(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5568582号
(P5568582)

(45)発行日　平成26年8月6日(2014.8.6)　(24)登録日　平成26年6月27日(2014.6.27)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/76	(2006.01)	C07K	14/76	ZNA
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	5/00	101

請求項の数 4　外国語出願　(全 328 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-41914(P2012-41914)
(22)出願日　平成24年2月28日(2012.2.28)
(62)分割の表示　特願2006-553197(P2006-553197)の分割
原出願日　平成17年2月9日(2005.2.9)
(65)公開番号　特開2012-140448(P2012-140448A)
(43)公開日　平成24年7月26日(2012.7.26)
審査請求日　平成24年3月16日(2012.3.16)
(31)優先権主張番号　60/542,274
(32)優先日　平成16年2月9日(2004.2.9)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/549,901
(32)優先日　平成16年3月5日(2004.3.5)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　597018381
ヒューマン　ジノーム　サイエンシーズ，インコーポレイテッド
Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国　メリーランド　２０８５０，ロックビル，シャディー　グローブ　ロード　１４２００
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アルブミン融合蛋白質

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号：３１９のアミノ酸配列からなるアルブミン融合タンパク質をコードしているポリヌクレオチドを含む、ＧＬＰ－１－アルブミン融合タンパク質発現コンストラクトを含有する宿主細胞から発現されたアルブミン融合タンパク質。
【請求項２】
宿主細胞が酵母細胞または哺乳類細胞である、請求項１記載のアルブミン融合タンパク質。
【請求項３】
酵母細胞がＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅである、請求項２記載のアルブミン融合タンパク質。
【請求項４】
宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）またはＮＳ０である、請求項１記載のアルブミン融合タンパク質。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
本出願は、「コピー１」「コピー２」および「コピー３」のラベルを付けた３つの同一のコンパクトディスク（ＣＤ－Ｒ）中の電子データとして提供される、以下に記載の「配列表」を参照する。これらのコンパクトディスクはそれぞれファイル「ＰＦ６１２ＰＣＴ

ＳＬ．ｔｘｔ」（９２９，０４８バイト、２００５年２月７日作成）を含み、出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０００２】

（発明の背景）

本発明は一般的に、アルブミンまたはアルブミンの断片もしくは変異体に融合させた治療用蛋白質（少なくとも１つのポリペプチド、抗体、ペプチドまたはその断片および変異体を含むが、これらに限定されない）に関する。本発明は、治療用アルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド、治療用アルブミン融合蛋白質、組成物、医薬組成物、処方およびキットを包含する。治療用アルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて形質転換させた宿主細胞も本発明に含まれ、同様に、これらのポリヌクレオチドおよび／または宿主細胞を用いて本発明のアルブミン融合蛋白質を調製する方法も本発明に含まれる。

【０００３】

ヒト血清アルブミン（ＨＳＡまたはＨＡ）は、その成熟形態では、（図１（配列番号：１）に示すような）５８５個のアミノ酸からなる蛋白質であり、血清の浸透圧の大部分に関与しており、また、内因性および外因性リガンドのキャリアーとしても機能する。現在、臨床用のＨＡはヒト血液からの抽出により生産されている。微生物による組換えＨＡ（ｒＨＡ）の産生は、ＥＰ　３３０　４５１およびＥＰ３６１　９９１に開示されている。

【０００４】

天然状態または組換えにより産生された治療用蛋白質、例えばインターフェロンおよび成長ホルモンは、典型的に、特に水溶液中に処方された場合に、短い貯蔵寿命を示す不安定な分子である。投与用に処方する場合のこれらの分子の不安定性のために、該分子の多くは貯蔵中、常に凍結乾燥および冷蔵する必要があり、そのため、該分子を輸送および／または貯蔵する際に困難が生じる。医薬処方を病院の環境外で貯蔵および調剤する必要がある場合、貯蔵の問題は特に深刻である。

【０００５】

不安定な蛋白質分子の貯蔵問題に対する実際的な解決策はほとんど提案されていない。従って、容易に調剤できる、好ましくは、貯蔵後の操作を最小限しか必要としない単純な処方をもつ、蛋白質治療用分子の安定化された持続性のある処方が必要とされている。

【０００６】

インビボで投与する場合、天然状態または組換えにより産生された治療用蛋白質、例えばインターフェロンおよび成長ホルモンは、血流からの迅速なクリアランスに起因して短い血漿安定性を示す。従って、これらの蛋白質により提供される治療効果も短命である。故に、インビボにおいてそれらの所望の治療効果を維持するためには、これらの蛋白質の血液からの迅速なクリアランスにより、治療用分子をより頻繁またはより高用量で投与する必要がある。しかし、治療用蛋白質を投与するための用量スケジュールを増大することは、多くの場合、注入部位反応、副作用および毒性の増大を患者にもたらす。同様に、高用量での治療用蛋白質の投与も、一般的に、毒性および副作用の増大を患者にもたらす。

【０００７】

化学コンジュゲーションを含む、提案されている治療用分子の血漿安定性を増大させるためのわずかな実際的な解決策は、患者に限定的な利点を提供している。一般的に、ほとんどの場合、これらの化学修飾された治療用分子は頻繁な用量スケジュールに基づいてなお投与され、注入部位反応、副作用および毒性を患者に与え続ける。従って、天然または組換えにより産生された治療剤単独よりも高いインビボ血漿安定性を保持し、およびより少ない頻度での投与を可能にし、それにより患者への潜在的な副作用を軽減する安定化された形態の治療用分子が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

（発明の概要）

本発明は、アルブミンまたはアルブミンの断片（部分）もしくは変異体に融合させた治療用蛋白質（例えば、ポリペプチド、抗体またはペプチド、またはその断片もしくは変異体）を含むアルブミン融合蛋白質を包含する。本発明は、アルブミンまたはアルブミンの断片（部分）もしくは変異体に融合させた治療用蛋白質（例えば、ポリペプチド、抗体、またはペプチド、またはその断片もしくは変異体）をコードする核酸分子を含むまたはそれからなるポリヌクレオチドも包含する。本発明は、非融合状態の治療用蛋白質の血漿安定性と比べて、治療用蛋白質の貯蔵寿命を延長し、治療用蛋白質の血漿安定性を増大させ、および／またはインビトロおよび／またはインビボにおいて治療用蛋白質および／または溶液中（または医薬組成物中）でのその活性を安定化するのに十分なアルブミンまたはアルブミンの断片（部分）もしくは変異体に融合させた治療用蛋白質（例えば、ポリペプチド、抗体、またはペプチド、またはその断片もしくは変異体）を含む蛋白質をコードする核酸分子を含む或いはそれからなるポリヌクレオチドも包含する。本発明のポリヌクレオチドによりコードされるアルブミン融合蛋白質も本発明に含まれ、同様に、本発明のポリヌクレオチドを用いて形質転換させた宿主細胞ならびに本発明のアルブミン融合蛋白質の調製方法および本発明のこれらのポリヌクレオチドおよび／または宿主細胞の使用方法も本発明に含まれる。

【０００９】

本発明の好ましい一の態様において、アルブミン融合蛋白質は、表２に記載のものおよびかかる蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含むが、これらに限定されない。

【００１０】

本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質および医薬上許容される希釈剤または担体を含む医薬処方も包含する。かかる処方はキットまたは容器中にあってもよい。かかるキットまたは容器は、延長された貯蔵寿命の治療用蛋白質に添付された使用説明書と一緒にパッケージされていてもよい。かかる処方は、患者、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトにおいて疾患または疾患徴候を処置、予防、改善または診断する方法であって、患者へ該医薬処方を投与する段階を含む方法において用いられてもよい。

【００１１】

他の実施態様において、本発明は、疾患または障害の予防、処置または改善方法を包含する。好ましい実施態様において、本発明は、表１の「好適な適応症：Ｙ」の欄に挙げた疾患または障害の処置方法を含み、該方法は、かかる処置、予防または緩和が所望される患者に、疾患または障害を処置、予防または改善するために有効な量で、（表１の「好適な適応症：Ｙ」の欄に挙げた処置すべき疾患または障害と同じ列にある）表１の「治療用蛋白質：Ｘ」の欄に開示した治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）に相当する治療用蛋白質または部分を含む本発明のアルブミン融合蛋白質を投与することを含む。

【００１２】

一の実施態様において、表１または２に記載のアルブミン融合蛋白質は延長された貯蔵寿命を有する。

【００１３】

第２の一の実施態様において、表１または２に記載のアルブミン融合蛋白質は、表１に記載の対応する非融合治療用分子よりも安定である。

【００１４】

本発明は、本発明の核酸分子（表１および２に記載のポリヌクレオチドを含むが、これらに限定されない）を含むよう修飾された、好ましくは本発明のアルブミン融合蛋白質を発現するよう修飾されたトランスジェニック生物をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】図１Ａ－Ｄは、ヒトアルブミン（配列番号：１）の成熟形態のアミノ酸配列およびそれをコードするポリヌクレオチド（配列番号：２）を示す。配列番号：２のヌクレオチド１～１７５５はヒトアルブミンの成熟形態（配列番号：１）をコードする。

【００１６】

【図２】図２は、ｐＰＰＣ０００５クローニングベクターＡＴＣＣ寄託ＰＴＡ－３２７８の制限地図を示す。
【００１７】
【図３】図３は、ｐＳＡＣ３５パン酵母（ｙｅａｓｔ　Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクター（Ｓｌｅｅｐら．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８：４２（１９９０））の制限地図を示す。
【００１８】
【図４】図４は、ＩＳＲＥ－ＳＥＡＰ／２９３Ｆレポーター細胞（実施例７６を参照のこと）における、ＳＥＡＰ活性への、ＣＩＤ２０１１および２０５３に含まれるＤＮＡによりコードされるＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質の様々な希釈効果を示す。蛋白質をＤＭＥＭ／１０％のＦＢＳ中、５ｅ－７ないし１ｅ－１４ｇ／ｍｌで段階希釈し、次いで、これを用いて、ＩＳＲＥ－ＳＥＡＰ／２９３Ｆレポーター細胞を処理した。２４時間後、レポーター細胞から上清を除き、次いで、ＳＥＡＰ活性についてアッセイした。ＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質を３つの安定なクローン：２９３Ｆ／＃；２０１１、ＣＨＯ／＃；２０１１およびＮＳＯ／＃；２０５３から精製した。哺乳類由来のＩＦＮｂ，Ａｖｏｎｅｘは Ｂｉｏｇｅｎから得、および２．０ｅ５　ＩＵ／ｕｇの特異的活性を有することが報告された。
【００１９】
【図５】図５は、Ｈｓ２９４Ｔメラノーマ細胞への、ＣＩＤ３１６５（ＣＩＤ３１６５蛋白質）によりコードされたＩＦＮアルブミン融合蛋白質と組換えＩＦＮａ（ｒＩＦＮａ）の抗－増殖活性を比較する。様々な濃度のＣＩＤ３１６５蛋白質またはＩＦＮａのいずれかと一緒に細胞を培養し、次いで、培養の３日後に、ＢｒｄＵ取り込みにより増殖を測定した。ＣＩＤ３１６５蛋白質は、１０ｎｇ／ｍｌより高い濃度で細胞増殖の測定可能な阻害を惹起し、約２００ｎｇ／ｍｌにおいて５０％阻害を示した。（■）＝ＣＩＤ３１６５蛋白質、（◆）＝ｒＩＦＮａ
【００２０】
【図６】図６は、ＩＳＲＥ－ＳＥＡＰ／２９３Ｆレポーター細胞における、ＳＥＡＰ活性への、ＩＦＮａアルブミン融合蛋白質の様々な希釈効果を示す。アルブミン（◆）の上流に融合されたＩＦＮａの一調製物ならびにアルブミン（●）および（■）の下流に融合されたＩＦＮａの２つの異なる調製物を試験した。
【００２１】
【図７】図７は、処置したサル（実施例７８を参照のこと）における、ＯＡＳ（ｐ４１）のｍＲＮＡレベルへの、コンストラクト２２４９（ＣＩＤ２２４９蛋白質）に含まれるＤＮＡによりコードされるＩＦＮａアルブミン融合蛋白質の時間および用量効果を示す。各時間ポイントにつき：一番目の棒＝ビヒクル対照、二番目の棒＝３０ｕｇ／ｋｇ　ＣＩＤ２２４９蛋白質、１日目、静脈内、三番目の棒＝３０ｕｇ／ｋｇ　ＣＩＤ２２４９蛋白質、１日目、皮下、四番目の棒＝３００ｕｇ／ｋｇ　ＣＩＤ２２４９蛋白質、１日目、皮下、五番目の棒＝４０ｕｇ／ｋｇ　組換えＩＦＮａ、１、３および５日目、皮下。
【００２２】
【図８】図８は、ＮＰＲ－Ａ／２９３Ｆレポーター細胞（実施例８０および８１を参照のこと）における、活性化ｃＧＭＰ成分についての、コンストラクトＣＩＤ３６９１および３６１８（ＣＩＤ３６９１および３６１８蛋白質）に含まれるＤＮＡによりコードされるＢＮＰアルブミン融合蛋白質の用量－応答関係を示す。組換えＢＮＰ（■）ならびにアルブミン（□）および（●）の上流に融合されたＢＮＰの２つの異なる調製物を共に試験した。
【００２３】
【図９】図９は、自然発生的な高血圧ラット（実施例８０を参照のこと）における平均動脈圧へのＢＮＰアルブミン融合蛋白質の効果を示す。ビヒクル（□）、組換えＢＮＰ蛋白質（●）またはＢＮＰアルブミン融合蛋白質（○）を尾部への静脈内注入により投与した。ｃｕｆｆ－ｔａｉｌ法により、尾部の収縮期血圧および拡張期血圧を記録した。

【００２４】
【図１０】図１０は、組換えＢＮＰ蛋白質（●）またはＢＮＰアルブミン融合蛋白質（○）（実施例８０を参照のこと）の静脈内注入した後の、１１～１２週齢の雄のＣ５７／ＢＬ６マウスにおける血漿ｃＧＭＰレベルを示す。静脈内注入後の幾つかの時間ポイントにて集めた尾部の血液から調製した血漿から、ｃＧＭＰレベルを測定した。
【００２５】
【図１１】図１１は、タンデムＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）２×－ＨＳＡ融合物（ＣＩＤ３６１０）（■）、モノマーＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡ融合物（△）またはＨＳＡ単独（●）の１回投与から２４時間後の、約８週齢の空腹の糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスにおける血液グルコースレベルを示す。経口グルコース負荷試験により、血液グルコースレベルを測定した。意外なことに、約８週齢の空腹の糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスにおける１回投与から２４時間後に、タンデムＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）２×－ＨＳＡ融合物（ＣＩＤ３６１０）（◇）は、モノマーＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡ融合物（△）よりも強いグルコース正常化活性を有した。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
（詳細な記載）
（定義）
本明細書を通して用いる特定の用語の理解を容易にするために、以下に定義する。
【００２７】
本明細書中用いる「ポリヌクレオチド」は、少なくとも１つの治療用蛋白質Ｘ（またはその断片もしくは変異体）のフレーム内に連結させたアルブミン（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子を含む或いはそれからなる融合蛋白質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子；配列番号：Ｙのアミノ酸配列（表２の欄６に記載のような）またはその断片もしくは変異体を含む或いはそれからなる融合蛋白質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子；配列番号：Ｘにて示される配列を含む或いはそれからなるヌクレオチド配列を有する核酸分子；配列番号：Ｚのアミノ酸配列を含む或いはそれからなる融合蛋白質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子；表２または実施例において記載のように産生される本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子；本発明の治療用アルブミン融合蛋白質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子；表２に記載のアルブミン融合コンストラクト中に含まれるヌクレオチド配列を有する核酸分子；または（表３に記載のような）ＡＴＣＣに寄託されたアルブミン融合コンストラクトに含まれるヌクレオチド配列を有する核酸分子を言う。
【００２８】
本明細書中用いる「アルブミン融合コンストラクト」は、治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドのフレーム内に連結させたアルブミン（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードするポリヌクレオチドを含む或いはそれからなる核酸分子含む或いはそれからなる核酸分子；表２または実施例に記載のように産生された治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドのフレーム内に連結させたアルブミン（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードするポリヌクレオチドを含む或いはそれからなる核酸分子；または治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドのフレーム内に連結されたアルブミン（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードするポリヌクレオチドを含む或いはそれからなり、例えば、１またはそれ以上の以下のエレメント：（１）自己複製機能ベクター（シャトルベクター、発現ベクター、組み込みベクターおよび／または複製系を含むが、これらに限定されない）、（２）転写開始領域（例えば、制御または誘導プロモーター、構成的プロモーターのごときプロモーター領域）、（３）転写終結領域、（４）リーダー配列および（５）選択マーカー：をさらに含む核酸分子を言う。治療用蛋白

質およびアルブミン蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、アルブミン融合コンストラクトの部分ならば、それぞれアルブミン融合コンストラクトの「部分」「領域」または「一部」と言われてもよい。

【００２９】

本発明は一般的に、アルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド；アルブミン融合蛋白質；およびアルブミン融合蛋白質またはアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いた、疾患もしくは障害の処置、予防または改善方法に関する。本明細書中用いる「アルブミン融合蛋白質」は、治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子に対してアルブミン（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子を融合することにより形成された蛋白質を言う。本発明のアルブミン融合蛋白質は、治療用蛋白質の少なくとも１つの断片もしくは変異体およびヒト血清アルブミンの少なくとも１つの断片もしくは変異体を含み、それらは遺伝学的融合により互いに結合される（すなわち、アルブミン融合蛋白質は核酸の翻訳により産生され、ここで、治療用蛋白質の全てまたは部分をコードするポリヌクレオチドは、アルブミンの全てまたは部分をコードするポリヌクレオチドのフレーム内に連結されている）。治療用蛋白質およびアルブミン蛋白質は、アルブミン融合蛋白質の部分ならば、それぞれアルブミン融合蛋白質の「部分」、「領域」または「一部」（例えば、「治療用蛋白質部分」または「アルブミン蛋白質部分」）と言われてもよい。非常に好ましい一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、治療用蛋白質Ｘの少なくとも１つの分子またはその断片もしくは変異体（成熟形態の治療用蛋白質Ｘを含むが、これに限定されない）およびアルブミンの少なくとも１つの分子またはその断片もしくは変異体（アルブミンの成熟形態を含むが、これに限定されない）を含む。

【００３０】

さらに好ましい一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、宿主細胞によりプロセッシングされ、そして周囲の培養培地中に分泌される。発現のために用いられる宿主の分泌経路において生じる新生アルブミン融合蛋白質のプロセッシングは、シグナルペプチド開裂；ジスルフィド結合の形成；適切なフォールディング；糖の付加およびプロセッシング（例えば、Ｎ－およびＯ－結合したグリコシル化のごとき）；特異的な蛋白質分解的切断；および多量体蛋白質へのアセンブリを含んでもよいが、これらに限定されない。好ましくは、本発明のアルブミン融合蛋白質はプロセッシングされた形態である。最も好ましい一の実施態様において、「プロセッシングされた形態のアルブミン融合蛋白質」は、Ｎ－末端シグナルペプチド開裂を受けたアルブミン融合蛋白質産物を言い、本明細書中、「成熟アルブミン融合蛋白質」とも言う。

【００３１】

幾つかの場合、本発明のアルブミン融合コンストラクトを含む典型的なクローンを、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（以後、「ＡＴＣＣ（登録商標）」と言う）に寄託した。さらに、当該技術分野において知られているおよび本明細書に別記されている技法により、該寄託物から特定のアルブミン融合コンストラクトを回収することが可能である。ＡＴＣＣ（登録商標）は、１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ ２０１１０－ ２２０９，ＵＳＡに位置する。ＡＴＣＣ（登録商標）寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の条項に準ずる。

【００３２】

一の実施態様において、本発明は、治療用蛋白質および血清アルブミン蛋白質を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを提供する。さらなる一の実施態様において、本発明は、治療用蛋白質および血清アルブミン蛋白質を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。好ましい一の実施態様において、本発明は、表２に記載のポリヌクレオチドによりコードされる治療用蛋白質および血清アルブミン蛋白質を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。さらに好ましい一の実施態様において、本発明は、その配列が表２の配列番号：Ｙとして示されてい

るアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを提供する。他の実施態様において、本発明は、治療用蛋白質および血清アルブミン蛋白質の生物活性および／または治療活性のある断片を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。他の実施態様において、本発明は、治療用蛋白質および血清アルブミン蛋白質の生物活性および／または治療活性のある変異体を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。好ましい実施態様において、アルブミン融合蛋白質の血清アルブミン蛋白質成分は、血清アルブミンの成熟部分である。本発明はこれらのアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

【００３３】

さらなる実施態様において、本発明は、治療用蛋白質および血清アルブミンの生物活性および／または治療活性のある断片を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。さらなる実施態様において、本発明は、治療用蛋白質および血清アルブミンの生物活性および／または治療活性のある変異体を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。好ましい実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分は、治療用蛋白質の成熟部分である。さらに好ましい一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分は、治療用蛋白質の細胞外可溶性ドメインである。別の一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分は、治療用蛋白質の活性形態である。本発明は、これらのアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

【００３４】

さらなる実施態様において、本発明は、治療用蛋白質の生物活性および／または治療活性のある断片もしくは変異体および血清アルブミンの生物活性および／または治療活性のある断片もしくは変異体を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。好ましい実施態様において、本発明は、治療用蛋白質の成熟部分および血清アルブミンの成熟部分を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。本発明は、これらのアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

【００３５】

治療用蛋白質

上記のように、本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは遺伝学的融合により互いに連結されている、治療用蛋白質の少なくとも１つの断片もしくは変異体およびヒト血清アルブミンの少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む或いはそれからなる蛋白質をコードする。

【００３６】

さらなる一の実施態様は、化学コンジュゲーションにより互いに連結されている、治療用蛋白質の少なくとも１つの断片もしくは変異体およびヒト血清アルブミンの少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む或いはそれからなる蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含む。

【００３７】

本明細書中用いる「治療用蛋白質」は、１またはそれ以上の治療活性および／または生物活性を有する蛋白質、ポリペプチド、抗体、ペプチドまたはその断片もしくは変異体を言う。本発明に包含される治療用蛋白質は、蛋白質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、および生物製剤（ペプチド、蛋白質、およびポリペプチドなる用語は本明細書中、同義的に用いられる）を含むが、これらに限定されない。用語「治療用蛋白質」が抗体およびその断片および変異体を含むことが特に熟慮される。故に、本発明の蛋白質は、治療用蛋白質の少なくとも１つの断片もしくは変異体および／または抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含んでもよい。さらに、用語「治療用蛋白質」は、治療用蛋白質の内在性または天然に存在する対応物に言及してもよい。

【００３８】

「治療活性」を示すポリペプチドまたは「治療上活性」のある蛋白質により、本明細書中に記載されているまたは当該技術分野において知られている１またはそれ以上の治療用

蛋白質のごとき治療用蛋白質に関連する１またはそれ以上の知られている生物活性および／または治療活性を有するポリペプチドが意味される。例えば、「治療用蛋白質」は、疾患、状態または障害の処置、予防または改善に有用な蛋白質であるが、これらに限定されない。非限定的な例として、「治療用蛋白質」は、特定の細胞型（正常な（例えばリンパ球）または異常な（例えば癌細胞））に特異的に結合してもよく、それ故に、化合物（薬剤または細胞傷害性剤）をその細胞型へ特異的にターゲッティングするために用いてもよい。

【００３９】

例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質に含まれてもよい「治療用蛋白質」部分の非包括的なリストには、ＧＬＰ－Ｉ、ＧＬＰ－２、ＰＡＣＡＰ－２７、ＰＡＣＡＰ－２８、ＶＩＰ、ＣＤ４Ｍ３３、セクレチン、グリセンチン、オキシントモジュリン、ＰＨＭ、ＩＦＮａ、ＩＦＮｐ、ＡＮＰ、ＢＮＰ、ＮＧＦ、ＢＤＮＦ、ＧＤＮＦおよびソマトスタチンが含まれるが、これらに限定されない。

【００４０】

インターフェロンハイブリッドはアルブミンのアミノまたはカルボキシ末端に融合されて、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質を形成してもよい。インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質は、インターフェロン活性、例えば、抗ウイルス応答、細胞成長の調節および免疫応答の調節（Ｌｅｂｌｅｕら．，ＰＮＡＳＵＳＡ，７３：３１０７－３１１１（１９７６）；Ｇｒｅｓｓｅｒら．，Ｎａｔｕｒｅ，２５１：５４３－５４５（１９７４）；およびＪｏｈｎｓｏｎ，Ｔｅｘａｓ Ｒｅｐｏｒｔｓ Ｂｉｏｌ Ｍｅｄ，３５：３５７－３６９（１９７７））を亢進或いは抑制してもよい。各インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質は、ウイルス感染（例えば、肝炎（例えばＨＣＶ）；またはＨＩＶ）、多発性硬化症または癌を処置、予防または改善するために用いられ得る。

【００４１】

一の実施態様において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のインターフェロンハイブリッド部分は、インターフェロンアルファ－インターフェロンアルファハイブリッド（本明細書中、アルファ－アルファハイブリッドと言う）を含む。例えば、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のアルファ－アルファハイブリッド部分は、インターフェロンアルファＤに融合されたインターフェロンアルファＡからなる或いはそれを含む。さらなる一の実施態様において、Ａ／Ｄハイブリッドは、一般的なＢｇｌＩＩ制限部位にてインターフェロンアルファＤに融合し、ここで、Ａ／ＤハイブリッドのＮ－末端部分はインターフェロンアルファＡのアミノ酸１～６２に対応し、およびＣ－末端部分はインターフェロンアルファＤのアミノ酸６４～１６６に対応する。例えば、このＡ／Ｄハイブリッドはアミノ酸配列：

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRX$_1$ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNX$_2$DSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE（配列番号：９９）、ここで、Ｘ$_1$はＲまたはＫであり、およびＸ$_2$はＡまたはＶである（例えばコンストラクト番号；２８７５を参照のこと）：

を含み得る。さらなる一の実施態様において、Ａ／ＤハイブリッドはＰｖｕＩＩ制限部位に融合され、ここで、Ａ／ＤハイブリッドのＮ－末端部分はインターフェロンアルファＡのアミノ酸１～９１に対応し、およびＣ－末端部分はインターフェロンアルファＤのアミノ酸９３～１６６に対応する。例えば、このＡ／Ｄハイブリッドはアミノ酸配列：

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRX$_1$ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNX$_2$DSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE（配列番号：１００）、ここで、Ｘ$_1$はＲまたはＫであり、および第２のＸ$_2$はＡまたはＶである（例えば、コンストラクト番号；２８７２を参照のこと）：

を含み得る。これらのハイブリッドは米国特許第４，４１４，５１０号にさらに記載されており、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【００４２】
さらなる一の実施態様において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のアルファ－アルファハイブリッド部分は、インターフェロンアルファＦに融合されたインターフェロンアルファＡからなる或いはそれを含む。さらなる一の実施態様において、Ａ／Ｆハイブリッドは、一般的なＰｖｕＩＩＩ制限部位にて融合され、ここで、Ａ／ＦハイブリッドのＮ－末端部分はインターフェロンアルファＡのアミノ酸１～９１に対応し、およびＣ－末端部分はインターフェロンアルファＦのアミノ酸９３～１６６に対応する。例えば、このＡ／Ｆハイブリッドはアミノ酸配列：
CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRXISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETL
LDKFYTELYQQLNDMEACVIQEVGVEETPLMNVDSILAVKKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSKIFQER
LRRKE（配列番号：１０１）、ここで、X_1はＲまたはＫのいずれかである（例えば、コンストラクト番号；２８７４を参照のこと）：
を含み得る。これらのハイブリッドは米国特許第４，４１４，５１０号にさらに記載されており、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。さらなる一の実施態様において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のアルファ－アルファハイブリッド部分は、インターフェロンアルファＢに融合されたインターフェロンアルファＡからなる或いはそれを含む。さらなる一の実施態様において、Ａ／Ｂハイブリッドは一般的なＰｖｕＩＩＩ制限部位にて融合され、ここで、Ａ／ＢハイブリッドのＮ－末端部分はインターフェロンアルファＡのアミノ酸１～９１に対応し、およびＣ－末端部分はインターフェロンアルファＢのアミノ酸９３～１６６に対応する。例えば、このＡ／Ｂハイブリッドはアミノ酸配列：
CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRX$_1$ISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET
LLDKFYTELYQQLNDLEX$_{2\ x\ 3}$X$_4$X$_5$QEVGVIESPLMYEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSSCAWEVVRAEIMRSFSL
SINLQKRLKSKE（配列番号：１０２）、ここで、X_1はＲまたはＫであり、およびX_2～X_5はＳＣＶＭまたはＶＬＣＤである（例えば、コンストラクト番号；２８７３を参照のこと）：
を含み得る。これらのハイブリッドは米国特許第４，４１４，５１０号にさらに記載されており該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【００４３】
別の実施態様において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のインターフェロンハイブリッド部分はインターフェロンベーターインターフェロンアルファハイブリッド（本明細書中、ベーターアルファハイブリッドと言う）を含む。例えば、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のベーターアルファハイブリッド部分は、インターフェロンアルファＤ（インターフェロンアルファ－１とも言う）に融合されたインターフェロンベーター１からなる或いはそれを含む。さらなる一の実施態様において、ベーター１／アルファＤハイブリッドは融合され、ここで、そのＮ－末端部分はインターフェロンベーター１のアミノ酸１～７３に対応し、およびそのＣ－末端部分はインターフェロンアルファＤのアミノ酸７４～１６７に対応する。例えば、このベーター１／アルファＤハイブリッドはアミノ酸配列：
MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSAAWDE
DLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNXDSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQ
ERLRRKE（配列番号：１０３）、ここで、X_1はＡまたはＶである：
を含み得る。これらのハイブリッドは米国特許第４，７５８，４２８号にさらに記載されており、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【００４４】
別の実施態様において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のインターフェロンハイブリッド部分は、インターフェロンアルファ－インターフェロンベータハイブリッド（本明細書中、アルファ－ベータハイブリッドと言う）を含む。例えば、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のアルファ－ベータハイブリッド部分は、インターフェロンベーター１に融合されたインターフェロンアルファＤ（インターフェ

ロンアルファ－１とも言う）からなる或いはそれを含む。さらなる一の実施態様において、アルファＤ／ベーター１ハイブリッドは融合され、ここで、そのＮ－末端部分はインターフェロンアルファＤのアミノ酸１～７３に対応し、およびそのＣ－末端部分はインターフェロンベーター１のアミノ酸７４～１６６に対応する。例えば、このアルファＤ／ベーター１ハイブリッドはアミノ酸配列：
MCDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSSTGWN
ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRL
TGYLRN（配列番号：１０４）：
を含み得る。これらのハイブリッドは米国特許第４，７５８，４２８号にさらに記載されており、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【００４５】

さらなる実施態様において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のインターフェロンハイブリッド部分は、アルファ－アルファインターフェロンハイブリッド、アルファ－ベータインターフェロンハイブリッドおよびベーターアルファインターフェロンハイブリッドのさらなる組み合わせを含んでもよい。さらなる実施態様において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質のインターフェロンハイブリッド部分は、インターフェロンハイブリッドのアミノ酸配列に対して置換、欠失または付加を含むように修飾されてもよい。インターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質に対するかかる修飾は、例えば、産生レベルを改善する、安定性を増大させる、活性を増大または減少させる、または新たな生物学的特性を付与するように、なされてもよい。

【００４６】

上記したインターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞およびベクターと同様に、本発明に含まれる。一の実施態様において、上記したようなポリヌクレオチドによりコードされるインターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質は、延長された貯蔵寿命を有する。さらなる一の実施態様において、上記したようなポリヌクレオチドによりコードされるインターフェロンハイブリッドアルブミン融合蛋白質は、インビトロおよび／またはインビボにて、対応する非融合インターフェロンハイブリッド分子よりも、溶液中（または医薬処方中）においてより長い血清半減期および／またはより安定な活性を有する。

【００４７】

別の非限定的な実施例において、「治療用蛋白質」は、生物活性および特に疾患の処置、予防または改善に有用な生物活性を有する蛋白質である。治療用蛋白質により保有されてもよい生物活性の非包括的なリストには、細胞のＨＩＶ－１感染の阻害、腸上皮細胞増殖の刺激、腸上皮細胞透過性の減少、インスリン分泌の刺激、気管支拡張および血管拡張の誘導、アルドステロンおよびレニン分泌の阻害、血圧調節、ニューロン成長の促進、免疫応答の亢進、炎症亢進、食欲抑制、または以下の「生物活性」のセクションに記載されるおよび／または表１（欄２）の特定の治療用蛋白質について開示される任意の１またはそれ以上の生物活性が含まれる。

【００４８】

一の実施態様において、ＩＦＮ－ベーターＨＳＡ融合物は、エボラウイルスおよびＳＡＲＳウイルス（トロント－２菌株）の活性を阻害するために用いられる。例えば、成熟ＨＳＡ（ＣＩＤ２０５３蛋白質）の上流に融合されたＩＦＮ－ベータのインビトロ抗ウイルス活性は、ベロ細胞においてエボラウイルスおよびＳＡＲＳウイルスに対抗することが評価された。これらの細胞を用いて、細胞変性効果（ＣＰＥ）の阻害に基づくＣＩＤ２０５３蛋白質の保護効果を評価し、および細胞生存率ニュートラルレッドアッセイを行った。遺伝子発現を分析することにより、インビトロでのシグナル伝達を評価した。さらに、ＣＩＤ２０５３蛋白質の薬物動態および薬動力学をアカゲザルにおいて評価した。その結果は、好ましい安全性指標を伴って強力なインビトロ抗ウイルス活性が成し遂げられることを示す。ＣＩＤ２０５３蛋白質についてのＩＣ５０は、エボラウイルスに対しては０．４ｎｇ／ｍｌ、およびＳＡＲＳウイルスに対しては２ｎｇ／ｍｌだった。アレイ分析は、Ｃ

ＩＤ２０５３蛋白質およびＩＦＮ－ベータが、遺伝子の類似するセットの発現を誘導し、およびＩＦＮ刺激応答エレメント（ＩＳＲＥ）のシグナル伝達経路を引き起こすことを示した。５０ｕｇ／ｋｇＩＶまたはＳＣまたは３００ｕｇ／ｋｇＳＣ用量のＣＩＤ２０５３蛋白質を投与されたアカゲザルにおいて、終末半減期は３６－４０時間だった。ＣＩＤ２０５３蛋白質の投与は、血清ネオプテリンレベルおよびＯＡＳ　Ｉ　ｍＲＮＡ発現における持続的な増大を誘導した。

【００４９】

さらなる一の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物を用いて、カテゴリーＡ－フィロ（エボラ）、アレナ（Ｐｉｃｈｅｎｄｅ）、カテゴリーＢ－トガ（ＶＥＥ）またはカテゴリーＣ－ブンヤ（Ｐｕｎｔｏ　ｔｏｒｏ）、フラビ（黄熱病、ウエスト・ナイル）に分類されるウイルス物質を阻害する。例えば、ＣＰＥ阻害、ニュートラルレッド染色およびウイルス産生アッセイを用いて、ＨＳＡ（ＣＩＤ３１６５蛋白質）の下流に融合されたＩＮＦ－アルファの抗ウイルス活性を評価した。カニクイザルおよびヒト対象においてＣＩＤ３１６５蛋白質の薬物動態および薬動力学活性を評価した。結果は、好ましい安全性指標を伴って評価した全てのＲＮＡウイルスに対抗する抗ウイルス活性が成し遂げられたことを示す。ＣＰＥアッセイにおいてＩＣ５０スコアは＜０．１ｎｇ／ｍｌ（Ｐｕｎｔａ　ＴｏｒｏＡ）～１９ｎｇ／ｍｌ（ＶＥＥ）だった。カニクイザルにおいて、ＣＩＤ３１６５蛋白質の半減期は９０時間であり、および投与から最高１４日後まで検出可能だった。ヒト対象において、ＣＩＤ３１６５蛋白質は安全であり、かつ十分に許容された。１回注入投与後のC_{max}は用量に比例した。５００ｕｇのコホートにおける平均C_{max}は２２ｎｇ／ｍｌであり、および平均$t_{1/2}$は１５０時間だった。２～４週ごとまたはそれ以上に１回の投与が薬物動態により支持される。１回注入のコホート（１２０－５００ｕｇ）の大部分の対象において、Ｃ型肝炎に対抗する抗ウイルス応答が観察された。

【００５０】

さらなる一の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物を用いて、慢性Ｃ型肝炎感染（ＨＣＶ）を有する患者を処置する。インターフェロンαまたは白血球インターフェロンとしても知られているインターフェロンアルファは、ＨＣＶに感染した患者を処置するための処置基準である。用語「インターフェロンアルファ」は、抗－ウイルス活性を有するポリペプチドに関連した高度に相同なファミリーを言う。ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物のインターフェロンアルファ部分は、当該技術分野において知られている任意のインターフェロンアルファまたは断片からなる或いはそれを含む。本発明に包含されるインターフェロンアルファの非限定的な例は、表１の治療用蛋白質の欄に開示されるインターフェロンアルファ蛋白質を含むが、これらに限定されない。特定の実施態様において、インターフェロンアルファ部分は、インターフェロンアルファ－２ａ、インターフェロンアルファ－２ｂ、インターフェロンアルファ－２ｃ、コンセンサスインターフェロン、インターフェロンアルファコン－１、インターフェロンアルファ－ｎｌ、インターフェロンアルファ－ｎ３、インターフェロンアルファの任意の市販されている形態、例えば、ＩＮＴＲＯ（登録商標）Ａ（Ｓｃｈｅｒｉｎｇ　Ｃｏｒｐ．，Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，Ｎ．Ｊ．）、ＲＯＦＥＲＯＮ（登録商標）Ａ（Ｈｏｆｆｍａｎ－Ｌａ　Ｒｏｃｈｅ，Ｎｕｔｌｅｙ，Ｎ．Ｊ．）、Ｂｅｒｏｆｏｒアルファインターフェロン（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｉｎｇｅｌｈｅｉｍ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ，Ｉｎｃ．，Ｒｉｄｇｅｆｉｅｄ，Ｃｏｎｎ．）、ＯＭＮＩＦＥＲＯＮ（登録商標）（Ｖｉｒａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，Ｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，ＦＬ）、ＭＵＬＴＩＦＥＲＯＮ（登録商標）（Ｖｉｒａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，Ｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，ＦＬ）ＷＥＬＬＦＥＲＯＮ（登録商標）（ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ，Ｌｏｎｄｏｎ，Ｇｒｅａｔ　Ｂｒｉｔｉａｎ）、ＩＮＦＥＲＧＥＮ（登録商標）（Ａｍｇｅｎ，Ｉｎｃ．，Ｔｈｏｕｓａｎｄｓ　Ｏａｋｓ，ＣＡ）、ＳＵＭＩＦＥＲＯＮ（登録商標）（Ｓｕｍｉｔｏｍｏ，Ｊａｐａｎ）、ＢＥＬＥＲＯＦＯＮ（登録商標）（Ｎａｕｔｉｌｕｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｆｒａｎｃｅ）または任意の精製インターフェロンアルファ産物またはその断片からなる或いはそれらを含む。さらなる実施態様におい

て、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物蛋白質のインターフェロンアルファ部分は、化学的部分の結合により修飾されてもよい。例えば、インターフェロンアルファ部分はペグ化により修飾されてもよい。従って、さらなる実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物蛋白質のインターフェロンアルファ部分は、インターフェロンアルファ－２ａ、２ｂ、またはコンセンサスインターフェロンのペグ化形態からなる或いはそれを含み、そして市販されているペグ化インターフェロンアルファ、例えば、ＰＥＧ－ＩＮＴＲＯＮ（登録商標）（Ｓｃｈｅｒｉｎｇ Ｃｏｒｐ．，Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，Ｎ．Ｊ．）、ＰＥＧＡＳＹＳ（登録商標）（Ｈｏｆｆｍａｎ－Ｌａ Ｒｏｃｈｅ，Ｎｕｔｌｅｙ，Ｎ．Ｊ．）、ＰＥＧ－ＯＭＮＩＦＥＲＯＮ（登録商標）（Ｖｉｒａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，Ｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，ＦＬ）またはその断片を含むが、これらに限定されない。しかし、本明細書中用いる「ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ」融合は、当該技術分野において知られている任意のインターフェロンアルファ蛋白質に融合されたＨＳＡまたはその断片を言う。

【００５１】

ＨＣＶに感染した患者は、ＨＣＶ感染を処置するためにインターフェロン療法を事前に受けたか否かに基づいて２つのカテゴリーに分類される。「無処置患者」は、インターフェロン療法を用いた処置を未だ受けていない患者である。「処置患者」は、インターフェロン療法を用いた処置を受けたまたは現在受けている患者である。「非応答患者」は、インターフェロン療法を用いた処置を事前に受けたが、早期のウイルス量減少（ＥＶＲ）または処置終了時の応答（ＥＴＲ）のごとき処置の主要なエンドポイントを満たさなかった処置患者である。しかし、本明細書中用いる「ＨＣＶ患者」はＨＣＶに感染している患者を言い、かつ、無処置患者、処置患者または非応答患者のいずれかを言う。

【００５２】

加えて、Ｃ型肝炎ウイルスは４つの遺伝子型、遺伝子型１、２、３または４に分類できる。一般的に、ＨＣＶ患者に感染するＣ型肝炎ウイルスは単一の遺伝子型を含む。しかし、該肝炎ウイルスは、２またはそれ以上の遺伝子型の組み合わせを含み得る。加えて、Ｃ型肝炎ウイルスの遺伝子型は、既知のＨＣＶ遺伝子型の１つの変異体であってもよい。さらなる一の実施態様において、ＨＣＶ患者のＣ型肝炎ウイルスは遺伝子型Ｉまたはその変異体である。しかし、本明細書中用いる「ＨＣＶ」は、任意の遺伝子型もしくはそれらの組み合わせまたは変異体のＣ型肝炎ウイルスを言う。

【００５３】

ＨＣＶを伴う患者についての標準的な処置療法は、リバビリンのごとき抗ウイルス剤と組み合わせたインターフェロンアルファを用いた処置を含む。一般的に、インターフェロンアルファは、毎日、１週間に２回または１週間に１回投与され、およびリバビリンは毎日投与される。しかし、最近の研究は、ＨＣＶの処置のために当該技術分野において知られている他の抗ウイルス剤と組み合わせて、インターフェロンアルファも用いた。故に、さらなる一の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物は、単独または例えばリバビリンのごとき抗ウイルス剤と組み合わせてＨＣＶ患者へ投与されてもよい。

【００５４】

上記したように、ＣＩＤ３１６５蛋白質の薬物動態は２～４週ごとまたはそれ以上に１回という投与計画を支持する。故に、さらなる一の実施態様において、ＨＣＶ患者は、２～４週ごとに１回、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物を単独または有効量の抗ウイルス剤と組み合わせて投与することにより処置される。好ましい一の実施態様において、ＨＣＶ患者は、２～４週ごとに１回、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物をと組み合わせて有効量の抗ウイルス剤と組み合わせて投与することにより処置される。さらなる一の好ましい実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物は４週ごとに１回ＨＣＶ患者へ投与される。さらなる一の好ましい実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物は４週ごとに１回以上ＨＣＶ患者へ投与される。さらなる実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物は４週またはそれ以上に１回ＨＣＶ患者に投与され、ここで、該処置は有効量の抗ウイルス剤の投与も含む。

【００５５】

別の一の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物は、ＨＣＶの維持療法のために低用量の単独療法として用いられてもよい。さらなる一層の一の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物は、リバビリンおよびＨＣＶ処置のための１またはそれ以上の他の抗ウイルス剤と組み合わせて用いられてもよい。別法では、別の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物は、ＨＣＶの処置のためのリバビリン以外の１またはそれ以上の抗ウイルス剤と組み合わせて用いられてもよい。

【００５６】

さらなる一の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物は他のウイルス感染の処置のために用いられてもよい。例えば、一の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物はＢ型肝炎（ＨＢＶ）の処置のために用いられてもよい。さらなる一の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物はヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）の処置に用いられてもよい。さらなる一の実施態様において、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合物は、有毛細胞白血病、悪性メラノーマ、濾胞性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、ＡＩＤＳ関連カポジ肉腫、多発性骨髄腫または腎細胞癌を含むがこれらに限定されない癌の処置において用いられてもよい。

【００５７】

別の実施態様において、ＧＬＰ－１－ＨＳＡ融合物は、糖尿病患者における血液グルコースレベルを調節するために用いられる。さらなる一の実施態様において、野生型または変異ＧＬＰ－１のタンデム融合物が、糖尿病患者における血液グルコースレベルを調節するために用いられる。例えば、血液グルコースレベルを調節するモノマーＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡおよびタンデムＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡ（ＣＩＤ３６１０）融合物の能力を、約８週齢の糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスにおいて、ＧＬＰ－１－ＨＳＡ蛋白質を皮下注入した後の経口グルコース負荷試験（１グラムのグルコース／ｋｇ、強制経口）を利用して評価した。このグルコース負荷試験は、ＧＬＰ－１－ＨＳＡ融合物の皮下注入、次いで、１グラムのグルコース／ｋｇの強制経口投与から構成した。空腹の糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスに等モル用量（１００および１７１ｎｍｏｌ／ｋｇ）のモノマーまたはタンデムＧＬＰ－１－ＨＳＡ融合物蛋白質のいずれかを投与し、および／または経口グルコース負荷試験を１回投与の６または２４時間後に行った。非常に意外なことおよび予期しないことに、タンデムＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡ融合物（ＣＩＤ３６１０）は、モノマーＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡ融合物と比べて、注入６時間後に血液グルコースを有意に減少した。加えて、モノマーＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡおよびタンデムＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡ（ＣＩＤ３６１０）融合物の間の違いは、糖尿病ｄｂ／ｄｂマウスを注入２４時間後に評価した場合、より一層顕著だった。図１１に示すように、タンデムＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡ融合物（ＣＩＤ３６１０）（◇）は意外にも強力なグルコース－正常化活性を有し、一方で、単一のＧＬＰ－１（７－３６Ａ８Ｇ）－ＨＳＡ（△）融合物についての空腹時血液グルコースレベルは、ＨＳＡを単独投与され、かつ明らかに糖尿病性を示す動物（●）と同様であった。

【００５８】

本明細書中用いる「治療活性」または「活性」は、ヒトにおける所望の治療結果に整合する効果を有する活性、或いはヒトでない哺乳類または他の種もしくは生物における所望の効果を言ってもよい。治療活性はインビボまたはインビトロで測定されてもよい。例えば、所望の効果は細胞培養にてアッセイされてもよい。かかるインビトロまたは細胞培養アッセイは、当該技術分野において記載されている多数の治療用蛋白質のために市販されている。アッセイの例は、本明細書中の実施例のセクションまたは表１の「代表的活性アッセイの例」の欄（欄３）に記載のものを含むが、これらに限定されない。

【００５９】

本発明のアルブミン融合蛋白質部分の治療用蛋白質に対応する治療用蛋白質、例えば、細胞表面および分泌蛋白質は、多くの場合、１またはそれ以上のオリゴ糖基の結合により修飾される。グリコシル化とも言われる修飾は、蛋白質の物性に顕著に作用し得、そして

蛋白質の安定性、分泌および局在性において重要であり得る。グリコシル化は、ポリペプチド骨格に沿った特定位置において生じる。通常、グリコシル化には２つの主要な型がある。すなわち、Ａｓｎ－Ｘ－ＳｅｒまたはＡｓｎ－Ｘ－Ｔｈｒ配列［式中、Ｘはプロリンを除く任意のアミノ酸であり得る］中のセリンまたはトレオニン残基に結合されているＯ－結合オリゴ糖により特徴付けられるグリコシル化；およびそのアスパラギン残基に結合されているＮ－結合オリゴ糖により特徴付けられるグリコシル化である。Ｎ－アセチルノイラミン酸（シアル酸としても知られている）は、通常、Ｎ－結合およびＯ－結合オリゴ糖の両方の末端残基である。蛋白質構造および細胞型のごとき変量は、鎖内の異なるグリコシル化部位での炭水化物単位の数および性質に影響する。グリコシル化アイソマーも、特定の細胞型の同じ部位において一般的である。

【００６０】

本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質ならびにそのアナログおよび変異体は修飾されてもよく、その結果、１またはそれ以上の部位でのグリコシル化が、それらを発現する宿主細胞によってかまたは他の発現条件に起因してそれらの核酸配列が遺伝子操作される結果として、改変される。例えば、グリコシル化アイソマーは、グリコシル化部位を除去または導入することにより、例えば、アスパラギンをグルタミンで置換するなどのアミノ酸残基の置換または欠失により作製されてもよく、またはグリコシル化されていない組換え蛋白質は、それらをグリコシル化しない宿主細胞、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）またはグリコシル化欠損酵母において蛋白質を発現させることにより作製されてもよい。これらのアプローチは以下により詳細に記載され、かつ当該技術分野において知られている。

【００６１】

特に表１に開示される治療用蛋白質およびそれらの核酸およびアミノ酸配列は当該技術分野においてよく知られており、およびＣｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ Ｄａｔａｂａｓｅｓ（例えば、ＣＡＳ Ｒｅｇｉｓｔｒｙ）、ＧｅｎＢａｎｋなどの公共データベースおよびＧｅｎＳｅｑ（例えば、Ｄｅｒｗｅｎｔ）のごとき会員に提供されるデータベースにおいて入手可能である。本発明のポリヌクレオチドを導くために用いられてもよい治療用蛋白質のヌクレオチド配列の例を、表２の欄７「配列番号：Ｘ」に示す。配列番号：Ｘとして示される配列は、特定の治療用蛋白質（例えば、全長または成熟型のいずれか）をコードする野生型ポリヌクレオチド配列であってもよく、または幾つかの場合、該配列は、該野生型ポリヌクレオチド配列の変異体（例えば、野生型治療用蛋白質をコードするポリヌクレオチド、ここで、該ポリヌクレオチドのＤＮＡ配列は例えば特定の種における発現のために最適化されている。；または野生型治療用蛋白質の変異体をコードするポリヌクレオチド（すなわち、部位特異的変異；対立遺伝子変異体））であってもよい。配列番号：Ｘで示す配列を用いて同じ列に記載のコンストラクトを誘導することは当業者の能力の範囲内に十分にある。例えば、全長蛋白質だけでなくその蛋白質の部分に対応する配列番号：Ｘを用いて特定のＣＩＤを生じる場合、ＰＣＲのごとき分子生物学技法に依存して特定の断片を増幅し、そしてそれを適切なベクターにクローニングすることは、当該技術分野の範囲内である。

【００６２】

本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応するさらなる治療用蛋白質は、表１の「治療用蛋白質Ｘ」の欄（欄１）に開示される１またはそれ以上の治療用蛋白質またはペプチドまたは断片または可変体を含むが、これらに限定されない。

【００６３】

表１は、本発明のアルブミン融合蛋白質または本発明のポリヌクレオチドによりコードされるアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質の非限定的なリストを提供する。初めの欄「治療用蛋白質Ｘ」は、治療用蛋白質分子を開示し、治療用蛋白質分子またはその断片もしくは変異体を含む或いはそれからなる蛋白質の学名および商品名を含む括弧書きが続いてもよい。本明細書中用いる「治療用蛋白質Ｘ」は、個々の治療用蛋白質分子または本欄において開示される特定の治療用蛋白質分子に関連する治療用

蛋白質の群全体のいずれかを言ってもよい。「生物活性」の欄（欄２）は、治療用蛋白質分子に関連する生物活性を記載する。欄３の「活性アッセイの例」は、治療用蛋白質：Ｘまたは治療用蛋白質Ｘ（またはその断片）部分を含むアルブミン融合蛋白質の治療および／または生物活性を試験するために用いられてもよいアッセイを記載している参考文献を提供する。「活性アッセイの例」欄に引用される参考文献のそれぞれは、特に表１の「生物活性」の欄に示される対応する生物活性をアッセイするために参考文献（例えば、「方法」のセクションを参照のこと）に記載されたそれぞれの活性アッセイの例の記載に関して、出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。４番目の欄の「好適な適応症：Ｙ」は、治療用蛋白質Ｘまたは治療用蛋白質Ｘ（またはその断片）部分を含むアルブミン融合蛋白質により処置、予防、診断および／または改善されてもよい疾患、障害および／または状態を記載する。「コンストラクト番号」の欄（欄５）は、参照した治療用蛋白質Ｘ（またはその断片）部分を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質をコードする表２に開示される代表的なアルブミン融合コンストラクトに関連している。

表１

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
ヒト成長ホルモン(PEGvisamont; Somatrem; Somatropin; TROVERT; PROTROPIN; BIO-TROPIN; HUMATROPE; NUTROPIN; NUTROPIN AQ; NUTROPHIN; NORDITROPIN; GENOTROPIN; SAIZEN; SEROSTIM)	２つのＧＨＲ分子に結合し、および受容体の二量体化によりシグナル伝達を誘導する	Ba/F3-hGHR増殖アッセイ,血清ヒト成長ホルモンについての新規特異的バイオアッセイ、J Clin Endocrinol Metab 2000Nov;85(11):4274-9 血漿成長ホルモン(GH)イムノアッセイおよび頸骨バイオアッセイ,Appl Physiol 2000Dec;89(6):2174-8 成長ホルモン(hGH)受容体介在細胞介在増殖、Growth Horm IGF Res 2000 Oct;10(5):248-55 成長ホルモンについての国際基準, Horm Res 1999;51 Suppl 1:7-12	先端肥大症;成長阻害;成長ホルモン補充;成長ホルモン欠損;小児成長ホルモン欠損;成人成長ホルモン欠損;特発性成長ホルモン欠損;成長遅滞;プラダー・ウィリ症候群;2歳以上の子供におけるプラダー・ウィリ症候群;発育不全;慢性腎不全に関連する成長阻害;骨粗鬆症;閉経後骨粗鬆症;骨減少症,破骨細胞形成;火傷;悪液質;癌悪液質;小人症;代謝性障害;肥満;腎不全;ターナー症候群;線維筋痛症;骨折処置;脆弱性,AIDS消耗;筋消耗;低身長;診断剤;女性不妊症;脂肪異栄養症.	3468、3469、3470、3475.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Z を参照のこと。
インターフェロンアルファ(インターフェロンアルファ-2b;組	抗ウイルス,抗増殖,抗腫瘍および免疫調節活性を含む一連の細	抗ウイルスアッセイ:Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. (1981) Convenient assay for interferones.	ウイルス感染。重症急性呼吸器症候群(SARS)および他のコロナウイルス感染;エボラウイルスおよびマー	2249、2343、2366、	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
換え体;インターフェロンアルファ-n1;インターフェロンアルファ-n3;ペグインターフェロンアルファ-2b;リバビリンおよびインターフェロンアルファ-2b;インターフェロンアルファコン-1;インターフェロンコンセンサス;YM643;CIFN;インターフェロン-アルファコンセンサス;組換えメチオニルコンセンサスインターフェロン;組換えコンセンサスインターフェロ	胞応答を与える;２つの酵素:プロテインキナーゼおよびオリゴアデニル酸合成酵素の産生を刺激する	J. Virol. 37(2):755-8; 抗増殖アッセイ: Gao Y, ら (1999)Sensitivity of an epstein-barr viral-positive tumor line, Daudi, to alpha interferon correlates with expression of a GC-rich viral transcript. Mol Cell Biol. 19(11):7305-13.	ルブルク病ウイルスを含むがこれらに限定されないフィロウイルス;Pichendeウイルス,ラッサ熱ウイルス,Juninウイルス,Machupoウイルス,Guanaritoウイルスを含むがこれらに限定されないアレナウイルス;およびリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV);Punta toroウイルス,クリミアーコンゴ出血熱ウイルス,サシチョウバエ熱ウイルス,リフトバレー熱ウイルス,ラ・クロス・ウイルス,およびハンタウイルスを含むがこれらに限定されないブニアウイルス;黄熱,Banziウイルス,ウエストナイルウイルス,デング熱ウイルス,日本脳炎ウイルス,ダニ媒介脳炎,オムスク出血熱およびキャサヌール森林病ウイルスを含むがこれらに限定されな	2381, 2382, 2410, 3165, 3422, 3423, 3424, 3476.	照のこと。

【表３】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
ン;CGP 35269; RO 253036; RO 258310; INTRON A; PEGINTRON; OIF; OMNIFERON; PEGOMNIFERON; VELDONA; PEGREBETRON; ROFERON A; WELLFERON; ALFERON N/LDO; REBETRON; ALTEMOL; VIRAFERONPEG; PEGASYS; VIRAFERON; VIRAFON; AMPLIGEN;			いフラビウイルス;ペネズエラウマ脳炎,東部および西部ウマ脳炎ウイルス,ロスリバーウイルス,および風疹ウイルスを含むがこれらに限定されないトガウイルス;ワクシニア,牛痘,天然痘およびサル痘を含むがこれらに限定されないオルソポックスウイルス;ヘルペスウイルス;インフルエンザA/B;呼吸器合胞体ウイルス(RSV);パライインフルエンザ;はしか;ライノウイルス;アデノウイルス;セムリキ森林熱ウイルス;ウイルス性出血熱;ラブドイドウイルス;ニパウイルスおよびHendraウイルスを含むがこれらに限定されないパラミキソウイルス;および疾患制御および予防のために米国セクター により最優先の病原体として同定されている他		

10

20

30

40

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
INFERGEN; INFAREX; ORAGEN)			のウイルス物質(すなわち,カテゴリーA,B,およびCの物質;*例えば*,Moran, Emerg. Med. Clin. North. Am. 2002; 20(2):311-30 and Darling ら., Emerg. Med. Clin. North Am. 2002;20(2):273-309を参照のこと)を含む。		
インターフェロンベータ(インターフェロンベータ-1a;インターフェロンベータ1b;インターフェロン-ベータ-セリン;SH 579; ZK 157046; BCDF; ベータ-2 IF; インターフ	単球においてMHC抗原発現,NK細胞活性およびIFNg産生およびIL12産生を調節する	抗ウイルスアッセイ:Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. (1981) Convenient assay for interferonss. J. Virol. 37(2):755-8; 抗増殖アッセイ:Gao Y,ら(1999) Sensitivity of an epstein-barr virus-positive tumor line, Daudi, to alha interferon correlates with	ウイルス感染。重症急性呼吸器症候群(SARS)および他のコロナウイルス感染;エボラウイルスおよびマールブルク病ウイルスを含むがこれらに限定されないフィロウイルス;Pichendeウイルス,ラッサ熱ウイルス,Juninウイルス,Machupoウイルス,Guanaritoウイルスを含むがこれ	1778, 1779, 2011, 2013, 2053, 2054, 2492, 2580,	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。

10 20 30 40

【表５】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
		Apr;178(1-2):118-30)。			
B7-H3	腫瘍免疫を高める;T細胞活性化および免疫反応を調節する。	腫瘍免疫は、当該技術分野において知られている方法、例えば、Luoら., J Immunol. 2004 Nov 1;173(9):5445-50におけるものにより測定され得る。T細胞活性化は、当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る(Chapovalら., Nat Immunol. 2001 Mar;2(3):269-74)。	癌;固形腫瘍;膵臓癌;大腸癌;肝臓癌;肺癌;骨癌;胸部癌;脳癌;自己免疫,自己免疫不全;溶骨性骨疾患;悪性腫瘍の高カルシウム血症;悪性腫瘍が誘導する骨疼痛。	3933.	特定のコンストラクトについては、配列番号:Z。

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
	ンホカイン産生およびCTL活性を刺激する;内皮細胞の遊走および増殖を刺激する;正常な蝸牛機能のために必要である。	13;101(15):5583-8)。 T細胞増殖,リンホカイン産生,およびCTL活性は、当該技術分野において知られているアッセイ、例えば、Yuら.,J Biol. Chem. 2004; 279(53):55531-55539におけるものを用いて測定され得る。 内皮細胞の遊走および増殖は、当該技術分 野において知られているアッセイ、例えば、Woods ら., J Biol Chem. 2002 Jan 18;277(3):1924-7におけるものを用いて測定され得る。蝸牛機能は、当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る (Howard ら., Hear Res. 2003	エローマ;心/肺バイパス;腎透析または薬剤が誘導するもの;血管新生障害;蝸牛障害;難聴;眩暈;耳鳴り;耳閉;急性および／または慢性内耳障害.		

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
		のゴナドトロピンホルモンの量を測定することにより決定され得る。	ロピン性生殖機能不全;カルマン症候群;続発性生殖機能不全の処置。		Harms ら., Clin Exp Metastasis. 2003;20(1):11-8またはGottsch ら., Endocrinology. 2004 Sep;145(9):4073-7を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。
エフリン B1 (EFNB1)	腫瘍成長および血管新生を調節する;癌細胞の遊走および侵襲を調節する;血小板凝集および凝血の成熟(clot maturation)を亢進する;T細胞増殖、リ	腫瘍成長,血管新生,遊走および侵襲は、当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る(Nakadaら., Cancer Res. 2004 May 1;64(9):3179-85 または Noren ら., Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr	癌;固形腫瘍;膵臓癌;大腸癌;肝臓癌;脳癌;結腸直腸癌;胃癌;肺癌;骨癌;胸部癌;心血管疾患;肝臓癌;T-リンパ腫;移植片対宿主病(GVH);自己免疫疾患;自己免疫不全;血友病;フォンウィルブランド病;出血障害;結合組織障害に起因する出血障害;白血病;ミ	3930; 3931; 3934; 3935.	特定のコンストラクト,については配列番号:Z。

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
TweakR (Fn14;線維芽細胞成長因子誘導14)	アポトーシス細胞死を刺激する;血管新生を誘導する;内皮細胞の遊走および増殖を促進する;突然変異された場合、クリッペル-トレノネイ症候群に対する感受性を惹起する	アポトーシス細胞死は、当該技術分野において知られているアッセイ、例えば、Nakayamaら.,J Immunol. 2003 Jan 1;170(1):341-8におけるものを用いて測定され得る。内皮細胞の遊走および増殖は、当該技術分野において知られている方法、例えば、Woodsら., J Biol Chem. 2002 Jan 18;277(3):1924-7におけるものを用いて決定され得る。	クリッペル-トレノネイ症候群;癌;固形腫瘍;膵臓癌;大腸癌;肝臓癌;脳癌;胃癌;肺癌;胸部癌;骨癌;自己免疫疾患;自己免疫不全;ループス;関節リウマチ;多発性硬化症;血管新生障害;心血管疾患の処置	3919, 3932.	特定のコンストラクトについては配列番号:Z。
Kiss-1 (Metastin; kisspeptin-54)	腫瘍転移を抑制する;G蛋白質共役型受容体GPR54を活性化して腫瘍発達を阻害する;ゴナドトロピン分泌を制御する	GPR54の活性化は、当該技術分野において知られているアッセイ、例えば、Beckerら., Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jan 21;326(3):677-86におけるものを用いて測定され得る。ゴナドトロピン分泌は、血清中	癌;胃癌;胸部癌;食道扁平上皮癌;膀胱癌;固形腫瘍;甲状腺癌;膵臓癌;大腸癌;肝臓癌;肺癌;脳癌;骨癌;ゴナドトロピン欠損;不妊症;下垂体機能不全;汎下垂体機能不全;発月経;無月経;性欲低下;顔面紅潮;性交疼痛症;インポテンツ;骨減少症;低ゴナドト	3928; 3929.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。さらに、Dharら., Int J Cancer. 2004 Oct 10;111(6):868-72,

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
	ンスの調節；腎保護に関与する。	用いて測定され得る(Cheng ら., J Endocrinol. 2004 Aug;182(2):249-56)。アルドステロンレベルは、当該技術分野において知られている方法、例えば Yamato ら., Circ J 2003 May; 67(5):384-90 におけるものを用いて測定され得る。血圧は、血圧計または当該技術分野において知られている他の方法、例えば、Reddy ら., Ultrasound Med Biol 2003 Mar; 29(3):379-85 におけるものを用いて測定され得る。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウム量を測定することにより決定される。利尿は、分泌された尿の量を測定することにより決定される。			

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
					Rhysiol 2003; 285:F167-177 を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。
Dendroaspis ナトリウム利尿ペプチド(DNP)	Na^+-K^+-ATPase を阻害する;平滑筋の収縮および弛緩ならびに血管の拡張および収縮を調節するプロスタグランジン E2 の合成を亢進する;アルドステロン分泌を阻害する;利尿およびナトリウム利尿を惹起する。血圧および体液中の塩/水/電解質のバラ	腎 Na^+-K^+-ATPase 活性は、Ku ら., 1987; Endocrinology 120:2166-2173 のごとき当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る。血管拡張は、当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る(Ashton ら, Pharmacology 2000; 61(2):101-105)。プロスタグランジン E2 合成は、当該技術分野において知られているアッセイを	うっ血性心不全;高血圧;心血管疾患;急性腎不全;急性細管壊死;腎疾患;腎糸球体疾患;心臓容量過負荷;心代償不全;左心室機能不全;呼吸困難の処置。血管狭窄,心拍出量障害および/または高血圧をもたらし得る高いアルドステロンレベル;心不全;心筋再灌流傷害;左心室リモデリングの処置。	3894, 3895.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。さらに、Vesely Am J Physiol Renal Rhysiol 2003; 285:F167-177を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。

【表１１】

表 1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
カリウム利尿 ペプチド (KUP; proANP-(99-126)).	血圧および体液中の塩/水/電解質のバランスの調節に関与する。	血圧は、血圧計または当該技術分野において知られている他の方法、例えば、Reddy ら., Ultrasound Med Biol 2003 Mar; 29(3):379-85 におけるものを用いて測定され得る。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウム量を測定することにより決定される。利尿は、分泌された尿の量を測定することにより決定される。	うっ血性心不全;高血圧;心血管疾患;急性細管壊死;急性腎不全;腎疾患;腎糸球体疾患の処置。	3890, 3891.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。さらに、Vesely Am J Physiol Renal Rhysiol 2003; 285:F167-177を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。
C-型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)	利尿およびナトリウム利尿を促進する。血圧および体液中の塩/水/電解質のバランスの調節に関与する。	ナトリウム利尿は、尿中のナトリウム量を測定することにより決定される。利尿は、分泌された尿の量を測定することにより決定される。	うっ血性心不全;高血圧;心血管疾患;急性細管壊死;急性腎不全;腎疾患;腎糸球体疾患の処置	3892, 3893.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。さらに、Vesely Am J Physiol Renal

【表１２】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
	利尿を惹起する。血圧および体液中の塩/水/電解質のバランスの調節;腎保護に関与する。	用いて測定され得る(Cheng ら., J Endocrinol. 2004 Aug;182(2):249-56)。アルドステロンレベルは、当該技術分野において知られている方法、例えばYamato ら., Circ J 2003 May; 67(5):384-90 におけるものを用いて測定され得る。血圧は、血圧計または当該技術分野において知られている他の方法、例えば、Reddy ら., Ultrasound Med Biol 2003 Mar; 29(3):379-85 における ものを用いて測定され得る。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウム量を測定することにより決定される。カリウム利尿は、尿中のカリウム量を測定することにより決定される。			

【表１３】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
		けるものを用いて測定され得る。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウム量を測定することにより決定される。利尿は、分泌された尿の量を測定することにより決定される。			
血管拡張剤（VDP; proANP-(79-98)）.	腎 Na^+-K^+-ATPase を阻害する;平滑筋の収縮および弛緩ならびに血管の拡張および収縮を調節するプロスタグランジン E2 の合成を亢進する;アルドステロン分泌を阻害する;うっ血性心不全を有する患者においてナトリウム利尿を惹起する;カリウム	腎 Na^+-K^+-ATPase 活性は、Kuら.. 1987; Endocrinology 120:2166-2173 のごとき当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る。血管拡張は、当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る (Ashton ら, Pharmacology 2000; 61(2):101-105)。プロスタグランジン E2 合成は、当該技術分野において知られているアッセイを	うっ血性心不全;高血圧;心血管疾患;心臓容量過負荷;心代償不全;左心室機能不全;呼吸困難;急性細管壊死;急性腎不全;腎疾患;腎糸球体疾患の処置。血管狭窄;心拍出量障害および/または高血圧をもたらし得るまたはレドステロンレベル;心不全;心筋再灌流傷害;左心室リモデリングの処置。	3888, 3889.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。さらに、Vesely Am J Physiol Renal Rhysiol 2003; 285:F167-177を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
ウム利尿ペプチド(LANP;proANP-(31-67);)	阻害する;平滑筋の収縮および弛緩ならびに血管の拡張および収縮を調節するプロスタグランジンE2の合成を亢進する;血漿レニン活性を阻害する;利尿およびナトリウム利尿を惹起する。血圧および体液中の塩/水/電解質のバランスの調節;腎保護に関与する。	技術分野において知られているアッセイ、例えば、Ku ら.,1987; Endocrinology 0:2166-2173 におけるものを用いて測定され得る。血管拡張は当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る(Ashton ら. pharmacology 2000; 61(2):101-105）。プロスタグランジンE2合成は当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る(Cheng ら., J Endocrinol. 2004 Aug;182(2):249-56)。血圧は、血圧計または当該技術分野において知られている他の方法、例えば、Reddy ら., Ultrasound Med Biol 2003 Mar; 29(3):379-85 にお	心臓容量過負荷;心代償不全;左心室機能不全;呼吸困難;急性細管壊死;急性腎不全;腎細管再生;慢性腎不全;腎疾患;腎糸球体疾患の処置。	3887.	クトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。さらに、Vesely Am J Physiol Renal Rhysiol 2003; 285:F167-177を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
	に関与する。	ら., J Endocrinol. 2004 Aug;182(2):249-56)。アルドステロンレベルは、当該技術分野において知られている方法、例えば Yamato ら., Circ J 2003 May; 67(5):384-90 におけるものを用いて測定され得る。血圧は、血圧計または当該技術分野において知られている他の方法、例えば、Reddy ら., Ultrasound Med Biol 2003 Mar; 29(3):379-85 におけるものを用いて測定され得る。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウム量を測定することにより決定される。利尿は、分泌された尿の量を測定することにより決定される。			
長時間作用性ナトリ	腎 Na^+-K^+-ATPase を	腎 Na^+-K^+-ATPase 活性は、当該	うっ血性心不全;高血圧;心血管疾患;	3886,	特定のコンストラ

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
ONCOLIPIN 2; MACROLIN)		homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. Science 288: 675-678, 2000; CTLL-2 Proliferation : Gillis ら (1978) J. Immunol. 120, 2027			
アドレノメデュリン (ADM)	腎 Na+-K+-ATPase を阻害する;平滑筋の収縮および弛緩ならびに血管の拡張および収縮を調節するプロスタグランジン E2 の合成を亢進する;アルドステロン分泌を阻害する;利尿およびナトリウム利尿を惹起する。血圧および体液中の塩/水/電解質のバランスの調節;腎保護	腎 Na+-K+-ATPase 活性は、Ku ら.,1987; Endocrinology 120:2166-2173 のごとき当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る。血管拡張は、当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る(Ashton ら,Pharmacology 2000; 61(2):101-105)。プロスタグランジン E2 合成は、当該技術分野において知られているアッセイを用いて測定され得る(Cheng	うっ血性心不全;高血圧;心血管疾患;急性腎不全;急性細管壊死;腎疾患;腎糸球体疾患;心臓容量過負荷;心代償不全;左心室機能不全;呼吸困難の処置。血管狭窄,心拍出量障害および/または高血圧をもたらし得る高いアルドステロンレベル;心不全;心筋再灌流傷害;左心室リモデリングの処置。	3924, 3925, 3926, 3927.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。さらに、Vesely Am J Physiol Renal Rhysiol 2003; 285:F167-177を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。

【表１７】

表 1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
			イルスを含むがこれらに限定されないパラミキソウイルス;および疾患制御および予防のために米国センターにより最優先の病原体として同定されている他のウイルス物質(すなわち、カテゴリーA,BおよびCの物質;例えば,Moran. Emerg. Med. Clin. North Am. 2002; 20(2):311-30およびDarling R., Emerg. Med. Clin. North Am. 2002;20(2):273-309を参照のことを含む。		
IL-2 (Aldesleukin; インターロイキン-2 融合トキシン; T 細胞成長因子; PROLEUKIN; IMMUNACE; CELEUK;	Bおよび T 細胞の成長を促進し、およびNK細胞およびCTL細胞殺滅活性を増加させる。	T細胞増殖アッセイ："Biological activity of recombinant human interlekin-2 produced in Eschericlia coli." Science 223: 1412-1415, 1984。 ナチュラルキラー(NK)細胞およびCTL細胞毒性アッセイ"Control of	癌;固形腫瘍;膵臓癌;大腸癌;肝臓癌;T-リンパ腫,移植片対宿主病(GVH);自己免疫疾患;自己免疫不全;IL-2受容体陽性悪性腫瘍。	1757, 1758, 1812. 1813, 1952, 1954.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。

【表１８】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
(IFNベータ-1/アルファ-1 ハイブリッド) IFNアルファ/ベータ ハイブリッド			ス;黄熱,Banziウイルス,ウエストナイルウイルス,デング熱ウイルス,日本脳炎ウイルス,ダニ媒介脳炎,オムスク出血熱,およびキャサヌール森林病ウイルスを含むがこれらに限定されないフラビウイルス;ベネズエラウマ脳炎,東部および西部ウマ脳炎ウイルス,ロスリバーウイルスおよび風疹ウイルスを含むがこれらに限定されないトガウイルス;ワクシニア,牛痘,天然痘およびサル痘を含むがこれらに限定されないオルソポックスウイルス;ヘルペスウイルス;インフルエンザA/B;呼吸器合胞体ウイルス(RSV);パラインフルエンザ;はしか;ライノウイルス;アデノウイルス;セムリキ森林熱ウイルス;ウイルス性出血熱;ラブドイドウイルス;ニパウイルスおよびHendraウ		

【表１９】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
					細書の一部となる。
インターフェロンハイブリッド、特に好ましくは、 IFNアルファ A/D ハイブリッド (BglII バージョン) IFNアルファ A/D ハイブリッド (PvuII バージョン) IFNアルファ A/F ハイブリッド IFNアルファ A/B ハイブリッド IFNベータ 1/アルファ D ハイブリッド	抗ウイルス,抗増殖,抗腫瘍および免疫調節活性を含む一連の細胞応答を与える;2つの酵素:プロテインキナーゼおよびオリゴアデニル酸合成酵素の産生を刺激する。さらに、単球におけるMHC抗原発現,NK細胞活性ならびにIFNg産生およびIL12産生を調節する。	抗ウイルスアッセイ: Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. (1981) Convenient assay for interferons. J. Virol. 37(2):755-8; 抗増殖アッセイ: Gao Y, ら (1999) Sensitivity of an epstein-barr virus-positive tumor line. Daudi, to alpha interferon correlates with expression of a GC-rich viral transcript. Mol Cell Biol. 19(11):7305-13.	ウイルス感染。重症急性呼吸器症候群(SARS)および他のコロナウイルス感染;エボラウイルスおよびマールブルク病ウイルスを含むがこれらに限定されないフィロウイルス;ウイルス感染;HIV感染;肝炎;Pichindeウイルス,ラッサ熱ウイルス,Juninウイルス,Machupoウイルス,Guanaritoウイルスを含むがこれらに限定されないアレナウイルス;およびリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV);Punta toroウイルス,クリミアーコンゴ出血熱ウイルス,サンチョウバエ熱ウイルス,リフトバレー熱ウイルス,ラ・クロス・ウイルスおよびハンタウイルスを含むがこれらに限定されないブニアウイル	2872, 2873, 2874, 2875, 2876.	特定のコンストラクトについては表2.配列番号:Zを参照のこと。

【表２０】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
					参照のこと。その各々は出典明示により本明細書の一部となる。他のウリカーゼ配列は、米国特許第4,062,731号;第4,273,874号;第4,987,076号;第5,376,545号;第5,700,674号;第5,728,562号;第5,801,036号;第5,834,273号;第5,955,336号において開示されており、その各々は出典明示により本明

【表２１】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
					5,196,195号において開示されており、その各々は出典明示により本明細書の一部となる。
ウリカーゼ(尿酸オキシダーゼ;*Aspergillus flavus* ウリカーゼ;*Candida utilis* ウリカーゼ;rasburicase;FASTURTEC;ELITEK)	尿酸のアラントインへの酸化を触媒する。	尿酸レベルは、分光光度法、比色測定法または当該技術分野においてよく知られている他の方法、例えば、Kageyama.Clin. Chim. Acta. 1971; 31(2):421-426におけるものを用いて測定され得る。	痛風,高尿酸血症;腫瘍溶解高尿酸血症;化学療法が誘導する高尿酸血症;虚血性脳卒中;脂質異常;高血圧;活動脈疾患,アテローム性動脈硬化を含むがこれらに限定されない心血管障害。	3903, 3904, 3936, 3937, 3938, 3939, 3940, 3941, 3942, 3943, 3944.	特定のコンストラクトについては表2.配列番号:Zを参照のこと。さらに、特定のウリカーゼ配列またはそのバリアントについては、CAS-134774-45.1; Wu ら., P.N.A.S. USA 1989 Dec; 86(23):9412-9416を

【表２２】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
		おいて知られている方法、例えば、Nohら.,Mol. Cells 2002 Feb;13(1):137-143において記載されているものを用いて評価され得る。 腫瘍細胞増殖は。当該技術分野において知られている方法、例えば、Miyazaki ら.,Cancer Res. 1990 Aug; 50(15):4522-4527において記載されているような増殖アッセイを用いて評価され得る。			を参照のこと。その各々は、出典明示により本明細書の一部となる。 他のアルギニンデアミナーゼ配列は、米国特許公開番号. 20040096437においては開示されており、該文献は出典明示により本明細書の一部となる。 他のアルギニンデアミナーゼは、米国特許第6,180,387号;第5,804,183号;第5,474,928号;第

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
					り、その各々は出典明示により本明細書の一部となる。
アルギニンデアミナーゼ (ADI-SS)	アルギニンのシトルリンおよびアンモニアへの不可逆的加水分解を触媒する;一酸化窒素合成を阻害する;血管新生を阻害する;多数の腫瘍細胞の増殖を阻害する	酵素活性は、当該技術分野においてよく知られている方法、例えば、Weickmannら.,J. Biol. Chem. 1977 Apr; 252(8):2615-2620において記載されている酵素アッセイを用いて測定され得る。血管新生の阻害は、当該技術分野において知られている方法、例えば、Parkら., Br. J. Cancer 2003 Sept; 89(5):907-914において記載されているマトリゲルアッセイを用いて評価され得る。一酸化窒素産生の阻害は、当該技術分野に	メラノーマおよび肝臓癌.を含むがこれらに限定されない癌。さらなる癌は、扁平上皮癌;骨肉腫,グリオーマ／星細胞腫;グリオブラストーマ,前骨髄球性白血病;リンパ芽球性白血病;および頸部,胸部,卵巣,前立腺,大腸または肺の癌を含むが、これらに限定されない。	3910, 3915, 3917, 3918.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。さらに、特定のアルギニンデアミナーゼ配列またはそのバリアントについては、Baurら.,Eur. J. Biochem 1989 Jan; 179(1):53-60: Misawa ら.,J.Biotechnol. 1994; 361:145-155

【表２４】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
					ムグルコセレブロシダーゼ配列は、米国特許公開番号.20040009165;20030133924;20020127219において開示されており、その各々は出典明示により本明細書の一部となる。さらなるリソソームグルコセレブロシダーゼは、米国特許第6,696,272号;第5,879,680号;第5,549,892号において開示されてお

【表２５】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
リソソームグルコセレブロシダーゼ;(Alglucerase;β-グルコセレブロシダーゼ;β-D-グルコシル-N-アシルスフィンゴシングルコヒドラーゼ;グルコシルセラミダーゼ;酸性β-グルコシダーゼ;Imiglucerase;CEREDASE;CEREZYME)(GCB)	D-グルコシル-N-アシルスフィンゴシンのD-グルコースおよびN-アシルスフィンゴシンへの加水分解を触媒する,グルコセレブロシドのグルコースへの加水分解を触媒する。	酵素活性は、当該技術分野において知られている方法、例えば,Poulos ら,Clin.Chim.Acta.1976Nov;72(3):327-335により記載されている薄層クロマトグラフィーアッセイ;またはRudenskyら..Blood Cells Mol. Dis. 2003 Jan-Feb;30(1):97-99により記載されているFACS法を利用して評価され得る。	ゴーシェ病,リソソーム貯蔵障害	3920;3921;3922;3923.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。さらに、特定のリソソームグルコセレブロシダーゼ配列またはそのバリアントについては、例えば、1.CM_IIUMAN.Gebankアクセッション番号.P04062;CAS-143003-46-7,を参照のこと。その各々は出典明示により本明細書の一部となる。他のリソソ

【表２６】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
			シール神経毒性,タリウム神経毒性,ヒ素神経毒性,放射線療法,糖尿病,悪性腫瘍,多発性硬化症,ファブリー病,タンジール病またはアミロイド。		
グルカゴン様-ペプチド1(GLP1;GLP-1;Insulinotropin)	インスリンの合成および放出を刺激する;インスリンに対する脂質,筋および肝細胞の感受性を高める;グルコース取り込みを刺激する;消化過程を遅延させる;食欲を抑制する;グルカゴンの分泌を遮断する。	GLP1活性は、[3-H]-グルコース取り込みアッセイ(J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43):30864-30873)を利用してインビトロでアッセイされてもよい。学習へのGLP-1効果は、ラットにおける受動的回避およびモーリス水迷路(MWM)パラダイム(Brain Res. 1996, 716:29-38 および Nature 1982, 297:681-683).を用いて研究され得る。	高血糖,糖尿病,尿崩症,真性糖尿病;1型糖尿病;2型糖尿病;インスリン抵抗性;インスリン欠損;高脂血症;高ケトン血症;非インスリン依存性真性糖尿病(NIDDM);インスリン依存性真性糖尿病(IDDM);肥満,心疾患,高血糖,感染,網膜症および/または潰瘍を含むがこれらに限定されない糖尿病に関連する状態;代謝性障害;免疫不全;肥満;血管障害;体重抑制;食欲抑制;症候群X;認知障害;記憶喪失。学習,記憶,連想学習,空間学習,海馬可塑性,認知,および/または神経保護を高めるための使用。	3610, 3696.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。

表１

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
		Aug;283(2):R349-R355を参照のこと)。 ナトリウム利尿は、尿中のナトリウム量を測定することにより決定される。		3897, 3898, 3899, 3900.	
BDNF アイソフォーム c (脳由来神経栄養因子)	ニューロン成長,分化および生存を促進し;発達の間、末梢および中枢ニューロンのサブセットの生存を維持し;成人神経系機能に関与し;障害受容反応に寄与してもよい神経栄養因子。	ニューロン成長へのBDNF活性は、ニューロン成長およびシナプス活性アッセイ、例えばBartrupら(1997) Neuroreport 1:8(17):3791-4において記載のものを利用して測定され得る;疼痛受容へのBDNF活性は、Shuら pain (1999) 80:463-470 and in Zhou ら Eur. J. Neurosci. (2000) 12:100-105.に記載のように、障害受容作用,痛覚過敏,および／または異痛症を測定することによりアッセイされ得る。	疼痛;神経因性疼痛;複合性局所性疼痛症候群I;反射性交感神経性ジストロフィー;三叉神経痛;異痛症;原発性および／または続発性痛覚過敏;灼熱痛;幻肢痛;術後疼痛;灼熱脚症候群、例えば、ギランバレー症候群;視床症候群;脳卒中後疼痛;血管炎性/血管障害性疼痛;特発性疼痛;以下の任意のものに関連する疼痛:エントラップメント神経障害,神経切断,脊髄損傷,瘢痕形成,アルコール性神経障害,ペラグラ,脚気,ヘルペス後神経痛,HIV/AIDS疼痛,ビンクリスチン神経毒性,シスプラチン神経毒性,タキ	3549.	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。

【表２８】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
			2002;20(2):273-309を参照のこと)を含む。		
B-型ナトリウム利尿ペプチド(BNP,脳ナトリウム利尿ペプチド)	平滑筋弛緩および血管拡張,ナトリウム利尿ならびにレニン－アンジオテンシンおよびエンドセリンの抑制を刺激する。	アンジオテンシンの阻害は、Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1999 May;359(5):394-9に記載のように、当該技術分野において知られているアッセイ、例えばラット心臓線維芽細胞を用いるインビトロ増殖アッセイを利用することにより測定され得る。血管拡張は、等圧動脈造影系(isobaric arteriograph system)にて動物における小さな腎動脈の筋原性反応を測定することにより測定され得る(Am J Physiol R例えばul Int例えばr Comp Physiol 2002	うっ血性心不全; 心臓容量過負荷(cardiac volume overload)；心代償不全; 心不全; 左心室機能不全; 呼吸困難. 糸球体肥大; 糸球体障害; 腎糸球体疾患; 急性 腎不全	3618, 3690, 3691, 3715, 3723, 3724, 3725, 3736, 3769, 3778, 3783, 3795, 3796, 3809, 3896,	特定のコンストラクトについては表2,配列番号:Zを参照のこと。

【表２９】

表1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
			牛痘,天然痘およびサル痘を含むがこれらに限定されないオルソポックスウイルス;ヘルペスウイルス;インフルエンザA/B;呼吸器合胞体ウイルス(RSV);パラインフルエンザ;はしか;ライノウイルス;アデノウイルス;セムリキ森林熱ウイルス;ウイルス性出血熱;ラブドイドウイルス;ニパウイルスおよびHendraウイルスを含むがこれらに限定されないパラミキソウイルス;および疾患制御および予防のために米国センターにより最優先の病原体として同定されている他のウイルス物質(すなわち,カテゴリーA,BおよびCの物質;*例えば*,Moran, Emerg. Med. Clin. North. Am. 2002; 20(2):311-30 and Darling ら., Emerg. Med. Clin. North Am.		

【表３０】

表 1

治療用蛋白質:X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症:Y	コンストラクト番号	治療用蛋白質:Z
エロンベータ-2; rhIL-6; SJ0031; DL 8234; FERON; IFNbeta; BETASERON; AVONEX; REBIF; BETFERON; SIGOSIX)		expression of a GC-rich viral transcript. Mol Cell Biol. 19(11):7305-13.	らに限定されないアレナウイルス;およびリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV);Punta toroウイルス,クリミア－コンゴ出血熱ウイルス,サンチョウバエ熱ウイルス,リフトバレー熱ウイルス,ラ・クロス・ウイルスおよびハンタウイルスを含むがこれらに限定されないブニアウイルス;黄熱,Banziウイルス,ウエストナイルウイルス,デング熱ウイルス,日本脳炎ウイルス,ダニ媒介脳炎,オムスク出血熱,およびキャサヌール森林病ウイルスを含むがこれらに限定されないフラビウイルス;ベネズエラウマ脳炎,東部および西部ウマ脳炎ウイルス,ロスリバーウイルス,およびに風疹ウイルスを含むがこれらに限定されないトガウイルス;ワクシニア,	2795, 2796. 2797.	

表２
【表３１】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
1	3422	pSAC35:APsp.HSA.IFNa	成熟HSAおよびIFNaが後に続く酸性ホスファターゼシグナルペプチド	pSAC35	149	117	181	213	214	酸性ホスファターゼ
2	3423	pSAC35:INVsp.HSA.IFNa	成熟HSAおよびIFNaが後に続くインベルターゼシグナルペプチド	pSAC35	150	118	182	215	216	インベルターゼ
3	3424	pSAC35:KTsp.HSA.IFNa	成熟HSAおよびIFNaが後に続くキラートキシンシグナルペプチド	pSAC35	151	119	183	217	218	キラートキシン
4	2249	pSAC35:IFNa2-HSA :pSAC23:IFNa2-HSA とも言う	成熟 HSA の上流および HSA/kex2 リーダー配列の下流に融合された成熟 IFNa2	pSAC35	152	120	184	219	220	HSA/kex2
5	2343	pSAC35.INV-IFNA2.HSA	成熟HSA の上流およびインベルターゼシグナルペプチドの下流に融合された成熟インターフェロンアルファ 2	pSAC35	153	121	185	221	222	インベルターゼ
6	2366	pSAC35.MAF-IFNa2.HSA	成熟HSA の上流および酵母接合因子アルファリーダー配列の下流に融合された成熟 IFNa2	pSAC35	154	122	186	223	224	MFα-1

【表３２】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
7	2381	pC4:HSA-IFNa2(C17-E181)	HSA の下流に融合された IFNa2 のアミノ酸 C17 ないし E181(配列番号:618 のアミノ酸 C1 ないし E165 に示すようなフラグメント)	pC4	155	123	187	225	226	HSA
8	2382	pC4:IFNa2-HSA	成熟 HSA の上流に融合された IFNa2.	pC4	156	124	188	227	228	天然 IFNα2 リーダー
9	2410	pSAC35INV:IFNa-HSA	インベルターゼシグナルペプチドの下流および成熟 HSA の上流に融合された成熟 IFNa2	pSAC35	157	125	189	229	230	インベルターゼ
10	3165	pSAC35:HSA.IFNa CID3165, pSAC35:HSA.INFa とも言う	IFNα の上流および HSA/kex2 リーダーの下流に融合された HSA	pSAC35	158	126	190			HSA/kex 2
11	1778	pSAC35:IFN ベータ.M22-N187:HSA	成熟 HSA の上流および HSA/kex2 リーダー配列の下流に融合された全長 IFNb の残基 M22-N187(配列番号:463 の M1 ないし N166 に示すような)	pSAC35	159	127	191	231	232	HSA/kex 2
12	1779	pSAC35:HSA:IFN ベータ.M22-N187	HSA/kex2 リーダー配列を伴う HSA の下流に融合された全長 IFNb の残基 M22-N187(配列番	pSAC35	160	128	192			HSA/kex 2

【表３３】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
			号:464 の M1 ないし N166 に示すような)							
13	2011	pC4:IFNb-HSA	成熟 HSA の上流に融合された全長 IFNb	pC4	161	129	193	233	234	天然 IFNb リーダー
14	2013	pC4:HSA-IFNb.M22-N187	HSA の下流に融合された IFNb のアミノ酸 M22 ないし N187(配列番号:527 のアミノ酸 M1 ないし N166 に示すようなフラグメント)	pC4	162	130	194			HSA
15	2053	pEE12:IFNb-HSA pEE12.1:IFN ベータ -HSA とも言う	成熟 HSA の上流に融合された全長 IFNb	pEE12.1	163	131	195			天然 IFNb リーダー
16	2054	pEE12:HSA-IFNb	HSA の下流に融合された成熟 IFNb	pEE12.1	164	132	196			HSA
17	2492	pC4.IFNb(deltaM22).HSA	成熟 HSA の上流に融合された変異全長 INF ベータ。天然成熟 IFN ベータ(M22)の初めの残基が欠失している。	pC4	165	133	197			天然 IFNβ リーダー

【表３４】

表2

融合番号	コンストラクトラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
18	2580	pC4.IFNb(deltaM22,C38S).HSA	成熟 HSA の上流に融合された IFNb。この融合に用いる IFNb は、配列番号:1687 の M22 に対応する IFNb の成熟形態の初めの残基を欠失している。さらに配列番号:1687 のアミノ酸 38 は Cys から Ser に変異されている。	pC4	166	134	198			天然 IFNβ
19	2795	pC4:HSA(A14)-IFNb.M22-N187	成熟形態の IFNb は、プロセッシングおよび均一性を促進するように設計された１つの修飾シグナルペプチドを含む HSA の C-末端に融合される。	pC4	167	135	199			修飾 HSA(A14)
20	2796	pC4:HSA(S14)-IFNb.M2-N187	成熟形態の IFNb は、プロセッシングおよび均一性を促進するように設計された１つの修飾シグナルペプチドを含む HSA の C-末端に融合される。	pC4	168	136	200			修飾 HSA(S14)
21	2797	pC4:HSA(G14)-IFNb.M2-N187	成熟形態の IFNb は、１つの修飾シグナルペプチドを含む HSA の C-末端に融合される。	pC4	169	137	201			修飾 HSA(G14)

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
22	2872	pSAC35:HSA.IFNaA(C1-Q91)/D(L93-E166)	このコンストラクトは、成熟HSAの下流に融合されたIFNaAおよびIFNaDのハイブリッド形態を含む。	pSAC35	170	138	202	235	236	HSA/kex2
23	2873	pSAC35:HSA.IFNaA(C1-Q91)/B(L93-E166)	このコンストラクトは、成熟HSAの下流に融合されたIFNaAおよびIFNaBのハイブリッド形態を含む。	pSAC35	171	139	203	237	238	HSA/kex2
24	2874	pSAC35:HSA.IFNaA(C1-Q91)/F(L93-E166)	このコンストラクトは、成熟HSAの下流に融合されたIFNaAおよびIFNaFのハイブリッド形態を含む。	pSAC35	172	140	204	239	240	HSA/kex2
25	2875	pSAC35:HSA.IFNaA(C1Q-62)/D(Q64-E166)	このコンストラクトは、成熟HSAの下流に融合されたIFNaAおよびIFNaDのハイブリッド形態を含む。	pSAC35	173	141	205	241	242	HSA/kex2
26	2876	pSAC35:HSA.IFNaA(C1-Q91)/D(L93-E166);R23K,A113V	このコンストラクトは、成熟HSAの下流に融合されたIFNaAおよびIFNaDのハイブリッド形態を含む。	pSAC35	174	142	206	243	244	HSA/kex2

40 30 20 10

表２

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
27	1757	pSAC35:IL2.A21-T153.145C/S.HSA	HSA/KEX2リーダーの下流および成熟HSAの上流にクローニングされた１つのアミノ酸変異(145位のＳに対してC)を有する成熟ヒトIL-2	pSAC35	175	143	207			HSA/kex2
28	1758	pSAC35:HSA.IL2.A21-T153.145C/S	HSA/kex2リーダー配列を伴うHSAの下流にクローニングされた１つのアミノ酸変異(145位のＳに対してC)を有する成熟ヒトIL-2	pSAC35	176	144	208			HSA/kex2
29	1812	pSAC35:IL2.A21-T153.HSA	HSA/kex2リーダーの下流および成熟HSAの上流に融合されたIL-2のアミノ酸A21ないしT153	pSAC35	177	145	209			HSA/kex2
30	1813	pSAC35:HSA.IL2.A21-T153	HSA/kex2リーダー配列を伴うHSAの下流に融合されたIL-2のアミノ酸A21ないしT153	pSAC35	178	146	210			HSA/kex2
31	1952	pcDNA3.1:IL2.HSA	成熟HSAの上流に融合された、アミノ酸145においてシステインからセリンへの変異を有する、全長ヒトIL-2	pCDNA3.1	179	147	211			天然IL-2リーダー
32	1954	pC4:IL2.HSA	成熟HSAの上流に融合された、アミノ酸145においてシステインからセリンへの変異を有する、全長ヒトIL-2	pC4	180	148	212			天然IL-2リーダー

【表３７】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
33	3468	pSAC35:KTsp.HSA.GH	成長ホルモンが後に続く成熟HSAが後に続くキラートキシンシグナルペプチド	pSAC35	313	245	381	449	450	キラートキシンプレプロ
34	3469	pSAC35:INVsp.HSA.GH	成長ホルモンが後に続く成熟HSAが後に続くインベルターゼシグナルペプチド	pSAC35	314	246	382	451	452	インベルターゼ
35	3470	pSAC35:APsp.HSA.GH	成長ホルモンが後に続く成熟HSAが後に続く酸性ホスファターゼシグナルペプチド	pSAC35	315	247	383	453	454	酸性ホスファターゼ
36	3475	pSAC35:G19Rsp.HSA.GH	成長ホルモンが後に続く成熟HSAが後に続く修飾HSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	316	248	384	455	456	修飾HSA/Kex2
37	3476	pSAC35:G19Rsp.HSA.IFNa	INF-アルファが後に続く成熟HSAが後に続く修飾HSA/kex2シグナル配列	pSAC35	317	249	385	457	458	修飾HSA/Kex2
38	3549	pSAC35:HSA/kex2.BDNFc.HSA	成熟HSAが後に続く成熟BDNFc(スプライスバリアント6)が後に続くHSA/kex2リーダー	pSAC35	318	250	386	なし	なし	HSA/Kex2

【表３８】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
39	3610	pSAC35:(HSA/KEX(R19G))SP.GLP-1(7-36A8G)x2.HSA	HSAのN末端に融合された酵母コドン最適化glp-1二量体(２番目の二量体は、各コドンのゆらぎ位置が初めの二量体と異なるように改変されている)が後に続く修飾HSA/kex2リーダー	pSAC35	319	251	387	459	460	修飾HSA/Kex2
40	3690	pC4:MPIFSP.BNP/HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたBNPが後に続く骨髄系前駆細胞阻害因子-1(MPIF)シグナル配列	pC4	320	252	388	461	462	MPIF-1
41	3691	pC4:SPCON.BNP/HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたBNPが後に続くコンセンサスシグナル配列	pC4	321	253	389	463	464	コンセンサス
42	3696	pEE12.1:GLP-1(7-36(A8G)x2.HSA	HSAのN末端に融合された酵母コドン最適化glp-1二量体(２番目の二量体は、各コドンのゆらぎ位置が初めの二量体と異なるように改変されている)が後に続く骨髄系前駆細胞阻害因子-1(MPIF)シグナル配列	pEE12.1	322	254	390	465	466	MPIF-1

【表３９】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
43	3715	pSAC35:BNP29/HSA.S65	HSAのN-末端(S65-L585)に融合されたヒトBNPの１コピー(アミノ酸1-29),HSAN-末端切断(デルタ1-64),これはHSA/Kex2シグナル配列の下流である。	pSAC35	323	255	391	467	468	HSA/Kex2
44	3723	pEE12.1:MPIFSP.BNP/HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたBNPが後に続く骨髄系前駆細胞阻害因子-1(MPIF)シグナル配列	pEE12.1	324	256	392	なし	なし	MPIF-1
45	3724	pEE12.1:SPCON.BNP/HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたBNPが後に続くコンセンサスシグナル配列が後に続く	pEE12.1	325	257	393	なし	なし	コンセンサス
46	3725	pEE12.1:SPCON2.BNP/HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたBNPが後に続くコンセンサスシグナル配列が後に続く	pEE12.1	326	258	394	なし	なし	コンセンサスシグナルペプチド#2
47	3736	pC4:SPCON2.BNP/HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたBNPが後に続くコンセンサスシグナル配列が後に続く	pC4	327	259	395	469	470	コンセンサスシグナルペプチド#2

【表４０】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
48	3769	pC4:BNP(R13G)/HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたBNP変異(R13G)が後に続く骨髄系前駆細胞阻害因子-1(MPIF)シグナル配列	pC4	328	260	396	471	472	MPIF-1
49	3778	pC4:SPCON.BNP29/HSA.S65	HSAのN-末端(S65-L585)に融合されたヒトBNPの１コピー(アミノ酸1-29),HSAN-末端切断(デルタ1-64),これはHSA/Kex2シグナル配列の下流である。	pC4	329	261	397	473	474	コンセンサス
50	3783	pC4:SPCON.BNP(R13G)/HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたBNP変異(R13G)が後に続く骨髄系前駆細胞阻害因子-1(MPIF)シグナル配列	pC4	330	262	398	475	476	コンセンサス
51	3795	pC4:SPCON.BNP(K14G)/HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたBNP変異(K１４G)が後に続く骨髄系前駆細胞阻害因子-1(MPIF)シグナル配列	pC4	331	263	399	477	478	コンセンサス
52	3796	pSAC35:HSA/BNP	BNPのN-末端に融合された成熟HSAが後に続く	pSAC35	332	264	400	479	480	HSA/Kex2
53	3809	pSAC35:BNP30(GGG)/HSA	成熟HSAのN-末端に三部からなる(tripartite)グリシンを介して融合されたBNP(アミノ酸1-30)が後に続くHSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	333	265	401	481	482	HSA/Kex2

【表４１】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
54	3886	pSAC35:HSA/KEX2.LANP.HSA	成熟HSAN-末端に融合されたLANPが後に続くHSA/Kex2シグナル配列。LANPは、配列番号:402(以後、LANPと言う)のアミノ酸26-55に対応する。	pSAC35	334	266	402	なし	なし	HSA/Kex2
55	3887	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.LANP	成熟LANPのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	335	267	403	なし	なし	HSA/Kex2
56	3888	pSAC35:HSA/KEX2.VDP.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたVDPが後に続くHSA/Kex2シグナル配列。VDPは、配列番号:404(以後、VDPと言う)のアミノ酸56-92に対応する。	pSAC35	336	268	404	なし	なし	HSA/Kex2
57	3889	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.VDP	成熟VDPのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	337	269	405	なし	なし	HSA/Kex2
58	3890	pSAC35:HSA/KEX2.KUP.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたKUPが後に続くHSA/Kex2シグナル配列。KUPは、配列番号:406(以後、KUPと言う)のアミノ酸104-123に対応する。	pSAC35	338	270	406	なし	なし	HSA/Kex2
59	3891	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.KUP	成熟KUPのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	339	271	407	なし	なし	HSA/Kex2

【表４２】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
60	3892	pSAC35:HSA/KEX2.CNP.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたCNPが後に続くHSA/Kex2シグナル配列。CNPは、配列番号:408(以後、KUPと言う)のアミノ酸105-123に対応する。	pSAC35	340	272	408	なし	なし	HSA/Kex2.
61	3893	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.CNP	成熟CNPのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	341	273	409	なし	なし	HSA/Kex2
62	3894	pSAC35:HSA/KEX2.DNP.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたDNPが後に続くHSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	342	274	410	なし	なし	HSA/Kex2
63	3895	pSAC35:HSA/KEX2.HSA.DNP	成熟DNPのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	343	275	411	なし	なし	HSA/Kex2
64	3896	pSAC35:HSA/KEX(R19G)-BNP30(GGG).HSA	成熟HSAのN-末端に三部からなるグリシンリンカーを介して融合されたBNP(アミノ酸1-30)が後に続く修飾HSA/KEX-2リーダー	pSAC35	344	276	412	なし	なし	修飾HSA/Kex2
65	3897	pEE12:SPCON-BNP(K14G).HSA	成熟HSAのN-末端に融合された変異BNP(K14G)が後に続くコンセンサスシグナル配列	pEE12.1	345	277	413	なし	なし	コンセンサス

【表４３】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
66	3898	pSAC35:HSA/Kex-2-BNP(K14G).HSA	成熟HSAのN-末端に融合された変異BNP(K14G)が後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	346	278	414	なし	なし	HSA/Kex 2
67	3899	pSAC35:HSA/Kex-2(R19G)-BNP(K14G).HSA	成熟HSAのN-末端に融合された変異BNP(K14G)が後に続く修飾HSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	347	279	415	なし	なし	修飾HSA/Kex 2
68	3900	pSAC35:HSA/Kex-2-HSA.BNP(K14G)	変異BNP(K14G)のN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	348	280	416	なし	なし	HSA/Kex 2
69	3903	pC4:SPCON-ウリカーゼ.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたウリカーゼが後に続くコンセンサスシグナル配列	pC4	349	281	417	なし	なし	コンセンサス
70	3904	pC4:HSA/Kex2-HSA.ウリカーゼ	ラット由来ウリカーゼのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pC4	350	282	418	なし	なし	HSA/Kex 2
71	3910	pSAC35:HSA/Kex-2-ADI.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたマイコプラズマ由来アルギニンデイミナーゼが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	351	283	419	なし	なし	HSA/Kex 2
72	3915	pC4:SPCON-ADI.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたマイコプラズマ由来アルギニンデイミナーゼが後に続くコンセンサスシグナル配列	pC4	352	284	420	なし	なし	コンセンサス

【表４４】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
73	3917	pC4:HSA/Kex-2-HSA.ADI	マイコプラズマ由来アルギニンデイミナーゼのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pC4	353	285	421	なし	なし	HSA/Kex 2
74	3918	pSAC35:HSA/Kex2-HSA.ADI	マイコプラズマ由来アルギニンデイミナーゼのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	354	286	422	なし	なし	HSA/Kex 2
75	3919	pSAC35:KEX2.TWEAKR.E28-F75.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたTweakR(アミノ酸28-75)が後に続くHSA/KEX-2シグナル配列。TweakRE28-F75は、配列番号:423(以後、TweakRE28-F75と言う)のアミノ酸28-75に対応する。	pSAC35	355	287	423	なし	なし	HSA/Kex 2
76	3920	pSAC35:HSA/Kex2-GCB.HSA	成熟HSA.のN-末端に融合されたリソソームグルコセレブロシダーゼが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	356	288	424	なし	なし	HSA/Kex 2
77	3921	pC4:SPCON-GCB.HSA	成熟HSA.のN-末端に融合されたリソソームグルコセレブロシダーゼが後に続くコンセンサスシグナル配列	pC4	357	289	425	なし	なし	コンセンサス

【表４５】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
78	3922	pSAC35:HSA/Kex2-HSA.GCB	リソソームグルコセレブロシダーゼのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	358	290	426	なし	なし	HSA/Kex2
79	3923	pC4:HSA/Kex2-HSA.GCB	リソソームグルコセレブロシダーゼのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pC4	359	291	427	なし	なし	HSA/Kex2
80	3924	pSAC35:HSA/Kex2-ADM.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたアドレノメデュリンが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	360	292	428	なし	なし	HSA/Kex2
81	3925	pC4:SPCON-ADM.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたアドレノメデュリンが後に続くコンセンサスシグナル配列	pC4	361	293	429	なし	なし	コンセンサス
82	3926	pSAC35:HSA/Kex2-HSA.ADM	アドレノメデュリンのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	362	294	430	なし	なし	HSA/Kex2
83	3927	pC4:HSA/Kex2-HSA.ADM	アドレノメデュリンのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pC4	363	295	431	なし	なし	HSA/Kex2

【表４６】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
84	3928	pc4:HSA.Kiss.E20-Q145	Kiss(アミノ酸20-145)のN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSAシグナル配列のプレプロ領域。KissE20-Q145は、配列番号:432(以後、KissE20-Q145)のアミノ酸20-145に対応する。	pC4	364	296	432	なし	なし	HSAプレプロ
85	3929	pSAC35:KEX2.HSA.KIS S-1.E20-Q145	Kiss(アミノ酸20-145)のN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/KEX-2シグナル配列	pSAC35	365	297	433	なし	なし	HSA/Kex 2
86	3930	pSAC35:KEX2.エフリンB1.K30-D229.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたエフリンB1(アミノ酸30-229)が後に続くHSA/KEX-2シグナル配列。エフリンB1 K30-D229は、配列番号:434(以後、エフリンB1 K30-D229)のアミノ酸30-229に対応する。	pSAC35	366	298	434	なし	なし	HSA/Kex 2
87	3931	pc4:エフリンB1.M1-D229.HSA	成熟HSAのN-末端に融合された、天然エフリンB1シグナル配列を含むエフリンB1(アミノ酸1-229)。	pC4	367	299	435	なし	なし	天然エフリンB1

【表４７】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
88	3932	pc4:TWEAKR.M1-F75.HSA	成熟HSAのN-末端に融合された、天然TweakRシグナル配列を含むTweakR(アミノ酸1-75)。TweakRM1-F75は、配列番号:436(以後、TweakRM1-F75と言う)のアミノ酸1-75に対応する。	pC4	368	300	436	なし	なし	天然TweakR
89	3933	pc4:B7-H3.M1-E247.HSA	成熟HSAのN-末端に融合された、天然B7-H3シグナル配列を含むB7-H3(アミノ酸1-247)。	pC4	369	301	437	なし	なし	天然B7-H3
90	3934	pc4:HSA.エフリンB1.K30-D229	エフリンB1(アミノ酸30-229)のN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSAシグナル配列のプレプロ領域。	pC4	370	302	438	なし	なし	HSAプレプロ
91	3935	pSAC35:HSA.エフリンB1.K30-D229	エフリンB1(アミノ酸30-229)のN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	371	303	439	なし	なし	HSA/Kex2
92	3936	pc4:SPCON.cウリカーゼ.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたチンパンジー由来ウリカーゼが後に続くコンセンサスシグナル配列	pC4	372	304	440	なし	なし	コンセンサス

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
93	3937	pc4:HSA.cウリカーゼ	チンパンジー由来ウリカーゼのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSAシグナル配列のプレプロ領域。	pC4	373	305	441	なし	なし	HSAプレプロ
94	3938	pc4:SPCON.hウリカーゼ.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたウリカーゼが後に続くコンセンサスシグナル配列。	pC4	374	306	442	なし	なし	コンセンサス
95	3939	pc4:HSA.hウリカーゼ	ウリカーゼのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSAシグナル配列のプレプロ領域。	pC4	375	307	443	なし	なし	HSAプレプロ
96	3940	pc4:SPCON.bウリカーゼ.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたヒヒ由来ウリカーゼが後に続くコンセンサスシグナル配列	pC4	376	308	444	なし	なし	コンセンサス
97	3941	pc4:HSA.bウリカーゼ	ヒヒ由来ウリカーゼのN-末端に融合された成熟HSAが後に続くHSAシグナル配列のプレプロ領域。	pC4	377	309	445	なし	なし	HSAプレプロ
98	3942	pSAC35:KEX2.hウリカーゼ.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたウリカーゼが後に続くHSA/Kex2シグナル配列。	pSAC35	378	310	446	なし	なし	HSA/Kex2
99	3943	pSAC35:KEX2.cウリカーゼ.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたチンパンジー由来ウリカーゼが後に続くHSA/Kex2シグナル配列	pSAC35	379	311	447	なし	なし	HSA/Kex2

【表４９】

表2

融合番号	コンストラクト番号	コンストラクト名	説明	発現ベクター	配列番号:Y	配列番号:X	配列番号:Z	配列番号:A	配列番号:B	リーダー配列
100	3944	pSAC35:KEX2.bウリカーゼ.HSA	成熟HSAのN-末端に融合されたヒト由来ウリカーゼが後に続くHSA/Kex2シグナル配列。	pSAC35	380	312	448	なし	なし	HSA/Kex2
101	3618	pC4:SPCON.BNP1-32(2x)/HSA	成熟HSAのN-末端に融合された成熟BNPの２つのタンデムコピーが後に続くコンセンサスシグナル配列。	pC4	483	484	485	463	464	コンセンサス

【００６４】

表２は、アルブミン融合蛋白質をコードする核酸分子を含む或いはそれからなる本発明のポリヌクレオチドの非限定的なリストを提供する。初めの欄の「融合番号」は、各ポリヌクレオチドの融合番号を与える。欄２の「コンストラクト番号」は、本発明のポリヌクレオチドそれぞれについて固有の識別番号を与える。該コンストラクト番号は、表１の対応する列に記載されており、かつ欄５にそのコンストラクト番号が記載される特定の治療用蛋白質：Ｘに対応する治療用蛋白質部分を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを同定するために用いられてもよい。「コンストラクト名」の欄（欄３）は、特定のアルブミン融合コンストラクトまたはポリヌクレオチドの名前を提供する。

【００６５】

表２の４番目の欄「説明」は、特定のアルブミン融合コンストラクトの一般的な説明を提供し、および５番目の欄の「発現ベクター」は、特定のアルブミン融合蛋白質をコードする核酸分子を含む或いはそれからなるポリヌクレオチドがクローニングされるベクターを記載する。ベクターは当該技術分野において知られており、かつ購入可能であり、または他に記載されている。例えば、実施例に記載されているように、（１）特定のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド（２）リーダー配列（３）プロモーター領域および（４）転写ターミネーターの１またはそれ以上を含む或いはそれらからなる「発現カセット」を、適切なクローニングベクター中に構築し、次いで、例えば、酵母発現ベクターまたは哺乳類の発現ベクターを含む発現ベクターのごとき別のベクターに移す。一の実施態様において、パン酵母（Ｓ．ｃｅｒｖｉｓｉａｅ）における発現のために、アルブミン融合蛋白質をコードする核酸分子を含む或いはそれからなる発現カセットは、ｐＳＡＣ３５中にクローニングされる。別の実施態様において、ＣＨＯ細胞における発現のために、アルブミン融合蛋白質をコードする核酸分子を含む或いはそれからなる発現カセットは、ｐＣ４中にクローニングされる。さらなる一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分をコードする核酸分子を含む或いはそれからなるポリヌクレオチドは、ｐＣ４：ＨＳＡ中にクローニングされる。さらなる一層の一の実施態様において、ＮＳＯ細胞における発現のために、アルブミン融合蛋白質をコードする核酸分子を含む或いはそれからなる発現カセットは、ｐＥＥ１２中にクローニングされる。他の有用なクローニングおよび／または発現ベクターは当業者に知られており、および本発明の範囲内である。

【００６６】

欄６の「配列番号：Ｙ」は、本発明のアルブミン融合蛋白質の全長アミノ酸配列を提供する。ほとんどの場合、配列番号：Ｙは、コードされたアルブミン融合蛋白質のプロセッシングされていない形態を示す。つまり、配列番号：Ｙは、シグナル配列、ＨＳＡ部分および特定のコンストラクトによりコードされる治療用部分全てを示す。特に、配列番号：Ｙをコードする全てのポリヌクレオチドが本発明により熟慮される。細胞がコードされた蛋白質を発現するためにこれらのポリヌクレオチドが用いられる場合、細胞の自然な分泌およびプロセッシング段階は、表２の欄４および／または１１に記載されるシグナル配列を欠失している蛋白質を生じる。記載されるシグナル配列の特定のアミノ酸配列は本明細書において後述されるか、または当該技術分野においてよく知られている。故に、本発明の最も好ましい実施態様は、細胞により産生されるアルブミン融合蛋白質（表２の欄４および／または１１に示されるリーダー配列を欠失し得る）を含む。さらに、表２の欄４および／または１１に記載される特定のリーダー配列のない配列番号：Ｙを含むポリペプチドは最も好ましい。これらの２つの好ましい実施態様を含む、医薬組成物を含む組成物も好ましい。さらに、表２の欄４および／または１１に記載されるシグナル配列を、異なるシグナル配列、例えば、本明細書において後述するものに置き換えて、プロセッシングされたアルブミン融合蛋白質の分泌を改善することは、十分に当業者の能力の範囲内にある。

【００６７】

７番目の欄の「配列番号：Ｘ」は、特定のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分を

コードするポリヌクレオチドが由来し得る親核酸配列を示す。一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分をコードするポリヌクレオチドが由来し得る親核酸配列は、表１に示される治療用蛋白質をコードする野生型遺伝子配列を含む。別の一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分をコードするポリヌクレオチドが由来し得る親核酸配列は、表１に示される治療用蛋白質をコードする野生型遺伝子配列の変異体または誘導体、例えば、治療用蛋白質をコードする野生型遺伝子配列の合成コドン最適化変異体を含む。

【００６８】

８番目の欄の「配列番号：Ｚ」は、予測される親核酸配列（配列番号：Ｘ）の翻訳を提供する。この親配列は、特定のコンストラクト、親蛋白質の成熟部分、野生型蛋白質の変異体もしくは断片または記載のコンストラクトを作製するために用いられ得る人工配列を得るために用いられる全長親蛋白質であり得る。当業者は、配列番号：Ｚに記載のこのアミノ酸配列を用いて、特定のコンストラクトによりコードされるアルブミン融合蛋白質のどのアミノ酸残基が治療用蛋白質に由来するかを決定することができる。さらに、配列番号：Ｚに記載の配列を用いて同じ列に記載されるコンストラクトを作製することは、十分に当業者の能力の範囲内にある。例えば、配列番号：Ｚが全長蛋白質に相当し、さらにその蛋白質部分を用いて特定のＣＩＤを作製する場合、ＰＣＲのごとき分子生物学技法により、特定の断片を増幅し、次いでそれを適切なベクター中にクローニングすることは、当該技術の範囲内である。

【００６９】

欄９および１０において提供される増幅用プライマー、「配列番号：Ａ」および「配列番号：Ｂ」はそれぞれ、特定のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分をコードする核酸分子を含む或いはそれからなるポリヌクレオチドを産生するために用いられる代表的なプライマーである。本発明の一の実施態様において、欄９および／または１０に示される配列（配列番号Ｓ：Ａおよび／またはＢ）を有するオリゴヌクレオチドプライマーは、対応する列の欄７において提供されるヌクレオチド配列（配列番号：Ｘ）を含む或いはそれからなる核酸分子を鋳型ＤＮＡとして用いて、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分をコードするポリヌクレオチドをＰＣＲ増幅するために用いられる。ＰＣＲ方法は、当該技術分野において十分に確立されている。さらなる有用なプライマー配列は、当業者により容易に構想および利用されよう。

【００７０】

別の一の実施態様において、オリゴヌクレオチドプライマーをオーバーラッピングＰＣＲ反応に用いて、鋳型ＤＮＡ配列内に変異を生じさせてもよい。ＰＣＲ方法は当該技術分野において知られている。

【００７１】

表３に示すように、本明細書中に開示される特定のアルブミン融合コンストラクトはＡＴＣＣ（登録商標）に寄託されている。

表３

【表５０】

コンストラクト番号	コンストラクト名	ATCC寄託番号/寄託日
1812	pSAC35:IL2.A21－T153.HSA	PTA－3759 2001年10月4日
2053	pEE12:IFNb－HSA pEE12.1:IFNβ－HSAとも言う	PTA－3764 2001年10月4日
2054	pEE12:HSA－IFNb	PTA－3941 2001年12月19日
2249	pSAC35:IFNa2－HSA pSAC23:IFNα2－HSAとも言う	PTA－3763 2001年10月4日
2343	pSAC35.INV－IFNA2.HSA	PTA－3940 2001年12月19日
2381	pC4:HSA－IFNa2(C17－E181)	PTA－3942 2001年12月19日
2382	pC4:IFNa2－HSA	PTA－3939 2001年12月19日
2492	pC4.IFNb(ﾃﾞﾙﾀM22).HSA	PTA－3943 2001年12月19日
3165	pSAC35:HSA.IFNa CID3165、pSAC35:HSA.INFαとも言う	PTA－4670 2002年9月16日

【００７２】

当該技術分野において知られているおよび本明細書中別記されている技法（実施例１０を参照のこと）により寄託物から特定のアルブミン融合コンストラクトを回収することができる。ＡＴＣＣは、１０８０１　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ　２０１１０－２２０９，ＵＳＡに所在する。ＡＴＣＣ寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の条項に準ずる。

【００７３】

本発明のさらなる一の実施態様において、（１）特定のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド（２）リーダー配列（３）プロモーター領域および（４）転写ターミネーターの１またはそれ以上を含む或いはそれらからなる「発現カセット」は、１つのベクターから別のベクターへ移されるかまたは「サブクローニング」され得る。サブクローニングされるべき断片は、当該技術分野においてよく知られている方法、例えば、ＰＣＲ増幅（例えば、配列番号：ＡまたはＢで示される配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用いる）および／または制限酵素消化により作製されてもよい。

【００７４】

好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、表１の対応する列に記載されるアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質の治療活性および／または生物活性に対応する治療活性および／または生物活性を有し得る。さらなる好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療活性のある蛋白質部分は、表２の配列番号：Ｘの欄に示される配列によりコードされる蛋白質の断片もしくは変異体であり、および対応する治療用蛋白質の治療活性および／または生物活性を有し得る。

【００７５】

ポリペプチドおよびポリヌクレオチド断片および変異体

断片

本発明は、表１に記載の治療用蛋白質、アルブミン蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質の断片をさらに対象とする。

【００７６】
本発明は、表１に記載の治療用蛋白質、アルブミン蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質の断片をコードするポリヌクレオチドも対象とする。
【００７７】
蛋白質のＮ－末端から１またはそれ以上のアミノ酸を欠失させ、その結果、その治療用蛋白質、アルブミン蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質の１またはそれ以上の生物学的機能を修飾または欠失させたとしても、他の治療活性および／または機能活性（例えば、生物活性、多量体形成能、リガンド結合能）がなお保持されていてもよい。例えば、完全なポリペプチドの過半数に満たない残基をＮ－末端から除去した場合、ポリペプチドの完全または成熟形態を認識する抗体を誘導するおよび／またはそれに結合するＮ－末端に欠失のあるポリペプチドの能力は一般的に保持され得る。完全なポリペプチドのＮ－末端残基を欠失している特定のポリペプチドがかかる免疫活性を保持しているか否かは、本明細書中にて記載されているおよびそうでなければ当該技術分野において知られている慣用法により容易に決定され得る。多数のＮ－末端のアミノ酸残基が欠失した突然変異蛋白質が幾つかの生物活性または免疫活性を保持していてもよいことが考えられ得る。実際に、わずか６個のアミノ酸残基からなるペプチドは多くの場合免疫応答を引き起こし得る。
【００７８】
従って、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質の断片は、全長蛋白質ならびに参照ポリペプチド（すなわち、表１で参照される治療用蛋白質、または表２に記載のポリペプチドもしくはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分）のアミノ酸配列のアミノ末端から１またはそれ以上の残基が欠失しているポリペプチドを含む。特に、Ｎ－末端の欠失は、一般式ｍからｑで示されてもよく、ここでｑは参照ポリペプチド（例えば、表１で参照される治療用蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分、または表２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分）中のアミノ酸残基の総数を示す整数値であり、ｍは２からｑ－６の範囲の任意の整数と定義される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。
【００７９】
加えて、本発明のアルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分に対応する血清アルブミンポリペプチドの断片は、全長蛋白質ならびに参照ポリペプチド（すなわち、血清アルブミン、または表２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン融合蛋白質の血清アルブミン部分）のアミノ酸配列のアミノ末端から１またはそれ以上の残基が欠失しているポリペプチドを含む。好ましい実施態様において、Ｎ－末端の欠失は、一般式ｍから５８５で示され、ここで５８５は成熟ヒト血清アルブミン（配列番号：１）にあるアミノ酸残基の総数を示す整数値であり、ｍは２から５７９の範囲の任意の整数と定義される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。さらなる実施態様において、Ｎ－末端の欠失は、一般式ｍから６０９で示され、ここで６０９は全長ヒト血清アルブミン（配列番号：３）にあるアミノ酸残基の総数を示す整数値であり、ｍは２から６０３の範囲の任意の整数と定義される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。
【００８０】
さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質の断片は、全長アルブミン融合蛋白質ならびにアルブミン融合蛋白質（例えば、表２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされるアルブミン融合蛋白質；または表２の欄６に開示されるアミノ酸配列を有するアルブミン融合蛋白質）のアミノ末端から１またはそれ以上の残基が欠失しているポリペプチドを含む。特に、Ｎ－末端の欠失は、一般式ｍからｑで示されてもよく、ここでｑはアルブミン融合蛋白質にあるアミノ酸残基の総数を示す整数値であ

り、ｍは２からｑ－６の範囲の任意の整数と定義される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。

【００８１】

上述のように、参照ポリペプチド（例えば、治療用蛋白質血清アルブミン蛋白質；または本発明のアルブミン融合蛋白質）のＮ－末端またはＣ－末端から１またはそれ以上のアミノ酸を欠失させることによってその蛋白質の１またはそれ以上の生物学的機能を修飾または欠失させたとしても、他の機能活性（例えば、生物活性、多量体形成能、リガンド結合能）および／または治療活性はなお保持されていてもよい。例えば、完全または成熟なポリペプチドの過半数に満たない残基をＣ－末端から除去した場合、ポリペプチドの完全または成熟形態を認識する抗体を誘導するおよび／またはそれに結合するＣ－末端に欠失のあるポリペプチドの能力は一般的に保持され得る。参照ポリペプチドのＮ－末端および／またはＣ－末端の残基を欠失している特定のポリペプチドが治療活性を保持するか否かは、本明細書中記載されているおよび／またはそうでなければ当該技術分野において知られている慣用法により容易に決定され得る。

【００８２】

本発明はさらに、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質（例えば、表１で参照される治療用蛋白質、または表２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分）のアミノ酸配列のカルボキシ末端から１またはそれ以上の残基が欠失しているポリペプチドを提供する。特に、Ｃ－末端の欠失は一般式１からｎで示されてもよく、ここで、ｎは６からｑ－１の範囲の任意の整数値であり、ｑは参照ポリペプチド（例えば、表１で参照される治療用蛋白質、または表２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分）中のアミノ酸残基の総数を示す整数値である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。

【００８３】

加えて、本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分に対応するアルブミン蛋白質（例えば、血清アルブミンまたは表２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされるアルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分）のアミノ酸配列のカルボキシ末端から１またはそれ以上の残基が欠失しているポリペプチドを提供する。特に、Ｃ－末端の欠失は一般式１からｎで示されてもよく、ここでｎは６から５８４の範囲の任意の整数値であり、５８４は成熟ヒト血清アルブミン（配列番号：１）のアミノ酸残基の総数を示す整数から１を引いたものである。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。特に、Ｃ－末端の欠失は一般式１からｎで示されてもよく、ここでｎは６から６０８の任意の整数値であり、６０８は血清アルブミン（配列番号：３）にあるアミノ酸残基の総数を示す整数から１を引いたものである。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。

【００８４】

さらに、本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質のカルボキシ末端から１またはそれ以上の残基が欠失しているポリペプチドを提供する。特に、Ｃ－末端の欠失は一般式１からｎで示されてもよく、ここでｎは６からｑ－１の範囲の任意の整数値であり、ｑは本発明のアルブミン融合蛋白質にあるアミノ酸残基の総数を示す整数値である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。

【００８５】

加えて、上記のＮ－またはＣ－末端の欠失を任意に組み合わせて、Ｎ－およびＣ－末端欠失参照ポリペプチドを産生することができる。本発明は、アミノおよびカルボキシル末端の両方から１またはそれ以上のアミノ酸を欠失させたポリペプチドも提供し、これは一般的に参照ポリペプチド（例えば、表１で参照される治療用蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分、または表２に記載のポリヌクレオチドまたはアル

ブミン融合コンストラクトによりコードされた治療用蛋白質部分、または血清アルブミン（例えば、配列番号：１）、または本発明のアルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分、または表２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン蛋白質部分、またはアルブミン融合蛋白質、または本発明のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされるアルブミン融合蛋白質）のｍ～ｎ個の残基を有するものとして示されてもよく、ここでｎおよびｍは上記の整数である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【００８６】

本出願は、本明細書中に記載の参照ポリペプチド配列（例えば、表１で参照される治療用蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分、または表２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされた治療用蛋白質部分、または血清アルブミン（例えば、配列番号：１）、または本発明のアルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分、または表２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン蛋白質部分、またはアルブミン融合蛋白質、または本発明のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン融合蛋白質）またはその断片と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるポリペプチドを含む蛋白質も対象とする。好ましい実施態様において、本出願は、上記のようにＮ－およびＣ－末端に欠失のあるアミノ酸配列を有する参照ポリペプチドと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるポリペプチドを含む蛋白質も対象とする。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。

【００８７】

本発明の好ましいポリペプチド断片は、そのアミノ酸配列が断片である治療用蛋白質または血清アルブミン蛋白質のポリペプチド配列の治療活性および／または機能活性（例えば、生物活性）を示すアミノ酸配列を含む或いはそれらからなる断片である。

【００８８】

他の好ましいポリペプチド断片は生物活性のある断片である。生物活性のある断片は、本発明のポリペプチドの活性と同一である必要はないが類似する活性を示すものである。断片の生物活性は、所望の活性の改善または所望でない活性の減少を含んでもよい。

【００８９】

変異体

「変異体」は、参照の核酸またはポリペプチドとは異なるがその必須な特性を保持しているポリヌクレオチドまたは核酸を言う。一般的に、変異体は全体としてその参照の核酸またはポリペプチドに対して非常に類似しており、および多くの領域において同一である。

【００９０】

本明細書中用いる「変異体」は、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分、本発明のアルブミン融合蛋白質のアルブミン部分または本発明のアルブミン融合蛋白質であって、それぞれ治療用蛋白質（例えば、表１の「治療用」の欄を参照のこと）、アルブミン蛋白質および／またはアルブミン融合蛋白質と配列が異なるが、本明細書中別記されているかまたはそうでなければ当該技術分野において知られている少なくともその１つの機能特性および／または治療特性を保持しているものを言う。一般的に、変異体は全体としてアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質、アルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分に対応するアルブミン蛋白質および／またはアルブミン融合蛋白質のアミノ酸配列に非常に類似しており、および多くの領域においてそれと同一である。これらの変異体をコードする核酸も本発明により包含される。

【００９１】

本発明は、例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質のアミノ酸配列（例えば、表１に開示される治療用蛋白質：Ｘのアミノ酸配列；

または表１および２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分のアミノ酸配列、またはその断片もしくは変異体）、本発明のアルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分に対応するアルブミン蛋白質のアミノ酸配列（例えば、表１および２に記載のポリヌクレオチドまたはアルブミン融合コンストラクトによりコードされたアルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分のアミノ酸配列；配列番号：１で示されるアミノ酸配列；またはその断片もしくは変異体）、および／またはアルブミン融合蛋白質のアミノ酸配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一であるアミノ酸配列を含む或いはそれらからなる蛋白質も対象とする。これらのポリペプチドの断片（例えば、本明細書中に記載の断片）も提供される。本発明により包含されるさらなるポリペプチドは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（例えば、６×の塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中でフィルターに結合させたＤＮＡと約４５℃でハイブリダイズさせ、次いで、約５０～６５℃、０．２×のＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ中で１回以上洗浄する）、よりストリンジェントな条件下（例えば、６×の塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中でフィルターに結合させたＤＮＡと約４５℃でハイブリダイズさせ、次いで、約６８℃、０．１×のＳＳＣ、０．２％のＳＤＳ中で１回以上洗浄する）、または当業者に知られている他のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら．，ｅｄｓ．，１９８９Ｃｕｒｒｅｎｔ ｐｒｏｔｏｃｏｌ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎ ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．，およびＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．６．３．１－６．３．６およびｐ．２．１０．３を参照のこと）にて、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードする相補的な核酸分子にハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドである。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。

【００９２】

クエリー（ｑｕｅｒｙ）アミノ酸配列に対して例えば少なくとも９５％「同一」なアミノ酸配列を有するポリペプチドにより、対象とするポリペプチドのアミノ酸配列が、クエリーアミノ酸配列の各アミノ酸１００個あたり最高５個までの変更を含み得ることを除いては、そのクエリー配列に同一であることが意図される。つまり、クエリーアミノ酸配列に対して少なくとも９５％同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、対象の配列のアミノ酸残基の５％までを挿入、欠失または他のアミノ酸と置換してもよい。参照配列のこれらの変更は、参照アミノ酸配列のアミノ－またはカルボキシ－末端の位置で生じてもよく、またはこれらの末端の間のどこでも、参照配列内の残基中に個々に散在するか、もしくはその参照配列内の１またはそれ以上の連続した群で散在していてもよい。

【００９３】

実際的な問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質またはその断片（例えば、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分またはアルブミン融合蛋白質のアルブミン部分）のアミノ酸配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるか否かは、既知のコンピュータープログラムを用いて慣用的に決定することができる。クエリー配列（本発明の１配列）と対象配列との間の全体として最も良好なマッチを決定するための好ましい方法は、グローバルシークエンスアライメントとも呼ばれ、Ｂｒｕｔｌａｇら（Ｃｏｍｐ．Ａｐｐ．Ｂｉｏｓｃｉ．６：２３７－２４５（１９９０））のアルゴリズムに基づいてＦＡＳＴＤＢコンピュータープログラムを用いて決定することができる。配列アライメントにおいて、クエリーと対象配列は共にヌクレオチド配列であるか、または共にアミノ酸配列である。該グローバルシークエンスアライメントの結果は、同一性パーセントとして示される。ＦＡＳＴＤＢアミノ酸アライメントにて用いられる好ましいパラメーターは以下の通りである：マトリックス（Ｍａｔｒｉｘ）＝ＰＡＭ ０、ｋ－ｔｕｐｌｅ＝２、ミスマッチペナルティ（Ｍｉｓｍａｔｃｈ Ｐｅｎａｌｔｙ）＝１、ジョイニングペナルティ（Ｊｏｉ

ｎｉｎｇ　Ｐｅｎａｌｔｙ）＝２０、ランダム化グループ長（Ｒａｎｄｏｍｉｚａｔｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ　Ｇｒｏｕｐ　Ｌｅｎｇｔｈ）＝０、カットオフスコア（Ｃｕｔｏｆｆ　Ｓｃｏｒｅ）＝ｌ、ウインドウサイズ（Ｗｉｎｄｏｗ　Ｓｉｚｅ）＝配列の長さ、ギャップペナルティ（Ｇａｐ　Ｐｅｎａｌｔｙ）＝５、ギャップサイズペナルティ（Ｇａｐ　Ｓｉｚｅ　Ｐｅｎａｌｔｙ）＝０．０５、ウインドウサイズ＝５００または短い方の対象アミノ酸配列の長さ。

【００９４】

対象配列が内部での欠失のためではなくＮ－またはＣ－末端の欠失に起因してクエリー配列より短いならば、結果に対して手動補正を行う必要がある。これはＦＡＳＴＤＢプログラムが全体的な同一性パーセントを計算する際に対象配列のＮ－およびＣ－末端の切断を考慮しないためである。Ｎ－およびＣ－末端で切断されている対象配列については、クエリー配列に対する同一性パーセントを、対象配列のＮ－およびＣ－末端にあり、対応する対象残基とマッチ／アライメントしないクエリー配列の残基数をクエリー配列の全塩基のパーセントとして計算することにより補正する。残基がマッチ／アライメントしているか否かは、ＦＡＳＴＤＢ配列アライメントの結果により決定される。次いで、このパーセンテージを、特定パラメーターを用いて上記ＦＡＳＴＤＢプログラムから計算した同一性パーセントから差し引いて、最終的な同一性パーセントスコアを導く。この最終的な同一性パーセントスコアは、本発明の目的のために用いられるものである。クエリー配列にマッチ／アライメントしない対象配列のＮ－およびＣ－末端に対する残基のみが、同一性パーセントスコアを手動補正するために考慮される。すなわち、対象配列のＮ－およびＣ－末端残基の最も遠い位置にあるものの外側にあるクエリー残基の位置のみである。

【００９５】

例えば、９０個のアミノ酸残基の対象配列を１００個の残基のクエリー配列とアライメントさせて、同一性パーセントを決定する。対象配列のＮ－末端に欠失が生じており、それ故に、ＦＡＳＴＤＢアライメントはＮ－末端の初めの１０個の残基にマッチング／アライメントを示さない。１０個の対をなさない残基は配列の１０％を占めることとなり（マッチしなかったＮ－およびＣ－末端の残基数／クエリー配列の残基の総数）、ＦＡＳＴＤＢプログラムにより計算された同一性パーセントスコアから１０％が差し引かれる。残りの９０個の残基が完全にマッチしているならば、最終的な同一性パーセントは９０％になるだろう。別の例では、９０個の残基の対象配列を１００個の残基のクエリー配列と比較する。この場合、欠失は内部の欠失であるので、クエリー配列とマッチ／アライメントしないような対象配列のＮ－またはＣ－末端の残基はない。この場合、ＦＡＳＴＤＢにより計算された同一性パーセントは手動補正しない。再度述べれば、ＦＡＳＴＤＢアライメントにより示された対象配列のＮ－およびＣ－末端の最後の残基の外側に位置する残基で、クエリー配列とマッチ／アライメントしないものについてのみ手動補正する。他の手動補正はいずれも本発明のために行われない。

【００９６】

通常、変異体は、その変異体と同じ長さである正常なＨＡもしくは治療用蛋白質と少なくとも７５％（好ましくは少なくとも約８０％、９０％、９５％または９９％）の配列同一性を有するだろう。ヌクレオチドもしくはアミノ酸配列レベルでの相同性もしくは同一性は、配列類似性検索のために最適化されたｂｌａｓｔｐ、ｂｌａｓｔｎ、ｂｌａｓｔｘ、ｔｂｌａｓｔｎおよびｔｂｌａｓｔｘプログラムによるアルゴリズム（Ｋａｒｌｉｎら．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：２２６４－２２６８（１９９０）およびＡｌｔｓｃｈｕｌ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｖｏｌ．３６：２９０－３００（１９９３）、出典明示により本明細書の一部となる）を用いたＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ）分析により決定される。

【００９７】

ＢＬＡＳＴプログラムで用いられるアプローチは、初めにクエリー配列とデータベース配列間の類似のセグメントを考慮し、次いで、同定された全てのマッチの統計学的有意性を評価し、そして最終的に、予め選択した有意性の閾値を満たすマッチのみを要約するこ

とである。配列データベースの類似性検索における基本的事項の考察については、Ａｌｔｓｃｈｕｌら．，（Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ６：１１９－１２９（１９９４））を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。ヒストグラム、説明（ｄｅｓｃｒｉｐｔｉｏｎ）、アライメント、期待値（ｅｘｐｅｃｔ）（すなわち、データベース配列に対するマッチを報告するための統計学的有意性の閾値）、カットオフ、マトリックスおよびフィルターのためのの検索パラメーターはデフォルト設定とする。ｂｌａｓｔｐ、ｂｌａｓｔｘ、ｔｂｌａｓｔｎおよびｔｂｌａｓｔｘで用いられるデフォルトスコアリングマトリックスはＢＬＯＳＵＭ６２マトリックス（Ｈｅｎｉｋｏｆｆら．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ１．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：１０９１５－１０９１９（１９９２）、出典明示により本明細書の一部となる）である。ｂｌａｓｔｎについては、スコアリングマトリックスはＭ（すなわち、マッチしている残基のペアについての報酬（ｒｅｗａｒｄ）スコア）対Ｎ（すなわち、ミスマッチの残基についてのペナルティースコア）の比率によって設定され、ここで、ＭおよびＮのデフォルトスコアはそれぞれ５および－４である。４つのｂｌａｓｔｎパラメーターを以下のように補正してもよい：Ｑ＝１０（ギャップクリエーションペナルティ）；Ｒ＝１０（ギャップエクステンションペナルティ）；ｗｉｎｋ＝１（クエリー配列に沿ってｗｉｎｋ^{ｔｈ}の位置ごとにワードヒット（ｗｏｒｄ ｈｉｔｓ）を作製する）；およびｇａｐｗ＝１６（ウインドウ（ｗｉｎｄｏｗ）幅を設定し、その中にギャップ化されたアライメントを作製する）。等価なＢｌａｓｔｐパラメーターの設定はＱ＝９；Ｒ＝２；ｗｉｎｋ＝ｌ；およびｇａｐｗ＝３２だった。ＧＣＧパッケージバージョン１０．０において利用可能な配列間のベストフィット比較は、ＤＮＡパラメーターＧＡＰ＝５０（ギャップクリエーションペナルティ）およびＬＥＮ＝３（ギャップエクステンションペナルティ）を用いており、および蛋白質の比較における等価な設定は、ＧＡＰ＝８およびＬＥＮ＝２である。

【００９８】

本発明のポリヌクレオチド変異体は、コーディング領域、非コーディング領域またはその両方において変更を含んでもよい。サイレントな置換、付加または欠失を生じるがコードされたポリペプチドの特性または活性を改変しない変更を含むポリヌクレオチド変異体は、特に好ましい。遺伝コードの縮重に起因するサイレントな置換により産生されるヌクレオチド変異体が好ましい。さらに、５０未満、４０未満、３０未満、２０未満、１０未満または５～５０、５～２５、５～１０、１～５または１～２個のアミノ酸が任意の組み合わせで置換、欠失または付加されているポリペプチド変異体も好ましい。ポリヌクレオチド変異体は様々な理由、例えば、特定の宿主でのコドンの発現を最適化するために（ヒトｍＲＮＡ中のコドンを細菌宿主、例えば、酵母または大腸菌に好ましいものに変更する）産生することができる。

【００９９】

好ましい一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質のアルブミン部分をコードする本発明のポリヌクレオチドは、酵母または哺乳類の細胞における発現のために最適化される。さらに好ましい一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分をコードする本発明のポリヌクレオチドは、酵母または哺乳類の細胞における発現のために最適化される。さらに一層好ましい一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、酵母または哺乳類の細胞における発現のために最適化される。

【０１００】

別の一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、上記したようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下では、治療用蛋白質をコードする野生型ポリヌクレオチドにハイブリダイズしない。さらなる一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質のアルブミン部分をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、上記したようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下では、アルブミン蛋白質をコードする野生型ポリヌクレオチドにハイブリダイズしない。別の実施態様において、アルブミン融合蛋白質をコードするコドン最適

化ポリヌクレオチドは、上記したようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下では、治療用蛋白質部分またはアルブミン蛋白質部分をコードする野生型ポリヌクレオチドにハイブリダイズしない。

【０１０１】

さらなる一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分をコードするポリヌクレオチドは、治療用蛋白質の自然に発生する配列を含まない或いはそれからならない。さらなる一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分をコードするポリヌクレオチドは、アルブミン蛋白質の自然に発生する配列を含まない或いはそれからならない。別の一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、治療用蛋白質部分またはアルブミン蛋白質部分の自然に発生する配列を含まない或いはそれからならない。

【０１０２】

自然に発生する変異体は「対立遺伝子変異体」と呼ばれ、生物体の染色体上の特定の座を占める遺伝子の幾つかの代替形態の一つを言う（ＧｅｎｅｓＩＩ，Ｌｅｗｉｎ，Ｂ．，ｅｄ．，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８５））。これらの対立遺伝子変異体は、ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドレベルで異なってもよく、および本発明に含まれる。別法では、自然に発生しない変異体を突然変異誘発技法または直接合成により産生してもよい。

【０１０３】

蛋白質工学および組換えＤＮＡ技法の知られている方法を用いて、本発明のポリペプチドの特徴を改善または改変するために変異体を作製してもよい。例えば、生物学的機能の実質的な損失を伴わずに、本発明のポリペプチドのＮ－末端またはＣ－末端から１またはそれ以上のアミノ酸を欠失させることができる。一例としては、Ｒｏｎら．（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：２９８４－２９８８（１９９３））が、アミノ－末端のアミノ酸残基の３、８または２７個を欠失させても、変異体ＫＧＦ蛋白質ではヘパリン結合活性を有することを報告している。同様に、インターフェロンガンマでは、この蛋白質のカルボキシ末端から８～１０個のアミノ酸残基を欠失させると活性が最高１０倍まで高くなることが示された（Ｄｏｂｅｌｉら．、Ｊ．ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　７：１９９－２１６（１９８８）．）。

【０１０４】

さらに、十分な証拠により、変異体が多くの場合自然に発生する蛋白質のものと類似する生物活性を保持することが実証されている。例えば、Ｇａｙｌｅおよび共同研究者ら（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：２２１０５－２２１１１（１９９３））は、ヒトサイトカインＩＬ－１ａの大規模な変異分析を行った。彼らはランダムな突然変異誘発を利用して、分子全長にわたって１変異体あたり平均２．５個のアミノ酸の変化がある、３，５００個を超える個々のＩＬ－１ａ変異体を作製した。起こり得る各アミノ酸位置について複数の突然変異を調べた。研究者らは、結合または生物活性のいずれかにほとんど作用することなく分子の大部分が改変できることを見出した。実際に、調べた３，５００個を超えるヌクレオチド配列のうち、わずか２３個のユニークなアミノ酸配列のみが、野生型の活性とは有意に異なる蛋白質を生じた。

【０１０５】

さらに、ポリペプチドのＮ－末端またはＣ－末端から１またはそれ以上のアミノ酸を欠失させることが１またはそれ以上の生物学的機能の修飾または欠失をもたらしたとしても、他の生物活性はなお保持され得る。例えば、分泌形態の過半数に満たない残基をＮ－末端またはＣ－末端から除去した場合、その分泌形態を認識する抗体を誘導するおよび／またはそれに結合する欠失変異体の能力は保持され得る。蛋白質のＮ－またはＣ－末端の残基を欠失している特定のポリペプチドがかかる免疫原性活性を保持しているか否かは、本明細書に記載されているおよびそうでなければ当該技術分野において知られている慣用法により容易に決定され得る。

【０１０６】

故に、本発明はさらに、機能活性（例えば、生物活性および／または治療活性）を有するポリペプチド変異体を含む。一の実施態様において、本発明は、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質の１またはそれ以上の生物学的および／または治療活性に対応する機能活性（例えば、生物活性および／または治療活性）を有するアルブミン融合蛋白質の変異体を提供する。別の実施態様において、本発明は、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質の１またはそれ以上の生物学的および／または治療活性に対応する機能活性（例えば、生物活性および／または治療活性）を有するアルブミン融合蛋白質の変異体を提供する。かかる変異体は、活性にほとんど作用しないように当該技術分野において知られている原則に従って選択される欠失、挿入、反転、反復および置換を含む。かかる変異体をコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【０１０７】

好ましい実施態様において、本発明の変異体は保存的置換を有する。「保存的置換」により、例えば、脂肪族または疎水性アミノ酸であるＡｌａ、Ｖａｌ、ＬｅｕおよびＩｌｅの置換；ヒドロキシル残基ＳｅｒおよびＴｈｒの置換；酸性残基ＡｓｐおよびＧｌｕの置換；アミド残基ＡｓｎおよびＧｉｎの置換、塩基性残基Ｌｙｓ、ＡｒｇおよびＨｉｓの置換；芳香族残基Ｐｈｅ、ＴｙｒおよびＴｒｐの置換、ならびに小さなサイズのアミノ酸Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＭｅｔおよびＧｌｙの置換のごとき群内での交換が意図される。

【０１０８】

表現型としてサイレントなアミノ酸置換を作製する方法に関するガイダンスは、例えば、Ｂｏｗｉｅら．，“Ｄｅｃｉｐｈｅｒｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｅｓｓａｇｅ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ： Ｔｏｌｅｒａｎｃｅ ｔｏ Ａｍｉｎｏ ＡＣＩＤＳ ｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎｓ”Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４７：１３０６－１３１０（１９９０）に提供され、ここで、著者らは、アミノ酸配列を変化させることによる寛容性を研究するために２つの主な戦略があることを示している。

【０１０９】

初めの戦略は、進化の過程での自然淘汰によるアミノ酸置換の寛容性を利用する。異なる種のアミノ酸配列を比較することにより、保存されているアミノ酸が同定され得る。これらの保存されているアミノ酸は蛋白質機能にとっておそらく重要である。対照的に、自然淘汰で置換が寛容されるアミノ酸の位置は、これらの位置がその蛋白質の機能のために重要ではないことを示す。故に、蛋白質の生物活性をなお維持しながら、アミノ酸置換に寛容な位置を修飾することができる。

【０１１０】

第２の戦略は遺伝子工学を利用して、クローン化された遺伝子の特定の位置にアミノ酸の変化を誘導し、蛋白質の機能決定に重要な領域を同定する。例えば、部位特異的突然変異誘発またはアラニンスキャニング突然変異誘発（分子内の各残基に単一のアラニン変異を誘導する）が用いられ得る。ＣｕｎｎｉｎｇｈａｍおよびＷｅｌｌｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４：１０８１－１０８５（１９８９）を参照のこと。次いで、得られた変異分子を生物活性について試験することができる。

【０１１１】

著者らが述べるように、これらの２つの戦略は、蛋白質がアミノ酸置換に対して驚くほど寛容であることを明らかにした。著者らはさらに、蛋白質の特定のアミノ酸の位置でどのアミノ酸の変化が寛容される可能性があるかを示す。例えば、（蛋白質の３次構造内で）最も埋め込まれたアミノ酸残基は非極性の側鎖を必要とするが、一方で、表面の側鎖の特徴は通常ほとんど保存されない。さらに、寛容な保存的アミノ酸置換は、脂肪族または疎水性アミノ酸であるＡｌａ、Ｖａｌ、ＬｅｕおよびＩｌｅの置換；ヒドロキシル残基ＳｅｒおよびＴｈｒの置換；酸性残基ＡｓｐおよびＧｌｕの置換；アミド残基ＡｓｎおよびＧｉｎの置換、塩基性残基Ｌｙｓ、ＡｒｇおよびＨｉｓの置換；芳香族残基Ｐｈｅ、ＴｙｒおよびＴｒｐの置換および小さなサイズのアミノ酸Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、ＭｅｔおよびＧｌｙの置換を含む。保存的アミノ酸置換に加えて、本発明の変異体は、（ｉ）１ま

たはそれ以上の非保存的アミノ酸残基の置換を含むポリペプチド、ここで、置換されたアミノ酸残基は遺伝コードによりコードされたものであってもなくてもよい、または（ｉｉ）置換基を有する１またはそれ以上のアミノ酸残基の置換を含むポリペプチド、または（ｉｉｉ）他の化合物、例えば、ポリペプチド（例えば、ポリエチレングリコール）の安定性および／または溶解性を増大させる化合物に融合されたまたは化学コンジュゲートされたポリペプチド、（ｉｖ）例えば、ＩｇＧＦｃ融合領域ペプチドのごときさらなるアミノ酸を含むポリペプチドを包含する。かかる変異体ポリペプチドは、本明細書中の教示から当業者の範囲内であると考えられる。

【０１１２】

例えば、電荷を有するアミノ酸と他の電荷を有するまたは中性のアミノ酸とのアミノ酸置換を含むポリペプチド変異体は、凝集が少ないなどの改善された特徴を有する蛋白質を産生する。医薬処方の凝集は、凝集体の免疫原性活性に起因して、活性を減少し、クリアランスを増大させる。Ｐｉｎｃｋａｒｄら．、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：３３１－３４０（１９６７）；Ｒｏｂｂｉｎｓら．、Ｄｉａｂｅｔｅｓ　３６：８３８－８４５（１９８７）；ＣｌｅｌおよびＲａｎｄｅｒａｔｈ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．ＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃＤｒｕｇＣａｒｒｉｅｒＳｙｓｔｅｍｓ１０：３０７－３７７（１９９３）を参照のこと。

【０１１３】

特定の実施態様において、本発明のポリペプチドは、アルブミン融合蛋白質のアミノ酸配列、治療用蛋白質および／またはヒト血清アルブミンのアミノ酸配列の断片もしくは変異体を含む或いはそれからなり、ここで、該断片もしくは変異体は、参照アミノ酸配列と比較した場合、１～５、５～１０、５～２５、５～５０、１０～５０または５０～１５０個のアミノ酸残基の付加、置換および／または欠失を有する。好ましい実施態様において、アミノ酸置換は保存的である。これらのポリペプチドをコードする核酸も本発明により含まれる。

【０１１４】

本発明のポリペプチドは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに連結されたアミノ酸からなるもの、すなわち、ペプチドイソスターからなることができ、および遺伝子によりコードされる２０種のアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングのごとき自然な過程または当該技術分野においてよく知られている化学的修飾技法により修飾されてもよい。かかる修飾は、基本書およびより詳細な研究書ならびに豊富な研究文献にて十分に記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含むポリペプチドの任意の位置で生じさせることができる。同じタイプの修飾は、特定のポリペプチドの幾つかの部位において同じまたは異なる程度で存在してもよいことが理解されよう。さらに、特定のポリペプチドは多くのタイプの修飾を含んでもよい。ポリペプチドは例えばユビキチン化の結果として分岐していてもよく、およびそれらは分岐を有するまたは有さない環状であってもよい。環状、分岐および分岐環状ポリペプチドは、翻訳後の自然な過程から生じてもよく、または合成方法により作成されてもよい。修飾は、アセチル化、アシル化、ＡＤＰ－リボシル化化、アミド化、フラビンの共有結合による付加、ヘム部分の共有結合による付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合による付加、脂質または脂質誘導体の共有結合による付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合による付加、架橋結合、閉環、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性の架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペグ化、蛋白質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、トランスファーＲＮＡが介在する蛋白質へのアミノ酸の付加、例えばアルギニン化、およびユビキチン化を含む（例えば、ＰＲＯＴＥＩＮＳ－ＳＴＲＵＣＴＵＲＥ　ＡＮＤ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＰＲＯＰＥＲＴＩＥＳ，２ｎｄ　Ｅｄ．，Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｗ．Ｈ．ＦｒｅｅｍａｎおよびＣｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９９３）；ＰＯＳ

Ｔ－ＴＲＡＮＳＬＡＴＩＯＮＡＬ ＣＯＶＡＬＥＮＴ ＭＯＤＩＦＩＣＡＴＩＯＮ ＯＦ ＰＲＯＴＥＩＮＳ，Ｂ．Ｃ．Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｅｄ．，ＡｃａｄｅｍｉｃＰｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｇｓ．１－１２（１９８３）；Ｓｅｉｆｔｅｒら．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２：６２６－６４６（１９９０）；Ｒａｔｔａｎら．，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６３：４８－６２（１９９２））。

【０１１５】

機能活性

「機能活性を有するポリペプチド」は、治療用蛋白質の全長、プロ蛋白質、および／または成熟形態に関連する１またはそれ以上の知られている機能活性を示し得るポリペプチドを言う。かかる機能活性は、生物活性、抗原性［抗－ポリペプチド抗体に結合する（または結合のためにポリペプチドと競合する）能力］、免疫原性（特定の本発明のポリペプチドに結合する抗体を生じる能力）、本発明のポリペプチドを用いて多量体を形成する能力、およびポリペプチドための受容体またはリガンド結合能力を含むが、これらに限定されない。

【０１１６】

「生物活性を有するポリペプチド」は、特定の生物学的アッセイにて測定される際に、用量依存性を伴うまたは伴うことなく、成熟形態を含む本発明の治療用蛋白質の活性に必ずしも一致しなくともよいが類似する活性を示すポリペプチドを言う。用量依存性が示される場合、それはポリペプチドのものと同一である必要はなく、本発明のポリペプチドと比較したときに特定の活性において実質的に類似の用量依存性であればよい（すなわち、候補ポリペプチドは、本発明のポリペプチドに対して、約２５倍未満以上またはせいぜい約２５倍未満および、好ましくは、せいぜい約１０倍未満の活性、および最も好ましくは、せいぜい約３倍未満の活性を示し得る）。

【０１１７】

好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、アルブミンに融合されない場合、治療用蛋白質部分（またはその断片もしくは変異体）に関連する少なくとも１つの生物学的および／または治療活性を有する。

【０１１８】

さらに好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、非融合状態の治療用蛋白質部分（またはその断片もしくは変異体）と比べて増大した血漿安定性を有する。本発明のアルブミン融合蛋白質または非融合治療用蛋白質部分（またはその断片もしくは変異体）の血漿安定性は、当該技術分野において知られているアッセイを用いて、またはそれを慣例的に修飾して用いて、アッセイできる。

【０１１９】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、当該技術分野において知られているアッセイならびに本明細書に記載のアッセイを用いて、またはそれを慣例的に修飾して用いて、その機能活性（例えば、生物活性）をアッセイできる。さらに、当業者は、表１の対応する列（例えば、表１の欄３）に記載のアッセイを用いて、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質の断片をその活性について慣用的にアッセイしてもよい。さらに、当業者は、当該技術分野において知られているおよび／または以下の実施例のセクションに記載されるアッセイを用いて、アルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分に対応するアルブミン蛋白質の断片をその活性について慣用的にアッセイしてもよい。

【０１２０】

例えば、抗－治療用ポリペプチド抗体および／または抗－アルブミン抗体に結合するために治療用蛋白質に結合するまたはそれと競合するアルブミン融合蛋白質の能力についてアッセイする一の実施態様において、当該技術分野において知られている様々なイムノアッセイを用いることができ、該アッセイは、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射定量測定法、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイツイムノアッセイ（金コロイド、酵素または放射性同位元素標識などを用いて）、ウエスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ（例えば、ゲ

ル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ）、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、蛋白質Ａアッセイおよび免疫電気泳動アッセイなどの技法を用いた競合的および非競合的アッセイ系を含むが、これらに限定されない。一の実施態様において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することにより検出される。別の実施態様において、一次抗体は、一次抗体への二次抗体または試薬の結合を検出することにより検出される。さらなる一の実施態様において、二次抗体は標識される。イムノアッセイにて結合を検出するために多くの方法が当該技術分野において知られており、および本発明の範囲内である。

【０１２１】

治療用蛋白質の結合パートナー（例えば、受容体またはリガンド）が同定されている好ましい一の実施態様において、その結合パートナーと、その治療用蛋白質を融合物の治療用蛋白質部分として含むアルブミン融合蛋白質の結合は、例えば当該技術分野においてよく知られている方法、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、蛋白質アフィニティークロマトグラフィー、およびアフィニティーブロッティングによりアッセイされ得る。一般的に、Ｐｈｉｚｉｃｋｙら．，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．５９：９４－１２３（１９９５）を参照のこと。別の実施態様において、アルブミン融合蛋白質と生理学的に関連のあるものが、融合物の治療用蛋白質部分に対応する治療用ポリペプチドの基質に結合する能力は、当該技術分野において知られている技法を用いて慣用的にアッセイされ得る。

【０１２２】

アルブミン融合蛋白質の多量体化する能力を評価する別の一の実施態様において、多量体の他の成分との結合が、例えば、当該技術分野においてよく知られている方法、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、蛋白質アフィニティークロマトグラフィーおよびアフィニティーブロッティングを用いてアッセイされ得る。一般的に、Ｐｈｉｚｉｃｋｙら．、上記を参照のこと。

【０１２３】

好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の全てまたは一部を含むアルブミン融合蛋白質は、アルブミンに融合されていない場合、治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）に結合する抗体に関連する少なくとも１つの生物学的および／または治療活性（例えば、ポリペプチドまたはエピトープに特異的に結合する）を有する。他の好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の全てまたは一部を含むアルブミン融合蛋白質の生物活性および／または治療活性は、治療用蛋白質に結合する抗体に特的に結合されたポリペプチドに関連する１またはそれ以上の生物活性および／または治療活性の阻害（すなわち、アンタゴニズム）または活性化（すなわち、アゴニズム）である。

【０１２４】

治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、様々な方法で特徴付けられてもよい。特に、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、本明細書中記載の技法または当該技術分野において知られている技法を用いて、またはそれを慣例的に修飾して用いて、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質に結合する抗体に特異的に結合された同じ抗原に特異的に結合する能力についてアッセイされてもよい。

【０１２５】

特定の蛋白質またはエピトープに（特異的に）結合するためのアルブミン融合蛋白質（例えば、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む）の能力についてのアッセイは、溶液中で（例えば、Ｈｏｕｇｈｔｅｎ、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１３：４１２４２１（１９９２））、ビーズ上で（例えば、Ｌａｍ，Ｎａｔｕｒｅ　３５４：８２－８４（１９９１））、チップ上で（例えば、Ｆｏｄｏｒ，Ｎａｔｕｒｅ３６４：５５５－５５６（１９９３））、細菌で（例えば、米国特許第５，２２３，４０９号）、胞子で（例えば、特許第５，５７１，６９８号；第５，４０３，４８４号

；および第５，２２３，４０９号）、プラスミド上で（例えば、Ｃｕｌｌら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ１．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１８６５－１８６９（１９９２））またはファージ上で（例えば、ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０（１９９０）；Ｄｅｖｌｉｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：４０４－４０６（１９９０）；Ｃｗｉｒｌａら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：６３７８－６３８２（１９９０）；およびＦｅｌｉｃｉ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：３０１－３１０（１９９１））（これらの参考文献の各々は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）で行われてもよい。治療用抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、本明細書に記載されているかまたはそうでなければ当該技術分野において知られている技法を用いて、またはそれを慣例的に修飾して用いて、特定の蛋白質またはエピトープに対するそれらの特異性および親和性についてアッセイされてもよい。

【０１２６】

治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、当該技術分野において知られている任意の方法により、他の抗原（例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）に結合する抗体と特異的に結合する分子で保存されている配列／構造を有する分子）との交差反応性についてアッセイされてもよい。

【０１２７】

（免疫特異的）結合および交差反応性を分析するために用いられ得るイムノアッセイは、例を幾つか挙げると、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定法、蛍光イムノアッセイ、および蛋白質Ａイムノアッセイのごとき技法を用いる競合的および非競合的アッセイ系を含むが、これらに限定されない。かかるアッセイは慣用的であり、かつ当該技術分野においてよく知られている（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）。イムノアッセイの例は以下に簡潔に記載されるが、これらに限定されない。

【０１２８】

一般的に、免疫沈降プロトコルは、溶解バッファー、例えば、蛋白質ホスファターゼおよび／またはプロテアーゼ阻害剤（例えば、ＥＤＴＡ、ＰＭＳＦ、アプロチニン、バナジン酸ナトリウム）を補足したＲＩＰＡバッファー（１％のＮＰ－４０またはトリトンＸ－１００、１％のナトリウムデオキシコール酸、０．１％のＳＤＳ、０．１５ＭのＮａＣｌ、０．０１Ｍのリン酸ナトリウム、ｐＨ７．２、１％のトラジロール）中に細胞集団を溶解し、本発明のアルブミン融合蛋白質（例えば、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む）を細胞溶解物へ加え、一定時間（例えば、１～４時間）、４０℃でインキュベーションし、抗－アルブミン抗体に結合されたセファロースビーズを例えば細胞溶解物に加え、約１時間以上４０℃でインキュベーションし、そのビーズを溶解バッファーで洗浄し、次いで、ＳＤＳ／試料バッファー中にそのビーズを再懸濁させることを含む。特定の抗原を免疫沈降させるアルブミン融合蛋白質の能力は、例えば、ウエスタンブロット分析により評価され得る。当業者は、抗原へのアルブミン融合蛋白質の結合を増大させ、およびバックグラウンドを減少させるために修飾され得るパラメーター（例えば、セファロースビーズを用いる細胞溶解物の前清浄化）について認識することができよう。免疫沈降プロトコルに関するさらなる議論については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ、１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ａｔ １０．１６．１．を参照のこと。

【０１２９】

一般的に、ウエスタンブロット分析は、蛋白質試料を調製し、その蛋白質試料をポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原分子量に応じて８％～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥ）中で電気泳動し、その蛋白質試料をポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、ＰＶＤＦまたはナイロンなどの膜へ転写し、その膜をブロッキング溶液（例えば、３％のＢＳＡを伴うＰＢＳまたは脱脂乳）中でメンブレンをブロッキングし、洗浄バッファー（例えば、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ２０）で洗浄し、本発明のアルブミン融合蛋白質（ブロッキングバッファー中で希釈されている）をその膜にアプライし、洗浄バッファーでその膜を洗浄し、ブロッキングバッファーで希釈した酵素基質（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）または放射性分子（例えば、^{32}Ｐまたは^{125}Ｉ）にコンジュゲートさせた二次抗体（アルブミン融合蛋白質を認識するもの、例えば、抗－ヒト血清アルブミン抗体）をアプライし、その膜を洗浄バッファーで洗浄し、次いで、抗原の存在を検出することを含む。当業者は、検出されるシグナルを増大し、およびバックグラウンドノイズを減少させるように修飾できるパラメーターについて認識することができよう。ウエスタンブロットプロトコルについてのさらなる議論については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ、１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＢＩｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ａｔ １０．８．１を参照のこと。

【０１３０】

ＥＬＩＳＡは、抗原を調製し、９６ウェルのマイクロタイタープレートのウェルをその抗原でコーティングし、ウェルに結合しなかった抗原を洗い流し、酵素基質（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のごとき検出可能な化合物にコンジュゲートさせた本発明のアルブミン融合蛋白質（例えば、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む）をウェルへ加え、次いで、一定時間インキュベーションし、結合しなかったまたは非特異的に結合したアルブミン融合蛋白質を洗い流し、次いで、ウェルにコーティングされた抗原と特異的に結合したアルブミン融合蛋白質の存在を検出することを含む。ＥＬＩＳＡでは、アルブミン融合蛋白質を検出可能な化合物とコンジュゲートさせる必要がなく；その代わりに、検出可能な化合物にコンジュゲートさせた二次抗体（アルブミン融合蛋白質を認識する）をウェルに加えてもよい。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、アルブミン融合蛋白質でウェルをコーティングしてもよい。この場合、検出可能な分子は、酵素基質（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のごとき検出可能な化合物にコンジュゲートさせた抗原であり得る。当業者は、検出されるシグナルを増大するようにに修飾され得るパラメーターならびに当該技術分野において知られているＥＬＩＳＡの他のバリエーションについて認識できるだろう。ＥＬＩＳＡに関するさらなる議論については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ａｔ １１．２．１を参照のこと。

【０１３１】

蛋白質、抗原またはエピトープに対するアルブミン融合蛋白質の結合親和性およびアルブミン融合蛋白質－蛋白質／抗原／エピトープ相互作用の解離速度は、競合的結合アッセイにより測定できる。競合的結合アッセイの一例はラジオイムノアッセイであり、該アッセイは、増大量の非標識抗原の存在下、本発明のアルブミン融合蛋白質と標識抗原（例えば、^{3}Ｈまたは^{125}Ｉ）とをインキュベーションし、次いで、標識抗原に結合した抗体を検出することを含む。特定の蛋白質、抗原またはエピトープについてのアルブミン融合蛋白質の親和性および結合の解離速度は、Ｓｃａｔｃｈａｒｄプロット分析によるデータから決定できる。アルブミン融合蛋白質と同じ蛋白質、抗原またはエピトープと結合する二次蛋白質との競合も、ラジオイムノアッセイを用いて決定できる。この場合、蛋白質、抗原またはエピトープを、本発明のアルブミン融合蛋白質と同じ蛋白質、抗原またはエピトープに結合する増大量の非標識二次蛋白質の存在下、標識化合物（例えば、^{3}Ｈまたは^{125}Ｉ）にコンジュゲートさせたアルブミン融合蛋白質とインキュベーションする。

【０１３２】
好ましい一の実施態様において、ＢＩＡｃｏｒｅ動態分析を用いて、蛋白質、抗原またはエピトープに対する本発明のアルブミン融合蛋白質の結合および解離速度を決定する。ＢＩＡｃｏｒｅ動態分析は、固定化特異的ポリペプチド、抗原もしくはエピトープまたはアルブミン融合蛋白質をそれぞれその表面に有するチップへの、アルブミン融合蛋白質または特定のポリペプチド、抗原もしくはエピトープの結合およびそれからの解離を分析することを含む。
【０１３３】
アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質に結合する抗体は、特定の蛋白質または抗原、好ましくはそれらが特異的に結合する抗原についてのそれらの結合親和性に関して記載されているかまたは特定されていてもよい。好ましい結合親和性は、５×１０$^{-2}$Ｍ、１０$^{-2}$Ｍ、５×１０$^{-3}$Ｍ、１０$^{-3}$Ｍ、５×１０$^{-4}$Ｍ、１０$^{-4}$Ｍ未満の解離定数またはＫｄを有するものを含む。より好ましい結合親和性は、５×１０$^{-5}$Ｍ、１０$^{-5}$Ｍ、５×１０$^{-6}$Ｍ、１０$^{-6}$Ｍ、５×１０$^{-7}$Ｍ、１０$^{-7}$Ｍ、５×１０$^{-8}$Ｍまたは１０$^{-8}$Ｍ未満の解離定数またはＫｄを有するものを含む。さらにより好ましい結合親和性は、５×１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ、５×１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ、５×１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ、５×１０$^{-12}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ、５×１０$^{-13}$Ｍ、１０$^{-13}$Ｍ、５×ｌ０$^{-14}$Ｍ、１０$^{-14}$Ｍ、５×１０$^{-15}$Ｍ未満の解離定数またはＫｄを有するものを含む。好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、アルブミン融合蛋白質の結合価（治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む）および対応する抗体の結合価を考慮すると、治療用蛋白質に結合する対応する抗体（アルブミンに融合されていない）のものに類似する、特定の蛋白質またはエピトープについての親和性を有する。加えて、本明細書中記載されている（実施例および表１を参照のこと）およびそうでなければ当該技術分野において知られているアッセイを慣用的に適用して、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分および／またはアルブミン部分のいずれかに関連する生物活性および／または治療活性（インビトロまたはインビボのいずれかにおいて）を導くアルブミン融合蛋白質およびその断片、変異体および誘導体の能力を測定してもよい。他の方法も当業者に知られており、かつ本発明の範囲内であり得る。
【０１３４】
アルブミン
上記のように、本発明のアルブミン融合蛋白質は、好ましくは遺伝学的融合により互いに結合されている治療用蛋白質の少なくとも１つの断片もしくは変異体およびヒト血清アルブミンの少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む。
【０１３５】
さらなる実施態様は、化学コンジュゲーションにより互いに結合されている治療用蛋白質の少なくとも１つの断片もしくは変異体およびヒト血清アルブミンの少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む。
【０１３６】
用語、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）およびヒトアルブミン（ＨＡ）は本明細書中同義的に用いられる。用語「アルブミン」および「血清アルブミン」はより広く、そしてヒト血清アルブミン（およびその断片および変異体）ならびに他の種に由来するアルブミン（およびその断片および変異体）を包含する。
【０１３７】
本明細書中用いる「アルブミン」は、総称としてアルブミン蛋白質またはアミノ酸配列、またはアルブミンの１もしくはそれ以上の機能活性（例えば生物活性）を有するアルブミン断片もしくは変異体を言う。特に、「アルブミン」は、ヒトアルブミンまたはその断片（例えば、ＥＰ　２０１　２３９、ＥＰ　３２２　０９４、ＷＯ　９７／２４４４５、ＷＯ９５／２３８５７を参照のこと）、特に図１および配列番号１において示されるよう

なヒトアルブミンの成熟形態、または他の脊椎動物に由来するアルブミンもしくはその断片、またはこれらの分子のアナログまたは変異体もしくはその断片を言う。

【０１３８】

好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質において用いられるヒト血清アルブミンは、配列番号１を参照すれば、以下のセットの点突然変異の１つまたはその両方を含む：Ｌｅｕ－４０７をＡｌａに、Ｌｅｕ－４０８をＶａｌに、Ｖａｌ－４０９をＡｌａに、およびＡｒｇ－４１０をＡｌａに；またはＡｒｇ－４１０をＡに、Ｌｙｓ－４１３をＧｌｎに、およびＬｙｓ－４１４をＧｌｎに（例えば、国際公開番号ＷＯ　９５／２３８５７を参照のこと。出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）。さらにより好ましい実施態様において、上記したセットの点突然変異の１つまたは両方を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、酵母Ｙａｐ３ｐ蛋白質による切断に対して安定性／耐性が改善されており、それにより、酵母宿主細胞中で発現される組換えアルブミン融合蛋白質の産生の増大が可能となる。

【０１３９】

本明細書中用いる治療用蛋白質の治療活性または血漿安定性または貯蔵寿命を延長するのに十分なアルブミンの部分は、非融合状態の貯蔵寿命または血漿安定性に比べてアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分の貯蔵寿命または血漿安定性が延長または拡大されるように、蛋白質の治療活性または血漿安定性を安定化させるまたは延長するために十分な長さまたは構造を有するアルブミンの部分を言う。アルブミン融合蛋白質のアルブミン部分は、上記したような全長のＨＡ配列を含んでもよく、または治療活性を安定化または延長し得る１またはそれ以上のその断片を含んでもよい。かかる断片は、１０個またはそれ以上のアミノ酸の長さであってもよく、またはＨＡ配列に由来する約１５、２０、２５、３０、５０個またはそれ以上の隣接した配列を含んでもよく、またはＨＡの特定のドメインの一部または全てをふくんでもよい。例えば、初めの２つの免疫グロブリン様ドメインにわたる１またはそれ以上のＨＡの断片が用いられてもよい。好ましい一の実施態様において、ＨＡ断片はＨＡの成熟形態である。

【０１４０】

本発明のアルブミン融合蛋白質のアルブミン部分は、通常のＨＡの変異体である。本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分は、本明細書中記載されるような治療用蛋白質の変異体であってもよい。用語「変異体」は、挿入、欠失および保存的または非保存的いずれかの置換を含み、ここで、かかる変化は、膨張圧（ｏｎｃｏｔｉｃ）、有用なリガンド結合性およびアルブミンの非免疫原性特性、または治療用蛋白質の治療活性を付与する活性部位もしくは活性ドメインのうちの１またはそれ以上を実質的に改変しない。

【０１４１】

特に、本発明のアルブミン融合蛋白質は、ヒトアルブミンおよびヒトアルブミンの断片の自然に発生する多形変異体、例えばＥＰ　３２２　０９４（すなわち、（Ｐｎ）、ここで、ｎは３６９～４１９である）において開示された断片を含む。アルブミンは、多くの脊椎動物、特に任意の哺乳類、例えばヒト、ウシ、ヒツジまたはブタに由来してもよい。哺乳類由来でないアルブミンは、メンドリおよびサケを含むが、これらに限定されない。アルブミン融合蛋白質のアルブミン部分は、治療用蛋白質部分とは異なる動物に由来してもよい。

【０１４２】

一般的に言うと、ＨＡ断片もしくは変異体は、少なくとも１００個のアミノ酸長、好ましくは少なくとも１５０個のアミノ酸長であり得る。ＨＡ変異体は、ＨＡの少なくとも１つの完全なドメイン、例えばドメイン１（配列番号：１のアミノ酸１～１９４）、ドメイン２（配列番号：１のアミノ酸１９５～３８７）、ドメイン３（配列番号：１のアミノ酸３８８～５８５）、ドメイン１および２（配列番号：１の１～３８７）、ドメイン２および３（配列番号：１の１９５～５８５）またはドメインＩおよび３（配列番号：１のアミノ酸１～１９４および配列番号：１のアミノ酸３８８～５８５）からなるまたはそれらを含んでもよい。

【０１４３】
各ドメインそれ自体は、２つの相同なサブドメイン、すなわち、１～１０５、１２０～１９４、１９５～２９１、３１６～３８７、３８８～４９１および５１２～５８５から構成され、Ｌｙｓ１０６ないしＧｌｕ１１９、Ｇｌｕ２９２ないしＶａｌ３１５およびＧｌｕ４９２ないしＡｌａ５１１の残基を含むフレキシブルなサブドメイン間リンカー領域を有する。

【０１４４】
好ましくは、本発明のアルブミン融合蛋白質のアルブミン部分は、ＨＡの少なくとも１つのサブドメインもしくはドメインまたはその保存的修飾を含む。融合がサブドメインに基づくならば、好ましくは、隣接するリンカーの幾つかまたは全てが治療用蛋白質部分を連結するために用いられる。

【０１４５】
治療用蛋白質に特異的に結合する抗体も治療用蛋白質である。
本発明は、表１に記載の治療用蛋白質に特異的に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質も包含する。特に、用語「治療用蛋白質」が治療用蛋白質（例えば、表１の欄Ｉに記載されるような）およびその断片および変異体に結合する抗体を含むことが熟慮される。故に、本発明のアルブミン融合蛋白質は、治療用蛋白質の少なくとも１つの断片もしくは変異体および／または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含んでもよい。

【０１４６】
抗体構造およびバックグラウンド
基本的な抗体構造単位は４量体を含むことが知られている。各４量体は、２つの同一のポリペプチド鎖のペアからなり、各ペアは１つの「軽鎖」（約２５ｋＤａ）および１つの「重鎖」（約５０～７０ｋＤａ）を有する。各鎖のアミノ－末端部分は、主に抗原認識に関与する約１００～１１０個またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ－末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、カッパおよびラムダ軽鎖として分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファまたはイプシロンとして分類され、それぞれ抗体のアイソタイプをＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡおよびＩｇＥとして規定する。一般的に、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｃｈａｐｔｅｒｓ ３－５（Ｐａｕｌ，Ｗ．，ｅｄ．，４ｔｈ ｅｄ．Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９９８））（出典明示により全ての目的のためにその全てが本明細書の一部となる）を参照のこと。各軽鎖／重鎖ペアの可変領域は抗体結合部位を形成する。

【０１４７】
故に、インタクトなＩｇＧ抗体は２つの結合部位を有する。二重機能性または二重特異性抗体を除いて、２つの結合部位は同じである。

【０１４８】
該鎖は全て、相補性決定領域またはＣＤＲとも言われる３つの超可変領域により連結された比較的良く保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と同じ一般構造を示す。一般的に、ＣＤＲ領域は、抗原と接触し、およびその特異性を決定する抗体の部分である。各ペアの重鎖および軽鎖に由来するＣＤＲは、フレームワーク領域によって整列し、特定のエピトープとの結合を可能にする。Ｎ－末端からＣ－末端までの軽鎖および重鎖可変領域は共に、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３およびＦＲ４ドメインを含む。可変領域は重鎖または軽鎖定常領域に連結されている。各ドメインに対するアミノ酸の割り当ては、Ｋａｂａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７および１９９１）），またはＣｈｏｔｈｉａ&Ｌｅｓｋ Ｊ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）；Ｃｈｏｔｈｉａら．Ｎａｔｕｒｅ３４２：８７８－８８３（１９８９）の定義に従う。

【０１４９】
本明細書中用いる「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫活性のある部分、すなわち、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子（例えば、抗体の１またはそれ以上のＣＤＲ領域を含む分子）を言う。アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、モノクローナル、多重特異性、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体（例えば、一本鎖Ｆｖｓ）、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーにより産生された断片、抗－イディオタイプ（抗－Ｉｄ）抗体（例えば、本発明の抗体に特異的な抗－Ｉｄ抗体を含む）、および上記した任意のエピトープ結合断片（例えば、ＶＨドメイン、ＶＬドメインまたは１もしくはそれ以上のＣＤＲ領域）を含むが、これらに限定されない。

【０１５０】
治療用蛋白質に結合する抗体
本発明は、治療用蛋白質（例えば、表１に開示したもの）またはその断片もしくは変異体に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質を包含する。

【０１５１】
治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）に結合する抗体は、鳥類および哺乳類を含む多くの動物に由来してもよい。好ましくは、抗体は、ヒト、ネズミ（例えば、マウスおよびラット）、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリ抗体である。最も好ましくは、抗体は、ヒト抗体である。本明細書中用いる「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、およびヒト免疫グロブリンライブラリーおよびヒト抗体を産生するように遺伝子操作されたゼノマウスまたは他の生物から単離された抗体を含む。

【０１５２】
治療用蛋白質に結合し、および本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意の型（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡＩおよびＩｇＡ２）またはサブクラスであり得る。好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合し、およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体分子はＩｇＧ１である。他の好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合し、およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る免疫グロブリン分子はＩｇＧ２である。他の好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合し、およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る免疫グロブリン分子はＩｇＧ４である。

【０１５３】
最も好ましくは治療用蛋白質に結合し、およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体断片であり、ならびにＦａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ）２、Ｆｄ、一本鎖Ｆｖｓ（ｓｃＦｖ）、一本鎖抗体、ジスルフィド－結合したＦｖｓ（ｓｄＦｖ）およびＶＬまたはＶＨドメインのいずれかを含む断片を包含するが、これらに限定されない。一本鎖抗体を含む、抗原に結合する抗体断片は、単独または以下の：ヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインの全部または一部と組み合わせて一または複数の可変領域を含んでもよい。

【０１５４】
治療用蛋白質に結合し、およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性またはそれ以上の多重特異性であってもよい。多重特異性抗体は、治療用蛋白質の異なるエピトープについて特異的であってもよく、または治療用蛋白質ならびに異種ポリペプチドもしくは固体支持物質のごとき異種エピトープの両方について特異的であってもよい。例えば、ＰＣＴ公開　ＷＯ　９３／１７７１５；ＷＯ　９２／０８８０２；ＷＯ　９１／００３６０；ＷＯ　９２／０５７９３；Ｔｕｔｔ、ら．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０－６９（１９９１）；米国特許第４，４７４，８９３号；第４，７１４，６８１号；第４，９２５，６４８号；第５，５７３，

９２０号；第５，６０１，８１９号；Ｋｏｓｔｅｌｎｙら．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３（１９９２）を参照のこと。

【０１５５】

治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）に結合する抗体は二重特異性または二重機能性であってもよく、これは、その抗体が２つの異なる重／軽鎖対および２つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体であることを意味する。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはＦａｂ’断片の結合を含む様々な方法により産生され得る。例えば、Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ＆Ｌａｃｈｍａｎｎ Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７９：３１５－３２１（１９９０），Ｋｏｓｔｅｌｎｙら．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７１５５３（１９９２）を参照のこと。加えて、二重特異性抗体は、「二重特異性抗体（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）」（Ｈｏｌｌｉｇｅｒら．「“‘Ｄｉａｂｏｄｉｅｓ’：ｓｍａｌｌ ｂｉｖａｌｅｎｔ ａｎｄ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｆｒａｇｍｅｎｔ”ＰＮＡＳ ＵＳＡ ９０：６４４４－６４４８（１９９３））または「ジャニュシン（Ｊａｎｕｓｉｎｓ）」（Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら．“Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ（Ｊａｎｕｓｉｎｓ）ｔａｒｇｅｔ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ ｏｎ ＨＩＶ ｉｎｆｅｃｔｅｄ ｃｅｌｌｓ”ＥＭＢＯ Ｊ １０：３６５５－３６５９（１９９１）およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ら．“Ｊａｎｕｓｉｎ ：ｎｅｗｍｏｌｅｃｕｌａｒｄｅｓｉｇｎ ｆｏｒ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃｓ ｒｅａｇｅｎｔｓ”Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｓｕｐｐｌ ７ ： ５１－５２（１９９２））として形成されてもよい。

【０１５６】

本発明は、本明細書中記載されているかまたは当該技術分野において知られている抗体の断片もしくは変異体（誘導体を含む）を含むアルブミン融合蛋白質を提供する。当業者に知られている標準的な技法を用いて、本発明の分子をコードするヌクレオチド配列中に、例えばアミノ酸の置換をもたらす部位特異的突然変異誘発およびＰＣＲ介在突然変異誘発を含む変異を誘導できる。好ましくは、変異体（誘導体を含む）は、標準のＶＨドメイン、ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２、ＶＨＣＤＲ３、ＶＬドメイン、ＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２またはＶＬＣＤＲ３と比べて、５０個未満のアミノ酸の置換、４０個未満のアミノ酸の置換、３０個未満のアミノ酸の置換、２５個未満のアミノ酸の置換、２０個未満のアミノ酸の置換、１５個未満のアミノ酸の置換、１０個未満のアミノ酸の置換、５個未満のアミノ酸の置換、４個未満のアミノ酸の置換、３個未満のアミノ酸の置換または２個未満のアミノ酸の置換をコードする。特定の実施態様において、変異体はＶＨＣＤＲ３の置換をコードする。好ましい一の実施態様において、変異体は、必須でないと考えられている１またはそれ以上のアミノ酸残基において保存的アミノ酸の置換を有する。

【０１５７】

治療用蛋白質に結合し、およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、それらが認識または特異的に結合する治療用蛋白質の一または複数のエピトープまたは一または複数の部分により、説明または特定されてもよい。治療用蛋白質または治療用蛋白質の特定のエピトープに特異的に結合する抗体を排除してもよい。それ故に、本発明は、治療用蛋白質に特異的に結合する抗体を含み、さらにそれを排除することもできる。好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、その抗体それ自体の融合されていない断片もしくは変異体と同じエピトープに結合する。

【０１５８】

治療用蛋白質に結合し、およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、それらの交差反応性により、説明または特定されてもよい。治療用蛋白質の任意の他のアナログ、オルソログまたはホモログに結合しない抗体も含まれる。治療用蛋白質と少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６５％、少なくとも６０％、少なくとも５５％、および少なくとも５０％の配列同一性（当該技術分野において知られているおよび本

明細書中に記載されている方法を用いて計算されるような）を有するポリペプチドと結合する抗体も本発明に含まれる。特定の実施態様において、治療用蛋白質に結合し、およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、ヒト蛋白質および対応するそのエピトープのネズミ、ラットおよび／またはウサギホモログと交差反応する。治療用蛋白質と９５％未満、９０％未満、８５％未満、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、６０％未満、５５％未満および５０％未満の配列同一性（当該技術分野において知られているおよび本明細書中に記載されている方法を用いて計算されるような）を有するポリペプチドに結合しない抗体も本発明に含まれる。特定の一の実施態様において、上記した交差反応性は、本明細書中に記載の任意の単一の特定の抗原性または免疫原性ポリペプチド、または２、３、４、５またはそれ以上の特定の抗原性および／または免疫原性ポリペプチドの一または複数の組み合わせに関する。好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、その特定の抗体自体の断片もしくは変異体と比べて、類似するまたは実質的に同一な交差反応性を有する。

【０１５９】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（本明細書中記載のような）、治療用蛋白質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドに結合する抗体もさらに本発明に含まれる。治療用蛋白質に結合し、および本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、本発明のポリペプチドに対するそれらの結合親和性により、説明または特定されてもよい。好ましい結合親和性は、５×１０$^{-2}$Ｍ、１０$^{-2}$Ｍ、５×１０$^{-3}$Ｍ、１０$^{-3}$Ｍ、５×１０$^{-4}$Ｍ、１０$^{-4}$Ｍ未満の解離定数またはＫｄを有するものを含む。より好ましい結合親和性は、５×１０$^{-5}$Ｍ、１０$^{-5}$Ｍ、５×１０$^{-6}$Ｍ、１０$^{-6}$Ｍ、５×１０$^{-7}$Ｍ、１０$^{-7}$Ｍ、５×１０$^{-8}$Ｍまたは１０$^{-8}$Ｍ未満の解離定数またはＫｄを有するものを含む。さらにより好ましい結合親和性は、５×１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ、５×１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ、５×１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ、５×１０$^{-12}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ、５×ｌ０$^{-13}$Ｍ、１０$^{-13}$Ｍ、５×１０$^{-14}$Ｍ、ｌ０$^{-14}$Ｍ、５×１０$^{-15}$または１０$^{-15}$Ｍ未満の解離定数またはＫｄを有するものを含む。好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、アルブミン融合蛋白質の結合価（治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む）および対応する抗体の結合価を考慮すると、治療用蛋白質に結合する対応する抗体（アルブミンに融合されていない）のものに類似する、特定の蛋白質またはエピトープについての親和性を有する。

【０１６０】

本発明は、競合的結合を測定するために当該技術分野において知られている任意の方法、例えば本明細書中に記載のイムノアッセイにより測定されるような、治療用蛋白質エピトープへの抗体の結合を競合的に阻害する抗体も提供する。好ましい実施態様において、抗体は、少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６０％または少なくとも５０％でエピトープへの結合を競合的に阻害する。好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、治療用蛋白質のエピトープへの第２の抗体の結合を競合的に阻害する。他の好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６０％または少なくとも５０％で治療用蛋白質のエピトープへの第２の抗体の結合を競合的に阻害する。

【０１６１】

治療用蛋白質に結合し、および本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、治療蛋白質のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用してもよい。例えば、本発明は、本発明の部分または完全いずれかのポリペプチドと受容体／リガンド

の相互作用を阻害する抗体を含む。本発明は受容体特異的抗体およびリガンド特異的抗体の両方を特徴とする。本発明はさらに、リガンド結合を阻害しないが受容体活性化を阻害する受容体特異的抗体も特徴とする。受容体活性化（すなわち、シグナリング）は、本明細書中に記載されているかまたはそうでなければ当該技術分野において知られている技法により測定されてもよい。例えば、受容体活性化は、受容体またはその基質のリン酸化（例えば、チロシンまたはセリン／トレオニン）を、免疫沈降、次いで、ウエスタンブロット分析（例えば、上記のような）により検出することにより測定することができる。特定の実施態様において、抗体の不在下、少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６０％または少なくとも５０％だけリガンド活性または受容体活性を阻害する抗体が提供される。好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、治療用蛋白質に結合する抗体の融合されていない断片もしくは変異体と比べて、リガンド結合の阻害および／または受容体活性化の阻害に関して、類似するまたは実質的に類似する特徴を有する。

【０１６２】

本発明は、リガンド結合および受容体活性化の両方を阻害する受容体特異的抗体ならびに受容体－リガンド複合体を認識し、そして好ましくは、結合していない受容体または結合していないリガンドを特異的に認識しない抗体も特徴とする。同様に、リガンドに結合し、受容体へのリガンドの結合を阻害しない抗体ならびにリガンドに結合しそれにより受容体活性化を阻害するがリガンドが受容体へ結合するのを阻害しない中和抗体も本発明に含まれる。さらに、受容体を活性化する抗体も本発明に含まれる。これらの抗体は受容体アゴニストとして作用し、すなわち、例えば受容体の二量体化により、リガンド介在受容体活性化の生物活性の全てまたはサブセットのいずれかを強化または活性化する。抗体は、治療用蛋白質（例えば、表１に開示されているような）の特定の生物活性を含む生物活性についてのアゴニスト、アンタゴニストまたはインバーズアゴニストとして特定されてもよい。上記抗体のアゴニストは当該技術分野において知られている方法を用いて作られ得る。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ　９６／４０２８１；米国特許第５，８１１，０９７号；Ｄｅｎｇら，Ｂｌｏｏｄ　９２（６）：１９８１－１９８８（１９９８）；Ｃｈｅｎら．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８（１６）：３６６８－３６７８（１９９８）；Ｈａｒｒｏｐら．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６１（４）：１７８６－１７９４（１９９８）；Ｚｈｕら．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８（１５）：３２０９－３２１４（１９９８）；Ｙｏｏｎら．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６０（７）：３１７０－３１７９（１９９８）；Ｐｒａｔら．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｓｃｉ．１１１（Ｐｔ２）：２３７－２４７（１９９８）；Ｐｉｔａｒｄら．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　２０５（２）：１７７－１９０（１９９７）；Ｌｉａｕｔａｒｄら．，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ９（４）：２３３－２４１（１９９７）；Ｃａｒｌｓｏｎら．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２（１７）：１１２９５－１１３０１（１９９７）；Ｔａｒｙｍａｎら．，Ｎｅｕｒｏｎ　１４（４）：７５５－７６２（１９９５）；Ｍｕｌｌｅｒら．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　６（９）：１１５３－１１６７（１９９８）；Ｂａｒｔｕｎｅｋら．，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　８（１）：１４－２０（１９９６）（該文献は全て出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）を参照のこと。好ましい実施態様において、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、治療用蛋白質に結合する抗体の融合されていない断片もしくは変異体と類似するまたは実質的に同一なアゴニストまたはアンタゴニスト特性を有する。

【０１６３】

治療用蛋白質に結合し、および本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、インビトロおよびインビボの両方を含む診断および治療法において、例えば、治療用蛋白質を精製、検出および標的化するために用いられてもよい。例えば、抗体は、生体試料中の治療用蛋白質のレベルを定性的および定量的に測定するためのイムノアッセイにおいて有用である。例えば、Ｈａｒｌｏｗら、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌ

ａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ ｅｄ．１９８８）を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。同様に、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、インビトロおよびインビボの両方を含む診断および治療法において、例えば、治療用蛋白質を精製、検出および標的化するために用いられてもよい。

【０１６４】

治療用蛋白質に結合し、およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、すなわち任意の型の分子と抗体の共有結合により修飾される誘導体を含む。例えば、これらに限定されないが、抗体の誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基／ブロッキング基による誘導体化、蛋白質分解的切断、細胞リガンド／または他の蛋白質への結合などにより修飾された抗体を含む。任意の非常に多くの化学修飾は、特定の化学開裂、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成を含むがこれらに限定されない知られている技法により行われてもよい。さらに、誘導体は、１またはそれ以上の古典的でないアミノ酸を含んでもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質も上記のように修飾されてもよい。

【０１６５】

治療用蛋白質に結合する抗体の産生方法

治療用蛋白質に結合し、および本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体を、当該技術分野において知られている任意の適当な方法により産生させてもよい。対象の抗原に対するポリクローナル抗体は、当該技術分野においてよく知られている様々な方法により産生できる。例えば、治療用蛋白質は、ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない様々な宿主動物に投与され、抗原特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導してもよい。様々なアジュバントを用いて宿主種に応じた免疫応答を誘導してもよく、該アジュバントは、フロイント（完全および不完全）、水酸化物アルミニウムのごときミネラルゲル、リゾレシチンのごとき界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールおよび潜在的に有用なヒトアジュバント、例えば、ＢＣＧ（ｂａｃｉｌｌｅ Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）およびコリネバクテリウム・パルブム（ｃｏｒｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ）を含むが、これらに限定されない。かかるアジュバントはまた当該技術分野においてよく知られている。

【０１６６】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換えおよびファージディスプレイ技法またはそれらの組み合わせの使用を含む当該技術分野において知られている多種多様な技法を用いて調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、当該技術分野において知られているものおよび例えば、Ｈａｒｌｏｗら．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ ｅｄ．１９８８）；Ｈａｍｍｅｒｉｎｇ，ら．，：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ５６３－６８１（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８１）（該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）において教示されているものを含むハイブリドーマ技法を用いて産生され得る。本明細書中、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技法により産生された抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」は、単一のクローンに由来する抗体を言い、任意の真核、原核またはファージクローンを含むが、それを産生する方法は含まれない。

【０１６７】

ハイブリドーマ技法を用いる特定の抗体についての産生およびスクリーニング方法は、慣用的であり、かつ当該技術分野においてよく知られている。非限定的な一例では、治療用蛋白質またはその断片もしくは変異体、アルブミン融合蛋白質、またはかかる治療用蛋白質もしくはその断片もしくは変異体またはアルブミン融合蛋白質を発現する細胞を用い

て、マウスを免疫することができる。免疫応答が検出されたらすぐに、例えば、抗原特異的抗体がマウス血清中に検出されたらすぐに、マウスの脾臓を摘出し、そして脾臓細胞を単離する。次いで、脾臓細胞をよく知られている技法により任意の適当なミエローマ細胞、例えばＡＴＣＣから入手可能な細胞株ＳＰ２０に由来する細胞に融合させる。ハイブリドーマを選別し、および限定希釈によりクローン化する。次いで、当該技術分野において知られている方法により、本発明のポリペプチドに結合し得る抗体を分泌する細胞について、ハイブリドーマクローンをアッセイする。一般的に高いレベルの抗体を含む腹水は、陽性ハイブリドーマクローンを用いてマウスを免疫することにより産生することができる。

【０１６８】

従って、本発明は、モノクローナル抗体の産生方法ならびに該方法により産生される抗体を提供し、ここで、該方法は、抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養することを含み、好ましくは、該ハイブリドーマは、本発明の抗原を用いて免疫したマウスから単離した脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させ、次いで、該融合から生じたハイブリドーマを、本発明のポリペプチドに結合し得る抗体を分泌するハイブリドーマクローンについてスクリーニングすることにより産生される。

【０１６９】

ポリクローナルおよびモノクローナルヒトＢ細胞株の両方を産生するためによく知られている他の方法は、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）を用いる形質転換である。ＥＢＶにより形質転換されたＢ細胞株を産生するためのプロトコルは、当該技術分野において一般的に知られており、例えば、Ｃｈａｐｔｅｒ　７．２２　ｏｆ　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｃｏｌｉｇａｎら．、Ｅｄｓ．、１９９４、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹにおいて説明されているプロトコルである。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。形質転換のためのＢ細胞のソースは一般的にヒト末梢血であるが、形質転換のためのＢ細胞は、リンパ節、扁桃、脾臓、腫瘍組織および感染組織を含むがこれらに限定されない他のソースに由来してもよい。組織は一般的にＥＢＶで形質転換する前に単一細胞浮遊液とする。さらに、抗－ＥＢＶ抗体について血清陽性個体に由来するＴ細胞は、ＥＢＶによるＢ細胞不死化を抑制し得るので、Ｂ細胞を含む試料中のＴ細胞を物理的に除去するまたは不活性化する（例えば、シクロスポリンＡを用いる処置により）かのいずれかの処置が行われてもよい。

【０１７０】

一般的に、ヒトＢ細胞を含む試料をＥＢＶと共に播種し、次いで、３４週間培養する。ＥＢＶの典型的なソースは、Ｂ９５－８細胞株（ＡＴＣＣ番号；ＶＲ－１４９２）の培養上清である。ＥＢＶによる形質転換の物理的徴候は、一般的に、３～４週の培養期間の終わり頃に認められる。位相差顕微鏡観察により、形質転換細胞は大きく、透明、有毛であってもよく、および密な細胞クラスターをなして凝集する傾向があってもよい。当初、ＥＢＶ株は一般的にポリクローナルである。しかし、長い細胞培養期間にわたって、特定のＢ細胞クローンの選択的成長の結果として、ＥＢＶ株はモノクローナルまたはポリクローナルになってもよい。別法では、ポリクローナルＥＢＶ形質転換株を、適当な融合パートナーにサブクローニング（例えば限界希釈培養により）または融合し、次いで、限界希釈濃度でプレーティングし、モノクローナルＢ細胞株を得てもよい。ＥＢＶ形質転換細胞株のための適当な融合パートナーは、マウスミエローマ細胞株（例えば、ＳＰ２／０、Ｘ６３－Ａｇ８．６５３）、ヘテロミエローマ細胞株（ヒトｘマウス；例えば、ＳＰＡＭ－８、ＳＢＣ－Ｈ２０およびＣＢ－Ｆ７）およびヒト細胞株（例えば、ＧＭ１５００、ＳＫＯ－００７、ＲＰＭＩ８２２６およびＫＲ－４）を含む。故に、本発明は、ヒトＢ細胞のＥＢＶ形質転換を含む、本発明のポリペプチドまたはその断片に対するポリクローナルまたはモノクローナルヒト抗体を産生する方法も提供する。

【０１７１】

特定エピトープを認識する抗体断片は知られている技法により産生されてもよい。例えば、本発明のＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２断片は、パパイン（Ｆａｂ断片を産生するため

に）またはペプシン（Ｆ（ａｂ’）２断片を産生するために）のごとき酵素を用いて、免疫グロブリン分子を蛋白質分解することにより産生されてもよい。Ｆ（ａｂ’）２断片は可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のＣＨ１ドメインを含む。

【０１７２】

例えば、治療用蛋白質に結合する抗体は、当該技術分野において知られている様々なディスプレー法を用いても産生され得る。ファージディスプレイ法では、機能的な抗体ドメインがそれらをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面にディスプレーされる。一の特定の実施態様において、かかるファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現される抗原結合ドメインを提示させるために利用され得る。対象の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原、例えば、標識抗原または固体表面またはビーズ上に結合または捕捉された抗原を用いて選択または同定され得る。これらの方法において用いられるファージは、典型的に、Ｆａｂ、Ｆｖを有するファージ発現されるまたはジスルフィド結合で安定化させたｆｄおよびＭ１３結合ドメインを含む繊維状ファージである。Ｆｖ抗体ドメインは組換えによりファージ遺伝子ＩＩＩまたは遺伝子ＶＩＩＩ蛋白質のいずれかに融合される。治療用蛋白質に結合する抗体を産生するために用いられ得るファージディスプレイ法の例は、Ｂｒｉｎｋｍａｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １８２：４１－５０（１９９５）；Ａｍｅｓら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １８４：１７７－１８６（１９９５）；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈら，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：９５２－９５８（１９９４）；Ｐｅｒｓｉｃら，Ｇｅｎｅ １８７ ９－１８（１９９７）；Ｂｕｒｔｏｎら，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５７：１９１－２８０（１９９４）；ＰＣＴ出願番号 ＰＣＴ／ＧＢ９１／０１１３４；ＰＣＴ公開番号 ＷＯ ９０／０２８０９；ＷＯ ９１／１０７３７；ＷＯ ９２／０１０４７；ＷＯ ９２／１８６１９；ＷＯ ９３／１１２３６；ＷＯ ９５／１５９８２；ＷＯ ９５／２０４０１；および米国特許第５，６９８，４２６号；第５，２２３，４０９号；第５，４０３，４８４号；第５，５８０，７１７号；第５，４２７，９０８号；第５，７５０，７５３号；第５，８２１，０４７号；第５，５７１，６９８号；第５，４２７，９０８号；第５，５１６，６３７号；第５，７８０，２２５号；第５，６５８，７２７号；第５，７３３，７４３号および第５，９６９，１０８号において開示されているものを含む。該文献のそれぞれは出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０１７３】

上記参考文献において記載されるように、ファージを選択した後、例えば以下に詳述するように、ファージに由来する領域をコードする抗体を単離し、次いで、ヒト抗体を含む完全抗体または任意の他の抗原に結合する断片を産生するために用いて、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主で発現させることができる。例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）２断片を産生する組換え技法は、ＰＣＴ公開ＷＯ ９２／２２３２４；Ｍｕｌｌｉｎａｘら，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １２（６）：８６４－８６９（１９９２）；およびＳａｗａｉら，ＡＪＲＩ ３４：２６－３４（１９９５）；およびＢｅｔｔｅｒら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０４１－１０４３（１９８８）（該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）において開示されているような当該技術分野において知られている方法を用いても行われ得る。

【０１７４】

一本鎖Ｆｖｓおよび抗体を産生するために用いられ得る技法の例は、米国特許第４，９４６，７７８号および第５，２５８，４９８号；Ｈｕｓｔｏｎら，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ２０３：４６－８８（１９９１）；Ｓｈｕら，ＰＮＡＳ９０：７９９５－７９９９（１９９３）；およびＳｋｅｒｒａら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０３８－１０４０（１９８８）において記載のものを含む。ヒトにおける抗体のインビボでの使用およびインビトロでの検出アッセイを含む幾つかの使用のために、キメラ、ヒト化またはヒト抗体を用いることが所望されてもよい。キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する一分子であり、例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する一

の可変領域および一のヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体である。キメラ抗体の産生方法は当該技術分野において知られている。例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４（１９８６）；Ｇｉｌｌｉｅｓら，（１９８９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ１２５：１９１－２０２；米国特許第５，８０７，７１５号；第４，８１６，５６７号；および第４，８１６３９７号を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。ヒト化抗体は、所望の抗原に結合するヒトでない種の抗体に由来する抗原分子であり、１またはそれ以上のヒトでない種に由来する相補性決定領域（ＣＤＲ）およびヒト免疫グロブリン分子に由来する一のフレームワーク領域を有する。多くの場合、ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、ＣＤＲドナー抗体に由来する対応する残基を用いて置換され、抗原結合を改変、好ましくは改善し得る。これらのフレームワーク置換は、当該技術分野においてよく知られている方法により、例えば、ＣＤＲおよびフレームワーク残基の相互作用をモデリングし、抗原結合および配列比較のために重要なフレームワーク残基を同定し、特定位置における異常なフレームワーク残基を同定することにより同定される（例えば、Ｑｕｅｅｎら，米国特許第５，５８５，０８９号；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら，Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３（１９８８），該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）。抗体は、例えば、ＣＤＲ－グラフティング（ＥＰ　２３９，４００；ＰＣＴ公開　ＷＯ　９１／０９９６７；米国特許第５，２２５，５３９号；第５，５３０，１０１号；および第５，５８５，０８９号），ｖｅｎｅｅｒｉｎｇまたはｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ（ＥＰ　５９２，１０６；ＥＰ　５１９，５９６；Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２８（４／５）：４８９－４９８（１９９１）；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａら，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ７（６）：８０５－８１４（１９９４）；Ｒｏｇｕｓｋａ．ら，ＰＮＡＳ　９１：９６９－９７３（１９９４））およびチェインシャフリング（ｃｈａｉｎ　ｓｈｕｆｆｌｉｎｇ）（米国特許第５，５６５，３３２号）を含む当該技術分野において知られている様々な技法を用いてヒト化され得る。

【０１７５】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療処置のために特に所望される。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記記載のファージディスプレイ方法を含む当該技術分野において知られている様々な方法により作製され得る。米国特許第４，４４４，８８７号および第４，７１６，１１１号；およびＰＣＴ公開　ＷＯ　９８／４６６４５，ＷＯ　９８／５０４３３，ＷＯ　９８／２４８９３，ＷＯ　９８／１６６５４，ＷＯ　９６／３４０９６，ＷＯ　９６／３３７３５，およびＷＯ　９１／１０７４１も参照のこと。該文献のそれぞれは出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０１７６】

ヒト抗体は、機能的な内因性免疫グロブリンを発現し得ないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いても作製され得る。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、ランダムまたは相同組換えによりにマウス胚性幹細胞に導入されてもよい。別法では、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域が、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、マウス胚性幹細胞中に導入されてもよい。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えにより、ヒト免疫グロブリン座の導入と別々または同時に非機能性を付与されてもよい。特に、ＪＨ領域のホモ接合型欠失は、内因性の抗体産生を阻害する。修飾された胚性幹細胞は増殖され、次いで、胚盤胞中にマイクロ注入され、キメラマウスを作り出す。次いで、キメラマウスを交配させ、ヒト抗体を発現するホモ接合型子孫を生じさせる。トランスジェニックマウスを、選択した抗原、例えば、本発明のポリペプチドの全てまたは一部を用いて通常の様式で免疫する。その抗原に対して作製されたモノクローナル抗体は、慣用的なハイブリドーマ技法を用いて、免疫したトランスジェニックマウスから得ることができる。トランスジェニックマウスが有するヒト免疫グロブリントランスジーンはＢ細胞分化の間に再構成され、その後、クラススイッチングおよび体細胞突然変異が起こる。故に、かかる技法を用いて、治療的に有用

なＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭおよびＩｇＥ抗体を産生することができる。ヒト抗体を産生するためのこの技法の総説については、ＬｏｎｂｅｒｇおよびＨｕｓｚａｒ，Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３（１９９５）を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技法およびかかる抗体を産生するためのプロトコルの詳細な議論については、例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ　９８／２４８９３；ＷＯ　９２／０１０４７；ＷＯ　９６／３４０９６；ＷＯ　９６／３３７３５；欧特許第０　５９８　８７７号；米国特許第５，４１３，９２３号；第５，６２５，１２６号；第５，６３３，４２５号；第５，５６９，８２５号；第５，６６１，０１６号；第５，５４５，８０６号；第５，８１４，３１８号；第５，８８５，７９３号；５，９１６，７７１号；第５，９３９，５９８号；第６，０７５，１８１号；および第６，１１４，５９８号を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。加えて、Ａｂｇｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．（Ｆｒｅｅｍｏｎｔ，ＣＡ）およびＧｅｎｐｈａｒｍ（Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）などの企業は、上記したものと類似する技法を用いて、特定の抗原に対するヒト抗体を提供することを受託することができる。

【０１７７】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイドされた選択（ｇｕｉｄｅｄ　ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ）」として参照される技法を用いて産生することができる。このアプローチでは、選択されたヒトでないモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体が、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を導くために用いられる（Ｊｅｓｐｅｒｓら．、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１２：８９９－９０３（１９８８））。

【０１７８】

抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明はさらに、抗体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およびその断片を提供する。本発明は、例えば上記したようなストリンジェントまたは別法ではより低いストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、好ましくは、治療用蛋白質に特異的に結合する抗体、およびより好ましくは、表２の「配列番号：Ｚ」の欄に開示されるような「治療用蛋白質：Ｘ」のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する抗体をコードするポリヌクレオチドへハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。

【０１７９】

当該技術分野において知られている任意の方法により、ポリヌクレオチドは得られてもよく、およびポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は決定されてもよい。例えば、抗体のヌクレオチド配列が知られているならば、抗体をコードするポリヌクレオチドを、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから構築してもよい（例えば、Ｋｕｔｍｅｉｅｒら．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１７：２４２（１９９４）に記載のように）。その操作には、簡潔に言うと、抗体をコードする配列部分を含むオーバーラッピングオリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよびライゲーション、次いで、ライゲーションしたオリゴヌクレオチドのＰＣＲによる増幅が含まれる。

【０１８０】

別法では、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適当なソースに由来する核酸から産生されてもよい。その抗体分子の配列は知られているのに特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが入手できないならば、免疫グロブリンをコードする核酸は、配列の３’および５’末端にハイブリダイズできる合成プライマーを用いてＰＣＲ増幅を行うか、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いてクローニングを行い、例えば、抗体をコードするｃＤＮＡライブラリーに由来するｃＤＮＡクローンを同定することにより、化学的に合成されるまたは適当なソース（例えば、抗体ｃＤＮＡライブラリー、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞、例えば抗体を発現するように選択されたハイブリドーマ細胞から作製されたｃＤＮＡライブラリー、またはそれらから単離された核酸、好ましくはポリＡ＋ＲＮＡ）から得られてもよい。

【０１８１】

次いで、ＰＣＲにより作製された増幅核酸は、当該技術分野においてよく知られている

任意の方法（実施例６５を参照のこと）を用いて、複製可能なクローニングベクター中にクローニングされてもよい。

【０１８２】

抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該技術分野においてよく知られている方法、例えば、組換えＤＮＡ技法、部位特異的突然変異誘発、ＰＣＲなど（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら．，１９９０，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｄ Ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹおよびＡｕｓｕｂｅｌら．，ｅｄｓ．，１９９８，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ ＭＯｌｅｃｕｌａｒ ＢＩｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹに記載の技法を参照のこと。両文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）を用いて操作し、異なるアミノ酸配列を有する抗体を産生させる、例えばアミノ酸の置換、欠失および／または挿入を作り出してもよい。

【０１８３】

特定の一の実施態様において、重鎖および／または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、当該技術分野においてよく知られている方法、例えば、他の重鎖および軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列と比較して、配列の可変性が高い領域を決定することにより、相補性決定領域（ＣＤＲ）の配列を同定するために調べられてもよい。慣用的な組換えＤＮＡ技法を用いて、１またはそれ以上のＣＤＲは、フレームワーク領域内、例えば、ヒトフレームワーク領域中に挿入され、上記のようにヒト以外の抗体をヒト化してもよい。フレームワーク領域は、自然に発生するまたはコンセンサスなフレームワーク領域、および好ましくはヒトフレームワーク領域であってもよい（例えばヒトフレームワーク領域のリストについてはＣｈｏｔｈｉａら．、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７８：４５７－４７９（１９９８）を参照のこと）。好ましくは、フレームワーク領域およびＣＤＲの連結により生じるポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記のように、１またはそれ以上のアミノ酸の置換は、フレームワーク領域内でなされてもよく、および好ましくは、アミノ酸の置換は、その抗原と抗体の結合を促進する。さらに、かかる方法を用いて、鎖内ジスルフィド結合に関与する１またはそれ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸の置換または欠失を生じさせ、１またはそれ以上の鎖間ジスルフィド結合を欠失している抗体分子を産生してもよい。ポリヌクレオチドに対する他の修飾も本発明に含まれ、かつ当該技術の範囲内である。

【０１８４】

加えて、適切な生物活性のヒト抗体分子に由来する遺伝子と一緒に、適切な抗原特異性のマウス抗体分子に由来する遺伝子をスプライシングすることにより、「キメラ抗体」の産生について開発された技法（Ｍｏｒｒｉｓｏｎら．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１：８５１－８５５（１９８４）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら．，Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６０４－６０８（１９８４）；Ｔａｋｅｄａら．，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２４５４（１９８５））も用いることができる。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する一分子であり、例えば、ネズミｍＡｂに由来する一の可変領域および一のヒト免疫グロブリン定常領域を有するもの、例えばヒト化抗体である。

【０１８５】

別法では、一本鎖抗体の産生について記載されている技法（米国特許第４，９４６，７７８号；Ｂｉｒｄ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２（１９８８）；Ｈｕｓｔｏｎら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：５８７９－５８８３（１９８８）；およびＷａｒｄら．，Ｎａｔｕｒｅ ３３４：５４４－５４（１９８９））も一本鎖抗体を産生するために適用できる。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してＦｖ領域の重鎖断片と軽鎖断片を連結させ、それにより一本鎖ポリペプチドをもたらすことによって、形成される。大腸菌中での機能性Ｆｖ断片のアセンブリのための技法も用いられてもよい（Ｓｋｅｒｒａら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：１０３８－１０４１（１９８８））。

【０１８６】
抗体の組換え発現
抗体またはその断片、誘導体またはアナログ（例えば、抗体の重鎖または軽鎖または一本鎖抗体）の組換え発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築を必要とする。抗体分子または抗体の重鎖または軽鎖をコードする本発明のポリヌクレオチドまたはその部分（好ましくは重鎖または軽鎖可変ドメインを含む）が得られると、抗体分子を産生するためのベクターは、当該技術分野においてよく知られている技法を用いる組換えＤＮＡ技法により作製されてもよい。故に、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含むポリヌクレオチドを発現させることにより蛋白質を調製する方法が本明細書中に記載されている。当業者によく知られている方法を用いて、抗体をコードしている配列および適切な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築ができる。これらの方法は、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技法、合成技法およびインビボ遺伝子組換えを含む。故に、本発明は、本発明の抗体分子、またはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖可変ドメインをコードする、プロモーターに作動的に連結されたヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。かかるベクターは、抗体分子の定常領域（例えば、ＰＣＴ公開　ＷＯ　８６／０５８０７；ＰＣＴ公開　ＷＯ　８９／０１０３６；および米国特許第５，１２２，４６４号を参照のこと）をコードするヌクレオチド配列を含んでもよく、および抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖を完全に発現させるためにかかるベクター中へクローニングされてもよい。
【０１８７】
発現ベクターは、慣用的な技法により宿主細胞へ移されてもよく、次いで、トランスフェクションされた細胞は慣用的な技法により培養されて、抗体を生じる。故に、本発明は、本発明の抗体分子、またはその重鎖もしくは軽鎖、または一本鎖抗体をコードする、非相同プロモーターに作動的に結合されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞を包含する。二本鎖抗体の発現についての好ましい実施態様において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳しく述べるように、完全な免疫グロブリン分子の発現のために宿主細胞において共発現されてもよい。
【０１８８】
様々な宿主－発現ベクター系を利用して、本発明の抗体分子を発現させてもよい。かかる宿主－発現系は、それにより対象のコーディング配列を産生させ、次いで精製されるビヒクルであり、さらに、適切なヌクレオチドコーディング配列を用いて形質転換または形質転換する場合、本発明の抗体分子をインサイツ（ｉｎ　ｓｉｔｕ）で発現する細胞である。これらは、抗体をコードする配列を含む組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターを用いて形質転換させた細菌（例えば、大腸菌、枯草菌（Ｂ．Ｓｕｂｔｉｌｉｓ））のごとき微生物；抗体をコードする配列を含む組換え酵母発現ベクターを用いて形質転換させた酵母（例えば、サッカロミケス、ピキア）；抗体をコードする配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を用いて感染させた昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）を用いて感染させたまたは抗体をコードする配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミド）を用いて形質転換させた植物細胞系；または哺乳類細胞（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳類ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；牛痘ウイルス７．５Ｋプロモーター）のゲノムに由来するプロモーターを含む組換え発現コンストラクトを有する哺乳類細胞系（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＨＫ、２９３、３Ｔ３細胞）を含むが、これらに限定されない。特に組換え抗体分子全体の発現のために、好ましくは、大腸菌のごとき細菌細胞、およびより好ましくは、真核細胞が、組換え抗体分子の発現のために用いられる。例えば、ヒトサイトメガロウイルスに由来する主要前初期遺伝子プロモーターエレメントのごときベクターと併用されるチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）のごとき哺乳類細胞は、抗体のための有効な発現系である（Ｆｏｅｃｋｉｎｇら．、Ｇｅｎｅ４５：１０１（１９８６）；Ｃｏｃｋｅｔｔら．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎ

ｏｌｏｇｙ　８：２（１９９０））。
【０１８９】
細菌系において、多数の発現ベクターは、有利には、発現されるべき抗体分子の使用目的に応じて選択されてもよい。例えば、かかる蛋白質を大量に産生する必要がある場合、抗体分子の医薬組成物を産生するために、容易に精製される融合蛋白質産物の高レベルな発現を導くベクターが所望されてもよい。かかるベクターは、大腸菌発現ベクターｐＵＲ２７８（Ｒｕｔｈｅｒら．、ＥＭＢＯ　Ｊ．２：１７９１（１９８３））を含むがこれらに限定されず、ここで、抗体をコードする配列は、ベクターのｌａｃ　Ｚ　コーディング領域を有するフレーム中に個々に連結され、その結果、融合蛋白質が産生される；ｐＩＮベクター（Ｉｎｏｕｙｅ＆Ｉｎｏｕｙｅ、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１３：３１０１－３１０９（１９８５）；Ｖａｎ　Ｈｅｅｋｅ＆Ｓｃｈｕｓｔｅｒ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２４：５５０３－５５０９（１９８９））など。ｐＧＥＸベクターを用いて、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合蛋白質として外来ポリペプチドを発現させてもよい。一般的に、かかる融合蛋白質は可溶性であり、およびマトリックスグルタチオン－アガロースビーズに吸着および結合させ、次いで、遊離のグルタチオンの存在下で溶離させることにより、溶解した細胞から容易に精製できる。ｐＧＥＸベクターをトロンビンまたは因子Ｘａプロテアーゼ開裂部位を含むように設計し、その結果、クローニングされた標的遺伝子産物をＧＳＴ部分から遊離することができる。
【０１９０】
昆虫系では、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｍｉｃａの核多角体ウイルス（ＡｃＮＰＶ）をベクターとして用いて、外来遺伝子を発現してもよい。ウイルスはＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞中で成長する。抗体をコードする配列は、このウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）中に個々にクローニングされ、ＡｃＮＰＶプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に置かれる。
【０１９１】
哺乳類の宿主細胞において、多数のウイルスに基づく発現系が利用されてもよい。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、目的の抗体をコードする配列は、アデノウイルス転写／翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーターおよび３つのリーダー配列に連結されてもよい。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボでの組換えによりアデノウイルスゲノム中に挿入されてもよい。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域ＥｌまたはＥ３）への挿入は、感染された宿主において生存可能なおよび抗体分子を発現し得る組換えウイルスを産生することができる（例えば、Ｌｏｇａｎ＆Ｓｈｅｎｋ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８１：３５５－３５９（１９８４）を参照のこと）。特定の開始シグナルは、挿入された抗体をコードする配列の効果的な翻訳のために必要とされてもよい。これらのシグナルは、ＡＴＧ開始コドンおよび隣接配列を含む。さらに、開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために、所望のコーディング配列のリーディングフレームと同じフレームである必要がある。これらの外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは様々な起源、天然および合成の両方に由来し得る。発現効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含むことにより増強されてもよい（Ｂｉｔｔｎｅｒら．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１－５４４（１９８７）を参照のこと）。
【０１９２】
加えて、挿入された配列の発現を調節し、または特定の所望の様式で遺伝子産物を修飾および処理する宿主細胞系が選択されてもよい。蛋白質産物のかかる修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセッシング（例えば、開裂）は、蛋白質の機能にとって重要である。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセッシングおよび蛋白質および遺伝子産物の修飾について、特徴的及び特異的な機序を有する。発現される外来蛋白質の適当な修飾およびプロセッシングを確実にするために、適切な細胞株または宿主系が選択され得る。この目的のために、主な転写産物の適当なプロセッシングならびに遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞が用いられてもよい。かかる哺乳類の宿主

細胞は、ＣＨＯ、ＶＥＲＹ、ＢＨＫ、Ｈｅｌａ、ＣＯＳ、ＭＤＣＫ、２９３、３Ｔ３、Ｗ１３８、および特に、胸癌細胞株、例えば、ＢＴ４８３、Ｈｓ５７８Ｔ、ＨＴＢ２、ＢＴ２０およびＴ４７Ｄ、ならびに例えば、ＣＲＬ７０３０およびＨｓ５７８Ｂｓｔのごとき正常な哺乳類腺細胞株を含むが、これらに限定されない。

【０１９３】

組換え蛋白質の長期間にわたる高収率の産生には、安定な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞株が作製されてもよい。ウイルス複製起点を含む発現ベクターを用いるよりもむしろ、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）により制御されるＤＮＡおよび選択マーカーを用いて形質転換され得る。外来ＤＮＡの導入後、遺伝子操作した細胞を濃縮培地中で１～２日間成長させ、次いで、選択培地に交換してもよい。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、それにより細胞はそれらの染色体中へプラスミドを安定に組み込み、そして成長して細胞巣を形成することができ、順次、細胞株へクローン化および増殖することができる。この方法は、有利には、抗体分子を発現する細胞株を操作するために用いられてもよい。遺伝子操作されたかかる細胞株は、抗体分子と直接的または間接的に相互作用する化合物をスクリーニングおよび評価する際に特に有用であってもよい。

【０１９４】

ｔｋ－細胞、ｈｇｐｒｔ－細胞またはａｐｒｔ－細胞においてそれぞれ用いることができる、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒら．，Ｃｅｌｌ　１１：２２３（１９７７））、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ＆Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ１．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　４８：２０２（１９９２））およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙら．，Ｃｅｌｌ　２２：８１７（１９８０））遺伝子を含むがこれらに限定されない多数の選択系を用いてもよい。さらに、代謝拮抗剤耐性を以下の遺伝子についての選択の基準として用いることができる：メトトレキセートに対する耐性を付与するｄｈｆｒ（Ｗｉｇｌｅｒら．，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：３５７（１９８０）；Ｏ’Ｈａｒｅら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：１５２７（１９８１））；ミコフェノール酸に対する耐性を付与するｇｐｔ（Ｍｕｌｌｉｇａｎ＆Ｂｅｒｇ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：２０７２（１９８１））；アミノグリコシドＧ－４１８に対する耐性を付与するｎｅｏ；Ｃｌｉｎｉｃｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　１２：４８８－５０５；ＷｕおよびＷｕ，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ　３：８７－９５（１９９１）；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６（１９９３）；Ｍｕｌｌｉｇａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ２６０：９２６－９３２（１９９３）；ならびにＭｏｒｇａｎおよびＡｎｄｅｒｓｏｎ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７（１９９３）；Ｍａｙ，１９９３，ＴＩＢＴＥＣＨ１１（５）：１５５－２１５（１９９３））；およびハイグロマイシンに耐性を付与するｈｙｇｒｏ（Ｓａｎｔｅｒｒｅら．，Ｇｅｎｅ３０：１４７（１９８４））。組換えＤＮＡの技術分野において一般的に知られている方法を所望の組換えクローンを選択するために慣用的に適用してもよく、およびかかる方法は、例えば、ｉｎＡｕｓｕｂｅｌら．（ｅｄｓ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９３）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９０）；およびＣｈａｐｔｅｒｓ　１２　ａｎｄ　１３，Ｄｒａｃｏｐｏｌｉら．（ｅｄｓ），Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９４）；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎら．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏ１．１５０：１（１９８１）において記載されており、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０１９５】

抗体分子の発現レベルは、ベクターの増幅により増大させることができる（報文については、ＢｅｂｂｉｎｇｔｏｎおよびＨｅｎｔｓｃｈｅｌ，Ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｖｅｃｔｏｒｓ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｇｅｎｅ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｔｈｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｃｌｏｎｅｄ ｇｅｎｅｓ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ＤＮＡ ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｖｏｌ．３．（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７）を参照のこと）。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能な場合、宿主細胞の培養液中に存在する阻害剤のレベル増大により、マーカー遺伝子のコピー数も増大し得る。増幅される領域は抗体遺伝子に関連付けられるので、抗体の産生も増大し得る（Ｃｒｏｕｓｅら．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２５７（１９８３））。

【０１９６】

選択マーカーとしてグルタミンシンターゼ（ＧＳ）またはＤＨＦＲを用いるベクターは、薬剤メチオニンスルホキシミンまたはメトトレキセートそれぞれの存在下で増幅することができる。グルタミンシンターゼに基づくベクターの利点は、グルタミンシンターゼネガティブである細胞株（例えば、ネズミミエローマ細胞株、ＮＳＯ）が利用できることである。グルタミンシンターゼ発現系は、内因性遺伝子の機能を阻害するさらなる阻害剤を提供することにより、グルタミンシンターゼを発現する細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞）中で機能することもできる。グルタミンシンターゼ発現系およびその成分は、ＰＣＴ公開：Ｗ０８７／０４４６２；Ｗ０８６／０５８０７；Ｗ０８９／０１０３６；Ｗ０８９／１０４０４；およびＷ０９１／０６６５７に詳述されており、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。さらに、本発明に従って用いられてもよいグルタミンシンターゼ発現ベクターは、例えばＬｏｎｚａ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ）を含む供給元から市販されている。ネズミミエローマ細胞におけるＧＳ発現系を用いるモノクローナル抗体の発現および産生は、Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら．，Ｂｉｏｌ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１６８（１９９２）ならびにＢｉｂｌｉａおよびＲｏｂｉｎｓｏｎＢｉｏｌｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．１１：１（１９９５）において記載されており、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０１９７】

宿主細胞は、本発明の２つの発現ベクター、重鎖由来のポリペプチドをコードする第１のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第２のベクターで同時にトランスフェクションされてもよい。２つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドを等しく発現し得る同一の選択マーカーを含んでもよい。別法では、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方をコードし、かつ発現し得る単一のベクターが用いられてもよい。かかる場合、軽鎖を重鎖の前にセットし、毒性のある遊離の重鎖が過剰となることを避ける必要がある（Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ，Ｎａｔｕｒｅ３２２：５２（１９８６）；Ｋｏｈｌｅｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７７：２１９７（１９８０））。重鎖および軽鎖のためのコーディング配列はｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡを含んでもよい。

【０１９８】

本発明の抗体分子が動物、化学的合成または組換え発現により産生されると、それは、免疫グロブリン分子の精製のために当該技術分野において知られている任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、特に蛋白質Ａでのアフィニティーの後に特異的抗原をについてのアフィニティーを行うこと、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解性の違いまたは蛋白質精製のための任意の他の標準的技法により精製されてもよい。加えて、治療用蛋白質に結合し、および本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体またはその断片は、精製を促進するために、本明細書中記載されているまたはそうでなければ当該技術分野において知られている異種ポリペプチド配列に融合され得る。

【０１９９】

抗体の修飾

治療用蛋白質に結合する抗体または断片もしくは変異体は、精製を促進するために、ペプチドのごときマーカー配列に融合され得る。好ましい実施態様において、該マーカーアミノ酸配列はヘキサ－ヒスチジンペプチド、例えば、ｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，９２５９Ｅｔｏｎ　Ａｖｅｎｕｅ，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ，９１３１１）中に提供されるタグであり、とりわけ、その多くは市販されている。Ｇｅｎｔｚら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：８２１－８２４（１９８９）において記載されているように、例えば、ヘキサ－ヒスチジンは、融合蛋白質の都合のよい精製を提供する。精製のために有用な他のペプチドタグは、肝炎赤血球凝集素蛋白質（Ｗｉｌｓｏｎら．、細胞３７：７６７（１９８４））に由来するエピトープに対応する赤血球凝集素タグ（「ＨＡタグ」とも言われる）および「ｆｌａｇ」タグを含むが、これらに限定されない。

【０２００】

本発明はさらに、診断または治療剤にコンジュゲートさせた抗体またはその断片を含む。抗体を診断的に用いて、例えば、臨床試験法の一部として腫瘍の発達または進行をモニターし、例えば、有効な特定の処置療法を決定することができる。検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングすることにより促進され得る。検出可能な物質の例は、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、様々な陽電子放出断層撮影法を用いる陽電子放出金属および非放射性常磁性金属イオンを含む。検出可能な物質は、当該技術分野において知られている技法を用いて直接的または中間体（例えば、当該技術分野において知られているリンカーのような）を介して間接的に抗体（またはその断片）にカップリングまたはコンジュゲートされてもよい。本発明に記載の診断剤として用いるための抗体にコンジュゲートされ得る金属イオンについては、例えば、米国特許第４、７４１、９００号を参照のこと。適当な酵素の例は、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを含み；適当な補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンを含み；適当な蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライドまたはフィコエリトリンを含み；発光物質の例はルミノールを含み；生物発光物質の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンを含み；および適当な放射性物質の例は、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１１１Ｉｎまたは９９Ｔｃを含む。検出可能な物質の他の例は、本明細書中に別記されている。

【０２０１】

さらに、本発明の抗体は、細胞毒、例えば、細胞分裂阻害剤または細胞破壊剤のごとき治療用部分、治療剤または放射性金属イオン、例えば、２１３Ｂｉのごときアルファ－放出体にコンジュゲートされてもよい。細胞毒または細胞傷害性剤は、細胞に有害な任意の剤を含む。例えば、パクリタキセル、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンおよびそれらのアナログまたはホモログを含む。治療剤は、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパクロランブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロリムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、およびシス－ジクロロジアミンプラチナム（Ｉｎ（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（正式にはダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（正式にはアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（ＡＭＣ））、および抗－有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）を含むが、これら

に限定されない。

【０２０２】

本発明のコンジュゲートは、特定の生物学的応答を修飾するために用いられ得、その治療剤または薬剤部分は古典的な化学治療剤に限定するものとは解釈されない。例えば、薬剤部分は所望の生物活性を有する蛋白質またはポリペプチドであってもよい。かかる蛋白質は、例えば、アブリン、リシンＡ、シュードモナス外毒素またはジフテリア毒素のごとき毒素；蛋白質、例えば、腫瘍壊死因子、アルファ－インターフェロン、Ｂ－インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノーゲン活性化剤、アポトーシス剤、例えば、ＴＮＦ－アルファ、ＴＮＦ－ベータ、ＡＩＭ　Ｉ（国際公開番号ＷＯ　９７／３３８９９を参照のこと）、ＡＩＭ　１１（国際公開番号ＷＯ　９７／３４９１１を参照のこと）、Ｆａｓリガンド（Ｔａｋａｈａｓｈｉら．，Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，６：１５６７－１５７４（１９９４））、ＶＥＧＩ（国際公開番号ＷＯ　９９／２３１０５を参照のこと）、血栓剤または抗－血管新生剤、例えば、アンジオスタチンまたはエンドスタチン；または生物学的応答修飾因子、例えば、リンホカイン、インターロイキン－１（「ＩＬ－Ｉ」）、インターロイキン－２（「ＩＬ－２」）、インターロイキン－６（「ＩＬ－６」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、顆粒球コロニー刺激因子（「Ｇ－ＣＳＦ」）、または他の成長因子を含んでもよい。

【０２０３】

抗体は固体支持体に結合されていてもよく、これは標的抗原のイムノアッセイまたは精製のために特に有用である。かかる固体支持体は、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニルまたはポリプロピレンを含むが、これらに限定されない。

【０２０４】

かかる治療用部分を抗体にコンジュゲートするための技法はよく知られている。例えば、Ａｍｏｎら．、“Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ｆｏｒ　Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ｏｆ　Ｄｒｕｇｓ　Ｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ”，ｉｎ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ａｎｄ　Ｃｎａｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｒｅｉｓｆｅｌｄら．（ｅｄｓ．），ｐｐ．２４３－５６（Ａｌａｎ　Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９８５）；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍら．，“Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ｆｏｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ”，ｉｎ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｏｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（２ｎｄ　Ｅｄ．），Ｒｏｂｉｎｓｏｎら．（ｅｄｓ．），ｐｐ．６２３－５３（Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．１９８７）；Ｔｈｏｒｐｅ，“Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｃａｒｒｉｅｒｓ　Ｏｆ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ａｇｅｎｔｓ　Ｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ　Ｒｅｖｉｅｗ”，ｉｎ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ａｎｃ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｐｉｎｃｈｅｒａら．（ｅｄｓ．），ｐｐ．４７５－５０６（１９８５）；“Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｕｓｕｌｔｓ，ａｎｄ　Ｆｕｔｕｒｅ　Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ　Ｏｆ　Ｔｈｅ　ＴＨｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｕｓｅ　Ｏｆ　Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ　ＡＮｔｉｂｏｄｙ　Ｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ”，ｉｎ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ＡＮｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　ｄｅｔｅｃｔｉｎｏ　Ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｂａｌｄｗｉｎら．（ｅｄｓ．），ｐｐ．３０３－１６（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　１９８５），およびＴｈｏｒｐｅら．，“Ｔｈｅ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ａｎｄ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｐｒｏｐｅｒｔｙ　Ｏｆ　ＡＮｔｉｂｏｄｙ－Ｔｏｘｉｎ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ’，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．６２：１１９－５８（１９８２）を参照のこと。

【０２０５】

別法では、Ｓｅｇａｌにより米国特許第４，６７６，９８０号に記載のように、抗体を二次抗体にコンジュゲートさせて、抗体のヘテロコンジュゲートを形成してもよい。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０２０６】

それにコンジュゲートされた治療用部分を有するまたは有さない、単独またはと一または複数の細胞傷害性因子および／または一または複数のサイトカインと組み合わせて投与される抗体は、治療剤として用いられ得る。

【０２０７】

抗体－アルブミンの融合

治療用蛋白質に結合し、および本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応し得る抗体は、表１の「治療用蛋白質Ｘ」の欄に開示される治療用蛋白質に結合する抗体またはその断片もしくは変異体抗体を含むが、これらに限定されない。

【０２０８】

特定の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、ＶＨドメインを含むあるいはそれからなる。他の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、１、２または３個のＶＨＣＤＲを含むあるいはそれらからなる。他の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、ＶＨＣＤＲ１を含むあるいはそれからなる。他の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、ＶＨＣＤＲ２を含むあるいはそれからなる。他の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、ＶＨＣＤＲ３を含むあるいはそれからなる。

【０２０９】

特定の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、ＶＬドメインを含むあるいはそれからなる。他の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、１、２または３個のＶＬ　ＣＤＲを含むあるいはそれらからなる。他の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、ＶＬ　ＣＤＲ１を含むあるいはそれからなる。他の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、ＶＬ　ＣＤＲ２を含むあるいはそれからなる。他の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、ＶＬ　ＣＤＲ３を含むあるいはそれからなる。

【０２１０】

他の実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、Ｖ１、２、３、４、５または６個のＶＨおよび／またはＶＬ　ＣＤＲを含むあるいはそれらからなる。

【０２１１】

好ましい実施態様において、治療用蛋白質に免疫特異的に結合する抗体およびアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する抗体の断片もしくは変異体は、$(Gly_4Ser)_3$（配列番号：４）のごときペプチドリンカーにより治療用抗体のＶＬドメインに結合された治療用抗体のＶＨドメインを含むｓｃＦｖを含むあるいはそれからなる。

【０２１２】

イムノフェノタイピング

本発明の抗体または治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、細胞株および生体試料のイムノフェノタイピングのために利用されてもよい。本発明の治療用蛋白質は、細胞特異的マーカー、またはより具体的には、特定の細胞型の分化および／または成熟の様々な段階において様々に発現される細胞マーカーとして有用であってもよい。特

定のエピトープまたはエピトープの組み合わせに対して作製されたモノクローナル抗体（または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質）により、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングが可能になり得る。モノクローナル抗体（または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質）を用いる様々な技法を利用して、一または複数のマーカーを発現する細胞集団をスクリーニングする。該技法は、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリックス（すなわち、プレート）に結合された抗体を用いる「パニング」およびフローサイトメトリー（例えば、米国特許第５，９８５，６６０号；およびＭｏｒｒｉｓｏｎら．，Ｃｅｌｌ，９６：７３７－４９（１９９９）を参照のこと）を含む。

【０２１３】

これらの技法により、細胞の特定集団のスクリーニングが可能となり、例えば、血液悪性腫瘍（すなわち急性白血病患者における微小残存病変（ＭＲＤ））および移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を予防するための移植における「非自己」細胞が見出されるかもしれない。別法では、これらの技法により、ヒト臍帯血において見出されるような増殖および／または分化を起こし得る造血幹細胞および前駆細胞のスクリーニングが可能となる。

【０２１４】

治療用蛋白質ならびに治療用蛋白質に結合する抗体の断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質に結合する抗体の特徴付け

本発明の抗体または治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、様々に特徴付けられる。特に、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、本明細書に記載されている技法を用いて、または当該技術分野において知られている技法を慣例的に変更して用いて、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に結合する抗体に対応する治療用蛋白質に結合する抗体に特異的に結合された同じ抗原に特異的に結合する能力についてアッセイされてもよい。

【０２１５】

本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質（またはその断片もしくは変異体）の特定の蛋白質またはエピトープに（特異的に）結合する能力のためのアッセイは、溶液中で（例えば、Ｈｏｕｇｈｔｅｎ，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｉｑｕｓ１３：４１２４２１（１９９２））、ビーズ上で（例えば、Ｌａｍ，Ｎａｔｕｒｅ３５４：８２－８４（１９９１））、チップ上で（例えば、Ｆｏｄｏｒ，Ｎａｔｕｒｅ　３６４：５５５－５５６（１９９３））、細菌で（例えば、米国特許第５，２２３，４０９号）、胞子で（例えば、特許第５，５７１，６９８号；第５，４０３，４８４号；および第５，２２３，４０９号）、プラスミドで（例えば、Ｃｕｌｌら，Ｐｒｏｅ．Ｎａｔｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：１８６５－１８６９（１９９２））またはファージ上で（例えば、ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９：３８６－３９０（１９９０）；Ｄｅｖｌｉｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ２４９：４０４－４０６（１９９０）；Ｃｗｉｒｌａら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８７：６３７８－６３８２（１９９０）；およびＦｅｌｉｃｉ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：３０１－３１０（１９９１））（これらの各参考文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）行われてもよい。本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質（またはその断片もしくは変異体）は、本明細書中記載されているかまたはそうでなければ当該技術分野において知られている技法を用いて、またはそれを慣例的に変更して用いて、特定の蛋白質またはエピトープについてのそれらの特異性および親和性についてアッセイされてもよい。

【０２１６】

治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、当該技術分野において知られている任意の方法により、他の抗原

（例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）に結合する抗体に特異的に結合された一または複数の分子と配列／構造保存性を有する分子）との交差反応性についてアッセイされてもよい。

【０２１７】

（免疫特異的）結合および交差反応性を分析するために用いられ得るイムノアッセイは、例えば幾つか挙げると、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定法、蛍光イムノアッセイおよび蛋白質Ａイムノアッセイのごとき技法を用いる競合的および非競合的アッセイ系を含むが、これらに限定されない。かかるアッセイは慣用的であり、かつ当該技術分野においてよく知られている（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる））。イムノアッセイの例を以下に簡潔に記載する（ただし、限定を意図するものではない）。

【０２１８】

一般的に、免疫沈降プロトコルは、溶解バッファー、例えば、蛋白質ホスファターゼおよび／またはプロテアーゼ阻害剤（例えば、ＥＤＴＡ、ＰＭＳＦ、アプロチニン、バナジン酸ナトリウム）を補足したＲＩＰＡバッファー（１％のＮＰ－４０またはトリトンＸ－１００、１％のナトリウムデオキシコール酸、０．１％のＳＤＳ、０．１５ＭのＮａＣｌ、０．０１Ｍのリン酸ナトリウム、ｐＨ７．２、１％のトラジロール）中に細胞集団を溶解させ、本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質（またはその断片もしくは変異体）を細胞溶解物に加え、一定時間（例えば、１～４時間）４０℃でインキュベーションし、蛋白質Ａおよび／または蛋白質Ｇセファロースビーズ（または治療用抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質の場合は、適切な抗－イディオタイプ抗体または抗－アルブミン抗体を用いてコーティングされたビーズ）を細胞溶解物に加え、約１時間以上４０℃でインキュベーションし、溶解バッファーでビーズを洗浄し、次いで、ＳＤＳ／試料バッファー中にビーズを再懸濁することを含む。抗体または本発明のアルブミン融合蛋白質の特定の抗原を免疫沈澱させる能力は、例えば、ウエスタンブロット分析によりアッセイすることができる。当業者は、抗体またはアルブミン融合蛋白質と抗原の結合を増大させ、およびバックグラウンドを減少させるために修飾され得るパラメーター（例えば、セファロースビーズを用いて細胞溶解物を予め洗浄すること）を認識できよう。免疫沈降プロトコルに関するさらなる議論については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら，ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ａｔ １０．１６．１を参照のこと。

【０２１９】

一般的に、ウエスタンブロット分析は、蛋白質試料を調製し、ポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原の分子量に応じて８％～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥ）中で蛋白質試料を電気泳動させ、蛋白質試料をポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、ＰＶＤＦまたはナイロンのごとき膜に転写し、ブロッキング溶液（例えば、３％のＢＳＡを含むＰＢＳまたは脱脂乳）中でその膜をブロッキングし、洗浄バッファー（例えば、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ２０）で膜を洗浄し、抗体または本発明のアルブミン融合蛋白質（ブロッキングバッファーで希釈）を膜にアプライし、洗浄バッファーでメンブレンを洗浄し、ブロッキングバッファーで希釈した酵素基質（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）または放射性分子（例えば、^{32}Ｐまたは^{125}Ｉ）にコンジュゲートさせた二次抗体（アルブミン融合蛋白質、例えば、抗－ヒト血清アルブミン抗体を認識する）をアプライし、洗浄バッファーでメンブレンを洗浄し、次いで、抗原の存在を検出することを含む。当業者は、検出されるシグナルを増大させ、およびバックグラウンドノイズ

を減少させるために修飾され得るパラメーターについて認識できよう。ウエスタンブロットプロトコルに関するさらなる議論については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら，ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ&Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ａｔ １０．８．１を参照のこと。

【０２２０】

ＥＬＩＳＡは、抗原を作製し、９６ウェルマイクロタイタープレートのウェルを抗原でコーティングし、ウェルに結合しなかった抗原を洗い流し、酵素基質（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のごとき検出可能な化合物にコンジュゲートさせた本発明のアルブミン融合蛋白質（例えば、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む）をそのウェルへ加え、次いで、一定時間インキュベーションし、結合しなかったまたは非特異的に結合したアルブミン融合蛋白質を洗い流し、次いで、ウェルをコーティングしている抗原に特異的に結合した抗体またはアルブミン融合蛋白質の存在を検出することを含む。ＥＬＩＳＡでは、抗体またはアルブミン融合蛋白質は検出可能な化合物にコンジュゲートさせる必要がなく；その代わりに、検出可能な化合物にコンジュゲートされている二次抗体（アルブミン融合蛋白質を認識する）をウェルに加えてもよい。さらに、抗原でウェルをコーティングする代わりに、抗体またはアルブミン融合蛋白質でウェルをコーティングしてもよい。この場合、検出可能な分子は、酵素基質（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のごとき検出可能な化合物にコンジュゲートさせた抗原であり得る。当業者は、検出されるシグナルを増大させるために修飾され得るパラメーターならびに当該技術分野において知られているＥＬＩＳＡの他のバリエーションについて認識できよう。ＥＬＩＳＡに関するさらなる議論については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら，ｅｄｓ，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ&Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ａｔ １１．２．１を参照のこと。

【０２２１】

蛋白質、抗原、またはエピトープに対するアルブミン融合蛋白質の結合親和性および抗原－アルブミン融合蛋白質－蛋白質／抗原／エピトープ相互作用の解離速度は、競合的結合アッセイにより測定され得る。競合的結合アッセイの一例は、増大量の非標識抗原の存在下、抗体または本発明のアルブミン融合蛋白質と一緒に標識抗原（例えば、^{3}Ｈまたは^{125}Ｉ）をインキュベーションし、次いで、標識抗原に結合した抗体を検出することを含むラジオイムノアッセイである。特定の蛋白質、抗原またはエピトープに対する抗体またはアルブミン融合蛋白質の親和性および結合の解離速度は、Ｓｃａｔｃｈａｒｄプロット分析によりデータから決定され得る。同じ蛋白質、抗原またはエピトープに結合する抗体またはアルブミン融合蛋白質などの二次蛋白質との競合も、ラジオイムノアッセイを用いて決定することができる。この場合、蛋白質、抗原またはエピトープは、本発明のアルブミン融合蛋白質と同じ蛋白質、抗原またはエピトープに結合する増大量の非標識の第２の蛋白質の存在下、標識された化合物（例えば、^{3}Ｈまたは^{125}Ｉ）にコンジュゲートさせた抗体またはアルブミン融合蛋白質と一緒にインキュベーションされる。

【０２２２】

好ましい一の実施態様において、ＢＩＡｃｏｒｅ動態分析を用いて、蛋白質、抗原またはエピトープに対する本発明の抗体またはアルブミン融合蛋白質の結合および解離速度を決定する。ＢＩＡｃｏｒｅ動態分析は、特定のポリペプチド、抗原またはエピトープ、抗体またはアルブミン融合蛋白質をその表面上にそれぞれ固定化したチップへの、抗体、アルブミン融合蛋白質または特定のポリペプチド、抗原もしくはエピトープの結合およびそれからの解離を分析することを含む。

【０２２３】

治療的使用

本発明はさらに、１またはそれ以上の開示された疾患、障害または状態を処置するため

に、本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質を動物、好ましくは哺乳類、および最も好ましくはヒト、患者に投与することを含む、抗体に基づく治療を対象とする。本発明の治療用化合物は、本発明の抗体（本明細書中記載されているような断片、そのアナログおよび誘導体を含む）、本発明の抗体をコードする核酸（本明細書中記載されているような断片、そのアナログおよび誘導体および抗－イディオタイプ抗体を含む）、治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質およびかかるアルブミン融合蛋白質をコードする核酸を含むが、これらに限定されない。本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、本明細書中記載されている任意の１またはそれ以上の疾患、障害または状態を含むがこれらに限定されない、治療用蛋白質の異常な発現および／または活性に関連する疾患、障害または状態を処置、阻害または予防するために用いられ得る。治療用蛋白質の異常な発現および／または活性に関連する疾患、障害または状態の処置および／または予防は、それらの疾患、障害または状態に関連する兆候を改善することを含むが、これらに限定されない。本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、当該技術分野において知られているかまたは本明細書中記載されているような医薬上許容される組成物にて提供されてもよい。

【０２２４】

特定および好ましい一の実施態様において、本発明は、神経障害、免疫系疾患、筋疾患、生殖器障害、胃腸疾患、肺障害、心血管疾患、腎障害、増殖性疾患および／または癌性疾患および状態および／または本明細書中別記されているものを含むがこれらに限定されない１またはそれ以上の疾患、障害または状態を処置するために、本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質を動物、好ましくは哺乳類、および最も好ましくはヒト、患者に投与することを含む、抗体に基づく治療を対象とする。本発明の治療用化合物は、本発明の抗体（例えば、哺乳類細胞の細胞表面で発現される全長蛋白質に対する抗体；治療用蛋白質のエピトープに対する抗体および本発明の抗体（本明細書中記載されるような断片、そのアナログおよび誘導体および抗－イディオタイプ抗体を含む）をコードする核酸）を含むが、これらに限定されない。本発明の抗体は、本明細書中記載されている任意の１またはそれ以上の疾患、障害または状態を含むがこれらに限定されない、治療用蛋白質の異常な発現および／または活性に関連する疾患、障害または状態を処置、阻害または予防するために用いられ得る。治療用蛋白質の異常な発現および／または活性に関連する疾患、障害または状態の処置および／または予防は、それらの疾患、障害または状態に関連する兆候を改善することを含むが、これらに限定されない。本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、当該技術分野において知られているかまたは本明細書中記載されているような医薬上許容される組成物にて提供されてもよい。

【０２２５】

本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質を治療的に用いてもよい方法には、体内の局所もしくは全身における、または例えば補体（ＣＤＣ）またはエフェクター細胞（ＡＤＣＣ）により媒介されるような抗体の直接的な細胞障害性による治療用蛋白質の結合が含まれる。これらのアプローチの幾つかは以下により詳細に記載する。本明細書中にて提供される技法を用いて、当業者は、過度な実験を行うことなく、診断、モニタリングまたは治療のために、本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質をいかにして用いるかを認識しよう。

【０２２６】

有利には、本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、他のモノクローナルまたはキメラ

抗体、または例えば抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増大するのに役立つリンホカインまたは造血成長因子（例えば、ＩＬ、２、ＩＬ－３およびＩＬ－７のごとき）と組み合わせて用いられてもよい。

【０２２７】

本発明の抗体または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、単独または他の種類の処置（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン療法、免疫療法および抗腫瘍剤）と組み合わせて投与されてもよい。一般的に、患者と同じ種の起源または反応性（抗体の場合）を有する産物の投与が好ましい。故に、好ましい一の実施態様において、ヒト抗体、断片誘導体、アナログまたは核酸が治療または予防のためにヒト患者に投与される

【０２２８】

その断片を含む本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを対象とするイムノアッセイおよびそれに関連する障害の治療の両方を目的として、治療用蛋白質、その断片または領域（またはかかる抗体に相関するアルブミン融合蛋白質）に対して、高親和性抗体および／またはインビボで強力な阻害抗体および／または中和抗体を用いることが、好ましい。かかる抗体、断片または領域は、好ましくは、その断片を含む本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドについて親和性を有する。好ましい結合親和性は、５×１０$^{-2}$Ｍ、１０$^{-2}$Ｍ、５×１０$^{-3}$Ｍ、１０$^{-3}$Ｍ、５×１０$^{-4}$Ｍ、１０$^{-4}$Ｍ未満の解離定数またはＫｄを含む。より好ましい結合親和性は、５×１０$^{-5}$Ｍ、１０$^{-5}$Ｍ、５×１０$^{-6}$Ｍ、１０$^{-6}$Ｍ、５×１０$^{-7}$Ｍ、１０^{7}Ｍ、５×１０$^{-8}$Ｍまたは１０$^{-8}$Ｍ未満の解離定数またはＫｄを有するものを含む。さらにより好ましい結合親和性は、５×１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ、５×１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ、５×１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ、５×１０$^{-12}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ、５×１０$^{-13}$Ｍ、１０$^{-13}$Ｍ、５×１０$^{-14}$Ｍ、１０$^{-14}$Ｍ、５×１０$^{-15}$Ｍまたは１０$^{-15}$Ｍ未満の解離定数またはＫｄを有するものを含む。

【０２２９】

遺伝子治療

特定の一の実施態様において、治療用蛋白質または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質に結合する抗体をコードする配列を含む核酸を投与して、遺伝子治療により、治療用蛋白質の異常な発現および／または活性に関連する疾患または障害を処置、阻害または予防する。遺伝子治療は、発現されたまたは発現可能な核酸を対象に投与することにより行われる治療を言う。本発明のこの実施態様において、核酸は、治療効果を介するそれらがコードした蛋白質を産生する。

【０２３０】

当該技術分野において有用な遺伝子治療のための任意の方法は、本発明に従って用いられ得る。該方法の例は、本明細書中、より詳細に別記されている。

【０２３１】

治療または予防活性の実証

好ましくは、本発明の化合物または医薬組成物は、ヒトにおいて使用する前に所望の治療または予防活性についてインビトロおよび次いでインビボにて試験される。例えば、化合物または医薬組成物の治療的または予防的有用性を実証するためのインビトロアッセイは、細胞株または患者組織試料への化合物の効果を含む。細胞株および／または組織試料への化合物または組成物の効果は、ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイを含むがこれらに限定されない当業者に知られている技法を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が必要であるか否かを決定するために用いられ得るインビトロアッセイは、患者組織試料を培地で成長させ、次いで、化合物に曝露するかまたは化合物を投与し、次いで、組織試料への該化合物の効果を観察する、インビトロ細胞培養アッセイを含む。

【０２３２】

治療的／予防的投与および組成物

本発明は、有効量の本発明の化合物または医薬組成物を対象へ投与することによる処置、阻害および予防方法を提供する。好ましい一の実施態様において、化合物は実質的に精製されている（例えば、実質的にその効果を限定するまたは所望されない副作用を生じる物質ではない）。好ましくは、対象は、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物を含むがこれらに限定されない動物であり、および好ましくは哺乳類であり、および最も好ましくはヒトである。

【０２３３】

化合物が核酸または免疫グロブリンを含む場合、用いられ得る処方および投与方法は上記されている；さらなる適切な処方および投与経路は本明細書中以下に記載されているものから選択され得る。

【０２３４】

様々なデリバリーシステムが知られており、および本発明の化合物を投与するために用いられ得る。例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル中へのカプセル化、化合物を発現し得る組換え細胞、受容体介在エンドサイトーシス（例えば、ＷｕおよびＷｕ、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２（１９８７）を参照のこと）、レトロウイルスまたは他のベクターの部分としての核酸の構築などである。導入方法は、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外および／または経口経路を含むが、これらに限定されない。化合物または組成物は、任意の都合のよい経路、例えば、注入またはボーラス注射、上皮または皮膚粘膜を介する吸収（例えば、口腔粘膜、直腸および小腸粘膜など）により投与されてもよく、および他の生物活性剤と一緒に投与されてもよい。投与は、全身または局所投与であり得る。加えて、脳室内およびくも膜下腔内注入を含む任意の適当な経路により、医薬化合物または本発明の組成物を中枢神経系に導入することが所望されてもよい；脳室内注入は、例えばＯｍｍａｙａリザーバーのごときリザーバーに取り付けられた脳室内カテーテルにより促進されてもよい。例えば、吸入器またはネブライザーおよびエアロゾル剤を伴う処方を用いた経肺投与も利用できる。

【０２３５】

特定の一の実施態様において、本発明の医薬化合物または組成物を処置の必要な領域に局所的に投与することが所望されてもよい；これは、限定するものではないが、例えば、手術中の局所注入、例えば手術後の創傷包帯と併用する局所適用、注入、カテーテル、坐剤またはインプラントなどにより成し遂げられてもよい。該インプラントは、シアラスティック（ｓｉａｌａｓｔｉｃ）メンブレンのごときメンブレンまたはファイバーを含む、多孔質、非多孔質またはゼラチン物質である。好ましくは、抗体を含む本発明の蛋白質を投与する場合、蛋白質が吸収しない材料を用いるように注意が必要である。

【０２３６】

別の実施態様において、化合物または組成物は、ベシクル、特にリポソーム中にて送達することができる（Ｌａｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０）；Ｔｒｅａｔら．，ｉｎ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ，Ｌｏｐｅｚ－ＢｅｒｅｓｔｅｉｎおよびＦｉｄｌｅｒ（ｅｄｓ．），Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．３５３－３６５（１９８９）；Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ，ｉｂｉｄ．，ｐｐ．３１７－３２７を参照のこと；一般的に同書を参照のこと）。

【０２３７】

さらなる別の実施態様において、化合物または組成物は、放出制御系にて送達することができる。一の実施態様において、ポンプが用いられてもよい（上記のＬａｎｇｅｒ；Ｓｅｆｌｏｎ，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１（１９８７）；Ｂｕｃｈｗａｌｄら．，Ｓｕｒｇｅｒｙ ８８：５０７（１９８０）；Ｓａｕｄｅｋら．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４（１９８９）を参照のこと）。別の実施態様において、ポリマー物質が用いられ得る（Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｏｎｔｏｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，ＬａｎｇｅｒおよびＷｉｓｅ（ｅｄｓ．），ＣＲＣ Ｐｒｅｓ．，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ（１９７４）

；Ｃｏｎｔｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ，Ｄｒｕｇ Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ，ＳｍｏｌｅｎおよびＢａｌｌ（ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ （１９８４）；ＲａｎｇｅｒおよびＰｅｐｐａｓ，Ｊ．，Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｓｃｉ．Ｒｅｖ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．２３：６１（１９８３）を参照のこと；Ｌｅｖｙら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２２８：１９０（１９８５）；Ｄｕｒｉｎｇら．，Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．２５：３５１（１９８９）；Ｈｏｗａｒｄら．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．７１：１０５（１９８９）も参照のこと）。さらなる別の実施態様において、放出制御系は、治療標的、例えば脳の近傍に配置することができるので、全身用量のごく一部しか必要としない（例えば、上記のＧｏｏｄｓｏｎ，Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｏｎｔｏｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，ｖｏｌ．２，ｐｐ．１１５－１３８（１９８４）を参照のこと）。

【０２３８】

他の放出制御系はＬａｎｇｅｒによる報文にて記載されている（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０））。

【０２３９】

本発明の化合物が蛋白質をコードする核酸である特定の一の実施態様において、適切な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築し、そして、例えば、レトロウイルスベクター（米国特許第４，９８０，２８６号を参照のこと）を用いて、または直接注入により、または微粒子ボンバードメントを用いて（例えば、遺伝子銃；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ、Ｄｕｐｏｎｔ）、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤でコーティングして、または核に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドなどに連結させてこれを投与すること（例えば、Ｊｏｌｉｏｔら．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８８：１８６４－１８６８（１９９１）を参照のこと）により、細胞内に位置するように核酸をインビボにて投与し、それがコードする蛋白質の発現を改善することができる。別法では、相同組換えにより、核酸は細胞内に導入され、および発現のための宿主細胞ＤＮＡ内に組み込まれる。

【０２４０】

本発明は医薬組成物も提供する。かかる組成物は、治療上有効量の化合物および医薬上許容される担体を含む。特定の一の実施態様において、用語「医薬上許容される」は、動物、およびより具体的にはヒトにおける使用のために、連邦または州の規制当局により認可されているか、または米薬局方または一般的に認識されている他の薬局方に記載されているものを意味する。用語「担体」は、治療剤と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを言う。かかる医薬担体は無菌液体であり得、例えば、石油、動物、植物または合成に由来するもの、例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などを含む水および油である。医薬組成物が静脈内投与される場合、水は好ましい担体である。生理的食塩水溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液も液体担体、特に注入可能な溶液として用いられ得る。適当な医薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、ライス、コムギコ、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどを含む。所望により、組成物は、少量の湿潤剤または乳化剤、またはｐＨ緩衝化剤も含み得る。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、タブレット剤、ピル剤、カプセル剤、散剤、徐放性処方などの形態をとり得る。組成物は、伝統的な結合剤および担体、例えばトリグリセリドと共に坐剤として処方され得る。経口用処方は、標準的な担体、例えば、医薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含み得る。適当な医薬担体の例は、Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎ．による“Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ”に記載されている。かかる組成物は、適当量の担体と共に、好ましくは精製された形態の治療上有効量の化合物を含有することができ、患者への適切な投与のための形態を提供する。

【０２４１】
好ましい一の実施態様において、組成物は、ヒトへの静脈内投与のために適合させた医薬組成物として、慣用法に従って処方される。典型的に、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性バッファー中の溶液である。必要な場合、組成物は、溶解剤および局所麻酔剤、例えばリグノカインを含んでもよく、注入部位の痛みを緩和する。一般的に、成分は、例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェットのごとき密閉した容器中の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、個別にまたは混合して、単位投与形態で供給される。組成物が注入投与される必要がある場合、それは、滅菌された医薬グレードの水または生理的食塩水を含む注入用ボトルを用いて投薬される。組成物が注入投与される場合、投与前に成分が混合され得るように、注入用の滅菌水または生理的食塩水のアンプルが提供され得る。

【０２４２】
本発明の化合物は中性または塩形態として処方され得る。医薬上許容される塩は、アニオン、例えば、塩酸、リン酸、酢酸、蓚酸、酒石酸などに由来するものを用いて形成されたものおよびカチオン、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどをに由来するものを用いて形成されたものを含む。

【０２４３】
治療用蛋白質の異常な発現および／または活性に関連する疾患または障害の処置、阻害および予防において有効であり得る本発明の化合物の量は、標準的な診断技法により決定され得る。加えて、所望により、インビトロアッセイを最適な投与範囲の決定に役立ててもよい。処方中用いられる正確な用量は、投与経路および疾患または障害の重篤度に依存してもよく、および担当医師の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。有効量は、インビトロまたは動物モデル実験系から得られる用量反応曲線から推定されてもよい。

【０２４４】
抗体については、患者に投与される用量は、典型的に、患者の体重の０．１ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇである。好ましくは、患者に投与される用量は、患者の体重の０．１ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇであり、より好ましくは、患者の体重の１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇである。一般的に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドに対する免疫応答に起因して、ヒト体内において他の種に由来する抗体よりも長い半減期を有する。故に、多くの場合、ヒト抗体はより少ない用量およびより少ない頻度での投与が可能となる。さらに、例えば脂質化などの修飾により、抗体の取り込みおよび組織浸透（例えば、脳への）を高めることにより、本発明の抗体の投与の用量および頻度は軽減されるてもよい。

【０２４５】
診断およびイメージング
治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）（治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質を含む）に結合する標識抗体およびその誘導体およびアナログを診断目的のために用いて、治療用蛋白質の異常な発現および／または活性に関連する疾患、障害および／または状態を検出、診断またはモニターすることができる。本発明は、治療用蛋白質の異常な発現の検出を提供し、これは、（ａ）目的のポリペプチドに特異的な１またはそれ以上の抗体を用いて、個体の細胞または体液における治療用蛋白質の発現をアッセイし、次いで、（ｂ）標準的な遺伝子発現レベルとその遺伝子発現レベルを比較することを含んでなり、ここで、標準発現レベルと比較して、アッセイした治療用蛋白質の発現レベルにおける増大または減少が異常な発現の指標となる。

【０２４６】
本発明は、（ａ）治療用蛋白質または治療用蛋白質に特異的な抗体の変異体の少なくとも１つの断片を含むアルブミン融合蛋白質に特異的な１またはそれ以上の抗体を用いて、個体の細胞または体液における治療用蛋白質の発現をアッセイし、次いで、（ｂ）標準的

な遺伝子発現レベルとその遺伝子発現レベルを比較することを含む障害を診断するための診断アッセイを提供し、ここで、標準発現レベルと比較してアッセイした治療用蛋白質の発現レベルにおける増大または減少が特定の障害の指標となる。癌については、個体からの生検用組織における比較的大量の転写産物の存在が、疾患の発症についての素因の指標となってもよく、または実際に臨床徴候が出現する前に疾患を検出するための手段を提供してもよい。この種のより確定的な診断により、医療の専門家は、癌の発症またはさらなる進行をより早く予防する予防的手段または積極的処置を利用することができる。

【０２４７】

本発明の抗体または治療用蛋白質に特異的な抗体の変異体の少なくとも１つの断片を含むアルブミン融合蛋白質を用いて、当業者に知られている古典的な免疫組織学的方法により、生体試料中の蛋白質レベルをアッセイできる（例えば、Ｊａｌｋａｎｅｎら．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎら．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏ　１０５：３０８７－３０９６（１９８７）を参照のこと）。蛋白質遺伝子発現を検出するために有用な他の抗体に基づく方法は、イムノアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）およびラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）を含む。適当な抗体アッセイ標識は、当該技術分野において知られており、およびグルコースオキシダーゼのごとき酵素標識；放射性同位元素、例えば、ヨウ素（１２５Ｉ、１２１Ｉ）、炭素（１４Ｃ）、硫黄（３５Ｓ）、トリチウム（３Ｈ）、インジウム（１１２Ｉｎ）およびテクネチウム（９９Ｔｃ）；ルミノールのごとき発光標識；およびフルオレセインおよびローダミンのごとき蛍光標識およびビオチンを含む。

【０２４８】

本発明の一の態様は、動物、好ましくは哺乳類、および最も好ましくはヒトにおいて、治療用蛋白質の異常な発現に関連する疾患または障害を検出および診断することである。一の実施態様において、診断は：ａ）目的のポリペプチドに特異的に結合する標識された有効量の分子を（例えば、非経口、皮下または腹腔内により）対象へ投与し；ｂ）投与後に一定時間待機して、治療用蛋白質を発現させる対象の部位に、標識分子を優先的に濃縮させ（および結合しなかった標識分子をバックグラウンドレベルまで浄化させる）；ｃ）バックグラウンドレベルを検出し；次いで、ｄ）対象における標識分子を検出することを含み、検出された標識分子がバックグラウンドレベルより高ければ、対象が治療用蛋白質の異常な発現に関連する特定の疾患または障害を有することを示す。バックグラウンドレベルは、特定の系について予め決定された標準値に対して検出された標識分子の量を比較することを含む様々な方法により決定することができる。

【０２４９】

当業者であれば、対象の大きさおよび用いられるイメージング系が、診断画像の作成に必要なイメージング部分の量を決定することが理解されよう。放射性同位元素部分の場合、ヒト対象については、注入される放射能の量は、通常、約５～２０ミリキュリーの範囲の９９ｍＴｃであり得る。標識抗体、抗体断片、または治療用蛋白質に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質は、次いで、特定の治療用蛋白質を含む細胞の特定の位置に選択的に蓄積し得る。インビボでの腫瘍イメージングは、Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌら．、”Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ　ｏｆ　Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｔｈｅｉｒ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ．”（Ｃｈａｐｔｅｒ　１３　ｉｎ　Ｔｕｍｏｒ　Ｉｍａｇｉｎｇ：Ｔｈｅ　Ｒａｄｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　ｄｅｔｅｃｔｉｎｏ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ，Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌ　ａｎｄ　Ｂ．Ａ．Ｒｈｏｄｅｓ，ｅｄｓ．，Ｍａｓｓｏｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｉｎｃ．（１９８２））において記載されている。

【０２５０】

用いる標識の型および投与方法を含む幾つかの変数に応じて、標識分子を対象中の部位に優先的に濃縮させ、および非標識分子をバックグラウンドレベルまで浄化させるための、投与後の時間間隔は、６～４８時間または６～２４時間または６～１２時間である。別の実施態様において、投与後の時間間隔は５～２０日または５～１０日である。

【０２５１】
一の実施態様において、疾患または障害のモニタリングは、例えば、初めの診断から１ヶ月後、初めの診断から６ヶ月後、初めの診断から１年後などに、疾患または障害を診断するための方法を繰り返すことにより行われる。
【０２５２】
標識された分子の存在は、インビボスキャニングについて当該技術分野において知られている方法を用いて患者において検出され得る。これらの方法は、用いる標識の型に依存する。当業者は、特定の標識を検出するための適切な方法を決定できよう。本発明の診断方法において用いられてもよい方法および装置は、コンピュータ連動断層撮影法（ＣＴ）、陽電子放出断層撮影法（ＰＥＴ）のごとき全身スキャン、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）および超音波検査を含むが、これらに限定されない。
【０２５３】
一の特定の実施態様において、分子は放射性同位元素を用いて標識され、および放射線応答手術装置を用いて患者において検出される（Ｔｈｕｒｓｔｏｎら．、米国特許第５，４４１，０５０号）。別の実施態様において、分子は蛍光化合物を用いて標識され、および蛍光応答スキャニング装置を用いて患者において検出される。別の実施態様において、分子は陽電子放出金属を用いて標識され、および陽電子放出断層撮影法を用いて患者において検出される。さらなる別の実施態様において、分子は常磁性標識を用いて標識され、および磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）を用いて患者において検出される。アルブミン融合蛋白質を特異的に検出し、アルブミンまたは治療用蛋白質単独では検出しない抗体は好ましい一の実施態様である。本明細書にわたって記載されているように、これらはアルブミン融合蛋白質を検出するために用いられ得る。
【０２５４】
キット
本発明は、上記方法において用いられ得るキットを提供する。一の実施態様において、キットは、１またはそれ以上の容器中に一の抗体、好ましくは精製された一の抗体を含む。一の特定の実施態様において、本発明のキットは、キット中に含まれる一の抗体と特異的に免疫反応性であるエピトープを含む、実質的に単離されたポリペプチドを含む。好ましくは、本発明のキットはさらに、目的のポリペプチドと反応しない一の対照抗体を含む。別の特定の実施態様において、本発明のキットは、抗体と目的のポリペプチドの結合を検出するための手段を含む（例えば、抗体は、検出可能な基質、例えば、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物または発光化合物にコンジュゲートされていてもよく、または一次抗体を認識する二次抗体が検出可能な基質にコンジュゲートされていてもよい）。
【０２５５】
本発明の別の特定の実施態様において、キットは、増殖性および／または癌性ポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対して特異的な抗体を含む血清のスクリーニングにおいて用いるための診断キットである。かかるキットは、目的のポリペプチドと反応しない一の対照抗体を含んでもよい。かかるキットは、少なくとも１つの抗－ポリペプチド抗原抗体と特異的に免疫反応性であるエピトープを含む、実質的に単離されたポリペプチド抗原を含む。さらに、かかるキットは、該抗体と抗原の結合を検出するための手段を含む（例えば、抗体は、フローサイトメトリーにより検出され得るフルオレセインまたはローダミンのごとき蛍光化合物にコンジュゲートされていてもよい）。特定の実施態様において、キットは、組換えにより産生されたまたは化学的に合成されたポリペプチド抗原を含んでもよい。キットのポリペプチド抗原は、固体支持体に結合させてもよい。
【０２５６】
より特定の一の実施態様において、上記キットの検出手段は、ポリペプチド抗原を結合させる固体支持体を含む。かかるキットは、非結合のレポーター標識抗ヒト抗体も含んでもよい。この実施態様において、抗体とポリペプチド抗原の結合は、該レポーター標識抗体の結合により検出され得る。
【０２５７】

さらなる一の実施態様において、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清のスクリーニングにおいて用いるための診断キットを含む。診断キットは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド抗原と特異的に免疫反応性である実質的に単離された抗体およびポリヌクレオチドまたはポリペプチド抗原と抗体の結合を検出するための手段を含む。一の実施態様において、抗体は固体支持体に結合される。特定の一の実施態様において、抗体はモノクローナル抗体であってもよい。キットの検出手段は、２番目の、標識されたモノクローナル抗体を含んでもよい。或いはまたは加えて、検出手段は、標識された競合抗原を含んでもよい。

【０２５８】

一の診断形態では、試験血清を、本発明の方法により得られた表面結合抗原を有する固相試薬と反応させる。特定の抗原抗体と試薬を結合させ、次いで、洗浄により結合されていない血清成分を除去した後、試薬をレポーター標識された抗－ヒト抗体と反応させ、固体支持体上に結合させた抗－抗原抗体の量に比例して、レポーターと試薬を結合させる。試薬を再度洗浄し、結合されていない標識抗体を除去し、次いで、試薬に関連するレポーターの量を測定する。典型的に、レポーターは、適当な蛍光性、発光または比色分析用基質（Ｓｉｇｍａ、セントルイス、ＭＯ）の存在下、固相をインキュベーションすることにより検出される酵素である。

【０２５９】

上記アッセイの固体表面試薬は、蛋白質物質を固体支持物質、例えば、ポリマービーズ、ディップスティック、９６－ウェルプレートまたはフィルター物質に付着させるために知られている技法により、作製する。これらの付着方法は、一般的に、支持体への蛋白質の非特異的吸着、または、典型的に遊離アミン基を介する、固体支持体上の化学的に反応性のある基、例えば、活性化されたカルボキシル、ヒドロキシルまたはアルデヒド基と蛋白質との共有結合を含む。別法では、ストレプトアビジンでコーティングしたプレートを、一または複数のビオチン化抗原と併用することができる。

【０２６０】

故に、本発明は、この診断方法を実施するためのアッセイ系またはキットを提供する。キットは一般的に、表面に組換え抗原が結合した支持体、および表面に結合した抗－抗原抗体を検出するためのレポーター標識抗－ヒト抗体を含む。

【０２６１】

アルブミン融合蛋白質

本発明は、一般的に、アルブミン融合蛋白質および疾患または障害の処置、予防、または改善方法に関する。本明細書中用いる「アルブミン融合蛋白質」は、アルブミン（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子と治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子の融合により形成された蛋白質を言う。本発明のアルブミン融合蛋白質は、治療用蛋白質の少なくとも１つの断片もしくは変異体およびヒト血清アルブミンの少なくとも１つの断片もしくは変異体を含み、それらは好ましくは遺伝学的融合（すなわち、アルブミン融合蛋白質は核酸の翻訳により生じ、ここで、治療用蛋白質の全てまたは一部をコードするポリヌクレオチドは、アルブミンの全てまたは一部をコードするポリヌクレオチドのフレーム内に連結される）により互いに関連付けられるかまたは互いを関連付ける。治療用蛋白質およびアルブミン蛋白質はアルブミン融合蛋白質の部分であるならば、それぞれ、アルブミン融合蛋白質の「部分」、「領域」または「一部」と言われてもよい。

【０２６２】

好ましい一の実施態様において、本発明は、ポリヌクレオチドによりコードされるアルブミン融合蛋白質または表１または表２に記載のアルブミン融合コンストラクトを提供する。これらのアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドも本発明に含まれる。

【０２６３】

好ましい本発明のアルブミン融合蛋白質は、治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドのフレー

ム内に連結されたアルブミン（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードするポリヌクレオチドを含む或いはそれからなる核酸分子；表１、表２または実施例に記載のように作製した治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドのフレーム内に連結されたアルブミン（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードするポリヌクレオチドを含む或いはそれからなる核酸分子；または治療用蛋白質（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドのフレーム内に連結されたアルブミン（またはその断片もしくは変異体）の少なくとも１つの分子をコードするポリヌクレオチドを含む或いはそれからなる核酸分子であって、さらに例えば１またはそれ以上の以下のエレメント：（１）機能的な自己複製ベクター（シャトルベクター、発現ベクター、組み込みベクターおよび／または複製系を含むが、これらに限定されない）、（２）転写開始領域（例えば、制御または誘導プロモーター、構成的プロモーターのごときプロモーター領域）、（３）転写終結領域、（４）リーダー配列、および（５）選択マーカーを含む核酸分子によりコードされたアルブミン融合蛋白質を含むが、これらに限定されない。

【０２６４】

一の実施態様において、本発明は、治療用蛋白質（例えば、表１に記載のような）および血清アルブミン蛋白質を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。他の実施態様において、本発明は、治療用蛋白質の生物活性および／または治療活性のある断片および血清アルブミン蛋白質を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。他の実施態様において、本発明は、治療用蛋白質の生物活性および／または治療活性のある変異体および血清アルブミン蛋白質を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。好ましい実施態様において、アルブミン融合蛋白質の血清アルブミン蛋白質成分は血清アルブミンの成熟部分である。

【０２６５】

さらなる実施態様において、本発明は、治療用蛋白質および血清アルブミンの生物活性および／または治療活性のある断片を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。さらなる実施態様において、本発明は、治療用蛋白質および血清アルブミンの生物活性および／または治療活性のある変異体を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。好ましい実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分は治療用蛋白質の成熟部分である。

【０２６６】

さらなる実施態様において、本発明は、治療用蛋白質の生物活性および／または治療活性のある断片もしくは変異体および血清アルブミンの生物活性および／または治療活性のある断片もしくは変異体を含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。好ましい実施態様において、本発明は、治療用蛋白質の成熟部分および血清アルブミンの成熟部分含む或いはそれからなるアルブミン融合蛋白質を提供する。

【０２６７】

好ましくは、アルブミン融合蛋白質はＮ－末端部分としてＨＡおよびＣ－末端部分として治療用蛋白質を含む。別法では、アルブミン融合蛋白質はＣ－末端部分としてＨＡを含み、および治療用蛋白質をＮ－末端部分として用いてもよい。

【０２６８】

他の実施態様において、アルブミン融合蛋白質は、アルブミンのＮ－末端およびＣ－末端の両方に融合された治療用蛋白質を有する。好ましい一の実施態様において、Ｎ－およびＣ－末端に融合された治療用蛋白質は同じ治療用蛋白質である。別の好ましい実施態様において、Ｎ－およびＣ－末端に融合された治療用蛋白質は異なる治療用蛋白質である。別の好ましい実施態様において、Ｎ－およびＣ－末端に融合された治療用蛋白質は、同じまたは関連する疾患、障害または状態（例えば、表１の「好適な適応症Ｙ」の欄に記載のような）を処置または予防するために用いられてもよい異なる治療用蛋白質である。別の好ましい実施態様において、Ｎ－およびＣ－末端に融合された治療用蛋白質は、当該分野

において一般的に、同時に、一緒に、または連続して患者に生じることが知られているか、または一般的に互いに関連して患者に生じる疾患または障害（例えば、表１の「好適な適応症Ｙ」の欄に記載のような）を処置、改善または予防するために用いられてもよい異なる治療用蛋白質である。

【０２６９】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、本発明のアルブミン融合蛋白質のＮ－またはＣ－末端および／またはアルブミンまたはその変異体のＮ－またはＣ－末端に融合された特定の治療用蛋白質Ｘまたはその変異体の１、２、３、４またはそれ以上の分子を含む蛋白質を包含する。特定の治療用蛋白質Ｘまたはその変異体の分子は、「頭部－頭部」の配向（例えば、治療用蛋白質Ｘの１つの分子のＮ－末端が治療用蛋白質Ｘの他の分子のＮ－末端に融合されている）、または「頭部－尾部」の配向（例えば、治療用蛋白質Ｘの１つの分子のＣ－末端治療用蛋白質Ｘの他の分子のＮ－末端に融合されている）を含むがこれらに限定されない、様々な配向性であってもよい。

【０２７０】

一の実施態様において、１、２、３またはそれ以上のタンデムに配向した治療用蛋白質Ｘポリペプチド（またはその断片もしくは変異体）は、本発明のアルブミン融合蛋白質のＮ－またはＣ－末端および／またはアルブミンまたはその変異体のＮ－および／またはＣ－末端に融合される。

【０２７１】

本発明のアルブミン融合蛋白質はさらに、本発明のアルブミン融合蛋白質のＮ－またはＣ－末端および／またはアルブミンまたはその変異体のＮ－および／またはＣ－末端に融合されている特定の治療用蛋白質Ｘまたはその変異体の１、２、３、４またはそれ以上の分子を含む蛋白質も包含し、ここで、分子はペプチドリンカーにより連結されている。例えば、米国特許第５，０７３，６２７号（出典明示により本明細書の一部となる）に記載されているペプチドリンカーを含む。ペプチドリンカーにより分離されている複数の治療用蛋白質Ｘポリペプチドを含むアルブミン融合蛋白質は、慣用的な組換えＤＮＡ技法を用いて産生されてもよい。小さなペプチドを大きなＨＡＳへ融合する場合、分子リンカーは特に重要である。ペプチドそれ自体がペプチドのタンデムコピーを融合させるリンカーであり得、または他の知られているリンカーが用いられ得る。リンカーを含むコンストラクトは表２に記載されているか、または配列番号：Ｙを検討することにより明らかである。

【０２７２】

さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質は、分子内および／または分子間の多量体形態を形成させるように、治療用蛋白質Ｘまたはその変異体をアルブミンまたはその変異体のＮ－末端および／またはのＣ－末端に融合させることにより産生されてもよい。本発明の一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質は、モノマーまたは多量体形態（すなわち、二量体、三量体、四量体およびそれ以上の多量体）であってもよい。本発明のさらなる一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分は、モノマー形態または多量体形態（すなわち、二量体、三量体、四量体およびそれ以上の多量体）であってもよい。特定の一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分は、多量体形態（すなわち、二量体、三量体、四量体およびそれ以上の多量体）であり、およびアルブミン蛋白質部分はモノマー形態である。

【０２７３】

アルブミン部分が治療用蛋白質部分のＮ－末端および／またはＣ－末端に融合されているアルブミン融合蛋白質に加えて、本発明のアルブミン融合蛋白質は、目的の治療用蛋白質またはペプチド（例えば、表１に開示されるような治療用蛋白質Ｘ、または治療用蛋白質に結合する抗体またはその断片もしくは変異体）をＨＡＮの内部領域へ挿入することにより産生されてもよい。例えば、ＨＡ分子の蛋白質配列内には、多数のループまたはターンが、α－ヘリックスの終点と始点の間に存在し、それらはジスルフィド結合により安定化されている。ＨＡの結晶構造から決定されるようなループ（ＰＤＢ識別　１Ａ０６、１ＢＪ５、ＩＢＫＥ、ＩＢＭＯ、ＩＥ７Ｅ～ＩＥ７１およびＩＵＯＲ）は大部分が分子本体

から離れて延びる。これらのループは、治療活性のあるペプチド、特に機能するために二次構造を必要とするものを挿入または内部融合して、特定の生物活性を有するアルブミン分子を本質的に産生するために有用である。

【０２７４】

ペプチドまたはポリペプチドが挿入されて本発明のアルブミン融合蛋白質を産生し得るヒトアルブミン構造中のループは：Ｖａ１５４－Ａｓｎ６１、Ｔｈｒ７６－Ａｓｐ８９、Ａ１ａ９２－Ｇ１ｕｌＯＯ、Ｇ１ｎｌ７０－Ａ１ａｌ７６、Ｈｉｓ２４７－Ｇｌｕ２５２、Ｇｌｕ２６６－Ｇｌｕ２７７、Ｇｌｕ２８０－Ｈｉｓ２８８、Ａｌａ３６２－Ｇｌｕ３６８、Ｌｙｓ４３９－Ｐｒｏ４４７、Ｖａｌ４６２－Ｌｙｓ４７５、Ｔｈｒ４７８－Ｐｒｏ４８６およびＬｙｓ５６０－Ｔｈｒ５６６を含む。より好ましい実施態様において、ペプチドまたはポリペプチドは、成熟ヒトアルブミン（配列番号：１）のＶａｌ５４－Ａｓｎ６ｌ、Ｇｌｎｌ７０－Ａｌａｌ７６、および／またはＬｙｓ５６０－Ｔｈｒ５６６ループへ挿入される。

【０２７５】

挿入しようとするペプチドは、特定の生物活性についてスクリーニングされたファージディスプレイまたは合成ペプチドのいずれか、或いは所望の機能を有する分子の活性部分に由来する。さらに、特定のループ内で、またはランダム化したペプチドをＨＡ分子の特定のループ中へ挿入することにより、ランダムペプチドライブラリーを作製してもよく、ここでは、アミノ酸の全ての可能な組み合わせが示される。

【０２７６】

かかる一または複数のライブラリーは、以下の方法の１つにより、ＨＡまたはＨＡのドメイン断片上で作製することができる：

ＨＡまたはＨＡドメイン断片の１またはそれ以上のペプチドループ内でのアミノ酸のランダム突然変異。この方法により、１ループ内の１以上または全ての残基を突然変異させることができる；

１またはそれ以上のループへの、長さＸｎ（ここで、Ｘはアミノ酸であり、およびｎは残基の数である）の一または複数のランダム化ペプチドのＨＡまたはＨＡのドメイン断片（すなわち、内部融合）の置換または挿入；

（ａ）および／または（ｂ）に加えて、Ｎ－，Ｃ－またはＮ－およびＣ－末端ペプチド／蛋白質融合。

【０２７７】

ＨＡまたはＨＡドメイン断片は、異なる標的に対する異なるループの異なるスクリーニングに由来するペプチドを、同じＨＡまたはＨＡのドメイン断片へ融合させることにより、多機能化されてもよい。

【０２７８】

好ましい実施態様において、ヒト血清アルブミンのループ中へ挿入されたペプチドは、表１に開示される治療用蛋白質のペプチド断片またはペプチド変異体である。より具体的には、本発明は、ヒト血清アルブミンのループ中へ挿入された、少なくとも７個少なくとも８、個少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個または少なくとも４０個のアミノ酸長のペプチド断片またはペプチド変異体を含むアルブミン融合蛋白質を包含する。本発明は、ヒト血清アルブミンのＮ－末端に融合された、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個または少なくとも４０個のアミノ酸長のペプチド断片またはペプチド変異体を含むアルブミン融合蛋白質も包含する。本発明は、ヒト血清アルブミンのＣ－末端に融合された、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、少なくとも１２個、少なくとも１３個、少なくとも１４個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なく

とも３５個または少なくとも４０個のアミノ酸長のペプチド断片またはペプチド変異体を含むアルブミン融合蛋白質も包含する。例えば、表１および２（例えば、治療用Ｙ）に記載の短いペプチドをアルブミンループ中に挿入することができる。

【０２７９】

一般的に、本発明のアルブミン融合蛋白質は、１つのＨＡに由来する領域および１つの治療用蛋白質に由来する領域を有してもよい。しかし、蛋白質の複数の領域は、本発明のアルブミン融合蛋白質を作製するために用いられてもよい。同様に、１個以上の治療用蛋白質は本発明のアルブミン融合蛋白質を作製するために用いられてもよい。例えば、治療用蛋白質はＨＡのＮ－およびＣ－末端の両方に融合されてもよい。このような形態では、治療用蛋白質部分は同じまたは異なる治療用蛋白質分子であってもよい。二重機能性アルブミン融合蛋白質の構造はｍＸ－ＨＡ－ＹまたはＹ－ＨＡ－Ｘのように表されてもよい。

【０２８０】

例えば、抗－ＢＬｙＳ（登録商標）ｓｃＦｖ－ＨＡ－ＩＦＮａ－２ｂ融合物を作製し、抗－ＢＬｙＳＴＭｓｃＦｖによるＩＦＮａ－２ｂに対する免疫応答を調節してもよい。別法では、２（または多）機能性用量のＨＡ－融合物、例えば、機能、半減期などに応じて様々な比で、ＨＡ－抗－ＢＬｙＳＴＭｓｃＦｖ融合物または他のＨＡ－融合物と混合されたＨＡ－ＩＦＮａ－２ｂ融合物を作製する。

【０２８１】

二重－または多機能性アルブミン融合蛋白質を作製して、ＨＡの反対側の末端にある蛋白質またはペプチドを介して、融合物の治療用蛋白質部分を標的の器官または細胞型へターゲッティングさせもよい。

【０２８２】

知られている治療用分子の融合物の代替物として、ペプチドは、典型的に６、８、１２、２０または２５またはX_n（ここで、Ｘはアミノ酸（ａａ）であり、およびｎは残基の数である）のランダム化アミノ酸からなる、ＨＡのＮ－、Ｃ－またはＮ－およびＣ－末端またはＨＡのドメイン断片との融合物として構築されたライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができ、ここでは、アミノ酸の全ての可能な組み合わせが示される。このアプローチの特に有利な点は、ペプチドをＨＡ分子上でインサイツで選択してもよいこと、それ故に、そのペプチドの特性を、任意の他の方法により誘導し、次いで、ＨＡに結合させたペプチドの場合と同様に潜在的に変更することなく、選択できることである。

【０２８３】

さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質は、融合された部分の間のリンカーペプチドを含ませ、部分間の物理的距離を増加させることによって、例えば同族受容体に対する結合についての治療用蛋白質の部分の接近可能性を最大化することができる。リンカーペプチドは、それの柔軟性または剛性を高めるようなアミノ酸から構成されてもよい。

【０２８４】

リンカー配列は、プロテアーゼまたは化学的に開裂されて、成長ホルモン関連部分を産生してもよい。好ましくは、プロテアーゼは、宿主により自然に生じるものであり、例えばＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅプロテアーゼｋｅｘ２またはそれに同等なプロテアーゼである。

【０２８５】

それ故に、上記のように、本発明のアルブミン融合蛋白質は、以下の式Ｒ１－ＬＲ２；Ｒ２－Ｌ－Ｒ１；またはＲ１－Ｌ－Ｒ２－Ｌ－Ｒ１を有してもよく、ここで、Ｒ１は少なくとも１つの治療用蛋白質、ペプチドまたはポリペプチド配列であり、および必ずしも同じ治療用蛋白質である必要はなく、Ｌはリンカーであり、およびＲ２は血清アルブミン配列である。

【０２８６】

好ましい実施態様において、治療用蛋白質を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、アルブミンに融合されていない同じ治療用蛋白質の血漿安定性に比べてより高い血漿安定性

を有する。典型的に、血漿安定性は、治療用蛋白質がインビボ投与され、そして血流中にもたらされてから、治療用蛋白質が分解され、そして血流から、最終的に治療用蛋白質を排除する腎臓または肝臓のごとき器官中へ排除されるまでの時間を言う。血漿安定性は、血流中の治療用蛋白質の半減期に関して算出される。血流中の治療用蛋白質の半減期は、当該技術分野において知られている一般的なアッセイにより容易に決定され得る。

【０２８７】

好ましい実施態様において、治療用蛋白質を含む本発明のアルブミン融合蛋白質は、アルブミンに融合されていない同じ治療用蛋白質の貯蔵寿命に比べて延長された貯蔵寿命を有する。典型的に、貯蔵寿命は、溶液中または幾つかの他の貯蔵用処方中の治療用蛋白質の治療活性が、治療活性の過度の損失を伴うことなく安定である期間を言う。多くの治療用蛋白質は、非融合状態において非常に不安定である。以下に述べるように、これらの治療用蛋白質の典型的な貯蔵寿命は、本発明のアルブミン融合蛋白質中に組み込まれると、著しく延長される。

【０２８８】

「延長された」または「拡大された」貯蔵寿命を有する本発明のアルブミン融合蛋白質は、同じ貯蔵および取扱い条件を受ける標準型と比較して、より高い治療活性を示す。基準型は、非融合の全長治療用蛋白質であってもよい。アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分がアナログ、変異体であるか、またはそうでなければ改変されているか、またはその蛋白質についての完全な配列を含んでいない場合、別法として、治療活性の延長は、アナログ、変異体、改変されたペプチドまたは不完全な配列の非融合等価物と比較されてもよい。例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質は、特定の時間ポイントで比較した場合、基準と同じ貯蔵および取扱い条件に曝されている基準の治療活性の約１００％よりも高い治療活性、または約１０５％、１１０％、１２０％、１３０％、１５０％または２００％よりも高い治療活性を保持していてもよい。

【０２８９】

貯蔵寿命を、貯蔵後に残存する治療活性に関して評価し、貯蔵開始時の治療活性に対して正規化してもよい。延長されたまたは拡大された貯蔵寿命を有する本発明のアルブミン融合蛋白質は、同じ条件に曝されている融合されていない対応する治療用蛋白質の治療活性の約５０％よりも高い治療活性、約６０％、７０％、８０％または９０％またはそれ以上よりも高い治療活性を保持していてもよい。

【０２９０】

融合蛋白質の発現

本発明のアルブミン融合蛋白質は、酵母、細菌のごとき微生物またはヒトまたは動物細胞株からの分泌により、組換え分子として産生されてもよい。好ましくは、ポリペプチドは宿主細胞から分泌される。

【０２９１】

本発明の一の特定の実施態様は、酵母における分泌を導くために有効なシグナル配列、特に酵母に由来するシグナル配列（特に、酵母宿主に相同なもの）をコードするＤＮＡコンストラクトと、本発明の初めの態様の融合された分子を含み、シグナルおよび成熟ポリペプチドの間には酵母由来のプロ配列はない。

【０２９２】

酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）インベルターゼシグナルは、酵母に由来するシグナル配列の好ましい例である。

【０２９３】

別々に調製されたポリペプチドが化学架橋結合により連結されている、Ｐｏｚｎａｎｓｋｙら（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．２３９：１８（１９８８））により調製された類のコンジュゲートは、熟慮されない。

【０２９４】

本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質を発現するように形質転換させた細胞、好ましくは酵母細胞も含む。形質転換させた宿主細胞それ自体に加えて、本発明は、栄養培地

中のそれらの細胞の培養物、好ましくはモノクローナル（クローン的に同種）培養物、またはモノクローナル培養物に由来する培養物も含む。ポリペプチドが分泌されるならば細胞を伴って、またはそれらが濾過または遠心分離により除かれるならば細胞を伴わずに、培地はポリペプチドを含み得る。細菌（例えば大腸菌および枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ））、酵母（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ，Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓおよびＰｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ、糸状真菌（例えば、アスペルギルス属）、植物細胞、動物細胞および昆虫細胞を含む多くの発現系が知られており、および用いられてもよい。

【０２９５】

アルブミン融合蛋白質の産生において用いられるべき好ましい酵母株は、Ｄ８８、ＤＸＹ１およびＢＸＰ１０である。Ｄ８８［ｌｅｕ２－３、ｌｅｕ２－１２２、ｃａｎｌ、ｐｒａｌ、ｕｂｃ４］は、親株ＡＨ２２ｈｉｓ$^{+}$（ＤＢ１としても知られている；例えば、Ｓｌｅｅｐら．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ８：４２－４６（１９９０）を参照のこと）の誘導体である。該株は、ｌｅｕ２突然変異を含み、これにより、ＬＥＵ２遺伝子を含む２ミクロン単位のプラスミドの栄養要求性選択が可能となる。Ｄ８８は、グルコース過剰において、ＰＲＢ１の抑制も示す。通常、ＰＲＢ１プロモーターは、グルコースレベルおよび成長段階をモニターする２つのチェックポイントにより制御される。該プロモーターは、グルコースが枯渇し、定常期に入ると、野生型酵母において活性化される。系Ｄ８８はグルコースによる抑制を示すが、定常期へ入ると、誘導を維持する。ＰＲＡ１遺伝子は、ＥＲに位置する酵母液胞プロテアーゼであるＹｓｃＡエンドプロテアーゼＡをコードする。ＵＢＣ４遺伝子はユビキチン化経路に存在し、ユビキチン依存性分解のために、短命および異常な蛋白質のターゲッティングに関与する。このｕｂｃ４突然変異の単離は、細胞中の発現プラスミドのコピー数を増大させ、および該プラスミドから発現される所望の蛋白質の発現レベルの増大を惹起することが見出されている（例えば、国際公開番号ＷＯ９９／００５０４を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）。

【０２９６】

Ｄ８８の誘導体であるＤＸＹ１は、以下の遺伝子型：［ｌｅｕ２－３、ｌｅｕ２－１２２、ｃａｎｌ、ｐｒａｌ、ｕｂｃ４、ｕｒａ３：．ｙａｐ３］を有する。Ｄ８８において単離した突然変異に加えて、この株は、ＹＡＰ３プロテアーゼのノックアウトも有する。このプロテアーゼは、主に二塩基性の残基（ＲＲ、ＲＫ、ＫＲ、ＫＫ）の開裂を惹起するが、蛋白質中の一塩基性の残基における開裂も促進し得る。このｙａｐ３突然変異の単離は、全長ＨＳＡの生産レベルをもたらした（例えば、米国特許第５，９６５，３８６号およびＫｅｒｒｙ－Ｗｉｌｌｉａｍｓら．，Ｙｅａｓｔ１４：１６１－１６９（１９９８）を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）。

【０２９７】

ＢＸＰ１０は以下の遺伝子型：ｌｅｕ２－３、ｌｅｕ２－１２２、ｃａｎｌ、ｐｒａｌ、ｕｂｃ４、ｕｒａ３、ｙａｐ３：：ＵＲＡ３、ｌｙｓ２、ｈｓｐｌ５０：：ＬＹＳ２、ｐｍｔｌ：：ＵＲＡ３を有する。ＤＸＹＩにおいて単離された突然変異に加えて、この株はＰＭＴＩ遺伝子およびＨＳＰ１５０遺伝子のノックアウトも有する。ＰＭＴ１遺伝子は、ドリキルーホスフェートＤ－マンノース蛋白質Ｏ－マンノシルトランスフェラーゼ（Ｐｍｔｓ）の進化的に保存されたファミリーのメンバーである。Ｐｍｔｌｐの膜貫通トポロジーは、Ｏ－結合したグリコシル化に関与する小胞体の内在性膜蛋白質であることを示す。この突然変異は、ＨＳＡ融合物のＯ－結合したグリコシル化を減少／除去するために役立つ（例えば、国際公開番号ＷＯ００／４４７７２を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）。研究は、ＨｓｐｌＳ０蛋白質がイオン交換クロマトグラフィーによりｒＨＡから非効率的に分離されることを明らかにした。ＨＳＰ１５０遺伝子における突然変異は、標準的な精製技法では除去が困難であることが証明されている潜在的な汚染を除去する。例えば、米国特許第５，７８３，４２３号を参照のこと、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０２９８】
所望の蛋白質は、慣用的な方法、例えば宿主染色体へ挿入されたコーディング配列から、または遊離プラスミド上で産生する。酵母は、通常の任意の方法、例えばエレクトロポレーションにより、所望の蛋白質についてのコーディング配列を用いて形質転換される。エレクトロポレーションによる酵母の形質転換のための方法は、Ｂｅｃｋｅｒ＆Ｇｕａｒｅｎｔｅ（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１９４，１８２に開示されている。
【０２９９】
好適に形質転換した細胞、すなわち、本発明のＤＮＡコンストラクトを含む細胞は、よく知られている技法により同定できる。例えば、発現コンストラクトの導入から得られる細胞を成長させて、所望のポリペプチドを産生することができる。細胞を回収し、次いで、溶解し、次いで、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ（１９７５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．９８，５０３またはＢｅｒｅｎｔら．（１９８５）Ｂｉｏｔｅｃｈ．３，２０８により記載のような方法を用いて、そのＤＮＡ内容物をＤＮＡの存在について調べることができる。別法では、抗体を用いて、上清中の蛋白質の存在を検出することができる。
【０３００】
有用な酵母プラスミドベクターは、ｐＲＳ４０３－４０６およびｐＲＳ４１３－４１６を含み、および一般的にＳｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ９２０３７，ＵＳＡから入手可能である。プラスミドｐＲＳ４０３、ｐＲＳ４０４、ｐＲＳ４０５およびｐＲＳ４０６は、酵母組込みプラスミド（Ｙｌｐｓ）であり、酵母選択マーカーＨＩＳ３、７ＲＰＩ、ＬＥＵ２およびＵＲＡ３を組み込む。プラスミドｐＲＳ４１３４１６は、酵母セントロメアプラスミド（Ｙｃｐｓ）である。
【０３０１】
酵母における発現用のアルブミン融合蛋白質を作製するために好ましいベクターは、ｐＰＰＣ０００５、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡおよびｐＣ４：ＨＳＡを含み、これらは実施例１に詳しく記載する。図２は、基本ベクターとして用いることができるｐＰＰＣ０００５プラスミドのマップを示し、ここへ、治療用蛋白質をコードするポリヌクレオチドをクローニングして、ＨＡ－融合物を形成してもよい。それは、ＰＲＢＩＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅプロモーター（ＰＲＢｌｐ）、融合リーダー配列（ＦＬ）、ＨＡ（ｒＨＡ）をコードするＤＮＡおよびＡＤＨＩ　Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅターミネーター配列を含む。融合リーダー配列の配列は、ヒト血清アルブミン（配列番号：３）のシグナルペプチドの初めの１９個のアミノ酸および接合因子アルファ１プロモーターの最後の５個のアミノ酸からなる（ＳＬＤＫＲ、ＥＰ－Ａ－３８７３１９を参照のこと、出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）。
【０３０２】
プラスミド、ｐＰＰＣ０００５、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡおよびｐＣ４：ＨＳＡは、２００１年４月１１日に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、１０８０１　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ　２０１１０－２２０９へ寄託され、それぞれ寄託番号ＡＴＣＣ　ＰＴＡ－３２７８、ＰＴＡ－３２７６、ＰＴＡ－３２７９およびＰＴＡ－３２７７を付与された。酵母においてアルブミン融合蛋白質を発現するために有用な他のベクターは、Ｓｌｅｅｐら．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ８：４２（１９９０）に記載されているｐＳＡＣ３５ベクターであり、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。
【０３０３】
アルブミン融合蛋白質を発現させるために用いることのできる酵母プロモーターはＭＥＴ２５プロモーターである。例えば、Ｄｏｍｉｎｉｋ　Ｍｕｍｂｕｒｇ，Ｒｏｌｆ　Ｍｕｌｌｅｒ およびＭａｒｔｉｎ　Ｆｕｎｋ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９４，Ｖｏｌ．２２，Ｎｏ．２５，ｐｐ．５７６７－５７６８を参照のこと。Ｍｅｔ２５プロモーターは３８３塩基長（塩基－３８２ないし－１）であり、およびこのプロモーターにより発現される遺伝子は、ＭｅｔｌＳ，Ｍｅｔｌ７およびＹＬＲ３０３Ｗ

としても知られている。好ましい一の実施態様は、以下の配列を利用し、ここで、クローニングにおいて用いられる該配列の５’末端のＮｏｔ１部位に下線が引かれ、および３’末端のＡＴＧ開始コドンに下線が引かれている：

【表５１】

GCGGCCGCCGGATGCAAGGGTTCGAATCCCTTAGCTCTCATTATTTTTTGCTTTTTCTCTTGAGGTCACATGATCGCAAA
ATGGCAAATGGCACGTGAAGCTGTCGATATTGGGGAACTGTGGTGGTTGGCAAATGACTAATTAAGTTAGTCAAGGCGCC
ATCCTCATGAAAACTGTGTAACATAATAACCGAAGTGTCGAAAAGGTGGCACCTTGTCCAATTGAACACGCTCGATGAAA
AAAATAAGATATATATAAGGTTAAGTAAAGCGTCTGTTAGAAAGGAAGTTTTTCCTTTTTCTTGCTCTCTTGTCTTTTCA
TCTACTATTTCCTTCGTGTAATACAGGGTCGTCAGATACATAGATACAATTCTATTACCCCCATCCATACAATG （配列番号:5)

【０３０４】

酵母においてアルブミン融合蛋白質を発現させるために用いられ得るさらなるプロモーターは、以下の：

ａ）ｃｂｈＩプロモーター：

【表５２】

TCTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCGCATCTAAATACTCCGAAGCTGCTGCGA
ACCCGGAGAATCGAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATTAGCATGAAAGGCTATGAGAAATTCT
GGAGACGGCTTGTTGAATCATGGCGTTCCATTCTTCGACAAGCAAAGCGTTCCGTCGCAGTAGCAGGCACTCAT
TCCCGAAAAAACTCGGAGATTCCTAAGTAGCGATGGAACCGGAATAATATAATAGGCAATACATTGAGTTGCCT
CGACGGTTGCAATGCAGGGGTACTGAGCTTGGACATAACTGTTCCGTACCCCACCTCTTCTCAACCTTTGGCGT
TTCCCTGATTCAGCGTACCCGTACAAGTCGTAATCACTATTAACCCAGACTGACCGGACGTGTTTTGCCCTTCA
TTTGGAGAAATAATGTCATTGCGATGTGTAATTTGCCTGCTTGACCGACTGGGGCTGTTCGAAGCCCGAATGTA
GGATTGTTATCCGAACTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGTCGGGCAGGACACGCCTCGAAGGTTCA
CGGCAAGGGAAACCACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGAAAATAC
AAACCAATGGCTAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTGTACAATCAA
GTGGCTAAACGTACCGTAATTTGCCAACGGCTTGTGGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAAGCCCCACTTCCCCACG
TTTGTTTCTTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGTGATCCCCCAATTGGGTCGCTTGTTTGTTCCGGTGAAGTGAA
AGAAGACAGAGGTAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAAA
TGTTGACATTCAAGGAGTATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAGGAGGTTTGTCTGCCGATACGAC
GAATACTGTATAGTCACTTCTGGTGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTG
AGTTGAAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTCGGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAT
GCAAAGTGTGGTAGGATCGAACACACTGCTGCCTTTACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAAATGTTCAG
GGGCCACTGCATGGTTTCGAATAGAAAGAGAAGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCCTCATTAAA
CGGAATGAGCTAGTAGGCAAAGTCAGCGAATGTGTATATATAAAGGTTCGAGGTCCGTGCCTCCCTCATGCTCT
CCCCATCTACTCATCAACTCAGATCCTCCAGGAGACTTGTACACCATCTTTTGAGGCACAGAAACCCAATAGTC
AACCGCGGACTGGCATC（配列番号:113）

【０３０５】

ｂ）Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓに由来するｃｙｓＤプロモーター：

【表５３】

AGATCTGGTTCCTGAGTACATCTACCGATGCGCCTCGATCCCCCTCTTAGCCGCATGAGATTCCTACCATTTATGT

CCTATCGTTCAGGGTCCTATTTGGACCGCTAGAAATAGACTCTGCTCGATTTGTTTCCATTATTCACGCAATTACG

ATAGTATTTGGCTCTTTTCGTTTGGCCCAGGTCAATTCGGGTAAGACGCGATCACGCCATTGTGGCCGCCGGCGTT

GTGCTGCTGCTATTCCCCGCATATAAACAACCCCTCCACCAGTTCGTTGGGCTTTGCGAATGCTGTACTCTATTTC

AAGTTGTCAAAAGAGAGGATTCAAAAAATTATACCCCAGATATCAAAGATATCAAAGCCATC（配列番号:114）

【０３０６】

ｃ）配列：

TCTAGAGTTGTGAAGTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATACGAGTCGCATCTAAATACTCCGAAGCTGCTGCGA

ACCCGGAGAATCGAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAAATTAGCATGAAAGGCTATGAGAAATTCT

GGAGACGGCTTGTTGAATCATGGCGTTCCATTCTTCGACAAGCAAAGCGTTCCGTCGCAGTAGCAGGCACTCAT

TCCCGAAAAAACTCGGAGATTCCTAAGTAGCGATGGAACCGGAATAATATAATAGGCAATACATTGAGTTGCCT

CGACGGTTGCAATGCAGGGGTACTGAGCTTGGACATAACTGTTCCGTACCCCACCTCTTCTCAACCTTTGGCGT

TTCCCTGATTCAGCGTACCCGTACAAGTCGTAATCACTATTAACCCAGACTGACCGGACGTGTTTTGCCCTTCA

TTTGGAGAAATAATGTCATTGCGATGTGTAATTTGCCTGCTTGACCGACTGGGGCTGTTCGAAGCCCGAATGTA

GGATTGTTATCCGAACTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAATCTGTGTCGGGCAGGACACGCCTCGAAGGTTCA

CGGCAAGGGAAACCACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAAGCCGCAATGCAGCATCACTGGAAAATAC

AAACCAATGGCTAAAAGTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAGTCATATACCAGCGGCTAATAATTGTACAATCAA

GTGGCTAAACGTACCGTAATTTGCCAACGGCTTGTGGGGTTGCAGAAGCAACGGCAAAGCCCCACTTCCCCACG

TTTGTTTCTTCACTCAGTCCAATCTCAGCTGGTGATCCCCCAATTGGGTCGCTTGTTTGTTCCGGTGAAGTGAA

AGAAGACAGAGGTAAGAATGTCTGACTCGGAGCGTTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAAA

TGTTGACATTCAAGGAGTATTTAGCCAGGGATGCTTGAGTGTATCGTGTAAGGAGGTTTGTCTGCCGATACGAC

GAATACTGTATAGTCACTTCTGGTGAAGTGGTCCATATTGAAATGTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTG

AGTTGAAACTGCCTAAGATCTCGGGCCCTCGGGCCTTCGGCCTTTGGGTGTACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAT

GCAAAGTGTGGTAGGATCGAACACACTGCTGCCTTTACCAAGCAGCTGAGGGTATGTGATAGGCAAATGTTCAG

GGGCCACTGCATGGTTTCGAATAGAAAGAGAAGCTTAGCCTGCAGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGC

TCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAAAACTGAAAAAACCCAGACACGCTCGACTTCCTGTCTTCCTATTGATTG

CAGCTTCCAATTTCGTCACACAACAAGGTCCTAGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAGATAGCCTCATTAA

ACGGAATGAGCTAGTAGGCAAAGTCAGCGAATGTGTATATATAAAGGTTCGAGGTCCGTGCCTCCCTCATGCTC

TCCCCATCTACTCATCAACTCAGATCCTCCAGGAGACTTGTACACCATCTTTTGAGGCACAGAAACCCAATAGT

CAACCGCGGACTGGCATC（配列番号:115）

を有する修飾ｃｂｈ１プロモーター

【０３０７】

ｄ）配列

【表５４】

AGATCTGGTTCCTGAGTACATCTACCGATGCGCCTCGATCCCCCTCTTAGCCGCATGAGATTCCTACCATTTAT
GTCCTATCGTTCAGGGTCCTATTTGGACCGCTAGAAATAGACTCTGCTCGATTTGTTTCCATTATTCACGCAAT
TACGATAGTATTTGGCTCTTTTCGTTTGGCCCAGGTCAATTCGGGTAAGACGCGATCACGCCATTGTGGCCGCC
GGCGCTGCAGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGCTCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAAAACTGAAAA
AACCCAGACACGCTCGACTTCCTGTCTTCCTATTGATTGCAGCTTCCAATTTCGTCACACAACAAGGTCCTACG
CCGGCGTTGTGCTGCTGCTATTCCCCGCATATAAACAACCCCTCCACCAGTTCGTTGGGCTTTGCGAATGCTGT
ACTCTATTTCAAGTTGTCAAAAGAGAGGATTCAAAAAATTATACCCCAGATATCAAAGATATCAAAGCCATC（
配列番号:116）

を有するＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｄｕｌａｎｓに由来するｃｙｓＤプロモーターを含む。

【０３０８】

相補的付着末端を介してベクターへＤＮＡを作動的に連結させるための様々な方法が開発されている。例えば、相補的なホモポリマー領域を、ＤＮＡへ挿入しようとするＤＮＡセグメントへ付加することができる。次いで、ベクターおよびＤＮＡセグメントは、相補的なホモポリマーテールの間の水素結合により連結され、組換えＤＮＡ分子を形成する。

【０３０９】

１またはそれ以上の制限部位を含む合成リンカーは、ベクターへＤＮＡセグメントを連結するための代替法を提供する。エンドヌクレアーゼ制限消化により生じるＤＮＡセグメントは、バクテリオファージＴ４ＤＮＡポリメラーゼまたは大腸菌ＤＮＡポリメラーゼ１を用いて処理し、これらの酵素が、３’５’－エキソヌクレアーゼ活性をもつ、突出したガンマ一本鎖末端を除去し、その重合活性によって、くぼんだ３’末端を充填する。

【０３１０】

それ故に、これらの活性の組み合わせは、平滑末端のＤＮＡセグメントを生じる。次いで、平滑末端セグメントを、平滑末端ＤＮＡ分子のライゲーションを触媒することのできる酵素、例えば、バクテリオファージＴ４ＤＮＡリガーゼの存在下、多大なモル過剰のリンカー分子と共にインキュベーションする。故に、その反応産物は、その末端にポリマーリンカー配列を有するＤＮＡセグメントである。次いで、これらのＤＮＡセグメントは、適切な制限酵素を用いて開裂され、およびＤＮＡセグメントのものと適合する末端を生じる酵素を用いて分解された発現ベクターへライゲートされる。

【０３１１】

様々な制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ，Ｎｅｗ　Ｈａｖｅｎ，ＣＴ，ＵＳＡを含む多数の供給元から市販されている。

【０３１２】

例えば、ＨＡ変異体を作製する必要があるならば、本発明に従ってＤＮＡを修飾するために望ましい方法は、Ｓａｉｋｉら．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２３９、４８７４９１により記載されているように、ポリメラーゼ連鎖反応を用いることである。この方法では、酵素的に増幅しようとするＤＮＡに、２つの特定のオリゴヌクレオチドプライマーを隣接させ、これを増幅ＤＮＡに組み込ませる。特定のプライマーは、当該技術分野において知られている方法を用いて発現ベクター中にクローニングするために用いられ得る制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含んでもよい。

【０３１３】

アルブミン融合蛋白質を発現するための宿主として本発明の実施において有用であると熟慮される酵母の属の例は、ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）（ハンセヌラ属（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ））、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、クルイベロミセス属（Ｋ

ｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）、トルロプシス属（Ｔｏｒｕｌｏｐｓｉｓ）、トルラスポラ属（Ｔｏｒｕｌａｓｐｏｒａ）、シゾサッカロミセス属（ＳｃｈｉｚｏＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅ）、サイテロミセス属（Ｃｉｔｅｒｏｍｙｃｅｓ）、パキソレン属（Ｐａｃｈｙｓｏｌｅｎ）、デバロミセス属（Ｄｅｂａｒｏｍｙｃｅｓ）、ミチニコウィア属（Ｍｅｔｓｃｈｕｎｉｋｏｗｉａ）、ロドスポリウジウム（Ｒｈｏｄｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ）、ロイコスポリジウム属（Ｌｅｕｃｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ）、ボトリオアスクス属（Ｂｏｔｒｙｏａｓｃｕｓ）、スポリディオボルス属（Ｓｐｏｒｉｄｉｏｂｏｌｕｓ）、エンドミコプシス属（Ｅｎｄｏｍｙｃｏｐｓｉｓ）などである。好ましい属は、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、シゾサッカロミセス属（Ｓｃｈｉｚｏ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、クルイベロミセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）およびトルラスポラ属（Ｔｏｒｕｌａｓｐｏｒａ）からなる群より選択されるものである。サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐｐ．）の例は、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓ．ｉｔａｌｉｃｕｓおよびＳ．ｒｏｕｘｉｉである。

【０３１４】

クルイベロミセス属の例は、Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ、Ｋ．ｌａｃｔｉｓおよびＫ．ｍａｒｘｉａｎｕｓである。適当ナートルラスポラの属種はＴ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉである。ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）ｓｐｐ．）の例はＰ．ａｎｇｕｓｔａ（以前はＨ．ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、Ｐ．ａｎｏｍａｌａ（以前はＨ．ａｎｏｍａｌａ）およびＰ．ｐａｓｔｏｒｉｓである。Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅの形質転換方法は、一般的に、ＥＰ ２５１ ７４４、ＥＰ ２５８ ０６７およびＷＯ ９０／０１０６３にて教示されており、該文献の全ては出典明示により本明細書の一部となる。

【０３１５】

サッカロミセス属の好ましい種の例は、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓ．ｉｔａｌｉｃｕｓ、Ｓ．ｄｉａｓｔａｔｉｃｕｓおよびＺｙｇｏ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｒｏｕｘｉｉを含む。クルイベロミセス属の好ましい種の例は、Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓおよびＫ．ｌａｃｔｉｓを含む。ハンセヌラ属の好ましい種の例は、Ｈ．ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ（現在はＰｉｃｈｉａ ａｎｇｕｓｔａ）、Ｈ．ａｎｏｍａｌａ（現在はＰｉｃｈｉａ ａｎｏｍａｌａ）およびＰｉｃｈｉａｃａｐｓｕｌａｔａを含む。ピキア属のさらに好ましい種の例は、Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓを含む。アスペルギルス属の好ましい種の例は、Ａ．ｎｉｇｅｒおよびＡ．ｎｉｄｕｌａｎｓを含む。ヤロウィア属の好ましい種の例は、Ｙ．ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａを含む。多くの好ましい酵母種はＡＴＣＣから入手可能である。例えば、以下の好ましい酵母種がＡＴＣＣから入手可能であり、およびアルブミン融合蛋白質の発現において有用である：サッカロミセスセレビシエハンセン（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ Ｈａｎｓｅｎ）、テレオモルフ（ｔｅｌｅｏｍｏｒｐｈ）株ＢＹ４７４３ ｙａｐ３突然変異体（ＡＴＣＣ寄託番号４０２２７３１）；サッカロミセスセレビシエハンセン，テレオモルフ株ＢＹ４７４３ｈｓｐｌ５０突然変異体（ＡＴＣＣ寄託番号４０２１２６６）；サッカロミセスセレビシエハンセン，テレオモルフ株ＢＹ４７４３ ｐｍｔｌ突然変異体（ＡＴＣＣ寄託番号４０２３７９２）；サッカロミセスセレビシエハンセン，テレオモルフ（ＡＴＣＣ寄託番号２０６２６；４４７７３；４４７７４；および６２９９５）；Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｄｉａｓｔａｔｉｃｕｓ Ａｎｄｒｅｗｓ ｅｔ Ｇｉｌｌｉｌａｎｄ ｅｘ ｖａｎ ｄｅｒ Ｗａｌｔ，テレオモルフ（ＡＴＣＣ寄託番号６２９８７）；Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ（Ｄｏｍｂｒｏｗｓｋｉ）ｖａｎ ｄｅｒ Ｗａｌｔ，テレオモルフ（ＡＴＣＣ寄託番号７６４９２）；Ｐｉｃｈｉａ ａｎｇｕｓｔａ（Ｔｅｕｎｉｓｓｏｎら）Ｋｕｒｔｚｍａｎ、Ｈａｎｓｅｎｕｌａ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ ｄｅ Ｍｏｒａｉｓ ｅｔ Ｍａｉａとして寄託されたテレオモルフ，テレオモルフ（ＡＴＣＣ寄託番号２６０１２）；Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ ｖａｎ Ｔｉｅｇｈｅｍ，アナモルフ（ＡＴＣＣ寄託番号９０２９）；Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ ｖａｎ Ｔｉｅｇｈｅｍ，アナモルフ（ＡＴＣＣ寄託番号１６４０４）；Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ（Ｅ

ｉｄａｍ）Ｗｉｎｔｅｒ，ａｎａｍｏｒｐｈ（ＡＴＣＣ寄託番号４８７５６）；およびＹａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ（Ｗｉｃｋｅｒｈａｍら．）ｖａｎ ｄｅｒ Ｗａｉｔ ｅｔ ｖｏｎ Ａｒｘ，テレオモルフ（ＡＴＣＣ寄託番号２０１８４７）。

【０３１６】

Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのための適当なプロモーターは、ＰＧＫＩ遺伝子、ＧＡＬ１またはＧＡＬ１０遺伝子、ＣＹＣＩ、ＰＨＯ５、ＴＲＰＩ、ＡＤＨＩＩ、ＡＤＨ２、ｔｈｅ遺伝子ｆｏｒグリセルアルデヒド３リン酸脱水素酵素、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、グルコキナーゼ、アルファ－接合因子フェロモン、［接合因子フェロモン］のための遺伝子に関連するもの、ＰＲＢＩプロモーター、ＧＵＴ２プロモーター、ＧＰＤＩプロモーター、５’調節領域の部分とその他のプロモーターの５’調節領域の部分とのハイブリッドを含む、または上流活性化部位（例えば、ＥＰ－Ａ－２５８０６７のプロモーター）を有するハイブリッドプロモーターを含む。

【０３１７】

シゾサッカロミセスポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）において用いるための有用な制御プロモーターは、Ｍａｕｎｄｒｅｌｌ（１９９０）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５、１０８５７－１０８６４により記載のようなｎｍｔ遺伝子に由来するチアミン抑制プロモーターおよびＨｏｆｆｍａｎ＆Ｗｉｎｓｔｏｎ（１９９０）Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １２４、８０７－８１６に記載のようなグルコース抑制ｊｂｐｌ遺伝子プロモーターである。

【０３１８】

外来遺伝子の発現のためのピキア属の形質転換方法は、例えば、Ｃｒｅｇｇら．（１９９３）、および様々なＰｈｉｒｉｐｓの特許（例えば、米国特許第４８５７４６７号、出典明示により本明細書の一部となる）において教示されており、そしてピキア属発現キットは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＢＶ、Ｌｅｅｋ，ＮｅｔｈｅｒｌａｎｄｓおよびＩｎｖｉｔｏｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｓａｎｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａから市販されている。適当なプロモーターはＡＯＸＩおよびＡＯＸ２を含む。Ｇｌｅｅｓｏｎら．（１９８６）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１３２，３４５９－３４６５は、ハンセヌラ属ベクターおよび形質転換についての情報が記載され、好適なプロモーターはＭＯＸＩおよびＦＭＤ１であり；一方で、ＥＰ ３６１ ９９１，Ｆｌｅｅｒら．（１９９１）およびＲｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｒｏｒｅｒからの他の刊行物では、クルイベロミセス属における外来蛋白質を発現させるための方法、適当なプロモーターがＰＧＫＩであることが教示されている。

【０３１９】

好ましくは、転写終結シグナルは、転写終結およびポリアデニル化のための適切なシグナルを含む真核遺伝子の３’フランキング配列である。適当な３’フランキング配列は、例えば、用いる発現制御配列に自然に連結されたものであってよく、すなわち、プロモーターに相当してもよい。或いは、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ ＡＤＨＩ遺伝子の終結シグナルが好ましい場合、それらは異なっていてもよい。

【０３２０】

所望のアルブミン融合蛋白質は、初めに、分泌リーダー配列で発現されてもよく、該配列は、選択された酵母において有用な任意のリーダーでよい。酵母において有用なリーダーは、以下：

ａ）ＭＰＩＦ－１シグナル配列（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＡＡＢ５１１３４のアミノ酸１－２１）MKVSVAALSCLMLVTALGSQA（配列番号：６）

ｂ）スタニオカルシンシグナル配列（MLQNSAVLLLLVISASA、配列番号：７）

ｃ）ＨＳＡシグナル配列のプレプロ領域（例えば、MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR、配列番号：８）

ｄ）ＨＳＡシグナル配列のプレ領域（例えば、MKWVTFISLLFLFSSAYS、配列番号：９）または例えば、MKWVSFISLLFLFSSAYS、（配列番号：１０）のごときその変異体

ｅ）インベルターゼシグナル配列（例えば、MLLQAFLFLLAGFAAKISA、配列番号：１１）
ｆ）酵母接合因子アルファシグナル配列（例えば、MRFPSIFTAVLAFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKR、配列番号：１２または
MRFPSIFTAVLAFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAKEEGVSLDKR、配列番号：１２）
ｇ）Ｋ．ｌａｃｔｉｓキラー毒素リーダー配列
ｈ）ハイブリッドシグナル配列（例えば、MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR、配列番号：１３）
ｉ）ＨＳＡ／ＭＦα－１ハイブリッドシグナル配列（ＨＳＡ／ｋｅｘ２としても知られている）（例えば、MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLDKR、配列番号：１４）
ｊ）Ｋ．ｌａｃｔｉｓキラー／ＭＦａ－１融合リーダー配列（例えば、MNIFYIFLFLLSFVQGSLDKR、配列番号：１５）
ｋ）免疫グロブリンＩｇシグナル配列（例えば、MGWSCI1LFLVATATGVHS、配列番号：１６）
１）フィブリンＢ前駆体シグナル配列（例えば、MERAAPSRRVPLPLLLLGGLALLAAGVDA、配列番号：１７）
ｍ）クラスター前駆体シグナル配列（例えば、MMKTLLLFVGLLLTWESGQVLG、配列番号：１８）
ｎ）インスリン様成長因子－結合蛋白質４シグナル配列（例えば、MLPLCLVAALLLAAGPGPSLG、配列番号：１９）
ｏ）ＨＳＡシグナル配列のプレプロ－領域の変異体、例えば、
MKWVSFISLLFLFSSAYSRGVFRR（配列番号：２０）、
MKWVTFISLLFLFAGVLG（配列番号：２１）、
MKWVTFISLLFLFSGVLG（配列番号：２２）、
MKWVTFISLLFLFGGVLG（配列番号：２３）、
修飾されたＨＳＡリーダーＨＳＡ＃；６４－MKWVTFISLLFLFAGVSG（配列番号：２４）；
修飾されたＨＳＡリーダーＨＳＡ＃；６６－MKWVTFISLLFLFGGVSG（配列番号：２５）；
修飾されたＨＳＡ（Ａ１４）リーダー－MKWVTFISLLFLFAGVSG（配列番号２６）；
修飾されたＨＳＡ（Ｓ１４）リーダー（修飾ＨＳＡ＃；６５としても知られている）－MKWVTFISLLFLFSGVSG（配列番号：２７）、
修飾されたＨＳＡ（Ｇ１４）リーダー－MKWVTFISLLFLFGGVSG（配列番号：２８）、またはMKWVTFISLLFLFGGVLGDLHKS（配列番号：２９）
ｐ）コンセンサスシグナル配列（MPTWAWWLFLVLLLALWAPARG、配列番号：３０）
ｑ）酸ホスファターゼ（ＰＨ０５）リーダー（例えば、MFKSVVYSILAASLANA配列番号：３１）
ｒ）ＭＦｏｚ－１のプレ配列
ｓ）Ｏグルカナーゼ（ＢＧＬ２）のプレ配列
ｔ）キラー毒素リーダー
ｕ）キラー毒素のプレ配列
ｖ）ｋ．ｌａｃｔｉｓキラー毒素プレプロ（２９個のアミノ酸；プレの１６個のアミノ酸およびプロの１３個のアミノ酸）
MN1FYIFLFLLSFVQGLEHTHRRGSLDKR（配列番号：３２）
ｗ）Ｓ．ｄｉａｓｔａｔｉｃｕｓグルコアミラーゼＩＩ分泌リーダー配列
ｘ）Ｓ．ｃａｒｌｓｂｅｒｇｅｎｓｉｓα－ガラクトシダーゼ（ＭＥＬ１）分泌リーダー配列
ｙ）カンジダグルコアルニラーゼリーダー配列
ｚ）ＥＰ－Ａ－３８７３１９（出典明示により本明細書の一部となる）において開示されるイブリッドリーダー
ａａ）（バキュロウイルス発現系と併せた）ｇｐ６７シグナル配列（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＡＡＡ７２７５９のアミノ酸１－１９）または

ｂｂ）治療用蛋白質Ｘの天然のリーダー；
ｃｃ）ＪＰ　６２－０９６０８６（９１１０３６５１６として特許されている、出典明示により本明細書の一部となる）において開示されるＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅインベルターゼ（ＳＵＣ２）リーダー；または
ｄｄ）イヌリナーゼ－MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKR（配列番号：３３）．
ｅｅ）修飾ＴＡ５７プロペプチドリーダー変異体＃；１－MKLKTVRSAVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAKR（配列番号：３４）
ｆｆ）修飾ＴＡ５７プロペプチドリーダー変異体＃；２－MKLKTVRSAVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDWGUSMAEEGEPKR（配列番号：３５）
ｇｇ）コンセンサスシグナルペプチド－MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWA（配列番号：１１１）
ｈｈ）修飾ＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナル配列－MKWVSFISLLFLFSSAYSGSLDKR（配列番号：１１２）
ｉｉ）コンセンサスシグナルペプチド＃；２－MRPTWAWWLFLVLLLALWAPARG（配列番号：１０５）：
の任意を含む。

【０３２１】

アルブミン融合蛋白質の組換えおよび合成による産生のさらなる方法

本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、宿主細胞ならびに合成および組換え技法によるアルブミン融合蛋白質の産生にも関する。ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウイルスまたはレトロウイルスベクターであってもよい。レトロウイルスベクターは、複製能を有していてもまたは複製欠損であってもよい。後者の場合、ウイルス増殖は、一般的に、宿主細胞を補う場合にしか起こらない。

【０３２２】

本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、宿主における増殖の選択マーカーを含むベクターに連結されてもよい。一般的に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿のごとき沈殿物または荷電脂質との複合体中に導入される。ベクターがウイルスであるならば、それは、適切なパッケージ細胞株を用いてパッケージされ、次いで、宿主細胞中に形質導入されてもよい。

【０３２３】

ポリヌクレオチドインサートは、幾つか例を挙げると、ファージラムダＰＬプロモーター、大腸菌ｌａｃ、ｔｒｐ、ｐｈｏｔおよびｔａｃプロモーター、ＳＶ４０初期および後期プロモーターおよびレトロウイルスＬＴＲｓのプロモーターのごとき適切なプロモーターに作動可能に連結される必要がある。他の適当なプロモーターは当業者に知られているだろう。発現コンストラクトはさらに、転写開始、終結のための部位を含み、そして転写された領域には、翻訳のためのリボソーム結合部位が含まれ得る。コンストラクトにより発現される転写物のコーディング部分は、好ましくは、翻訳されるべきポリペプチドの末端に適切に位置された開始および終止コドン（ＵＡＡ、ＵＧＡまたはＵＡＧ）にある翻訳開始コドンを含み得る。

【０３２４】

記載したように、好ましくは、発現ベクターは少なくとも１つの選択マーカーを含み得る。かかるマーカーは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、Ｇ４１８、グルタミンシンターゼまたは真核細胞培養についてのネオマイシン耐性、および大腸菌および他の細菌の培養についてのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む。適切な宿主の典型例は、細菌細胞、例えば大腸菌、ストレプトミセスおよびネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）細胞；真菌細胞、例えば、酵母細胞（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅまたはＰｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ　（ＡＴＣＣ寄託番号２０１１７８））；昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエＳ２およびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ　Ｓｆ９細胞；動物細胞、例えば、ＣＨＯ、ＣＯＳ、ＮＳＯ、２９３およびＢｏｗｅｓメラノーマ細胞；および植物細胞を含むが、これらに限定

されない。上記した宿主細胞についての適切な培養培地および条件は、当該技術分野において知られている。

【０３２５】

細菌における使用のために好ましいベクターは、ＱＩＡＧＥＮ、Ｉｎｃ．から入手可能なｐＱＥ７０、ｐＱＥ６０およびｐＱＥ－９；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｉｎｃ．から入手可能なｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔベクター、Ｐｈａｇｅｓｃｒｉｐｔベクター、ｐＮＨ８Ａ、ｐＮＨ１６ａ、ｐＮＨ１８Ａ、ｐＮＨ４６Ａ；およびＰｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ, Ｉｎｃ．から入手可能な ｐｔｒｃ９９ａ、ｐＫＫ２２３－３、ｐＫＫ２３３－３、ｐＤＲ５４０、ｐＲＩＴ５ を含む。好ましい 真核 ベクターには、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ から入手可能なｐＷＬＮＥＯ、ｐＳＶ２ＣＡＴ、ｐＯＧ４４、ｐＸＴＩ および ｐＳＧ； および Ｐｈａｒｍａｃｉａ から入手可能なｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧおよびｐＳＶＬが含まれる。酵母系における使用のために好ましい発現ベクターは、ｐＹＥＳ２、ｐＹＤＩ、ｐＴＥＦＩ／Ｚｅｏ、ｐＹＥＳ２／ＧＳ、ｐＰＩＣＺ、ｐＧＡＰＺ、ｐＧＡＰＺａｌｐｈ、ｐＰＩＣ９、ｐＰＩＣ３．５、ｐＨＩＬ－Ｄ２、ｐＨＩＬ－ＳＩ、ｐＰＩＣ３．５Ｋ、ｐＰＩＣ９ＫおよびＰＡ０８１５（全てＩｎｖｉｔｏｇｅｎ、Ｃａｒから入手可能である）ｂａｄ、ＣＡ）を含むが、これらに限定されない。他の適当なベクターは当業者にとって容易に明かであろう。。

【０３２６】

一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドをシグナル配列へ融合してもよく、該シグナル配列が、原核または真核細胞の特定のコンパートメントへの本発明の蛋白質の局在化を指令する、および／または原核または真核細胞からの本発明の蛋白質の分泌を指令する。例えば、大腸菌では、周辺腔に対する蛋白質の発現を指令させようとしてもよい。細菌の周辺腔に対するポリペプチドの発現を指令するために、本発明のアルブミン融合蛋白質と融合されてもよいシグナル配列または蛋白質（またはその断片）の例は、ｐｅｌＢシグナル配列、マルトース結合蛋白質（ＭＢＰ）シグナル配列、ＭＢＰ、ｏｍｐＡシグナル配列、ペリプラズム大腸菌非耐熱性エンテロトキシンＢ－サブユニットのシグナル配列およびアルカリホスファターゼのシグナル配列を含むが、これらに限定されない。蛋白質の局在化を指令する融合蛋白質を構築するための幾つかのベクターは市販されており、例えば、ベクターのｐＭＡＬシリーズ（特にｐＭＡＬ－ｐシリーズ）はＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓから入手可能である。特定の一の実施態様において、本発明のポリヌクレオチドアルブミン融合蛋白質は、ｐｅｌＢペクチン酸リアーゼシグナル配列に融合されて、グラム陰性細菌におけるかかるポリペプチドの発現および精製効率を増大してもよい。米国特許第５，５７６，１９５号および第５，８４６，８１８号を参照のこと。該内容は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０３２７】

哺乳類細胞におけるその分泌を導くために本発明のアルブミン融合蛋白質に融合されてもよいシグナルペプチドの例は：

ａ）ＭＰＩＰ－１シグナル配列（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＡＡＢ５１１３４のアミノ酸１－２１）MKVSVAALSCLMLVTALGSQA（配列番号：６）

ｂ）スタニオカルシンシグナル配列（MLQNSAVLLLLVISASA、配列番号：７）

ｃ）ＨＳＡシグナル配列のプレプロ領域（例えば、MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR、配列番号：８）

ｄ）ＨＳＡシグナル配列のプレ領域（例えば、MKWVTFISLLFLFSSAYS、配列番号：９）または例えば、MKWVSFISLLFLFSSAYS、（配列番号：１０）のごときその変異体、

ｅ）インベルターゼシグナル配列（例えば、MLLQAFLFLLAGFAAKISA、配列番号：１１）

ｆ）酵母接合因子アルファシグナル配列（例えば、MRFPSIFTAVLAFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKR、配列番号：１２または

MRFPSIFTAVLAFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAKE EGVSLDKR、配列番号：１２）
ｇ）Ｋ．ｌａｃｔｉｓキラー毒素リーダー配列
ｈ）ハイブリッドシグナル配列（例えば、MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLEKR、配列番号：１３）
ｉ）ＨＳＡ／ＭＦα－１ハイブリッドシグナル配列（ＨＳＡ／ｋｅｘ２としても知られている）（例えば、MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLDKR、配列番号：１４）
ｊ）Ｋ．ｌａｃｔｉｓキラー／ＭＦａ－Ｉ融合リーダー配列（例えば、MNIFYIFLFLLSFV QGSLDKR、配列番号：１５）
ｋ）免疫グロブリンＩｇシグナル配列（例えば、MGWSCIILFLVATATGVHS、配列番号：１６）
１）フィブリンＢ前駆体シグナル配列（例えば、MERAAPSRRVPLPLLLLGGLALLAAGVDA、配列番号：１７）
ｍ）クラスター前駆体シグナル配列（例えば、MMKTLLLFVGLLLTWESGQVLG、配列番号：１８）
ｎ）インスリン様成長因子－結合蛋白質４シグナル配列（例えば、MLPLCLVAALLLAAGPGP SLG、配列番号：１９）
ｏ）ＨＳＡシグナル配列のプレプロ－領域の変異体、例えば、
MKWVSFISLLFLFSSAYSRGVFRR（配列番号：２０）、
MKWVTFISLLFLFAGVLG（配列番号：２１）、
MKWVTFISLLFLFSGVLG（配列番号：２２）、
MKWVTFISLLFLFGGVLG（配列番号：２３）、
修飾されたＨＳＡリーダーＨＳＡ＃；６４－MKWVTFISLLFLFAGVSG（配列番号：２４）；
修飾されたＨＳＡリーダーＨＳＡ＃；６６－MKWVTFISLLFLFGGVSG（配列番号：２５）；
修飾されたＨＳＡ（Ａ１４）リーダー－MKWVTFISLLFLFAGVSG（配列番号：２６）；
修飾されたＨＳＡ（Ｓ１４）リーダー（修飾されたＨＳＡ＃；６５としても知られている）－MKWVTFISLLFLFSGVSG（配列番号：２７）、
修飾されたＨＳＡ（Ｇ１４）リーダー－MKWVTFISLLFLFGGVSG（配列番号：２８）、またはMKWVTFISLLFLFGGVLGDLHKS（配列番号：２９）
ｐ）コンセンサスシグナル配列（MPTWAWWLFLVLLLALWAPARG、配列番号：３０）
ｑ）酸ホスファターゼ（ＰＨ０５）リーダー（例えば；MFKSVVYSILAASLANA配列番号：３１）
ｒ）ＭＦｏｚ－１のプレ配列
ｓ）Ｏグルカナーゼ（ＢＧＬ２）のプレ配列
ｔ）キラー毒素リーダー
ｕ）キラー毒素のプレ配列
ｖ）ｋ．ｌａｃｔｉｓキラー毒素プレプロ（２９個のアミノ酸；プレの１６個のアミノ酸およびプロの１３個のアミノ酸）
MNIFYIFLFLLSFVQGLEHTHRRGSLDKR（配列番号：３２）
ｗ）Ｓ．ｄｉａｓｔａｔｉｃｕｓグルコアルニラーゼＩｌ分泌リーダー配列
ｘ）Ｓ．ｃａｒｌｓｂｅｒｇｅｎｓｉｓ　α－ガラクトシダーゼ（ＭＥＬ１）分泌リーダー配列
ｙ）カンジダグルコアルニラーゼリーダー配列
ｚ）ＥＰ－Ａ－３８７３１９（出典明示により本明細書の値伊部となる）にて開示されるハイブリッドリーダー
ａａ）（バキュロウイルス発現系と併せた）ｇｐ６７シグナル配列（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＡＡＡ７２７５９のアミノ酸１－１９）または
ｂｂ）治療用蛋白質Ｘの天然のリーダー；
ｃｃ）ＪＰ　６２　０９６０８６（９１１０３６５１６として特許される、出典明示により本明細書の一部となる）に開示されるようなＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅインベルター

ゼ（ＳＵＣ２）リーダー；または
ｄｄ）イヌリラーゼ－MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKR（配列番号：３３）；
ｅｅ）修飾されたＴＡ５７プロペプチドリーダー変異体＃１－MKLKTVRSAVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAKR（配列番号：３４）
ｆｆ）修飾されたＴＡ５７プロペプチドリーダー変異体＃２－MKLKTVRSAVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAEEGEPKR（配列番号：３５）
ｇｇ）コンセンサスシグナルペプチド－MWWRLWWLLLLLLLLwpMvwA（配列番号：１１１）
ｊｊ）修飾されたＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナル配列－MKWVSFISLLFLFSSAYSGSLDKR（配列番号：１１２）
ｋｋ）コンセンサスシグナルペプチド＃；２－MRPTWAWWLFLVLLLALWAPARG（配列番号：１０５）：を含むが、これらに限定されない。

【０３２８】

好ましい一の実施態様において、修飾されたＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナル配列（配列番号：１１２）は、本明細書中記載されているアルブミンおよび治療用蛋白質を含む融合蛋白質を含むアルブミン融合蛋白質ならびにＷ０９３／１５１９９；Ｗ０９７／２４４４５；Ｗ００３／６００７１；Ｗ００３／５９９３４；およびＰＣＴ／ＵＳ０４／０１３６９において開示されるアルブミン融合蛋白質のアミノ末端に融合される。該文献のそれぞれは出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。修飾されたＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナル配列は、例えば、Ｓｌｅｅｐら．、ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１９９０，ｖｏｌ．８，ｐｐ．４２－４６；および米国特許第５，３０２，６９７号において開示されるＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナル配列（配列番号：１４）に基づき、両文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。本明細書中開示される修飾されたＨＳＡ／ｋｅｘ２リーダー配列は、親シグナルペプチドの残基１９において非保存的アミノ酸置換（ＡｒｇからＧｌｙ）を含む。修飾されたＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナルペプチドは、酵母において発現される場合、意外にも、修飾されていないＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナル配列よりも良好なアルブミン融合蛋白質の発現量および／またはよりよい開裂効率を生じることが見出されている。ＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナルペプチドの変異体も本発明に包含される。特に配列番号：１１２の位置１９にあるＧｌｙ残基は、Ｐｒｏ残基で置換されてもよい。修飾されたＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナル配列の他の保存的置換された変異体も熟慮される。配列番号：１１２の修飾されたＨＳＡ／ｋｅｘ２シグナル配列をコードする核酸ならびにその保存的置換された変異体も本発明に包含される。

【０３２９】

選択マーカーとしてグルタミンシンターゼ（ＧＳ）またはＤＨＦＲを利用するベクターは、薬剤メチオニンスルホキシミンまたはメトトレキセートそれぞれの存在下において増幅され得る。グルタミンシンターゼの基づくベクターの利点は、グルタミンシンターゼネガティブである細胞株（例えば、ネズミミエローマ細胞株，ＮＳＯ）の利用可能性にある。グルタミンシンターゼ発現系も、内因性遺伝子の機能を阻止するためにさらなる阻害剤を与えることにより、グルタミンシンターゼを発現する細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞）において機能し得る。グルタミンシンターゼ発現系およびその成分は、ＰＣＴ公開：Ｗ０８７／０４４６２；Ｗ０８６／０５８０７；Ｗ０８９／０１０３６；Ｗ０８９／１０４０４；およびＷ０９１／０６６５７に詳述されており、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。さらに、グルタミンシンターゼ発現ベクターは、Ｌｏｎｚａ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ）から入手できる。ＧＳ発現系を用いるネズミミエローマ細胞におけるモノクローナル抗体の発現および産生は、Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら．，Ｂｉｏ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：１６９（１９９２）およびＢｉｂｌｉａ　ａｎｄ　Ｒｏｂｉｎｓｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．１１：１（１９９５）に記載されており、該文献は出典明示により本明細書の一部となる。

【０３３０】

本発明は、本明細書中上記したベクターコンストラクトを含む宿主細胞にも関連し、お

よびさらに当該技術分野において知られている技法を用いて１またはそれ以上の異種制御領域（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）に作動的に連結される本発明のヌクレオチド配列を含む宿主細胞を包含する。宿主細胞は、高等真核細胞、例えば、哺乳類細胞（例えば、ヒトに由来する細胞）、または下等真核細胞、例えば、酵母細胞であり得、または宿主細胞は、細菌細胞のごとき原核細胞であり得る。挿入された遺伝子配列の発現を調節する、または所望される特定の様式で遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主株が選択されてもよい。特定のプロモーターに由来する発現が特定の誘導物質の存在下で高められ得る；故に遺伝子操作されたポリペプチドの発現は制御されてもよい。さらに、異なる宿主細胞は、蛋白質の翻訳および翻訳後プロセッシングおよび修飾（例えば、リン酸化、開裂）について、特徴的および特異的な機序を有する。発現される外来蛋白質の所望の修飾およびプロセッシングを確実にするために、適切な細胞株が選択され得る。

【０３３１】

宿主細胞への本発明の核酸および核酸コンストラクトの導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン介在トランスフェクション、カチオン性脂質介在トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染または他の方法によりもたらされ得る。かかる方法は、多くの標準的な実験マニュアル、例えば、Ｄａｖｉｓら．，Ｂａｓｉｃ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９８６）において記載されている。特に、組換えベクターを欠失している宿主細胞により本発明のポリペプチドを実際に発現させることが特に熟慮される。本明細書中に記載のベクターコンストラクトを含む宿主細胞を包含することに加えて、本発明は、脊椎動物に由来する、特に哺乳類に由来する一次、二次および不死化させた宿主細胞も包含し、該細胞は、内因性遺伝物質（例えば、治療用蛋白質に対応するコーディング配列は、治療用蛋白質に対応するアルブミン融合蛋白質を用いて置換されてもよい）を欠失または置換するように、および／または遺伝物質（例えば、例えば、治療用蛋白質に対応する本発明のアルブミン融合蛋白質のごとき異種ポリヌクレオチド配列が含まれてもよい）を含むように設計される。内因性ポリヌクレオチドに作動的に結合された遺伝物質は、内因性ポリヌクレオチドを活性化、改変および／または増幅してもよい。

【０３３２】

加えて、当該技術分野において知られている技法を用いて、相同組換えにより、異種ポリヌクレオチド（例えば、アルブミン蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたはその断片もしくは変異体）および／または異種制御領域（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）を、治療用蛋白質をコードする内因性ポリヌクレオチド配列を作動的に結合してもよい（例えば、米国特許第５，６４１，６７０号（１９９７年６月２４日公開）；国際公開番号ＷＯ　９６／２９４１１；国際公開番号ＷＯ　９４／１２６５０；Ｋｏｌｌｅｒら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ　８６：８９３２－８９３５（１９８９）；およびＺｉｊｌｓｔｒａら．，Ｎａｔｕｒｅ３４２：４３５４３８（１９８９）を参照のこと。各文献の開示内容は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）。

【０３３３】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、疎水性荷電相互作用クロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含むよく知られている方法により、組換え細胞培養物から回収または精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（「ＨＰＬＣ」）が精製のために用いられる。

【０３３４】

好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、Ｑ－セファロース、ＤＥＡＥセファロース、ｐｏｒｏｓＨＱ、ｐｏｒｏｓＤＥＡＥ、ＴｏｙｏｐｅａｒｌＱ、Ｔ

ｏｙｏｐｅａｒｌＱＡＥ、ＴｏｙｏｐｅａｒｌＤＥＡＥ、Ｒｅｓｏｕｒｃｅ／ＳｏｕｒｃｅＱおよびＤＥＡＥ、ＦｒａｃｔｏｇｅｌＱおよびＤＥＡＥカラム上でのクロマトグラフィーを含むがこれらに限定されないアニオン交換クロマトグラフィーを用いて精製される。

【０３３５】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、ＳＰ－セファロース、ＣＭセファロース、ｐｏｒｏｓＨＳ、ｐｏｒｏｓＣＭ、ＴｏｙｏｐｅａｒｌＳＰ、ＴｏｙｏｐｅａｒｌＣＭ、Ｒｅｓｏｕｒｃｅ／ＳｏｕｒｃｅＳおよびＣＭ、ＦｒａｃｔｏｇｅｌＳおよびＣＭカラムおよびそれらの等価物および同等物を含むが、これらに限定されないカチオン交換クロマトグラフィーを用いて精製される。

【０３３６】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、フェニル、ブチル、メチル、オクチル、ヘキシル－セファロース、ｐｏｒｏｓフェニル、ブチル、メチル、オクチル、ヘキシル、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌフェニル、ブチル、メチル、オクチル、ヘキシルＲｅｓｏｕｒｃｅ／Ｓｏｕｒｃｅフェニル、ブチル、メチル、オクチル、ヘキシル、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌフェニル、ブチル、メチル、オクチル、ヘキシルカラムおよびそれらの等価物および同等物を含むが、これらに限定されない疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いて精製される。

【０３３７】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、セファロース１００、Ｓ２００、Ｓ３００、ｓｕｐｅｒｄｅｘ樹脂カラムおよびそれらの等価物および同等物を含むがこれらに限定されないサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製される。

【０３３８】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、ＨＳＡまたは「融合標的」分子のいずれかを選択する模倣色素（Ｍｉｍｅｔｉｃ　Ｄｙｅ）アフィニティー、ペプチドアフィニティーおよび抗体アフィニティーカラムを含むが、これらに限定されないアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製される。

【０３３９】

好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、上記の１またはそれ以上のクロマトグラフィー法を用いて精製される。他の好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、以下のクロマトグラフィーカラム、ＱセファロースＦＦカラム、ＳＰセファロースＦＦカラム、Ｑセファロース高速カラム、ＢｌｕｅセファロースＦＦカラム、Ｂｌｕｅカラム、フェニルセファロースＦＦカラム、ＤＥＡＥセファロースＦＦ、またはメチルカラムの１またはそれ以上を用いて精製される。

【０３４０】

さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質は、ＰＣＴ国際公開ＷＯ００／４４７７２において記載の方法を用いて精製されてもよい。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。本発明のアルブミン融合蛋白質の精製に用いるために、当業者はそこに記載されている方法を容易に修正できよう。

【０３４１】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、化学合成工程による産物；および例えば、細菌、酵母、高等植物、昆虫および哺乳類細胞を含む原核または真核宿主から組換え技法により生成される産物から回収されてもよい。組換え工程に用いた宿主に応じて、本発明のポリペプチドをグリコシル化または非グリコシル化してもよい。加えて、本発明のアルブミン融合蛋白質は、宿主媒介過程の結果として、開始改変メチオニン残基を含んでもよい。故に、当該技術分野においてよく知られている翻訳開始コドンによりコードされるＮ－末端のメチオニンは、一般的に、全ての真核細胞において翻訳後の任意の蛋白質から高い効率で除去される。大部分の蛋白質上にあるＮ－末端のメチオニンは、大部分の原核生物においても効率よく除去されるが、幾つかの蛋白質については、Ｎ－末端のメチオニンが共有結合されたアミノ酸の性質に依存して、この原核生物の除去過程は効率が悪い。

【０３４２】
一の実施態様において、酵母ピチア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）を用いて、真核系における本発明のアルブミン融合蛋白質を発現させる。ピチア・パストリスは、その唯一の炭素供給原としてメタノールを代謝できるメチロトローフ酵母である。メタノール代謝経路における主要な段階は、O_2を用いてメタノールをホルムアルデヒドへ酸化することである。この反応は、酵素アルコールオキシダーゼにより触媒される。その唯一の炭素供給原としてメタノールを代謝するために、ピチア・パストリスは、一部にはアルコールオキシダーゼのO_2に対する比較的低い親和性に起因して、高レベルのアルコールオキシダーゼを生じる。結果として、主要な炭素源としてメタノールに依存する成長培地中で、２つのアルコールオキシダーゼ遺伝子（ＡＯＸＩ）の１つのプロモーター領域は非常に活性がある。メタノールの存在下、ＡＯＸＩ遺伝子から生じるアルコールオキシダーゼは、ピチア・パストリスの全可溶性蛋白質の最高約３０％にまで及ぶ。Ｅｌｌｉｓ，Ｓ．Ｂ．，ら．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：１１１１－２１（１９８５）；Ｋｏｕｔｚ，Ｐ．Ｊ，ら．，Ｙｅａｓｔ５：１６７－７７（１９８９）；Ｔｓｃｈｏｐｐ，Ｊ．Ｆ．，ら．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１５：３８５９－７６（１９８７）を参照のこと。故に、例えば本発明のポリヌクレオチドのごとき異種コード配列は、ＡＯＸＩ制御配列の全てまたは一部の転写調節を受けて、メタノールの存在下で成長するピチア酵母において極めて高いレベルで発現する。

【０３４３】
一例として、プラスミドベクターｐＰＩＣ９Ｋを用いて、”Ｐｉｃｈｉａ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、”Ｄ．Ｒ．ＨｉｇｇｉｎｓおよびＪ．Ｃｒｅｇｇ，ｅｄｓ．Ｔｈｅ Ｈｕｍａｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ，１９９８．に基本的に記載されているようなピチア酵母系において、本明細書中に記載されているような本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡを発現させる。この発現ベクターは、マルチクローニング部位の上流に位置するピチア・パストリスアルカリホスファターゼ（ＰＨＯ）分泌シグナルペプチド（すなわち、リーダー）に結合された強力なＡＯＸＩプロモーターにより、本発明のポリペプチドの発現および分泌を可能にする。

【０３４４】
当業者には容易に理解されるように、考案した発現コンストラクトが、必要に応じてフレーム内のＡＵＧを含む、適切に位置した転写、翻訳、分泌（所望ならば）用のシグナルを提供する限りは、ｐＰＩＣ９Ｋの代わりに多くの他の酵母ベクター、例えば、ｐＹＥＳ２、ｐＹＤＩ、ｐＴＥＦＩ／Ｚｅｏ、ｐＹＥＳ２／ＧＳ、ｐＰＩＣＺ、ｐＧＡＰＺ、ｐＧＡＰＺアルファ、ｐＰＩＣ９、ｐＰＩＣ３．５、ｐＨＩＬ－Ｄ２、ｐＨＩＬ－ＳＩ、ｐＰＩＣ３．５ＫおよびＰＡ０８１５を用いることができる。

【０３４５】
別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドのごとき異種コード配列の高レベルな発現は、本発明の異種ポリヌクレオチドを例えばｐＧＡＰＺまたはｐＧＡＰＺアルファのごとき発現ベクター中へクローニングし、次いで、メタノール不在下で酵母培養液を成長させることにより成し遂げることができる。

【０３４６】
加えて、本発明のアルブミン融合蛋白質は、当該技術分野において知られている技法（例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、１９８３，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ＆Ｃｏ．，Ｎ．Ｙ．，およびＨｕｎｋａｐｉｌｌｅｒら．，Ｎａｔｕｒｅ，３１０：１０５－１１１（１９８４）を参照のこと）を用いて化学的に合成できる。例えば、ポリペプチドの断片に対応するポリペプチドは、ペプチドシンセサイザーを用いることにより合成され得る。さらに、所望ならば、非古典的なアミノ酸または化学アミノ酸アナログは、ポリペプチド配列への置換または付加として導入され得る。非古典的なアミノ酸は、一般的なアミノ酸のＤ－アイソマー、２、４－ジアミノ酪酸、ａ－アミノイソ酪酸、４－アミノ酪酸、Ａｂ

ｕ、２－アミノ酪酸、ｇ－Ａｂｕ、ｅ－Ａｈｘ、６－アミノヘキサン酸、Ａｉｂ、２－アミノイソ酪酸、３－アミノプロピオン酸、オミチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ｂ－アラニン、フルオロ－アミノ酸、デザイナ－アミノ酸、例えばｂ－メチルアミノ酸、Ｃａ－メチルアミノ酸、Ｎａ－メチルアミノ酸、および一般的なアミノ酸のアナログを含むが、これらに限定されない。さらに、アミノ酸はＤ（右旋性）またはＬ（左旋性）であり得る。

【０３４７】

本発明は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基／ブロッキング基による誘導体化、蛋白質分解的切断、抗体分子または他の細胞リガンドへの結合などにより、翻訳の間または後に様々に修飾される本発明のアルブミン融合蛋白質を包含する。任意の多くの化学修飾は、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、Ｖ８プロテアーゼ、ＮａＢＨ４による特定の化学開裂；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシンの存在下での代謝合成；などを含むが、これらに限定されない知られている技法により行われてもよい。

【０３４８】

本発明に含まれるさらなる翻訳後修飾は、例えば、例えば、Ｎ－結合されたまたはＯ－結合された糖鎖、Ｎ－末端またはＣ－末端のプロセッシング、アミノ酸骨格への化学的部分の結合、Ｎ－結合されたまたはＯ－結合された糖鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞の発現の結果としてのＮ－末端メチオニンの付加または欠失を含む。アルブミン融合蛋白質は、蛋白質の検出および単離を可能にするために、検出可能な標識、例えば、酵素標識、蛍光標識、アイソトープ標識またはアフィニティー標識を用いて修飾されてもよい。

【０３４９】

適当な酵素の例は、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含み；適当な補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンを含み；適当な蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライドまたはフィコエリトリンを含み；発光物質の例はルミノールを含み；生物発光物質の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンを含み；および適当な放射性物質の例は、ヨウ素（^{121}Ｉ、^{123}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{111}Ｉｎ、^{112}Ｉｎ、^{113}ｍＩｎ、^{115}ｍＩｎ）、テクネチウム（^{99}Ｔｃ、^{99}ｍＴｃ）、タリウム（^{201}Ｔｉ）、ガリウム（^{68}Ｇａ、^{67}Ｇａ）、パラジウム（^{103}Ｐｄ）、モリブデン（^{99}Ｍｏ）、キセノン（^{133}Ｘｅ）、フッ素（^{18}Ｆ）、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ、^{159}Ｇｄ、^{149}Ｐｍ、^{140}Ｌａ、^{175}Ｙｂ、^{166}Ｈｏ、^{90}Ｙ、^{47}Ｓｃ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{142}Ｐｒ、^{105}Ｒｈおよび^{97}Ｒｕを含む。

【０３５０】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質またはその断片もしくは変異体は、^{177}Ｌｕ、^{90}Ｙ、^{116}Ｈｏおよび^{153}Ｓｍを含むがこれらに限定されない、ポリペプチドに対する放射性金属イオンに会合されるマクロサイクル（ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃ）キレート剤に結合される。好ましい一の実施態様において、マクロサイクルキレート剤に会合される放射性金属イオンは、^{111}Ｉｎである。別の好ましい実施態様において、マクロサイクルキレート剤に会合される放射性金属イオンは^{90}Ｙである。特定の実施態様において、マクロサイクルキレート剤は、１、４、７、１０－テトラアザシクロドデカン－Ｎ、Ｎ’、Ｎ’’、’’’－テトラ酢酸（ＤＯＴＡ）である。他の特定の実施態様において、ＤＯＴＡはリンカー分子を介して本発明の抗体またはその断片に結合する。ＤＯＴＡをポリペプチドにコンジュゲートするために有用なリンカー分子の例は一般的に当該技術分野において知られている。例えば、ＤｅＮａｒｄｏら．、Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４（１０）：２４８３－９０（１９９８）；Ｐｅｔｅｒｓｏｎら．、

Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．１０（４）：５５３－７（１９９９）；およびＺｉｍｍｅｒｍａｎら，Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２６（８）：９４３－５０（１９９９）を参照のこと；該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０３５１】

記載したように、本発明のアルブミン融合蛋白質は、翻訳後プロセッシングのごとき自然な過程または当該技術分野においてよく知られている化学的修飾技法のいずれかにより修飾されてもよい。同じ型の修飾が特定のポリペプチドの幾つかの部位において同じまたは異なる程度で存在してもよいことは、容易に理解されよう。本発明のポリペプチドは、例えばユビキチン化の結果として分岐されてもよく、および分岐を伴うまたは伴わない環状であってもよい。環状、分岐および分岐環状ポリペプチドは、翻訳後の自然な過程から生じてもよく、または合成方法により作られる。修飾は、アセチル化、アシル化、ＡＤＰ－リボシル化化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、閉環、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋結合形成、システイン形成、ピログルタミン酸形成、ホルミル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペグ化、蛋白質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、トランスファーＲＮＡが介する蛋白質へのアミノ酸付加、例えばアルギニン化およびユビキチン化を含む（例えば、ＰＲＯＴＥＩＮＳ－ＳＴＲＵＣＴＵＲＥＡＮＤＭＯＬＥＣＵＬＡＲＰＲＯＰＥＲＴＩＥＳ、２ｎｄ Ｅｄ．，Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）；ＰＯＳＴ－ＴＲＡＮＳＬＡＴＩＯＮＡＬ ＣＯＶＡＬＥＮＴ ＭＯＤＩＦＩＣＡＴＩＯＮ ＯＦ ＰＲＯＴＥＩＮＳ，Ｂ．Ｃ．Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｇｓ．１－１２（１９８３）；Ｓｅｉｆｔｅｒら．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２：６２６－６４６（１９９０）；Ｒａｔｔａｎら．，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６３：４８－６２（１９９２）を参照のこと）。

【０３５２】

本発明のアルブミン融合蛋白質および治療用蛋白質またはその断片もしくは変異体に結合する抗体は、ペプチドのごときマーカー配列に融合されて、生成を改善し得る。好ましい実施態様において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，９２５９ Ｅｔｏｎ Ａｖｅｎｕｅ，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ，９１３１１）中に提供されるタグのごときヘキサ－ヒスチジンペプチドであり、その多くは市販されている。Ｇｅｎｔｚら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：８２１－８２４（１９８９）において記載されているように、例えば、ヘキサ－ヒスチジンは、融合蛋白質の都合のよい精製を提供する。精製のために有用な他のペプチドタグは、肝炎赤血球凝集素蛋白質（Ｗｉｌｓｏｎら．、Ｃｅｌｌ３７：７６７（１９８４））に由来するエピトープに対応する「ＨＡ」タグおよび「ｆｌａｇ」タグを含むが、これらに限定されない。

【０３５３】

さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質は、細胞毒のごとき治療用部分、例えば、細胞分裂阻害剤または細胞破壊剤、治療剤または放射性金属イオン、例えば、２１３Ｂｉのごときアルファ－放出体にコンジュゲートされてもよい。細胞毒または細胞傷害性剤は、細胞に有害な任意の剤を含む。例えば、パクリタキセル、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシンおよびそれらのアナログまたはホモログを含む。治療剤は、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート、６－メルカプトプリン、６－チオ

グアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパクロランブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロリムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、およびシス－ジクロロジアミンプラチナム（Ｉｎ（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（正式には、ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（ｆｏｒｍｅｒｌｙアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（ＡＭＣ））、および抗－有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）を含むが、これらに限定されない。

【０３５４】

本発明のコンジュゲートは、特定の生物学的応答を修飾するために用いられ得、治療剤または薬剤部分は古典的な化学治療剤に限定されないものとみなす。例えば、薬剤部分は、所望の生物活性を有する蛋白質またはポリペプチドであってもよい。かかる蛋白質は、例えば、毒素、例えば、アブリン、リシンＡ、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素；蛋白質、例えば、腫瘍壊死因子、アルファ－インターフェロン、Ｂ－インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノーゲン活性化剤、アポトーシス剤、例えば、ＴＮＦ－アルファ、ＴＮＦ－ベータ、ＡＩＭ　Ｉ（国際公開番号ＷＯ　９７／３３８９９を参照のこと）、ＡＩＭ　１１（国際公開番号ＷＯ　９７／３４９１１を参照のこと）、Ｆａｓリガンド（Ｔａｋａｈａｓｈｉら．、Ｉｎｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，６：１５６７－１５７４（１９９４））、ＶＥＧＩ（国際公開番号ＷＯ　９９／２３１０５を参照のこと）、血栓剤または抗－血管新生剤、例えば、アンジオスタチンまたはエンドスタチン；または生物学的応答修飾因子、例えば、リンホカイン、インターロイキン－１（「ＩＬ－Ｉ」）、インターロイキン－２（「ＩＬ－２」）、インターロイキン－６（「ＩＬ－６」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、顆粒球コロニー刺激因子（「Ｇ－ＣＳＦ」）または他の成長因子を含んでもよい。かかる治療用部分を蛋白質（例えば、アルブミン融合蛋白質）へコンジュゲートするための技法は、当該技術分野においてよく知られている。

【０３５５】

アルブミン融合蛋白質を固体支持体に結合してもよく、これは、本発明のアルブミン融合蛋白質が結合する、それに結合する、またはそれに会合するポリペプチドのイムノアッセイまたは精製のために特に有用である。かかる固体支持体は、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニルまたはポリプロピレンを含むが、これらに限定されない。

【０３５６】

単独または一または複数の細胞傷害性因子および／または１または複数のサイトカインと組み合わせて投与される、コンジュゲートされた治療用部分を伴うまたは伴わないアルブミン融合蛋白質は治療剤として用いられ得る。

【０３５７】

本発明のアルブミン融合蛋白質が治療用蛋白質に結合する抗体のＶＨドメインのみを含む実施態様において、融合蛋白質と治療用蛋白質に結合する同じ抗体のＶＬドメインを共に発現させることが必要とされるおよび／または所望されてもよく、その結果、ＶＨ－アルブミン融合蛋白質およびＶＬ蛋白質は翻訳後に結合され得る（共有結合または非共有結合）。

【０３５８】

本発明のアルブミン融合蛋白質が治療用蛋白質に結合する抗体のＶＬドメインのみを含む実施態様において、融合蛋白質と治療用蛋白質に結合する同じ抗体のＶＨドメインを共に発現させることが必要とされるおよび／または所望されてもよく、その結果、ＶＬ－アルブミン融合蛋白質およびＶＨ蛋白質は翻訳後に結合され得る（共有結合または非共有結合）。

【０３５９】

幾つかの治療用抗体は二重特異性抗体であり、これは、治療用蛋白質に結合する抗体が２つの異なる重鎖／軽鎖対および２つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体であることを意味する。治療用蛋白質に対応するアルブミン融合蛋白質を作るために、アルブミン蛋白質部分の両方に融合されたｓｃＦｖ断片を有するアルブミン融合蛋白質を作り出すことが可能である。より具体的には、アルブミンのＮ－末端に融合されたｓｃＦｖは、治療用蛋白質に結合する元々の抗体の重鎖／軽鎖（ＶＨ／ＶＬ）対の１つに対応し得、およびアルブミンのＣ－末端に融合されたｓｃＦｖは、治療用蛋白質に結合する元々の抗体の他の重鎖／軽鎖（ＶＨ／ＶＬ）対の１つに対応し得る。

【０３６０】

本発明により、ポリペプチドの溶解性、安定性および循環時間の増大または免疫原性の減少（米国特許第４、１７９、３３７号を参照のこと）のごときさらなる利点を提供し得る、本発明のアルブミン融合蛋白質の化学修飾された誘導体も提供される。誘導体化のための化学的部分は、水溶性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどから選択されてもよい。アルブミン融合蛋白質は、分子内のランダムな位置または分子内の予め決定した位置において修飾されてもよく、および１、２、３またはそれ以上の結合された化学的部分を含んでもよい。

【０３６１】

ポリマーは、任意の分子量のものであってよく、および分岐しているまたは分岐していなくてもよい。ポリエチレングリコールについては、取扱いおよび製造を容易にするための好ましい分子量は約１ｋＤａ～約１００ｋＤａである（用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製中、幾つかの分子は記載の分子量より大きな分子量を有し、幾つかはより小さい分子量を有し得ることを示す））。所望の治療特性（例えば、所望の徐放持続時間、もしあるならば生物活性への効果、取扱いの容易さ、抗原性の程度または欠損、および治療用蛋白質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の知られている効果）に依存して、他の大きさが用いられてもよい。例えば、ポリエチレングリコールは、約２００、５００、１０００、１５００、２０００、２５００、３０００、３５００、４０００、４５００、５０００、５５００、６０００、６５００、７０００、７５００、８０００、８５００、９０００、９５００、１０，０００、１０，５００、１１，０００、１１，５００、１２，０００、１２，５００、１３，０００、１３，５００、１４，０００、１４，５００、１５，０００、１５，５００、１６，０００、１６，５００、１７，０００、１７，５００、１８，０００、１８，５００、１９，０００、１９，５００、２０，０００、２５，０００、３０，０００、３５，０００、４０，０００、４５，０００、５０，０００、５５，０００、６０，０００、６５，０００、７０，０００、７５，０００、８０，０００、８５，０００、９０，０００、９５，０００または１００、０００ｋＤａの平均分子量を有してもよい。

【０３６２】

上記したように、ポリエチレングリコールは分岐構造を有してもよい。分岐したポリエチレングリコールは、例えば、米国特許第５，６４３，５７５号；Ｍｏｒｐｕｒｇｏら．，Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．５６：５９－７２（１９９６）；Ｖｏｒｏｂｊｅｖら．，Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ １８：２７４５－２７５０（１９９９）；およびＣａｌｉｃｅｔｉら．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．１０：６３８－６４６（１９９９）に記載されており、該開示内容のそれぞれは出典明示により本明細書の一部となる。

【０３６３】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学的部分）は、蛋白質の機能または抗原性ドメインへの効果を考慮して、蛋白質へ結合される必要がある。例えば、ＥＰ０４０１３８４（Ｇ－ＣＳＦへのＰＥＧのカップリング）において記載されている方法のごとき、当業者に利用可能な多数の結合方法がある。該文献は出典明示により本明細書の一部となる；Ｍａｌｉｋら．，Ｅｘｐ．Ｈｅｍａｔｏｌ．２０：１０２８－１０３５（１９９２），

ｒｅｐｏｒｔｉｎｇ ｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ ｏｆ ＧＭ－ＣＳＦ ｕｓｉｎｇ ｔｒｅｓｙｌ ｃｈｌｏｒｉｄｅも参照のこと。例えば、ポリエチレングリコールは、遊離アミノまたはカルボキシル基のごとき反応性基を経るアミノ酸残基を介して共有結合されてもよい。反応性基は、活性化されたポリエチレングリコール分子が結合されてもよいものである。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基は、リジン残基およびＮ－末端アミノ酸残基を含んでもよく；遊離カルボキシル基を有するものは、アスパラギン酸残基グルタミン酸残基およびＣ－末端アミノ酸残基を含む。スルフヒドリル基も、ポリエチレングリコール分子に結合するための反応性基として用いられてもよい。治療目的のために、アミノ基における結合、例えば、Ｎ－末端またはリジン基における結合が好ましい。

【０３６４】

上で示したように、ポリエチレングリコールは、任意の多数のアミノ酸残基への結合を介して蛋白質へ結合されてもよい。例えば、ポリエチレングリコールは、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステイン残基に対する共有結合を介して蛋白質に結合され得る。ポリエチレングリコールを蛋白質の特定のアミノ酸残基（例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステイン）または蛋白質の１以上の型のアミノ酸残基（例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システインおよびそれらの組み合わせ）へ結合するために、１またはそれ以上の反応ケミストリーが用いられてもよい。

【０３６５】

特に、Ｎ－末端において化学修飾された蛋白質を所望してもよい。本発明の組成物の例として示すポリエチレングリコールを用いて、様々なポリエチレングリコール分子（分子量、分岐など）から、反応混合物中の蛋白質（ポリペプチド）分子に対するポリエチレングリコール分子の割合、実施しようとするペグ化反応の種類、および選択したＮ－末端ペグ化蛋白質を得る方法を選択してもよい。Ｎ－末端ペグ化調製物を得る方法（すなわち、必要に応じて、この部分を他のモノペグ化部分から分離する）は、ペグ化蛋白質分子の集団からＮ－末端ペグ化物質を精製することであってもよい。Ｎ－末端修飾で化学修飾された選択性蛋白質は、特定の蛋白質の誘導体化のために使用可能な異なる型の一級アミノ基（リジン対Ｎ－末端）の示差反応性を利用する還元的アルキル化より成し遂げられてもよい。適切な反応条件下、ポリマーを含むカルボニル基を用いたＮ－末端において、蛋白質の実質的に選択的な誘導体化が成し遂げられる。

【０３６６】

上記したように、本発明のアルブミン融合蛋白質のペグ化は、任意の数の手段により成し遂げられてもよい。例えば、ポリエチレングリコールは、直接的または介在リンカーのいずれかにより、アルブミン融合蛋白質へ結合されてもよい。ポリエチレングリコールを蛋白質へ結合させるリンカーのない系は、Ｄｅｌｇａｄｏら．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓ．９：２４９－３０４（１９９２）；Ｆｒａｎｃｉｓら．，Ｉｎｔｅｍ．Ｊ．ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌ．６８：１－１８（１９９８）；米国特許第４，００２，５３１号；米国特許第５，３４９，０５２号；ＷＯ ９５／０６０５８；およびＷＯ ９８／３２４６６において記載されており、該開示内容のそれぞれは出典明示により本明細書の一部となる。

【０３６７】

介在リンカーなしにポリエチレングリコールを蛋白質のアミノ酸残基に直接結合させる１つの系は、トレシル化ＭＰＥＧを利用し、トレシルクロリド（$ClSO_2CH_2CF_3$）を用いて、モノメトキシポリエチレングリコール（ＭＰＥＧ）を修飾することにより産生される。トレシル化ＭＰＥＧと蛋白質の反応において、ポリエチレングリコールは蛋白質のアミン基に直接結合される。故に、本発明は、２，２，２－トリフルオロエタンスルホニル基を有するポリエチレングリコール分子と本発明の蛋白質の反応により生じる、蛋白質－ポリエチレングリコールコンジュゲートを含む。

【０３６８】

ポリエチレングリコールは、多数の異なる介在リンカーを用いても蛋白質に結合され得

る。例えば、米国特許第５，６１２，４６０号は、ポリエチレングリコールを蛋白質に連結するためのウレタンリンカーを開示している。該開示内容の全ては出典明示により本明細書の一部となる。ポリエチレングリコールがリンカーにより蛋白質に結合されている蛋白質－ポリエチレングリコールコンジュゲートは、ＭＰＥＧ－スクシンイミジルスクシナート，１，ｌ’－カルボニルジイミダゾールを用いて活性化されたＭＰＥＧ、ＭＰＥＧ－２，４，５－トリクロロペニルカルボナート、ＭＰＥＧ－ｐ－ニトロフェノールカルボナートおよび様々なＭＰＥＧ－スクシナート誘導体のごとき化合物と蛋白質の反応により生じ得る。蛋白質にポリエチレングリコールを結合するための多数のさらなるポリエチレングリコール誘導体および反応ケミストリーは、国際公開番号ＷＯ　９８／３２４６６に記載されており、該開示内容の全ては出典明示により本明細書の一部となる。本明細書中に記載の反応ケミストリーを用いて生じたペグ化蛋白質産物は本発明の範囲内に含まれる。

【０３６９】

本発明のアルブミン融合蛋白質のそれぞれに結合されるポリエチレングリコール部分の数（すなわち、置換度）は、様々であってもよい。例えば、本発明のペグ化蛋白質は、平均して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１５、１７、２０個またはそれ以上のポリエチレングリコール分子に結合されてもよい。同様に、平均置換度は、例えば、１個の蛋白質分子あたり、１～３、２～４、３～５、４～６、５～７、６～８、７～９、８～１０、９～１１、１０～１２、１１～１３、１２～１４、１３～１５、１４～１６、１５～１７、１６～１８、１７～１９、または１８～２０個のポリエチレングリコール部分である。置換度を決定する方法は、例えば、Ｄｅｌｇａｄｏら．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａ．Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓ．９：２４９－３０４（１９９２）に記載されている。

【０３７０】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含むがこれらに限定されない標準的な方法により、化学合成および組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（「ＨＰＬＣ」）が精製のために用いられる。単離および／または精製の間にポリペプチドが変性されている場合、蛋白質のリフォールディングのためによく知られている技法を用いて、活性コンフォメーションを再生してもよい。

【０３７１】

本発明のアルブミン融合蛋白質の存在および量は、ＥＬＩＳＡ、当該技術分野においてよく知られているイムノアッセイを用い決定されてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質を検出／定量するために有用であり得るＥＬＩＳＡプロトコルの１つは、抗－ヒト血清アルブミン抗体を用いてＥＬＩＳＡプレートをコーティングし、非特異的結合を防ぐためにプレートをブロッキングし、ＥＬＩＳＡプレートを洗浄し、本発明のアルブミン融合蛋白質（１またはそれ以上の異なる濃度で）を含む溶液を加え、検出可能な標識（本明細書中記載されているまたは当該技術分野において知られているような）にカップリングされている二次抗－治療用蛋白質特異的抗体を加え、次いで、二次抗体の存在を検出する工程を含む。このプロトコルの代替バージョンにおいて、ＥＬＩＳＡプレートは、抗－治療用蛋白質特異的抗体を用いてコーティングされてもよく、および標識された二次試薬は、抗－ヒトアルブミン特定の抗体であってもよい。

【０３７２】

ポリヌクレオチドの使用

本明細書中にて同定された各ポリヌクレオチドは、様々な方法において試薬として用いられ得る。以下の記載は例示と見なされるべきであり、および知られている技法を利用している。

【０３７３】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のアルブミン融合蛋白質に生じるために有用である。以下に詳細に記載するように、本発明のポリヌクレオチド（アルブミン融合蛋白質をコードする）は、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドによりコードされるアルブミン融合蛋白質を発現する細胞、細胞株、または組織を産生するための遺伝子工学において有用な組換えＤＮＡ法において用いられてもよい。

【０３７４】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子治療においても有用である。遺伝子治療の１つの目標は、遺伝子欠損を修正するために、欠損遺伝子を有する生物体へ正常な遺伝子を挿入することである。本発明にて開示されるポリヌクレオチドは、かかる遺伝子欠損を非常に正確なやり方で標的化する手段を提供する。別の目標は、宿主ゲノム中の存在しない新しい遺伝子を挿入し、それにより、宿主細胞において新しい特徴を生じさせることである。本発明に含まれる遺伝子治療のさらなる非限定的な例は、本明細書中の別の箇所により詳細に記載される（例えば、「遺伝子治療」のセクションおよび実施例６１および６２を参照のこと）。

【０３７５】

ポリペプチドの使用

本明細書中同定された各ポリペプチドは、様々な方法で用いられ得る。以下の記載は例示と見なされるべきであり、および知られている技法を利用している。

【０３７６】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、一または複数の組織（例えば、例えば、ＡＢＣイムノペルオキシダーゼ（Ｈｓｕら．，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．２９：５７７－５８０（１９８１）のごとき免疫組織化学アッセイ）または一または複数の細胞型（例えば、免疫細胞化学アッセイ）を識別同定するための免疫プローブを提供するために有用である。

【０３７７】

アルブミン融合蛋白質は、当業者に知られている古典的な免疫組織学的方法（例えば、Ｊａｌｋａｎｅｎ，ら．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎ，ら．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７－３０９６（１９８７）を参照のこと）を用いて生体試料中のポリペプチドのレベルをアッセイするために用いられ得る。蛋白質遺伝子発現を検出するために有用な他の方法は、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）およびラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）のごときイムノアッセイを含む。適当なアッセイ標識は当該技術分野において知られており、および酵素標識、例えば、グルコースオキシダーゼ；放射性同位元素、例えば、ヨウ素（^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{123}Ｉ、^{121}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{115}ｍＩｎ、^{113}ｍＩｎ、^{112}Ｉｎ、^{111}Ｉｎ）、およびテクネチウム^{99}Ｔｃ、^{99m}Ｔｃ）、タリウム（^{201}Ｔｉ）、ガリウム（^{68}Ｇａ、^{67}Ｇａ）、パラジウム（^{103}Ｐｄ）、モリブデン（^{99}Ｍｏ）、キセノン（^{133}Ｘｅ）、フッ素（^{18}Ｆ）、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ、^{159}Ｇｄ、^{149}Ｐｍ、^{140}Ｌａ、^{175}Ｙｂ、^{166}Ｈｏ、^{90}Ｙ、^{47}Ｓｃ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{142}Ｐｒ、^{105}ＳＲｈ、^{97}Ｒｕ；ルミノールのごとき発光標識；およびフルオレセインおよびローダミンのごとき蛍光標識およびビオチンを含む。

【０３７８】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、イメージングによりインビボにおいても検出され得る。蛋白質のインビボイメージングのための標識またはマーカーは、Ｘ線撮影、核磁気共鳴（ＮＭＲ）または電子スピン緩和（ＥＳＲ）により検出可能なものを含む。Ｘ線撮影については、適当な標識は、検出可能な放射線を放出するが、対象に対して過度に有害でないバリウムまたはセシウムのごとき放射性同位元素を含む。ＮＭＲおよびＥＳＲに適当なマーカーは、重水素のごとき検出可能な特徴的なスピンを有するものを含み、これは、本発明のアルブミン融合蛋白質を発現する細胞株に付与した栄養素の標識により、アルブミン融合蛋白質中に取り込まれてもよい。

【０３７９】
適切な検出可能なイメージング部分、例えば、放射性同位元素（例えば、^{131}Ｉ、^{112}Ｉｎ、^{99m}Ｔｃ、（^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{123}Ｉ、^{121}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{115}ｍＩｎ、^{113}ｍＩｎ、^{112}Ｉｎ、^{111}Ｉｎ）、およびテクネチウム^{99}Ｔｃ、^{99m}Ｔｃ）、タリウム（^{201}Ｔｉ）、ガリウム（^{68}Ｇａ、^{67}Ｇａ）、パラジウム（^{103}Ｐｄ）、モリブデン（^{99}Ｍｏ）、キセノン（^{133}Ｘｅ）、フッ素（^{18}Ｆ、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ、^{159}Ｇｄ、^{149}Ｐｍ、^{140}Ｌａ、^{175}Ｙｂ、^{166}Ｈｏ、^{90}Ｙ、^{47}Ｓｃ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{142}Ｐｒ、^{105}Ｒｈ、^{97}Ｒｕ）、放射線不透過（ｒａｄｉｏ－ｏｐａｑｕｅ）物質または核磁気共鳴により検出可能な物質を用いて標識されているアルブミン融合蛋白質は、哺乳類へ導入され（例えば、非経口的、皮下または腹腔内に）、免疫系疾患について調べられる。対象の大きさおよび用いられるイメージング装置が、診断画像を得るために必要とされるイメージング部分の量を決定し得ることが、当業者には理解されよう。放射性同位元素部分の場合、ヒト対象については、通常、注入される放射能の量は、約５～２０ミリキュリーの^{99m}Ｔｃの範囲に及び得る。次いで、標識されたアルブミン融合蛋白質は、１またはそれ以上の受容体、リガンドまたは基質（本発明のアルブミン融合蛋白質をつくるために用いられる治療用蛋白質のものに対応する）が位置する体内の部位（例えば、組織、細胞、細胞外空間またはマトリックス）において選択的に蓄積し得る。或いは、アルブミン融合蛋白質が治療用蛋白質の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含む場合、標識されたアルブミン融合蛋白質は、次いで、（本発明のアルブミン融合蛋白質をつくるために用いられる）治療用蛋白質により結合されたものに対応するポリペプチド／エピトープが位置する体内の部位（例えば、組織、細胞、細胞外空間またはマトリックス）において選択的に蓄積し得る。インビボでの腫瘍イメージングは、Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌら．，”Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ”（Ｃｈａｐｔｅｒ １３ ｉｎ Ｔｕｍｏｒ Ｉｍａｇｉｎｇ：Ｔｈｅ Ｒａｄｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ｄｅｔｅｃｔｉｎｏ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌ ａｎｄ Ｂ．Ａ．Ｒｈｏｄｅｓ，ｅｄｓ．，Ｍａｓｓｏｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｉｎｃ．（１９８２））において記載されていう。そこで開示されているプロトコルは、本発明のアルブミン融合蛋白質について用いるために、当該分野の技術により容易に修飾され得るだろう。

【０３８０】
一の実施態様において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸に関連する本発明のアルブミン融合蛋白質（例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または抗体をコードするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド）を投与することにより、本発明のアルブミン融合蛋白質を細胞へ特異的に送達させるための方法を提供する。一の実施態様において、本発明は、治療用蛋白質を標的細胞へ送達させるための方法を提供する。別の実施態様において、本発明は、一本鎖核酸（例えば、アンチセンスまたはリボザイム）または二本鎖核酸（例えば、細胞のゲノム中に統合し得るかまたはエピソームとして複製し、および転写できるＤＮＡ）を標的細胞へ送達させるための方法を提供する。

【０３８１】
別の実施態様において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラックに関連するアルブミン融合蛋白質を投与することにより本発明の細胞を特異的に破壊する（例えば、腫瘍細胞の破壊）ための方法を提供する。

【０３８２】
「毒素」により、内因性細胞傷害エフェクター系に結合し、およびそれを活性化する１またはそれ以上の化合物、放射性同位元素、ホロ毒素、修飾された毒素、毒素の触媒サブユニット、或いは特定条件下において細胞死を惹起する、細胞内または細胞表面に通常存在しない任意の分子または酵素が意味される。本発明の発明に従って用いられてもよい毒素は、当該技術分野において知られている放射性同位元素、化合物、例えば、生来のまた

は誘導された内因性細胞傷害エフェクター系に結合する抗体（またはその部分を含む補体結合）、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、ＲＮＡｓｅ、アルファ毒素、リシン、アブリン、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）エキソ毒素Ａ、ジフテリア毒素、サポリン、モモルジン、ゲロニン、ヨウシュヤマゴボウ（ｐｏｋｅｗｅｅｄ）抗ウイルス蛋白質、アルファ－サルシンおよびコレラ毒素を含むが、これらに限定されない。「毒素」は、細胞分裂阻害剤または細胞破壊剤、治療剤または放射性金属イオン、例えば、^{213}Ｂｉのごときアルファ－放出体、または他の放射性同位元素、例えば、^{103}Ｐｄ、^{133}Ｘｅ、^{131}Ｉ、^{68}Ｇｅ、^{57}Ｃｏ、^{65}Ｚｎ、^{85}Ｓｒ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{153}Ｓｍ、^{153}Ｇｄ、^{169}Ｙｂ、^{51}Ｃｒ、^{54}Ｍｎ、^{75}Ｓｅ、^{113}Ｓｎ、^{90}イットリウム、^{117}スズ、^{186}レニウム、^{166}ホルミウムおよび^{188}レニウム；ルミノールのごとき発光標識；およびフルオレセインおよびローダミンのごとき蛍光標識およびビオチンも含む。一の特定の実施態様において、本発明は、放射性同位元素^{90}Ｙに関連する本発明のポリペプチドまたは本発明の抗体を投与することにより、細胞を特異的に破壊する（例えば、腫瘍細胞の破壊）ための方法を提供する。別の特定の実施態様において、本発明は、放射性同位元素^{111}Ｉｎに関連する本発明のポリペプチドまたは本発明の抗体を投与することにより、細胞を特異的に破壊する（例えば、腫瘍細胞の破壊）ための方法を提供する。さらなる一の特定の実施態様において、本発明は、放射性同位元素^{131}Ｉに関連する本発明のポリペプチドまたは本発明の抗体を投与することにより、細胞を特異的に破壊する（例えば、腫瘍細胞の破壊）ための方法を提供する。

【０３８３】

当該技術分野において知られている技法を用いて、本発明のポリペプチドを標識してもよい。かかる技法は、二重機能性コンジュゲート物質（例えば、米国特許第５，７５６，０６５号；第５，７１４，６３１号；第５，６９６，２３９号；第５，６５２，３６１号；第５，５０５，９３１号；第５，４８９，４２５号；第５，４３５，９９０号；第５，４２８，１３９号；第５，３４２，６０４号；第５，２７４；１１９号；第４，９９４，５６０号；および第５，８０８，００３号を参照のこと。該内容のそれぞれは出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）の使用を含むが、これらに限定されない。

【０３８４】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、哺乳類、好ましくはヒトにおける様々な障害を診断、処置、予防および／または予後するために有用である。かかる障害は、本明細書中の以下の「生物活性」と題するセクションの下で記載されているものを含むが、これらに限定されない。

【０３８５】

故に、本発明は、（ａ）本発明のアルブミン融合蛋白質を用いて、個体の細胞または体液における特定のポリペプチドの発現レベルをアッセイし、（ｂ）基準ポリペプチドの発現レベルとアッセイしたポリペプチドの発現レベルを比較することを含む障害の診断方法を提供し、ここで、基準の発現レベルと比較してアッセイしたポリペプチドの発現レベルにおける増大または減少が障害の指標となる。癌については、個体からの生検用組織における比較的高い量の転写物の存在が、疾患発症のための素因を示してもよく、または、実際の臨床徴候が顕れる前に疾患を検出するための手段を提供してもよい。この型のより確定的な診断により、医療の専門家はより早期に予防的手段または攻撃的処置を用いて、癌の発症またはさらなる進行を予防することができる。

【０３８６】

さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質は、例えば、神経障害、免疫系障害、筋疾患、生殖器系障害、胃腸障害、肺障害、心血管障害、腎障害、増殖性障害および／または癌性疾患および状態のごとき疾患または状態を処置または予防するために用いることができる。例えば、患者に本発明のポリペプチドを投与して、ポリペプチド（例えば、インスリン）の欠失または低下レベルを補う、異なるポリペプチド（例えば、ヘモグロビンＢについてヘモグロビン、ＳＯＤ、カタラーゼ、ＤＮＡ修復蛋白質）の欠失または低下レベルを補う、ポリペプチド（例えば、オンコジーンまたは腫瘍抑制因子）の活性を阻害する、ポリ

ペプチド（例えば、受容体に結合することにより）の活性を増大させる、遊離リガンド（例えば、炎症の軽減において用いられる可溶性ＴＮＦ受容体）と競合させることにより膜結合型蛋白質の活性を減少する、または所望の応答（例えば、血管成長阻害、増殖性細胞または組織に対する免疫応答の亢進）を引き起こすことができる。

【０３８７】

特に、治療用抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質を用いて、疾患（上記および本明細書中別記されるもの）を処置することができる。例えば、治療用抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質の投与は、アルブミン融合蛋白質特異的を作るために用いられる治療用抗体が特異的に結合するポリペプチドを結合および／または中和し得、および／またはアルブミン融合蛋白質特異的を作るために用いられる治療用抗体が特異的に結合するポリペプチドの過剰な産生を軽減することができる。同様に、治療用抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質の投与は、膜（受容体）に結合したポリペプチドに結合させることにより、アルブミン融合蛋白質を調製するために用いた治療用抗体が特異的に結合したポリペプチドを活性化することができる。

【０３８８】

少なくとも、本発明のアルブミン本発明の融合蛋白質は、当業者に知られている方法により、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルまたはモレキュラーシーブゲル濾過カラム上での分子量マーカーとして用いることができる。本発明のアルブミン融合蛋白質を用いて、抗体を産生し、順次、宿主細胞または生体試料における形質転換を評価する方法として、組換え細胞に由来する本発明の治療用蛋白質、アルブミン蛋白質および／またはアルブミン融合蛋白質の蛋白質発現を測定するために用いてもよい。さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質は、本明細書中記載されている生物活性を試験するために用いることができる。

【０３８９】

診断アッセイ

本発明の化合物は、哺乳類、好ましくはヒトにおける様々な障害を診断、処置、予防および／または予後するために有用である。かかる障害は、表１の対応する列において各治療用蛋白質について記載されているもの、および本明細書の以下の「免疫活性」「血液関連疾患」「過増殖性疾患」「腎障害」「心血管疾患」「呼吸器疾患」「抗－血管新生活性」「細胞レベルにおける疾患」「創傷治癒および上皮細胞増殖」「神経活性および神経疾患」「内分泌性障害」「生殖器系疾患」「感染症」「再生」および／または「胃腸障害」のセクションに記載のものを含むが、これらに限定されない。

【０３９０】

多数の障害について、遺伝子発現の実質的に改変された（増大されたまたは減少された）レベルが、「標準の」遺伝子発現レベル、すなわち、障害を有さない個体に由来する組織または体液における発現レベルと比較して、かかる障害を有する個体から得られた組織、細胞または体液（例えば、血清、血漿、尿、精液、滑液または髄液）において検出され得る。故に、本発明は、障害の診断において有用な診断方法であって、個体に由来する組織、細胞または体液においてポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを測定し、次いで、測定された遺伝子発現レベルを標準の遺伝子発現レベルと比較することを含む方法を提供し、ここで、標準と比較して一または複数の遺伝子発現レベルの増大および減少が障害の指標となる。これらの診断アッセイは、インビボまたはインビトロ、例えば、血液試料、生検組織または剖検組織において行われてもよい。

【０３９１】

本発明は、遺伝子発現の亢進または抑制を示す患者がより悪い臨床結果を被るという予後指標としても有用である。

【０３９２】

「ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルをアッセイする」とは、特定のポリペプチド（例えば、表１に開示される治療用蛋白質に対応するポリペプチド）のレベルまたは初めの生体試料において本発明のポリペプチドをコードするｍＲＮＡのレベルを、直接

的（例えば、絶対蛋白質レベルまたはｍＲＮＡレベルを測定または推定することによる）または相対的（例えば、第２の生体試料におけるポリペプチドレベルまたはｍＲＮＡレベルと比較することによる）に、定性的または定量的に測定または推定することが意図される。好ましくは、初めの生体試料におけるポリペプチド発現レベルまたはｍＲＮＡレベルが測定または推定され、次いで、基準のポリペプチドレベルまたはｍＲＮＡレベルと比較される。該基準は、障害を有さない個体から得られた二次的な生体試料から得られるものであるか、または障害を有さない個体の集団に由来する平均レベルから決定されるものである。当業者に理解されるように、基準のポリペプチドレベルまたはｍＲＮＡレベルが知られていれば、それは比較のための基準として繰り返し用いられ得る。

【０３９３】

「生体試料」により、個体、細胞株、組織培養物または本発明のポリペプチド（その部分を含む）またはｍＲＮＡを含む他のソースから得られた任意の生体試料が意図される。示されるように、生体試料は、体液（例えば、血清、血漿、尿、滑液および髄液）およびポリペプチドまたはｍＲＮＡの全長またはその断片を発現することが見出されている組織ソースを含む。哺乳類から生検組織および体液を得るための方法は当該技術分野においてよく知られている。生体試料がｍＲＮＡを含む必要がある場合、生検組織は好ましいソースである。

【０３９４】

細胞の全ＲＮＡは、任意の適当な技法、例えば、ＣｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉおよびＳａｃｃｈｉ，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６２：１５６－１５９（１９８７）に記載されている単一段階のグアニジウム－チオシアナートフェノール－クロロホルム法を用いて、生体試料から単離され得る。次いで、本発明のポリペプチドをコードするｍＲＮＡのレベルは、任意の適切な方法を用いてアッセイされ得る。これらは、ノーザンブロット分析、Ｓ１ヌクレアーゼマッピング、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）と組み合わせた逆転写およびリガーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＬＣＲ）と組み合わせた逆転写を含む。

【０３９５】

本発明は、生体試料（例えば、細胞および組織）において本発明のアルブミン融合蛋白質に結合する、結合される、または会合するポリペプチドのレベルを検出するための診断アッセイ、例えば、定量および診断アッセイであって、ポリペプチドの正常なおよび異常なレベルを測定することを含むアッセイにも関する。故に、例えば、正常な対照組織試料と比較した、アルブミン融合蛋白質に結合する、結合される、または会合するポリペプチドの異常な発現を検出するための本発明に従う診断は、腫瘍の存在を検出するために用いられてもよい。宿主に由来する試料における本発明のアルブミン融合蛋白質に結合する、結合される、または会合するポリペプチドのレベルを決定するために用いられ得るアッセイ技法は、当業者によく知られている。かかるアッセイ方法は、ラジオイムノアッセイ、競合的－結合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびＥＬＩＳＡアッセイを含む。生体試料におけるポリペプチドレベルのアッセイは、任意の知られている方法を用いて行うことができる。

【０３９６】

生体試料におけるポリペプチドレベルのアッセイは、様々な技法を用いて行われ得る。例えば、組織中のポリペプチド発現は、古典的な免疫組織学的方法（Ｊａｌｋａｎｅｎら．、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎ，Ｍ．，ら．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７－３０９６（１９８７））を用いて研究され得る。ポリペプチド遺伝子発現を検出するために有用な他の方法は、イムノアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）およびラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）を含む。適当な抗体アッセイ標識は、当該技術分野において知られており、およびグルコースオキシダーゼのごとき酵素標識およびヨウ素（^{125}Ｉ、^{121}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{112}Ｉｎ）およびテクネチウム（^{99m}Ｔｃ）のごとき放射性同位元素およびフルオレセインおよびローダミ

ンのごとき蛍光標識およびビオチンを含む。

【０３９７】

一般的に、分析されるべき組織または細胞型は、目的の遺伝子（例えば、癌のごとき）を発現することが知られているかまたはその疑いのあるものを含み得る。本明細書中用いられる蛋白質単離方法は、例えば、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ（Ｈａｒｌｏｗ，Ｅ．およびＬａｎｅ，Ｄ．，１９８８，”Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）に記載されているものを含んでもよく、該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。単離される細胞は、細胞培養物または患者に由来し得る。培養物から得られた細胞の分析は、細胞に基づく遺伝子治療法の一部として用いられ得る細胞の評価において、または別法では、遺伝子の発現における化合物の効果を試験するために、必須な段階であってもよい。

【０３９８】

例えば、アルブミン融合蛋白質は、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合する、結合される、または会合するポリペプチドの存在を定量的または定性的に検出するために用いられてもよい。これは、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリーまたは蛍光定量による検出と組み合わせた、蛍光標識したアルブミン融合蛋白質を用いる免疫蛍光技法により成し遂げられ得る。

【０３９９】

好ましい一の実施態様において、（例えば、表１に開示される治療用蛋白質）または当該技術分野において知られている少なくとも１つの治療用蛋白質に特異的に結合する抗体の少なくとも１つの断片もしくは変異体を含むアルブミン融合蛋白質を用いて、遺伝子産物または保存変異体またはそのペプチド断片の存在を定量的または定性的に検出してもよい。これは、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光定量による検出と組み合わせた、蛍光標識した抗体を用いる免疫蛍光技法により成し遂げることができる。

【０４００】

さらに、免疫蛍光、免疫電子顕微鏡または非免疫学的アッセイと同様に、本発明のアルブミン融合蛋白質を組織学的に用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合する、結合される、または会合するポリペプチドを検出してもよい。インサイツでの検出は、患者から組織標本を取り出し、次いで、それを標識された本発明の抗体またはポリペプチドへ加えることにより成し遂げられてもよい。好ましくは、アルブミン融合蛋白質は、生体試料上に標識されたアルブミン融合蛋白質を重層することにより、加えられる。かかる方法を用いることにより、アルブミン融合蛋白質に結合する、結合される、または会合するポリペプチドの存在だけでなく、被検組織におけるその分布も測定することができる。本発明を用いて、当業者は、任意の多種多様な組織学的方法（染色法のような）がかかるインサイツでの検出を成し遂げるために修飾することができることを容易に認識するだろう。

【０４０１】

アルブミン融合蛋白質に結合する、結合される、または会合するポリペプチドを検出するイムノアッセイおよび非イムノアッセイは、典型的に、遺伝子産物または保存変異体またはペプチドその断片に結合し得る検出可能に標識抗体の存在下、試料、例えば、生物の体液、組織抽出物、新たに回収した細胞、細胞培養にてインキュベーションされた細胞の溶解物をインキュベーションし、次いで、および当該技術分野においてよく知られている任意の多数の技法により結合された抗体を検出することを含む。

【０４０２】

生体試料は、ニトロセルロースなどの固相支持体もしくは担体、または細胞、細胞粒子もしくは可溶性蛋白質を固定化し得る他の固体支持体と接触させ、次いで、そこに固定化されてもよい。次いで、支持体は適当なバッファーを用いて洗浄され、その後、検出可能に標識された本発明のアルブミン融合蛋白質を用いて処置されてもよい。次いで、固相支持体を、バッファーで２回洗浄し、結合しなかった抗体またはポリペプチドを除去してもよい。所望により、その後抗体を標識する。次いで、固体支持体上に結合された標識の量

を慣用的な手段を用いて検出してもよい。

【０４０３】

「固相支持体もしくは担体」により、ポリペプチド（例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合する、結合される、または会合するアルブミン融合蛋白質またはポリペプチド）に結合し得る任意の支持体が意図される。よく知られている支持体または担体は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩および磁鉄鉱を含む。本発明の目的のために、担体の性質は、ある程度可溶性であるか、または不溶性のいずれかであり得る。カップリングした分子がポリペプチドに結合することができれば、支持物質は、事実上任意の可能な構造形状を有してもよい。故に、支持体の形状は、ビーズにおけるような球状或いは試験管の内表面またはロッドの外表面におけるようなシリンダー状であってもよい。別法では、表面は、シート、試験片などのように平らであってもよい。好ましい支持体はポリスチレンビーズを含む。当業者は、抗体または抗原に結合するための多くの他の適当な担体を知っているか、または慣用的な実験を用いることによりそれを確認することができよう。

【０４０４】

特定ロットのアルブミン融合蛋白質の結合活性がよく知られている方法により測定されてもよい。当業者は、慣用的な実験を用いることによる測定それぞれについての操作的および最適なアッセイ条件を決定することができよう。

【０４０５】

個体から得られた生体試料におけるポリペプチドレベルをアッセイすることに加えて、ポリペプチドはイメージングによってもインビボにて検出できる。例えば、本発明の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、患部細胞または新生物細胞をイメージングするために用いられる。

【０４０６】

本発明のアルブミン融合蛋白質のインビボイメージングのための標識またはマーカーは、Ｘ線撮影、ＮＭＲ、ＭＲＩ、ＣＡＴ－スキャンまたはＥＳＲにより検出可能なものを含む。Ｘ線撮影については、適当な標識は、検出可能な放射線を放出するが、対象に対して過度に有害でないバリウムまたはセシウムのごとき放射性同位元素を含む。ＮＭＲおよびＥＳＲのために適当なマーカーは、重水素のごとき検出可能な特徴的なスピンを有するものを含み、これを、遺伝子操作した細胞株（または細菌または酵母株）の栄養素を標識することにより、アルブミン融合蛋白質中に取り込んでもよい。

【０４０７】

さらに、その存在が検出され得る本発明のアルブミン融合蛋白質が投与され得る。例えば、放射線不透過なまたは他の適切な化合物を用いて標識した本発明のアルブミン融合蛋白質は、標識抗体について上記したように、インビボにおいて投与および可視化され得る。さらに、かかるポリペプチドはインビトロ診断法においても利用され得る。

【０４０８】

適切な検出可能なイメージング部分、例えば、放射性同位元素（例えば、^{131}Ｉ、^{112}Ｉｎ、^{99m}Ｔｃ）、放射線不透過物質、もしくは核磁気共鳴により検出可能な物質を用いて標識されているポリペプチド特異的抗体または抗体断片を、例えば、非経口的、皮下または腹腔内に、障害について検査しようとする哺乳類へ導入する。対象の大きさおよび用いられるイメージング装置が、診断画像を作成するために必要なイメージング部分の量を決定し得ることが、当業者には理解されよう。放射性同位元素部分の場合、ヒト対象について、注入される放射量は、通常、約５～２０ミリキュリーの範囲の９９ｍＴｃであろう。次いで、標識されたアルブミン融合蛋白質は、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合する、結合される、または会合するポリペプチドまたは他の物質を含む体内の部位に選択的に蓄積し得る。インビボでの腫瘍イメージングは、Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌら，”Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ”（Ｃｈａｐｔｅｒ

13 in Tumor Imaging：The Radiochemical detectino of Cancer, S.W.Burchiel and B.A.Rhodes, eds., Masson Publishing Inc.（1982））に記載されている。

【0409】

本発明のアルブミン融合蛋白質が検出可能に標識され得る方法の1つは、それをレポーター酵素に結合させ、次いで、結合した産物を酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）において用いることによる（Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay （ELISA）", 1978, Diagnostic Horizons 2：1－7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD）；Vollerら., J. Clin. Pathol. 31：507－520（1978）；Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73：482－523（1981）；Maggio, E.（ed.）, 1980, EnzymeImmunoassay, CRCPress, BocaRaton, FL, ；Ishikawa, E.ら.,（eds.）, 1981, Enzyme Immunoassay, Kgaku Shoin, Tokyo）。抗体に結合するレポーター酵素は、例えば、分光光度的、蛍光定量的または視覚的手段により検出できる化学的部分を生じるように、適切な基質、好ましくは色素産生性基質と反応させることができる。抗体を検出可能に標識するために用いられ得るレポーター酵素は、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター５－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファーグリセロリン酸、デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベーターガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを含むが、これらに限定されない。さらに、検出は、レポーター酵素用の発色性基質を用いる比色分析方法により成し遂げることができる。同様に調製した標準物に対して、基質の酵素反応の程度を目視比較することにより、検出は成し遂げられてもよい。

【0410】

アルブミン融合蛋白質は、放射標識されてもよく、および任意の様々な他のイムノアッセイにおいて用いられてもよい。例えば、アルブミン融合蛋白質を放射標識することにより、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）においてアルブミン融合蛋白質を用いることが可能である（例えば、Weintraub、B.、Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる）。放射性同位元素は、ガンマカウンター、シンチレーションカウンターまたはオートラジオグラフィーを含むがこれらに限定されない手段により検出され得る。

【0411】

さらに、キレート分子は、当該技術分野において知られており、そしてアルブミン融合蛋白質を標識するために用いられ得る。キレート分子は、アルブミン融合蛋白質に結合され、放射線核種または蛍光標識を含む金属イオンを用いるその蛋白質の標識を促進してもよい。例えば、Subramanian, R.およびMeares, C. F., "Bifunctional Chelating Agents for Radiometal－labeled monoclonal Antibodies," in Cancer Imaging with Radiolabeled Antibodies（D. M. Goldenberg, Ed.）Kluwer Academic Publications, Boston；Saji, H., "Targeted delivery of radiolabeled imaging and therapeu

tic agents: bifunctional radiopharmaceuticals.”Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 16：209－244（1999）；Srivastava S. C. and Mease R. C.,”Progress in research on ligands, nuclides and techniques for labeling monoclonal antibodies.” Int. J. Rad. Appl. Instrum. B 18：589－603（1991）；and Liu, S. and Edwards, D. S.,”Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals.”Bioconjug. Chem. 12：7－34（2001）を参照のこと。該アルブミン融合蛋白質に共有結合され得る任意のキレート剤は、本発明に従って用いられてもよい。キレート剤はさらに、アルブミン融合蛋白質にキレート剤部分を連結するリンカー部分を含んでもよい。

【0412】

一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、非環式キレート剤、例えば、ジエチレントリアミン－N，N，N’，N”，N”－五酢酸（DPTA）、DPTAのアナログおよびDPTAの誘導体に結合される。非限定的な例として、キレート剤は、2－（p－イソチオシアナートベンジル）－6－メチルジエチレントリアミン五酢酸（1B4M－DPTA、MX－DTPAとしても知られている）、2－メチル－6－（rho－ニトロベンジル）－1，4，7－トリアザヘプタン－N，N，N’，N”，N”－五酢酸（ニトロ－1B4M－DTPAまたはニトロ－MX－DTPA）；2－（p－イソチオシアナートベンジル）－シクロヘキシルジエチレントリアミン五酢酸（CHX－DTPA）またはN－［2－アミノ－3－（rho－ニトロフェニル）プロピル］－トランス－シクロヘキサン－1，2－ジアミン－N，N’，N”－五酢酸（ニトロ－CHX－A－DTPA）を含んでもよい。

【0413】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、非環式テルピリジンキレート剤、例えば、6，6”－ビス［［N，N，N”，N”－テトラ（カルボキシメチル）アミノ］メチル］－4’－（3－アミノ－4－メトキシフェニル）－2，2’：6’，2”－テルピリジン（TMT－アミン）に結合される。

【0414】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合されるマクロサイクルキレート剤は、1，4，7，10－テトラアザシクロドデカン－N，N’，N”，N”’－テトラ酢酸（DOTA）である。他の特定の実施態様において、DOTAは、リンカー分子を介して本発明のアルブミン融合蛋白質に結合される。DOTAをポリペプチドへコンジュゲートするために有用なリンカー分子の例は一般的に当該技術分野において知られている。例えば、DeNardoら.，Clin. CancerRes. 4（10）：2483－90，1998；Petersonら.，Bioconjug. Chem. 10（4）：553－7，1999；およびZimmermanら.，Nucl. Med. Biol. 26（8）：943－50，1999を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。加えて、米国特許第5，652，361号および第5，756，065号は、抗体にコンジュゲートされてもよいキレート剤およびそれらの製造方法および使用方法を記載しており、これらは出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。米国特許第5，652，361号および第5，756，065号は、抗体に対するキレート剤のコンジュゲーションに焦点を当てているが、当業者は、他のポリペプチドに対してキレート剤をコンジュゲートするために、そこに開示されている方法を容易に適用できよう。

【0415】

コンジュゲーションが、リガンドの炭素骨格に結合した活性化アームまたは官能基を介するものである、マクロサイクルリガンドに基づく二重機能性キレート剤は、M. Moi

ｅｌａｌ．，Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．４９：２６３９（１９８９）（２－ｐ－ｎｉｔｒｏｂｅｎｚｙｌ－１，４，７，１０－ｔｅｔｒａａｚａｃｙｃｌｏｄｏｄｅｃａｎｅ－Ｎ，Ｎ’，Ｎ”，Ｎ”’－ｔｅｔｒａａｃｅｔｉｃａｃｉｄ）；Ｓ．Ｖ．Ｄｅｓｈｐａｎｄｅら．，Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ３１：４７３（１９９０）；Ｇ．Ｒｕｓｅｒら．，Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．１：３４５（１９９０）；Ｃ．Ｊ．Ｂｒｏａｎら．，Ｊ．Ｃ．Ｓ．Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍ．２３：１７３９（１９９０）；およびＣ．Ｊ．Ａｎｄｅｒｓｏｎら．，Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．３６：８５０（１９９５）に記載のように用いられ得る。

【０４１６】

一の実施態様において、所望により１またはそれ以上のカルボキシ、アミノ、ヒドロキサマート、ホスホナートまたはリン酸基を含むマクロサイクルキレート剤、例えば、ポリアザマクロサイクルキレート剤が本発明のアルブミン融合蛋白質に結合される。別の実施態様において、キレート剤は、ＤＯＴＡ、ＤＯＴＡのアナログおよびＤＯＴＡの誘導体からなる群より選択されるキレート剤である。

【０４１７】

一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合されてもよい適当なキレート剤分子は、ＤＯＸＡ（Ｉ－オキサ－４，７，１０－トリアザシクロドデカントリ酢酸）、ＮＯＴＡ（１，４，７－トリアザシクロノナン三酢酸）、ＴＥＴＡ（１，４，８，１１－テトラアザシクロテトラデカンテトラ酢酸）、およびＴＨＴ（４’－（３－アミノ－４－メトキシ－フェニル）－６，６”－ビス（Ｎ’，Ｎ’－ジカルボキシメチル－Ｎ－メチルヒドラジノ）－２，２’：６’，２”－テルピリジン）、およびそのアナログおよび誘導体を含む。例えば、Ｏｈｍｏｎｏら．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３５：１５７－１６２（１９９２）；Ｋｕｎｇら．，Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ ２５：３２６－３３２（１９８４）；Ｊｕｒｉｓｓｏｎら．，Ｃｈｅｍ．Ｒｅｖ．９３：１１３７－１１５６（１９９３）；および米国特許第５，３６７，０８０号を参照のこと。他の適当なキレート剤は、米国特許第４，６４７，４４７号；第４，６８７，６５９号；第４，８８５，３６３号；ＥＰ－Ａ－７１５６４；Ｗ０８９／００５５７；およびＥＰ－Ａ－２３２７５１において開示されているキレート剤を含む。

【０４１８】

別の実施態様において、本発明において用いられ得る適当なマクロサイクルカルボン酸キレート剤は、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ”，Ｎ”’－テトラ酢酸（ＤＯＴＡ）；１，４，８，１２－テトラアザシクロペンタデカン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－テトラ酢酸（１５Ｎ４）；１，４，７－トリアザシクロノナン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ”－トリ酢酸（９Ｎ３）；１，５，９－トリアザシクロドデカン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ”－トリ酢酸（１２Ｎ３）；および６－ブロモアセトアミド－ベンジル－１，４，８，１１－テトラアザシクロテトラデカン－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－テトラ酢酸（ＢＡＴ）を含む。

【０４１９】

本発明のアルブミン融合蛋白質に結合され得る好ましいキレート剤は、ＭｅＯ－ＤＯＴＡ－ＮＣＳとしても知られている、α－（５－イソチオシアナート２－メトキシフェニル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－テトラ酢酸である。α－（５－イソチオシアナート２－メトキシフェニル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－テトラ酢酸の塩またはエステルも用いられてもよい。

【０４２０】

記載のごときキレート剤が共有結合する本発明のアルブミン融合蛋白質は、治療、診断、または治療および診断の双方を目的として、適当な放射線核種を用いて（キレート剤の配位部位を介して）標識されてもよい。適切な金属の例は、Ａｇ、Ａｔ、Ａｕ、Ｂｉ、Ｃｕ、Ｇａ、Ｈｏ、Ｉｎ、Ｌｕ、Ｐｂ、Ｐｄ、Ｐｍ、Ｐｒ、Ｒｂ、Ｒｅ、Ｒｈ、Ｓｃ、Ｓｒ、Ｔｃ、Ｔｌ、ＹおよびＹｂを含む。診断目的のために用いられる放射線核種の例は、Ｆ

ｅ、Ｇｄ、^{111}Ｉｎ、^{67}ＧａまたはGaを含む。別の実施態様において、診断目的のために用いられる放射線核種は、^{111}ＩｎまたはGaである。治療目的のために用いられる放射線核種の例は、^{166}Ｈｏ、^{165}Ｄｙ、^{90}Ｙ、^{115m}Ｉｎ、^{52}ＦｅまたはGaである。一の実施態様において、治療目的のために用いられる放射線核種は、^{166}ＨｏまたはYである。治療および診断双方を目的として用いられる放射線核種の例は、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ、^{159}Ｇｄ、^{175}Ｙｂ、または^{47}Ｓｃを含む。一の実施態様において、放射線核種は、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ、^{175}Ｙｂ、または^{159}Ｇｄである。

【０４２１】

好ましい金属放射線核種は、^{90}Ｙ、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{47}Ｓｃ、^{67}Ｇａ、^{51}Ｃｒ、^{177m}Ｓｎ、^{67}Ｃｕ、^{167}Ｔｍ、^{97}Ｒｕ、^{188}Ｒｅ、^{177}Ｌｕ、^{199}Ａｕ、^{47}Ｓｃ、^{67}Ｇａ、^{51}Ｃｒ、^{177m}Ｓｎ、^{67}Ｃｕ、^{167}Ｔｍ、^{95}Ｒｕ、^{188}Ｒｅ、^{177}Ｌｕ、^{199}Ａｕ、^{203}Ｐｂおよび^{141}Ｃｅを含む。

【０４２２】

特定の一の実施態様において、キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合蛋白質は、^{90}Ｙ、^{111}Ｉｎ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏ、^{215}ＢｉおよびAcからなる群より選択される金属イオンを用いて標識されてもよい。

【０４２３】

さらに、診断イメージングのために、γ－放出放射線核種、例えば、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{67}ＧａおよびYbが認可されているかまたは研究されており、一方でβ－放射体、例えば、^{67}Ｃｕ、^{111}Ａｇ、^{186}ＲｅおよびYは腫瘍治療に適用するために有用である。さらに他の有用な放射線核種は、γ－放射体、例えば、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{67}ＧａおよびYbおよびβ－放射体、例えば、^{67}Ｃｕ、^{111}Ａｇ、^{186}Ｒｅ、^{188}ＲｅおよびYを含み、ならびに対象とする他の放射線核種は、例えば、^{211}Ａｔ、^{212}Ｂｉ、^{177}Ｌｕ、^{86}Ｒｂ、^{105}Ｒｈ、^{153}Ｓｍ、^{198}Ａｕ、^{149}Ｐｍ、^{85}Ｓｒ、^{142}Ｐｒ、^{214}Ｐｂ、^{109}Ｐｄ、^{166}Ｈｏ、^{208}ＴｌおよびScを含む。キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合蛋白質は、上記の放射線核種を用いて標識されてもよい。

【０４２４】

別の実施態様において、キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合蛋白質は、遷移およびランタニド金属、例えば、原子番号２１－２９、４２、４３、４４、または５７－７１を有する金属のイオン、特に、Ｃｒ、Ｖ、Ｍｎ、Ｆｅ、Ｃｏ、Ｎｉ、Ｃｕ、Ｌａ、Ｃｅ、Ｐｒ、Ｎｄ、Ｐｍ、Ｓｍ、Ｅｕ、Ｇｄ、Ｔｂ、Ｄｙ、Ｈｏ、Ｅｒ、Ｔｍ、ＹｂおよびＬｕのイオンを含む常磁性金属イオンを用いて標識されてもよい。磁気共鳴画像法のために組成物中に用いられる常磁性金属は、原子番号２２～２９、４２、４４および５８～７０を有するエレメントを含む。

【０４２５】

別の実施態様において、キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合蛋白質は、ランタニド、特にＬａ、Ｃｅ、Ｐｒ、Ｎｄ、Ｐｍ、Ｓｍ、Ｅｕ（例えば、^{152}Ｅｕ）、Ｇｄ、Ｔｂ、Ｄｙ、Ｈｏ、Ｅｒ、Ｔｍ、Ｙｂ、およびＬｕを含む蛍光金属イオンを用いて標識されてもよい。

【０４２６】

別の実施態様において、キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合蛋白質は、Ｍｏ、Ｂｉ、ＳｉおよびＷの原子を含んでもよい、重金属を含むレポーターを用いて標識されてもよい。

【０４２７】

蛍光化合物を用いてアルブミン融合蛋白質を標識することが可能である。蛍光標識抗体が適切な波長の光に曝されると、その存在が蛍光に起因して検出され得る。最も一般的に用いられる蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オフトアルデヒドおよびフルオレ

スカミンがある。

【０４２８】

アルブミン融合蛋白質は、^{152}Ｅｕのごとき蛍光放出金属またはランタニド属の他のものを用いて検出可能に標識され得る。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）またはエチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）などの金属キレート基を用いて抗体に結合され得る。

【０４２９】

アルブミン融合蛋白質は、それを化学発光化合物にカップリングすることによっても検出可能に標識され得る。次いで、化学発光標識されたアルブミン融合蛋白質の存在は、化学反応の間に生じる発光の存在を検出することにより測定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマティック（ｔｈｅｒｏｍａｔｉｃ）アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

【０４３０】

同様に、生物発光化合物は、本発明のアルブミン融合蛋白質を標識するために用いられてもよい。生物発光は、生物系において見出される化学発光の一の型であり、ここで、触媒蛋白質は化学発光反応の効率を増大する。生物発光蛋白質は、発光の存在を検出することにより測定される。標識のための重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

【０４３１】

トランスジェニック生物

本発明のアルブミン融合蛋白質を発現するトランスジェニック生物も本発明に含まれる。トランスジェニック生物は遺伝学的に改変された生物であり、その中に組換え、外因性またはクローン化された遺伝物質が移入されている。かかる遺伝物質は多くの場合トランスジーンと言われる。トランスジーンの核酸配列は、コードされた蛋白質の最適な発現および分泌のために必要とされてもよい、１またはそれ以上の転写制御配列およびイントロンのごとき他の核酸配列を含んでもよい。トランスジーンは、生物体または生物体が産生する産物、例えば、生物体の乳、血液、尿、卵、髪または種からのその回収を高めるように、コードされた蛋白質の発現を指令するように設計されてもよい。トランスジーンは、標的動物の種と同種または異種のゲノムに由来する核酸配列からなる。トランスジーンは、そうでなければ特定の核酸配列が正常に見出されないゲノムの遺伝子座またはトランスジーンの正常な遺伝子座のいずれかに組み込まれてもよい。

【０４３２】

用語「生殖細胞系トランスジェニック生物」は、遺伝的改変または遺伝情報を生殖系列細胞系に導入することにより、遺伝情報を子孫へ伝達するトランスジェニック生物の能力を付与されたトランスジェニック生物を言う。かかる子孫が実際にその改変または遺伝情報の幾つかまたは全てを有するならば、それらもトランスジェニック生物である。改変または遺伝情報は、レシピエントが属する生物の種に対して外来のものであってもよく、特定の個体のレシピエントに対してのみ外来であってもよく、またはレシピエントが既に有する遺伝情報であってもよい。後者の場合、改変されたまたは導入された遺伝子は、天然の遺伝子と異なって発現されてもよい。

【０４３３】

トランスジェニック生物は、トランスジェニック動物またはトランスジェニック植物であってもよい。トランスジェニック動物は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、胚性幹細胞および組換えウイルスにおける標的遺伝子導入およびレトロウイルス感染を含む様々な異なる方法により産生できる（例えば、米国特許第４，７３６，８６６号；米国特許第５，６０２，３０７号；Ｍｕｌｌｉｎｓら．（１９９３）Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓｉｏｎ ２２（４）：６３０－６３３；Ｂｒｅｎｉｎら．（１９９７）Ｓｕｒｇ．Ｏｎｃｏｌ．６（２）９９－１１０；Ｔｕａｎ（ｅｄ．），Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｍｅｔｈ

ｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｎｏ． ６２， Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（１９９７）を参照のこと）。組換え能力をもつ哺乳類細胞中に核酸断片を導入する方法は、複数の核酸分子の共形質転換を支持する任意の方法により行うことができる。トランスジェニック動物を産生するための詳細な方法は当業者に容易に入手可能であり、米国特許第５，４８９，７４３号および米国特許第５，６０２，３０７号における開示内容を含む。

【０４３４】

多数の組換えまたはトランスジェニックマウスが生産されており、活性型癌遺伝子配列を発現するもの（米国特許第４，７３６，８６６号）；サルＳＶ４０Ｔ－抗原を発現するもの（米国特許第５，７２８，９１５号）；インターフェロン調節因子１（ＩＲＦ－１）の発現を欠失しているもの（米国特許第５，７３１，４９０号）；ドーパミン作動性機能障害（米国特許第５，７２３，７１９号）を示すもの；血圧制御に関与する少なくとも１つのヒト遺伝子を発現するもの（米国特許第５，７３１，４８９号）；自然発症性アルツハイマー病に見られる状態と大きな類似性を示すもの（米国特許第５，７２０，９３６号）；細胞接着を媒介する能力が低下したもの（米国特許第５，６０２，３０７号）；ウシ成長ホルモン遺伝子を有するもの（Ｃｌｕｔｔｅｒら．（１９９６）Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １４３（４）：１７５３－１７６０）；または十分なヒト抗体応答を生じ得るもの（ＭｃＣａｒｔｈｙ（１９９７）Ｔｈｅ Ｌａｎｃｅｔ ３４９（９０４９）：４０５）を含む。

【０４３５】

マウスおよびラットは依然としてほとんどのトランスジェニック実験のために選択される動物であるが、幾つかの場合、別の動物種を用いることが好ましく、またはさらには必要とされる。トランスジェニック法は、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジー、ハムスター、ウサギ、ウシおよびモルモットを含む様々なネズミでない動物において首尾よく利用されている（例えば、Ｋｉｍら．（１９９７）Ｍｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｄｅｖ．４６（４）：５１５－５２６；Ｈｏｕｄｅｂｍｅ（ＩＹＹＤＪ ｘｅｐｒｏｄ Ｎｕｔｒ Ｄｅｖ． ３５（６）：６０９－６１７；Ｆｅｔｔｅｒｓ（１９９４）Ｒｅｐｒｏｄ．Ｆｅｒｔｉｌ．Ｄｅｖ．６（５）：６４３－６４５；Ｓｃｈｎｉｅｋｅら．（１９９７）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７８（５３４６）：２１３０－２１３３；およびＡｍｏａｈ（１９９７）Ｊ．Ａｎｉｍａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ７５（２）：５７８－５８５を参照のこと）。

【０４３６】

本発明のトランスジーンによりコードされた蛋白質のトランスジェニック動物の乳汁中への分泌を指令するためには、哺乳類上皮細胞において選択的に活性化されたプロモーターの制御下にそれを置いてもよい。乳蛋白質をコードする遺伝子を制御するプロモーター、例えば、カゼイン、ベータラクトグロブリン、乳清酸蛋白質、またはラクトアルブミンのためのプロモーター（例えば、ＤｉＴｕｌｌｉｏ（１９９２）ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０ ：７４－７７；Ｃｌａｒｋら．（１９８９）ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７：４８７４９２；Ｇｏｒｔｏｎら．（１９８７）ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ５：１１８３－１１８７；およびＳｏｕｌｉｅｒら．（１９９２） ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｓ．２９７：１３を参照のこと）が好ましい。選択するトランスジェニック哺乳類、例えばヤギ、ウシ、ラクダまたはヒツジは、大量の乳汁を生じ、および長い乳汁分泌期間を有する。

【０４３７】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、トランスジェニック植物、例えば、ＤＮＡトランスジーンを核またはプラスチドゲノムに挿入した植物において発現させることもできる。植物細胞またはプロトプラスト中に外来核酸を導入するために用いられる植物形質転換法は、当該技術分野において知られている。一般的に、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．１５３（”Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ Ｐａｒｔ Ｄ”）１９８７、Ｗｕ ａｎｄ Ｇｒｏｓｓｍａｎ Ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓおよび欧特許出願ＥＰ ６９３５５４を参照のこと。遺伝子操作された植物の生産方法は、米国特許

第５，２８３，１８４号、米国特許第５，４８２，８５２号および欧特許出願ＥＰ　６９３　５５４においてさらに記載されており、その全ては出典明示により本明細書の一部となる。

【０４３８】

医薬または治療用組成物

本発明のアルブミン融合蛋白質またはその処方は、非経口（例えば、皮下または筋内）注入または静脈内注入を含む任意の慣用的な方法により投与されてもよい。処置は、特定期間にわたって、単一回投与または複数回投与から構成されてもよい。

【０４３９】

本発明のアルブミン融合蛋白質は単独投与され得るが、１またはそれ以上の許容される担体と一緒に医薬処方としてそれを提供することが好ましい。１または複数の担体は、アルブミン融合蛋白質に適合し、かつそのレシピエントに有害ではないという意味において「許容される」必要がある。典型的に、担体は、滅菌およびパイロジェン不含であり得る水または生理的食塩水であろう。本発明のアルブミン融合蛋白質は、特に、溶液中のそれらの拡大された貯蔵寿命のために、パイロジェン不含滅菌水、生理的食塩水または他の等張溶液のごとき水性担体中の処方に十分に適する。例えば、医薬本発明の組成物は、十分に前もって、例えば、投与される数週間前または数ヶ月間前またはそれ以上の期間前に、処方されてもよい。

【０４４０】

例えば、アルブミン融合蛋白質を含む処方は、水性処方中のアルブミン融合蛋白質の延長された貯蔵寿命を考慮して調製されてもよい。上記したように、多くのこれらの治療用蛋白質の貯蔵寿命は、ＨＡに融合された後、著しく増大または延長される。

【０４４１】

エアロゾル投与が適切な場合、本発明のアルブミン融合蛋白質は、標準的な方法を用いてエアロゾルとして処方され得る。用語「エアロゾル」は、細気管支または鼻腔経路中へ吸入され得る、本発明のアルブミン融合蛋白質の任意のガス中（ｇａｓ－ｂｏｒｎｅ）懸濁相を言う。特に、エアロゾルは、本発明のアルブミン融合蛋白質の小滴からなるガス中懸濁物を含み、これは、一定用量吸入器またはネブライザーまたはミストスプレーで生成してもよい。エアロゾルは、空気または他の担体ガス中に懸濁させた本発明の化合物のドライパウダー組成物も含み、それは吸入デバイスからの吹き込みにより送達されてもよい。例えば、Ｇａｎｄｅｒｔｏｎ＆Ｊｏｎｅｓ、Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｔｏ　ｔｈｅ　Ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ　Ｔｒａｃｔ，Ｅｌｌｉｓ　Ｈｏｒｗｏｏｄ（１９８７）；Ｇｏｎｄａ（１９９０）Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　ｉｎ　ＴＨｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　６：２７３－３１３；およびＲａｅｂｕｍら，．（１９９２）Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ２７：１４３－１５９を参照のこと。

【０４４２】

典型的に、本発明の処方は、一つには適切な種に由来するアルブミン融合蛋白質の成分を用いるために、非免疫原性でもある。例えば、ヒトへの使用のために、アルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質およびアルブミン部分の両方が、典型的にヒト由来であり得る。どちらかの成分がヒト由来でない幾つかの場合、主要なアミノ酸を置換することにより、その成分をヒト化させてもよく、その結果、特定のエピトープは、ヒト免疫系にとって、外来ではなくヒトの性質であると思われる。

【０４４３】

処方は都合よく単位投与形態にて提供されてもよく、および調剤分野においてよく知られている任意の方法により調製されてもよい。かかる方法は、アルブミン融合蛋白質を、１またはそれ以上の補助成分を構成する担体と結合させる段階を含む。一般的に、処方は、活性成分と液体担体または微粉状の固形担体またはその両方を均一かつ密接に混合し、次いで必要に応じて、製品として成形することにより、調製する。

【０４４４】

非経口投与に適する処方は、対象レシピエントに適した処方にする抗酸化剤、バッファー、静菌剤および溶質を含む水性および非水性滅菌注入溶液；ならびに懸濁剤および増粘剤を含んでもよい水性および非水性滅菌懸濁液を包含する。処方は、単位投与用または複数回投与用容器、例えば密封されたアンプル、バイアルまたはシリンジ中にて提供されてもよく、および使用直前に注入用滅菌液体担体、例えば水を添加するだけでよいフリーズドライ（凍結乾燥）状態で提供されてもよい。即席の注入溶液および懸濁液は、滅菌散剤から調製されてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質の多くが拡大された血清半減期を示すことから、治療用蛋白質の非融合の標準的処方と比較して、より低いモル濃度またはより低い投与量の治療用蛋白質部分を含んでもよい。

【０４４５】

例として、本発明のアルブミン融合蛋白質が、１またはそれ以上の治療用蛋白質領域として表１の「治療用蛋白質：Ｘ」の欄に記載の蛋白質の１つを含む場合、投与形態は、天然の治療用蛋白質のものと比較したアルブミン融合蛋白質の血清半減期および貯蔵寿命が延長されていることを考慮しながら、治療用蛋白質単独の効力に対するアルブミン融合蛋白質の効力に基づいて計算することができる。例えば、治療用蛋白質が典型的に０．３～３０．０ＩＵ／ｋｇ／週または０．９～１２．０ＩＵ／ｋｇ／週で投与されるならば、一年またはそれ以上にわたって、３または７回に分けて投与される。治療用蛋白質に融合した全長ＨＡからなるアルブミン融合蛋白質では、単位に関しては同等の用量でも、より大きい薬剤重量を示すことになるが、投与頻度は、例えば１週間に２回、１週間に１回またはそれ未満に減らすことができる。

【０４４６】

処方または本発明の組成物は、アルブミン融合蛋白質成分の拡大された貯蔵寿命について記載した説明書または添付文書と一緒にパッケージされるか、またはキットに納めることができる。例えば、かかる説明書または添付文書は、本発明のアルブミン融合蛋白質の拡大されたまたは延長された貯蔵寿命を考慮した、時間、温度および光などの推奨される貯蔵条件を記載している。かかる説明書または添付文書は、本発明のアルブミン融合蛋白質の特定の利点、例えば、管理された病院、診療所または会社環境以外の現場での使用が必要となり得る処方についての貯蔵の容易さを記載していてもよい。上記のように、本発明の処方は、水性形態であってもよく、および理想に満たない状況において、治療活性を有意に損なうことなく貯蔵され得る。

【０４４７】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、栄養補助食品に含ませることができる。例えば、特定の本発明のアルブミン融合蛋白質は、アルブミン融合蛋白質を発現するトランスジェニック哺乳類から得られた乳または乳製品を含む、天然物質中にて投与されてもよい。かかる組成物は、アルブミン融合蛋白質を発現するトランスジェニック植物から得られた植物または植物生成物も含み得る。アルブミン融合蛋白質は、他の知られている添加剤、担体、充填剤および希釈剤を伴うまたは伴うことなく、散剤または錠剤形態でも提供され得る。栄養補助食品は、Ｓｃｏｔｔ Ｈｅｇｅｎｈａｒｔ，Ｆｏｏｄ Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｄｅｓｉｇｎ，Ｄｅｃ．１９９３にて記載されている。

【０４４８】

本発明は、医薬上許容される担体中の有効量の本発明のアルブミン融合蛋白質または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド（「アルブミン融合ポリヌクレオチド」）を対象に投与することにより、疾患または障害（例えば、本明細書中に開示される任意の１またはそれ以上の疾患または障害のごとき）を処置および／または予防する方法も提供する。

【０４４９】

アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、個々の患者の臨床状態（特に、アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチド単独による処置の副作用）、送達部位、投与方法、投与スケジュールおよび当業者に知られている他の要因を考慮して、良好な医療実施にかなうように、処方および投与することができる。従って、本明細書

の目的のための「有効量」はこれらを考慮することにより決定される。

【０４５０】

一般的に提案されるように、非経口投与されるアルブミン融合蛋白質の１用量あたりの医薬上の合計有効量は、患者体重の約１ｕｇ／ｋｇ／日～１０ｍｇ／ｋｇ／日の範囲であり得るが、上記したように、これは治療判断に影響され得る。より好ましくは、この用量は、少なくとも０．０１ｍｇ／ｋｇ／日であり、およびヒトについて最も好ましくは、ホルモンの場合、約０．０１～１ｍｇ／ｋｇ／日である。連続投与されるならば、典型的に、アルブミン融合白質は、例えばミニポンプを用いて、１日あたり１～４回の注入または連続的な皮下注入のいずれかにより、約１ｕｇ／ｋｇ／時間～約５０ｕｇ／ｋｇ／時間の投与速度で投与される。静脈用バッグ溶液も用いられてもよい。変化を観察するのに必要とされる処置期間および処置から応答が現れるまでの時間は、所望の効果に応じて変化すると思われる。

【０４５１】

上記したように、本発明のアルブミン融合蛋白質は、治療用蛋白質部分（またはその断片もしくは変異体）単独と比べるとより高い血漿安定性を有する。投与されるべきアルブミン融合蛋白質の１用量あたりの有効量および用量投与スケジュールを決定する場合、この血漿安定性における増大を考慮する必要がある。特に、より高い血漿安定性により、投与頻度が同じ場合にはより低い用量でのアルブミン融合蛋白質の投与が可能となり、或いは、アルブミン融合蛋白質をより少ない頻度で投与してもよい。好ましくは、より高い安定性により、本発明のアルブミン融合蛋白質を低い頻度で投与してもよい。より好ましくは、アルブミン融合蛋白質は、２週間ごとに１回投与され得る。さらにより好ましくは、アルブミン融合蛋白質の薬物動態に依存して、アルブミン融合蛋白質は３、４、５またはそれ以上の週ごとに１回投与され得る。例えば、上記したように、ＩＦＮ－アルファ－ＨＳＡ融合蛋白質の薬物動態は、２～４週またはそれ以上ごとに１回の投与計画および４週または４週以上ごとに１回の間隔での投与を支持する。

【０４５２】

アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、経口、直腸内、非経口、大槽内、膣内、腹腔内、局所（例えば、散剤、軟膏、ゲル、ドロップまたは経皮パッチによる）、頬側投与されるか、または経口または経鼻スプレーとして投与され得る。「医薬上許容される担体」は、任意の無毒の固形、半固形もしくは液体充填剤、希釈剤、カプセル化物質または処方補助剤を言う。本明細書中、用語「非経口」は、静脈内、筋内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内注入および注入を含む投与方法を言う。

【０４５３】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチは、徐放系によっても適切に投与される。徐放性アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドの例は、経口、直腸内、非経口、大槽内、膣内、腹腔内、局所（例えば、散剤、軟膏、ゲル、ドロップまたは経皮パッチによる）、頬側投与されるか、または経口または経鼻スプレーとして投与される。「医薬上許容される担体」は、任意の型の無毒の固形、半固形もしくは液体充填剤、希釈剤、カプセル化物質または処方補助剤を言う。本明細書中、用語「非経口」は、静脈内、筋内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内注入および注入を含む投与方法を言う。徐放性アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドのさらなる例は、適当なポリマー材料（例えば、造形した物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態をした半透性ポリマー材料）、適当な疎水性物質（例えば許容されるオイル中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂、および難溶性誘導体（例えば、難溶性塩のごとき）を含む。

【０４５４】

徐放性マトリックスは、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号，ＥＰ５８，４８１），Ｌ－グルタミン酸およびガンマーエチル－Ｌ－グルタマートのコポリマー（Ｓｉｄｍａｎら．，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２２：５４７－５５６（１９８３）），ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリラート）（Ｌａｎｇｅｒら．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａ

ｔｅｒ．Ｒｅｓ．１５：１６７－２７７（１９８１），およびＬａｎｇｅｒ，Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．　１２：９８－１０５（１９８２））、エチレンビニルアセタート（Ｌａｎｇｅｒ　ｅｔａｕ．，Ｉｄ．）またはポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸（ＥＰ１３３，９８８）を含む。

【０４５５】

徐放性アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、リポソーム封入された本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドも含む（一般的に、Ｌａｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９：１５２７－１５３３（１９９０）；Ｔｒｅａｔら．，ｉｎ　Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ　ｉｎ　ｔｈｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｏｆ　Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　Ｄｉｓｅａｓｅ　ａｎｄ　Ｃａｎｃｅｒ，Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ　ａｎｄ　Ｆｉｄｌｅｒ（ｅｄｓ．），Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ｐｐ．３１７－３２７および３５３－３６５（１９８９）を参照のこと）。アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドを含むリポソームは、他に関係なく：ＤＥ　３，２１８，１２１；Ｅｐｓｔｅｉｎら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）８２：３６８８－３６９２（１９８５）；Ｈｗａｎｇら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）７７：４０３０－４０３４（１９８０）；ＥＰ　５２，３２２；ＥＰ　３６，６７６；ＥＰ　８８，０４６；ＥＰ　１４３，９４９；ＥＰ　１４２，６４１；日本特許出願８３－１１８００８；米特許第４，４８５，０４５号および第４，５４４，５４５号；およびＥＰ１０２，３２４：にて知られている方法により調製される。通常、リポソームは、小さな（約２００－８００オングストローム）単層型であり、その脂質含有量は、約３０ｍｏｌパーセントのコレステロールよりも大きく、選択する割合は最適な治療剤に適合させる。

【０４５６】

さらなる一層の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、ポンプにより送達される（上記のＬａｎｇｅｒ；Ｓｅｆｔｏｎ，ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１（１９８７）；Ｂｕｃｈｗａｌｄら．，Ｓｕｒｇｅｒｙ　８８：５０７（１９８０）；Ｓａｕｄｅｋら．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４（１９８９）を参照のこと）。

【０４５７】

他の放出制御系は、Ｌａｎｇｅｒによる報文（Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９：１５２７－１５３３（１９９０））において議論されている。

【０４５８】

非経口投与のために、一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、一般的に、単位用量の注入可能な形態（溶液、懸濁液またはエマルジョン）中、それを所望の純度で医薬上許容される担体、すなわち、用いる用量および濃度においてレシピエントに毒性がなく、および処方の他の成分と適合するものと混合することにより処方される。例えば、好ましくは、処方は酸化剤および治療剤に対して有害であることが知られている他の化合物を含まない。

【０４５９】

一般的に、処方は、アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドを液体担体または微粉状の固体担体またはその両方と均一かつ密接に接触させることにより調製される。次いで、必要ならば、生成物は所望の処方に形成される。好ましくは、担体は非経口用担体であり、より好ましくは、レシピエントの血液と等張な溶液である。かかる担体ビヒクルの例は、水、生理的食塩水、Ｒｉｎｇｅｒ’ｓ溶液およびデキストロース溶液を含む。固定油およびオレイン酸エチルのごとき非水性ビヒクルならびにリポソームも本明細書中有用である。

【０４６０】

適当には、担体は添加剤、例えば、等張性および化学安定性を高める物質を少量含む。かかる物質は、用いる用量および濃度においてレシピエントに対して毒性がなく、およびバッファー、例えば、リン酸、クエン酸、コハク酸、酢酸および他の有機酸またはそれら

の塩；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸；低分子量（約１０残基未満の）ポリペプチド、例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド；蛋白質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニン；単糖、二糖およびセルロースまたはその誘導体、グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の糖；キレート剤、例えば、ＥＤＴＡ；糖アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトール；対イオン、例えば、ナトリウム；および／または非イオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート（例えば、Ｔｗｅｅｎ－２０を含む）、ポリオキサマー（ｐｏｌｏｘａｍｅｒｓ）またはＰＥＧを含む。

【０４６１】

アルブミン融合蛋白質は、典型的に、約０．１ｍｇ／ｍｌ～１００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１～１０ｍｇ／ｍｌの濃度、約３～８のｐＨで、かかるビヒクル中に処方される。特定の前記した賦形剤、担体または安定化剤がポリペプチド塩の形成をもたらし得ることが理解されよう。

【０４６２】

治療投与のために用いられる任意の医薬は滅菌することができる。滅菌は、滅菌濾過メンブレン（例えば、０．２ミクロンのメンブレン）を介した濾過により容易に成し遂げられる。アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、一般的に無菌の進入口を有する容器、例えば、皮下注入針により貫通可能なストッパーを有する静脈溶液用バックまたはバイアル中にセットされる。

【０４６３】

通常、アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、単位投与用または複数回投与用容器、例えば、密封されたアンプルまたはバイアル中に、水溶液または復元のための凍結乾燥処方として、貯蔵され得る。凍結乾燥処方の例として、１０ｍｌのバイアルは、５ｍｌの滅菌濾過された１％（ｗ／ｖ）の水性アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチド溶液で満たされ、そして得られた混合物が凍結乾燥される。注入溶液は、注入のための静菌水を用いて、凍結乾燥されたアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドを復元することにより調製される。

【０４６４】

特定および好ましい一の実施態様において、アルブミン融合蛋白質処方は、０．０１Ｍのリン酸ナトリウム、０．１５ｍＭの塩化ナトリウム、１ミリグラムの融合蛋白質あたり０．１６マイクロモルのオクタン酸ナトリウム、１ミリリットルのポリソルベート８０あたり１５マイクログラム、ｐＨ７．２を含む。別の特定および好ましい実施態様において、アルブミン融合蛋白質処方は、０．０１Ｍのリン酸ナトリウム、０．１５ｍＭの塩化ナトリウム、１ミリグラムの融合蛋白質あたり０．１６マイクロモルのオクタン酸ナトリウム、１ミリリットルあたり１５マイクログラムのポリソルベート８０、ｐＨ７．２を含む。ｐＨおよびバッファーは、生理学的条件に適合するように選択され、および張度調節剤として塩を加える。オクタン酸ナトリウムは、溶液中の蛋白質の温度安定性を増大する能力が報告されていることから、選択した。最後に、ポリソルベートは、一般的界面活性剤として加えられ、溶液の表面張力を低下させ、および容器密閉系に対するアルブミン融合蛋白質の非特異的吸着を軽減する。

【０４６５】

本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドの１またはそれ以上の成分が充填された１またはそれ以上の容器を含む医薬パックまたはキットも提供する。かかる一または複数の容器には、医薬または生物製品の製造、使用または販売を規制する政府機関により規定された形式の注意書きを備えることができる。その注意書きは、当局による、ヒトへの投与のための製造、使用または販売の認可を示すものである。加えて、アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドを他の治療用化合物と併用してもよい。

【０４６６】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、単独またはアジュバントと組み合わせて投与されてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよいアジュバントは、ミョウバン、ミョウバンとデオキシコール酸塩（ＩｍｍｕｎｏＡｇ）、ＭＴＰ－ＰＥ（Ｂｉｏｃｉｎｅ　Ｃｏｒｐ．）、ＱＳ２１（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、Ｉｎｃ．）、ＢＣＧ（例えば、ＴＨＥＲＡＣＹＳ（登録商標））ＭＰＬおよびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍの無生育性（ｎｏｎｖｉａｂｌｅ）調製物を含むが、これらに限定されない。特定の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、ミョウバンと組み合わせて投与される。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、ＱＳ－２１と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよいさらなるアジュバントは、モノホスホリル脂質免疫調製剤、ＡｄｊｕＶａｘ　１００ａ、ＱＳ－２１、ＱＳ－１８、ＣＲＬ１００５、アルミニウム塩、ＭＦ－５９およびヴィロソマル（Ｖｉｒｏｓｏｍａｌ）アジュバント技法を含むが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよいワクチンは、ＭＭＲ（はしか、おたふく風邪、風疹）、ポリオ、水疱瘡、破傷風／ジフテリア、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、ヘモウイルスインフルエンザＢ菌、百日咳、肺炎、肝炎、ライム病、ロタウイルス、コレラ、黄熱病、日本脳炎、灰白髄炎、狂犬病、腸チフスおよび百日咳を防御するワクチンを含むが、これらに限定されない。組み合わせは、例えば混合物として同時に、別々だが同時または一緒に；または連続して投与されてもよい。これは、組み合わせた剤を治療混合物として一緒に投与する形態、および、組み合わせた剤が別々だが同時に投与する方法、例えば別々の静脈内経路を介して同じ個体へ投与する方法を含む。「組み合わせ」投与はさらに、初めに化合物または剤の１つを投与し、次いで、第２のものを投与する個別投与を含む。

【０４６７】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、単独または他の治療剤と組み合わせて投与されてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与されてもよいアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチド剤は、化学治療剤、抗生物質、ステロイドおよび非ステロイド系抗－炎症剤、慣用的な免疫治療剤、および／または以下に記載の治療用処置を含むが、これらに限定されない。組み合わせは、例えば混合物として同時に、別々だが同時または一緒に；または連続して投与されてもよい。これは、組み合わせた剤が治療混合物として一緒に投与される形態、および、組み合わせた剤が別々だが同時に投与する方法、例えば別々の静脈内経路を介して同じ個体へ投与する方法を含む。「組み合わせ」投与はさらに、初めに化合物または剤の１つを投与し、次いで、第２のものを投与する個別投与を含む。

【０４６８】

一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、抗凝血剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物と一緒に投与される抗凝血剤は、ヘパリン、低分子量ヘパリン、ワルファリンナトリウム（例えば、ＣＯＵＭＡＤＩＮ（登録商標））、ジクマロール、４－ヒドロキシクマリン、アニシンジオン（例えば、ＭＩＲＡＤＯＮ（登録商標））、アセノクマロール（例えば、ニクマロン、ＳＩＮＴＨＲＯＭＥ（登録商標））、インダン－１、３－ジオン、フェンプロクモン（例えば、ＭＡＲＣＵＭＡＲ（登録商標））、ビスクマセタートエチル（例えば、ＴＲＯＭＥＸＡＮ（登録商標））およびアスピリンを含むが、これらに限定されない。特定の一の実施態様において、本発明の組成物は、ヘパリンおよび／またはワルファリンと組み合わせて投与される。別の特定の実施態様において、本発明の組成物は、ワルファリンと組み合わせて投与される。別の特定の実施態様において、本発明の組成物は、ワルファリンおよびアスピリンと組み合わせて投与される。別の特定の実施態様において、本発明の組成物は、ヘパリンと組み合わせて投与される。別の特定の実施態様において、本発明の組成物は、ヘパリンおよびアスピリンと組み合わせて投与される。

【０４６９】
別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、血栓溶解剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物と一緒に投与されてもよい血栓溶解剤は、プラスミノーゲン、ｌｙｓ－プラスミノーゲン、アルファ２－抗プラスミン、ストレプトキナーゼ（例えば、ＫＡＢＩＫＩＮＡＳＥ（登録商標））、抗レスプラス（ａｎｔｉｒｅｓｐｌａｃｅ）（例えば、ＥＭＩＮＡＳＥ（登録商標））、組織プラスミノーゲン活性化剤（ｔ－ＰＡ、アルテバーゼ、ＡＣＴＩＶＡＳＥ（登録商標））、ウロキナーゼ（例えば、ＡＢＢＯＫＩＮＡＳＥ（登録商標））、ソールプラーゼ、（プロウロキナーゼ、一本鎖ウロキナーゼ）およびアミノカプロン酸（例えば、ＡＭＩＣＡＲ（登録商標））を含むが、これらに限定されない。特定の一の実施態様において、本発明の組成物は、組織プラスミノーゲン活性化剤およびアスピリンと組み合わせて投与される。

【０４７０】
別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、血小板凝集阻害剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物と一緒に投与されてもよい血小板凝集阻害剤は、アスピリン、ジピリダモール（例えば、ＰＥＲＳＡＮＴＩＮＥ（登録商標））およびチクロピジン（例えば、ＴＩＣＬＩＤ（登録商標））を含むが、これらに限定されない。

【０４７１】
特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせた抗血液凝固剤、血栓溶解剤および／または血小板凝集阻害剤の使用は、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、血栓塞栓症、肺塞栓症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、一過性脳虚血発作、不安定狭心症の予防、診断および／または処置のために熟慮される。特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせた抗凝血剤、血栓溶解剤および／または血小板凝集阻害剤の使用は、伏在移植片の閉塞の予防、血管形成術に付随し得る手術周辺血栓症の危険性の減少、非リウマチ性心房細動を含む心房細動を有する患者における脳卒中の危険性の減少、人工心臓弁および／または僧帽弁疾患に関連する塞栓症の危険性の減少のために熟慮される。単独または抗血小板剤、抗凝血剤および／または血栓溶解剤と組み合わせた本発明の治療剤の他の使用は、体外デバイス（例えば、血管内カニューレ、血液透析患者における血管進入シャント、血液透析機器、および心肺バイパス機器）における閉塞の予防を含むが、これらに限定されない。

【０４７２】
特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、抗レトロウイルス剤、ヌクレオシド／ヌクレオチド逆転写酵素阻害剤（ＮＲＴＩ）、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（ＮＮＲＴＩ）および／またはプロテアーゼ阻害剤（ＰＩｓ）と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与されるＮＲＴＩは、ＲＥＴＲＯＶＩＲ（登録商標）（ジドブジン／ＡＺＴ）、ＶＩＤＥＺ（登録商標）（ジダノシン／ｄｄｌ）、ＨＩＶＩＤ（登録商標）（ザルシタビン／ｄｄＣ）、ＺＥＲＩＴ（登録商標）（スタブジン／ｄ４Ｔ）、ＥＰＩＶＩＲ（登録商標）（ラミブジン／３ＴＣ）およびＣＯＭＢＩＶＩＲ（登録商標）（ジドブジン／ラミブジン）を含むが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与されるＮＮＲＴＩは、ＲＥＴＲＯＶＩＲ（登録商標）（ジドブジン／ＡＺＴ）、ＶＩＤＥＸ（登録商標）（ジダノシン／ｄｄＩ）、ＨＩＶＩＤ（登録商標）（ザルシタビン／ｄｄＣ）、ＺＥＲＩＴ（登録商標）（スタブジン／ｄ４Ｔ）、ＥＰＩＶＩＲ（登録商標）（ラミブジン／３ＴＣ）およびＣＯＭＢＩＶＩＲ（登録商標）（ジドブジン／ラミブジン）を含むが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与されてもよいＮＮＲＴＩは、ＶＩＲＡＭＵＮＥ（登録商標）（ネビラピン）、ＲＥＳＣＲＩＰＴＯＲ（登録商標）（デラビルジン）およびＳＵＳＴＩＶＡ（登録商標）（エファビレンツ）を含むが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合蛋白質および／ま

たはポリヌクレオチドと組み合わせて投与されてもよいプロテアーゼ阻害剤は、ＣＲＩＸＩＶＡＮ（登録商標）（インジナビル）、ＮＯＲＶＩＲ（登録商標）（リトナビル）、ＩＮＶＩＲＡＳＥ（登録商標）（サキナビル）およびＶＩＲＡＣＥＰＴ（登録商標）（ネルフィナビル）を含むが、これらに限定されない。一の特定の実施態様において、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤および／またはプロテアーゼ阻害剤は、ＡＩＤＳを処置するため、および／またはＨＩＶ感染を予防するために、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドとの任意の組み合わせで用いられてもよい。

【０４７３】

さらなるＮＲＴＩは、ＬＯＤＥＮＯＳＩＮＥ（登録商標）（Ｆ－ｄｄＡ；酸安定性アデノシンＮＲＴＩ；Ｔｒｉａｎｇｌｅ／Ａｂｂｏｔｔ；ＣＯＶＩＲＡＣＩＬ（登録商標）（エムトリシタビン／ＦＴＣ；構造的にラミブジン（３ＴＣ）に関連するが、３～１０倍より大きいインビトロ活性を有する；Ｔｒｉａｎｇｌｅ／Ａｂｂｏｔｔ）；ｄＯＴＣ（ＢＣＨ－１０６５２、さらに構造的にラミブジンに関連するが、実質的比率のラミブジン耐性単離物に対して、活性を保持する；Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｐｈａｒｍａ）；アデフォビル（抗ＨＩＶ治療のためにＦＤＡにより認可されていない；Ｇｉｌｅａｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）；ＰＲＥＶＥＯＮ（登録商標）（Ａｄｅｆｏｖｉｒ　Ｄｉｐｉｖｏｘｉｌ、アデフォビルの活性プロドラッグ；その活性形態はＰＭＥＡ－ｐｐである）；ＴＥＮＯＦＯＶＩＲ（登録商標）（ｂｉｓ－ＰＯＣＰＭＰＡ、ＰＭＰＡプロドラッグ；Ｇｉｌｅａｄ）；ＤＡＰＤ／ＤＸＧ（ＤＡＰＤの活性代謝物；Ｔｒｉａｎｇｌｅ／Ａｂｂｏｔｔ）；Ｄ－Ｄ４ＦＣ（３ＴＣに関連する、ＡＺＴ／３ＴＣ耐性ウイルスに対抗する活性を有する）；ＧＷ４２０８６７Ｘ（ＧｌａｘｏＷｅｌｌｃｏｍｅ）；ＺＩＡＧＥＮ（登録商標）（アバカビル／１５９Ｕ８９；ＧｌａｘｏＷｅｌｌｃｏｍｅＩｎｃ．）；ＣＳ－８７（３’アジド－２’、３’－ジデオキシウリジン；ＷＯ９９／６６９３６）；およびβ－Ｌ－ＦＤ４Ｃおよびβ－Ｌ－ＦｄｄＣ（ＷＯ９８／１７２８１）のＳ－アシル－２－チオエチル（ＳＡＴＥ）をもたらすプロドラッグ形態を含む。

【０４７４】

さらなるＮＮＲＴＩは、ＣＯＡＣＴＩＮＯＮ（登録商標）（エンビリン／ＭＫＣ－４４２、ＨＥＰＴクラスの強力なＮＮＲＴＩ；Ｔｒｉａｎｇｌｅ／Ａｂｂｏｔｔ）；ＣＡＰＲＡＶＩＲＩＮＥ（登録商標）（ＡＧ－１５４９／Ｓ－１１５３、Ｋ１０３Ｎ変異体を含むウイルスに対抗する活性を有する次世代ＮＮＲＴＩ；Ａｇｏｕｒｏｎ）；ＰＮＵ－１４２７２１（その先祖デラビルジンよりも２０～５０倍より大きい活性を有し、およびＫ１０３Ｎ変異体に対抗する活性がある；Ｐｈａｒｍａｃｉａ＆Ｕｐｊｏｈｎ）；ＤＰＣ－９６１およびＤＰＣ－９６３（エファビレンツの第２世代誘導体、Ｋ１０３Ｎ変異を有するウイルスに対抗する活性があるように設計される；ＤｕＰｏｎｔ）；ＧＷ－４２０８６７Ｘ（ＨＢＹ０９７より２５倍より大きい活性を有し、Ｋ１０３Ｎ変異体に対抗する活性がある；ＧｌａｘｏＷｅｌｌｃｏｍｅ）；ＣＡＬＡＮＯＬＩＤＥＡ（ゴムの木から自然に生じる；Ｙ１８１ＣおよびＫ１０３Ｎ変異のいずれかまたは両方を含むウイルスに対抗する活性がある）；およびプロポリス（ＷＯ　９９／４９８３０）を含む。

【０４７５】

さらなるプロテアーゼ阻害剤は、ＬＯＰＩＮＡＶＩＲ（登録商標）（ＡＢＴ３７８／ｒ；Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）；ＢＭＳ－２３２６３２（アザペプチド；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｒｅｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）；ＴＩＰＲＡＮＡＶＩＲ（登録商標）（ＰＮＵ－１４０６９０、非消化性ジヒドロピロン；Ｐｈａｒｍａｃｉａ＆Ｕｐｊｏｈｎ）；ＰＤ－１７８３９０（非ペプチド性ジヒドロピロン；Ｐａｒｋｅ－Ｄａｖｉｓ）；ＢＭＳ２３２６３２（アザペプチド；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）；Ｌ－７５６、４２３（インジナビルアナログ；Ｍｅｒｃｋ）；ＤＭＰ－４５０（環状尿素化合物；Ａｖｉｄ＆ＤｕＰｏｎｔ）；ＡＧ－１７７６（プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルスに対抗するインビトロ活性を有するペプチド模倣物；Ａｇｏｕｒｏｎ）；ＶＸ－１７５／ＧＷ－４３３９０８（アンプレナビルのホスフェートプロドラッグ；Ｖｅｒｔｅｘ＆Ｇｌａｘｏ

Ｗｅｌｃｏｍｅ）；ＣＧＰ６１７５５（Ｃｉｂａ）；およびＡＧＥＮＥＲＡＳＥ（登録商標）（アンプレナビル；Ｇｌａｘｏ　Ｗｅｌｌｃｏｍｅ　Ｉｎｃ．）を含む。

【０４７６】

さらなる抗レトロウイルス剤は、融合阻害剤／ｇｐ４１結合剤を含む。融合阻害剤／ｇｐ４１結合剤には、Ｔ－２０（その休止状態にてｇｐ４１に結合し、融合誘導状態への形質転換を阻止するＨＩＶｇｐ４１膜貫通型蛋白質の外部ドメインの６４３－６７８残基に由来するペプチド；Ｔｒｉｍｅｒｉｓ）およびＴ－１２４９（第２世代融合阻害剤；Ｔｒｉｍｅｒｉｓ）を含む。

【０４７７】

さらなる抗レトロウイルス剤は、融合阻害剤／ケモカイン受容体アンタゴニストを含む。融合阻害剤／ケモカイン受容体アンタゴニストは、ＣＸＣＲ４アンタゴニスト、例えば、ＡＭＤ３１００（バイサイクラム（ｂｉｃｙｃｌａｍ））、ＳＤＦ－１およびそのアナログならびにＡＬＸ４０－４Ｃ（カチオン性ペプチド）、Ｔ２２（１８個のアミノ酸のペプチド；Ｔｒｉｍｅｒｉｓ）およびＴ２２アナログＴ１３４およびＴ１４０；ＣＣＲ５アンタゴニスト、例えば、ＲＡＮＴＥＳ（９－６８）、ＡＯＰ－ＲＡＮＴＥＳ、ＮＮＹ－ＲＡＮＴＥＳおよびＴＡＫ－７７９；ならびにＣＣＲ５／ＣＸＣＲ４アンタゴニスト、例えば、ＮＳＣ６５１０１６（ジスタマイシンアナログ）を含む。ＣＣＲ２Ｂ、ＣＣＲ３およびＣＣＲ６アンタゴニストも含む。ケモカイン受容体アゴニスト、例えば、ＲＡＮＴＥＳ、ＳＤＦ－１、ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１βなども融合を阻害してもよい。

【０４７８】

さらなる抗レトロウイルス剤は、インテグラーゼ阻害剤を含む。インテグラーゼ阻害剤は、ジカフェオイルキナ酸（ＤＦＱＡ）；Ｌ－キコル酸（ジカフェオイル酒石酸（ＤＣＴＡ））；キナリザリン（ＱＬＣ）および関連アントラキノン；ＺＩＮＴＥＶＩＲ（登録商標）（ＡＲ１７７、真性インテグラーゼ阻害剤としてよりも細胞表面で作用すると考えられるオリゴヌクレオチド；Ａｒｏｎｄｅｘ）；およびＷＯ９８／５０３４７において開示されているようなナフトールを含む。

【０４７９】

さらなる抗レトロウイルス剤は、ヒドロキシ尿素様化合物、例えば、ＢＣＸ－３４（プリンヌクレオチドホスホリラーゼ阻害剤；Ｂｉｏｃｒｙｓｔ）；リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤、例えば、ＤＩＤＯＸ（登録商標）（Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ　ｆｏｒ　Ｈｅａｌｔｈ）；イノシンモノホスフェートデヒドロゲナーゼ（ＩＭＰＤＨ）阻害剤、例えば、ＶＸ－４９７（Ｖｅｒｔｅｘ）；およびミコフェノール酸、例えば、ＣｅｌｌＣｅｐｔ（ミコフェノラートモフェチル；Ｒｏｃｈｅ）を含む。

【０４８０】

さらなる抗レトロウイルス剤は、ウイルスインテグラーゼの阻害剤、ウイルスゲノム核転座の阻害剤、例えば、アリーレンビス（メチルケトン）化合物；ＨＩＶ侵入の阻害剤、例えば、ＡＯＰ－ＲＡＮＴＥＳ、ＮＮＹ－ＲＡＮＴＥＳ、ＲＡＮＴＥＳ－ＩｇＧ融合蛋白質、ＲＡＮＴＥＳおよびグリコサミノグリカン（ＧＡＧ）の可溶性複合体、ならびにＡＭＤ－３１００；ヌクレオカプシドジンクフィンガー阻害剤、例えば、ジチアン化合物；ＨＩＶＴａｔおよびＲｅｖの標的；および薬理エンハンサー、例えば、ＡＢＴ－３７８を含む。

【０４８１】

他の抗レトロウイルス治療剤および補助治療剤は、サイトカインおよびリンホカイン、例えば、ＭＩＰ－１α、ＭｌＰ－１β、ＳＤＦ－１α、ＩＬ－２、ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ（登録商標）（アルデスロイキン／Ｌ２－７００１；Ｃｈｉｒｏｎ）、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、およびＩＬ－１３；インターフェロン、例えば、ＩＦＮ－アルファ２ａ、ＩＦＮ－アルファ２ｂまたはＩＦＮ－ベータ；ＴＮＦｓ、ＮＦκＢ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦおよびＩＬ－１０のアンタゴニスト；免疫活性化調節剤、例えば、シクロスポリンおよびプレドニゾン；ワクチン、例えば、Ｒｅｍｕｎｅ（登録商標）（ＨＩＶＩｍｍｕｎｏｇｅｎ）、ＡＰＬ４００－００３（Ａｐｏｌｌｏｎ）、組換えｇｐ１２０および断片

、二価（Ｂ／Ｅ）組換えエンベロープ糖蛋白質、ｒｇｐ１２０ＣＭ２３５、ＭＮｒｇｐｌ２０、ＳＦ－２ｒｇｐｌ２０、ｇｐｌ２０／可溶性ＣＤ４複合体、デルタＪＲ－ＦＬ蛋白質、不連続ｇｐｌ２０Ｃ３／Ｃ４ドメインに由来する分岐合成ペプチド、融合－コンピテント免疫原およびＧａｇ、Ｐｏｌ、ＮｅｆおよびＴａｔワクチン；遺伝子に基づく治療、例えば、遺伝子抑制エレメント（ＧＳＥｓ；ＷＯ９８／５４３６６）、およびイントラカイン（新しく合成されたＣＣＲ５の表面発現を阻害するために、ＥＲにターゲッティングされた遺伝子修飾ＣＣケモカイン（Ｙａｎｇら、ＰＮＡＳ９４：１１５６７－７２（１９９７）；Ｃｈｅｎら．、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．３：１１１０－１６（１９９７））；抗体、例えば、抗－ＣＸＣＲ４抗体１２Ｇ５、抗－ＣＣＲ５抗体２Ｄ７、５Ｃ７、ＰＡ８、ＰＡ９、ＰＡ１０、ＰＡ１１、ＰＡ１２およびＰＡ１４、抗－ＣＤ４抗体Ｑ４１２０およびＲＰＡ－Ｔ４、抗－ＣＣＲ３抗体７Ｂ１１、抗－ｇｐｌ２０抗体１７ｂ、４８ｄ、４４７－５２Ｄ、２５７－Ｄ、２６８－Ｄおよび５０．１、抗－Ｔａｔ抗体、抗－ＴＮＦ－ａ抗体、およびモノクローナル抗体３３Ａ；アリール炭素水素（ＡＨ）受容体アゴニストおよびアンタゴニスト、例えば、ＴＣＤＤ、３，３’，４，４’，５－ペンタクロロビフェニル，３，３’，４，４’－テトラクロロビフェニル、およびα－ナフトフラボン（ＷＯ９８／３０２１３）；および抗酸化剤、例えば、γ－Ｌ－グルタミル－Ｌ－システインエチルエステル（ｙ－ＧＣＥ；ＷＯ９９／５６７６４）を含む。

【０４８２】

さらなる一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、抗ウイルス剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい抗ウイルス剤は、アシクロビル、リバビリン、アマンタジン、レマンチジン、マクサミン（ｍａｘａｍｉｎｅ）またはチマルファシンを含むが、これらに限定されない。特に、インターフェロンアルブミン融合蛋白質は、任意のこれらの剤と組み合わせて投与され得る。さらに、インターフェロンアルファアルブミン融合蛋白質も、任意のこれらの剤と一緒に投与され得、および好ましくは、インターフェロンアルファ２ａまたは２ｂアルブミン融合蛋白質が任意のこれらの剤と一緒に投与され得る。さらに、インターフェロンベータアルブミン融合蛋白質も、任意のこれらの剤と一緒に投与され得る。さらに、任意のＩＦＮハイブリッドアルブミン融合蛋白質は、任意のこれらの剤と組み合わせて投与され得る。

【０４８３】

最も好ましい一の実施態様において、インターフェロンアルブミン融合蛋白質は、リバビリンと組み合わせて投与される。さらに好ましい一の実施態様において、インターフェロンアルファアルブミン融合蛋白質は、リバビリンと組み合わせて投与される。さらに好ましい一の実施態様において、インターフェロンアルファ２ａアルブミン融合蛋白質は、リバビリンと組み合わせて投与される。さらに好ましい一の実施態様において、インターフェロンアルファ２ｂアルブミン融合蛋白質は、リバビリンと組み合わせて投与される。さらに好ましい一の実施態様において、インターフェロンベータアルブミン融合蛋白質は、リバビリンと組み合わせて投与される。さらに好ましい一の実施態様において、ハイブリッドインターフェロンアルブミン融合蛋白質は、リバビリンと組み合わせて投与される。

【０４８４】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、抗－日和見感染剤と組み合わせて投与されてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与されてもよい抗－日和見剤は、ＴＲＩＭＥＴＨＯＰＲＩＭ－ＳＵＬＦＡＭＥＴＨＯＸＡＺＯＬＥ（登録商標）、ダプソン（登録商標）、ＰＥＮＴＡＭＩＤＩＮＥ（登録商標）、ＡＴＯＶＡＱＵＯＮＥ（登録商標）、ＩＳＯＮＩＡＺＩＤ（登録商標）、ＲＩＦＡＢＵＴＩＮ（登録商標）、ＰＹＲＡＺＩＮＡＭＩＤＥＴＭ（登録商標）、ＥＴＨＡＭＢＵＴＯＬ（登録商標）、ＲＩＦＡＢＵＴＩＮ（登録商標）、ＣＬＡＲＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ（登録商標）、ＡＺＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ（登録商標）、ＧＡＮＣＩＣＬＯＶＩＲ（登録商標）、ＦＯＳＣＡＲＮＥＴ（登録商標）

、ＣＩＤＯＦＯＶＩＲ（登録商標）、ＦＬＵＣＯＮＡＺＯＬＥ（登録商標）、ＩＴＲＡＣＯＮＡＺＯＬＥ（登録商標）、ケトコナゾール（登録商標）、ＡＣＹＣＬＯＶＩＲ（登録商標）、ＦＡＭＣＩＣＯＬＶＩＲ（登録商標）、ＰＹＲＩＭＥＴＨＡＭＩＮＥ（登録商標）、ロイコボリン（登録商標）、ＮＥＵＰＯＧＥＮ（登録商標）（フィルグラスチム／Ｇ－ＣＳＦ）、およびＬＥＵＫＩＮＥ（登録商標）（サルグラスチム／ＧＭ－ＣＳＦ）を含むが、これらに限定されない。特定の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、日和見ニューモサイティスカリニ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ　ｃａｒｉｎｉｉ）肺炎感染を予防的処置または予防するために、ＲＩＭＥＴＨＯＰＲＩＭ－ＳＵＬＦＡＭＥＴＨＯＸＡＺＯＬＥ（登録商標）、ダプソン（登録商標）、ＰＥＮＴＡＭＩＤＩＮＥ（登録商標）および／またはＡＴＯＶＡＱＵＯＮＥ（登録商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、日和見マイコバクテリウムアビウム（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｖｉｕｍ）複合感染を予防的処置または予防するために、ＩＳＯＮＩＡＺＩＤ（登録商標）、ＲＩＦＡＢＵＴＩＮ（登録商標）、ＰＹＲＡＺＩＮＡＭＩＤＥＴＭ（登録商標）および／またはＥＴＨＡＭＢＵＴＯＬ（登録商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、日和見マイコバクテリウム（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）結核菌感染を予防的処置または予防するために、ＲＩＦＡＢＵＴＩＮ（登録商標）、ＣＬＡＲＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ（登録商標）および／またはＡＺＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ（登録商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、日和見サイトメガロウイルス感染を予防的処置または予防するために、ＧＡＮＣＩＣＬＯＶＩＲ（登録商標）、ＦＯＳＣＡＲＮＥＴ（登録商標）および／またはＣＩＤＯＦＯＶＩＲ（登録商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、日和見真菌感染を予防的処置または予防するために、ＦＬＵＣＯＮＡＺＯＬＥ（登録商標）、ＩＴＲＡＣＯＮＡＺＯＬＥ（登録商標）および／またはケトコナゾール（登録商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、日和見単純ヘルペスウイルスＩ型および／またはＩＩ型感染を予防的処置または予防するために、ＡＣＹＣＬＯＶＩＲ（登録商標）および／またはＦＡＭＣＩＣＯＬＶＩＲ（登録商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、日和見トキソプラスマ原虫（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ　ｇｏｎｄｉｉ）感染を予防的処置または予防するために、ＰＹＲＩＭＥＴＨＡＭＩＮＥ（登録商標）および／またはロイコボリン（登録商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、日和見細菌感染を予防的処置または予防するために、ロイコボリン（登録商標）および／またはＮＥＵＰＯＧＥＮ（登録商標）と任意に組み合わせて用いられる。

【０４８５】

さらなる一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、抗生剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい抗生剤は、アモキシシリン、ベーターラクタマーゼ、アミノグリコシド、ベーターラクタム（グリコペプチド）、ベーターラクタマーゼ、クリンダマイシン、クロラムフェニコール、セファロスポリン、シプロフロキサシン、エリスロマイシン、フルオロキノロン、マクロライド、メトロニダゾール、ペニシリン、キノロン、ラパマイシン、リファンピン、ストレプトマイシン、スルホンアミド、テトラサイクリン、トリメトプリム、トリメトプリム－スルファメトキサゾールおよびバンコマイシンを含むが、これらに限定されない。

【０４８６】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチ

ドは、免疫賦活剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい免疫賦活剤は、レバミゾール（例えば、ＥＲＧＡＭＩＳＯＬ（登録商標））、イソプリノシン（例えば、ＩＮＯＳＩＰＬＥＸ（登録商標））、インターフェロン（例えば、インターフェロンアルファ）、およびインターロイキン（例えば、ＩＬ－２）を含むが、これらに限定されない。

【０４８７】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、免疫抑制剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい免疫抑制剤は、ステロイド、シクロスポリン、シクロスポリンアナログ、シクロホスホアミドメチルプレドニゾン、プレドニゾン、アザチオプリン、ＦＫ－５０６、１５－デオキシスペルグアリン、およびＴ細胞に応答する機能を抑制することにより作用する他の免疫抑制剤を含むが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい他の免疫抑制剤は、プレドニゾロン、メトトレキセート、サリドマイド、メトキサレン、ラパマイシン、レフルノミド、ミゾリビン（ＢＲＥＤＩＮＩＮ（登録商標））、ブレキナル、デオキシスペルグアリン、およびアザスピラン（ＳＫＦ１０５６８５）、ＯＲＴＨＯＣＬＯＮＥＯＫＴ（登録商標）３（ムロモナブ－ＣＤ３）、ＳＡＮＤＩＭＭＵＮＥ（登録商標）、ＮＥＯＲＡＬ（登録商標）、ＳＡＮＧＤＹＡ（登録商標）（シクロスポリン）、ＰＲＯＧＲＡＦ（登録商標）（ＦＫ５０６、タクロリムス）、ＣＥＬＬＣＥＰＴ（登録商標）（ミコフェノラートモテフィル、その活性代謝物はミコフェノール酸である）、ＩＭＵＲＡＮ（登録商標）（アザチオプリン）、グルココルチコステロイド、副腎皮質ステロイド、例えば、オキソ遷移金属錯体を含むが、これらに限定されない。一の特定の実施態様において、免疫抑制剤は、臓器または骨髄移植の拒絶を予防するために用いられてもよい。

【０４８８】

さらなる一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、単独または１またはそれ以上の静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい静脈内免疫グロブリン調製物は、ＧＡＭＭＡＲ（登録商標）、ＩＶＥＥＧＡＭ（登録商標）、ＳＡＮＤＯＧＬＯＢＵＬＩＮ（登録商標）、ＧＡＭＭＡＧＡＲＤＳ／Ｄ（登録商標）、ＡＴＧＡＭ（登録商標）（抗胸腺細胞グロブリン）およびＧＡＭＩＭＵＮＥ（登録商標）を含むが、これらに限定されない。一の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、移植療法（例えば、骨髄移植）において静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。

【０４８９】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、単独または併用療法の部分として、インビボにおいて患者またはインビトロにおいて細胞のいずれかへ投与される。一の特定の実施態様において、アルブミン融合蛋白質、特にＩＬ－２－アルブミン融合物は、Ｄｕｄｌｅｙら．（Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｅｘｐｒｅｓｓ、１９ Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２００２．、ａｔ ｗｗｗ．ｓｃｉｅｎｃｅｅｘｐｒｅｓｓ．ｏｒｇ、出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）において記載されているように、転移性メラノーマのための養子細胞移植療法のごとき、癌のための受動的免疫療法の間、繰り返し投与される。特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、単独または抗炎症剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい抗炎症剤は、コルチコステロイド（例えばベタメタゾン、ブデソニド、コルチゾン、デキサメサゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾンおよびトリアムシノロン）、非ステロイド性抗炎症剤（例えば、ジクロフェナク、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェン、フロクタフェニン、フルルビプロフェン、イビプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、メクロフェナム酸、メフェナム酸、メ

ロキシカム、ナブメトン、ナプロキセン、オキサプロジン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダク、テノキシカム、チアプロフェン酸およびトルメチン）ならびに抗ヒスタミン剤、アミノアリールカルボン酸誘導体、アリール酢酸誘導体、アリール酪酸誘導体、アリールカルボン酸、アリールプロピオン酸誘導体、ピラゾール、ピラゾロン、サリチル酸誘導体、チアジンカルボキサミド、ｅ－アセトアミドカプロン酸、Ｓ－アデノシルメチオニン、３－アミノ－４－ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン、ベンダザック、ベンジダミン、ブコローム、ジフェンピラミド、ジタゾール、エモルファゾン、グアイアズレン、ナブメトン、ニメスリド、オルゴテイン、オキサセプロール、ピラニリン、ペリソキサール、ピホキシム、プロクァゾン、プロキサゾールおよびテニダップを含むが、これらに限定されない。

【０４９０】

さらなる一の実施態様において、本発明の組成物は、単独または抗血管新生剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物と一緒に投与されてもよい抗血管新生剤は、アンジオスタチン（Ｅｎｔｒｅｍｅｄ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）、トロポニン－１（ＢｏｓｔｏｎＬｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）、抗侵襲因子、レチノイン酸およびその誘導体、パクリタキセル（タキソール）、スラミン、メタロプロテイナーゼ－１の組織阻害剤、メタロプロテイナーゼ－２の組織阻害剤、ＶＥＧＩ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤－１、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤－２、および様々な形態の軽い「ｄ族」遷移金属を含むが、これらに限定されない。

【０４９１】

軽い「ｄ族」遷移金属は、例えば、バナジウム、モリブデン、タングステン、チタニウム、ニオブおよびタンタルの種を含む。かかる遷移金属の種は、遷移金属錯体を形成してもよい。上記した遷移金属の種の適当な錯体は、オキソ遷移金属錯体を含む。

【０４９２】

バナジウム錯体の典型例は、オキソバナジウム錯体、例えば、バナジン酸塩およびバナジル錯体を含む。適当なバナジン酸塩錯体は、メタバナジン酸塩および／またはオルトバナジン酸塩錯体、例えば、アンモニウムメタバナジン酸塩、ナトリウムメタバナジン酸塩、およびナトリウムオルトバナジン酸塩を含む。適当なバナジル錯体は、例えば、バナジルアセチルアセトナートおよび硫酸バナジル一および三水和物のごとき硫酸バナジル水和物を含む硫酸バナジルを含む。

【０４９３】

タングステンおよびモリブデン錯体の典型例は、オキソ錯体も含む。適当なオキソタングステン錯体は、タングステン酸および酸化タングステン錯体を含む。適当なタングステン酸錯体は、アンモニウムタングステン酸、カルシウムタングステン酸、ナトリウムタングステン酸二水和物、およびタングステン酸を含む。適当な酸化タングステンは、酸化タングステン（ＩＶ）および酸化タングステン（ＶＩ）を含む。適当なオキソモリブデン錯体は、モリブデン酸、酸化モリブデンおよびモリブデニル錯体を含む。適当なモリブデン酸錯体は、モリブデン酸アンモニウムおよびその水和物、ナトリウムモリブデン酸およびその水和物、およびモリブデン酸カリウムおよびその水和物を含む。適当な酸化モリブデンは、酸化モリブデン（Ｖｎ）、酸化モリブデン（ＶＩ）およびモリブデン酸を含む。適当なモリブデニル錯体は、例えば、モリブデニルアセチルアセトナートを含む。他の適当なタングステンおよびモリブデン錯体は、例えば、グリセロール、酒石酸、および糖に由来するヒドロキソ誘導体を含む。

【０４９４】

多種多様な他の抗－血管新生因子が、本発明の文脈において利用されてもよい。典型例は、血小板因子４；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（ズワイガニ殻から調製）、（Ｍｕｒａｔａら．，ＣａｎｖｅｒＲｅｓ．５１：２２－２６，（１９９１））；硫酸化多糖ペプチドグリカン複合体（ＳＰ－ＰＧ）（この化合物の機能はエストロゲンのごときステロイドおよびタモキシフェンクエン酸塩の存在により高められてもよい）；スタウロスポリン；マトリックス代謝物の修飾因子、例えば、プロリンアナログ、シスヒドロキシプ

ロリン、ｄ、Ｌ－３，４－デヒドロプロリン、チアプロリン、アルファ、アルファ－ジピリジル、アミノプロピオニトリルフマル酸塩を含む；４－プロピル－５－（４－ピリジニル）－２（３Ｈ）－オキサゾロン；メトトレキセート；ミトキサントロン；ヘパリン；インターフェロン；２マクログロブリン－血清；ＣｈＩＭＰ－３（Ｐａｖｌｏｆｆら．、Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．２６７：１７３２１－１７３２６，（１９９２））；キモスタチン（Ｔｏｍｋｉｎｓｏｎら．，ＢｉｏｃｈｅｍＪ．２８６：４７５４８０，（１９９２））；シクロデキストリンテトラデカサルフェート；エポネマイシン；カンプトテシン；フマギリン（Ｉｎｇｂｅｒら．，Ｎａｔｕｒｅ３４８：５５５－５５７，（１９９０））；金チオリンゴ酸ナトリウム（「ＧＳＴ」；ＭａｔｓｕｂａｒａおよびＺｉｆｆ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．７９：１４４０－１４４６，（１９８７））；抗コラゲナーゼ－血清；アルファ２－抗プラスミン（Ｈｏｌｍｅｓら．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２（４）：１６５９－１６６４，（１９８７））；ビサントレン（ＮａｔｉｏｎａｌＣａｎｃｅｒＩｎｓｔｉｔｕｔｅ）；ロベンザリットジナトリウム（Ｎ－（２）－カルボキシフェニル－４－クロロアントロニル酸ジナトリウムまたは「ＣＣＡ」；（Ｔａｋｅｕｃｈｉら．，ＡｇｅｎｔｓＡｃｔｉｏｎｓ３６：３１２－３１６，（１９９２））；およびＢＢ９４のごときメタロプロテイナーゼ阻害剤を含むが、これらに限定されない。

【０４９５】

本発明の文脈において利用されてもよいさらなる抗－血管新生因子は、サリドマイド、（Ｃｅｌｇｅｎｅ，Ｗａｒｒｅｎ，ＮＪ）；アンジオスタティックステロイド；ＡＧＭ－１４７０（Ｈ．ＢｒｅｍおよびＪ．ＦｏｌｋｍａｎＪ　Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｓｕｒｇ．２８：４４５－５１（１９９３））；インテグリンアルファｖベータ３アンタゴニスト（Ｃ．Ｓｔｏｒｇａｒｄら．，Ｊ　Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０３：４７－５４（１９９９））；カルボキシアミノールミダゾール；カルボキシアミドトリアゾール（ＣＡＩ）（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）；Ｃｏｎｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎ　Ａ－４（ＣＡ４Ｐ）（ＯＸｉＧＥＮＥ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）；スクアラミン（Ｍａｇａｉｎｉｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｐｌｙｍｏｕｔｈ　Ｍｅｅｔｉｎｇ，ＰＡ）；ＴＮＰ４７０，（Ｔａｐ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＩＬ）；ＺＤ－０１０１　ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ（Ｌｏｎｄｏｎ，ＵＫ）；ＡＰＲＡ（ＣＴ２５８４）；ベネフィン，バイロスタチン－１（ＳＣ３３９５５５）；ＣＧＰ４１２５１（ＰＫＣ４１２）；ＣＭ１０１；デクスラゾキサン（ＩＣＲＦ１８７）；ＤＭＸＡＡ；エンドスタチン；フラボプリジオール；ゲネステイン；ＧＴＥ；ＩｍｍＴｈｅｒ；イレッサ（ＺＤ１８３９）；オクトレオチド（ソマトスタチン）；パンレチン；ペナシルアミン；フォトポイント；ＰＩ－８８；プリノマスタット（ＡＧ－３３４０）プルリチン；スラディスカ（ＦＣＥ２６６４４）；タモキシフェン（Ｎｏｌｖａｄｅｘ）；タザロテン；テトラチオモリブデン酸；ゼローダ（カペシタビン）；および５－フルオロウラシルを含む。

【０４９６】

本発明の化合物と組み合わせて投与されてもよい抗－血管新生阻害剤は、様々な機序を通して作用してもよく、該機序は、成長因子のごとき血管新生誘導因子の機能をアンタゴナイズし、および増殖性内皮細胞上で発現されるインテグリン受容体を阻害することによる、細胞外マトリックスの蛋白質分解の阻害、内皮細胞－細胞外マトリックス接着分子の機能のブロッキングを含む。細胞外マトリックス蛋白質分解と相互作用し、および本発明の組成物と組み合わせて投与されてもよい抗－血管新生阻害剤の例は、ＡＧ－３３４０（Ａｇｏｕｒｏｎ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ），ＢＡＹ－１２－９５６６（Ｂａｙｅｒ，Ｗｅｓｔ　Ｈａｖｅｎ，ＣＴ），ＢＭＳ－２７５２９１（Ｂｒｉｓｔｏｌ　Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，ＮＪ），ＣＧＳ－２７０３２Ａ（Ｎｏｖａｒｔｉｓ，Ｅａｓｔ　Ｈａｎｏｖｅｒ，ＮＪ），マリマスタット（Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ），およびメタスタット（Ａｅｔｅｍａ，Ｓｔ－Ｆｏｙ，Ｑｕｅｂｅｃ）を含むが、これらに限定されない。内皮細胞－細胞外マトリックス接着分子の機能をブロッキングすることにより作用し、および本発明の組成物と組み合わせて投与されて

もよい抗－血管新生阻害剤の例は、ＥＭＤ－１２１９７４（Ｍｅｒｃｋ ＫｃｇａＡ Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）およびバイタクシン（Ｉｘｓｙｓ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ／Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を含むが、これらに限定されない。血管新生誘導因子を直接アンタゴナイズまたは阻害することにより作用し、および本発明の組成物と組み合わせて投与されてもよい抗－血管新生阻害剤の例は、Ａｎｇｉｏｚｙｍｅ（Ｒｉｂｏｚｙｍｅ，Ｂｏｕｌｄｅｒ，ＣＯ）、抗－ＶＥＧＦ抗体（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓ．Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）、ＰＴＫ－７８７／ＺＫ－２２５８４６（Ｎｏｖａｒｔｉｓ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、ＳＵ－１０１（Ｓｕｇｅｎ，Ｓ．Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）、ＳＵ－５４１６（Ｓｕｇｅｎ／Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｕｐｊｏｈｎ，Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ，ＮＪ）、およびＳＵ－６６６８（Ｓｕｇｅｎ）を含むが、これらに限定されない。他の抗－血管新生阻害剤は間接的に作用し、血管新生を阻害する。本発明の組成物と組み合わせて投与されてもよい血管新生の間接的な阻害剤の例は、ＩＭ－８６２（Ｃｙｔｒａｎ，Ｋｉｒｋｌａｎｄ，ＷＡ）、インターフェロン－アルファ、ＩＬ－１２（Ｒｏｃｈｅ，Ｎｕｔｌｅｙ，ＮＪ）、およびペントサンポリサルフェート（Ｇｅｏｒｇｅｔｏｗｎ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ）を含むが、これらに限定されない。

【０４９７】

特定の実施態様において、抗－血管新生阻害剤と組み合わせた本発明の組成物の使用は、自己免疫疾患、例えば本明細書中記載されている自己免疫疾患の処置、予防および／または緩和のために熟慮される。

【０４９８】

特定の一の実施態様において、抗－血管新生阻害剤と組み合わせた本発明の組成物の使用が、関節炎の処置、予防および／または緩和のために熟慮される。より特定の一の実施態様において、抗－血管新生阻害剤と組み合わせた本発明の組成物の使用は、関節リウマチの処置、予防および／または緩和のために熟慮される。

【０４９９】

別の実施態様において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、血管新生蛋白質、または血管新生蛋白質をコードするポリヌクレオチドと組み合わせて投与される。本発明の組成物と一緒に投与されてもよい血管新生蛋白質の例は、酸性および塩基性線維芽成長因子、ＶＥＧＦ－１、ＶＥＧＦ－２、ＶＥＧＦ－３、上皮成長因子アルファおよびベータ、血小板由来内皮細胞成長因子、血小板由来成長因子、腫瘍壊死因子アルファ、肝細胞成長因子、インスリン様成長因子、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子および一酸化窒素シンターゼを含むが、これらに限定されない。

【０５００】

さらなる実施態様において、本発明の組成物は、化学治療剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい化学治療剤は、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード（例えば、メクロレタミン、シクロホスホアミド、シクロホスホアミドイフォスファミド、メルファラン（Ｌ－サルコリシン）、およびクロランブシル）、エチレンイミンおよびメチルメルアミン（例えば、ヘキサメチルメルアミンおよびチオテパ）、アルキルスルホナート（例えば、ブスルファン、）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロリムスチン（ＣＣＮＵ）、セムスチン（メチル－ＣＣＮＵ）、およびストレプトゾシン（ストレプトゾトシン））、トリアゼン（例えば、ダカルバジン（ＤＴＩＣ；ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキサミド））、葉酸アナログ（例えば、メトトレキセート（アメトプテリン））、ピリミジンアナログ（例えば、フルオロウアシル（５－フルオロウラシル；５－ＦＵ）、フロクスウリジン（フルオロデオキシウリジン；ＦｕｄＲ）、およびシタラビン（サイトシンアラビノサイド））、プリンアナログおよび関連する阻害剤（例えば、メルカプトプリン（６－メルカプトプリン；６－ＭＰ）、チオグアニン（６－チオグアニン；ＴＧ）、およびペントスタチン（２’－デオキシコホルマイシン））、ビンカアルカロイ

ド（例えば、ビンブラスチン（ＶＬＢ、ビンブラスチンサルフェート））およびビンクリスチン（ビンクリスチンサルフェート））、エピポドフィロ毒素（例えば、エトポシドおよびテニポシド）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ）、ダウノルビシン（ダウノマイシン；ルビドマイシン）、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、およびマイトマイシン（マイトマイシンＣ）、酵素（例えば、Ｌ－アスパラギナーゼ）、生物学的応答修飾因子（例えば、インターフェロン－アルファおよびインターフェロン－アルファ－２ｂ）、白金配位化合物（例えば、シスプラチン（シス－ＤＤＰ）およびカルボプラチン）、アントラセンジオン（ミトキサントロン）、置換尿素（例えば、ヒドロキシ尿素）、メチルヒドラジン誘導体（例えば、プロカルバジン（Ｎ－メチルヒドラジン；ＭＩＨ）、副腎皮質ステロイド（例えば、プレドニゾン）、プロゲスチン（例えば、ヒドロキシプロゲステロンカプロアート、メドロキシプロゲステロン、メドロキシプロゲステロンアセテート、およびメゲストロールアセテート）、エストロゲン（例えば、ジエチルスチルベストロール（ＤＥＳ）、ジエチルスチルベストロールジホスフェート、エストラジオール、およびエチニルエストラジオール）、抗エストロゲン（例えば、タモキシフェン）、アンドロゲン（テストステロンプロプリオナート、およびフルオキシメステロン）、抗アンドロゲン（例えば、フルタミド）、ゴナドトロピン放出ホルモンアナログ（例えば、リュープロリド）、他のホルモンおよびホルモンアナログ（例えば、メチルテストステロン、エストラサイト、エストラサイトホスフェートナトリウム、クロロトリアニセン、およびテストラクトン）、および他のもの（例えば、ジカルバジン、グルタミン酸、およびミトタン）を含むが、これらに限定されない。

【０５０１】

一の実施態様において、本発明の組成物は、１またはそれ以上の以下の薬剤と組み合わせて投与される：インフリキシマブ（Ｒｅｍｉｃａｄｅ（登録商標）Ｃｅｎｔｏｃｏｒ、Ｉｎｃ．としても知られている）、トロカード（Ｒｏｃｈｅ，ＲＯ－３２－３５５５），レフルノミド（Ｈｏｅｃｈｓｔ　Ｍａｒｉｏｎ　Ｒｏｕｓｓｅ1からのＡｒａｖａ（登録商標）としても知られている），Ｋｉｎｅｒｅｔ（登録商標）（Ａｍｇｅｎ，Ｉｎｃ．からのＡｎａｋｉｎｒａとしても知られているＩＬ－Ｉ受容体アンタゴニスト）。

【０５０２】

特定の一の実施態様において、本発明の組成物は、ＣＨＯＰ（シクロホスホアミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン）と組み合わせて投与されるか、またはＣＨＯＰの１またはそれ以上の成分と組み合わせて投与される。一の実施態様において、本発明の組成物は、抗－ＣＤ２０抗体、ヒトモノクローナル抗－ＣＤ２０抗体と組み合わせて投与される。別の実施態様において、本発明の組成物は、抗－ＣＤ２０抗体およびＣＨＯＰ、または抗－ＣＤ２０抗体と組み合わせて投与されるか、およびＣＨＯＰの１またはそれ以上の成分、特にシクロホスホアミドおよび／またはプレドニゾンを任意に組み合わせて投与される。特定の一の実施態様において、本発明の組成物は、リツキシマブと組み合わせて投与される。さらなる一の実施態様において、本発明の組成物は、リツキシマブおよびＣＨＯＰ、またはリツキシマブおよびＣＨＯＰの１またはそれ以上の成分の任意の組み合わせ、特にシクロホスホアミドおよび／またはプレドニゾンと一緒に投与される。特定の一の実施態様において、本発明の組成物は、トシツモマブと組み合わせて投与される。さらなる一の実施態様において、本発明の組成物は、トシツモマブおよびＣＨＯＰ、またはトシツモマブおよびＣＨＯＰの１またはそれ以上の成分の任意の組み合わせ、特にシクロホスホアミドおよび／またはプレドニゾンと一緒に投与される。抗－ＣＤ２０抗体は、所望により、放射性同位元素、毒素または細胞傷害性プロドラッグと結合させてもよい。

【０５０３】

別の特定の実施態様において、本発明の組成物は、Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標）と組み合わせて投与される。さらなる一の実施態様において、本発明の組成物は、Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標）およびＣＨＯＰ、またはＺｅｖａｌｉｎ（登録商標）およびＣＨＯＰの１またはそれ以上の成分の任意の組み合わせ、特にシクロホスホアミドおよび／またはプレ

ドニゾンと一緒に投与される。Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標）は、１またはそれ以上の放射性同位元素と結合させてもよい。特に好ましいアイソトープは^{90}Ｙおよび^{111}Ｉｎである。

【０５０４】

さらなる一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、サイトカインと組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよいサイトカインは、ＩＬ２、ＩＬ３、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ７、ＩＬ１０、ＩＬ１２、ＩＬ１３、ＩＬＩ５、抗－ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＩＦＮ－ガンマおよびＴＮＦ－アルファを含むが、これらに限定されない。別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、ＩＬ－１アルファ、ＩＬ－１ベータ、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－１９、ＩＬ－２０およびＩＬ－２１を含むがこれらに限定されない任意のインターロイキンと一緒に投与されてもよい。

【０５０５】

一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、ＴＮＦファミリーのメンバーと組み合わせて投与されてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよいＴＮＦ、ＴＮＦに関連するまたはＴＮＦに類似する分子は、ＴＮＦ－アルファ、リンホ毒素－アルファ（ＬＴ－アルファ、ＴＮＦ－ベータとしても知られている）、ＬＴ－ベータ（複合体ヘテロ三量体ＬＴ－アルファ２－ベータにて見出される）ＯＰＧＬ、ＦａｓＬ、ＣＤ２７Ｌ、ＣＤ３０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、４－１ＢＢＬ、ＤｃＲ３、ＯＸ４０Ｌ、ＴＮＦ－ガンマ（国際公開番号ＷＯ９６／１４３２８）、ＡＩＭ－Ｉ（国際公開番号ＷＯ　９７／３３８９９）、エンドカイン－アルファ（国際公開番号ＷＯ　９８／０７８８０）、ＯＰＧ、およびニューロカイン－アルファ（国際公開番号ＷＯ　９８／１８９２１、ＯＸ４０、および神経成長因子（ＮＧＦ）の可溶性形態、およびＦａｓ、ＣＤ３０、ＣＤ２７、ＣＤ４０および４－ＩＢＢ、ＴＲ２（国際公開番号ＷＯ９６／３４０９５）、ＤＲ３（国際公開番号ＷＯ９７／３３９０４）、ＤＲ４（国際公開番号ＷＯ　９８／３２８５６）、ＴＲ５（国際公開番号ＷＯ　９８／３０６９３）、ＴＲＡＮＫ、ＴＲ９（国際公開番号ＷＯ　９８／５６８９２）、ＴＲ１０（国際公開番号ＷＯ　９８／５４２０２）、３１２Ｃ２（国際公開番号ＷＯ　９８／０６８４２）、およびＴＲ１２の可溶性形態、およびＣＤ１５４、ＣＤ７０、およびＣＤ１５３の可溶性形態を含むが、これらに限定されない。

【０５０６】

さらなる一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、血管新生蛋白質と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい血管新生蛋白質は、欧特許番号ＥＰ－３９９８１６において開示されているようなグリオーマ由来成長因子（ＧＤＧＦ）；欧特許番号ＥＰ－６８２１１０において開示されているような血小板由来成長因子－Ａ（ＰＤＧＦ－Ａ）；欧特許番号ＥＰ－２８２３１７において開示されているような血小板由来成長因子－Ｂ（ＰＤＧＦ－Ｂ）；国際公開番号ＷＯ　９２／０６１９４において開示されているような胎盤成長因子（ＰＩＧＦ）；Ｈａｕｓｅｒら．、Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒ，４：２５９－２６８（１９９３）において開示されているような胎盤成長因子－２（ブタＦ－２）；国際公開番号ＷＯ　９０／１３６４９において開示されているような血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）；欧特許番号ＥＰ－５０６４７７において開示されているような血管内皮成長因子－Ａ（ＶＥＧＦ－Ａ）；国際公開番号ＷＯ　９６／３９５１５において開示されているような血管内皮成長因子－２（ＶＥＧＦ－２）；血管内皮成長因子Ｂ（ＶＥＧＦ－３）；国際公開番号ＷＯ９６／２６７３６において開示されているような血管内皮成長因子Ｂ－１８６（ＶＥＧＦ－Ｂ１８６）；国際公開番号ＷＯ　９８／０２５４３において開示されているような血管内皮成長因子－Ｄ（ＶＥＧＦ－Ｄ）；国際公

開番号ＷＯ　９８／０７８３２において開示されているような血管内皮成長因子－Ｄ（ＶＥＧＦ－Ｄ）；および独特許番号ＤＥ１９６３９６０１において開示されているような血管内皮成長因子－Ｅ（ＶＥＧＦ－Ｅ）を含むが、これらに限定されない。上記参考文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【０５０７】

さらなる一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、線維芽成長因子と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい線維芽成長因子は、ＦＧＦ－１、ＦＧＦ－２、ＦＧＦ－３、ＦＧＦ－４、ＦＧＦ－５、ＦＧＦ－６、ＦＧＦ－７、ＦＧＦ－８、ＦＧＦ－９、ＦＧＦ－１０、ＦＧＦ－１１、ＦＧＦ－１２、ＦＧＦ－１３、ＦＧＦ－１４、およびＦＧＦ－１５を含むが、これらに限定されない。

【０５０８】

さらなる一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、造血成長因子と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい造血成長因子は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）（ｓａｒｇｒａｍｏｓｔｉｍ、ＬＥＵＫＩＮＥ（登録商標）、ＰＲＯＫＩＮＥ（登録商標））、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）（フィルグラスチム、ＮＥＵＰＯＧＥＮ（登録商標））、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ、ＣＳＦ－１）エリストポエチン（エポエチンアルファ、ＥＰＯＧＥＮ（登録商標）、ＰＲＯＳＣＲＩＴ（登録商標））、幹細胞因子（ＳＣＦ、ｃ－キットリガンド、造血幹細胞因子）、巨核球コロニー刺激因子、ＰＩＸＹ３２１（ａＧＭＣＳＦ／Ｉｌ－３融合蛋白質）、特にＩＬ－１からＩＬ－１２までの任意の１またはそれ以上のインターロイキン、インターフェロン－ガンマまたはトロンボポエチンを含むが、これらに限定されない。

【０５０９】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、アドレナリン遮断剤、例えば、アセブトロール、アテノロール、ベータキソロール、ビソプロロール、カルテオロール、ラベタロール、メトプロロール、ナドロール、オクスプレノロール、ペンブトロール、ピンドロール、プロプラノロール、ソタロールおよびチモロールと組み合わせて投与される。

【０５１０】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、抗不整脈剤（例えば、アデノシン、アミドアロン、ブレチリウム、ジギタリス、ジゴキシン、ジギ毒素、ジリアゼム、ジソピラミド、エスモロール、フレカイニド、リドカイン、メキシレチン、モリシジン、フェニトイン、プロカインアミド、Ｎ－アセチルプロカインアミド、プロパフェノン、プロプラノロール、キニジン、ソタロール、トカイニドおよびベラパミル）と組み合わせて投与される。

【０５１１】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、利尿剤、例えば、炭酸アンヒドラーゼ阻害剤（例えば、アセタゾールアミド、ジクロルフェンアミド、およびメタゾールアミド）、浸透圧利尿剤（例えば、グリセリン、イソソルビド、マンニトール、および尿素）、Na^+－K^+－２Cl^-共輸送を阻害する利尿剤（例えば、フロセミド、ブメタニド、アゾセミド、ピレタニド、トリパミド、エタクリン酸、ムゾリミン、およびトルセミド）、サイアザイドおよびサイアザイド様利尿剤（例えば、ベンドロフルメチアジド、ベンズサイアザイド、クロロサイアザイド、ヒドロクロロサイアザイド、ヒドロフルメチアジド、メチクロサイアザイド、ポリサイアザイド、トリコルムサイアザイド、クロルタリドン、インダパミド、メトラゾンおよびキネタゾン）、カリウム節約型利尿剤（例えば、アミロライドおよびトリアムテレン）ならびに鉱質コルチコイド受容体アンタゴニスト（例えば、スピロノラクトン、カンレノンおよびカリウムカンレノアート）と組み合わせて投与される。

【０５１２】
一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、内分泌および／またはホルモン不均衡障害のための処置と組み合わせて投与される。内分泌および／またはホルモン不均衡障害のための処置は、^{127}Ｉ、ヨウ素の放射性同位元素、例えば、^{131}Ｉおよび^{123}Ｉ；組換え成長ホルモン、例えば、ＨＵＭＡＴＲＯＰＥ（登録商標）（組換えソマトロピン）；成長ホルモンアナログ、例えば、ＰＲＯＴＲＯＰＩＮ（登録商標）（ソマトレム）；ドーパミンアゴニスト、例えば、ＰＡＲＬＯＤＥＬ（登録商標）（ブロモクリプチン）；ソマトスタチンアナログ、例えば、ＳＡＮＤＯＳＴＡＴＩＮ（登録商標）（オクトレオチド）；ゴナドトロピン調製物、例えば、ＰＲＥＧＮＹＵＭ（登録商標）、Ａ．Ｐ．Ｌ．（登録商標）およびＰＲＯＦＡＳＰ（登録商標）（絨毛性ゴナドトロピン（ＣＧ））、ＰＥＲＧＯＮＡＬ（登録商標）（メノトロピン）、およびＭＥＴＲＯＤＲＮ（登録商標）（ウロフォリトロピン（ｕＦＳＨ））；合成ヒトゴナドトロピン放出ホルモン調製物、例えば、ＦＡＣＴＲＥＬ（登録商標）およびＬＵＴＲＥＰＵＬＳＥ（登録商標）（ゴナドレリンヒドロクロリド）；合成ゴナドトロピンアゴニスト、例えば、ＬＵＰＲＯＮ（登録商標）（リュープロリドアセテート）、ＳＵＰＰＲＥＬＩＮ（登録商標）（ヒストレリンアセテート）、ＳＹＮＡＲＥＵＭ（ナファレリンアセテート）、およびＺＯＬＡＤＥＸ（ゴセレリンアセテート）；甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンの合成調製物、例えば、ＲＥＬＥＦＡＣＴＴＲＨ（登録商標）およびＴＨＹＰＩＮＯＮＥ（登録商標）（プロチレリン）；組換えヒトＴＳＨ、例えば、ＴＨＹＲＯＧＥＮ（登録商標）；甲状腺ホルモンの天然アイソマーのナトリウム塩の合成調製物、例えば、Ｌ－Ｔ４ＴＭ、ＳＹＮＴＨＲＯＩＤ（登録商標）およびＬＥＶＯＴＨＲＯＩＤ（登録商標）（レボチロキシンナトリウム）、ＬＴ３（登録商標）、ＣＹＴＯＭＥＬ（登録商標）およびＴＲＩＯＳＴＡＴ（登録商標）（リオチロインナトリウム）、およびＴＨＹＲＯＬＡＲ（登録商標）（リオトリックス）；抗甲状腺化合物、例えば、６－ｎ－プロピルチオウラシル（プロピルチオウラシル）、１－メチル－２－メルカプトイミダゾールおよびＴＡＰＡＺＯＬＥＴＭ（メチマゾール）、ＮＥＯ－ＭＥＲＣＡＺＯＬＥ（登録商標）（カルビマゾール）；ベーターアドレナリン受容体アンタゴニスト、例えば、プロプラノロールおよびエスモロール；Ca^{2+}チャネル拮抗剤；デキサメサゾンおよびヨウ素化放射線造影剤、例えば、ＴＥＬＥＰＡＱＵＥ（登録商標）（イオパノ酸）および／またはＡＧＲＡＦＩＮ（登録商標）（ナトリウムイポダート）を含むが、これらに限定されない。

【０５１３】
内分泌および／またはホルモン不均衡障害のためのさらなる処置は、エストロゲンまたはコンジュゲートされたエストロゲン、例えば、ＥＳＴＲＡＣＥ（登録商標）（エストラジオール）、ＥＳＴＩＮＹＬ（登録商標）（エチニルエストラジオール）、ＰＲＥＭＡＲＩＮ（登録商標）、ＥＳＴＲＡＴＡＢ（登録商標）、ＯＲＴＨＯ－ＥＳＴ（登録商標）、ＯＧＥＮ（登録商標）およびエストロピペート（エストロン）、ＥＳＴＲＯＶＩＳ（登録商標）（キネストロール）、ＥＳＴＲＡＤＥＲＭ（登録商標）（エストラジオール）、ＤＥＬＥＳＴＲＯＧＥＮ（登録商標）およびＶＡＬＥＲＧＥＮ（登録商標）（吉草酸エストラジオール）、ＤＥＰＯ－ＥＳＴＲＡＤＩＯＬシピオン酸（登録商標）およびＥＳＴＲＯＪＥＣＴＬＡ（登録商標）（シピオン酸エストラジオール）；抗エストロゲン、例えば、ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）（タモキシフェン）、ＳＥＲＯＰＨＥＮＥ（登録商標）およびＣＬＯＭＩＤ（登録商標）（クロミフェン）；プロゲスチン、例えば、ＤＵＲＡＬＵＭＩＮ（ヒドロキシプロゲステロンカプロアート）、ＭＰＡ（登録商標）およびＤＥＰＯ－ＰＲＯＶＥＲＡ（登録商標）（メドロキシプロゲステロンアセテート）、ＰＲＯＶＥＲＡ（登録商標）およびＣＹＣＲＩＮ（登録商標）（ＭＰＡ）、ＭＥＧＡＣＥ（登録商標）（メゲストロールアセテート）、ＮＯＲＬＵＴＩＮ（登録商標）（ノレシンドロン）、およびＮＯＲＬＵＴＡＴＥ（登録商標）およびＡＹＧＥＳＴＩＮ（登録商標）（ノレシンドロンアセテート）；プロゲステロンインプラント、例えば、ＮＯＲＰＬＡＮＴＳＹＳＴＥＭ（登録商標）（ノルゲストレルの真皮下インプラント）；抗プロゲスチン、例えば、ＲＵ４８６（登録商標）（ミフェプリストン）；ホルモン避妊剤、例えば、ＥＮＯＶＩＤ（

登録商標）（ノレチノドレル（ｎｏｒｅｔｈｙｎｏｄｒｅｌ）プラスメストラノール）、ＰＲＯＧＥＳＴＡＳＥＲＴ（登録商標）（プロゲステロンを放出する子宮内デバイス）、ＬＯＥＳＴＲＩＮ（登録商標）、ＢＲＥＶＩＣＯＮ（登録商標）、ＭＯＤＩＣＯＮ（登録商標）．ＧＥＮＯＲＡ（登録商標）、ＮＥＬＯＮＡ（登録商標）、ＮＯＲＩＮＹＬ（登録商標）、ＯＶＡＣＯＮ－３５（登録商標）およびＯＶＡＣＯＮ－５０（登録商標）（エチニルエストラジオール／ノレシンドロン）、ＬＥＶＬＥＮ（登録商標）、ＮＯＲＤＥＴＴＥ（登録商標）、ＴＲＩ－ＬＥＶＬＥＮ（登録商標）およびＴＲＩＰＨＡＳＩＬ－２１（登録商標）（エチニルエストラジオール／レボノルゲストレル）、ＬＯ／ＯＶＲＡＬ（登録商標）およびＯＶＲＡＬ（登録商標）（エチニルエストラジオール／ノルゲストレル）、ＤＥＭＵＬＥＮ（登録商標）（エチニルエストラジオール／エチノジオールジアセタート）、ＮＯＲＩＮＹＬ（登録商標）、ＯＲＴＨＯ－ＮＯＶＵＭ（登録商標）、ＮＯＲＥＴＨＩＮ（登録商標）、ＧＥＮＯＲＡ（登録商標）およびＮＥＬＯＶＡ（登録商標）（ノレシンドロン／メストラノール）、ＤＥＳＯＧＥＮ（登録商標）および／またはＴＨＯ－ＣＥＰＴ（登録商標）（エチニルエストラジオール／デソゲストレル）、ＯＲＴＨＯ－ＣＹＣＬＥＮ（登録商標）およびＯＲＴＨＯ－ＴＲＩＣＹＣＬＥＮ（登録商標）（エチニルエストラジオール／ノルゲスチメート）、ＭＩＣＲＯＮＯＲ（登録商標）およびＮＯＲ－ＱＤ（登録商標）（ノルエチンドロン）およびＯＶＲＥＴＴＥ（登録商標）（ノルゲストレル）を含むが、これらに限定されない。

【０５１４】

内分泌および／またはホルモン不均衡障害のためのさらなる処置は、テストステロンエステル、例えば、酢酸メテノロンおよびウンデカン酸テストステロン；非経口および経口用アンドロゲン、例えば、ＴＥＳＴＯＪＥＣＴ－５０（登録商標）（テストステロン）、ＴＥＳＴＥＸ（登録商標）（プロピオン酸テストステロン）、ＤＥＬＡＴＥＳＴＲＹＬ（登録商標）（エナント酸テストステロン）、ＤＥＰＯ－ＴＥＳＴＯＳＴＥＲＯＮＥ（登録商標）（シピオン酸テストステロン）、ＤＡＮＯＣＲＩＮＥ（登録商標）（ダナゾール）、ＨＡＬＯＴＥＳＴＩＮ（登録商標）（フルオキシメステロン）、ＯＲＥＴＯＮＭＥＴＨＹＬ（登録商標）、ＴＥＳＴＲＥＤ（登録商標）およびＶＩＲＩＬＯＮ（登録商標）（メチルテストステロン）およびＯＸＡＮＤＲＩＮ（登録商標）（オキサンドロロン）；テストステロン経皮系、例えば、ＴＥＳＴＯＤＥＲＭ（登録商標）；アンドロゲン受容体アンタゴニストおよび５－アルファ－レダクターゼ阻害剤、例えば、ＡＮＤＲＯＣＵＲ（登録商標）（酢酸シプロテロン）、ＥＵＬＥＸＩＮ（登録商標）（フルタミド）およびＰＲＯＳＣＡＲ（登録商標）（フィナステリド）；副腎皮質刺激ホルモン調製物、例えば、ＣＯＲＴＲＯＳＹＮ（登録商標）（コシントロピン）；副腎皮質ステロイドおよびそれらの合成アナログ、例えば、ＡＣＬＯＶＡＴＥ（登録商標）（アルクロメタソンジプロピオナート）、ＣＹＣＬＯＣＯＲＴ（登録商標）（アムシノニド）、ＢＥＣＬＯＶＥＮＴ（登録商標）およびＶＡＮＣＥＲＩＬ（登録商標）（ベクロメタソンジプロピオナート）、ＣＥＬＥＳＴＯＮＥ（登録商標）（ベタメタソン）、ＢＥＮＩＳＯＮＥ（登録商標）およびＵＴＩＣＯＲＴ（登録商標）（安息香酸ベタメタソン）、ＤＩＰＲＯＳＯＮＥ（登録商標）（ベタメタソンジプロピオナート）、ＣＥＬＥＳＴＯＮＥリン酸塩（登録商標）（ベタメタソンナトリウムリン酸塩）、ＣＥＬＥＳＴＯＮＥＳＯＬＵＳＰＡＮ（登録商標）（ベタメタソンナトリウムリン酸塩および酢酸塩）、ＢＥＴＡ－ＶＡＬ（登録商標）およびＶＡＬＩＳＯＮＥ（登録商標）（吉草酸ベタメタソン）、ＴＥＭＯＶＡＴＥ（登録商標）（クロベタソールプロピオン酸塩）、ＣＬＯＤＥＲＭ（登録商標）（ピバル酸クロコルトロン）、ＣＯＲＴＥＦ（登録商標）およびＨＹＤＲＯＣＯＲＴＯＮＥ（登録商標）（コルチゾール（ヒドロコルチゾン））、ＨＹＤＲＯＣＯＲＴＯＮＥ酢酸塩（登録商標）（酢酸コルチゾール（ヒドロコルチゾン））、ＬＯＣＯＩＤ（登録商標）（酪酸コルチゾール（ヒドロコルチゾン））、ＨＹＤＲＯＣＯＲＴＯＮＥＰＨＯＳＰＨＡＴＥ（登録商標）（コルチゾール（ヒドロコルチゾン）ナトリウムリン酸塩）、Ａ－ＨＹＤＲＯＣＯＲＴ（登録商標）およびＳＯＬＵＣＯＲＴＥＦ（登録商標）（コハク酸コルチゾール（ヒドロコルチゾン）ナトリウム）、ＷＥＳＴＣＯＲＴ（登録商標）（吉草酸コルチゾール（ヒドロコルチゾン

））、コルチゾンＡＣＥＴＡＴＥ（登録商標）（酢酸コルチゾン）、ＤＥＳＯＷＥＮ（登録商標）およびＴＲＩＤＥＳＩＬＯＮ（登録商標）（デソニド）、ＴＯＰＩＣＯＲＴ（登録商標）（デソキシメタソン）、ＤＥＣＡＤＲＯＮ（登録商標）（デキサメタソン）、ＤＥＣＡＤＲＯＮＬＡ（登録商標）（酢酸デキサメタソン）、ＤＥＣＡＤＲＯＮＰＨＯＳＰＨＡＴＥ（登録商標）およびＨＥＸＡＤＲＯＬＰＨＯＳＰＨＡＴＥ（登録商標）（デキサメタソンナトリウムリン酸塩）、ＦＬＯＲＯＮＥ（登録商標）およびＭＡＸＩＦＬＯＲ（登録商標）（ジフロラソンジアセタート）、ＦＬＯＲＩＮＥＦＡＣＥＴＡＴＥ（登録商標）（酢酸フルドロコルチゾン）、ＡＥＲＯＢＩＤ（登録商標）およびＮＡＳＡＬＩＤＥ（登録商標）（フルニソリド）、ＦＬＵＯＮＩＤ（登録商標）およびＳＹＮＡＬＡＲ（登録商標）（フルオシノロンアセトニド）、ＬＩＤＥＸ（登録商標）（フルオシノニド）、ＦＬＵＯＲ－ＯＰ（登録商標）およびＦＭＬ（登録商標）（フルオロメトロン）、ＣＯＲＤＲＡＮ（登録商標）（フルランドレノリド）、ＨＡＬＯＧ（登録商標）（ハルシノニド）、ＨＭＳＬＩＺＵＩＦＩＬＭ（登録商標）（メドリソン）、ＭＥＤＲＯＬ（登録商標）（メチルプレドニゾロン）、ＤＥＰＯ－ＭＥＤＲＯＬ（登録商標）およびＭＥＤＲＯＬＡＣＥＴＡＴＥ（登録商標）（メチルプレドニゾン酢酸塩）、Ａ－ＭＥＴＨＡＰＲＥＤ（登録商標）およびＳＯＬＵＭＥＤＲＯＬ（登録商標）（メチルプレドニゾロンナトリウムコハク酸）、ＥＬＯＣＯＮ（登録商標）（フランカルボン酸モメタゾン）、ＨＡＬＤＲＯＮＥ（登録商標）（酢酸パラメタソン）、ＤＥＬＴＡ－ＣＯＲＴＥＦ（登録商標）（プレドニゾロン）、ＥＣＯＮＯＰＲＥＤ（登録商標）（酢酸プレドニゾロン）、ＨＹＤＥＬＴＲＡＳＯＬ（登録商標）（プレドニゾロンナトリウムリン酸塩）、ＨＹＤＥＬＴＲＡ－Ｔ．Ｂ．Ａ（登録商標）（プレドニゾロンテブタート）、ＤＥＬＴＡＳＯＮＥ（登録商標）（プレドニゾン）、ＡＲＩＳＴＯＣＯＲＴ（登録商標）およびＫＥＮＡＣＯＲＴ（登録商標）（トリアムシノロン）、ＫＥＮＡＬＯＧ（登録商標）（トリアムシノロンアセトニド）、ＡＲＩＳＴＯＣＯＲＴ（登録商標）およびＫＥＮＡＣＯＲＴＤＩＡＣＥＴＡＴＥ（登録商標）（トリアムシノロンジアセタート）、およびＡＲＩＳＴＯＳＰＡＮ（登録商標）（トリアムシノロンヘキサアセトニド）；副腎皮質ステロイドの生合成および作用の阻害剤、例えば、ＣＹＴＡＤＲＥＮ（登録商標）（アミノグルテチミド）、ＮＩＺＯＲＡＬ（登録商標）（ケトコナゾール）、ＭＯＤＲＡＳＴＡＮＥ（登録商標）（トリロスタン）、およびＭＥＴＯＰＩＲＯＮＥ（登録商標）（メチラポン）；ウシ、ブタまたはヒトインスリンまたはその混合物；インスリンアナログ；組換えヒトインスリン、例えば、ＨＵＭＵＬＩＮ（登録商標）およびＮＯＶＯＬＩＮ（登録商標）；経口低血糖剤、例えば、ＯＲＡＭＩＤＥ（登録商標）およびＯＲＩＮＡＳＥ（登録商標）（トルブトアミド）、ＤＩＡＢＩＮＥＳＥ（登録商標）（クロルプロプアミド）、ＴＯＬＡＭＩＤＥ（登録商標）およびＴＯＬＩＮＡＳＥ（登録商標）（トラザミド）、ＤＹＭＥＬＯＲ（登録商標）（アセトヘキサアミド）、グリベンクルアミド、ＭＩＣＲＯＮＡＳＥ（登録商標）、ＤＩＢＥＴＡ（登録商標）およびＧＬＹＮＡＳＥ（登録商標）（グリブリド）、ＧＬＵＣＯＴＲＯＬ（登録商標）（グリピジド）、およびＤＩＡＭＩＣＲＯＮ（登録商標）（グリクラジド）、ＧＬＵＣＯＰＨＡＧＥ（登録商標）（メトホルミン）、シグリタゾン、ピオグリタゾン、およびアルファ－グルコシダーゼ阻害剤；ウシまたはブタグルカゴン；ソマトスタチン、例えば、ＳＡＮＤＯＳＴＡＴＩＮ（登録商標）（オクトレオチド）；およびジアゾキシド、例えば、ＰＲＯＧＬＹＣＥＭ（登録商標）（ジアゾキシド）を含むが、これらに限定されない。

【０５１５】

一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、子宮運動障害のための処置と組み合わせて投与される。子宮運動障害のための処置は、エストロゲン薬剤、例えば、コンジュゲートされたエストロゲン（例えば、ＰＲＥＭＡＲＩＮ（登録商標）およびＥＳＴＲＡＴＡＢ（登録商標）、エストラジオール（例えば、ＣＬＩＭＡＲＡ（登録商標）およびＡＬＯＲＡ（登録商標））、エストロピペートおよびクロロトリアニセン；プロゲスチン薬剤（例えば、ＡＭＥＮ（登録商標）（メドロキシプロゲステロン）、ＭＩＣＲＯＮＯＲ（登録商標）（ノレチドロンアセテート）、ＰＲＯ

ＭＥＴＲＩＵＭ（登録商標）プロゲステロンおよびメゲストロールアセテート）；およびエストロゲン／プロゲステロン併用療法、例えば、コンジュゲートされたエストロゲン／メドロキシプロゲステロン（例えば、ＰＲＥＭＰＲＯ（登録商標）およびＰＲＥＭＰＨＡＳＥ（登録商標））および酢酸ノレシンドロン／エチニルエストラジオール（例えば、ＦＥＭＨＲＴ）を含むが、これらに限定されない。

【０５１６】

さらなる一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、鉄欠乏性貧血および低色素性貧血の処置において有効な薬剤と組み合わせて投与され、該薬剤は、硫酸第一鉄（硫酸鉄、ＦＥＯＳＯＬ（登録商標））、フマル酸第一鉄（例えば、ＦＥＯＳＴＡ（登録商標））、グルコン酸第一鉄（例えば、ＦＥＲＧＯＮ（登録商標））、多糖－鉄錯体（例えば、ＮＩＦＥＲＥＸ（登録商標））、鉄デキストランの注入（例えば、ＩＮＦＥＤ（登録商標））、硫酸第二銅、ピロキシジン、リボフラビン、ビタミンB_{12}、シアンコバラミン注入（例えば、ＲＥＤＩＳＯＬ（登録商標）、ＲＵＢＲＡＭＩＮＰＣ（登録商標））、ヒドロキソコバラミン、葉酸（例えば、ＦＯＬＶＩＴＥ（登録商標））、ロイコボリン（ホリン酸、５－ＣＨＯＨ４ＰｔｅＧｌｕ、シトロボルム因子）またはＷＥＬＬＣＯＶＯＲＩＮ（ロイコボリンのカルシウム塩）、トランスフェリンまたはフェリチンを含むが、これらに限定されない。

【０５１７】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、精神疾患を処置するために用いられる剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい精神剤は、抗精神剤（例えば、クロルプロマジン、クロルプロチキセン、クロザピン、フルフェナジン、ハロペリドール、ロキサピン、メソリダジン、モリンドン、オランザピン、ペルフェナジン、ピモジド、クエチアピン、リスペリドン、チオリダジン、チオチキセン、トリフルオペラジン、およびトリフルプロマジン）、抗鬱剤（例えば、カルバマゼピン、ジバルプロエクスナトリウム、炭酸リチウム、およびクエン酸リチウム）、抗鬱剤（例えば、アミトリプチリン、アモキサピン、ブプロピオン、シタロプラム、クロミプラミン、デシプラミン、ドキセピン、フルボキサミン、フルオキセチン、イミプラミン、イソカルボキサジド、マプロチリン、ミルトラザピン、ネファゾドン、ノルトリプチリン、パロキセチン、フェネイジン、プロトリプチリン、セルトラリン、トラニルプロミン、トラゾドン、トリミプラミンおよびベンラフェキシン）、抗不安剤（例えば、アルプラゾラム、ブスピロン、クロルジアゼポキシド、クロラゼプ酸、ジアゼパム、ハラゼパム、ロラゼパム、オキサゼパムおよびプラゼパム）、および刺激剤（例えば、ｄ－アンフェタミン、フェニド酸メチルおよびペモリン）を含むが、これらに限定されない。

【０５１８】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、神経疾患の処置において用いられる剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい神経剤は、抗てんかん剤（例えば、カルバマゼピン、クロナゼパム、エトサクシミド、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルプロ酸、ジバルプロエクスナトリウム、フェルバメート、ギャバペンチン、ラモトリジン、レベチラセタム、オキシカルバゼピン、チアガビン、トピラメート、ゾニサミド、ジアゼパム、ロラゼパムおよびクロナゼパム）、抗パーキンソン病剤（例えば、レボドパ／カルビドパ、セレギリン、アマンチジン、ブロモクリプチン、ペルゴリド、ロピニロール、プラミペキソール、ベンズトロピン；ビペリデン；エトプロパジン；プロシクリジン；トリヘキシフェニジル、トルカポン）およびＡＬＳ治療剤（例えば、リルゾール）を含むが、これらに限定されない。

【０５１９】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、血管拡張剤および／またはカルシウムチャネルブロッキング剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与さ

れてもよい血管拡張剤は、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）阻害剤（例えば、パパベリン、イソクスプリン、ベナゼプリル、カプトプリル、シラザプリル、エナラプリル、エナラプリラット、フォシノプリル、リシノプリル、モエキシプリル、ペリンドプリル、キナプリル、ラミプリル、スピラプリル、トランドラプリル、およびニリドリン）、および硝酸塩（例えば、イソソルビドジニトラート、イソソルビドモノニトラート、およびニトログリセリン）を含むが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよいカルシウムチャネルブロッキング剤の例は、アムロジピン、ベプリジル、ジルチアゼム、フェロジピン、フルナリジン、イスラジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニモジピンおよびベラパミルを含むが、これらに限定されない。

【０５２０】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、胃腸疾患のための処置と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドと一緒に投与されてもよい胃腸疾患のための処置は、Ｈ２ヒスタミン受容体アンタゴニスト（例えば、ＴＡＧＡＭＥＴ（登録商標）（シメチジン）、ＺＡＮＴＡＣ（登録商標）（ラニチジン）、ＰＥＰＣＴＤ（登録商標）（ファモチジン）、およびＡＸＩＤ（登録商標）（ニザチジン））；H^+、K^+ＡＴＰａｓｅの阻害剤（例えば、ＰＲＥＶＡＣＩＤ（登録商標）（ランソプラゾール）およびＰＲＩＬＯＳＥＣ（登録商標）（オメプラゾール））；ビスマス化合物（例えば、ＰＥＰＴＯ－ＢＩＳＭＯＬ（登録商標）（サブサリチル酸ビスマス）およびＤＥ－ＮＯＣＥ（サブクエン酸ビスマス））；様々な制酸剤；スクラルファート；プロスタグランジンアナログ（例えば、ＣＹＴＯＴＥＣ（登録商標）（ミソプロストール））；ムスカリン性抗コリン剤；緩下剤（例えば、サーファクタント緩下剤、刺激性緩下剤、生理的食塩水および浸透圧性緩下剤）；止瀉剤（例えば、ＬＯＭＯＴＩＬ（登録商標）（ジフェノキシラート）、ＭＯＴＯＦＥＮ（ジフェノキシン）およびＩＭＯＤＩＵＭ（登録商標）（ロペラミドヒドロクロリド））、ソマトスタチンの合成アナログ、例えば、ＳＡＮＤＯＳＴＡＴＩＮ（登録商標）（オクトレオチド）、制吐剤（例えば、ＺＯＦＲＡＮ（登録商標）（オンダンセトロン）、ＫＹＴＲＩＬＴＭ（塩酸グラニセトロン）トロピセトロン、ドラセトロン、メトクロプラミド、クロルプロマジン、ペルフェナジン、プロクロルペラジン、プロメタジン、チエチルペラジン、トリフルプロマジン、ドンペリドン、ハロペリドール、ドロペリドール、トリメトベンザミド、デキサメサゾン、メチルプレドニゾロン、ドロナビノールおよびナビロン）；Ｄ２アンタゴニスト（例えば、メトクロプラミド、トリメトベンザミドおよびクロルプロマジン）；胆汁酸塩；ケノデオキシコール酸；ウルソデオキシコール酸；および膵臓酵素調製物、例えば、パンクレアチンおよびパンクレリパーゼを含むが、これらに限定されない。

【０５２１】

さらなる実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、例えば、放射線療法のごとき他の治療または予防計画と組み合わせて投与される。

【０５２２】

本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質を含有する医薬組成物の１またはそれ以上の成分を充填した１またはそれ以上の容器を含む、医薬包装またはキットも提供する。所望により、かかる１または複数の容器に、医薬または生物製品の製造、使用または販売を規制する政府機関により規定された形式の注意書きを備え付けることができる。かかる注意書きは、当局による、ヒトへの投与のための製造、使用または販売の認可を示している。

【０５２３】

遺伝子治療

本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするコンストラクトは、治療上有効量のアルブミン融合蛋白質を送達するために、遺伝子治療プロトコルの一部として用いられ得る。細胞へ核酸をインビボ導入するための好ましい一のアプローチは、核酸を含み、本発明のア

ルブミン融合蛋白質をコードするウイルスベクターの使用である。ウイルスベクターを用いた細胞の感染は、大部分の標的細胞が核酸を受け取ることができるという利点を有する。さらに、例えば、ウイルスベクター中に含まれるｃＤＮＡによりウイルスベクター内にコードされた分子は、ウイルスベクターの核酸を取り込んだ細胞において効果的に発現される。

【０５２４】

レトロウイルスベクターおよびアデノ関連ウイルスベクターは、アルブミン融合蛋白質をコードする外因性核酸分子をインビボにおいて輸送するための組換え遺伝子デリバリーシステムとして用いることができる。これらのベクターは、細胞中への核酸の効果的なデリバリーを提供し、および輸送された核酸は、宿主の染色体ＤＮＡに適切に組み込まれる。複製能欠損レトロウイルスのみを生じる特殊化した細胞株（「パッケージング細胞」と言われる）の開発により、遺伝子治療のためのレトロウイルスの有用性を増大し、および欠損レトロウイルスは、遺伝子治療のための遺伝子輸送における使用について特徴付けられる（報文についてはＭｉｌｌｅｒ，Ａ．Ｄ．（１９９０）Ｂｌｏｏｄ７６：２７　１を参照のこと）。複製能欠損レトロウイルスを、ビリオンにパッケージングし、これを用いて、標準的な技法によりヘルパーウイルスを用いて標的細胞を感染させることができる。組換えレトロウイルスを産生するための、およびかかるウイルスを用いてインビトロまたはインビボにて細胞を感染させるためのプロトコルは、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら．，（ｅｄｓ．）Ｇｒｅｅｎｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，（１９８９），Ｓｅｃｔｉｏｎｓ　９．１０－９．１４および他の標準的な実験マニュアルにおいて見出され得る。

【０５２５】

本発明において有用な別のウイルス遺伝子デリバリーシステムは、アデノウイルス由来のベクターを利用する。アデノウイルスのゲノムを遺伝子操作して、目的の遺伝子産物をコードかつ発現するが、正常な溶菌ウイルス生活環で複製するその能力については不活性化させることができる。例えば、Ｂｅｒｋｎｅｒら．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ６：６１６（１９８８）；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５２：４３１４３４（１９９１）；およびＲｏｓｅｎｆｅｌｄら．，Ｃｅｌｌ　６８：１４３－１５５（１９９２）を参照のこと。アデノウイルス株Ａｄ型５ｄ１３２４またはアデノウイルスの他の株（例えば、Ａｄ２、Ａｄ３、Ａｄ７など）に由来する適当なアデノウイルスベクターは当業者に知られている。組換えアデノウイルスは、非分裂細胞を感染させることができないために、特定の状況において有利であり得、および、上皮細胞を含む多種多様な細胞型を感染させるために用いることができる（上記引用のＲｏｓｅｎｆｅｌｄら．，（１９９２）。さらに、ウイルス粒子は、精製および濃度に対して相対的に安定しており、かつこれらに影響を受けやすく、そして、上記のように、感染のスペクトルに作用するように修飾することができる。さらに、導入されたアデノウイルスＤＮＡ（およびその中に含まれる外来ＤＮＡ）は、宿主細胞のゲノムに組み込まれず、エピソームのままであるために、導入されたＤＮＡが宿主ゲノム（例えば、レトロウイルスＤＮＡ）中に組み込まれる場合に挿入突然変異誘発の結果として生じ得る潜在的な問題を回避できる。さらに、外来ＤＮＡがアデノウイルスゲノムを保有する能力は、他の遺伝子デリバリーベクターに比べて大きい（最高８キロ塩基）（Ｂｅｒｋｎｅｒら．，前掲；Ｈａｊ－Ａｈｍおよびら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５７：２６７（１９８６））。

【０５２６】

別の実施態様において、本発明の非ウイルス遺伝子デリバリーシステムは、標的細胞による対象ヌクレオチド分子の取り込みについて、エンドサイトーシス経路に依存する。この型の遺伝子デリバリーシステムの例は、リポソームに由来する系、ポリ－リジンコンジュゲートおよび人工ウイルスエンベロープを含む。典型的な一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードする核酸分子は、その表面に正電荷を有し（例えば、リポフェクチン）、および（所望により）標的組織の細胞表面抗原に対する抗体をタグと

して用いるリポソーム中に封入することができる（Ｍｉｚｕｎｏら．（１９９２）Ｎｏ Ｓｈｉｎｋｅｉ Ｇｅｋａ ２０：５４７－５５１；ＰＣＴ公開Ｗ０９１／０６３０９；日本特許出願１０４７３８１；および欧特許公開ＥＰ－Ａ－４３０７５）。

【０５２７】

本発明のアルブミン融合蛋白質をコードする遺伝子に関する遺伝子デリバリーシステムは、任意の多数の方法により患者へ導入することができる。例えば、遺伝子デリバリーシステムの医薬調製物を、例えば静脈内注入により全身的に導入することができ、そして、標的細胞への蛋白質の特異的形質導入は、遺伝子デリバリービヒクルにより与えられるトランスフェクションの特異性、受容体遺伝子の発現を制御する転写調節配列による細胞型もしくは組織型の発現、またはそれらの組み合わせから主として生じる。他の実施態様において、組換え遺伝子の初期デリバリーはさらに制限されており、動物への導入は限局化される。例えば、遺伝子デリバリービヒクルはカテーテル（米国特許第５，３２８，４７０号を参照のこと）または定位的注入（例えば、Ｃｈｅｎら．（１９９４）ＰＮＡＳ９１：３０５４－３０５７）により導入され得る。遺伝子治療コンストラクトの医薬調製物は、本質的に、許容される希釈剤中の遺伝子デリバリーシステムからなり得、または遺伝子デリバリービヒクルが埋め込まれた徐放性マトリックスを含むことができる。アルブミン融合蛋白質が組換え細胞、例えば、レトロウイルスベクターからインタクトで生産できる場合、医薬調製物は、アルブミン融合蛋白質を生じる１またはそれ以上の細胞を含むことができる。

【０５２８】

さらなる遺伝子治療

障害、疾患および状態を処置または予防するための遺伝子治療も、本発明により含まれる。遺伝子治療は、核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡおよびアンチセンスＤＮＡまたはＲＮＡ）配列を動物に導入し、本発明のアルブミン融合蛋白質の発現を成し遂げることに関する。この方法は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド、および標的組織による融合蛋白質の発現のために必要な任意の他の遺伝子エレメントを必要とする。かかる遺伝子治療およびデリバリー技法は、当該技術分野において知られており、例えば、Ｗ０９０／１１０９２を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。

【０５２９】

故に、例えば、患者からの細胞は、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドに作動的に結合されたプロモーターを含むポリヌクレオチド（ＤＮＡまたはＲＮＡ）を用いてエキソビボにて操作されてもよく、次いで、操作された細胞は、本発明の融合蛋白質を用いて処置されるべき患者に提供される。かかる方法は、当該技術分野においてよく知られている。例えば、Ｂｅｌｌｄｅｇｒｕｎ，Ａ．，ら．，Ｊ．Ｎａｔｌ．ＣａｎｃｅｒＩｎｓｔ．８５：２０７－２１６（１９９３）；Ｆｅｒｒａｎｔｉｎｉ，Ｍ．ら．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：１１０７－１１１２（１９９３）；Ｆｅｒｒａｎｔｉｎｉ，Ｍ．ら．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １５３：４６０４－４６１５（１９９４）；Ｋａｉｄｏ，Ｔ．，ら．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ６０：２２１－２２９（１９９５）；Ｏｇｕｒａ，Ｈ．，ら．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５０：５１０２－５１０６（１９９０）；Ｓａｎｔｏｄｏｎａｔｏ，Ｌ．，ら．，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ ＴＨｅｒａｐｙ ７：１－１０（１９９６）；Ｓａｎｔｏｄｏｎａｔｏ，Ｌ．，ら．，Ｇｅｎｅ ＴＨｅｒａｐｙ ４：１２４６－１２５５（１９９７）；およびＺｈａｎｇ，Ｊ．－Ｆ．ら．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ ＴＨｅｒａｐｙ ３：３１－３８（１９９６））を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。一の実施態様において、遺伝子操作される細胞は、動脈細胞である。動脈細胞は、動脈、動脈周囲組織への直接注入またはカテーテル注入により患者へ再度導入されてもよい。

【０５３０】

以下に詳細に述べるように、ポリヌクレオチドコンストラクトは、組織（心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓など）の間質腔への注入のごとき、注入可能な物質を動物の細胞へ送達す

る任意の方法により送達され得る。ポリヌクレオチドコンストラクトは、医薬上許容される液体または水性担体中にて送達されてもよい。

【０５３１】

一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、裸の（ｎａｋｅｄ）ポリヌクレオチドとして送達される。用語「裸の」ポリヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡは、ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方、リポフェクチンまたは沈殿剤などを含む、細胞への侵入を補助、改善または簡便化するように作用する任意のデリバリービヒクルのない配列を言う。しかし、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、当業者によく知られている方法により調製され得るリポソーム処方およびリポフェクチン処方など中にても送達され得る。かかる方法は、例えば、米国特許第５，５９３，９７２号、第５，５８９，４６６号および第５，５８０，８５９号に記載されており、該文献は出典明示により本明細書の一部となる。

【０５３２】

好ましくは、遺伝子治療において用いられるポリヌクレオチドベクターコンストラクトは、宿主ゲノムへ統合されず、しかも複製を可能にする配列を含まないコンストラクトである。適切なベクターは、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅから入手可能なｐＷＬＮＥＯ、ｐＳＶ２ＣＡＴ、ｐＯＧ４４、ｐＸＴＩおよびｐＳＧ；Ｐｈａｒｍａｃｉａから入手可能なｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧおよびｐＳＶＬ；およびＩｎｖｉｔｏｇｅｎから入手可能なｐＥＦＩＮ５、ｐｃＤＮＡ３．１およびｐＲｃ／ＣＭＶ２を含む。他の適当なベクターは、当業者に容易に明かであろう。

【０５３３】

当業者に知られている任意の強力なプロモーターを用いて、ポリヌクレオチド配列を発現させることができる。適当なプロモーターは、アデノウイルスプロモーター、例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター；または異種プロモーター、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター；呼吸器系シンシチウムウイルス（ＲＳＶ）プロモーター；誘導プロモーター、例えば、ＭＭＴプロモーター、メタロチオネインプロモーター；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ＡｐｏＡＩプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター；レトロウイルスＬＴＲｓ；ｂ－アクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターを含む。プロモーターは、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する遺伝子のための天然プロモーターであってもよい。

【０５３４】

他の遺伝子治療技法と異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する主な利点の１つは、細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究により、非複製ＤＮＡ配列を細胞に導入し、最高６ヶ月の期間にわたり、所望のポリペプチドを産生し得ることが示されている。

【０５３５】

ポリヌクレオチドコンストラクトは、筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺および結合組織を含む、動物中の組織の間質腔へ送達され得る。組織の間質腔は、器官組織の細網繊維、血管または室の壁内の弾性繊維、繊維組織のコラーゲン繊維の間の細胞間、液体、ムコ多糖マトリックス、或いは筋肉細胞を覆う結合組織内または骨小腔内の同じマトリックスを含む。それは、循環血漿およびリンパ管のリンパ液により占有される同様の空間である。筋肉組織の間質腔への送達が、以下に記載の理由のために、好ましい。それらは、注入により、これらの細胞を含む組織中に有意に送達されてもよい。好ましくは、それらは、分化している永続型非分裂細胞中に送達され、および発現されるが、送達および発現は、例えば、血液または皮膚線維芽細胞の幹細胞のごとき非分化または完全には分化していない細胞において成し遂げられてもよい。インビボにおいて、筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、かつ発現させる能力において特にコンピテントである。

【０５３６】
裸の核酸配列の注入のために、有効量のＤＮＡまたはＲＮＡは、体重１ｋｇあたり約０．０５ｍｇ～体重１ｋｇあたり約５０ｍｇの範囲であり得る。好ましくは、該用量は、約０．００５ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇであり、およびより好ましくは、約０．０５ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇである。もちろん、当業者に理解されるように、この用量は、注入する組織部位に従って、変化し得る。適切かつ有効用量の核酸配列は、当業者により容易に決定され得、および処置される状態および投与経路に依存してもよい。
【０５３７】
好ましい投与経路は、非経口経路による、組織の間質腔への注入である。しかし、他の非経口経路、例えば、特に、肺または気管組織、咽頭または鼻の粘膜へ送達させるための、エアロゾル処方の吸入も用いられてもよい。加えて、裸のＤＮＡコンストラクトは、手術で用いられるカテーテルにより、血管形成中に動脈へ送達することができる。
【０５３８】
裸のポリヌクレオチドは、送達部位での直接針注入、静脈内注入、局所投与、カテーテル注入およびいわゆる「遺伝子銃」を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において知られている任意の方法により送達される。これらのデリバリー方法は、当該技術分野において知られている。
【０５３９】
コンストラクトは、デリバリービヒクル、例えば、ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方、リポフェクチン、沈殿剤などと一緒に送達されてもよい。かかる送達方法は、当該技術分野において知られている。
【０５４０】
特定の実施態様において、ポリヌクレオチドコンストラクトは、リポソーム調製物中に複合体化される。本発明において用いるためのリポソーム調製物は、カチオン性（正荷電）、アニオン性（負荷電）および中性調製物を含む。しかし、カチオン性リポソームおよびポリアニオン性核酸の間に堅密な電荷複合体を形成することができるので、カチオン性リポソームが特に好ましい。カチオン性リポソームは、プラスミドＤＮＡ（Ｆｅｉｇｎｅｒら．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８７）８４：７４１３－７４１６、該文献は出典明示により本明細書の一部となる）；ｍＲＮＡ（Ｍａｌｏｎｅら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８９）８６：６０７７－６０８１，該文献は出典明示により本明細書の一部となる）；および精製された転写因子（Ｄｅｂｓら．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（１９９０）２６５：１０１８９－１０１９２，該文献は出典明示により本明細書の一部となる）の細胞内送達を機能的な形態で媒介することが示されている。
【０５４１】
カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、Ｎ［１－２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリエチルアンモニウム（ＤＯＴＭＡ）リポソームは特に有用であり、およびＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎの商標で、ＧＩＢＣＯＢＲＬ、Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、Ｎ．Ｙ．（Ｆｅｌｇｎｅｒら．，Ｐｒｏｃ．ＮａｔｌＡｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８７）８４：７４１３－７４１６も参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる）から入手可能である。他の市販されているリポソームは、トランスフェクタース（ＤＤＡＢ／ＤＯＰＥ）およびＤＯＴＡＰ／ＤＯＰＥ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ）を含む。
【０５４２】
他のカチオン性リポソームは、当該技術分野においてよく知られている技法を用いて、容易に入手可能な物質から調製できる。例えば、ＤＯＴＡＰ（１，２－ビス（オレオイルオキシ）－３－（トリメチルアンモニオ）プロパン）リポソームの合成の説明については、ＰＣＴ公開ＷＯ９０／１１０９２（該文献は出典明示により本明細書の一部となる）を参照のこと。ＤＯＴＭＡリポソームの調製は文献に記載されており、例えば、Ｐ．Ｆｅｌｇｎｅｒら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８４：７４１３－７４１

７を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。同様の方法は、他のカチオン性脂質物質からリポソームを調製するために用いられ得る。

【０５４３】

同様に、アニオン性および中性リポソームは、例えば、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ脂質（Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，Ａｌａ．）から容易に入手可能であるか、または容易に入手可能な物質を用いて容易に調製され得る。かかる物質は、とりわけ、ホスファチジル、コリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）を含む。これらの物質はまた、ＤＯＴＭＡおよびＤＯＴＡＰ出発物質と適切な割合で混合され得る。これらの物質を用いたリポソームの製造方法は、当該技術分野においてよく知られている。

【０５４４】

例えば、市販のジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）を様々な組み合わせで用いて、コレステロールを加えてまたは加えることなく、慣用的なリポソームを作製することができる。従って、例えば、超音波処理バイアルへの窒素気流下で、それぞれ５０ｍｇのＤＯＰＧおよびＤＯＰＣを乾燥させることにより、ＤＯＰＧ／ＤＯＰＣベシクルを調製することができる。試料を吸引ポンプ下に一晩置き、次の日に脱イオン水で水和する。次いで、逆転カップ（槽タイプ）プローブを備えたヒートシステムズモデル３５０ソニケーターを最大設定で用いて、槽を１５℃で循環させながら、キャップしたバイアル中で試料を２時間超音波処理する。別法では、超音波処理せずに、負荷電ベシクルを調製し、多重膜ベシクルを形成することができ、或いはメンブレンからの押し出しにより、個別の大きさの一枚膜ベシクルを形成することができる。他の方法も知られており、および当業者に利用される。

【０５４５】

リポソームは、多重膜ベシクル（ＭＬＶｓ）、小さな一枚膜ベシクル（ＳＵＶｓ）または大きな一枚膜ベシクル（ＬＩＪＶｓ）を含み、ＳＵＶｓが好ましい。様々なリポソーム－核酸複合体は、当該技術分野においてよく知られている方法を用いて調製される。例えば、Ｓｔｒａｕｂｉｎｇｅｒら．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９８３），１０１：５１２－５２７を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。例えば、核酸を含むＭＬＶｓは、ガラス管の壁に薄いフィルム状のリン脂質を付着させ、次いで、カプセル化されるべき物質の溶液を用いて水和することにより、作製することができる。ＳＵＶｓは、ＭＬＶｓの超音波処理を長引かせ、一枚膜リポソームの均質な集団を形成することにより作製する。封入されるべき物質を、形成されたＭＬＶｓの懸濁液に加え、次いで、超音波処理する。カチオン性脂質を含むリポソームを用いて、乾燥した脂質フィルムを、適切な溶液、例えば、滅菌水または１０ｍＭのトリス／ＮａＣＩのごとき等張バッファー溶液中に再懸濁し、超音波処理し、次いで、形成されたリポソームはＤＮＡと直接混合させる。リポソームおよびＤＮＡは、正荷電リポソームとカチオン性ＤＮＡとの結合に起因して、非常に安定な複合体を形成する。ＳＵＶｓは、小さな核酸断片を用いる用途も見出す。ＬＵＶｓは、当該技術分野においてよく知られている多数の方法により調製される。一般的に用いられる方法は、ＣＬ２’－ＥＤＴＡキレート化（Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓら．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ（１９７５）３９４：４８３；Ｗｉｌｓｏｎら．，Ｃｅｌｌ　１７：７７（１９７９））；エーテル注入（Ｄｅａｍｅｒ，Ｄ．およびＢａｎｇｈａｍ，Ａ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ　４４３：６２９（１９７６）；Ｏｓｔｒｏら．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．７６：８３６（１９７７）；Ｆｒａｌｅｙら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７６：３３４８（１９７９））；デタージェント透析（Ｅｎｏｃｈ，Ｈ．およびＳｔｒｉｔｔｍａｔｔｅｒ，Ｐ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７６：１４５（１９７９））；および逆相蒸発（ＲＥＶ）（Ｆｒａｌｅｙら．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５５：１０４３１（１９８０）；

Ｓｚｏｋａ，Ｆ．およびＰａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓ，Ｄ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７５：１４５（１９７８）；Ｓｃｈａｅｆｅｒ－Ｒｉｄｄｅｒら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２１５：１６６（１９８２））を含む。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。

【０５４６】

一般的に、リポソームに対するＤＮＡの比は、約１０：１ないし約１：１０である。好ましくは、該比は、約５：１ないし約１：５である。より好ましくは、該比は、約３：１ないし約１：３であり得る。さらにより好ましくは、該比は約１：１であり得る。

【０５４７】

米国特許第５，６７６，９５４号（該文献は出典明示により本明細書の一部となる）は、カチオン性リポソーム担体に複合体化された遺伝物質のマウスへの注入を報告している。米国特許第４，８９７，３５５号、第４，９４６，７８７号、第５，０４９，３８６号、第５，４５９，１２７号、第５，５８９，４６６号、第５，６９３，６２２号、第５，５８０，８５９号、第５，７０３，０５５号および国際公開番号ＷＯ９４／９４６９（該文献は出典明示により本明細書の一部となる）は、細胞および哺乳類中へのＤＮＡのトランスフェクションにおいて用いられるためのカチオン性脂質を提供する。米国特許第５，５８９，４６６号、第５，６９３，６２２号、第５，５８０，８５９号、第５，７０３，０５５号および国際公開番号ＷＯ　９４／９４６９は哺乳類へＤＮＡ－カチオン性脂質複合体を送達するための方法を提供する。

【０５４８】

特定の実施態様において、細胞は、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードする配列を含むＲＮＡを含むレトロウイルス粒子を用いて、エキソビボまたはインビボにて操作される。レトロウイルスプラスミドベクターが由来してもよいレトロウイルスは、モロニーマウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、ギボンザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルスおよび哺乳類腫瘍ウイルスを含むが、これらに限定されない。

【０５４９】

レトロウイルスプラスミドベクターを用いて、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。形質導入されてもよいパッケージング細胞の例は、ＰＥ５０１、ＰＡ３１７、Ｒ－２、Ｒ－ＡＭ、ＰＡ１２、Ｔ１９－１４Ｘ、ＶＴ－１９－１７－Ｈ２、ＲＣＲＥ、ＲＣＲＩＰ、ＧＰ＋Ｅ－８６、ＧＰ＋ｅｎｖＡｍｌ２、およびＭｉｌｌｅｒ、ＨｕｍａＧｅｎｅＴｈｅｒａｐｙ１：５－１４（１９９０）にて記載されているようなＤＡＮ細胞株を含むが、これらに限定されない。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。ベクターは、当該技術分野において知られている任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入してもよい。かかる手段は、エレクトロポレーション、リポソームの使用およびＣａＰＯ$_4$沈殿を含むが、これらに限定されない。一の別法において、レトロウイルスプラスミドベクターは、リポソーム中にカプセル化されるか、または脂質にカップリングされ、次いで、宿主に投与される。

【０５５０】

プロディーサー細胞株は、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含む感染性レトロウイルスベクター粒子を生じる。次いで、かかるレトロウイルスベクター粒子を用いて、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、真核細胞を形質導入してもよい。形質導入された真核細胞は、本発明の融合蛋白質を発現し得る。

【０５５１】

特定の他の実施態様において、アデノウイルスベクター中に含まれるポリヌクレオチドを用いて、エキソビボまたはインビボにおいて細胞を操作する。アデノウイルスは、それが本発明の融合蛋白質をコードおよび発現すると同時に、正常なの溶菌ウイルス生活環において複製するその能力に関しては不活性化されるように、操作することができる。アデノウイルス発現は、宿主細胞染色体へウイルスＤＮＡを組み込むことなく成し遂げられ、それにより、挿入突然変異誘発に関する問題が緩和される。さらに、アデノウイルスは、

優れた安全プロフィールを有する腸溶性生ワクチンとして長年使用されてきた（Ｓｃｈｗａｒｔｚら．Ａｍ．Ｒｅｖ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｄｉｓ．１０９：２３３－２３８（１９７４））。最後に、アデノウイルス媒介遺伝子輸送は、コットンラットの肺へのアルファ－１－抗トリプシンおよびＣＦＴＲの輸送を含む、多数の事例において実証されている（Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ、Ｍ．Ａ．ら．（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ２５２：４３１４３４；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら．、（１９９２）Ｃｅｌｌ　６８：１４３－１５５）。さらに、アデノウイルスをヒト癌における原因物質として証明しようとする大規模な研究は、一様に否定的であった（Ｇｒｅｅｎ，Ｍ．ら．（１９７９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７６：６６０６）。

【０５５２】

本発明において有用な適当なアデノウイルスベクターは、例えば、ＫｏｚａｒｓｋｙおよびＷｉｌｓｏｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖｅｌ．３：４９９－５０３（１９９３）；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら．，Ｃｅｌｌ６８：１４３－１５５（１９９２）；Ｅｎｇｅｌｈａｒｄｔら．，ＨｕｍａｎＧｅｎｅｔ．Ｔｈｅｒ．４：７５９－７６９（１９９３）；Ｙａｎｇら．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔ．７：３６２－３６９（１９９４）；Ｗｉｌｓｏｎら．，Ｎａｔｕｒｅ　３６５：６９１－６９２（１９９３）；および米国特許第５，６５２，２２４号に記載されている。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。例えば、アデノウイルスベクターＡｄ２は有用であり、およびヒト２９３細胞において成長させることができる。これらの細胞は、アデノウイルスのＥｌ領域を含み、およびＥｌａおよびＥｌｂを構成的に発現し、ベクターから欠失された遺伝子の産物を提供することにより、欠損アデノウイルスを補完する。Ａｄ２に加えて、アデノウイルスの他の変種（例えば、Ａｄ３、Ａｄ５およびＡｄ７）も本発明において有用である。

【０５５３】

好ましくは、本発明において用いられるアデノウイルスは、複製能欠損性である。複製能欠損アデノウイルスは、感染性粒子を形成するために、ヘルパーウイルスおよび／またはパッケージング細胞株の補助を必要とする。得られるウイルスは、細胞に感染でき、およびプロモーターに作動的に連結した目的のポリヌクレオチドを発現することができるが、ほとんどの細胞で複製することができない。複製能欠損アデノウイルスは、以下の遺伝子：Ｅｌａ、Ｅｌｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｅ２ａまたはＬｌ～Ｌ５の全てまたは一部の１またはそれ以上を欠失していてもよい。

【０５５４】

特定の他の実施態様において、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）を用いて、エキソビボまたはインビボにおいて細胞を操作する。ＡＡＶｓは、感染性粒子を生じるのにヘルパーウイルスを必要とする、自然に発生する欠損ウイルスである（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｎ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ　ｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７（１９９２））。それは、そのＤＮＡを非分化細胞へ組み込み得る幾つかのウイルスの１つであってもよい。わずか３００塩基対を含むＡＡＶのベクターは、パッケージし、そして組み込むことができるが、外因性ＤＮＡのための空間は、約４．５ｋｂに限られている。ＡＡＶｓの生成および使用方法は、当該技術分野において知られている。例えば、米国特許第５，１３９，９４１号、第５，１７３，４１４号、第５，３５４，６７８号、第５，４３６，１４６号、第５，４７４，９３５号、第５，４７８，７４５号および第５，５８９，３７７号を参照のこと。

【０５５５】

例えば、本発明における使用のために適切なＡＡＶベクターは、ＤＮＡ複製、キャプシド形成および宿主－細胞組み込みのために必要な全ての配列を含む。ポリヌクレオチドコンストラクトは、標準的なクローニング方法、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ（１９８９）にて見出されるものを用いて、ＡＡＶベクター中に挿入される。次いで、組換えＡＡＶベクターは、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む任意の標準的な技法により、ヘル

パーウイルスを用いて感染されるパッケージング細胞中にトランスフェクションされる。適切なヘルパーウイルスは、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、牛痘ウイルスまたはヘルペスウイルスを含む。一旦、パッケージング細胞がトランスフェクションおよび感染されると、それらは、ポリヌクレオチドコンストラクトを含む感染性ＡＡＶウイルス粒子を生じ得る。次いで、これらのウイルス粒子をエキソビボまたはインビボにいずれかにおいて用いて、真核細胞を形質導入する。形質導入された細胞は、そのゲノムに統合されたポリヌクレオチドコンストラクトを含み得、および本発明の融合蛋白質を発現し得る。

【０５５６】

遺伝子治療の別の方法は、相同組換えにより作動的に連結する異種制御領域および内因性ポリヌクレオチド配列（例えば、本発明のポリペプチドをコードする）を含む（例えば、１９９７年６月２４日公開の米国特許第５，６４１，６７０号；１９９６年９月２６日公開の国際公開番号ＷＯ９６／２９４１１；１９９４年８月４日公開の国際公開番号ＷＯ９４／１２６５０；Ｋｏｌｌｅｒら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：８９３２－８９３５（１９８９）；およびＺｉｊｌｓｔｒａら．，Ｎａｔｕｒｅ３４２：４３５－４３８（１９８９）を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる）。この方法は、標的細胞中に存在するが、正常に細胞に発現されない、または所望レベルよりも低いレベルで発現されている遺伝子の活性化を含む。

【０５５７】

当該技術分野において知られている標準的な技法を用いて、標的配列が隣接して位置するプロモーターを含むポリヌクレオチドコンストラクトを作製する。適当なプロモーターは本明細書中記載されている。標的配列は、内因性配列とプロモーター－標的配列の相同組換えが可能となるように、内因性配列に対して十分に相補的である。標的配列は、所望の内因性ポリヌクレオチド配列の５’末端に十分に近接しており、その結果、プロモーターは、相同組換えの際に、内因性配列に作動的に結合され得る。

【０５５８】

プロモーターおよび標的配列は、ＰＣＲを用いて増幅され得る。好ましくは、増幅されたプロモーターは、５’および３’末端に特徴的な制限酵素部位を含む。好ましくは、初めの標的配列の３’末端は、増幅されたプロモーターの５’末端と同じ制限酵素部位を含み、および二番目の標的配列の５’末端は、増幅されたプロモーターの３’末端と同じ制限部位を含む。増幅されたプロモーターおよび標的配列は共に消化され、およびライゲートされる。

【０５５９】

プロモーター－標的配列コンストラクトは、裸のポリヌクレオチドとしてか、またはトランスフェクション－促進剤、例えば、以下に詳細に記載されるリポソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、全ウイルス、リポフェクション、沈殿剤などとの組み合わせのいずれかにより、細胞に送達される。Ｐプロモーター－標的配列は、直接針注入、静脈内注入、局所投与、カテーテル注入、粒子加速器などを含む任意の方法により、送達され得る。該方法は以下に詳細に記載する。

【０５６０】

プロモーター－標的配列コンストラクトは、細胞により取り込まれる。コンストラクトおよび内因性配列の間の相同組換えが生じ、結果として、内因性配列はプロモーターの制御下に置かれる。次いで、プロモーターは内因性配列の発現を駆動する。

【０５６１】

本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、蛋白質の分泌を改善する分泌シグナル配列を含んでもよい。典型的に、シグナル配列は、発現させようとするポリヌクレオチドのコーディング領域中、またはコーディング領域の５’末端に位置する。シグナル配列は、目的のポリヌクレオチドに対して相同または非相同であってもよく、およびトランスフェクションされるべき細胞に対して相同または非相同であってもよい。さらに、シグナル配列は、当該技術分野において知られている方法を用いて、化学的に合成されてもよい。

【０５６２】
治療効果を与えるのに十分な量で１またはそれ以上の分子を発現する限り、任意の上記したポリヌクレオチドコンストラクトの任意の投与方法を用いることができる。これは、直接針注入、全身注入、カテーテル注入、微粒子銃注入、粒子加速器（すなわち、「遺伝子銃」）、ゲルフォームスポンジデポー、他の市販のデポー物質、浸透圧ポンプ（例えば、Ａｌｚａミニポンプ）、経口または坐剤用固形（錠剤またはピル剤）医薬処方ならびに手術中のデカントまたは局所適用を含む。例えば、リン酸カルシウム－沈殿された裸のプラスミドをラット肝臓およびラット脾臓中へ直接注入するか、または蛋白質コーティングされたプラスミドを門脈中へ直接注入することにより、ラット肝臓において外来遺伝子の遺伝子発現をもたらした（Ｋａｎｅｄａら．、Ｓｃｉｅｎｃｅ２４３：３７５（１９８９））。

【０５６３】
局所投与の好ましい方法は、直接注入による。好ましくは、デリバリービヒクルに複合体化させた本発明のアルブミン融合蛋白質を、動脈領域内への直接注入により、または該領域内に局所的に投与する。動脈領域内への組成物の局所投与は、動脈内の数センチメートル、および好ましくは、数ミリメートルの領域へ組成物を注入することを言う。

【０５６４】
局所投与の別の方法は、本発明のポリヌクレオチドコンストラクトを手術による創傷内またはその周辺に接触させることである。

【０５６５】
例えば、患者は手術を受け、そしてポリヌクレオチドコンストラクトを創傷内部の組織表面上に塗布するか、または該コンストラクトを創傷内部の組織領域に注入することができる。

【０５６６】
全身投与において有用な治療用組成物は、本発明の標的デリバリービヒクルに複合体化させた本発明の融合蛋白質を含む。全身投与に用いるために適当なデリバリービヒクルは、ビヒクルを特定部位にターゲッティングさせるためのリガンドを含むリポソームを包含する。特定の実施態様において、全身投与に用いるために適当なデリバリービヒクルは、ビヒクルを特定部位にターゲッティングさせるための本発明のアルブミン融合蛋白質を含むリポソームを包含する。

【０５６７】
全身投与の好ましい方法は、静脈内注入、エアロゾル、経口および経皮（局所）送達を含む。当該技術分野において標準的な方法を用いて、静脈内注入を実施することができる。エアロゾルデリバリーも、当該技術分野において標準的な方法を用いて実施することができる（例えば、Ｓｔｒｉｂｌｉｎｇら．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１８９：１１２７７－１１２８１，１９９２を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる）。経口送達は、本発明のポリヌクレオチドコンストラクトを、動物の消化管にある消化酵素による分解に耐え得る担体に複合体化させることにより、実施することができる。かかる担体の例は、プラスチックカプセル剤またはタブレット剤、例えば、当該技術分野において知られているものを含む。局所送達は、本発明のポリヌクレオチドコンストラクトを、皮膚に浸透可能な脂肪親和性試薬（例えば、ＤＭＳＯ）と混合することにより、実施することができる。

【０５６８】
送達されるべき物質の有効量は、例えば、物質の化学構造および生物活性、動物の年齢および体重、処置を要する正確な状態およびその重篤度ならびに投与経路を含む多数の因子に応じて決定される。処置の頻度は多数の因子、例えば、１用量あたり投与されるポリヌクレオチドコンストラクトの量ならびに対象の健康状態および病歴に依存する。正確な量、投与回数および投与のタイミングは、担当の医師または獣医により決定され得る。

【０５６９】
本発明のアルブミン融合蛋白質は、任意の動物、好ましくは哺乳類および鳥類へ投与さ

れ得る。好ましい哺乳類は、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマおよびブタを含み、特にヒトが好ましい。

【０５７０】

生物活性

アルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、１またはそれ以上の生物活性を試験するためのアッセイにおいて用いられ得る。アルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドが、特定のアッセイにおいて活性を示すならば、その融合蛋白質に対応する治療用蛋白質は、その生物活性に関連する疾患に関与している可能性がある。故に、融合蛋白質を用いて、関連疾患を処置することができよう。

【０５７１】

好ましい実施態様において、本発明は、表１の「好適な適応症Ｙ」の欄に挙げた疾患または障害の処置方法であって、かかる処置、予防または緩和が所望される患者へ、表１の「治療用蛋白質Ｘ」の欄に開示される（表１の「好適な適応症Ｙ」に開示される処置されるべき疾患または障害と同じ列中）治療用蛋白質に対応する治療用蛋白質部分を含む本発明のアルブミン融合蛋白質を、疾患または障害を処置、予防または改善するのに有効な量で投与することを含む方法を包含する。

【０５７２】

さらに好ましい一の実施態様において、本発明は、表１の「好適な適応症Ｙ」の欄に挙げる特定の治療用蛋白質について記載された疾患または障害の処置方法であって、かかる処置、予防または緩和が所望される患者へ、実施例の適応症に関連する、治療用蛋白質に対応する治療用蛋白質部分を含む本発明のアルブミン融合蛋白質を、疾患または障害を処置、予防または改善するのに有効な量で投与することを含む方法を包含する。

【０５７３】

配列番号：Ｙをコードするポリヌクレオチドによりコードされる場合、細胞により産生されるアルブミン融合蛋白質が、本発明により特に熟慮される。これらのポリヌクレオチドを用いて、細胞からコードされた蛋白質を発現させる場合、細胞の自然分泌およびプロセッシング段階は、表２の欄４および／または１１に明確に記載されるシグナル配列を欠損している蛋白質を生じる。記載されたシグナル配列の特定のアミノ酸配列は、明細書中に示されているか、または当該技術分野においてよく知られている。故に、本発明の最も好ましい実施態様は、細胞により産生されるアルブミン融合蛋白質（表２の欄４および／または１１で示されるリーダー配列を欠損している）を含む。さらに、表２の欄４および／または１１に記載される特定のリーダー配列を有さない、配列番号：Ｙを含むポリペプチドが最も好ましい。これらの２つの好ましい実施態様を包含する、医薬組成物を含む組成物も好ましい。これらのアルブミン融合蛋白質は、表１の「好適な適応症：Ｙ」の欄にて特定の治療用蛋白質について記載された疾患または障害を処置、予防または改善するために特に熟慮される。

【０５７４】

好ましい実施態様において、本発明の融合蛋白質は、内分泌系（例えば、以下の「内分泌障害」セクションを参照のこと）、神経系（例えば、以下の「神経疾患」セクションを参照のこと）、免疫系（例えば、以下の「免疫活性」セクションを参照のこと）、呼吸器系（例えば、以下の「呼吸器疾患」セクションを参照のこと）、心血管系（例えば、以下の「心血管疾患」セクションを参照のこと）、生殖器系（例えば、以下の「生殖器系疾患」セクションを参照のこと）消化器系（例えば、以下の「胃腸疾患」セクションを参照のこと）、細胞増殖に関連する疾患および／または障害（例えば、以下の「過増殖性疾患」セクションを参照のこと）および／または血液に関連する疾患または障害（例えば、以下の「血液関連疾患」セクションを参照のこと）の疾患および障害に関連する疾患および／または障害の診断、予後、予防および／または処置において用いられてもよい。

【０５７５】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、本発明の融合蛋白質の治

療用蛋白質部分に対応する遺伝子が発現されている、一または複数の組織に関連する疾患および／または障害を診断および／または予後するために用いられてもよい。

【０５７６】

故に、本発明の融合蛋白質および本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、プロホルモン活性化、神経伝達物質活性、細胞シグナル伝達、細胞増殖、細胞分化および細胞遊走を含むがこれらに限定されない活性に関連する疾患および／または障害の診断、検出および／または処置において有用である。

【０５７７】

より一般的には、本発明の融合蛋白質および本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、以下の系に関連する疾患および／または障害の診断、予後、予防および／または処置において有用である。

【０５７８】

免疫活性

本発明のアルブミン融合蛋白質および本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、免疫細胞の増殖、分化または動員（走化性）を活性化または阻害することにより、免疫系の疾患、障害および／または状態の処置、予防、診断および／または予後において有用であってもよい。免疫細胞は、血球新生と呼ばれる過程を通して発達し、多能性幹細胞からミエロイド（血小板、赤血球細胞、好中球およびマクロファージ）およびリンパ（ＢおよびＴリンパ球）細胞を生じる。これらの免疫性疾患、障害および／または状態の病因は、癌および幾つかの自己免疫疾患のように遺伝的、体質的、後天的（例えば、化学療法または毒素による）なものかまたは感染性のものであってもよい。さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、特定の免疫系疾患または障害のマーカーまたは検出器として用いられ得る。

【０５７９】

別の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、免疫系を疾患および障害するため、および／または本発明のポリペプチドが発現される一または複数の組織に関連する細胞により生じる免疫応答を阻害または亢進するために用いられてもよい。

【０５８０】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、先天的および後天的免疫不全の両方を含む免疫不全の処置、予防、診断、および／または予後において有用であってもよい。免疫グロブリンレベルＢ細胞機能および／またはＢ細胞数が減少するＢ細胞免疫不全の例は：Ｘ連鎖性無ガンマグロブリン血症（Ｂｒｕｔｏｎ’ｓ疾患）、Ｘ連鎖性乳児無ガンマグロブリン血症、高ＩｇＭを伴うＸ連鎖性免疫不全、高ＩｇＭを伴う非Ｘ連鎖性免疫不全、Ｘ連鎖性リンパ増殖症候群（ＸＬＰ）、先天的および後天的無ガンマグロブリン血症、成人性無ガンマグロブリン血症、遅発性無ガンマグロブリン血症、ガンマグロブリン異常症、低ガンマグロブリン血症、非特異的低ガンマグロブリン血症、劣性無ガンマグロブリン血症（スイス型）を含む無ガンマグロブリン血症、選択的ＩｇＭ欠乏、選択的ＩｇＡ欠乏、選択的ＩｇＧサブクラス欠乏、ＩｇＧサブクラス欠乏（ＩｇＡ欠乏を伴うまたは伴わない）、ＩｇＭ増大を伴うＩｇ欠乏、ＩｇＭ増大を伴うＩｇＧおよびＩｇＡ欠乏、正常または増加Ｉｇを伴う抗体欠損症、Ｉｇ重鎖欠失、カッパ鎖欠損症、Ｂ細胞リンパ増殖障害（ＢＬＰＤ）、分類不能原発性免疫不全（ＣＶＩＤ）、分類不能型免疫不全（ＣＶＩ）（後天的）および乳児一時性低ガンマグロブリン血症を含むが、これらに限定されない。

【０５８１】

特定の実施態様において、毛細血管拡張性失調症または毛細血管拡張性失調症に関連する状態は、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置、予防、診断および／または予後される。

【０５８２】

Ｔ細胞および／またはＢ細胞機能および／または数が減少している先天的免疫不全の例は：ディジョージ異常症、重症複合型免疫不全（ＳＣｉＤ）（Ｘ連鎖性ＳＣＩＤ、常染色体劣性ＳＣＩＤ、アデノシンデアミナーゼ欠乏、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（ＰＮＰ）欠乏、クラスＩＩＭＨＣ欠乏（不全リンパ球症候群）、ウィスコット・アルドリッチ症候群および毛細血管拡張性失調症を含むが、これらに限定されない）、胸腺形成不全症、第３および第４咽頭嚢症候群、２２ｑｌ１．２欠失、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ナチュラルキラー細胞欠損（ＮＫ）、特発性ＣＤ４＋Ｔ－リンパ球減少症、主要Ｔ細胞欠損（非特異的）を伴う免疫不全および細胞介在免疫の非特異的免疫不全を含むが、これらに限定されない。

【０５８３】

特定の実施態様において、ディジョージ異常症またはディジョージ異常症に関連する状態は、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、処置、予防、診断および／または予後される。

【０５８４】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置、予防、診断および／または予後されてもよい他の免疫不全は、慢性肉芽腫症、チェディアック・東症候群、ミエロペルオキシダーゼ欠乏、白血球グルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ欠乏、Ｘ連鎖性リンパ増殖症候群（ＸＬＰ）、白血球接着欠乏、補体成分欠損症（Ｃｌ、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８および／またはＣ９欠乏を含む）、細網異形成症、胸腺リンパ形成不全症－無形成、胸腺腫を伴う免疫不全、重篤な先天的白血球減少症、免疫不全を伴う異形成症、新生児好中球減少症、四肢短縮型低身長症、およびｌｇｓを伴うネゼロフ症候群複合型免疫不全を含むが、これらに限定されない。

【０５８５】

好ましい一の実施態様において、上記した免疫不全および／または免疫不全に関連する状態は、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、処置、予防、診断および／または予後される。

【０５８６】

好ましい一の実施態様において本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、免疫不全症の個体において免疫応答性を改善する剤として用いられ得るだろう。特定の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、Ｂ細胞および／またはＴ細胞免疫欠損の個体において免疫応答性を改善する剤として用いられ得るだろう。

【０５８７】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、自己免疫疾患の処置、予防、診断および／または予後において有用であってもよい。多くの自己免疫疾患は、免疫細胞が自己を外来物質と不適切に認識することから生じる。この不適切な認識は、宿主組織の破壊に至る免疫応答をもたらす。それ故に、免疫応答、特にＴ－細胞の増殖、分化または走化性を阻害し得る本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドの投与は、自己免疫疾患の予防において有効な両方であってもよい。

【０５８８】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより処置、予防、診断および／または予後されてもよい自己免疫疾患または障害は、以下：全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、強直性脊椎炎、多発性硬化症、自己免疫甲状腺炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性溶血性貧血、溶血性貧血、血小板減少症、自己免疫血小板減少症紫斑病、自己免疫新生児血小板減少症、特発性血小板減少症紫斑病、紫斑病（例えば、Ｈｅｎｌｏｃｈ－Ｓｃｏｅｎｌｅｉｎ紫斑病）、自己免疫性血球減少、グッドパスチャー症候群、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、グレーブス病（甲状腺機能亢

進症）およびインスリン耐性真性糖尿病の１またはそれ以上を含むが、これらに限定されない。

【０５８９】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置、予防および／または診断されてもよい自己免疫成分を有すると考えられるさらなる障害は、ＩＩ型コラーゲン誘導関節炎、抗リン脂質抗体症候群、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、心筋炎、再発性多発性軟骨炎、リウマチ性心疾患、神経炎、ブドウ膜炎眼炎、多腺性内分泌障害、ライター疾患、スティフマン症候群、自己免疫経肺炎症、自閉症、ギラン・バレー症候群、インスリン依存性真性糖尿病および自己免疫性炎症性眼障害を含むが、これらに限定されない。

【０５９０】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置、予防、診断および／または予後されてもよい自己免疫成分を有する可能性のあるさらなる障害は、抗コラーゲン抗体を伴う強皮症（多くの場合、例えば、核および他の核抗体により特徴付けられる）、混合性結合組織疾患（多くの場合、例えば、抽出可能な核抗原に対する抗体（例えば、リボヌクレオ蛋白質）により特徴付けられる）、多発性筋炎多くの場合、例えば、非ヒストン性ＡＮＡにより特徴付けられる）、悪性貧血（多くの場合、例えば、抗壁細胞、ミクロソーム、および内因子抗体により特徴付けられる）、特発性アジソン疾患（多くの場合、例えば、体液性および細胞介在副腎細胞傷害、不妊症（多くの場合、例えば、抗精子抗体により特徴付けられる）、糸球体腎炎（多くの場合、例えば、糸球体基底膜抗体または免疫複合体により特徴付けられる）、水疱性類天疱瘡（多くの場合、例えば、基底膜中のＩｇＧおよび補体により特徴付けられる）、シェーグレン症候群（多くの場合、例えば、複数の組織抗体、および／または特定の非ヒストン性ＡＮＡ（ＳＳ－Ｂ）により特徴付けられる）、真性糖尿病（多くの場合、例えば、細胞介在および体液性島細胞抗体により特徴付けられる）およびアドレナリン薬剤耐性（喘息または嚢胞性線維症を伴うアドレナリン薬剤耐性を含む）（多くの場合、例えば、ベーターアドレナリン受容体抗体により特徴付けられる）を含むが、これらに限定されない。

【０５９１】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置、予防、診断および／または予後されてもよい、自己免疫成分を含むさらなる障害は、慢性活動性肝炎（多くの場合、例えば、平滑筋抗体により特徴付けられる）、原発性胆汁性肝硬変（多くの場合、例えば、ミトコンドリア抗体により特徴付けられる）、他の内分泌腺障害（例えば、特定の組織抗体より特徴付けられる場合もある）、白斑（多くの場合、例えば、メラノサイト抗体により特徴付けられる）、脈管炎（多くの場合、例えば、脈管壁中のＩｇおよび補体および／または低血清補体により特徴付けられる）、心筋梗塞後症候群（ｐｏｓｔ－ＭＩ）（多くの場合、例えば、心筋抗体により特徴付けられる）、心臓切開症候群（多くの場合、例えば、心筋抗体により特徴付けられる）、じんま疹（多くの場合、例えば、ＩｇＥに対するＩｇＧおよびＩｇＭ抗体により特徴付けられる）、アトピー性皮膚炎（多くの場合、例えば、ＩｇＥに対するＩｇＧおよびＩｇＭ抗体により特徴付けられる）、喘息（多くの場合、例えば、ＩｇＥに対するＩｇＧおよびＩｇＭ抗体により特徴付けられる）および多くの他の炎症性、肉芽腫性、変性および萎縮性障害を含むが、これらに限定されない。

【０５９２】

好ましい一の実施態様において、自己免疫疾患および障害および／または上記した疾患および障害に関連する状態は、例えば、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、処置、予防、診断および／または予後される。一の特定の好ましい実施態様において、関節リウマチは、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、処置、予防および／または診断される。

【０５９３】
別の特定の好ましい実施態様において、全身性エリテマトーデスは、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、処置、予防および／または診断される。別の特定の好ましい実施態様において、特発性血小板減少症紫斑病は、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、処置、予防および／または診断される。
【０５９４】
別の特定の好ましい実施態様においてＩｇＡ腎障害は、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、処置、予防および／または診断される。
【０５９５】
好ましい一の実施態様において、自己免疫疾患および障害および／または上記した疾患および障害に関連する状態は、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、処置、予防、診断および／または予後される。
【０５９６】
好ましい実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、一または複数の免疫抑制剤として用いられる。
【０５９７】
本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、造血細胞の疾患、障害および／または状態の処置、予防、予後および／または診断において有用であってもよい。白血球減少症、好中球減少症、貧血および血小板減少症を含むがこれらに限定されない、特定（または多くの）型の造血細胞の減少に関連する疾患、障害および／または状態を処置または予防するために、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、造血細胞の分化および増殖を増大させることができよう。別法では、組織球症を含むがこれらに限定されない、特定（または多くの）型の造血細胞の増大に関連する疾患、障害および／または状態を処置または予防するために、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、造血細胞の分化および増殖を増大させることができよう。
【０５９８】
アレルギー反応および状態、例えば、喘息（特にアレルギー性喘息）または他の呼吸器系障害も、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、処置、予防、診断および／または予後されてもよい。さらに、これらの分子は、アナフィラキシー、抗原分子に対する過感受性または血液型不適合を処置、予防、予後および／または診断するために用いられ得る。
【０５９９】
さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ＩｇＥ介在アレルギー反応を処置、予防、診断および／または予後するために用いられてもよい。かかるアレルギー反応は、喘息、鼻炎および湿疹を含むが、これらに限定されない。特定の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、インビトロまたはインビボにおいて、ＩｇＥ濃度を調節するために用いられてもよい。
【０６００】
さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、炎症状態の診断、予後、予防および／または処置における用途も有する。例えば、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、炎症性応答に関与する細胞の活性化、増殖および／または分化を阻害してもよいので、これらの分子は、慢性および急性炎症状態を予防および／ま

たは処置するために用いることができる。かかる炎症状態は、例えば、感染に関連する炎症（例えば、敗血症ショック、敗血症、または全身性炎症反応症候群）、虚血再灌流傷害、内毒素による致死、補体介在超急性拒絶、腎炎、サイトカインまたはケモカイン誘導肺傷害、炎症性腸疾患、クローン病、サイトカイン（例えば、ＴＮＦまたはＩＬ－１）の産生過剰、呼吸器疾患（例えば、喘息およびアレルギー）；胃腸疾患（例えば、炎症性腸疾患）；癌（例えば、胃、卵巣、肺、膀胱、肝臓および胸）；ＣＮＳ障害（例えば、多発性硬化症；虚血性脳傷害および／または脳卒中、外傷性脳傷害、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病およびアルツハイマー病）；ＡＩＤＳ関連認知症；およびプリオン疾患）；心血管疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症、心筋炎、心血管疾患および心肺バイパス合併症）；ならびに炎症（例えば、肝炎、関節リウマチ、痛風、外傷、膵炎、サルコイドーシス、皮膚炎、腎虚血再灌流傷害、グレーブス病、全身性エリテマトーデス、真性糖尿病および同種移植拒絶反応）により特徴付けられる多くのさらなる疾患、状態および障害を含むが、これらに限定されない。

【０６０１】

炎症は基本的な防御機構であるので、事実上炎症性疾患は、身体の事実上任意の組織に作用する。従って、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、副腎炎、肺胞炎、胆管胆嚢炎、虫垂炎、亀頭炎、眼瞼炎、気管支炎、滑液包炎、心臓炎、蜂巣炎、子宮頸管炎、胆嚢炎、声帯炎、結腸炎、大腸炎、結膜炎、膀胱炎、皮膚炎、憩室炎、脳炎、心内膜炎、食道炎、耳管炎、結合組織炎、毛嚢炎、胃炎、胃腸炎、歯肉炎、舌炎、肝脾炎、角膜炎、内耳炎、喉頭炎、リンパ管炎、乳腺炎、中耳炎、髄膜炎、子宮筋層炎、粘膜炎、心筋炎、筋炎、鼓膜炎、腎炎、神経炎、精巣炎、骨軟骨炎、耳炎、心膜炎、腱鞘炎、腹膜炎、咽頭炎、静脈炎、灰白髄炎、前立腺炎、歯髄炎、網膜炎、鼻炎、卵管炎、強膜炎、強膜脈絡膜炎、陰嚢炎、副鼻腔炎、脊椎炎、脂肪組織炎、口内炎、滑膜炎、耳管炎、腱炎、扁桃炎、尿道炎および膣炎を含むがこれらに限定されない組織特異的炎症性疾患の処置において用いられる。

【０６０２】

特定の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、器官移植拒絶反応および移植片対宿主病を診断、予後、予防および／または処置するために有用である。器官拒絶反応は、免疫応答を介した移植組織の宿主免疫細胞破壊によって生じる。同様に、免疫応答はＧＶＨＤにも関与するが、この場合、外来の移植された免疫細胞は宿主組織を破壊する。免疫応答、特にＴ－細胞の活性化、増殖、分化または走化性を阻害する、ポリペプチド、抗体または本発明のポリヌクレオチドおよび／またはそれらのアゴニストまたはアンタゴニストは、予防器官拒絶反応またはＧＶＨＤにおいて有効な療法であってもよい。特定の実施態様において、免疫応答、特にＴ－細胞の活性化、増殖、分化または走化性を阻害する、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、実験的アレルギー性および超急性異種移植拒絶反応の予防において有効な療法であってもよい。

【０６０３】

他の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血清病、膿痂疹後腎炎、結節性多発性動脈炎、および免疫複合体誘導脈管炎を含むがこれらに限定されない免疫複合体疾患を診断、予後、予防および／または処置するために有用である。

【０６０４】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、感染物質を処置、検出および／または予防するために用いられ得る。例えば、免疫応答を増大させることにより、特にＢおよび／またはＴ細胞の増殖活性化および／または分化を増大させることにより、感染症は処置、検出および／または予防されてもよい。免疫応答は、存在する免疫応答を高めるか、または新しい免疫応答を惹起するかのいずれかにより、増大されてもよい。別法では、本発明の融合蛋白質および／

または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、免疫応答を必ずしも引き出すことなしに、感染物質（感染物質などを記載する本明細書のセクションを参照のこと）を直接阻害してもよい。

【０６０５】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、抗原に対する免疫応答を高めるワクチンアジュバントとして用いられる。特定の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、腫瘍特異的な免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。

【０６０６】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、抗－ウイルス免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。アジュバントとして本発明の組成物を用いて高められてもよい抗－ウイルス免疫応答は、ウイルスおよび本明細書中記載されているまたはそうでなければ当該技術分野において知られている疾患または徴候に関連するウイルスを含む。特定の実施態様において、本発明の組成物は、ウイルスか、ＡＩＤＳ、髄膜炎、デング熱、ＥＢＶ、および肝炎（例えば、Ｂ型肝炎）からなる群より選択される疾患または徴候に対する免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。別の特定の実施態様において、本発明の組成物は、ウイルスか、ＨＩＶ／ＡＩＤＳ、呼吸器合胞体ウイルス、デング熱、ロタウイルス、Ｂ型日本脳炎、ＡおよびＢ型インフルエンザ、パラインフルエンザ、はしか、サイトメガロウイルス、狂犬病、フニン、チクングンヤ熱、リフトバレー熱、単純ヘルペス、および黄熱病からなる群より選択される疾患または徴候に対する免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。

【０６０７】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、抗－細菌または抗－真菌免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。アジュバントとして本発明の組成物を用いて高められてもよい抗－細菌または抗－真菌免疫応答は、細菌または真菌ならびに本明細書中記載されているまたはそうでなければ当該技術分野において知られている疾患または徴候に関連する細菌または真菌を含む。特定の実施態様において、本発明の組成物は、細菌または真菌か、破傷風、ジフテリア、ボツリヌス中毒、およびＢ型髄膜炎からなる群より選択される疾患または徴候に対する免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。

【０６０８】

別の特定の実施態様において、本発明の組成物は、コレラ菌（Ｖｉｖｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）、ハンセン菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ）、サルモネラ菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ）、パラチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｐａｒａｔｙｐｈｉ）、髄膜炎菌（Ｍｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、Ｂ群連鎖球菌、赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｐｐ．）、腸毒素産出性大腸菌、腸出血性大腸菌およびライム病（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）からなる群より選択される細菌または真菌、疾患または徴候に対する免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。

【０６０９】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、抗－寄生虫免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。アジュバントとして本発明の組成物を用いて高められてもよい抗－寄生虫免疫応答は、寄生虫および本明細書中記載されているまたはそうでなければ当該技術分野において知られている疾患または徴候に関連する寄生虫を含む。特定の実施態様において本発明の組成物は、寄生虫に対する免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。別の特定の実施態様において、本発明の組成物は、プラスモデ

ィウム（マラリア）またはレーシュマニアに対する免疫応答を高めるためのアジュバントとして用いられる。

【０６１０】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、単核食細胞の動員および活性化を阻害することにより、ケイ肺症、サルコイドーシスおよび特発性肺線維症を含む感染症を処置するために用いられてもよい。

【０６１１】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに対する免疫介在応答を阻害または亢進するために、抗体産生の抗原として用いられる。

【０６１２】

一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ、ニワトリ、ラクダ、ヤギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ヒトでない霊長類およびヒト、最も好ましくはヒト）へ投与され、免疫系を改善し、１またはそれ以上の抗体（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭおよびＩｇＥ）の量を増大させるか、より高い親和性抗体の産生および免疫グロブリンクラススイッチング（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、およびＩｇＥ）を誘導するか、および／または免疫応答を増大させる。

【０６１３】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、病原菌に対するＢ細胞反応性の刺激因子として用いられる。

【０６１４】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、Ｔ細胞の活性化剤として用いられる。

【０６１５】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、免疫抑制療法を受ける前に、個体の免疫状態を高める剤として用いられる。

【０６１６】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、より高い親和性抗体を誘導するための剤として用いられる。

【０６１７】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血清免疫グロブリン濃度を増大させるための剤として用いられる。

【０６１８】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、免疫不全個体の回復を加速するための剤として用いられる。

【０６１９】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、老年集団および／または新生児における免疫応答性を改善するための剤として用いられる。

【０６２０】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明の

アルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、骨髄移植および／または他の移植（例えば、同種または異種臓器移植）の前、その間またはその後において、免疫系エンハンサーとして用いられる。移植に関して、本発明の組成物は、移植の前、それと同時に、および／またはその後に投与されてもよい。特定の一の実施態様において、本発明の組成物は、移植後、Ｔ－細胞集団の回復が開始する前に、投与される。別の特定の実施態様において、本発明の組成物は、移植後、Ｔ細胞集団の回復が開始した後であるが、Ｂ細胞集団が完全に回復する前に、初めて投与される。

【０６２１】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、Ｂ細胞機能の後天的欠損を有する個体において免疫応答性を改善するための剤として用いられる。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明の融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを投与することにより改善または処置されてもよいＢ細胞機能の後天的欠損をもたらす状態は、ＨＩＶ感染、ＡＩＤＳ、骨髄移植およびＢ細胞慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）を含むが、これらに限定されない。

【０６２２】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、一時的な免疫欠損を有する個体において免疫応答性を改善するための剤として用いられる。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを投与することにより改善または処置されてもよい一時的な免疫欠損の状態は、ウイルス感染（例えば、肝炎）からの回復、栄養不良に関連する状態、感染性単核球症からの回復またはストレスに関連する状態、はしかからの回復、輸血からの回復および手術からの回復を含むが、これらに限定されない。

【０６２３】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、単球、樹枝状細胞および／またはＢ－細胞による抗原提示の調節剤として用いられる。一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、インビトロまたはインビボにおいて、抗原提示を増強するか、または抗原提示をアンタゴナイズする。さらに、関連する実施態様において、抗原提示のこの増強または拮抗は、抗－腫瘍処置として、または免疫系を調節するために有用であってもよい。

【０６２４】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ＴＨＩ細胞応答とは反対に、体液性応答（すなわちＴＨ２）の発生に向けて、個体の免疫系を指令する剤として用いられる。

【０６２５】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、腫瘍増殖を誘導することにより、抗新生物剤に対する感受性を高めるための手段として用いられる。例えば、多発性骨髄腫は、分裂の遅い疾患であり、それ故に、実質的に全ての抗新生物療法に対して難治性である。これらの細胞がより迅速な増殖へと駆り立てられるならば、それらの感受性特性は変化するだろう。

【０６２６】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、病理学的状態、例えば、ＡＩＤＳ、慢性リンパ球障害および／または一般的な分類不能型原発性免疫不全においてＢ細胞産生の刺激因子として用いられる。

【０６２７】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、手術、外傷または遺伝子欠損後に、リンパ様組織を産生および／または再生するための療法として用いられる。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、移植前の骨髄試料の前処置において用いられる。

【０６２８】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ＳＣＩＤ患者において観察されるような免疫不適格性／免疫不全をもたらす遺伝性障害に対する遺伝子に基づく療法として用いられる。

【０６２９】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、レーシュマニアのごとき単球に作用する寄生虫疾患を防御するために、単球／マクロファージを活性化する手段として用いられる。

【０６３０】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドにより導かれる分泌サイトカインを調節する手段として用いられる。

【０６３１】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、本明細書中に記載の１またはそれ以上の適用において用いられ、同様にそれらを獣医用医薬へ適用してもよい。

【０６３２】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、外来物質または自己に対する免疫応答の様々な態様をブロッキングする手段として用いられる。免疫応答の特定の態様のブロッキングが所望されてもよい疾患または状態の例は、ループスのごとき自己免疫疾患、関節炎ならびに皮膚アレルギーへの免疫応答、炎症、腸疾患、病原菌に関連する傷害および疾患／障害を含む。

【０６３３】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデスおよび多発性硬化症のごとき自己免疫疾患に関連するＢ細胞増殖およびＩｇ分泌を阻害するための療法として用いられる。

【０６３４】

別の特定の実施態様において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／または本発明の融合蛋白質のアゴニストまたはアンタゴニストおよび／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドが、内皮細胞におけるＢおよび／またはＴ細胞遊走の阻害剤として用いられる。この活性は組織構造または同族の（ｃｏｇｎａｔｅ）応答を破壊し、そして例えば免疫応答の破壊および敗血症の阻止において有用である。

【０６３５】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、重症度が不確かな単クローン性高ガンマグロブリン血症（ＭＧＵＳ）、ワルデンシュトレーム疾患、関連する特発性単クローン性免疫グロブリン血症、および形質細胞腫のごとき疾患において明らかである慢性高ガンマグロブリン血症のための療法として用いられる。

【０６３６】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、特定の自己免疫および慢性炎症性および感染性疾患において、マクロファージおよびそれらの前駆細胞および好中球、好塩基球、Ｂリンパ球および幾つかのＴ－細胞サブセット、例えば、活性化およびＣＤ８細胞傷害性Ｔ細胞およびナチュラルキラー細胞のポリペプチド走化性および活性化を阻害するために用いられてもよい。自己免疫疾患の例は本明細書中記載されており、および多発性硬化症およびインスリン依存性糖尿病を含む。

【０６３７】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、好酸球の産生および遊走を阻害することにより、特発性好酸球増加症候群を処置するために用いられてもよい。

【０６３８】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、補体介在細胞溶解を増強するまたは阻害するために用いられる。

【０６３９】

他の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、抗体依存性細胞傷害を増強または阻害するために用いられる。

【０６４０】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、動脈壁への単球湿潤を阻害することにより、アテローム性動脈硬化症を処置するために用いられてもよい。

【０６４１】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは。成人呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）
を処置するために用いられてもよい。

【０６４２】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、創傷および組織修復の刺激、血管新生の刺激および／または血管またはリンパ管疾患または障害の修復の刺激のために有用であってもよい。さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、粘膜表面の再生を刺激するために用いられてもよい。

【０６４３】

特定の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、原発性または後天的免疫不全、不十分な血清免疫グロブリン産生、反復性感染および／または免疫系機能障害により特徴付けられる障害を診断、予後、処置および／または予防するために用いられる。さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、関節、骨、皮膚および／または耳下腺腺の感染、血液由来感染（例えば、敗血症、髄膜炎、敗血症関節炎および／または骨髄炎）、自己免疫疾患（例えば、本明細書中に記載のもの）、炎症性疾患および悪性腫瘍、および／またはＣＶＩＤ、他の原発性免疫欠損、ＨＩＶ疾患、ＣＬＬ、反復性気管支炎、副鼻腔炎、中耳炎、結膜炎、肺炎、肝炎、髄膜炎、帯状疱疹（例えば、重度の帯状疱疹）および／またはカリニ肺炎を含むがこれらに限定されない、これらの感染、疾患、障害および／または悪性腫瘍に関連する任意の疾患または障害または状態を処置または予防するために用いられてもよい。本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて予防、診断、予後および／または処置されてもよい他の疾患および障害は、ＨＩＶ感

染、ＨＴＬＶ－ＢＬＶ感染、リンパ球減少症、食細胞殺菌不全性貧血、血小板減少症およびヘモグロビン尿症を含むが、これらに限定されない。

【０６４４】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、一般的な分類不能型免疫不全症（「ＣＶｍ」；「後天的無ガンマグロブリン血症」および「後天的低ガンマグロブリン血症」としても知られている）またはこの疾患のサブセットを有する個体を処置および／または診断するために用いられる。

【０６４５】

特定の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、免疫細胞または免疫組織に関連する癌または新生物を含む癌または新生物を診断、予後、予防および／または処置するために用いられてもよい。本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより予防、診断、または処置されてもよい癌または新生物の例は、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ球性貧血（ＡＬＬ）慢性リンパ球白血病、形質細胞腫、多発性骨髄腫、バーキットリンパ腫、ＥＢＶ変換疾患および／または本明細書中「過増殖性疾患」のセクションに別記されている疾患および障害を含むが、これらに限定されない。

【０６４６】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、大Ｂ細胞リンパ腫の細胞増殖を減じるための療法として用いられる。

【０６４７】

別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、慢性骨髄性白血病に関連するＢ細胞およびＩｇの関与を減少させる手段として用いられる。

【０６４８】

特定の実施態様において、本発明の組成物は、Ｂ細胞免疫欠損の個体、例えば、部分または完全脾臓摘出を受けた個体において免疫応答性を高めるための剤として用いられる。

【０６４９】

血液関連疾患

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、止血性（出血を停止する）または血栓溶解性（血栓を溶解する）活性を調節するために用いられてもよい。例えば、止血性または血栓溶解性活性を増大させることにより、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血液凝固疾患、障害および／または状態（例えば、無フィブリノゲン血症、因子欠損、血友病）、血液血小板疾患、障害および／または状態（例えば、血小板減少症）、または外傷、手術または他の原因から生じる創傷を処置または予防するために用いられ得る。別法では、止血性または血栓溶解性活性を減少し得る本発明の融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、血栓を防ぐまたは溶解するために用いられ得る。これらの分子は、心臓発作（梗塞）、脳卒中または瘢痕化の処置または予防において有用であろう。

【０６５０】

特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、血栓塞栓症、肺塞栓症、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、一過性脳虚血発作、不安定狭心症を予防、診断、予後および／または処置するために用いられてももよい。特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、伏在静脈移植片の閉塞の予防、血管形成法に付随し得る、手術前後の血栓症の危険性の減少、非リウマチ性心房細動を含む心房細動を有

する患者における脳卒中の危険性の減少、人工心臓弁および／または僧帽弁疾患に関連する塞栓症の危険性減少のために用いられてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドについての他の使用は、体外デバイス（例えば、血液透析患者内の血管内カニューレ、血管進入シャント、血液透析機器および心肺バイパス装置）における閉塞の予防を含むが、これらに限定されない。

【０６５１】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドが発現される一または複数の組織に関連する血液および／または血液産生器官の疾患および障害を予防、診断、予後および／または処置するために用いられてもよい。

【０６５２】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、造血活性（血液細胞の形成）を調節するために用いられてもよい。例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血液細胞、例えば、赤血球、リンパ球（ＢまたはＴ細胞）、ミエロイド細胞（例えば、好塩基球、好酸球、好中球、肥満細胞、マクロファージ）および血小板の全てまたはサブセットの量を増大させるために用いられてもよい。血液細胞または血液細胞のサブセットの量を減少させる能力は、以下に記載の貧血および白血球減少症の予防、検出、診断および／または処置において有用である。別法では、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血液細胞、例えば、赤血球、リンパ球（ＢまたはＴ細胞）、ミエロイド細胞（例えば、好塩基球、好酸球、好中球、肥満細胞、マクロファージ）および血小板の全てまたはサブセットの量を減少させるために用いられてもよい。血液細胞または血液細胞のサブセットの量を減少させる能力は、例えば好酸球増加症のごとき白血球増加症の予防、検出、診断および／または処置において有用であってもよい。

【０６５３】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、造血機能障害を予防、処置、または診断するために用いられてもよい。

【０６５４】

貧血は、赤血球細胞の数またはその中のヘモグロビン（酸素を運ぶ蛋白質）の量が通常よりも低い状態である。貧血は、過度の出血、赤血球細胞産生の減少または赤血球細胞破壊（溶血）の増大により惹起されてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、貧血の処置、予防および／または診断において有用であってもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより処置予防または診断されてもよい貧血は、鉄欠乏貧血、低色素性貧血、小球性貧血、萎黄病、遺伝性鉄芽球性貧血；特発性後天的鉄芽球性貧血、赤芽球癆、巨赤芽球性貧血（例えば、悪性貧血、（ビタミンＢ１２欠乏）および葉酸欠乏貧血）、再生不良性貧血、溶血性貧血（例えば、自己免疫性溶血性貧血、微小血管症性溶血性貧血および発作性夜間ヘモグロビン尿症）を含む。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、全身性エリテマトーデス、癌、リンパ腫、慢性腎疾患、および脾臓肥大を含むがこれらに限定されない疾患に関連する貧血の処置、予防および／または診断において有用であってもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、メチルドーパ、ダプソンおよび／またはサルファ剤に関連する貧血のごとき、薬剤処置から生じる貧血の処置、予防および／または診断において有用であってもよい。さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、遺伝性球状赤血球症、遺伝性楕円赤血球症、グルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ欠乏および鎌状細胞貧血を含むがこれらに限定されない、異常な赤血球細胞構造に関連する貧血

の処置、予防および／または診断において有用であってもよい。

【０６５５】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ヘモグロビン異常症（例えば、鎌状細胞貧血、ヘモグロビンＣ疾患、ヘモグロビンＳ－Ｃ疾患およびヘモグロビンＥ疾患に関連するもの）の処置、予防および／または診断において有用であってもよい。さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、アルファ－サラセミアおよびベーターサラセミアのメジャーおよびマイナー形態を含むがこれらに限定されないサラセミアの診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。

【０６５６】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血小板減少症（例えば、特発性血小板減少性紫斑病および血栓性血小板減少性紫斑病）、フォン・ヴィレブランド病、遺伝性血小板障害（例えば、チェディアック－東およびヘルマンスキー－パドラック症候群のごとき貯蔵プール疾患、トロンボキサンＡ２機能障害、血小板無力症およびベルナール・スーリエ症候群）、溶血性尿毒症症候群、血友病Ａまたは因子ＶＩＩ欠乏およびクリスマス病または因子ＩＸ欠乏のごとき血友病、ランデュ・オスラー・ウェーバー症候群としても知られている遺伝性出血性末梢血管拡張症、アレルギー紫斑病（ヘノッホ・シェーンライン紫斑病）および播種性血管内凝固を含むがこれらに限定されない出血性障害の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。

【０６５７】

血液凝固時間への本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドの効果は、全血部分トロンボプラスチン時間（ＰＴＴ）、活性化部分トロンボプラスチン時間（ａＰＴＴ）、活性化凝固時間（ＡＣＴ）、カルシウム再沈着活性化凝固時間またはリー・ホワイト凝固時間を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において知られている任意の凝固試験を用いて、モニターされてもよい。

【０６５８】

幾つかの疾患および様々な薬剤は血小板機能障害を惹起する。故に、特定の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、腎臓障害、白血病、多発性骨髄腫、肝硬変および全身性エリテマトーデスに付随する血小板機能障害ならびに高用量のアスピリン、チクロピジン、非ステロイド性抗炎症剤（関節炎、疼痛および捻挫のために用いられる）およびペニシリンを用いた処置を含む薬剤処置に関連する血小板機能障害のごとき後天的血小板機能障害の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。

【０６５９】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、白血球細胞数の増大または減少により特徴付けられるかまたはそれに関連する疾患および障害の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。白血球減少症は、白血球細胞が正常値より減少する場合に生じる。白血球減少症は、好中球減少症およびリンパ球減少症を含むが、これらに限定されない。正常値と比べての白血球細胞数の増大は、白血球増加症として知られている。体は、感染中、白血球細胞数の増大を生じる。故に、白血球増加症は、容易に、感染を反映する通常の生理学的パラメーターとなり得る。別法では、白血球増加症は、癌のごとき傷害または他の疾患の指標であってもよい。白血球増加症は、好酸球増加症およびマクロファージの蓄積を含むが、これらに限定されない。特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、白血球減少症の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。他の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／また

は本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、白血球増加症の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。

【０６６０】

白血球減少症は、全ての型の白血球細胞のにおける全般的な減少であってもよく、または特定の型の白血球細胞の特定の欠乏であってもよい。故に、特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、好中球減少症として知られている、好中球数における減少の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後、予防および／または処置されてもよい好中球減少症は、小児遺伝性無顆粒球症、家族性好中球減少症、環状好中球減少症、栄養不足（例えば、ビタミンＢ１２欠乏または葉酸欠乏）から生じるかまたはそれに関連する好中球減少症、薬剤処置（例えば、抗生物質計画、例えば、ペニシリン処置、スルホンアミド処置、抗凝血剤処置、抗痙攣剤、抗－甲状腺薬剤および癌化学療法）から生じるかまたはそれに関連する好中球減少症、および幾つかの細菌感染またはウイルス感染、アレルギー疾患、自己免疫疾患、個体が脾臓肥大を有する状態（例えば、フェルティー症候群、マラリアおよびサルコイドーシス）および幾つかの薬剤処置計画に関連して生じてもよい好中球破壊の増大によりもたらされる好中球減少症結果を含むが、これらに限定されない。

【０６６１】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ストレス、薬剤処置（例えば、コルチコステロイド、癌化学療法および／または放射線療法を用いた薬剤処置）、ＡＩＤＳ感染および／または他の疾患、例えば、癌、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、慢性感染、幾つかのウイルス感染および／または遺伝性障害（例えば、ディジョージ症候群、ウィスコット－アルドリッチ症候群、重症複合免疫不全、毛細血管拡張性運動失調症）から生じるかまたはそれらに関連するリンパ球減少症を含むがこれらに限定されないリンパ球減少症（Ｂおよび／またはＴリンパ球の数の減少）の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。

【０６６２】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ゴーシェ病、ニーマン・ピック病、レテラーージーヴェ疾患およびハンド・シュラー・クリスチャン病を含むがこれらに限定されない、マクロファージ数および／またはマクロファージ機能に関連する疾患および障害の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。

【０６６３】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、特発性好酸球増加症候群、好酸球増加症－筋痛症候群、およびハンド・シュラー・クリスチャン病を含むがこれに限定されない、好酸球数および／または好酸球機能に関連する疾患および障害の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。

【０６６４】

さらなる別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、急性リンパ球性（リンパ芽球性）白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性（骨髄性（ｍｙｅｌｏｃｙｔｉｃ）、骨髄性（ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ）、骨髄芽球性または骨髄単球性）白血病、慢性リンパ球性白血病（例えば、Ｂ細胞白血病、Ｔ細胞白血病、セザリー症候群および有毛細胞白血病）、慢性骨髄性（ミエロイド、骨髄性または顆粒性）白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫および菌状息肉腫を含むがこれらに限定されない、白血病およびリンパ腫の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。

【０６６５】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血漿細胞悪液質、単クローン性免疫グロブリン血症、重症度が不確かな単クローン性免疫グロブリン血症、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、クリオグロブリン血症およびレイノー現象を含むがこれらに限定されない、血漿細胞の疾患および障害の診断、予後、予防および／または処置において有用であってもよい。

【０６６６】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、真性赤血球増加症、相対的赤血球増加症、二次性多血症、骨髄線維症、急性骨髄線維症、原因不明骨髄様化生、血小板血症（原発性および二次性血小板血症の両方を含む）および慢性骨髄性白血病を含むがこれらに限定されない、骨髄増殖性疾患の処置、予防および／または診断において有用であってもよい。

【０６６７】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血液細胞産生を増大させるための、手術前の処置として有用であってもよい。

【０６６８】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、遊走、食作用、スーパーオキシド産生、ｏｆ好中球、抗酸球およびマクロファージの抗体依存細胞傷害を高めるための剤として有用であってもよい。

【０６６９】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、幹細胞交換療法前に、循環中の幹細胞の数を増大させるための剤として有用であってもよい。別の特定の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血小板交換療法前に、循環中の幹細胞の数を増大させるための剤として有用であってもよい。

【０６７０】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、サイトカイン産生を増大させるための剤として有用であってもよい。

【０６７１】

他の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、原発性造血障害の予防、診断、および／または処置において有用であってもよい。

【０６７２】

過増殖性疾患

特定の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、新生物を含む過増殖性疾患を処置または検出するために用いられ得る。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、直接的または間接的相互作用により、該障害の増殖を阻害してもよい。別法では、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、過剰増殖性障害を阻害し得る他の細胞を増殖させてもよい。

【０６７３】

例えば、免疫応答、特に過剰増殖性障害の抗原性を増大させることによるか、またはＴ－細胞を増殖、分化または動員させることにより、過増殖性疾患は処置され得る。この免疫応答は、存在する免疫応答を高めるか、または新しい免疫応答を開始させるかのいずれ

かにより増大されてもよい。別法では、化学治療剤のように、免疫応答の低下も、過増殖性疾患を処置する方法であってもよい。

【０６７４】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより処置または検出され得る過増殖性疾患の例は、大腸、腹部、骨、胸、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭および首、神経（中枢および末梢）、リンパ管系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部および泌尿生殖管に位置する新生物を含むが、これらに限定されない。

【０６７５】

同様に、他の過増殖性疾患も、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより処置または検出され得る。かかる過増殖性疾患の例は、小児急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌腫、成人（原発性）肝細胞癌、成人（原発性）肝臓癌、成人急性リンパ球性白血病、成人急性骨髄性白血病、成人ホジキン病、成人ホジキンリンパ腫、成人リンパ球性白血病、成人非ホジキンリンパ腫、成人原発性肝臓癌、成人軟組織肉腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、ＡＩＤＳ関連悪性腫瘍、肛門癌、星細胞腫、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳幹グリオーマ、脳腫瘍、胸癌、腎骨盤および尿管の癌、中枢神経系（原発性）リンパ腫、中枢神経系リンパ腫、小脳星細胞腫、脳星細胞腫、子宮頸癌、小児（原発性）肝細胞癌、小児（原発性）肝臓癌、小児急性リンパ芽球性白血病、小児急性骨髄性白血病、小児脳幹グリオーマ、小児小脳星細胞腫、小児脳星細胞腫、小児頭蓋外生殖細胞腫瘍、小児ホジキン病、小児ホジキンリンパ腫、小児視床下部および視覚伝導路グリオーマ、小児リンパ芽球性白血病、小児髄芽腫、小児非ホジキンリンパ腫、小児松果体およびテント上原始神経外胚葉腫瘍腫瘍、小児原発性肝臓癌、小児横紋筋肉腫、小児軟組織肉腫、小児視覚伝導路および視床下部グリオーマ、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、大腸癌、皮膚Ｔ－細胞リンパ腫、内分泌膵臓島細胞癌腫、子宮内膜癌、上衣細胞腫、上皮癌、食道癌、ユーイング肉腫および関連する腫瘍、外分泌膵臓癌、頭蓋外生殖細胞腫瘍、性腺外生殖細胞腫瘍、肝外胆管癌、眼癌、女性胸癌、ゴーシェ病、胆嚢癌、胃癌、胃腸カルチノイド腫瘍、胃腸腫瘍、生殖細胞腫瘍、妊娠栄養膜腫瘍、有毛細胞白血病、頭および首癌、肝細胞癌、ホジキン病、ホジキンリンパ腫、高ガンマグロブリン血症、下咽頭癌、腸癌、眼球内メラノーマ、島細胞癌腫、島細胞膵臓癌、カポジ肉腫、腎臓癌、喉頭癌、口唇および／口腔癌、肝臓癌、肺癌、リンパ増殖性疾患、マクログロブリン血症、男性乳癌、悪性中皮腫、悪性胸腺腫、髄芽腫、メラノーマ、中皮腫、転移性潜在性原発性扁平上皮頸部癌、転移性原発性扁平上皮頸部癌、転移性扁平上皮頸部癌、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫／血漿細胞新生物、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、骨髄性白血病、骨髄増殖性疾患、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、妊娠中非ホジキンリンパ腫、非メラノーマ皮膚癌、非小細胞肺癌、潜在性原発性転移性扁平上皮頸部癌、口腔咽頭癌、骨肉腫／悪性繊維肉腫、骨肉腫／悪性繊維組織球腫、骨肉腫／骨の悪性繊維組織球腫、卵巣上皮癌、卵巣生殖細胞腫瘍、卵巣低悪性潜在腫瘍、膵臓癌、パラプロテイン血症、紫斑病、副甲状腺癌、陰茎癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、血漿細胞新生物／多発性骨髄腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性肝臓癌、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎骨盤および尿管癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、サルコイドーシス肉腫、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟組織肉腫、扁平上皮頸部癌、胃癌、テント上原始神経外胚葉腫瘍および松果体腫瘍、Ｔ－細胞リンパ腫、精巣癌、胸腺腫、甲状腺癌、腎骨盤および尿管の遷移性細胞癌、遷移性腎骨盤および尿管癌、絨毛性腫瘍、尿管および腎骨盤細胞癌、尿道癌、子宮癌、子宮肉腫、膣癌、視覚伝導路および視床下部グリオーマ、外陰癌、ワルデンストレームマクログロブリン血症、ウィルム腫瘍および上記の器官系に存在する腫瘍以外の任意の他の過増殖性疾患を含むが、これらに限定されない。

【０６７６】

別の好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、前癌性状態を診断、予後、予

防および／または処置するために、および上記した障害を含むがこれらに限定されない腫瘍または悪性状態への進行を予防するために用いられる。かかる使用は、特に、過形成、化生
または最も具体的には異形成症からなる非腫瘍性細胞成長が起こっている腫瘍または癌への進行に先行することが知られている、または先行すると考えられている状態において必要とされる（かかる異常な成長状態の報文については、ＲｏｂｂｉｎｓおよびＡｎｇｅｌｌ，１９７６，Ｂａｓｉｃ　Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ，２ｄＥｄ．，Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ　Ｃｏ．，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ｐｐ．６８－７９を参照のこと）。

【０６７７】

過形成は、構造または機能を有意に変化させることなく、組織または器官中の細胞数を増大させることを含む、制御された細胞増殖の一形態である。本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて診断、予後、予防および／または処置され得る過形成性障害は、血管濾胞性縦隔リンパ節過形成、好酸球増加症随伴血管リンパ組織過形成、異型メラノサイト過形成、基底細胞過形成、良性巨リンパ節過形成、セメント質過形成、先天的副腎過形成、先天的脂肪質過形成、嚢胞性過形成、乳房嚢胞性過形成、義歯過形成、脈管過形成、子宮内膜過形成、線維筋性過形成、限局性上皮過形成、歯肉過形成、炎症性繊維過形成、炎症性乳頭過形成、血管内乳頭内皮過形成、前立腺の結節性過形成、結節性再生過形成、偽上皮腫性過形成、老人性脂肪質過形成および疣状過形成を含むが、これらに限定されない。

【０６７８】

化生は、細胞成長の制御された形態であり、ここで、成人または十分に分化した細胞の１つの型は、成人細胞の他の型に置換されている。本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて診断、予後、予防および／または処置され得る化生性障害は、原因不明骨髄様化生、アポクリン化生、非定型化生、自己実質化生、結合組織化生、上皮化生、腸化生、化生性貧血、化生性骨化、化生性ポリープ、骨髄線維症、原因不明骨髄様化生、二次性骨髄線維症、扁平上皮化生、羊膜の扁平上皮化生および症候性骨髄線維症を含むが、これらに限定されない。

【０６７９】

異形成症は癌の前兆であることが多く、および主に上皮にて見出される；それは、細胞の個々の細胞均一性および構造配向性における損失を含む、非腫瘍性細胞成長の最も混乱した形態である。異形成細胞は多くの場合、異常に大きく、濃く染まった核を有し、および多形性を示す。特徴的なことに、慢性過敏または炎症がある場合、異形成症は生じる。本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて診断、予後、予防および／または処置され得る異形成障害は、無汗性外胚葉性異形成症、前後異形成症、窒息性胸郭異形成症、心房指異（ａｔｒｉｏｄｉｇｉｔａｌ）形成症、気管支肺異形成症、脳異形成症、子宮頸異形成症、軟骨外胚葉性異形成症、鎖骨頭蓋骨異形成症、先天的外胚葉異形成症、頭蓋骨幹異形成症、頭蓋手根足根骨異形成症、頭蓋骨幹端異形成症、象牙質異形成症、骨幹異形成症、外胚葉異形成症、エナメル質異形成症、脳眼球異形成症、骨端形成異常性半肢症、多発性骨端異形成症、点状骨端異形成症、上皮異形成症、顔面指趾生殖（ｆａｃｉｏｄｉｇｉｔｏｇｅｎｉｔａｌ）異形成症、家族性繊維性顎異形成症、家族性白色襞（ｆａｍｉｌｉａｌ　ｗｈｉｔｅ　ｆｏｌｄｅｄ）異形成症、繊維筋性異形成症、繊維性骨異形成症、根尖性骨異形成症、遺伝性腎臓網膜異形成症、発汗性外胚葉異形成症、低発汗性外胚葉異形成症、リンパ球減少性胸腺異形成症、哺乳類異形成症、下顎顔面異形成症、骨幹端異形成症、モンディーニ異形成症、単発性繊維異形成症、粘膜上皮異形成症、多発性骨端異形成症、眼耳脊椎異形成症、眼歯指異形成症、眼脊椎（ｏｃｕｌｏｖｅｒｔｅｂｒａｌ）異形成症、歯性異形成症、眼下顎四肢異形成症、歯根尖周囲セメント質異形成症、多発性繊維異形成症、偽軟骨発育不全脊椎骨端異形成症、網膜異形成症、眼中隔異形成症、脊椎骨端異形成症および心室橈骨異形成症を含むが、これらに限定されない。

【０６８０】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて診断、予後、予防および／または処置され得るさらなる前腫瘍性障害は、良性増殖性異常疾患（例えば、良性腫瘍、線維嚢胞状態、組織肥大、腸ポリープ、大腸ポリープおよび食道異形成症）、白斑症、角化症、ボーエン病、農夫皮膚、日光口唇炎および日光角化症を含むが、これらに限定されない。

【０６８１】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドが発現される、一または複数の組織に関連する傷害を診断および／または予後するために用いられてもよい。

【０６８２】

別の実施態様において、本明細書中記載されているような毒素または放射性同位元素にコンジュゲートさせた、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、本明細書中記載されているものを含むがこれらに限定されない、癌および新生物を処置するために用いられてもよい。さらに好ましい一の実施態様において、本明細書中記載されているような毒素または放射性同位元素にコンジュゲートさせた、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、急性骨髄性白血病を処置するために用いられてもよい。

【０６８３】

さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドははアポトーシスに作用してもよく、およびそれ故に、細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関連する多数の疾患の処置において有用であろう。例えば、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアゴニストまたはアンタゴニストにより診断、予後、予防および／または処置され得る、細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関連する疾患は、癌（例えば、濾胞性リンパ腫、ｐ５３突然変異を伴う癌腫およびホルモン依存性腫瘍、を含むが、これらに限定されない大腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、メラノーマ、網膜芽細胞腫、グリオブラストーマ、肺癌、腸癌、精巣癌、胃癌、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、胸癌、前立腺癌、カポジ肉腫および卵巣癌）；自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎および関節リウマチ）およびウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、ポックス・ウイルスおよびアデノウイルス）、炎症、移植片対宿主病、急性移植拒絶反応および慢性移植拒絶反応を含む。

【０６８４】

好ましい実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、癌、特に上記したものの成長、進行および／または転移を阻害するために用いられる。

【０６８５】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後、予防および／または処置され得る、細胞生存の増大に関連するさらなる疾患または状態は、例えば、白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む））および慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒性）白血病および慢性リンパ球性白血病）を含む）、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖疾患、ならびに肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ血管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、大腸癌腫、膵臓癌、胸癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌腫、基底細胞癌腫、腺癌腫、汗腺癌腫、皮脂腺癌腫、乳頭癌腫、乳頭腺癌

腫、嚢胞腺癌腫、髄様癌腫、気管支原性肺癌腫、腎細胞癌腫、肝細胞腫、胆管癌腫、絨毛癌腫、精上皮腫、胚性癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌腫、小細胞肺癌腫、膀胱癌腫、上皮癌腫、グリオーマ、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、オリゴデンドログリオーマ、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫を含むがこれらに限定されない固形腫瘍などの悪性疾患および関連疾患の進行および／または転移を含むが、これらに限定されない。

【０６８６】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後、予防および／または処置され得るアポトーシスの増大に関連する疾患は、ＡＩＤＳ；神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、網膜色素変性症、小脳変性症および脳腫瘍または先の関連疾患）；自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎および関節リウマチ）骨髄異形成症候群（例えば、再生不良性貧血）、移植片対宿主病、虚血性傷害（例えば、心筋梗塞、脳卒中により惹起されるものおよび再灌流傷害）、肝臓傷害（例えば、肝炎関連する肝臓傷害、虚血／再灌流傷害、胆汁鬱帯（胆管傷害）および肝臓癌）；毒素が誘導する肝臓疾患（例えば、アルコールにより惹起されるもの）、敗血症ショック、悪液質および拒食症を含むが、これらに限定されない。

【０６８７】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後、予防および／または処置され得る、過増殖性疾患および／または障害は、肝臓、腹部、骨、胸、消化器系、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭および首、神経系（中枢および末梢）、リンパ管系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部および泌尿生殖管に位置する新生物を含むが、これらに限定されない。

【０６８８】

同様に、他の過増殖性疾患も、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後、予防および／または処置され得る。かかる過増殖性疾患の例は、高ガンマグロブリン血症、リンパ増殖性疾患、パラプロテイン血症、紫斑病、サルコイドーシス、セザリー症候群、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ゴーシェ病、組織球症および上記の器官系に存在する腫瘍以外の任意の他の過増殖性疾患を含むが、これらに限定されない。

【０６８９】

別の好ましい実施態様は、本発明および／または蛋白質融合またはその断片を用いる遺伝子治療により異常な細胞分裂を阻害するために、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを利用する。

【０６９０】

故に、本発明は、異常な増殖性細胞中へ本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを挿入することにより細胞増殖性疾患を処置するための方法を提供し、ここで、該ポリヌクレオチドはその発現を抑制する。

【０６９１】

本発明の別の実施態様は、個体において細胞－増殖性疾患を処置する方法であって、１またはそれ以上の本発明の活性遺伝子コピーを異常な増殖性細胞または細胞へ投与することを含む方法を提供する。好ましい一の実施態様において、本発明のポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドをコードするＤＮＡ配列を発現する際に有効である組換え発現ベクターを含むＤＮＡコンストラクトである。本発明の別の好ましい実施態様において、本発明の融合蛋白質をコードするＤＮＡコンストラクトは、レトロウイルス、またはより好ましくはアデノウイルスベクター（ＧＪ．Ｎａｂｅｌ，ら，ＰＮＡＳ１９９９９６：３２４－３２６を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる）を利用して処置されるべき細胞中へ挿入される。最も好ましい一の実施態様において、ウイルスベクター

は欠損しており、そして、非増殖性細胞を形質転換せず、増殖性細胞のみを形質転換する。さらに、好ましい一の実施態様において、単独または他のポリヌクレオチドと組み合わせてかまたはそれに融合された増殖性細胞へ挿入された本発明のポリヌクレオチドは、次いで、外部刺激（すなわち磁気、特定の小分子、化学物質または薬剤投与など）により調節することができ、該ポリヌクレオチドのプロモーター上流に作用し、コードされた蛋白質産物の発現を誘導する。そのようなものとして、本発明の有用な治療効果は、該外部刺激に基づいて、明らかに調節されてもよい（すなわち、本発明の発現を増大、減少または阻害する）。

【０６９２】

本発明のポリヌクレオチドは、発癌性遺伝子または抗原の発現の抑制において有用であってもよい。「発癌性遺伝子の発現の抑制」により、遺伝子の転写の抑制、遺伝子転写産物の分解（プレメッセンジャーＲＮＡ）、スプライシングの阻害、メッセンジャーＲＮＡの破壊、蛋白質の翻訳後修飾の阻害、蛋白質の破壊または蛋白質の通常の機能の阻害が意図される。

【０６９３】

異常な増殖性細胞へ局所投与するために、本発明のポリヌクレオチドは、細胞の、またはリポソーム、リポフェクチンもしくは裸のポリヌクレオチドのごときビヒクル中のトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクションを含むがこれらに限定されない当業者に知られている任意の方法、または本明細書にわたって記載されている任意の他の方法により投与されてもよい。本発明のポリヌクレオチドは、例えば、レトロウイルスベクター（Ｇｉｌｂｏａ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　４４：８４５（１９８２）；Ｈｏｃｋｅ，Ｎａｔｕｒｅ　３２０：２７５（１９８６）；Ｗｉｌｓｏｎ，ら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８５：３０１４），牛痘ウイルス系（Ｃｈａｋｒａｂａｒｔｙら．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．５：３４０３（１９８５）または当業者に知られている他の有効なＤＮＡデリバリーシステム（Ｙａｔｅｓら．，Ｎａｔｕｒｅ３１３：８１２（１９８５））であるがこれらに限定されない、知られている遺伝子デリバリーシステムにより送達されてもよい。これらの参考文献は単なる例示であって、かつ出典明示により本明細書の一部となる。異常に増殖している細胞を特異的に送達またはトランスフェクションし、および非分裂細胞のスペアを作るために、当業者に知られているレトロウイルスまたはアデノウイルス（当該技術分野および本明細書の別の箇所に記載されているような）デリバリーシステムを利用することが好ましい。レトロウイルスＤＮＡの組み込みには宿主ＤＮＡの複製が必要であるので、レトロウイルスはその生活環に必要なレトロウイルス遺伝子を欠失しているために自己複製することができないだろう。本発明のポリヌクレオチドのためにかかるレトロウイルスデリバリーシステムを利用することは、かかる遺伝子およびコンストラクトを異常な増殖性細胞へ送達させ、および正常な非分裂細胞のスペアを作るだろう。

【０６９４】

本発明のポリヌクレオチドは、注入針を疾患部位へ直接誘導するために用いられるイメージングデバイスを用いることにより、内部器官、体腔などの細胞増殖性障害／疾患部位へ直接送達されてもよい。本発明のポリヌクレオチドは、外科的介入時に疾患部位へ投与されてもよい。

【０６９５】

「細胞増殖性疾患」により、器官、腔または体の部分の任意の一つまたは任意の組み合わせに作用する、良性または悪性であろうとなかろうと、細胞、細胞群または組織の単一または複数の局所的異常増殖により特徴付けられる、任意のヒトまたは動物の疾患または障害が意味される。

【０６９６】

処置した細胞の増殖に生物学的な阻害効果を有する限りは、任意の量の本発明のポリヌクレオチドが投与されてもよい。さらに、１以上の本発明のポリヌクレオチドを同時に同じ部位へ投与することも可能である。「生物学的な阻害」は、部分的または完全な成長阻

害ならびに細胞の増殖または成長の割合の減少が意味される。生物学的な阻害量は、組織培養における標的の悪性または異常な増殖性細胞成長、動物および細胞培養における腫瘍成長に対する本発明のポリヌクレオチドの効果を評価することにより、または任意の当業者に知られている他の方法により決定されてもよい。

【０６９７】

さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードする本発明ポリヌクレオチドは、蛋白質融合物として単独か、または本明細書中別記されているような他のポリペプチドと組み合わせてのいずれかにより、増殖細胞または組織の血管新生の阻害において直接的または間接的に有用である。最も好ましい一の実施態様において、該抗－血管新生効果は、造血性、腫瘍特異的細胞、例えば、腫瘍関連マクロファージ（Ｊｏｓｅｐｈ ＩＢ，ら．Ｊ Ｎａｔｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ，９０（２１）：１６４８－５３（１９９８）を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる）の阻害により、間接的に成し遂げられてもよい。

【０６９８】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、アポトーシスの誘導により、増殖細胞または組織の阻害において有用であってもよい。これらの融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、例えば、デスドメイン受容体、例えば、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）受容体－１、ＣＤ９５（Ｆａｓ／ＡＰＯ－１）、ＴＮＦ－受容体関連アポトーシス介在蛋白質（ＴＲＡＭＰ）およびＴＮＦ関連アポトーシス誘導リガンド（ＴＲＡＩＬ）ｐ受容体－ｌおよび－２（Ｓｃｈｕｌｚｅ－Ｏｓｔｈｏｆｆ Ｋ、ら．，ＥｕｒＪ Ｂｉｏｃｈｅｍ ２５４（３）：４３９－５９（１９９８）を参照のこと。出典明示により本明細書の一部となる）の活性化において、増殖細胞および組織のアポトーシスに、直接的または間接的のいずれかにより作用してもよい。さらに、本発明の別の好ましい実施態様において、これらの融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドは、単独かまたは小分子薬剤またはアジュバント、例えば、アポプトニン、ガレクチン、チオレドキシン、抗－炎症性蛋白質（例えば、Ｍｕｔａｔ Ｒｅｓ ４００（１－２）：４４７－５５（１９９８），Ｍｅｄ Ｈｙｐｏｔｈｅｓｅｓ．５０（５）：４２３－３３（１９９８），Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ Ｉｎｔｅｒａｃｔ．Ａｐｒ ２４；１１１－１１２：２３－３４（１９９８），Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．７６（６）：４０２－１２（１９９８），Ｉｎｔ Ｊ Ｔｉｓｓｕｅ Ｒｅａｃｔ；２０（１）：３－１５（１９９８）を参照のこと。全文献は出典明示により本明細書の一部となる）と組み合わせてのいずれかで、アポトーシスを活性化し得る他の蛋白質の活性化におけるような他の機序を介して、これらの蛋白質の発現を刺激することにより、アポトーシスを誘導してもよい。

【０６９９】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、増殖細胞または組織の転移の阻害において有用である。阻害は、これらのアルブミン融合蛋白質および／またはポリヌクレオチドを投与する直接的な結果として生じてもよく、または間接的に、例えば、転移を阻害することが知られている蛋白質、例えばアルファ４インテグリン（例えば、Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９８；２３１：１２５－４１を参照のこと。該文献は出典明示により本明細書の一部となる）の発現を活性化することによりもたらされてもよい。本発明のかかる治療効果は、単独または小分子薬剤もしくはアジュバントと組み合わせてのいずれかにより成し遂げられてもよい。

【０７００】

別の実施態様において、本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合される、結合するまたは会合するポリペプチドを発現している標的細胞へ、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含む組成物を送達させる方法を提供する。本発明のアルブミン融合蛋白質は、疎水性、親水性、イオン的および／または共有結合的相互作用を介して、異種ポリペプチド、異種核酸、

毒素またはプロドラッグに関連されていてもよい。

【０７０１】

本発明のアルブミン融合蛋白質は、直接的に（例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質が増殖抗原および免疫原に対する免疫応答を「受けた」ならば生じるような）または間接的に（例えば、該抗原および免疫原に対する免疫応答を亢進することが知られている蛋白質（例えば、ケモカイン）の発現の活性化において）、増殖性細胞または組織の免疫原性および／または抗原性を亢進する際に有用である。

【０７０２】

腎障害

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、腎臓障害、腎炎、腎臓の血管障害、代謝および先天的腎臓障害、腎臓の排尿障害、自己免疫疾患、硬化症および壊死、電解質異常、および腎臓癌を含むがこれらに限定されない、本発明の組成物を用いて診断、予後、予防および／または処置され得る腎系の傷害を処置、予防、診断、および／または予後するために用いられてもよい。

【０７０３】

本発明の組成物を用いて診断、予後、予防および／または処置され得る腎臓疾患は、急性腎臓障害、慢性腎臓障害、アテローム性塞栓性腎障害、末期腎疾患、炎症性腎疾患（例えば、急性糸球体腎炎、感染後糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、膜性糸球体腎炎、家族性ネフローゼ症候群、膜性増殖性糸球体腎炎Ｉおよび１１、メサンギウム増殖糸球体腎炎、慢性糸球体腎炎、急性尿細管間質性腎炎、慢性尿細管間質性腎炎、急性レンサ球菌感染後糸球体腎炎（ＰＳＧＮ）、腎盂腎炎、ループス腎炎、慢性腎炎、間質性腎炎、およびレンサ球菌感染後糸球体腎炎）、腎臓の血管障害（例えば、腎臓梗塞、アテローム性塞栓性腎臓疾患、腎皮質壊死、悪性腎硬化症、腎静脈血栓症、腎灌流不全、腎網膜症、腎虚血－再灌流、腎動脈塞栓症、および腎動脈狭窄）、および尿道疾患（例えば、腎盂腎炎、水腎症、尿石症（腎結石症、腎石病）、逆流性腎症、尿道感染、尿閉、および急性または慢性片側性閉塞性尿路疾患）から生じる腎臓障害を含むが、これらに限定されない。

【０７０４】

加えて、本発明の組成物は、腎臓（例えば、尿毒症、腎アミロイドーシス、腎性骨ジストロフィー、腎性尿細管性アシドーシス、腎糖尿、腎性尿崩症、シスチン尿症、ファンコニ症候群、腎線維嚢胞骨組織形成（腎性くる病）、ハートナップ病、バーター症候群、リドル症候群、ポリ嚢胞腎臓疾患、髄様嚢胞疾患、髄質性海綿腎、アルポート症候群、爪－膝蓋骨症候群、先天的ネフローゼ症候群、ＣＲＵＳＨ症候群、馬蹄腎、糖尿病腎障害、腎性尿崩症、鎮痛薬性腎症、腎石、および膜性腎障害）および腎臓の自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、グッドパスチャー症候群、ＩｇＡ腎障害およびＩｇＭメサンギウム増殖糸球体腎炎）の代謝および先天的障害を診断、予後、予防および／または処置するために用いられ得る。

【０７０５】

本発明の組成物は、腎臓の硬化性または壊死性障害（例えば、糸球体硬化症、糖尿病腎障害、限局性分節性糸球体硬化症（ＦＳＧＳ）、壊死性糸球体腎炎および腎乳頭壊死）、腎臓の癌（例えば、腎腫、副腎腫、腎芽細胞腫、腎細胞癌、遷移性細胞癌、腎腺癌腫、扁平上皮細胞癌およびウィルムス腫瘍）および電解質異常（例えば、腎石灰沈着症、膿尿症、浮腫、水腎症、タンパク尿、低ナトリウム血症、高ナトリウム血症、低カリウム血症、高カリウム血症、低カルシウム血症、高カルシウム血症、低リン血症および高リン血症）を診断、予後、予防および／または処置するためにも用いられ得る。

【０７０６】

本発明の組成物は、デリバリー部位で直接針注入、静脈内注入、局所投与、カテーテル注入、微粒子銃注入、粒子加速器、ゲルフォームスポンジデポー、他の市販のデポー物質、浸透圧ポンプ、経口または坐剤用固形医薬処方、デカンティングまたは手術中の局所適

用、エアロゾルデリバリーを含むがこれらに限定されない、当該技術分野において知られている任意の方法を用いて投与されてもよい。かかる方法は当該技術分野において知られている。本発明の組成物は、以下に詳細に記載あれている治療剤の一部として投与されてもよい。本発明のポリヌクレオチドの送達方法は、本明細書中、以下に詳細に記載されている。

【０７０７】

心血管疾患

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、末梢動脈疾患、例えば、肢虚血を含むがこれらに限定されない心血管疾患を処置、予防、診断、および／または予後するために用いられてもよい。

【０７０８】

心血管疾患は、心血管異常、例えば、動脈－動脈瘻、動静脈瘻、脳動静脈奇形、先天的心臓欠陥、肺動脈閉鎖およびシミター症候群を含むが、これらに限定されない。先天的心臓欠陥は、大動脈縮窄、三房心、冠状血管奇形、交差心、右胸心、動脈管開存症、エプスタイン奇形、アイゼンメンゲル・コンプレックス、左心低形成症候群、左胸心、ファロー四徴症、大血管転位、両大血管右室起始症、三尖弁閉鎖症、動脈管遺残および心中隔欠損、例えば、大動脈肺動脈中隔欠損、心内膜床欠損、ルタンバッシェ症候群、ファロー三徴症、心室中隔欠損を含むが、これらに限定されない。

【０７０９】

心血管疾患は、心臓疾患、例えば、不整脈、カルチノイド心臓疾患、高い心拍出量、低い心拍出量、心タンポナーデ、心内膜炎（細菌を含む）、心臓動脈瘤、心停止、うっ血性心臓障害、うっ血性心筋症、発作性呼吸困難、心臓浮腫、心臓肥大、うっ血性心筋症、左心室肥大、右心室肥大、梗塞後心臓破裂、心室中隔破裂、心臓弁疾患、心筋疾患、心筋虚血、心外膜液、心膜炎（狭窄性および結核性を含む）、心嚢内気腫、心膜切開後症候群、肺性心疾患、リウマチ性心臓疾患、心室機能障害、充血、心血管妊娠合併症、シミター症候群、心血管梅毒および心血管結核症も含むが、これらに限定されない。

【０７１０】

不整脈は、洞性不整脈、心房細動、心房粗動、徐脈、期外収縮、アダムス・ストークス症候群、脚ブロック、洞房ブロック、ＱＴ延長症候群、副収縮、ラウン－ギャノン－レバイン症候群、マハイム型早期興奮症候群、ウォルフ－パーキンソン－ホワイト症候群、洞不全症候群、頻脈および心室細動を含むが、これらに限定されない。頻脈は、発作性頻脈、心室頻脈、頻脈性心室固有調律、房室結節内リエントリー性頻拍、異所性心房性頻脈、異所性接合部性頻泊、洞房結節リエントリー性頻拍、トルサード・ド・ポアントおよび心室頻脈を含む。

【０７１１】

心臓弁疾患は、大動脈弁閉鎖不全症、大動脈弁狭窄、心雑音、大動脈弁逸脱、僧帽弁逸脱、三尖弁逸脱、僧帽弁閉鎖不全症、僧帽弁狭窄、肺動脈閉鎖、肺動脈弁不全、肺動脈弁狭窄、三尖弁閉鎖症、三尖弁閉鎖不全症、および三尖弁狭窄を含むが、これらに限定されない。

【０７１２】

心筋疾患は、アルコール性心筋症、うっ血性心筋症、肥大性心筋症、大動脈弁下狭窄症、肺動脈弁下狭窄、拘束型心筋症、シャーガス心筋症、心内膜線維弾性症、心内膜心筋線維症、キームス症候群、心筋再灌流傷害および心筋炎を含むが、これらに限定されない。

【０７１３】

心筋虚血は、冠状動脈性疾患、例えば、狭心症、冠状動脈性動脈瘤、冠状動脈硬化症、冠状動脈性血栓症、冠状動脈血管けいれん、心筋梗塞および気絶心筋を含むが、これらに限定されない。

【０７１４】

心血管疾患は、血管疾患、例えば、動脈瘤、血管異形成症、血管腫症、細菌性血管腫症、ヒッペル・リンドウ病、クリペル－トルノネー－ウェーバー症候群、スタージ－ウェー

バー症候群、血管神経性浮腫、大動脈疾患、高安動脈炎、大動脈炎、レルヒェ症候群、動脈閉塞性疾患、動脈炎、動脈内膜炎、結節性多発性動脈炎、脳血管障害、糖尿病性血管症、糖尿病性網膜症、塞栓症、血栓症、肢端紅痛症、痔核、肝静脈閉塞性疾患、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管疾患、静脈炎、肺静脈閉塞性疾患、レイノー病ＲＥＳＴ症候群、網膜静脈閉塞、シミター症候群、上大静脈症候群、毛細血管拡張、毛細血管拡張性失調症、遺伝性出血性毛細血管拡張、精索静脈瘤、静脈瘤、静脈瘤性潰瘍、脈管炎および静脈不全も含む。

【０７１５】

動脈瘤は、解離性動脈瘤、偽性動脈瘤、感染性動脈瘤、破裂性動脈瘤、大動脈瘤、脳動脈瘤、冠状動脈性動脈瘤、心臓動脈瘤および腸骨動脈瘤を含むが、これらに限定されない。

【０７１６】

動脈閉塞性疾患は、動脈硬化症、間欠性跛行、頸動脈狭窄、繊維筋性異形成症、腸間膜血管閉塞、モヤモヤ病、腎動脈閉塞、網膜動脈閉塞および閉塞性血栓性血管炎を含むが、これらに限定されない。

【０７１７】

脳血管障害は、頸動脈疾患、脳のアミロイド・アンギオパチー、脳動脈瘤、脳無酸素症、脳動脈硬化症、脳動静脈奇形、脳動脈疾患、脳塞栓症および血栓症、頸動脈血栓症、静脈洞血栓症、バレンベリー症候群、脳出血、硬膜外血腫、硬膜下血腫、くも膜下出血、脳梗塞、脳虚血（一過性を含む）、鎖骨下動脈盗血症候群、脳室周囲白質軟化症、血管性頭痛、群発頭痛、偏頭痛および椎骨脳底動脈循環不全を含むが、これらに限定されない。

【０７１８】

塞栓症は、空気塞栓症、羊水塞栓症、コレステロール塞栓症、ブルートウ症候群、脂肪塞栓症、肺塞栓症および血栓塞栓症を含むが、これらに限定されない。冠状動脈性血栓症は、肝静脈血栓症、網膜静脈閉塞、頸動脈血栓症静脈洞血栓症、バレンベリー症候群および静脈血栓症を含むが、これらに限定されない。

【０７１９】

虚血性障害は、脳虚血、虚血性結腸炎、コンパートメント症候群、前コンパートメント症候群、心筋虚血、再灌流傷害および末梢肢虚血を含むが、これらに限定されない。脈管炎は、大動脈炎、動脈炎、ベーチェット症候群、チャーグ・ストラウス症候群、皮膚粘膜リンパ節症候群、閉塞性血栓性血管炎、過敏性血管炎、シェンライン－ヘノッホ紫斑病、アレルギー皮膚脈管炎およびウェゲナー肉芽腫症を含むが、これらに限定されない。

【０７２０】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、デリバリー部位での直接針注入、静脈内注入、局所投与、カテーテル注入、微粒子銃注入、粒子加速器、ゲルフォームスポンジデポー、他の市販のデポー物質、浸透圧ポンプ、経口または坐剤用固形医薬処方、デカンティングまたは手術中の局所適用、エアロゾルデリバリーを含むがこれらに限定されない、当該技術分野において知られている任意の方法を用いて投与されてもよい。かかる方法は、当該技術分野において知られている。ポリヌクレオチドの送達方法は、本明細書中、より詳細に記載されている。

【０７２１】

呼吸器疾患

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、呼吸器系の疾患および／または障害を処置、予防、診断および／または予後するために用いられてもよい。

【０７２２】

呼吸器系の疾患および障害は、鼻前庭炎、非アレルギー性鼻炎（例えば、急性鼻炎、慢性鼻炎、萎縮性鼻炎、血管運動性鼻炎）、鼻ポリープおよび副鼻腔炎、若年性血管線維腫、鼻の癌および若年性パピローマ、声帯ポリープ、小結節（歌手の小結節）、接触潰瘍、

声帯麻痺、喉頭気腫、咽頭炎（例えば、ウイルスおよび細菌性）、扁桃炎、扁桃蜂巣炎、咽頭傍化膿巣、喉頭炎、喉頭気腫および咽喉癌（例えば、鼻咽頭の癌、扁桃癌、喉頭癌）、肺癌（例えば、扁平上皮細胞癌腫、小細胞（燕麦細胞）癌腫、大きな細胞癌腫および腺癌腫）、アレルギー疾患（好酸球性肺炎、過敏性肺炎（例えば、外因性アレルギー肺胞炎、アレルギー性間質性肺炎、有機塵肺症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、喘息、ウェゲナー肉芽腫症（肉芽腫性脈管炎）、グッドパスチャー症候群））、肺炎（例えば、細菌肺炎（例えば、肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）（肺炎球菌性肺炎）、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）（ブドウ球菌性肺炎）、グラム陰性細菌肺炎（例えば、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）およびシュードモナス種（Ｐｓｅｕｄｏｍａｓ ｓｐｐ．）により惹起される）、肺炎マイコプラズマ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ヘモフィルスインフルエンザ（Ｈｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）肺炎、レジオネラニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）（レジオネラ病）およびオウム病クラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｐｓｉｔｔａｃｉ）（オウム病））およびウイルス肺炎（例えば、肝炎、水痘（水疱瘡）を含むが、これらに限定されない。

【０７２３】

呼吸器系のさらなる疾患および障害は、細気管支炎、ポリオ（灰白髄炎）、クループ、呼吸器系シンシチウムウイルス感染、おたふく風邪、伝染性紅斑（第５病）、突発性発疹、進行性風疹全脳炎、三日ばしかおよび亜急性硬化性全脳炎）、真菌肺炎（例えば、激しく抑制された免疫系を有するヒト（例えば、クリプトコッカスネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）により惹起されるクリプトコッカス症；アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ，ｓｐｐ．）により惹起されるアスペルギルス症；カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）により惹起されるカンジダ症；およびムコール症）におけるヒストプラズマ症、コクシジオイデス症、ブラストミセス症、真菌感染）、カリニ肺炎（ニューモシスチス肺炎）、異型肺炎（例えば、マイコプラズマ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）およびクラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｓｐｐ．））、日和見感染肺炎、院内肺炎、化学肺臓炎および嚥下性肺炎、胸膜疾患（例えば、胸膜炎、胸水および気胸（例えば、単純自然気胸、合併した自然気胸、緊張性気胸））、閉塞性気道疾患（例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肺気腫、慢性または急性気管支炎）、職業性肺疾患（例えば、ケイ肺症、黒色肺（炭坑作業員塵肺症）、石綿沈着症、ベリリウム症、職業性喘息、綿肺症および良性塵肺症）、浸潤性肺疾患（例えば、肺線維症（例えば、線維化性肺胞炎、通常型間質性肺炎）、特発性肺線維症、剥離性間質性肺炎、リンパ様間質性肺炎、組織球症Ｘ（例えば、レテラーージーヴェ疾患、ハンド・シュラー・クリスチャン病、好酸球性肉芽腫）、特発性肺ヘモシデローシス、サルコイドーシスおよび肺胞タンパク症）、急性呼吸器系窮迫症候群（例えば、成人呼吸窮迫症候群とも言われる）、浮腫、肺塞栓症、気管支炎（例えば、ウイルス、細菌性）、気管支拡張症、無気肺、肺化膿巣（例えば、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）またはレジオネラニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）により惹起される）および嚢胞性線維症を含むが、これらに限定されない。

【０７２４】

抗－血管新生活性

内因性刺激因子および血管新生阻害剤の間の自然に発生する平衡は、阻害的作用が優性である。Ｒａｓｔｉｎｅｊａｄら．，Ｃｅｌｌ５６：３４５－３５５（１９８９）。通常の生理学的状態、例えば、創傷治癒、器官再生、胚発生および女性生殖過程下にて新血管形成が生じるという稀な場合において、血管新生は、ストリンジェントに調節され、ならびに空間的および時間的に区切られている。特徴的な固形腫瘍成長のごとき病理学的な血管新生状態の下では、これらの制御調節は機能しなくなる。調節されていない血管新生は病理学的となり、そして、多くの腫瘍性および非腫瘍性疾患の進行を維持する。多数の重大な疾患は、固形腫瘍成長および転移、関節炎、ある種の眼障害、および乾癬を含む異常な

新血管形成により支配される。例えば、報文については、Ｍｏｓｅｓら．，Ｂｉｏｔｅｃｈ．９：６３０－６３４（１９９１）；Ｆｏｌｋｍａｎら．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．，３３３：１７５７－１７６３（１９９５）；Ａｕｅｒｂａｃｈら．，Ｊ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．２９：４０１４１１（１９８５）；Ｆｏｌｋｍａｎ，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，ｅｄｓ．ＫｌｅｉｎおよびＷｅｉｎｈｏｕｓｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．１７５－２０３（１９８５）；Ｐａｔｚ，Ａｍ．Ｊ．Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ．９４：７１５－７４３（１９８２）；およびＦｏｌｋｍａｎら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２２１：７１９－７２５（１９８３）を参照のこと。多数の病理学的状態において、血管新生過程はその疾患状態に寄与する。例えば、固形腫瘍成長が血管新生に依存することを示唆する有意なデータが蓄積されている。ＦｏｌｋｍａｎおよびＫｌａｇｓｂｒｕｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３５：４４２－４４７（１９８７）。

【０７２５】

本発明は、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを投与することによる、新血管形成に関連する疾患または障害の処を提供する。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド、またはアゴニストまたはアンタゴニストを用いて処置され得る悪性および転移性状態は、本明細書中記載されているおよびそうでなければ当該技術分野において知られている、悪性腫瘍、固形腫瘍および癌（かかる障害の報文については、Ｆｉｓｈｍａｎら．，Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２ｄ Ｅｄ．，Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏ．，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ（１９８５）を参照のこと）を含むが、これらに限定されない。故に、本発明は、血管新生関連疾患および／または障害の処置方法であって、その必要のある個体へ治療上有効量の本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む方法を提供する。例えば、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、様々なさらなる方法において利用され、癌または腫瘍を治療的に処置してもよい。本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置されてもよい癌は、前立腺、肺、胸、卵巣、胃、膵臓、喉頭、食道、精巣、肝臓、耳下腺、胆管、大腸、直腸、頸部、子宮、子宮内膜、腎臓、膀胱、甲状腺癌を含む固形腫瘍；原発性腫瘍および転移；メラノーマ；グリオブラストーマ；カポジ肉腫；平滑筋肉腫；非小細胞肺癌；直腸結腸癌；進行性悪性腫瘍；および血液感染性腫瘍、例えば、白血病を含むが、これらに限定されない。例えば、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは局所投与され、皮膚癌、頭および首腫瘍、胸腫瘍およびカポジ肉腫のごとき癌を処置してもよい。

【０７２６】

さらなる他の態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、例えば膀胱内投与により、表在性膀胱癌を処置するために利用されてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、腫瘍または腫瘍部位近くへ、注入またはカテーテルを介して直接送達されてもよい。もちろん、当業者が理解するように、適切な投与様式は、処置されるべき癌によって様々であろう。他の送達経路は、本明細書中に記載されている。

【０７２７】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血管新生に関与する、癌以外の他の障害の処置においても有用であってもよい。これらの障害は、良性腫瘍、例えば血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマおよび化膿性肉芽腫；アテローム硬化性プラーク；眼血管新生疾患、例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症黄斑変性症、角膜）移植拒絶反応、新血管緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、眼のブドウ膜炎および表皮爪膜（Ｐｔｅｒｙｇｉａ）（異常な血管成長）；関節リウマチ；乾癬；遅延創傷治癒；子宮内膜症；脈管形

成；肉芽形成；肥厚性瘢痕（ケロイド）；癒着不能骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋血管新生；冠状動脈側枝（ｃｏｒｏｎａｒｙ　ｃｏｌａｔｅｒａｌｓ）；脳側枝（ｃｅｒｅｂｒａｌ　ｃｏｌｌａｔｅｒａｌｓ）；動静脈奇形；虚血性肢血管新生；オスラー－ウェバー症候群；プラーク新血管形成；毛細血管拡張；血友病関節症；血管線維腫；繊維筋性異形成症；創傷肉芽形成；クローン病；およびアテローム性動脈硬化症を含むが、これらに限定されない。

【０７２８】

例えば、本発明の一の態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを肥厚性瘢痕またはケロイドを投与する段階を含む、肥厚性瘢痕およびケロイドを処置するための方法も提供される。

【０７２９】

本発明の一の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、これらの病変の進行を防ぐために、肥厚性瘢痕またはケロイドへ直接注入される。この療法は、肥厚性瘢痕およびケロイド（例えば、火傷）の発達をもたらすことが知られている状態の予防的処置において特に価値が高く、および好ましくは、増殖段階が進行する時間を経過した後（初めの傷害から約１４日後）であるが、肥厚性瘢痕またはケロイドが発達する前に開始する。上記したように、本発明は、例えば、角膜新血管形成、新血管緑内障、増殖糖尿病性網膜症、水晶体後線維増殖症および黄斑変性症を含む眼の新血管疾患の処置方法も提供する。

【０７３０】

さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置され得る、新血管形成に関連する眼障害は、新血管緑内障、糖尿病性網膜症、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟児黄斑変性網膜症、角膜移植片新血管形成ならびに他の眼炎症性疾患、眼腫瘍および脈絡膜または虹彩の新血管形成に関連する疾患を含むが、これらに限定されない。例えば、報文については、Ｗａｌｔｍａｎら．，Ａｍ．Ｊ　Ｏｐｈｔｈａｌ．８５：７０４－７１０（１９７８）およびＧａｒｔｎｅｒら．，Ｓｕｒｖ．Ｏｐｈｔｈａｌ．２２：２９１－３１２（１９７８）を参照のこと。

【０７３１】

故に、本発明の一の態様において、血管形成を阻害するように、患者の角膜へ治療上有効量の化合物（例えば、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド）を投与する段階を含む、角膜の新血管形成（角膜移植片新血管形成を含む）のごとき眼の新血管疾患を処置するための方法が提供される。すなわち、角膜は通常血管のない組織である。しかし、特定の病理学的状態において、毛細血管は、角膜縁の角膜周囲血管網から角膜にまで及んでいてもよい。角膜が血管化すると、角膜が濁り、結果として、患者の視力低下が起こる。角膜が完全に混濁するならば、完全に視力が喪失することもある。例えば、角膜感染（例えば、トラコーマ、単純ヘルペス角膜炎、リーシュマニア症および回旋糸状虫症）、免疫学的過程（例えば、移植拒絶反応およびスティーブンス－ジョンソン症候群）、アルカリによる火傷、外傷、炎症（任意の原因による）、毒性および栄養欠乏状態およびコンタクトレンズ装着による合併症を含む、多種多様な障害は、角膜の新血管形成をもたらし得る。

【０７３２】

本発明の特に好ましい実施態様では、生理的食塩水（眼調製物中にて一般的に用いられている任意の防腐剤および抗菌剤と合わせた）中にて局所投与のために調製されてもよく、および点眼形態にて投与されてもよい。溶液または懸濁液は、その精製形態にて調製されてもよく、および毎日数回投与されてもよい。或いは、上記のように調製された抗－血管新生組成物は、角膜へ直接投与されてもよい。好ましい実施態様において、抗－血管新生組成物は、角膜に結合する粘膜付着性ポリマーと一緒に調製される。さらなる実施態様において、抗－血管新生因子または抗－血管新生組成物は、慣用的なステロイド療法に付加して利用されてもよい。高い確率で血管新生応答を誘導することが知られている局所療

法も、角膜病変（例えば、化学火傷）において予防的に有用であってもよい。これらの場合、ステロイドと併用され得る処置を直ちに開始し、続いて起こる合併症を予防してもよい。

【０７３３】

他の実施態様において、眼科医が顕微鏡使用下で上記の化合物を角膜基質へ直接注入してもよい。好ましい注入部位は、個々の病変の形態によって変化してもよいが、投与の目的は、前進する脈管構造の前部に組成物をセットする（すなわち、血管および通常の角膜の間に散在させる）ことであろう。ほとんどの場合、これは、発達している血管から角膜を「保護する」ための、角膜周囲辺縁への注入を含み得る。この方法は、角膜新血管形成を予防的に阻害するために、角膜損傷のすぐ後に、利用されてもよい。この場合、角膜の病変およびその所望でない潜在的な辺縁系への血液供給の間に散在した角膜周囲辺縁系に、物質を注入することができる。かかる方法は移植された角膜の毛細血管侵入を防ぐために、同様に利用されてもよい。徐放性形態では１年につきたった２～３回しか注入が必要とされないだろう。ステロイドは注入溶液へ加えられ、注入それ自体から生じる炎症を軽減し得るだろう。

【０７３４】

本発明の別の態様において、血管形成が阻害されるように、治療上有効量の本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを患者の眼内に投与する段階を含む、新血管緑内障を処置するための方法が提供される。一の実施態様において、化合物は、早期新血管緑内障を処置するために、眼へ局所投与されてもよい。他の実施態様では、化合物は、前房隅角領域中へ注入することにより埋め込まれてもよい。他の実施態様では、化合物は、化合物が房水中に連続的に放出されるように、任意の位置にセットされてもよい。本発明の別の態様では、血管形成を阻害するように、治療上有効量の本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを患者の眼内へ投与する段階を含む、増殖糖尿病性網膜の処置のための方法が提供される。

【０７３５】

本発明の特に好ましい実施態様では、増殖糖尿病性網膜症は、網膜中のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストの局所濃度を増大させるために、房水または硝子体へ注入することにより処置されてもよい。好ましくは、この処置は、光凝固が必要な重篤な疾患となる前に、開始されるべきである。

【０７３６】

本発明の別の態様では、血管形成が阻害されるように、治療上有効量の本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを患者の眼内に投与する段階を含む、水晶体後線維増殖症を処置するための方法が提供される。化合物は、硝子体内注入および／または眼球内インプラントを介して局所投与されてもよい。

【０７３７】

さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置され得る障害は、血管腫、関節炎、乾癬、血管線維腫、動脈硬化プラーク、遅延創傷治癒、肉芽形成、血友病関節、肥厚性瘢痕、癒着不能骨折、オスラー－ウェーバー－症候群、化膿性肉芽腫、強皮症、トラコーマおよび血管接着を含むが、これらに限定されない。

【０７３８】

さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードする本発明のポリヌクレオチドを用いて処置、予防、診断、および／または予後され得る障害および／または状態は、固形腫瘍、血液感染性腫瘍、例えば、白血病、腫瘍転移、カポジ肉腫、良性腫瘍、例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマおよび化膿性肉芽腫、関節リウマチ、乾癬、眼血管新生疾患、例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症黄斑変性症、角膜移植拒絶反応、新血管緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオー

シス、網膜芽細胞腫およびブドウ膜炎、創傷治癒の遅延、子宮内膜症、血管形成、肉芽形成、肥厚性瘢痕（ケロイド）、癒着不能骨折、強皮症、トラコーマ、血管接着、心筋血管新生、冠状動脈性側枝、脳側枝、動静脈奇形、虚血性肢血管新生、オスラー－ウェバー症候群、プラーク新血管形成、毛細血管拡張、血友病関節、血管線維腫繊維筋性異形成症、創傷肉芽形成、クローン病、アテローム性動脈硬化症、胎芽着床のために必要な脈管新生の阻害により月経を制御する避妊剤、病理学的結果として血管新生を有する疾患、例えば、ネコ引っ掻き病（Ｒｏｃｈｅｌｅ ｍｉｎａｌｉａ ｑｕｉｎｔｏｓａ）、潰瘍（ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ））、バルトネラ症および細菌性血管腫症を含むが、これらに限定されない。

【０７３９】

避妊法の一の態様において、性交および受精の前または後に、胎芽着床を阻害するのに十分な化合物の量を投与することにより、効果的な避妊法、場合により「モーニング・アフター」法が提供される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、月経調節において用いてもよく、或いは、子宮内膜症の処置において腹膜洗浄液または腹膜インプラントのいずれかとして投与してもよい。

【０７４０】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、縫合部肉芽腫を予防するために、外科縫合中に組み込まれてもよい。

【０７４１】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、様々な外科的処置において利用されてもよい。例えば、本発明の一の態様において、組成物（例えば、スプレーまたはフィルムの形態にある）を、腫瘍を除去する前に、領域をコーディングまたはスプレーするために利用して、悪性組織から正常な周囲組織を単離するか、および／または疾患が周囲組織へ広がるのを防いでもよい。本発明の他の態様において、組成物（例えば、スプレーの形態にある）は、内視鏡による手段を介して送達されて、腫瘍をコーティングするか、または所望の位置にある血管新生を阻害してもよい。本発明のさらなる他の態様において、本発明の抗－血管新生組成物を用いてコーティングされている外科用メッシュは、外科用メッシュが利用されてもよい任意の方法において利用されてもよい。例えば、本発明の一の実施態様において、抗－血管新生組成物を含んだ外科用メッシュを、腹腔内の癌の切除手術中（例えば、大腸切除の後）に利用し、構造を支持し、かつ一定量の抗－血管新生因子を放出させてもよい。

【０７４２】

本発明のさらなる態様において、癌の局所再発およびその部位での新規血管形成が阻害されるように、切除後に、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを腫瘍の切除周辺部分に投与することを含む、腫瘍切除部位を処置するための方法が提供される。本発明の一の実施態様において、抗－血管新生化合物は、腫瘍切除部位に直接投与される（例えば、抗－血管新生化合物を用いて腫瘍の切除周辺部分を塗布、ブラッシングまたはそうでなければコーティングすることにより適用する）。別法では、抗－血管新生化合物は、投与前に、知られている外科用ベースと中に組み込まれてもよい。本発明の特に好ましい実施態様では、抗－血管新生化合物は、肝臓の悪性腫瘍切除後および神経外科手術後に適用される。

【０７４３】

本発明の一の態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、胸、大腸、脳および肝腫瘍を含む多種多様な腫瘍の切除面に投与されてもよい。例えば、本発明の一の実施態様において、抗－血管新生化合物は、その部位での新規血管形成が阻害されるように、切除後、神経腫瘍の部位へ投与されてもよい。

【０７４４】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、他の抗－血管新生因子と一緒に投与されてもよい。他の抗－血管新生因子の典型例は、抗－侵襲性因子、レチノイン酸およびその誘導体、パクリタキセル、スラミン、メタロプロテイナーゼ－１の組織阻害剤、メタロプロテイナーゼ－２の組織阻害剤、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤－１、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤－２およびより軽い「ｄ族」遷移金属の様々な形態を含む。

【０７４５】

より軽い「ｄ族」遷移金属は、例えば、バナジウム、モリブデン、タングステン、チタン、ニオブおよびタンタル種を含む。かかる遷移金属種は、遷移金属錯体を形成してもよい。上記の遷移金属種の適当な錯体は、オキソ遷移金属錯体を含む。

【０７４６】

バナジウム錯体の典型例は、オキソバナジウム錯体、例えば、バナジン酸塩およびバナジル錯体を含む。適当なバナジン酸錯体は、例えば、メタバナジンアンモニウムアンモニウム、メタバナジン酸ナトリウムおよびオルトバナジン酸ナトリウムのごとき、メタバナジン酸塩およびオルトバナジン酸塩錯体を含む。適当なバナジル錯体は、バナジル硫酸塩水和物、例えば、バナジル硫酸塩一および三水和物を含む、例えば、バナジルアセチルアセトナートおよび硫酸バナジルを含む。

【０７４７】

タングステンおよびモリブデン錯体の典型例は、オキソ錯体も含む。適当なオキソタングステン錯体は、タングステン酸および酸化タングステン錯体を含む。適当なタングステン酸錯体は、タングステン酸アンモニウム、タングステン酸カルシウム、タングステン酸ナトリウム二水和物およびタングステン酸を含む。適当な酸化タングステンは、酸化タングステン（ＩＶ）および酸化タングステン（ＶＩ）を含む。適当なオキソモリブデン錯体は、モリブデン酸、酸化モリブデンおよびモリブデニル錯体を含む。適当なモリブデン酸錯体は、モリブデン酸アンモニウムおよびその水和物、モリブデン酸ナトリウムおよびその水和物、ならびにモリブデン酸カリウムおよびその水和物を含む。適当な酸化モリブデンは、酸化モリブデン（ＶＩ）、酸化モリブデン（ＶＩ）およびモリブデン酸を含む。適当なモリブデニル錯体は、例えば、モリブデニルアセチルアセトナートを含む。他の適当なタングステンおよびモリブデン錯体は、例えば、グリセロール、酒石酸および糖に由来するヒドロキソ誘導体を含む。

【０７４８】

多種多様な他の抗－血管新生因子は、本発明の文脈にて利用されてもよい。典型例は、血小板因子４；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（ズワイガニ殻から調製）、（Ｍｕｒａｔａら．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５１：２２－２６，１９９１）；硫酸化多糖ペプチドグリカン複合体（ＳＰ－ＰＧ）（この化合物の機能は、ステロイド、例えば、エストロゲンおよびクエン酸タモキシフェンにより高められてもよい）；スタウロスポリン；マトリックス代謝の調節因子、例えば、プロリンアナログ、シスヒドロキシプロリン、ｄ，Ｌ－３，４－デヒドロプロリン、チアプロリン、アルファ、アルファ－ジピリジル、アミノプロピオニトリルフマラートを含む；４－プロピル－５－（４－ピリジニル）－２（３Ｈ）－オキサゾロン；メトトレキセート；ミトキサントロン；ヘパリン；インターフェロン；２マクログロブリン－血清；ＣｈＩＭＰ－３（Ｐａｖｌｏｆｆら．、Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．２６７：１７３２１－１７３２６，（１９９２））；キモスタチン（Ｔｏｍｋｉｎｓｏｎら．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ．２８６：４７５４８０，（１９９２））；シクロデキストリンテトラデカサルフェート；エポネマイシン；カンプトテシン；フマギリン（Ｉｎｇｂｅｒら．，Ｎａｔｕｒｅ　３４８：５５５－５５７，１９９０）；ナトリウム金チオマレート（「ＧＳＴ」；ＭａｔｓｕｂａｒａおよびＺｉｆｆ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．７９：１４４０－１４４６，（１９８７））；抗コラゲナーゼ－血清；アルファ２－抗プラスミン（Ｈｏｌｍｅｓら．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２（４）：１６５９－１６６４，（１９８７））；ビサントレン（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）；ロベンザリットジナトリウム（Ｎ－（２）－カルボキシフェニル－４－

クロロアントロニル酸ジナトリウムまたは「ＣＣＡ」；Ｔａｋｅｕｃｈｉら．，Ａｇｅｎｔ　Ａｃｔｉｏｎｓ　３６：３１２－３１６，（１９９２））；サリドマイド；血管拡張性ステロイド；ＡＧＭ－１４７０；カルボキシアミノルミダゾール；およびメタロプロテイナーゼ阻害剤、例えば、ＢＢ９４を含む。

【０７４９】

細胞レベルにおける疾患

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置、予防、診断および／または予後され得る、細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関連する疾患は、癌（例えば、大腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、メラノーマ、網膜芽細胞腫、グリオブラストーマ、肺癌、腸癌、精巣癌、胃癌、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、胸癌、前立腺癌、カポジ肉腫および卵巣癌を含むがこれらに限定されない、濾胞性リンパ腫、ｐ５３突然変異を伴う癌腫およびホルモン依存性腫瘍）；自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎および関節リウマチ）およびウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、ポックス・ウイルスおよびアデノウイルス）、炎症、移植片対宿主病、急性移植拒絶反応および慢性移植拒絶反応を含む。

【０７５０】

好ましい実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、癌、特に上記のものの成長、進行および／または転移を阻害するために用いられる。

【０７５１】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより処置または検出され得る、細胞生存の増大に関連するさらなる疾患または状態は、悪性腫瘍および関連する障害、例えば、白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む）を含む）および慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒性）白血病および慢性リンパ球性白血病））、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖疾患、ならびに、肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ血管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、大腸癌腫、膵臓癌、胸癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌腫、基底細胞癌腫、腺癌腫、汗腺癌腫、皮脂腺癌腫、乳頭癌腫、乳頭腺癌腫、嚢胞腺癌腫、髄様癌腫、気管支原性肺癌腫、腎細胞癌腫、肝細胞腫、胆管癌腫、絨毛癌腫、精上皮腫、胚性癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌腫、小細胞肺癌腫、膀胱癌腫、上皮癌腫、グリオーマ、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、オリゴデンドログリオーマ、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫を含むがこれらに限定されない固形腫瘍のの進行および／または転移を含むが、これらに限定されない。

【０７５２】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置、予防、診断および／または予後され得る、アポトーシスの増大に関連する疾患は、ＡＩＤＳ；神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、網膜色素変性症、小脳変性および脳腫瘍または先の関連疾患）；自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎および関節リウマチ）骨髄異形成症候群（例えば、再生不良性貧血）、移植片対宿主病、虚血性傷害（例えば、心筋梗塞、脳卒中および再灌流傷害により惹起されるもの）、肝臓傷害（例えば、肝炎関連する肝臓傷害、虚血／再灌流傷害、胆汁鬱帯（胆管

傷害）および肝臓癌）；毒素が誘導する肝臓疾患（例えば、アルコールにより惹起されるもの）、敗血症ショック、悪液質および拒食症を含むが、これらに限定されない。

【０７５３】

創傷治癒および上皮細胞増殖

本発明のさらなる一層の一の態様に従って、治療を目的として、例えば、創傷治癒のために上皮細胞増殖および基底ケラチノサイトを刺激し、および毛嚢産生および皮膚創傷の治癒を刺激するための、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを利用するための方法が提供される。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、外科創傷、切除創傷、真皮および表皮の損傷を含む深い創傷、眼組織創傷、歯組織創傷、口腔創傷、糖尿病潰瘍、皮膚潰瘍、肘潰瘍、動脈潰瘍、静脈うっ血性潰瘍、熱への暴露または化学物質により生じる火傷および他の異常な創傷治癒状態、例えば、尿毒症、栄養不良、ビタミン欠乏ならびにステロイド、放射線療法および抗腫瘍剤および代謝拮抗剤を用いた全身処置に関連する合併症を含む創傷治癒の刺激において臨床上有用であってもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、皮膚喪失後の皮膚再生を改善するために用いることができる。

【０７５４】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、皮膚移植片と創傷床の付着を増大させ、および創傷床からの上皮再形成を刺激するために用いられ得る。以下は、創傷床への接着性を高めるために、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを投与できる移植片の型である：自家移植片、人工皮膚、同種移植片、自家皮膚移植片、自己（ａｕｔｏｅｐｄｅｒｍｉｃ）移植片、無血管性移植片、ブレア・ブラウン移植片、骨移植片、胚胎組織移植片、皮膚移植片、遅延移植片、真皮移植片、表皮移植片、筋膜移植片、全層移植片、ヘテロ移植片、異種移植片、同種移植片、過形成性移植片、層状移植片、メッシュ移植片、粘膜移植片、オリアーティールシュ移植片、大網移植片、パッチ移植片、茎移植片、穿通性移植片、スプリット（ｓｐｌｉｔ）皮膚移植片、シックスプリット（ｔｈｉｃｈ　ｓｐｌｉｔ）移植片。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、、皮膚強度を改善し、および老化した皮膚の外観を改善するために用いられ得る。

【０７５５】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、肝細胞の増殖ならびに肺、胸、膵臓、胃、小腸および大腸における上皮細胞の増殖において変化を生じるとも考えられている。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、上皮細胞、例えば、皮脂細胞、毛嚢、肝細胞、ＩＩ型肺細胞、ムチン産生ゴブレット細胞および他の上皮細胞、ならびに皮膚、肺、肝臓および胃腸管内に含まれるそれらの前駆体の増殖を改善し得る。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、内皮細胞、ケラチノサイトおよび基底ケラチノサイトの増殖を改善してもよい。

【０７５６】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、放射線、化学療法による処置またはウイルス感染から生じる腸毒性の副作用を軽減するためにも用いられ得る。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、小腸粘膜への細胞保護効果を有してもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、化学療法およびウイルス感染から生じる粘膜炎（口腔潰瘍）の治癒を刺激してもよい。

【０７５７】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、火傷を含む、完全および部分的厚さの皮膚欠損の完全な再生（すなわち、毛嚢、汗腺および皮脂腺の再生）、乾癬のごとき他の皮膚欠損の処置において、さらに用いられ得る。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、病変の再上皮化を加速することにより、表皮水疱症、幾つもの、開いた、かつ痛みを伴う水膨れをもたらす、表皮とその下にある真皮との付着における欠陥を処置するために用いられ得る。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、胃および十二指腸潰瘍を処置し、ならびに、粘膜の瘢痕化および腺性粘膜および十二指腸の粘膜の再生により、より迅速な治癒を補助する。炎症性腸疾患、例えば、クローン病および潰瘍性結腸炎は、小腸または大腸それぞれの粘膜表面の破壊をもたらす疾患である。故に、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、粘膜表面の再生を改善して、より迅速な治癒を補助し、および炎症性腸疾患の進行をできる。本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、胃腸管にわたる粘液の産生への有意な効果を有すると考えられ、および摂取された有害物質からの、または手術後の腸粘膜を保護するために用いることができる。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、発現不足に関連する疾患を処置するために用いられ得る。

【０７５８】

さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、様々な病理学的状態に起因する肺への損傷を予防および治癒するために用いられ得る。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、増殖および分化を刺激し、および肺胞および細気管支上皮の修復を改善し、急性または慢性肺損傷を予防または処置し得る。例えば、肺胞の進行性消失をもたらす肺気腫、および細気管支上皮および肺胞の壊死を惹起する、すなわち、気道熱傷および火傷に由来する吸入傷害は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストを用いて効果的に処置することができる。また、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ＩＩ型の肺細胞の増殖および分化を刺激するために用いることができ、これは、ヒアリン膜症、例えば、幼児呼吸器系窮迫症候群および気管支肺異形成症のごとき早産児における疾患の処置または予防に役立ち得る。

【０７５９】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、肝細胞の増殖および分化を刺激し得、それ故に、硬変により惹起される激症肝臓障害、ウイルス肝炎および毒性物質（すなわち、アセトアミノフェン、四塩化炭素および当該技術分野において知られている他の肝臓毒素）により惹起される肝臓損傷のごとき肝臓疾患および病理学的状態を改善または処置するために用いることができる。

【０７６０】

加えて、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、真性糖尿病の兆候を処置または予防するために用いることができる。新たにＩ型およびＩＩ型糖尿病と診断された患者において、幾つかの島細胞機能が残存する場合、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、その島機能を維持し、疾患の永続的な徴候を改善、遅延または予防し得る。また．本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、島細胞移植における補助として用いられ得、島細胞機能を改善または改善する。

【０７６１】

神経活性および神経疾患

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、脳および／または神経系の疾患、障害、損傷または傷害を診断および／または処置するために用いられてもよい。本発明の組成物（例えば、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド）を用いて処置され得る神経系障害は、軸索の断絶、ニューロンの減少または変性、または脱髄のいずれかをもたらす神経系傷害および疾患または障害を含むが、これらに限定されない。本発明の方法に従って、患者（ヒトおよびヒトでない哺乳類患者を含む）において処置されてもよい神経系病変は、中枢（脊髄、脳を含む）または末梢神経系いずれかの以下の病変を含むが、これらに限定されない：（１）虚血性病変、ここで、神経系の一部における酸素不足は、脳梗塞または虚血或いは脊髄梗塞または虚血を含む、ニューロンの傷害または死をもたらす；（２）外傷性病変、物理的傷害により惹起されるか、または手術に関連する病変、例えば、神経系の一部を断絶する病変、或いは圧迫損傷を含む；（３）悪性病変、ここで、神経系の一部は、悪性腫瘍に関連する神経系または非神経系組織に由来する悪性腫瘍のいずれかである悪性組織により破壊または損傷される；（４）感染性病変、ここで、神経系の一部は、感染の結果として、例えば、化膿巣によるか、またはヒト免疫不全ウイルス、帯状疱疹、または単純ヘルペスウイルスによる感染か、またはライム病、結核症または梅毒に関連して、破壊または損傷される；（５）変性病変、ここで、神経系の一部は、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病または筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）に関連する変性を含むがこれらに限定されない、変性過程の結果として、破壊または損傷される；（６）栄養疾患または障害に関連する病変、ここで、神経系の一部は、ビタミンＢ１２欠乏、葉酸欠乏、ウェルニッケ疾患、タバコ－アルコール性弱視、マルキャファーバービニャーミ疾患（脳梁の原発性変性）およびアルコール性小脳変性を含むがこれらに限定されない、栄養障害または代謝障害により、破壊または損傷される；（７）糖尿病（糖尿病性ニューロパシー、ベル麻痺）、全身性エリテマトーデス、癌腫、またはサルコイドーシスを含むがこれらに限定されない、全身疾患に関連する神経病変；（８）アルコール、鉛または特定の神経毒素を含む、毒性物質により惹起される病変；および（９）脱髄病変、ここで、神経系の一部は、多発性硬化症、ヒト免疫不全ウイルス関連ミエロパシー、横断性ミエロパシーまたは様々な病因、進行性多発性白質脳症、および橋中央ミエリン溶解を含むがこれらに限定されない脱髄疾患により、破壊または損傷される。

【０７６２】

一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、低酸素症の損傷効果から神経細胞を保護するために用いられる。さらに好ましい一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、脳低酸素症の損傷効果から神経細胞を保護するために用いられる。この実施態様に従って、本発明の組成物は、脳低酸素症に関連する神経細胞傷害を処置または予防するために用いられる。この実施態様の非限定的な１つの態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、脳虚血に関連する神経細胞傷害を処置または予防するために用いられる。この実施態様の別の非限定的な態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、脳梗塞に関連する神経細胞傷害を処置または予防するために用いられる。

【０７６３】

別の好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、脳卒中に関連する神経細胞傷害を処置または予防するために用いられる。特定の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、脳卒中に関連する神経細胞傷害を処置または予防するために用いられる。

【０７６４】

別の好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、心臓発作に関連する神経細胞傷害を処置または予防するために用いられる。特定の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、心臓発作に関連する神経細胞傷害を処置または予防するために用いられる。

【０７６５】

神経系障害の処置または予防のために有用な本発明の組成物は、ニューロンの生存または分化の改善における生物活性を試験することにより、選択されてもよい。例えば、これらに限定はされないが、以下の任意の効果を導く本発明の組成物は、本発明に従って有用であってもよい：（１）低酸素症または低酸素状態の存在または不在下のいずれかにおける培養中のニューロンの生存時間の増大；（２）培養液中またはインビボにおけるニューロンの発芽の増大；（３）培養液中またはインビボにおけるニューロンに関連する分子、例えば、運動ニューロンに関連するコリンアセチルトランスフェラーゼまたはアセチルコリンエステラーゼの産生の増大；または（４）インビボでのニューロン機能障害の徴候の減少。かかる効果は、当該技術分野において知られている任意の方法により測定されてもよい。好ましい、非限定的な実施態様において、ニューロン生存の増大は、本明細書中に記載されているか、またはそうでなければ当該技術分野において知られている方法、例えば、Ｚｈａｎｇら．，ＰｒｏｃＮａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９７３６３７－４２（２０００）またはｉｎ Ａｒａｋａｗａら．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，１０：３５０７－１５（１９９０）の方法を用いて慣用的に測定されてもよく；ニューロンの発芽の増大は、当該技術分野において知られている方法、例えば、Ｐｅｓｔｒｏｎｋら．，Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｌ．，７０：６５－８２（１９８０），またはＢｒｏｗｎら．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，４：１７４２（１９８１）に記載の方法により検出されてもよく；ニューロンに関連する分子の産生増大は、当該技術分野において知られている技法を用いて、および測定されるべき分子に依存して、バイオアッセイ、酵素によるアッセイ、抗体結合、ノーザンブロットアッセイなどにより、測定されてもよく；および運動ニューロン機能障害は、運動ニューロン障害の物理的徴候、例えば、弱さ、運動ニューロン伝導速度、または機能傷害を査定することにより評価されてもよい。

【０７６６】

特定の実施態様において、本発明に従って処置されてもよい運動ニューロン障害は、梗塞、感染、毒素への曝露、外傷、外科的損傷、運動ニューロンおよび神経系他の成分に作用してもよい変性疾患または悪性腫瘍のごとき障害、ならびに筋萎縮性側索硬化症のようにニューロンに特異的に作用し、および進行性脊髄性筋萎縮症、進行性球麻痺、原発性側索硬化症、幼児性および若年性筋萎縮症、小児の進行性延髄麻痺ファチオーロンド症候群）、灰白髄炎およびポリオ後症候群、および遺伝性運動感覚ニューロパシー（シャルコー・マリー・トゥース病）を含むがこれらに限定されない障害を含むが、これらに限定されない。。

【０７６７】

さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ニューロンの生存；シナプス形成；コンダクタンス；神経分化などにおいて役割を果たしてもよい。故に、本発明の組成物（本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含む）は、障害の学習および／または認識を含むがこれらに限定されない、これらの役割に関連する疾患または障害を診断および／または処置または予防するために用いられてもよい。本発明の組成物は、神経変性疾患状態および／または行動障害の処置または予防において有用であってもよい。かかる神経変性疾患状態および／または行動障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、トゥレット症候群、統合失調症、躁病、認知症、パラノイア、強迫神経症障害、パニック障害、学習障害、ＡＬＳ、精神病、自閉症および摂食、睡眠パターン、バランスおよび知覚における障害を含む行動の変化を含むが、これらに限定されない。加えて、本発明の組成物は、発生胚に関連する障害または性関連障害の処置、

予防および／または検出においても役割を果たしてもよい。

【０７６８】

さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、障害頸動脈疾患（例えば、頸動脈血栓症、頸動脈狭窄、またはモヤモヤ病）、脳のアミロイド・アンギオパチー、脳動脈瘤、脳無酸素症、脳動脈硬化症、脳動静脈奇形、脳動脈疾患、脳塞栓症および血栓症（例えば、頸動脈血栓症静脈洞血栓症、またはバレンベリー症候群）、脳出血（例えば、硬膜外または硬膜下血腫、またはくも膜下出血）、脳梗塞、脳虚血（例えば、一過性脳虚血、鎖骨下動脈スチール症候群または椎骨脳底動脈循環不全）、血管性認知症（例えば、多発脳梗塞性）、脳室周囲白質軟化症および血管性頭痛（例えば、群発頭痛または偏頭痛）を含むがこれらに限定されない、脳血管に関連する疾患、損傷、障害、または傷害から神経細胞を保護するのに有用であってもよい。

【０７６９】

本発明のさらなる一層の一の態様に従って、治療目的のために、例えば、神経細胞の増殖および／または分化を刺激するために、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを利用するための方法が提供される。それ故に、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、神経系疾患を処置および／または検出するために用いられてもよい。さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、特定の神経系疾患または障害のマーカーまたは検出器として用いられ得る。

【０７７０】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置または検出され得る神経系疾患の例は、脳疾患、例えば、母性フェニルケトン尿症のごときフェニルケトン尿症を含む代謝脳疾患、ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症、ビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠損症、ウェルニッケ脳症、脳浮腫、脳新生物、例えば、テント下新生物を含む小脳新生物、脳室新生物、例えば、脈絡叢新生物、視床下部新生物、テント上新生物、カナバン病、小脳疾患、例えば、毛細血管拡張性失調症のごとき脊髄小脳変性を含む小脳運動失調症、小脳共同運動障害、フリードリッシュ運動失調症、マチャド・ジョセフ病、オリーブ橋小脳萎縮症、小脳新生物、例えば、テント下新生物、汎発性脳硬化症、例えば、軸周囲脳炎、球様細胞白質萎縮症、異染性白質萎縮症および亜急性硬化性全脳炎を含む。

【０７７１】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置または検出され得るさらなる神経系疾患は、脳血管障害（例えば、頸動脈血栓症、頸動脈狭窄およびモヤモヤ病を含む、頸動脈疾患）、脳のアミロイド・アンギオパチー、脳動脈瘤、脳無酸素症、脳動脈硬化症、脳動静脈奇形、脳動脈疾患、脳塞栓症および血栓症、例えば、頸動脈血栓症静脈洞血栓症およびバレンベリー症候群、脳出血、例えば、硬膜外血腫、硬膜下血腫およびくも膜下出血、脳梗塞、脳虚血、例えば、一過性脳虚血、鎖骨下動脈スチール症候群および椎骨脳底動脈循環不全、血管認知症、例えば、多発脳梗塞性認知症、脳室周囲白質軟化症、血管性頭痛、例えば、群発頭痛および偏頭痛を含む。

【０７７２】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置または検出され得るさらなる神経系疾患は、認知症、例えば、ＡＩＤＳ認知症合併症、初老性認知症、例えば、アルツハイマー病およびクロイツフェルト・ヤコブ症候群、老人性認知症、例えば、アルツハイマー病および進行性核上麻痺、血管認知症、例えば、多発脳梗塞性認知症、軸周囲脳炎、ウイルス脳炎、例えば、流行性脳炎、日本脳炎、セントルイス脳炎、ダニ媒介脳炎およびウエスト・ナイル熱を含む脳炎、急性播種性脳脊髄炎、髄膜脳炎、例えば、ブドウ膜脳炎症候群、脳炎後パーキンソン病およ

び亜急性硬化性全脳炎、脳軟化症、例えば、脳室周囲白質軟化症、てんかん、例えば、幼児性けいれん、欠神発作、ＭＥＲＲＦ症候群を含むミオクローヌスてんかん、強直間代性てんかん、部分てんかん、例えば、複雑部分てんかん、前頭葉てんかんおよび側頭葉てんかん、外傷後てんかん、てんかん重積症、例えば、部分持続てんかんおよびハレルフォルデン・スパッツ症候群を含むてんかん重積状態のごときてんかんを含む。

【０７７３】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置または検出され得るさらなる神経系疾患は、水頭症、例えば、ダンディ・ウォーカー症候群および正常圧水頭症、視床下部疾患、例えば、視床下部新生物、脳マラリア、脱力発作を含むナルコレプシー、延髄灰白髄炎、脳偽腫瘍、レット症候群、ライ症候群、視床疾患、脳トキソプラズマ症、頭蓋内結核腫およびツェルヴェーガー症候群、中枢神経系感染、例えば、ＡＩＤＳ認知症合併症、脳化膿巣、硬膜下蓄膿症、脳脊髄炎、例えば、馬脳脊髄炎、ベネズエラ馬脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、ビスナおよび脳マラリアを含む。

【０７７４】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置または検出され得るさらなる神経系疾患は、髄膜炎、例えば、くも膜炎、無菌性髄膜炎、例えば、リンパ球性絨毛髄膜炎を含むウイルス髄膜炎、ヘモフィルス髄膜炎、リステリア髄膜炎を含む細菌髄膜炎、髄膜炎菌性髄膜炎、例えば、ウォーターハウス－フリーデリクセン症候群、肺炎球菌髄膜炎および髄膜結核症、真菌髄膜炎、例えば、クリプトコックス髄膜炎、硬膜下滲出、髄膜脳炎、例えば、ブドウ膜脳炎症候群、横断性脊髄炎のごとき脊髄炎、脊髄癆のごとき神経梅毒、延髄灰白髄炎および灰白髄炎後症候群を含む灰白髄炎、プリオン疾患（例えば、クロイツフェルト・ヤコブ症候群、ウシ海綿状脳症、ゲルストマン－ストロイスラー症候群、クールー、スクレピー）および脳トキソプラズマ症を含む。

【０７７５】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置または検出され得るさらなる神経系疾患は、中枢神経系新生物を含む脳新生物、例えば、小脳新生物、例えば、テント下新生物、脳室新生物、例えば、脈絡叢新生物、視床下部新生物およびテント上新生物、髄膜新生物、硬膜外新生物を含む脊髄新生物、脱髄疾患、例えば、カナバン疾患、副腎白質ジストロフィーを含む汎発性脳硬化症、軸周囲脳炎、球様細胞白質萎縮症、汎発性脳硬化症、例えば、異染性白質萎縮症、アレルギー性脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、進行性多病巣性白質脳障害、多発性硬化症、橋中央ミエリン溶解、横断性脊髄炎、視神経脊髄炎、スクレピー、脊柱湾曲症、慢性疲労症候群、ビスナ、高圧神経症候群、髄膜症、脊髄疾患、例えば、先天性筋無緊張症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、例えば、ウェルドニッヒ・ホフマン病、脊髄圧迫、脊髄新生物、例えば、硬膜外新生物、脊髄空洞症、脊髄癆、スティフマン症候群、知能発育不全、例えば、アンジェルマン症候群、猫鳴き症候群、ドランジ症候群、ダウン症候群、ガングリオシドーシス、例えば、ガングリオシドーシスＧ（Ｍ１）、サンドホフ病、テイ・サックス病、ハートナップ病、ホモシスチン尿症、ローレンス－ムーン－ビードル症候群、レッシュ・ナイハン症候群、メープルシロップ尿症、ムコリピドーシス、例えば、フコシドーシス、神経セロイド－リポフスチン症、眼脳腎症候群、フェニルケトン尿症、例えば、母性フェニルケトン尿症、プラダーウィリ症候群、レット症候群、ルビンスタイン－テイビ症候群、結節硬化症、ＷＡＧＲ症候群、神経系異常、例えば、全前脳症、神経管欠損症、例えば、水無脳症を含む無脳症、アーノルド・キアリ奇形、脳ヘルニア、髄膜瘤、髄膜脊髄瘤、脊椎管癒合異常、例えば、嚢胞性二分脊椎および潜在性二分脊椎を含む。

【０７７６】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置または検出され得るさらなる神経系疾患は、シャルコー・マリー

病、遺伝性視神経萎縮、レフサム病、遺伝性痙性対麻痺、ウェルドニッヒ・ホフマン病、遺伝性感覚および自律神経ニューロパシー、例えば、先天性無痛覚症および家族性自律神経失調症を含む遺伝性運動感覚ニューロパシー、精神症状（例えば、ゲルストマン症候群を含む失認症、健忘症、例えば、逆向性健忘症、行動不能症、神経因性膀胱、脱力発作、コミュニケーション障害、例えば、難聴、部分的な聴覚喪失、ラウドネスレクルートメント（ｌｏｕｄｎｅｓｓ　ｒｅｃｒｕｉｔｍｅｎｔ）および耳鳴りを含む聴覚障害、言語障害、例えば、失書症、健忘性失語症、ブローカ失語症およびウェルニッケ失語症を含む失語症、失読症、例えば、後天性失読症、言語発達障害、例えば、健忘性失語症、ブローカ失語症およびウェルニッケ失語症を含む失語症、構音障害、コミュニケーション障害、例えば、構音障、反響言語、無言症および吃音を含む言語障害、発声障害、例えば、失声症および嗄声、除脳硬直状態、狂乱状態、線維束収縮、幻覚、髄膜症、運動障害、例えば、アンジェルマン症候群、運動失調、アテトーシス、舞踏病、筋失調症、運動低下症、筋緊張低下、ミオクローヌス、チック、斜頸および振戦、筋緊張亢進、例えば、筋硬直、例えば、スティフマン症候群、筋痙直、麻痺、例えば、耳帯状疱疹を含む顔面麻痺、胃不全麻痺、片麻痺、眼筋麻痺、例えば、複視、デュアン症候群、ホルネル症候群、慢性進行性外眼筋麻痺、例えば、キーンズ症候群、延髄麻痺、熱帯性痙性不全対麻痺、対麻痺、例えば、ブラウン・セカール症候群、四肢麻痺、呼吸麻痺および声帯麻痺、不全麻痺、幻肢、味覚障害、例えば、味覚消失および味覚障害、視覚障害、例えば、弱視、失明、色覚欠如、複視、半盲、暗点および正常以下視力、睡眠障害、例えば、クライネ－レヴィン症候群を含む過眠、不眠および夢遊、けいれん、例えば、開口障害、意識消失、例えば、昏睡、遷延性植物状態および失神および目まい、神経筋疾患、例えば、先天性筋無緊張症、筋萎縮性側索硬化症、ランバート・イートン筋無力症症候群、運動ニューロン障害、筋萎縮症、例えば、脊髄性筋萎縮症、シャルコー・マリー病およびウェルドニッヒ・ホフマン病、ポリオ後脊髄炎症候群、筋ジストロフィー、重症筋無力症、萎縮性ミオトニー、先天性ミオトニー、ネマリン・ミオパシー、家族性周期性四肢麻痺、多発性パラミオクロヌス（Ｐａｒａｍｙｏｃｌｏｎｕｓ）、熱帯性痙性不全対麻痺およびスティフマン症候群、末梢神経系疾患、例えば、先端疼痛症、アミロイドニューロパシー、自律神経系疾患、例えば、エーディ症候群、バレー－リーウー（Ｂａｒｒｅ－Ｌｉｅｏｕ）症候群、家族性自律神経失調症、ホルネル症候群、反射性交感神経性ジストロフィーおよびシャイ・ドレーガー症候群、脳神経疾患、例えば、聴神経疾患、例えば、神経線維腫症を含む聴神経腫、顔面神経疾患、例えば、顔面神経痛、メルカーソン・ローゼンタール症候群、弱視を含む眼球運動障害、眼振、動眼神経麻痺、眼筋麻痺、例えば、デュアン症候群、ホルネル症候群、キームス症候群を含む慢性進行性外眼筋麻痺、内斜視および外斜視のごとき斜視、眼球運動神経麻痺、視神経疾患、例えば、遺伝性視神経萎縮を含む視神経萎縮、視神経円板ドルーゼ、視神経炎、例えば、視神経脊髄炎、乳頭浮腫、三叉神経痛、声帯麻痺、脱髄疾患、例えば、視神経脊髄炎および脊柱湾曲症、ならびに糖尿病ニューロパシー、例えば、糖尿病足を含む。

【０７７７】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置または検出され得るさらなる神経系疾患は、神経圧迫症候群、例えば、手根管症候群、足根管症候群、胸郭出口症候群、例えば、頸肋症候群、尺骨神経圧迫症候群、神経痛、例えば、灼熱痛、頸腕神経痛、顔面神経痛および三叉神経痛、神経炎、例えば、実験的アレルギー性神経炎、視神経炎、多発性神経炎、多発性神経根神経炎および神経根炎、例えば、多発性神経根炎、遺伝性運動および感覚ニューロパシー、例えば、シャルコー・マリー疾患、遺伝性視神経萎縮、レフサム病、遺伝性痙性対麻痺およびウェルドニッヒ・ホフマン病、遺伝性感覚および自律神経ニューロパシー、先天的無痛覚症および家族性自律神経障害を含む、ＰＯＥＭＳ症候群、坐骨神経痛、味覚性発汗およびテタニーを含む。

【０７７８】

内分泌障害

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ホルモン異常に関連する障害および／または疾患および／または内分泌系の障害または疾患を処置、予防、診断、および／または予後するために用いられてもよい。

【０７７９】

内分泌系の腺により分泌されたホルモンは、物理的成長、性機能、代謝および他の機能を制御する。障害は、２通り：ホルモン産生障害および組織のホルモン応答不能に分類されてもよい。これらのホルモン異常または内分泌系疾患、障害または状態の病因は、癌および幾つかの自己免疫疾患のように、遺伝性、体性、後天性（例えば、化学療法、傷害または毒素による）または感染性であってもよい。さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、内分泌系および／またはホルモン異常に関連する特定の疾患または障害のマーカーまたは検出器として用いられ得る。

【０７８０】

内分泌系および／またはホルモン異常および／または疾患は、妊娠および陣痛（例えば、早期陣痛、過期妊娠、自然流産および緩慢な陣痛または陣痛の終了）に伴う合併症；および月経周期の障害および／または疾患（例えば、月経困難症および子宮内膜症）を含むがこれらに限定されない、子宮運動の障害を包含する。

【０７８１】

内分泌系および／またはホルモン不均衡障害および／または疾患は、膵臓の障害および／または疾患、例えば、真性糖尿病、尿崩症、先天的膵臓形成不全、褐色細胞腫－膵島細胞腫瘍症候群；副腎腺の障害および／または疾患、例えば、アジソン疾患、コルチコステロイド欠乏、男性化障害、多毛、クッシング症候群、高アルドステロン症、褐色細胞腫；下垂体腺の障害および／または疾患、例えば、下垂体機能亢進症、下垂体機能低下症、下垂体小人症、下垂体腺腫、汎下垂体機能低下症、末端肥大症、巨人症；甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症、プラマー病、グレーブス病（毒性汎発性甲状腺腫）、毒性結節性甲状腺腫、甲状腺炎（橋本甲状腺炎、亜急性肉芽腫性甲状腺炎およびサイレントリンパ球性甲状腺炎）、ペンドレッド症候群、粘液水腫、クレチン症、甲状腺中毒症、甲状腺ホルモン縮合障害、胸腺無形成症、甲状腺のヒュルトレ細胞腫、甲状腺癌、甲状腺癌腫、髄様甲状腺癌腫を含むがこれらに限定されない、甲状腺の障害および／または疾患；副甲状腺の障害および／または疾患、例えば、副甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能低下症；視床下部の障害および／または疾患を含む。

【０７８２】

加えて、内分泌系および／またはホルモン不均衡障害および／または疾患は、癌を含む、精巣または卵巣の障害および／または疾患も含んでもよい。精巣または卵巣の他の障害および／または疾患はさらに、例えば、卵巣癌、ポリ嚢胞卵巣症候群、クラインフェルター症候群、消失精巣症候群（両側無睾丸症）、ライディッヒ細胞の先天的欠損、停留睾丸、ヌーナン症候群、筋硬直性ジストロフィー、精巣の毛細血管腫（良性）、精巣および新生精巣の異常増殖を含む。

【０７８３】

さらに、内分泌系および／またはホルモン不均衡障害および／または疾患は、多腺性欠乏症候群、褐色細胞腫、神経芽細胞腫、多発性内分泌異常増殖のごとき障害および／または疾患ならびに内分泌組織の障害および／または癌を含んでもよい。

【０７８４】

別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のアルブミン蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する治療用蛋白質が発現される、一または複数の組織に関連する内分泌疾患および／または障害を診断、予後、予防および／または処置するために用いられてもよい。

【０７８５】

生殖器系疾患

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、生殖器系の疾患および／または障害を診断、処置、または予防するために用いられてもよい。本発明の組成物により処置され得る生殖器系障害は、生殖器系傷害、感染、腫瘍性障害、先天的欠陥、ならびに不妊症、妊娠、陣痛または分娩に伴う合併症、および分娩後障害をもたらす疾患または障害を含むが、これらに限定されない。

【０７８６】

生殖器系障害および／または疾患は、精巣萎縮、精巣性女性化、潜伏精巣（片側性および両側性）、無睾丸症、異所性精巣、精巣上体炎および精巣炎（典型的に、例えば、淋病、おたふく風邪、結核症および梅毒のごとき感染から生じる）を含む精巣の疾患および／または障害、睾丸捻転、結節性精管炎、生殖細胞腫瘍（例えば、精上皮腫、胚性細胞癌腫、奇形癌、絨毛癌腫、卵黄嚢腫瘍および奇形腫）、間質性腫瘍（例えば、ライディッヒ細胞腫瘍）、睾丸瘤、血瘤、精索静脈瘤、精液瘤、鼠径ヘルニアおよび精子産生の障害（例えば、線毛不動症候群、無精液症、精子無力症、無精子症、精子減少症および奇形無精子症）を包含する。

【０７８７】

生殖器系障害は、前立腺腺の障害、例えば、急性非細菌性前立腺炎、慢性非細菌性前立腺炎、急性細菌性前立腺炎、慢性細菌性前立腺炎、前立腺失調症、前立腺炎、肉芽腫性前立腺炎、マラコプラキア、良性前立腺肥大または過形成、ならびに腺癌腫、遷移性細胞癌腫、脈管癌腫および扁平上皮細胞癌腫を含む
前立腺腫瘍性障害も包含する。

【０７８８】

さらに、本発明の組成物は、炎症性疾患、例えば、亀頭包皮炎、閉塞性乾燥性亀頭炎、包茎、嵌頓包茎、梅毒、単純ヘルペスウイルス、淋病、非淋菌性尿道炎クラミジア、マイコプラズマ、トリコモナス、ＨＩＶ、ＡＩＤＳ、ライター症候群、尖圭コンジローム、扁平コンジロームおよび真珠様陰茎小丘疹；尿道異常、例えば、尿道下裂、尿道上裂、および包茎；ケイラー赤色肥厚症、ボーエン病、ボーエン様丘疹症、ブシュケーレーベンシュタインの巨大コンジロームおよびいぼ状癌腫を含む前癌性病変；扁平上皮細胞癌腫、インサイツの癌腫、疣状癌腫および播種性陰茎癌腫を含む、陰茎癌；陰茎尿道癌腫、尿道球膜癌腫および前立腺尿道性癌腫を含む、尿道性腫瘍性障害；および勃起障害、例えば、持続勃起症、ペイロニー病、勃起機能障害およびインポテンツを含む、ペニスおよび尿道の障害または疾患の診断、処置および／または予防において有用であってもよい。

【０７８９】

さらに、輸精管の疾患および／または障害は、脈管炎およびＣＢＡＶＤ（先天性両側性精管欠如症）を含み；さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、包虫症、先天的塩素下痢およびポリ嚢胞腎臓疾患を含む、精嚢の疾患および／または障害の診断、処置および／または予防において用いられてもよい。

【０７９０】

男性生殖器系の他の障害および／または疾患は、例えば、クラインフェルター症候群、ヤング症候群、早漏、真性糖尿病、嚢胞性線維症、カルタゲナー症候群、高熱、多発性硬化症および女性化乳房を含む。

【０７９１】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、細菌性膣炎、カンジダ膣炎、単純ヘルペスウイルス、軟性下疳、鼠径部肉芽腫、鼠径リンパ肉芽腫、疥癬、ヒトパピローマウイルス、膣外傷、外陰外傷、腺症、クラミジア膣炎、淋病、トリコモナス膣炎、尖圭コンジローム、梅毒、伝染性軟属腫、萎縮性膣炎、パジェット病、萎縮性硬化症、扁平苔癬、外陰痛、毒素ショック症候群、膣痙、外陰膣炎、外陰膣前庭炎、ならびに腫瘍性障害、例えば、扁

平上皮細胞過形成、明細胞癌腫、基底細胞癌腫、メラノーマ、バルトリン腺癌および外陰上皮内異常増殖を含む、膣および外陰部の疾患および／または障害の診断、処置および／または予防において有用であってもよい。

【０７９２】

子宮の障害および／または疾患は、月経困難症、後傾子宮、子宮内膜症、子宮筋腫、腺筋症、無排卵性出血、無月経、クッシング症候群、胞状奇胎、アッシャーマン症候群、早発閉経、性的早熟、子宮ポリープ、機能不全性子宮出血（例えば、異常なホルモンシグナルに起因する）、および腫瘍性障害、例えば、腺癌腫、平滑筋肉腫および肉腫を含む。さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、先天的子宮異常、例えば、双角子宮、中隔子宮、単純単角子宮、非空洞性不完全発育の角を有する単角子宮、非伝達性空洞性不完全発育の角を有する単角子宮、伝達性空洞性角を有する単角子宮、弓状子宮、完全重複子宮およびＴ型子宮の診断、処置および／または予防におけるマーカーまたは検出器として有用であってもよい。

【０７９３】

卵巣疾患および／または障害は、無排卵、ポリ嚢胞卵巣症候群（スタイン・レーベンタール症候群）、卵巣嚢胞、卵巣機能低下、ゴナドトロピンへの卵巣非感受性、アンドロゲンの卵巣過剰産生、右卵巣静脈症候群、無月経、多毛症および卵巣癌（原発性および二次性癌成長、セルトリーライディッヒ腫瘍、卵巣の類子宮内膜癌腫、卵巣乳頭漿膜腺癌腫、卵巣粘液腺癌腫および卵巣クルケンベルグ腫瘍を含むが、これらに限定されない）を含む。

【０７９４】

子宮頸疾患および／または障害は、子宮頸管炎、慢性子宮頸管炎、粘液膿性子宮頸管炎、子宮頸異形成症、子宮頸ポリープ、ナボット嚢胞、子宮膣部びらん、子宮膣部不全および子宮頸部新生物（例えば、子宮頸癌腫、扁平上皮化生、扁平上皮細胞癌腫、腺扁平上皮細胞異常増殖および円柱状細胞異常増殖を含む）を含む。

【０７９５】

さらに、生殖器系の疾患および／または障害は、流産および死産、例えば、早期の中絶、後期の中絶、自然流産、誘発流産、治療的流産、切迫流産、稽留流産、不全流産、完全流産、習慣流産、稽留流産および敗血症流産；異所性妊娠、貧血、Ｒｈ不適合、妊娠中の膣内出血、妊娠性糖尿病、子宮内成長遅延、羊水過多症、ＨＥＬＬＰ症候群、胎盤早期剥離、前置胎盤、妊娠悪阻、子癇前症、子癇、妊娠性ヘルペスおよび妊娠性じんま疹を含む、妊娠の障害および／または疾患を包含する。さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、心臓疾患、心臓障害、リウマチ性心臓疾患、先天的心臓疾患、僧帽弁逸脱、高血圧、貧血、腎臓疾患、感染症（例えば、風疹、サイトメガロウイルス、トキソプラズマ症、感染性Ｃ型肝炎、クラミジア、ＨＩＶ、Ａ１ＬＪおよび陰部ヘルペス）、真性糖尿病、グレーブス病、甲状腺炎、甲状腺機能低下症、橋本甲状腺炎、慢性活動性Ｃ型肝炎、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、喘息、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、重症筋無力症、特発性血小板減少性紫斑病、虫垂炎、卵巣嚢胞、胆嚢障害および腸閉塞を含む妊娠を困難にし得る疾患の診断、処置および／または予防において用いられてもよい。

【０７９６】

陣痛および分娩に関連する合併症は、膜の早期破裂、早期陣痛、過期妊娠、過熟妊娠症、進行が遅すぎる陣痛、胎児仮死（例えば、異常な心拍数（胎児または母体）、呼吸困難および異常な胎児位置）、肩甲難産、臍帯脱出、羊水塞栓症および異常な子宮出血を含む。

【０７９７】

さらに、出産後期間の疾患および／または障害は、子宮内膜炎、子宮筋層炎、子宮傍結合組織炎、腹膜炎、骨盤内血栓性静脈炎、肺塞栓症、内毒素血症、腎盂腎炎、伏在静脈静脈血栓症、乳腺炎、膀胱炎、分娩後出血および子宮反転症を含む。

【０７９８】
本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより診断、処置および／または予防されてもよい女性生殖器系の他の障害および／または疾患は、例えば、ターナー症候群、仮性半陰陽、月経前症候群、骨盤内炎症性疾患、骨盤うっ血（血管拡張）、不感症、無オルガスム症、性交疼痛症、卵管破裂および月経中期の排卵に伴う下腹部の違和感や痛み（Ｍｉｔｔｅｌｓｃｈｍｅｒｚ）を含む。
【０７９９】
感染症
本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、感染物質を処置または検出するために用いられ得る。例えば、免疫応答を増大させる、特に、Ｂおよび／またはＴ細胞の増殖および分化を増大させることにより、感染症は処置されてもよい。免疫応答は、存在する免疫応答を高めるか、または新しい免疫応答を開始させるかのいずれかにより、増大されてもよい。別法では、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、免疫応答を必ずしも導くことなく、感染物質を直接的に阻害してもよい。
【０８００】
ウイルスは、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより処置または検出され得る疾患または徴候を惹起し得る感染物質の一例である。ウイルスの例は、を含むが、これらに限定されない。ウイルスの例は、以下のＤＮＡおよびＲＮＡウイルスおよびウイルスファミリーを含むがこれらに限定されないウイルスの例を含むが、これらに限定されない：アルボウイルス、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アルテリ・ウイルス、ビルナ・ウイルス科、ブニヤウイルス科、カルシ・ウイルス科、サーコウイルス科、コロナウイルス科、デング、ＥＢＶ、ＨＩＶ、フラビ・ウイルス科、ヘパドナ・ウイルス科（肝炎）、ヘルペス・ウイルス科（例えば、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス、帯状疱疹）、モノネガウイルス（例えば、パラミクソウイルス科、麻疹ウイルス属、ラブドウイルス科）、オルトミクソ・ウイルス科（例えば、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎およびパラインフルエンザ）、パピローマウイルス、パポバウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナ・ウイルス科、ポックスウイルス科（例えば、天然痘または牛痘）、レオウイルス科（例えば、ロタウイルス）、レトロウイルス科（ＨＴＬＶ－Ｉ、ＨＴＬＶ－１１、レンチウイルス）およびトガウイルス科（例えば、ルビ・ウイルス属）。これらのファミリー内にあるウイルスは、関節炎、細気管支炎、呼吸器合胞体ウイルス、脳炎、眼感染（例えば、結膜炎、角膜炎）、慢性疲労症候群、肝炎（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｅ、慢性活動性、デルタ）、Ｂ型日本脳炎、フニン、チクングンヤ熱、リフトバレー熱、黄熱病、髄膜炎、日和見感染（例えば、ＡＩＤＳ）、肺炎、バーキットリンパ腫、水痘、出血性熱、はしか、おたふく風邪、パラインフルエンザ、狂犬病、一般的な風邪、ポリオ、白血病、風疹、性感染疾患、皮膚疾患（例えば、カポジ肉腫、いぼ）およびウイルス血症を含むがこれらに限定されない、様々な疾患または徴候を惹起する。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、任意のこれらの徴候または疾患を処置または検出するために用いられ得る。特定の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、髄膜炎、デング熱、ＥＢＶ、および／または肝炎（例えば、Ｂ型肝炎）を処置するために用いられる。さらなる特定の一の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、１またはそれ以上の他の市販の肝炎ワクチンに反応しない患者を処置するために用いられる。さらに特定の一の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ＡＩＤを処置するために用いられる。
【０８０１】
同様に、疾患または徴候を惹起し得、および本発明のアルブミン融合蛋白質および／ま

たは本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより処置または検出され得る細菌および真菌剤は、以下のグラム陰性およびグラム陽性細菌、細菌ファミリー、および菌類：アクチノミセス（例えば、放射菌（Ｎｏｒｃａｒｄｉａ））、アシネトバクター属、クリプトコッカスネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、アスペルギルス、バシラス科（例えば、炭疽菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｈｒａｓｉｓ））、バクテロイデス属（例えば、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｆｒｎｇｉｌｉｓ）、ブラストミセス症、ボルデテラ、Ｂｏｒｒｅｌｉａ（例えば、ライム病菌（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ））、ブルセラ菌、カンジダ、カンピロバクター、クラミジア、クロストリジウム属（例えば、ボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）、クロストリジウム・ディフィシレ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｃｉｌｅ）、クロストリジウム・パーフリンジェンス（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍｔｅｔａｎｉ）、コクシジオイデス属、コリネバクテリウム属（例えば、ジフテリア菌毒素（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｅｐｔｈｅｒｉａｅ））クリプトコッカス、Ｄｅｒｍａｔｏｃｙｃｏｓｅｓ、大腸菌（例えば、Ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｇｅｎｉｃ Ｅ．ｃｏｌｉおよびＥｎｔｅｒｏｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ Ｅ．ｃｏｌｉ）、エンテロバクター属（例えば、エンセロバクター・エロゲネス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ａｅｒｏｇｅｎｅｓ））、腸内細菌科（クレブシエラ、サルモネラ（例えば、サルモネラ菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ）、ゲルトネル菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ）、サルモネラ菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ））、セラシア属、エルシニア属、シゲラ）、エリジペロスリックス属、ヘモフィルス（例えば、Ｂ型ヘモフィルスインフルエンザ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ））、ヘリコバクター属、レジオネラ（例えば、レジオネラニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ））、レプトスピラ属、リステリア（例えば、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ））、マイコプラズマ、マイコバクテリウム属（例えば、ハンセン菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ）およびヒト結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ））、ビブリオ（例えば、ビブリオコレラ（Ｖｉｖｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）、ナイセリア科（例えば、淋菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｅａ）、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｌｉｄｉｓ））、パスツレラ属、プロテウス属、シュードモナス（例えば、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｎｕｇｉｎｏｓａ））リケッチア科、スピロヘータ（例えば、トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｓｐｐ）．、レプトスピラ（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｓｐｐ．）、ボレリア（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｓｐｐ．））、赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｐｐ．）、ブドウ球菌（例えば、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ））、髄膜炎菌（Ｍｅｎｉｎｇｉｏｃｏｃｃｕｓ）、肺炎球菌（Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ）および連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）（例えば、肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）およびＡ、Ｂ、およびＣ群の連鎖球菌）、およびウレアプラズマ属を含むが、これらに限定されない。これらの細菌、寄生虫および真菌ファミリーは、抗生物質耐性感染、菌血症、心内膜炎、敗血症、眼感染（例えば、結膜炎）、ブドウ膜炎、結核症、歯肉炎、細菌下痢、日和見感染（例えば、ＡＩＤＳ関連感染）、爪周囲炎、プロテーゼ関連感染、虫歯、ライター疾患、気道感染、例えば、百日咳または蓄膿症、敗血症、ライム病、猫引っかき病、赤痢、パラチフス熱、食中毒、レジオネラ疾患、慢性および急性炎症、紅斑、酵母感染、腸チフス、肺炎、淋病、髄膜炎（例えば、ＡおよびＢ型髄膜炎）、クラミジア、梅毒、ジフテリア、ハンセン病、ブルセラ症、消化性潰瘍、炭疽菌、自然流産、出生異常、肺炎、肺感染、耳感染、難聴、失明、無気力、不快感、嘔吐、慢性下痢、クローン病、結腸炎、膣炎、不妊、骨盤内炎症性疾患、カンジダ症、パラ結核、結核症、ループス、ボツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿痂疹、リウマチ熱、猩紅熱、性感染疾患、皮膚疾患（例えば、蜂巣炎、皮膚嚢腫）、毒血症、尿道感染、創傷感染、院内感染を含むがこれらに限定されない、疾患または徴候を惹起し得る。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリ

ヌクレオチド、任意のこれらの徴候または疾患を処置または検出するために用いられ得る。特定の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、破傷風、ジフテリア、ボツリヌス中毒、および／またはＢ型髄膜炎を処置するために用いられる。

【０８０２】

さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドにより処置、予防および／または診断され得る疾患または徴候を惹起する寄生虫剤は、以下のファミリーまたはクラス：アメーバ症、バベシア症、コクシジウム症、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症、嚢疫、外部寄生虫、ランブル鞭毛虫症、蠕虫病、リーシュマニア症、住血吸虫、タイレリア症、トキソプラズマ症、トリパノソーマ症、およびトリコモナスおよび胞子虫（例えば、三日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｒａｘ）、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｉｕｍ）、四日熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅ）および卵形マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ））を含むが、これらに限定されない。これらの寄生虫は、疥癬、ツツガムシ病、眼感染、腸疾患（例えば、赤痢、ランブル鞭毛虫症）、肝臓疾患、肺疾患、日和見感染（例えば、ＡＩＤＳに関連する）、マラリア、妊娠合併症およびトキソプラズマ症を含むがこれらに限定されない、様々な疾患または徴候を惹起し得る。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、任意のこれらの徴候または疾患を処置、予防および／または診断するために用いられ得る。特定の実施態様において、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、マラリアを処置、予防および／または診断するために用いられる。

【０８０３】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、有効量の本発明のアルブミン融合蛋白質を患者に投与するか、または患者から細胞を取り出し、その細胞へ本発明のポリヌクレオチドを与え、次いで操作した細胞を患者へ戻す（エキソビボ療法）。さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、感染症に対抗する免疫応答を惹起するために、ワクチン中の抗原として用いることができる。

【０８０４】

再生

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、細胞を分化、増殖および誘引させ、組織の再生をもたらすことができる（Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７６：５９－８７（１９９７）を参照のこと）。組織の再生は、先天的欠損、外傷（創傷、火傷、切断、または潰瘍）、年齢、疾患（例えば、骨粗しょう症、骨関節炎、歯周病、肝臓障害）、美容形成術を含む手術、繊維症、再灌流傷害または全身サイトカイン損傷による組織損傷を修復、置換または保護するために用いることができる。

【０８０５】

本発明を用いて再生され得る組織は、器官（例えば、膵臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮）、筋肉（平滑筋、骨格筋または心筋）、脈管構造（血管およびリンパ管を含む）、神経、造血、および骨格（骨、軟骨、腱および靭帯）組織を含む。好ましくは、瘢痕化を伴わずに、または僅かな瘢痕化を伴って、再生が生じる。再生は血管新生も含んでもよい。

【０８０６】

さらに、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、治癒困難な組織の再生を増大してもよい。例えば、腱／靭帯の再生増大は、損傷後の回復時間を短くし得る。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、損傷を回避するために予防的にも用いられ得る。処置され得る特定の疾患は、腱炎、手根管症候群および他の腱または靭帯欠陥を含む。治癒しない創傷の組織再生のさらなる一例は、床擦れ、血管不

全、手術および外傷性創傷に関連する潰瘍を含む。

【０８０７】

同様に、神経および脳組織も、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、神経細胞を増殖および分化させることにより、再生され得る。この方法を用いて処置され得る疾患は、中枢および末梢神経系疾患、ニューロパシー、または機械的および外傷性障害（例えば、脊髄障害、頭部外傷、脳血管疾患および脳卒中）を含む。特に、末梢神経傷害、末梢ニューロパシー（例えば、化学療法または他の療法から生じる）、限局性ニューロパシー、および中枢神経系疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、およびシャイ・ドレーガー症候群）に関連する疾患は全て、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて処置され得る。

【０８０８】

胃腸障害

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、炎症性疾患および／または状態、感染、癌（例えば、腸新生物（小腸のカルチノイド腫瘍、小腸の非ホジキンリンパ腫、小腸リンパ腫））および潰瘍、例えば、消化性潰瘍を含む胃腸疾患を処置、予防、診断、および／または予後するために用いられてもよい。

【０８０９】

胃腸疾患は、嚥下障害、嚥下痛、食道の炎症、消化性食道炎、胃逆流、粘膜下繊維症および狭窄、マロリー・ワイス病変、平滑筋腫、脂肪腫、表皮癌、腺癌、胃滞留障害、胃腸炎、胃萎縮、胃／胃癌、胃ポリープ、自己免疫疾患、例えば、悪性貧血、幽門狭窄、胃炎（細菌、ウイルス、好酸球性、ストレスに誘導される、慢性浸食性、萎縮性、血漿細胞、およびメネトリエ病）および腹膜疾患（例えば、乳び腹膜、血管腹膜、腸間膜嚢胞、腸間膜リンパ節炎、腸間膜血管閉塞、脂肪織炎、新生物、腹膜炎、気腹、横隔膜下腫瘍）を含む。

【０８１０】

胃腸疾患は、小腸に関連する障害、例えば、吸収不良症候群、膨張、過敏性腸症候群、糖不耐症、セリアック病、十二指腸潰瘍、十二指腸炎、熱帯性スプルー、ウィップル病、腸リンパ管拡張症、クローン病、虫垂炎、回腸の閉塞、メッケル憩室症、多発性憩室症、小腸および大腸の完全回転障害、リンパ腫ならびに細菌および寄生虫疾患（例えば、旅行者の下痢、腸チフスおよびパラチフス、コレラ、回虫（Ａｓｃａｒｉａｓｉｓ ｌｕｍｂｒｉｃｏｉｄｅｓ）、鉤虫（Ａｎｃｙｌｏｓｔｏｍａ ｄｕｏｄｅｎａｌｅ）、線虫（Ｅｎｔｅｒｏｂｉｕｓ ｖｅｒｍｉｃｕｌａｒｉｓ）、サナダムシ（Ｔａｅｎｉａ ｓａｇｉｎａｔａ，Ｅｃｈｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｇｒａｎｕｌｏｓｕｓ，Ｄｉｐｈｙｌｌｏｂｏｔｈｒｉｕｍ ｓｐｐ．およびＴ．ｓｏｌｉｕｍ）による感染も含む。

【０８１１】

肝臓疾患および／または障害は、肝内胆汁うっ滞（アラジール症候群、胆汁性肝硬変）、脂肪肝（アルコール性脂肪肝、ライ症候群）、肝静脈血栓症、肝レンズ核変性症、肝腫大、肝肺症候群、肝腎症候群、門脈圧亢進症（食道および胃静脈瘤）、肝臓化膿巣（アメーバ性肝臓化膿巣）、肝硬変（アルコール性、胆汁性および実験的）、アルコール性臓疾患（脂肪肝、Ｃ型肝炎、肝硬変）、寄生虫（肝包虫症、肝蛭症、アメーバ性肝臓化膿巣）、黄疸（溶血性、肝細胞性および胆汁うっ滞性）、胆汁うっ滞性、門脈圧亢進症、肝拡大、腹水、肝炎（アルコール性肝炎、動物肝炎、慢性肝炎（自己免疫、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、Ｄ型肝炎、薬剤に誘導される）、毒性肝炎、ウイルスヒト肝炎（Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、Ｄ型肝炎、Ｅ型肝炎）、ウィルソン病、肉芽腫性肝炎、二次性胆汁性肝硬変、肝脳症、門脈圧亢進症、静脈瘤、肝脳症、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、肝細胞腺腫、血管腫、胆石、肝臓障害（肝脳症、急性肝臓障害）および肝臓新生物（血管筋脂肪腫、石灰化肝臓転移、嚢胞肝臓転移、上皮腫瘍、繊維性層状肝細胞癌、限局性結節性

過形成、肝腺腫、肝胆汁性嚢胞腺腫、肝芽細胞腫、肝細胞癌腫、肝細胞腫、肝臓癌、肝臓血管内皮腫、間葉性過誤腫、肝臓の間葉性腫瘍、結節性再生式過形成、良性肝臓腫瘍（肝嚢胞［単一の嚢胞、多数の嚢胞の肝臓疾患、肝胆汁性嚢胞腺腫、総胆管嚢胞］、間葉性腫瘍［間葉性過誤腫、幼児性血管内皮腫、血管腫、肝臓性紫斑病、脂肪腫、炎症性偽腫瘍、混合型］、上皮腫瘍［胆管上皮（胆管過誤腫、胆管腺腫）、肝細胞（腺腫、限局性結節性過形成、結節性再生式過形成）］、悪性肝臓腫瘍［肝細胞、肝芽細胞腫、肝細胞癌腫、胆管細胞、胆管癌腫、嚢胞腺癌腫、血管の腫瘍、血管肉腫、カポジ肉腫、血管内皮腫、他の腫瘍、胚性肉腫、線維肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、癌肉腫、奇形腫、カルチノイド、扁平上皮癌腫、原発性リンパ腫］）、肝臓性紫斑病、赤血球性肝性ポルフィリン症、肝性ポルフィリン症（急性間欠性ポルフィリン症、晩発性皮膚ポルフィリン症）、ツェルヴェーガー症候群）を含む。

【０８１２】

膵臓疾患および／または障害は、急性膵炎、慢性膵炎（急性壊死性膵炎、アルコール性膵炎）、新生物（膵臓の腺癌腫、嚢胞腺癌腫、インスリノーマ、ガストリノーマおよびグルカゴノーマ、嚢胞新生物、島－細胞腫瘍、パンクレオブラストーマ）および他の膵臓疾患（例えば、嚢胞性線維症、嚢胞（膵臓偽嚢胞、膵臓瘻、不全））を含む。

【０８１３】

胆嚢疾患は、胆石（胆石症および総胆管結石症）、胆嚢摘出後症候群、胆嚢の憩室症、急性胆嚢炎、慢性胆嚢炎、胆管腫瘍および粘液嚢胞を含む。

【０８１４】

大腸の疾患および／または障害は、抗生物質に関連する結腸炎、憩室炎、潰瘍性結腸炎、後天的巨大結腸、膿瘍、真菌および細菌感染、肛門直腸障害（例えば、亀裂、痔核）、大腸疾患（結腸炎、大腸新生物［大腸癌、腺腫性大腸ポリープ（例えば、絨毛状腺腫）、大腸癌腫、直腸結腸癌］、大腸憩室炎、大腸憩室症、巨大結腸［ヒルシュスプリング病、毒性巨大結腸］；Ｓ字結腸疾患［直腸結腸炎、Ｓ字結腸新生物］）、便秘、クローン病、下痢（幼児性下痢、赤痢）、十二指腸疾患（十二指腸新生物、十二指腸閉塞、十二指腸潰瘍、十二指腸炎）、腸炎（全腸炎）、ＦＩＮ腸疾患、回腸疾患（回腸新生物、回腸炎）、免疫増殖性小腸疾患、炎症性腸疾患（潰瘍性結腸炎、クローン病）、腸閉鎖症、寄生虫疾患（アニサキス症、バランチジウム症、ブラストシスティス感染、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症、アメーバ性赤痢、ランブル鞭毛虫症）、腸瘻（直腸瘻）、腸新生物（盲腸新生物、大腸新生物、十二指腸新生物、回腸新生物、腸ポリープ、空腸新生物、直腸新生物）、腸閉塞（輸入脚症候群、十二指腸閉塞、埋伏糞便、腸偽－閉塞直腸ヘルニア）、消化性潰瘍（十二指腸潰瘍、消化性食道炎、出血、穿孔、胃潰瘍、ゾリンジャー－エリソン症候群）、胃切除後症候群（ダンピング症候群）、胃疾患（例えば、無酸症、十二指腸胃逆流（胆汁逆流）、胃腔血管拡張症、胃瘻、胃の出口閉塞、胃炎（萎縮性または肥大性）、胃不全麻痺、胃膨張、胃憩室、胃新生物（胃癌、胃ポリープ、胃腺癌腫、過形成性胃ポリープ）、胃破裂、胃潰瘍、胃腸軸捻）、結核症、内臓下垂症、嘔吐（例えば、吐血、妊娠悪阻、術後悪心および嘔吐）および出血性結腸炎を含む。

【０８１５】

胃腸系のさらなる疾患および／または障害は、胆管疾患、例えば、胃壁破裂、瘻（例えば、胆汁性瘻、食道瘻、胃瘻、腸瘻、膵臓瘻）、新生物（例えば、胆管新生物、食道新生物、例えば、食道の腺癌腫、食道扁平上皮細胞癌腫、胃腸新生物、膵臓新生物、例えば、膵臓の腺癌腫、膵臓の粘液嚢胞新生物、膵臓嚢胞新生物、膵芽腫および腹膜新生物）、食道疾患（例えば、水疱性疾患、カンジダ症、糖原性表皮肥厚、潰瘍化、バレット食道静脈瘤、閉鎖症、嚢胞、憩室（例えば、ツェンカー憩室）、瘻（例えば、気管食道瘻）、運動障害（例えば、ＣＲＥＳＴ症候群、嚥下障害、アカラシア、けいれん、胃食道逆流）、新生物、穿孔（例えば、ブールハーフェ症候群、マロリー・ワイス症候群）、狭窄、食道炎、横隔膜ヘルニア（例えば、裂孔ヘルニア）；胃腸疾患、例えば、胃腸炎（例えば、コレラ病、ノーウォークウイルス感染）、出血（例えば、吐血、メレナ、消化性潰瘍出血）、胃新生物（胃癌、胃ポリープ、胃腺癌腫、胃癌））、ヘルニア（例えば、先天的横隔膜ヘ

ルニア、大腿ヘルニア、鼠径部ヘルニア、閉塞筋ヘルニア、へそヘルニア、腹壁ヘルニア）、および腸疾患（例えば、盲腸疾患（虫垂炎、盲腸新生物））を含む。

【０８１６】

走化性

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、走化性活性を有してもよい。走化性分子は、炎症、感染または増殖過剰部位のごとき体内の特定部位へ、細胞（例えば、単球、線維芽、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）を誘引または動員する。次いで、動員された細胞は、特定の外傷または異常を撃退および／または治癒し得る。

【０８１７】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、特定の細胞の走化性活性を増大してもよい。次いで、これらの走化性分子は、体内の特定位置へ標的化される細胞の数を増大させることにより、炎症、感染、過増殖性疾患または任意の免疫系障害を処置するために用いられ得る。例えば、走化性分子は、免疫細胞を損傷位置へ誘導することにより、組織の創傷および他の外傷を処置するために用いることができる。本発明の走化性分子は、創傷を処置するために用いることができる線維芽を誘引することもできる。

【０８１８】

本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、走化性活性を阻害してもよいことも熟慮される。これらの分子は、障害を処置するためにも用いられ得る。故に、本発明の融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、走化性の阻害剤として用いられ得る。

【０８１９】

結合活性

本発明のアルブミン融合蛋白質は、融合蛋白質の治療用蛋白質部分に結合する分子か、または融合蛋白質の治療用蛋白質部分が結合する分子についてスクリーニングするために用いられてもよい。融合蛋白質と分子の結合は、融合蛋白質または分子の結合活性を活性化（アゴニスト）、増大、阻害（アンタゴニスト）または減少してもよい。かかる分子の例は、抗体、オリゴヌクレオチド、蛋白質（例えば、受容体）または小分子を含む。

【０８２０】

好ましくは、分子は、本発明の融合蛋白質の治療用蛋白質部分の天然リガンド、例えば、リガンドの断片または天然の基質、リガンド、構造または機能模倣物に密接に関連している（Ｃｏｌｉｇａｎら．、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１（２）：Ｃｈａｐｔｅｒ　５（１９９１）を参照のこと）。同様に、該分子は、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分が結合する天然の受容体、または本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分（例えば、活性部位）が結合できる少なくとも１つの受容体断片に密接に関連し得る。いずれの場合でも、該分子は、知られている技法を用いて合理的に設計され得る。

【０８２１】

好ましくは、これらの分子についてのスクリーニングは、本発明のアルブミン融合蛋白質を発現する適切な細胞の産生を含む。好ましい細胞は、哺乳類、酵母、ショウジョウバエまたは大腸菌に由来する細胞を含む。

【０８２２】

アッセイは、単純に、本発明のアルブミン融合蛋白質と候補化合物の結合を試験してもよく、ここで、該結合は標識によってか、または標識された競合物質との競合を含むアッセイにて検出される。さらに、アッセイは、候補化合物が、融合蛋白質との結合により生じるシグナルをもたらすか否かを試験してもよい。

【０８２３】

別法では、アッセイは、無細胞調製物、固体支持体に担持させた融合蛋白質／分子、化

学ライブラリーまたは天然産物混合物を用いて行われ得る。アッセイでは、単純に、候補化合物とアルブミン融合蛋白質を含有する溶液を混合する、融合蛋白質／分子の活性または結合を測定する、および融合蛋白質／分子の活性または結合を基準と比較するという段階を含んでもよい。

【０８２４】

好ましくは、ＥＬＩＳＡアッセイは、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて、試料（例えば、生体試料）中の融合蛋白質のレベルまたは活性を測定できる。抗体は、アルブミン融合蛋白質へ直接または間接的に結合させるか、または基質に関してアルブミン融合蛋白質と競合させることにより、融合蛋白質のレベルまたは活性を測定することができる。

【０８２５】

さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分が結合する受容体は、当業者に知られている様々な方法、例えば、リガンドパニングおよびＦＡＣＳソーティング（Ｃｏｌｉｇａｎ，ら．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎ．，１（２），Ｃｈａｐｔｅｒ ５，（１９９１））により同定され得る。例えば、融合蛋白質の治療用蛋白質部分がＦＧＦに対応する場合、発現クローニングが行われてもよく、ここで、ポリアデニル化されたＲＮＡは、アルブミン融合蛋白質に応答する細胞、例えば、ＦＧＦファミリー蛋白質について複数の受容体を含むことが知られているＮＩＨ３Ｔ３細胞およびＳＣ－３細胞から調製し、そして、このＲＮＡから作製したｃＤＮＡライブラリーをプールに分割し、次いで、ＣＯＳ細胞またはアルブミン融合蛋白質に応答しない他の細胞をトランスフェクションするために用いる。ガラススライド上で成長させたトランスフェクション細胞を、それらを標識した後に、本発明のアルブミン融合蛋白質に曝す。アルブミン融合蛋白質は、ヨウ素化または部位特異的な蛋白質キナーゼの認識部位の組み込みを含む、様々な手段により標識され得る。

【０８２６】

固定化およびインキュベーションの後、スライドを、オートラジオグラフィー分析に付した。陽性プールを同定し、およびサブプールを調製し、次いで、サブプールの調製および再スクリーニングの過程を繰り返して再度トランスフェクションし、最終的に、推定受容体をコードする単一クローンを産生する。

【０８２７】

受容体同定のための代替アプローチとして、標識されたアルブミン融合蛋白質を、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質成分の受容体分子を発現する細胞膜または抽出調製物に光親和性結合させてもよく、結合した物質をＰＡＧＥ分析により分解し、次いで、Ｘ線フィルムに露光させてもよい。融合蛋白質の受容体を含む標識された複合体を切り出して、ペプチド断片へ分解し、次いで、蛋白質マイクロシークエンスを行うことができる。マイクロシークエンスから得られたアミノ酸配列を用いて、縮重したオリゴヌクレオチドのプローブのセットを設計し、ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングして、推定受容体をコードする遺伝子を同定することができる。

【０８２８】

さらに、遺伝子－シャフリング、モチーフ－シャフリング、エキソン－シャフリングおよび／またはコドン－シャフリング（「ＤＮＡシャフリング」と総称される）の技法を用いて、融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分またはアルブミン成分の活性を調節し、それにより、本発明のアルブミン融合蛋白質のアゴニストおよびアンタゴニストを効果的に産生させもよい。一般的に、米国特許第５，６０５，７９３号、第５，８１１，２３８号、第５，８３０，７２１号、第５，８３４，２５２号および第５，８３７，４５８号、およびＰａｔｔｅｎ，Ｐ．Ａ．，ら．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：７２４－３３（１９９７）；Ｈａｒａｙａｍａ，Ｓ．ＴｒｅｎｄｓＢｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６（２）：７６－８２（１９９８）；Ｈａｎｓｓｏｎ，Ｌ．Ｏ．，ら．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８７：２６５－７６（１９９９）；およびＬｏｒｅｎｚｏ，Ｍ．Ｍ．およびＢｌａｓｃｏ，Ｒ．ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌ

ｏｇｙ２４（２）：３０８－１３（１９９８）を参照のこと。これらの特許および刊行物のそれぞれは出典明示により本明細書の一部となる）。一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドおよび故にそれによりコードされるアルブミン融合蛋白質の改変は、ＤＮＡシャフリングにより成し遂げられてもよい。ＤＮＡシャフリングは、相同または部位特異的組換えにより、２またはそれ以上のＤＮＡセグメントを所望の分子中へ組み込むことを含む。別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドおよび故にそれによりコードされるアルブミン融合蛋白質は、組換え前に、誤りがちなＰＣＲ、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によって、ランダム突然変異誘発に付されることにより、改変されてもよい。別の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質の１またはそれ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片などは、１またはそれ以上の異種分子の１またはそれ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片などと組み換えられてもよい。好ましい実施態様において、非相同分子は、ファミリーメンバーである。さらなる好ましい実施態様において、非相同分子は、成長因子、例えば、血小板に由来する成長因子（ＰＤＧＦ）、インスリン様成長因子（ＩＧＦ－Ｉ）、トランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）－アルファ、上皮成長因子（ＥＧＦ）、線維芽成長因子（ＦＧＦ）、ＴＧＦ－ベータ、骨形成蛋白質（ＢＭＰ）－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－７、アクチビンＡおよびＢ、デカペンタプレジック（ｄｐｐ）、６０Ａ、ＯＰ－２、ドルサリン（ｄｏｒｓａｌｉｎ）、成長分化因子（ＧＤＦｓ）、ノーダル（ｎｏｄａｌ）、ＭＩＳ、インヒビン－アルファ、ＴＧＦ－ｂら、ＴＧＦ－ベータ２、ＴＧＦ－ベータ３、ＴＧＦ－ベータ５およびグリアに由来する神経栄養因子（ＧＤＮＦ）である。

【０８２９】

他の好ましい断片は、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分および／またはアルブミン成分の生物活性のある断片である。生物活性のある断片は、本発明のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分および／またはアルブミン成分の活性と同一である必要はないが類似する活性を示すものである。断片の生物活性は、所望の活性の増大または所望でない活性の減少を含んでもよい。

【０８３０】

さらに、本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質の作用を調節するものを同定するための化合物をスクリーニングする方法を提供する。かかるアッセイの例は、線維芽細胞が正常に増殖し得る細胞培養条件下にて、哺乳類の線維芽細胞、本発明のアルブミン融合蛋白質およびスクリーニングしようとする化合物および^{3}［Ｈ］チミジンを合わせることを含む。対照アッセイを、スクリーニングされるべき化合物の不在にて行い、次いで、化合物の存在下における線維芽増殖の量と比較し、各場合における^{3}［Ｈ］チミジンの取り込みを測定することにより、化合物が増殖を刺激するか否かを決定してもよい。線維芽細胞増殖の量は、^{3}［Ｈ］チミジンの取り込みを測定する液体シンチレーションクロマトグラフィーにより測定される。アゴニストおよびアンタゴニスト化合物は共にこの方法により同定されてもよい。

【０８３１】

別の方法では、本発明の融合蛋白質の治療用蛋白質の受容体を発現する哺乳類細胞または膜調製物を、化合物の存在下にて、標識された本発明の融合蛋白質と一緒にインキュベーションする。次いで、この相互作用を亢進または遮断する化合物の能力を測定することができる。別法では、スクリーニングされた化合物と受容体の相互作用後、知られている第２のメッセンジャー系の応答を測定し、そして、受容体へ結合し、かつ第２のメッセンジャー応答を誘導する化合物の能力を測定し、化合物が潜在的な融合蛋白質であるか否かを決定する。かかる第２のメッセンジャー系は、ｃＡＭＰグアニル酸シクラーゼ、イオンチャネルまたはホスホイノシチド加水分解を含むが、これらに限定されない。

【０８３２】

これらの上記アッセイの全ては、診断または予後マーカーとして用いられ得る。これらのアッセイを用いて見出される分子は、融合蛋白質／分子を活性化または阻害することに

より、患者において疾患を処置するか、または特定の結果（例えば、血管成長）をもたらすために用いることができる。さらに、アッセイは、適切に操作された細胞または組織から、本発明のアルブミン融合蛋白質の産生を阻害または亢進し得る物質を見出すこともできる。

【０８３３】

それ故に、本発明は、（ａ）本発明のアルブミン融合蛋白質と一緒に候補結合化合物をインキュベーションし；次いで、（ｂ）結合が生じたかを決定する：工程を含む、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合する化合物の同定方法を包含する。さらに、本発明は、（ａ）本発明のアルブミン融合蛋白質と一緒に候補化合物をインキュベーションし、（ｂ）生物活性をアッセイし、次いで、（ｂ）融合蛋白質の生物活性が改変されたかを決定する：工程を含む、アゴニスト／アンタゴニストの同定方法を包含する。

【０８３４】

標的デリバリー

別の実施態様において、本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質の成分についての受容体を発現している標的細胞へ組成物を送達する方法を提供する。

【０８３５】

上記のように、本発明の融合蛋白質を、疎水性、親水性、イオン性および／または共有的相互作用を介して、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素またはプロドラッグと結合させてもよい。一の実施態様において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸に結合させた本発明の融合蛋白質（抗体を含む）を投与することにより、本発明の組成物を細胞へ特異的に送達させるための方法を提供する。一の実施例では、本発明は、標的細胞中へ治療用蛋白質を送達させるための方法を提供する。別の実施例では、本発明は、一本鎖核酸（例えば、アンチセンスまたはリボザイム）または二本鎖核酸（例えば、細胞のゲノムへ組み込まれるか、またはエピソームとして複製でき、および転写され得るＤＮＡ）を標的細胞中へ送達させるための方法を提供する。

【０８３６】

別の実施態様において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラッグと共に、本発明のアルブミン融合蛋白質（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の抗体）を投与することにより、細胞を特異的破壊（例えば、腫瘍細胞の破壊）するための方法を提供する。

【０８３７】

「毒素」により、内因性の細胞傷害エフェクター系に結合しおよびそれを活性化させる化合物、放射性同位元素、ホロ毒素、修飾された毒素、毒素の触媒サブユニット、或いは細胞内または細胞表面上に通常存在せず、所定の条件下にて細胞死を惹起する任意の分子または酵素が意味される。本発明の方法に従って用いられてもよい毒素は、当該技術分野において知られている放射性同位元素、例えば、固有または誘導された内因性細胞傷害エフェクター系に結合する抗体（またはその部分を含む補体結合）のごとき化合物、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、ＲＮＡｓｅ、アルファ毒素、リシン、アブリン、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓｅｘｏｔｏｘｉｎ）外毒素Ａ、ジフテリア毒素アポリン、モモルジン、ゲロニン、ヤマゴボウ抗ウイルス蛋白質、アルファ－サルシンおよびコレラ毒素を含むが、これらに限定されない。「細胞傷害性プロドラッグ」により、通常、細胞中に存在する酵素により、細胞傷害性化合物へ変換される無毒の化合物が意味される。本発明の方法に従って用いられてもよい細胞傷害性プロドラッグは、安息香酸マスタードアルキル化剤のグルタミル誘導体、エトポシドまたはマイトマイシンＣのホスフェート誘導体、サイトシンアラビノサイド、ダウノルビシンおよびドキソルビシンのフェノキシアセトアミド誘導体を含むが、これらに限定されない。

【０８３８】

薬剤スクリーニング

本発明のアルブミン融合蛋白質またはアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対応する蛋白質の活性を修飾する分子についてスクリーニングするための、本発明のアルブミ

ン融合蛋白質またはこれらの融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドの使用がさらに熟慮される。かかる方法は、アンタゴニストまたはアゴニスト活性を有すると考えられる一または複数の選択された化合物と融合蛋白質を接触させ、次いで、結合後の融合蛋白質の活性をアッセイすることを含み得る。

【０８３９】

本発明は、任意の様々な薬剤スクリーニング技法において、本発明のアルブミン融合蛋白質または結合その断片を用いることにより、治療用化合物をスクリーニングするために特に有用である。かかる試験にて用いられるアルブミン融合蛋白質は、固体支持体へ固定させてもよく、細胞表面上で発現させてもよく、溶液中に遊離してもよく、または細胞内に位置付けられてもよい。薬剤スクリーニングの一の方法は、アルブミン融合蛋白質を安定に発現している組換え核酸を用いて安定に形質転換された真核または原核宿主細胞を利用する。薬剤は、競合的結合アッセイにおいて、かかる形質転換細胞またはかかる細胞の培養から得られる上清に対して、スクリーニングされる。例えば、処置されるべき剤と本発明のアルブミン融合蛋白質の間の複合体の形成を測定してもよい。

【０８４０】

故に、本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質に仲介される活性に作用する薬剤または任意の他の剤についてスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、当該技術分野においてよく知られている方法により、本発明のアルブミン融合蛋白質またはその断片とかかる剤を接触させ、次いで、該剤とアルブミン融合蛋白質またはその断片の間の複合体の存在についてアッセイすることを含む。かかる競合的結合アッセイにおいて、スクリーニングのための剤は典型的に標識されている。インキュベーションの後、遊離の物質を、結合形態で存在しているものから分離し、そして、遊離型または複合体化されていない標識の量が、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合する特定の物質の能力の尺度となる。

【０８４１】

薬剤スクリーニングのための別の技法は、本発明のアルブミン融合蛋白質に対して適当な結合親和性を有する化合物についての、ハイスループットスクリーニングを提供し、および欧特許出願８４／０３５６４（１９８４年９月１３日公開）にて非常に詳細に記載されている。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。簡潔に言うと、大量の異なる小ペプチド試験化合物は、固体担体、例えば、プラスチックピンまたは何らかの表面上で合成される。ペプチド試験化合物を本発明のアルブミン融合蛋白質と反応させ、洗浄する。次いで、結合されたペプチドは、当該技術分野においてよく知られている方法により検出される。精製されたアルブミン融合蛋白質は、前記の薬剤スクリーニング技法において用いるために、プレート上に直接コーティングされてもよい。加えて、非中和抗体を用いて、ペプチドを捕捉し、およびそれを固体支持体上に固定してもよい。

【０８４２】

本発明は、競合的薬剤スクリーニングアッセイの使用も熟慮され、ここで、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合し得る中和抗体は、アルブミン融合蛋白質またはその断片に結合する試験化合物と特異的に競合する。この方法では、抗体は、本発明のアルブミン融合蛋白質と１またはそれ以上の抗原性エピトープを共有する任意のペプチドの存在を検出するために用いられる。

【０８４３】

結合ペプチドおよび他の分子

本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合するポリペプチドおよび非ポリペプチドを同定するためのスクリーニング方法ならびにそれにより同定される結合分子も包含する。これらの結合分子は、例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質のアゴニストおよびアンタゴニストとして有用である。かかるアゴニストおよびアンタゴニストは、以下に詳細に記載する治療的な実施態様において、本発明に従って用いることができる。

【０８４４】

この方法は、本発明のアルブミン融合蛋白質を複数の分子と接触させ；次いで、アルブ

ミン融合蛋白質に結合する分子を同定する；という工程を含む。

【０８４５】

本発明のアルブミン融合蛋白質と複数の分子と接触させる工程は、多数の様式で行われてもよい。例えば、アルブミン融合蛋白質を固体支持体上に固定化し、次いで、複数分子の溶液を固定化したポリペプチドと接触させることも熟慮されてよい。かかる方法は、アフィニティーマトリックスが固定化させた本発明のアルブミン融合蛋白質から構成される、アフィニティークロマトグラフィー法と同種であり得る。次いで、アルブミン融合蛋白質について選択親和性を有する分子は、アフィニティー選択により精製され得る。固体支持体の性質、アルブミン融合蛋白質と固体支持体の結合についての過程、溶媒およびアフィニティー分離または選択の条件は、概して慣用的であり、および当業者によく知られている。

【０８４６】

別法では、複数のポリペプチドを、個々のポリペプチドまたはそのサブセットを含むフラクションへ実質的に分離してもよい。例えば、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィーまたはポリペプチドの分離について当業者に知られている同様の方法により、複数のポリペプチドを分離できる。個々のポリペプチドは、形質転換された宿主細胞（例えば、組換えファージ）によって、その外表面上またはその周囲で発現されるように、作製することができる。次いで、所望により、発現が必要とされる場合は、誘導物質の存在下にて、個々の単離物を本発明のアルブミン融合蛋白質により「プローブ化」し、任意の選択的アフィニティー相互作用がアルブミン融合蛋白質および個々のクローンの間で生じるかを決定することができる。個々のポリペプチドを含む各フラクションとアルブミン融合蛋白質を接触させる前に、さらなる利便性のために、ポリペプチドをまず固体支持体に転写することができる。かかる固体支持体は単に１つのフィルターメンブレン、例えば、ニトロセルロースまたはナイロンからつくられたものであってもよい。この方法で、陽性クローンを、発現ライブラリーの形質転換された宿主細胞のコレクションから同定することができ、本発明のアルブミン融合蛋白質について選択親和性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡコンストラクトを提供する。さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質について選択親和性を有するポリペプチドのアミノ酸配列を、慣用的手段により直接的に測定することができ、またはポリペプチドをコードするＤＮＡコードのコーディング配列は、多くの場合、より都合よく測定することができる。次いで、一次配列が対応するＤＮＡ配列から推定され得る。アミノ酸配列がポリペプチドそれ自体から決定される必要があるならば、マイクロシークエンス技法を用いてもよい。該シークエンス技法は、質量分析を含んでもよい。

【０８４７】

特定の状況において、選択親和性相互作用の存在を決定または検出する前に、本発明のアルブミン融合蛋白質と複数のポリペプチドの混合物から、結合していない任意のポリペプチドを洗い流すことが所望されてもよい。かかる洗浄工程は、本発明のアルブミン融合蛋白質または複数のポリペプチドが固体支持体に結合している場合、特に所望されてもよい。

【０８４８】

この方法に従って提供される複数の分子は、本発明のアルブミン融合蛋白質に特異的に結合する分子についてスクリーニングされ得る、多様なライブラリー、例えば、ランダムまたはコンビナトリアルペプチドまたは非ペプチドライブラリーにより提供されてもよい。使用できる多くのライブラリー、例えば、化学合成されたライブラリー、組換え（例えば、ファージディスプレイライブラリー）およびインビトロでの翻訳に基づくライブラリーは、当該技術分野において知られている。化学合成されたライブラリーは、Ｆｏｄｏｒら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５１：７６７－７７３（１９９１）；Ｈｏｕｇｈｔｅｎら．，Ｎａｔｕｒｅ　３５４：８４－８６（１９９１）；Ｌａｍら．，Ｎａｔｕｒｅ　３５４：８２－８４（１９９１）；Ｍｅｄｙｎｓｋｉ，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１２：７０９－７１０（１９９４）；Ｇａｌｌｏｐら．，Ｊ．Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓ

ｔｒｙ ３７（９）：１２３３－１２５１（１９９４）；Ｏｈｌｍｅｌｙｅｒら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：１０９２２－１０９２６（１９９３）；Ｅｒｂら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１１４２２－１１４２６（１９９４）；Ｈｏｕｇｈｔｅｎら．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３：４１２（１９９２）；Ｊａｙａｗｉｃｋｒｅｍｅら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１６１４－１６１８（１９９４）；Ｓａｌｍｏｎら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ． ＵＳＡ ９０：１１７０８－１１７１２（１９９３）；ＰＣＴ公開 ＷＯ ９３／２０２４２；およびＢｒｅｎｎｅｒおよびＬｅｍｅｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：５３８１－５３８３（１９９２）に記載されている。

【０８４９】

ファージディスプレイライブラリーの例は、Ｓｃｏｔｔら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０（１９９０）；Ｄｅｖｌｉｎら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９：４０４－４０６（１９９０）；Ｃｈｒｉｓｔｉａｎら．，１９９２，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７１１－７１８１９９２）；Ｌｅｎｓｔｒａ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．１５２：１４９－１５７（１９９２）；Ｋａｙら．，Ｇｅｎｅ１２８：５９－６５（１９９３）；およびＰＣＴ公開ＷＯ ９４／１８３１８（１９９４年８月１８日）に記載されている。

【０８５０】

インビトロでの翻訳に基づくライブラリーは、ＰＣＴ公開 ＷＯ ９１／０５０５８（１９９１年４月１８日）；およびＭａｔｔｈｅａｋｉｓら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：９０２２－９０２６（１９９４）に記載のものを含むが、これらに限定されない。

【０８５１】

非ペプチドライブラリーの例としては、ベンゾジアゼピンライブラリー（例えば、Ｂｕｎｉｎら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９１：４７０８４７１２（１９９４）を参照のこと）が使用に適用できる。ペプトイドライブラリー（Ｓｉｍｏｎら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：９３６７－９３７１（１９９２））も用いられ得る。化学変換されたコンビナトリアルライブラリーを作製するためにペプチドのアミド官能基がペルメチル化された、使用可能なライブラリーの別の例は、Ｏｓｔｒｅｓｈら．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１１１３８－１１１４２（１９９４））に記載されている。

【０８５２】

本発明において有用な様々な非ペプチドライブラリーは卓越している。例えば、ＥｃｋｅｒおよびＣｒｏｏｋｅ（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３：３５１－３６０（１９９５）は、様々なライブラリーの基礎を形成する化学種として、ベンゾジアゼピン、ヒダントイン、ピペラジンジオン、ビフェニル、糖アナログ、ベーターメルカプトケトン、アリール酢酸、アシルピペリジン、ベンゾピラン、クバン、キサンチン、アミニミドおよびオキサゾロンを記載している。

【０８５３】

非ペプチドライブラリーは概して２つの型：修飾モノマーおよびオリゴマーに分類できる。装飾されたモノマーライブラリーは、比較的単純な足場構造を利用し、そこへ様々な官能基が付加される。多くの場合、足場は、知られている有用な薬理活性を有する分子であり得る。例えば、足場はベンゾジアゼピン構造であってもよい。

【０８５４】

非ペプチドオリゴマーライブラリーは大量のモノマーを利用し、これを一緒にアセンブリし、モノマーの順序に応じて新しい形状を作り出す。用いられるモノマー単位には、カルバマート、ピロリノンおよびモルホリノがある。側鎖がアルファ炭素ではなくアルファアミノ基に結合しているペプチド様オリゴマー、ペプトイドは、非ペプチドオリゴマーライブラリーの別の形式の基礎となる。初期の非ペプチドオリゴマーライブラリーでは一種

類のモノマーを利用し、それ故に、繰り返し骨格を含んでいた。最近のライブラリーは１以上のモノマーを利用し、ライブラリーには柔軟性がある。

【０８５５】

ライブラリーのスクリーニングは、任意の様々な一般的に知られている方法により成し遂げられ得る。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを開示している以下の参考文献：Ｐａｒｓｌｅｙら．，Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２５１：２１５－２１８（１９８９）；Ｓｃｏｔｔら，．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０（１９９０）；Ｆｏｗｌｋｅｓら．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３：４２２４２７（１９９２）；Ｏｌｄｅｎｂｕｒｇら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：５３９３－５３９７（１９９２）；Ｙｕら．，Ｃｅｌｌ ７６：９３３－９４５（１９９４）；Ｓｔａｕｄｔら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２４１：５７７－５８０（１９８８）；Ｂｏｃｋら．，Ｎａｔｕｒｅ ３５５：５６４－５６６（１９９２）；Ｔｕｅｒｋら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：６９８８－６９９２（１９９２）；Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎら．，Ｎａｔｕｒｅ３５５：８５０－８５２（１９９２）；米国特許第５，０９６，８１５号，米国特許第５，２２３，４０９号および米国特許第第５，１９８，３４６号，全てＬａｄｎｅｒら．；Ｒｅｂａｒら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６３：６７１－６７３（１９９３）；およびＰＣＴ公開ＷＯ ９４／１８３１８を参照のこと。

【０８５６】

特定の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質に結合する分子を同定するためのスクリーニングは、固定相に固定化された本発明のアルブミン融合蛋白質とライブラリーメンバーを接触させ、次いで、アルブミン融合蛋白質に結合するライブラリーメンバーを回収することにより行うことができる。「パニング」技法と言われる、かかるクリーニング方法の例は、Ｐａｒｍｌｅｙら．，Ｇｅｎｅ ７３：３０５－３１８（１９８８）；Ｆｏｗｌｋｅｓら．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３：４２２－４２７（１９９２）；ＰＣＴ公開 ＷＯ ９４／１８３１８；および本明細書中にて引用されている参考文献に例として記載されている。

【０８５７】

別の実施態様において、酵母において相互作用蛋白質を選択するための２つのハイブリッド系（Ｆｉｅｌｄｓら．，Ｎａｔｕｒｅ ３４０：２４５－２４６（１９８９）；Ｃｈｉｅｎら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ１．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：９５７８－９５８２（１９９１）は、本発明のポリペプチドに特異的に結合する分子を同定するために用いられ得る。

【０８５８】

結合分子がポリペプチドである場合、ポリペプチドは有意に、ランダムペプチドライブラリー、コンビナトリアルペプチドライブラリーまたはバイアスペプチドライブラリーを含む任意のペプチドライブラリーから選択され得る。本明細書中、用語「バイアス」は、この場合はペプチドである得られる分子のコレクションの多様性を調節する１またはそれ以上のパラメーターを制限するように、ライブラリーの作製方法を操作することを意味する。

【０８５９】

故に、真のランダムペプチドライブラリーは、ペプチドのコレクションを生じ得、ここで、ペプチドの特定位置で特定のアミノ酸を見出す確率は、２０種のアミノ酸全てについて同じである。しかし、例えば、リジンがアミノ酸５個ごとに存在し、またはデカペプチドライブラリーの４、８および９番目の位置を固定してアルギニンのみを含むように特定化することにより、バイアスをライブラリーに導入することができる。明らかに、多くの型のバイアスが熟慮され得、そして本発明は任意の特定のバイアスに限定されない。さらに、本発明は、特定の型のペプチドライブラリー、例えば、ファージディスプレイペプチドライブラリーおよびＤＮＡインサートを有するラムダファージベクターを含むＤＮＡコンストラクトを利用するものを熟慮する。

【０８６０】

上記したように、結合分子がポリペプチドである場合、ポリペプチドは、約６個～約６０個未満のアミノ酸残基、好ましくは、約６個～約１０個のアミノ酸残基、および最も好ましくは、約６個～約２２個のアミノ酸を有してもよい。別の実施態様において、結合ポリペプチドは、１５～１００個のアミノ酸または２０～５０個の範囲のアミノ酸を有する。

【０８６１】

選択された結合ポリペプチドは、化学合成または組換え発現により得ることができる。

【０８６２】

他の活性

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、血栓症、動脈硬化症のごとき様々な疾患状態および他の心血管状態に起因する、虚血組織の再血管新生を刺激するための処置において用いられてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、上記のように、血管新生および肢再生を刺激するために用いられてもよい。

【０８６３】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、傷害、火傷、術後の組織修復および潰瘍に起因する創傷を処置するために用いられてもよく、というのも、それらは、異なる器官の様々な細胞、例えば、線維芽細胞および骨格筋細胞に対して分裂促進的であり、およびそれ故に、損傷または疾患組織の修復またはの置換を促進するからである。

【０８６４】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ニューロンの成長を刺激し、および特定のニューロン性障害または神経変性状態、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病およびＡＩＤＳ関連合併症にて生じるニューロンの損傷を処置および予防するために用いられてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、軟骨細胞の成長を刺激する能力を有してもよく、それ故に、それらは、骨および歯根の再生を増強するため、および組織移植または骨移植を補助するために用いられてもよい。

【０８６５】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、ケラチノサイトの成長を刺激することで、日焼けに起因する皮膚老化を防ぐために用いられてもよい。

【０８６６】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、脱毛を防ぐために用いられてもよい。同じように、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、他のサイトカインと組み合わせて用いられる場合、造血細胞および骨髄細胞の成長および分化を刺激するために用いられてもよい。

【０８６７】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、移植前の器官を維持するためか、または一次組織の細胞培養を支持するために、用いられてもよい。本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、初期の胚における分化のために、中胚葉に由来する組織を誘導するために用いられてもよい。

【０８６８】

本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、上記したような造血系以外に、胚性幹細胞の分化または増殖を増大または減少させるために用いられてもよい。

【０８６９】
本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、哺乳類の特徴、例えば、身長、体重、髪の色、眼の色、皮膚、脂肪組織のパーセンテージ、色素沈着、大きさおよび形状（例えば、美容手術）を調節するために用いられてもよい。同様に、本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、エネルギーの異化、同化、処理、利用および貯蔵に作用する哺乳類の代謝を調節するために用いられてもよい。
【０８７０】
本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、バイオリズム、ｃａｒｉｃａｄｉｃリズム、鬱（鬱障害を含む）、暴力癖、疼痛への耐性、生殖能力（好ましくはアクチビンまたはインヒビン様活性により）、ホルモンまたは内分泌レベル、食欲、性欲、記憶、ストレスまたは他の認識できる性質に作用することにより、哺乳類の精神状態または身体状態を変化させるために用いられてもよい。
【０８７１】
本発明のアルブミン融合蛋白質および／または本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、食品添加物または防腐剤として用いて、例えば、貯蔵能、脂肪含有量、脂質、蛋白質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子または他の栄養成分を増強または低下させてもよい。
【０８７２】
上記の適用は、多種多様な宿主において使用される。かかる宿主は、ヒト、ネズミ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ミニブタ、ニワトリ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ヒトでない霊長類およびヒトを含むが、これらに限定されない。特定の実施態様において、宿主は、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ニワトリ、ラット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌまたはネコである。好ましい実施態様において、宿主は哺乳類である。最も好ましい実施態様において、宿主はヒトである。
【０８７３】
本発明は概括的に記載されているが、以下の実施例を参照することにより容易に理解されよう。該実施例は例示のために提供されており、これらに決して限定されない。
【０８７４】
さらなる記載がなくとも、当業者は、前記記載および以下の例示的な実施例を用いて、本発明にて認められる変更を行い、利用し、および特許請求の範囲の方法を実施することができよう。従って、以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様を特に示しているが、残りの開示内容をなんら限定するものではない。
【実施例】
【０８７５】
実施例１：ｐＳｃＮＨＳＡおよびｐＳｃＣＨＳＡの生成
ベクターｐＳｃＮＨＳＡ（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－３２７９）およびｐＳｃＣＨＳＡ（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－３２７６）は、ｐＰＰＣ０００５（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－３２７８）の派生物である。それらをクローニングベクターとして用いる。そこでは、治療用蛋白質、またはその断片または変異体をコードするポリヌクレオチドが、ヒト血清アルブミン「ＨＳＡ」をコードするポリヌクレオチドと隣接し、かつ翻訳フレーム内に挿入されている。ｐＳｃＣＨＳＡを治療用蛋白質－ＨＳＡ融合物を生成するために用い、一方ｐＳｃＮＨＳＡをＨＳＡ－治療用蛋白質融合物を生成するために用い得る。
【０８７６】
ｐＳｃＣＨＳＡ：アルブミン部分のＣ末端と治療用蛋白質のアルブミン融合物の生成
ｐＰＰＣ０００５のキメラＨＳＡシグナルペプチドをコードする核酸配列を変えて、ＸｈｏＩおよびＣｌａＩ制限酵素認識部位を含ませることで、治療用蛋白質のＮ－末端をコードするＤＮＡの成熟アルブミン蛋白質をコードするＤＮＡへのクローニングを促進する

ベクターを作製した。

【０８７７】

まず、ｐＰＰ０００５をＸｈｏＩおよびＣｌａＩで消化し、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで突出末端を充填し、次に、平滑末端を再びライゲーションすることで、ｐＰＰ０００５に固有のＸｈｏＩおよびＣｌａＩ部位（ＡＤＨ１終結配列の３’に位置する）を取り除き、ｐＰＰＣ０００６を作製した。

【０８７８】

次に、２ラウンドのＰＣＲを用い、ｐＰＰＣ０００６中のＨＳＡのシグナルペプチド（ＨＳＡリーダーのキメラおよび接合因子αである「ＭＡＦ」由来のｋｅｘ２部位）をコードする核酸配列内にＸｈｏＩおよびＣｌａＩ制限酵素認識部位を設計した。１ラウンド目のＰＣＲにおいては、配列番号：３６および配列番号：３７として示すプライマーを用いた増幅を行った。配列番号：３６として配列を示すプライマーは、ＨＳＡのシグナルペプチドの一部、接合因子αのリーダー配列由来のｋｅｘ２部位、および成熟型ＨＳＡのアミノ末端部分を含むものである。４個の点変異を配列に導入し、それにより、キメラシグナルペプチドと成熟型ＨＳＡの結合部に見られるＸｈｏＩおよびＣｌａＩ部位を作製した。以下に示す配列において、これら４個の変異に下線を付す。ｐＰＰＣ０００５では、これら４ヶ所の位置のヌクレオチドは、５’から３’の順にＴ、Ｇ、Ｔ、そしてＧである。

5’-GCCTCGAGAAAAGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGATTTAAAGATTTGGG-3’（配列番号：３６）、および

5’-AATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCTCTTTTCTCGAGGCTCCTGGAATAAGC-3’（配列番号：３７）。次に、２ラウンド目のＰＣＲを上流に隣接するプライマー5’-TACAAACTTAAGAGTCCAATTAGC-3’（配列番号：３８）、および下流に隣接するプライマー5’－CACTTCTCTAGAGTGGTTTCATATGTCTT-3’（配列番号：３９）を用いて行った。次に、生じたＰＣＲ産物を精製し、ＡｆｌＩＩおよびＸｂａＩで消化し、ｐＰＰＣ０００６の同じ部位にライゲーションして、ｐＳｃＣＨＳＡを作製した。生じたプラスミドは、シグナル配列内に設計したＸｈｏＩおよびＣｌａＩ部位を有する。ＸｈｏＩ部位の存在により、シグナル配列の最後に１アミノ酸の変化（ＬＤＫＲからＬＥＫＲ）が作製される。５’ＳａｌＩ部位（これはＸｈｏＩ部位と互換性がある）および３’ＣｌａＩ部位を有するアルブミン融合蛋白質の治療用部分をコードするポリヌクレオチドを含む核酸配列が、ｐＳｃＣＨＳＡのＸｈｏＩおよびＣｌａＩ部位にライゲーションされると、ＤからＥへの変化は、最終的なアルブミン融合蛋白質の発現プラスミド中に存在しなくなる。ＳａｌＩのＸｈｏＩへのライゲーションは、シグナルペプチド配列のオリジナルのアミノ酸配列を保存する。アルブミン融合蛋白質の治療用部分をコードするＤＮＡを、Ｋｅｘ２部位（Ｋｅｘ２は、シグナルペプチドの終わりにある２塩基性アミノ酸配列ＫＲに結合する）の後、ＣｌａＩ部位の前で挿入する。

【０８７９】

ｐｓｃＮＨＳＡ：アルブミン部分のＮ末端と治療用蛋白質のアルブミン融合物の生成

３個の８塩基対制限酵素認識部位をｐＳｃＣＨＳＡに付加することで、治療用蛋白質のＣ末端をコードするＤＮＡの成熟アルブミン蛋白質をコードするＤＮＡへのクローニングを促進するベクターを作製した。成熟ＨＳＡ蛋白質をコードする核酸配列の終わりのＢｓｕ３６ＩとＨｉｎｄＩＩＩ部位の間に、ＡｓｃＩ、ＦｓｅＩ、およびＰｍｅＩ制限酵素認識部位を付加した。これは、下線を付したＡｓｃＩ、ＦｓｅＩ、およびＰｍｅＩ制限酵素認識部位を含有する２つの相補的合成プライマー（配列番号：４０および配列番号：４１）の使用により、なし得た。

5’-AAGCTGCCTTAGGCTTATAATAAGGCGCGCCGGCCGGCCGTTTAAACTAAGCTTAATTCT-3’（配列番号：４０）、および

5’-AGAATTAAGCTTAGTTTAAACGGCCGGCCGGCGCGCCTTATTATAAGCCTAAGGCAGCTT-3’（配列番号：４１）。これらのプライマーをアニーリングし、Ｂｓｕ３６ＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、ｐＳｃＣＨＳＡの同じ部位にライゲーションして、ｐＳｃＮＨＳＡを作製した。

【０８８０】

実施例２：酵母形質転換のための一般的なコンストラクトの生成

ベクターｐＳｃＮＨＳＡおよびｐＳｃＣＨＳＡをクローニングベクターとして用い得る。そこでは、治療用蛋白質、またはその断片または変異体をコードするポリヌクレオチドが、成熟ヒト血清アルブミンである「ＨＳＡ」をコードするポリヌクレオチドに隣接して挿入されている。ｐＳｃＣＨＳＡを治療用蛋白質－ＨＳＡ融合物の生成に用い、一方ｐＳｃＮＨＳＡをＨＳＡ－治療用蛋白質融合物の生成に用いることができる。

【０８８１】

ＨＳＡ－治療用蛋白質融合産物を含むアルブミン融合コンストラクトの生成

融合コンストラクトの生成を（例えば、制限酵素認識部位の付加、シームレスな融合物のコード化、リンカー配列のコード化などにより）促進するプライマーを用いて、治療用蛋白質をコードするＤＮＡ（例えば、配列番号：Ｘにおいて示す配列、または当該技術分野で知られた配列）をＰＣＲ増幅する。例えば、当業者は、治療用蛋白質をコードするＤＮＡの５’末端に、成熟型ＨＳＡの最後の４アミノ酸をコードする（かつ、Ｂｓｕ３６Ｉ部位を含有する）ポリヌクレオチドを付加した５’プライマー；および治療用蛋白質コード配列の３’末端に、終止コドンおよび適当なクローニングサイトを付加した３’プライマーを設計し得る。例えば、治療用蛋白質をコードするＤＮＡの増幅に用いられるフォワードプライマーは、配列5’-aagctGCCTTAGGCTTA$(N)_{15}$－3’（配列番号：４２）（下線を付した配列はＢｓｕ３６Ｉ部位であり、大文字のヌクレオチドは成熟ＨＳＡ蛋白質の最後の４アミノ酸（ＡＬＧＬ）をコードし、そして（Ｎ）$_{15}$は目的の治療用蛋白質をコードする最初の１５ヌクレオチドと一致する）を有し得る。同様に、治療用蛋白質をコードするＤＮＡの増幅に用いられるリバースプライマーは、配列

【表５５】

5’－ＧＣＧＣＧＣ*ＧＴＴＴＡＡＡＣ*ＧＧＣＣＧＧＣＣＧＧＣＧＣＧＣＣＴＴＡＴＴＡ

$(N)_{15}$－３’（配列番号：４３）

（イタリック体の配列はＰｍｅＩ部位であり、二重の下線を付した配列はＦｓｅＩ部位であり、下線を付した配列はＡｓｃＩ部位であり、四角で囲ったヌクレオチドは２つのタンデムな終止コドンの逆向きの相補鎖であり、そして（Ｎ）$_{15}$は目的の治療用蛋白質をコードする最後の１５ヌクレオチドの逆向きの相補鎖と一致する）を有し得る。ＰＣＲ産物を増幅させ、それをＢｓｕ３６ＩおよびＡｓｃＩ、ＦｓｅＩ、またはＰｍｅＩの１つで消化し、ｐＳｃＮＨＳＡにライゲーションする。

【０８８２】

ＨＳＡキメラリーダー配列中のＸｈｏＩ部位の存在により、ＬＤＫＲ（配列番号：４４）からＬＥＫＲ（配列番号：４５）の１アミノ酸変化がキメラシグナル配列、すなわち、ＨＳＡ－ｋｅｘ２シグナル配列の終わりに作製される。

【０８８３】

遺伝子－ＨＳＡ融合産物を含むアルブミン融合コンストラクトの生成

上述の方法と同様に、次のプライマー：治療用蛋白質をコードする５’末端に、ＳａｌＩ部位を含有し、ＨＳＡリーダー配列の最後の３アミノ酸ＤＫＲをコードするポリヌクレオチドを付加した５’プライマー；および治療用蛋白質をコードするＤＮＡの３’末端に、ＣｌａＩ部位を含有する成熟ＨＳＡの最初の数アミノ酸を付加した３’プライマーを用いて、治療用蛋白質をコードするＤＮＡを増幅する。例えば、治療用蛋白質をコードするＤＮＡの増幅に用いられるフォワードプライマーは、配列５’－ａｇｇａｇｃｇｔｃＧＡＣＡＡＡＡＧＡ（Ｎ）$_{15}$－３’（配列番号：４６）（下線を付した配列は、ＳａｌＩ部位であり、大文字のヌクレオチドはＨＳＡリーダー配列の最後の３アミノ酸（ＤＫＲ）をコードし、そして（Ｎ）$_{15}$は目的の治療用蛋白質をコードする最初の１５ヌクレオチドと一致する）を有し得る。同様に、治療用蛋白質をコードするＤＮＡの増幅に用いられるリバースプライマーは、配列

【表５６】

5’－ＣＴＴＴＡＡ*ＡＴＣＧＡＴ*ＧＡＧＣＡＡＣＣＴＣＡＣＴＣＴＴＧＴＧＴＧＣＡＴＣ（Ｎ）$_{15}$－３’（配列番号：４７）

（イタリック体の配列はＣｌａＩ部位であり、下線を付したヌクレオチドは成熟型ＨＳＡの最初の９アミノ酸（ＤＡＨＫＳＥＶＡＨ、配列番号：４８）の逆向きの相補鎖であり、そして（Ｎ）$_{15}$は目的の治療用蛋白質をコードする最後の１５ヌクレオチドの逆向きの相補鎖と一致する）を有し得る。ＰＣＲ産物を増幅し、ＳａｌＩおよびＣｌａＩで消化し、ＸｈｏＩおよびＣｌａＩで消化したｐＳｃＣＨＳＡにライゲーションする。異なるシグナルまたはリーダー配列、例えば、インベルターゼ「ＩＮＶ」（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔアクセション番号Ｐ００７２４）、接合因子α「ＭＡＦ」（Ｇｅｎｂａｎｋアクセション番号ＡＡＡ１８４０５）、ＭＰＩＦ（Ｇｅｎｓｅｑ　ＡＡＦ８２９３６）、フィブリンＢ（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔアクセション番号Ｐ２３１４２）、クラスタリン（Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎ）（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔアクセション番号Ｐ１０９０９）、インスリン様成長因子－結合蛋白質４（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔアクセション番号Ｐ２２６９２）が好ましく、当該技術分野で知られた標準的方法により、適当なベクターに順列のＨＳＡリーダー配列をサブクローニングできる。

【０８８４】

酵母（Ｙａｓｅｔ　Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）における発現に合ったアルブミン融合コンストラクトの生成

次に、ＬＥＵ２選択マーカーを有するｐＳＡＣ３５のＮｏｔＩ部位に、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＳｃＣＨＳＡから生成したＮ－末端またはＣ－末端アルブミン融合蛋白質のいずれかをコードするＤＮＡを含有するＮｏｔＩ断片をクローニングする。

【０８８５】

実施例３：酵母における一般的発現

酢酸リチウム形質転換法、エレクトロポレーション法、または当該技術分野で知られた他の方法および／またはＳａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ　Ｍａｎｉａｔｉｓ．１９８９．“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２^{ｎｄ}　ｅｄｉｔｉｏｎ”，ｖｏｌｕｍｅｓ１－３、およびＡｕｓｕｂｅｌら．２０００．Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ　Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ　ａｎｄ　Ｈａｒｖａｒｄ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｃｈｏｏｌ“Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ”，ｖｏｌｕｍｅｓ１－４の一部に記載の他の方法により、酵母発現に合った発現ベクターを酵母に形質転換することができる。形質転換により、エス・セレビシア株ＤＸＹ１、Ｄ８８、またはＢＸＰ２０に発現ベクターを導入し、個々の形質転換体を、例えば、ＹＥＰＤ（１％ｗ／ｖ　酵母エキス、２％ｗ／ｖ　ペプトン、２％ｗ／ｖ　デキストロース）１０ｍＬ中、３０℃にて３日間成長させ、成長の６０時間後の静止期で、細胞を回収することができる。３０００ｇで１０分間遠心して、細胞を回収する。

【０８８６】

ｐＳＡＣ３５（Ｓｌｅｅｐら．，１９９０，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ８：４２および図３を参照）は、ＬＥＵ選択マーカーに加えて、複製機能をもたらすための完全な酵母２μｍプラスミド、ＰＲＢ１プライマー、およびＡＤＨ１終結シグナルを含む。

【０８８７】

実施例４：酵母においてアルブミン融合物から発現したアルブミン融合蛋白質の一般的精製

好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、成熟型治療用蛋白質またはその部分（例えば、表１に挙げた成熟型治療用蛋白質、または表２において配列番号：Ｚとして示す成熟型治療用蛋白質）のＮ－またはＣ－末端のいずれかと融合した成熟型ＨＳＡを含む。本発明の１つの実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質はさらに、発現に用いられる宿主の分泌経路において新生融合ポリペプチドを指示するシグナル

配列を含む。好ましい実施態様において、シグナル配列によりコードされるシグナルペプチドが取り除かれ、成熟アルブミン融合蛋白質が培地に直接分泌される。好ましくは、本発明のアルブミン融合蛋白質は、ＭＡＦ、ＩＮＶ、Ｉｇ、フィブリンＢ、クラスタリン、インスリン様成長因子結合蛋白質４を含む（しかし、これらに限定されない）異種性シグナル配列（例えば、特定の治療用蛋白質の本来ないシグナル配列）、キメラＨＳＡ／ＭＡＦリーダー配列を含む（しかし、これに限定されない）変異体ＨＳＡリーダー配列、または当該技術分野で知られた他の異種性シグナル配列を含む。特に好ましくは、表２に挙げたシグナル配列、および／または明細書の上記セクション「融合蛋白質の発現」および／または「アルブミン融合蛋白質の組換え体および合成産生のさらなる方法」において挙げたシグナル配列である。好ましい実施態様において、本発明の融合蛋白質はさらに、Ｎ－末端メチオニン残基を含む。断片および／または変異体を含むこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。

【０８８８】

次の通り、Ｄｙａｘペプチドアフィニティーカラムを通して小スケールで上記の酵母で発現されたアルブミン融合蛋白質を精製できる。アルブミン融合蛋白質発現酵母由来の上清を、３ｍＭ　リン酸緩衝液　ｐＨ６．２、２０ｍＭ　ＮａＣｌ、および０．０１％　Ｔｗｅｅｎ２０に対してダイアフィルトレーションして体積を減らし、かつ色素を除去する。次に、溶液を０．２２μｍの装置に通して濾過する。濾液をＤｙａｘペプチドアフィニティーカラムにロードする。カラムを１００ｍＭ　トリス／ＨＣｌバッファー、ｐＨ８．２を用いて溶出する。蛋白質含有ピーク画分を回収し、５倍に濃縮後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて分析する。

【０８８９】

ラージスケールの精製には、次の方法を利用することができる。２Ｌを超える上清をダイアフィルトレーションし、２０ｍＭのトリス／ＨＣｌ、ｐＨ８．０中、５００ｍＬに濃縮する。濃縮した蛋白質溶液を予め平衡化した５０ｍＬのＤＥＡＥ－セファロースファーストフローカラムにロードし、カラムを洗浄し、蛋白質を直線的勾配のＮａＣｌ（２０ｍＭ　トリス／ＨＣｌ、ｐＨ８．０中の０から０．４Ｍ　ＮａＣｌ）を用いて溶出する。蛋白質含有画分をプールし、０．５Ｍのリン酸ナトリウム（NaH_2PO_4）を用いてｐＨ６．８に調節する。最終濃度０．９Ｍの（$(NH_4)_2SO_4$を蛋白質溶液に添加し、全溶液を予め平衡化した５０ｍＬのＢｕｔｙｌ６５０Ｓカラムにロードする。蛋白質を直線的勾配の硫酸アンモニウム（０．９から０Ｍの（$(NH_4)_2SO_4$）を用いて溶出する。アルブミン融合物を含む画分を再びプールし、１０ｍＭのNa_2HPO_4／クエン酸バッファー、ｐＨ５．７５に対してダイアフィルトレーションし、予め平衡化した５０ｍＬのＳＰ－セファロースファーストフローカラムにロードする。蛋白質を直線的勾配（０から０．５Ｍ）のＮａＣｌを用いて溶出する。目的の蛋白質含有画分を合併し、バッファーをＡｍｉｃｏｎ濃縮器（伝導率は、＜２．５ｍＳ／ｃｍ）を用いて１０ｍＭのNa_2HPO_4／クエン酸、ｐＨ６．２５に交換する。この蛋白質溶液を予め平衡化した１５ｍＬのＱ－セファロース高速カラムにロードし、カラムを洗浄し、蛋白質を直線的勾配（０から０．１５Ｍ）のＮａＣｌを用いて溶出する。次に、精製した蛋白質をバッファー交換により特定のバッファー組成中に調製できる。

【０８９０】

実施例５：哺乳類細胞の形質移入のための一般的なコンストラクトの生成

哺乳類細胞株における発現に合ったアルブミン融合コンストラクトの生成

哺乳類細胞培養系で用いる発現ベクターにおいて、アルブミン融合コンストラクトを生成することができる。当該技術分野で知られた標準的方法（例えば、ＰＣＲ増幅、制限酵素消化、およびライゲーション）により、哺乳類の発現ベクター中のＨＳＡのＮ－末端またはＣ－末端に、治療用蛋白質をコードするＤＮＡをクローニングすることができる。発現ベクターを構築すると、哺乳類発現系への形質移入を行うことができる。適当なベクターが当該技術分野で知られており、例えば、ｐＣ４ベクター、および／またはＬｏｎｚａ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ）より入手可能なベクタ

ーを含むが、これらに限定されない。

【０８９１】

ヒト血清アルブミンをコードするＤＮＡを、哺乳類培養系に適したｐＣ４ベクターにクローニングし、プラスミドｐＣ４：ＨＳＡ（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－３２７７）を作製した。このベクターは、メトトレキセートの存在下での選択を可能にするジヒドロ葉酸還元酵素「ＤＨＦＲ」遺伝子を有する。

【０８９２】

ｐＣ４：ＨＳＡベクターは、ＣＨＯ細胞におけるアルブミン融合蛋白質の発現に適している。他の哺乳類細胞培養系における発現のため、アルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡを含むか、あるいはそれからなる断片を、別の発現ベクターにサブクローニングすることが望ましい。例えば、成熟アルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡを含むか、あるいはそれからなる断片は、本明細書に記載の任意の哺乳類発現ベクターを含む（しかし、これらに限定されない）別の発現ベクターにサブクローニングできる。

【０８９３】

好ましい実施態様において、アルブミン融合物をコードするＤＮＡコンストラクトは、ＮＳ０細胞での発現のため、当該技術分野で知られた方法により、Ｌｏｎｚａ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ）により提供されるベクターにサブクローニングされる。

【０８９４】

ＨＳＡ－治療用蛋白質融合産物を含むアルブミン融合コンストラクトの生成

ｐＣ４：ＨＳＡ（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－３２７７）を用いて、治療用蛋白質部分が成熟アルブミン配列のＣ末端にクローニングしたアルブミン融合コンストラクトを生成できる。例えば、治療用蛋白質、またはその断片または変異体をコードするＤＮＡを、ベクターのＢｓｕ３６ＩとＡｓｃＩ制限酵素認識部位との間にクローニングすることができる。Ｂｓｕ３６ＩおよびＡｓｃＩにクローニングする際、酵母ベクター系へのクローニングに用いるのと同じプライマーデザイン（配列番号：４２および４３）を利用できる（実施例２参照）。

【０８９５】

遺伝子－ＨＳＡ融合産物を含むアルブミン融合コンストラクトの生成

ｐＣ４：ＨＳＡ（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－３２７７）を用いて、治療用蛋白質部分が成熟アルブミン配列のＮ末端にクローニングしたアルブミン融合コンストラクトを生成できる。例えば、それ自体のシグナル配列を有する治療用蛋白質をコードするＤＮＡを、ｐＣ４：ＨＳＡのＢａｍＨＩ（または、ＨｉｎｄＩＩＩ）とＣｌａＩ部位との間にクローニングすることができる。ＢａｍＨＩまたはＨｉｎｄＩＩＩ部位のいずれかにクローニングする場合、治療用蛋白質をコードするＤＮＡの翻訳開始コドンの前にコザック配列（ＣＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧ、配列番号：４９）を含むことが好ましい。治療用蛋白質がシグナル配列を有しないなら、治療用蛋白質をコードするＤＮＡは、ｐＣ４：ＨＳＡのＸｈｏＩとＣｌａＩ部位の間にクローニングされてもよい。ＸｈｏＩ部位を用いる場合、次の５’（配列番号：５０）および３’（配列番号：５１）の典型的なＰＣＲプライマー：

5’-CCGCCGCTCGAGGGGTGTGTTTCGTCGA$(N)_{18}$-3’（配列番号：５０）

5’-AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATC$(N)_{18}$-3’（配列番号：５１）

を用いてもよい。

【０８９６】

５’プライマー（配列番号：５０）では、下線を付した配列がＸｈｏＩ部位であり；そしてＸｈｏＩ部位およびＸｈｏＩ部位の次のＤＮＡが、天然ヒト血清アルブミンのリーダー配列の最後の７アミノ酸をコードする。配列番号：５０では、「（Ｎ）$_{18}$」が目的の治療用蛋白質をコードする最初の１８ヌクレオチドと一致する。３’プライマー（配列番号：５１）では、下線を付した配列がＣｌａＩ部位であり；そしてＣｌａＩ部位およびその次のＤＮＡが成熟ＨＳＡ蛋白質（配列番号：１）の最初の１０アミノ酸の逆向きの相補鎖である。配列番号：５１では、「（Ｎ）$_{18}$」が目的の治療用蛋白質をコードする最後

の１８ヌクレオチドをコードするＤＮＡの逆向きの相補鎖である。これら２つのプライマーを用いて、目的の治療用蛋白質をＰＣＲ増幅し、ＰＣＲ産物を精製し、それをＸｈｏＩおよびＣｌａＩ制限酵素で消化し、ｐＣ４：ＨＳＡベクターのＸｈｏＩおよびＣｌａＩ部位にクローニングすることができる。

【０８９７】

別のリーダー配列を所望なら、当該技術分野で知られた標準的方法により、キメラアルブミンリーダー、すなわち、ＨＳＡ－ｋｅｘ２シグナルペプチド、または別のリーダーと未変性のアルブミンリーダー配列を置き換えることができる（例えば、当業者は、通常、別のリーダーをＰＣＲ増幅し、リーディングフレームを維持しながらアルブミンリーダーの代わりにＰＣＲ産物をアルブミン融合コンストラクトにサブクローニングすることができる）。

【０８９８】

実施例６：哺乳離細胞株における一般的発現

リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクタミン法、エレクトロポレーション法、または当該技術分野で知られた他の形質移入方法、および／またはＳａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ．１９８９．“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ”およびＡｕｓｕｂｅｌら．２０００．Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｈｏｓｐｉｔａｌ ａｎｄ Ｈａｒｖａｒｄ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｃｈｏｏｌ“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”，ｖｏｌｕｍｅｓ１－４に記載の他の形質移入方法により、哺乳類細胞株での発現に合った発現ベクターにおいて生成したアルブミン融合コンストラクトを適当な細胞株に形質移入できる。次に、発現ベクター中の選択マーカーにより決定するスクリーニング因子の存在により、形質移入した細胞を選択する。

【０８９９】

ｐＣ４発現ベクター（ＡＴＣＣアクセッション番号２０９６４６）は、ｐＳＶ２－ＤＨＦＲ（ＡＴＣＣアクセッション番号３７１４６）の派生物である。ｐＣ４は、ラウス肉腫ウイルスの強力なプロモーターロング末端反復「ＬＴＲ」（Ｃｕｌｌｅｎら．，Ｍａｒｃｈ １９８５，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，４３８－４４７）およびサイトメガロウイルス「ＣＭＶ」－エンハンサーの断片（Ｂｏｓｈａｒｔら．，１９８５，Ｃｅｌｌ ４１：５２１－５３０）を含有する。ベクターは、ＳＶ４０初期プロモーターの調節下に、ラットプレプロインスリン遺伝子の３’イントロン、ポリアデニル化シグナルおよび終結シグナル、およびマウスＤＨＦＲ遺伝子も含有する。チャイニーズハムスター卵巣「ＣＨＯ」細胞、または活性なＤＨＦＲ遺伝子を欠く他の細胞株を形質移入に用いる。当該技術分野で知られた方法によるｐＣ４中のアルブミン融合コンストラクトのＣＨＯ細胞への形質移入により、ＣＨＯ細胞におけるアルブミン融合蛋白質の発現が可能になり、リーダー配列の開裂、上清への分泌が続く。次に、さらに上清からアルブミン融合蛋白質を精製する。

【０９００】

ｐＥＥ１２．１発現ベクターは、Ｌｏｎｚａ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ）より提供される。それはｐＥＥ６（Ｓｔｅｐｈｅｎｓ ａｎｄ Ｃｏｃｋｅｔｔ，１９８９，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：７１１０）の派生物である。このベクターは、ヒトサイトメガロウイルスの主要初期遺伝子「ｈＣＭＶ－ＭＩＥ」（国際公報番号ＷＯ８９／０１０３６）のプロモーター、エンハンサー、および完全な５’－非翻訳領域、目的配列の上流、および選択的メチオニンスルホキシミン含有培地での形質移入細胞の選択ためのグルタミン合成遺伝子（Ｍｕｒｐｈｙら．，１９９１，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．２２７：２７７－２７９；Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら．，１９９２，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１６９－１７５；米国特許第５，１２２，４６４号）を含む。当該技術分野で知られた方法による、ｐＥＥ１２．１に作製したアルブミン融合蛋白質のＮＳ０細胞への形質移入（国際公報番号ＷＯ８６／０５８０７）により、ＮＳ

０細胞でのアルブミン融合蛋白質の発現が可能になり、リーダー配列の開裂、および上清への分泌が続く。次に、本明細書に記載の技術、または当該技術分野で知られた他のものを用いて、さらに上清からアルブミン融合蛋白質を精製する。

【０９０１】

例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロット、逆相ＨＰＬＣ分析、または当該技術分野で知られた他の方法により、アルブミン融合蛋白質の発現を分析してもよい。

【０９０２】

当該技術分野で知られた方法（例えば、リポフェクタミン形質移入法）により、アルブミン融合コンストラクトを形質移入した安定なＣＨＯおよびＮＳ０細胞株を生成し、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素「ＤＨＦＲ」遺伝子を選択マーカーとして有するベクターについては、１００ｎＭのメトトレキセートを用いて、あるいはグルタミン不存下の成長により選択する。例えば、まず、抗ＨＳＡ血清を１次抗体として、次に、所定のアルブミン融合蛋白質の治療用蛋白質部分に対する抗体含有血清を２次抗体として用いたイムノブロットにより、発現レベルを調べることができる。

【０９０３】

１次抗体として抗ＨＳＡ血清を用いたイムノブロット検出により、発現レベルを調べる。具体的な産生率をＥＬＩＳＡにより決定する。ＥＬＩＳＡでは、捕獲抗体は、アルブミン融合物の治療用蛋白質部分に対するモノクローナル抗体であり、検出抗体は、モノクローナル抗ＨＳＡビオチン化抗体であり（または逆）、西洋わさびペルオキシダーゼ／ストレプトアビジンを結合させ、製造元のプロトコルにより分析する。

【０９０４】

実施例７：哺乳類細胞におけるアルブミン融合蛋白質の発現

本発明のアルブミン融合蛋白質を哺乳類細胞で発現させることができる。典型的な哺乳類発現ベクターはプロモーターエレメントを含有し、そしてそれが、ｍＲＮＡ、蛋白質コード配列、および転写の終結および転写物のポリアデニル化に必要なシグナルの転写の開始を仲介する。さらなるエレメントは、エンハンサー、コザック配列、およびＲＮＡスプライシングのドナーおよびアクセプター部位に隣接する介在性配列を含む。非常に効率的な転写を、ＳＶ４０由来の初期および後期プロモーター、レトロウイルス由来の末端反復配列（ＬＴＲ）、例えば、ＲＳＶ、ＨＴＬＶＩ、ＨＩＶＩ、およびサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）の初期プロモーターを用いて達成する。しかしながら、細胞エレメントも用いることができる（例えば、ヒトのアクチンプロモーター）。

【０９０５】

本発明の実施に用いるのに適した発現ベクターは、例えば、ｐＳＶＬおよびｐＭＳＧ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）、ｐＲＳＶｃａｔ（ＡＴＣＣ３７１５２）、ｐＳＶ２ｄｈｆｒ（ＡＴＣＣ３７１４６）、ｐＢＣ１２ＭＩ（ＡＴＣＣ６７１０９）、ｐＣＭＶＳｐｏｒｔ２．０、およびｐＣＭＶＳｐｏｒｔ３．０のようなベクターを含む。用い得る哺乳類宿主細胞は、ヒトＨｅｌａ、２９３、Ｈ９、およびジャーカット細胞、マウスＮＩＨ３Ｔ３、およびＣ１２７細胞、Ｃｏｓ１、Ｃｏｓ７、およびＣＶ１、ウズラＱＣＩ－３細胞、マウスＬ細胞、およびチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を含むが、これらに限定されない。

【０９０６】

別法では、染色体内に一体化したアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有する安定な細胞株において、アルブミン融合蛋白質を発現させることができる。ＤＨＦＲ、ｇｐｔ、ネオマイシン、またはハイグロマイシンのような選択マーカーとの同時形質移入により、形質移入細胞の同定および単離が可能になる。

【０９０７】

融合蛋白質をコードする形質移入ポリヌクレオチドを増幅し、大量のコード化融合蛋白質を発現させることができる。ＤＨＦＲ（ジヒドロ葉酸還元酵素）マーカーは、目的の遺伝子を数百または数千コピー有する細胞株の開発において有用である（例えば、Ａｌｔら．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５３：１３５７－１３７０（１９７８）；Ｈａｍｌｉ

ｎら．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１０９７：１０７－１４３（１９９０）；Ｐａｇｅら．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ９：６４－６８（１９９１）を参照）。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ（ＧＳ）である（Ｍｕｒｐｈｙら．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ．２２７：２７７－２７９（１９９１）；Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：１６９－１７５（１９９２））。これらのマーカーを用いて、哺乳類細胞を選択培地において成長させ、そして最も耐性の細胞を選択する。これらの細胞株は増幅遺伝子を含有し、これは染色体内に一体化している。しばしば蛋白質の産生のために、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）およびＮＳ０細胞を用いる。

【０９０８】

プラスミドｐＳＶ２－ｄｈｆｒ（ＡＴＣＣアクセッション番号３７１４６）の派生物である発現ベクターｐＣ４（ＡＴＣＣアクセッション番号２０９６４６）およびｐＣ６（ＡＴＣＣアクセッション番号２０９６４７）は、ラウス肉腫ウイルスの強力なプロモーター（ＬＴＲ）（Ｃｕｌｌｅｎら．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，４３８－４４７（Ｍａｒｃｈ，１９８５））およびＣＭＶ－エンハンサーの断片（Ｂｏｓｈａｒｔら．，Ｃｅｌｌ　４１：５２１－５３０（１９８５））を含有する。例えば、制限酵素認識部位ＢａｍＨＩ、ＸｂａＩおよびＡｓｐ７１８を含むマルチクローニングサイトは、目的の遺伝子のクローニングを促進する。ベクターはまた、ＳＶ４０初期プロモーターの制御下に、ラットプレプロインスリン遺伝子の３’イントロン、ポリアデニル化および終結シグナル、およびマウスＤＨＦＲ遺伝子を含有する。

【０９０９】

具体的には、例えば、プラスミドｐＣ６を適当な制限酵素で消化し、次に、当該技術分野で知られた方法により、子ウシ腸リン酸塩で脱リン酸する。次に、１％　アガロースゲルからベクターを単離する。

【０９１０】

当該技術分野で知られた技術を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを生成し、当該技術分野で知られたＰＣＲ技術を用いて、このポリヌクレオチドを増幅する。天然に存在するシグナル配列を本発明の融合蛋白質の生成に用いる場合、ベクターは第２のシグナルペプチドを必要としない。別法として、天然に存在するシグナル配列を用いない場合、異種性シグナル配列を含むようにベクターを修飾する（例えば、国際公報番号ＷＯ９６／３４８９１参照）。

【０９１１】

市販のキット（「Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ」ＢＩＯ　１０１　Ｉｎｃ．，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，Ｃａ．）を用いて、１％　アガロースゲルから本発明の融合蛋白質をコードする増幅断片を単離する。次に、断片を適当な制限酵素で消化し、再び１％　アガロースゲルにて精製する。

【０９１２】

次に、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードする増幅断片を、同じ制限酵素で消化し、１％のアガロースゲルにて精製する。次に、単離断片と脱リン酸化ベクターをＴ４　ＤＮＡリガーゼでライゲーションする。次に、大腸菌（Ｅ．　Ｃｏｌｉ）ＨＢ１０１またはＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞を形質転換し、例えば、制限酵素分析を用いて、プラスミドｐＣ６に挿入された断片を含有するバクテリアを同定する。

【０９１３】

活性なＤＨＦＲ遺伝子を欠くチャイニーズハムスター卵巣細胞を形質移入用に用いる。発現プラスミドｐＣ６またはｐＣ４　５μｇをプラスミドｐＳＶｎｅｏ　０．５μｇと共にリポフェクチンを用いて同時形質移入する（Ｆｅｌｇｎｅｒら．，前掲）。プラスミドｐＳＶ２－ｎｅｏは、優性選択マーカーであるＧ４１８を含む一群の抗生物質に対する耐性をもたらす酵素をコードするＴｎ５由来のｎｅｏ遺伝子を含有する。細胞を１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を添加したα－ＭＥＭ中に播種する。２日後、細胞をトリプシン処理し、１０、２５、または５０ｎｇ／ｍｌのメトトレキセートおよび１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を添

加したα－ＭＥＭ中ハイブリドーマクローニングプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に播種する。約１０～１４日後、シングルコロニーをトリプシン処理し、次に、異なる濃度（５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、４００ｎＭ、８００ｎＭ）のメトトレキセートを用いて、６ウェルペトリディッシュまたは１０ｍｌフラスコに播種する。次に、高濃度のメトトレキセートにて成長するクローンを、より高濃度（１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０ｍＭ、２０ｍＭ）のメトトレキセートを含有する新しい６ウェルプレートに移す。１００～２００μＭの濃度にて成長するクローンを得るまで、同じ方法を繰り返す。

【０９１４】

実施例８：哺乳類細胞株においてアルブミン融合コンストラクトから発現したアルブミン融合蛋白質の一般的精製

好ましい実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質は、成熟型治療蛋白質またはその部分（例えば、表１に挙げた成熟型治療蛋白質、または表２において配列番号：Ｚとして示す成熟型治療用蛋白質）のＮ－またはＣ－末端のいずれかと融合した成熟型ＨＳＡを含む。本発明の１つの実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質はさらに、発現に用いる宿主の分泌経路において新生融合ポリペプチドを指示するシグナル配列を含む。好ましい実施態様において、シグナル配列によりコードされるシグナルペプチドを取り除き、成熟アルブミン融合蛋白質を細胞培地に直接分泌させる。好ましくは、本発明のアルブミン融合蛋白質は、ＭＡＦ、ＩＮＶ、Ｉｇ、フィブリンＢ、クラスタリン、インスリン様成長因子－結合蛋白質４を含む（しかし、これらに限定されない）異種性シグナル配列（例えば、特定の治療用蛋白質に本来存在しないシグナル配列）、キメラＨＳＡ／ＭＡＦを含む（しかし、これに限定されない）変異体ＨＳＡリーダー配列、または当該技術分野で知られた他の異種性シグナル配列を含む。特に好ましくは、表２に挙げたシグナル配列、および／または本明細書の上記セクション「融合蛋白質の発現」および／または「アルブミン融合蛋白質の組換え体および合成産生のさらなる方法」において挙げたシグナル配列である。好ましい実施態様において、本発明の融合蛋白質はさらに、Ｎ－末端メチオニン残基を含む。断片および／または変異体を含むこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。

【０９１５】

用いた発現系に依存して異なるプロトコルにより、哺乳類細胞株の上清由来のアルブミン融合蛋白質を精製する。

【０９１６】

ＣＨＯおよび２９３Ｔ細胞株からの精製

ＣＨＯ細胞上清または一過性形質移入２９３Ｔ細胞上清からのアルブミン融合蛋白質の精製は、リン酸ナトリウムバッファーおよびリン酸塩濃度勾配溶出を用いたアニオン性ＨＱ樹脂での捕獲、次に、塩勾配溶出を用いたブルーセファロースＦＦカラムでのアフィニティークロマトグラフィーを含む。ブルーセファロースＦＦは、主なＢＳＡ／フェチュイン混入物を除去する。リン酸塩勾配を用いたＰｏｒｏｓ　ＰＩ　５０樹脂でのさらなる精製により、エンドトキシン混入物を除去し、低下させ、並びにアルブミン融合蛋白質を濃縮する。

【０９１７】

ＮＳ０細胞株からの精製

ＮＳ０細胞上清からのアルブミン融合蛋白質の精製は、Ｑ－セファロースアニオン交換クロマトグラフィー、次に、溶出工程を含むＳＰ－セファロース精製、溶出工程を含むＰｈｅｎｙｌ－６５０Ｍ精製、最後に、ダイアフィルトレーションを含み得る。

【０９１８】

次に、精製蛋白質をバッファー交換により調製し得る。

【０９１９】

実施例９：アルブミン融合蛋白質のバクテリア発現

ＤＮＡ配列の５’および３’末端に対応するＰＣＲオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、バクテリアシグナル配列を含む本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌ

クレオチドを増幅し、インサート断片を合成する。インサートをコードするポリヌクレオチドの増幅に用いられるプライマーは、好ましくは、増幅産物を発現ベクターにクローニングするためにプライマーの５’末端にＢａｍＨＩおよびＸｂａＩのような制限酵素認識部位を含有する。例えば、ＢａｍＨＩおよびＸｂａＩは、バクテリア発現ベクターｐＱＥ－９（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ）の制限酵素認識部位に対応する。このプラスミドベクターは、抗生物質耐性（Ａｍｐ^{r}）、バクテリアの複製起点（ｏｒｉ）、ＩＰＴＧ誘導性プロモーター／オペレーター（Ｐ／Ｏ）、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）、６－ヒスチジンタグ、および制限酵素クローニングサイトをコードする。

【０９２０】

ｐＱＥ－９ベクターをＢａｍＨＩおよびＸｂａＩで消化し、バクテリアＲＢＳにて開始するリーディングフレームを維持したｐＱＥ－９ベクターに増幅断片をライゲーションする。次に、ライゲーション混合物を用いて、プラスミドｐＲＥＰ４を複数コピー含有する大腸菌株Ｍ１５／ｒｅｐ４（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．）を形質導入できる。そしてそれは、ｌａｃＩリプレッサーを発現し、カナマイシン耐性（Ｋａｎ^{r}）ももたらす。形質転換体をＬＢプレート上での成長能により同定し、アンピシリン／カナマイシン耐性コロニーを選択する。プラスミドＤＮＡを単離し、制限酵素分析により確かめる。

【０９２１】

Ａｍｐ（１００μｇ／ｍｌ）およびＫａｎ（２５μｇ／ｍｌ）の両方を添加したＬＢ培地における液体培養にて、所望のコンストラクトを含有するクローンを一晩（Ｏ／Ｎ）成長させる。Ｏ／Ｎ培養物を用いて、１：１００から１：２５０の比でラージ培養物を播種する。吸光度６００（Ｏ．Ｄ．$_{600}$）０．４から０．６の間まで、細胞を成長させる。次に、ＩＰＴＧ（イソプロピル－Ｂ－Ｄ－チオガラクトピラノシド）を添加し、最終濃度１ｍＭとする。ＩＰＴＧは、ｌａｃＩリプレッサーを不活性化し、Ｐ／Ｏをきれいにして、遺伝子発現の増大を誘発する。

【０９２２】

細胞をさらに３～４時間成長させる。次に、細胞を遠心分離（６０００×ｇにて２０分）により回収する。細胞ペレットを４℃にて３～４時間攪拌して、カオトロピック剤６Ｍグアニジン ＨＣｌ、または好ましくは、８Ｍ 尿素および０．１４Ｍより高濃度の２－メルカプトエタノールに溶解する（例えば、Ｂｕｒｔｏｎら．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１７９：３７９－３８７（１９８９）参照）。細胞片を遠心分離により除去し、ポリペプチド含有上清をニッケル－ニトロ－トリ－酢酸（「Ｎｉ－ＮＴＡ」）アフィニティー樹脂カラム（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，上記より入手可能）にロードする。６×Ｈｉｓタグを有する蛋白質はＮｉ－ＮＴＡ樹脂と高親和性で結合し、単純工程方法で精製できる（詳細については、上記Ｔｈｅ ＱｌＡｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎｉｓｔ （１９９５） ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．を参照）。

【０９２３】

簡単にいうと、６Ｍ グアニジン－ＨＣＬ、ｐＨ８中の上清をカラムにロードする。カラムをまず１０容量の６Ｍ グアニジン－ＨＣＬ、ｐＨ８で洗浄し、次に１０容量の６Ｍ グアニジン－ＨＣＬ、ｐＨ６で洗浄し、最後にポリペプチドを６Ｍ グアニジン－ＨＣＬ、ｐＨ５を用いて溶出する。

【０９２４】

次に、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）、または５０ｍＭ 酢酸ナトリウムバッファー、ｐＨ６および２００ｍＭ ＮａＣｌに対して透析することで、精製蛋白質を復元する。別法では、蛋白質をＮｉ－ＮＴＡカラムに固定化しながら、十分にリフォールディングさせることができる。例示的な条件は次の通りである：５００ｍＭのＮａＣｌ中の直線的勾配６Ｍ～１Ｍの尿素、２０％のグリセロール、プロテアーゼ阻害剤含有２０ｍＭのトリス／ＨＣｌ、ｐＨ７．４を用いて復元させる。復元は、１．５時間以上かけて行われなければならない。復元後、２５０ｍＭのイミダゾールを添加して、蛋白質を溶出する。ＰＢＳまたは５０ｍＭ 酢酸ナトリウム、ｐＨ６および２００ｍＭのＮａＣｌに対する最終透析工程により、イミダゾールを除去する。精製蛋白質を４℃で保存するか、あるいは－８０℃で

凍結する。

【０９２５】

上記の発現ベクターに加えて、本発明はさらに、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドと作動可能に結合したファージオペレーターおよびプロモーターエレメントを含有する、ｐＨＥ４ａ（ＡＴＣＣアクセッション番号２０９６４５、１９９８年2月２５日付で寄託）と呼ばれる発現ベクターを含む。このベクターは、１）選択マーカーとしてネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、２）大腸菌の複製起点、３）Ｔ５ファージプロモーター配列、４）２つのｌａｃオペレーター配列、５）シャイン・ダルガノ配列、および６）ラクトースオペロンリプレッサー遺伝子（ｌａｃＩｑ）を含有する。複製起点（ｏｒｉＣ）は、ｐＵＣ１９（ＬＴＩ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）に由来する。プロモーターおよびオペレーター配列を合成する。

【０９２６】

ＮｄｅＩおよびＸｂａＩ、ＢａｍＨＩ、ＸｈｏＩ、またはＡｓｐ７１８でベクターを消化し、消化産物をゲル泳動し、次に、より大きな断片（詰込み断片は、約３１０塩基対である）を単離することで、ＤＮＡをｐＨＥ４ａに挿入することができる。本明細書に記載のＰＣＲプロトコルまたは当該技術分野で知られた他のものにより、ＮｄｃＩ（５’プライマー）およびＸｂａＩ、ＢａｍＨＩ、ＸｈｏＩ、またはＡｓｐ７１８（３’プライマー）の制限酵素認識部位を有するＰＣＲプライマーを用いて、ＤＮＡインサートを生成する。ＰＣＲインサートをゲル精製し、対応する酵素で消化する。標準的プロトコルにより、インサートとベクターをライゲーションする。

【０９２７】

設計したベクターを上記プロトコルで置換し、バクテリアシステムにおいて蛋白質を発現させる。

【０９２８】

実施例１０：寄託試料からの選択ｃＤＮＡクローンの単離

表３に示す通り、たいていの本発明のアルブミン融合コンストラクトはＡＴＣＣに寄託されたものである。アルブミン融合コンストラクトは、次の発現ベクター：酵母発現ベクターｐＳＡＣ３５、哺乳類発現ベクターｐＣ４、または哺乳類発現ベクターｐＥＥ１２．１のいずれか１つを含み得る。

【０９２９】

ｐＳＡＣ３５（Ｓｌｅｅｐら．，１９９０，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８：４２）、ｐＣ４（ＡＴＣＣアクセッション番号２０９６４６；Ｃｕｌｌｅｎら．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，４３８－４４７（１９８５）；Ｂｏｓｈａｒｔら．，Ｃｅｌｌ　４１：５２１－５３０（１９８５））、およびｐＥＥ１２．１（Ｌｏｎｚａ　Ｂｉｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．；Ｓｔｅｐｈｅｎｓ　ａｎｄ　Ｃｏｃｋｅｔｔ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１７：７１１０（１９８９）；国際公報番号ＷＯ８９／０１０３６；Ｍｕｒｐｈｙら．，Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ．２２７：２７７－２７９（１９９１）；Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：１６９－１７５（１９９２）；米国特許第５，１２２，４６４号；国際公報番号ＷＯ８６／０５８０７）ベクターは、バクテリア細胞での成長のためのアンピシリン耐性遺伝子を含む。Ｈａｎａｈａｎのような当該技術分野で記載された技術を用いて、ＳｔｒａｔａｇｅｎｅＸＬ－１Ｂｌｕｅ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．，１１０１１　Ｎ．Ｔｏｒｒｅｙ　Ｐｉｎｅｓ　Ｒｏａｄ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ，９２０３７）のような大腸菌株に、これらのベクターおよび／またはそれらを含むアルブミン融合コンストラクトを形質導入し、１００μｇ／ｍＬ　アンピシリン含有ＬＢアガープレートに播種し、３７℃で一晩成長させる。

【０９３０】

任意の所定のアルブミン融合コンストラクトについて表３で引用したＡＴＣＣ受託番号を指定した試料中の寄託材料はまた、１以上のさらなるアルブミン融合コンストラクトを含有してもよく、それらはそれぞれ異なるアルブミン融合蛋白質をコードする。従って、

同じＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物は、表３の対応の列において同定した少なくとも１つのアルブミン融合コンストラクトを含有する。

【０９３１】

２種類のアプローチを用いて、表３のアルブミン融合コンストラクトについて引用したプラスミドＤＮＡの寄託試料から、特定のアルブミン融合コンストラクトを単離できる。

【０９３２】

方法１：スクリーニング

まず、当該技術分野で知られた方法により、表１の個々のコンストラクト番号の配列番号：Ｘに対応するポリヌクレオチドプローブを用いて寄託プラスミドＤＮＡ試料をスクリーニングすることにより、アルブミン融合コンストラクトを直接単離することができる。例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ　ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓのＤＮＡの合成装置を用いて、報告された配列に従い、３０～４０ヌクレオチドを有する特定のポリヌクレオチドを合成してもよい。Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、例えば、^{32}Ｐ－γ－ＡＴＰでオリゴヌクレオチドを標識し、通常の方法により精製することができる（例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓら．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ，ＮＹ（１９８２））。当業者に既知の技術（例えば、ベクター供給源により提供されるもの、または上で引用した関連公報または特許）を用いて、上記の適当な宿主（例えば、ＸＬ－１（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ））に所定のＡＴＣＣ寄託物由来のアルブミン融合コンストラクトを形質転換する。１．５％のアガロースプレート（適当な選択剤、例えば、アンピシリンを含有する）上に、１プレート当たり約１５０個の形質転換体（クローン）密度で形質転換体を播種する。バクテリアのコロニースクリーニングの通常の方法（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ　Ｅｄｉｔ．，（１９８９），Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，ｐ．１．９３～１．１０４）、または当業者に既知の他の技術により、ナイロンメンブレンを用いてこれらのプレートをスクリーニングする。

【０９３３】

方法２：ＰＣＲ

別法では、例えば、寄託した所定のアルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡの５’および３’アルブミン融合コンストラクトとハイブリダイズする１７～２０ヌクレオチドからなる２つのプライマーを用いて、配列番号：Ｘを有する寄託したアルブミン融合コンストラクト試料から、所定のアルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡを増幅する。ポリメラーゼ連鎖反応を、通常の条件、例えば、上記ｃＤＮＡテンプレート０．５μｇを含む反応混合物２５μｌにおいて行う。好ましい反応混合物は、１．５～５ｍＭの$MgCl_2$、０．０１％（ｗ／ｖ）のゼラチン、２０μＭの各ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ、２５ｐｍｏｌの各プライマー、および０．２５ＵのＴａｑポリメラーゼである。Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｃｅｔｕｓ自動化サーマルサイクラーを用いて、３５サイクルのＰＣＲ（変性９４℃、１分；アニーリング５５℃、１分；伸長７２℃、１分）を行う。アガロースゲル電気泳動により、増幅産物を分析し、予測分子量を有するＤＮＡバンドを切り出し、精製する。ＤＮＡ産物をサブクローニングし、配列決定することで、ＰＣＲ産物が選択配列のものであることを証明する。

【０９３４】

いくつかの方法を、寄託クローンに存在しない遺伝子の５’または３’非コード部分の同定に利用することができる。これらの方法は、フィルター探査、特定のプローブを用いたクローン濃縮、および当該技術分野で知られた５’および３’「ＲＡＣＥ」プロトコルに類似または同一のプロトコルを含むが、これらに限定されない。例えば、５’ＲＡＣＥに類似の方法は、所望の５’末端を欠いた全長転写物の生成に利用可能である（Ｆｒｏｍｏｎｔ－Ｒａｃｉｎｅら．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．，２１（７）：１６８３－１６８４（１９９３））。

【０９３５】
簡単にいうと、特定のＲＮＡオリゴヌクレオチドをおそらく全長遺伝子ＲＮＡ転写物を含有するＲＮＡ集団の５’末端にライゲーションする。ライゲーションしたＲＮＡオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の既知の配列に特異的なプライマーを含有するプライマーセットを用いて、所望の全長遺伝子の５’部分をＰＣＲ増幅する。次に、この増幅産物を配列決定し、これを用いて全長遺伝子を生成する。
【０９３６】
上記方法は、所望の供給源から単離したトータルＲＮＡで開始し、ポリ－Ａ$^{+}$ＲＮＡを用い得る。次に、後のＲＮＡリガーゼ工程と干渉し得る変性または損傷ＲＮＡ上の５’ホスフェート基の除去が必要なら、ＲＮＡ調製物をホスファターゼで処理できる。次に、ホスファターゼを不活性化し、メッセンジャーＲＮＡの５’末端に存在するキャップ構造を除去するために、タバコ酸性ピロホスファターゼでＲＮＡを処理する。この反応により、Ｔ４　ＲＮＡリガーゼを用いてＲＮＡオリゴヌクレオチドにライゲーションすることができるキャップ開裂ＲＮＡの５’末端の５’ホスフェート基を除去する。
【０９３７】
この修飾ＲＮＡ調製物を遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを用いた１本鎖ｃＤＮＡ合成のテンプレートとして用いる。ライゲーションしたＲＮＡオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の既知の配列に特異的なプライマーを用いる所望の５’末端のＰＣＲ増幅のテンプレートとして、１本鎖合成反応物を用いる。次に、生じた産物を配列決定し、分析して、５’末端配列が所望の遺伝子に属することを確認する。
【０９３８】
実施例１１：複数融合した融合物
アルブミン融合蛋白質（例えば、アルブミン（またはその断片または変異体）と融合した治療用蛋白質（またはその断片または変異体）を含有する）をさらに他の蛋白質と融合させ、「複数融合した融合物」を生成する。これらの複数融合した蛋白質を様々な応用に用いることができる。例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質のＨｉｓ－タグ、ＨＡ－タグ、蛋白質Ａ、ＩｇＧドメイン、およびマルトース結合タンパク質との融合物は、精製を促進する（例えば、ＥＰ　Ａ　３９４，８２７；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら．，Ｎａｔｕｒｅ　３３１：８４－８６（１９８８））。本発明のポリペプチドに融合した核局在性シグナルは、細胞内局在性に特異的な蛋白質を標的とすることができるが、共有結合ヘテロ２量体、ホモ２量体は、アルブミン融合蛋白質の活性を増大または低減することができる。さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質とのさらなる蛋白質配列の融合物は、融合蛋白質の溶解性および／または安定性をさらに増大させることができる。当該技術分野で知られた技術を用いて、またはそれを一般的に変形して、および／または次のプロトコルを変形して上記融合蛋白質を作製する。ポリペプチドのＩｇＧ分子との融合物の要点を述べる。
【０９３９】
簡単にいうと、以下の配列の５’および３’末端に及ぶプライマーを用いて、ＩｇＧ分子のヒトＦｃ部分をＰＣＲ増幅することができる。好ましくは、これらのプライマーはまた、発現ベクター、好ましくは、哺乳類または酵母発現ベクターへのクローニングを促進する制限酵素認識部位を有する。
【０９４０】
例えば、ｐＣ４（ＡＴＣＣアクセッション番号２０９６４６）を用いる場合、ヒトＦｃ部分をＢａｍＨＩクローニング部位にライゲーションすることができる。３’ＢａｍＨＩ部位を破壊しないよう注意されたい。次に、ヒトＦｃ部分含有ベクターをＢａｍＨＩで再び消化し、ベクターを直鎖化し、次に、このＢａｍＨＩ部位に本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド（当該技術分野で知られた技術を用いて生成し、単離したもの）をライゲーションする。本発明の融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを終止コドンなしでクローニングし、そうでなければ、融合蛋白質含有Ｆｃが生成されないことに注意されたい。
【０９４１】

天然に存在するシグナル配列を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質を生成する場合、ｐＣ４は第２のシグナルペプチドを必要としない。別法では、天然に存在するシグナル配列を用いない場合、ベクターを異種性シグナル配列を含むように修飾し得る（例えば、国際公報番号ＷＯ９６／３４８９１を参照）。

【０９４２】

ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域：

GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAATTCGAGGGTGCACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACTCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
AAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAACCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGC
GACTCTAGAGGAT（配列番号：５２）

【０９４３】

実施例１２：アルブミン融合蛋白質からの抗体の産生

ハイブリドーマ技術

本発明のアルブミン融合蛋白質、および本発明のアルブミン融合蛋白質の部分（例えば、治療用蛋白質部分、または融合蛋白質のアルブミン部分）を種々の方法により製造することができる（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，　Ｃｈａｐｔｅｒ　２．を参照）。かかる方法の１つの例として、本発明のアルブミン融合蛋白質または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分の調製物を製造し、精製して、実質的に天然の混入物がない状態にする。次に、より高い特異的活性のポリクローナル抗血清を産生するために、かかる調製物を動物に導入する。

【０９４４】

ハイブリドーマ技術（Ｋｏｈｌｅｒら．，Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５（１９７５）；Ｋｏｈｌｅｒら．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５１１（１９７６）；Ｋｏｈｌｅｒら．，Ｅｕｒ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：２９２（１９７６）；Ｈａｍｍｅｒｉｎｇら．，ｉｎ：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．，ｐｐ．５６３－６８１（１９８１））を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分に特異的なモノクローナル抗体を製造する。一般に、動物（好ましくは、マウス）を本発明のアルブミン融合蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分を用いて免疫する。かかるマウスの脾細胞を抽出し、適当なミエローマ細胞株と融合する。本発明をふまえて、任意の適当なミエローマ細胞株を利用し得る；しかしながら、好ましくは、ＡＴＣＣから入手可能な親ミエローマ細胞株（ＳＰ２０）を利用する。融合後、生じたハイブリドーマ細胞をＨＡＴ培地で選択的に維持し、次に、Ｗａｎｄ等（Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ８０：２２５－２３２（１９８１））により記載された限界希釈により、クローニングする。次に、かかるセレクションにより得たハイブリドーマ細胞をアッセイして、本発明のアルブミン融合蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分と結合可能な抗体を分泌するクローンを同定する。

【０９４５】

別法では、抗イディオタイプ抗体を用いた２工程方法において、本発明のアルブミン融合蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分と結合可能なさらなる抗体を産生することができる。かかる方法は、抗体がそれ自体抗原であり、それ故、２次抗体と結合する抗体を得ることができるという事実を用いるものである。この方法に従い、抗体特異的蛋白質を用い、動物、好ましくは、マウスを免疫する。次に、かかる動物の脾細胞を用いて、ハイブリドーマ細胞を産生し、本発明のアルブミン融合蛋白質（または本発明のア

ルブミン融合蛋白質の部分）特異的抗体と結合する能力が、本発明の融合蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分によりブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定する。かかる抗体は、本発明の融合蛋白質（または、本発明のアルブミン融合蛋白質の部分）特異的抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、これを用いて、動物を免疫し、さらなる本発明の融合蛋白質（本発明のアルブミン融合蛋白質の部分）特異的抗体の形成を誘導する。

【０９４６】

抗体のヒトでのインビボ使用のため、抗体を「ヒト化」する。上記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞由来の遺伝子コンストラクトを用いて、かかる抗体を産生できる。キメラおよびヒト化抗体を産生する方法は、当該技術分野で知られており、本明細書で考察される（参考として、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４（１９８６）；Ｃａｂｉｌｌｙら．，米国特許第４，８１６，５６７；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら．，ＥＰ　１７１４９６；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら．，ＥＰ　１７３４９４；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら．，ＷＯ８６０１５３３；Ｒｏｂｉｎｓｏｎら．，国際公報番号ＷＯ８７０２６７１；Ｂｏｕｌｉａｎｎｅら．，Ｎａｔｕｒｅ　３１２：６４３（１９８４）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら．，Ｎａｔｕｒｅ３１４：２６８（１９８５）を参照されたい）。

【０９４７】

ｓｃＦｖｓライブラリーからの本発明のアルブミン融合蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分に対する抗体断片の単離

ヒトＰＢＬから単離した天然に存在するＶ遺伝子を、本発明のアルブミン融合蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分に対する反応性を含有する抗体断片ライブラリーに構築し、それに対してドナーを曝露するか、あるいはしない（例えば、米国特許第５，８８５，７９３（引用により全体として本明細書に取り込まれる）参照）。

【０９４８】

ライブラリーのレスキュー

ｓｃＦｖｓライブラリーを国際公開番号ＷＯ９２／０１０４７において記載のヒトＰＢＬのＲＮＡから構築する。抗体断片をディスプレーするファージをレスキューするため、ファージミドを宿す大腸菌約10^9個を１％のグルコースおよび１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する２×ＴＹ（２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＧＬＵ）５０ｍｌに播種し、振盪しながらＯ．Ｄ．０．８まで成長させる。この培養液５ｍｌを用いて、２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＧＬＵ　５０ｍｌに播種し、δ遺伝子３ヘルパー２×１０８ＴＵ（Ｍ１３δ遺伝子ＩＩＩ、国際公報番号ＷＯ９２／０１０４７参照）を添加し、培養物を３７℃で４５分間、振盪せずにインキュベーションし、次に３７℃で４５分間、振盪しながらインキュベーションする。培養物を４０００ｒｐｍにて１０分間遠心し、ペレットを１００μｇ／ｍｌのアンピシリンおよび５０μｇ／ｍｌのカナマイシン含有２×ＴＹ　２Ｌ中に再懸濁し、一晩成長させる。ファージを国際公報番号ＷＯ９２／０１０４７に記載の通り調製する。

【０９４９】

Ｍ１３δ遺伝子ＩＩＩを次の通り調製する：Ｍ１３δ遺伝子ＩＩＩヘルパーファージは、遺伝子ＩＩＩ蛋白質をコードせず、ゆえに、抗体断片をディスプレーするファージ（ミド）は、より高い抗体との結合親和性を有する。ファージ形態形成中に野生型遺伝子ＩＩＩ蛋白質を供給するｐＵＣ１９派生物を宿す細胞においてヘルパーファージを成長させることにより、感染性Ｍ１３δ遺伝子ＩＩＩ粒子を作製する。培養物を３７℃で１時間、振盪せずにインキュベーションし、次に、３７℃でさらに１時間、振盪しながらインキュベーションする。細胞をスピンダウン（ＩＥＣ－Ｃｅｎｔｒａ　８，４００ｒｐ、１０分間）し、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンおよび２５μｇ／ｍｌのカナマイシン含有２×ＴＹブロス（２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＫＡＮ）に再懸濁し、３７℃で一晩、振盪しながら成長させる。ファージ粒子を精製し、培地から２ＰＥＧ－沈殿法（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ら．，１９９０）により濃縮し、ＰＢＳ２ｍｌに再懸濁し、０．４５μｍのフィルター（Ｍｉｎｉｓａｒｔ　ＮＭＬ；Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）を通し、最終密度約10^{13}（単位／ｍｌに

変換）のクローンとした。

【０９５０】

ライブラリーのパニング　イムノチューブ（Ｎｕｎｃ）を１００μｇ／ｍｌまたは１０μｇ／ｍｌのいずれかの本発明のアルブミン融合蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分４ｍｌを含むＰＢＳで一晩コートする。チューブを２％のＭａｒｖｅｌ－ＰＢＳを用いて３７℃で２時間ブロッキングし、次に、ＰＢＳにて３回洗浄する。ファージ約10^{13}ＴＵをチューブにアプライし、室温で３０分間、上下方向の（ｏｖｅｒ　ａｎｄ　ｕｎｄｅｒ）回転板上で混和しながらインキュベーションし、次に、さらに１．５時間立てたままでインキュベーションする。チューブを０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳで１０回洗浄し、ＰＢＳで１０回洗浄する。１００ｍＭのトリエチルアミン１ｍｌを添加し、上下方向の回転板上で１５分間混和することで、ファージを溶出し、その後、直ちに１．０Ｍのトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．４　０．５ｍｌを用いて溶液を中和する。次に、溶解したファージをバクテリアと３７℃で３０分間インキュベーションすることで、ファージをｍｉｄ－ｌｏｇ大腸菌ＴＧＩ　１０ｍｌに感染させる。次に、大腸菌を１％のグルコースおよび１００μｇ／ｍｌのアンピシリン含有ＴＹＥプレート上に播種する。次に、生じたバクテリアライブラリーを上述のδ遺伝子３ヘルパーファージでレスキューし、次の選択工程のためファージを調製する。次に、合計４ラウンドの親和性精製についてこの工程を繰り返す。ここで、０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳでのチューブの洗浄を２０回、そして３ラウンドと４ラウンドのＰＢＳでの洗浄を２０回に増やす。

【０９５１】

結合体の特徴決定　３ラウンドおよび４ラウンド目の選択物から溶出したファージを用いて、大腸菌ＨＢ２１５１を感染させ、アッセイのためシングルコロニーから溶解性ｓｃＦｖを生成する（Ｍａｒｋｓら．，１９９１）。５０ｍＭの重炭酸塩、ｐＨ９．６中の１０ｐｇ／ｍｌの本発明のアルブミン融合蛋白質、または本発明のアルブミン融合蛋白質の部分のいずれかでコートしたマイクロタイタープレートを用いて、ＥＬＩＳＡを行う。ＰＣＲフィンガープリント（例えば、公開公報番号ＷＯ９２／０１０４７を参照）、次に、配列決定により、ＥＬＩＳＡをさらに特徴付ける。例えば、エピトープマッピング、結合親和性、受容体シグナル伝達、抗体／抗原結合をブロックするかあるいは完全に阻害する能力、および競合的アゴニストまたはアンタゴニスト活性のような、当該技術分野で知られた技術を用いて、ＥＬＩＳＡポジティブクローンをさらに特徴付ける。

【０９５２】

実施例１３：［^{3}Ｈ］－２－デオキシグルコース取り込みアッセイ

脂肪、骨格筋、および肝臓はインスリン感受性組織である。インスリンは、グルコース取り込み／これらの組織への輸送を刺激することができる。脂肪および骨格筋の場合、インスリンは、実際に特定の細胞内区画から細胞表面へのグルコース輸送体４分子ＧＬＵＴ４の転位を導くシグナル伝達を開始させる。細胞表面上で、ＧＬＵＴ４はグルコース取り込み／輸送が可能になる。

【０９５３】

［^{3}Ｈ］－２－デオキシグルコース取り込み

多数の脂肪および筋肉関連細胞株を用いて、糖尿病の処置のために挙げた治療剤の任意の１種以上の組合せの不存または存在下でグルコース取り込み／輸送活性を試験することができる。具体的には、［^{3}Ｈ］－２－デオキシグルコース取り込みアッセイの適当なインビトロモデルとなるように、３Ｔ３－Ｌ１マウス線維芽細胞およびＬ６マウス骨格筋細胞をそれぞれ３Ｔ３－Ｌ１脂肪細胞および筋管に分化させる（Ｕｒｓｏら．，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，２７４（４３）：３０８６４－７３（１９９９）；Ｗａｎｇら．，Ｊ　Ｍｏｌ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ，１９（３）：２４１－８（１９９７）；Ｈａｓｐｅｌら．，Ｊ　Ｍｅｍｂｒ　Ｂｉｏｌ，１６９（１）：４５－５３（１９９９）；Ｔｓａｋｉｒｉｄｉｓら．，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ，１３６（１０）：４３１５－２２（１９９５））。簡単にいうと、2×10^{5}細胞／１００μＬ　脂肪細胞または分化したＬ６細胞を、分化後培地を入れた処理（すなわち、５０μｇ／ｍＬ　ポリ－Ｌ－リジンでコート）９

６ウェル組織培養「ＴＣ」に移し、３７℃、５％ CO_2にて一晩インキュベーションする。まず、細胞を無血清低グルコースＤＭＡＭ培地で１回洗浄し、次に、１００μＬ／ウェル 同じ培地、および１００μＬ／ウェル バッファーまたは糖尿病の処置のために挙げた治療剤の任意の１種以上の組合せ、例えば、１ｎＭ、１０ｎＭ、および１００ｎＭの増加濃度の本発明の治療剤（例えば、配列番号：Ｙとして開示した特定の融合物、およびその断片および変異体）のいずれかと、１ｎＭ インスリンの不存または存在下、３７℃で１６時間飢餓状態におく。プレートを、１００μＬ／ウェルのＨＥＰＥＳ緩衝食塩水で３回洗浄する。インスリンをＨＥＰＥＳ緩衝食塩水中１ｎＭにて添加し、１０μＭの［^{3}Ｈ］－２－デオキシグルコース（Ａｍｅｒｃｈａｍ、番号ＴＲＫ６７２）および１０μＭの非標識２－デオキシグルコース（ＳＩＧＭＡ、Ｄ－３１７９）の存在下、３７℃で３０分間インキュベーションする。対照として、インスリン不存以外同じ条件のものを行う。最終濃度１０μＭのサイトカラシンＢ（ＳＩＧＭＡ、Ｃ６７６２）を別々のウェルに１０μＬ／ウェルにて添加し、非特異的な取り込みを測定する。細胞をＨＥＰＥＳ緩衝食塩水で３回洗浄する。標識、すなわち、１０μＭの［^{3}Ｈ］－２－デオキシグルコース、および非標識、すなわち、１０μＭの２－デオキシグルコースを添加し、室温にて１０分間インキュベーションする。細胞を冷リン酸緩衝食塩水「ＰＢＳ」で３回洗浄する。０．２のＮａＯＨを１５０μＬ／ウェルにて添加して、細胞を溶解し、次に、室温で２０分間振盪しながらインキュベーションする。次に、試料をシンチレーションバイアルに移し、それにシンチレーション溶液５ｍＬを添加する。バイアルをβ－シンチレーションカウンターにてカウントする。インスリンの不存または存在が異なるデュプリケートの条件下での取り込みを、次の方程式：［（１分間当たりのインスリンカウント「ｃｐｍ」－非特異的ｃｐｍ）／（インスリンなしのｃｐｍ－非特異的ｃｐｍ）］を用いて決定する。応答平均は、脂肪細胞および筋管それぞれについて、対照の約５倍から３倍の範囲内となる。

【０９５４】

細胞の分化

細胞を、Ｔ－７５ｃｍ^{2}フラスコ中完全なコンフルエントとする。培地を除去し、前分化培地２５ｍＬと置き換え、４８時間インキュベーションする。細胞を３７℃、５％のCO_2、湿度８５％にてインキュベーションする。４８時間後、前分化培地を除去し、分化培地２５ｍＬと置き換え、４８時間インキュベーションする。細胞を再び３７℃、５％のCO_2、湿度８５％にてインキュベーションする。４８時間後、培地を除去し、分化後培地３０ｍＬと置き換える。１４～２０日間、あるいは分化を完全に達成するまで、分化後培地を維持する。培地を２～３日毎に交換する。ヒト脂肪細胞はＺｅｎ－Ｂｉｏ，ＩＮＣ（番号ＳＡ－１０９６）から購入できる。

【０９５５】

実施例１４：膵臓細胞株への［^{3}Ｈ］－チミジン取り込みのインビトロアッセイ

最近、ＧＬＰ－１が、膵島十二指腸ホメオボックス－１（ＩＤＸ－１）およびインスリンｍＲＮＡレベルの増大と関連する時間および用量に依存した方法でラット膵管上皮細胞株ＡＲＩＰの分化を誘導することが示された（Ｈｕｉら．，２００１，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，５０（４）：７８５－９６）。ＩＤＸ－１は順に、ＧＬＰ－１受容体のｍＲＮＡレベルを増大させる。

【０９５６】

試験した細胞種類

ＲＩＮ－Ｍ細胞：これらの細胞は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ細胞株番号ＣＲＬ－２０５７）より入手可能である。ＲＩＮ－Ｍ細胞株は、放射線誘発性の移植可能なラット膵島細胞腫瘍からもたらされたものである。腫瘍のヌードマウス異種移植から細胞株を確立した。細胞は、膵島ポリペプチドホルモンを産生して分泌し、かつＬ－ドーパデカルボキシラーゼ（アミン前駆体取り込みおよび脱炭酸反応、またはＡＰＵＤ、活性を有する細胞のマーカー）を産生する。

【０９５７】

ＡＲＩＰ細胞：これらは、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ細胞株番号ＣＲＬ－１６７４）から入手可能な上皮形態の膵外分泌腺細胞である。参考文献：Ｊｅｓｓｏｐ，Ｎ．Ｗ．ａｎｄ Ｈａｙ，Ｒ．Ｊ．，”Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃｓ ｏｆ ｔｗｏ ｒａｔ ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ ｅｘｏｃｒｉｎｅ ｃｅｌｌ ｌｉｎｅｓ ｄｅｒｉｖｅｄ ｆｒｏｍ ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｂｌｅ ｔｕｍｏｒｓ，”Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ １６：２１２，（１９８０）；Ｃｏｃｋｅｌｌ，Ｍ．ら．，”Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｃｅｌｌ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ＤＮＡ－ｂｉｎｄｉｎｇ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｔｈａｔ ｉｎｔｅｒａｃｔｓ ｗｉｔｈ ａ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｏｆ ｇｅｎｅｓ ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ｉｎ ｔｈｅ ａｃｉｎａｒ ｐａｎｃｒｅａｓ，”Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．９：２４６４－２４７６，（１９８９）；Ｒｏｕｘ，Ｅ．，ら．”Ｔｈｅｃｅｌｌ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ ＰＴＦ１ ｃｏｎｔａｉｎｓ ｔｗｏ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｓｕｂｕｎｉｔｓ ｔｈａｔ ｉｎｔｅｒａｃｔ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ＤＮＡ”Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：１６１３－１６２４，（１９８９）；およびＨｕｉ，Ｈ．，ら．，“Ｇｌｕｃａｇｏｎ－ｌｉｋｅ ｐｅｐｔｉｄｅ １ ｉｎｄｕｃｅｓ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｓｌｅｔ ｄｕｏｄｅｎａｌ ｈｏｍｅｏｂｏｘ－１－ｐｏｓｉｔｉｖｅ ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ ｄｕｃｔａｌ ｃｅｌｌｓ ｉｎｔｏ ｉｎｓｕｌｉｎ－ｓｅｃｒｅｔｉｎｇ ｃｅｌｌｓ，” Ｄｉａｂｅｔｅｓ ５０： ７８５－７９６ （２００１）も参照されたい。

【０９５８】

細胞の調製

ＲＩＮ－Ｍ細胞株を１０％のウシ胎児血清（ＨｙＣｌｏｎｅ、番号ＳＨ３００８８．０３）を含むＲＰＭＩ １６４０培地（ＨｙＣｌｏｎｅ、番号ＳＨ３０００２７．０１）にて成長させ、１：３から１：６の比で６から８日毎に継代培養する。培地を３～４日毎に交換する。

【０９５９】

ＡＲＩＰ細胞株（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１６７４）を１．５ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムおよび１０％のウシ胎児血清を含有するよう調節した２ｍＭのＬ－グルアミンを含むＨａｍ’ｓ Ｆ１２Ｋ培地（ＡＴＣＣ番号３０－２００４）にて成長させる。ＡＲＩＰ細胞株を１週間に２回１：３から１：６の比で継代培養する。培地を３から４日毎に交換する。

【０９６０】

アッセイプロトコル

９６ウェルプレート中４０００細胞／ウェルにて細胞を播種し、５０％のコンフルエントまで４８～７２時間培養する。１００μＬ／ウェルの無血清培地に細胞を切り換える。４８～７２時間インキュベーション後、血清および／または本発明の治療剤（例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質、およびその断片および変異体）をウェルに添加する。インキュベーションをさらに３６時間続ける。［^{3}Ｈ］－チミジン（５～２０Ｃｉ／ｍｍｏｌ）（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ、番号ＴＲＫ１２０）を、１μＣｉ／マイクロタイターに希釈する。３６時間インキュベーション後、１ウェル当たり５マイクロタイターを添加し、さらに２４時間インキュベーションする。細胞を冷リン酸緩衝食塩水「ＰＢＳ」にて１回軽く洗浄することで、反応を終結させる。次に、１０％の氷冷ＴＣＡ １００マイクロタイターを用いて、４℃にて１５分間細胞を固定する。ＰＢＳを除去し、０．２ ＮａＯＨ ２００マイクロタイターを添加する。プレートを室温にて１時間、振盪しながらインキュベーションする。溶液をシンチレーションバイアルに移し、水溶液に合ったシンチレーション液５ｍＬを添加し、勢いよく混合する。バイアルをβシンチレーションカウンターにてカウントする。負対照として、バッファーのみを用いる。正対照として、ウシ胎児血清を用いる。

【０９６１】

実施例１５：糖尿についてのアッセイ

糖尿（すなわち、尿中の過剰な糖）は容易にアッセイでき、これは糖尿病の疾患状態の指標とおなる。正常患者試料と比較して、患者試料中の過剰な尿は、ＩＤＤＭおよびＮＩＤＤＭの徴候である。結果として、生じた尿中の過剰なグルコースの量の低減により、かかるＩＤＤＭおよびＮＩＤＤＭを有する患者の処置の有効性を示す。ＩＤＤＭおよびＮＩＤＤＭのモニタリングの好ましい実施態様において、当該技術分野で知られた技術を用いて、患者由来の尿試料をグルコースの存在についてアッセイする。ヒトの糖尿は尿のグルコース濃度が１００ｍｌあたり１００ｍｇを超えるものと定義する。血液試料を採取し、血清グルコースをアッセイして、糖尿を示すそれらの患者の過剰な糖濃度をより正確に測定できる。

【０９６２】

実施例１６：Ｂ細胞の増殖および分化の刺激または阻害を検出するアッセイ

機能的な液性免疫応答の作製は、Ｂ細胞系統とそれらの微小環境の間の溶解性および同族シグナル伝達経路を必要とする。シグナルは、Ｂ細胞系統にそのプログラム化された発生を続けさせる陽性刺激、またはその現行の発生経路を阻止することを細胞に指示するネガティブな刺激を伝え得る。これまでに、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ１０、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４およびＩＬ－１５を含む多数の刺激および阻害シグナルが、Ｂ細胞応答に影響することが見出されてきた。興味深いことに、これらのシグナルはそれ自体は弱いエフェクターであるが、様々な同時刺激蛋白質と組み合わされてＢ細胞集団間での活性化、増殖、分化、ホーミング、寛容、および死を誘導することができる。

【０９６３】

Ｂ細胞同時刺激蛋白質の最も研究された種類の１つが、ＴＮＦスーパーファミリーである。このファミリーの中で、ＣＤ４０、ＣＤ２７、およびＣＤ３０、加えてそれらのそれぞれのリガンドであるＣＤ１５４、ＣＤ７０、およびＣＤ１５３が、種々の免疫応答を調節することが見出された。これらのＢ細胞集団およびそれらの前駆体の増殖および分化の検出および／または観察を可能にするアッセイは、種々の蛋白質が増殖および分化に関してこれらのＢ細胞に対して効果を有するかを決定する際の価値あるツールである。Ｂ細胞集団およびそれらの前駆体の分化、増殖、または阻害の検出を可能にするよう指向した２種のアッセイを以下に示す。

【０９６４】

本発明のアルブミン融合蛋白質（治療用蛋白質の断片または変異体、および／またはアルブミンまたはアルブミンの断片または変異体を含有する融合蛋白質を含む）のインビトロアッセイは、Ｂ細胞集団およびそれらの前駆体において活性化、増殖、分化、または阻害、および／または死を誘導するその能力について評価することができる。本発明のアルブミン融合蛋白質の精製ヒト扁桃Ｂ細胞に対する活性（用量範囲０．１から１０，０００ｎｇ／ｍＬに渡り定量的に測定）を、標準的Ｂリンパ球同時刺激アッセイ（ここで、精製扁桃Ｂ細胞は、起爆剤であるホルマリン固定スタフィロコッカス・アウレウス・コーワン（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｓｕｓ　Ｃｏｗａｎ）Ｉ（ＳＡＣ）または固定化抗ヒトＩｇＭ抗体の存在下で培養される）にて評価する。ＩＬ－２およびＩＬ－１５のような第２シグナルは、トリチウムチミジン取り込みにより測定するＢ細胞増殖を顕現させるために、ＳＡＣとＩｇＭの架橋と相乗作用する。このアッセイを用いて、新規相乗因子を容易に同定することができる。アッセイは、磁石ビーズ（ＭＡＣＳ）によりＣＤ３陽性細胞を減少させることによるヒト扁桃Ｂ細胞の単離を含む。生じた細胞集団は９５％より多いＢ細胞を有し、これをＣＤ４５Ｒ（Ｂ２２０）の発現により評価する。

【０９６５】

各試料の種々の希釈物を９６ウェルプレートの個々のウェルに入れ、そこに合計容量１５０μｌの培地（１０％のＦＢＳ、５×10^{-5}Ｍの２ＭＥ、１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、１０μｇ／ｍｌのストレプトマイシン、および10^{-5}のＳＡＣ希釈液含有ＲＰＭＩ１６４０）に懸濁したＢ細胞10^{5}個を添加する。３Ｈ－チミジン（６．７Ｃｉ／ｍＭ）で２０時間パルス（１μＣｉ／ウェル）し、７２時間後に因子を添加して、増殖または

阻害を定量する。正および負対照は、それぞれＩＬ２および培地である。

【０９６６】

インビボアッセイ－ＢＡＬＢ／ｃマウスに、バッファーのみまたは２ｍｇ／Ｋｇの本発明のアルブミン融合蛋白質（治療用蛋白質の断片または変異体および／またはアルブミンまたはアルブミンの断片または変異体を含む）を１日２回注射（腹腔内）する。連続して４日間この処置を受けた時点でマウスを屠殺し、分析のために種々の組織および血清を回収する。正常な脾臓および本発明のアルブミン融合蛋白質で処置した脾臓由来のＨＥ染色切片を比較することで、動脈周囲リンパ鞘の分布および／または赤脾髄領域の有核細胞の有意な増加のような融合蛋白質の脾細胞に対する活性結果を同定する。そしてそれはＢ細胞集団の分化および増殖の活性化を示し得る。Ｂ細胞マーカー抗ＣＤ４５Ｒ（Ｂ２２０）を用いた免疫組織化学研究を用いて、脾臓の破壊のような脾細胞に対する任意の生理的変化が、確立したＴ細胞領域に浸潤する緩く規定されたＢ細胞ゾーン内でのＢ細胞顕現の増大によるものであるかどうかを決定する。

【０９６７】

アルブミン融合蛋白質で処置したマウス由来の脾臓のフローサイトメトリー分析を用いて、アルブミン融合蛋白質が、対照マウスで観察するものより、ＴｈＢ$^{+}$、ＣＤ４５Ｒ（Ｂ２２０）ｄｕｌｌＢ細胞部分を特異的に増大させるかどうかを示す。

【０９６８】

同様に、予測した結果であるインビボでの成熟Ｂ細胞顕現の増大は、血清ＩｇタイターのＩｇＭおよびＩｇＡレベルを、バッファーで処置したマウスと融合蛋白質で処置したマウスとの間で比較する。

【０９６９】

実施例１７：Ｔ細胞増殖アッセイ

ＣＤ３誘発性増殖アッセイをＰＢＭＣにおいて行い、^{3}Ｈ－チミジンの取り込みにより測定する。アッセイを次のように行う。９６ウェルプレートを、１００μｌ／ウェルのＣＤ３０に対するｍＡｂ（ＨＩＴ３ａ、Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）またはアイソタイプ一致対照ｍＡｂ（Ｂ３３．１）を用いて４℃にて一晩コートし（０．５Ｍの重炭酸バッファー、ｐＨ９．５中１μｇ／ｍｌ）、次に、ＰＢＳで３回洗浄する。Ｆ／Ｈ勾配遠心法により、ヒト末梢血からＰＢＭＣを単離し、ｍＡｂコートプレートの４組のウェルに（５×１０^{4}／ウェル）１０％のＦＢＳおよびＰ／Ｓ含有ＲＰＭＩ中、各濃度の本発明のアルブミン融合蛋白質（治療用蛋白質の断片または変異体および／またはアルブミンまたはアルブミンの断片または変異体を含有する融合蛋白質を含む）の存在下（合計容量２００μｌ）で添加する。対照は、関連する蛋白質バッファーおよび培地のみのものである。３７℃で４８時間培養後、増殖に対する効果を観察したなら、プレートを１０００ｒｐｍで２分間遠心し、上清１００μｌを取り出し、ＩＬ－２（または他のサイトカイン）を測定するため－２０℃で保存する。ウェルに０．５μＣｉの^{3}Ｈ－チミジン含有培地１００μｌを添加し、３７℃で１８～２４時間培養する。ウェルを回収し、^{3}Ｈ－チミジンの取り込みを増殖の目安として用いる。増殖の正対照は、抗ＣＤ３０のみのものである。増殖を増強させる対照として、ＩＬ－２（１００Ｕ／ｍｌ）も用いる。本発明の融合蛋白質の効果の負対照として、Ｔ細胞の増殖を誘導しない対照抗体を用いる。

【０９７０】

実施例１８：ＭＨＣクラスＩＩ、同時刺激分子、および接着分子の発現、および単球および単球由来ヒト樹状細胞の細胞分化に対する本発明の融合蛋白質の効果

末梢血に見られる前駆体を増殖させて拡大し、樹状細胞を生成する：接着性ＰＢＭＣまたは洗浄単球画分をＧＭ－ＣＳＦ（５０ｎｇ／ｍｌ）およびＩＬ－４（２０ｎｇ／ｍｌ）と共に７～１０日間培養する。これらの樹状細胞は、未成熟細胞の特徴的表現型（ＣＤ１、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ４０、およびＭＨＣクラスＩＩ抗原の発現）を有する。ＴＮＦ－αの様な活性化因子での処置により、表面表現型の急激な変化（ＭＨＣクラスＩおよびＩＩ、同時刺激分子、および接着分子の発現の増大、ＦＣγＲＩＩのダウンレギュレーション、ＣＤ８３のアップレギュレーション）を引き起こす。これらの変化は、樹状細胞

の抗原提示能の増大および機能的成熟と関連する。

【０９７１】

表面抗原のＦＡＣＳ分析を次の通りに行う。細胞を、増加濃度の本発明のアルブミン融合蛋白質またはＬＰＳ（正対照）で１～３日間処理し、１％のＢＳＡおよび０．０２ｍＭのアジ化ナトリウム含有ＰＢＳで洗浄し、次に、１：２０希釈の適当なＦＩＴＣまたはＰＥ標識モノクローナル抗体と共に４℃にて３０分間インキュベーションする。さらに洗浄後、標識細胞をＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｌｉｎｓｏｎ）でのフローサイトメトリーにより分析する。

【０９７２】

サイトカインの産生に対する効果

樹状細胞により生成されるサイトカイン、特に、ＩＬ－１２は、Ｔ細胞依存性免疫応答の開始に重要である。ＩＬ－１２は、Ｔｈ１ヘルパーＴ細胞免疫応答の発生に強く影響し、細胞障害性Ｔ細胞およびＮＫ細胞機能を誘導する。ＥＬＩＳＡを用いて、次の通りＩＬ－１２の放出を測定する。樹状細胞（10^6／ｍｌ）を、増加濃度の本発明のアルブミン融合蛋白質で２４時間処理する。正対照として、ＬＰＳ（１００ｎｇ／ｍｌ）を細胞培養物に添加する。次に、細胞培養物由来上清を回収し、市販のＥＬＩＳＡキット（例えば、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ））を用いて、ＩＬ－１２含有量について分析する。キットの標準的プロトコルを用いる。

【０９７３】

ＭＨＣクラスＩＩ、同時刺激分子、および接着分子の増殖に対する効果

細胞表面抗原の３つの主要なファミリー：接着分子、抗原提示に関与する分子、およびＦｃ受容体を単球上で同定することができる。ＭＨＣクラスＩＩ抗原、およびＢ７およびＩＣＡＭ－１のような他の共刺激分子の発現の調節は、単球の抗原提示能およびＴ細胞活性化誘導能の変化を引き起こし得る。Ｆｃ受容体発現の増大は、単球の細胞障害活性、サイトカイン放出、および食作用の改善と関連し得る。

【０９７４】

次の通りＦＡＣＳ分析を用いて表面抗原を調べる。増加濃度の本発明のアルブミン融合蛋白質またはＬＰＳ（正対照）で単球を１～５日間処理し、１％のＢＳＡおよび０．０２ｍＭおよび０．０２ｍＭのアジ化ナトリウム含有ＰＢＳで洗浄し、次に、１：２０希釈の適当なＦＩＴＣまたはＰＥ標識モノクローナル抗体と４℃にて３０分間インキュベーションする。さらに洗浄後、標識細胞をＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）上でのフローサイトメトリーにより分析する。

【０９７５】

単球の活性化および／または生存率の増大

単球を活性化（別法では、不活性化）、および／または単球の生存率を増大させる（別法では、単球の生存率の低減）分子についてのアッセイは当該技術分野で知られており、通常には、本発明の分子が単球の阻害因子または活性化因子として機能するかどうかの決定に用いるために適用され得る。以下に記載の３種類のアッセイを用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質をスクリーニングすることができる。これらのアッセイのそれぞれについて、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ勾配（Ｓｉｇｍａ）を通した遠心分離により、単一ドナーの白血球パック（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｒｅｄ　Ｃｒｏｓｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ）から末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を精製する。向流遠心分離洗浄により、ＰＢＭＣから単球を単離する。

【０９７６】

単球の生存率アッセイ

ヒト末梢血単球は血清または他の刺激物質の不存下で培養すると、生存率が徐々に低下する。それらの死は内部の調節過程（アポトーシス）から生じる。ＴＮＦ－αのような活性化因子の培養物への添加は、細胞生存率を劇的に改善し、ＤＮＡの断片化を阻止する。ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）染色を用いて、次の通りアポトーシスを測定する。単球をポリプロピレンチューブにて無血清培地（正対照）中、１００ｎｇ／ｍｌのＴＮＦ－α（負

対照）、試験すべき各濃度の融合蛋白質の存在下で４８時間培養する。細胞を最終濃度５μｇ／ｍｌのＰＩ含有ＰＢＳ中、２×１０^{6}／ｍｌの密度で懸濁し、次に、室温にて５分間インキュベーションし、ＦＡＣＳｃａｎ分析する。ＰＩの取り込みは、この実験系におけるＤＮＡ断片化との関連を示す。

【０９７７】

サイトカイン放出に対する効果

単球／マクロファージの重要な機能は、刺激後のサイトカイン放出を介した、免疫系の他の細胞集団に対するそれらの調節活性である。サイトカイン放出を測定するＥＬＩＳＡを次の通り行う。増加濃度の本発明のアルブミン融合蛋白質と共に同じ条件下だが融合蛋白質の不存下で、密度５×１０^{5}細胞／ｍｌにてヒト単球をインキュベーションする。ＩＬ－１２を産生させるため、融合蛋白質の存在下でＩＦＮ（１００Ｕ／ｍｌ）を用いて細胞を一晩刺激する。次に、ＬＰＳ（１０ｎｇ／ｍｌ）を添加する。２４時間後、条件培地を回収し、使用するまで凍結したままにする。次に、市販のＥＬＩＳＡキット（例えば、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ））を用いて、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１０、ＭＣＰ－１およびＩＬ－８の測定を行う。キットの標準的プロトコルを適用する。

【０９７８】

酸化破壊

精製した単球を９６ウェルプレートに２～１×１０^{5}細胞／ウェルにて入れる。増加濃度の本発明のアルブミン融合蛋白質を合計容量０．２ｍｌの培地（１０％のＦＣＳ、グルアミン、および抗生物質を含むＲＰＭＩ）に添加する。３日間インキュベーションした後、プレートを遠心し、培地を各ウェルから除去する。単層のマクロファージに０．２ｍｌ／ウェル　フェノールレッド溶液（１４０ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのリン酸カリウム緩衝液、ｐＨ７．０、５．５ｍＭのデキストロース、０．５６ｍＭのフェノールレッド、および１９Ｕ／ｍｌのＨＲＰＯ）を刺激剤（２００ｎＭのＰＭＡ）と共に添加する。プレートを３７℃で２時間インキュベーションし、１ＮのＮａＯＨを２０μｌ／ウェルにて添加して反応を停止させる。６１０ｎｍの吸光度を読む。マクロファージが産生したH_2O_2の量を測定するために、各実験について既知のモル濃度のH_2O_2溶液の標準曲線を作成する。

【０９７９】

実施例１９：血管内皮細胞の成長に対する本発明のアルブミン融合蛋白質の効果

１日目に、４％　ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、１６Ｕ／ｍｌのヘパリン、および５０Ｕ／ｍｌの内皮細胞成長補助剤（ＥＣＧＳ、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，Ｉｎｃ．）含有Ｍ１９９培地中、２～５×１０^{4}細胞／３５ｍｍのディッシュ密度で、ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）を播種する。２日目に、１０％のＦＢＳ、８Ｕ／ｍｌのヘパリン含有Ｍ１９９と培地を置き換える。本発明のアルブミン融合蛋白質、およびＶＥＧＦおよび塩基性ＦＧＦ（ｂＦＧＦ）のような正対照を各濃度で添加する。４日目および６日目に培地を交換する。８日目に、Ｃｏｌｕｔｅｒカウンターを用いて、細胞数を決定する。

【０９８０】

ＨＵＶＥＣ細胞数の増加は、融合蛋白質が血管内皮細胞を増殖させ得ることを示し、一方、ＨＵＶＥＣ細胞数の減少は、融合蛋白質が血管内皮細胞を阻害することを示す。

【０９８１】

実施例２０：ラット角膜創傷治癒モデル

この動物モデルは、本発明のアルブミン融合蛋白質の血管新生に対する効果を示す。実験プロトコルは：

角膜中心から間質細胞層に、１～１．５ｍｍ切開すること、

目尻と接する切開の端の下に、へらを挿入すること、

くぼみ（その土台は目の端から１～１．５ｍｍにある）をつくること、

本発明のアルブミン融合蛋白質５０ｎｇ～５μｇ含有ペレットのくぼみ内の位置を決定すること、

を含む。
本発明のアルブミン融合蛋白質での処置を、２０ｍｇ～５００ｍｇの用量範囲（５日間毎日処置）で角膜創傷に局所適用することもできる。
【０９８２】
実施例２１：糖尿病マウスおよび糖質コルチコイド障害性創傷治癒モデル
糖尿病ｄｂ＋／ｄｂ＋マウスモデル
本発明のアルブミン融合蛋白質が治癒過程を加速するかどうかを示すため、一般的に、創傷治癒の糖尿病マウスモデルを用いる。ｄｂ＋／ｄｂ＋マウスにおける全層創傷治癒モデルは十分に特徴付けられた、臨床上適切かつ再現可能な障害性創傷治癒モデルである。糖尿病創傷の治癒は、萎縮よりむしろ肉芽組織の形成および再上皮形成に依存する（Ｇａｒｔｎｅｒ，Ｍ．Ｈ．ら．，Ｊ．Ｓｕｒｇ Ｒｅｓ．５２：３８９（１９９２）；Ｇｒｅｅｎｈａｌｇｈ，Ｄ．Ｇ．ら．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１３６：１２３５（１９９０））。
【０９８３】
糖尿病動物は、ＩＩ型糖尿病で観察されるほとんどの特徴的特性を有している。ホモ接合型（ｄｂ＋／ｄｂ＋）マウスは、それらの正常ヘテロ接合型（ｄｂ＋／＋ｍ）同腹仔と比較して肥満である。変異糖尿病（ｄｂ＋／ｄｂ＋）マウスは、４番染色体に１個の常染色体劣性変異（ｄｂ＋）を有する（Ｃｏｌｅｍａｎら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７７：２８３－２９３（１９８２））。動物は、多食、多飲、および多尿を示す。変異糖尿病マウス（ｄｂ＋／ｄｂ＋）は、血糖の上昇、上昇または正常なインスリンレベル、および細胞介在性免疫の抑制を有する（Ｍａｎｄｅｌら．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２０：１３７５（１９７８）；Ｄｅｂｒａｙ－Ｓａｃｈｓ，Ｍ．ら．，Ｃｌｉｎ．Ｅｘ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５１（１）：１－７（１９８３）；Ｌｅｉｔｅｒら．，Ａｍ．Ｊ．ｏｆ Ｐａｔｈｏｌ．１１４：４６－５５（１９８５））。末梢神経障害、心筋の合併症、および微小血管の損傷、基底膜の肥厚、および糸球体濾過異常がこれらの動物において観察された（Ｎｏｒｉｄｏ，Ｆ．ら．，Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｌ．８３（２）：２２１－２３２（１９８４）；Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎら．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ ２９（Ｉ）：６０－６７（１９８０）；Ｇｉａｃｏｍｅｌｌｉら．，Ｌａｂ Ｉｎｖｅｓｔ．４０（４）：４６０－４７３（１９７９）；Ｃｏｌｅｍａｎ Ｄ．Ｌ．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ ３１（Ｓｕｐｐｌ）：１－６（１９８２））。これらのホモ接合型糖尿病マウスは高血糖を発症し、これはヒトＩＩ型糖尿病同様インスリン抵抗性である（Ｍａｎｄｅｌら．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２０：１３７５－１３７７（１９７８））。
【０９８４】
これらの動物で観察される特徴は、このモデルでの治癒がヒト糖尿病において観察される治癒と類似し得ることを示唆する（Ｇｒｅｅｎｈａｌｇｈ，ら．，Ａｍ．Ｊ．ｏｆ Ｐａｔｈｏｌ．１３６：１２３５－１２４６（１９９０））。
【０９８５】
一般に、糖尿病のメスＣ５７ＢＬＫｓＪ（ｄｂ＋／ｄｂ＋）マウスおよびそれらの非糖尿病（ｄｂ＋／＋ｍ）ヘテロ接合型同腹仔を本研究に用いる（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）。６週齢のマウスを購入し、研究の開始時に８週齢とする。動物を個々に収容し、餌と水を自由に摂取させる。全ての操作を無菌技術を用いて行う。Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｉｎｃ．の動物実験委員会（Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ）および実験動物の管理と使用のガイドライン（Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌ）の規則およびガイドラインに従い、実験を行う。
【０９８６】
既に報告された方法（Ｔｓｕｂｏｉ，Ｒ．ａｎｄ Ｒｉｆｋｉｎ，Ｄ．Ｂ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ １７２：２４５－２５１（１９９０））の治癒プロトコルを行う。簡単にいうと、創傷した日に、アーバティン（０．０１ｍｇ／ｍＬ）、脱イオン水に溶解した２

，２，２－トリブロモエタノールおよび２－メチル－２－ブタノールの腹腔内注射により、動物を麻酔する。動物の背部を剃り、皮膚を７０％　エタノール溶液およびヨウ素で洗浄する。手術範囲を創傷前に滅菌ガーゼで拭き取る。次に、キース組織パンチを用いて、８ｍｍの全層創傷を作製する。創傷後直ちに、周辺の皮膚を軽くのばし、創傷の拡大を防ぐ。創傷は実験期間中開いたままである。創傷の日後連続して５日間、処置を局所適用する。処置に先立ち、滅菌生理食塩水およびガーゼスポンジで創傷を簡単に拭く。

【０９８７】

創傷を視覚的に調べ、手術日およびその後は２日間隔で固定距離にて撮影する。１～５日目および８日目の測定により、創傷の閉鎖を決定する。目盛付きジェームソンキャリパーを用いて、水平および垂直方向で損傷を測定する。肉芽組織がもはやみられなくなり、創傷が一枚の上皮で覆われると、創傷は治癒したとみなされる。

【０９８８】

異なる用量範囲、ビヒクル中の４ｍｇ～５００ｍｇ／創傷／日を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質を８日間投与する。ビヒクル対照群には、ビヒクル溶液５０ｍＬを投与する。

【０９８９】

８日目にペントバルビタールナトリウム（３００ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内注射して、動物を安楽死させる。次に、組織学および免疫組織化学用に、創傷および周辺の皮膚を採取する。さらに処理するため、生検スポンジ間の組織カセット中、１０％の中性平衡化ホルマリンに組織標本を入れる。

【０９９０】

それぞれ１０匹（糖尿病５匹、および非糖尿病対照５匹）からなる３つの群：１）ビヒクルプラシーボ対照、２）無処置群、および３）処置群を評価する。

【０９９１】

縦軸および横軸間の領域を測定し、創傷の正方形領域の合計を得て、創傷閉鎖を分析する。次に、最初の創傷領域（０日目）と処置後のもの（８日目）の差を確定して、萎縮を評価する。１日目の創傷領域は６４ｍｍ^{2}であり、これはパンチ直径に対応する。次の式：

【数１】

ａ．［８日目の開放領域］－［１日目の開放領域］／［１日目の開放領域］

を用いて計算する。

【０９９２】

１０％　平衡化ホルマリン中で標本を固定し、Ｒｅｉｃｈｅｒｔ－Ｊｕｎｇミクロトームを用いて、創傷表面に垂直にパラフィン包埋ブロックを薄切（５ｍｍ）する。二分した創傷の断面を通常のヘマトキシリン－エオジン（Ｈ＆Ｅ）染色する。創傷の組織学的調査を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質での処置により治癒過程および修復皮膚の形態学的外見が変化するかどうかを評価する。この評価は、細胞蓄積の存在、炎症性細胞、毛細血管、線維芽細胞、再上皮形成、および表皮の成熟の検証を含む（Ｇｒｅｅｎｈａｌｇｈ，Ｄ．Ｇ．ら．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１３６：１２３５（１９９０））。盲検観測者は目盛付レンズマイクロメータを用いる。

【０９９３】

ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅ検出システムを用いて、ポリクローナルウサギ抗ヒトケラチン抗体で、組織切片を免疫組織化学染色する。ヒトの皮膚を正の組織対照として用い、一方非免疫ＩｇＧを負対照として用いる。目盛付レンズマイクロメータを用いて、創傷の再上皮形成の程度を評価することで、ケラチノサイトの成長を決定する。

【０９９４】

ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅ検出システムで抗ＰＣＮＡ抗体（１：５０）を用いて、皮膚標本における増殖性細胞核抗原／サイクリン（ＰＣＮＡ）を決定する。ヒト大腸癌は正の組織対照となり、ヒト脳組織を負の組織対照として用いる。各標本は、１次抗体が脱落し、非免

疫マウスＩｇＧで置換した切片を含む。増殖の程度に基づき、これらの切片を０～８の階級にランキングする。低い階級ほど増殖がわずかであることを反映し、高いほど急激な増殖を反映する。

【０９９５】

対応のないｔ検定を用いて、実験データを分析する。０．０５未満のｐ値を有意とみなす。

【０９９６】

ステロイド障害性ラットモデル

ステロイドによる創傷治癒の阻害は、種々のインビトロおよびインビボシステムにおいて十分に示されている（Ｗａｈｌ，Ｇｌｕｃｏｃｏｒｔｉｃｏｉｄｓ ａｎｄ Ｗｏｕｎｄ ｈｅａｌｉｎｇ．Ｉｎ：Ａｎｔｉ－Ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ａｃｔｉｏｎ：Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｓｐｅｃｔｓ．２８０－３０２（１９８９）；Ｗａｈｌら．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１５：４７６－４８１（１９７５）；Ｗｅｒｂら．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１４７：１６８４－１６９４（１９７８））。血管新生を阻害し、血管透過性（Ｅｂｅｒｔら．，Ａｎ．Ｉｎｔｅｒｎ．Ｍｅｄ．３７：７０１－７０５（１９５２））、線維芽細胞増殖、およびコラーゲン合成（Ｂｅｃｋら．，Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ．５：２９５－３０４（１９９１）；Ｈａｙｎｅｓら．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．６１：７０３－７９７（１９７８））を低減し、循環単球を一過性に低減すること（Ｈａｙｎｅｓら．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．６１：７０３－７９７（１９７８）；Ｗａｈｌ，”Ｇｌｕｃｏｃｏｒｔｉｃｏｉｄｓ ａｎｄ ｈｅａｌｉｎｇ”，Ｉｎ：Ａｎｔｉｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ａｃｉｏｎ：Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｓｐｅｃｔｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２８０－３０２（１９８９））により、糖質コルチコイドは創傷治癒を遅延させる。障害された創傷治癒に対するステロイドの全身投与は、ラットにおいて十分に確立された現象である（Ｂｅｃｋら．，Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ．５：２９５－３０４（１９９１）；Ｈａｙｎｅｓら．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．６１：７０３－７９７（１９７８）；Ｗａｈｌ，”Ｇｌｕｃｏｃｏｒｔｉｃｏｉｄｓ ａｎｄ ｗｏｕｎｄ ｈｅａｌｉｎｇ”，Ｉｎ：Ａｎｔｉｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ａｃｔｉｏｎ：Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｓｐｅｃｔｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２８０－３０２（１９８９）；Ｐｉｅｒｃｅら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：２２２９－２２３３（１９８９））。

【０９９７】

本発明のアルブミン融合蛋白質が治癒過程を加速することができることを示すために、治癒がメチルプレドニゾロンの全身投与により改善されたラットの全層切開性皮膚創傷に対する融合蛋白質の複数局所適用の効果を評価する。

【０９９８】

体重２５０ｇ～３００ｇの若い成体のオススプラーグドーリーラット（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）をこの実験で用いる。動物を８週齢にて購入し、研究の開始時に９週齢となる。ラットの治癒応答を創傷時のメチルプレドニゾロンの全身投与（１７ｍｇ／ｋｇ／ラット 筋肉内）により改善する。動物を個別に収容し、餌と水を自由に与える。無菌的技術を用いて全ての操作を行う。Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｉｎｃ．の動物実験委員会（Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ）および実験動物の管理と使用のガイドライン（Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌ）の規則およびガイドラインに従い、この実験を行う。

【０９９９】

創傷のプロトコルは上述の通りである。創傷日に、ケタミン（５０ｍｇ／ｋｇ）およびキシラジン（５ｍｇ／ｋｇ）を筋注して、動物を麻酔する。動物の背部を剃り、皮膚を７

０％　エタノールおよびヨウ素溶液で洗浄する。創傷前に、手術範囲を滅菌ガーゼで拭く。Ｋｅｙｅｓ組織パンチを用いて、８ｍｍの全層創傷を作製する。創傷は実験期間中開いたままである。創傷日から連続して７日間、試験物質を局所適用し、次に、メチルプレドニゾロンを投与する。処置の前に、創傷を滅菌生理食塩水およびガーゼスポンジで簡単に拭く。

【１０００】

損傷を視覚的に調べ、創傷日および処置の終わりに固定距離にて撮影する。１～５日目および８日目の測定により、創傷の閉鎖を決定する。目盛付きジェームソンキャリパーを用いて、創傷を水平および垂直方向で測定する。肉芽組織がもはやみられなくなり、創傷が１枚の上皮で覆われると、損傷は治癒したとみなされる。

【１００１】

異なる用量範囲、ビヒクル中の４ｍｇから５００ｍｇ／創傷／日を用いて、本発明の融合蛋白質を８日間投与する。ビヒクル対照群には、ビヒクル溶液５０ｍＬを投与する。

【１００２】

８日目にペントバルビタールナトリウム（３００ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内注射して、動物を安楽死させる。次に、組織学のために、創傷および周辺の皮膚を採取する。さらに処理するため、生検スポンジ間の組織カセット中、１０％の中性平衡化ホルマリンに組織標本を入れる。

【１００３】

それぞれ１０匹（メチルプレドニゾロンあり５匹、および糖質コルチコイドなし５匹）からなる３つの群：１）無処置群、２）ビヒクルプラシーボ対照、および３）処置群を評価する。

【１００４】

縦軸および横軸の領域を測定し、創傷の領域の合計を得ることで、創傷閉鎖を分析する。次に、最初の創傷領域（０日目）と処置後のもの（８日目）との間の差を確立して、萎縮を評価する。１日目の創傷領域は６４ｍｍ^{2}であり、これはパンチの直径に対応するものである。次の式：

【数２】

ｂ．［８日目の開放領域］－［１日目の開放領域］／［１日目の開放領域］

を用いて計算する。

【１００５】

１０％　平衡化ホルマリン中で標本を固定し、Ｏｌｙｍｐｕｓミクロトームを用いて、パラフィン包埋ブロックを創傷表面に垂直に薄切（５ｍｍ）する。二分した創傷の断面を、通常のヘマトキシリン－エオジン（Ｈ＆Ｅ）染色する。創傷の組織学的調査を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質での処置により、治癒過程および修復皮膚の形態学的外見が変化するかどうかを評価する。盲検観測者は目盛付レンズマイクロメータを用い、創傷間の差を決定する。

【１００６】

対応のないｔ検定を用いて、実験データを分析する。０．０５未満のｐ値を有意とみなす。

【１００７】

実施例２２：リンパ浮腫動物モデル

この実験アプローチの目的は、ラットの後足のリンパ性循環系のリンパ脈管新生および再確立における本発明のアルブミン融合蛋白質の治療効果を試験するための適切かつ首尾一貫した、リンパ浮腫モデルを作製することである。影響を受けた足の浮腫容積、リンパ脈管構造の定量、総血漿蛋白質、および組織病理により、有効性を測定する。急性リンパ浮腫は７～１０日間観察される。より重要なことに、おそらく浮腫の臨床上の進行は３～４週間まで続く。

【１００８】

手術の開始に先立ち、蛋白質濃度分析のため、血液試料を採取する。約～３５０ｇの体重のオスのラットにペントバルビタールを投与する。次に、右足を膝からおしりに向けて剃る。剃った範囲を７０％のＥｔＯＨに浸したガーゼで拭く。血清総蛋白質の検査のため、血液を採取する。周囲および容積を測定し、２箇所の測定レベル（かかとの上０．５ｃｍ、足の後の中点）にマーキング後、足にダイを注入する。右足および左足両方の背側皮内に１％のエバンスブルー０．０５ｍｌを注入する。次に、後足へのダイの注入後の周囲および容積を測定する。

【１００９】

膝関節を目印として用い、足の中央部から鼠径部の周囲を切開することで、大腿血管の位置を決定する。鉗子および止血剤を用いて解剖し、皮膚片を分取する。大腿血管の位置を決定した後、側部に沿って走るリンパ管および下部の血管の位置を決定する。次に、この範囲の主要なリンパ管を電気で凝固させるか、あるいは縫合する。

【１０１０】

顕微鏡を用いて、足の後ろ（半膜様筋および内転筋の近く）の筋肉を露出させる。次に、膝窩のリンパ節の位置を決定する。次に、膝窩リンパ節の２本の近位リンパ管および２本の遠位リンパ管、および遠位の血液供給を縫合する。次に、結合組織を切断して、膝窩リンパ節および任意の付随の脂肪組織を除去する。

【１０１１】

この方法に起因する任意の多少の出血を制御するよう注意する。リンパ管をふさいだ後、液状の皮膚（Ｖｅｔｂｏｎｄ）（ＡＪ　Ｂｕｃｋ）を用いて、皮膚弁に封をする。足の周り～０．５ｃｍの隙間を残して、分取した皮膚の端を下にある筋肉組織と結ぶ。必要なら、皮膚を下にある筋肉に縫合して、とめてもよい。

【１０１２】

感染を回避するために、網で隔てて個々に動物をいれる（寝具類なし）。最適な浮腫ピークを通じて、動物の回復を毎日チェックする。典型的には、それは、５～７日までに生じる。次に、プラートーの浮腫ピークを観察する。リンパ浮腫の程度を評価するために、各足の周囲および２ヶ所の指定地点の容積を、手術前、そして７日間毎日測定する。血漿蛋白質のリンパ浮腫に対する効果を決定し、蛋白質分析が有用な周囲長検査であるかどうかも調べる。２地点で対照および浮腫の足の両方の重さを評価する。盲検で分析する。

【１０１３】

周囲の測定：四肢の運動を防ぐために簡易ガス麻酔下で布巻き尺を用いて足の周囲を測定する。２人の別人が距骨および足の後で測定し、２回の測定値を平均する。対照および浮腫の足の両方から読み取る。

【１０１４】

容積の測定：手術日にペントバルビタールで動物を麻酔し、手術前に試験する。日々の容積測定のためには、動物を簡単なハロタン麻酔（迅速な固定かつ回復）下におき、両方の足を剃り、防水マーカーを用いて足に等しく印を付ける。両足をまず水に浸し、次に、装置を各印を付けたレベルまで浸し、次に、Ｂｕｘｃｏ浮腫ソフトウエア（Ｃｈｅｎ／Ｖｉｃｔｏｒ）により測定する。１人の人間がデータを記録し、別の者が印を付けた範囲まで足を浸す。

【１０１５】

血漿蛋白質の測定：手術前に、血液を採取し、遠心し、血清を分離させ、総蛋白質およびCa^{2+}を比較する。

【１０１６】

足重量の比較：採血後、動物に組織回収の準備をする。キリチン（ｑｕｉｌｌｉｔｉｎｅ）を用いて足を切断し、次に、実験した足および対照の足の両方を結紮糸で切断し、重量を測定する。脛踵関節をはずし、足の体重を測定することで、第２の重量測定を行う。

【１０１７】

組織プレパラート：膝（膝窩）部分の後に位置する横筋を切開し、金型に並べ、凍結ゲルを充填し、冷メチルブタンに浸し、薄切まで－８０ＥＣの標識試料バッグに入れる。薄

切後、蛍光顕微鏡下でリンパ腺について筋肉を観察する。

【１０１８】

実施例２３：本発明のアルブミン融合蛋白質によるＴＮＦα誘発性接着分子の発現の抑制

炎症および血管形成領域へのリンパ球の動員は、リンパ球の細胞表面接着分子（ＣＡＭ）と血管内皮との間の特異的な受容体－リガンド相互作用を含む。正常および病理学的設定における結合工程は、内皮細胞（ＥＣ）上の細胞接着分子１（ＩＣＭ－１）、血管細胞接着分子１（ＶＣＡＭ－１）、および内皮白血球接着分子１（Ｅ－セレクチン）の発現を含む複数工程のカスケードが続く。血管内皮でのこれらの分子および他の分子の発現は、炎症反応の発生中、白血球が局所脈管構造と結合し、局所組織に侵出する確率を決定する。サイトカインおよび成長因子の局所濃度は、これらのＣＡＭの発現の調節に関与する。

【１０１９】

強力な前炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）は、内皮細胞上の３種のＣＡＭ全ての刺激因子であり、広範な炎症反応に関与し、しばしば病的結果を生じる。

【１０２０】

本発明のアルブミン融合蛋白質が、ＴＮＦ－α誘発性ＣＡＭ発現の抑制を介在する可能性を調べることができる。ＥＣを固相吸着剤として用いた変形ＥＬＩＳＡアッセイを用いて、ＦＧＦファミリーのメンバーである蛋白質で同時刺激した場合のＴＮＦ－α処理ＥＣにおけるＣＡＭ発現量を測定する。

【１０２１】

実験を行うために、プールした臍帯収集物からヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）培養物を得て、１０％のＦＣＳ、および１％のペニシリン／ストレプトマイシンを添加した成長培地（ＥＧＭ－２；Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）中、３７℃、５％のCO_2含有加湿インキュベーター内にて維持する。ＨＵＶＥＣをＥＧＭ培地中密度1×10^4細胞／ウェルにて９６ウェルプレートに播種し、３７℃で１８～２４時間またはコンフルエントまで培養する。次に、１００Ｕ／ｍｌのペニシリンおよび１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシンを添加した無血清ＲＰＭＩ－１６４０溶液で３回洗浄し、所定のサイトカインおよび／または成長因子を用いて３７℃にて２４時間処理する。インキュベーション後、ＣＡＭ発現について細胞を評価する。

【１０２２】

ヒト臍帯血静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）を、標準的な９６ウェルプレート中コンフルエントまで成長させる。成長培地を細胞から除去し、１９９培地（１０％のＦＢＳ）９０μｌと置き換える。検査用試料、および正または負対照をプレートにトリプリケートで添加する（容量１０μｌ中）。３７℃にて、５時間（セレクチンおよびインテグリンの発現）または２４時間（インテグリンの発現のみ）のいずれか、プレートをインキュベーションする。プレートをアスピレーションして培地を除去し、０．１％のパラホルムアルデヒド－ＰＢＳ（Ca^{++}およびMg^{++}を含む）１００μｌを各ウェルに添加する。プレートを４℃に３０分間おく。

【１０２３】

次に、固定剤をウェルから除去し、ウェルを０．５％のＢＳＡを含むＰＢＳ（Ｃａ、Ｍｇを含む）で１回洗浄し、排水する。ウェルを乾燥させてはいけない。希釈した１次抗体１０μｌを試験および対照ウェルに添加する。抗ＩＣＡＭ－１－ビオチン、抗ＶＣＡＭ－１－ビオチン、および抗Ｅ－セレクチン－ビオチンを１０μｇ／ｍｌ（０．１ｍｇ／ｍｌのストック抗体の１：１０希釈）の濃度にて用いる。細胞を３７℃で１０分間、加湿環境下でインキュベーションする。ウェルを０．５％のＢＳＡを含むＰＢＳ（Ｃａ、Ｍｇを含む）で３回洗浄する。

【１０２４】

次に、希釈したエキストラアビジン－アルカリホスファターゼ（１：５，０００希釈）２０μｌを各ウェルに添加し、３７℃で３０分間インキュベーションする。ウェルを０．５％のＢＳＡを含むＰＢＳ（Ｃａ、Ｍｇを含む）で３回洗浄する。ｐ－ニトロフェノール

ホスフェートｐＮＰＰ１錠をグリシンバッファー（ｐＨ１０．４）５ｍｌに溶解する。グリシンバッファー中のｐＮＰＰ基質１００μｌを各試験ウェルに添加する。グリシンバッファー中のエキストラアビジン－アルカリホスファターゼの実用的希釈物：１：５，０００（10^{0}）＞$10^{-0.5}$＞10^{-1}＞$10^{-1.5}$からトリプリケートの標準ウェルを調製する。各希釈物５μｌをウェルにトリプリケートで添加する。各ウェル中で生じたＡＰ含有量は、５．５０ｎｇ、１．７４ｎｇ、０．５５ｎｇ、０．１８ｎｇである。次に、ｐＮＮＰ試薬１００μｌを各標準ウェルに添加する。プレートを３７℃で４時間インキュベーションする。３ＭのＮａＯＨ　５０μｌを全ウェルに添加する。プレートリーダー、４０５ｎｍで結果を定量する。グリシンバッファーのみを充填したブランクウェルにおいてバックグラウンド減算オプションを用いる。各標準ウェルのＡＰ結合体量［５．５０ｎｇ；１．７４ｎｇ；０．５５ｎｇ；０．１８ｎｇ］を示すよう、テンプレートを設定する。各試料中の結合したＡＰ結合体量として結果を示す。

【１０２５】

実施例２４：ＧＡＳ受容体コンストラクトの構築

細胞の分化および増殖に関与する１つのシグナル伝達経路は、Ｊａｋ－ＳＴＡＴ経路と呼ばれる。Ｊａｋ－ＳＴＡＴ経路の活性化蛋白質は、多くの遺伝子のプロモーターに位置するガンマ活性化部位「ＧＡＳ」エレメントまたはインターフェロン－感受性応答エレメント（「ＩＳＲＥ」）と結合する。蛋白質のこれらのエレメントとの結合は、関連遺伝子の発現を変化させる。

【１０２６】

ＧＡＳおよびＩＳＲＥエレメントは、シグナル伝達物質および転写活性化因子、または「ＳＴＡＴ」と呼ばれる転写因子類により認識される。ＳＴＡＴファミリーには６種類のメンバーが存在する。Ｓｔａｔ１、およびＳｔａｔ３は、Ｓｔａｔ２（ＩＦＮ－αに対する応答として、広範囲に存在する）のように、多くの細胞種類に存在する。Ｓｔａｔ４はより限定されており、多くの細胞種類には存在しないが、ＩＬ－１２での処置後、Ｔヘルパークラスの細胞において見られる。Ｓｔａｔ５はもともと乳成長因子と呼ばれ、骨髄細胞を含む他の細胞においてより高濃度で見られる。それは組織培養細胞において多くのサイトカインにより活性化され得る。

【１０２７】

ヤヌスキナーゼ（「Ｊａｋ」）ファミリーとして知られた一連のキナーゼによるチロシンリン酸化において、ＳＴＡＴは活性化されて細胞質から核に転位する。Ｊａｋは可溶性チロシンキナーゼの明確なファミリーを表し、Ｔｙｋ２、Ｊａｋ１、Ｊａｋ２、およびＪａｋ３を含む。これらのキナーゼは有意な配列類似性を示し、一般的に休止細胞で触媒不活性である。

【１０２８】

Ｊａｋは、以下の表で概説する広範な受容体により活性化される（Ｓｃｈｉｄｌｅｒ ａｎｄ Ｄａｒｎｅｌｌ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６４：６２１－５１（１９９５）による調査から適用）。Ｊａｋを活性化できるサイトカイン受容体ファミリーは２つの群に分けられる：（ａ）クラス１は、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、１Ｌ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－Ｉ５、Ｅｐｏ、ＰＲＬ、ＧＨ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＬＩＦ、ＣＮＴＦ、およびトロンボポエチンの受容体を含み；そして（ｂ）クラス２は、ＩＦＮ－ａ、ＩＦＮ－ｇ、およびＩＬ－１０を含む。クラス１受容体は、保存システインモチーフ（４個の保存システインおよび１個のトリプトファンのセット）およびＷＳＸＷＳモチーフ（Ｔｒｐ－Ｓｅｒ－Ｘａａ－Ｔｒｐ－Ｓｅｒ（配列番号：５３）をコードする膜近接領域）を共有する。

【１０２９】

従って、リガンドの受容体との結合において、Ｊａｋは活性化され、順にＳＴＡＴを活性化し、転位し、ＧＡＳエレメントと結合する。この過程の全てがＪａｋ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路に包含される。それゆえ、ＧＡＳまたはＩＳＲＥエレメントの結合により影響されるＪａｋ－ＳＴＡＴの活性化を用いて、細胞の増殖および分化に関与する蛋白質を

示すことができる。例えば、成長因子およびサイトカインは、Ｊａｋ－ＳＴＡＴ経路を活性化することが知られている（以下の表５参照）。従って、受容体分子と結合したＧＡＳエレメントを用いることで、Ｊａｋ－ＳＴＡＴ経路の活性化因子を同定することができる。

【１０３０】

表５

【表５７】

JAK		STAT			GAS(ｴﾚﾒﾝﾄ)またはISRE	
ﾘｶﾞﾝﾄﾞ	tyk2	Jak1	Jak2	Jak3		
IFNﾌｧﾐﾘｰ						
IFN-a/B	+	+	−	−	1,2,3	ISRE
IFN-g		+	+	−	1	GAS(IRF1>Lys6>IFP)
Il-10	+	?	?	−	1,3	
gp130ﾌｧﾐﾘｰ						
IL-6(多面発現)	+	+	+	?	1,3	GAS(IRF1>Lys6>IFP)
Il-11(多面発現)	?	+	?	?	1,3	
OnM(多面発現)	?	+	+	?	1,3	
LIF(多面発現)	?	+	+	?	1,3	
CNTF(多面発現)	−/+	+	+	?	1,3	
G-CSF(多面発現)	?	+	?	?	1,3	
IL-12(多面発現)	+	−	+	+	1,3	

【表５８】

g-Cﾌｧﾐﾘｰ						
IL-2(ﾘﾝﾊﾟ球)	−	+	−	+	1,3,5	GAS
IL-4(ﾘﾝﾊﾟ球/骨髄)	−	+	−	+	6	GAS(IRF1=IFP>>Ly6)(IgH)
IL-7(ﾘﾝﾊﾟ球)	−	+	−	+	5	GAS
IL-9(ﾘﾝﾊﾟ球)	−	+	−	+	5	GAS
IL-13(ﾘﾝﾊﾟ球)	−	+	?	?	6	GAS
IL-15	?	+	?	+	5	GAS
gp140ﾌｧﾐﾘｰ						
IL-3(骨髄)	−	−	+	−	5	GAS(IRF>IFP>>Ly6)
IL-5(骨髄)	−	−	+	−	5	GAS
GM-CSF(骨髄)	−	−	+	−	5	GAS
成長ﾎﾙﾓﾝﾌｧﾐﾘｰ						
GH	?	−	+	−	5	
PRL	?	+/−	+	−	1,3,5	
EPO	?	−	+	−	5	GAS(B-CAS>IRF1=IFP>>Ly6)
受容体ﾁﾛｼﾝｷﾅｰｾﾞ						
EGF	?	+	+	−	1,3	GAS(IRF1)
PDGF	?	+	+	−	1,3	
CSF-1	?	+	+	−	1,3	GAS(非IRF1)

【１０３１】

実施例２７～２９に記載の生物学的アッセイにおいて用いるプロモーターエレメント含有合成ＧＡＳを構築するために、ＰＣＲベースのストラテジーを利用し、ＧＡＳ－ＳＶ４０プロモーター配列を生成する。５’プライマーは、ＩＲＦ１プロモータに見られ、広範なサイトカインでの誘導の際ＳＴＡＴと結合することが既に示されている（Ｒｏｔｈｍａｎ　ら．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１：４５７－４６８（１９９４））４個のタンデムコピーのＧＡＳ結合部位を含有するが、他のＧＡＳまたはＩＳＲＥエレメントを代わりに用いることもできる。５’プライマーはまた、ＳＶ４０初期プロモーターに相補的な配列１８ｂｐを含有し、そしてＸｈｏＩ部位と隣接する。５’プライマーの配列は：

5’:GCGCCTCGAGATTTCCCCGAAATCTAGATTTCCCCGAAATGATTTCCCCGAAATGATTTCCCCGAAATATCTGCCA

TCTCAATTAG:3’（配列番号：５４）である。

【１０３２】

下流プライマーは、ＳＶ４０プロモーターに相補的であり、ＨｉｎｄＩＩＩ部位に隣接する：5’:GCGGCAAGCTTTTTGCAAAGCCTAGGC:3’（配列番号：５５）。

【１０３３】

Ｃｌｏｎｔｅｃｈから得たＢ－ｇａｌ：プロモータープラスミドに存在するＳＶ４０プロモーターテンプレートを用いて、ＰＣＲ増幅を行う。生じたＰＣＲ断片をＸｈｏＩ／ＨｉｎｄＩＩＩで消化し、ＢＬＳＫ２－（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）にサブクローニングする。フォワードおよびリバースプライマーを用いた配列決定により、インサートが次の配列：

5’:CTCGAGATTTCCCCGAAATCTAGATTTCCCCGAAATGATTTCCCCGAAATGATTTCCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT:3’(配列番号:56)を含有することを確認する。

【１０３４】

次に、ＳＶ４０プロモーターと結合したこのＧＡＳプロモーターエレメントを用いて、ＧＡＳ：ＳＥＡＰ２受容体コンストラクトを設計する。ここで、受容体分子は、分泌アルカリホスファターゼまたは「ＳＥＡＰ」である。しかしながら、この実施例または他の実施例のいずれかにおいて、任意の分子がＳＥＡＰの代わりとなり得ることは明らかである。ＳＥＡＰの代わりに用いられ得るよく知られた受容体分子は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、Ｂ－ガラクトシダーゼ、緑色蛍光蛋白質（ＧＦＰ）、または抗体により検出可能な任意の蛋白質を含む。

【１０３５】

合成ＧＡＳ－ＳＶ４０プロモーターエレメントを確認した上記配列を、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＸｈｏＩを用いてＣｌｏｎｔｅｃｈから得たｐＳＥＡＰ－プロモーターベクターにサブクローニングし、ＳＶ４０プロモーターを増幅ＧＡＳ：ＳＶ４０プロモーターエレメントと有効に置き換え、ＧＡＳ－ＳＥＡＰベクターを作製する。しかしながら、このベクターはネオマイシン耐性遺伝子を含有しないので、哺乳類の発現系には好ましくない。

【１０３６】

従って、ＧＡＳ－ＳＥＡＰ受容体を発現する哺乳類の安定な細胞株を生成するために、ＳａｌＩおよびＮｏｔＩを用いて、ＧＡＳ－ＳＥＡＰカセットをＧＡＳ－ＳＥＡＰベクターから除去し、ｐＧＦＰ－１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）のようなネオマイシン耐性遺伝子含有骨格ベクターに、マルチクローニングサイトのこれらの制限酵素認識部位を用いて挿入し、ＧＡＳ－ＳＥＡＰ／Ｎｅｏベクターを作製する。このベクターを哺乳類細胞に形質移入し、実施例２７～２９に記載のＧＡＳ結合の受容体分子として用い得る。

【１０３７】

上記のものを用いて、ＧＡＳを異なるプロモーター配列と置き換え、他のコンストラクトを作製することができる。例えば、ＥＧＲおよびＮＦ－ＫＢプロモーター配列含有受容体分子の構築を実施例２７～３１に記載する。しかしながら、これらの実施例に記載のプロトコルを用いて、多くの他のプロモーターを置換することができる。例えば、ＳＲＥ、ＩＬ－２、ＮＦＡＴ、またはオステオカルシンプロモーターを単独または組合せて置換することができる（例えば、ＧＡＳ／ＮＦ－ＫＢ／ＥＧＲ、ＧＡＳ／ＮＦ－ＫＢ、ＩＬ－２／ＮＦＡＴ、またはＮＦ－ＫＢ／ＧＡＳ）。同様に、他の細胞株を用いて、ＨＥＬＡ（上皮）、ＨＵＶＥＣ（内皮）、Ｒｅｈ（Ｂ細胞）、Ｓａｏｓ－２（骨芽細胞）、ＨＵＶＡＣ（大動脈）、または心筋細胞のような受容体コンストラクト活性を試験することができる。

【１０３８】

実施例２５：ＳＥＡＰ活性についてのアッセイ

Ｔｒｏｐｉｘ　Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｌｉｇｈｔキット（カタログ番号ＢＰ－４００）を用

いて、以下の一般的な方法により、本明細書に開示の実施例に記載のアッセイの受容体分子としてのＳＥＡＰ活性をアッセイする。Ｔｒｏｐｉｘ　Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｌｉｇｈｔキットは、以下で用いる希釈バッファー、アッセイバッファー、および反応バッファーを含む。

【１０３９】

まず、容器に２．５×希釈バッファーを入れ、本発明のアルブミン融合蛋白質含有溶液３５μｌを含有する光学プレートに２．５×希釈バッファー１５μｌを分配する。プレートをプラスチックシーラーで密封し、６５℃で３０分間インキュベーションする。不均一な加熱を避けるため、光学プレートを引き離しておく。

【１０４０】

試料を室温まで１５分間冷却する。容器を空にし、アッセイバッファーを入れる。アッセイバッファー５０ｍｌを添加し、室温で５分間インキュベーションする。容器を空にし、反応バッファー（以下の表を参照）を入れる。反応バッファー５０μｌを添加し、室温で２０分間インキュベーションする。化学発光シグナルの強度は時間に依存し、かつルミノメーターでプレート５枚を読むのに約１０分かかるので、プレート５枚を同時に処理し、１０分後に次のセットを処理し始めなければならない。

【１０４１】

ルミノメーターでは、相対的発行単位を読み取る。Ｈ１２をブランクに設定し、結果をプリントアウトする。化学発光の増大は、受容体活性を示す。

【１０４２】

表６

【表５９】

ﾌﾟﾚｰﾄ番号	反応ﾊﾞｯﾌｧｰ希釈液(ml)	CSPD (ml)	ﾌﾟﾚｰﾄ番号	反応ﾊﾞｯﾌｧｰ希釈液(ml)	CSPD (ml)
10	60	3	31	165	8.25
11	65	3.25	32	170	8.5
12	70	3.5	33	175	8.75
13	75	3.75	34	180	9
14	80	4	35	185	9.25
15	85	4.25	36	190	9.5
16	90	4.5	37	195	9.75
17	95	4.75	38	200	10
18	100	5	39	205	10.25
19	105	5.25	40	210	10.5
20	110	5.5	41	215	10.75
21	115	5.75	42	220	11
22	120	6	43	225	11.25
23	125	6.25	44	230	11.5
24	130	6.5	45	235	11.75
25	135	6.75	46	240	12
26	140	7	47	245	12.25
27	145	7.25	48	250	12.5
28	150	7.5	49	255	12.75
29	155	7.75	50	260	13
30	160	8			

【１０４３】

実施例２６：ニューロン活性を同定するアッセイ

細胞が分化および増殖するとき、多くの異なるシグナル伝達経路を介して、１群の遺伝子が活性化される。これらの遺伝子の１つであるＥＧＦＲ１（初期成長応答遺伝子１）は

、活性化の際種々の組織および細胞種類で誘導される。ＥＧＦＲ１のプロモーターはかかる誘導に関与する。受容体分子と結合したＥＧＦＲ１プロモーターを用いて、本発明の融合蛋白質の細胞を活性化する能力を評価することができる。

【１０４４】

具体的には、次のプロトコルを用いて、ＰＣ１２細胞株におけるニューロン活性を評価する。ＰＣ１２細胞（ラット褐色細胞腫細胞）は、ＴＰＡ（テトラデカノイルホルボールアセテート）、ＮＧＦ（神経成長因子）およびＥＧＦ（表皮成長因子）のような多数のマイトジェンでの活性化により増殖および／または分化することが知られている。この処置において、ＥＧＲ１遺伝子発現が活性化される。従って、ＳＥＡＰ受容体と結合したＥＧＲプロモーター含有コンストラクトで、ＰＣ１２細胞を安定に形質移入することにより、本発明のアルブミン融合蛋白質によるＰＣ１２細胞の活性化を評価することができる。

【１０４５】

ＥＧＲ／ＳＥＡＰ受容体コンストラクトを次のプロトコルによりアセンブリすることができる。次のプライマー：
第１プライマー：5’GCGCTCGAGGGATGACAGCGATAGAACCCCGG-3’（配列番号：５７）
第２プライマー：5’GCGAAGCTTCGCGACTCCCCGGATCCGCCTC-3’（配列番号：５８）
を用いて、ヒトゲノムＤＮＡからＥＧＲ－１プロモーター配列（－６３３から＋１）（ＳａｋａｍｏｔｏＫら．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ６：８６７－８７１（１９９１））をＰＣＲ増幅する。

【１０４６】

次に、実施例２４で生成したＧＡＳ：ＳＥＡＰ／Ｎｅｏベクターを用いて、ＥＧＲ１増幅産物をこのベクターに挿入することができる。制限酵素ＸｈｏＩ／ＨｉｎｄＩＩＩを用いて、ＧＡＳ：ＳＥＡＰ／Ｎｅｏベクターを直鎖にし、ＧＡＳ／ＳＶ４０詰込みを除去する。これらと同じ酵素でＦＧＲ１増幅産物を消化する。ベクターとＥＧＲ１プロモーターをライゲーションする。

【１０４７】

細胞培養用９６ウェルプレートを調製するために、３０％のエタノール（フィルター濾過）中のコーティング溶液（Ｉ型コラーゲン（Ｕｐｓｔａｔｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．カタログ番号０８－１１５）の１：３０希釈）を１０ｃｍプレート１枚当たり２ｍｌ、または９６ウェルプレートの１ウェル当たり５０ｍｌ添加し、２時間空気乾燥させる。

【１０４８】

通常、１００Ｕ／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを添加した１０％のウマ血清（ＪＲＨ　ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥＳ、カタログ番号１２４４９－７８Ｐ）、５％の熱失活ウシ胎児血清（ＦＢＳ）含有ＲＰＭＩ－１６４０（Ｂｉｏ　Ｗｈｉｔｔａｋｅｒ）中、予めコートした１０ｃｍ組織培養ディッシュにてＰＣ１２細胞を成長させる。３から４日毎に４分の１に分ける。プレートから細胞を掻き取って取り出し、１５回以上ピペッティングして再懸濁する。

【１０４９】

当該技術分野で知られた技術を用いて、ＥＧＲ／ＳＥＡＰ／Ｎｅｏコンストラクトを ＰＣ１２に形質移入する。細胞を３００μｇ／ｍｌのＧ４１８にて成長させ、ＥＧＲ－ＳＥＡＰ／ＰＣ１２安定細胞を得る。通常の培養のためにはＧ４１８を含まない培地を用いるが、１から２ヶ月毎に３００μｇ／ｍｌのＧ４１８にて２継代細胞を成長させるとよい。

【１０５０】

ニューロン活性についてアッセイするために、細胞が約７０から８０％コンフルエントの１０ｃｍプレートから古い培地を除去してスクリーニングする。細胞をＰＢＳ（リン酸緩衝食塩水）で１回洗浄する。次に、低血清培地（抗生物質を含む１％のウマ血清および０．５％のＦＢＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０）にて細胞を一晩飢餓状態におく。

【１０５１】

翌朝、培地を除去し、細胞をＰＢＳで洗浄する。細胞をプレートから掻き取り、該細胞を低血清培地２ｍｌに十分に懸濁する。細胞数をカウントし、低血清培地をさらに添加し

て、最終細胞密度５×１０^{5}細胞／ｍｌとする。

【１０５２】

細胞懸濁液２００μｌを９６ウェルプレートの各ウェルに添加する（１×１０^{5}細胞／ウェルと同等）。一連の異なる濃度の本発明のアルブミン融合蛋白質を添加し、３７℃にて４８から７２時間インキュベーションする。正対照として、ＥＧＲを介してＰＣ１２細胞を活性化することが知られている成長因子、例えば、５０ｎｇ／μｌの神経成長因子（ＮＧＦ）を用いることができる。典型的には、正対照において、５倍を超えるＳＥＡＰの導入を観察する。通常、当該技術分野で知られた技術および／または実施例２５に記載の技術を用いて、ＳＥＡＰアッセイを行い得る。

【１０５３】

実施例２７：Ｔ細胞活性についてのアッセイ

次のプロトコルを用いて、因子を同定し、本発明のアルブミン融合蛋白質がＴ細胞を増殖および／または分化させるかどうかを決定して、Ｔ細胞活性を評価する。実施例２４で生成したＧＡＳ／ＳＥＡＰ／Ｎｅｏコンストラクトを用いて、Ｔ細胞活性を評価する。従って、ＳＥＡＰ活性を増大させる因子は、Ｊａｋ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路を活性化する能力を示す。このアッセイで用いたＴ細胞は、ジャーカットＴ細胞（ＡＴＣＣアクセッション番号ＴＩＢ－１５２）であるが、Ｍｏｌｔ－３細胞（ＡＴＣＣアクセッション番号ＣＲＬ－１５５２）、およびＭｏｌｔ４細胞（ＡＴＣＣアクセッション番号ＣＲＬ－１５８２）も用いることができる。

【１０５４】

ジャーカットＴ細胞は、リンパ芽球性ＣＤ４＋Ｔｈ１ヘルパー細胞である。安定な細胞株を生成するために、ＤＭＲＩＥ－Ｃ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、ＧＡＳ－ＳＥＡＰ／ｎｅｏベクターでジャーカット細胞約２００万個を形質移入する（下記形質移入法）。形質移入した細胞を１ウェル当たり約２０，０００細胞密度で播種し、１ｍｇ／ｍｌ　ジェネテシンに抵抗性の形質移入体を選択する。抵抗性コロニーを拡大し、次に、増加濃度のインターフェロンγに対するそれらの応答性について試験する。選択したクローンの用量応答性を示す。

【１０５５】

具体的には、次のプロトコルにより、７５ウェル（細胞２００μｌ含有）に十分な細胞を生成する。従って、それをスケールアップしてもよいし、あるいは複数回行い、複数の９６ウェルプレートに十分な細胞を生成する。１％のペニシリン／ストレプトマイシンを添加した１０％の血清を含むＲＰＭＩにて、ジャーカット細胞を維持する。ＯＰＴＩ－ＭＥＭ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）２．５ｍｌをプラスミドＤＮＡ１０μｇとＴ２５フラスコ中で組み合わせる。ＤＭＲＩＥ－Ｃ５０μｌ含有ＯＰＴＩ－ＭＥＭ２．５ｍｌを添加し、室温にて１５～４５分間インキュベーションする。

【１０５６】

インキュベーション中に細胞密度をカウントし、必要な数の細胞（１回のトランスフェクション当たり１０^{7}個）をスピンダウンし、ＯＰＴＩ－ＭＥＭに再懸濁し、最終密度１０^{7}細胞／ｍｌとする。次に、ＯＰＴＩ－ＭＥＭ中１×１０^{7}細胞１ｍｌをＴ２５フラスコに添加し、３７℃で６時間インキュベーションする。インキュベーション後、１５％の血清を含むＲＰＭＩ１０ｍｌを添加する。

【１０５７】

ジャーカット：ＧＡＳ－ＳＥＡＰ安定受容体株を１０％血清、１ｍｇ／ｍｌ　ジェネテシン、および１％のペニシリン／ストレプトマイシンを含むＲＰＭＩにて維持する。これらの細胞を、種々の濃度の本発明の融合蛋白質１種類以上で処理する。

【１０５８】

融合蛋白質での処理日に細胞を洗浄し、新しい１０％の血清を含むＲＰＭＩに再懸濁し、１ｍｌ当たり５００，０００細胞密度とする。必要とする正確な細胞数は、スクリーニングする融合蛋白質の数、および異なる濃度の融合蛋白質の数に依存するだろう。９６ウェルプレート１枚に対して、約１０００万個の細胞（１０プレートに対して、１００００

万個の細胞）が必要である。

【１０５９】

融合蛋白質で処理したジャーカット細胞含有ウェルディッシュを、インキュベーター内に４８時間おく（注意：この時間は４８から７２時間の間で変更可能である）。次に、１２チャンネルピペットを用いて、半透明の９６ウェルプレートに各ウェル由来試料３５μｌを移す。半透明のプレートを（セロファンカバーを用いて）覆い、実施例２５に従い、ＳＥＡＰアッセイを行うまで－２０℃にて保存する。残りの処理細胞含有プレートを４℃におき、所望に応じて、特定のウェルについてアッセイを繰り返すための材料供給源として用いる。

【１０６０】

ジャーカットＴ細胞を活性化することが知られている１００Ｕ／ｍｌのインターフェロンγを正対照として用いることができる。典型的には、正対照ウェルでは３０倍を超える誘導を観察する。

【１０６１】

一過性並びに安定な形質移入細胞の生成において、上記プロトコルを用いることができる。これは当業者に明らかだろう。

【１０６２】

実施例２８：Ｔ細胞活性についてのアッセイ

ＮＦ－ＫＢ（核因子ＫＢ）は、炎症性サイトカインＩＬ－１およびＴＮＦ、ＣＤ３０およびＣＤ４０、リンホトキシン－αおよびリンホトキシン－βを含む広範な因子により、ＬＰＳまたはトロンビンへの曝露により、およびある種のウイルス遺伝子産物の発現により活性化される転写因子である。転写因子としてＮＦ－ＫＢは、免疫細胞の活性化、アポトーシスの制御（ＮＦ－ＫＢはアポトーシスから細胞を守るようである）、ＢおよびＴ細胞発生、抗ウイルスおよび抗菌応答、および複数のストレス性応答に関与する遺伝子の発現を調節する。

【１０６３】

無刺激状態において、ＮＦ－ＫＢはＩ－ＫＢ（阻害因子ＫＢ）と共に細胞質に保持される。しかしながら、刺激の際、Ｉ－ＫＢはリン酸化され、分解され、ＮＦ－ＫＢは核を行ったり来たりし、それにより、標的遺伝子が活性化される。ＮＦ－ＫＢにより活性化される標的遺伝子は、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＣＡＭ－１およびＭＨＣクラスＩを含む。

【１０６４】

広範な刺激に応答するその中心的な役割および能力により、ＮＦ－ＫＢプロモーターエレメントを有する受容体コンストラクトを用いて、融合蛋白質をスクリーニングする。ＮＦ－ＫＢの活性化因子または阻害因子は、疾患の処置、予防、および／または診断に有用である。例えば、ＮＦ－ＫＢの阻害因子を用いて、関節リウマチのようなＮＦ－ＫＢの急性または慢性活性化と関連する疾患を処置できる。

【１０６５】

ＮＦ－ＫＢプロモーターエレメント含有ベクターを構築するために、ＰＣＲベースのストラテジーを用いる。上流プライマーは、４個のタンデムコピーのＮＦ－ＫＢ結合部位（ＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＣ）（配列番号：５９）、ＳＶ４０初期プロモーター配列の５’末端に相補的な配列１８ｂｐを含有し、ＸｈｏＩ部位に隣接する：

5’:GCGGCCTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCCATCCTGCCATCTCAATTAG：3’（配列番号：６０）。

【１０６６】

下流プライマーは、ＳＶ４０プロモーターの３’末端に相補的であり、ＨｉｎｄＩＩＩ部位と隣接する：

5’GCGGCCTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCCATCCTGCCATCTCAATTAG:3’（配列番号：６０）。

【１０６７】

Ｃｌｏｎｔｅｃｈより得たｐＢ－ｇａｌ：プロモータープラスミドに存在するＳＶ４０プロモーターテンプレートを用いて、ＰＣＲ増幅を行う。生じたＰＣＲ断片をＸｈｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩを用いて消化し、ＢＬＳＫ２－（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）にサブクローニングする。Ｔ７およびＴ３プライマーを用いて配列決定し、インサートが次の配列：
5’:CTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCCATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT:3’（配列番号：６１）
を含有することを確認する。

【１０６８】

次に、ＸｈｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩを用いて、ｐＳＥＡＰ２プロモータープラスミド（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）に存在するＳＶ４０微小プロモーターエレメントをＮＦ－ＫＢ／ＳＶ４０断片と置き換える。しかしながら、このベクターはネオマイシン耐性遺伝子を含有しないので、哺乳類の発現系には好ましくはない。

【１０６９】

安定な哺乳類細胞株を生成するために、制限酵素ＳａｌＩおよびＮｏｔＩを用いて、上記ＮＦ－ＫＢ／ＳＥＡＰベクターからＮＦ－ＫＢ／ＳＶ４０／ＳＥＡＰカセットを除去し、ネオマイシン耐性遺伝子含有ベクターに挿入する。具体的には、ＮＦ－ＫＢ／ＳＶ４０／ＳＥＡＰカセットをｐＧＦＰ－１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）に挿入し、ｐＧＦＰ－１をＳａｌＩおよびＮｏｔＩで消化した後、ＧＦＰ遺伝子と置き換える。

【１０７０】

ＮＦ－ＫＢ／ＳＶ４０／ＳＥＡＰ／Ｎｅｏベクターを作製し、安定なジャーカットＴ細胞を作製し、実施例２５に記載のプロトコルにより維持する。同様に、これらの安定なジャーカットＴ細胞を用いて融合蛋白質をアッセイする方法も実施例２５に記載している。正対照として、外因性ＴＮＦ－α（０．１、１、１０ｎｇ）をウェルＨ９、Ｈ１０およびＨ１１に添加する。典型的には、５～１０倍の活性を観察する。

【１０７１】

実施例２９：骨髄活性を同定するアッセイ

次のプロトコルを用いて、融合蛋白質が骨髄細胞を増殖および／または分化させるかどうかを決定することにより、本発明のアルブミン融合蛋白質の骨髄活性を評価する。実施例２４で生成したＧＡＳ／ＳＥＡＰ／Ｎｅｏコンストラクトを用いて、骨髄細胞活性を評価する。従って、ＳＥＡＰ活性を増大する因子は、Ｊａｋ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路を活性化する能力を示す。このアッセイで用いた骨髄細胞は前単球細胞株のＵ９３７であるが、ＴＦ－１、ＨＬ６０、またはＫＧ１も用いることができる。

【１０７２】

実施例２４で生成したＧＡＳ／ＳＥＡＰ／ＮｅｏコンストラクトでＵ９３７細胞を一過性に形質移入するために、ＤＥＡＥ－Ｄｅｘｔｒａｎ法（Ｋｈａｒｂａｎｄａら．，Ｃｅｌｌ　Ｇｒｏｗｔｈ＆Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ，５：２５９－２６５）を用いる。まず、Ｕ９３７細胞２×１０^{7}個を回収し、ＰＢＳで洗浄する。通常、１００Ｕ／ｍｌペニシリンおよび１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシンを添加した１０％　熱失活ウシ胎児血清（ＦＢＳ）含有ＲＰＭＩ　１６４０にてＵ９３７細胞を成長させる。

【１０７３】

次に、０．５ｍｇ／ｍｌのＤＥＡＥ－Ｄｅｘｔｒａｎ、ＧＡＳ－ＳＥＡＰ２プラスミド８μｇ、１４０ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭのＫＣｌ、３７５μＭの$Na_2HPO_4 7H_2O$、１ｍＭの$MgCl_2$、および６７５μＭの$CaCl_2$含有２０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）バッファー１ｍｌに細胞を懸濁する。３７℃で４５分間インキュベーションする。

【１０７４】

１０％のＦＢＳ含有ＲＰＭＩ　１６４０培地で細胞を洗浄し、次に、完全培地１０ｍｌに再懸濁し、３７℃で３６時間インキュベーションする。

【１０７５】
細胞を４００μｇ／ｍｌのＧ４１８にて成長させ、ＧＡＳ－ＳＥＡＰ／Ｕ９３７安定細胞を得る。通常の成長には、Ｇ４１８を含まない培地を用いるが、１から２ヶ月毎に４００μｇ／ｍｌのＧ４１８にて２継代細胞を再び成長させるとよい。
【１０７６】
１×１０^{8}細胞（これは１０回の９６ウェルプレートアッセイに十分である）を回収し、ＰＢＳで洗浄し、細胞を試験する。上記成長培地２００ｍｌに細胞を懸濁し、最終密度５×１０^{5}細胞／ｍｌとする。９６ウェルプレート１ウェル当たり細胞２００μｌ（または１×１０^{5}細胞／ウェル）を播種する。
【１０７７】
異なる濃度の融合蛋白質を添加する。３７℃で４８から７２時間インキュベーションする。正対照として、Ｕ９３７細胞を活性化することが知られている１００Ｕ／ｍｌ　インターフェロンγを用いることができる。典型的には、正対照ウェルでは、３０倍を超える誘導を観察する。ＳＥＡＰは、当該技術分野で知られた方法および／または実施例２５に記載のプロトコルにより上清をアッセイする。
【１０７８】
実施例３０：小分子濃度および膜透過性の変化を同定するアッセイ
リガンドの受容体との結合は、カルシウム、カリウム、ナトリウムのような小分子の細胞内濃度、およびｐＨを変化させ、ならびに膜電位を変化させることが知られている。特定の細胞の受容体と結合する融合蛋白質を同定するためのアッセイにおいて、これらの変化を測定できる。次のプロトコルはカルシウムのアッセイについて記載するが、このプロトコルを変形して、カリウム、ナトリウム、ｐＨ、膜電位、または蛍光プローブにより検出可能な任意の他の小分子の変化を容易に検出することができる。
【１０７９】
次のアッセイは、小分子と結合する蛍光分子（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）の変化を測定するために蛍光イメージングプレートリーダー（「ＦＬＩＰＲ」）を用いる。小分子を検出する任意の蛍光分子をカルシウム蛍光分子（ここでは、ｆｌｕｏ－４（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．；カタログ番号Ｆ－１４２０２）を用いる）の代わりに用いられることは明らかである。
【１０８０】
接着細胞については、透明な底のＣｏ－ｓｔａｒ黒色９６ウェルプレート中、１０，０００～２０，０００細胞／ウェルにて細胞を播種する。プレートをCO_2インキュベーターにて２０時間インキュベーションする。Ｂｉｏｔｅｋ洗浄機にて、ＨＢＳＳ（ハンクス緩衝塩溶液）２００μｌで２回洗浄し、最後の洗浄後、バッファー溶液１００μｌを残す。
【１０８１】
１０％のプルロン酸（ｐｌｕｒｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）ＤＭＳＯ中１ｍｇ／ｍｌ　ｆｌｕｏ－４ストック溶液を生成する。細胞をｆｌｕｏ－４と共にロードするために、１２μｇ／ｍｌのｆｌｕｏ－４　５０μｌを各ウェルに添加する。プレートを３７℃、CO_2インキュベーターにて６０分間インキュベーションする。Ｂｉｏｔｅｋ洗浄機にて、ＨＢＳＳで４回プレートを洗浄し、バッファー１００μｌを残す。
【１０８２】
非接着細胞については、細胞を培地からスピンダウンする。５０ｍｌのコニカルチューブ中、ＨＢＳＳを用いて細胞を再懸濁し、２～５×１０^{6}細胞／ｍｌとする。１０％のプルロン酸ＤＭＳＯ中の１ｍｇ／ｍｌのｆｌｕｏ－４ストック溶液４μｌを細胞懸濁液各１ｍｌに添加する。次に、チューブを３７℃のウォーターバスにて３０～６０分間おく。細胞をＨＢＳＳで２回洗浄し、１×１０^{6}細胞／ｍｌに再懸濁し、マイクロプレートに分注し、１０μｌ／ウェルとする。プレートを１０００ｒｐｍにて５分間遠心する。次に、Ｄｅｎｌｅｙ細胞洗浄機にて、２００μｌを用いてプレートを洗浄し、次に、アスピレーションして、最終容量１００μｌとする。

【１０８３】
非細胞ベースのアッセイのために、各ウェルはｆｌｕｏ－４のような蛍光分子を含有する。本発明の融合蛋白質をウェルに添加し、蛍光の変化を検出する。
【１０８４】
細胞内カルシウムの蛍光を測定するために、次のパラメーターについてＦＬＩＰＲをセットする：（１）システムゲインは３００～８００mWであり：（２）露出時間は０．４秒であり；（３）カメラＦ／停止はＦ／２であり；（４）励起は４８８ｎｍであり；（５）放出は５３０ｎｍであり；そして（６）試料添加量は５０μｌである。５３０ｎｍでの放出の増大は、本発明のアルブミン融合蛋白質により引き起こされる細胞外シグナル伝達現象、または本発明のアルブミン融合蛋白質により誘発される分子を示し、それは細胞内Ca^{++}濃度の上昇を生じる。
【１０８５】
実施例３１：チロシンキナーゼ活性の同定アッセイ
蛋白質チロシンキナーゼ（ＰＴＫ）は、多様なグループの膜貫通型および細胞質キナーゼである。受容体蛋白質チロシンキナーゼ（ＲＰＴＫ）のグループの中には、ＰＤＧＦ、ＦＧＦ、ＥＧＦ、ＮＧＦ、ＨＧＦおよびインスリン受容体サブファミリーを含む、様々な分裂促進因子および代謝成長因子に対する受容体がある。加えて、対応するリガンドが知られていない大きなＲＰＴＫｓファミリーがある。ＲＰＴＫｓについてのリガンドは、主に、分泌される小蛋白質を含むが、膜結合型および細胞外マトリックス蛋白質も含む。
【１０８６】
リガンドによるＲＰＴＫの活性化は、リガンド媒介受容体二量体化を含み、受容体サブユニットのトランスリン酸化および細胞質チロシンキナーゼ活性化をもたらす。細胞質チロシンキナーゼは、ｓｒｃ－ファミリー（例えば、ｓｒｃ、ｙｅｓ、Ｉｃｋ、ｌｙｎ、ｆｙｎ）の受容体関連チロシンキナーゼ、ならびに非受容体結合およびサイトゾル蛋白質チロシンキナーゼ、例えば、Ｊａｋファミリーを含み、そのメンバーは、受容体のサイトカインスーパーファミリー（例えば、インターロイキン、インターフェロン、ＧＭ－ＣＳＦおよびレプチン）によりトリガーされるシグナル伝達を介する。
【１０８７】
チロシンキナーゼ活性を刺激し得る多種多様な既知の因子のために、本発明のアルブミン融合蛋白質または本発明の融合蛋白質により誘導される分子が、チロシンキナーゼシグナル伝達経路を活性化できるか否かを同定することは、興味深いものである。それ故に、以下のプロトコルを考案し、チロシンキナーゼシグナル伝達経路を活性化し得るかかる分子を同定する。
【１０８８】
Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ（Ｎａｐｅｒｖｉｌｌｅ、ＩＬ）から購入した９６ウェルのＬｏｐｒｏｄｙｎｅサイレントスクリーンプレート中に、１ウェル当たり約２５，０００細胞の密度で、標的細胞（例えば、初代ケラチノサイト）を播種する。１００％のエタノールで３０分間ずつ２回リンスすることによりそのプレートを滅菌し、水でリンスし、次いで、一晩乾燥する。全てＳｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、MO）から購入できる、１００ｍｌの細胞培養グレードのＩ型コラーゲン（５０ｍｇ／ｍｌ）、ゼラチン（２％）またはポリリシン（５０ｍｇ／ｍｌ）或いはＢｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ（Ｂｅｄｆｏｒｄ、MA）から購入した１０％のマトリゲルまたは仔ウシ血清を用いて幾つかのプレートを二時間コーティングし、ＰＢＳでリンスし、次いで、４℃で貯蔵する。成長培地に５、０００細胞／ウェルで播種し、４８時間後、製造元Ａｌａｍａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ，ＣＡ）の説明に従ってアラマーブルー（ａｌａｍａｒＢｌｕｅ）を用いて、細胞数を間接計量することにより、これらのプレート上での細胞成長をアッセイする。Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ（Ｂｅｄｆｏｒｄ，MA）製のＦａｌｃｏｎプレートカバー＃；３０７１を用いて、Ｌｏｐｒｏｄｙｎｅサイレントスクリーンプレートを覆う。幾つかの増殖実験ではＦａｌｃｏｎ Ｍｉｃｒｏｔｅｓｔ ＩＩＩ細胞培養プレートを用いることもできる。

【１０８９】
抽出物を調製するために、Ａ４３１細胞を、Ｌｏｐｒｏｄｙｎｅプレート（２０，０００／２００ｍｌ／ウェル）のナイロンメンブレン上に播種し、次いで、完全培地中で一晩培養する。無血清基本培地中で２４時間インキュベーションすることにより、細胞を静止状態とする。ＥＧＦ（６０ｎｇ／ｍｌ）または異なる濃度の本発明のアルブミン融合蛋白質で処置し、５～２０分後、培地を除き、次いで、１００ｍｌの抽出バッファー（（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ，ｐＨ７．５，０．１５ＭのＮａＣｌ，１％のトリトンＸ－１００，０．１％のＳＤＳ，２ｍＭのＮａ３Ｖ０４，２ｍＭのＮａ４Ｐ２０７およびＢｏｅｈｒｉｎｇｅｒＭａｎｎｈｅｉｍ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）から入手したプロテアーゼ阻害剤のカクテル（＃；１８３６１７０））を各ウェルへ加え、次いで、回転攪拌器上で、プレートを５分間４℃で攪拌する。次いで、プレートを真空トランスファーマニホールド中にセットし、次いで、ハウスバキュームを用いて抽出物を各ウェルの０．４５ｍｍのメンブレン層から濾過する。真空マニホールドの底の９６－ウェルキャッチ／アッセイプレート中に抽出物を集め、その後直ちに氷上に置く。遠心分離により清澄化させた抽出物を得るために、界面活性剤で５分間可溶化させた後、各ウェルの内容物を取り出し、次いで、１５分間、４℃、１６，０００×ｇにて遠心分離する。

【１０９０】
チロシンキナーゼ活性のレベルについて、濾過した抽出物を試験する。チロシンキナーゼ活性を検出する多くの方法が知られているが、ここでは１つの方法を記載する。

【１０９１】
一般的に、本発明のアルブミン融合蛋白質のチロシンキナーゼ活性は、特定の基質（ビオチン化されたペプチド）上にあるチロシン残基をリン酸化する能力を測定することにより、評価する。この目的のために用いられ得るビオチン化されたペプチドは、ＰＳＫ１（細胞分裂キナーゼｃｄｃ２－ｐ３４のアミノ酸６－２０に対応する）およびＰＳＫ２（ガストリンのアミノ酸１－１７に対応する）を含む。両ペプチドは、様々なチロシンキナーゼのための基質であり、およびＢｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍから入手可能である。

【１０９２】
以下の成分を順に加えることにより、チロシンキナーゼ反応を開始する。初めに、１０ｕｌの５ｕＭのビオチン化されたペプチド、次いで、１０ｕｌのＡＴＰ／Mg_{2+}（５ｍＭのＡＴＰ／５０ｍＭの$MgCl_2$）、次いで、１０ｕｌの５×アッセイバッファー（４０ｍＭのイミダゾールヒドロクロリド、ｐＨ７．３，４０ｍＭのベーターグリセロリン酸，１ｍＭのＥＧＴＡ，１００ｍＭの$MgCl_2$，５ｍＭの$MnC1_2$０．５ｍｇ／ｍｌのＢＳＡ）、次いで、５ｕｌのバナジン酸ナトリウム（１ｍＭ）、次いで、５ｕｌの水を加える。成分を穏やかに混合し、次いで、反応混合物を２分間３０℃でプレインキュベーションする。１０ｕｌの対照酵素または濾過上清を加えることにより、反応を開始する。

【１０９３】
次いで、１０ｕｌの１２０ｍｍＥＤＴＡを加え、そして、反応物を氷上に置くことにより、チロシンキナーゼアッセイ反応を終了させる。

【１０９４】
５０ｕｌアリコートの反応混合物をマイクロタイタープレート（ＭＴＰ）モジュールに移し、次いで、３７℃で２０分間インキュベーションすることにより、チロシンキナーゼ活性を測定する。これにより、ストレプトアビジンでコーティングされた９６ウェルプレートをビオチン化ペプチドと結合させることができる。３００ｕｎ／ウェルのＰＢＳを用いてＭＴＰモジュールを４回洗浄する。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼ（抗－Ｐ－Ｔｙｒ－ＰＯＤ（０．５ｕ／ｍｌ））にコンジュゲートさせた７５ｕｌの抗－ホスホチロシン抗体を各ウェルに加え、次いで、３７℃で１時間インキュベーションする。上記のようにウェルを洗浄する。

【１０９５】
次に、１００ｕｌのペルオキシダーゼ基質溶液（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅ

ｉｍ）を加え、次いで、室温で少なくとも５分間（最高３０分）インキュベーションする。ＥＬＩＳＡリーダーを用いて、４０５ｎｍにおける試料の吸光度を測定する。ＥＬＩＳＡリーダーを用いて、結合したペルオキシダーゼ活性のレベルを定量する。これは、チロシンキナーゼ活性のレベルを反映する。

【１０９６】

実施例３２：リン酸化活性の同定アッセイ

実施例３１に記載した蛋白質チロシンキナーゼ活性のアッセイに対する潜在的な代替および／または補助として、主要な細胞内シグナル伝達中間体の活性化（リン酸化）を検出するアッセイを用いることもできる。例えば、以下に記載するように、一の特定のアッセイは、Ｅｒｋ－１およびＥｒｋ－２キナーゼのチロシンリン酸化を検出できる。しかし、他の分子、例えば、Ｒａｆ、ＪＮＫ、ｐ３８ＭＡＰ、Ｍａｐキナーゼキナーゼ（ＭＥＫ）、ＭＥＫキナーゼ、Ｓｒｃ、筋肉特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）、ＩＲＡＫ、Ｔｅｃおよびヤヌスならびに任意の他のホスホセリン、ホスホチロシンまたはホスホトレオニン分子のリン酸化は、以下のアッセイにおいて、Ｅｒｋ－１またはＥｒｋ－２の代わりにこれらの分子をを用いることにより検出することができる。

【１０９７】

特に、０．１ｍｌの蛋白質Ｇ（１ｕｇ／ｍｌ）を用いて２時間室温（ＲＴ）で９６－ウェルＥＬＩＳＡプレートのウェルをコーティングすることにより、アッセイプレートを作製する。次いで、ＰＢＳでそのプレートをリンスし、次いで、３％のＢＳＡ／ＰＢＳを用いて１時間室温でブロッキングする。次いで、Ｅｒｋ－１およびＥｒｋ－２に対する２つの市販のモノクローナル抗体（１００ｎｇ／ウェル）（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を用いて、蛋白質Ｇプレートを処理する（室温で１時間）（他の分子を検出するために、任意の上記分子を検出するモノクローナル抗体に置き換えることにより、この工程を容易に修飾することができる）。３～５時間後、ＰＢＳでリンスし、使用時までそのプレートを４℃で貯蔵する。

【１０９８】

２０，０００／ウェルにて９６－ウェルのＬｏｐｒｏｄｙｎｅフィルタープレートにＡ４３１細胞を播種し、次いで、成長培地中で一晩培養する。次いで、基本培地（ＤＭＥＭ）中で４８時間かけてその細胞を飢餓状態とし、次いで、ＥＧＦ（６ｎｇ／ウェル）または様々な濃度の本発明の融合蛋白質を用いて５～２０分間処理する。次いで、細胞を溶解し、次いで、抽出物をアッセイプレート中に直接濾過して加える。

【１０９９】

抽出物を１時間室温でインキュベーションした後、ウェルを再度リンスする。正対照として、Ａ４３１抽出物の代わりに、市販のＭＡＰキナーゼ調製物（１０ｎｇ／ウェル）を用いる。次いで、Ｅｒｋ－ｌおよびＥｒｋ－２キナーゼのリン酸化されたエピトープを特異的に認識する市販のポリクローナル（ウサギ）抗体（ｌｕｇ／ｍｌ）を用いてプレートを処理する（室温で１時間）。この抗体を標準的な方法によりビオチン化する。次いで、ＤＥＬＦＩＡ装置（時間分解蛍光）で、ユーロピウム－ストレプトアビジンおよびユーロピウム蛍光増強試薬を用いて連続的にインキュベーションすることにより、結合されたポリクローナル抗体を定量する。バックグラウンドを超える蛍光シグナルの増大は、本発明の融合蛋白質または本発明のアルブミン融合蛋白質により誘導された分子によるリン酸化を示す。

【１１００】

実施例３３：リン酸化アッセイ

本発明のアルブミン融合蛋白質のリン酸化活性をアッセイするために、米特許第５，９５８，４０５号（該文献は出典明示により本明細書の一部となる）に記載されているリン酸化アッセイを利用する。すなわち、ガンマ標識^{32}Ｐ－ＡＴＰを用いて蛋白質基質をリン酸化し、次いで、ガンマ放射性同位元素カウンターを用いて取り込まれた放射能を定量することにより、リン酸化活性を測定してもよい。本発明の融合蛋白質を、蛋白質基質、^{32}Ｐ－ＡＴＰおよびキナーゼバッファーと一緒にインキュベーションする。次いで、電

気泳動により、基質に取り込まれた^{32}Ｐを遊離の^{32}Ｐ－ＡＴＰから分離し、次いで取り込まれた^{32}Ｐをカウントし、次いで、負対照と比較する。負対照を超える放射能カウントは、融合蛋白質のリン酸化活性の指標となる。

【１１０１】

実施例３４：ポリペプチドリガンドの存在下での、本発明のアルブミン融合蛋白質のリン酸化活性｛活性化）の検出

当該技術分野において知られているかまたは本明細書中記載されている方法を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質のリン酸化活性を測定する。リン酸化活性の好ましい測定方法は、米国特許第５，８１７，４７１号（出典明示により本明細書の一部となる）に記載されているように、チロシンリン酸化アッセイを用いることによる。

【１１０２】

実施例３５：骨髄ＣＤ３４＋細胞増殖の刺激についてのアッセイ

このアッセイは、造血成長因子の存在下でのヒトＣＤ３４＋の増殖能力に基づき、およびＣＤ３４＋細胞の増殖を刺激する本発明の融合蛋白質の能力を評価する。

【１１０３】

ほとんどの成熟前駆細胞は単一のシグナルだけに応答し得ることが、既に示されている。より未成熟な前駆細胞は、少なくとも２つの応答シグナルを必要とする。それ故に、多種多様な始原細胞の造血活性への本発明の融合蛋白質の効果を試験するために、アッセイは、造血成長因子の存在下または不在下の本発明の特定の融合蛋白質を含む。単離した細胞を試験する試料と組み合わせて、幹細胞因子（ＳＣＦ）の存在下で５日間培養する。ＳＣＦ単独では、かかる条件下では「生存」因子としてのみ作用するという、骨髄（ＢＭ）細胞の増殖に対して非常に限られた効果を有する。しかし、これらの細胞（例えば、ＩＬ－３）への刺激効果を示す任意の因子と組み合わせると、ＳＣＦは相乗効果を惹起し得る。それ故に、試験される融合蛋白質が造血始原細胞への刺激効果を有するならば、かかる活性は容易に検出できる。通常のＢＭ細胞は低レベルのサイクリング細胞を有するので、特定の融合蛋白質の阻害効果はなんら検出されないかもしれない。従って、好ましくは、始原細胞への阻害効果のためのアッセイは、初めに、ＳＣＦ＋ＩＬ＋３によるインビトロ刺激に曝し、次いで、かかる誘導増殖の阻害について評価しようとする化合物と接触させた細胞において試験する。

【１１０４】

すなわち、当該技術分野において知られている方法を用いてＣＤ３４＋細胞を単離する。細胞を解凍し、次いで、培地（１％のＬ－グルタミン（５００ｍＩ）Ｑｕａｌｉｔｙ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ，Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ Ｃａｔ＃；１６０－２０４－１０１を加えた、ＱＢＳＦ ６０無血清培地）中に再懸濁させる。２００×ｇで穏やかな遠心分離工程を数回行った後、細胞を１時間静置する。細胞数を２．５×１０５細胞／ｍｌに調節する。この間、１００μｌの滅菌水を９６－ウェルプレートの周壁へ加える。このアッセイにおいて本発明のアルブミン融合蛋白質を用いて試験できるサイトカインは、単独では５０ｎｇ／ｍｌの、ｒｈＳＣＦおよびｒｈＬ－３（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，Ｃａｔ＃；２０３－ＭＬ）と組み合わせる際は３０ｎｇ／ｍｌのｒｈＳＣＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，Ｃａｔ＃；２５５－ＳＣ）である。１時間後、１０μｌの調製したサイトカイン、様々な濃度の本発明のアルブミン融合蛋白質および２０μｌの希釈した細胞を、１００μｌの最終容量となるように、ウェル中に既に存在する培地へ加える。次いで、そのプレートを３７℃／５％のCO_2インキュベーターに５日間セットする。

【１１０５】

アッセイ物を回収する１８時間前に、０．５μＣｉ／ウェルの［^{3}Ｈ］チミジンを各ウェルに１０μｌ容量で加え、増殖速度を測定する。Ｔｏｍｔｅｃハーベスター９６を用いて各９６－ウェルプレートからフィルターマットへ細胞を回収することにより、実験を終了する。回収後、そのフィルターマットを乾燥し、トリミングし、次いで、１つのＯｍｎｉフィルタープレートと１つのＯｍｎｉフィルタートレイからなるＯｍｎｉフィルターア

センブリ中にセットする。６０μｌのＭｉｃｒｏｓｃｉｎｔを各ウェルに加え、次いで、トップシールＡ－プレスオン－シーリングフィルムを用いてプレートを密封する。カウンティングのために、バーコード１５ステッカーを初めのプレートに取り付ける。次いで、密封したプレートを装填し、Ｐａｃｋａｒｄトップカウントにより放射能レベルを測定し、そして、印刷されたデータを収集して、解析する。放射能のレベルは細胞増殖の量を反映する。

【１１０６】

この実施例に記載の研究は、骨髄ＣＤ３４＋細胞の増殖を刺激する、特定の融合蛋白質の活性を試験するものである。当業者は、例示された研究を容易に修飾して、本発明の融合蛋白質およびポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストの活性を試験することができよう。骨髄ＣＤ３４＋細胞の増殖を刺激する本発明のアルブミン融合蛋白質の能力は、アルブミン融合蛋白質および／またはその融合蛋白質に対応するポリヌクレオチドが、免疫系および血球新生に作用する障害の診断および処置のために有用であることを示す。典型的な使用は、本明細書中上記した「免疫活性」および「感染症」のセクションおよび本明細書中の別の箇所に記載されている。

【１１０７】

実施例３６：細胞外マトリックス増強細胞応答｛ＥＭＥＣＲ）のためのアッセイ

細胞外マトリックス増強細胞応答（ＥＭＥＣＲ）アッセイの目的は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）誘導シグナルに関連して、造血幹細胞に作用するための本発明の融合蛋白質の能力を評価することである。

【１１０８】

周囲の微小環境から受け取った一または複数のシグナルに関連して、細胞は制御因子に応答する。例えば、線維芽細胞ならびに内皮および上皮幹細胞は、ＥＣＭからのシグナルがないと複製できない。造血幹細胞は、骨髄中では自己再生できるが、インビトロ懸濁培養液中ではできない。幹細胞がインビトロで自己再生できる能力は、ストロマ細胞およびＥＣＭ蛋白質フィブロネクチン（ｆｎ）とのそれらの相互作用に依存している。ｆｎへの細胞接着は、ヒトおよびマウス造血幹細胞により発現される、$\alpha_5-\beta_1$および$\alpha_4-\beta_1$インテグリン受容体により介される。ＥＣＭ環境と一体となって、かつ幹細胞の自己再生の刺激に関与する一または複数の該因子はまだ同定されていない。かかる因子を見出すことは、遺伝子治療および骨髄移植への適用において非常に興味深いだろう。

【１１０９】

すなわち、組織培養処理されていないポリスチレン製の９６－ウェルプレートを、ｆｎ断片を用いて０．２μｇ／ｃｍ^{2}のコーティング濃度でコーティングする。マウス骨髄細胞を、０．２ｍｌの無血清培地中にプレーティングする（１，０００細胞／ウェル）。ＩＬ－３（５ｎｇ／ｍｌ）＋ＳＣＦ（５０ｎｇ／ｍｌ）の存在下で培養した細胞を正対照として用い、該条件下では、幹細胞はほとんど自己再生しないが、顕著な分化を起こすと考えられる。ＳＣＦ（５．０ｎｇ／ｍｌ）の存在下および不在下にて適切な負対照と共に本発明のアルブミン融合蛋白質を試験する。ここで、本発明のアルブミン融合蛋白質を含む投与組成物の量は、全アッセイ容量の１０％を占める。次いで、低酸素環境（５％のCO_2，７％のO_2および８８％のN_2）の組織培養インキュベーター中で７日間インキュベーションすることにより、プレーティングされた細胞を成長させる。次いで、細胞ＤＮＡ中へのチミジン取り込みを測定することにより、ウェル内の増殖細胞数を定量する。該アッセイにおける陽性ヒットを検証するには、細胞の表現型の特徴付けが必要であろう。これは、培養系をスケールアップし、そして、細胞表面抗原に対する適切な抗体試薬およびＦＡＣＳｃａｎを用いることにより、成し遂げることができる。

【１１１０】

本発明の特定の融合蛋白質が造血始原細胞の刺激因子であると見出されるならば、融合蛋白質および融合蛋白質に対応するポリヌクレオチドは、例えば、免疫系および血球新生に作用する障害の診断および処置において有用であってもよい。典型的な使用は、本明細書中上記した「免疫活性」および「感染症」のセクションならびに本明細書中に別記され

ている。融合蛋白質は、様々な血液系列の幹細胞および決定付けられている前駆細胞の増殖ならびに様々な細胞型の分化および／または増殖において有用であってもよい。

【１１１１】

さらに、本発明のアルブミン融合蛋白質および本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、造血細胞の増殖および分化を阻害するために用いられてもよく、それ故に、化学療法の間、化学治療剤から骨髄幹細胞を保護するために用いられてもよい。この抗増殖効果により、高用量の化学治療剤の投与、およびそれ故に、より有効な化学治療処置が可能となる。

【１１１２】

さらに、間質性細胞が造血系列の細胞の産生に重要であるために、本発明の融合蛋白質および本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、造血に関連する障害、例えば、貧血、汎血球減少症、白血球減少症、血小板減少症または白血病の処置および診断のために有用であってもよい。該使用は、骨髄細胞のエキソビボ培養、骨髄移植、骨髄再構築、腫瘍症の放射線療法または化学療法を含む。

【１１１３】

実施例３７：ヒト皮膚線維芽細胞および大動脈平滑筋細胞増殖

本発明のアルブミン融合蛋白質を、正常なヒト皮膚線維芽細胞（ＮＨＤＦ）およびヒト大動脈平滑筋細胞（ＡｏＳＭＣ）の培養液へ加え、そして各試料について２つの共アッセイを行う。初めのアッセイは、正常なヒト皮膚線維芽細胞（ＮＨＤＦ）または大動脈平滑筋細胞（ＡｏＳＭＣ）の増殖への融合蛋白質の効果を調べる。線維芽細胞または平滑筋細胞の異常な成長は、繊維症および再狭窄を含む幾つかの病理学的過程の一部である。第２のアッセイは、ＮＨＤＦおよびＳＭＣの両方によるＩＬ６産生を調べる。ＩＬ６産生は、機能活性化の指標である。活性化された細胞は、多数のサイトカインおよび他の因子の産生を増大させ、炎症誘発または免疫調節の成果をもたらし得る。アッセイは、共ＴＮＦａ刺激を伴うおよび伴わずに行い、共刺激性または阻害性活性を調べる。

【１１１４】

すなわち、１日目、１００μｌの培養培地中に１０００細胞／ウェル（ＮＨＤＦ）または２０００細胞／ウェル（ＡｏＳＭＣ）を有する９６－ウェルブラックプレートを用意する。ＮＨＤＦ培養培地は、Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ　ＦＢ基本培地、１ｍｇ／ｍｌのｈＦＧＦ、５ｍｇ／ｍｌのインスリン、５０ｍｇ／ｍｌのゲンタマイシン、２％のＦＢＳを含み、一方、ＡｏＳＭＣ培養培地は、Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ　ＳＭ基本培地、０．５ｇ／ｍｌのｈＥＧＦ、５ｍｇ／ｍ１のインスリン、１μｇ／ｍ１のｈＦＧＦ、５０ｍｇ／ｍ１のゲンタマイシン、５０μｇ／ｍｌのアンホテリシンＢ、５％のＦＢＳを含む。３７℃で少なくとも４～５時間インキュベーションした後、培養培地を吸引し、次いで、成長停止培地と交換する。ＮＨＤＦのための成長停止培地は、線維芽細胞基本培地、５０ｍｇ／ｍｌのゲンタマイシン、２％のＦＢＳを含み、一方、ＡｏＳＭＣのための成長停止培地は、ＳＭ基本培地、５０ｍｇ／ｍｌのゲンタマイシン、５０μｇ／ｍ１のアンホテリシンＢ、０．４％のＦＢＳを含む。２日目まで３７℃でインキュベーションする。

【１１１５】

２日目、培地対照および既知の蛋白質対照が常に含まれるように、本発明のアルブミン融合蛋白質の段階希釈液および鋳型を設計する。刺激および阻害の両方の実験のために、成長停止培地で蛋白質を希釈する。阻害実験のために、ＴＮＦａを最終濃度が２ｎｇ／ｍｌ（ＮＨＤＦ）または５ｎｇ／ｍｌ（ＡｏＳＭＣ）となるように加える。対照または本発明のアルブミン融合蛋白質を含有する培地の１／３を加え、次いで、５日目まで３７℃／５％のCO_2でインキュベーションする。

【１１１６】

各ウェルから６０μ１を、標識した別の９６－ウェルプレートへ移し、プレート－シーラーで覆い、次いで、６日目まで４℃で貯蔵する（ＩＬ６　ＥＬＩＳＡ用）。細胞培養プレート中の残りの１００μｌへ、培養容量の１０％に等しい容量（１０ｕｌ）でＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅを無菌的に加える。プレートを３～４時間インキュベーターへ戻す。次い

で、ＣｙｔｏＦｌｕｏｒを用いて、５３０ｎｍでの励起および５９０ｎｍ発光に関する蛍光を測定する。これにより成長刺激／阻害データを得る。

【１１１７】

５日目、ＩＬ６　ＥＬＩＳＡを行うために、ＰＢＳ、ｐＨ７．４で希釈した５０～１００ｕｎ／ウェルの抗－ヒトＩＬ６モノクローナル抗体で９６ウェルプレートをコーティングし、室温でインキュベーションする。

【１１１８】

６日目、プレートの中身をシンクへ注ぎ、次いで、ペーパータオル上にブロットする。４％のＢＳＡと共にＰＢＳを含有するアッセイバッファーを調製する。ＰＢＳ中の２００μｌ／ウェルのＰｉｅｒｃｅスーパーブロックブロッキングバッファーを用いてプレートを１～２時間ブロッキングし、次いで、洗浄バッファー（ＰＢＳ，０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）でプレートを洗浄する。プレートをペーパータオルでブロットする。次いで、５０μ／ウェルに希釈された抗－ヒトＩＬ－６モノクローナルビオチン標識抗体、０．５０ｍｇ／ｍｌを加える。培地中でＩＬ－６ストックの希釈液（３０、１０、３、１、０．３、０ｎｇ／ｍｌ）を作製する。プレートの最上列に二通りの試料を加える。プレートを覆い、次いで、攪拌器で、２時間室温でインキュベーションする。

【１１１９】

プレートを洗浄バッファーで洗浄し、次いで、ペーパータオルにブロットする。ＥＵで標識されたストレプトアビジンをアッセイバッファーで１：１０００に希釈し、次いで、１００μｌ／ウェルで加える。プレートを覆い、次いで、室温で１時間インキュベーションする。プレートを再度洗浄バッファーで洗浄し、次いで、ペーパータオルにブロットする。

【１１２０】

１００μｌ／ウェルの増強溶液を加える。５分間攪拌する。ＤＥＬＦＩＡフルオロメーターでプレートを読み取る。各アッセイの３通りの試料から得られた読み取り値を表にし、平均する。

【１１２１】

このアッセイにおける陽性の結果は、ＡｏＳＭＣ細胞増殖を示し、およびアルブミン融合蛋白質が皮膚線維芽細胞の増殖および／または平滑筋細胞の増殖に関与するかもしれないことを示す。陽性の結果は、融合蛋白質およびアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドの多数の潜在的な用途も示す。本明細書にわたり詳述されるように、例えば、炎症および免疫応答、創傷治癒および血管新生である。特に、融合蛋白質は、創傷治癒および皮膚再生ならびに血管およびリンパ管両方の脈管形成の改善において用いられてもよい。脈管の成長は、例えば、心血管疾患の処置において用いることができる。さらに、このアッセイにおいてアンタゴニスト活性を示す融合蛋白質は、抗－血管剤（例えば、抗－血管新生剤）として作用することにより、血管新生を含む疾患、障害および／または状態の処置において有用であってもよい。これらの疾患、障害および／または状態は、当該技術分野において知られているか、および／または本明細書中記載されており、例えば、悪性腫瘍、固形腫瘍、良性腫瘍、例えば血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマおよび化膿性肉芽腫；動脈硬化斑；眼血管新生疾患、例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症黄斑変性症、角膜）移植拒絶反応、新血管緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、ブドウ膜炎および眼の翼状斑（Ｐｔｅｒｙｇｉａ）（異常な血管成長）；関節リウマチ；乾癬；創傷治癒の遅延；子宮内膜症；脈管形成；肉芽形成；肥厚性瘢痕（ケロイド）；癒着不能骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋血管新生；冠状動脈性側枝；脳側枝；動静脈奇形；虚血性肢血管新生；オスラー－ウェバー症候群；プラーク新血管形成；毛細血管拡張；血友病関節；血管線維腫；繊維筋性異形成症；創傷肉芽形成；クローン病；およびアテローム性動脈硬化症である。さらに、このアッセイにおいてアンタゴニストとして作用するアルブミン融合蛋白質は、当該技術分野において知られているおよび／または本明細書中記載されている抗－過増殖性疾患および／または抗－炎症性疾患の処置において有用であってもよい。

【１１２２】

実施例３８：内皮細胞での細胞接着分子（ＣＡＭ）の発現

炎症および血管新生領域へのリンパ球の動員は、リンパ球上の細胞表面接着分子（ＣＡＭｓ）と血管内皮との間の特異的な受容体－リガンド相互作用を含む。通常の環境および病理学的環境のいずれにおいても、接着過程は、内皮細胞（ＥＣ）での細胞内接着分子－１（ＩＣＡＭ－１）、血管細胞接着分子－１（ＶＣＡＭ－Ｉ）および内皮白血球接着分子－１（Ｅ－セレクチン）発現を含む多段階カスケードに従う。血管内皮でのこれらの分子および他の分子の発現は、炎症応答の発生中に、白血球が局部脈管構造に接着し、そして局部組織中へ血管外遊出し得る効率を決定する。サイトカインおよび成長因子の局所濃度は、これらのＣＡＭｓの発現の調節に関与する。

【１１２３】

すなわち、内皮細胞（例えば、ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣｓ））を標準的な９６ウェルプレート中で集密まで成長させ、細胞から成長培地を除き、次いで、１００μｌの１９９培地（１０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ））に交換する。試験用の試料（本発明のアルブミン融合蛋白質を含む）および正または負対照を３通りずつ（１０μｌ容量で）プレートに加える。次いで、プレートを３７℃で５時間（セレクチンおよびインテグリン発現）または２４時間（インテグリン発現のみ）インキュベートする。プレートを吸引して、培地を除き、次いで、１００μｌの０．１％のパラホルムアルデヒド－ＰＢＳ（Ｃａ＋＋およびＭｇ＋＋添加）を各ウェルに加える。プレートを４℃で３０分間保持する。固定液をウェルから除き、次いで、ウェルをＰＢＳ（＋Ｃａ，Ｍｇ）＋０．５％のＢＳＡを用いて１回洗浄し、次いで、排出する。１０μｌの希釈した一次抗体を試験および対照のウェルへ加える。抗－ＩＣＡＭ－１－ビオチン、抗－ＶＣＡＭ－１－ビオチンおよび抗－Ｅ－セレクチンビオチンを、１０μｇ／ｍｌ（０．１ｍｇ／ｍｌのストック抗体の１：１０希釈）の濃度で用いる。加湿した環境にて、細胞を３７℃で３０分間インキュベーションする。ＰＢＳ（＋Ｃａ，Ｍｇ）＋０．５％ＢＳＡを用いてウェルを３回洗浄する。２０μｌの希釈したＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎ－アルカリホスファターゼ（１：５，０００希釈、本明細書中、使用希釈という）を各ウェルに加え、次いで、３７℃で３０分間インキュベーションする。ＰＢＳ（＋Ｃａ，Ｍｇ）＋０．５％のＢＳＡを用いてウェルを３回洗浄する。５ｍｌのグリシンバッファー（ｐＨ１０．４）につき１錠のｐ－ニトロフェノールホスフェートｐＮＰＰを溶解させる。グリシンバッファー中のｐＮＰＰ基質、１００μ１を各試験ウェルに加える。標準ウェルを３通りずつ、グリシンバッファー中のＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎアルカリホスホターゼの使用希釈：１：５，０００（10^{0}）＞$10^{-0.5}$＞10^{-1}＞$10^{-1.5}$から調製する。５μｌの各希釈を３通りのウェルに加え、そして、各ウェル中の得られたＡＰ内容量は、５．５０ｎｇ、１．７４ｎｇ、０．５５ｎｇ、０．１８ｎｇである。次いで、１００μ１のｐＮＮＰ試薬を基準のウェルそれぞれに加える。プレートを３７℃で４時間インキュベーションする。３ＭのＮａＯＨを容量５０μ１で全ウェルに加える。グリシンバッファーのみで満たしたブランクウェルに対してバックグラウンド減算オプションを用いて、プレートリーダーにより、４０５ｎｍでプレートを読み取る。さらに、標準ウェルそれぞれにおけるＡＰ－コンジュゲートの濃度［５．５０ｎｇ；１．７４ｎｇ；０．５５ｎｇ；０．１８ｎｇ］を示す鋳型を構成する。結果は、各試料中の結合したＡＰ－コンジュゲートの量として示される。

【１１２４】

実施例３９：Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ内皮細胞増殖アッセイ

このアッセイを用いて、ウシリンパ管内皮細胞（ＬＥＣｓ）、ウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）またはヒト微小血管子宮筋層細胞（ＵＴＭＥＣ）のｂＦＧＦ誘導増殖の蛋白質介在阻害を定量的に測定してもよい。このアッセイには、代謝活性の検出に基づく蛍光定量的成長指標（ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ　ｇｒｏｗｔｈ　ｉｎｄｉｃａｔｏｒ）が組み込まれる。標準的なＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ増殖アッセイは、内皮細胞刺激のソースとして添加される１０ｎｇ／ｍｌのｂＦＧＦを有するＥＧＭ－２ＭＶ中で調製される。成長培地および細胞濃度を若干変化させで、様々な内皮細胞について、このアッセイを用いてもよ

い。試験される蛋白質バッチの希釈は適宜、希釈される。ｂＦＧＦ不含の無血清培地（ＧＩＢＣＯＳＦＭ）を無刺激対照として用い、およびアンジオスタチンまたはＴＳＰ－１を既知の刺激対照として用いる。

【１１２５】

すなわち、ＬＥＣ、ＢＡＥＣまたはＵＴＭＥＣを、５０００～２０００細胞／ウェルの密度で９６ウェルプレート中の成長培地に播種し、次いで、３７℃で一晩置く。細胞を一晩インキュベーションした後、、成長培地を除き、次いで、ＧＩＢＣＯＥＣ－ＳＦＭに交換する。１０ｎｇ／ｍｌの濃度になるようにさらなるｂＦＧＦを有する３通りのウェル中、本発明のアルブミン融合蛋白質または１または複数の対照蛋白質試料の適切な希釈液（ＳＦＭ中にて調製）を用いて、細胞を処理する。試料を用いて細胞を処理した後、一または複数のプレートを３７℃のインキュベーターに戻し、３日間置く。３日後、１０ｍｌのストックａｌａｍａｒ ｂｌｕｅ（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ Ｃａｔ＃；ＤＡＬＩ１００）を各ウェルに加え、次いで、一または複数のプレートを３７℃のインキュベーターに戻し、４時間置く。次いで、蛍光リーダーを用いて、５３０ｎｍ励起光および５９０ｎｍ発光の条件にて、一または複数のプレートを読み取る。直接出力を相対的な蛍光単位で記録する。

【１１２６】

Ａ１ａｍａｒ ｂｌｕｅは、細胞成長から生じる成長培地の化学還元に応じて蛍光および色変化の両方を生じる、酸化－還元指標である。細胞が培養下で成長するにつれ、本来の代謝活性により、隣接する周囲環境の化学還元が生じる。成長に関連して還元が起こると、指標は、酸化（非蛍光青色）形態から還元（蛍光赤色）形態へ変化する（すなわち、増殖の刺激はより強いシグナルを生じ、および増殖の阻害はより弱いシグナルを生じ、および全シグナルは、全細胞数およびそれらの代謝活性に比例する）。バックグラウンドの活性レベルは、飢餓培地単独で観察する。これを、正対照試料（成長培地中のｂＦＧＦ）および蛋白質希釈から観察された結果と比較する。

【１１２７】

実施例４０：混合リンパ球反応の阻害の検出

このアッセイを用いて、本発明の融合蛋白質による混合リンパ球反応（ＭＬＲ）の阻害を検出および評価できる。ＭＬＲの阻害は、細胞増殖および生存率への直接的効果、相互作用細胞に対する共刺激分子の調節、リンパ球とアクセサリー細胞との間の接着の調節またはアクセサリー細胞によるサイトカイン産生の調節に起因してもよい。このアッセイにおいて用いられる末梢血単核フラクションは、Ｔ、Ｂおよびナチュラルキラーリンパ球ならびに単球および樹枝状細胞を含むので、ＭＬＲを阻害するアルブミン融合蛋白質により複数の細胞が標的されてもよい。

【１１２８】

ＭＬＲを阻害することが見出されている本発明のアルブミン融合蛋白質は、リンパ球および単球の活性化または増殖に関連する疾患に適用できるかもしれない。これらは、疾患、例えば、喘息、関節炎、糖尿病、炎症性皮膚状態、乾癬、湿疹、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、糸球体腎炎、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性結腸炎、動脈硬化症、硬変、移植片対宿主疾患、宿主対移植片疾患、肝炎、白血病およびリンパ腫を含むが、これらに限定されない。

【１１２９】

すなわち、リンパ球分離培地（ＬＳＭ（登録商標）、密度１．０７７０ｇ／ｍｌ、Ｏｒｇａｎｏｎ Ｔｅｋｎｉｋａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｗｅｓｔ Ｃｈｅｓｔｅｒ，ＰＡ）を用いて、密度勾配遠心分離によりヒトドナーに由来するＰＢＭＣを精製する。１０％のＦＣＳおよび２ｍＭのグルタミンで補足したＲＰＭＩ－１６４０（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中、2×10^{6}細胞／ｍｌとなるように２ドナーに由来するＰＢＭＣを適合させる。第３のドナーに由来するＰＢＭＣを2×10^{5}細胞／ｍｌに適合させる。９６－ウェルの丸底マイクロタイタープレートのウェルへ、各ドナーからの５０マイクロリットルのＰＢＭＣを加える。融合蛋白質試験材料

（５０μｌ）の希釈液を、３通りにて、マイクロタイターウェルへ加える。試験試料（目的の蛋白質の）を１：４の最終希釈で加え；ｒｈｕｌＬ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，カタログ番号２０２－ＩＬ）を１μｇ／ｍｌの最終濃度で加え；抗－ＣＤ４ｍＡｂ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍ，ｃｌｏｎｅ３４９３０．１１，カタログ番号ＭＡＢ３７９）を１０ｕｇ／ｍｌの最終濃度で加える。５％のＣＯＳ中、細胞を３７℃で７～８日間培養し、次いで、１μＣの［^{3}Ｈ］チミジンを最後の１６時間の培養のためにウェルへ加える。細胞を回収し、次いで、Ｐａｃｋａｒｄ　ＴｏｐＣｏｕｎｔを用いてチミジン取り込みを測定する。３通りの測定の平均および標準偏差として、データを表す。

【１１３０】

別の実験にて、目的の融合蛋白質試料をスクリーニングし、そして、リンパ球の増殖を阻害する負対照処置、抗－ＣＤ４ｍＡｂ、およびリンパ球の増殖を高める正対照処置、ＩＬ－２（組換え物質または上清のいずれかとして）と比較する。

【１１３１】

実施例４１：プロテアーゼ活性のアッセイ

以下のアッセイを用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質のプロテアーゼ活性を評価してもよい。

【１１３２】

本質的に（Ｈｅｕｓｅｎら．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０２：１９６－２０２（１９８０）；Ｗｉｌｓｏｎら．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｕｒｏｌｏｇｙ，１４９：６５３－６５８（１９９３））に記載されているように、ゼラチンおよびカゼインザイモグラフィを行う。１％のゼラチンまたはカゼインを含有する１０％のポリアクリルアミド／０．１％のＳＤＳゲル上で試料を泳動し、室温で２．５％のトリトン中に１時間、次いで、３７℃で０．１Ｍのグリシン、ｐＨ８．３中に５～１６時間浸漬する。アミドブラック中で染色した後、蛋白質分解の領域は、青黒色のバックグラウンドに対して透明な領域として現れる。トリプシン（Ｓｉｇｍａ　Ｔ８６４２）を正対照として用いる。

【１１３３】

プロテアーゼ活性は、ｎ－ａ－ベンゾイル－Ｌ－アルギニンエチルエステル（ＢＡＥＥ）（ＳｉｇｍａＢ－４５００）の切断をモニタリングすることによっても測定される。反応は、（２５ｍＭのＮａＰＯ$_{4}$，１ｍＭのＥＤＴＡおよび１ｍＭのＢＡＥＥ），ｐＨ７．５にセットされる。試料を加え、次いで、時間駆動モードのＢｅｃｋｍａｎＤＵ－６分光光度計にて、２６０ｎｍの吸光度における変化をモニタリングする。トリプシンを正対照として用いる。

【１１３４】

２８０ｎｍの吸光度またはＦｏｌｉｎ法を用いた比色定量により測定される、カゼインまたはヘモグロビンからの酸－可溶性ペプチドの放出に基づくさらなるアッセイを、Ｂｅｒｇｍｅｙｅｒ，ら．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｏｆ　Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ　Ａｎａｌｙｓｉｓ，５（１９８４）に記載のように行う。他のアッセイは、発色性基質の溶解を含む（Ｗａｒｄ，Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５１－３１７（１９８３））。

【１１３５】

実施例４２：セリンプロテアーゼ基質特異性の同定

当該技術分野において知られているかまたは本明細書中記載されている方法を用いて、セリンプロテアーゼ活性を有する本発明のアルブミン融合蛋白質の基質特異性を測定してもよい。基質特異性測定の好ましい一の方法は、ＧＢ２　３２４　５２９（出典明示により本明細書の一部となる）に記載されているような、ポジショナルスキャニング合成コンビナトリアルライブラリーの使用である。

【１１３６】

実施例４３：リガンド結合アッセイ

以下のアッセイを用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質のリガンド結合活性を評価してもよい。

【１１３７】
リガンド結合アッセイは、受容体薬理を確認するための直接的方法を提供し、およびハイスループット方式に適用可能である。結合を研究するために、本発明のアルブミン融合蛋白質に対する精製リガンドを、高い特異的活性（５０－２０００Ｃｉ／ｍｍｏｌ）になるように放射標識する。次いで、放射標識化過程が融合蛋白質に対するリガンドの活性を低減させないことを決定する。バッファー、イオン、ｐＨおよび他の調節因子、例えば、ヌクレオチドについてのアッセイ条件を最適化し、膜および全細胞ポリペプチドソースの両方について使用可能なシグナル対ノイズ比を定める。これらのアッセイのために、特異的なポリペプチド結合を、全結合放射能から過剰量の非標識競合リガンドの存在下で測定した放射能を差し引いた値として定める。可能な場合には、２以上の競合リガンドを用いて残りの非特異的結合を定める。

【１１３８】
実施例４４：ツメガエル卵母細胞における機能アッセイ
標準的な方法により、ＲＮＡポリメラーゼを用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードする線状化プラスミド鋳型からのキャップＲＮＡ転写物をインビトロで合成する。０．２ｍｇ／ｍｉの最終濃度でインビトロ転写物を水中に懸濁する。成体雌ヒキガエルから卵巣葉を取り出し、第Ｖ期の濾胞除去した卵母細胞を得、次いで、マイクロインジェクション装置を用いて、ＲＮＡ転写物（１０ｎｇ／卵母細胞）を５０ｎｌボーラスで注入する。２つの電極電圧クランプを用いて、融合蛋白質およびポリペプチドアゴニストの曝露に応答する、個々のツメガエル卵母細胞からの電流を測定する。室温、Ｃａ２＋不含のＢａｒｔｈ’ｓ培地で記録を行う。ツメガエル系を用いて、知られているリガンドおよび組織／細胞抽出物を活性化リガンドについてスクリーニングすることもできる。

【１１３９】
実施例４５：マイクロフィジオメトリック（Ｍｉｃｒｏｐｈｙｓｉｏｍｅｔｒｉｃ）アッセイ
多種多様な二次性メッセンジャー系の活性化は、細胞から少量の酸の放出をもたらす。概して、生成される酸は、細胞内シグナル伝達過程を刺激するために必要な代謝活性が増大された結果である。細胞周囲の培地のｐＨ変化は、非常に小さいが、ＣＹＴＯＳＥＮＳＯＲマイクロフィジオメーター（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ Ｌｔｄ．，Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ，Ｃａｌｉｆ．）により検出可能である。故に、ＣＹＴＯＳＥＮＳＯＲは、エネルギーを利用する細胞内シグナル伝達経路に連動した２次メッセンジャーを活性化させる本発明のアルブミン融合蛋白質の能力を検出することができる。

【１１４０】
実施例４６：抽出物／細胞上清スクリーニング
未だにコグネイトな活性化リガンド（アゴニスト）が見出されていない多数の哺乳類受容体が存在する。故に、これらの受容体に対する活性リガンドは、今日までに同定されたリガンドバンク内に含まれていない可能性がある。従って、本発明のアルブミン融合蛋白質は、組織抽出物に対して機能的にスクリーニングされ（カルシウム、ｃＡＭＰ、マイクロフィジオメーター、卵母細胞の電気生理学など機能的スクリーニングを用いて）、治療用蛋白質部分および／または本発明のアルブミン融合蛋白質のアルブミン蛋白質部分のための天然リガンドを同定することができる。活性化リガンドが単離かつ同定されるまで、陽性の機能応答を生じる抽出物を逐次、細分画することができる。

【１１４１】
実施例４７：ＡＴＰ－結合アッセイ
以下のアッセイを用いて、本発明の融合蛋白質のＡＴＰ－結合活性を評価してもよい。

【１１４２】
本発明のアルブミン融合蛋白質のＡＴＰ－結合活性は、米特許第５，８５８，７１９号に記載のＡＴＰ－結合アッセイを用いて検出されてもよい。該文献は、出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。すなわち、競合アッセイで、８－アジド－ＡＴＰで光親和性標識することにより、本発明のアルブミン融合蛋白質に対するＡＴＰ－結合を測定す

る。１ｍｇ／ｍｌのＡＢＣ輸送蛋白質を含有する反応混合物を、様々な濃度のＡＴＰまたは非加水分解性ＡＴＰアナログ、アデニル－５’－イミドジホスフェートと一緒に１０分間４℃でインキュベーションする。８－アジド－ＡＴＰ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍ．Ｃｏｒｐ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ．）および８－アジド－ＡＴＰ（^{32}Ｐ－ＡＴＰ）（５ｍＣｉ／ｌｌｍｏｌ，ＩＣＮ，Ｉｒｖｉｎｅ　ＣＡ．）の混合物を１００ｕＭの最終濃度で加え、次いで、０．５ｍｌアリコートを氷上の磁器スポットプレートのウェルに入れる。プレートから２．５ｃｍの距離で短波長２５４ｎｍＵＶランプを用いて、１分間の冷却時間をはさんでプレートへの１分間の照射を２回行う。ジチオスレイトールを最終濃度２ｍＭで加えることにより、反応を停止させる。インキュベーション物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動に付し、乾燥し、次いで、オートラジオグラフを行う。本発明のアルブミン融合蛋白質に対応する蛋白質バンドを切り取り、次いで、放射能を定量する。ＡＴＰまたはアデニル－５’－イミドジホスフェートの増大に伴う放射能の減少は、融合蛋白質に対するＡＴＰ親和性の尺度となる。

【１１４３】

実施例４８：本発明のアルブミン融合蛋白質と相互作用するシグナル伝達蛋白質の同定

本発明のアルブミン融合蛋白質を、シグナル伝達経路蛋白質または受容体蛋白質の同定、特徴付けおよび精製のための研究ツールとして用いてもよい。すなわち、標識された本発明の融合蛋白質は、それと相互作用する分子を精製するための試薬として有用である。アフィニティー精製の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質をクロマトグラフィーカラムに共有結合させる。癌腫組織のごとき推定上の標的細胞に由来する無細胞抽出物をカラムに通し、そして適切な親和性を有する分子をアルブミン融合蛋白質に結合させる。蛋白質複合体をカラムから回収し、解離させ、次いで、回収した分子をＮ－末端蛋白質シークエンスに付す。次いで、このアミノ酸配列を用いて、捕捉された分子を同定するか、または適切なｃＤＮＡライブラリーから該当する遺伝子をクローン化するための縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計する。

【１１４４】

実施例４９：ＩＬ－６バイオアッセイ

本発明のアルブミン融合蛋白質の増殖効果を試験するために、様々なアッセイが当該技術分野において知られている。例えば、かかる一のアッセイは、Ｍａｒｚら．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．ＡｃａｄＳｃｉ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．，９５：３２５１－５６（１９９８）；該文献は出典明示により本明細書の一部となる）により記載のようなＩＬ－６バイオアッセイである。３７℃で６８時間後、テトラゾリウム塩チアゾリルブルー（ＭＴＴ）を加え、次いで、さらに３７℃で４時間インキュベーションすることにより、生存細胞の数を測定する。Ｂ９細胞をＳＤＳにより溶解させ、次いで、５７０ｎｍにおける光学密度を測定する。対照は、ＩＬ－６（正対照）を含むものおよびサイトカインを含まないもの（負対照）である。すなわち、ＩＬ－６依存性Ｂ９ネズミ細胞をＩＬ－６不含培地で３回洗浄し、次いで、５０μｌ中５，０００細胞／ウェルの濃度でプレーティングし、次いで、５０μｌの本発明の融合蛋白質を加え、利用する。負対照と比べた、一または複数の試験試料（本発明のアルブミン融合蛋白質を含む）における増殖の増大は、融合蛋白質により介される増殖効果の指標である。

【１１４５】

実施例５０：ニワトリ胚ニューロン生存の支持

交感ニューロン細胞の生存率が本発明のアルブミン融合蛋白質により支持されるかを試験するために、Ｓｅｎａｌｄｉらのニワトリ胚ニューロン生存アッセイを利用してもよい（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．，９６：１１４５８－６３（１９９８）。該文献は出典明示により本明細書の一部となる。すなわち、運動および交感ニューロンをニワトリ胚から単離し、それぞれＬ１５培地（１０％のＦＣＳ、グルコース、亜セレン酸ナトリウム、プロゲステロン、コナルブミン、プトレシンおよびインスリン；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ．を添加）およびダルベッコ改変イーグル培地［１０％のＦＣＳ、グルタミン、ペニシリンおよび２５ｍＭの

Ｈｅｐｅｓバッファー（ｐＨ７．２）；Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ．を添加］中に再懸濁し、次いで、異なる濃度の精製された本発明の融合蛋白質の存在下で、ならびにいかなるサイトカインも欠損している負対照として、５％のCO_2中にて３７℃でインキュベーションする。３日後、細胞形態を評価し、およびＭｏｓｍａｎｎの比色アッセイ（Ｍｏｓｍａｎｎ，Ｔ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，６５：５５－６３（１９８３））を用いることにより、ニューロン生存を測定する。サイトカインを欠損している対照と比較して増強されたニューロン細胞の生存能力は、ニューロン細胞の生存を増強するアルブミン融合蛋白質の能力の指標である。

【１１４６】

実施例５１：ホスファターゼ活性のアッセイ

以下のアッセイを用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質のセリン／トレオニンホスファターゼ（ＰＴＰａｓｅ）活性を評価してもよい。

【１１４７】

セリン／トレオニンホスファターゼ（ＰＴＰａｓｅ）活性をアッセイするために、当業者に広く知られているアッセイを用いることができる。例えば、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．からのＰＳＰａｓｅアッセイキットを用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質のセリン／トレオニンホスファターゼ（ＰＳＰａｓｅ）活性を測定してもよい。ＰＳＰａｓｅのための基質であるミエリン塩基性蛋白質（ＭｙＢＰ）を、［^{32}Ｐ］ＡＴＰの存在下、ｃＡＭＰ－依存蛋白質キナーゼを用いて、セリンおよびトレオニン残基上でリン酸化する。次いで、^{32}Ｐ－標識ＭｙＢＰからの無機リン酸の放出を測定することにより、蛋白質セリン／トレオニンホスファターゼ活性を測定する。

【１１４８】

実施例５２：他の蛋白質とセリン／トレオニンホスファターゼの相互作用

セリン／トレオニンホスファターゼ活性（例えば、実施例５１にて測定されるような）を有する本発明の融合蛋白質は、例えば、さらなる相互作用蛋白質または受容体蛋白質または他のシグナル伝達経路蛋白質の同定、特徴付けおよび精製のための研究ツールとして有用である。すなわち、標識された本発明の融合蛋白質は、それが相互作用する分子を精製するための試薬として有用である。アフィニティー精製の一の実施態様において、本発明のアルブミン融合蛋白質をクロマトグラフィーカラムに共有結合させる。神経または肝臓細胞のごとき推定上の標的細胞に由来する無細胞抽出物をカラムに通し、そして、適切な親和性を有する分子は融合蛋白質に結合させる。融合蛋白質－複合体をカラムから回収し、解離させ、次いで、回収した分子をＮ－末端蛋白質シークエンスに付す。次いで、このアミノ酸配列を用いて、捕捉された分子を同定するか、または適切なｃＤＮＡライブラリーから該当する遺伝子をクローニングするための縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計する。

【１１４９】

実施例５３：ヘパラナーゼ活性のためのアッセイ

本発明のアルブミン融合蛋白質のヘパラナーゼ活性をアッセイするために用いられてもよい様々なアッセイが当該技術分野において知られている。一例として、本発明のアルブミン融合蛋白質のヘパラナーゼ活性は、Ｖｌｏｄａｖｓｋｙら，（Ｖｉｏｄａｖｓｋｙら．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．，５：７９３－８０２（１９９９））により記載されているように、アッセイされる。すなわち、細胞溶解物、条件培地、インタクト細胞（３５－ｍｍディッシュあたり1×10^6細胞）、細胞培養上清または精製された融合蛋白質を、^{35}Ｓ－標識ＥＣＭまたは可溶性ＥＣＭ誘導ピークＩプロテオグリカンと共に、３７℃で１８時間、ｐＨ６．２～６．６でインキュベーションする。インキュベーション培地を遠心分離し、次いで、上清をセファロースＣＬ－６Ｂカラム（０．９×３０ｃｍ）でゲル濾過することにより、分析する。ＰＢＳでフラクションを溶離し、次いで、その放射能を測定する。ヘパラン硫酸側鎖の分解断片を、０．５＜Ｋ，Ｖ＜０．８（ピークＩＩ）でセファロース６Ｂから溶離させる。各実験を少なくとも３回行う。Ｖｌｏｄａｖｓｋｙら．により記載のような「ピークＩＩ」に対応する分解断片は、ヘパラン硫酸の切断における本発明のア

ルブミン融合蛋白質の活性の指標である。

【１１５０】

実施例５４：生体分子の固定化

この実施例は、非宿主細胞脂質二重層コンストラクト中で本発明のアルブミン融合蛋白質を安定化するための方法（例えば、Ｂｉｅｒｉら．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ １７：１１０５－１１０８（１９９９）を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）を提供し、該方法は、上記の様々な機能アッセイにおける本発明の融合蛋白質の研究に適用できる。すなわち、ビオチン化のための炭水化物特異的化学を用いて、ビオチンタグを本発明のアルブミン融合蛋白質に拘束し、固定化に均一な配向を可能とさせる。洗浄されたメンブレン中の５０ｕＭの本発明のアルブミン融合蛋白質の溶液を、２０ｍＭのＮａＩ０４および１．５ｍｇ／ｍｌ（４ｍＭ）のＢＡＣＨまたは２ｍｇ／ｍｌ（７．５ｍＭ）のビオチン－ヒドラジドと共に、室温で１時間インキュベーションする（反応容量，１５０ｕｌ）。次いで、試料を透析し（Ｐｉｅｒｃｅ Ｓｌｉｄｅａｌｉｚｅｒ Ｃａｓｓｅｔｔ，１０ｋＤａ ｃｕｔｏｆｆ；Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ ＩＬ）、１時間ごとにバッファーを交換しながら、最初の５時間は４℃で、そして最後にに５００ｍｌのバッファーＲ（０．１５ＭのＮａＣｌ，１ｍＭのＭｇＣｌ$_2$，１０ｍＭのリン酸ナトリウム，ｐＨ７）に対して１２時間透析する。キュベットに加える直前に、バッファーＲＯＧ５０（５０ｍＭのオクチルグルコシドを加えたバッファーＲ）中に試料を１：５で希釈する。

【１１５１】

実施例５５：メタロプロテイナーゼ活性のアッセイ

メタロプロテイナーゼは、触媒機序として金属イオン、例えば、Zn^{2+}を利用するペプチド加水分解酵素である。本発明のアルブミン融合蛋白質のメタロプロテイナーゼ活性は、当該技術分野において知られている方法に従ってアッセイすることができる。以下の例示的方法が提供される：

【１１５２】

アルファ－２－マクログロブリンの蛋白質分解

プロテアーゼ活性を確認するために、精製した本発明の融合蛋白質を、１×アッセイバッファー（５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５、０．２ＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのＣａｌ$_2$、２５ｕＭのＺｎＣｌ$_2$および０．０５％のＢｒｉｊ－３５）中、基質アルファ－２－マクログロブリン（０．２ユニット／ｍｌ；Ｂｏｅｈｒｌｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ）と混合し、次いで、３７℃で１～５日間インキュベーションする。トリプシンを正対照として用いる。負対照は、アッセイバッファー中、アルファ－２－マクログロブリンのみを含む。試料を集め、次いで、５％の２－メルカプトエタノールを含有するＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料バッファー中で５分間ボイルし、次いで、８％のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルにローディングする。電気泳動した後、蛋白質を銀染色により視覚化する。負対照と比べてより低い分子量のバンドが出現することにより、蛋白質分解が実証される。

【１１５３】

メタロプロテイナーゼ阻害剤によるアルファ－２－マクログロブリン蛋白質分解の阻害

知られているメタロプロテイナーゼ阻害剤（金属キレート剤（ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡおよびＨｇＣｌ$_2$）、ペプチドメタロプロテイナーゼ阻害剤（ＴＩＭＰ－１およびＴＩＭＰ－２）および市販の小分子ＭＭＰ阻害剤）を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質の蛋白質分解活性を特徴付けてもよい。用いられてもよい３つの合成ＭＭＰ阻害剤は：ＭＭＰ阻害剤Ｉ、［ＭＭＰ－１およびＭＭＰ－８に対してIC_{50}＝１．０μＭ；ＭＭＰ－９に対してIC_{50}＝３０μＭ；ＭＭＰ－３に対してIC_{50}＝１５０μＭ］；ＭＭＰ－３（ストロメライシン－１）阻害剤Ｉ［ＭＭＰ－３に対してIC_{50}＝５μＭ］およびＭＭＰ－３阻害剤ＩＩ［ＭＭＰ－３に対してK_i；＝１３０ｎＭ］；であり、それぞれＣａｌｂｉｏｃｈｅｍカタログ番号；４４４２５０、４４４２１８、および４４４２２５から入手可能な阻害剤である。すなわち、異なる濃度の小分子ＭＭＰ阻害剤を、２２．９μｌの１×

ＨＥＰＥＳバッファー（５０mMのＨＥＰＥＳ，ｐＨ７．５，０．２MのＮａＣｌ，１０mMのＣａＣ１$_2$，２５uMのＺｎＣ１$_2$および０．０５％のＢｒｉｊ－３５）中、精製した本発明の融合蛋白質（５０ｕｇ／ｍｌ）と混合し、次いで、室温（２４℃）で２時間インキュベーションし、次いで、７．１μｌの基質アルファ－２－マクログロブリン（０．２ユニット／ｍｌ）を加え、次いで、３７℃で２０時間インキュベーションする。４×試料バッファーを加え、その後直ぐに５分間ボイルすることにより、反応を停止させる。ＳＤＳ－ＰＡＧＥの後、蛋白質バンドを銀染色により視覚化する。

【１１５４】

合成蛍光性ペプチド基質の切断アッセイ

メタロプロテイナーゼ活性が実証されている本発明の融合蛋白質の基質特異性は、当該技術分野において知られている技法、例えば、合成蛍光性ペプチド基質（ＢＡＣＨＥＭ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｉｎｃから購入）を用いて測定されてもよい。試験基質は、Ｍ－１９８５、Ｍ－２２２５、Ｍ－２１０５、Ｍ－２１１０およびＭ－２２５５を含む。初めの４つはＭＭＰ基質であり、および最後の１つは腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）転換酵素（ＴＡＣＥ）の基質である。好ましくは、これらの基質を、１：１ジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）および水中にて調製する。ストック溶液は５０～５００uMである。恒温水浴を備えたＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒＬＳ５０Ｂルミネセンス分光計を用いて、蛍光アッセイを行う。励起λは３２８ｎｍであり、および放出λは３９３ｎｍである。すなわち、１７６μｌの１×ＨＥＰＥＳバッファー（０．２MのＮａＣｌ、１０mMのＣａＣ１$_2$、０．０５％のＢｒｉｊ－３５および５０mMのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５）を４μｌの基質溶液（５０μM）と一緒に２５℃で１５分間インキュベーションし、次いで、２０μ１の精製した本発明の融合蛋白質をアッセイキュベットに加えることにより、アッセイを行う。基質の最終濃度は１μMである。初期の加水分解速度を３０分間モニタリングする。

【１１５５】

実施例５６：ＮＯＤマウスにおける糖尿病の発症

ヒトにおいて見出されるものと同様の経過を有するＩＤＤＭを示すことにより、雌ＮＯＤ（非肥満糖尿病）マウスを特徴付けた。該疾患は雄ＮＯＤマウスよりも雌においてより明白である。以後、別記しない限り、用語「ＮＯＤマウス」は、雌ＮＯＤマウスを言う。ＮＯＤマウスは、慢性自己免疫疾患により惹起されるベータ細胞の進行性破壊を有する。かくして、ＮＯＤマウスは正常血糖または正常な血液グルコースレベルを伴って育つ。しかし、約１５～１６週齢までに、ＮＯＤマウスは高血糖になり始め、それらの膵臓ベータ細胞の大部分の破壊を示し、そしてそれに対応して膵臓が十分なインスリンを産生することができなくなる。故に、疾患の原因および進行はいずれもヒトＩＤＤＭ患者と同様である。

【１１５６】

免疫化計画の効力のインビボアッセイは、雌ＮＯＤ／ＬｔＪマウス（Ｔｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｂａｒ Ｈａｒｂｏｒ，Ｍｅ．から市販されている）において評価することができる。文献では、雌マウスの８０％が２４週齢までに糖尿病を発症し、そして６～８週齢の間に膵島炎を発症し始めることが報告されている。ＮＯＤマウスは近交系であり、および様々な免疫制御ストラテジーに対して高度に応答する。成体ＮＯＤマウス（６～８週齢）は２０～２５ｇの平均体重を有する。

【１１５７】

これらのマウスは、未処置（対照）であっても、本発明の治療剤（例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質およびその断片および変異体）を単独または上記の他の治療用化合物と組み合わせて用いて処置されてもよい。糖尿病の進行におけるこれらの様々な処置の効果は以下のように測定できる：

【１１５８】

１４週齢にて、雌ＮＯＤマウスはグルコース耐性に従ってフェノタイプすることができる。グルコース耐性は腹腔内グルコース負荷試験（ＩＰＧＴＴ）により測定することができる。すなわち、０分およびグルコース（１ｇ／ｋｇ体重）の腹腔内注入から６０分後に

、眼窩周囲神経叢から血液を取り出す。正常な耐性を、０分における１４４ｍｇ％未満の、または６０分後における１６０ｍｇ％未満の血漿グルコースとして定める。Ｇｌｕｃｏｍｅｔｅｒ　Ｅｌｉｔｅ装置を用いて、血液グルコースレベルを測定する。

【１１５９】

フェノタイプ分析に基づいて、動物を異なる実験群に割り当てることができる。特に、より高い血液グルコースレベルを有する動物は、グルコース耐性障害の群に割り当てられる。マウスは適宜食べることができ、および酸性化水（ｐＨ２．３）を与えられる。

【１１６０】

グルコース耐性および不耐性マウスを、対照、本発明のアルブミン融合蛋白質およびアルブミン融合蛋白質／治療用化合物組み合わせの群へとさらに細かく分けることができる。対照群のマウスは、１週間につき６回、毎日、ビヒクルを腹膜内注入され得る。アルブミン融合群のマウスは、１週間につき６回、毎日、ビヒクル中の本発明の治療剤（例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質およびその断片および変異体）を腹膜内注入され得る。アルブミン融合蛋白質／治療用化合物組み合わせ群のマウスは、アルブミン融合蛋白質および上記のような治療用化合物の組み合わせを投与され得る。

【１１６１】

ＮＯＤマウスにおける尿グルコースのレベルは、Ｌａｂｓｔｉｘ（Ｂａｙｅｒ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｈａｍｐｓｈｉｒｅ，Ｅｎｇｌａｎｄ）を用いて隔週ごとに測定できる。体重および液体取り込みも隔週ごとに測定できる。２つの連続した測定において糖尿が現れたら、糖尿病の発症と定める。処置の１０週後、さらなるＩＰＧＴＴを行うことができ、および動物は次の日に屠殺される。

【１１６２】

１０週にわたる処置の間、グルコース耐性およびグルコース不耐性の両方の群における対照動物は、それぞれ６０％および８６％の割合で糖尿病を発症する（米国特許第５，８６６，５４６号，Ｇｒｏｓｓら．を参照のこと）。故に、処置が全く行われないならば、初めにグルコース耐性であるＮＯＤマウスにおいて、糖尿病は高い割合で発症する。

【１１６３】

処置の前および後にＮＯＤマウスにおける血液グルコースレベルを測定することにより、その結果を確証することができる。記載した全群のグルコース耐性および不耐性マウス両方において、血液グルコースレベルを上記のように測定する。

【１１６４】

別の一の実施態様において、分光分析を用いて、本発明の治療剤（例えば、配列番号：Ｙおよびその断片および変異体として開示される特定の融合物）を定量でき、および注入前に、１用量あたり５０．ｍｕ．１のリン酸バッファー生理的食塩水（ＰＢＳ）中に適切な蛋白質量を再懸濁することができる。各マウス背部の皮膚下に、１週間の間隔をあけて２回の皮下注入を実施することができる。モニタリングは、免疫化前の２つの異なる時間に行うことができ、処置中は１週間に１回行い、そしてその後も続けることができる。毎週、尿のグルコースについて試験することができ（Ｋｅｔｏ－Ｄｉａｓｔｉｘ．ＲＴＭ．；Ｍｉｌｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｋａｎｋａｋｅｅ，１１１．）、および血清グルコースについて糖尿マウスを調べることができる（ＥｘａｃＴｅｃｈ．ＲＴＭ．，ＭｅｄｉＳｅｎｓｅ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，Ｍａｓｓ．）、空腹時高血糖が２．５ｇ／Ｌよりも高い場合、糖尿病と診断される。

【１１６５】

実施例５７：ＮＯＤマウスの組織学的試験

ＮＯＤマウスからの組織試料の組織学的試験は、膵臓のベータ細胞の相対濃度を増大させる、本発明の組成物および／または他の糖尿病用治療剤と本発明の組成物の組み合わせの能力を示すことができる。実験的方法は以下の通りである：

【１１６６】

処置期間の終わりに、実施例５６からのマウスを屠殺でき、そして組織試料を膵臓から採取することができる。試料を、０．９％の生理的食塩水中の１０％のホルマリン中に固

定し、そしてワックス中に包埋できる。５つの連続した５．ｍｕ．ｍセクションの２セットを、免疫標識のために１５０．ｍｕ．ｍの切断間隔で切断することができる。そのセクションを、インスリン（モルモット抗－インスリン抗血清希釈１：１０００，ＩＣＮ Ｔｈａｍｅｓ Ｕ．Ｋ．）およびグルカゴン（ウサギ抗－膵臓グルカゴン抗血清希釈１：２０００）について免疫標識することができ、次いで、ペルオキシダーゼコンジュゲートさせた抗－モルモット（Ｄａｋｏ，Ｈｉｇｈ Ｗｙｃｏｍｂｅ，Ｕ．Ｋ．）またはペルオキシダーゼコンジュゲートさせた抗－ウサギ抗血清（希釈１：５０，Ｄａｋｏ）を用いて検出することができる。

【１１６７】

本発明の組成物は、グルコース耐性およびグルコース不耐性の動物において、糖尿病の臨床徴候に対する効果と同程度の効果をベータ細胞の可視量に対して有していてもまたは有さなくともよい。

【１１６８】

実施例５８：ＮＩＤＤＭインビボマウス実験

Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（Ｂａｒ Ｈａｒｂｏｒ，ＭＥ）からの雄Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスは、３週齢から入手でき、および慣用的な食餌或いは脂肪（３５．５重量％；Ｂｉｏｓｅｒｖ．Ｆｒｅｎｃｈｔｏｗｎ，ＮＪ）またはフルクトース（６０重量％；Ｈａｒｌａｎ Ｔｅｋｌａｄ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｌ）のいずれかが豊富な食餌を与える。標準食餌は、４．５重量％の脂肪、２３重量％の蛋白質、３１．９重量％のデンプン、３．７重量％のフルクトースおよび５．３重量％の繊維からなる。高脂肪（ラード）食は、３５．５重量％の脂肪、２０重量％の蛋白質、３６．４重量％のデンプン、０．０重量％のフルクトースおよび０．１重量％の繊維からなる。高フルクトース食は、５重量％の脂肪、２０重量％の蛋白質、０．０重量％のデンプン、６０重量％のフルクトースおよび９．４重量％の繊維からなる。１２－時間の明（午前６時から午後６時まで）／暗サイクルを伴う２２°＋／－３℃の温度および５０％＋／－２０％の湿度に制御された部屋に置かれたケージにて、マウスは１ケージあたりわずか５匹ずつ飼育されてもよい（Ｌｕｏら．，１９９８，Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ ４７（６）：６６３－８，”Ｎｏｎｇｅｎｅｔｉｃ ｏｕｓｅ ｍｏｄｅｌｓ ｏｆ ｎｏｎ－ｉｎｓｕｌｉｎ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｄｉａｂｅｔｅｓ ｍｅｌｌｉｔｕｓ”；Ｌａｒｓｅｎら．，Ｄｉａｂｅｔｅｓ ５０（１１）：２５３０－９（２００１），”Ｓｙｓｔｅｍｉｃ ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｌｏｎｇ－ａｃｔｉｎｇ ＧＬＰ－１ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅ ＮＮ２２１１ ｉｎｄｕｃｅｓ ｌａｓｔｉｎｇ ａｎｄ ｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ ｗｅｉｇｈｔ ｌｏｓｓ ｉｎ ｂｏｔｈ ｎｏｒｍａｌ ａｎｄ ｏｂｅｓｅ ｒａｔ”）。３週間マウスをそれぞれに摂食させた後、１００ｍｇ／ｋｇ体重のストレプトゾトシン、「ＳＴＺ」（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）またはビヒクル（０．０５ｍｏｌ／Ｌクエン酸，ｐＨ４．５）のいずれかを用いて、マウスに腹腔内注入でき、次いで、次の４週間は同じ食餌を与えることができる。ＳＴＺの１、２および４週後に非空腹条件下にて、尾部の遠位部から血液を採取する。試料を用いて非空腹時血漿グルコースおよびインスリン濃度を測定する。体重および食餌取り込みを１週間に１回記録する。

【１１６９】

グルコース廃棄を刺激するインスリンの能力に対する高脂肪食餌の効果を直接決定するために、脂肪食餌を与えられた、食餌を与えられ、ビヒクルを注入された、および脂肪食餌を与えられ、上記の７週間の終わりにＳＴＺを注入された３群のマウスにて実験を開始できる。マウスは実験前の４時間、空腹とする。最初の一連の実験において、メトキシフルラン（Ｐｉｔｍａｎ－Ｍｏｏｒ，Ｍｕｎｄｅｌｅｉｎ，ＩＬ）吸入を用いて、マウスを麻酔できる。レギュラーインスリン（Ｓｉｇｍａ）は尾静脈から静脈内注入でき（［ＩＶ］０．１Ｕ／ｋｇ体重）、および血液は注入から３、６、９、１２および１５分後に異なる尾静脈から採取できる。血漿グルコース濃度はこれらの試料にて測定でき、および血漿からのグルコース消失の半減期（$t_{1/2}$）は、ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｃｏｎｓｕｌｔｉｎｇ，Ａｐｅｘ，ＮＣ）の薬物動態／薬動力学ソフトウェアプロ

グラムを用いて、算出できる。

【１１７０】

第２の一連の実験において、腹腔内ナトリウムペントバルビタール（Ｓｉｇｍａ）を用いてマウスを麻酔できる。腹腔を開き、主要な腹腔内静脈を曝露させ、そして、２４－ゲージのＩＶカテーテル（Ｊｏｈｎｓｏｎ－ＪｏｈｎｓｏｎＭｅｄｉｃａｌ，Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ，ＴＸ）を用いてカテーテル処置する。カテーテルを腹腔内静脈に隣接する筋肉組織に固定し、シリンジ連結部の下側を切断し、次いで、予め充填したＰＥ５０プラスチックチューブに接続し、順次、注入溶液とシリンジとを接続させる。次いで、腹腔を縫合して閉鎖する。この方法により、体の低い部分からの血液の逆流によるブロックはなくなるであろう。グルコース（２４．１ｍｇ／ｋｇ／分）およびインスリン（１０ｍＵ／ｋｇ／分）を１０ｗＬ／分の注入量にてマウスに連続的に注入できる。血漿グルコースおよびインスリン濃度を測定するために、注入開始から９０、１０５、１２０および１３５分後に、眼窩後部の血液試料（各７０μＬ）を採取する。これら４つの試料を用いて、各動物についての定常状態の血漿グルコース（ＳＳＰＧ）およびインスリン（ＳＳＰＩ）濃度を評価する。

【１１７１】

最後に、単独或いは真性糖尿病の処置のために記載した任意の１またはそれ以上の治療用薬剤と組み合わせたアルブミン融合蛋白質、本出願の治療用組成物の、血漿グルコースを減少する能力を評価するための実験は、以下の２群のＳＴＺ－注入「ＮＩＤＤＭ」マウスモデル：（１）脂肪食飼を与えられたＣ５７ＢＵ６Ｊ、および（２）フルクトース食飼を与えられたＣ５７ＢＬ／６Ｊにおいて行うことができる。これらの研究について、マウスの血漿グルコース濃度は、２５５～５５５ｍｇ／ｄＬの範囲にわたってもよい。マウスはランダムに、ビヒクル、単独或いは真性糖尿病の処置のために記載した任意の１またはそれ以上の治療用薬剤と組み合わせた本発明のアルブミン融合治療剤のいずれかを用いた処置を受ける。全部で３用量を投与することができる。血漿グルコース濃度を測定するために、初めの投与前および最後の投与の３時間に、尾静脈の血液試料を採取することができる。

【１１７２】

Ｓｉｇｍａからのグルコース診断キット（Ｓｉｇｍａ　Ｎｏ．３１５）、酵素比色アッセイを用いて、血漿グルコース濃度を測定できる。Ｌｉｎｃｏ　ＲｅｓｅａｒｃｈからのラットインスリンＲＩＡキット（＃；ＲＩ－１３Ｋ；Ｓｔ．Ｃｈａｒｌｅｓ，ＭＯ）を用いて、血漿インスリンレベルは測定できる。

【１１７３】

実施例５９：インスリン作用における関与を証明する、インビトロＨ４ＩＩｅ－ＳＥＡＰレポーターアッセイ

様々なＨ４ＩＩｅレポーター

Ｈ４ＩＩｅ／ｒＭＥＰ－ＳＥＡＰ：ラットから単離されたリンゴ酸酵素プロモーター（ｒＭＥＰ）は、インスリン経路にあるＰＰＡＲ－ガンマエレメントを含む。このレポーターコンストラクトは、肝臓Ｈ４Ｕｅ細胞系中に安定にトランスフェクションされる。

【１１７４】

Ｈ４ＩＩｅ／ＳＲＥＢＰ－ＳＥＡＰ：ステロール制御エレメント結合蛋白質（ＳＲＥＢＰ－１ｃ）は、多数のインスリン－応答性遺伝子、例えば、脂肪酸合成酵素（ＦＡＳ）のプロモーターに作用し、および線維芽細胞、脂肪細胞および肝細胞における脂肪酸代謝の主要な遺伝子の発現を制御する、転写因子である。脂肪細胞決定および分化因子Ｉ（ＡＤＤ－１）としても知られているＳＲＥＢＰ－１ｃは、脂肪細胞における遺伝子発現に対するインスリンの効果の一次調節因子と考えられる。その活性は、インスリン、ステロールおよびグルコースレベルにより調節される。このレポーターコンストラクトは肝臓Ｈ４１１ｅ細胞系中に安定にトランスフェクションされる。

【１１７５】

Ｈ４ＩＩｅ／ＦＡＳ－ＳＥＡＰ：脂肪酸合成酵素レポーターコンストラクトは、最小Ｓ

ＲＥＢＰ－応答性ＦＡＳプロモーターを含む。このレポーターコンストラクトは肝臓Ｈ４ＩＩｅ細胞系中に安定にトランスフェクションされる。

【１１７６】

Ｈ４ＩＩｅ／ＰＥＰＣＫ－ＳＥＡＰ：ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（ＰＥＰＣＫ）プロモーターは、ＰＥＰＣＫ遺伝子転写調節ＰＥＰＣＫ活性のホルモン調節の主な部位である。ＰＥＰＣＫは肝の糖新生において、決定付けられている律速段階を触媒しているので、血液グルコースレベルが正常な範囲内に維持されるよう注意深く制御する必要がある。このレポーターコンストラクトは肝臓Ｈ４ＩＩｅ細胞系中へ安定にトランスフェクションされる。

【１１７７】

これらのレポーターコンストラクトは、３Ｔ３－ＬＩ線維芽細胞およびＬ６筋芽細胞中にも安定にトランスフェクションすることができる。次いで、これらの適当な細胞系は、実施例１３において前記したように、３Ｔ３－ＬＩ脂肪細胞およびＬ６筋管に分化する。次いで、以下に記載のＳＥＡＰアッセイにおいて、分化した細胞系を用いることができる。

【１１７８】

成長およびアッセイ培地

成長培地は、１０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ）、１０％の仔ウシ血清、１％のＮＥＡＡ、ｌｘペニシリン／ストレプトマイシンおよび０．７５ｍｇ／ｍＬのＧ４１８（Ｈ４ＩＩｅ／ｒＦＡＳ－ＳＥＡＰおよびＨ４ＩＩｅ／ＳＲＥＢＰ－ＳＥＡＰのために）または０．５０ｍｇ／ｍＬＧ４１８（Ｈ４ＩＩｅ／ｒＭＥＰ－ＳＥＡＰのために）を含む。Ｈ４ＩＩｅ／ＰＥＰＣＫ－ＳＥＡＰのために、成長培地は、１０％のＦＢＳ、１％のペニシリン／ストレプトマイシン、１５ｍＭのＨＥＰＥＳバッファー生理的食塩水および０．５０ｍｇ／ｍＬのＧ４１８からなる。

【１１７９】

Ｈ４ＩＩｅ／ｒＦＡＳ－ＳＥＡＰ、Ｈ４ＩＩｅ／ＳＲＥＢＰ－ＳＥＡＰ、Ｈ４ＩＩｅ／ｒＭＥＰ－ＳＥＡＰレポーターのためのアッセイ培地は、低グルコースＤＭＥＭ培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１％のＮＥＡＡ、１×のペニシリン／ストレプトマイシンからなる。Ｈ４ＩＩｅ／ＰＥＰＣＫ－ＳＥＡＰレポーターのためのアッセイ培地は、０．１％のＦＢＳ、１％のペニシリン／ストレプトマイシンおよび１５ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝化生理的食塩水からなる。

【１１８０】

方法

対数増殖期の細胞が接着するまで、７５，０００細胞／ウェルで１００μＬ／ウェルの成長培地の９６－ウェルプレートに播種する。成長培地を２００μＬ／ウェルのアッセイ培地（Ｈ４ＩＩｅ／ＰＥＰＣＫ－ＳＥＡＰ細胞のために、０．５μＭのデキサメサゾン含有のアッセイ培地を１００μＬ／ウェルにて加え、次いで、約２０時間インキュベーションする）と交換することにより、細胞を４８時間かけて飢餓状態とする。その後、アッセイ培地を１００μＬ／ウェルの新鮮なアッセイ培地と交換し、次いで、本発明の治療剤（例えば、本発明のアルブミン融合蛋白質およびその断片および変異体）を発現する、トランスフェクションさせた細胞系から得られた５０μＬアリコートの細胞上清をそのウェルに加える。空のベクターにトランスフェクションさせた細胞系からの上清を負対照として用いる。ウェルへ１０ｎＭおよび／または１００ｎＭのインスリンを添加したものを正対照として用いる。インキュベーションの４８時間後、条件培地を回収し、次いで、ＳＥＡＰ活性を測定する（Ｐｈｏｓｐｈａ－Ｌｉｇｈｔ　Ｓｙｓｔｅｍプロトコル、Ｔｒｏｐｉｘ　＃；ＢＰ２５００）。すなわち、希釈バッファー中に試料を１：４で希釈し、次いで、６５℃で３０分間インキュベーションし、内因性非胎盤形態のＳＥＡＰを不活性化する。希釈した試料の５０μＬアリコートを、非胎盤ＳＥＡＰアイソザイムに対して活性のある阻害剤の混合物を含む、５０μＬのＳＥＡＰアッセイバッファーと混合し、さらに5分間インキュベーションする。Ｅｍｅｒａｌｄ発光増強剤中に１：２０希釈した５０μＬア

リコートのＣＳＰＤ化学発光基質をその混合物へ加え、次いで、１５～２０分間インキュベーションする。Ｄｙｎｅｘプレートルミノメーターでプレートを読み取る。

【１１８１】

実施例６０：トランスジェニック動物

本発明のアルブミン融合蛋白質は、トランスジェニック動物中で発現させることもできる。マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ（ｍｉｃｒｏ－ｐｉｇ）、ヤギ、ヒツジ、ウシならびにヒトでない霊長類、例えば、ヒヒ、サルおよびチンパンジーを含むがこれらに限定されない任意の種の動物を用いて、トランスジェニック動物を作製してもよい。特定の実施態様において、本明細書に記載されているまたは当技術分野で知られている方法を用いて、遺伝子治療プロトコルの一部としてヒトにおいて本発明の融合蛋白質を発現させる。

【１１８２】

本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを動物に導入してトランスジェニック動物の創始者系統（ｆｏｕｎｄｅｒ　ｌｉｎｅ）を作製するために、当技術分野で知られている任意の技法を用いてもよい。かかる技法は、前核マイクロインジェクション（Ｐａｔｅｒｓｏｎら，Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４０：６９１－６９８（１９９４）；Ｃａｒｖｅｒら．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）１１：１２６３－１２７０（１９９３）；Ｗｒｉｇｈｔら．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）９：８３０－８３４（１９９１）；およびＨｏｐｐｅら．，米国特許第４，８７３，１９１号（１９８９））；生殖細胞系（Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｐｕｔｔｅｎら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ　８２：６１４８－６１５２（１９８５））、胚盤胞または胚へのレトロウイルス媒介遺伝子導入；胚幹細胞における遺伝子ターゲッティング（Ｔｈｏｍｐｓｏｎら．，Ｃｅｌｌ　５６：３１３－３２１（１９８９））；細胞または胚のエレクトロポレーション（Ｌｏ，１９８３，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：１８０３－１８１４（１９８３））；遺伝子銃を用いる本発明のポリヌクレオチドの導入（例えば、Ｕｌｍｅｒら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５９：１７４５（１９９３）を参照のこと）；多能性胚幹細胞への核酸構築物の導入および胚盤胞へのその幹細胞の戻し移入；ならびに精子媒介遺伝子導入（Ｌａｖｉｔｒａｎｏら，Ｃｅｌｌ　５７：７１７－７２３（１９８９）；などを含むが、これらに限定されない。かかる技法の報文については、Ｇｏｒｄｏｎ，”Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ　Ａｎｉｍａｌｓ”Ｉｎｔｌ．Ｒｅｖ．Ｃｙｔｏｌ．１１５：１７１－２２９（１９８９）を参照のこと。該文献は出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【１１８３】

当技術分野で知られている任意の方法を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するトランスジェニッククローンを作製してもよく、例えば、静止期に誘導されている培養された胚性細胞、胎児細胞または成体細胞から、核を除核した卵母細胞に、核を移入してもよい（Ｃａｍｐｅｌｌら．，Ｎａｔｕｒｅ　３８０：６４－６６（１９９６）；Ｗｉｌｍｕｔら．，Ｎａｔｕｒｅ　３８５：８１０－８１３（１９９７））。

【１１８４】

本発明は、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドをすべての細胞中に有するトランスジェニック動物、ならびにすべての細胞中ではなく一部の細胞中にこれらのポリヌクレオチドを有する動物、すなわち、モザイク動物またはキメラ動物を提供する。トランスジーンは、単独のトランスジーンとして、または頭部－頭部タンデム、頭部－尾部タンデムなどのコンカテマーのような複数コピーとして、組み込まれてもよい。トランスジーンは、例えば、Ｌａｓｋｏら（Ｌａｓｋｏら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：６２３２－６２３６（１９９２））の教示に従って、特定の細胞型に選択的に導入され、そこで活性化されてもよい。かかる細胞型特異的活性化に必要な調節配列は、対象の特定の細胞型に依存し得、およびそうした調節配列は当業者に明らかであろう。本発明の融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを、本発明の融合蛋

白質の治療用蛋白質部分またはアルブミン部分に対応する内因性遺伝子の染色体部位に組み込むことが望まれる場合は、遺伝子ターゲッティングが好ましい。すなわち、かかる技法を利用する場合、染色体配列との相同的組換えにより内因性遺伝子のヌクレオチド配列中に組み込んでその機能を破壊するために、その内因性遺伝子に相同な幾つかのヌクレオチド配列を含有するベクターを設計する。トランスジーンは、たとえば、Ｇｕら（Ｇｕら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６５：１０３－１０６（１９９４））の教示に従うことにより、特定の細胞型に選択的に導入し、それにより、その細胞型においてのみ内因性遺伝子を不活性化してもよい。かかる細胞型特異的不活性化に必要な調節配列は、対象の特定の細胞型に依存し得、および当業者には明らかであろう。

【１１８５】

トランスジェニック動物が作製されたならば、標準的な技法を利用して組換え遺伝子の発現をアッセイしてもよい。サザンブロット分析またはＰＣＲ技法により最初のスクリーニングを行って動物組織を分析して、本発明の融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドの組込みが起こったことを確認してもよい。動物から得られた組織試料のノーザンブロット分析、インサイツハイブリダイゼーション分析および逆転写酵素－ＰＣＲ（ｒｔ－ＰＣＲ）を含むがこれらに限定されない技法を用いて、トランスジェニック動物の組織中における本発明の融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドのｍＲＮＡ発現のレベルを評価してもよい。融合蛋白質発現組織の試料は、融合蛋白質に特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的または免疫組織化学的に評価してもよい。

【１１８６】

創始者動物が作製されれば、それらを交配、同系交配または異種交配して、特定の動物のコロニーを作成する。かかる交配ストラテジーの例は、別個の系統を樹立するために、２ヶ所以上の組込み部位を有する創始者動物を異系交配すること；それぞれのトランスジーンの相加的発現の効果によってより高レベルでトランスジーンを発現する複合トランスジェニック動物を作製するために、別個の系統を同系交配すること；発現を増大させ、かつＤＮＡ分析による動物のスクリーニングの必要性をなくすべく、所与の組込み部位に関してホモ接合である動物を作製するために、ヘテロ接合性トランスジェニック動物を交配すること；複合ヘテロ接合系統またはホモ接合系統を作製するために、別個のホモ接合系統を交配すること；および対象の実験モデルに適した明確なバックグラウンドにトランスジーン（すなわち、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド）が配置されるように交配すること；を含むが、これらに限定されない。本発明のトランスジェニック動物は、本発明の融合蛋白質ならびに本発明の融合蛋白質の治療用蛋白質および／またはアルブミン成分の生物学的機能を詳細に検討し、異常な発現に関連する状態および／または障害を研究し、ならびにかかる状態および／または障害を改善するのに有効な化合物をスクリーニングする際に有用な動物モデル系を含むがこれに限定されない用途を有する。

【１１８７】

実施例６１：エキソビボでの遺伝子治療を用いる治療方法

遺伝子治療の一の方法では、本発明のアルブミン融合蛋白質を発現し得る繊維芽細胞が患者に移植される。一般的には、皮膚生検により対象から繊維芽細胞を得る。得られた組織を組織培養培地に配置し、小片に分割する。組織の小塊を組織培養フラスコの湿潤表面上に配置する。約１０片をそれぞれのフラスコ中に配置する。フラスコを上下逆さまにし、密閉して室温で一晩放置する。室温で２４時間後、フラスコを反転させ、組織塊をフラスコの底部に固定された状態に保持し、新鮮な培地（たとえば、１０％のＰＢＳ、ペニシリンおよびストレプトマイシンを有するＨａｍ’ｓＦ１２培地）を加える。次いで、フラスコを３７℃で約１週間インキュベーションする。

【１１８８】

この時点で、新鮮な培地を加え、さらに数日ごとに交換する。さらに２週間培養した後、繊維芽細胞の単層が現れる。単層をトリプシン処理して、より大きなフラスコにスケールアップする。

【１１８９】
Ｍｏｌｏｎｅｙマウス肉腫ウイルスの長末端反復配列によりフランキングされたｐＭＶ－７（Ｋｉｒｓｃｈｍｅｉｅｒ，Ｐ．Ｔ．ら．，ＤＮＡ，７：２１９－２５（１９８８））をＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化させ、続いて仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。アガロースゲル上で線状ベクターを分画し、次いで、ガラスビーズを用いて精製する。
【１１９０】
当技術分野にて知られている方法を用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドを作製し、必要に応じて、５’および３’末端の配列に対応しておりおよび所望により適切な制限部位および開始／停止コドンを有するＰＣＲプライマーを用いて、増幅することができる。好ましくは、５’プライマーはＥｃｏＲＩ部位を含み、３’プライマーはＨｉｎｄＩＩＩ部位を含む。等量のＭｏｌｏｎｅｙマウス肉腫ウイルスの線状骨格ならびに増幅されたＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ断片を、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼの存在下で一緒に添加する。得られた混合物を２るの断片のライゲーションに適切な条件下に保持する。次いで、ライゲーション混合物を用いて細菌ＨＢ１０１を形質転換し、次いでそれを、適切に挿入された対象遺伝子をベクターが有していることを確認するために、カナマイシンを含有する寒天上にプレーティングする。
【１１９１】
１０％の仔ウシ血清（ＣＳ）、ペニシリンおよびストレプトマイシンを有するダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で、アンホトロピックなｐＡ３１７またはＧＰ＋ａｍ１２パッケージング細胞を集密濃度まで組織培養により増殖させる。次いで、その遺伝子を含むＭＳＶベクターを培地に添加して、ベクターをパッケージング細胞に形質導入する。こうすると、パッケージング細胞は、その遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する（ここで、パッケージング細胞は、プロデューサー細胞と呼ばれる）。
【１１９２】
形質導入されたプロデューサー細胞に新鮮な培地を添加し、続いて、集密的なプロデューサー細胞の１０ｃｍのプレートから培地を回収する。感染性ウイルス粒子を含む使用済み培地をミリポアフィルターから濾過し、分離されたプロデューサー細胞を除去する。次いで、この培地を用いて繊維芽細胞に感染させる。繊維芽細胞の半集密的プレートから培地を除去し、プロデューサー細胞からの培地とすばやく交換する。この培地を除去し、新鮮な培地と交換する。ウイルスの力価が高い場合、実質的に全ての繊維芽細胞が感染しているであろうから、選択の必要はない。力価が非常に低い場合、ｎｅｏまたはｈｉｓのごとき選択マーカーを有するレトロウイルスベクターを用いる必要がある。繊維芽細胞に効率的に感染させた後、繊維芽細胞を分析してアルブミン融合蛋白質が産生されるか否かを調べる。
【１１９３】
次いで、操作された繊維芽細胞を、そのままかまたはｃｙｔｏｄｅｘ　３マイクロキャリアービーズ上で集密的になるまで増殖させた後に、宿主に移植する。
【１１９４】
実施例６２：インビボでの遺伝子治療を用いる治療方法
本発明の他の態様は、障害、疾患および状態を処置するためにインビボでの遺伝子治療を用いることである。遺伝子治療は、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードする裸の核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡおよびアンチセンスＤＮＡまたはＲＮＡ）配列を動物に導入することに関連する。本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、標的組織によるポリペプチドの発現に必要なプロモーターまたは任意の他の遺伝的エレメントに作動可能に連結（すなわち、結合）されてもよい。かかる遺伝子治療および送達の技法および方法は当技術分野にて知られている。例えば、ＷＯ９０／１１０９２，ＷＯ９８／１１７７９；米国特許第５６９３６２２号，第５７０５１５１号，第５５８０８５９号；Ｔａｂａｔａら．，Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．３５（３）：４７０－４７９（１９９７）；Ｃｈａｏら．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｓ．３５（６）：５１７－５２２（１９９

７）；Ｗｏｌｆｆ，Ｎｅｕｒｏｍｕｓｃｕｌ．Ｄｉｓｏｒｄ．７（５）：３１４－３１８（１９９７）；Ｓｃｈｗａｒｔｚら．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．３（５）：４０５－４１１（１９９６）；Ｔｓｕｒｕｍｉら．，Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ９４（１２）：３２８１－３２９０（１９９６）を参照のこと（出典明示により本明細書の一部となる）。

【１１９５】

ポリヌクレオチドコンストラクトは、注入可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法、例えば、組織（心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸など）の間質空間への注入により、送達されてもよい。ポリヌクレオチドコンストラクトは、医薬上許容される液体または水性担体中にて送達できる。

【１１９６】

用語「裸」のポリヌクレオチドＤＮＡまたはＲＮＡは、ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方、リポフェクチンまたは沈澱剤などを含む細胞への進入を支援、促進または容易化するように作用する任意の送達ビヒクルを有さない配列を言う。しかし、本発明のアルブミン融合蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、当業者によく知られている方法により調製され得るリポソーム処方（例えば、Ｆｅｌｇｎｅｒ　Ｐ．Ｌ．ら．（１９９５）Ａｎｎ．ＮＹ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７７２：１２６－１３９およびＡｂｄａｌｌａｈ　Ｂ．ら．（１９９５）Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ　８５（１）：１－７にて教示されているもの）中にて送達してもよい。

【１１９７】

好ましくは、遺伝子治療法で用いられるポリヌクレオチドベクターコンストラクトは、宿主ゲノム中に組み込まれずかつ複製を可能にする配列を含まないコンストラクトである。ＤＮＡの発現を駆動するために、当業者に知られている任意の強力なプロモーターを用いることができる。他の遺伝子治療技法と異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入することの一つの主要な利点は、細胞中におけるポリヌクレオチド合成の一過的な性質である。非複製性ＤＮＡ配列を細胞に導入することにより所望のポリペプチドの産生が最大６ヶ月間提供されることが研究により示されている。

【１１９８】

ポリヌクレオチドコンストラクトを、筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺および結合組織を含む動物内の組織の間質空間に送達できる。組織の間質空間は、細胞間液；器官組織の細網繊維間、脈管もしくは房室の壁中の弾性繊維間または繊維組織の膠原繊維間にムコ多糖マトリックス；あるいは結合組織鞘膜保持筋肉細胞内または骨小腔中に同マトリックスを含む。それは、同様に、循環の血漿およびリンパ管のリンパ液により占有された空間である。以下に述べる理由により、筋肉組織の間質空間への送達が好ましい。これらの細胞を含む組織に注入することにより、それらを都合よく送達してもよい。それらを分化した永続的に非分裂性の細胞に送達し、発現させることが好ましいが、例えば、血液の幹細胞や皮膚の繊維芽細胞のごとき未分化または不完全分化細胞にて送達および発現を成し遂げてもよい。インビボ筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、発現させる能力が特に大きい。

【１１９９】

裸のポリヌクレオチドを注入するために、ＤＮＡまたはＲＮＡの有効投与量は、約０．０５ｇ／ｋｇ体重～約５０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲であろう。好ましくは、用量は、約０．００５ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは約０．０５ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇであろう。もちろん、当業者であればわかるであろうが、この用量は、注入の対象部位によって変化するであろう。核酸配列の適切かつ有効用量は、当業者により容易に決定することができ、処置されるべき状態および投与経路に依存してもよい。好ましい投与経路は、組織の間質空間に注入する非経口経路によるものである。しかし、他の非経口経路を用いてもよく、例えば、特に、肺もしくは気管支組織、咽頭または鼻の粘膜に送達するために、エアロゾル処方の吸入を行ってもよい。さらに、血管形成術を施す際、その処置に用いられるカテーテルにより、裸のポリヌクレオチドコンストラクトを動脈に送達す

ることができる。
【１２００】
インビボで筋肉に注入されたポリヌクレオチドの用量応答効果は、以下のように決定される。本発明のポリペプチドをコードするｍＲＮＡの産生に好適な鋳型ＤＮＡを、標準的な組換えＤＮＡ法に従って調製する。環状であっても直鎖状であってもよい鋳型ＤＮＡを、裸のＤＮＡとして使用するかまたはリポソームと複合化させる。次いで、マウスの四頭筋に様々な量の鋳型ＤＮＡを注入する。
【１２０１】
０．３ｍｌの２．５％のＡｖｅｒｔｉｎを腹腔内注入することにより、５～６週齢の雌および雄Ｂａｌｂ／Ｃマウスに麻酔をかける。大腿前部に１．５ｃｍの切開を行い、四頭筋を直接肉眼視できるようにする。筋肉の遠位挿入部位から膝中に約０．５ｃｍ入った深さ約０．２ｃｍの位置に、１ｃｃシリンジ中の０．１ｍｌの担体中の鋳型ＤＮＡを、２７ゲージ針で注射する。あとで位置が特定されるように注射部位上で縫合を行い、ステンレス鋼クリップを用いて皮膚を閉鎖する。
【１２０２】
適切なインキュベーション時間（たとえば、７日間）の後、四頭筋全体を切除することにより筋肉摘出物を調製する。蛋白質発現のために、それぞれの四頭筋の１５ｕｍの横断切片を５片ごとに組織化学的に染色する。様々な時間に別々のマウスからの四頭筋を回収すること以外は同様にして、融合蛋白質発現の時間的経過を調べてもよい。注射後の筋肉内でのＤＮＡの持続性については、注射されたマウスおよび対照のマウスから全細胞ＤＮＡおよびＨＩＲＴ上清を調製した後、サザンブロット分析により調べてもよい。マウスにおける上記の実験の結果を用いて、裸のＤＮＡを使用する、ヒトおよび他の動物における適切な用量および他の治療パラメーターを推定できる。
【１２０３】
実施例６３：本発明の融合蛋白質の生物学的効果
星状細胞およびニューロンアッセイ
皮質ニューロン細胞の生存、神経突起伸長または表現型分化を促進する活性に関して、およびグリア繊維酸性蛋白質免疫陽性細胞である星状細胞の増殖の誘導に関して、本発明のアルブミン融合蛋白質を試験することができる。バイオアッセイのための皮質細胞の選択は、皮質構造中でのＦＧＦ－１およびＦＧＦ－２の優勢な発現ならびに既に報告されているＦＧＦ－２処理から生じる皮質ニューロン生存の増強に基づく。例えば、チミジン取り込みアッセイを用いて、これらの細胞に対する本発明のアルブミン融合蛋白質の活性を解明することができる。
【１２０４】
さらに、インビトロにおける皮質または海馬ニューロンへのＦＧＦ－２（塩基性ＦＧＦ）の生物学的効果を記載した既報により、ニューロン生存および神経突起伸長の両方における増大が実証されている（Ｗａｌｉｃｋｅら，”Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｐｒｏｍｏｔｅｓ ｓｕｒｖｉｖａｌ ｏｆ ｄｉｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ ｎｅｕｒｏｎｓ ａｎｄ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｎｅｕｒｉｔｅ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ．”Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：３０１２－３０１６（１９８６）。該アッセイは出典明示によりその全てが本明細書の一部となる）。しかし、ＰＣ－１２細胞で行われた実験の報告からは、これらの２つの応答が、必ずしも同義的なものでないこと、およびどのＦＧＦが試験されているかだけでなくどの受容体が標的細胞で発現されるかにも依存し得ることが示唆される。皮質ニューロン初代培養パラダイムを用いて、本発明のアルブミン融合蛋白質が神経突起伸長を誘導する能力を、例えばチミジン取り込みアッセイを用いてＦＧＦ－２で得られた応答と比較することができる。
【１２０５】
繊維芽細胞および内皮細胞アッセイ
ヒト肺繊維芽細胞をＣｌｏｎｅｔｉｃｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手し、そ

してＣｌｏｎｅｔｉｃｓ製の成長培地中で保持する。真皮微小血管内皮細胞をＣｅｌｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手する。増殖アッセイのために、ヒト肺繊維芽細胞および真皮微小血管内皮細胞を、９６ウェルプレートの増殖培地中、５，０００細胞／ウェルで１日培養することができる。次いで、０．１％のＢＳＡ基本培地中で細胞を１日インキュベーションする。培地を新鮮な０．１％のＢＳＡ培地と交換した後、本発明の蛋白質の試験融合蛋白質と共に細胞を３日間インキュベーションする。Ａｌａｍａｒ Ｂｌｕｅ（Ａｌａｍａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ，ＣＡ）を１０％の最終濃度になるように各ウェルに加える。細胞を４時間インキュベーションする。ＣｙｔｏＦｌｕｏｒ蛍光リーダーで読み取ることにより細胞生存能力を測定する。ＰＧＥ２アッセイのために、９６ウェルプレート中、５，０００細胞／ウェルでヒト肺繊維芽細胞を１日培養する。培地を０．１％のＢＳＡ基本培地と変換した後、ＩＬ－１αを用いてまたは用いずにＦＧＦ－２または本発明の融合蛋白質と共に細胞を２４時間インキュベーションする。上清を採取し、そしてＥＩＡキット（Ｃａｙｍａｎ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩ）によりＰＧＥ２についてアッセイする。ＩＬ－６アッセイのために、９６ウェルプレート中、５，０００細胞／ウェルでヒト肺繊維芽細胞を１日培養する。培地を０．１％のＢＳＡ基本培地と変換した後、ＦＧＦ－２と共にまたは本発明のアルブミン融合蛋白質および／またはＩＬ－１αを用いてまたは用いずに、細胞を２４時間インキュベーションする。上清を採取し、そしてＥＬＩＳＡキット（Ｅｎｄｏｇｅｎ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）によりＩＬ－６についてアッセイする。

【１２０６】

ヒト肺繊維芽細胞をＦＧＦ－２または本発明のアルブミン融合蛋白質と共に基本培地中で３日間培養し、その後、Ａｌａｍａｒ Ｂｌｕｅを加えて、繊維芽細胞の成長への効果を評価する。ＦＧＦ－２は、１０～２５００ｎｇ／ｍｌで刺激を示すはずであり、これを用いて本発明の融合蛋白質による刺激と比較することができる。

【１２０７】

［３Ｈ］チミジン取り込みに基づく細胞増殖

以下の［３Ｈ］チミジン取り込みアッセイを用いて、繊維芽細胞、上皮細胞または未熟筋肉細胞のごとき細胞の増殖への増殖因子蛋白質のごとき治療用蛋白質の効果を測定することができる。

【１２０８】

無血清培地中で１８時間インキュベートすることにより、半集密的培養物をＧ１期で停止させる。次いで、治療用蛋白質を２４時間にわたり添加し、その最後の４時間で、培養物を０．３３μＭの最終濃度の［３Ｈ］チミジン（２５Ｃｉ／ｍｍｏｌ，Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ Ｈｅｉｇｈｔｓ，ＩＬ）で標識する。組み込まれた［３Ｈ］チミジンを１０％の氷冷トリクロロ酢酸で２４時間かけて沈澱させる。続いて、１０％の氷冷トリクロロ酢酸、次いで氷冷水で、連続的に細胞をリンスする。０．５ＭのＮａＯＨ中に溶解した後、溶解物およびＰＢＳリンス（５００ｍｌ）をプールして、放射能の量を測定する。

【１２０９】

パーキンソンモデル

パーキンソン病における運動機能の喪失は、黒質線条体のドーパミン作動性投射ニューロンの変性から生じる線条体ドーパミンの欠乏に起因する。広範に特徴付けられているパーキンソン病のための動物モデルは、１－メチル－４フェニル１，２，３，６－テトラヒドロピリジン（ＭＰＴＰ）の全身的投与を伴う。ＣＮＳの場合、ＭＰＴＰは、星状細胞に取り込まれ、そしてモノアミンオキシダーゼＢにより１－メチル－４－フェニルピリジン（ＭＰＰ＋）に異化され、そして放出される。続いて、ＭＰＰ＋は、ドーパミンの高親和性再取り込みトランスポーターによりドーパミン作動性ニューロンに能動的に蓄積される。次いで、ＭＰＰ＋は、電気化学的勾配によりミトコンドリア中に濃縮され、そしてニコチン酸アミドアデニン二リン酸：ユビキノン酸化レダクターゼ（複合体Ｉ）を選択的に阻害し、それにより電子伝達を妨害し、最終的に酸素ラジカルを生成する。

【１２１０】
ＦＧＦ－２（塩基性ＦＧＦ）は黒質のドーパミン作動性ニューロンへの栄養活性を有することが組織培養状況で実証されている（Ｆｅｒｒａｒｉら．，Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．１９８９）。最近、Ｕｎｓｉｃｋｅｒ博士のグループは、ゲル泡沫体インプラントとしてＦＧＦ－２を線条体に投与すると、ＭＰＴＰ曝露に関連する毒性から黒質のドーパミン作動性ニューロンがほぼ完全に保護されることを実証した（Ｏｔｔｏ　ａｎｄ　Ｕｎｓｉｃｋｅｒ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，１９９０）。
【１２１１】
ＦＧＦ－２でのデータに基づいて、本発明のアルブミン融合蛋白質を評価し、インビトロにおけるドーパミン作動性ニューロンの生存を増強するＦＧＦ－２の作用と類似の作用を有するか否かを調べることができ、そして、線条体においてＭＰＴＰ処理に関連する損傷からドーパミン作動性ニューロンを保護することに関してインビボにて試験することもできる。ドーパミン作動性ニューロン細胞培養状況において本発明のアルブミン融合蛋白質の潜在的効果を最初にインビトロで試験する。妊娠１４日目のＷｉｓｔｅｒラット胚に由来する中脳底板を切り取ることにより、培養物を調製する。組織をトリプシンを用いて分離し、次いで、ポリオルニチン－ラミニンでコーティングされたカバーガラス上に２００，０００細胞／ｃｍ２の密度で接種する。ホルモン添加物（ＮＩ）を含有するダルベッコ改変イーグル培地およびＦ１２培地中で細胞を維持する。８日後、パラホルムアルデヒドを用いて培養物をインビトロで固定し、次いで、ドーパミン作動性ニューロンのための特異的マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼの免疫組織化学的染色のための処理を施す。胎児期ラットから解離細胞培養物を調製する。培養培地を３日ごとに交換し、および因子もその時に加える。
【１２１２】
ドーパミン作動性前駆細胞が増殖する段階を過ぎている発生時期である妊娠１４日目に、ドーパミン作動性ニューロンを動物から単離するので、チロシンヒドロキシラーゼ免疫陽性ニューロンの数の増加は、インビトロで生存するドーパミン作動性ニューロンの数の増加を表すであろう。故に、本発明の治療用蛋白質がドーパミン作動性ニューロンの生存を延長するように作用するならば、それは、その融合蛋白質がパーキンソン病に関与し得ることを示唆するだろう。
【１２１３】
実施例６４：膵臓ベータ細胞移植併用療法
移植は、自己免疫疾患の処置、特に標的組織それ自体がひどく損傷している場合の処置において一般的な形態である。例えば、これらに限定されるものではないが、膵臓移植および島細胞移植は、ＩＤＤＭのための一般的な処置選択である（例えば、Ｓｔｅｗａｒｔら．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ&Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ　８６（３）：９８４－９８８（２００１）；Ｂｒｕｎｉｃａｒｄｉ，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ．Ｐｒｏｃ．２８：２１３８－４０（１９９６）；Ｋｅｎｄａｌｌ&Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ，Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｍｅｔａｂ．２２：１５７－１６３（１９９６）；Ｈａｍａｎｏら．，Ｋｏｂｅ　Ｊ．Ｍｅｄ．Ｓｃｉ．４２：９３－１０４（１９９６）；Ｌａｒｓｅｎ&Ｓｔｒａｔｔａ，Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｍｅｔａｂ．２２：１３９－１４６（１９９６）；およびＫｉｎｋｈａｂｗａｌａ，ら．，Ａｍ．Ｊ．Ｓｕｒｇ．１７１：５１６－５２０（１９９６）を参照のこと）。任意の移植方法に関して、自己免疫疾患患者のための移植療法は、移植された組織の宿主拒絶反応の危険性を最小限にするための処置を含む。しかし、自己免疫疾患は、元々の組織自体を損傷する既に存在する宿主自己免疫応答が、移植された組織に対して同じ損傷効果を及ぼし得るというさらなる独立した危険性を含む。従って、本発明は、自己免疫疾患の移植療法を受けている個体において、免疫調製剤／免疫抑制剤と組み合わせて本発明のアルブミン融合蛋白質を用いて自己免疫膵臓疾患を処置するための方法および組成物を包含する。
【１２１４】
本発明に従って、上記したアルブミン融合に基づく組成物および処方を投与して、初め

に元々の自己組織に対して影響する宿主個体の自己免疫応答から生じる、移植された器官、組織または細胞への損傷を予防および処置する。投与は２～４用量にて、それぞれ１週間の間隔をあけて、移植の前および後の両方において行ってもよい。

【１２１５】

以下の、ＡＩ－４０１、ＣＤＰ－５７１（抗－ＴＮＦモノクローナル抗体）、ＣＧ－１０８８、Ｄｉａｍｙｄ（糖尿病ワクチン）、ＩＣＭ３（抗－ＩＣＡＭ－３モノクローナル抗体）、ｌｉｎｏｍｉｄｅ（Ｒｏｑｕｉｎｉｍｅｘ）、ＮＢＩ－６０２４（改変ペプチドリガンド）、ＴＭ－２７、ＶＸ－７４０（ＨＭＲ－３４８０）、カスパーゼ８プロテアーゼ阻害剤、サリドマイド、ｈＯＫＴ３ガンマｌ（Ａｌａ－ａｌａ）（抗－ＣＤ３モノクローナル抗体）、経口用インターフェロン－アルファ、経口用乳酸菌およびＬｙｍｐｈｏｓｔａｔ－Ｂを含むがこれらに限定されない免疫調製剤／免疫抑制剤は、島細胞または膵臓移植において、本発明のアルブミン融合治療剤と一緒に用いられ得る。

【１２１６】

実施例６５：ＶＨおよびＶＬドメインの同定およびクローニング

特定の抗体を発現する細胞系に由来するＶＨおよびＶＬドメインを同定およびクローニングする一つの方法は、抗体発現細胞系から作製されたｃＤＮＡについてＶＨおよびＶＬに特異的なプライマーを用いてＰＣＲを行うことである。すなわち、ＲＮＡを細胞系から単離し、そしてＥＢＶ細胞系により発現される抗体のＶＨおよびＶＬドメインを増幅するように設計されたＲＴ－ＰＣＲ用の鋳型として用いる。ＴＲＩｚｏｌ（登録商標）試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）中で細胞を溶解して、１／５容量のクロロホルムで抽出してもよい。クロロホルムを加えた後、溶液を室温で１０分間インキュベーションしておき、次いで、卓上用遠心機にて１４，０００ｒｐｍ、１５分間、４℃で遠心分離する。上清を収集し、そして等量のイソプロパノールを用いてＲＮＡを沈澱させる。卓上用遠心機にて１４，０００ｒｐｍ、１５分間、４℃で遠心処理することにより、沈澱させたＲＮＡをペレット化する。遠心処理の後、上清を捨て、７５％のエタノールで洗浄する。洗浄の後、８００ｒｐｍ、５分間、４℃でＲＮＡを再び遠心分離する。上清を捨て、ペレットを空気乾燥させる。ＲＮＡをＤＥＰＣ水に溶解させ、１０分間で６０℃に加熱する。ＲＮＡの量は、光学密度測定を用いて算出することができる。

【１２１７】

ｃＤＮＡは、当技術分野でよく知られている方法に従って、逆転写酵素およびランダムヘキサマープライマーを用いて１．５～２．５マイクログラムのＲＮＡから合成してもよい。次いで、ＶＨおよびＶＬドメインのＰＣＲ増幅のために、鋳型としてｃＤＮＡを用いる。ＶＨおよびＶＬ遺伝子の増幅に用いられるプライマーを表７に示す。典型的には、ＰＣＲ反応では、単一の５’プライマーおよび単一の３’プライマーを利用する。場合により、利用可能なＲＮＡ鋳型の量が限られているか、または効率を高めるために、５’および／または３’プライマーのグループを用いてもよい。例えば、場合により、全部で５つのＶＨ５’プライマーおよび全てのＪＨ３’プライマーが、単一のＰＣＲ反応で用いられる。ＰＣＲ反応は、１×ＰＣＲバッファー、２ｍＭの各ｄＮＴＰ、０．７ユニットの高忠実性Ｔａｑポリメラーゼ、５’プライマーミックス、３’プライマーミックスおよび７．５マイクロリットルのｃＤＮＡを含む５０マイクロリットル容量で行う。ＶＨおよびＶＬの両方の５’および３’プライマーミックスは、それぞれ、個々のプライマーのそれぞれの２２ｐｍｏｌｅおよび２８ｐｍｏｌｅを一緒にプールすることにより、作製することができる。ＰＣＲ条件は次のとおりである：９６℃で５分間；その後、９４℃で１分間、５０℃で１分間、および７２℃で１分間を２５サイクル；その後、７２℃で１０分間の伸長サイクル。反応が終了した後、試料チューブを４℃で保存する。

【１２１８】

表７：ＶＨおよびＶＬドメインの増幅に使用されるプライマー配列

【表６０】

プライマー名	配列番号	プライマー配列(5’－3’)
VHプライマー		
HuVH1－5’	62	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
HuVH2－5’	63	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
HuVH3－5’	64	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
HuVH4－5’	65	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
HuVH5－5’	66	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC
HuVH6－5’	67	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
HuJH1,2－5’	68	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
HuJH3－5’	69	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
HuJH4,5－5’	70	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
HuJH6－5’	71	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC

【表６１】

VLプライマー		
HuVカッパ1－5’	72	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
HuVカッパ2a－5’	73	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
HuVカッパ2b－5’	74	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC
HuVカッパ3－5’	75	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC
HuVカッパ4－5’	76	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
HuVカッパ5－5’	77	GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
HuVカッパ6－5’	78	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
HuVラムダ1－5’	79	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
HuVラムダ2－5’	80	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
HuVラムダ3－5’	81	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
HuVラムダ3b－5’	82	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
HuVラムダ4－5’	83	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
HuVラムダ5－5’	84	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
HuVラムダ6－5’	85	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA

【表６２】

HuJカッパ1－3’	86	ACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC
HuJカッパ2－3’	87	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
HuJカッパ3－3’	88	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC
HuJカッパ4－3’	89	ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC
HuJカッパ5－3’	90	ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
HuJラムダ1－3’	91	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
HuJラムダ2－3’	92	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
HuJラムダ3－－3’	93	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
HuJラムダ3b－3’	94	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
HuJラムダ4－3’	95	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
HuJラムダ5－3’	96	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
HuJラムダ6－3’	97	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA

【１２１９】

次いで、ＰＣＲ試料を１．３％のアガロースゲルで電気泳動する。予想される大きさ（ＶＨドメインについては約５０６塩基対およびＶＬドメインについては３４４塩基対）のＤＮＡバンドをゲルから切り取り、当技術分野にてよく知られている方法を用いて精製することができる。精製されたＰＣＲ産物は、ＰＣＲクローニングベクター（Ｉｎｖｉｔｒ

ｏｇｅｎ　Ｉｎｃ．，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ製のＴＡベクター）中にライゲーションすることができる。大腸菌のトランスフェクションおよび青／白の色選択を行った後、個々にクローニングされたＰＣＲ産物を単離することができる。次に、クローニングされたＰＣＲ産物を当技術分野にて一般的に知られている方法を用いてシークエンスしてもよい。

【１２２０】

ＶＨドメインおよびＶＬドメインを含むＰＣＲバンドを用いて、全長Ｉｇ発現ベクターを作製することもできる。適切な宿主細胞にトランスフェクションされた場合に、これらのベクターから完全な重鎖もしくは軽鎖分子を発現させることができるように、ＶＨおよびＶＬドメインを、重鎖（たとえば、ヒトＩｇＧ１もしくはヒトＩｇＧ４）または軽鎖（ヒトカッパもしくはヒトラムダ）定常領域のヌクレオチド配列を含むベクター中にクローニングすることができる。さらに、クローニングされた重鎖および軽鎖を共に１つの細胞系で（１つもしくは２つのベクターから）発現させる場合は、細胞培養培地中に分泌される完全な機能性抗体分子中にアセンブルさせることができる。完全な抗体分子をコードする発現ベクターを作製するためにＶＨおよびＶＬ抗体ドメインをコードするポリヌクレオチドを用いる方法は、当技術分野内でよく知られている。

【１２２１】

実施例６６：ＨＡ－サイトカインまたはＨＡ－成長因子融合蛋白質（例えば、ＮＧＦ、ＢＤＮＦａ．ＢＤＮＦｂおよびＢＤＮＦｃ）の調製

ＮＧＦのごとき目的のサイトカインまたは成長因子についてのｃＤＮＡは、全て標準的な方法を用いる、ｃＤＮＡライブラリー、ＲＴ－ＰＣＲおよび一連のオーバーラッピング合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いるＰＣＲを含む様々な手段により単離され得る。これらの蛋白質の全てについてのヌクレオチド配列は知られており、かつ入手可能である。ｃＤＮＡをＨＡのｃＤＮＡを含むベクター中にクローニングするためにオリゴヌクレオチドリンカーを用いることができるように、ｃＤＮＡの５’および３’末端を調節して、制限部位を作製する。これは、スペーサー配列を伴うまたは伴わないＮまたはＣ－末端であり得る。ＮＧＦ（または他のサイトカイン）ｃＤＮＡは、ベクター、例えば、ｐＰＰＣ０００５（図２）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＣ４：ＨＳＡ中にクローニングされ、次いで、そこから、完全発現カセットを切り取り、次いで、プラスミドｐＳＡＣ３５中に挿入し、酵母におけるアルブミン融合蛋白質の発現を可能にする。次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を集め、次いで、培地から精製し、次いで、その生物活性について試験する。哺乳類細胞株の発現について、用いる発現カセットが哺乳類のプロモーター、リーダー配列およびターミネーター（実施例１を参照のこと）を利用することを除き同様の手法を適用する。次いで、この発現カセットを切り取り、次いで、哺乳類細胞株のトランスフェクションに適するプラスミド中に挿入する。

【１２２２】

実施例６７：ＨＡ－ＩＦＮ融合蛋白質（例えば、ＩＦＮａ）の調製

ＩＦＮａのごとき目的のインターフェロンについてのｃＤＮＡは、全て標準的な方法を用いる、ｃＤＮＡライブラリー、ＲＴ－ＰＣＲおよび一連のオーバーラッピング合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いるＰＣＲを含む様々な手段により単離され得る。インターフェロン、例えばＩＦＮａについてのヌクレオチド配列は、例えば、米国特許第５，３２６，８５９号および第４，５８８，５８５号、ＥＰ３２１３４ならびにＧｅｎＢａｎｋのごとき公共データベースにおいて知られており、かつ入手可能である。ｃＤＮＡをＨＡのｃＤＮＡを含むベクター中にクロー－にグするためにオリゴヌクレオチドリンカーを用いることができるように、ｃＤＮＡの５’および３’末端を調節して、制限部位を作製する。これは、スペーサー配列を伴うまたは伴わない、ＨＡ配列のＮまたはＣ－末端であり得る。ＩＦＮａ（または他のインターフェロン）ｃＤＮＡは、ベクター、例えば、ｐＰＰＣ０００５（図２）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＣ４：ＨＳＡ中にクローニングされ、次いで、そこから、完全発現カセットを切り取り、次いで、プラスミドｐＳＡＣ３５中に挿入し、酵母におけるアルブミン融合蛋白質の発現を可能にする。次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を集め、次いで、培地から精製し、次いで、その

生物活性について試験する。哺乳類細胞株の発現について、用いる発現カセットが哺乳類のプロモーター、リーダー配列およびターミネーター（実施例１を参照のこと）を利用することを除き同様の手法を適用する。次いで、この発現カセットを切り取り、次いで、哺乳類細胞株のトランスフェクションに適するプラスミド中に挿入する。

【１２２３】

バイアルからの蛋白質の最大回収率

本発明のアルブミン融合蛋白質は、低濃度でパッケージングした場合でさえも、高度の安定性を有する。さらに、低い蛋白質濃度にも関わらず、水溶液が、バイアル壁への結合を最小限に抑えるべく添加される他の蛋白質を含んでいない場合でさえも、良好な融合蛋白質回収率が観察される。バイアルに保存されたＨＡ－ＩＦＮ溶液の回収率をストック溶液と比較した。６または３０μｇ／ｍｌのＨＡ－ＩＦＮ溶液をバイアルに入れて４℃で保存した。４８または７２時間後、最初の１０ｎｇに相当する容量の試料を取り出し、ＩＦＮサンドイッチＥＬＩＳＡで測定した。その推定値を、高濃度ストック溶液のものと比較した。示されるように、これらのバイアル中では本質的にサンプルの損失はなく、バイアル壁へのサンプル損失を防止するためにアルブミンのような外因性物質を添加することは必ずしも必要ではないことを示す。

【１２２４】

ＨＡ－α－ＩＦＮ融合物のインビボ安定性および生物学的利用能

ＨＡ－α－ＩＦＮ融合分子のインビボ安定性および生物学的利用能を調べるために、精製された融合分子（酵母由来）をサルに投与した。ＨＡ－α－ＩＦＮ融合物から処方された医薬組成物は、増大された血清半減期および生物学的利用能を呈してもよい。従って、医薬組成物は、天然のアルファ－インターフェロン分子と比較して、より低い用量のアルファ－インターフェロン活性を含むように処方されてもよい。

【１２２５】

ＨＡ－α－ＩＦＮ融合物を含有する医薬組成物は、α－ＩＦＮの投与により調節され得る任意の疾患または疾患状態を有する患者において疾患を処置または予防するために用いられてもよい。かかる疾患は、ヘアリー細胞白血病、カポジ肉腫、生殖器および肛門疣贅、慢性Ｂ型肝炎、慢性非Ａ型非Ｂ型肝炎、特に、Ｃ型肝炎、Ｄ型肝炎、慢性骨髄性白血病、腎細胞癌、膀胱癌、卵巣および子宮頚癌、皮膚癌、再発性呼吸器乳頭腫症、非ホジキンおよび皮膚Ｔ細胞リンパ腫、黒色腫、多発性骨髄腫、ＡＩＤＳ、多発性硬化症、膠芽細胞腫など（Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ　Ａｌｐｈａ、ＡＨＦＳ　Ｄｒｕｇ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，１９９７を参照のこと）を含むが、これらに限定されない。

【１２２６】

従って、本発明は、ヒト投与のために適切な用量を用いて処方された、ＨＡ－ａ－ＩＦＮ融合蛋白質、ポリペプチドまたはペプチドを含有する医薬組成物を含む。本発明は、少なくとも１つのＨＡ－ａ－ＩＦＮ融合蛋白質、ポリペプチドまたはペプチドを含有する医薬組成物を投与する少なくとも１つの段階を含む、かかる処置の必要な患者を処置する方法も包含する。

【１２２７】

二重機能性ＨＡ－α－ＩＦＮ融合物

二重機能性ＨＡ－α－ＩＦＮ融合蛋白質を発現させるために、ＨＡ－α－ＩＦＮ発現ベクターを改変して、インサートを挿入してもよい。例えば、二重終止コドンを除去するかまたはコーディング配列の下流に移動させた後、対象の第２の蛋白質のｃＤＮＡを「ｒＨＡ－ＩＦＮ」配列の下流のフレーム内に挿入してもよい。

【１２２８】

二重機能性ＨＡ－α－ＩＦＮ融合蛋白質の一形態では、Ｂリンパ球刺激性蛋白質（ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号４４５５１３９）またはポリペプチドに対する抗体または断片を、融合分子のＨＡ部分の一方の末端に融合させてもよい。この二重機能性蛋白質は、融合物のα－ＩＦＮ部分により引き起こされる任意の免疫応答を当節するために有用である。

【１２２９】

実施例６８：ＨＡ－ホルモン融合蛋白質の調製

対象のホルモンのｃＤＮＡは、全て標準的な方法を用いる、ｃＤＮＡライブラリー、一連の重複する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてＲＴ－ＰＣＲによりおよびＰＣＲを含むがこれらに限定されない、様々な手段により単離することができる。これらの蛋白質の全てのヌクレオチド配列は知られており、例えば、ＧｅｎＢａｎｋのごとき公共のデータベースにて利用できる。ＨＡのｃＤＮＡを含むベクター中に上記ｃＤＮＡをクローニングするためにオリゴヌクレオチドリンカーを使用できるように、ｃＤＮＡの５’および３’末端を遺伝子操作して制限部位を形成することができる。これは、スペーサー配列を用いてまたは用いずに、ＮまたはＣ末端で行うことができる。ホルモンｃＤＮＡは、ｐＰＰＣ０００５（図４）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＣ４：ＨＳＡのごときベクター中にクローニングされ、それらから完全な発現カセットが切り出され、プラスミドｐＳＡＣ３５に挿入されて、酵母におけるアルブミン融合蛋白質の発現が可能となる。次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を培地から回収して精製し、その生物活性に関して試験を行うことができる。哺乳類細胞系における発現については、用いる発現カセットとして哺乳類のプロモーター、リーダー配列およびターミネーター（実施例１を参照のこと）を利用する点を除けば、同様の手順を適用する。次いで、この発現カセットを切り出して、哺乳類細胞系のトランスフェクションに好適なプラスミドに挿入する。

【１２３０】

実施例６９：ＨＡ－可溶性受容体またはＨＡ－結合性蛋白質型融合蛋白質の調製

対象の可溶性受容体または結合性蛋白質のｃＤＮＡは、全て標準的な方法を用いる、ｃＤＮＡライブラリー、一連の重複する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてＲＴ－ＰＣＲによりおよびＰＣＲを含むがこれらに限定されない、様々な手段により単離することができる。これらの蛋白質の全てのヌクレオチド配列は知られており、例えば、ＧｅｎＢａｎｋにて利用できる。ＨＡのｃＤＮＡを含むベクター中に上記ｃＤＮＡをクローニングするためにオリゴヌクレオチドリンカーを使用できるように、ｃＤＮＡの５’および３’末端を遺伝子操作して制限部位を形成することができる。これは、スペーサー配列を用いてまたは用いずに、ＮまたはＣ末端で行うことができる。受容体ｃＤＮＡは、ｐＰＰＣ０００５（図２）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＣ４：ＨＳＡのごときベクター中にクローニングされ、それらから完全な発現カセットが切り出され、プラスミドｐＳＡＣ３５に挿入されて、酵母におけるアルブミン融合蛋白質の発現が可能となる。次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を培地から回収して精製し、その生物活性について試験することができる。哺乳類細胞系における発現については、用いる発現カセットとして哺乳類のプロモーター、リーダー配列およびターミネーター（実施例１を参照のこと）を利用する点を除けば、同様の手順を適用する。次いで、この発現カセットを切り出して、哺乳類細胞系のトランスフェクションに好適なプラスミドに挿入する。

【１２３１】

実施例７０：ＨＡ－成長因子の調製

対象の増殖因子のｃＤＮＡは、全て標準的な方法を用いる、ｃＤＮＡライブラリー、一連の重複する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてＲＴ－ＰＣＲによりおよびＰＣＲを含むがこれらに限定されない、様々な手段により単離することができる（ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＮＰ＿０００６０９を参照のこと）。ＨＡのｃＤＮＡを含むベクター中に上記ｃＤＮＡをクローニングするためにオリゴヌクレオチドリンカーを使用できるように、ｃＤＮＡの５’および３’末端を遺伝子操作して制限部位を形成することができる。これは、スペーサー配列を用いてまたは用いずに、ＮまたはＣ末端で行うことができる。増殖因子ｃＤＮＡは、ｐＰＰＣ０００５（図２）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＣ４：ＨＳＡのごときベクター中にクローニングされ、それらから完全な発現カセットが切り出され、プラスミドｐＳＡＣ３５に挿入されて、酵母におけるアルブミン融合蛋白質の発現が可能となる。次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を培地から回収して精製し、その生物活性について試験することができる。哺乳類細胞系における発現に

ついては、用いる発現カセットとして哺乳類のプロモーター、リーダー配列およびターミネーター（実施例１を参照のこと）を利用する点を除けば、同様の手順を適用する。次いで、この発現カセットを切り出して、哺乳類細胞系のトランスフェクションに好適なプラスミドに挿入する。

【１２３２】

実施例７１：ＨＡ－一本鎖抗体融合蛋白質の調製

一本鎖抗体は、ファージライブラリーからの選択、抗体のｃＤＮＡをクローン化し、可変領域をクローニングするためのプライマーとしてフランキング定常領域を用いるかまたは任意の特異的抗体の可変領域に対応するオリゴヌクレオチドを合成することによる特異的抗体の可変領域のクローニング：を含むがこれらに限定されない、幾つかの方法により産生される。ＨＡのｃＤＮＡを含むベクター中に上記ｃＤＮＡをクローニングするためにオリゴヌクレオチドリンカーを使用できるように、ｃＤＮＡの５’および３’末端を遺伝子操作して制限部位を形成することができる。これは、スペーサー配列を用いてまたは用いずに、ＮまたはＣ末端で行うことができる。細胞ｃＤＮＡは、ｐＰＰＣ０００５（図２）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＣ４：ＨＳＡのごときベクター中にクローニングされ、それらから完全な発現カセットが切り出され、プラスミドｐＳＡＣ３５に挿入されて、酵母におけるアルブミン融合蛋白質の発現が可能となる。

【１２３３】

本発明の融合分子において、ＶＨおよびＶＬは、以下の手段のうちの１つまたはそれらの組み合わせにより連結させることができる：ＶＨのＣ末端とＶＬのＮ末端との間のペプチドリンカー；分泌時に２つが開裂分離され次いで自己会合するように設けられたＶＨとＶＬとの間のＫｅｘ２ｐプロテアーゼ開裂部位；ならびにＶＨおよびＶＬがそれらの間にジスルフィド結合を形成して両者が互いに連結できるように配置されたシステイン残基。代替手段としては、ＨＡまたはＨＡドメイン断片のＮ末端にＶＨを、ＨＡまたはＨＡドメイン断片のＣ末端にＶＬを配置してもよい。

【１２３４】

次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を培地から回収して精製し、その生物活性について試験することができる。哺乳類細胞系における発現については、用いる発現カセットとして哺乳類のプロモーター、リーダー配列およびターミネーター（実施例１を参照のこと）を利用する点を除けば、同様の手順を適用する。次いで、この発現カセットを切り出して、哺乳類細胞系のトランスフェクションに好適なプラスミドに挿入する。

【１２３５】

実施例７２：ＨＡ－細胞接着分子融合蛋白質の調製

対象の細胞接着分子のｃＤＮＡは、全て標準的な方法を用いる、ｃＤＮＡライブラリー、一連の重複する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてＲＴ－ＰＣＲによりおよびＰＣＲを含むがこれらに限定されない、様々な手段により単離することができる。既知の細胞接着分子のヌクレオチド配列は知られており、例えば、ＧｅｎＢａｎｋにて利用できる。ＨＡのｃＤＮＡを含むベクター中に上記ｃＤＮＡをクローニングするためにオリゴヌクレオチドリンカーを使用できるように、ｃＤＮＡの５’および３’末端を遺伝子操作して制限部位を形成することができる。これは、スペーサー配列を用いてまたは用いずに、ＮまたはＣ末端で行うことができる。細胞接着分子ｃＤＮＡは、ｐＰＰＣ０００５（図２）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡ、またはｐＣ４：ＨＳＡのごときベクター中にクローニングされ、それらから完全な発現カセットが切り出され、プラスミドｐＳＡＣ３５に挿入されて、酵母におけるアルブミン融合蛋白質の発現が可能となる。次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を培地から回収して精製し、その生物活性について試験することができる。哺乳類細胞系における発現については、用いる発現カセットとして哺乳類のプロモーター、リーダー配列およびターミネーター（実施例１を参照のこと）を利用する点を除けば、同様の手順を適用する。次いで、この発現カセットを切り出して、哺乳類細胞系のトランスフェクションに好適なプラスミドに挿入する。

【１２３６】

実施例７３：ＨＡ融合蛋白質としての阻害因子およびペプチド（例えば、ＨＡ－抗ウイルス剤、ＨＡ－抗生物質、ＨＡ－酵素阻害剤およびＨＡ－抗アレルギー性蛋白質）の調製

抗生物質ペプチドのごとき対象のペプチドのｃＤＮＡは、全て標準的な方法を用いる、ｃＤＮＡライブラリー、一連の重複する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてＲＴ－ＰＣＲによりおよびＰＣＲを含むがこれらに限定されない、様々な手段により単離することができる。ＨＡのｃＤＮＡを含むベクター中に上記ｃＤＮＡをクローニングするためにオリゴヌクレオチドリンカーを使用できるように、ｃＤＮＡの５’および３’末端を遺伝子操作して制限部位を形成することができる。これは、スペーサー配列を用いてまたは用いずに、ＮまたはＣ末端で行うことができる。ペプチドｃＤＮＡは、ｐＰＰＣ０００５（図２）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＣ４：ＨＳＡのごときベクター中にクローニングされ、それらから完全な発現カセットが切り出され、プラスミドｐＳＡＣ３５に挿入されて、酵母におけるアルブミン融合蛋白質の発現が可能となる。次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を培地から回収して精製し、その生物活性について試験することができる。哺乳類細胞系における発現については、用いる発現カセットとして哺乳類のプロモーター、リーダー配列およびターミネーター（実施例１を参照のこと）を利用する点を除けば、同様の手順を適用する。次いで、この発現カセットを切り出して、哺乳類細胞系のトランスフェクションに好適なプラスミドに挿入する。

【１２３７】

実施例７４：標的ＨＡ融合蛋白質の調製

対象の蛋白質のｃＤＮＡは、標準的な分子生物学的手法を用いて、ｃＤＮＡライブラリーから単離するか、またはいくつかの重複オリゴヌクレオチドを用いて合成的に作製することができる。適切なヌクレオチドを遺伝子工学的にｃＤＮＡに導入し、都合のよい制限部位を形成し、そして、アルブミンｃＤＮＡへの蛋白質ｃＤＮＡの結合を可能にもする。また、細胞内部の蛋白質に向かうことのできる一本鎖抗体またはペプチド、例えば、核局在化シグナルのごとき標的蛋白質またはペプチドｃＤＮＡを、アルブミンの他方の末端に融合させることができる。対象の蛋白質および標的ペプチドは、アルブミンｃＤＮＡとの融合を可能にするｐＰＰＣ０００５（図２）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＣ４：ＨＳＡのごときベクター中にクローニングされる。このように、アルブミンのＮ－およびＣ－末端の両方を他の蛋白質に融合させる。次いで、融合されたｃＤＮＡをｐＰＰＣ０００５から切り出して、ｐＳＡＣ３５のごときプラスミドに挿入し、酵母においてアルブミン融合蛋白質を発現させる。上記の手順はすべて、分子生物学における標準的方法を用いて行うことができる。酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を培地から回収して精製し、適切な生化学的および生物学的試験を用いて、その生物活性およびそのターゲッティング活性について調べることができる。

【１２３８】

実施例７５：ＨＡ－酵素融合物の調製

対象の酵素のｃＤＮＡは、全て標準的な方法を用いる、ｃＤＮＡライブラリー、一連の重複する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてＲＴ－ＰＣＲによりおよびＰＣＲを含むがこれらに限定されない、様々な手段により単離することができる。ＨＡのｃＤＮＡを含むベクター中に上記ｃＤＮＡをクローニングするためにオリゴヌクレオチドリンカーを使用できるように、ｃＤＮＡの５’および３’末端を遺伝子操作して制限部位を形成することができる。これは、スペーサー配列を用いてまたは用いずに、ＮまたはＣ末端で行うことができる。酵素ｃＤＮＡは、ｐＰＰＣ０００５（図２）、ｐＳｃＣＨＳＡ、ｐＳｃＮＨＳＡまたはｐＣ４：ＨＳＡのごときベクター中にクローニングされ、それらから完全な発現カセットが切り出され、プラスミドｐＳＡＣ３５に挿入されて、酵母におけるアルブミン融合蛋白質の発現が可能となる。次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合蛋白質を培地から回収して精製し、その生物活性について試験することができる。哺乳類細胞系における発現については、用いる発現カセットとして哺乳類のプロモーター、リーダー配列およびターミネーター（実施例１を参照のこと）を利用する点を除けば、同様の手順を適用する。次いで、この発現カセットを切り出して、哺乳類細胞系のトランスフェクシ

ョンに好適なプラスミドに挿入する。

【１２３９】

実施例７６：コンストラクト番号２０５３、ＩＦＮｂ－ＨＡＳの産生

コンストラクト番号２０５３、ｐＥＥ１２．１：ＩＦＮｂ．ＨＡＳは、ＮＳＯ発現ベクターｐＥＥ１２．１．にある成熟形態のＨＡＳのアミノ－末端に融合された天然のＩＦＮｂリーダー配列を含む全長ＩＦＮｂ蛋白質を有するＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡを含む。

【１２４０】

ＩＦＮｂｃＤＮＡのクローニング

ＩＦＮｂをコードするポリヌクレオチドは、以下に記載のプライマーＩＦＮｂ－１およびＩＦＮｂ－２を用いてＰＣＲ増幅され、Ｂａｍ　ＨＩ／Ｃｌａ　Ｉを用いて開裂され、次いで、Ｂａｍ　ＨＩ／Ｃｌａ　Ｉで開裂されたｐＣ４：ＨＡＳ中にライゲーションされ、コンストラクト２０１１を生じた。コンストラクト番号２０１１からのＥｃｏ　ＲＩ／Ｅｃｏ　ＲＩ断片は、ｐＥＥ１２．１のＥｃｏ　ＲＩ部位へサブクローニングされ、成熟ＨＡＳ蛋白質が後に続く、リーダー配列および成熟形態のＩＦＮｂを含むアルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡを含むコンストラクト番号２０５３を生じた。

【１２４１】

全長ＩＦＮｂ、ＩＦＮｂ－１およびＩＦＮｂ－２をコードするポリヌクレオチドのＰＣＲ増幅に適する２つのオリゴヌクレオチドを合成した：

IFNb-1: 5' GCGCGGATCCGAATTCCGCCGCCATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTT CTCCACTACAGCTCTTTCCATGAGCTACAACTTGCTTGG-3’ (配列番号:107)

IFNb-2: 5’ GCGCGCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCGTTTCGGA GGTAACCTGT 3’ (配列番　　号:108)

【１２４２】

ＩＦＮｂ－１プライマーは、全長形態のＩＦＮｂの初めの２７個のアミノ酸をコードする８０個のヌクレオチドが後に続く、Ｂａｍ　ＨＩクローニング部位（下線）、ＥｃｏＲＩクローニング部位およびＫｏｚａｋ配列（イタリック体）を組み込む。ＦＮｂ－２において、Ｃｌａ　Ｉ部位（下線）およびその後のＤＮＡは、成熟ＨＡＳ蛋白質（配列番号：１）の初めの１０個のアミノ酸をコードするＤＮＡの逆相補配列、ならびにＩＦＮｂの最後のアミノ酸残基をコードするＤＮＡの逆相補配列である（実施例２を参照のこと）。これらのプライマーを用いてＰＣＲ増幅産物を産生し、精製し、制限酵素を用いて消化させ、次いで、ｐＣ４：ＨＡＳベクターのＢａｍ　ＨＩおよびＣｌａ　Ｉ部位へクローニングする。配列を確かめた後、ＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質発現カセットを含むＥｃｏＲＩ断片を、Ｅｃｏ　ＲＩで消化したｐＥＥ１２．１中にサブクローニングする。

【１２４３】

さらに、アミノ酸配列により発現されたアルブミン融合蛋白質のＮ－末端の分析により、予想されたＩＦＮｂ配列（以下を参照のこと）の存在が確認できる。

【１２４４】

好ましくは、ＩＦＮｂ本発明のアルブミン融合蛋白質は、成熟形態のＩＦＮｂ、すなわち、Ｍｅｔ－２２ないしＡｓｎ－１８７のＮ－またはＣ－末端のいずれかに融合された成熟形態のＨＳＡ、すなわち、Ａｓｐ－２５ないしＬｅｕ－６０９を含む。本発明の一の実施態様において、本発明のＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質はさらに、発現に用いられる宿主の分泌経路に、直接新生融合ポリペプチドをもたらすシグナル配列を含む。さらに好ましい一の実施態様において、シグナル配列によりコードされるシグナルペプチドを取り出し、次いで、成熟ＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質を培養培地中に直接分泌させる。本発明のＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質は、ＭＡＦ、ＩＮＶ、Ｉｇ、フィブリンＢ、クラステリン、インスリン様成長因子結合蛋白質４、キメラＨＳＡ／ＭＡＦリーダー配列を含むがこれらに限定されない変異体ＨＳＡリーダー配列、または当該技術分野において知られている他の異種シグナル配列を含むがこれらに限定されない、異種シグナル配列を含んでもよ

い。好ましい一の実施態様において、本発明のＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質は、天然のＩＦＮｂを含む。さらなる好ましい実施態様において、本発明のＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質はさらに、Ｎ－末端メチオニン残基を含む。断片および／または変異体を含む、これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に包含される。

【１２４５】

コンストラクト番号２０５３の発現および精製

ネズミミエローマＮＳＯ細胞系における発現

当該技術分野において知られている方法により、コンストラクト番号；２０５３、ｐＥＥ１２．１：ＩＦＮｂ－ＨＡＳをＮＳＯ細胞中に電気穿孔処理した（実施例６を参照のこと）。

【１２４６】

ＮＳＯ細胞上清からの精製

ＮＳＯ細胞上清からのＩＦＮｂ－ＨＡＳの精製は、２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ中、０～１ＭのＮａＣＩ勾配を用いるｐＨ７．４でのＱ－セファロースアニオン交換クロマトグラフィー、次いで、５～４０ｍＭのクエン酸ナトリウム勾配を用いるｐＨ６．５でのＰｏｒｏｓＰＩ５０アニオン交換クロマトグラフィー、および１０ｍＭのクエン酸、ｐＨ６．５および１４０ｍＭのＮａＣＩの最終バッファー組成物中への６ＤＶについてのダイアフィルトレーションを含んでもよい。Ｎ－末端配列は、成熟形態のＩＦＮｂのアミノ末端である配列ＭＳＹＮＬＬを産生し得る。蛋白質は約８８．５ｋＤａの分子量を有する。

【１２４７】

より大規模な精製のために、例えば、５０ＬのＮＳＯ細胞上清を約８～１０Ｌに濃縮することができる。次いで、５０ｍＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ６．０および１５０ｍＭのＮａＣｌからなる溶離段階を用いて、濃縮された試料をｐＨ７．５のＱ－セファロースアニオン交換カラム（１０ｘ１９ｃｍ，１．５Ｌ）へ通過させることができる。次いで、溶離された試料は、０．７５％のトリトン－Ｘ１００を用いて、６０分間、室温でウイルス不活性化され得る。次いで、ＳＤＲ－逆相クロマトグラフィー（１０ｃｍ×１０ｃｍ，０．８Ｌ）を、５０ｍＭのＮａＯＡｃおよび１５０ｍＭのＮａＣ１と一緒に、ｐＨ６．０にて用いるか、或いは、試料は、５０ｍＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ６．０、および１５０ｍＭのＮａＣ１の溶離工程を用いて、ｐＨ４．８のＳＰ－セファロースカラムを通過させることができる。ＤＶ５０濾過を続けて、任意のウイルス内容物を除く。３５０ｍＭの$(NH_4)_2SO_4$および５０ｍＭのＮａＯＡｃまたは５０ｍＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ６．０からなる溶離工程を用いて、ｐＨ６．０でのフェニル－６５０Ｍクロマトグラフィー（２０ｃｍ×１２ｃｍ，３．８Ｌ）を続けることができる。６－８ＤＶについてのダイアフィルトレーションにより、バッファーを、１０ｍＭのNa_2HPO_4＋５８ｍＭのスクロース＋１２０ｍＭのＮａＣ１、ｐＨ７．２または１０ｍＭのクエン酸、ｐＨ６．５、および１４０ｍＭのＮａＣｌまたは２５ｍＭのNa_2HPO_4、１００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．２からなる所望の最終処方バッファーに交換することが可能となるだろう。

【１２４８】

ＩＦＮｂの活性はインビトロＩＳＲＥ－ＳＥＡＰアッセイを用いてアッセイできる

全てのＩ型インターフェロン蛋白質は、インターフェロン配列応答性エレメント「ＩＳＲＥ」を介する応答性遺伝子、インターフェロン、「ＩＦＮ」の活性化をもたらす、一般的な受容体複合体および類似するＪａｋ／ＳＴＡＴシグナル経路を介してシグナルを送る。Ｉ型ＩＦＮ活性のために有用なアッセイは、下流レポーター遺伝子に融合されたＩＳＲＥエレメントの複数コピーを含む、プロモーター－レポーターに基づくアッセイ系である。適当なＨＥＫ２９３細胞系を産生することができ、そして、それは、Ｉ型ＩＦＮｓに非常に感受性があるＩＳＲＥ－ＳＥＡＰレポーター遺伝子の安定に統合されたコピーを含み、および濃度の５ログよりも高い直線性を示す。

【１２４９】

ＩＦＮｂ－ＨＳＡＮＳＯ安定クローンのスクリーニング方法

実施例６において記載したように、コンストラクト２０５３をＮＳＯ細胞中に電気穿孔

処理した。ＩＳＲＥ－ＳＥＡＰアッセイにおいて条件成長培地を試験することにより、コンストラクト番号；２０５３を用いてトランスフェクションされたＮＳＯ細胞を活性についてスクリーニングした。処置１日前に、ＩＳＲＥ－ＳＥＡＰ／２９３Ｆレポーター細胞を、９６－ウェルのポリ－Ｄ－リジンコーティングされたプレート中に、3×10^{4}細胞／ウェルで配置した。レポーター細胞を、コンストラクト番号２０５３によりコードされたＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質の、様々な希釈（１：５００および１：５０００を含むがこれらに限定されない）の条件化上清または精製した調製物アルイ派対照としてｒｈＩＦＮｂを用いて処理した。次いで、レポーター細胞を２４時間インキュベーションし、その後、ＳＥＡＰレポーター遺伝子化学発光アッセイ（Ｒｏｃｈｅカタログ番号；１７７９８４２）において用いるために、４０μＬを取り出した。組換えヒトインターフェロンベータ“ｒｈＩＦＮｂ”（Ｂｉｏｇｅｎ）を正対照として用いた。

【１２５０】

結果

ＩＦＮｂ－ＨＳＡ発現したＮＳ０の精製調製物は、１．８×１０－１０ｇ／ｍＬのＥＣ５０を有するｒｈＩＦＮｂ（Ｂｉｏｇｅｎ）よりも高い９．３×１０－９ｇ／ｍＬのＥＣ５０を有する（図４参照のこと）。

【１２５１】

インターフェロンによるＯＡＳのインビボ誘導

方法

ＯＡＳ酵素２’－５’－オリゴアデニラート合成酵素は、抗ウイルス感染に応答して、インターフェロンにより転写レベルで活性化される。処置するサルから血液試料を得、次いで、これらの試料を２つのＯＡＳｍＲＮＡ、ｐ４１およびｐ６９の転写活性化について分析することにより、インターフェロンコンストラクトの効果は、測定できる。全血液の０．５ｍＬ量を動物につき異なる７つの時間ポイント、０日目、１日目、２日目、４日目、８日目、１０日目および１４日目にて１群あたり４匹の動物から得ることができる。様々な群は、ビヒクル対照の注入、１日目における３０ｕｇ／ｋｇおよび／または３００ｐｇ／ｋｇいずれかのＩＦＮアルブミン融合蛋白質の静脈内および／または皮下注入、および１、３、５日目の正対照としての４０ｕｇ／ｋｇのインターフェロンアルファ（Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－Ｐｌｏｕｇｈ）の皮下注入を含む。ｐ４１－ＯＡＳおよびｐ６９－ＯＡＳに特異的なプローブを用いるリアルタイム定量的ＰＣＲ（Ｔａｑｍａｎ）により、ｐ４１およびｐ６９ｍＲＮＡ転写物のレベルを測定することができる。ＯＡＳｍＲＮＡレベルは、１８Ｓリボソーム ＲＮＡ内因性対照に対して定量できる。

【１２５２】

コンストラクト番号２０５３によりコードされたインターフェロンベータアルブミン融合によるＯＡＳのインビボ誘導

方法

コンストラクト２０５３によりコードされたＨＳＡ－ＩＦＮｂ融合蛋白質の活性は、「インターフェロンによるＯＡＳのインビボ誘導」と題するサブセクションにて既に上記したように、インビボＯＡＳアッセイにおいてアッセイできる。

【１２５３】

実施例７７：ＩＦＮｂアルブミン融合蛋白質の適応症

ＩＦＮベータアルブミン融合蛋白質（コンストラクト２０５３によりコードされたものを含むが、これらに限定されない）を用いて、多発性硬化症を処置、予防、改善および／または検出することができる。他の適応症は、重症急性呼吸症候群（ＳＡＲＳ）および他のコロナウイルス感染；エボラウイルスおよびマールブルグウイルスを含むがこれらに限定されないフィロウイルス；Ｐｉｃｈｅｎｄｅウイルス、ラッサウイルス、フニンウイルス、マクポウイルス、Ｇｕａｎａｒｉｔｏウイルスを含むがこれらに限定されないアレナウイルス；およびリンパ球性絨毛髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）；Ｐｕｎｔａ ｔｏｒｏウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスおよびｆｌｙ熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、ラ・クロスウイルス、およびハンタウイルスを含むがこれらに限定されないブンヤ

ウイルス；黄熱病、Ｂａｎｚｉウイルス、ウエスト・ナイルウイルス、デング熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介脳炎、オムスク出血熱およびキャサヌール森林病ウイルスを含むがこれらに限定されないフラビウイルス；ベネズエラ、西部および西部ウマ脳炎ウイルス、Ｒｏｓｓ　Ｒｉｖｅｒウイルス、および風疹ウイルスを含むがこれらに限定されないトガウイルス；ワクシニア、牛痘、天然痘、およびサル痘を含むがこれらに限定されないオルトポックス・ウイルス；ヘルペスウイルス；インフルエンザＡ／Ｂ；呼吸Ｓｉｎｃｙｔｉａｌウイルス（ＲＳＶ）；ｐａｒａｆｌｕ；はしか；ライノウイルス；アデノウイルスセムリキ森林熱ウイルス；ウイルス出血熱；ラブドウイルス；ニパウイルスおよびヘンドラウイルスを含むがこれらに限定されないパラミクソウイルス；および最優先疾患物質（すなわち、カテゴリーＡ、ＢおよびＣ物質；例えば、Ｍｏｒａｎ、Ｅｍｅｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｌｉｎ．Ｎｏｒｔｈ．Ａｍ．２００２；２０（２）：３１１－３０およびＤａｒｌｉｎｇら．、Ｅｍｅｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｌｉｎ．Ｎｏｒｔｈ　Ａｍ．２００２；２０（２）：２７３－３０９を参照のこと）として疾患制御および予防のために米国センターにより同定されている他のウイルス物質を含むウイルス感染を含むが、これらに限定されない。

【１２５４】

実施例７８：コンストラクト番号２２４９．ＩＦＮａ２－ＨＳＡ産生

コンストラクト番号２２４９、ｐＳＡＣ３５：ＩＦＮａ２．ＨＡＳは、成熟形態のＩＦＮａ２蛋白質、すなわち、酵母(ｙｅａｓｔ　Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＳＡＣ３５中の成熟形態のＨＡＳのアミノ－末端に融合されたＣｌ－Ｅ１６５が後に続く、ＨＳＡキメラリーダー配列を有するＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡを含む。

【１２５５】

ＩＦＮａ２ｃＤＮＡのクローニング

ＩＦＮａ２をコードするポリヌクレオチドを、以下に記載のプライマー、ＩＦＮａ２－１およびＩＦＮａ２－２を用いてＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ増幅産物をＳａｌ１／Ｃｌａ１を用いて開裂し、次いで、Ｘｈｏ　１／Ｃｌａ　Ｉで開裂したｐＳｃＣＨＳＡ中にライゲーションした。コンストラクト番号；２２４９は、成熟ＨＳＡ蛋白質が後に続く、ＨＡＳのキメラリーダー配列、成熟形態のＩＦＮａ２を含む、アルブミン融合蛋白質をコードする。

【１２５６】

成熟形態のＩＦＮａ２、ＩＦＮａ２－１およびＩＦＮａ２－２をコードするポリヌクレオチドのＰＣＲ増幅に適する２つのオリゴヌクレオチドを合成した：

IFNa2-1: 5’ CGCGCGCGTCGACAAAAGATGTGATCTGCCTCAAACCCACA-3’ (配列番号:109)
IFNa2-2: 5’ GCGCGCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCTTCCTTACTTCTTAAACTTTCT 3’ (配列番号:110)

【１２５７】

ＩＦＮａ２－１プライマーは、ＳａｌＩクローニング部位（下線）、キメラＨＳＡリーダー配列の最後の３個のアミノ酸残基をコードするヌクレオチドならびに成熟形態のＩＦＮａ２の最初の７個のアミノ酸残基をコードする２２個のヌクレオチド（太字）を組み込む。ＩＦＮａ２－２において、ＣｌａＩ部位（下線）およびその後のＤＮＡは、成熟ＨＳＡ蛋白質の初めの１０個のアミノ酸をコードするＤＮＡの逆相補であり、および最後の２２個のヌクレオチド（太字）は、ＩＦＮａ２の最後の７個のアミノ酸残基をコードするＤＮＡの逆相補である（実施例２を参照のこと）。これらのプライマーを用いてＩＦＮａ２－ＨＡＳのＰＣＲ増幅産物を産生し、精製し、ＳａｌＩおよびＣ／ａＩ制限酵素を用いて消化させ、次いで、ｐＳｃＣＨＳＡベクターのＸｈｏＩおよびＣ／ａＩ部位へクローニングした。配列を確認した後、このＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質をコードする発現カセットを、Ｎｏｔ　Ｉで消化したｐＳＡＣ３５中へサブクローニングした。

【１２５８】
さらに、アミノ酸配列により発現されたアルブミン融合蛋白質のＮ－末端の分析により、予想されたＩＦＮａ２配列の存在を確認できる（以下を参照のこと）。
【１２５９】
異なるリーダー配列を用いる他のＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質は、当該技術分野において知られている方法により構築されている（実施例２を参照のこと）。様々なリーダー配列の例は、インベルターゼ「ＩＮＶ」（コンストラクト２３４３および２４１０）および接合アルファ因子「ＭＡＦ」（コンストラクト２３６６）を含むが、これらに限定されない。これらのＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質は、既に記載したように（実施例５を参照のこと）、哺乳類の発現ベクター、例えば、ｐＣ４（コンストラクト２３８２）およびｐＥＥ１２．１へサブクローニングすることができる。ＨＡＳにＣ－末端融合された治療用部分を伴うＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質も構築できる（コンストラクト２３８１）。
【１２６０】
好ましくは、本発明のＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質は、成熟形態のＩＦＮａ２、すなわち、Ｃｙｓ－１ないしＧｌｕ－１６５のＮ－またはＣ－末端のいずれかに融合された成熟形態のＨＳＡ、すなわち、Ａｓｐ－２５ないしＬｅｕ－６０９を含む。本発明の一の実施態様において、本発明のＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質はさらに、発現に用いられる宿主の分泌経路に、直接新生融合ポリペプチドをもたらすシグナル配列を含む。
【１２６１】
さらなる好ましい一の実施態様において、シグナル配列によりコードされたシグナルペプチドを取り出し、次いで、成熟ＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質を培養培地中に直接分泌させる。本発明のＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質は、ＭＡＦ、ＩＮＶ、Ｉｇ、フィブリンＢ、クラステリン、インスリン様成長因子結合蛋白質４、キメラＨＳＡ／ＭＡＦリーダー配列を含むがこれらに限定されない変異体ＨＳＡリーダー配列または当該技術分野において知られている他の異種シグナル配列を含むがこれらに限定されない、異種シグナル配列を含んでもよい。好ましい一の実施態様において、本発明のＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質は天然のＩＦＮａ２を含む。さらなる好ましい実施態様において、本発明のＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質はさらに、Ｎ－末端メチオニン残基を含む。断片および／または変異体を含む、これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明により包含される。
【１２６２】
コンストラクト番号２２４９の発現および精製
酵母(ｙｅａｓｔ　Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）における発現
当該技術分野において知られている方法（実施例３を参照のこと）を用いて、酵母(ｙｅａｓｔ　Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）系ＢＸＰ１０へのコンストラクト２２４９の形質転換を行った。成長の７２時間後の静止期に細胞を収集できる。３０００ｇで１０分間細胞を澄明化することにより、上清を集める。抗－ＨＳＡ血清（ＫｅｎｔＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を用いる免疫ブロット検出か一次抗体として、発現レベルを調べる。適切な分子量、８８．５ｋＤａのＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質を得ることができる。
【１２６３】
酵母(ｙｅａｓｔ　Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞上清からの精製
酵母(ｙｅａｓｔ　Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞のコンストラクト番号；２２４９から発現されたＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質を含む細胞上清は、小規模なＤｙａｘペプチドアフィニティーカラム（実施例４を参照のこと）によるか、または大規模の以下の５工程：ダイアフィルトレーション、ＤＥＡＥ－セファロースＦａｓｔＦｌｏｗカラムを用いるアニオン交換クロマトグラフィー、ブチル６５０Ｓカラムを用いる疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）、ＳＰ－セファロースＦａｓｔ　ＦｌｏｗカラムまたはＢｌｕｅ－セファロースクロマトグラフィーを用いるカチオン交換クロマトグラフィーならびにＱ－セファロース高速カラムクロマトグラフィーを用いる高速クロマトグラフィー（

実施例４を参照のこと）のいずれかにより精製できる。ＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質は、１００～２５０ｍＭのＮａＣＩを用いてＤＥＡＥ－セファロースＦａｓｔ　Ｆｌｏｗカラムから、１００－２５０ｍＭのＮａＣｌを用いてＳＰ－セファロースＦａｓｔ　Ｆｌｏｗカラムから、および５～７．５ｍＳ／ｃｍでＱ－セファロース高速カラムから溶離されてもよい。Ｎ－末端配列は、成熟形態のＩＦＮａ２に対応する配列ＣＤＬＰＱ（配列番号：９８）を産生する。

【１２６４】

ＩＦＮａ２の活性はインビトロＩＳＲＥ－ＳＥＡＰアッセイを用いてアッセイできる方法

コンストラクト番号；２２４９によりコードされたＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質は、実施例７６にて既に述べたように、ＩＳＲＥ－ＳＥＡＰアッセイにおいて、活性について試験できる。すなわち、条件化酵母上清を１：１０００希釈にて、ＩＳＲＥ－ＳＥＡＰ／２９３Ｆレポーター細胞系へＩＳＲＥシグナル伝達をもたらすそれらの能力について試験した。処置１日前に、ＩＳＲＥ－ＳＥＡＰ／２９３Ｆレポーター細胞を、９６－ウェルのポリ－Ｄ－リジンコーティングされたプレート中に、3×10^{4}細胞／ウェルで配置した。次いで、レポーター細胞を１８または２４時間インキュベーションし、その後、ＳＥＡＰレポーター遺伝子化学発光アッセイ（Ｒｏｃｈｅカタログ番号；１７７９８４２）において用いるために、４０μＬを取り出した。組換えヒトインターフェロンベータ“ｒｈＩＦＮｂ”（Ｂｉｏｇｅｎ）を正対照として用いた。

【１２６５】

結果

ＩＦＮａ２－ＨＡＳの精製した調製物は、10^{-1}～10^{1}ｎｇ／ｍＬ（図５を参照のこと）または10^{-10}～10^{-8}ｎｇ／ｍＬ（図６を参照のこと）の範囲の濃度にわたるＩＳＲＥ－ＳＥＡＰアッセイにおいて相対的に直線的増大を示した。

【１２６６】

コンストラクト番号２２４９によりコードされるインターフェロンアルファ融合物によるＯＡＳのインビボ誘導

方法

ＯＡＳ酵素、２’－５’－オリゴアデニラート合成酵素は、抗ウイルス感染に応答して、インターフェロンにより転写レベルで活性化される。処置するサルから血液試料を得、次いで、これらの試料を２つのＯＡＳｍＲＮＡ、ｐ４１およびｐ６９の転写活性化について分析することにより、インターフェロンコンストラクトの効果は、測定できる。全血液の０．５ｍＬ量を動物につき異なる７つの時間ポイント、０日目、１日目、２日目、４日目、８日目、１０日目および１４日目にて１群あたり４匹の動物から得ることができる。様々な群は、ビヒクル対照の注入、１日目における３０ｕｇ／ｋｇのＩＦＮの静脈内注入、１日目における３０ｕｇ／ｋｇのＩＦＮの皮下注入、１日目における３００ｕｇ／ｋｇのＩＦＮの皮下注入、および１、３、５日目の正対照としての４０ｕｇ／ｋｇのインターフェロンアルファ（Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－Ｐｌｏｕｇｈ）の皮下注入を含む。ｐ４１－ＯＡＳおよびｐ６９－ＯＡＳに特異的なプローブを用いるリアルタイム定量的ＰＣＲ（Ｔａｑｍａｎ）により、ｐ４１およびｐ６９ｍＲＮＡ転写物のレベルを測定することができる。ＯＡＳｍＲＮＡレベルは、１８Ｓリボソーム　ＲＮＡ内因性対照に対して定量できる。コンストラクト２２４９によりコードされたアルブミン融合物に類似する実験を行うことができる。

【１２６７】

結果

ＩＦＮａで処置したサルと対照的に、ＨＳインターフェロンで処置したサルにおいて、ｐ４１およびｐ６９ＯＡＳの両方についてのｍＲＮＡ転写物レベルにおける有意な増大が観察された（ｐ４１データについては図７を参照のこと）。効果は約１０日間続いた。

【１２６８】

実施例７９：ＩＦＮａ２アルブミン融合蛋白質のための適応症

ＩＦＮアルファアルブミン融合蛋白質は（コンストラクト２２４９、２３４３、２４１０、２３６６、２３８２および２３８１によりコードされたものを含むが、これらに限定されない）を用いて、多発性硬化症を処置、予防、改善および／または検出することができる。他の適応症は、重症急性呼吸症候群（ＳＡＲＳ）および他のコロナウイルス感染；エボラウイルスおよびマールブルグウイルスを含むがこれらに限定されないフィロウイルス；Ｐｉｃｈｅｎｄｅウイルス、ラッサウイルス、フニンウイルス、マクポウイルス、Ｇｕａｎａｒｉｔｏウイルスを含むがこれらに限定されないアレナウイルス；およびリンパ球性絨毛髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）；Ｐｕｎｔａ　ｔｏｒｏウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスおよびｆｌｙ熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、ラ・クロスウイルス、およびハンタウイルスを含むがこれらに限定されないブンヤウイルス；黄熱病、Ｂａｎｚｉウイルス、ウエスト・ナイルウイルス、デング熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介脳炎、オムスク出血熱およびキャサヌール森林病ウイルスを含むがこれらに限定されないフラビウイルス；ベネズエラ、西部および西部ウマ脳炎ウイルス、Ｒｏｓｓ　Ｒｉｖｅｒウイルス、および風疹ウイルスを含むがこれらに限定されないトガウイルス；ワクシニア、牛痘、天然痘、およびサル痘を含むがこれらに限定されないオルトポックス・ウイルス；ヘルペスウイルス；インフルエンザＡ／Ｂ；呼吸Ｓｉｎｃｙｔｉａｌウイルス（ＲＳＶ）；ｐａｒａｆｌｕ；はしか；ライノウイルス；アデノウイルスセムリキ森林熱ウイルス；ウイルス出血熱；ラブドウイルス；ニパウイルスおよびヘンドラウイルスを含むがこれらに限定されないパラミクソウイルス；および最優先疾患物質（すなわち、カテゴリーＡ、ＢおよびＣ物質；例えば、Ｍｏｒａｎ、Ｅｍｅｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｌｉｎ．Ｎｏｒｔｈ．Ａｍ．２００２；２０（２）：３１１－３０およびＤａｒｌｉｎｇら．、Ｅｍｅｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｌｉｎ．Ｎｏｒｔｈ　Ａｍ．２００２；２０（２）：２７３－３０９を参照のこと）として疾患制御および予防のために米国センターにより同定されている他のウイルス物質を含むウイルス感染を含むが、これらに限定されない。

【１２６９】

好ましくは、ＩＦＮａ－アルブミン融合蛋白質またはＩＦＮハイブリッド融合蛋白質は、ＣＣＲ５アンタゴニストと組み合わせて、さらには、少なくとも１つのリバビリン、ＩＬ－２、ＩＬ－１２と組み合わせて、ｐｅｎｔａｆｕｓｉｄｅ単独かまたはＨＩＶ－１感染、ＨＣＶまたはＨＩＶ－１およびＨＣＶ共感染を処置するための医薬を調製するための抗－ＨＩＶ薬剤療法、例えば、ＨＡＡＲＴと組み合わせて、処置経験のないおよび処置経験のある成人および小児患者に投与される。

【１２７０】

実施例８０：コンストラクト番号；３６９１．ＢＮＰ－ＨＳＡ、産生

コンストラクト番号；３６９１、ｐＣ４：ＳＰＣＯＮ．ＢＮＰＩ－３２／ＨＡＳは、哺乳類の発現ベクターｐＣ４中の成熟形態のＨＡＳのアミノ－末端に融合された処理された活性のあるＢＮＰペプチド（アミノ酸１－３２）が後に続く、コンセンサスリーダー配列、ｓｅｃｒｅｃｏｎを有するＢＮＰアルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡを含む。

【１２７１】

コンストラクト３６９１についてのＢＮＰｃＤＮＡのクローニング

ＢＮＰをコードするポリヌクレオチドを以下に記載のプライマー、ＢＮＰ－１およびＢＮＰ－２を用いてＰＣＲ増幅し、Ｂａｍ　ＨＩｌＣｌａ　１を用いて開裂し、次いで、Ｂａｍ　Ｈｌ／Ｃｌａ　Ｉで開裂されたｐＣ４：ＨＡＳにライゲーションし、コンストラクト番号；３６９１を生じる。コンストラクト番号；３６９１は、コンセンサスリーダー配列（配列番号：１１１）および成熟ＨＡＳ蛋白質が後に続く、ＢＮＰの処理された活性形態を含むアルブミン融合蛋白質をコードする（コンストラクト３６９１については表２の配列番号：３２１を参照のこと）。

【１２７２】

ＢＮＰの活性のあるプロセッシング形態をコードするポリヌクレオチドのＰＣＲ増幅に適する２つのオリゴヌクレオチド、ＢＮＰ－１およびＢＮＰ－２を合成した：

BNP-1: 5'-GAGCGCGGATCCAAGCTTCCGCCATCATGTGGTGGCGCCTGTGGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTG CTGCTGTG GCCCATGGTGTGGGCCAGCCCCAAGCTGGTGCAAGG -3' (配列番号:463)
BNP-2: 5'-AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCATGCCGCCTCAGCACTTTGC-3' (配列番号:464).

ＢＮＰ－１は、Ｂａｍ　ＨＩクローニング部位（下線）、コンセンサスリーダー配列をコードするヌクレオチド（配列番号：１１１）（イタリック体）およびＢＮＰの初めの７個のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド（太字）を組み込む。ＢＮＰ－２では、下線を引いた配列はＣｌａ　Ｉ部位であり、それに続くポリヌクレオチドは、ＢＮＰ（太字）の最後の６個のアミノ酸および成熟ＨＡＳ蛋白質の初めの１０個のアミノ酸をコードするＤＮＡの逆相補を含む。これらの２つのプライマーを用いて、ＢＮＰ蛋白質をＰＣＲ増幅した。アニーリングおよび伸長温度および回数は、特定のプライマーおよび鋳型それぞれについて実験により決定される必要がある。

【１２７３】

ＰＣＲ産物を精製し（例えば、Ｗｉｚａｒｄ　ＰＣＲ　Ｐｒｅｐｓ　ＤＮＡ　精製システム（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ）を用いて）、次いで、Ｂａｍ　ＨＩおよびＣｌａ　Ｉを用いて消化させた。ゲル電気泳動によりＢａｍ　ＨＩ-ＣｌａＩ断片をさらに精製した後、その産物をＢａｍ　ＨＩ／Ｃｌａ　Ｉで消化したｐＣ４：ＨＳＡへクローニングし、コンストラクト番号３６９１を生じた。発現コンストラクトの配列を確認した。

【１２７４】

コンストラクト番号３６９１の発現および精製

２９３Ｆ細胞における発現

当該技術分野において知られている方法（実施例６を参照のこと）により、コンストラクト番号３６９１、ｐＣ４：ＳＰＣＯＮ．ＢＮＰ１－３２／ＨＡＳを２９３Ｆ細胞フェートランスフェクションした。

【１２７５】

２９３Ｆ細胞上清からの精製

トランスフェクションから３日後、２リットルの上清を集めた。組み換え蛋白質を５ｍｌのＢｌｕｅセファロースＣＬ－６Ｂカラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ、ＵＳＡ）により捕らえ、次いで、２ＭのＮａＣｌにより溶離した。その物質はＨｉＰｒｅｐ１６／１０フェニルＦＦ（ｈｉｇｈ　ｓｕｂ）カラムに結合され、次いで、２０ｍＭのＭＥＳ、ｐＨ６．７により溶離される。リン酸ナトリウムバッファー勾配（２００ｍｌ中、０－２０ｍＳ／ｃｍ）、ｐＨ６．８中のヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより、ＢＮＰ－ＨＳＡをさらに精製する。最終産物をＨｉＰｒｅｐ２６／１０脱塩カラム（ＡｍｅｒｓｈａｍＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）によりＰＢＳｐＨ７．２中へ交換する。

【１２７６】

ＢＮＰ－ＨＡＳの活性はインビトロＮＰＲ－Ａ／ｃＧＭＰアッセイを用いてアッセイできる

ナトリウム利尿ペプチド受容体－Ａ（ＮＰＲ－Ａ）はＢＮＰのためのシグナル受容体であり、そしてそのようなものとして、ＢＮＰの生物学的効果のほとんどに関与する。ＢＮＰ生物活性は、活性化の際にＧＴＰをｃＧＭＰへ変換する、ＮＰＲ－Ａグアニリルシクラーゼドメインにより介される。ＢＮＰ活性のための有意なアッセイは、ＮＰＲ－Ａを安定に過剰発現する２９３Ｆ細胞系のＢＮＰ刺激を測定することである。ＢＮＰに暴露した後の該細胞におけるｃＧＭＰ産生をｃＧＭＰＥＬＩＳＡにより測定することができる。

【１２７７】

ＮＰＲ－Ａ２９３Ｆ安定クローンのスクリーニング法

ヒトＮＰＲ－ＡのオープンリーディングフレームをｐｃＤＮＡ３．１発現ベクター（Ｉｎｖｉｔｏｇｅｎ）中に構築した。リポフェクタミン法により２９３Ｆ細胞は安定にプラスミドＤＮＡにトランスフェクションされ、次いで、０．８／ｌｇ／ｍｌのＧ４１８によ

り選択された。２９３Ｆ／ＮＰＲ－Ａ安定クローンを、組換えＢＮＰの最良の応答についてスクリーニングした。

【１２７８】

ｃＧＭＰ活性化の測定

ＢＮＰによるｃＧＭＰ活性化を２９３Ｆ／ＮＰＲ－Ａ細胞にて行い、次いで、ＣａｔｃｈＰｏｉｎｔ環状－ＧＭＰ蛍光アッセイキット（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ，ＵＳＡ）により測定した。すなわち、９６－ウェルプレートにて培養した５０，０００細胞／ウェルの２９３Ｆ／ＮＰＲ－Ａ細胞を洗浄して、８０μｌの予備刺激バッファー（１０ｍＭのグルコース、ｐＨ７．４、１５ｎＭの重炭酸ナトリウムおよび０．７５ｍＭの３－イソブチル－ｌ－メチルキサンチンを加えたＫｒｅｂｓ－Ｒｉｎｇｅｒ重炭酸塩バッファー）へ加えた。４０μｌの予備刺激バッファー中のＢＮＰ－ＨＳＡまたは組換えＢＮＰを、３７℃で１０分間、細胞へ加えた。４０μｌの溶解バッファーを用いて１０分間攪拌しながら細胞を溶解した。溶解物中のｃＧＭＰの量を、製造元の指示に従って定量した。

【１２７９】

結果

ＢＮＰ－ＨＳＡおよび組換えＢＮＰの用量応答関係を測定した（図８を参照のこと）。コンストラクト番号；３６９１および組換えＢＮＰの最大活性は類似しており（それぞれ、１．６３±０．０１６、対して、１．８０±０．０１６ｐｍ）、それぞれ、２８．４±１．２、および０．４６±１．１ｎＭのＥＣ５０値を有した。

【１２８０】

ＢＮＰ－ＨＡＳはインビボにて血圧を減少させる

方法

直接的な血管拡張ならびにレニン／アンジオテンシン／エンドセリン／アルドステロン系の抑制により、ＢＮＰは血圧を減少させる。Ｔａｃｏｎｉｃ（Ｇｅｒｍａｎｔｏｗｎ，ＮＹ，ＵＳＡ）から購入した３ヶ月齢雄の自然発生的な高血圧ラットにおいて、動脈圧を減少させるＢＮＰ－ＨＡＳの能力を試験した。自然発生的な高血圧ラットは遺伝的に高血圧であり、３ヶ月齢後に高血圧を発症する。ラット１匹あたり０．３ｃｃのＰＢＳ中にＢＮＰ－ＨＳＡまたは組換えＢＮＰを復元した。尾部への静脈注入により薬剤を投与した。ＸＢＰ－１０００系（Ｋｅｎｔ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｔｏｒｒｉｎｇｔｏｎ，ＣＴ，ＵＳＡ）を用いてｃｕｆｆ－ｔａｉｌ法により、収縮期および拡張期血圧を記録した。それぞれの血圧データポイントにおいて、４－５回、連続してリーディングを行い、ついで、平均した。１／３の収縮期血圧＋２／３の拡張期血圧として平均動脈圧（ＭＡＰ）を算出した。用量応答を測定するために、ｐＣ４：ＳＰＣＯＮの２０時間後に血圧を測定した。ＢＮＰＩ－３２／ＨＳＡを、０．５、２、６および１８ｎｍｏｌ／ｋｇの用量で投与した。

【１２８１】

結果

自然発生的な高血圧ラットの投与前の典型的な収縮期血圧は１８０－２００ｍｍＨｇだった。尾部への静脈内注入により投与された単一ボーラスの６ｎｍｏｌ／ｋｇのＢＮＰ－ＨＡＳは、収縮期および拡張期血圧を共に低下させ、３０ｍｍＨｇの平均動脈圧（ＭＡＰ）減少を示した。低下した血圧は安定であり、そして１日間持続し、次いで、数日かけて徐々にベースラインへと戻った（図９を参照のこと）。対照的に、その即時のクリアランスに起因して、単一ボーラスの６ｎｍｏｌ／ｋｇの組換えＢＮＰは、非常に一過性である約１５ｍｍＨｇのＭＡＰの減少のみを生じた。

【１２８２】

加えて、４匹の自然発生的な高血圧ラットにおいて、ＢＮＰ－ＨＡＳボーラスの注入後２０時間の用量応答を測定した。０．５ｎｍｏｌ／ｋｇのＢＮＰ－ＨＡＳは平均７ｍｍＨｇのＭＡＰ減少を有したが、一方で、６ｎｍｏｌ／ｋｇのＢＮＰ－ＨＡＳは平均３０ｍｍＨｇのＭＡＰ減少を有し、高用量の１８ｎｍｏｌ／ｋｇのＢＮＰ－ＨＡＳは６ｎｍｏｌ／

ｋｇよりわずかに高い血圧のみを低下させた。

【１２８３】

ＢＮＰ－ＨＡＳによる血漿ｃＧＭＰのインビボ誘導

方法

ＢＮＰによる細胞内ｃＧＭＰ活性化は、細胞から循環へのその放出をもたらす。血漿ｃＧＭＰレベルは、ＢＮＰが誘導する心血管および腎の生理機能に対応する。血漿ｃＧＭＰは、インビボＢＮＰ作用のためのバイオマーカーとして用いられている。インビボでのＢＮＰ－ＨＡＳによる血漿ｃＧＭＰの誘導を試験するために、１１～１２－週齢の雄Ｃ５７／ＢＬ６マウスに、単一ボーラスの組換えＢＮＰまたはＢＮＰ－ＨＡＳを、６ｎｍｏｌ／ｋｇ用量で、尾部静脈へ投与した。組換えＢＮＰ投与群については５、１０、２０、４０および８０分の時間ポイントにて、およびＢＮＰ－ＨＡＳ群についてはさらに６４０、１４４０、２８８０および５７６０分にて、血漿を尾部血液から調製した。ビヒクル対照としてＰＢＳを用いて処置したマウスからの血漿試料を時間ポイントゼロにて集めた。ＣａｔｃｈＰｏｉｎｔ環状－ＧＭＰ蛍光アッセイキットにより、製造元の指示に従って、ｃＧＭＰレベルを測定した。

【１２８４】

結果

６ｎｍｏｌ／ｋｇの組換えＢＮＰまたはＢＮＰ－ＨＡＳの単一静脈内ボーラスの後、ピーク血漿ｃＧＭＰレベルはそれぞれベースラインの３．９－または５．６－倍に増大した（図１０を参照のこと）。加えて、組換えＢＮＰ処置の後のｃＧＭＰの１相崩壊半減期は１６分であり（１０～４２分、９５％のＣＩ）、一方で、ＢＮＰ－ＨＳＡ投与後のｃＧＭＰの１相崩壊半減期は１５３８分（１０１７～３１５３分、９５％のＣＩ）だった。

【１２８５】

コンストラクト番号３６９１によりコードされたＢＮＰアルブミン融合物のインビボ薬物動態分析

方法

１１～１２週齢の雄Ｃ５７／ＢＬ６マウス（Ａｃｅ Ａｎｉｍａｌｓ，Ｂｏｙｅｒｔｏｗｎ，ＰＡ，ＵＳＡから得た）は、研究時にて、２５．１±０．１２ｇの体重だった。全ての動物は１０ｍｌ／ｋｇ体重の用量で投与された。予め投与の動物はＰＢＳを注入した。組換えＢＮＰを、尾部または肩甲骨中間領域の皮下に静脈内注入した。

【１２８６】

薬物動態分析を以下の群において行った：

表８．

【表６３】

群	薬剤	用量(mg/kg)	経路	N/時間	時間(時間)
1	BNP－HSA	2.19	皮下	3	0.5,2,6,16,24,32,48,72,96
2	BNP－HSA	2.19	静脈内	3	0.083,2,6,16,24,32,48,72,96
3	ビヒクル	0	皮下	3	予め投与
4	ビヒクル	0	静脈内	3	予め投与

【１２８７】

血液を下大静脈から採取し、ＥＤＴＡコーティングしたマイクロタイター上にセットし、次いで、氷上で貯蔵した。その試料を微小遠心にて１４，０００ｒｐｍ（１６，０００ｘｇ）、１０分間、室温で遠心分離した。血漿をクラスターチューブに移し、次いで、－８０℃で貯蔵した。

【１２８８】

ＢＮＰ ＥＩキット（Ｐｈｏｅｎｉｘ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ，Ｂｅｌｍｏｎｔ，ＣＡ，ＵＳＡ）を用いて、血漿試料中のＢＮＰ－ＨＳＡ濃度を測定した。試験試料を

用いて、同じプレート同じ時間において、標準曲線を作成した。組換えＢＮＰについて検出限界は０．１１ｎｇ／ｍＬだった。アッセイは組換えＢＮＰを検出し、そしてマウスＢＮＰと交差反応しない。

【１２８９】

ノンコンパートメント法（ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ；バージョン　４．１；Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ　Ｃｏｒｐ．，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ，ＵＳＡ）により分析を行った。各時間での平均血漿濃度をその分析に用いた。ｌｉｎｅａｒｕｐ／ｌｏｇ　ｄｏｗｎｔｒａｐｅｚｏｉｄａｌ　方法を用いて、ＡＵＣ０－ｔを算出した。最後に観察された濃度を末端の排出速度定数で割ることにより無限ＡＵＣ０－∞への外挿を行った。これらの分析について、データを一様に検討した。

【１２９０】

結果

予め投与した試料中に検出された、血漿中のＢＮＰ－ＨＡＳの平均ベースライン濃度は約０．０８１－０．０９５μｇ／ｍｌだった。単一の静脈内または皮下注入の後、ＢＮＰ－ＨＡＳは、１１．２（静脈内デリバリー）または１９．３時間（皮下デリバリー）の終末排出半減期を有し、一方で、マウスにおける組換えＢＮＰの半減期は３．１分だった。ＢＮＰ－ＨＡＳのノンコンパートメント分析は、ＢＮＰ－ＨＡＳが以下の特徴を有することを明らかにした：

表９．

【表６４】

	単位	静脈内	皮下
t_{max}	h	NA	16
C_{max}	μg/ml	NA	11.2
$t_{1/2,term}$	h	11.2	19.3
$AUC_{0-\infty}$	(h·μg/ml)/(mg/kg)	658.9	227.9
V_{ss}	ml/kg	37	NA
V_zまたはV_z/F	ml/kg	53.5	268
CLまたはCL/F	ml/h/kg	3.3	9.6
MRT	h	11.2	19.8
生物学的利用能	%		34.6

C_{max}，薬剤ピーク血漿濃度；t_{max}，最大血漿濃度の時間；$AUC_{0-\infty}$，時間０～無限大までの血漿薬剤濃度－時間曲線下面積；$t_{1/2,term}$，終末排泄相半減期；ＣＬ，静脈内投与後のクリアランス；ＣＬ／Ｆ，皮下投与後の明らかなクリアランス；V_{ss}，静脈内投与後の定常状態における分布量；V_z：静脈投与後の終末期における分布量；V_z／Ｆ，皮下投与後の終末期における分布量；ＮＡ，適用せず

【１２９１】

静脈内プロフィールの終末期における５ポイントおよび皮下プロフィールの終末期における４ポイントを終末半減期の算出のために選択した。この終末期における得られたＡＵＣは、静脈内および皮下プロフィールそれぞれについて全ＡＵＣの約１０％だった。これを、最後の３ポイントを終末半減期の算出のために選択した場合の、静脈内および皮下プロフィールそれぞれについて全ＡＵＣのわずか２％および４％の値と比較する。

【１２９２】

実施例８１：コンストラクト番号；３６１８、ＢＮＰ（２×）－ＨＳＡ、産生

コンストラクト番号；３６１８、ｐＣ４：ＳＰＣＯＮ．ＢＮＰ１－３２（２×）／ＨＡＳは、哺乳類の発現ベクターｐＣ４中の成熟形態のＨＡＳのアミノ－末端にタンデム融合された２つのプロセッシングされた活性のあるＢＮＰペプチド（アミノ酸１－３２）が後に続く、コンセンサスリーダー配列、セクレトンを有するＢＮＰアルブミン融合蛋白質をコードするＤＮＡを含む。

【１２９３】

コンストラクト３６１８についてのＢＮＰｃＤＮＡのクローニング

複製ＢＮＰ部分をコードするポリヌクレオチドを初めに、以下に述べるように４つのプライマーＢＮＰ－１、ＢＮＰ－２、ＢＮＰ－３およびＢＮＰ－４を用いてＢＮＰ（アミノ酸１－３２）のプロセッシングされた活性形態からＰＣＲ増幅して、２つの断片ＡおよびＢを作製する。増幅後、２つの精製された断片（ＡおよびＢ）を等モル量で混合し、そして、ＰＣＲ鋳型として用い、次いで、以下に述べるようにプライマーＢＮＰ－５およびＢＮＰ－６を用いて増幅した。次いで、ＢＮＰ（２×）インサートをＢａｍＨＩおよびＣｌａＩを用いて消化し、次いで、ＢａｍＨＩおよびＣｌａＩを用いて予め消化されたｐＣ４ＨＳＡベクターにライゲーションし、コンストラクト３６１８を産生する。コンストラクト番号；３６１８は、成熟ＨＳＡ蛋白質が後に続く、コンセンサスリーダー配列、セクレコン（配列番号：ｌｌｌ）およびＢＮＰのプロセッシングされた活性形態の２つのタンデムコピーを含むアルブミン融合蛋白質をコードする（コンストラクト３６１８については表２の配列番号：４８３を参照のこと）。

【１２９４】

ＢＮＰ蛋白質の２つの断片をコードするポリヌクレオチドのＰＣＲ増幅に適切な４つのオリゴヌクレオチドを初めに合成した：

BNP-1 5'AGCCCCAAGATGGTGCAAGGGTCTGGCTGCTTTGGGAGGAAGATGGACCGGATCAGCTCCTCCAGTG GCTGGGCT GCAAAGTGCTGAGGCGGCAT-3' (配列番号:486)

BNP-2 5'-CCTTGCACCATCTTGGGGCTATGCCGCCTCAGCACTTTGC-3' (配列番号:487)

BNP-3 5'-GCAAAGTGCTGAGGCGGCATAGCCCCAAGATGGTGCAAGG-3' (配列番号:488)

BNP-4 5'-AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCATGCCGCCTC AGCACTTTGC-3' (配列番号:489)

【１２９５】

プライマーセットＢＮＰ－Ｉ／ＢＮＰ－２およびＢＮＰ－３／ＢＮＰ－４を用いて、２つのＢＮＰ蛋白質断片（それぞれＡおよびＢ）をＰＣＲ増幅した。アニーリングおよび伸長温度および回数は、それぞれの特定のプライマー対および鋳型について実験により決定される必要がある。断片ＡおよびＢを精製し（例えば、ＷｉｚａｒｄＰＣＲＰｒｅｐｓＤＮＡ精製システム（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ）を用いて）、等モル量で混合し、次いで、ＰＣＲ増幅に適するさらなる２つのオリゴヌクレオチド、ＢＮＰ－５およびＢＮＰ－６を用いるＰＣＲ増幅のための鋳型として用いた：

BNP-5: 5'-GAGCGCGGATCCAAGCTTCCGCCATCATGTGGTGGCGCCTGTGGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GCT GTGGCCCATGGTGTGGGCCAGCCCCAAGCTGGTGCAAGG -3' (配列番号:463)

BNP-6: 5'-AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCATGCCGCCTCAGCACTTTGC-3' (配列番号:464)

【１２９６】

ＢＮＰ－５は、ＢａｍＨＩクローニング部位（下線）、コンセンサスリーダー配列をコードするポリヌクレオチド（配列番号：１１１）（イタリック体）およびＢＮＰの初めの７つのアミノ酸配列のコードするポリヌクレオチド（太字）を組み込む。ＢＮＰ－６では、下線の配列はＣｌａＩ部位、およびその後に続くポリヌクレオチドは、ＢＮＰの最後の６個のアミノ酸をコードするＤＮＡ（太字）および成熟ＨＳＡ蛋白質の初めの１０個のアミノ酸の逆相補を含む。これらの２つのプライマーを用いて、コンセンサスリーダー配列および活性のあるＢＮＰペプチドの２つのタンデムコピーをＰＣＲ増幅した。アニーリングおよび伸長温度および回数は、それぞれの特定のプライマー対および鋳型について実験

により決定される必要がある。

【１２９７】

ＰＣＲ産物は精製され（例えば、Ｗｉｚａｒｄ　ＰＣＲ　Ｐｒｅｐｓ　ＤＮＡ精製システム（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ）を用いて）、次いで、ＢａｍＨＩおよびＣｌａＩ断片を用いて消化した。ゲル電気泳動によりＢａｍＨＩおよびＣｌａＩ断片をさらに精製した後、その産物を、ＢａｍＨＩ／ＣｌａＩで消化したｐＣ４：ＨＡＳ中にクローニングし、コンストラクト番号；３６１８を生じた。発現コンストラクトの配列を確認した。

【１２９８】

コンストラクト番号；３６１８の発現および精製

２９３Ｆ細胞における発現

当該技術分野において知られている方法（実施例６を参照のこと）により、コンストラクト番号；３６１８、ｐＣ４：ＳＰＣＯＮ．ＢＮＰ１－３２（２×）／ＨＡＳを２９３Ｆ細胞にトランスフェクションした。

【１２９９】

２９３Ｆ細胞上清からの精製

コンストラクト番号；３６１８によりコードされたｐＣ４：ＳＰＣＯＮ．ＢＮＰ１－３２（２×）／ＨＳＡを、実施例８０、「２０３Ｆ細胞上清からの精製」と題するサブセクションにおいて既に述べたように精製した。

【１３００】

ＢＮＰ（２×）－ＨＡＳの活性はインビトロＮＰＲ－Ａｌｃ ＧＭＰアッセイを用いてアッセイできる

コンストラクト番号；３６１８によりコードされたＢＮＰ（２×）－ＨＳＡの活性は、実施例８０、「ＢＮＰ－ＨＡＳのアッセイはインビトロＮＰＲ－Ａ／ｃＧＭＰアッセイを用いてアッセイできる」および「ＮＰＲ－Ａ２０３Ｆ安定クローンのスクリーニング方法」と題するサブセクションにおいて既に述べたように、ＮＰＲ－Ａ／ｃＧＭＰアッセイを用いてインビトロでアッセイできる。

【１３０１】

結果

ＢＮＰ（２×）－ＨＳＡおよび組換えＢＮＰの用量応答関係を測定した（図８を参照のこと）。コンストラクト番号；３６１８によりコードされるＢＮＰ（２×）－ＨＡＳおよび組換えＢＮＰの最大活性は類似しており（それぞれ、１．６８０．０２１、対して、１．８００．０１６ｐｍ）、それぞれ９．８±１．１、および０．４６±１．１ｎＭのＥＣ５０値を有する。

【１３０２】

引用した各文献の全開示内容（特許、特許出願、特許公報、学術論文、抄録、実験マニュアル、刊行物または他の開示）ならびに本明細書中に記載したＧｅｎＢａｎｋ、ＧｅｎｓｅｑまたはＣＡＳＲｅｇｉｓｔｒｙのごときデータベースに特定の識別番号により入手可能な情報は、出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【１３０３】

さらに、以下の各米国出願：２００５年２月４日出願の米国出願番号６０／５４２，２７４；２００４年３月５日出願の米国出願番号６０／５４９，９０１；２００４年３月２９日出願の米国出願番号６０／５５６，９０６；および２００４年１２月１７日出願の米国出願番号６０／６３６，６０３の明細書および配列表も出典明示によりその全てが本明細書の一部となる。

【１３０４】

寄託した生物材料に関連する情報（ＰＣＴ規則１３ｂｉｓ）

Ａ．以下の指示は、明細書の表３に記載の寄託した生物材料に関連する。

Ｂ．寄託物の特定：受託機関名：アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション
受託機関住所：10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110－2209

United States of America

【表６５】

	寄託番号	寄託日		寄託番号	寄託日
1	PTA－3759	2001年10月4日	2	PTA－3764	2001年10月4日
3	PTA－3941	2001年12月19日	4	PTA－3763	2001年10月4日
5	PTA－3940	2001年12月19日	6	PTA－3942	2001年12月19日
7	PTA－3939	2001年12月19日	8	PTA－3943	2001年12月19日
9	PTA－4670	2002年9月16日	１０		

【１３０５】

カナダ

出願人は、出願を基礎としてカナダ特許が発行されたか、または出願が拒絶され、もしくは放棄されかつ回復の可能性がないか、もしくは取下げされるまでは、特許庁長官は、出願に引用されている寄託生物材料のサンプルを、長官に指名された個々の専門家にのみ提供する権限を有するよう、請求する。本出願人は、国際出願の公開のための手続的準備が完了する前に、上申書により国際事務局へ通知する必要がある。

【１３０６】

ノルウェー

出願人は、（ノルウェー特許庁によって）出願が公衆の閲覧のために公開されるか、または公開されずにノルウェー特許庁によって最終決定されるまでは、当該分野の専門家にのみサンプルを提供されるよう、請求する。この効果の請求は、ノルウェー特許法第２２条および第３３条（３）に基づき出願が公衆に利用可能となる時点より前に、出願人がノルウェー特許庁に提出するものとする。出願人によってそのような請求が申請された場合、第三者によるサンプル提供のいかなる要求も、専門家がそれを用いることを示さなくてはならない。その専門家は、ノルウェー特許庁が作成した公認専門家のリストに記載された任意の者、または個々の場合には出願人が認めた任意の者であればよい。

【１３０７】

オーストラリア

出願人は、特許付与の前、または出願の失効、拒絶もしくは取下げの前に、微生物のサンプルは、本発明に利害関係を有しない技術者の受け取り手に対してのみ提供されるよう、ここに強調する（オーストラリア特許法規則　規則３．２５（３））。

【１３０８】

フィンランド

出願人は、（国家特許登録庁によって）出願が公衆の閲覧のために公開されたか、または公開されずに国家特許登録庁によって最終決定されるまでは、サンプルは当該分野の専門家にのみ提供されるよう、ここに請求する。

【１３０９】

英国

出願人は、微生物サンプルは専門家にのみが入手可能なように提供されるよう、ここに請求する。この効果の請求は、出願の国際公開の手続的準備が完了する前に、出願人が国際事務局へ提出するものとする。

【１３１０】

デンマーク

出願人は、（デンマーク特許庁によって）出願が公衆の閲覧のために公開されるか、ま

たは公開されずにデンマーク特許庁によって最終決定される前に、サンプルは当該分野の専門家にのみ提供されるよう、ここに請求する。この効果の請求は、デンマーク特許法第２２条および第３３条（３）に基づき出願が公衆に利用可能となる時点より前に、出願人がデンマーク特許庁に提出するものとする。出願人によってそのような請求が申請された場合、第三者によるサンプル提供のいかなる要求も、専門家がそれを用いることを示さなくてはならない。専門家は、デンマーク特許庁が作成した公認専門家のリストに記載された者、または個々の場合には出願人が認めた任意の者であればよい。

【１３１１】

スウェーデン

出願人は、（スウェーデン特許庁によって）出願が公衆の閲覧のために公開されるか、または公開されずにスウェーデン特許庁によって最終決定される前に、サンプルは当該分野の専門家にのみ提供されるよう、ここに請求する。この効果の請求は、優先日から１６月以内に、出願人が国際事務局に提出するものとする（ＰＣＴ出願人ガイド第１貫の付録Ｚに掲載された様式ＰＣＴ／ＲＯ／１３４が好ましい）。出願人によってそのような請求が申請された場合、第三者によるサンプル提供のいかなる要求も、専門家がそれを用いることを示さなくてはならない。その専門家はスウェーデン特許庁が作製した公認専門家のリストに記載された者、または個々の場合には出願人が認めた任意の者であればよい。

【１３１２】

オランダ

出願人は、オランダ特許が登録される日まで、または出願が拒絶もしくは取下げもしくは失効される日までに、特許規則第３１Ｆ（１）で規定されるように、微生物サンプルは専門家のみが入手可能となるよう供給されるように、ここに請求する。この効果の請求は、出願がオランダ王国特許法第２２条Ｃまたは第２５条に基づいて利用可能となる日のいずれか早い日よりも前に、出願人がオランダ知的財産庁に提出するものとする。

【図１－Ａ】

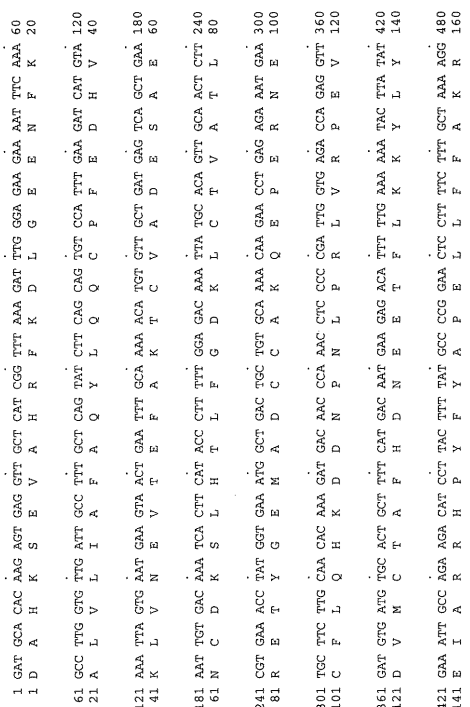


Figure 1A

【図１－Ｂ】

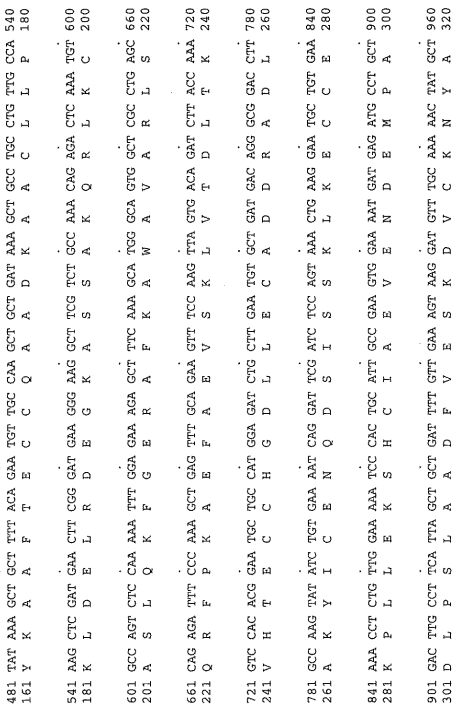


Figure 1B

【図１－Ｃ】

```
961 GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT 1020
321 E   A   K   D   V   F   L   G   M   F   L   Y   E   Y   A   R   R   H   P   D   340

1021 TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC 1080
341 Y   S   V   V   L   L   L   R   L   A   K   T   Y   E   T   T   L   E   K   C   360

1081 TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT 1140
361 C   A   A   A   D   P   H   E   C   Y   A   K   V   F   D   E   F   K   P   L   380

1141 GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG 1200
381 V   E   E   P   Q   N   L   I   K   Q   N   C   E   L   F   E   Q   L   G   E   400

1201 TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT 1260
401 Y   K   F   Q   N   A   L   L   V   R   Y   T   K   K   V   P   Q   V   S   T   420

1261 CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT 1320
421 P   T   L   V   E   V   S   R   N   L   G   K   V   G   S   K   C   C   K   H   440

1321 CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA 1380
441 P   E   A   K   R   M   P   C   A   E   D   Y   L   S   V   V   L   N   Q   L   460

1381 TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG TCC 1440
461 C   V   L   H   E   K   T   P   V   S   D   R   V   T   K   C   C   T   E   S   480
```

Figure 1C

3/14

【図１－Ｄ】

```
1441 TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA 1500
481 L   V   N   R   R   P   C   F   S   A   L   E   V   D   E   T   Y   V   P   K   500

1501 GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG 1560
501 E   F   N   A   E   T   F   T   F   H   A   D   I   C   T   L   S   E   K   E   520

1561 AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA 1620
521 R   Q   I   K   K   Q   T   A   L   V   E   L   V   K   H   K   P   K   A   T   540

1621 AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG 1680
541 K   E   Q   L   K   A   V   M   D   D   F   A   A   F   V   E   K   C   C   K   560

1681 GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA 1740
561 A   D   D   K   E   T   C   F   A   E   E   G   K   K   L   V   A   A   S   Q   580

1741 GCT GCC TTA GGC TTA TAA CAT CTA CAT TTA AAA GCA TCT CAG 1782
581 A   A   L   G   L   *                                   585
```

Figure 1D

4/14

【図２】

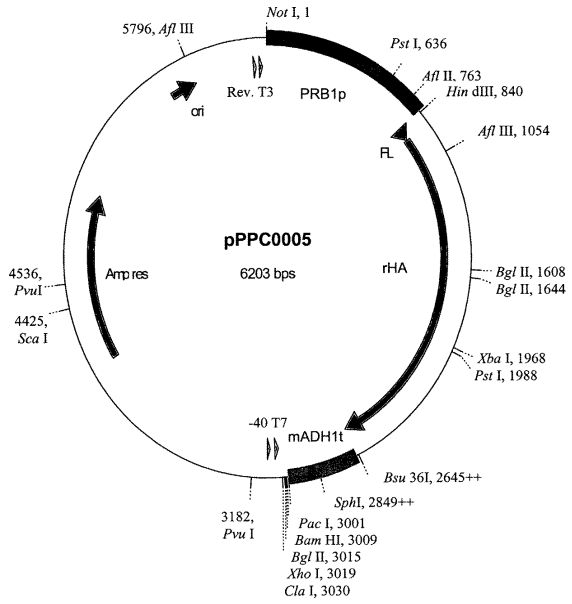


Figure 2

5/14

【図３】

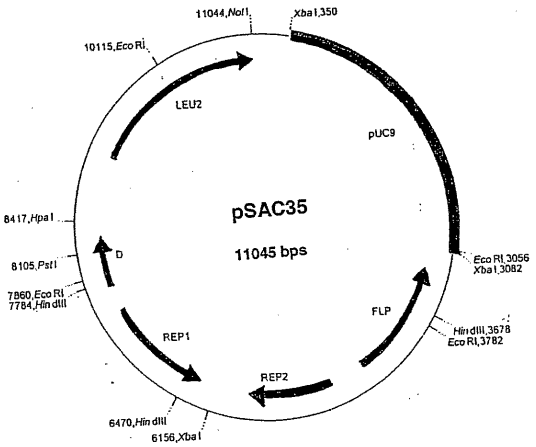


Figure 3

6/14

【図４】

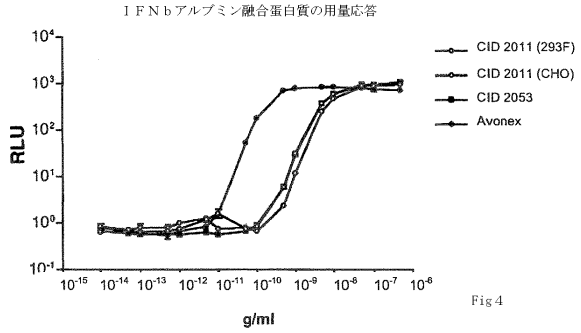


Fig4

【図５】

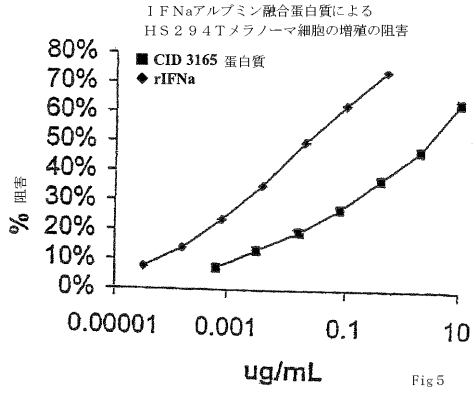


Fig5

【図６】

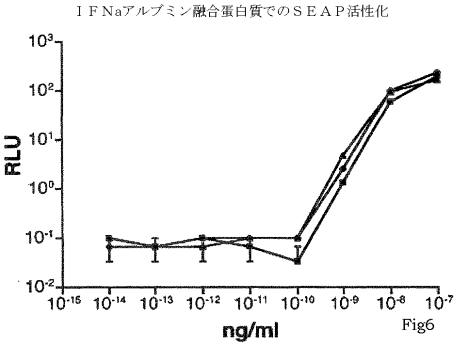


Fig6

【図７】

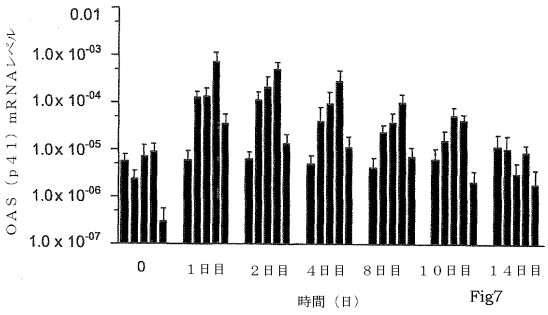


Fig7

【図８】

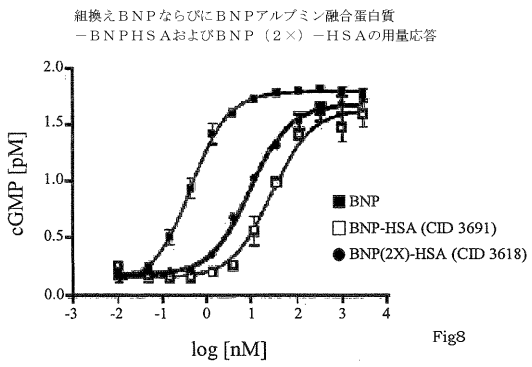


Fig8

【図９】

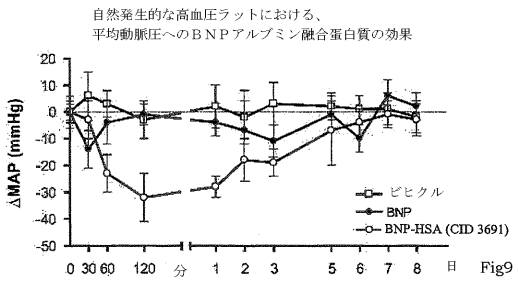


Fig9

【図１０】

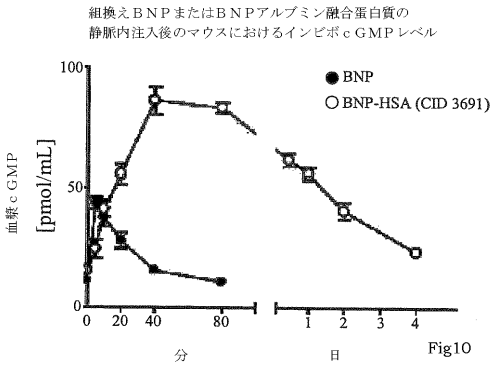
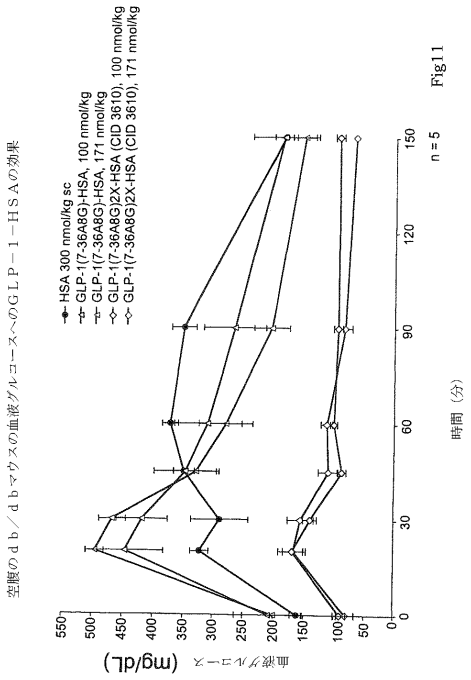


Fig10

【図１１】



【配列表】

0005568582000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
C12N	***1/19***	***(2006.01)***	C12N	1/21
C12N	***1/15***	***(2006.01)***	C12N	1/19
			C12N	1/15

(31)優先権主張番号 60/556,906
(32)優先日 平成16年3月29日(2004.3.29)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/636,603
(32)優先日 平成16年12月17日(2004.12.17)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 クレイグ・エイ・ローゼン
アメリカ合衆国２１１２２メリーランド州パサデナ、イーグル・ヒル・ロード３７０番
(72)発明者 ウィリアム・エイ・ヘイゼルタイン
アメリカ合衆国２０００７ワシントン・ディストリクト・オブ・コロンビア、ノース・ウエスト、ピー・ストリート３０５３番
(72)発明者 スティーブン・エム・ルーベン
アメリカ合衆国２０８３３メリーランド州ブルックビル、パイライト・レイン１９４２０番
(72)発明者 ポール・エイ・ムーア
アメリカ合衆国２０８５２メリーランド州ノース・ベセズダ、オールド・ゲイト・ロード７０１３番
(72)発明者 ジェイソン・ビー・ボック
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ノース・ポトマック、シクルーデッド・レイン１４２００番
(72)発明者 デイビッド・ラフルーア
アメリカ合衆国２００１５ワシントン・ディストリクト・オブ・コロンビア、ノース・ウエスト、ケサダ・ストリート３１４２番

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第０３／０６００７１（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １４／７６
Ｃ０７Ｋ １９／００
Ｃ１２Ｎ １／００
Ｃ１２Ｎ ５／００
Ｃ１２Ｎ １５／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）