおよびB)。実施例18に記載された知見に合致して、煮沸GIPFは β -カテニンを安定化するその能力に影響しなかったが、該効果はプロテイナーゼKでの処理によって、およびDTTでの還元によって消滅した(図41C)。

【0417】

β -カテニンの蓄積に導くGIPFによるシグナル伝達経路をさらに調べるために、GSK3 β の活性をHEK293細胞で分析した。カノニカルwntシグナル伝達経路において、Wntは、そうでなければ β -カテニンをリン酸化し、プロテオソームによる破壊につきそれをマークするであろうGSK3 β を阻害することによって β -カテニンを活性化する。

【0418】

GIPFは時間依存的にHEK293細胞においてGSK3 β のリン酸化を増大させた(図42)。これらのデータは、GIPFが、GSK3による β -カテニンリン酸化を阻害することによって、カノニカルwntシグナル伝達経路により β -カテニンを活性化することができることを示した。しかしながら、GIPFは、Wnt3Aが β -カテニン活性化の誘導に対する優れた効果を有することが示されているマウス上皮細胞系C57MGを含む他の細胞系において β -カテニンの安定化を誘導しなかった。さらに、Wntシグナル伝達経路(Kuhnert, PNAS 101: 266-271; 2004)の優れた阻害剤であるDickkopf-1(Dkk1)は、293細胞におけるGIPFによる β -カテニン安定化を完全に阻害しなかった(データは示さず)。これらのデータは、GIPFが、公知のカノニカルWnt/ β -カテニン経路とは区別される経路を介して β -カテニンを安定化できることを示唆する。

【0419】

実施例18

β -カテニン標的遺伝子の発現に対するGIPFの効果

蓄積 β -カテニンの結果、その核へのトランスローケーションがもたらされ、そこで、それは、TCF/LEFファミリーの転写因子に付随する。そのトランス活性化能力のため、 β -カテニン-転写-因子複合体はDNAに結合し、wnt標的遺伝子を活性化する。GIPF誘発 β -カテニンシグナル伝達をさらに調べるために、発明者らは、定量的PCRによって、HEK293およびNCI-H716細胞での下流標的遺伝子の活性化を測定した。

【0420】

1×10^6 HEK-293細胞および 2×10^6 NCI-H716細胞(ATCC)を6ウェルプレートに播種し、完

10

20

30

40

50

全培地中で6時間付着させた。次いで、細胞を0.1%FBSアッセイ培地に変更し、一晩インキュベートした。アッセイの日に、さらに1mlのアッセイ培地中の細胞に処理を加えた。細胞を、20mM LiCl (Sigma)、100ng/ml Wnt-3A (R&D Systems)、250ng/ml GIPFt、または250ng/mlのキャップされたGIPFタンパク質いずれかと共に37°C/5%CO₂にて8時間インキュベートした。アッセイ培地中に維持した未処理細胞のウェルを遺伝子発現用のバックグラウンドとして含めた。RNeasy MiniキットおよびDNaseIキット (Qiagen) を用いて全RNAを双方の細胞型から単離し、全RNAの質および濃度を定量した。各試料について、4ugの全RNAを、3ugのランダムヘキサマーおよび2mMの各dNTPにて70°Cにて3分間、予め反応させた。反応を氷上で1分間冷却した。反応容量を、5×M-MLV緩衝液 (Promega)、25mM MgCl₂、0.1M DTTおよびRNaseOut (Invitrogen) で22ulとした。400ユニットのM-MLV逆転写酵素 (Promega) の添加に際して、反応を23°Cにて10分間、42°Cにて50分間、および70°Cにて5分間インキュベートして、反応を停止させた。次いで、cDNAを希釈し、1ユニットのRNase H (Invitrogen) で処理して、残りのRNAを消化した。OD260nmにより、cDNA濃度を定量した。核10ulの定量的SYBR (Green PCR反応では、2ulのcDNA (440ng) を、1.25 μMの各フォワードおよびリバースプライマー、および2×SYBR Greenマスターミックス (Eurogentec) と組み合わせて用いた。反応は三連で行った。定量的PCRのためのプライマーは、以下のヒトβ-カテニン標的遺伝子につき設計した。Axin-2 (SEQ ID NO: 70および71)、CD44 (SEQ ID NO: 72および73)、EphrinB2 (SEQ ID NO: 74および75)、c-myc (SEQ ID NO: 76および77)、Proglucagon (SEQ ID NO: 78および79)、およびCox-2 (SEQ ID NO: 80および81)。ヒトEF1 (SEQ ID NO: 82および83) をハウスキーピング遺伝子として用いて、発現レベルを標準化した。

【0421】

GIPFはHEK-293およびNCI-H716細胞においてAxin-2の発現を増大させ、CD44およびEphrinB2の、Wnt3Aまたはリチウムでの刺激に由来するよりも高レベルまでのアップレギュレーションを引き起こした。Cox-2、c-mycおよびプログルカゴン遺伝子の発現レベルはGIPFによって影響されなかった (データは示さず)。

【0422】

これらのデータは、GIPF誘発標的遺伝子活性化に関与するメカニズムへの洞察を提供した。さらなる実験を行った、GIPFシグナル伝達の下流の事象を解明する。

【0423】

実施例19

GIPFの活性についてのインビトロアッセイ

GIPFの11の欠失突然変異体 (SEQ ID NO: 84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、および104) をpIntron/IgKベクターにサブクローン化し、一過的にHEK293細胞で発現させた。全長GIPFポリペプチド内のコードされたポリペプチド断片 (SEQ ID NO: 85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、および178) の各々の位置を図43に示す。哺乳動物発現ベクターpIntron/IgKは、pCI哺乳動物発現ベクター (Promega, Madison, WI) に由来する作製されたキメライントロンを導入することによりpSectagベクター (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) を遺伝子的に修飾することによって得た。pcDNA/IntronベクターをBglIIおよびNheIで消化し、イントロン配列を、BglIIおよびNheIで消化してあるpSectagにクローン化した。ポリヌクレオチド断片を増幅し、サブクローン化するのに用いたフォワードおよびリバースプライマーは、配列表に示した、SEQ ID NO: 106~119に対応する。SEQ ID NO: 106のフォワードプライマーは断片1~7のためのリバースプライマー (プライマーSEQ ID NO: 107~113) と共に用い；SEQ ID NO: 114のフォワードプライマーは断片8~10のためのリバースプライマー (SEQ ID NO: 115~117) と共に用いた。

【0424】

ポリペプチド断片をHEK293細胞で一過的に発現させ、β-カテニンを安定化させる際の断片の活性化を実施例17に記載したようにアッセイした。SEQ ID NO: 91のポリペプチド断片は、試験した他の断片によって示される活性と比較して、β-カテニンの最大安定化を誘導した。この知見は、GIPFのフーリン様システイン-リッチのドメインがGIPFの増

殖活性を媒介するのに必須でありうることを示唆する。しかしながら、SEQ ID NO: 91のポリペプチドの活性は全長GIPFのそれよりも低かった（図44）。従って、GIPFタンパク質の他の部分は、 β -カテニンの最大安定化を可能とするのに必須である。

【0425】

実施例20

組換えGIPFの活性についての迅速インビボアッセイ

迅速インビボアッセイを開発して、精製されたGIPFの生物活性を試験した。

【0426】

グループ分けし、以下のように処理したマウスにおいて、ヒトおよびマウスGIPF（GIPF wtおよびmGIPFt）の活性を試験した。

10

1. 生理食塩水、静脈内注射
2. GIPFwt、100 μ gの静脈内注射
3. GIPFwt、50 μ gを静脈内注射
4. mGIPFt、100 μ gを静脈内注射
5. mGIPFt、50 μ gを静脈内注射
6. GIPFwt、煮沸し、100 μ gを静脈内注射
7. GIPFwt、キャッピングし、100 μ gを静脈内注射
8. GIPFwt、100 μ gを皮下注射。

【0427】

24匹の雌BALB/cマウスを実験で用いた。GIPFを毎日3日間注射した。動物を4日目に屠殺した。屠殺する前に、血液学的分析のために0.5mlの血液を収集し、屠殺の2時間前に、全ての動物に0.4mlのBrdUの1mg/ml溶液を腹腔内注射した。小腸および結腸を切開し、前記のように測定し、中央空腸および結腸のセグメントを先の実施例に記載したように組織学的分析のために処理した。

20

【0428】

結果を図45に示す。マウスGIPFタンパク質、mGIPFtを受けたマウスからの小腸の拡張は、ヒトGIPFwtによって誘導されたものに匹敵した。加えて、皮下投与を介してGIPFwtを受けたマウス的小腸の表現型は、静脈内経路を介してGIPFwtを受けたマウスのそれに匹敵した。前記のように、GIPFwtの煮沸は、小腸の拡張を引き起こすその能力に影響しない。これらの知見は、全ての動物群からの腸の長さ、重量および直径の測定と合致した（表8）

30

【0429】

（表8）

動物群	直径 (mm) 中央空腸 平均±SD	重量 (g) 小腸 平均±SD	重量 (g) 大腸 平均±SD	長さ (cm) 小腸 平均±SD	長さ (cm) 大腸 平均±SD
1	2.31 ± 0.15	0.90 ± 0.04	0.24 ± 0.03	29.5 ± 1.5	6.7 ± 0.3
2	3.64 ± 0.14*	1.34 ± 0.10*	0.33 ± 0.02*	36.0 ± 1.3*	8.5 ± 0.5*
3	3.55 ± 0.12*	1.32 ± 0.07*	0.32 ± 0.03*	36.5 ± 0.5*	8.7 ± 0.3*
4	3.68 ± 0.06*	1.39 ± 0.05*	0.35 ± 0.02*	37.8 ± 0.8*	8.8 ± 0.3*
5	3.45 ± 0.09*	1.23 ± 0.04*	0.33 ± 0.01*	36.5 ± 0.5*	8.5 ± 0.5*
6	3.07 ± 0.12*	1.25 ± 0.06*	0.34 ± 0.01*	35.5 ± 0.5*	8.3 ± 0.3*
7	2.28 ± 0.11	0.88 ± 0.07	0.21 ± 0.03	31.0 ± 1.3	6.3 ± 0.3
8	3.03 ± 0.10*	1.12 ± 0.04*	0.28 ± 0.02*	34.2 ± 0.8*	7.8 ± 0.3*

* P<0.05 (ANOVA、群1～8対群1)

【0430】

全ての血液学的結果は動物についての正常な範囲内にあり、したがって、GIPFはいずれの即時の悪影響も生じないことを示す。絨毛の高さおよび陰窩の深さに対するGIPFwtおよびmGIPFtの効果は、3日間の投与計画の後に、GIPFが健康なマウスにおける陰窩の深さを有意に増大させたことを示した。疾病の動物の腸における絨毛の高さの増大に対するGIPFの効果とは対照的に、GIPFは正常な健康な動物からの絨毛の高さに影響しなかった（図46）。

【0431】

これらのデータは、ヒト組換えGIPFの増殖効果が異所性効果ではないことを示す。加えて、GIPFは、静脈内または皮下投与にかかわらず、生物学的活性を示す。

【0432】

実施例21

単離された陰窩細胞におけるGIPFの活性についてのインビトロアッセイ

Fujimoto, et al. (Fujimoto et al., Gastroenterology 117: 858-865 (2002)) の方法に従って、陰窩上皮細胞のシグナル伝達および増殖に対するGIPFの効果を実験したマウス結腸陰窩細胞でアッセイした。

【0433】

結腸をマウスから切開し、0.04%次亜塩素酸ナトリウム溶液中で15分間滅菌した。PBS中で濯いだ後、結腸をDTT/EDTA溶液（PBS中0.5mM DTT、3mM EDTA）中で室温にて90分間インキュベートした。インキュベーションの後、組織をPBS中で1回洗浄し、10mlのPBSを加えた。チューブを激しく振盪して、陰窩を粘膜下から遊離させた。陰窩を含有するPBSを遠心管に移し、陰窩収率が減少するまで振盪段階を反復した。陰窩を穏やかに遠心し（5分間400rpm）、新鮮なPBSで洗浄した。陰窩を20mlのPBS中0.3%パンクレアチン（Sigma）に再懸濁し、最初の30分間は10分毎に、その後は30分毎に振盪しつつ、室温にて90分間インキュベートした。インキュベーションの最後に、等容量のPBSを加え、陰窩を1000rpmにおいて5分間遠心し、全ての粘膜が取り出されるまで、EDTA/DTT溶液で更に1～2回洗浄した。陰窩細胞を1×培地（5%FCS、グルタミン、NaHCO₃、インスリン、トランスフェリン、セレン、ペニシリン/ストレプトマイシンを補足したRPMI 1640）に再懸濁した。細胞ク

10

20

30

40

50

ランプをシリンジで21G、次いで、23G針を用いて破壊した。細胞をカウントし、 β -カテニンの安定化につき、 ^3H -チミジンの取り込みによる増殖活性を測定するために；および陰窩細胞のクローン原性に影響するGIPFの能力を試験するためにアッセイした。

【0434】

A. インビボでの β -カテニンの活性化に対するGIPFの効果は、前記のように、100 μg のGIPFwtを静脈内注射してから6時間後にBalb/cマウスから単離された陰窩細胞において実験した。

【0435】

図47に示すように、GIPFwtは、対照マウスからの陰窩細胞で見られたものと比較した場合、単離された陰窩細胞からの細胞基質における β -カテニンの有意な安定化を誘導した。図47Aは非リン酸化活性 β -カテニンのレベルを示し、および図47Bは細胞基質に存在する全 β -カテニンのレベルを示す。非リン酸化 β -カテニンはUpstate (Waltham, MA, USA) から購入した β -カテニン抗体によって認識され、他方、全 β -カテニンレベルは、リン酸化および非リン酸化タンパク質双方を認識するAbcam (Cambridge, MA, USA) からの抗体を用いてアッセイした。この結果は、マウスにおけるGIPF誘発陰窩上皮細胞増殖が β -カテニンシグナル伝達によって媒介され得ることを示す。

【0436】

B. 単離された陰窩細胞の増殖に対するGIPFwtの効果は、 ^3H -チミジンの取り込みにつきインビトロにてアッセイした。結果は、GIPFwtタンパク質が用量依存的に単離された陰窩細胞の増殖を増大させたことを示した。

【0437】

従って、GIPFは、 β -カテニンを安定化することによって単離された陰窩細胞の増殖を誘導し、単離された腸細胞を用いて、GIPFの増殖効果の基礎となるシグナル伝達経路を解明することができる。

【0438】

C. Whitehead et al. (Whitehead et al. Gastroenterology, 117: 858-865 (1999)) によって記載されたクローン原性はアッセイを行って、腸粘膜の増殖および/または分化を制御する際のGIPFの能力を調べる。簡単に述べれば、1%寒天および2 $\times$ RPMI培地+10%FBSの同等混合物を含有する基層を35mm皿に加える。単離された結腸陰窩細胞をml当たり50,000細胞にて上部層培地（同等部の0.8%アガロースおよび2 $\times$ RPMI培地+10%FBS）に加え、2mlの細胞懸濁液を各ウェルに分注する。プレートを50、100、および200ng/mlのGIPFの存在下で、37 $^{\circ}\text{C}$ にて3~4週間インキュベートする。インキュベーションの後、プレートを調べ、コロニーの数をカウントする。コロニーは40個を超える細胞の凝集体と定義される。

【0439】

GIPFはコロニー形成を刺激する。クローン原性アッセイを用いて、インビトロにてGIPFおよびGIPFアナログの増殖活性を試験する。

【0440】

実施例22

TNBS誘発結腸炎に対するGIPFの効果

ハプテン剤2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) は、下痢、直腸脱出、および体重減少を伴う重篤な経壁炎症によって特徴付けられる慢性結腸炎を誘導する。これらの臨床的および組織病理学的特徴は、TNBS誘発結腸炎がヒトクローン病の重要な特徴に似ていることを示す (Neurath et al., J Exp Med 182: 1281-1290 (1995))。

【0441】

GIPFの治療効果をTNBS誘発結腸炎を有するマウスで試験した。腸炎症は、Neurath et al., 前記によって記載されたように、1mgのTNBSの単一直腸投与によって6~8週齢雌BALBcマウス（群2）において誘導された。対照動物群（群1）は、ビヒクル単独（45%エタノール）の直腸投与を受けた。hGIPFの治療効果は、100 μg （群3）または50 μg （群4）のhGIPF（4mg/kgまたは2mg/kg）の皮下用量（日）を、TNBSを3日間受けた動物に投与することに

10

20

30

40

50

よって試験した。マウスを7日後に屠殺し、TNBSによる結腸炎の誘発を評価した。hGIPFは、群2の動物においてTNBSによって誘発された体重の減少を有意に低下させた（図48）。hGIPFは、群2のTNBS処理動物が罹った結腸の重篤な下痢、潰瘍、出血および萎縮も低下させた（データは示さず）。

【0442】

組織学的変化が、対照およびTNBS群からの結腸のH&E染色パラフィン包埋切片で評価した。hGIPFは、マウス結腸におけるTNBS誘発経壁浸潤および粘膜陰窩構造崩壊を低下させた（図49）。図49中のグラフは、結腸の結腸炎の組織学的グレーディングによって測定したhGIPFの効果を以下のように表す。

結腸の結腸炎の組織学的（微視的）グレーディング	
スコア	基準
0	正常
1	低レベルの（偶発的）白血球浸潤、構造的変化はなし
2	固有層における中程度の白血球浸潤、表面上皮病巣、潰瘍なし
3	粘膜下へ伸びる炎症細胞を伴う高白血球浸潤、粘液性糜爛、局所性潰瘍、結腸壁の中程度の厚化
4	経壁炎症を伴う非常に高い白血球浸潤、広範な粘膜損傷、杯細胞の喪失、高血管密度、結腸壁の厚化、潰瘍

10

20

【0443】

加えて、hGIPFは、マウス結腸における好中球浸潤の特徴であるTNBS誘発ミエロペルオキシダーゼの増加を減少させた。GIPF処理は、GIPFで処理していない動物に対して、TNBS誘発下痢、結腸壁の炎症および厚化、および杯細胞の喪失を有意に低下させる。従って、GIPFは、クローン病に罹った患者を治療するための治療剤として潜在的に用いることができる。

30

【0444】

実施例23

マウスにおける慢性デキストラン硫酸ナトリウム誘発結腸炎に対するGIPFの治療効果

結腸炎の治療における組換えヒトGIPF（GIPFwt）の効率は、慢性デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発結腸炎のマウスモデルで試験した（L'Heureux and Brubaker, J Pharmacol Exp Ther 306: 347-354（2003）；Kriegelstein et al., J Clin Invest 110: 1773-1782（2002）；Siegmond et al., J Pharmacol Exp Ther 296: 99-105（2001））。

40

【0445】

6～8週齢雌BALB/cマウス（Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA）を換気ケージに収容し、1週間～12時間明/暗サイクルに順応させた。マウスに飲料水中の4% DSS（v/w）を0～7日目に与えて、結腸炎を誘発させた。7日目～21日目に、マウスにDSSを含まない水を与えて、第一の緩解相を誘導した。21日目～28日目に、マウスに再度4% DSSを与えて、第一の再発相を誘導した。28日目～35日目に、マウスに再度DSSを含まない水を与えて、第二の緩解を誘導した。35日目に、マウスを種々の実験群にランダム化し、35日目にGIPF療法を開始し、42日目まで継続した。マウスを35日～42日目に疾病活性の症状につき毎日モニターした。42日目に、実験を停止し、マウスを屠殺し、腸組織を分析のために回収した。

50

【0446】

GIPFは、炎症性腸疾患活性指標（IBDAI）の有意な減少によって反映されるように、用量依存的にマウスにおいてDSS誘発結腸炎を有意に低下させた（図50； $^*P<0.05$ （ANOVA、DSS/生理食塩水対DSS/hGIPF群）； $\#P<0.05$ （ANOVA、DSS/生理食塩水対DSS/KGF）； $^{**}P<0.05$ （ANOVA、DSS/生理食塩水対DSS/GLP-2））。IBDAIの定義は実施例14に与えられる。小腸および結腸のH&E染色切片は、hGIPFがマウスの腸粘膜に対するDSS誘発損傷を妨げ、絨毛の高さおよび陰窩の深さのDSS誘発欠点を逆行させたことを示した（図51）。また、GIPFは、小腸における陰窩細胞の増殖に対するDSSの抑制効果に取って代わった（図52； $^*P<0.05$ （ANOVA、DSS/生理食塩水対水/生理食塩水）； $\#P<0.05$ （ANOVA、DSS/hGIPF対DSS/生理食塩水） $^{**}P<0.05$ （ANOVA、DSS/KGF対DSS/生理食塩水）； $\#\#P<0.05$ （ANOVA、DSS/GLP-2対DSS/生理食塩水））。陰窩増殖指標は実施例14に定義される。

【0447】

まとめると、GIPFの治療的処置はマウスにおいて慢性DSS誘発結腸炎を有意に低下させ、これは、GIPFがヒト炎症性腸疾患を治療するための潜在的に有用な療法であり得ることを示す。

【0448】

実施例24

hGIPFによる5-FU誘発毒性の低下

5-FUの胃腸毒性を低下させる際のhGIPFの効率を、正常なBDF-1マウスで評価した。

【0449】

マウスを以下の群に分けた。

- 1) 生理食塩水処理でのビヒクル注射
- 2) 生理食塩水処理での5-FU注射
- 3) GIPF処理での5-FU注射。

【0450】

11～13週齢の雌BDF-1マウスに、-3日目を開始とし、生理食塩水または用量hGIPF当たり100 μ gいずれかの日皮下注射を与えた。0日目～4日目に、各マウスに50mg/kg 5FUの用量を4連続日の間腹腔内注射した。マウスを体重、下痢の発生、および死亡率につき日ベースでモニターした。

【0451】

GIPF処置は、最大体重減少、下痢スコアおよび死亡率の低下を含めた5-FU誘発胃腸毒性を有意に低下させ（表9）、したがってこれは、GIPFがマウスにおいて化学療法誘発胃腸毒性を低下させる際に効果的であることを示す。

【0452】

（表9）

5-FU	処置	毒性			
		最大体重減少 (%)	下痢スコア	死亡率 (%)	生存時間 (日)
あり	なし	33.1 $\pm$ 3.6	2.8 $\pm$ 0.5	92	8.5 $\pm$ 1.2
あり	hGIPF	12.5 $\pm$ 6.9*	0.9 $\pm$ 0.6*	8.3	10.0 $\pm$ 0.0*
あり	KGF	16.8 $\pm$ 7.9*	1.7 $\pm$ 0.8*	25	9.0 $\pm$ 1.0
あり	GLP-2	17.4 $\pm$ 8.3*	1.9 $\pm$ 0.8	42	8.4 $\pm$ 1.1

* $p<0.05$ （ANOVA、5-FU/hGIPF、5-FU/KGFまたは5-FU/GLP-2対5-FU/生理食塩水

【0453】

実施例25

非ヒト霊長類におけるインビボGIPFの活性

GIPFの活性の反復用量実験をマカクザルで行って、非ヒト霊長類におけるGIPFの活性を測定した。

【0454】

未処理でない（non-naive）雌のサル9匹をSNBL USA（Everett, Washington, USA）のスタッフの獣医または動物技術者によって健康についてスクリーニングし、血液学および血清化学スクリーニングを受けさせた。健康が確認された9匹の雌動物のうち、8匹を選択し、実験群に割り当てた。従前に隔離した動物を、実験の開始に先立って最低14日間、SNBL USA施設の実験室に順応させた。

【0455】

プロトコル

8匹の雌を以下の表に概略を説明するように4つの処理群に割り当て、GIPFタンパク質の静脈内ボラス注射を介して、3日間毎日1回投与した。4日目に、全ての動物に、剖検からほぼ4時間先立って、プロモデオキシウリジン（BrdU）（50mg/kg）の静脈内ボラス注射を1回投与した。選択した組織を剖検で収集した。

【0456】

実験計画

群	用量レベル (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	用量 容量 (mL/kg)	動物の 数
1	0 mg/kg (対照)	0	3.3 mL/kg	2
2	0.1 mg/kg	1.5 mg/mL	0.067 mL/kg	2
3	1.0 mg/kg	1.5 mg/mL	0.67 mL/kg	2
4	5.0 mg/kg	1.5 mg/mL	3.3 mL/kg	2

【0457】

観察および調査

順応の間に、および実験を通じて以下のように臨床的観察を行った。死亡率および糞便チェックは朝毎日1回行い、一般的健康および外観についての臨床的観察は、順応の開始で始め、存命の最後まで、午後毎日1回行った。もし必要であれば、さらなる臨床的観察を行い、記録した。スタッフの獣医または動物技術者は、もし臨床的観察により衰退状態が示されれば、各動物を評価し、実験管理者に知らせた。

【0458】

血液試料の収集

血液学および血清化学のために、順応の間に1回、剖検日のBrdU投与前に1回、血液を収集した。

【0459】

肉眼による病理学的調査

剖検においては、身体の外表面、全ての穴、ならびに頭蓋、胸部、および腹腔およびそれらの内容物を調べた。器官の重量および組織病理学的調査は巨視的に行い、収集し、組織病理学的調査のために10%中性緩衝化ホルマリン中に保存した。調べた組織は以下に列挙する。

脳 -脳幹 -小脳 -大脳	大腸 ^a -盲腸 -結腸 -直腸	小腸 ^a -空腸 -十二指腸 -回腸
脾臓	肝臓	舌

【0460】

BruU IHCによる組織増殖アッセイ

パラフィン包埋切片をBrdUアッセイのために調製した。

10

【0461】

結果

剖検での肉眼による病理学的調査は、調べた器官において明白な変化は見出さず、この処理計画においてhGIPFの急性毒性を示さない。加えて、hGIPF処理の前および後に収集した血液試料についての血液学および血清化学は、血液細胞成分ならびに試験した血清生化学パラメーターの変化を示さなかった。

【0462】

小腸の長さにおいて用量関連増加があるように見える。群1、2、3、および4についての（cmで表した）平均腸の長さは、各々、120.65、122.555、133.350、および142.875であった。加えて、以下の表（表10）にまとめるように、個々の組織の組織学の巨視的評価は全てのGIPF処理群における十二指腸、空腸および回腸の陰窩過形成を示した。陰窩の過形成は盲腸、結腸および直腸において用量関連様式でやはり観察された。この結果は、hGIPFがサル腸の陰窩上皮細胞に対して増殖効果を有することを示唆し、これは、マウスおよびラットで観察されたものと合致する。

20

【0463】

hGIPFの増殖効果を確認するために、免疫組織化学を行って、小腸および大腸におけるBrdUの取り込みを分析した。hGIPFは小腸および結腸双方においてBrdU陽性増殖指標を増加させる。

【0464】

これらの知見は、hGIPFが非ヒト霊長類において陰窩上皮の増殖を増加させることを示す。

30

【0465】

個々の組織病理学的知見

グレード

－：異常な変化なし

±：非常にわずか

＋：わずか

2＋：中程度

3＋：顕著

【0466】

（表10）雌マカクザルにおける個々の組織病理学的知見

40

組織	知見	群（動物の数）							
		1		2		3		4	
		#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2
十二指腸	陰窩過形成	—	—	—	±	±	±	+	2+
空腸	陰窩過形成	—	—	±	±	±	±	±	+
回腸	陰窩過形成	—	—	—	±	+	±	+	+
盲腸	陰窩過形成、	—	—	—	—	±	±	+	+
	増大した腺の長さ	—	—	—	—	—	—	±	+
結腸	陰窩過形成、	—	—	—	—	±	±	±	+
	増大した腺の長さ	—	—	—	—	—	—	—	±
直腸	陰窩過形成	—	—	—	—	±	+	±	+
肝臓	-	—	—	—	—	—	—	—	—
脾臓	-	—	—	—	—	—	—	—	—
大脳	-	—	—	—	—	—	—	—	—
小脳	-	—	—	—	—	—	—	—	—
脳幹	-	—	—	—	—	—	—	—	—

10

20

30

40

【0467】

実施例26

放射性標識¹²⁵I-hGIPFタンパク質を用いる吸着分布代謝排出（ADME）実験

実験目的

マウスにおける血漿薬物動態および¹²⁵I-hGIPFの組織分布を調べること。

【0468】

タンパク質標識

hGIPFタンパク質はIODO-GEN標識方法（Amersham）によって¹²⁵Iで標識した。標識に際しての初期特異的活性は35uCi/ug（1020Ci/ミリモル）であった。標識タンパク質は

50

マウスへの注射に先立ってさらに精製した。

【0469】

動物

雄CD-1（登録商標）[Cr1:CD-1（登録商標）（ICR）BRマウスを注射に先立って7日間順応させ、清浄な吊り下げ型ワイヤーメッシュケージ中に個々に収容した。ケージをケージ-ボードまたは他の適当な材料上方に上昇させ、毎週少なくとも3回変化させた。各マウスに、 $3\mu\text{Ci}$ の ^{125}I -hGIPFタンパク質を含有するhGIPFの 1.67mg/kg 用量を与えた。放射性標識用量を受けさせた後、尿および糞の収集が計画されている動物を代謝ユニット中に個々に収容した。

【0470】

実験計画

群	収集した試料	投与量 レベル	投与量 容量	安楽死の時間	時点 当たりの 動物の数	動物の数 合計
1	血液および 組織	1.67 mg/kg	10 mL/kg	投与後5分 および30分、 ならびに 1時間、3時間、 6時間、および 24時間	3	18
2	尿、糞、組織、 および死体	1.67 mg/kg	10 mL/kg	投与後24時間	3	3

【0471】

本実験を受けた全ての動物をヨウ化ナトリウムで処理して、標識された試験品に由来する遊離ヨウ化物の胸腺による取り込みをブロックした。 0.1mL の1% NaI溶液の経口（胃管栄養）投与を、放射性標識タンパク質の投与からほぼ48、24、および1時間前に与えた。各動物には、静脈内注射を介して投与された $[^{125}\text{I}]$ -hGIPFの単一用量を受けさせた。動物を2つの群に分け、前記実験計画で概説したように分析した。示した安楽死の時点において、血液試料を収集し、細胞画分および血漿を分析のために分離した。肝臓、腎臓、肺、舌、脾臓、脳、食道、胃、小腸、大腸、およびその内容物を含む大腸の組織試料を収集し、組織への $[^{125}\text{I}]$ -hGIPFの取り込みを測定した。

【0472】

^{125}I -hGIPFの取り込みについての分析は、WIL標準操作手法に従って、DPC GAMMA-C12マルチクリスタルガンマカウンターにてガンマ係数によって行った。ガンマ係数の結果を同位体半減期につき修正した。実験で生じた種々の物質中の放射能の量の計算は、WIL標準操作手法に従い、WIL毒性学データ管理システム（Toxicology Data Management System）またはスプレッドシートのプログラムを用いて行った。一般に、記述的統計学（例えば、合計、代数的平均、標準偏差、標準誤差、変動の係数、パーセンテージ）のみを用いた。可能な場合、標準薬物動態パラメーター（例えば、 C_{max} 、 t_{max} 、AUC（曲線下面積）、 $T_{1/2}$ （半減期））を、標準薬物動態方程式を用いて計算した。

【0473】

結果

マウスの血漿、赤血球細胞、肝臓、腎臓、肺、心臓、脳、脾臓、食道、胃、小腸、および大腸における [^{125}I]-hGIPFの濃度および動態を示すデータを表11～14に示す。

【0474】

(表11) 1.67mg/kgでの静脈内投与に続いてのマウス血漿および赤血球細胞における [^{125}I]-hGIPF等価物の濃度および動態

時間 (hr)	血漿 (ng/g) (平均 ±SD)	赤血球細胞 (ng/g) (平均 ±SD)
0.083	11145 (113)	2745
0.5	3894 (485)	2121
1	2506 (490)	1658
3	1347 (68)	971
6	476 (204)	295
24	60 (7)	23
$C_{\max}$ (ng/g)	11145	2745
$t_{\max}$ (h)	0.083	0.083
AUC_{0-24} (ng-h/g)	16607	9458

10

20

最終相の動態

(Log濃度対時間3～24hrの直線回帰)

傾き (b)	-0.05939	-0.07225
Y切片 (ng)	1517.75	1161.79
決定係数 (r^2)	0.960	0.967
排出速度定数 (h^{-1})	0.1367	0.1664
半減期 (h)	5	4

30

24時間、N=6以外は、N=3

【0475】

(表12) 1.67mg/kgの静脈内投与に続いてのマウス肝臓、腎臓、肺、心臓、脳、および脾臓における [^{125}I]-hGIPF等価物の濃度および動態

		肝臓		腎臓		肺		舌		脳		脾臓	
		(ng/g)		(ng/g)		(ng/g)		(ng/g)		(ng/g)		(ng/g)	
		(平均±SD)		(平均±SD)		(平均±SD)		(平均±SD)		(平均±SD)		(平均±SD)	
0.083	hr	9104	(959)	24581	(5032)	3332	(462)	1157	(88)	141	(25)	1956	(354)
0.5	hr	4982	(1319)	21283	(4731)	1997	(375)	1124	(202)	105	(28)	1905	(663)
1	hr	3635	(413)	17039	(1543)	1575	(375)	1044	(292)	95	(18)	1380	(106)
3	hr	2706	(185)	13445	(1084)	633	(450)	588	(32)	51	(7)	840	(74)
6	hr	1757	(213)	8933	(800)	337	(106)	227	(91)	17	(9)	457	(193)
24	hr	875	(75)	4707	(485)	63	(13)	35	(7)	5	(3)	157	(49)

10

C _{max} (ng/g)	9104	24581	3332	1157	141	1955.54
t _{max} (h)	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
AUC ₀₋₂₄ (ng-h/g)	42191	206968	9404	6282	554	11400

最終相の動態

(log濃度対時間3～24hrの直線回帰)

20

傾き (b)	-0.02106	-0.01953	-0.04512	-0.05344	-0.04209	-0.03164
Y切片 (ng)	2742.03	13559.24	746.08	649.87	47.18	873.39
決定の係数 (r ²)	0.936	0.932	0.982	0.958	0.883	0.947
排出速度定数 (h ⁻¹)	0.0485	0.0450	0.1039	0.1230	0.0969	0.0728
半減期 (h)	14	15	7	6	7	10

30

24時間、N=6以外は、N=3

【0 4 7 6】

(表 1 3 A および B) 1.67mg/kgの静脈内投与に続いてのマウス食道、胃、小腸および大腸における [¹²⁵I]-hGIPF等価物の濃度および動態

A

		食道	胃	小腸	大腸
		(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)
		(平均±SD)	(平均±SD)	(平均±SD)	(平均±SD)
0.083	hr	1560 (321)	1960 (166)	1117 (135)	1016 (150)
0.5	hr	1743 (178)	2855 (1140)	1191 (423)	910 (135)
1	hr	1666 (743)	5545 (3546)	1053 (369)	1006 (189)
3	hr	1199 (330)	3678 (2047)	664 (28)	694 (141)
6	hr	350 (63)	1021 (475)	222 (110)	383 (175)
24	hr	48 (43)	106 (40)	32 (6)	74 (13)
$C_{\max}$ (ng/g)		1743	5545	1191	1016
$t_{\max}$ (h)		0.5	1	0.5	0.083
AUC_{0-24} (ng-h/g)		10372	29604	6421	8344

10

B

最終相の動態

20

(log濃度対時間3～24hrの直線回帰)

傾き (b)	-0.06022	-0.06683	-0.05745	-0.04408
Y切片 (ng)	1247.25	3997.67	715.76	822.73
決定の 係数 (r^2)	0.936	0.947	0.948	0.984
排出速度 定数 (h^{-1})	0.1387	0.1539	0.1323	0.1015
半減期 (h)	5	5	5	7

30

** 24時間、N=6以外は、N=3

【 0 4 7 7 】

(表 1 4 A および B) 1.67mg/kgの静脈内投与から24時間後におけるマウスからのhGIPF
等価物の回収

A

組織	Su									
肝臓 小腸 結腸 脳 脾臓 肺 腎臓 胃 食道 舌										
2.39 0.07 0.06 0.01 0.02 0.02 4.83 0.03 0.01 0.01	7.43									
2.13 0.10 0.06 0.00 0.02 0.02 5.17 0.10 0.00 0.01	7.61									
2.64 0.07 0.04 0.01 0.02 0.02 4.21 0.03 0.00 0.01	7.03									

10

動物 番号	GIPF/組織 (%)	GIPF/腸内容物 (%)	GIPF/尿 (%)	GIPF/糞 (%)	GIPF/死体 (%)	全回収率
1	7.43	0.13	85.70	3.48	1.87	98.6
2	7.61	0.13	76.70	3.12	1.82	89.4
3	7.03	0.32	87.47	3.53	1.76	100.1
平均	7.35	0.19	83.29	3.38	1.82	96.0
SD	0.30	0.11	5.77	0.23	0.06	5.81

† 組織の合計、GI内容物、ケージ濯ぎを含めた尿、糞、および死体

B

20

【0478】

予測されたように、最も早い T_{max} および最大 C_{max} は高度に灌流された組織、すなわち、肝臓、腎臓、脾臓および肺で観察され、最も長い半減期は腎臓および肝臓で見られた（表11）。

【0479】

食道、胃および小腸を含めた胃腸管の組織は、各々、延長された T_{max} を示した（表12）。表13Aは、放射線標識hGIPFの投与から24時間後における、種々の器官からの組織における、および動物の腸内容物、尿、糞および死体における放射線標識GIPFの回収率（%）を示す。個々の器官組織からのhGIPFの回収は表13Bに与える。データは、放射線標識hGIPFの分布が、静脈内経路を介する投与後に胃腸管の器官で異常に高いことを示し、したがって、hGIPFが胃腸組織に対する高い親和性を有し得ることを示唆する。

30

【0480】

実施例27

照射誘発粘膜炎：最適治療計画の評価

本実験の目的は、照射誘発粘膜炎に対するGIPFの最大予防的効果を供するであろう治療プロトコルを規定することであった。

【0481】

使用の時点において10～12週齢の成体雄BDF-1マウス。動物を12時間の明/暗サイクルにて1週間収容し、その間食料および水は自由に与えた。動物を各々5匹の6つの群にランダムに分け（合計30匹のマウス）、以下のように処理した。

40

1. 未処理、未照射対照

2. 13Gy X線曝露（全身照射）の3、2、1日前に、4mg/kgのhGIPFを静脈内投与

3. 13Gy X線曝露（全身照射）の4、3、2日前に、4mg/kgのhGIPFを静脈内投与

4. 13Gy X線曝露（全身照射）の5、4、3日前に、4mg/kgのhGIPFを静脈内投与

5. 13Gy X線曝露（全身照射）の6、5、4日前に、4mg/kgのhGIPFを静脈内投与

6. 13Gy X線曝露（全身照射）の72、48、24時間前に、生理食塩水を静脈内投与

【0482】

動物を、2.7Gy/分で送達する13Gy X線の単一用量での全身照射に曝露した。照射後に動物を毎日検査した。

【0483】

50

照射から4日後に動物を屠殺した。屠殺する2時間前に、動物に0.4mlの容量にて4mgのBrdUを注射した。解剖に際して、小腸および大腸の長さおよび重量を測定し、小腸（中央空腸）、結腸（横行結腸）、舌、食道および胃の組織セグメントの～1cmを10%ホルマリン中で固定した。

【0484】

小腸の断面をBrdU取り込みにつき分析した。断面当たりの生存陰窩の数をスコア取りし、群当たりの平均を決定した。10個以上の強くH&E染色された細胞（パネート細胞を除く）を含有する陰窩のみ、およびパイエル板を欠く無傷切片のみをスコア取りした。

【0485】

また、平均陰窩幅（その最大点において測定）を測定して、陰窩サイズの差によるスコアリング誤差を修正した。このようにして、修正が適用される。

修正した陰窩数 / 断面 =

未処理対照における平均陰窩幅 X 処理群における生存陰窩の平均数
処理動物における平均陰窩幅

【0486】

結果

放射線への曝露後の陰窩の生存に対するhGIPFの効果を図53に示す。データは、hGIPFを全身照射から24時間または48時間先立って動物に投与した場合に、hGIPFが放射線誘発腸粘膜炎症を有意に低下させたことを示す（表15）。

【0487】

これらの知見により、hGIPFを予防剤として用いて、放射線誘発腸粘膜炎症の有害効果を相殺することができ、全身照射の24時間前の投与は腸陰窩に対して最大の保護を供することが確認される。

【0488】

（表15）

	hGIPF 療法		
照射用量 (Gy)	GIPF (mg/kg/ 日)	治療スケジュール	hGIPF保護因子 (平均 ± SD)
13	なし	なし	1.0 ± 0.5
13	4	-3日目～-1日目	15.8 ± 6.2*
13	4	-4日目～-2日目	9.4 ± 6.8*
13	4	-5日目～-3日目	4.8 ± 3.3
13	4	-6日～-4日	5.3 ± 4.4

* P<0.05 (ANOVA、13Gy/hGIPF対13Gy/生理食塩水)

【0489】

実施例28

マウス小腸における細胞系依存性増殖アッセイ

小腸陰窩に対するhGIPFの効果を調べて、形態学的変化の開始に先立ってhGIPFの効果が、幹細胞および陰窩の移行性増殖細胞双方のいずれかに影響することによって起こるか否かを判断した。

【0490】

動物を以下の群にランダムに分けた。

30

40

50

1. PBS（群当たり1匹のマウス）：注射後1、3、6、12、24、または48時間
2. hGIPF（群当たり2匹のマウス、100ugの単回注射）：注射後1、3、6、12、24、または48時間

【0491】

各動物には、屠殺の2時間前にBrdU（4mg/kg）を注射した。陰窩の深さ、陰窩の増殖指標、および細胞定位置増殖アッセイを小腸の中央空腸切片で行った。陰窩増殖指標は、hGIPF（100ug）の単回注射後示された時点において（3、6、12、24、および48時間）BrdU免疫組織化学によって測定した。2匹のマウスからの40の陰窩をBrdU取り込みにつき分析し、結果を平均±SD（*P<0.01、ANOVA）として得る。

【0492】

結果

表16に示すように、hGIPFは3時間と早い小腸陰窩細胞の増殖を増加させ、増殖はhGIPF処理後24時間においてピークに達した。hGIPF誘発陰窩増殖は48時間以内に逆行された。加えて、BrdU陽性細胞の定位置分析（Potten et al., Int J Exp Path 78:219-243 (1997)）は、（幹細胞が位置する陰窩の下部からの）位置3～5、ならびに陰窩の上方部分において陰窩細胞の増殖の有意な増加を示した。

【0493】

これらのデータは、hGIPFが幹細胞および分裂する移行細胞集団に共に影響し得ることを示唆する。

【0494】

（表16）

時間 (hr)	BrdU陽性細胞の割合 (%) PBS対照群	BrdU陽性細胞の割合 (%) hGIPF群
3	38.0 ± 12.47	47.7 ± 8.38
6	36.45 ± 8.33	49.75 ± 11.3
12	39.16 ± 8.57	51.24 ± 9.86
24	36.55 ± 9.62	74.97 ± 9.0
48	33.0 ± 5.32	19.5 ± 6.5

【0495】

実施例29

分化および移動陰窩細胞に対するhGIPFの効果

杯およびパネート細胞の数を、hGIPFでのマウスの処理に続いてスコア取りして、hGIPFが小腸におけるこれらの細胞型の集団および分布に影響するかどうかを判断した。

【0496】

アルシャンブルー染色を行って、PBSおよびhGIPF処理マウスからの中央空腸切片における杯細胞を可視化した（n=3）。動物にhGIPF（100ug）またはPBSの注射を毎日3または7日間与えた。パネート細胞を可視化するために、抗リゾザイム抗体を用い、免疫組織化学（IHC）を同一動物の中央空腸切片に対して行った。

【0497】

結果

小腸の免疫組織化学分析およびアルシャンブルー染色は、hGIPF処理マウスの小腸におけるパネート細胞および杯細胞数の有意な変化を示さなかった。hGIPFは、陰窩/絨毛軸に沿った分化細胞の成熟および移動に影響しなかった。

【0498】

実施例30

腸上皮細胞においてhGIPFを発現するトランスジェニックキメラマウス

(1) マウス villin 遺伝子プロモーターの長い断片の調製 (図54A)

吸収組織の先端刷子縁に見出されるアクチンバンドリングタンパク質である villin は、胚腸内胚葉において転写的に活性化される第一の構造遺伝子の1つである。成体においては、villin は腸の垂直軸（陰窩から絨毛先端）および水平軸（結腸を通過して十二指腸）双方上の腸上皮の各細胞で広く発現される。Madison et al. は、マウス villin 遺伝子の 12.4 kb 領域が、トランスジェニックマウスの全腸上皮内での2つの異なるレポーター遺伝子（LacZ および Cre レコンビナーゼ）の高レベルの発現を駆動することを示した（J. Biol. Chem. 277, p33275-33283, 2002）。腸上皮細胞においてヒト GIPF を発現するトランスジェニックキメラマウスを作製するために、発明者らは、GIPF cDNA が、腸上皮細胞におけるその発現を指令するこの転写調節配列に連結した発現ベクターを構築した。

10

【0499】

マウス villin 遺伝子上流領域のヌクレオチド配列情報は公のデータベース（ensembl）から入手した。マウス BAC（RP23-278N11；GenBank アクセッション番号：AC098570）DNA を EcoRI および BamHI（Roche）で消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動に供して、ほぼ 11 kb の断片を単離した。pBluescript IISK（-）（STRATAGENE）の EcoRI および BamHI（Roche）での消化に続いて、ベクター断片を 0.8% アガロースゲル電気泳動によって単離し、子牛アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。前記ほぼ 11 kb の DNA 断片を脱リン酸化ベクター断片に連結し、連結混合物を XL10-Gold Ultracompetent 細胞（STRATAGENE）にトランスフェクトした。得られた形質転換体から調製された DNA 試料を、以下に記載するプライマー組（SEQ ID NO: 120 および 121）を用いる PCR 増幅に供した。増幅された断片の配列分析は、ほぼ 11.2 kb のマウス villin 遺伝子プロモーター断片（pPvil 11.2）が含まれていることを示した。pPvil 11.2 を制限酵素 ClaI および BamHI で消化し、反応混合物を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供して、ほぼ 11.2 kb の断片を単離した。

20

PvilEIBI-FW1 (SEQ ID NO: 120) GATCAGCAGCTGGAACAAACACAG

PvilEIBI-RV1 (SEQ ID NO: 121) TGCACAATCAGTCAATCAACAGAGC

【0500】

(2) マウス villin 遺伝子プロモーターの短断片の調製 (図54B)

公のデータベース（ensembl）から入手したマウス villin 遺伝子上流領域のヌクレオチド配列に基づき、2つの合成DNAを合成した（SEQ ID NO: 122 および 123）。

30

PvilBI-FW (SEQ ID NO: 122) GGCGGATCCCTGAGTTGGAGGCCAGTTTGG

PvilBI-NcoIXbaIRV (SEQ ID NO: 123)

GCTCTAGACCATGGTGGACGAGCCTAGAGGAGAAGGCAT

【0501】

KOD-puls (TOYOBO) を PCR 反応で用いた。PCR 反応混合物は 10 ピコモルの各プライマー、および鋳型としてのマウス BAC（RP23-278N11；GenBank アクセッション番号：AC098570）DNA を含有した。この PCR 増幅は初期変性インキュベーションを用いて 94℃ にて 2 分間行った。次いで、15 秒間の 94℃ における、および 2 分間の 68℃ におけるインキュベーションによって、変性、アニーリングおよび増幅の 30 サイクルを行った。PCR 産物（ほぼ 1.9 kb）を、0.8% アガロースゲル電気泳動および QIAquick ゲル抽出キット（QIAGEN）によって精製した。単離された PCR 産物の BamHI および XbaI での消化に続いて、消化された断片を、0.8% アガロースゲル電気泳動および QIAquick ゲル抽出キット（QIAGEN）によって精製した。精製された断片を、XhoI および XbaI で消化した pBluescript IISK（-）（STRATAGENE）に連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物を DH5α にトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製された DNA 試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを NcoI で消化した。その双方の末端を平滑化するために、消化した断片をクレノウ断片（TAKARA BIO）で処理し、それをさらに XbaI で消

40

50

化し、0.8%アガロースゲル電気泳動によって精製した。得られた断片を大腸菌C75アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。

【0502】

(3) GIPF断片の調製 (図54C)
Hy01XhISphIFW (SEQ ID NO: 124)

CCGCTCGAGGCATGCGGCTTGGGCTGTGTGTGGTGGCCCTG

Hy01BgXb-RV (SEQ ID NO: 125)

GCTCTAGAAGATCTCTAGGCAGGCCCTGCAGATGTGAGTGGCCC

10

KOD-puls- (TOY0B0) をPCR反応に用いた。PCR反応混合物は10ピコモルの各プライマー (SEQ ID NO: 124および125)、および鋳型としてのGIPF cDNAを含有した。このPCR増幅は、初期変性インキュベーションを用いて94℃にて3分間行った。次いで、15秒間の94℃における、および2分間の68℃におけるインキュベーションによって、変性、アニーリングおよび増幅の30サイクルを行った。PCR産物 (ほぼ800bp) を、0.8%寒天およびQIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) を用いる電気泳動によって精製した。単離されたPCR産物をXhoIおよびXbaIで消化し、それを、XhoIおよびXbaIで消化したpBluescriptIISK (-) に連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。反応混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製したDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンをSphIで消化した。その双方の末端を平滑化するために、消化した断片をBlunting high (TOY0B0) で処理し、それをさらにXbaIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動によって精製した。

20

【0503】

(4) pPvil 2-01の構築 (図54D)

(3) で調製したGIPF断片を(2) で調製したpPvil2に連結し、連結混合物をDH5αにトランスフェクトした。得られた形質転換体から調製したDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pPvil 2-01)。

【0504】

(5) pIRES-GFPの調製 (図54E)

pIRES2-EGFP (BD Bioscience Clontech) をEcoRIおよびNotIで消化し、IRES-GFP領域を含む断片を0.8%アガロースゲル電気泳動およびQIA quickゲル抽出キット (QIAGEN) によって精製した。精製された断片 (IRES-GFP) を、XhoIおよびXbaIで消化したpcDNA3 (Invitrogen) に連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製されたDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pIRES-GFP)。

【0505】

(6) pUC119 IRES-GFPの構築 (図54F)

pIRES-GFPをBamHIおよびXbaIで消化し、IRES-GFP領域を含む断片を0.8%アガロースゲル電気泳動およびQIA quickゲル抽出キット (QIAGEN) によって精製した。精製された断片 (IRES-GFP) を、BamHIおよびXbaIで消化したpUC119に連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製したDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pUC119 IRES-GFP)。

40

【0506】

(7) pUC119 IRES-GFP+Asの構築 (図54G)

以下に記載する合成されたオリゴヌクレオチド (SEQ ID NO: 126および127) のアニー

50

リングによって調製されたDNA断片を、EcoRIおよびBamHIで消化したpUC119 IRES-GFPに連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製されたDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pUC119 IRES-GFP+As)。

EI-BIAscI-(BI) S (SEQ ID NO: 126) AATTCGGATCCGGCGCGCC

EI-BIAscI-(BI) AS (SEQ ID NO: 127) GATCGGCGCGCCGGATCCG

【0507】

(8) pUC119 IRES-GFP+loxPの構築 (図54H)

10

以下に記載した合成されたオリゴヌクレオチド (SEQ ID NO: 128および129) のアニーリングによって調製されたDNA断片を、NotIおよびXhoIで消化したpUC119 IRES-GFP+Asに連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製されたDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pUC119 IRES-GFP+loxP)。

Nt-PmloxP-Xh S (SEQ ID NO: 128)

GGCCGTTTAAACATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATC

Nt-PmloxP-Xh AS (SEQ ID NO: 129)

20

TCGAGATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGTTTAAAC

【0508】

(9) ウシ成長ホルモン (BGH) ポリA断片の調製 (図54I)

BGHpAFW (SEQ ID NO: 130)

CGGGATCCGTTTAAACCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC

BGHpARV (SEQ ID NO: 131)

CGGATATCCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGC

30

KOD-puls- (TOYOBO) をPCR反応で用いた。PCR反応混合物は10ピコモルの各プライマー (SEQ ID NO: 130および131) および、(6) で調製したIRES-GFP断片を鋳型として含有した。このPCR増幅は、94℃における3分間の初期変性インキュベーションを用いて行った。次いで、15秒間の94℃における、および2分間の68℃におけるインキュベーションによって、変性、アニーリングおよび増幅の30サイクルを行った。PCR産物 (ほぼ0.2kb) を0.8%アガロースゲル電気泳動およびQIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) によって精製した。単離されたPCR産物をBamHIおよびEcoRVで消化し、それを、BamHIおよびEcoRVで消化したpBluescriptIISK (-) に連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製したDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンをPmeIおよびEcoRVで消化し、ウシ成長ホルモン (BGH) ポリA領域を含む断片を、0.8%寒天およびQIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) を用いる電気泳動によって精製した。

40

【0509】

(10) IRES-GFP、ウシ成長ホルモンポリAおよびloxP配列を含むDNA断片の調製 (図54J)

pUC119 IRES-GFP+loxPをPmeIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動によって精製した。(9) で調製したBGHポリA断片を精製されたpUC119 IRES-GFP+loxPベクターに連結し、これを、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製されたDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。GFP

50

のコード配列と同一向きのBGHポリA断片を含むクローンを選択した (pIRES-GFP+pA)。pIRES-GFP-pAをBamHIおよびXbaIで消化し、IRES-GFP、ウシ成長ホルモンポリAおよびloxP配列を含む断片を、0.8%寒天およびQIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) を用いる電気泳動によって精製した。

【0510】

(11) pPv1 2-01GFPの構築 (図54K)

IRES-GFP、ウシ成長ホルモンポリAおよびloxP配列 [(10) 参照] を含むDNA断片を、BgIIIおよびXbaIで消化したpPv12GIPFに連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製されたDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pPv1 2-01GFP)。

【0511】

(12) pPv-totalの構築 (図54L)

マウスvillin遺伝子プロモーター [(1) 参照] のほぼ11.2kbの長い断片を、BgIIIおよびClaIで消化したpPv12-01 GFPに連結し、大腸菌C75アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をXL10-Gold Ultracompetent細胞 (STRATAGENE) にトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製したDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pPv-total)。

【0512】

(13) pLoxP-STneoRの構築 (図54M)

W0 00/10383に記載されたpLoxP-STneoをXhoIで消化し、その双方の末端を平滑化するためにBlunting high (TOYOBO) で処理した。loxP-Neo^r-loxPユニットを含む得られたDNA断片を0.8%アガロースゲル電気泳動によって精製した。以下に記載された合成されたオリゴヌクレオチド (SEQ ID NO: 132および133) のアニーリングによって調製されたDNA断片を、PacIおよびFseIで消化したpBlueLAB (W0 00/10383) に連結し、0.8%アガロースゲル電気泳動によって精製した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製したDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pBlueLAB2)。loxP-Neo^r-loxPユニットを含む前記DNA断片を、EcoRVで消化したpBlueLAB2ベクターに連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製されたDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。pLoxP-STneo (W0 00/10383) に対して反対向きである断片を含むクローンを選択した (pLoxP-STneoR)。

AsiSI-S (SEQ ID NO: 132) □TAACCGCGATCGCGGCCGG

AsiSI-AS (SEQ ID NO: 133) □CCGCGATCGCCCTTAAT

【0513】

(14) pPv01GFPの構築 (図54N)

pPv-totalプラスミドDNAを制限酵素ClaIおよびXhoIで消化し、Pv-GIPFユニットを含むDNA断片を0.8%アガロースゲル電気泳動によって精製した。精製されたDNA断片を、ClaIおよびXhoIで消化したpLoxP-STneoRに連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をXL10-Gold Ultracompetent細胞 (STRATAGENE) にトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製されたDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pPv01GFP)。

【0514】

(15) マウスES細胞に対するエレクトロポレーションのためのpPv01GFPプラスミドDNAの

調製

pPv01GFPのプラスミドDNA (60 µg) を、1mMスベルミジン (pH7.0, Sigma) を含有する反応混合物中のClaIで37℃にて5時間消化した。次いで、反応混合物を、-20℃における16時間のフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿 (0.3M NaHCO₃) に供した。線状化ベクター断片をHBS緩衝液 (0.5 µg/µl) に溶解させ、以下のエレクトロポレーション実験で用いた。

【0515】

(16) 腸上皮細胞においてヒトGIPFおよびGFPを発現するトランスジェニックキメラマウスの産生

マウス胚の入手、培養、ES細胞の胚への注射、借腹母の子宮への移植についての一般的な手法は、1995年Yodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」に記載された方法に従って行った。 10

【0516】

1995年Yodoshaによって公表されたShinichi Aizawa, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」によって記載された方法に従い、線状化pPv01GFPベクターを、エレクトロポレーションによって、C57BL/6 X CBA F1株由来マウスTT2F ES細胞 (Uchida, 1995), Lifetech oriental) にトランスフェクトした。エレクトロポレーションに供されたES細胞を20mlのES培地に懸濁し、予めフィーダー細胞が播種されている2つの100mm組織培養プラスチックプレート (Corning) に接種した。1日後、培地を200 µg/mlのG418 (Invitrogen) を含有する培地で置き換えた。7~9日後、各ベクターにつき合計24のコロニーを拾った。各コロニーを12ウェルプレート中で密集するまで増殖させ、次いで、培養の4/5を0.2mlの低温保存培地 (ES培地+10% DMSO (Sigma)) に懸濁し、-80℃にて凍結保存した。残りの1/5を12ウェルゼラチン被覆プレートに接種し、2日間培養した。次いで、Puregene DNA単離キット (Gentra System) を用いてゲノムDNAを単離した。G418耐性TT2F細胞から単離されたゲノムDNAを制限酵素EcoRIおよびXhoIで消化し、次いで、0.8% アガロースゲル電気泳動に供した。EcoRI-XhoI消化を用い、villinプロモーター、ヒトGIPF cDNA、GFP cDNAおよびpPv01GFPのBGHポリA配列をG418耐性クローン中に含む無傷発現ユニットの保持は、ほぼ16kbバンドの検出によって測定することができる。分離されたDNA断片を膜 (Gene Screen, NEN Life science Products) に移し、次いで、以下に記載するプライマー組 (SEQ ID NO: 134および135) (IRESprobeF1, R1) を用いるPCRによって、pPV01GFP [(13) 参照] のIRES領域から調製されたDNA断片をプローブとして用い、ハイブリダイゼーションを行った。発明者らは、サザンブロッティングで単一の16kbバンドを示したESクローンを選択した。また、1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」に記載された方法に従って、選択されたESクローンを核型分析によって試験した。正常な核型を示した1つのESクローン、#2を胚への注入のために用いた。 30

IRESプローブF1 (SEQ ID NO: 134): CTAACGTTACTGGCCGAAGC

IRESプローブR1 (SEQ ID NO: 135): ATTATCATCGTGTTTTTCAAAGGAA

【0517】

トランスフェクトされたES細胞クローン#2の凍結ストック中の細胞を解凍し、培養を開始し、MCH (ICR) マウス株 (CREA JAPAN, INC.) の雄および雌マウスを交配させることによって得られた8細胞段階の胚に注入した; 注入率は胚当たり10~12細胞であった。胚をES細胞用の培地中で一晚培養して、未分化胚芽細胞まで発生させた後、約10のES細胞注入胚を、2.5日間の偽妊娠処理に供した借腹母ICRマウス (CREA JAPAN, INC.) の子宮の各側に移植した。宿主胚 (アルビノ) 由来組織におけるTT2F (アグーチ) ESクローン由来組織の寄与は、胚における芽の色素沈着および生存する子孫における毛色によって決定することができる。 40

【0518】

(17) トランスジェニックキメラマウスにおけるヒトGIPF-GFP mRNAの発現

種々の発生段階 (E13.5、E16.5、E19.5、3日、7日) におけるpPv01GFP/TT2F-#2由来キ 50

メラの腸管から全RNA試料を調製し、半定量的RT-PCR分析に供して、GIPF-GFP mRNA発現を調べた。Isogen (Nippon Gene) およびRNasy Mini (QIAGEN) を用いることによって、pPv01GFP/TT2F-#2由来キメラおよび対照TT2F由来キメラの腸管から抽出された500ngの全RNA、およびランダムヘキサマーを用い、第一ストランドcDNAをSuperscript III (Invitrogen) で合成した。半定量的RT-PCR分析を、各プライマー対のための特異的アニーリング温度にてcDNAを用いて行った。PCR産物を2%寒天ゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色した。RNAの完全性は、ネズミGAPDHによって作製されたcDNAの増幅によって調整した。GIPF (Pv01RT F1、R1; SEQ ID NO: 136および137)、Axin2 (Axin2 F、R; SEQ ID NO: 138および139) およびmGAPDH (mGAP DH5、3; SEQ ID NO: 140および141) についてのプライマー組のヌクレオチド配列およびアニーリング温度を以下に列挙する。

10

Pv01RT F1 (SEQ ID NO: 136) GCTCTGACACCAAGGAGACC

Pv01RT R1 (60°C) (SEQ ID NO: 137) CCCTAGGAATGCTCGTCAAG

Axin2 F(MUS) (SEQ ID NO: 138) CAGGAGCCTCACCCCTTCG

Axin2 R(MUS) (60°C) (SEQ ID NO: 139) ACGCCGAGGTGCTTGCCC

mGAPDH5 (SEQ ID NO: 140) CACCATGGAGAAGGCCGGGGGCCAC

mGAPDH3 (65°C) (SEQ ID NO: 141) ATCATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG

【0519】

20

図55に示すように、GIPF-GFP転写物はpPv01GFP/TT2F-#2由来キメラの腸管においてE13.5で検出可能であったが、調べた全ての肝臓試料では検出されず、これは、13kb villin プロモーターによって駆動される導入遺伝子の発現が12.5dpc.において胚後腸および中央腸でまず検出可能であり、発現は腸上皮に大いに特異的であることを記載する以前の研究 (Madison et al., J.Biol.Chem.277,p33275-33283,2002) とよく合致する。また、GIPF-GFP転写物の発現レベルは発生のコースの間に徐々に年齢と共に上昇することも明らかである。Eek-hoon et al.は、内因性Axin2 mRNA発現がWntシグナル伝達経路の活性化によって誘導され得ることを報告した (Mol.Cell Biol.22,1172-1183,2002)。また、Wntシグナル伝達が腸管の発生において非常に重要な役割を演じることも知られている。従って、発明者らは、pPv01GFP/TT2F-#2由来キメラの腸管におけるAxin2発現を調べた。結果 (図55) は、Axin2 mRNAの上昇した発現は、対照キメラと比較すると、3日目および7日目に明らかであることを示し、これは、ヒトGIPFの発現の結果、新生児の腸管におけるWntシグナル伝達経路の活性化をもたらすことを示す。

30

【0520】

(18) トランスジェニックキメラマウスの腸管におけるβ-カテニンの安定化

Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路に対するGIPFの効果を評価するために、β-カテニンの安定化を、10日目におけるpPv01GFP/TT2F-#2由来キメラからサンプリングした小腸および結腸で測定した。β-カテニン安定化アッセイについての手法を実施例17に記載する。図56に示すように、GIPFの発現は、対照キメラ (野生型) と比較した場合、pPv01GFP/TT2F-#2 (Pv01#2) 由来キメラからサンプリングされた小腸および結腸双方においてβ-カテニンの安定化を強く誘導した。

40

【0521】

(19) トランスジェニックキメラマウスの腸管における表現型変化の評価

新生児pPv01GFP/TT2F-#2由来キメラは、3日目に有意な腹部拡張を示し、この表現型の程度は年齢と共に徐々に強まった。剖検にいて3日目のキメラを肉眼で検査したところ、増大した表面血管化を伴う、小腸全体の直径の顕著な拡大が示された。全胚、子または胃腸管をブアン液中で固定した。パラフィン包埋切片を組織学的評価のためにヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で染色した。図57に示すように、pPv01GFP/TT2F-#2 (Pv01#2) からのH&E切片の組織病理学的分析は、対照と比較して、胚19.5日 (E19.5) ~14日 (d14) の陰窩および分岐の数の増大を明らかにした。

50

【0522】

実施例31

腸上皮細胞においてGIPFおよびWnt3aを発現するトランスジェニックキメラマウス

(1) Wnt3a断片の調製 (図58A)

Wnt3aFW (SEQ ID NO:

142) □CGGGATCCCCATGGCTCCTCTCGGATACCTCTTAGTGCT

Wnt3aRV (SEQ ID NO:

143) □GCTCTAGAGTTTAAACCTACTTGCAGGTGTGCACGTCATAG

10

KOD-puls- (TOYOBO) をPCR反応で用いた。PCR反応混合物は10ピコモルの各プライマー (SEQ ID NO: 142および143)、および鋳型としてのヒトWnt3a cDNAを含有した。このPCR増幅は94℃における3分間の初期変性インキュベーションを用いて行った。次いで、15秒間の94℃における、および2分間の68℃におけるインキュベーションによって、変性、アニーリングおよび増幅の30サイクルを行った。PCR産物 (ほぼ1.06kb) を0.8%アガロースゲル電気泳動およびQIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) によって精製した。単離されたPCR産物をBamHIおよびEcoRVで消化し、それを、BamHIおよびXbaIで消化したpBluescriptIISK (-) に連結し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製したDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンをNcoIおよびPmeIで消化し、Wnt3a cDNAを含む断片を、0.8%寒天およびQIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) を用いる電気泳動によって精製した。

20

【0523】

(2) IRES/Wnt3a+pA断片の調製 (図58B)

pIRES/GFP+pAプラスミドDNA [実施例30-(13)] をNcoIおよびPmeIで消化し、GFPコード配列なしのベクター断片を0.8%アガロースゲル電気泳動によって精製した。Wnt3a cDNA [(1) 参照] を含む断片を、大腸菌C75アルカリ性ホスファターゼで処理した精製ベクター断片に連結して、その双方の末端を脱リン酸化した。連結混合物をDH5αにトランスフェクトし、得られた形質転換体から調製されたDNA試料をヌクレオチド配列決定によって分析して、挿入された断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列 (pIRES/Wnt3a+pA) を有する断片を含むクローンをAscIおよびXhoIで消化し、IRES/Wnt3a+pAユニットを含むDNA断片を、0.8%アガロースゲル電気泳動およびQIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) によって精製した。

30

【0524】

(3) pPv01Wnt3aの構築 (図58C)

pPv01GFPプラスミドDNA [実施例30-(13)参照] を制限酵素AscIおよびXhoIで消化し、消化した反応混合物を0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。IRES/GFP+pA領域なしのベクター断片を単離し、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼで処理して、その双方の末端を脱リン酸化した。IRES/Wnt3a+pA断片 [(2) 参照] および前記ベクター断片の連結混合物をXL10-Gold Ultracompetent細胞 (STRATAGENE) にトランスフェクトした。得られた形質転換体から調製したDNA試料をヌクレオチド配列によって分析して、正しい断片の構造を確認した。正しいヌクレオチド配列を有する断片を含むクローンを選択した (pPv01Wnt3a)。

40

【0525】

(4) マウスES細胞に対するエレクトロポレーションのためのpPv01Wnt3aプラスミドDNAの調製

pPv01Wnt3a (60 μg) のプラスミドDNAを、1mMスベルミジン (pH7.0、Sigma) を含有する反応混合物中でClaIで37℃にて5時間消化した。次いで、反応混合物を-20℃における16時間のフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿 (0.3M NaHCO₃) に供した。線

50

状化ベクター断片をHBS緩衝液（0.5 μg/ul）に溶解させ、以下のエレクトロポレーション実験で用いた。

【0526】

(5) 腸上皮細胞においてヒトGIPFおよびWnt3aを発現するトランスジェニックキメラマウスの産生

マウス胚の入手、培養、ES細胞の胚への注入、借腹母の子宮への移植のための一般的な手法は、1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa,「Biomanual Series 8, Gene Targeting」に記載された方法に従って行った。

【0527】

1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa,「Biomanual Series 8, Gene Targeting」によって記載された方法に従い、線状化pPv01Wnt3aベクターを、エレクトロポレーションによって、C57BL/6 X CBA F1株由来マウスTT2F ES細胞（（Uchida,1995）, Lifetech oriental）にトランスフェクトした。エレクトロポレーションに供されたES細胞を20mlのES培地に懸濁し、予めフィーダー細胞を播種してある2つの100mm組織培養プラスチックプレート（Corning）に接種した。1日後、培地を200 μg/mlのG418（Invitrogen）を培養する培地で置き換えた。7～9日後、各ベクターにつき合計24のコロニーを拾った。各コロニーを12ウェルプレート中で密集するまで増殖させ、次いで、培養の4/5を0.2mlの低温保存培地（ES培地+10% DMSO（Sigma））に懸濁し、-80℃にて凍結保存した。残りの1/5を12ウェルのゼラチン被覆プレートに接種し、2日間培養した。次いで、ゲノムDNAをPuregene DNA単離キット（Gentra System）を用いて単離した。G418耐性TT2F細胞から単離されたゲノムDNAを制限酵素EcoRIおよびXhoIで消化し、次いで、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。EcoRI-XhoI消化を用いると、villinプロモーター、ヒトGIPF cDNA、Wnt3a cDNA、およびpPv01Wnt3aのBGHポリA配列を含む無傷発現ユニットのG418耐性クローンにおける保有は、ほぼ16kbバンドの検出によって測定することができる。分離されたDNA断片を膜（Gene Screen, NEN Life science Products）に移し、次いで、実施例30-(16)に記載されたプライマー組（IRESprobeF1, R1）を用いるPCRによって、pPV01GFP〔実施例30-(13)参照〕のIRES領域から調製したDNA断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った。発明者らは、サザンブロッティングにおいて単一の16kbを示したクローンを選択した。選択されたESクローンを、1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa,「Biomanual Series 8, Gene Targeting」に記載された方法に従って核型分析によっても試験した。正常な核型を示した2つのESクローン、#7および#13を胚への注入のために用いた。

【0528】

トランスフェクトされたES細胞クローン#7および#13の凍結ストック中の細胞を解凍し、培養を開始し、MCH（ICR）マウス株（CREA JAPAN, INC.）の雄および雌マウスを交配させることによって得られた8細胞段階の胚に注入した；注入率は胚当たり10～12細胞であった。胚をES細胞用の培地中で一晚培養して、未分化胚芽細胞まで発生させた後、約10のES細胞注入胚を、2.5日間の偽妊娠処理に供された借腹母ICRマウス（CREA JAPAN, INC.）の子宮の各側に移植した。宿主胚（アルビノ由来）組織におけるTT2F（アグーチ）ESクローン由来細胞の寄与は、胚における芽色素沈着および生存する子孫における毛色によって決定することができる。

【0529】

(6) トランスジェニックキメラマウスにおけるヒトGIPF/Wnt3a mRNAの発現

新生キメラに由来するpPv01Wnt3a/TT2F-#7および#13の腸管から全RNA試料を調製し、半定量的RT-PCR分析に供して、GIPF-GFP mRNA発現を調べた。Isogen（Nippon Gene）およびRNasy Mini（QIAGEN）を用いることによって、pPv01Wnt3a/TT2F-#7および#13由来キメラおよび対照TT2F由来キメラの胃腸管から抽出された500ngの全RNA、およびランダムヘキサマーを用い、第一ストランドcDNAをSuperscript III（Invitrogen）で合成した。半定量的RT-PCR分析は、各プライマー対のための特異的アニーリング温度においてcDNAを用いて行った。PCR産物を2%寒天ゲル上の電気泳動に供し、臭化エチジウムで染色した。RN

Aの完全性はネズミGAPDHによって作製されたcDNAの増幅によって調整した。GIPF (Pv01RT F1、R1)、Axin2 (Axin2F、R) およびmGAPDH (mGAPDH5、3) についてのプライマー組のヌクレオチド配列およびアニーリング温度を以下に列挙する。

Pv01RT F1 (SEQ ID NO: 136) GCTCTGACACCAAGGAGACC

Pv01RT R1 (60°C) (SEQ ID NO: 137) CCCTAGGAATGCTCGTCAAG

Axin2 F(MUS) (SEQ ID NO: 138) CAGGAGCCTCACCCCTTCG

Axin2 R(MUS) (60°C) (SEQ ID NO: 139) ACGCCGAGGTGCTTGCCC

mGAPDH5 (SEQ ID NO: 140) CACCATGGAGAAGGCCGGGGCCAC

mGAPDH3 (65°C) (SEQ ID NO: 141) ATCATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG

10

【0530】

図59に示すように、GIPF-Wnt3a転写物は、新生キメラ (Pv01Wnt3a; 1~4) に由来するpPv01Wnt3a/TT2F-#7および-#13の腸組織で検出できた。結果 (図59) は、対照キメラ (TT2F: 5および6) と比較した場合、Axin2 mRNAの上昇した発現が明らかであることも示す。

【0531】

(7) トランスジェニックキメラマウスの腸管におけるβ-カテニンの安定化

Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路に対するGIPFの効果を評価するために、β-カテニンの安定化を、pPv01Wnt3a/TT2F-#7および-#13由来キメラからサンプリングされた小腸および結腸で測定した。β-カテニン安定化アッセイのための手法は実施例17に記載されている。図60に示すように、GIPFおよびWnt3aの共発現は、対照キメラ (野生型: 3および4) と比較した場合に、pPv01Wnt3a/TT2F-#7胚 (E20.5: 1および2) からサンプリングされた十二指腸および結腸においてβ-カテニンの安定化を誘導した。

20

【0532】

(8) トランスジェニックキメラマウスの腸管の表現型変化の評価

新生児pPv01Wnt3aTT2F-#7および-#13由来キメラは、有意な腹部拡張を示した。剖検において新生キメラを肉眼で検査したところ、増大した表面血管形成を伴う、小腸全体での直径の顕著な拡大が示された。全胚、子または胃腸管をブアン液中で固定した。パラフィン包埋切片を、組織学的評価のためにヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で染色した。図61に示すように、pPv01Wnt3a/TT2F-#13胚20.5日胚 (E20.5) からのH&E切片の組織病理学的分析は、絨毛、絨毛の不規則な分岐および過形成の数の増大を明らかにした。これらの表現型の程度はpPv01GFP/TT2F-#2由来キメラ [実施例30-(19)] よりも強く、これは、Wnt3a発現によるGIPF作用の増強を示唆する。

30

【0533】

実施例32

RS-K0マウスES細胞

A. RS-K0ベクターの構築

以下に記載され、図62B-1Kに示される方法に従い、RS-K0ベクターの構築 (図62A) を行った。

40

【0534】

図62B pBluescriptII SK (-) (Stratagene) への新しい制限部位 (NruI、SgrAI、およびAscI) の付加

pBluescriptII SK (-) の付加のためのオリゴDNA断片 (SEQ ID NO: 144および145) を合成した。

LinkA1:TCGAGTCGCGACACCGGCGGGCGCGCCC (SEQ ID NO: 144)

LinkA2:TCGAGGGCGCGCCCGCCGGTGTGCGCGAC (SEQ ID NO: 145)

調製したLinkA1およびLinkA2を、制限酵素SalIおよびXhoIで予め消化したpBluescriptII

50

SK (-) に連結した。得られたプラスミド pBlueLA は新しく付加された制限部位 (NruI、SgrAI、および AscI) を含有した。

【0535】

図 62C 新しい制限部位 (PacI、FseI、および SalI) の pBlueLA への付加

pBlueLA における新しい制限部位の付加のためのオリゴ DNA 断片 (SEQ ID NO: 146 および 147) を合成した。

LinkB1: GGCCGCTTAATTAAGGCCGGCCGTCGACG□SEQ ID NO: 146)

LinkB2: AATTCGTCGACGGCCGGCCTTAATTAAGC□SEQ ID NO: 147)

調製した LinkB1 および LinkB2 を、制限酵素 NotI および EcoRI で予め消化した pBlueLA に連結した。得られたプラスミド pBlueLAB は新しく付加された制限部位 (PacI、FseI、および SalI) を含有した。

【0536】

図 62D LoxP-Neo-B 断片の調製

LoxP-Neo-B 断片は、pLoxP-STneo (W0 00/10383) の XhoI 消化から得られた LoxP-Neo の T4 DNA ポリメラーゼ処理によって調製された。

【0537】

図 62E pBlueLAB-LoxP-Neo プラスミドの調製

LoxP-Neo-B 断片を、制限酵素 EcoRV で予め消化した pBlueLAB に連結した。得られたプラスミド pBlueLAB-LoxP-Neo は LoxP-Neo-B 断片を含有した。

【0538】

図 62F DT-A 断片の調製

pMC1DT-A□GIBCO BRL□を XhoI および SalI で消化し、得られた DT-A 断片を分離し、アガロースゲル電気泳動から回収した。

【0539】

図 62G pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A プラスミドの調製

DT-A 断片を、制限酵素 XhoI で予め消化した pBlueLAB-LoxP-Neo に連結した。得られたプラスミド pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A は DT-A 断片を含有した。

【0540】

図 62H RS エLEMENT の 3' ゲノム領域の調製

PCR 用のフォワード (RS3'FW2; SEQ ID NO: 148) およびリバース (RS3'RV3; SEQ ID NO: 149) プライマーは、GenBank (アクセッション番号 AC090291) から入手し、かつ RS エLEMENT の 3' ゲノム領域の DNA を増幅するのに用いられるマウスの配列に基づいていた。

RS3'FW2: TTGGCGCGCCCTCCCTAGGACTGCAGTTGAGCTCAGATTGA

(SEQ ID NO: 148)

は、AscI 認識配列を 5' 末端部位に加えることによって調製し、かつ

RS3'RV3:

CCGCTCGAGTCTTACTGTCTCAGCAACAATAATATAAACAGGGG (SEQ ID

NO: 149)

は、XhoI 認識配列を 5' 末端部位に加えることによって調製した。PCR は、鋳型として BAC クローン RP23-435I4 (GenBank アクセッション番号 AC090291) を用いて行った。PCR 産物を制限酵素 AscI および XhoI で消化し、制限酵素 AscI および XhoI で予め消化した pBlueLAB に連結した。得られたプラスミドは RS エLEMENT の 3' ゲノム領域の指定された DNA 配列を含有し、ヌクレオチド配列内には置換はなかった。AscI および XhoI の間の領域を AscI および XhoI で処理し、次いで、RS エLEMENT (約 2Kb) の 3' ゲノム領域を得た。

【0541】

図 62I RS の 3' ゲノム領域の、pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A への挿入

RS エLEMENT の 3' ゲノム領域を、AscI および XhoI で予め消化した pBlueLAB-LoxP-Neo-DT

10

20

30

40

50

-Aに連結した。pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-AおよびRSエレメントの3'ゲノム領域の間の連結領域を確認した後、プラスミドpBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A-3'RSを得た。

【0542】

図62J マウスRSエレメントの5'ゲノム領域の調製

PCR用のフォワード (RS5'FW3; SEQ ID NO: 150) およびリバース (RS5'RV3; 配列場号: 151) プライマーは、GenBank (アクセッション番号AC090291) から得、かつRSエレメントの5'ゲノム領域のDNAを増幅するのに用いられるマウスの配列に基づいて合成した。

RS5'FW3:

ATAAGAATGCGGCCGCAAAGCTGGTGGGTAAAGACTATCTCGTGAAGTG

(SEQ ID NO: 150)

は、NotI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製し、かつ

RS5'RV3:

ACGCGTCGACTCACAGGTTGGTCCCTCTCTGTGTGTGGTTGCTGT (SEQ ID

NO: 151)

は、SalI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製した。PCRは、鋳型としてBACクローンRP23-435I4 (GenBankアクセッション番号AC090291) を用いて行った。PCR産物を制限酵素NotIおよびSalIで消化し、制限酵素NotIおよびSalIで予め消化したpBlueLABに連結した。得られたプラスミドはRSエレメントの5'ゲノム領域の指定されたDNA配列を含有し、ヌクレオチド配列に置換はなかった。NotIおよびSalIの間の領域をNotIおよびSalIで処理し、次いで、RSエレメント (約5Kb) の5'ゲノム領域を得た。

【0543】

図62K pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A-3'RSへのRSエレメントの5'ゲノム領域の挿入

RSエレメントの5'ゲノム領域を、NotIおよびSalIで予め消化したpBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A-3'RSに連結した。pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A-3'RSおよびRSエレメントの5'ゲノム領域の間の連結領域を確認した後、RS-KOベクターを構築した。

【0544】

B. RS-KOマウスES細胞の調製

1995年にYodoshaによって公表された、Aizawa Shinichi, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」に記載された方法に従って、マウス胚の入手および培養のための一般的手法を行った。1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」によって記載された方法に従って、RS-KOベクターをNot Iで線状化し、エレクトロポレーションによって、C57BL/6 X CBA F1由来マウスTT2F ES細胞 (Uchida, 1995), Lifetech oriental) に導入した。電気穿孔したES細胞を20mlのES培地 [DMEM (GIBCO)、18% FBS (GIBCO)、0.1mM 2-メルカプトエタノール (GIBCO)、1000U/ml LIF (白血病阻害因子、CHEMICON International, Inc.)] に懸濁し、フィーダー細胞 (Invitrogen) が予め播種してある、2つの100mm組織培養プラスチックプレート (Corning) に接種した。1日後、培地を、0.75g/mlのピューロマイシン (Sigma) を含有する培地で交換した。7日後、形成されたピューロマイシン耐性コロニーを拾った。各コロニーを24ウェルプレート中で密集するまで増殖させ、次いで、培養の2/3を0.2mlの低温保存培地 [FBS+10% DMSO (Sigma)] に懸濁し、-80℃にて凍結保存した。残りの1/3を12ウェルゼラチン被覆プレートに接種し、2日間培養した。次いで、Puregene DNA単離キット (Gentra System) を用いてゲノムDNAを単離した。

【0545】

サザン分析用の3'KO-プローブは以下のようにして調製した。RS3'サザンFW1 (SEQ ID NO: 152) およびRS3'サザンRV2 (SEQ ID NO: 153) プライマーは、GenBank (アクセッション番号AC090291) から得、かつRSエレメントの3'ゲノム領域の約600量体の長いDNA断片を増幅するのに用いられるマウスの配列に基づいて合成した。

10

20

30

40

RS3'サザン FW1: TCTTACTAGAGTTCTCACTAGCTCT□SEQ ID NO: 152)

RS3'サザン RV2: GGAACCAAAGAATGAGGAAGCTGTT□SEQ ID NO: 153)

【0546】

ピューロマイシン耐性TT2F細胞から単離したゲノムDNAを制限酵素EcoRI (Takara Shuzo) で消化し、次いで、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。

【0547】

分離されたDNA断片を膜 (GeneScreen, NEN (商標) Life Science Products) に移し、次いで、RSエレメントDNA (3'K0-プローブ) の3'ゲノム領域から調製したDNA断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った。未標的化ESクローンのバンドパターンは約5.7KbのMWの1つのバンドを示し、標的化ESクローンは約5.7Kbおよび7.4KbのMWの2つのバンドを示す (図63)。また、1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa, 「Biomannual Series 8, Gene Targeting」によって記載された方法に従って、選択されたRS-K0マウスESクローンを核型分析によって試験した。正常な核型を示したRS-K0マウスESクローンをさらなる実験で用いた。

【0548】

実施例33

トランスジェニックGIPF欠失突然変異体動物

A. pCk m4 KIベクターの構築

GIPF欠失突然変異体4 Ckノックイン (pCk m4 KI) ベクターの構築 (図64A) は、以下に記載し、図64B~64Kに示した方法に従って行った。

【0549】

図64B Ck P2 KI+AS KIの調製

Ck P2 KIにおける新しい制限部位の付加のためのオリゴDNA断片 (SEQ ID NO: 154および155) を合成した。

AscI 上部リンカー: GGCCAGGCGCGCCTTGC (SEQ ID NO: 154)

AscI 下部リンカー: GGCCGCAAGGCGCGCCT (SEQ ID NO: 155)

調製したAscI上部リンカーおよびAscI下部リンカーを、制限酵素NotIで予め消化したCk P2 KIに連結した。得られたプラスミドCk P2 KI+AS KIは新しく付加された制限部位 (AscI) を含有した。

【0550】

図64C pBlueLAB+Nhの調製

pBlueLAB中の新しい制限部位の付加のためのオリゴDNA断片 (SEQ ID NO: 156および157) を合成した。

Pac-Nhe-Fse S: TAAGGGCTAGCTAGGGCCGG (SEQ ID NO: 156)

Pac-Nhe-Fse AS: CCCTAGCTAGCCCTTAAT (SEQ ID NO: 157)

調製したPac-Nhe-Fse SおよびPac-Nhe-Fse ASを、制限酵素PacIおよびFseIで予め消化したpBlueLABに連結した。得られたプラスミドpBlueLAB+Nhは新しく付加された制限部位 (NheI) を含有した。

【0551】

図64D pBlueLAB+NhHpの調製

pBlueLAB+Nhにおける新しい制限部位の付加のためのオリゴDNA断片 (SEQ ID NO: 158および159) を合成した。

S/HpaI/Hd-S: TCGAGTTAAC (SEQ ID NO: 158)

S/HpaI/Hd-AS: AGCTGTAAAC (SEQ ID NO: 159)

調製したS/HpaI/Hd-SおよびS/HpaI/Hd-ASを、制限酵素SalIおよびHindIIIで予め消化したpBlueLAB+Nhに連結した。得られたプラスミドpBlueLAB+NhHpは新しく付加された制限部

位 (HpaI) を含有した。

【0552】

図64E pCkpAP2の調製

pCkp2+As KIをHpaIおよびNheIで消化し、得られた952bp断片を分離し、アガロースゲル電気泳動から回収した。952bp断片を、制限酵素HpaIおよびNheIで予め消化したpBlueLAB+NhHpに連結した。得られたプラスミドpCkpAP2は952bp断片を含有した。

【0553】

図64F pCkpAMCSの調製

pCkpAP2における新しい制限部位の付加のためのオリゴDNA断片 (SEQ ID NO: 160および161) を合成した。

10

SPFNリンカー-S: AGCTGTCGACTTAATTAAGGCCGGCCG (SEQ ID NO: 160)

SPFNリンカー-AS: CTAGCGGCCGGCCTTAATTAAGTCGAC (SEQ ID NO: 161)

調製したSPFNリンカー-SおよびSPFNリンカー-ASを、制限酵素HindIIIおよびNheIで予め消化したCkpAMCSに連結した。得られたプラスミドCkpAMCSは新しく付加された制限部位 (PacI) を含有した。

【0554】

図64G pCkp2ΔPの調製

pCkpAMCSをHpaIおよびNheIで消化し、得られた約700bpの長さの断片を分離し、アガロースゲル電気泳動から回収した。700bp断片を、制限酵素HpaIおよびNheIで予め消化したpCkp2+As KIに連結した。得られたプラスミドpCkp2ΔPは700bpの断片を含有した。

20

【0555】

図64H pBS+PFNの調製

pBluescript II SK (-) 中の新しい制限部位の付加のためのオリゴDNA断片 (SEQ ID NO: 162および163) を合成した。

S/PFN/Hd-S: TCGACTTAATTAAGGCCGGCCCTAGCTAGCA (SEQ ID NO: 162)

S/PFN/Hd-AS: AGCTTGCTAGCTAGGGCCGGCCTTAATTAAG (SEQ ID NO: 163)

調製されたS/PFN/Hd-SおよびS/PFN/Hd-ASを、制限酵素SalIおよびHindIIIで予め消化したpBluescriptII SK (-) に連結した。得られたプラスミドpBS□PFNは新しく付加された制限部位 (PacI、FseI、およびNheI) を含有した。

30

【0556】

図64I pPSs3.8の調製

PCR用のフォワード (PsecSP FW1; SEQ ID NO: 164) およびリバース (PsecSP RV; SEQ ID NO: 165) プライマーは、GenBank (アクセッション番号K02159) から入手し、かつIgκのプロモーターおよびリーダー配列コーディング領域のDNAを増幅するのに用いられるマウスの配列に基づいて合成した。リーダー配列コーディング領域は固有のイントロン配列を含有した。

PsecSP FW1:

CCTTAATTAAAGTTATGTGTCCTAGAGGGCTGCAAACTCAAGATC

40

(SEQ ID NO: 164)

は、PacI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製し、かつ

PsecSP RV:

TTGGCCGGCCTTGGCGCCAGTGGAACCTGGAATGATAAACACAAAGATTA

TTG (SEQ ID NO: 165)

は、FseI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製した。PCRは、鋳型としてTT2FES細胞 (Uchida, 1995), Lifetech oriental) からのマウスゲノムを用いて行った。PCR産物を制限酵素PacIおよびFseIで消化し、制限酵素PacIおよびFseIで予め消化したpBS□P

50

FNに連結した。得られたプラスミドpPSs3.8はIgκのプロモーターおよびリーダー配列コーディング領域のDNA断片を含有した。

【0557】

図64J m4 (+SP) およびm4 (-SP) の調製

PCR用のフォワード (SalコザックGIPF F; SEQ ID NO: 166) およびリバース (GIPFm4 RV Fse; SEQ ID NO: 167) プライマーを、欠失突然変異体#4 (図43; SEQ ID NO: 91) の配列に基づいて合成し、これを用いてGIPFのリーダー配列およびGIPFの欠失突然変異体#4配列のDNAを増幅した。

SalコザックGIPF F: AAG CGT CGA CCA CCA TGC GGC TTG GGC TGT GTG (SEQ ID NO: 166)

10

は、SalI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製し、
GIPF m4 RV Fse: ATG GCC GGC CCT ACA TGG TGC CAT TGG CAG (SEQ ID NO: 167)

は、FseI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製した。PCRは、鋳型としてGIPF KIベクターを用いて行った。PCR産物を制限部位SalIおよびFseIで消化し、次いで、m4 (+SP) 断片を得た。

【0558】

PCR用のフォワード (Hy01 (-SP) FW; SEQ ID NO: 168) およびリバース (GIPF m4 RV Fse; SEQ ID NO: 169) プライマーは欠失突然変異体#4の配列 (図43; SEQ ID NO: 91) に基づいて合成し、これを用いて、GIPFの欠失突然変異体#4配列のDNAを増幅した。

Hy01(-SP) FW: AGCCGGGGGATCAAGGGGAAAAGGCAGAGG (SEQ ID NO: 168)

20

は、リン酸を5'末端部位に加えることによって調製し、かつ
GIPF m4 RV Fse:

ATG GCC GGC CCT ACA TGG TGC CAT TGG CAG (SEQ ID NO: 169)

は、FseI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製した。PCRは、鋳型としてGIPF KIベクターを用いて行った。PCR産物を制限酵素FseIで消化し、次いで、m4 (-SP) 断片を得た。

30

【0559】

図64K pCk m4 KIベクターの構築

m4 (+SP) 断片を、制限酵素SalIおよびFseIで予め消化したpCkP2+As KIに連結した。得られたpCkm4 KIベクターはm4 (+SP) 断片を含有し、これは、GIPF欠失突然変異体マウスの作製で用いた。

【0560】

B. pPSm4 KIベクターの構築

GIPF欠失突然変異体4 PSノックイン (pPS m4 KI) ベクター (図65A) の構築は、以下に記載され、図65B~65Cに示される方法に従って行った。

【0561】

40

図65B pPSs3.8m4の調製

m4 (-SP) 断片を、制限酵素SfoIおよびFseIで予め消化したpPSs3.8に連結した。得られたpPSs3.8m4はm4 (-SP) 断片を含有した。

【0562】

図65C pPSm4 KIベクターの構築

pPSs3.8m4をPacIおよびFseIで消化し、得られた約1.2Kbの長さの断片を分離し、アガロースゲル電気泳動から回収した。1.2Kb断片を、制限酵素PacIおよびFseIで予め消化したCkP2ΔPに連結した。得られたpPSm4 KIベクターは1.2Kb断片を含有し、これは、GIPF欠失突然変異体マウスの作製で用いた。

【0563】

50

C. GIPF欠失突然変異体マウスの作製

マウス胚の入手、培養、ES細胞の胚への注入、借腹母子宮への移植への一般的手法は1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa,「Biomanual Series 8, Gene Targeting」に記載された方法に従って行った。

【0564】

pCkm4 KIベクターおよびpPSm4 KIベクターをNot Iで線状化し、次いで、1995年にYodoshaによって公表された、Aizawa Shinichi,「Biomanual Series 8,Targeting」によって記載された方法に従って、エレクトロポレーションによってRS-KOマウスES細胞に導入した。エレクトロポレーションに供されたRS-KOマウスES細胞を20mlのES培地 [DMEM (GIBCO)、18% FBS (GIBCO)、0.1mM 2-メルカプトエタノール (GIBCO)、1000U/mlのLIF (白血病阻害因子、CHEMICON International, Inc.)] に懸濁し、予めフィーダー細胞 (Invitrogen) が播種されている2つの100mm組織培養プラスチックプレート (Corning) に接種した。1日後、培地を、0.75g/mlのピューロマイシン (Sigma) を含有する培地で交換した。7日～9日後、pCkm4 KIベクターでエレクトロポレーションされたRS-KOマウスES細胞からの24コロニー、およびpPSm4 KIベクターでエレクトロポレーションされたRS-KOマウスES細胞からの24コロニーを、各々、拾った。各コロニーを12ウェルプレート中で密集するまで増殖させ、次いで、培養の2/3を0.2mlの低温保存培地 [FBS+10% DMSO (Sigma)] に懸濁し、-80℃にて凍結保存した。残りの1/3をウェルゼラチン被覆に接種し、2日間培養した。次いで、Puregene DNA単離キット (Gentra System) を用いてゲノムDNAを単離した。ピューロマイシンで耐性RS-KOマウスES細胞から単離されたゲノムDNAを制限酵素EcoRI (Takara Shuzo) で消化し、次いで、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。分離されたDNA断片を膜 (GeneScreen, NEN (商標) Life Science Products) に移し、次いで、IgJ κ -C κ ゲノムDNAの3'領域から調製したDNA断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った (Xho I-EcoR I、1.3Kb (SEQ ID NO: 67: WO 00/10383、実施例番号48))。未標的化ESクロンのバンドパターンは15.6KbのMWの1つのバンドを示す。pCkm4 KI標的化RS-KOマウスESクロンは15.6Kbおよび12.9KbのMWの2つのバンドを示し、pPSm4 KI標的化RS-KOマウスESクロンは、各々、15.6Kbおよび12.5KbのMWの2つのバンドを示す (図66および67)。10のpCkm4 KI標的化RS-KOマウスESクロン#3のうちの1つをサザン分析後に選択し (相同組換え率は約41.7%であった)、7つのpPSm4 KI標的化RS-KOマウスESクロン#7のうちの1つをサザン分析後に選択した (相同組換え率は約29.2%であった)。また、1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa,「Biomanual Series 8, Gene Targeting」によって記載された方法に従って核型分析によって試験した。正常な核型を示したpCkm4 KI標的化RS-KOマウスESクロンの1つのクロン#3およびpPSm4 KI標的化RS-KOマウスESクロンの1つのクロン#7を、各々、胚への移植で用いた。

【0565】

pCkm4 KI標的化RS-KOマウスES細胞クロン#3およびpPSm4 KI標的化RS-KOマウスES細胞クロン#7の凍結ストック中の細胞を解凍し、培養を開始し、免疫グロブリン重鎖ノックアウトマウス株 (Tomizuka et. Al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 722-727, 2000) の雄および雌マウスを交配させることによって得られた8細胞段階の胚に注入した; 注入率は胚当たり10～12細胞であった。胚をES細胞用の培地中で一晚培養して、未分化胚芽細胞まで発生させた後、約10個のES細胞注入胚を、2.5日間の偽妊娠処理に供された借腹母ICRマウス (CREA JAPAN, INC.) の子宮の各側に移植した。80個の注入された胚の各々の移植の結果、15匹および20匹の子孫が各々生まれた。子孫におけるキメラ現象は、宿主胚 (ICR) 由来アルビノ毛色におけるTT2F細胞由来アグーチ毛色 (暗い茶色) の程度によって測定された。15匹の子孫のうち、9匹のマウス (pCkm4ノックインマウス) は部分的アグーチ毛色を有すると認められ、これは、RS-KOマウスES細胞の寄与を示し、および20匹の子孫のうち、16匹のマウス (pPSm4ノックインマウス) は部分的アグーチ毛色を有すると認められ、これは、RS-KOマウスES細胞の寄与を示す。GIPF欠失突然変異体マウスは、pCkm4 KI標的化RS-KOマウスES細胞およびpPSm4 KI標的化RS-KOマウスES細胞の他のクロンから前記記載と同様にして得られた。

【0566】

マウスを12/12-時間暗/明サイクル下に維持し（8:00 amに明かりをつける）、5 μ m濾過水およびCE-2食料（CLEA JAPAN, INC.）を自由に与えた。雄マウスを離乳期後に個々に収容した。

【0567】

実施例34

トランスジェニックGIPF変種動物

A. pCk VR KIベクターの構築

以下に記載され、図68B~68Cに示される方法に従い、GIPF変種Ckノックイン（pCk VR KI）ベクター（図68A）の構築を行った。

10

【0568】

図6B コザック（VR+kz）を有するGIPF変種およびGIPF変種（VR）の調製

PCR用のフォワード（VR Ck Fw; SEQ ID NO: 171）およびリバース（VR KI Rv; SEQ ID NO: 171）プライマーはGenBank（アクセッション番号AK098225）の配列に基づいて合成し、これを用いて、5'末端部位にコザックをもつGIPF変種のDNAを増幅した。

VR Ck Fw: ACG CGT CGA CCA CCA TGA TAT TCC GAG TCA GTG C (SEQ ID

NO: 170)

は、SalI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製し、かつ

VR KI

20

Rv: GGC CGG CCC TAG GCA GGC CCT GCA GAT GTG AGT GG (SEQ ID NO: 171)

は、FseI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製した。PCRは、鋳型としてGIPF KIベクターを用いて行った。PCR産物を制限酵素SalIおよびFseIで消化し、次いで、VR+kzを得た。

【0569】

PCR用のフォワード（VR Fw; SEQ ID NO: 172）およびリバース（VR KI Rv; SEQ ID NO: 173）プライマーは、GenBank（アクセッション番号AK098225）に基づいて合成し、これを用いて、GIPF変種のDNAを増幅した。

VR Fw: ATG ATA TTC CGA GTC AGT GCC GAG GGG AGC CAG (SEQ ID NO: 172)

30

は、リン酸を5'末端に加えることによって調製し、かつ

VR KI Rv: GGC

CGG CCC TAG GCA GGC CCT GCA GAT GTG AGT GG (SEQ ID NO: 173)

は、FseI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製した。PCRは、鋳型としてGIPF KIベクターを用いて行った。PCR産物を制限酵素FseIで消化し、次いで、VRを得た。

【0570】

図68C pCk VR KIベクターの構築

VR+kzを、制限酵素SalIおよびFseIで予め消化したpCkP2+As KIに連結した。得られたpCk VR KIベクターはVR+kzを含有し、これは、GIPF変種マウスの作製で用いた。

40

【0571】

B. pPS VR KIベクターの構築

以下に記載され、図69B~69Cに示される方法に従い、GIPF変種PSノックイン（pPS VR KI）ベクター（図69A）の構築を行った。

【0572】

図69B pPSs3.8VRの調製

VRを、制限酵素SfoIおよびFseIで予め消化したpPSs3.8に連結した。得られたpPSs3.8VRはVRを含有した。

【0573】

図69C pPS VR KIベクターの構築

50

pPSs3.8VRをSalIおよびFseIで消化し、得られた約1.5Kbの長さの断片を分離し、アガロースゲル電気泳動から回収した。1.5Kb断片を、制限酵素SalIおよびFseIで予め消化した□CkP2ΔPに連結した。得られたpPS VR KIベクターは1.5Kb断片を含有し、これは、GIPF変種マウスの作製で用いた。

【0574】

C. GIPF変種マウスの作製

マウス胚の入手、培養、ES細胞の胚への注入、借腹母の子宮への移植のための一般的な手法は、1995年にYodoshaによって公表された、Aizawa Shinichi, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」に記載された方法に従って行った。

【0575】

1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」によって記載された方法に従い、pCk VR KIベクターおよびpPSVR KIベクターをNotIで線状化し、エレクトロポレーションによってRS-K0マウスES細胞に導入した。エレクトロポレーションに供されたRS-K0マウスES細胞を20mlのES培地 [DMEM (GIBCO)、18% FBS (GIBCO)、0.1mM 2-メルカプトエタノール (GIBCO)、1000U/ml LIF (白血病阻害因子、CHEMICON International, Inc.)] に懸濁し、予めフィーダー細胞 (invitrogen) が播種されている2つの100mm組織培養プラスチックプレート (Corning) に接種した。1日後に、培地を、0.75g/mlのピューロマイシン (Sigma) を含有する培地と交換した。7日～9日後に、pCk VR KIベクターでエレクトロポレーションされたRS-K0マウスES細胞から形成された24コロニーおよびpPSVR KIベクターでエレクトロポレーションされたRS-K0マウスES細胞から形成された24コロニーを、各々、拾った。各コロニーを12ウェルプレート中で密集まで増殖させ、次いで、培養の2/3を0.2mlの低温保存培地 [FBS+10% DMSO (Sigma)] に懸濁し、-80℃にて凍結保存した。残りの1/3を12ウェルゼラチン被覆プレートに接種し、2日間培養した。次いで、Puregene DNA単離キット (Gentra System) を用いてゲノムDNAを単離した。ピューロマイシン耐性RS-K0マウスES細胞から単離されたゲノムDNAを制限酵素EcoR I (Takara Shuzo) で消化し、次いで、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。分離されたDNA断片を膜 (GeneScreen, NEN (商標) Life Science Products) に移し、次いで、IgJκ-CκゲノムDNA (Xho I-EcoR I、1.3Kb (SEQ ID NO: 67) : WO 00/10383、実施例番号48) の3'領域から調製されたDNA断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った。未標的化ESクローンのバンドパターンは15.6KbのMWの1つのバンドを示した。pCkVR KI標的化RS-K0マウスESクローンは15.6Kbおよび13.1KbのMWの2つのバンドを示し、pPSVR KI標的化RS-K0マウスESクローンは、各々、15.6Kbおよび12.9KbのMWの2つのバンドを示す。(図70および71)。12のpCkVR KI標的化RS-K0マウスESクローン#3の1つをサザン分析の後に選択し(相同組換え率は約37.5%である)、8つのpPSVR KI標的化RS-K0マウスESクローン#14のうちの1つをサザン分析の後に選択した(相同組換え率は約25%であった)。また、1995年にYodoshaによって公表された、Shinichi Aizawa, 「Biomanual Series 8, Gene Targeting」によって記載された方法に従い、選択されたESクローンを核型分析によって試験した。正常な核型を示したpCkVR KI標的化RS-K0マウスESクローンの1つのクローン#3およびpPSVR KI標的化RS-K0マウスESクローンの1つのクローン#14は、各々、胚への移植で用いた。

【0576】

pCkVR KI標的化RS-K0マウスES細胞クローン#3およびpPSVR KI標的化RS-K0マウスES細胞クローン#14の凍結ストック中の細胞を解凍し、培養を開始し、免疫グロブリン重鎖ノックアウトマウス株 (Tomizuka et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 722-727, 2000) の雄および雌マウスを交配させることによって得られた8細胞段階の胚に注入した; 注入率は胚当たり10～12細胞であった。胚をES細胞用の培地中で一晚培養して、未分化胚芽細胞まで発生させた後、約10個のES細胞注入胚を、2.5日間の偽妊娠処理に供された借腹母ICRマウス (CREA JAPAN, INC.) の子宮の各側に移植した。220個の注入された胚の各々の移植の結果、各々、68匹および60匹の子孫マウスが生まれた。子孫におけるキメラ現象は、宿主胚 (ICR) 由来アルビノ毛色におけるTT2F細胞由来アグーチ毛色 (暗い茶色) の程度に

10

20

30

40

50

よって測定された。68匹の子孫のうち、47匹のマウス（pCkVRノックインマウス）は部分的アグーチ毛色を有すると認められ、これはRS-K0マウスES細胞の寄与を示し、60匹の子孫のうち、38匹のマウス（pPSVRノックイン）マウスは部分的アグーチ毛色を有すると認められ、これは、RS-K0マウスES細胞の寄与を示す。GIPF変種マウスは、pCk VR KI標的化RS-K0マウスES細胞およびpPSVR KI標的化RS-K0マウスES細胞の他のクローンから前記と同様にして得た。

【0577】

マウスを12/12時間暗/明サイクル下に維持し（8:00 amに明かりを付ける）、5μmの濾過水およびCE-2食料（CLEA JAPAN, INC.）を自由に与えた。離乳期後に、雄マウスを個々に収容した。

【0578】

実施例35

トランスジェニックGIPF欠失突然変異体-KIマウスを用いるGIPF欠失突然変異体の生物学的活性の評価

前記のトランスジェニックマウスからの小腸および結腸の肉眼による病理学的変化および組織学的変化を以下のようにして評価した。GIPF欠失突然変異体-KI（Ckm4-KIおよびPSm4-KI）マウスを4週齢で得た。GIPF欠失突然変異体-KI胃腸管の肉眼的外観は、対照と比較してほとんど差を示さなかった（図72）。組織病理学的評価のために、胃腸管を摘出し、ホルマリン中で固定した。パラフィン包埋切片を、組織学的評価のためにヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色した。小腸のH&E切片を図73（低倍率）および図74（高倍率）に示した。

【0579】

GIPF欠失突然変異体-KIマウス小腸からのH&E切片は、対照と比較した陰窩の長さおよび数のわずかな増大を明らかとした。PSm4-KIにおける陰窩の長さおよび数の増加はCkm4-KIよりも大きい傾向があった。

【0580】

GIPF欠失突然変異体-KIマウスに由来する小腸および結腸試料を用い、GIPF欠失突然変異体#4遺伝子の発現およびβ-カテニン標的化Axin-2遺伝子発現の誘導を分析した。50mgの回腸、結腸および肝臓試料を摘出し、液体窒素を用いることによって迅速に凍結させた。凍結した切片を1mlのISOGEN（NIPPON GENE）でホモジナイズし、全RNAを推奨される条件下で抽出した。ゲノムDNAを除去するために、RNA溶液をDNase（WAKO；デオキシリボヌクレアーゼRTグレード）で37℃にて15分間処理した。次いで、全RNAを推奨される条件下でRNasy Mini（QIAGEN）で精製した。各試料につき、推奨される条件下で、Super Script III（Invitrogen）を用い、500ngの全RNAからcDNAを合成した。次いで、cDNAを1ユニットのRNaseH（Invitrogen）で37℃にて20分間処理して、残りのRNAを消化した。PCRは、合成されたcDNAを鋳型として用いて行った。以下の2つのプライマーをGIPF欠失突然変異体の検出で用いた。

PSm4RT F1:

ATCAAGGGGAAAAGGCAGAG (SEQ ID NO: 174), およびCkポリA R2:

CGCTTGTGGGGAAGCCTCCAAGACC (SEQ ID NO: 175)

Axin-2の検出では、以下の2つのプライマーを用いた。

Axin2 F (MUS): CAGGAGCCTCACCTTCG (SEQ ID NO: 138),

およびAxin2 R (MUS): ACGCCGAGGTGCTTGCCC (SEQ ID NO: 139)

マウスGAPDHプライマー
mGAPDH5:

CACCATGGAGAAGGCCGGGGCCAC (SEQ ID NO: 140), およびmGAPDH3:

ATCATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG (SEQ ID NO: 141)

10

20

30

40

50

を、ハウスキーピング遺伝子発現の検出のために用いた。PCRの反応混合物は、滅菌蒸留水を2.5ulの10×LA PCR緩衝液II (Takara Shuzo) 4ulの2.5mMの各dNTP混合物 (Takara Shuzo)、0.5ulの10mMの各プライマー、2ulの滅菌蒸留水で希釈された10×cDNAおよび0.5ulのLA Taq (Takara Shuzo)を加えて25ulとすることによって調製した。GIPF欠失突然変異体およびAxin-2の検出のために、PCRの反応混合物を94℃にて2分間インキュベートし、33サイクルの反応を、30秒間の94℃、30秒間の60℃、および30秒間の72℃にて行った。GAPDHの検出のために、PCRの反応混合物を94℃にて2分間インキュベートし、22サイクルの反応を、30秒間の94℃、30秒間の65℃、および30秒間の72℃で行った。

【0581】

GIPF欠失突然変異体遺伝子発現をPSM4-KIマウスからの回腸および結腸で検出した。Axin-2の発現レベルは、対照と比較してPSM4-KIマウスにおいて増大した (図75)。このデータは、GIPFの欠失突然変異体形態が、β-カテニン標的化遺伝子発現を誘導する活性を有し、β-カテニンシグナル伝達経路の下流の活性化を担うことを示唆した。

【0582】

したがって、GIPF欠失突然変異体 #4はβ-カテニンシグナル伝達経路を刺激する活性を有することが示唆された。

【0583】

実施例36

トランスジェニックGIPF変種-KIマウスを用いるGIPF変種の生物学的活性の評価

前記のトランスジェニックマウスからの小腸および結腸の肉眼による病理学的変化および組織学的変化を以下のように評価した。GIPF変種-KI (CkVR-KIおよびPSVR-KI) マウスを4週齢で得た。得られたPSVR-KIの肉眼による外観は、対照マウスと比較した場合に、顕著な腸拡張および増大した小腸質量を示したことを示した (図76)。組織病理学的評価のために、胃腸管を摘出し、ホルマリン中で固定した。パラフィン包埋切片を、組織学的評価のためにヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で染色した。小腸のH&E切片を図77 (低倍率) および図78 (高倍率) に示した。

【0584】

小腸からのH&E切片は、PSVR-KIおよび対照の間の顕著な差を明らかとした。図76に示すように、PSVR-KIの陰窩細胞過形成は、対照マウスと比較して、陰窩の長さおよびパネート細胞の数の増大を示した。他方、CkVR-KIは明白な腸拡張または陰窩長さの増大を示さなかった (データは示さず)。KI-ベクター構造が異なるため、CkVR-KIおよびPSVR-KIの間における観察された表現型の差を評価した。

【0585】

GIPF変種遺伝子の発現およびβ-カテニン標的化Axin-2遺伝子発現の誘導は、GIPF変種-KIマウスに由来する小腸および結腸の試料を用いて分析した。50mgの回腸、結腸および肝臓の試料を摘出し、液体窒素を用いることによって迅速に凍結させた。凍結した切片を1mlのISOGEN (NIPPON GENE) でホモジナイズし、全RNAを推奨される条件下で抽出した。ゲノムDNAを除去するために、RNA溶液をDNase (WAKO; デオキシリボヌクレアーゼRTグレード) で37℃にて15分間処理した。次いで、全RNAを推奨される条件下でRNasy Mini (QIAGEN) で精製した。各試料については、推奨される条件下で、Super Script III (Invitrogen) を用い、500ngの全RNAからcDNAを合成した。次いで、cDNAを1ユニットのRNaseH (Invitrogen) で37℃にて20分間処理して、残りのRNAを消化した。PCRは、合成されたcDNAを鋳型として用いて行った。以下の2つのプライマーをGIPF変種の検出で用いた。

PSFLJRT F1:

ATAACTTCTGCACCAAGTGTAAGGA (SEQ ID NO: 176), および CkポリA R2:

CGCTTGTGGGGAAGCCTCCAAGACC (SEQ ID NO: 175)

Axin-2の検出のために、以下の2つのプライマーを用いた。

Axin2 F (MUS): CAGGAGCCTCACCCCTTCG (SEQ ID NO: 138),

および Axin2 R (MUS): ACGCCGAGGTGCTTGCCC (SEQ ID NO:139)

マウス GAPDH プライマー
mGAPDH5:

CACCATGGAGAAGGCCGGGGCCCCAC (SEQ ID NO: 140), および mGAPDH3:

ATCATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG (SEQ ID NO: 141)

を、ハウスキーピング遺伝子発現の検出のために用いた。PCRの反応混合物は、滅菌蒸留水を2.5ulの10×LA PCR緩衝液II (Takara Shuzo)、4ulの2.5mMの各dNTP混合物 (Takara Shuzo)、0.5ulの10mMの各プライマー、2ulの滅菌蒸留水で希釈した10×cDNAおよび0.5ulのLA Taq (Takara Shuzo) に加えて25ulとすることによって調製した。GIPF変種およびAxin-2の検出のために、PCRの反応混合物を94℃にて2分間インキュベートし、33サイクルの反応を、30秒間の94℃、30秒間の60℃、および30秒間の72℃で行った。GAPDHの検出では、PCRの反応混合物を94℃で2分間 インキュベートし、23サイクルの反応を、30秒間の94℃、30秒間の65℃、および30秒間の72℃にて行った。

【0586】

GIPF変種遺伝子発現をPSVR-KIマウスからの回腸および結腸において検出した。Axin-2の発現レベルは、対照と比べて、PSVR-KIマウスにおいて増大した (図79)。このデータは、GIPF変種がβ-カテニン標的化遺伝子発現を誘導する能力を有し、β-カテニンシグナル伝達経路の下流の活性化を担うことを示唆した。

【0587】

したがって、GIPF変種がβ-カテニンシグナル伝達経路を刺激する活性を有することが示された。

【0588】

実施例37

CD4+CD45RB^{high}T細胞導入モデル

CD4+CD45RB^{high}Tリンパ球サブセットを免疫不全SCIDマウスに導入することによる炎症性腸疾患と同様な慢性腸炎症の誘発はAranda et al., (J Immunol 158: 3464-3473) によって報告された。従って、免疫学的に誘発された結腸炎に対するGIPFの治療効果をCD4+CD45RB^{high}T細胞導入モデルで以下のように試験した。

【0589】

7週齢の成体雌C.B-17/Icr Crj-scid/scidマウス (CHARLES RIVER JAPAN, INC.) を用いた。供給業者からの送達に際し、かつ実験に先立って、動物を個々に換気されるケージ中に12時間の明：暗サイクルにて2週間収容して、日周期のリズムを安定化させた。動物には食料および水を自由に与えた。

【0590】

細胞の導入の日 (0日目) において、CD4+CD45RB^{high}T細胞を20匹のBALB/c雌マウスの脾臓から収集した。脾臓細胞を2% FBS、2mM EDTA、PBSソーティング緩衝液に懸濁し、CD4陽性細胞をFACS (Becton Dickinson FACS Aria) によってソーティングした。次いで、ソーティングしたCD4陽性細胞をソーティング緩衝液中に 2×10^7 細胞/mlまで再懸濁し、CD4陽性およびCD45RB^{high}細胞画分をゲートした。収集したCD4+CD45RB^{high}T細胞を遠心し、6mlのPBS中に 1.1×10^6 細胞/mlまで懸濁した。 4.5×10^5 細胞/マウスのCD4+CD45RB^{high}T細胞を、腹腔内注射によって、13匹の雌C.B-17/Icr Crj-scid/scidマウスに導入した。

【0591】

T細胞の導入の後、血清アミロイドA (SAA) 濃度を炎症進行につきモニターした。また、結腸炎の進行は、体重、糞便粘稠度および肉眼で見えない血液試験の低下によってモニターした。SAA濃度は導入から7日後に増大し、炎症はT細胞導入マウスにおいて明らかとなった。T細胞導入から12日後に、緩い糞および目に見えない血液陽性個体が出現した。T細胞導入から30日後に、下痢および肉眼による出血がT細胞導入マウスで観察された。さ

らに40日後、体重減少がT細胞導入マウスで観察された。T細胞導入から61日後に、100ug/用量のGIPFをT細胞導入マウスの4匹に3日間静脈内注射した。また、陰性対照として、PBSをT細胞導入マウスの3匹に3日間静脈内注射した。T細胞導入から70日後に、これらの動物を屠殺した。腸を摘出し、ホルマリン中に固定した。パラフィン包埋切片を、組織学的評価のために、ヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）で染色した。

【0592】

図80に示すように、100ug/用量のGIPFを注射した大腸からの切片のH&E染色は、PBS注射マウスと比較して、明瞭な腺構造、有糸分裂細胞の数の増加、およびより少ない壊死細胞片を示した。T細胞導入によって引き起こされた大腸粘膜における組織病理学的変化は、現実には、GIPF注射によって低下した。従って、GIPFは、クローン病を含めた炎症性腸疾患によって引き起こされた粘膜炎を患う患者を治療することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0593】

【図1】DNA配列（SEQ ID NO：2）（A）および全長GIPFについての対応するアミノ酸配列（SEQ ID NO：4）（B）を示す。SEQ ID NO：2は、オープンリーディングフレームと組み合わせた5'および3'非翻訳領域を含む。

【図2】ヒト（A）およびマウス（B）からの組織におけるGIPF mRNAの発現を示す。

【図3】本発明の組成物のGIPFポリペプチドの模式的表示である。下線を施した数字はポリペプチドのSEQ ID NOに対応し、残りの数字はコードされたポリヌクレオチド配列のSEQ ID NOである。

20

【図4】図4Aは、SEQ ID NO：2または3によってコードされたGIPFタンパク質（すなわち、SEQ ID NO：4）およびヒト幹細胞成長因子A1 SEQ ID NO：23（PCT WO 01/77169 A2からのSEQ ID NO：10）の間のBLASTPアミノ酸配列の整列を示し、これは、2つの配列がSEQ ID NO：4のアミノ酸残基10～251、およびSEQ ID NO：23のアミノ酸残基11～257にわたって63%の類似性、およびSEQ ID NO：4のアミノ酸残基10～251およびアミノ酸配列：23のアミノ酸残基11～257にわたって46%同一性を有することを示す。図4Bは、SEQ ID NO：2または3によってコードされるGIPFタンパク質（すなわち、SEQ ID NO：4）、GIPFポリペプチド、およびヒトトロポプラスチン1の特異的領域（SwissProtアクセッション番号P07996のアミノ酸残基501～657；SEQ ID NO：28）の間のBLASTPアミノ酸配列整列を示す。該図面は、2つの配列がSEQ ID NO：4のアミノ酸残基14～166およびSEQ ID NO：28のアミノ酸残基501～657にわたって36%の類似性および26%の同一性を有することを示し、ここで、A=アラニン、C=システイン、D=アスパラギン酸、E=グルタミン酸、F=フェニルアラニン、G=グリシン、H=ヒスチジン、I=イソロイシン、K=リシン、L=ロイシン、M=メチオニン、N=アスパラギン、P=プロリン、Q=グルタミン、R=アルギニン、S=セリン、T=スレオニン、V=バリン、W=トリプトファン、Y=チロシンである。ギャップはダッシュとして表す。

30

【図5】図5A～5Rは、本発明のGIPF-ノックイン（GIPF-KI）ベクターを作製するのに用いる方法の段階を示す。それらのB細胞においてGIPFを発現するトランスジェニックマウスを作製するための好ましい方法も記載する。

【図6】相同組換えから得られるESクローン、ならびに相同または非相同組換えを受けたマウスゲノムDNAのEcoRI消化断片を選択するためにサザンブロット分析で利用されるプローブの位置を示す。

40

【図7】GIPF-KIマウス：対照（A）GIPF-KI（B）の腸管の肉眼的病理を示す。

【図8】各々、GIPF-KI（A）および対照キメラ（B）マウスの小腸の横方向断面のH&E染色である。

【図9】より高い倍率下で見た図8の腸断面のH&E染色を示す。パネルAおよびCは図8のパネルAで見られたGIPF-KI断面に対応し、パネルBおよびDは図8のパネルBで見られた対照キメラマウスに由来する腸断面に対応する。

【図10】対照キメラマウス（AおよびC）からの、およびGIPF-KIマウス（BおよびD）からの小腸の断面のKi67染色を示す。

50

【図 1 1】 対照マウス (A および C)、および 1×10^{10} ウイルス粒子で処理されたマウス (B および D) に由来する小腸の断面。該断面は、各々、空または GIPF アデノウイルスの注射後 3 日目に得られた。

【図 1 2】 対照 (A および C)、および 1×10^{10} ウイルス粒子 (VP) で処理したマウス (図 1 2B および D) に由来する小腸の断面図。該断面は、各々、空または GIPF アデノウイルスの注射後 5 日目に得られた。

【図 1 3】 対照マウス (A および C)、および 1×10^{10} ウイルス粒子 (VP) で処理したマウス (B および D) の小腸における増殖する陰窩細胞への BrdU の取り込み。

【図 1 4】 対照 (A および C) および GIPF-アデノウイルス処理マウス (B および D) の小腸における増殖する陰窩細胞の Ki67 染色。

【図 1 5】 対照マウス (A および C)、および 1×10^9 ウイルス粒子において GIPF-アデノウイルスで処理されているマウス (B および D) の小腸に由来する断面の H&E 染色。

【図 1 6】 対照 (A および C) および GIPF-アデノウイルス処理マウス (B および D) の結腸に由来する断面の H&E 染色。

【図 1 7】 (A および B) CHO 細胞から精製された未処理の V5-His-標識した GIPF タンパク質の溶解性の要件。

【図 1 8】 (A および B) マウス血清中の V5-His-標識した GIPF タンパク質の薬物動態。

【図 1 9】 対照マウス (A および C)、および精製された GIPF タンパク質で処理されたマウス (B および D) の小腸に由来する断面の H&E 染色。

【図 2 0】 対照マウス (A および C)、および精製された GIPF タンパク質で処理されたマウス (B および D) の小腸における増殖する陰窩細胞への BrdU の取り込み。

【図 2 1】 対照マウス (A)、および精製された GIPF タンパク質で処理されたマウス (B) の結腸に由来する断面の H&E 染色。

【図 2 2】 対照マウス (A および C)、および精製された GIPF タンパク質 (B および D) で処理されたマウスの結腸における増殖する陰窩細胞への BrdU の取り込み。

【図 2 3】 非照射マウス (A)、生理食塩水 (B)、KGF (C) または GIPFwt (D) で処理された照射マウスの小腸に由来する断面の H&E 染色。

【図 2 4】 対照マウスおよび GIPFwt を受けるマウスにおける腫瘍のサイズに対する 5-FU の効果。

【図 2 5】 対照 (E および F) および担癌マウス (A-D) の小腸および結腸の肉眼的病理に対する GIPF の効果。

【図 2 6】 5-FU および /または GIPF を受けた正常および担癌マウスの小腸および結腸に由来する断面の H&E 染色。

【図 2 7】 絨毛の高さおよび陰窩の深さのミクロ形態測定は、5-FU を受けたマウスの腸上皮に対する GIPF の効果を示す。

【図 2 8】 対照マウス (A および B)、および KGF または GIPF (C-E) で処理され、全身照射に供されたマウスの腹側舌における増殖する上皮細胞の Ki67 染色。

【図 2 9】 対照マウス (A および B)、および KGF または GIPF (C および D) で処理され、かつ全身照射に供されたマウスの背側舌における増殖する上皮細胞の Ki67 染色。

【図 3 0】 KGF または GIPF で処理され、かつ全身照射に供されたマウスからの腹側舌上皮の増殖指標。

【図 3 1】 GIPF で処理され、かつ全身照射に供されたマウスの舌に由来する断面の H&E 染色。

【図 3 2】 DSS 誘発結腸炎を有するマウスの炎症性腸疾患活性指標 (IBDAI) に対する GIPF の効果。

【図 3 3】 DSS 誘発結腸炎を有するマウスにおける動物体重についてのスコアに対する GIPF の効果。

【図 3 4】 DSS 誘発結腸炎を有するマウスにおける糞便粘稠度についてのスコアに対する GIPF の効果。

【図 3 5】 DSS 誘発結腸炎を有するマウスにおける直腸出血についてのスコアに対する GIPF

10

20

30

40

50

Fの効果。

【図36】対照およびDSS処理マウスの小腸および結腸の肉眼的病理に対するGIPFの効果。

【図37】DSS-および/またはGIPFを受けたマウスの小腸および結腸に由来する断面H&E染色。

【図38】絨毛の高さおよび陰窩の深さのミクロ形態測定は、DSS誘発結腸炎を有するマウスの腸上皮に対するGIPFの効果を示す。

【図39】DSSおよび/またはGIPFを受けたマウスの小腸および結腸における増殖する陰窩細胞へのBrdUの取り込み。

【図40】DSS誘発結腸炎を有するマウスの小腸上皮の増殖に対するGIPFの効果。 10

【図41】ヒト内分泌および腎臓上皮細胞における β -カテニンの安定化に対するGIPFの効果。GIPFはHEK293細胞において β -カテニンの用量依存的(A)および時間依存的(B)安定化を誘導した。GIPFの安定化効果は煮沸(C)によって破壊されない。

【図42】GSK3 β のリン酸化に対するGIPFの効果。

【図43】 β -カテニンの安定化におけるGIPFの種々の領域の能力を測定するように設計されたGIPFポリペプチドアナログの模式図。断片番号1~11は、各々、ポリペプチドSEQ ID NO: 85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、および105に対応する。

【図44】図43に示されたGIPFアナログによる β -カテニンの安定化。

【図45】マウス腸の肉眼的病理についてのヒトおよびマウスGIPFの活性の比較。

【図46】腸陰窩の深さに対するGIPFの効果。 20

【図47】単離された陰窩細胞における β -カテニンの安定化に対するGIPFの効果。

【図48】TNBS誘発結腸炎を有する動物の体重に対するGIPFの効果。

【図49】TNBS誘発結腸炎を有する動物における結腸炎スコアに対するGIPFの効果。

【図50】DSSによって誘発された慢性結腸炎に対するGIPFの効果。

【図51】DSS誘発慢性結腸炎を有する動物における絨毛の高さおよび陰窩の深さに対するGIPFの効果。

【図52】DSS誘発慢性結腸炎を有する動物の陰窩増殖指標に対するGIPFの効果。

【図53】照射に続く陰窩の生存に対するGIPFの効果。

【図54】(A~N) トランスジェニックマウスの上皮におけるGIPFのvillin駆動発現についての導入遺伝子構築のダイアグラム。 30

【図55】トランスジェニックマウスの腸上皮および肝臓におけるGIPFの胚発現。

【図56】GIPFを発現するトランスジェニックマウスにおける β -カテニンの安定化。

【図57】GIPFを発現するトランスジェニックマウスの小腸の断面のH&E染色。

【図58】(A~C) トランスジェニックマウスにおけるGIPFおよびWnt3aのvillin駆動発現についての導入遺伝子構築の概略図。

【図59】トランスジェニックマウスの小腸および大腸におけるGIPFおよびWnt3aの胚発現。

【図60】GIPFおよびWnt3aを発現するトランスジェニックマウスにおける β -カテニンの安定化。

【図61】GIPFおよびWnt3aを発現するトランスジェニックマウス胚の小腸の断面のH&E染色。 40

【図62】(A~K) RS-KOベクター構築の概略図。

【図63】野生型および組換えRS-KOクローンのゲノム地図。

【図64】(A~K) トランスジェニックマウスにおけるGIPF欠失突然変異体(SEQ ID NO: 91)の発現についてのノックインベクターpCk m4 KI構築の概略図。

【図65】(A~C) トランスジェニックマウスにおけるGIPF欠失突然変異体(SEQ ID NO: 91)の発現についてのノックインベクターpPS m4 KI構築の概略図。

【図66】野生型および組換えCk m4 KIクローンのゲノム地図。

【図67】野生型および組換えPS m4 KIクローンのゲノム地図。

【図68】(A~C) トランスジェニックマウスにおけるGIPF変種(SEQ ID NO: 177; GenB 50

ankアクセッション番号AK098225)の発現についてのノックインベクターpCk VR KI構築の概略図。

【図69】(A~C)トランスジェニックマウスにおけるGIPF変種(SEQ ID NO:177; GenBankアクセッション番号AK098225)の発現についてのノックインベクターpPS VR KI構築の概略図。

【図70】野生型および組換えCk VR KIクローンのゲノム地図。

【図71】野生型および組換えPS VR KIクローンのゲノム地図。

【図72】GIPF欠失突然変異体SEQ ID NO:91を発現するトランスジェニックマウスおよび対照の小腸および大腸の比較。

【図73】GIPF欠失突然変異体SEQ ID NO:91を発現するトランスジェニックマウスからの小腸の断面のH&E染色(低倍率)。

【図74】GIPF欠失突然変異体SEQ ID NO:91を発現するトランスジェニックマウスからの小腸の断面のH&E染色(高倍率)。

【図75】GIPF欠失突然変異体SEQ ID NO:91を発現するトランスジェニックマウスにおけるAxin-2の安定化。

【図76】対照動物のGIPFに対するGIPF変種(SEQ ID NO:177; GenBankアクセッション番号AK098225)を発現するトランスジェニックマウス(PSVR KI)および対照の小腸および大腸の比較。

【図77】GIPF変種(SEQ ID NO:177; GenBankアクセッション番号AK098225)を発現するトランスジェニックマウス(PSVR KI)および対照からの小腸の断面のH&E染色(低倍率)。

【図78】GIPF変種(SEQ ID NO:177; GenBankアクセッション番号AK098225)を発現するトランスジェニックマウス(PSVR KI)および対照からの小腸の断面のH&E染色(高倍率)。

【図79】GIPF変種(SEQ ID NO:177; GenBankアクセッション番号AK098225)を発現するトランスジェニックマウスおよび対照におけるAxin-2の安定化。

【図80】対照動物、および慢性IBDがT細胞導入によって誘発された動物(実施例37)の大腸からの断面のH&E染色。

10

20

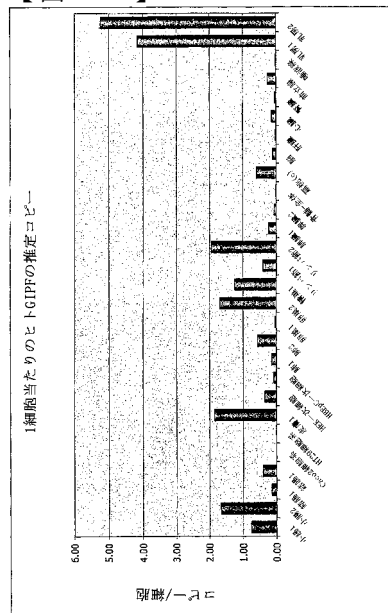
【図 1 A】

CGGGTCACGATTATCTCGTGGCCGCTCGCCCTCCGGGCGTCCGCCCTCGCGACTTGGCGAC
ACGAGTCTGAGATTGTGGTTTCTCGTGGTATTCAGTGGGGAATGGGCGACAGATACCCGCTGG
CAAGGACTGGTGTGTCTCAACTGAAGGCACTGCAAGACAGATCTACAGGAGGTTCTCGACACT
TTGTTTGGAAAGATGCTGCAATTAAAGCAACATCTATTACCTCTGAGTGAATCGTTTGGTGTGCGAG
GCAATCAACCATAAAGATAAATGCAATATGCAATGCAATACAGTGTATGAGTATTAAGTTGGT
TTGAGGAGTCTGCTTTGGAGAGCTCCCTTTGAGCTTGATGGAGAAATGGGCTGCCCAACCACTCTC
TGTCCCGACGTGAGATATGTGGTGATTTGGGCTCAAGGCGAGGCTGGGCTGCTCTGTGCTG
CCAGGCCCCAGAGGTGTTATGCAAGAGCGCTGTGCTATCCCACTCTCCCGAGACACCCCTGCG
ACCAAGGGAGCTCGAGACTGGCGGTGATCTCCGGCTCTGGGCTGTGTGTGGTGGGCTGGTCT
TGAGCTGTGAGCACTCCACATCAGCAGCCGGGGGATCAAGGGGAAAGAGCGACGGGCGATC
ATGTCGCAAGGCGAGCGACGCTTGTCCCAAGGGCTGTGAGCTCTGTCTGTGAGATCAAGCCGTG
TGTGAGGAGTCTGCTGCAAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CAATGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GGGCTGTACCTGTCAGCAAGGCGGCTCTGTATCAGCTTGTGCCGAGGGCTCTCAGCTGTGCGAAT
GGCCACTGTGAGTGTGAGTGTGCTGTGCTGCGCAATGTGAATGAGCGAGTGTGCTCTGCTGGGGGCG
CTGCTCCAGGAAGCAGCGACTCTGTGCTGTTTCCGAGGGGCTCTCGAGGAGCGACACGAGGCG
TGCTCATCTGCCCTCTGGGAGGACATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GGGATATGCCACATGAGGACTGTGGCAGGAGGAGGAGCAGGAGGCGGCTGCTGCTCTCGAA
GAGCGCAGGGGCGACCAACGAGCAGGACGCAAGGAGGCTGTGGGCGCACTCAGATCTCAGAGG
CTGCTGCTGAGGACATCTGCGAGCTCCAGGCTCCAGGCTCATGAGAAGAAGATTGAGTGTACTCTGCTG
GATTCAAGCTTCTGCAAGTGGAACTCGGGGGCGAAGATACACACAGCACTCGAATCCATCGA
TGATGATACATGCAAGACAGACACACAGCTGCAAACTGCTGCCATATACACATCATGATCTGT
CCATGCTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
TTTTCAGAGCTCCGAGTGGGACATGTGACAGACAAACATCTCCGACCTGTGAGACCAACTGAC
AGGGGAGGCTCTTGGGAGAGTCTGTGGGATGGAGCCAGGCACTGTGGCAGATGGGAGCCAACT
TGTGAGGACTGCTGGTGCTGGGGAAGAACTCTTCCCATCTGTTGACGACTCCGAGCTGT
GTGACTTGTGTTGTGAGGAGATTTGTGACTTCGAGGATCATCAGGTTTAACTGTGACTTGTGA
AACTTCTTAAGGTTTATTTCAAATAAAACAAAATCAACGACAGAGTGTGAGACAGGAC
TGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAG
TGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAGTGTGAGGAG
GGCTGCTGTGAGGCTGTGATCAACAGGCTGTGTATGCTGTATCGCTCATAGAGCATGGCCGGCAG
CAGTGTGTGTCACAGGGGCACTTGTATGAAGTAAATATTCAGGCTCTATTCCAGACTGTGGAGC
CCATGAGTCTAAATTTTAAAGTTCTGTATGATGTGATATTTACCAAAATTTGAGAAGTGTCT

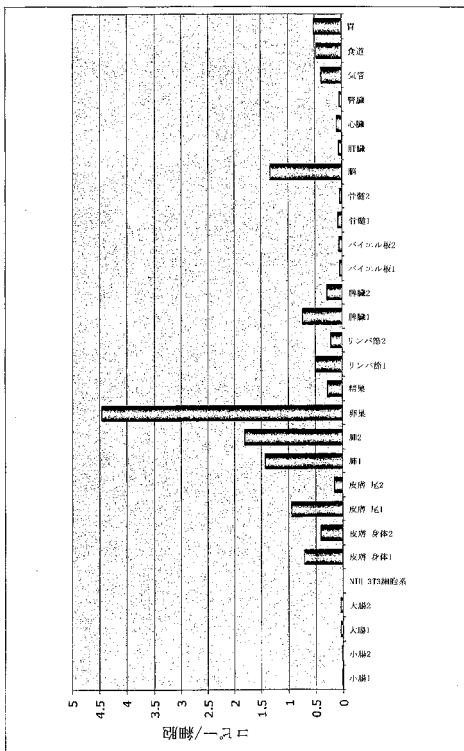
【図 1 B】

MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRIISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLK
CSPKFLIFILLERNDIRQVGCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFSHNF
TKCKEGLYLHKGRCPACPEGSSAAGDTEMCSSPACCEMSWSPWGPCSKKQQ
LCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAAACSTKETRQCTVRRVPCPEGQKRRKGGQ
GRRENANRNLARKESKEAGAGSRRRKGGQQQQQQGGTVGLPLTSAGPA

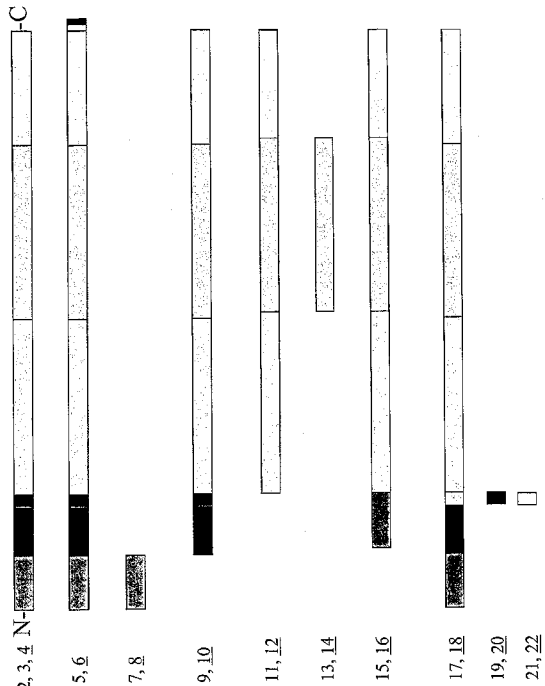
【图 2 A】



【 図 2 B 】



【図 3】



【図 4 A】

```

>gi|18490982|ref|NP_116173.2| thrombospondin; thrombospondin-like
   gene [Homo sapiens]
gb|AAK34947.1|AF251057.1 thrombospondin [Homo sapiens]
gb|AAH22367.1|Thrombospondin [Homo sapiens]
   Length = 272

Score = 252 bits (644), Expect = 4e-66
Identities = 116/252 (46%), Positives = 159/252 (63%), Gaps = 15/252 (5%)

Query: 10  LVLSTHLLTSSRGIKRQRISABGSQACAKGCHLSEVNGCLKCSKPLFILLRNDI 69
      ++l++ S ++C+RQR++ SQ C GC CS+ NGCL C P+LF LER +
Sbjct: 11  LILNFMREYIGSQNASRGRQRMRHNPVSGCGGCGCATCSYNGCLSCKPLFPALERIGM 70

Query: 70  ROVGVCPLSPCPFGYFDARNPDMNKCICKIEHCACFSNPFCTCKEGLYLHKRCYPAC 129
      +Q+GVCL SCP GY+ R PD+NKC KCK + C+ CF+ NFCTCK G YLH G+C C
Sbjct: 71  KQIGVCLSSCPGSGYGTTRYPDINKCTCKAD-CDTCFNKPFCTCKSGFYLIHLKCLDNC 129

Query: 130  PEGSSAANTWTECSSPAQCSEMSWSPWGPCSKKQQLCGFRGSGSETRRVILHVPVGDHAA 189
      PEG A N TMEC S CR+SEW+PW PC+KK + OGF+RG+E R R ++ P
Sbjct: 130  PEGLEANNHTNECVSIVHCEVSWNPWSPCTKKGKTGCFKRGTEIRVRELIQHPSAKGNL 189

Query: 190  CSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGQGRRENANRNLARKESEAGAGSR----- 240
      C T ETR+CTV+R C +G++ +KG + +R+ N+ ESKEA S+
Sbjct: 190  CPPTNETRCKTVQKKKCQKGERGKGRERKKKLPNGK---ESKEAIPDSKSLSSKEIP 245

Query: 241  -RRKGQQQQQQQ 251
      +R+ +QQQ+++
Sbjct: 246  RQRENKQQQKKR 257

```

【図 4 B】

```

>sp|P07996|TSPI_HUMAN Thrombospondin 1 precursor - Homo sapiens
   (human) - From: original residue 501-through-657
   Length = 157

Score = 73 (30.8 bits), Expect = 1.0e-05, P = 1.0e-05
Identities = 38/165 (23%), Positives = 51/165 (36%)

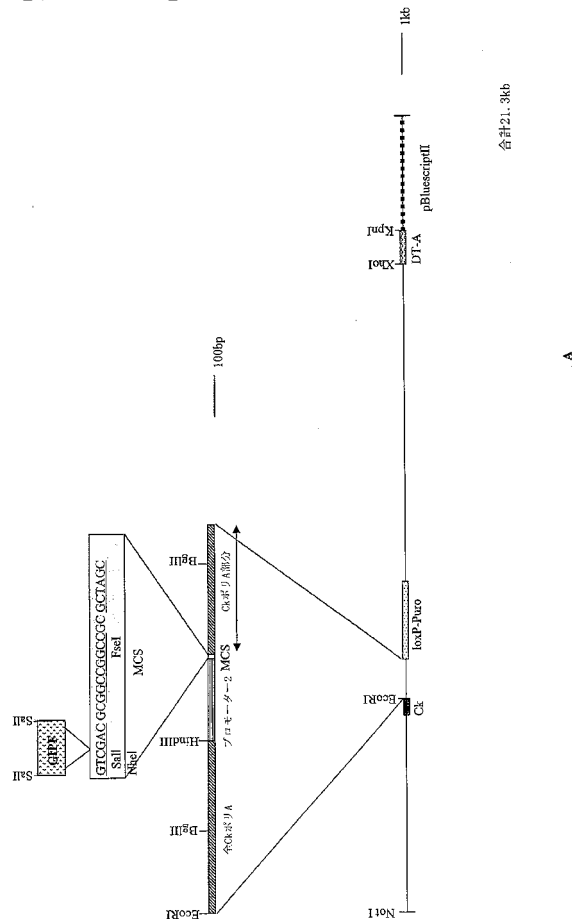
Query: 14  WTLHTISSRGIKRQRISABGSQACAKG-----ELCSE---VNGCLKCSKPLFI 62
      W +++ G KR R + O R C ++C++ ++GCL +P P
Sbjct: 501  WDCSTVTCGGVQKSRRLCNPTPFGSKDCVDVTENQICNKGQDPIDGLS-HP-CFA 58

Query: 63  LLERNHDIRQVGVCLPSCPFGYFDARNPDMNKCICKIEHCACFSNPFCTCKEGLYLHK 122
      ++ +CPFGY ++CK E +ACF+HN +C+
Sbjct: 59  GVKCTSYFDGSKCGACPFY-SONIQCTVDDECK-EVDFACFVNGEHRCEH---TDP 113

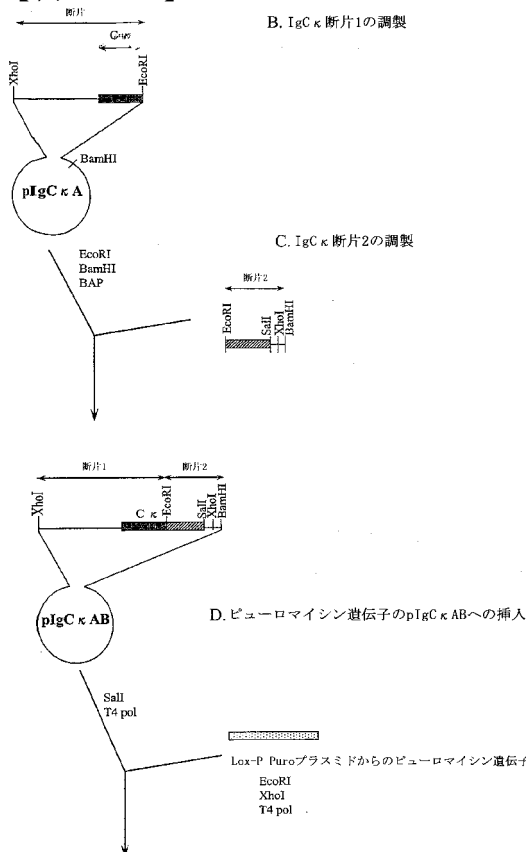
Query: 123  G-RCTPACFEGSSAANTWTECSSPAQCSEMSWSPWGPCSKKQQLC 166
      G C P C P + + + A P PC+ C
Sbjct: 114  GTNCLP-CFPRFTGSGPGGVHATNWKVCKFEPCTGTHDC 657

```

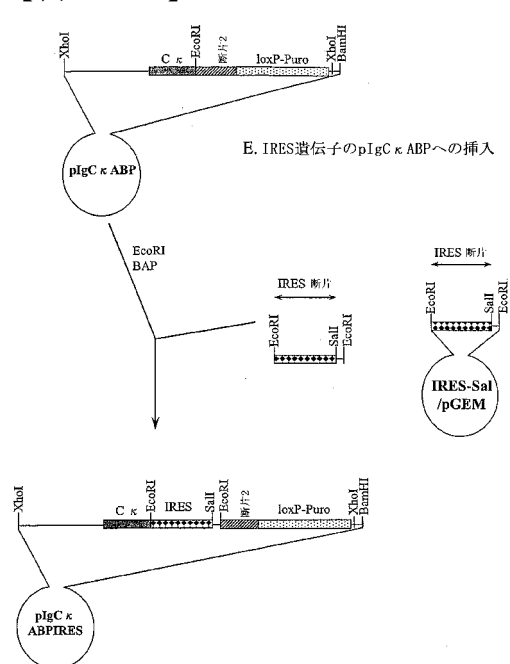
【図 5 - 1】



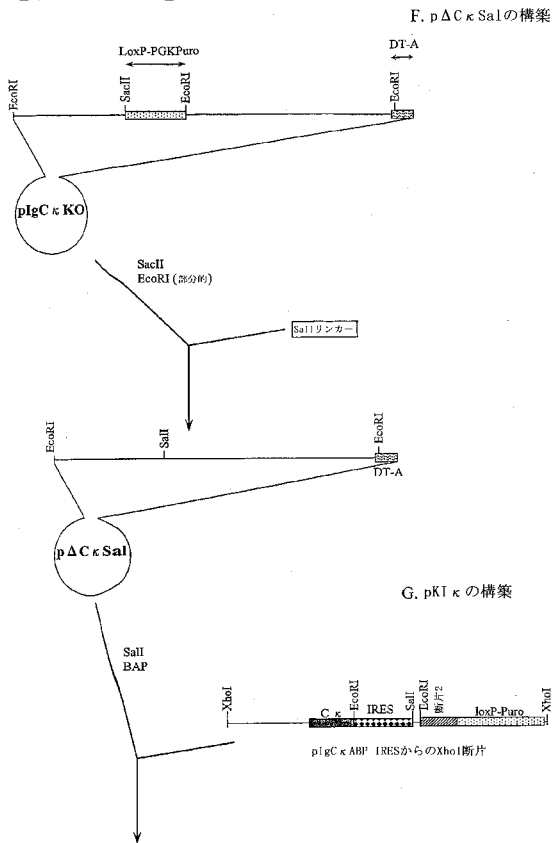
【図 5 - 2】



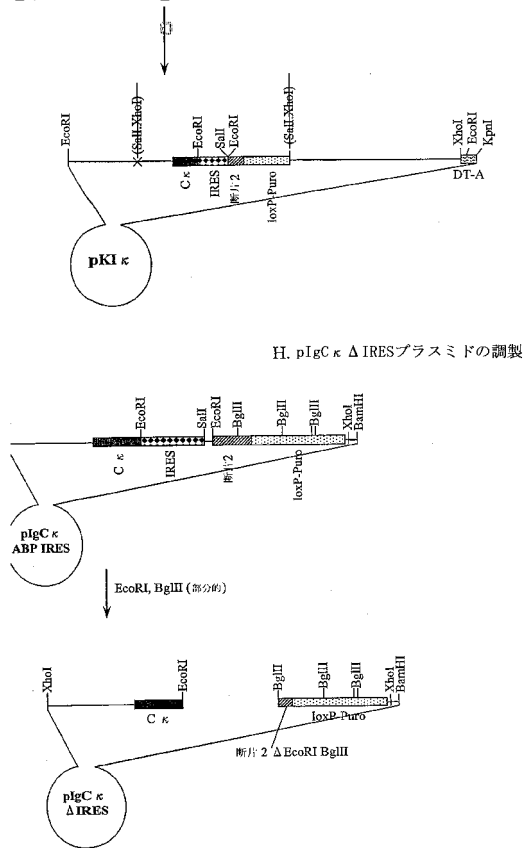
【図 5 - 3】



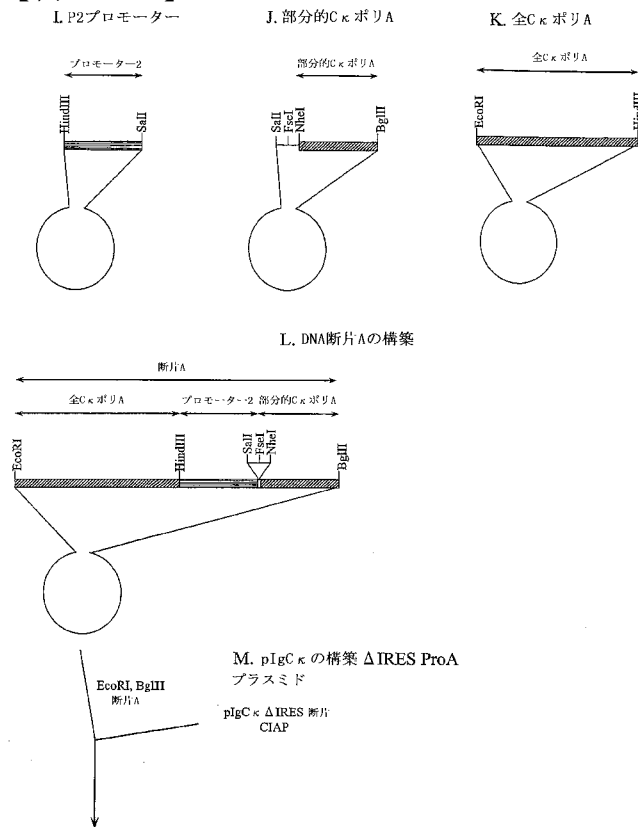
【図 5-4】



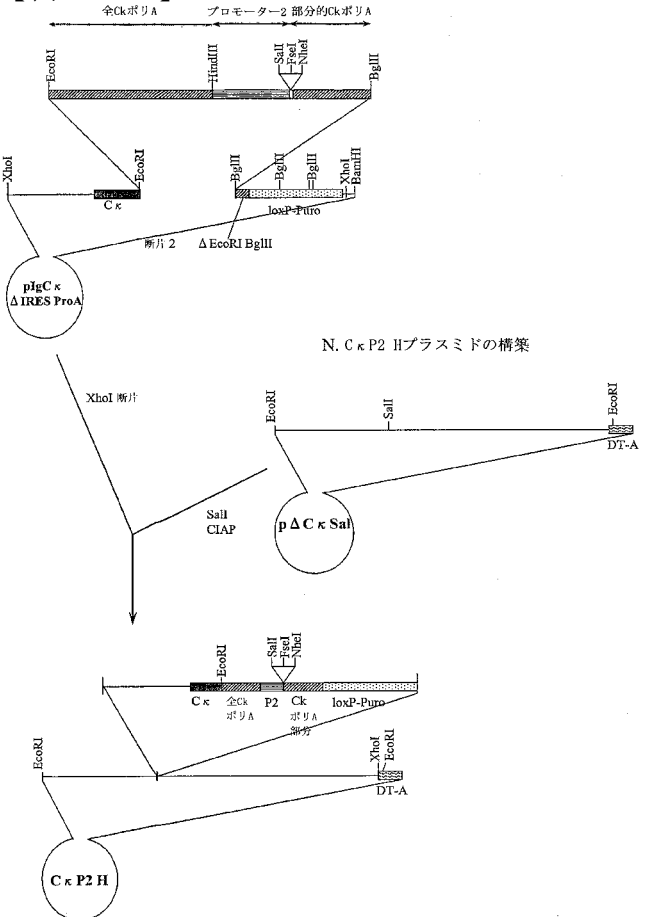
【図 5-5】



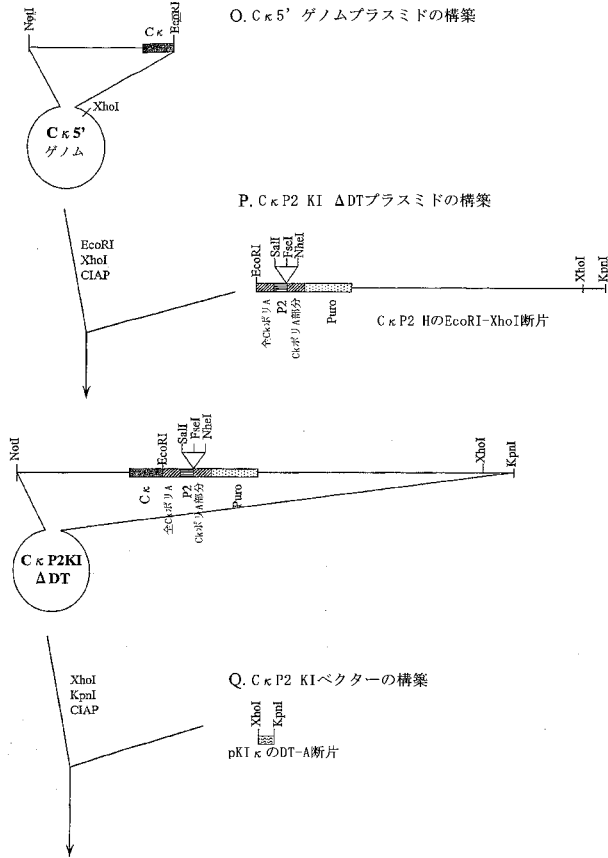
【図 5-6】



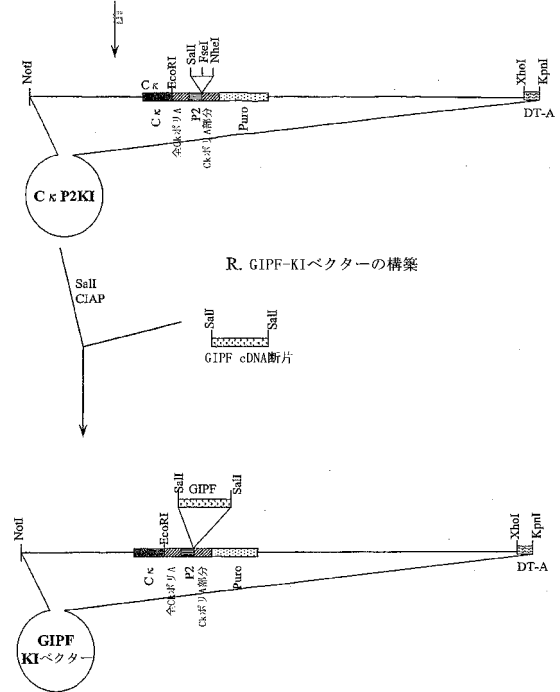
【図 5-7】



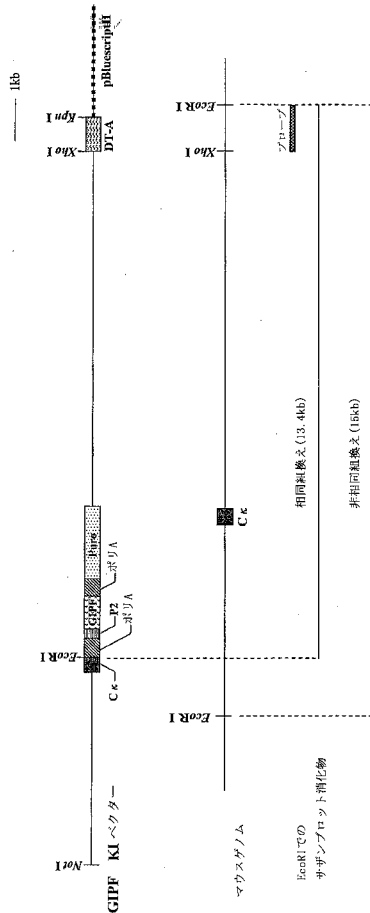
【図 5-8】



【図 5-9】



【図 6】



【図 7】

GIPF-KIマウスの肉眼的病理：腸拡張

GIPF-KIマウス

キメラ対照

B



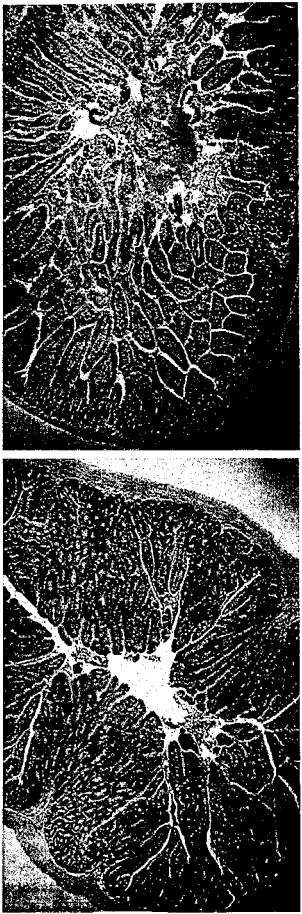
A

【図 8】

KIマウスのH&E染色小腸断面
(5×倍率)

対照

GIPF

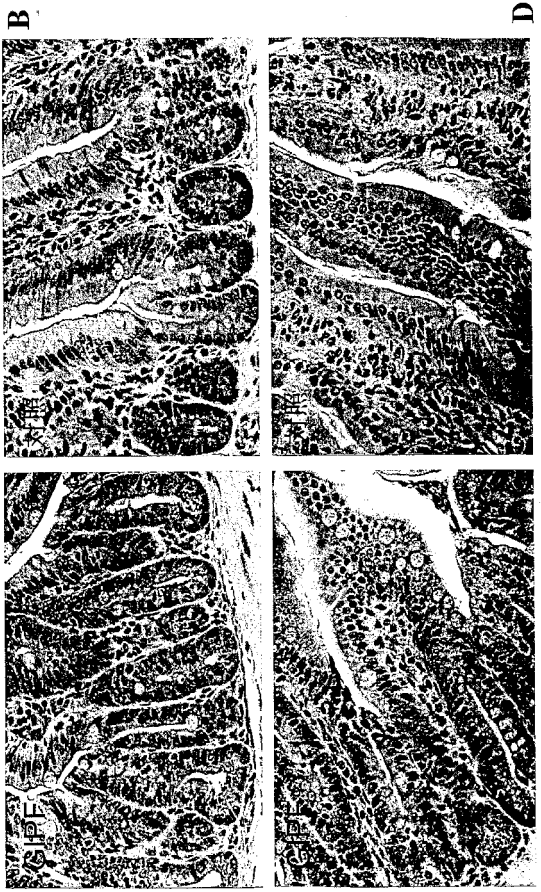


B

A

【図 9】

KIマウスのH&E染色小腸断面
(40×倍率)



A

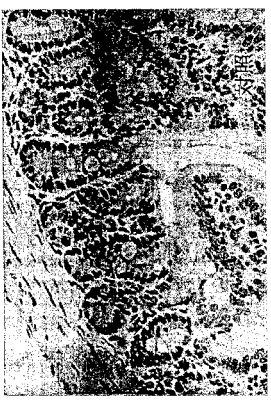
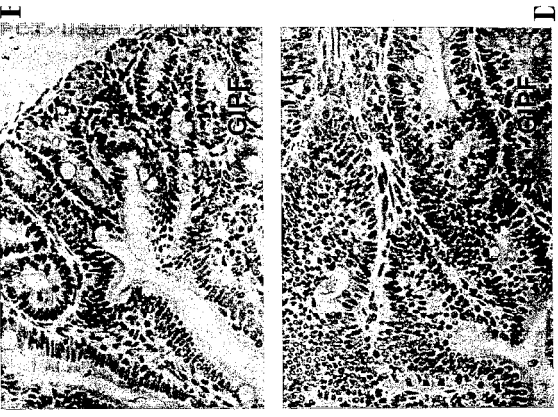
B

C

D

【図 10】

KI67染色 (GIPF KIマウス)

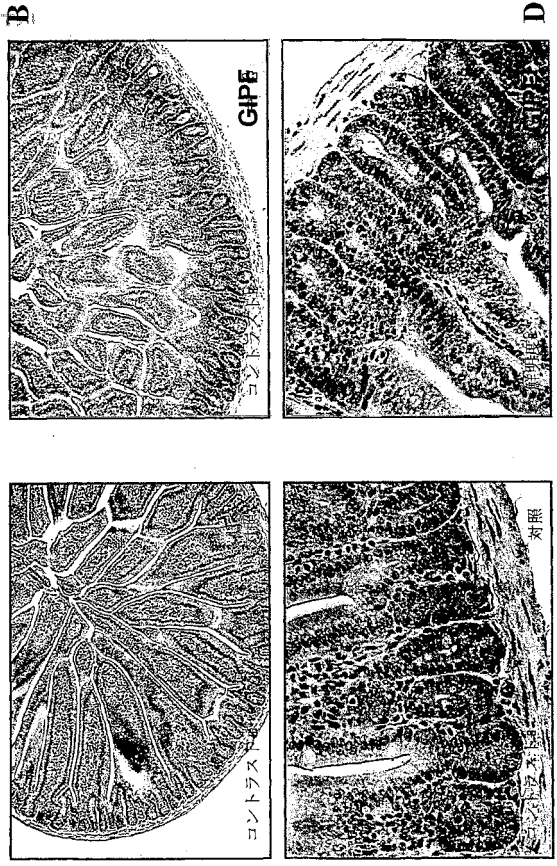


A

C

【図 11】

アデノウイルス注入後の腸上皮細胞増殖
(3日目、 1×10^{10} ウイルス粒子/マウス)



A

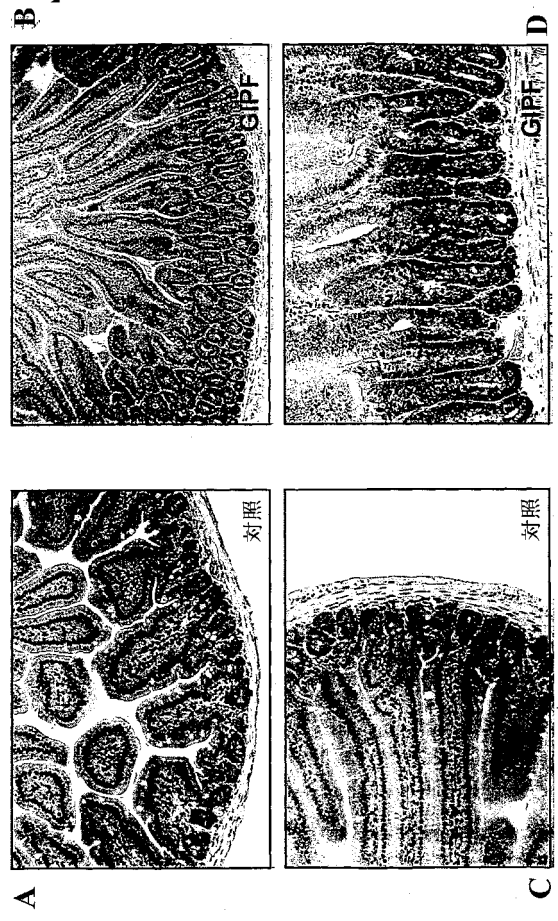
B

C

D

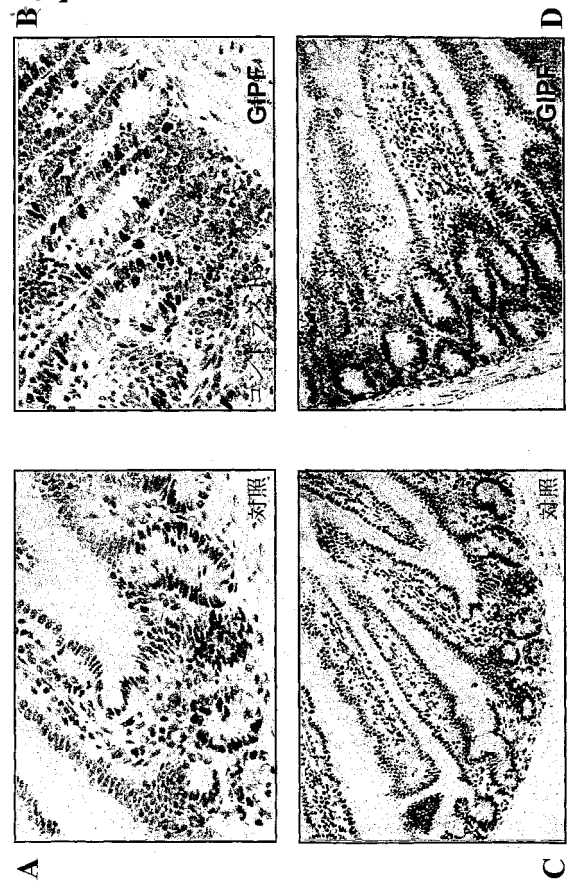
【図 1 2】

アデノウイルス注入後の腸上皮細胞増殖
(5日目、 1×10^{10} ウイルス粒子/マウス)



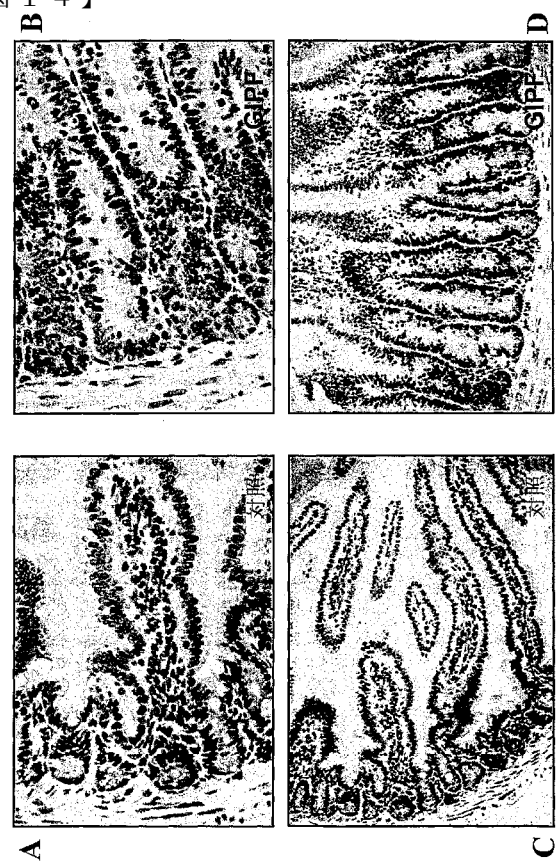
【図 1 3】

インビボ増殖アッセイ：BrdU IHC
(アデノウイルス 3日目、 1×10^{10} VP)



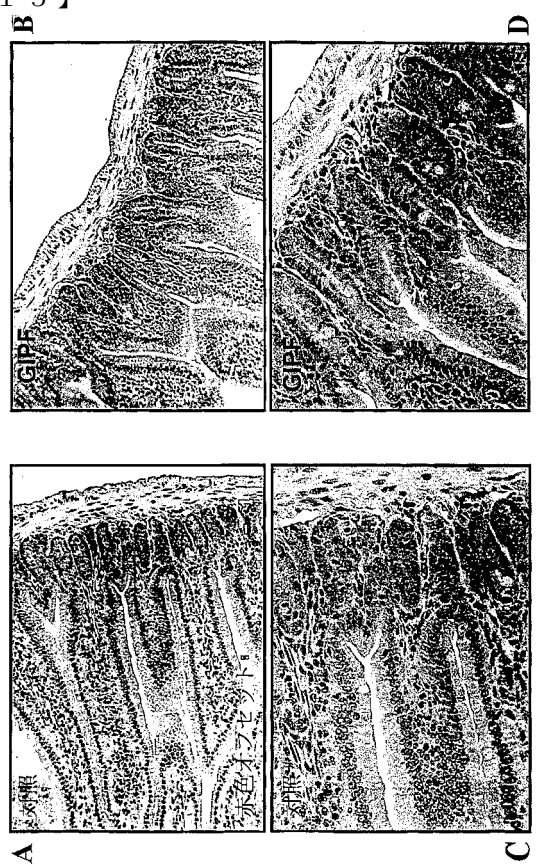
【図 1 4】

Ki67 IHC(アデノウイルス 5日目、 1×10^{10} VP)



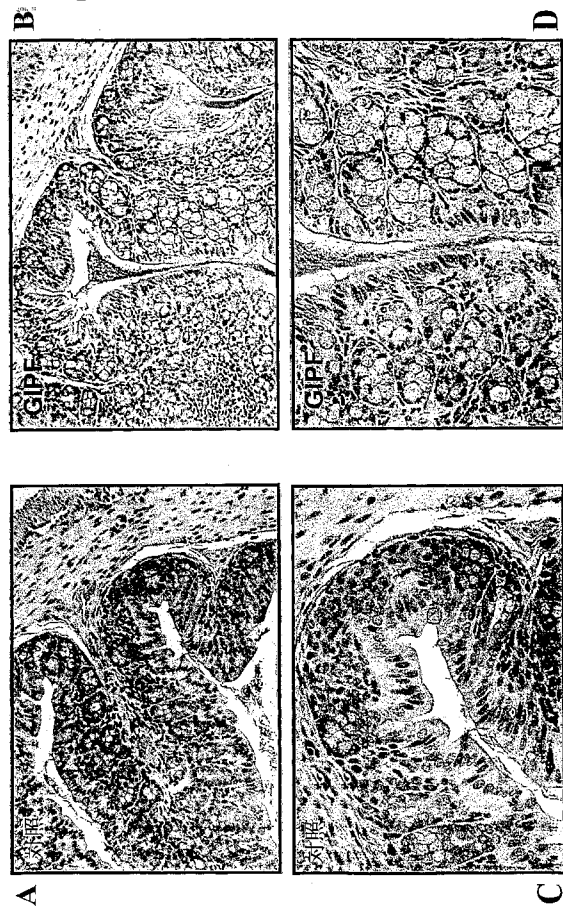
【図 1 5】

アデノウイルス注入後の腸上皮細胞増殖
(5日目、 1×10^9 ウイルス粒子/マウス)

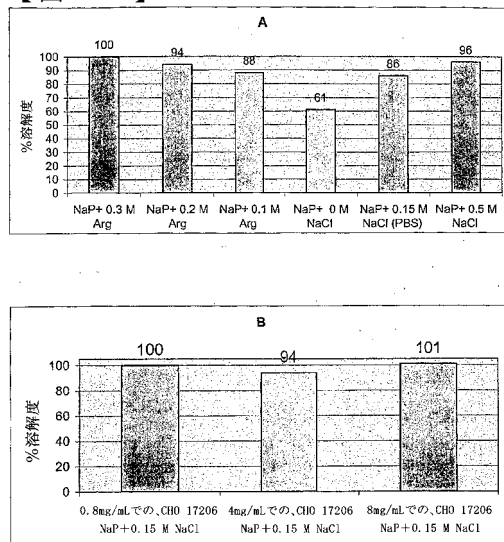


【図16】

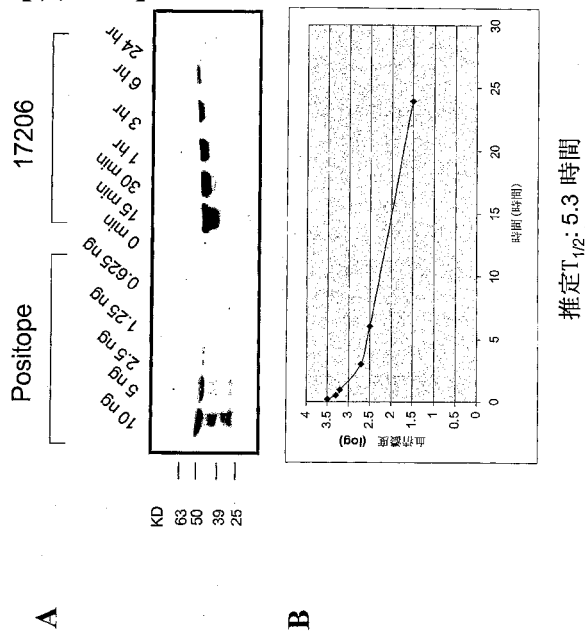
結腸：アデノウイルス 5日目、 1×10^9 VP



【図17】

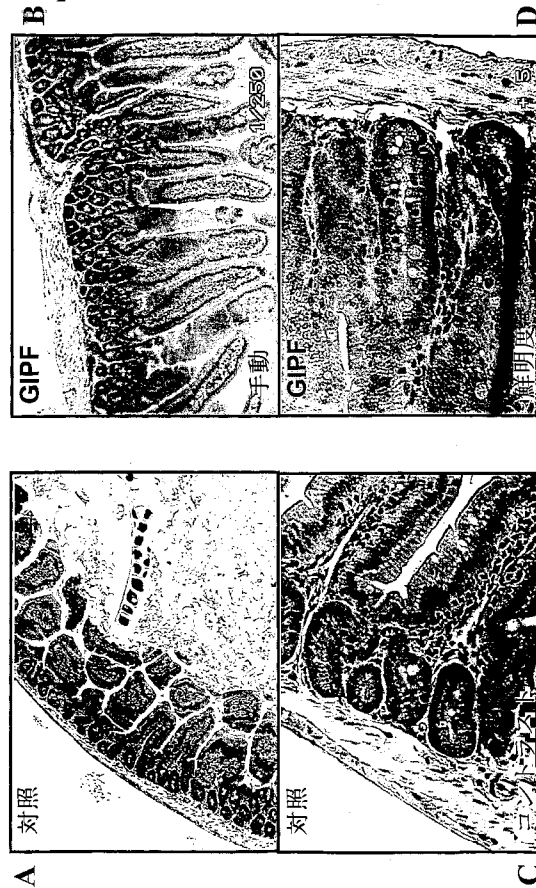


【図18】



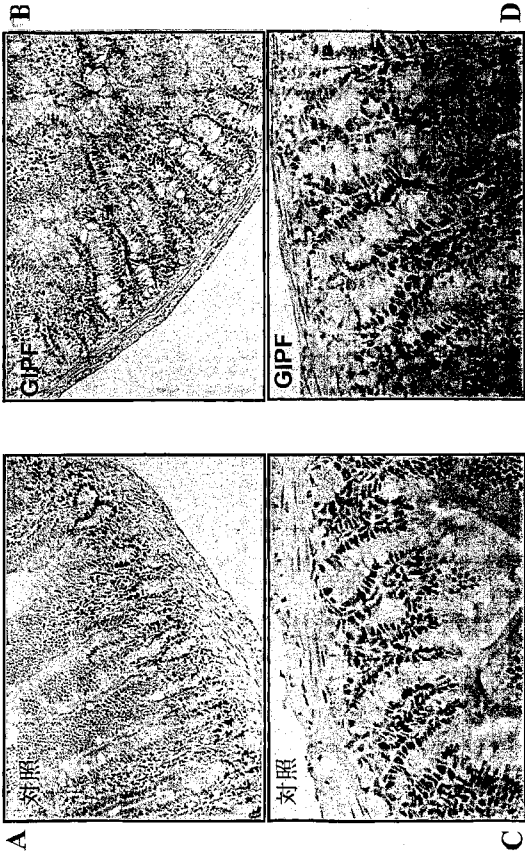
【図19】

タンパク質注入後の腸上皮細胞増殖：小腸



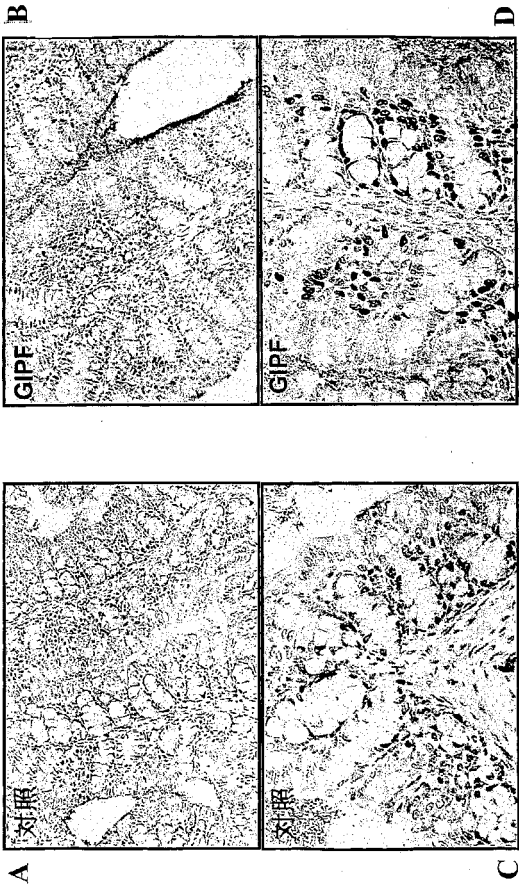
タンパク質注入後のインビボ増殖アッセイ
：小腸におけるBrdU IHC

【図 2 0】



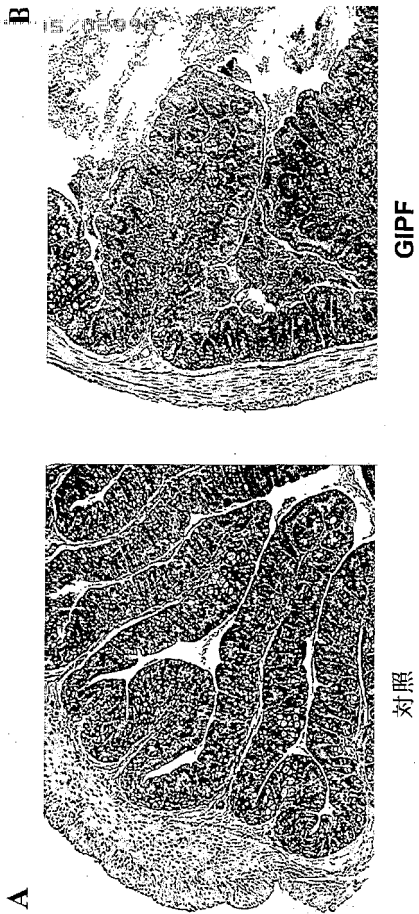
タンパク質注入後のインビボ増殖アッセイ
：結腸におけるBrdU IHC

【図 2 2】

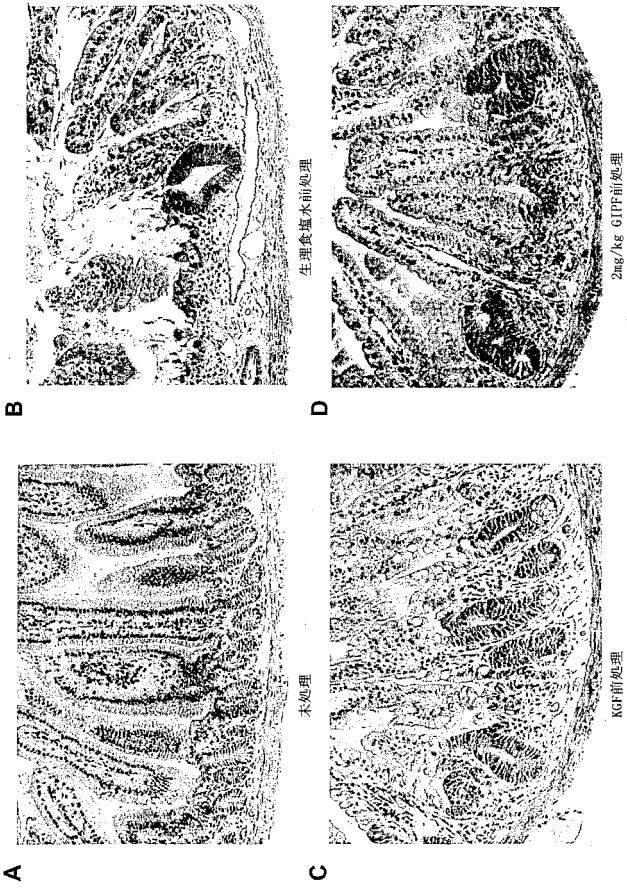


GIPFタンパク質注入後の腸上皮細胞増殖：結腸

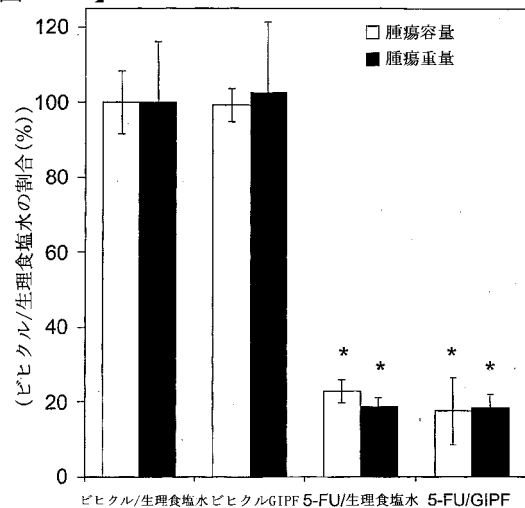
【図 2 1】



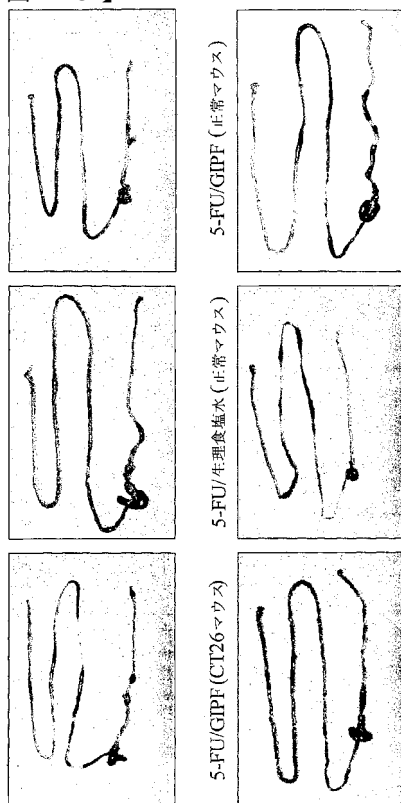
【図 2 3】



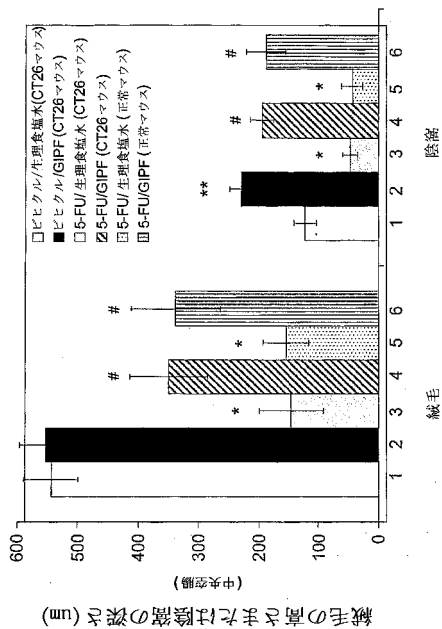
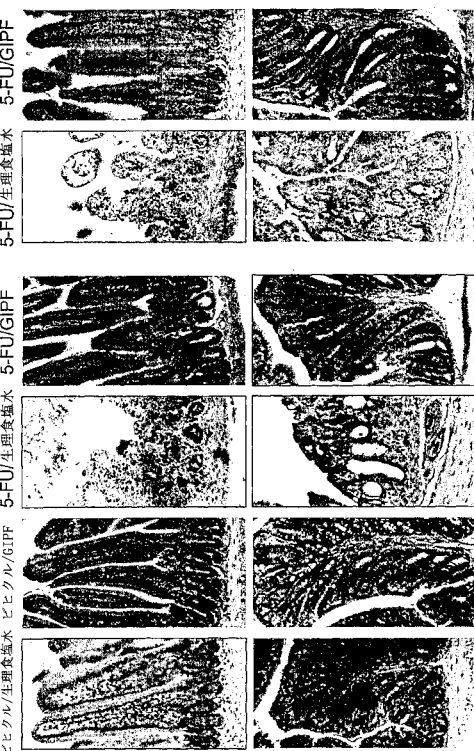
腫瘍容量または腫瘍重量



ビヒクル/生理食塩水(CT26マウス) ビヒクル/GFP(CT26マウス) 5-FU/生理食塩水(CT26マウス)

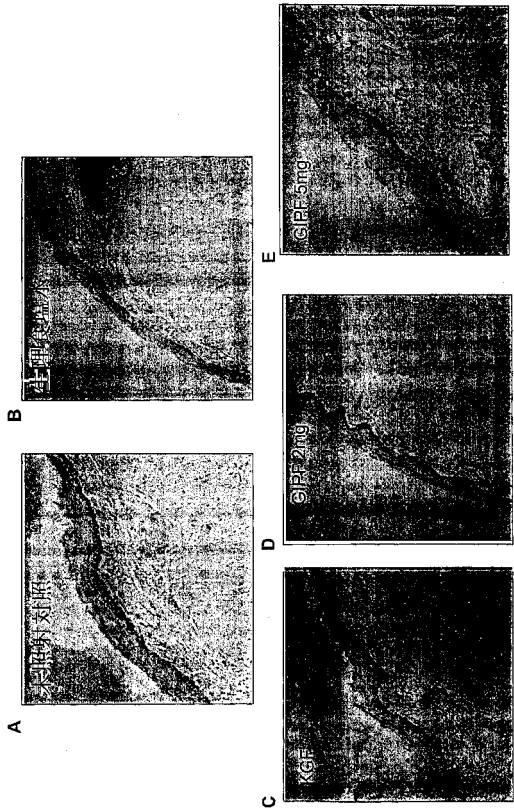


CT26 担癌マウス



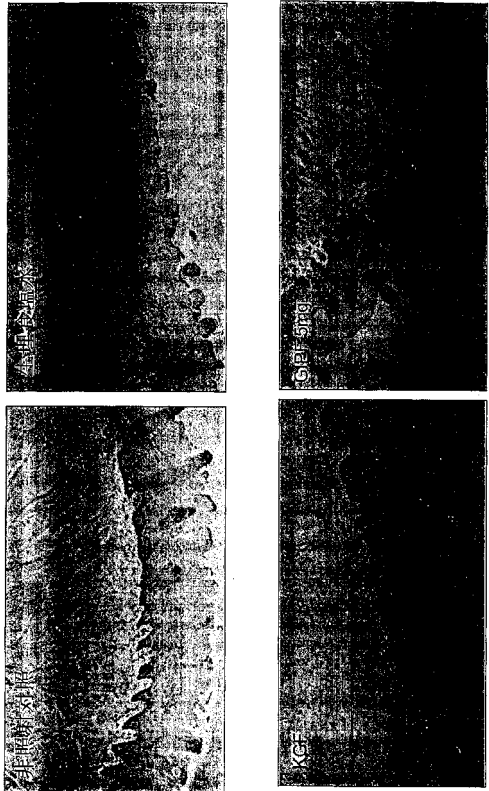
【図 28】

放射線誘発口腔粘膜炎
Ki67 IHC : 腹側舌



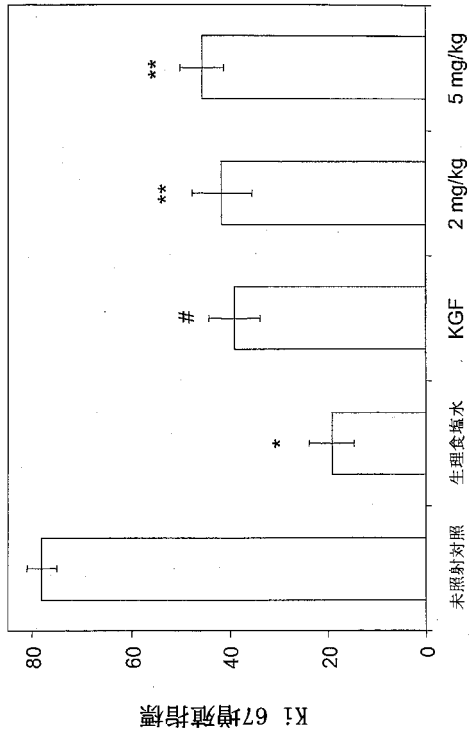
【図 29】

放射線誘発口腔粘膜炎
Ki67 IHC : 背側舌



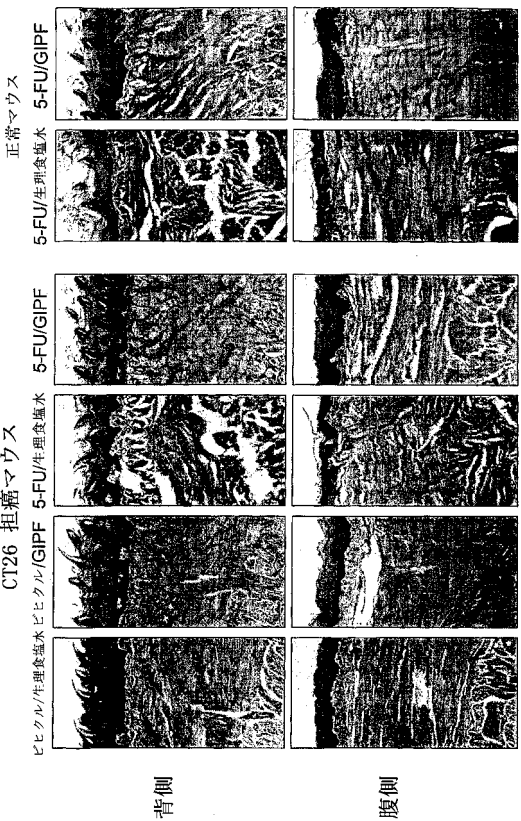
【図 30】

Ki 67増殖指標 : マウス腹側舌

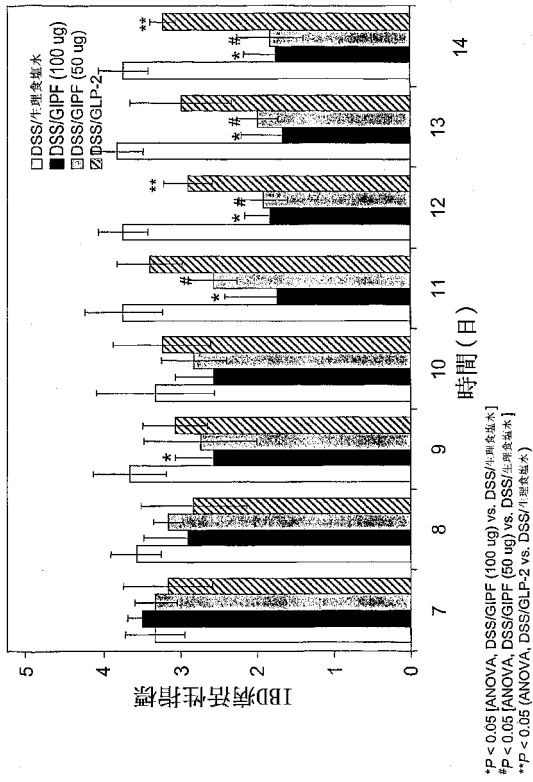


* $P < 0.05$ (ANOVA, 生理食塩水 vs. 未照射対照)
$P < 0.05$ (ANOVA, KGF vs. 生理食塩水)
** $P < 0.05$ (ANOVA, 17208 vs. 生理食塩水)

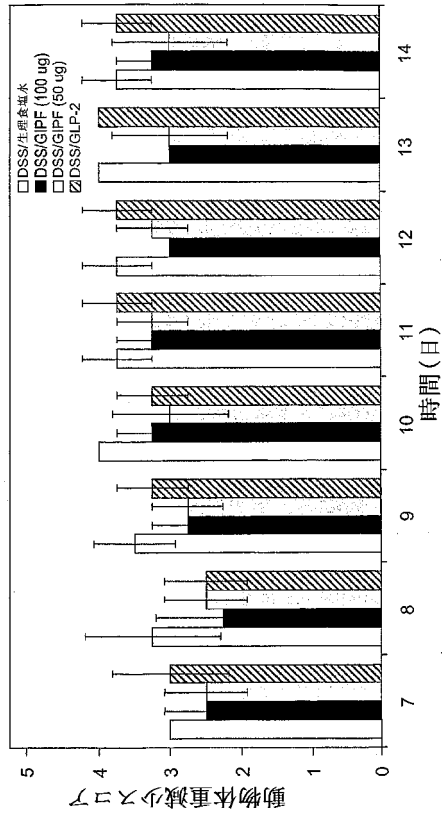
【図 31】



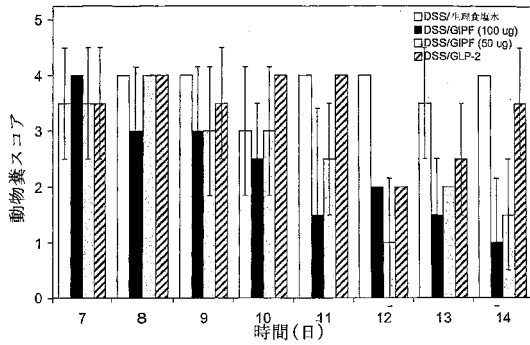
【図 3 2】



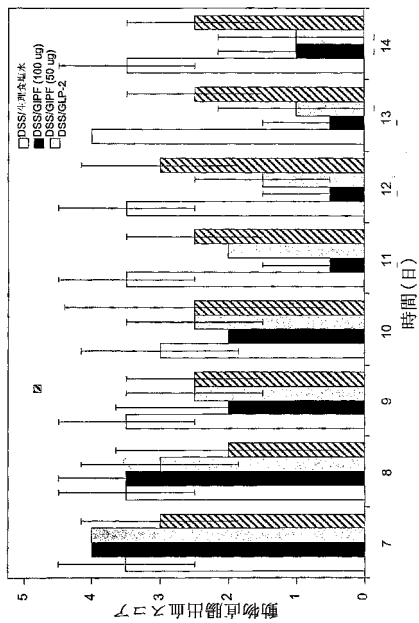
【図 3 3】



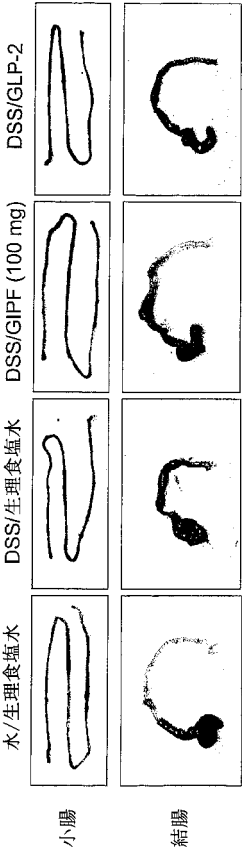
【図 3 4】



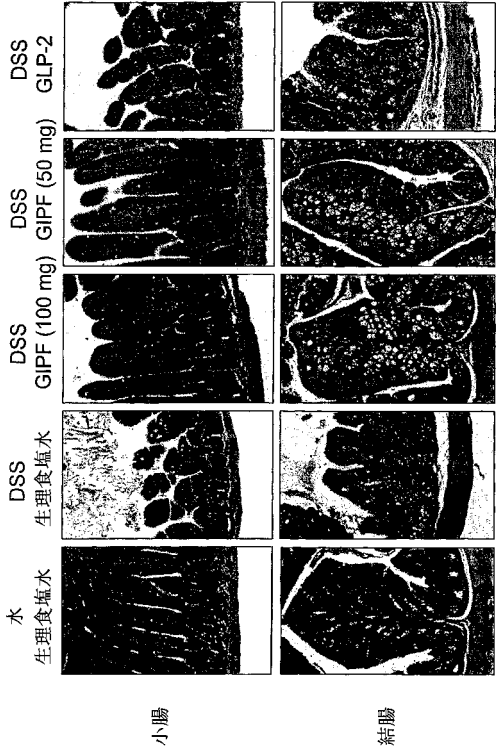
【図 3 5】



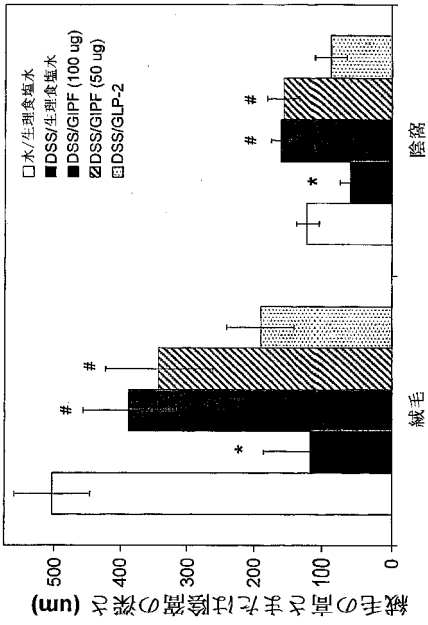
【図 3 6】



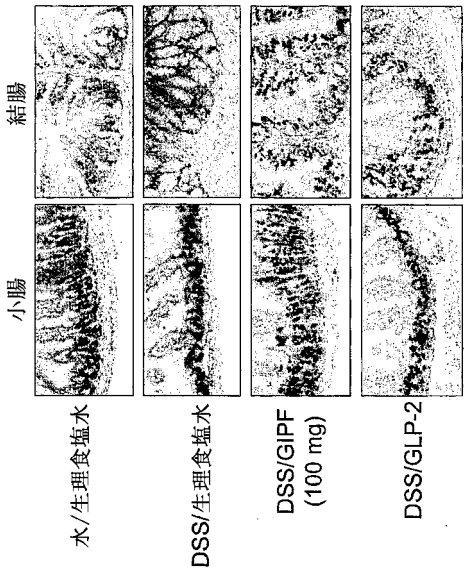
【図 3 7】



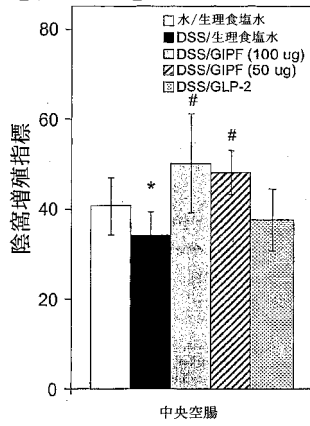
【図 3 8】



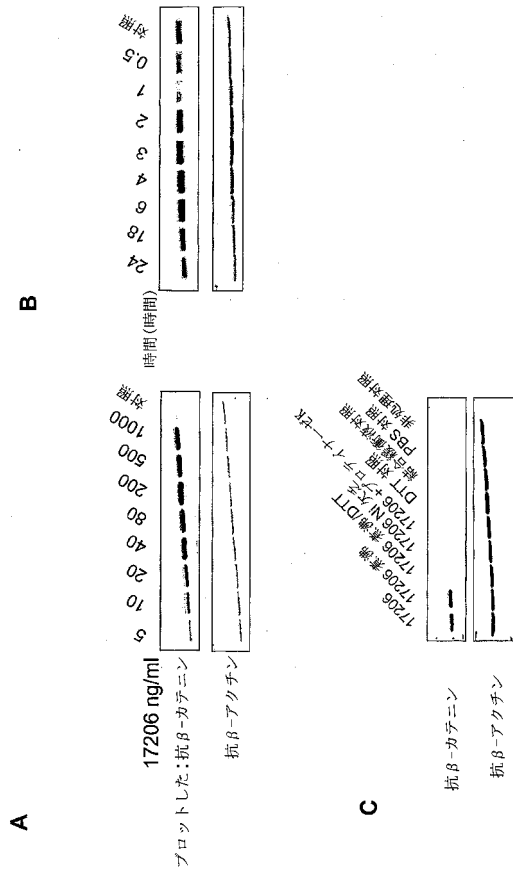
【図 3 9】



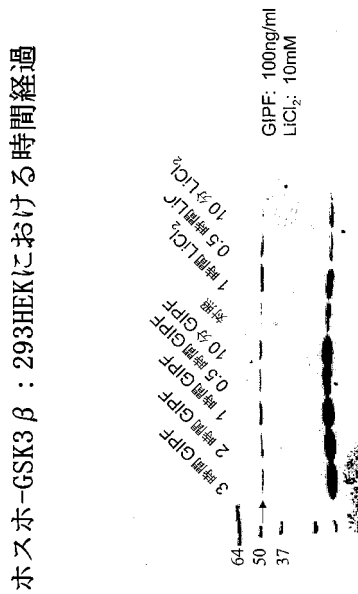
【図 40】



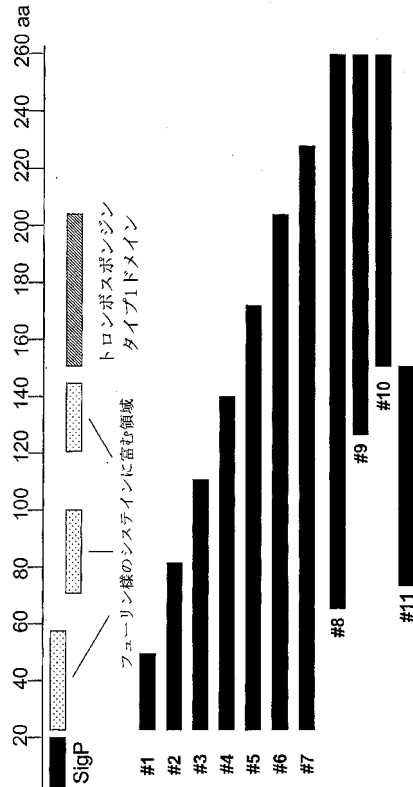
【図 41】



【図 42】



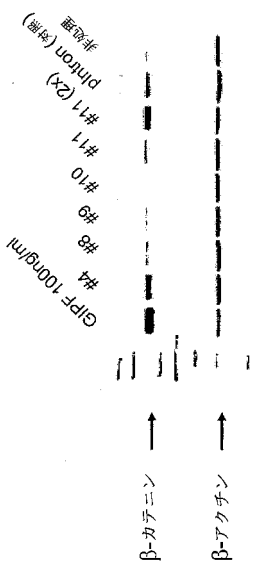
【図 43】



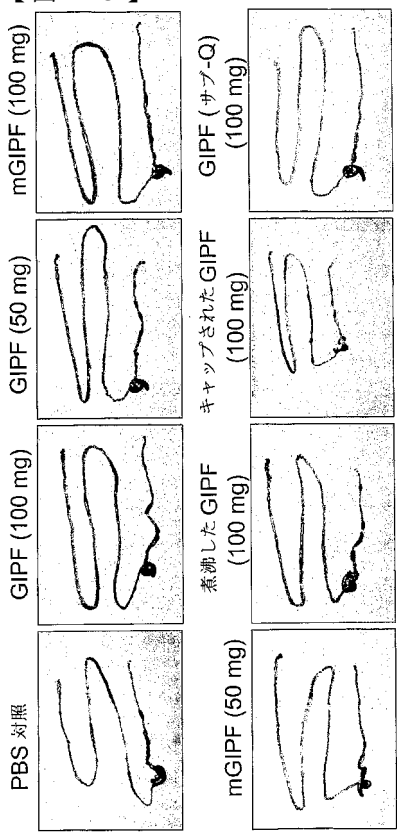
ホスホ-GSK3β : 293HEKにおける時間経過

【図 4 4】

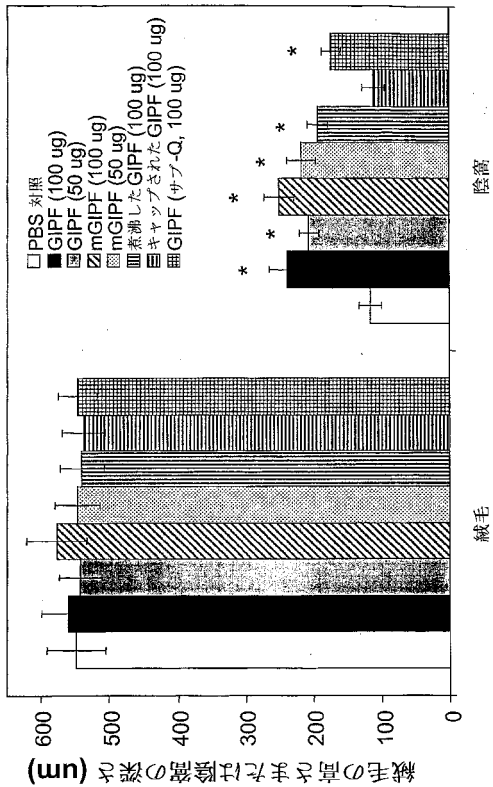
GIPFのアナログによるβ-カテニンの安定化



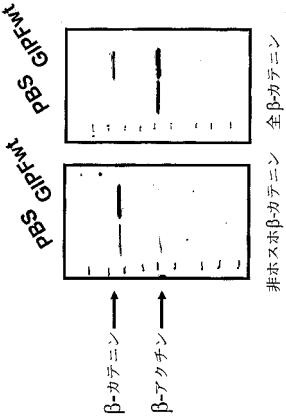
【図 4 5】



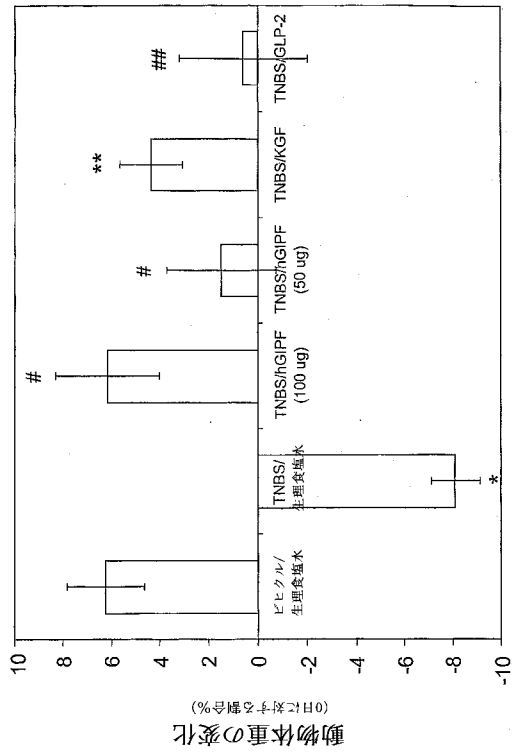
【図 4 6】



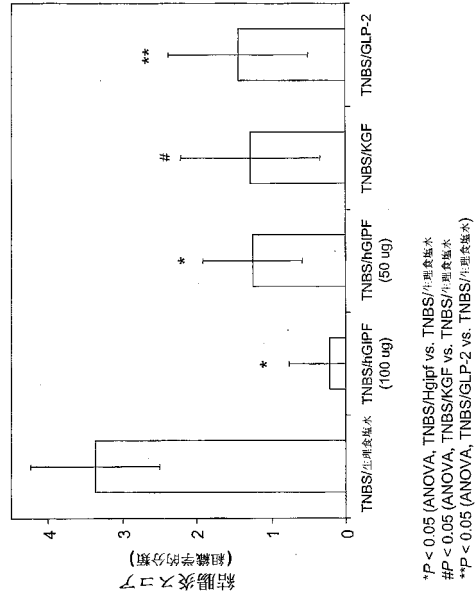
【図 4 7】



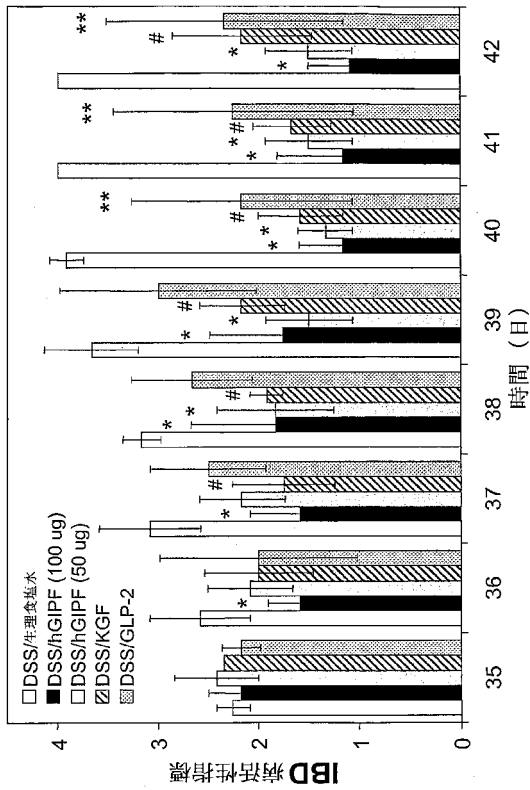
【図 48】



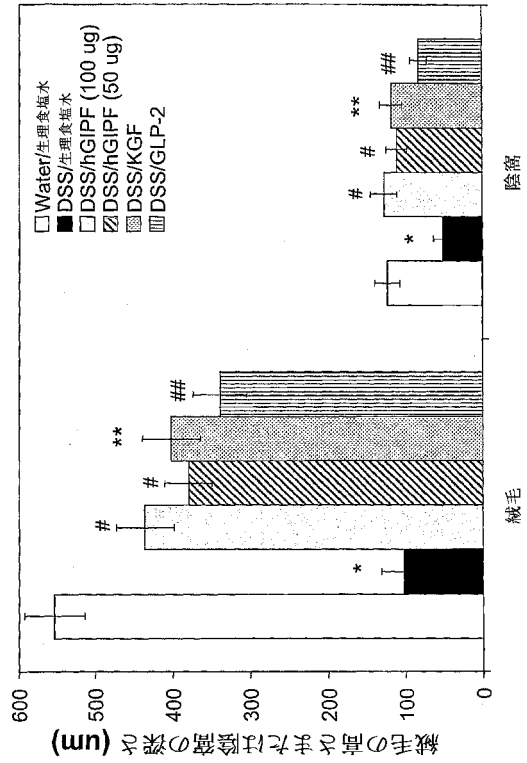
【図 49】



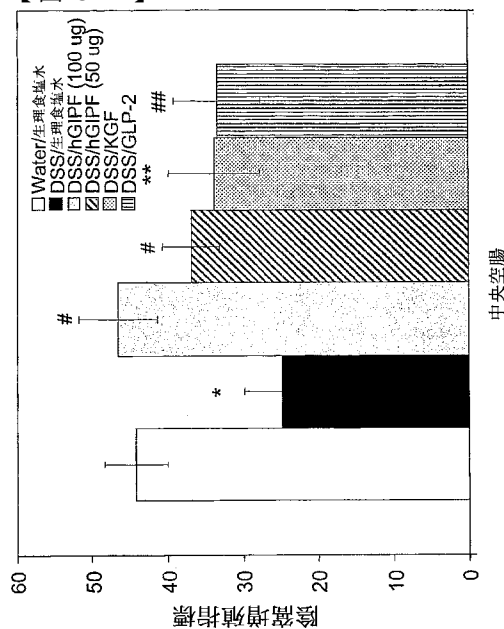
【図 50】



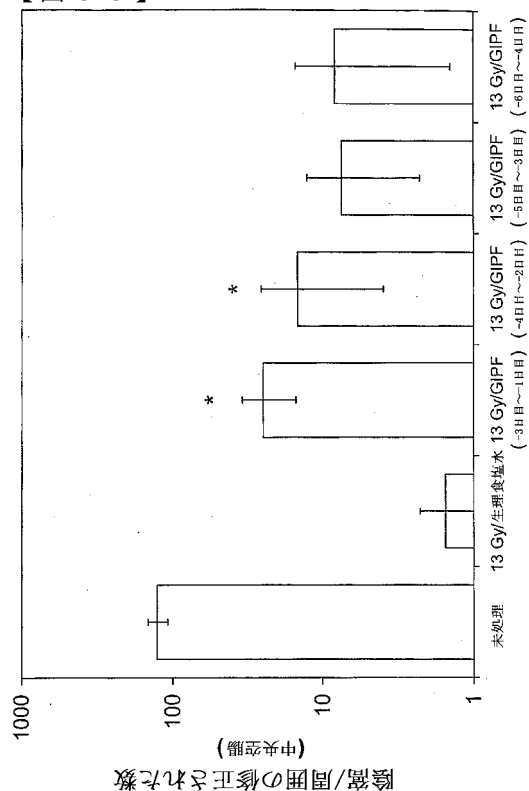
【図 51】



【図 5 2】

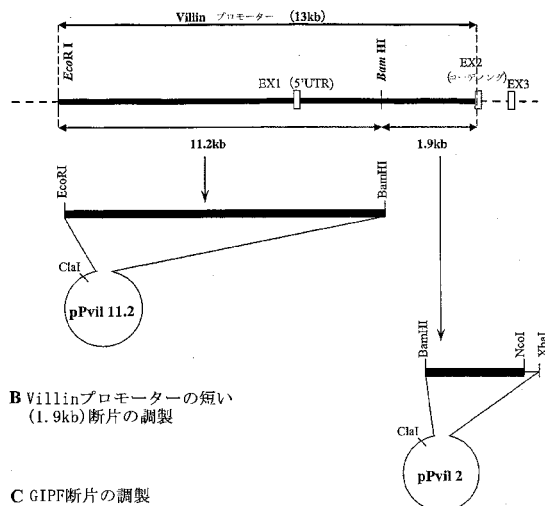


【図 5 3】



【図 5 4 - 1】

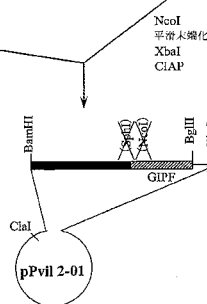
A Villinプロモーターの長い(11.2kb)断片の調製



B Villinプロモーターの短い(1.9kb)断片の調製

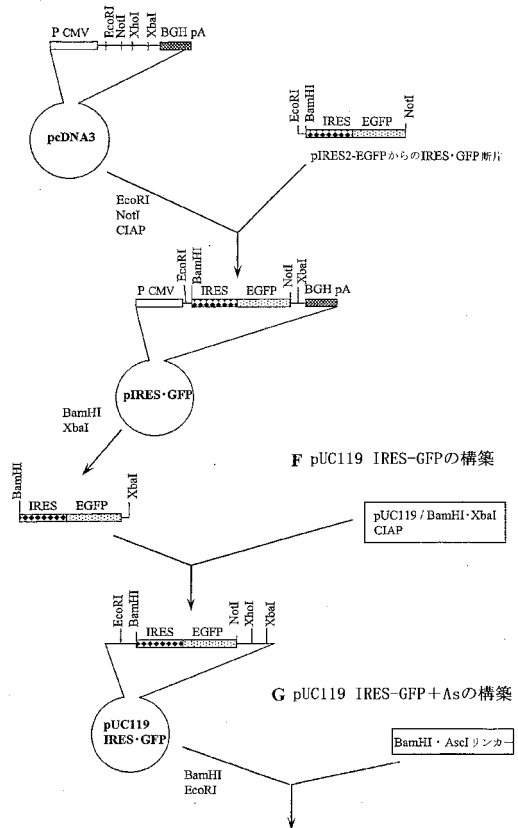
C GIPF断片の調製

D pPvil 2-01の構築



【図 5 4 - 2】

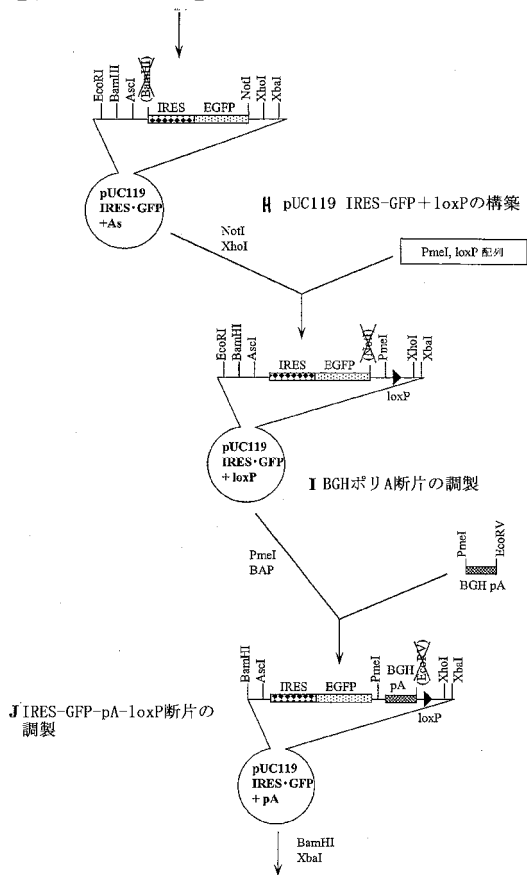
E pIRES-GFPの構築



F pUC119 IRES-GFPの構築

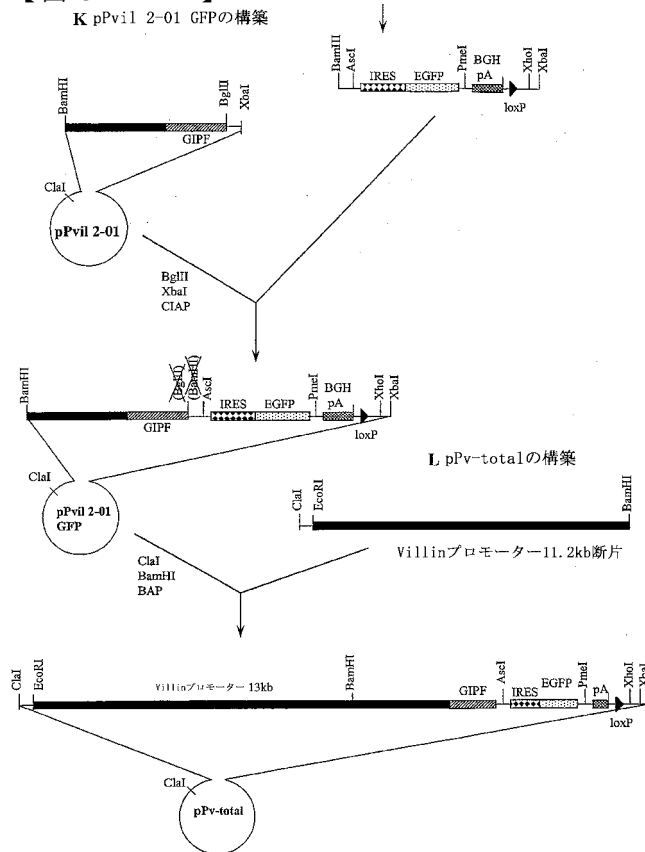
G pUC119 IRES-GFP+Asの構築

【図54-3】



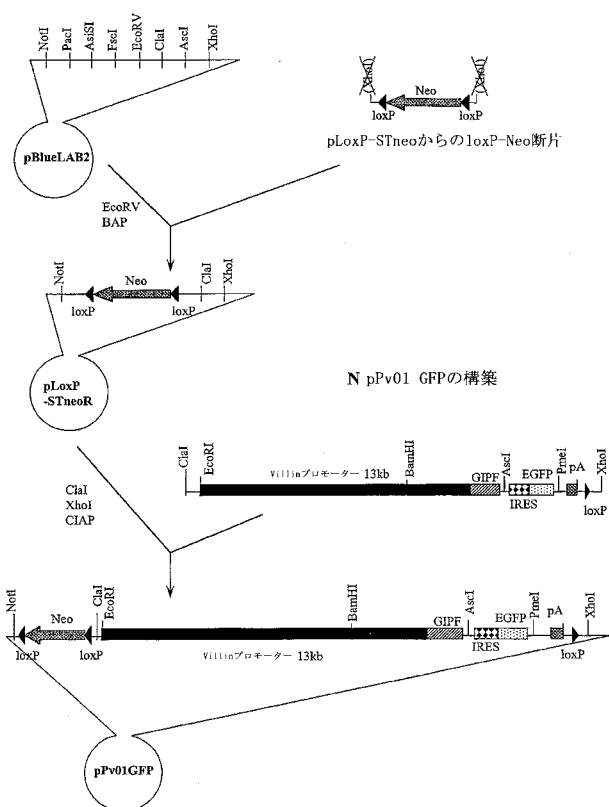
【図54-4】

K pPv1 2-01 GFPの構築

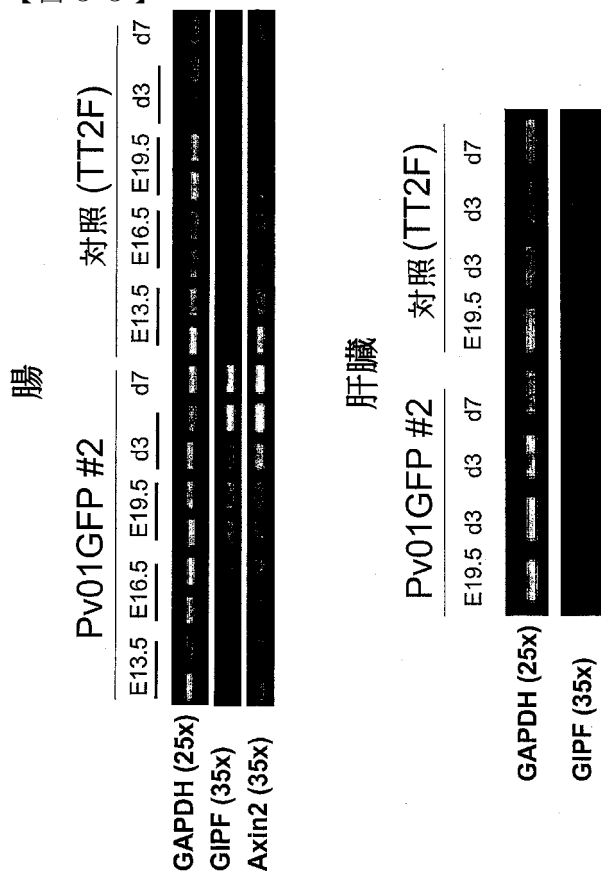


【図54-5】

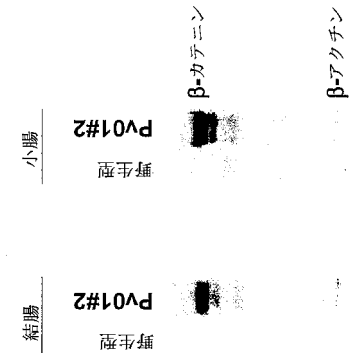
M pLoxP-STneoRの構築



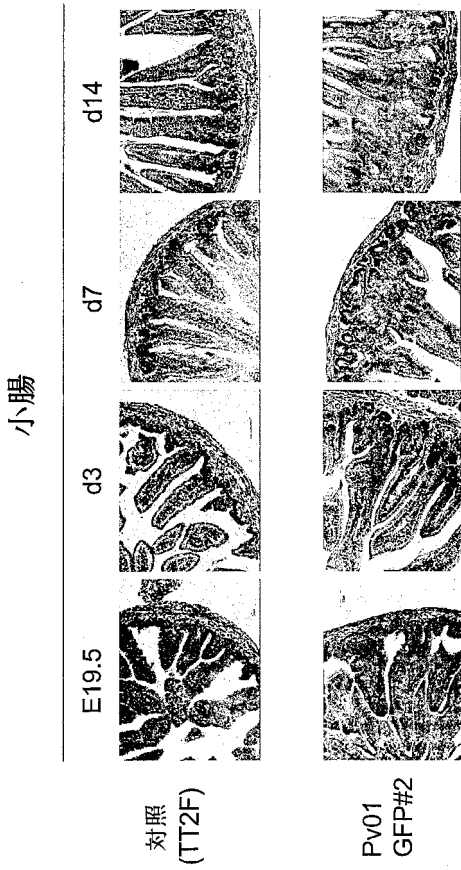
【図55】



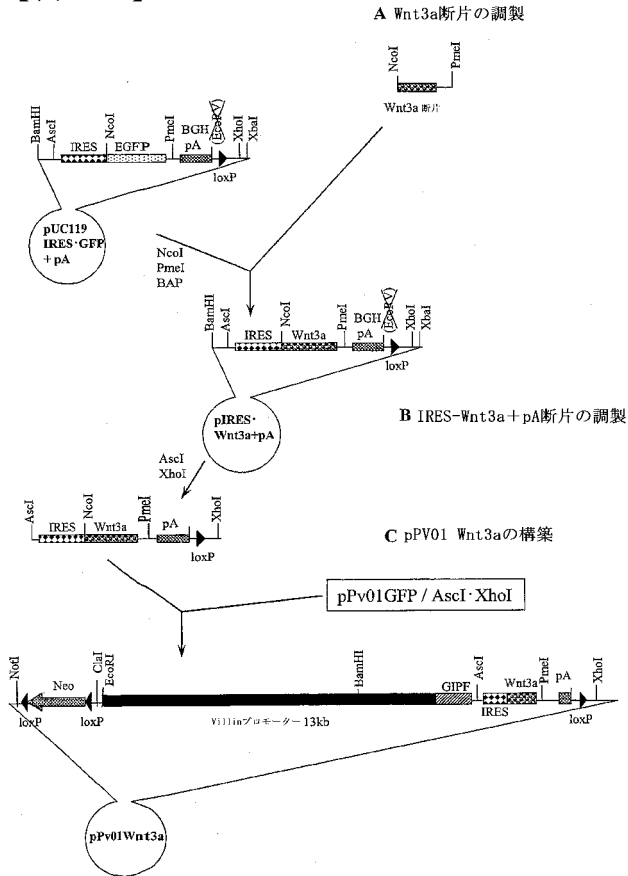
【図 5 6】



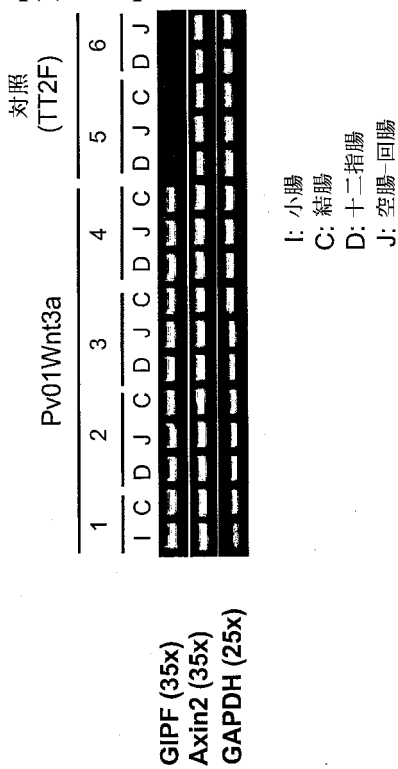
【図 5 7】



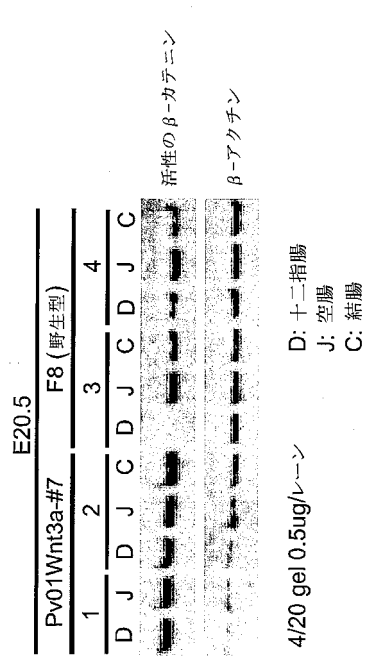
【図 5 8】



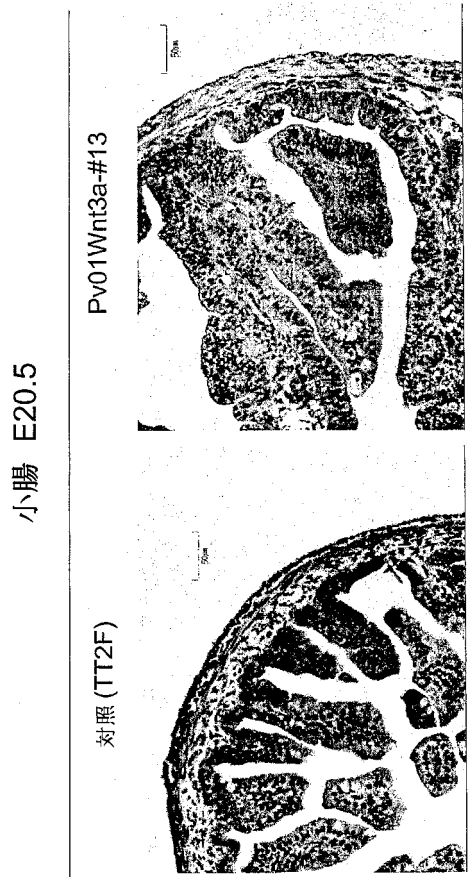
【図 5 9】



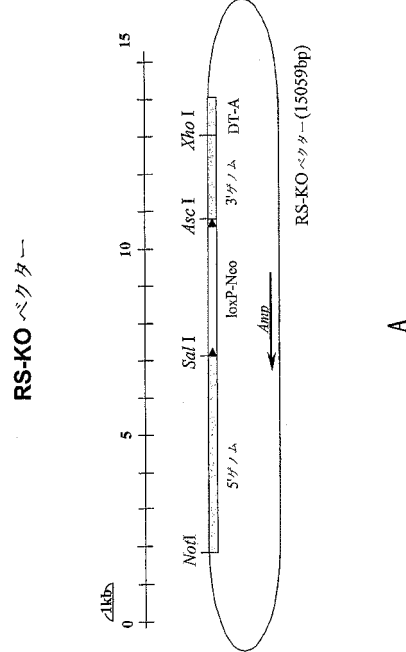
【図 6 0】



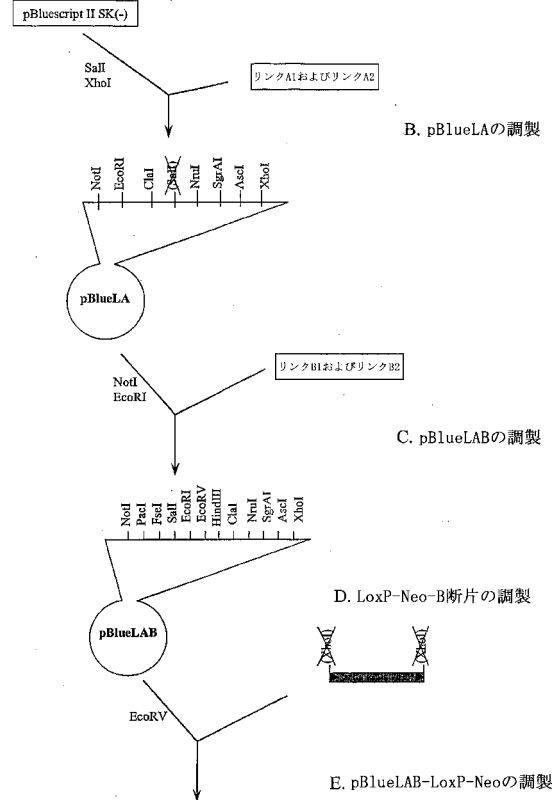
【図 6 1】



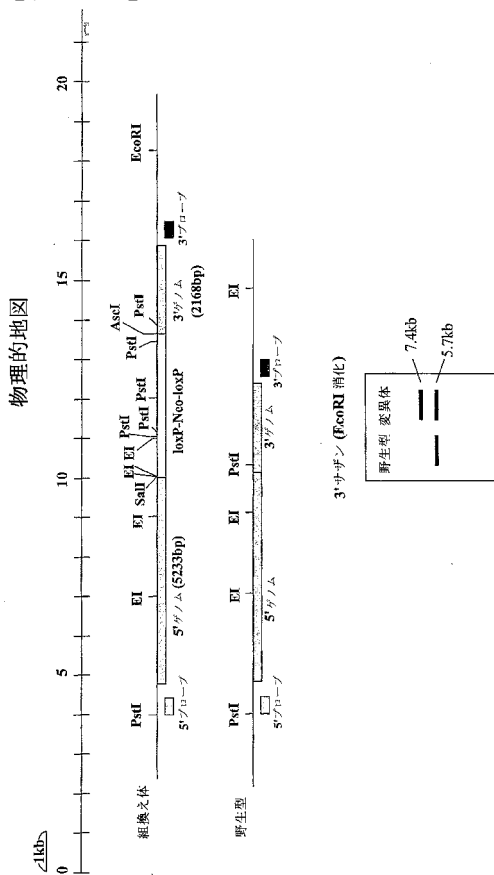
【図 6 2 - 1】



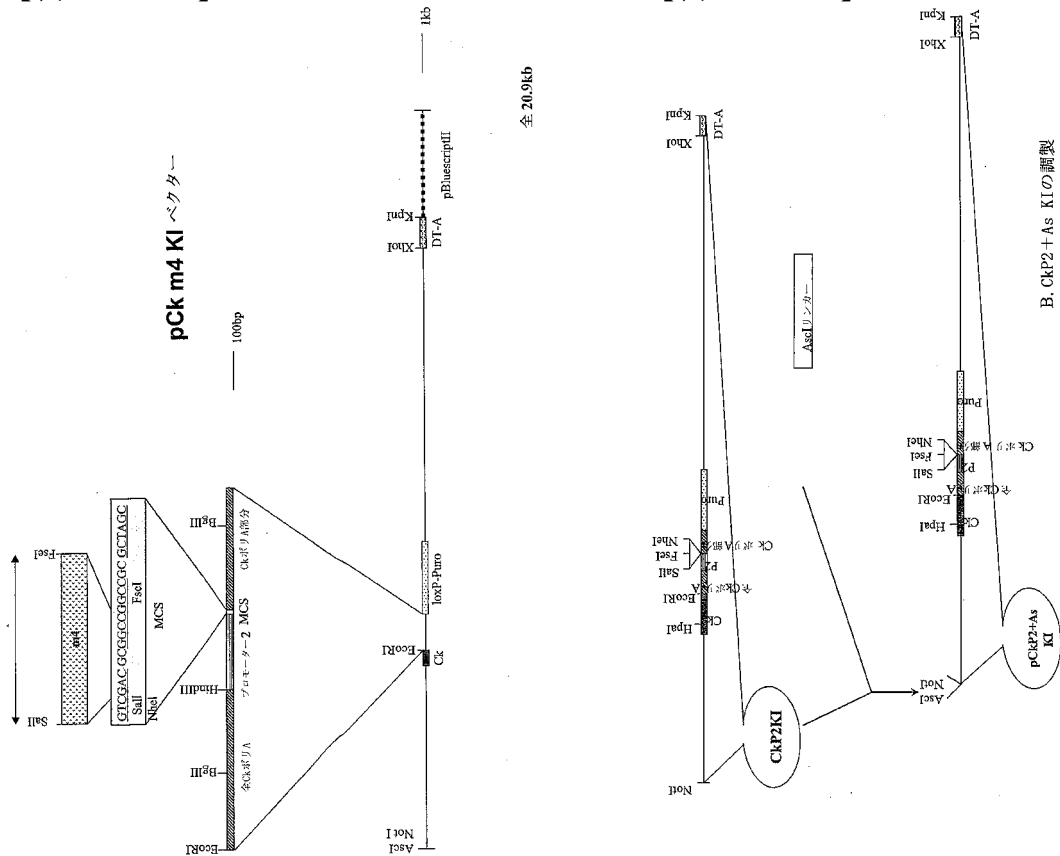
【図 6 2 - 2】



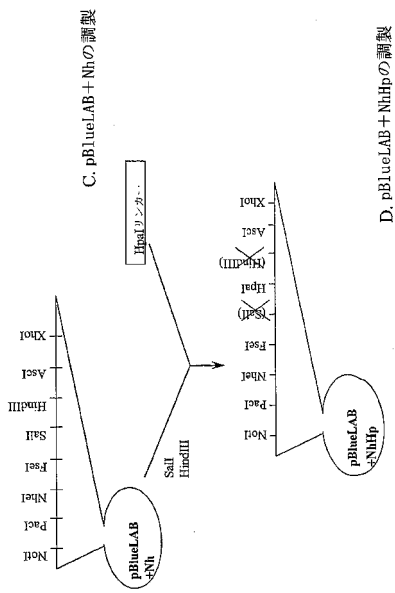
【図 6 3】



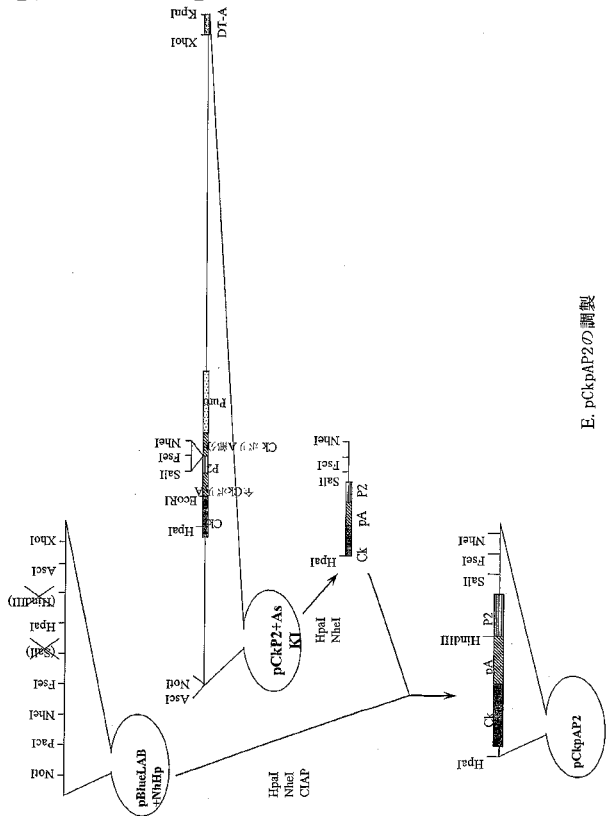
【图 6 4 - 2】



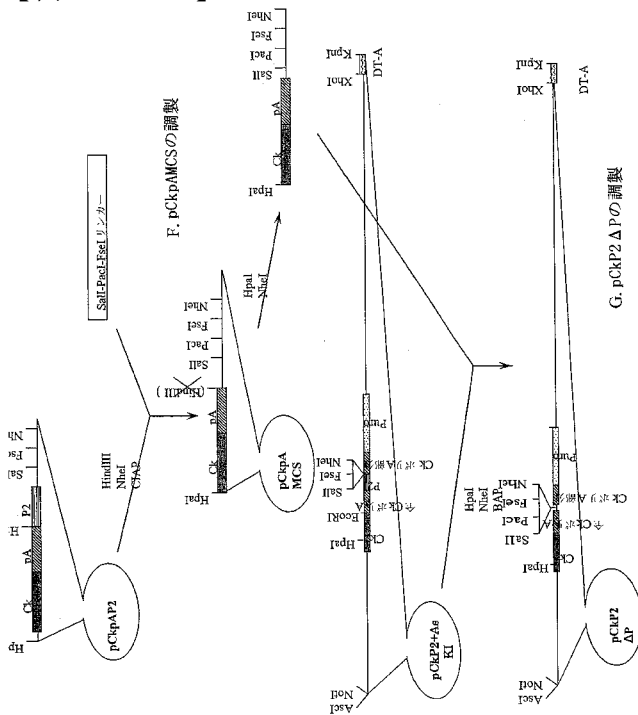
【図 64-3】



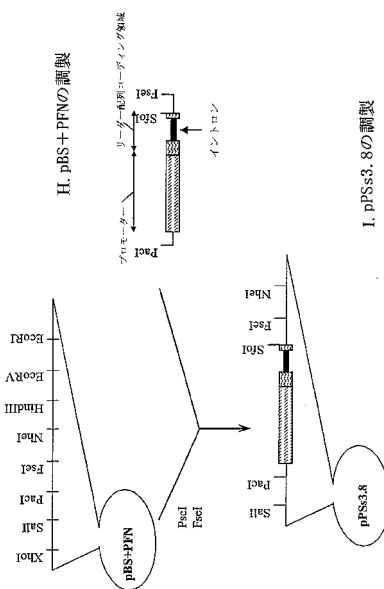
【図 64-4】



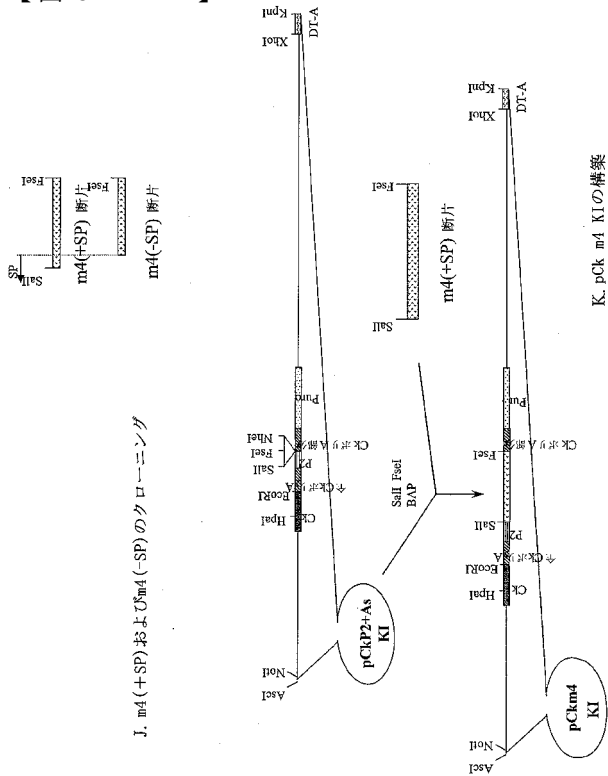
【図 64-5】



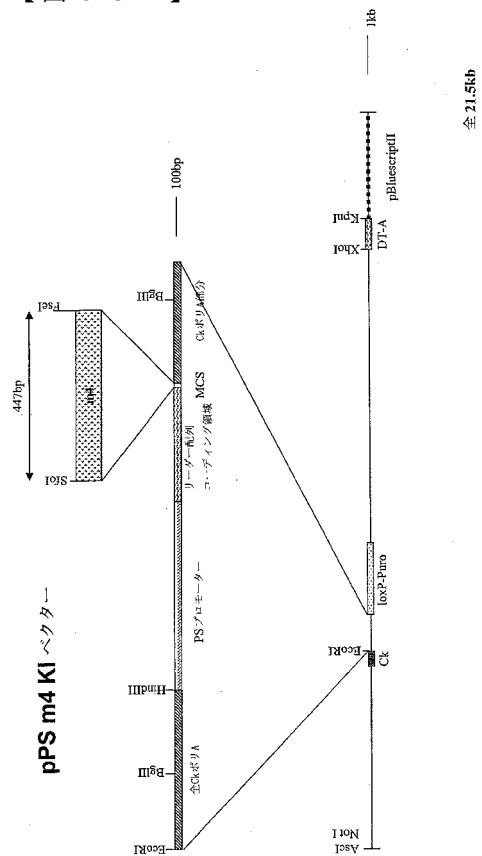
【図 64-6】



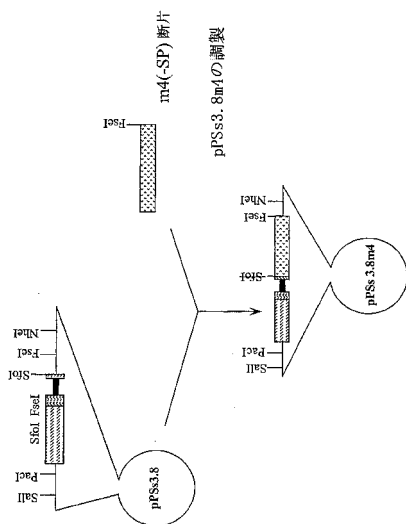
【図 64-7】



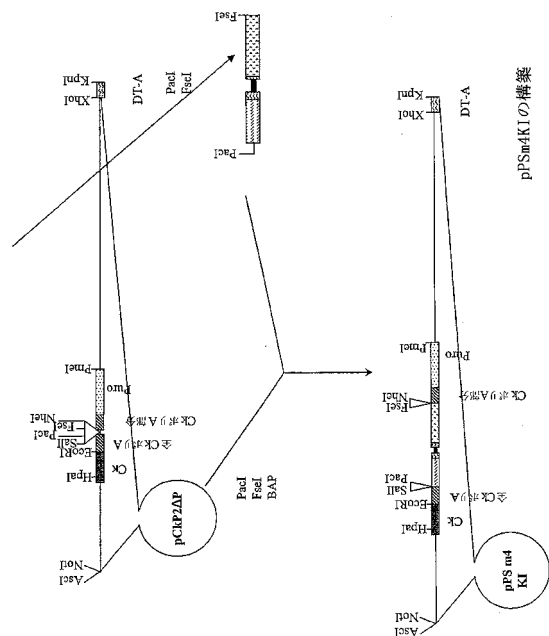
【図 65A】



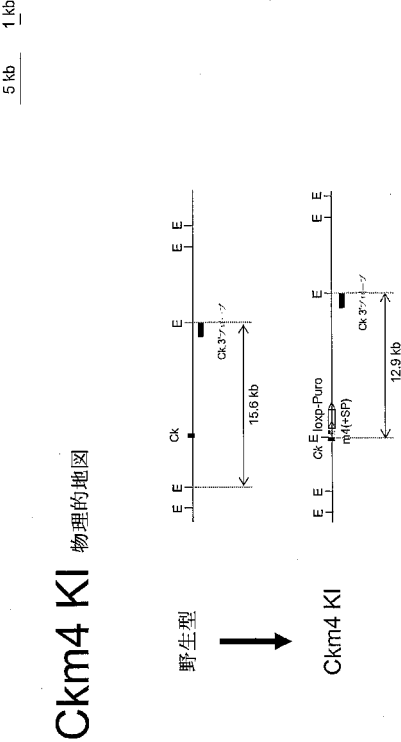
【図 65B】



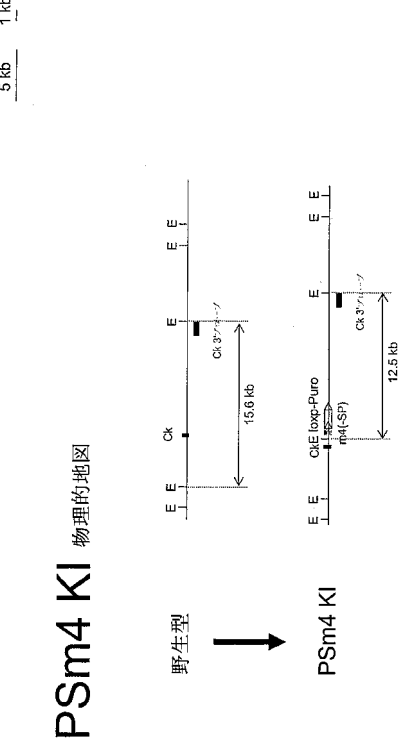
【図 65C】



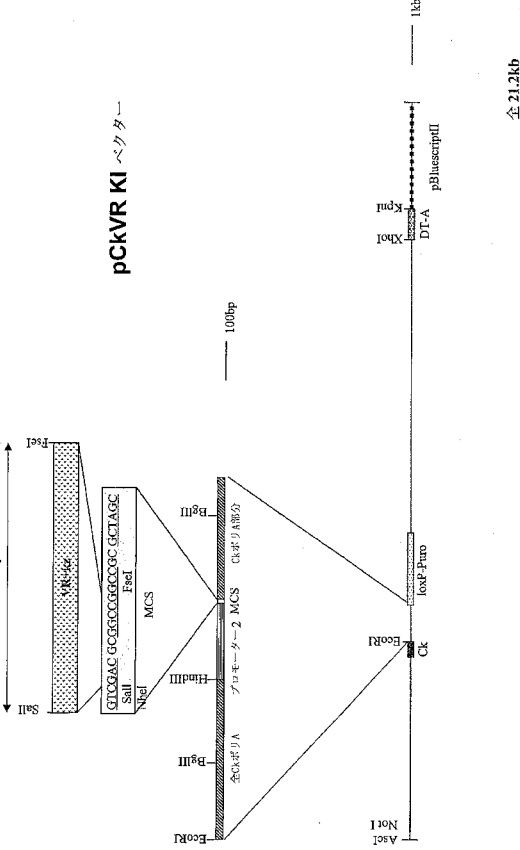
【図 6 6】



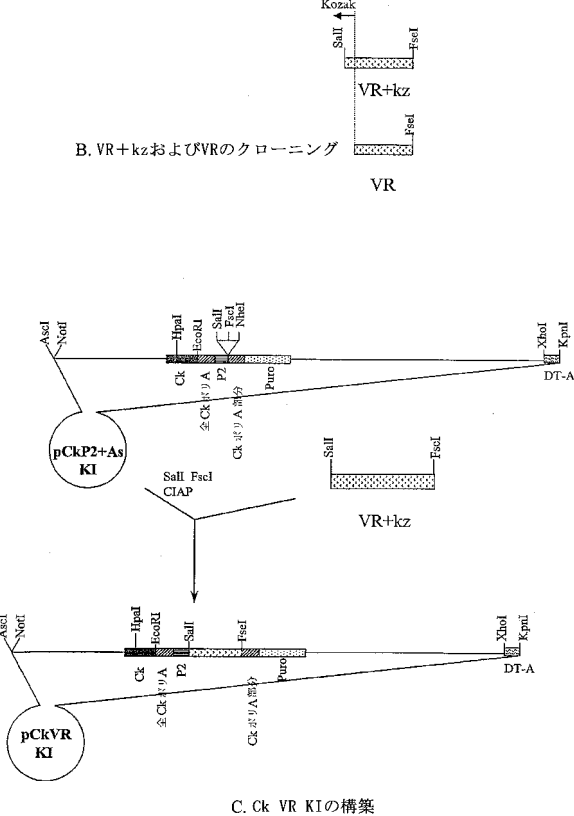
【図 6 7】



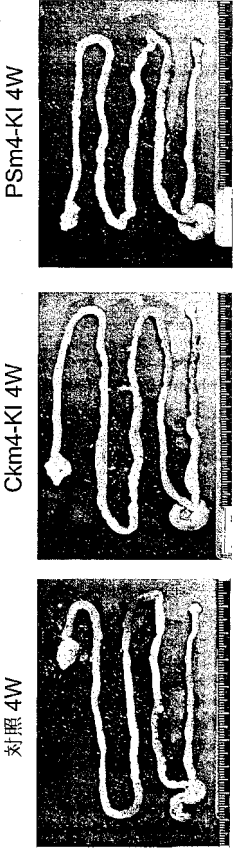
【図 6 8 - 1】



【図 6 8 - 2】



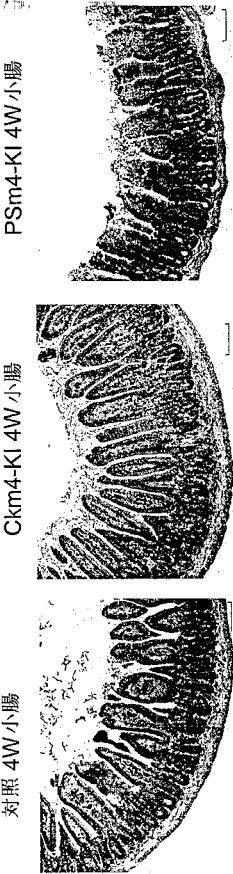
【図 7 2】



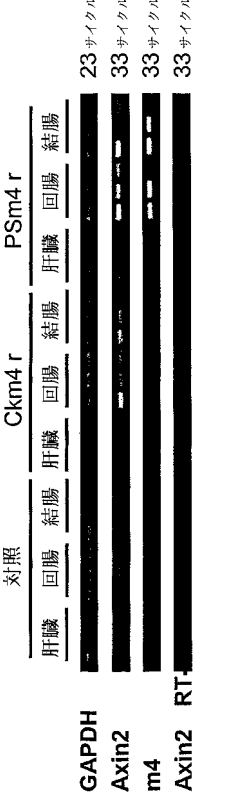
【図 7 3】



【図 7 4】

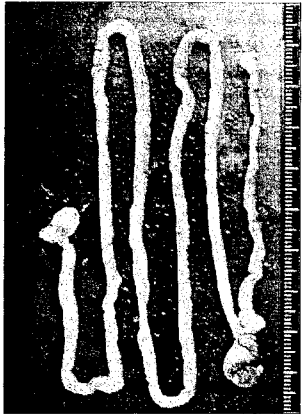


【図 7 5】



【図 7 6】

PSVR-KI 4W

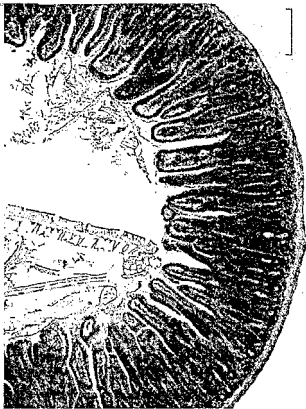


対照 4W

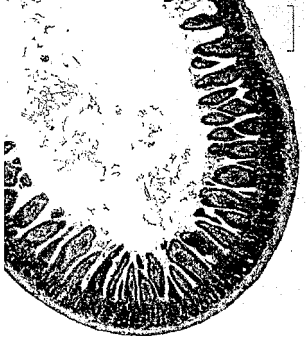


【図 7 7】

PSVR-KI 4W 小腸



対照 4W 小腸



【図 7 8】

PSVR-KI 4W 小腸



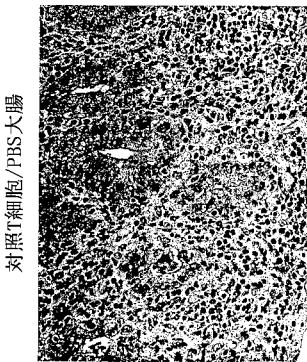
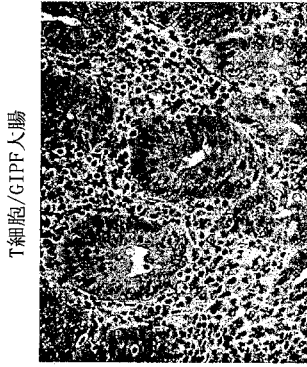
対照 4W 小腸



【図 7 9】

	対照		CkVR-KI		PSVR-KI	
	肝臓	回腸	肝臓	回腸	肝臓	回腸
GAPDH	23 サイクル		23 サイクル		23 サイクル	
Axin2	33 サイクル		33 サイクル		33 サイクル	
変種	33 サイクル		33 サイクル		33 サイクル	
Axin2 RT	33 サイクル		33 サイクル		33 サイクル	

【図 80】



【配列表】

[2007526248000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成19年2月19日(2007.2.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列またはその断片と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離された胃腸増殖因子 (gastrointestinal proliferative factor) (GIPF) ポリペプチド。

【請求項2】

SEQ ID NO: 4、6、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載のGIPFポリペプチド

。

【請求項3】

SEQ ID NO: 4のアミノ酸50位で生じたバリンのイソロイシンへの置換を含む、請求項1記載のGIPFポリペプチド。

【請求項4】

上皮細胞増殖を刺激する、請求項1記載のGIPFポリペプチド。

【請求項5】

治療上有効量の請求項1～4のいずれか一項記載のポリペプチド、および薬学的に許容さ

れる担体を含む組成物。

【請求項 6】

上皮細胞増殖の刺激が必要な哺乳動物対象において上皮細胞増殖を刺激するために用いられる請求項5記載の組成物。

【請求項 7】

口道または胃腸管内の上皮細胞増殖を刺激するために用いられる、請求項6記載の組成物。

【請求項 8】

食道内の上皮細胞増殖を刺激するために用いられる、請求項7記載の組成物。

【請求項 9】

小腸内の上皮細胞増殖を刺激するために用いられる、請求項7記載の組成物。

【請求項 10】

大腸内の上皮細胞増殖を刺激するために用いられる、請求項7記載の組成物。

【請求項 11】

胃内の上皮細胞増殖を刺激するために用いられる、請求項7記載の組成物。

【請求項 12】

口腔内の上皮細胞増殖を刺激するために用いられる、請求項7記載の組成物。

【請求項 13】

対象が放射線療法もしくは化学療法を受けたことがあるかまたは受ける、請求項7記載の組成物。

【請求項 14】

哺乳動物対象がヒトである、請求項6～13のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 15】

胃腸障害または口腔粘膜障害の処置が必要な哺乳動物対象において胃腸障害または口腔粘膜障害を処置するために用いられる請求項5記載の組成物。

【請求項 16】

障害が粘膜炎、炎症性腸疾患、または短腸症候群である、請求項15記載の組成物。

【請求項 17】

請求項1～4のいずれか一項記載のGIPFポリペプチドをコードするコード配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 18】

SEQ ID NO: 3、5、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、または104から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項17記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 19】

宿主細胞においてコード配列の発現を指令する転写調節配列に機能的に結合した請求項17記載のポリヌクレオチドを含む発現構築物。

【請求項 20】

転写調節配列がB細胞においてコード配列の発現を指令する配列を含む、請求項19記載の発現構築物。

【請求項 21】

転写調節配列が腸上皮細胞においてコード配列の発現を指令する配列を含む、請求項19記載の発現構築物。

【請求項 22】

ポリヌクレオチドがWnt3aタンパク質をコードするコード配列をさらに含む、請求項21記載の発現構築物。

【請求項 23】

アデノウイルスベクター中に存在する、請求項19～22のいずれか一項記載の発現構築物。

【請求項 24】

請求項19～22のいずれか一項記載の発現構築物を含む、宿主細胞。

【請求項25】

(a) ポリペプチドを産生する条件下で請求項24記載の宿主細胞集団を培養する段階；および、

(b) ポリペプチドを細胞または培地から精製する段階を含む、GIPFポリペプチドを産生する方法。

【請求項26】

治療上有効量の請求項19～22のいずれか一項記載の発現構築物、および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項27】

対象において上皮細胞増殖を刺激するために用いられる請求項26記載の組成物。

【請求項28】

検出可能なレベルの請求項1～4のいずれか一項記載のGIPFポリペプチドを産生するトランスジェニックマウスであって、コード配列の発現を指令する転写調節配列に機能的に連結されたGIPFポリペプチドをコードするコード配列を含むポリヌクレオチドが、ゲノムに安定に組み込まれているトランスジェニックマウス。

【請求項29】

転写調節配列がB細胞におけるコード配列の発現を指令する配列を含み、マウスがB細胞において検出可能なレベルのGIPFポリペプチドを産生する、請求項28記載のトランスジェニックマウス。

【請求項30】

転写調節配列が腸上皮細胞におけるコード配列の発現を指令する配列を含み、マウスが腸上皮細胞において検出可能なレベルのGIPFポリペプチドを産生する、請求項28記載のトランスジェニックマウス。

【請求項31】

ポリヌクレオチドがWnt3aタンパク質をコードするコード配列をさらに含む、請求項30記載のトランスジェニックマウス。

【請求項32】

腸拡張を示す、請求項30記載のトランスジェニックマウス。

【請求項33】

(a) 組換えGIPFポリペプチドを発現しないこと以外は同一であるマウスと比較して増大した腸上皮細胞増殖を示す、請求項29～32のいずれか一項記載のトランスジェニックマウスに試験化合物を投与する段階；および

(b) 腸細胞増殖の増大によって試験化合物が粘膜炎、炎症性腸疾患、または短腸症候群の処置のための薬物候補として同定される、腸上皮細胞増殖に対する試験化合物の効果を評価する段階を含む、粘膜炎、炎症性腸疾患、または短腸症候群の処置のための薬物候補を同定する方法。

【請求項34】

腸上皮細胞が陰窩細胞である、請求項32記載の方法。

【請求項35】

請求項1～4のいずれか一項記載のポリペプチドを薬学的に許容される担体と組み合わせる段階を含む、薬学的組成物を産生するための方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

本発明の薬学的組成物は、限定されるものではないが、SEQ ID NO: 4、6、10、12、14、

16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178のアミノ酸配列を含む群から選択される単離されたポリペプチドを含むポリペプチドを含む。また、本発明のポリペプチドはまた、

(a) 前記SEQ ID NO: 2、3、5、9、11、13、15、17、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、177において記載されたヌクレオチド配列を有する任意のポリヌクレオチド；または、

(b) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で (a) のポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチド

によってコードされる生物学的活性を有するポリペプチドも含む。SEQ ID NO: 4、6、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、または178に列挙された任意のタンパク質配列の生物学的にまたは免疫学的に活性なアナログ、および生物学的活性を保持するその実質的等価物もまた企図される。本発明のポリペプチドは全体が、または部分的に化学的に合成されたものでよいが、好ましくは本発明の遺伝学的に設計された細胞（例えば、宿主細胞）を用いて組換え手段によって産生される。本発明はSEQ ID NO: 4、6、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、および178のいずれかと少なくとも85%、90%、92%、94%、96%、98%、または99%同一であるポリペプチドを含む。本発明はまた、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸残基がSEQ ID NO: 4、6、10、12、14、16、18、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、および178のいずれかの配列と異なるポリペプチドも含む。アミノ酸変化は保存的または非保存的であり得る。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

CH0および/または293細胞によって主として産生される支配的成熟または成熟ポリペプチド形態（各々、SEQ ID NO: 10およびSEQ ID NO: 12）のいずれかの産生を制御するために、合成構築物が作製された。SEQ ID NO: 15は、ベクター系に含まれたヌクレオチド配列であり、その結果、予測シグナルペプチド（SEQ ID NO: 8）と293細胞で産生される主成熟形態（SEQ ID NO: 10）とが隣接したポリペプチド（SEQ ID NO: 16）が発現される。SEQ ID NO: 17はフューリン-プロテアーゼ切断コンセンサス部位（SEQ ID NO: 22）に突然変異を含むように部位特異的突然変異誘発（Weiner et al., Gene 126: 35-41 (1993)）によって産生されたヌクレオチド構築物である。この突然変異は、SEQ ID NO: 20の最初のアルギニン（R）残基をグルタミン（Q）に変化させる。アルギニンからグルタミンへの突然変異は、293細胞によるGIPFの支配的成熟形態（SEQ ID NO: 10）の産生を可能とする。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0059

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0059】

用語「断片」とは、GIPFの全配列を含まない天然GIPFに由来するポリペプチドをいう。そのような断片は全長分子の切断型バージョン、例えば、SEQ ID NO: 10および12、ならびに内部欠失ポリペプチド、例えば、SEQ ID NO: 16であり得る。GIPF断片は、本明細書において記載のように、インビトロおよび/またはインビボでの上皮細胞の増殖に対するGIPFの効果によって決定されるGIPF生物活性を有し得る。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 2 7

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 2 7】

本発明の核酸配列は、さらに、記載されたタンパク質のアナログをコードする配列を対象とする。これらのアミノ酸配列アナログは、天然または変種ポリヌクレオチドへ適当なヌクレオチド変化を導入することによって当技術分野において公知の方法によって調製することができる。アミノ酸配列変種の構築には2つの可変性がある。突然変異の位置および突然変異の性質。アミノ酸配列アナログをコードする核酸は、好ましくは、天然に生じないアミノ酸配列をコードするようにポリヌクレオチドを突然変異させることによって構築される。これらの核酸改変は、異なる種由来の核酸（可変位置）が、または高度に保存された領域（定常領域）の異なる部位でなすことができる。そのような位置の部位は、例えば、まず保存的選択で置換（例えば、異なる疎水性アミノ酸に対する疎水性アミノ酸）、次いで、より距離がある選択で置換（例えば、荷電アミノ酸に対する疎水性アミノ酸）そして、標的部位で欠失または挿入がなされるように、典型的には連続して修飾される。アミノ酸欠失は、一般には、約1〜30残基、好ましくは約1〜10残基の範囲であって、典型的には連続している。アミノ酸挿入は、長さが、1〜100以上の残基の範囲のアミノ-および/またはカルボキシ末端融合、ならびに単一または複数アミノ酸残基の配列内挿入を含む。配列内挿入は、一般には、約1〜10アミノ残基、好ましくは1〜5残基の範囲であり得る。末端挿入の例は、異なる宿主細胞における分泌、または細胞内標的化に必要な異種シグナル配列、および発現されたタンパク質を精製するのに有用なポリ-ヒスチジン配列のような配列を含む。

【手続補正6】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 4 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 2 4 2】

もう1つの態様において、インビボ遺伝子療法が考えられる。GIPFをコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の分泌のために対象に直接導入して、本明細書に列挙した疾病を予防または治療する。GIPFをコードするポリヌクレオチドは治療すべき組織に直接注射することができるか、あるいはそれはウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターによって冒された組織の細胞に送達することができる。GIPF-コーディング核酸を含有する適当なベクターの物理的導入もまた、リポソーム媒介伝達、裸のDNAの直接的注入、受容体媒介導入、または微粒子衝撃を含む方法によって達成することもできる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 4 6

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 2 4 6】

経口投与では、化合物は、活性化合物を当技術分野において周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に処方することができる。そのような担体は本発明の化合物が、治療すべき患者による経口摂取のための、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方されるのを可能とする。経口使用用の薬剤調整物は、固形賦形剤を用いて製造され、任意で、得られた混合物を粉碎し、次いで、顆粒の混合物を処理し、その後、もし必要であれば適当な補助剤を加えて、錠剤または糖衣錠コアを得ることができる。適当な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトールを含む糖；例えば、トウモロコシ澱粉、小麦澱粉、米澱粉

、ジャガイモ澱粉、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、および/またはポリビニルピロリドン（PVP）のようなセルロース調製物のような充填剤である。所望ならば、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸、またはアルギン酸ナトリウムのような、その塩のような崩壊剤を加えることができる。この目的では、濃縮された糖溶液を用いることができ、これは、任意で、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボルゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含有することができる。染料または色素を同定のために、あるいは活性化化合物用量の異なる組合せを特徴付けるために、錠剤または糖衣錠コーティングに加えることができる。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0373

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0373】

照射から4日後に、動物を殺した。小腸を摘出し、組織学的分析のための処理に先立ってカルノア固定液で固定した。横方向切片3μm厚みを切断し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。屠殺した直後に、十二指腸、中央大腸、肝臓、肺、舌、脾臓、胃および膵臓もまた摘出し、70%エタノール中での保存に先立って一晩ホルマリンで固定した。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0529

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0529】

(6) トランスジェニックキメラマウスにおけるヒトGIPF/Wnt3a mRNAの発現

新生キメラに由来するpPv01Wnt3a/TT2F-#7および#13の腸管から全RNA試料を調製し、半定量的RT-PCR分析に供して、GIPF-Wnt3a mRNA発現を調べた。Isogen (Nippon Gene) およびRNasy Mini (QIAGEN) を用いることによって、pPv01Wnt3a/TT2F-#7および#13由来キメラおよび対照TT2F由来キメラの胃腸管から抽出された500ngの全RNA、およびランダムヘキサマーを用い、第一ストランドcDNAをSuperscript III (Invitrogen) で合成した。半定量的RT-PCR分析は、各プライマー対のための特異的アニーリング温度においてcDNAを用いて行った。PCR産物を2%寒天ゲル上の電気泳動に供し、臭化エチジウムで染色した。RNAの完全性はネズミGAPDHによって作製されたcDNAの増幅によって調整した。GIPF (Pv01 RT F1、R1)、Axin2 (Axin2F、R) およびmGAPDH (mGAPDH5、3) についてのプライマー組のヌクレオチド配列およびアニーリング温度を以下に列挙する。

Pv01RT F1 (SEQ ID NO: 136) GCTCTGACACCAAGGAGACC

Pv01RT R1 (60°C) (SEQ ID NO: 137) CCCTAGGAATGCTCGTCAAG

Axin2 F(MUS) (SEQ ID NO: 138) CAGGAGCCTCACCCCTTCG

Axin2 R(MUS) (60°C) (SEQ ID NO: 139) ACGCCGAGGTGCTTGCCC

mGAPDH5 (SEQ ID NO: 140) CACCATGGAGAAGGCCGGGGCCCCAC

mGAPDH3 (65°C) (SEQ ID NO: 141) ATCATACTTGGCAGGTTTCTCCAGG

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0538

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0538】

図62F DT-A断片の調製

pMC1DT-A (GIBCO BRL) をXhoIおよびSalIで消化し、得られたDT-A断片を分離し、アガロースゲル電気泳動から回収した。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0540

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0540】

図62H RSエレメントの3'ゲノム領域の調製

PCR用のフォワード (RS3'FW2; SEQ ID NO: 148) およびリバース (RS3'RV3; SEQ ID NO: 149) プライマーは、GenBank (アクセッション番号 AC090291) から入手し、かつRSエレメントの3'ゲノム領域のDNAを増幅するのに用いられるマウスの配列に基づいていた。
RS3'FW2: TTGGCGCGCCCTCCCTAGGACTGCAGTTGAGCTCAGATTGA

(SEQ ID NO: 148)

は、AscI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製し、かつ
RS3'RV3:

CCGCTCGAGTCTTACTGTCTCAGCAACAATAATATAAACAGGGG (SEQ ID

NO: 149)

は、XhoI認識配列を5'末端部位に加えることによって調製した。PCRは、鋳型としてBACクローンRP23-435I4 (GenBankアクセッション番号AC090291) を用いて行った。PCR産物を制限酵素AscIおよびXhoIで消化し、制限酵素AscIおよびXhoIで予め消化したpBlueLABに連結した。得られたプラスミドはRSエレメントの3'ゲノム領域の指定されたDNA配列を含有し、ヌクレオチド配列内には置換は無かった。AscIおよびXhoIの間の領域をAscIおよびXhoIで処理し、次いで、RSエレメント (約2Kb) の3'ゲノム領域を得た。

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月4日(2007.7.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i)SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列との少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

(ii)その断片

を含むポリペプチドの使用であって、上皮細胞増殖を刺激するための薬剤の治療上有効量を投与することによって、それを必要とする哺乳動物対象において上皮細胞増殖を刺激する、該薬剤の製造における使用。

【請求項2】

ポリペプチドがSEQ ID NO: 10との少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1記載の使用。

【請求項3】

ポリペプチドがSEQ ID NO: 10のアミノ酸配列からなる、請求項2記載の使用。

【請求項4】

口腔または胃腸管における上皮細胞増殖を刺激する段階を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の使用。

【請求項5】

食道における上皮細胞増殖を刺激する段階を含む、請求項4記載の使用。

【請求項6】

小腸における上皮細胞増殖を刺激する段階を含む、請求項4記載の使用。

【請求項7】

大腸における上皮細胞増殖を刺激する段階を含む、請求項4記載の使用。

【請求項8】

胃における上皮細胞増殖を刺激する段階を含む、請求項4記載の使用。

【請求項9】

口腔における上皮細胞増殖を刺激する段階を含む、請求項4記載の使用。

【請求項10】

対象が放射線療法または化学療法を受けたことがある、または受けることになっている、請求項4記載の使用。

【請求項11】

哺乳動物対象がヒトである、請求項1～10のいずれか一項記載の使用。

【請求項12】

(i)SEQ ID NO：4のアミノ酸配列との少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

(ii)その断片

を含むポリペプチドの使用であって、胃腸疾患または口腔粘膜疾患を処置するための薬剤の治療上有効量を投与することによって、それを必要とする哺乳動物対象において胃腸疾患または口腔粘膜疾患を処置する、該薬剤の製造における使用。

【請求項13】

ポリペプチドがSEQ ID NO：10との少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項12記載の使用。

【請求項14】

ポリペプチドがSEQ ID NO：10のアミノ酸配列からなる、請求項13記載の使用。

【請求項15】

疾患が粘膜炎、炎症性腸疾患、または短腸症候群である、請求項12～14のいずれか一項記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A 4 C 0 8 7
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00	C 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
C 0 7 K 14/475 (2006.01)	C 0 7 K 14/475	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ボイル ブライアン ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタクララ エル カミーノ レアル 500 エスシー
ユー - 2752

(72)発明者 ファンク ウォルター
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ハイワード モドック コート 25432

(72)発明者 柿谷 誠
日本国 群馬県 高崎市 井野町 95-1 井野寮 310

(72)発明者 大島 毅
日本国 群馬県 前橋市 上小出 2丁目 37-16 麒麟麦酒 敷島寮 ビー-203

(72)発明者 パーク ウン ジュ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロスアルトス パサ ロブレス アベニュー 251

(72)発明者 タン トム ワイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンノゼ ランウィック コート 4230

(72)発明者 八木 幹生
日本国 埼玉県 さいたま市 浦和区 上木崎 1丁目 10-1 グランデュオ 北街区 10
05

(72)発明者 富塚 一磨
日本国 群馬県 高崎市 田島町 110-1 アールエム2 高崎 401

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36
4B024 AA01 AA11 BA03 CA04 DA02 DA03 EA02
4B063 QQ20 QR72 QR77 QR80 QS05 QS38 QX01
4B064 AG13 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA91X AA93X AA93Y AA95X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 BA34 BA35 CA18 CA23
DB53 NA13 NA14 ZA662 ZB112 ZC412
4C087 AA01 AA02 BC38 CA12 NA13 NA14 ZA66 ZB11 ZC41

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA20 EA25 EA28 FA74