

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-501959

(P2011-501959A)

(43) 公表日 平成23年1月20日 (2011.1.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 B 0 5 0
C 0 7 K 14/76 (2006.01)	C 0 7 K 14/76	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/58 (2006.01)	C 0 7 K 14/58	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 403 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-532056 (P2010-532056)	(71) 出願人	597018381
(86) (22) 出願日	平成20年10月30日 (2008.10.30)		ヒューマン ジノーム サイエンスーズ, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成22年6月29日 (2010.6.29)		Human Genome Sciences, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/012306		アメリカ合衆国 メリーランド 2085 O, ロックビル, シャディー グローブ ロード 14200
(87) 国際公開番号	W02009/058322	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成21年5月7日 (2009.5.7)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	11/932, 823	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成19年10月31日 (2007.10.31)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アルブミン融合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、アルブミン融合タンパク質を包含する。本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子もまた本発明により包含され、同様に、これらの核酸を含むベクター、これらの核酸ベクターで形質転換された宿主細胞、また本発明のアルブミン融合タンパク質を作製する方法、ならびにこれらの核酸、ベクター、および／または宿主細胞を使用する方法も、本発明により包含される。さらに、本発明は、アルブミン融合タンパク質を含む医薬組成物、および本発明のアルブミン融合タンパク質を用いて疾患、障害、または状態を処置、予防、もしくは改善する方法を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルブミンに融合された心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）を含むアルブミン融合タンパク質であって、前記融合タンパク質は、ANP活性を有し、

（a）前記ANPポリペプチドは、野生型ANP、ANPフラグメント、およびANP変異体から選択され、

（b）前記アルブミンは、野生型アルブミン、アルブミンフラグメント、およびアルブミン変異体から選択され、前記アルブミンは、前記ANPポリペプチドの血清血漿半減期を増大させる、アルブミン融合タンパク質。

【請求項 2】

前記ANPポリペプチドが、配列番号302および配列番号560から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 3】

前記アルブミンが、

- a) ヒトアルブミン、
- b) ウシアルブミン、
- c) ヒツジアルブミン、
- d) ブタアルブミン、
- e) ニワトリアルブミン、
- f) サケアルブミン、
- j) アルブミンフラグメント、
- k) アルブミン変異体、

l) 配列番号1、

m) 配列番号1のアミノ酸1～194からなるアルブミンのフラグメント、

n) 配列番号1のアミノ酸195～387からなるアルブミンのフラグメント、

o) 配列番号1のアミノ酸388～585からなるアルブミンのフラグメント、

p) 配列番号1のアミノ酸1～387からなるアルブミンのフラグメント、

q) 配列番号1のアミノ酸195～585からなるアルブミンのフラグメント、

r) 配列番号1のアミノ酸1～105からなるアルブミンのフラグメント、

s) 配列番号1のアミノ酸120～194からなるアルブミンのフラグメント、

t) 配列番号1のアミノ酸195～291からなるアルブミンのフラグメント、

u) 配列番号1のアミノ酸316～387からなるアルブミンのフラグメント、

v) 配列番号1のアミノ酸388～491からなるアルブミンのフラグメント、

w) 配列番号1のアミノ酸512～585からなるアルブミンのフラグメント、

x) 10、15、20、25、30、50、100、または150アミノ酸長である、アルブミンのフラグメント、

y) 1つ以上のアルブミンのドメインからなるアルブミンのフラグメント、ならびに

z)

i) L407A、

ii) L408V、

iii) V409A、

iv) R410A、

v) K413Q、および

vi) K414Qから選択される配列番号1の変異体、から選択される、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 4】

前記アルブミン融合タンパク質が、リーダー配列をさらに含む、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 5】

前記リーダー配列が、

10

20

30

40

50

- a) H S A、
- b) k e x 2、ならびに
- c) H S Aおよびk e x 2の融合物から選択される、請求項4に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項6】

1つ以上の追加の治療用ポリペプチドをさらに含む、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項7】

配列番号227および配列番号524から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

10

【請求項8】

配列番号227および配列番号524から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項9】

請求項7に記載のアルブミン融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

【請求項10】

配列番号152および配列番号488から選択されるANPヌクレオチド配列を含む、請求項9に記載のヌクレオチド配列。

【請求項11】

請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質を発現する構築物。

20

【請求項12】

構築物ID3484および構築物ID4174から選択される請求項11に記載の構築物。

【請求項13】

請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質を発現する宿主細胞。

【請求項14】

哺乳類細胞、酵母細胞、または原核細胞である、請求項13に記載の宿主細胞。

【請求項15】

前記アルブミン融合タンパク質の発現に適している条件下で、請求項13に記載の宿主細胞を培養するステップ、および前記アルブミン融合タンパク質を回収するステップを含む、アルブミン融合タンパク質を発現するための方法。

30

【請求項16】

グリコシル化、非グリコシル化、またはグリコシル化異性体である、請求項13に記載の宿主細胞により発現されるアルブミン融合タンパク質。

【請求項17】

請求項1に記載のアルブミン融合タンパク質および医薬的に許容される担体を含む組成物。

【請求項18】

請求項17に記載の組成物およびその使用のための取扱説明書を含むキット。

【請求項19】

疾患、障害、または状態の処置、予防、診断、または改善を必要とする対象における、疾患、障害、または状態を処置、予防、診断、または改善する方法であって、アルブミンに融合されるANPポリペプチドを含む有効量のアルブミン融合タンパク質を投与するステップを含み、前記融合タンパク質は、ANP活性を有し、

40

(a) 前記ANPポリペプチドは、野生型ANP、ANPフラグメント、およびANP変異体から選択され、

(b) 前記アルブミンは、野生型アルブミン、アルブミンフラグメント、およびアルブミン変異体から選択され、前記アルブミンは、前記ANPポリペプチドの血清血漿半減期を増大させる、方法。

【請求項20】

50

前記疾患、障害、または状態が、高血圧、食塩感受性高血圧、うっ血性心不全、狭心症、末梢動脈障害、糖尿病性腎症、脳卒中、腎不全、急性および／または慢性腎不全、急性尿細管壊死、急性腎不全、腎臓病、腎糸球体疾患、組織の過剰な流体、低血圧、心容積の過負荷、心代償不全、左心室機能障害、呼吸困難、アルドステロン濃度の上昇の治療、血管収縮、心拍出量低下および／または高血圧、心血管疾患、心不全、心筋再かん流傷害、左室リモデリングならびに心筋梗塞後から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

アルブミンに融合されたブチリルコリンエステラーゼポリペプチド (B C h E) を含むアルブミン融合タンパク質であって、前記融合タンパク質は、B C h E 活性を有し、

(a) 前記 B C h E ポリペプチドは、野生型 B c h E、B C h E フラグメント、および B C h E 変異体から選択され、

(b) 前記アルブミンは、野生型アルブミン、アルブミンフラグメント、およびアルブミン変異体から選択され、前記アルブミンは、前記 B c h E ポリペプチドの血清血漿半減期を増大させる、アルブミン融合タンパク質。

【請求項 22】

前記 B C h E ポリペプチドが、配列番号 708 および配列番号 709 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 21 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 23】

前記アルブミンが、

- a) ヒトアルブミン、
- b) ウシアルブミン、
- c) ヒツジアルブミン、
- d) ブタアルブミン、
- e) ニワトリアルブミン、
- f) サケアルブミン、
- j) アルブミンフラグメント、
- k) アルブミン変異体、

l) 配列番号 1、

m) 配列番号 1 のアミノ酸 1～194 からなるアルブミンのフラグメント、

n) 配列番号 1 のアミノ酸 195～387 からなるアルブミンのフラグメント、

o) 配列番号 1 のアミノ酸 388～585 からなるアルブミンのフラグメント、

p) 配列番号 1 のアミノ酸 1～387 からなるアルブミンのフラグメント、

q) 配列番号 1 のアミノ酸 195～585 からなるアルブミンのフラグメント、

r) 配列番号 1 のアミノ酸 1～105 からなるアルブミンのフラグメント、

s) 配列番号 1 のアミノ酸 120～194 からなるアルブミンのフラグメント、

t) 配列番号 1 のアミノ酸 195～291 からなるアルブミンのフラグメント、

u) 配列番号 1 のアミノ酸 316～387 からなるアルブミンのフラグメント、

v) 配列番号 1 のアミノ酸 388～491 からなるアルブミンのフラグメント、

w) 配列番号 1 のアミノ酸 512～585 からなるアルブミンのフラグメント、

x) 10、15、20、25、30、50、100、または 150 アミノ酸長である、アルブミンのフラグメント、

y) 1 つ以上のドメインのアルブミンからなるアルブミンのフラグメント、ならびに

z)

i) L 407 A、

i i) L 408 V、

i i i) V 409 A、

i v) R 410 A、

v) K 413 Q、および

v i) K 414 Q から選択される配列番号 1 の変異体、から選択される、請求項 21 に記載のアルブミン融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

前記アルブミン融合タンパク質が、リーダー配列をさらに含む、請求項 2 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 2 5】

前記リーダー配列が、

- a) H S A、
- b) k e x 2、
- c) コンセンサスシグナル配列、ならびに
- d) H S A、k e x 2、およびコンセンサスシグナル配列から選択されるリーダー配列のうちの少なくとも 1 つの融合物から選択される、請求項 2 4 に記載のアルブミン融合タンパク質。

10

【請求項 2 6】

1 つ以上の追加の治療用ポリペプチドをさらに含む、請求項 2 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 2 7】

配列番号 6 6 9 および配列番号 6 7 0 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

【請求項 2 8】

配列番号 6 6 9 および配列番号 6 7 0 から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 2 1 に記載のアルブミン融合タンパク質。

20

【請求項 2 9】

請求項 2 7 に記載のアルブミン融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列。

【請求項 3 0】

配列番号 6 3 0 および配列番号 6 3 1 から選択される B C h E ヌクレオチド配列を含む、請求項 2 9 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 3 1】

請求項 2 1 に記載のアルブミン融合タンパク質を発現する構築物。

【請求項 3 2】

構築物 I D 4 2 5 8 および構築物 I D 4 2 5 9 から選択される請求項 1 1 に記載の構築物。

30

【請求項 3 3】

請求項 2 1 に記載のアルブミン融合タンパク質を発現する宿主細胞。

【請求項 3 4】

哺乳類細胞、酵母細胞、または原核細胞である、請求項 3 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 5】

前記アルブミン融合タンパク質の発現に適している条件下で、請求項 3 3 に記載の宿主細胞を培養するステップ、および前記アルブミン融合タンパク質を回収するステップを含む、アルブミン融合タンパク質を発現するための方法。

【請求項 3 6】

グリコシル化、非グリコシル化、またはグリコシル化異性体である、請求項 3 3 に記載の宿主細胞により発現されるアルブミン融合タンパク質。

40

【請求項 3 7】

請求項 2 1 に記載のアルブミン融合タンパク質および医薬的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載の組成物およびその使用のための取扱説明書を含むキット。

【請求項 3 9】

疾患、障害、または状態の処置、予防、診断、または改善を必要とする対象における、疾患、障害、または状態を処置、予防、診断、または改善する方法であって、アルブミンに融合される B C h E ポリペプチドを含む有効量のアルブミン融合タンパク質を投与する

50

ステップを含み、前記融合タンパク質は、B C h E活性を有し、

(a) 前記B C h Eポリペプチドは、野生型B c h E、B C h Eフラグメント、およびB C h E変異体から選択され、

(b) 前記アルブミンは、野生型アルブミン、アルブミンフラグメント、およびアルブミン変異体から選択され、前記アルブミンは、前記B c h Eポリペプチドの血清血漿半減期を増大させる、方法。

【請求項40】

前記疾患、障害、または状態が、コカインの過剰摂取の解毒、スキサメトニウム過敏症、および無呼吸から選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記疾患、障害、または状態が、コカインの過剰摂取である、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記B C h Eポリペプチドが、A 2 2 7 S、S 3 1 5 G、A 3 5 6 W、およびY 3 6 0 Gのアミノ酸置換を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項43】

前記B C h EポリペプチドB C h Eポリペプチドが、A 2 2 7 S、S 3 1 5 G、A 3 5 6 W、およびY 3 6 0 Gのアミノ酸置換を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項44】

疾患、障害、または状態の処置、予防、診断、または改善を必要とする対象における、疾患、障害、または状態を処置、予防、診断、または改善する方法であって、有効量のアルブミン融合タンパク質を投与するステップを含み、前記疾患、障害、または状態は、アルツハイマー病を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国出願第11/495,624号の一部継続出願であり、35 U. S. C. § 119 (e)の下で、2005年8月12日出願の米国仮出願第60/707,521号、2005年8月31日出願の同第60/712,386号、2005年11月3日出願の同第60/732,724号、2006年2月28日出願の同第60/776,914号、2006年3月13日出願の同第60/781,361号、2006年6月2日出願の同第60/810,182、および2006年6月15日出願の同第60/813,682号の利益を主張する。米国出願第11/495,624号はまた、2005年2月9日出願の国際出願第PCT/US2005/004041号の一部継続出願であり、119 (e)の下で、2004年2月9日出願の米国仮出願第60/542,274号、2004年3月5日出願の同第60/549,901号、および2004年3月29日出願の同第60/556,906号、および2004年12月17日出願の同第60/636,603号の利益を主張する。米国出願第11/495,624号はまた、2005年7月7日出願の米国出願第11/175,690号の一部継続出願であり、2004年1月20日出願の国際出願第PCT/2004/001369号の継続出願であり、35 U. S. C. § 119 (e)の下で、2003年1月22日出願の米国仮出願第60/441,305号、2003年3月11日出願の同第60/453,201号、2003年5月2日出願の同第60/467,222号、2003年5月23日出願の同第60/472,816号、2003年6月6日出願の同第60/476,267号、2003年9月24日出願の同第60/505,172号、および2003年9月30日出願の同第60/506,746号の利益を主張する。米国出願第11/495,624号はまた、2006年5月8日出願の米国出願第11/429,276号の一部継続出願であり、それは2004年2月11日出願の米国出願第10/775,204号の継続出願であり、その出願は2002年12月23日出願の国際出願第PCT/US2002/40891号

10

20

30

40

50

の継続出願であり、35 U. S. C. § 119 (e) の下で、2001年12月21日出願の米国仮出願第60/341, 811号、2002年1月24日出願の同第60/350, 358号、2002年1月28日出願の同第60/351, 360号、2002年2月26日出願の同第60/359, 370号、2002年2月28日出願の同第60/360, 000号、2002年3月27日出願の同第60/367, 500号、2002年4月8日出願の同第60/370, 227号、2002年5月10日出願の同第60/378, 950号、2002年5月24日出願の同第60/382, 617号、2002年5月28日出願の同第60/383, 123号、2002年6月5日出願の同第60/385, 708号、2002年7月10日出願の同第60/394, 625号、2002年7月24日出願の同第60/398, 008号、2002年8月9日出願の同第60/402, 131号、2002年8月13日出願の同第60/402, 708号、2002年9月18日出願の同第60/411, 426号、2002年9月18日出願の同第60/411, 355号、2002年10月2日出願の同第60/414, 984号、2002年10月11日出願の同第60/417, 611号、2002年10月23日出願の同第60/420, 246号、および2002年11月5日出願の同第60/423, 623号の利益を主張する。上記の全ての出願はその全体が本明細書に参照することにより組み込まれる。

10

【0002】

コンパクトディスクにおける配列表の参照

本願は、「コピー1」「コピー2」および「CRF」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)中の電子文書として米国出願第11/495, 624号とともに提供される、「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「PF617 Sequence Listing. txt」(1, 193, 482バイト、2006年7月28日作成)を含み、その全体が参照することにより組み込まれる。

20

【背景技術】

【0003】

本発明は、概して、アルブミンまたはアルブミンのフラグメントもしくは変異体に融合された治療用タンパク質(少なくとも1つのポリペプチド、抗体、ペプチド、またはそのフラグメントおよび変異体が挙げられるが、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タンパク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タンパク質、組成物、医薬組成物、製剤、およびキットを含む。治療用アルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞もまた、本発明により包含され、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タンパク質を作製する方法も本発明に包含される。

30

【0004】

その成熟形態において、(図1(配列番号1)に示されるような)585個のアミノ酸のタンパク質であるヒト血清アルブミン(HSAまたはHA)は、血清の浸透圧の相当な割合に関与しており、内因性および外因性リガンドの担体としても機能する。現在、臨床用のHAは、ヒト血液からの抽出物により生成される。微生物における組換えHA(rHA)の生成は、欧州特許出願第330451号および欧州特許出願第361991号に開示されている。

40

【0005】

天然状態における、または組換え産生される場合の治療用タンパク質(例えば、インターフェロンおよび成長ホルモン)は、典型的には、特に水溶液中で製剤化される場合、短い貯蔵寿命を示す不安定な分子である。投与用に製剤化する場合のこれらの分子の不安定性は、該分子の多くが貯蔵中、常に凍結乾燥および冷蔵されなければならない、それにより、該分子を輸送および/または貯蔵するのを困難にする。貯蔵の問題は、医薬製剤が、病院の環境の外で貯蔵および調剤されなければならない場合に、特に深刻である。

【0006】

50

不安定なタンパク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。したがって、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による、タンパク質治療用分子の安定化された持続性のある製剤が必要とされている。

【0007】

生体内に投与する場合、天然状態における、または組換えにより産生された治療用タンパク質（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。したがって、これらのタンパク質により提供される治療効果も短命である。したがって、生体内においてこれらの所望の治療効果を維持するためには、血液からのこれらのタンパク質の迅速なクリアランスにより、治療用分子をより頻繁に、またはより高用量で投与する必要がある。しかしながら、治療用タンパク質を投与するための投薬スケジュールの増加は、多くの場合、注入部位反応、副作用、および毒性の増加を患者にもたらす。同様に、高用量での治療用タンパク質の投与も、一般的に、毒性および副作用の増加を患者にもたらす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

化学的共役を含む、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いくつかの実際的な解決策は、患者に限定的な利点を提供している。概して、ほとんどの場合、これらの化学修飾された治療用分子は、頻繁な投薬スケジュールでなお投与され、著しい注入部位反応、副作用、および毒性を患者に与え続ける。したがって、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生体内での血漿安定性を保持し、かつ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。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、アルブミンまたはアルブミンのフラグメント（部分）もしくは変異体に融合された治療用タンパク質（例えば、ポリペプチド、抗体、またはペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体）を含むアルブミン融合タンパク質を含有する。本発明はまた、アルブミンまたはアルブミンのフラグメント（部分）もしくは変異体に融合された治療用タンパク質（例えば、ポリペプチド、抗体、またはペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体）をコードする核酸分子を含む、または代替としてそれからなるポリヌクレオチドも包含する。本発明はまた、治療用タンパク質の貯蔵寿命を延長し、その非融合状態と比較して、治療用タンパク質の血漿安定性を増大させ、ならびに／または体外および／もしくは生体内で溶液中（または医薬組成物中）の治療用タンパク質および／もしくは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フラグメント（部分）もしくは変異体に融合された治療用タンパク質（例えば、ポリペプチド、抗体、またはペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体）を含むタンパク質をコードする核酸分子を含む、または代替として、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タンパク質もまた、本発明により包含され、同様に、本発明のポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞、本発明のアルブミン融合タンパク質の作製方法、ならびに本発明のこれらのポリヌクレオチドおよび／もしくは宿主細胞の使用方法も、本発明により包含される。

【0010】

本発明の好ましい態様において、アルブミン融合タンパク質は、表2に記載のもの、およびかかるタンパク質をコードするポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0011】

本発明はまた、本発明のアルブミン融合タンパク質および医薬的に許容される希釈剤または担体を含む医薬製剤も包含する。かかる製剤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、長期化した貯蔵寿命の治療用タンパク質に付属する使用説明書と一緒にパッケージされていてもよい。かかる製剤は、患者、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトにおける、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に使用され得、患者へ該医薬製剤を投与する工程を含む。

【0012】

他の実施形態において、本発明は、疾患または障害の予防、処置、または改善する方法を包含する。好ましい実施形態において、本発明は、表1の「好適な適応症Y」の列に挙げた疾患または障害の処置方法を包含し、該方法は、かかる処置、予防、または改善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」の列に挙げた処置すべき疾患または障害と同じ行にある）表1の「治療用タンパク質X」の列に開示された治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）に対応する治療用タンパク質または部分を含む本発明のアルブミン融合タンパク質を投与することを含む。

10

【0013】

一実施形態において、表1または2に記載のアルブミン融合タンパク質は長期化した貯蔵寿命を有する。

【0014】

第2の実施形態において、表1または2に記載のアルブミン融合タンパク質は、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。

【0015】

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が挙げられるが、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タンパク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。

20

【図面の簡単な説明】

【0016】

【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（配列番号1）の成熟形態をコードする。

【図2】図2は、pPPC0005クローニングベクターATCC寄託番号PTA-3278の制限酵素切断地図を示す。

30

【図3】図3は、pSAC35パン酵母（*yeast S. cerevisiae*）発現ベクター（Sleep et al., *BioTechnology* 8:42 (1990)）の制限酵素切断地図を示す。

【図4】図4は、Hs294Tメラノーマ細胞におけるCID3165（CID3165タンパク質）によりコードされるIFNアルブミン融合タンパク質と組換えIFNa（rIFNa）の抗増殖活性を比較する。様々な濃度のCID3165タンパク質またはrIFNaのいずれかと共に細胞を培養し、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タンパク質は、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タンパク質、（◆）=rIFNa。

40

【図5】図5は、ISRE-SEAP/293Fレポーター細胞における、様々な希釈度のIFNaアルブミン融合タンパク質のSEAP活性に対する効果を示す。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の下流に融合されたIFNaの2つの異なる調製物（●）および（■）を試験した。

【図6】図6は、処置したサル（実施例76を参照のこと）における、OAS（p41）のmRNAレベルへの、構築物2249（CID2249タンパク質）に含まれるDNAによりコードされるIFNaアルブミン融合タンパク質の時間および用量効果を示す。各時点につき：1番目の棒＝媒体対照、2番目の棒＝30ug/kg CID2249タンパク質、1日目、静脈内、3番目の棒＝30ug/kg CID2249タンパク質、1日目、皮下、4番目の棒＝300ug/kg CID2249タンパク質、1日目、皮下

50

、5番目の棒 = 40 ug/kg 組換えIFNa、1、3および5日目、皮下。

【図7】図7は、構築物CID3691および3618（CID3691および3618タンパク質）に含まれるDNAによりコードされるBNPアルブミン融合タンパク質の、NPR-A/293Fレポーター細胞におけるcGMP形成の活性化に対する用量反応関係を示す（実施例78および79を参照のこと）。BNPペプチド（■）ならびにアルブミンの上流に融合されたBNPの2つの異なる調製物（□）および（●）を共に試験した。

【図8】図8は、自然発生的な高血圧ラットにおける平均動脈圧に対するBNPアルブミン融合タンパク質の効果を示す（実施例78を参照のこと）。媒体（□）、BNPペプチド（●）、またはBNPアルブミン融合タンパク質（○）を尾部への静脈内注射により送達した。cuff-tail法により、収縮期血圧および拡張期血圧を記録した。

【図9】図9は、組換えBNPペプチド（●）またはBNPアルブミン融合タンパク質（○）の静脈内注射後の、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（実施例78を参照のこと）。cGMPレベルを、静脈内注射後のいくつかの時点に集めた尾部の血液から調製した血漿から測定した。

【図10】図10は、構築物CID3796および3959に含まれるDNAによりコードされるBNPペプチドおよびBNPアルブミン融合タンパク質の、NPR-A/293Fレポーター細胞におけるcGMP形成の活性化に対する用量反応関係を示す（実施例80を参照のこと）。BNPペプチド（■）ならびにアルブミンの下流に融合されたBNPを含む2つの異なる調製物（□）および（◇）を共に試験した。

【図11】図11Aは、ネプリライシンでの処置を行う、または行わない、BNPおよびANPペプチドの、NPR-A/293Fレポーター細胞におけるcGMP形成の活性化に対する、24時間での用量反応関係を示す（実施例81を参照のこと）。図11Bは、ネプリライシンまたは対照MES緩衝液での処置後の、ANPペプチドの、NPR-A/293Fレポーター細胞におけるcGMP形成の活性化に対する、20分間、1時間、または24時間での用量反応関係を示す（実施例81を参照のこと）。図11Cは、ネプリライシンまたは対照MES緩衝液での処置後の、アルブミンの上流に融合されたANPを含み、構築物CID3484に含まれるDNAによりコードされる、ANPアルブミン融合タンパク質の、NPR-A/293Fレポーター細胞におけるcGMP形成の活性化に対する、20分間、1時間、または24時間での用量反応関係を示す（実施例81を参照のこと）。図11Dは、ネプリライシンでの処理後の、特定の時間での無傷ナトリウム利尿ペプチドの割合（%）を示す。ANPおよびBNPペプチド、ならびに三部構造を有するグリシン（CID3809）によりアルブミンの上流に融合されたBNPおよびアルブミン（CED3484）の上流に融合されたANPを含む、2つのアルブミン融合タンパク質を共に試験した（実施例81を参照のこと）。

【図12】図12は、慢性C型肝炎遺伝子型1に感染し、0～24週間、リバビリンと組み合わせて、HSA-IFNa2bでの処置後、リバビリン（PEG-RBV）と組み合わせて、ペグインターフェロンアルファの少なくとも1つの処置計画に以前応答しなかった患者（非応答者）における、HCV RNA中央値の変化（log₁₀ IU/ml）により測定される、HCV RNA滴定濃度の減少を示す。

【図13】図13AおよびBは、正常で健全なブタ（n = 4～6/群）における、5mg/kgの静脈内ボラスの投与後、それぞれの血漿および尿cGMPレベルに対するHSA-BNP（構築物ID番号3959）の効果を示す。アスタリスクは、媒体からのcGMPレベルの有意な差異（p < 0.05）を示す。

【図14】図14Aは、ブタ実験的心不全モデル（n = 10/群）における、拡張末期径の変化に対する2mg/kgまたは6mg/kgのHSA-BNP（構築物ID番号3959）の静脈内ボラスの投与の効果を示す。心室ペーシングにより、ブタにおいて心不全を誘導した。心エコー検査法により、拡張末期径を測定した。媒体すなわち基準値からの有意な変化（p < 0.05）が示される（それぞれ&および#）。図14Bは、ブタ実験的心不全モデル（n = 10/群）における、短縮率に対する2mg/kgまたは6m

10

20

30

40

50

g/kgのHSA-BNP（構築物ID番号3959）の静脈内ボラスの投与の効果を示す。心室ペーシングにより、ブタにおいて心不全を誘導した。媒体すなわち基準値からの有意な変化（ $p < 0.05$ ）が示される（それぞれ&および#）。

【図15】図15A～Hは、正常なイヌモデルにおいて、0.5mg/kgまたは5mg/kgでの単一静脈内ボラスにより投与されたHSA-BNP（構築物ID番号3959）の血行動態の効果を示す。心拍出量（CO）、平均動脈圧（MAP）、肺毛細血管楔入圧（PCWP）、および肺動脈圧（PAP）を、麻酔状態の正常な雑種イヌ（ $n = 8$ /群）において、0.5mg/kgまたは5mg/kgのHSA-BNP（構築物ID番号3959）の静脈内ボラス前の基準値、ならびに注入してから30、60、90、150、210、および270分後、測定した。アスタリスクは、基準値からの統計的に有意な差異（ $p < 0.05$ ）を示す。

10

【図16】図16A～Hは、正常なイヌモデルにおいて、0.5mg/kgまたは5mg/kgでの単一静脈内ボラスにより投与されたHSA-BNP（構築物ID番号3959）の腎臓に関する効果を示す。尿流量（速度/30分間の採集）、ナトリウム利尿、腎血流量、および糸球体濾過量（GFR）を、麻酔状態の正常な雑種イヌ（ $n = 8$ /群）において、0.5mg/kgまたは5mg/kgのHSA-BNP（構築物ID番号3959）の静脈内ボラス前の基準値、ならびに注入してから30、60、90、150、210、および270分後、測定した。アスタリスクは、基準値からの統計的に有意な差異（ $p < 0.05$ ）を示す。

【図17】図17A～Fは、正常なイヌモデルにおいて、0.5mg/kgまたは5mg/kgでの単一静脈内ボラスにより投与されたHSA-BNP（構築物ID番号3959）のホルモン効果を示す。血漿アルドステロン、レニン、およびアンジオテンシンIIレベルを、麻酔状態の正常な雑種イヌ（ $n = 8$ /群）において、0.5mg/kgまたは5mg/kgのHSA-BNP（構築物ID番号3959）の静脈内ボラス前の基準値、ならびに注入してから30、60、90、150、210、および270分後、測定した。アスタリスクは、基準値からの統計的に有意な差異（ $p < 0.05$ ）を示す。

20

【図18】図18A～Cは、全身動脈血圧、心拍数、およびECGデータ収集能力を有する、Data Sciences International社製の無線遠隔送信機を外科的に埋め込まれた正常な、健全な、覚醒中のビーグルにおける収縮期および平均動脈圧における、5mg/kgのHSA-BNP（構築物ID番号3959）の単一静脈内ボラスの効果を示す。注入してから48時間の連続データを記録し、最大血圧の基準値からの変化（図18A）、平均最大血圧の差異（図18B）、および平均動脈圧における基準値からの変化（図18C）を示す。アスタリスクは、媒体と比較して、5mg/kgのHSA-BNP（構築物ID番号3959）に対する基準調整された平均値の統計的に有意な差異を示す（ $p < 0.05$ ）。

30

【図19】図19AおよびBは、全身動脈血圧、心拍数、およびECGデータ収集能力を有する、Data Sciences International社製の無線遠隔送信機を外科的に埋め込まれた正常な、健全な、覚醒中のビーグルの全身血圧における、0.02mg/kgの非融合BNPペプチドの静脈内ボラスと、10mg/kgのHSA-BNP（構築物ID番号3959）の皮下注射の効果の比較を示す。BNP（図19A）およびHSA-BNP（構築物ID番号3959）を投与してから48時間の連続データを記録し、最大血圧の基準値からの変化を示す。アスタリスクは、媒体と比較して、5mg/kgのHSA-BNP（構築物ID番号3959）に対する基準調整された平均値の統計的に有意な差異を示す（ $p < 0.05$ ）。

40

【図20】図20は、BChE-アルブミン融合の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。融合は、実施例90で論じられる。

【図21】図21は、野生型BChE（WT）およびこの酵素から誘導されるコカイン加水分解酵素の触媒能力を示す。値は、kcat（酵素1分子毎の1分間あたりの天然、（-）-コカイン加水分解された酵素の分子）として表される。BChE変異体におけるアミノ酸置換は、A328W/Y332A（CocE, Sun et al., 2002）

50

、F 2 2 7 A / S 2 8 7 G / A 3 2 8 W / Y 3 3 2 A (A M E 3 5 9, P a n c o o k e t a l 2 0 0 3)、A 3 2 8 W / Y 3 3 2 G / S 2 8 7 G / A 1 9 9 S (C o c H, P a n e t a l, 2 0 0 4)である。

【図 2 2】図 2 2 は、A l b u - C o c H の精製および滴定を示す。A) 最終産物のクマシーブルー染色された S D S 電気泳動ゲル (M = マーカー、R = 還元状態下での試料、N R = 非還元状態下での試料) B) サイズ排除クロマトグラフィー (S E C - H P L C) および N 末端シーケンシングによる精製の評価 C) 活性部位の滴定 残留 B c h E 活性は、半化学量論的な量の不可逆的有機リン酸エステル系コリンエステラーゼ阻害薬であるジイソプロピルフルオロリン酸塩 (D F P) を増加させながら、一晚培養後、線形的に減少した。この典型的なバッチ (3 つのうちの 1 つ) の X 軸の切片は、約 7 . 7 p m o l の活性部位セリン残基 (推定上の D F P 標的) を示す。酵素タンパク質の量は、0 . 7 2 μ g であり、8 . 5 p m o l に等しい。したがって、9 0 % を超える精製物質は、酵素的に活性であった。

10

【図 2 3】図 2 3 は、生体内の A l b u - C o c H の安定性を示す。ゼロ時間での、A l b u - C o c H の 3 m g / k g の静脈内投与を注入された 5 匹のラットのうちの 1 匹における血漿コカイン加水分解酵素の代表的な経時変化。二重指数減衰式に適合した、これらのデータは、7 . 9 時間の末端消失半減期を示した。初期でのより高い傾きは、予備的な再分布相は、酵素の組織要素への結合、代謝破壊、または細胞外液への制限された経毛細管経路を示し得る

【図 2 4】図 2 4 は、コカイン誘起される高血圧の鈍化を示す。ラットは、動脈カニューレのために、ウレタン (1 . 4 5 g / k g) で麻酔された。次いで、A l b u - C o c H (黒丸、3 m g / k g の静脈投与)、または生理食塩水 (白丸) を投与し、次いで、アトロピン (1 m g / k g) を投与し、迷走神経反射を減少させ、基準圧力を 1 0 分間記録した。ゼロ時間での、ラットをコカイン (3 . 5 m g / k g) でチャレンジし、ノルエピネフィリン (N E、6 μ g / k g) で 1 0 分後に、チャレンジした。平均血圧の変化を示す (平均 ± 標準誤差、1 群あたり 5 匹のラット)。

20

【図 2 5】図 2 5 は、コカインの過剰摂取からの保護および救出。A : 生理食塩水 (n = 1 0)、A l b u - C o c H (1 用量あたり n = 6)、または野生型 B C h E (W T、n = 3) を静脈投与してから 1 0 分後、コカイン (1 0 0 m g / k g、腹腔内) を与えられた際の覚醒および発作の発生の割合 (%)。B : コカインを投与されてから 1 0 分後の、用量反応曲線における A l b u - C o c H (1 0 m g / k g) の効果 (1 群あたり n = 6)。

30

【図 2 6】図 2 6 は、加速したコカインのクリアランスを示す。1 0 分前に A l b u - C o c H (3 m g / k g の静脈投与 - 黒記号、n = 4) または生理食塩水 (白記号、n = 4) を接種したラットに、コカイン (3 0 μ C i、3 . 5 m g / k g の静脈投与) を注入した後の血漿コカインレベルを、時間の関数として示す。血液試料は、コカイン投与の 3 0 秒後から開始して、大腿動脈から採取し、放射分析でアッセイした。ここに示されるように、対照ラットにおける血漿コカインレベルは徐々に減少したが、A l b u - C o c H で処置されたラットにおいては、最も早い採取時点 (薬物注射の 3 0 秒後) でほとんど検出限界まで低下した。

40

【図 2 7】図 2 7 は、コカインの組織内蓄積の減少を示す。ラット (1 群あたり n = 4) は、A l b u - C o c H (3 m g / k g の静脈投与) また生理食塩水で処置されてから 1 0 分後、3 H - コカイン (3 0 μ C i、3 . 5 m g / k g の静脈投与) が投与された。コカインを注射してから 1 0 分後、脳、心臓、および血漿を、コカイン、およびその代謝物である安息香酸の分析のために採取した。A l b u - C o c H による処置は、組織負荷を大いに低下させた。未変化のコカインは、酵素で処置されたラットからの心臓および血漿において、ほとんど検出されず、代謝物である安息香酸により定量的に置換されていた。処置効果は脳においても十分ではあったが、小さく、神経組織がコカインの摂取に対して好ましい部位であるという事実と一致した。

【図 2 8】図 2 8 は、薬物探索行動の、コカインで薬物刺激された復元の選択的遮断を示

50

す。コカインを予め自己投与し、それを生理食塩水と置き換え、コカインを絶たれた15匹のラットを、1日各12回の2時間のセッションの直前に、生理食塩水(S)、コカイン(C、10mg/kg)、またはアンフェタミン(A、2mg/kg)の静脈注射で薬物刺激した。4日目と6日目に、2時間前に、AlbucocHの酵素(E)(2mg/kgの静脈投与)を接種した。示されるデータは、以前は動作した(その時点ではなんの結果ももたらさない)レバーに対する全ての応答の平均±標準誤差である。水平ブラケットは、統計比較を示す(*p<0.05、**p<0.01)。

【発明を実施するための形態】

【0017】

定義

以下の定義は、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提供される。

【0018】

本明細書に使用される「ポリヌクレオチド」とは、少なくとも1つの治療用タンパク質X(またはそのフラグメントもしくは変異体)のフレーム内に連結させたアルブミン(またはそのフラグメントもしくは変異体)の少なくとも1つの分子を含む、または代替として、それからなる融合タンパク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の列6に記載のような)またはそのフラグメントもしくは変異体を含む、または代替として、それからなる融合タンパク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に示される配列を含む、または代替として、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、または代替として、それからなる融合タンパク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タンパク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タンパク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構築物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)ATCに寄託されたアルブミン融合構築物に含まれるヌクレオチド配列を有する核酸分子を指す。

【0019】

本明細書に使用される「アルブミン融合構築物」とは、治療用タンパク質(またはそのフラグメントもしくは変異体)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(またはそのフラグメントもしくは変異体)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あるいはそれからなる核酸分子を含む、または代替として、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タンパク質(またはそのフラグメントもしくは変異体)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(またはそのフラグメントもしくは変異体)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、または代替として、それからなる核酸分子；または治療用タンパク質(またはそのフラグメントもしくは変異体)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(またはそのフラグメントもしくは変異体)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、または代替として、それからなり、例えば、以下の要素：(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/または複製系が挙げられるが、これらに限定されない)、(2)転写開始領域(例えば、プロモーター領域(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等))、(3)転写終結領域、(4)リーダー配列、および(5)選択可能なマーカーのうちの1つ以上をさらに含む、核酸分子を指す。治療用タンパク質およびアルブミンタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、アルブミン融合構築物の一部になると、それぞれ、アルブミン融合構築物の「一部(portion)」、「領域」、または「部分(moiety)」とも称され得る。

10

20

30

40

50

【0020】

本発明は、概して、アルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、アルブミン融合タンパク質、およびアルブミン融合タンパク質をコードするアルブミン融合タンパク質またはポリヌクレオチドを用いて、疾患または障害を処置、予防または改善する方法に関する。本明細書に使用される「アルブミン融合タンパク質」とは、治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）の少なくとも1つの分子にアルブミン（またはそのフラグメントもしくは変異体）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タンパク質を指す。本発明のアルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質の少なくとも1つのフラグメント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つのフラグメントもしくは変異体を含み、それらは遺伝子融合により互いに結合される（すなわち、アルブミン融合タンパク質は核酸の翻訳により産生され、ここで、治療用タンパク質のすべてまたは一部をコードするポリヌクレオチドは、アルブミンのすべ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ている）。治療用タンパク質およびアルブミンタンパク質は、アルブミン融合タンパク質の一部になると、それぞれ、アルブミン融合タンパク質の「一部（portion）」、「領域」、または「部分（moiety）」（例えば、「治療用タンパク質部分」または「アルブミンタンパク質部分」）とも称され得る。非常に好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、少なくとも1つの分子の治療用タンパク質Xまたはそのフラグメントもしくは変異体（治療用タンパク質Xの成熟形態が挙げられるが、これに限定されない）、および少なくとも1つの分子のアルブミンまたはそのフラグメントもしくは変異体（アルブミンの成熟形態が挙げられるが、これに限定されない）を含む。

【0021】

さらなる好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、宿主細胞によりプロセッシングを受け、周りの培地に分泌される。発現のために使用さ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タンパク質のプロセッシングは、シグナルペプチド切断、ジスルフィド結合形成、適切な折りたたみ、炭水化物の付加およびプロセッシング（例えば、N結合型グリコシル化およびO結合型グリコシル化等）、特異的タンパク質切断、および多量体タンパク質へのアセンブリが挙げられ得るが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質は、好ましくは、プロセッシングされた形態である。最も好ましい実施形態において、「アルブミン融合タンパク質のプロセッシングされた形態」とは、N末端シグナルペプチド切断をうけたアルブミン融合タンパク質産物を指し、本明細書において「成熟アルブミン融合タンパク質」とも称する。

【0022】

いくつかの場合、本発明のアルブミン融合構築物を含む代表的クローンを、アメリカンタイプカルチャーコレクション（本明細書において「ATCC（登録商標）」と称する）に寄託した。さらに、当該技術分野で周知の技法および本明細書中に別記されている技法によって、寄託物から所定のアルブミン融合構築物を取り出すことが可能である。ATCC（登録商標）は、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USAに所在する。ATCC（登録商標）寄託は、特許手続目的のための微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に拠って行われた。

【0023】

一実施形態において、本発明は、治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。さらなる実施形態において、本発明は、治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい実施形態において、本発明は、表2に記載されるポリヌクレオチドによりコードされる治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。さらなる好ましい実施形態において、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

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。他の実施形態において、本発明は、治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質の生物学的に活性なおよび／または治療的に活性なフラグメントを含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。他の実施形態において、本発明は、治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質の生物学的に活性なおよび／または治療的に活性な変異体を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク質の血清アルブミンタンパク質成分は、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タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに包含する。

【0024】

さらなる実施形態において、本発明は、治療用タンパク質、ならびに血清アルブミンの生物学的に活性なおよび／または治療的に活性なフラグメントを含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。さらなる実施形態において、本発明は、治療用タンパク質、ならびに血清アルブミンの生物学的に活性なおよび／または治療的に活性な変異体を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分は、治療用タンパク質の成熟部分である。さらなる好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分は、治療用タンパク質の細胞外可溶性ドメインである。代替的な実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分は、治療用タンパク質の活性形態である。本発明は、これらのアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに包含する。

【0025】

さらなる実施形態において、本発明は、治療用タンパク質の生物学的に活性なおよび／または治療的に活性なフラグメントもしくは変異体、ならびに血清アルブミンの生物学的に活性なおよび／または治療的に活性なフラグメントもしくは変異体を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい実施形態において、本発明は、治療用タンパク質の成熟部分および血清アルブミンの成熟部分を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。本発明は、これらのアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに包含する。

【0026】

治療用タンパク質

上記のように、本発明のポリヌクレオチドは、（好ましくは遺伝子融合により）互いに結合されている、治療用タンパク質の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体、およびヒト血清アルブミンの少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む、または代替として、それからなるタンパク質をコードする。

【0027】

さらなる実施形態は、治療用タンパク質の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体、およびヒト血清アルブミンの少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む、または代替として、それからなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、これらは、互いに化学的共役により連結されている。

【0028】

本明細書に使用される「治療用タンパク質」とは、1つ以上の治療的および／または生物学的活性を有する、タンパク質、ポリペプチド、抗体、ペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体を指す。本発明により包含される治療用タンパク質は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、および生物製剤が挙げられるが、これらに限定されない。（ペプチド、タンパク質、およびポリペプチドという用語は、本明細書に同義的に用いられる。）「治療用タンパク質」という用語は、抗体ならびにそのフラグメントもしくは変異体を包含することが特に企図される。したがって、本発明のタンパク質は、治療用タンパク質の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体、および／または抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。さらに、「治療用タンパク質」

という用語は、治療用タンパク質の内在性または天然に存在する関連物に言及してもよい。

【0029】

「治療活性」を示すポリペプチドまたは「治療的に活性」であるタンパク質とは、本明細書に記載の、またはさなければ当該技術分野で周知の1つ以上の治療用タンパク質のような、治療用タンパク質と関連する1つ以上の既知の生物学的活性および／または治療的活性を保有する、ポリペプチドを意味する。非限定的な例として、「治療用タンパク質」は、疾患、状態または障害を処置、予防、または改善するために有用なタンパク質である。非限定的な例として、「治療用タンパク質」は、特定の細胞型（正常（例えば、リンパ球）または異常（例えば、癌細胞））に特異的に結合し、したがって、その細胞型に化合物（薬物または細胞傷害性薬剤）を特異的に標的化するために使用され得るタンパク質であり得る。

10

【0030】

例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質に含まれ得る「治療用タンパク質」部分の非包括的なリストには、IFN α 、ANP、BNP、LANP、VDP、KUP、CNP、DNP、HCC-1、ベータデフェンシン-2、フラクタルカイン、オキシントモジュリン、キラー毒素ペプチド、TIMP-4、PYY、アドレノメデュリン（adrenomedullin）、グレリン、CGRP、IGF-1、ノイラミニダーゼ、血球凝集素、ブチリルコリンエステラーゼ、エンドセリン、およびメカノ成長因子が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0031】

インターフェロンハイブリッドはまた、アルブミンのアミノまたはカルボキシ末端に融合され、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク質を形成し得る。インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク質は、増強された、または代替として抑制された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を有し得る（Lebleu et al., PNAS USA, 73:3107-3111 (1976)、Gresser et al., Nature, 251:543-545 (1974)、およびJohnson, Texas Reports Biol Med, 35:357-369 (1977)）。各インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク質は、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。

30

【0032】

一実施形態において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク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（本明細書においてアルファ-アルファハイブリッドと称する）を含む。例えば、該インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク質のアルファ-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、または代替として、それを含む。さらなる実施形態において、A/Dハイブリッドは、一般的なBgIII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、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：CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRX1ISLFSCLKDRHDFGFPEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDL LDKFC TELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNX2DSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE（配列番号99）を含み、ここで、X1は、RまたはKであり、X2は、AまたはVである。さらなる実施形態において、A/Dハイブリッドは、一般的なPvuII制限部位にて融合し、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1～91に対応し、C末端部分は、インターフェロンアルファDのアミノ酸93～16

40

50

6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：CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRX1ISLFSCLKDRHDFGFPPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQ LNDLEACVMQEERVGETPLMNX2DSILAVKKKYFRRITLYLTEKKKYS PCAWEVVRAEIMRSLSLSTNQLQERLRRKE（配列番号100）を含み、ここで、X1は、RまたはKであり、第2のX2は、AまたはVである。これらのハイブリッドは、米国特許第4,414,510号（参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる）にさらに記載される。

【0033】

さらなる実施形態において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク質のアルファ-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、または代替として、それを含む。さらなる実施形態において、A/Fハイブリッドは、一般的なPvuIII制限部位にて融合し、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、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：CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRXISLFSCLKDRHDFGFPPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQ LNDMEACV IQEVGV EETPLMNVDSILAVKKKYFQRITLYLTEKKKYS PCAWEVVRAEIMRSFSLSKIFQERLRRKE（配列番号101）を含み、ここで、Xは、RまたはKのいずれかである。これらのハイブリッドは、米国特許第4,414,510号（参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる）にさらに記載される。さらなる実施形態において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク質のアルファ-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、または代替として、それを含む。さらなる実施形態において、A/Bハイブリッドは、一般的なPvuIII制限部位にて融合し、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、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：CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRX1ISLFSCLKDRHDFGFPPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQ LNDLEX2X3X4X5QEVGVIESPLMYEDSILAVRKYFQRITLYLTEKKKYS SCWEVVRAEIMRSFSL SINLQKRLKSKKE（配列番号102）を含み、ここで、X1は、RまたはKであり、X2～X5は、SCVMまたはVLC Dである。これらのハイブリッドは、米国特許第4,414,510号（参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる）にさらに記載される。

【0034】

別の実施形態において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク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-インターフェロンアルファハイブリッド（本明細書においてベータ-アルファハイブリッドと称する）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タンパク質のベータ-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ベータ-1からなる、または代替として、それを含む（インターフェロンアルファ-1とも称する）。さらなる実施形態において、ベータ-1/アルファDハイブリッドが融合され、ここでN末端部分は、インターフェロンベータ-1のアミノ酸1～73に対応し、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-1/アルファDハイブリッドは、アミノ酸配列：MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAAALT IYEMLQNI FAIFRQDSSAAWDEDL LDKFCTELYQQ LNDLEACVMQEERVGETPLMNXDSILAVKKKYFRRITLYLTEKKY

S P C A W E V V R A E I M R S L S L S T N L Q E R L R R K E (配列番号 103) を含み、Xは、AまたはVである。これらのハイブリッドは、米国特許第4,758,428号(参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる)にさらに記載される。

【0035】

別の実施形態において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク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(本明細書においてアルファ-ベータハイブリッドと称する)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タンパク質のアルファ-ベータハイブリッド部分は、インターフェロンベータ-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とも称する)からなる、または代替として、それを含む。さらなる実施形態において、アルファD/ベータ-1ハイブリッドが融合され、ここで、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、C末端部分は、インターフェロンベータ-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-1ハイブリッドは、アミノ酸配列: M C D L P E T H S L D N R R T L M L L A Q M S R I S P S S C L M D R H D F G F P Q E E F D G N Q F Q K A P A I S V L H E L I Q Q I F N L F T T K D S S S T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N H L K T V L E E K L E K E D F T R G K L M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F I N R L T G Y L R N (配列番号104)を有する。これらのハイブリッドは、米国特許第4,758,428号(参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる)にさらに記載される。

【0036】

さらなる実施形態において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク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-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み得る。さらなる実施形態において、インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク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変異、置換、欠失、または付加を含むように改変され得る。インターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク質に対するこのような改変は、例えば、産生のレベルを改善し、安定性を増大し、活性を増大または減少し、あるいは新たな生物学的特性を付与するように行われ得る。

【0037】

上記のインターフェロンハイブリッドアルブミン融合タンパク質は、本発明により包含され、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も同様に含まれる。一実施形態において、上記の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タンパク質は、長期化した貯蔵寿命を有する。さらなる実施形態において、上記の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タンパク質は、体外および/または生体内において、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長い血清半減期、および/または溶液中(または医薬組成物中)でのより安定した活性を有する。

【0038】

別の非限定的例において、「治療用タンパク質」は、生物学的活性、特に、疾患を処置、予防、または改善するために有用な生物学的活性を有するタンパク質である。治療用タンパク質により保持され得る生物学的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「生物学的活性」の項に記載される、および/または表1(列2)の特定の治療用タンパク質について開示される任意の1つ以上の生物学的活性が含まれる。

【0039】

一実施形態において、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（P i c h e n d e）、カテゴリーB-ートガ（V E E）またはカテゴリーC-ブンヤ（P u n t o t o r o）、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、C P E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採用して、H S A（C I D 3 1 6 5タンパク質）の下流に融合されたI N F-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C I D 3 1 6 5タンパク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すべてのRNAウイルスに対する抗ウイルス活性が成し遂げられたことを示す。C P EアッセイにおいてI C 5 0値は、 $< 0.1 \text{ ng/ml}$ （P u n t a T o r o A） $\sim 19 \text{ ng/ml}$ （V E E）であった。カニクイザルにおいて、C I D 3 1 6 5タンパク質の半減期は、90時間であり、投与から最高14日後まで検出可能であった。ヒト対象において、C I D 3 1 6 5タンパク質は安全であり、かつ十分に許容された。1回注入投与後のC m a xは用量に比例した。500 u gのコホートにおける平均C m a xは、 22 ng/ml であり、および平均t_{1/2}は、150時間であった。2～4週以上ごとに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（120～500 u g）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。

【0040】

さらなる実施形態において、I F N-アルファ-H S A融合物を用いて、慢性C型肝炎感染（H C V）を有する患者を処置する。インターフェロンアルファまたは白血球インターフェロンとしても周知のインターフェロンアルファは、H C Vに感染した患者を処置するための処置基準である。「インターフェロンアルファ」という用語は、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指す。I F N-アルファ-H S A融合物のインターフェロンアルファ部分は、当該技術分野で周知の任意のインターフェロンアルファまたはフラグメントからなる、または代替として、それを含む。本発明のI F N-アルファ-H S A融合タンパク質のインターフェロンアルファのインターフェロンアルファ部分の非限定的な例としては、表1の治療用タンパク質の列に開示されるインターフェロンアルファタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、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-2 a、インターフェロンアルファ-2 b、インターフェロンアルファ-2 c、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-n 1、インターフェロンアルファ-n 3、インターフェロンアルファの任意の商業的に入手可能な形態、例えば、I N T R O（登録商標）A（S c h e r i n g C o r p., K e n i l w o r t h, N. J.）、R O F E R O N（登録商標）A（H o f f m a n - L a R o c h e, N u t l e y, N. J.）、B e r o f o r アルファインターフェロン（B o e h r i n g e r I n g e l h e i m P h a r m a c e u t i c a l, I n c., R i d g e f i e d, C o n n.）、O M N I F E R O N（商標）（V i r a g e n, I n c., P l a n t a t i o n, F L）、M U L T I F E R O N（商標）（V i r a g e n, I n c., P l a n t a t i o n, F L）W E L L F E R O N（登録商標）（G l a x o S m i t h K l i n e, L o n d o n, G r e a t B r i t a n）、I N F E R G E N（登録商標）（A m g e n, I n c., T h o u s a n d s O a k s, C A）、S U M I F E R O N（登録商標）（S u m i t o m o, J a p a n）、B E L E R O F O N（登録商標）（N a u t i l u s B i o t e c h, F r a n c e）、M A X Y - A L P H A（商標）（M a x y g e n, R e d w o o d C i t y, C A / H o f f m a n - L a R o c h e, N u t l e y, N. J.）、または任意の精製インターフェロンアルファ産物もしくはそのフラグメントからなる、または代替として、それらを含む。さらなる実施形態において、I F N-アルファ-H S A融合タンパク質のインターフェロンアルファ部分は、持続放出、または制御放出に対して修飾された、または処方されたインターフェロンアルファからなる、または代替として、それらを含む。例えば、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-X L（F l a m e l T e c h n o l o g i e s, F r a n c e）およびL O C T E R O N（商標）（B i o L e x T h e r a p e u

t i c s / O c t o P l u s , P i t t s b o r o , N C) が挙げられるが、これらに限定されない、商業的に入手可能である持続放出、または制御放出インターフェロナルファからなる、または代替として、それらを含む。さらなる実施形態において、I F N - ア ルファ - H S A 融合タンパク質のインターフェロナルファ部分は、化学的部分の付着により修飾されてもよい。例えば、インターフェロナルファ部分はペグ化により修飾されてもよい。したがって、さらなる実施形態において、I F N - ア ルファ - H S A 融合タンパク質のインターフェロナルファ部分は、インターフェロナルファ - 2 a、2 b、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、または代替として、それらを含み、商業的に入手可能であるペグ化インターフェロナルファ、例えば、P E G - I N T R O N (登録商標) (S c h e r i n g C o r p . , K e n i l w o r t h , N . J .)、P E G A S Y S (登録商標) (H o f f m a n - L a R o c h e , N u t l e y , N . J .)、P E G - O M N I F E R O N (商標) (V i r a g e n , I n c . , P l a n t a t i o n , F L) またはそのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。しかしながら、本明細書に使用される「I F N - ア ルファ - H S A」融合物とは、当該技術分野で周知の任意のインターフェロナルファタンパク質に融合されたH S Aまたはそのフラグメントを指す。

10

【0041】

H C V に感染した患者は、H C V 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つのカテゴリー内にあり得る。「無処置患者 (T r e a t m e n t - n a i v e p a t i e n t または n a i v e p a t i e n t)」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。「処置経験のある患者 (T r e a t m e n t - e x p e r i e n c e d p a t i e n t または e x p e r i e n c e d p a t i e n t)」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 (N o n - r e s p o n d e r)」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 (E V R) または処置終了時の応答 (E T R) 等の処置の主要なエンドポイントを満たさなかった、処置経験のある患者である。「再発者 (R e l a p s e r)」は、インターフェロン療法を用いた処置を事前に受け、E V R または E T R 等の処置の主要なエンドポイントに達したが、その後、さらに後の時点で、H C V に対して陽性を示した、処置経験のある患者である。しかしながら、本明細書に使用される「H C V 患者」とは、H C V に感染している患者、および無処置患者あるいは処置経験のある患者のいずれかである、患者を指す。加えて、本明細書に使用される「処置経験のある」「H C V 患者」は、非応答患者あるいは再発者のいずれかである。

20

30

【0042】

加えて、C型肝炎ウイルスは、数多くの遺伝子型に分類することができ、最も4つの遺伝子型である、遺伝子型1、2、3、または4の4つの遺伝子型が最も一般的である。概して、H C V 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。しかしながら、該肝炎ウイルスは、2つ以上の遺伝子型の組み合わせを含むことができる。加えて、C型肝炎ウイルスの遺伝子型は、既知のH C V 遺伝子型の1つの変異体であり得る。さらなる実施形態において、H C V 患者のC型肝炎ウイルスは、遺伝子型1またはその変異体である。しかしながら、本明細書に使用される「H C V」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型肝炎ウイルスを指す。

40

【0043】

H C V に罹患する患者についての標準的な処置療法は、リバビリン等の抗ウイルス剤と組み合わせたインターフェロナルファを用いた処置を含む。一般的に、インターフェロナルファは、毎日、1週間に2回、または1週間に1回投与され、リバビリンは、毎日投与される。しかしながら、最近の研究は、H C V の処置のために当該技術分野で周知の他の抗ウイルス剤と組み合わせて、インターフェロナルファも用いている。したがって、さらなる実施形態において、I F N - ア ルファ - H S A 融合物は、単独、または例えばリバビリン等の抗ウイルス剤と組み合わせて、H C V 患者へ投与されてもよい。さらに好

50

ましい実施形態において、I F N－アルファ－H S A融合物は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス剤、例えば、リバビリンおよびさらなる抗ウイルス剤等と組み合わせて、H C V患者に投与され得る。

【0044】

上記のように、C I D 3 1 6 5タンパク質の薬物動態は2～4週以上ごとに1回という投薬スケジュールを支持する。したがって、さらなる実施形態において、H C V患者は、2～4週ごとに1回、I F N－アルファ－H S A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。好ましい実施形態において、H C V患者は、2～4週ごとに1回、I F N－アルファ－H S A融合物を、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上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。さらなる好ましい実施形態において、I F N－アルファ－H S A融合物は、4週ごとに1回、H C V患者へ投与される。さらなる好ましい実施形態において、I F N－アルファ－H S A融合物は、4週ごとに1回以上、H C V患者へ投与される。さらなる実施形態において、I F N－アルファ－H S A融合物は、4週またはそれ以上に1回、H C V患者へ投与され、ここで、処置は、有効量の1つ、2つ、3つまたはそれ以上の抗ウイルス剤の投与も含む。

10

【0045】

別の実施形態において、I F N－アルファ－H S A融合物は、H C Vの維持治療のために低用量の単独治療法として用いられてもよい。さらなる追加の実施形態において、I F N－アルファ－H S A融合物は、H C Vの処置のためにリバビリン、および1つ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。代替として、別の実施形態において、I F N－アルファ－H S A融合物は、H C Vの処置のためにリバビリン以外の1つ、2つ、3つ、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。

20

【0046】

さらなる実施形態において、I F N－アルファ－H S A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、一実施形態において、I F N－アルファ－H S A融合物は、B型肝炎(H B V)の処置のために用いられてもよい。さらなる実施形態において、I F N－アルファ－H S A融合物は、ヒトパピローマウイルス(H P V)の処置のために用いられてもよい。さらなる実施形態において、I F N－アルファ－H S A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、A I D S関連カポジ肉腫、多発性骨髄腫、または腎細胞癌が挙げられるが、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。

30

【0047】

別の実施形態において、A N P－H S A融合物またはB N P－H S A融合物が挙げられるが、これらに限定されないナトリウム利尿ペプチドを有するH S A融合物は、心血管疾患の処置のために用いられてもよい。例えば、好ましい実施形態において、A N P－H S A融合物またはB N P－H S A融合物が挙げられるが、これらに限定されないナトリウム利尿ペプチドを有するH S A融合物は、うっ血性心不全の処置のために用いられてもよい。さらなる好ましい実施形態について、A N P－H S A融合物またはB N P－H S A融合物が挙げられるが、これらに限定されないナトリウム利尿ペプチドを有するH S A融合物は、心筋梗塞後の処置のために用いられてもよい。さらなる実施形態において、A N P－H S A融合物またはB N P－H S A融合物が挙げられるが、これらに限定されないナトリウム利尿ペプチドを有するH S A融合物は、高血圧、食塩感受性高血圧、狭心症、末梢動脈障害、低血圧、心容積の過負荷、心代償不全、心不全、左心室機能障害、呼吸困難、心筋再かん流傷害、または左室リモデリングが挙げられるが、これらに限定されないさらなる心血管疾患の処置のために用いられてもよい。別の実施形態において、A N P－H S A融合物またはB N P－H S A融合物が挙げられるが、これらに限定されないナトリウム利尿ペプチドを有するH S A融合物は、血管収縮、心拍出量低下および／または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の治療において用いられてもよい。さらなる実施形態において、A N P－H S A融合物またはB N P－H S A融合物が挙げられるが、こ

40

50

れらに限定されないナトリウム利尿ペプチドを有するH S A融合物は、糖尿病腎症、糸球体肥大、糸球体損傷、腎糸球体疾患、急性および／または慢性腎不全が挙げられるが、これらに限定されない腎臓病の処置において用いられてもよい。さらなる実施形態において、A N P－H S A融合物またはB N P－H S A融合物が挙げられるが、これらに限定されないナトリウム利尿ペプチドを有するH S A融合物は、脳卒中または組織の過剰な流体を処置するために用いられてもよい。

【0048】

さらなる実施形態において、H S Aは、融合タンパク質のB N P成分がB N Pアミノ酸残基1～29である、B N P－H S A融合物が挙げられるが、これに限定されないナトリウム利尿ペプチド変異体と融合し得る。一実施形態において、H S A融合タンパク質のB N P要素は、縦に連結した、2つのB N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）からなる。別の実施形態において、H S A融合タンパク質のB N P成分は、縦に連結した、3つ、4つ、5つ、またそれ以上のB N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）からなる。好ましい実施形態において、B N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）とのH S A融合は、うっ血性心不全の処置のために用いられ得る。さらなる好ましい実施形態において、B N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）とのH S A融合は、心筋梗塞後の処置において用いられてもよい。さらなる実施形態において、B N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）とのH S A融合は、高血圧、食塩感受性高血圧、狭心症、末梢動脈障害、低血圧、心容積の過負荷、心代償不全、心不全、非血液動態的慢性心不全、左心室機能障害、呼吸困難、心筋再かん流傷害、または左室リモデリングが挙げられるが、これらに限定されないさらなる心血管疾患の処置のために用いられ得る。別の実施形態において、B N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）とのH S A融合は、血管収縮、心拍出量低下および／または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の治療において用いられ得る。好ましい実施形態において、B N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）とのH S A融合は、糖尿病腎症、糸球体肥大、糸球体損傷、腎糸球体疾患、急性および／または慢性腎不全が挙げられるが、これらに限定されない腎臓障害または腎臓病の処置において用いられ得る。さらなる実施形態において、B N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）とのH S A融合は、脳卒中または組織の過剰な流体を処置するために用いられ得る。

【0049】

関連するが異なる実施形態において、本発明は、ペプチドが、H S Aと融合しない、B N Pアミノ酸残基1～29を含むが、これらに限定されないナトリウム利尿ペプチド変異体を対象にする。一実施形態において、本発明のB N P変異体は、縦に連結した、2つのB N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）の配列を有する。さらなる実施形態において、本発明のB N P変異体は、縦に連結した、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上のB N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）の配列を有する。好ましい実施形態において、本発明のB N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）は、うっ血性心不全の処置のために用いられ得る。さらなる好ましい実施形態において、本発明のB N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）は、心筋梗塞後の処置において用いられ得る。さらなる実施形態において、本発明のB N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）は、高血圧、食塩感受性高血圧、狭心症、末梢動脈障害、低血圧、心容積の過負荷、心代償不全、心不全、非血液動態的慢性心不全、左心室機能障害、呼吸困難、心筋再かん流傷害、または左室リモデリングが挙げられるが、これらに限定されないさらなる心血管疾患の処置のために用いられ得る。別の実施形態において、本発明のB N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）は、血管収縮、心拍出量低下および／または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の処置において用いられ得る。好ましい実施形態において、本発明のB N P変異体（例えば、B N Pアミノ酸残基1～29）は、糖尿病腎症、糸球体肥大、糸球体損傷、腎糸球体疾患、急性および／または慢性腎不全が挙げられるが、これらに限定されない腎臓障害または腎臓病の処置において用いられ得る。さらなる実施形態において、本発明のB N P変異体（例えば、B N Pアミノ

酸残基 1～29) は、脳卒中または組織の過剰な流体を処置するために用いられ得る。

【0050】

さらなる実施形態において、本発明は、半減期を延長する、生物学的活性を改善する、および／または変異体の精製を容易にするために、改変されている、BNP変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)を含むが、これらに限定されないナトリウム利尿ペプチド変異体を対象にする。本実施形態によれば、ナトリウム利尿ペプチド変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)は、ペグ化、メチル化、またはさもなければ当該技術分野で周知の技法を用いて化学修飾もしくは共役され得る。代替として、当該技術分野で周知の方法は、半減期を延長する、生物学的活性を改善する、および／または精製を容易にするために、当該技術分野で周知の他のペプチド配列に本発明のナトリウム利尿ペプチド変異体を組み換え技術により融合するために用いられてもよい。例えば、本発明のナトリウム利尿ペプチド変異体は、抗体Fc領域またはその部分に融合または共役され得る。本発明のナトリウム利尿ペプチド変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)に融合される抗体部分は、定常領域、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、または全ドメインまたはその部分の任意の組み合わせを含み得る。ナトリウム利尿変異体はまた、多量体を形成するために、上記の抗体部分に融合または共役され得る。例えば、本発明のポリペプチド(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)に融合されるFc部分は、Fc部分間のジスルフィド結合を通して二量体を形成することができる。それ以上の多量体型は、IgAおよびIgMの部分に変異体を融合することにより作製され得る。抗体部分に本発明の変異体を融合または共役するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、米国特許第5,336,603号、同第5,622,929号、同第5,359,046号、同第5,349,053号、同第5,447,851号、同第5,112,946号、欧州特許出願第307,434号、同第367,166号、PCT公開第WO96/04388号、同第WO91/06570号、Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539(1991)、Zheng et al., J. Immunol. 154:5590-5600(1995)、およびVil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341(1992)を参照のこと(該参照は、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる)。さらなる実施形態において、本発明の修飾されたBNP変異体は、縦に連結した、2つのBNP変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)の配列を有する。さらなる実施形態において、本発明の修飾されたBNP変異体は、縦に連結した、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上のBNP変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)の配列を有する。好ましい実施形態において、本発明の修飾されたBNP変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)は、うっ血性心不全の処置のために用いられ得る。好ましい実施形態において、本発明の修飾されたBNP変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)は、心筋梗塞後の処置において用いられ得る。さらなる実施形態において、本発明の修飾されたBNP変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)は、高血圧、食塩感受性高血圧、狭心症、末梢動脈障害、低血圧、心容積の過負荷、心代償不全、心不全、非血液動態的慢性心不全、左心室機能障害、呼吸困難、心筋再かん流傷害、または左室リモデリングが挙げられるが、これらに限定されないさらなる心血管疾患の処置のために用いられ得る。別の実施形態において、本発明の修飾されたBNP変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)は、血管収縮、心拍出量低下および／または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の処置において用いられ得る。好ましい実施形態において、本発明の修飾されたBNP変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)は、糖尿病腎症、糸球体肥大、糸球体損傷、腎糸球体疾患、急性および／または慢性腎不全が挙げられるが、これらに限定されない腎臓障害または腎臓病の処置において用いられ得る。さらなる実施形態において、本発明の修飾されたBNP変異体(例えば、BNPアミノ酸残基1～29)は、脳卒中または組織の過剰な流体を処置するために用いられ得る。

【0051】

別の実施形態において、CNP-HSA融合物は、軟骨内骨化（*endochondral ossification*）の調節において用いられ得る。例えば、好ましい実施形態において、CNP-HSA融合物は、軟骨形成不全症、軟骨低形成症、および致死性骨異形成症が挙げられるが、これらに限定されない骨異形成症の処置において用いられ得る。

【0052】

本明細書に使用される「治療活性」または「活性」は、その効果が、ヒトにおける所望の治療結果に一致する活性、あるいは非ヒト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指し得る。治療活性は、生体内または体外で測定することができる。例えば、所望の効果は、細胞培養にてアッセイされ得る。このような体外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る多数の治療用タンパク質のために一般的に使用可能である。アッセイの例としては、実施例の項または表1の「例示的な活性アッセイ」の列（列3）における本明細書に記載のものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0053】

例えば、細胞表面および分泌タンパク質等の本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質は、多くの場合、1つ以上のオリゴ糖基の付着により修飾される。グリコシル化と称されるこの修飾は、タンパク質の物理的特性に顕著に作用し得、タンパク質の安定性、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の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：セリンまたはトレオニン残基に付着する、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〕中のアスパラギン残基に付着する、N-結合オリゴ糖により特徴付けられるグリコシル化がある。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-結合オリゴ糖の双方の末端残基である。タンパク質構造および細胞型等の可変要素は、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また、所定の細胞型内の同じ部位で一般的である。

20

【0054】

本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分、ならびにそのアナログおよび変異体に対応する治療用タンパク質は、1つ以上の部位でのグリコシル化が、それらが発現される宿主細胞により、またはそれらの発現の他の条件に起因して、それらの核酸配列の操作の結果として変化するように改変され得る。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等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タンパク質は、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タンパク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、以下でより詳細に記載され、当該技術分野で周知である。

30

【0055】

（特に表1に開示される）治療用タンパク質、およびそれらの核酸およびアミノ酸配列は、当該技術分野でよく知られており、*Chemical Abstracts Services Databases*（例えば、*CAS Registry*）、*GenBank*等の公共データベース、および*GenSeq*（例えば、*Derwent*）等の定期購読契約型提供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誘導するために使用され得る治療用タンパク質の例示的なヌクレオチド配列を、表2の列7「配列番号X」に示す。配列番号Xとして示される配列は、所定の治療用タンパク質（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、またはいくつかの場合、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、野生型治療用タンパク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

40

50

治療用タンパク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として示される配列を用いて同じ列に記載の構築物を誘導することは、当業者の能力の範囲内に十分にある。例えば、配列番号Xが全長タンパク質に対応するが、そのタンパク質の一部のみを用いて特定のC I Dを生成する場合、P C R等の分子生物学技法に依存して特定のフラグメントを増幅し、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。

【0056】

本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応するさらなる治療用タンパク質としては、表1の「治療用タンパク質X」列（列1）に開示される1つ以上の治療用タンパク質もしくはペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0057】

表1は、本発明のアルブミン融合タンパク質、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タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質の非限定的なリストを提供する。第1の列「治療用タンパク質X」は、治療用タンパク質分子を開示し、治療用タンパク質分子、またはそのフラグメントもしくは変異体を含む、または代替として、それからなるタンパク質の学名および商品名を含む括弧書きが続き得る。本明細書に使用される「治療用タンパク質X」は、個々の治療用タンパク質分子またはこの列において開示される所定の治療用タンパク質分子に関連する治療用タンパク質の群全体のいずれかを指し得る。「生物学的活性」の列（列2）は、治療用タンパク質分子に関連する生物学的活性を記載する。列3の「例示的な活性アッセイ」は、治療用タンパク質X、または治療用タンパク質X（またはそのフラグメント）部分を含むアルブミン融合タンパク質の治療および／または生物学的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。「例示的な活性アッセイ」列に引用される参考文献のそれぞれは、特に、表1の「生物学的活性」の列に示される対応する生物学的活性をアッセイするために参考文献（例えば、その中の「方法」の項を参照のこと）に記載される各活性アッセイの例の記述に関して、その全体が本明細書に参照することにより組み込まれる。4番目の列の「好適な適応症Y」は、治療用タンパク質Xまたは治療用タンパク質X（またはそのフラグメント）部分を含むアルブミン融合タンパク質により処置、予防、診断、および／または改善され得る疾患、障害、および／または状態を記載する。「構築物I D」の列（列5）は、参照した治療用タンパク質X（またはそのフラグメント）部分を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質をコードする、表2に開示される例示的なアルブミン融合構築物に対する関連を提供する。

20

30

【0058】

【表 1-1】

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性化ッセイ	好適な適應症 Y	構造物 ID	治療用タンパク質 Z
インターフェロニンA ルファア(インターフェ ロンアルファ-2β; イン ターフェロンアルフ ァ-2α;組換え体; 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 -2β; リバビリンおよ びインターフェロン アルファ-2β; インター フェロンアルファコ ン-1; インターフェ ンコンセンサス	抗ウイルス、抗癌増殖、抗肿瘤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：タンパク質キナーゼおよびオリゴデニール酸合成酵素的産生を刺激する	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, et al (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.	重症急性呼吸器症候群(SARS)および他のコロナウィルス感染を含むウィルス感染; エボラウィルスおよびマールブルグウィルスを含むが、これらに限定されないフィロウィルス; Pichende ウイルス、ラッサウイルス、Junin ウィルス、Machupo ウィルス、Guanarito ウィルスを含むが、これらに限定されないアレナウィルス; およびリンパ球性脈絡髄膜炎ウィルス(LCMV); Punta toro ウィルス、クリミア-コンゴ出血熱ウィルス、サンチヨウバエ熱ウィルス、リフトバレー熱ウィルス、ラクロスウィルス、およびハンタウィルスを含み、これらの限定されなが	2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、4296。	特定の構築物については、表2の配列番号Zを参照のこと。

表

【 0 0 5 9 】

10

20

30

【表 1 - 2】

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
253036;RO 258310;INTRON A; PEG-INTRON; OIF; OMNIFERON; PEG- OMNIFERON; VELDONA; PEG- REBETRON; ROFERON A; WELLFERON; ALFERON N/LDO; REBETRON; ALTEMOL; VIRAFERONPEG; PEGASYS; V IRAFERON; VIRAFON; AMPLIGEN; INFERGEN;INFAREX; ORAGEN)			いづニアウイルス;黄熱、Banza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、オムスクス出血熱およびキヤサ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、ペネスエラウマ脳炎ウイルス、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ボックスウイルス;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		

表 1

【 0 0 6 0 】

10

20

30

【表 1 - 3】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
			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キソウイルス;ならびに疾患制御および予防のために米国セリターにより最優先の病原体として特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 et al., Emerg. Med. Clin. North Am. 2002;20(2):273-309を参照のこと)を含む。		

【 0 0 6 1】

10

20

30

【表 1 - 4】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構造物 ID	治療用タンパク質 Z
心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP);心房性ナトリウム利尿因子(ANF)	ANPは、利尿薬(ナトリウム利尿)、低血圧であり、レニンおよびアルドステロン分泌における阻害作用を有する。血圧および体液中の塩/水バランス/電解質恒常性の調節に関与する。	レニンおよびアルドステロンレベルは、例えば、Yamato et al., Circ J 2003 May;67(5):384-90等の当該技術分野で周知の方法を用いて測定され得る。血圧は、血圧計を用いて、またはReddy et al., Ultrasound Med Biol 2003 Mar;29(3):379-85等の当該技術分野で周知の他の方法を用いて測定され得る。	高血圧;食塩感受性高血圧;うつ血性心不全;狭心症、末梢動脈障害;糖尿病性腎症;脳卒中;腎不全;急性および/または慢性腎不全;急性尿管管壊死;急性腎不全;腎臓病;腎糸球体疾患;組織の過剰な流体;低血圧;心容積の過負荷;心代償不全;左心室機能障害;呼吸困難;血管収縮、心拍出量低下および/または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の治療;心血管疾患;心不全;心筋再かん流傷害;左室リモデリング;心筋梗塞後。	3484、4174。	特定の構造物については、表2の配列番号Zを参照のこと。
B型ナトリウムペプチド(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、当該技術分野で周知のアッセイを用いて (例えば、Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1999 May;359(5):394-9)に記	高血圧;食塩感受性高血圧;うつ血性心不全;狭心症、末梢動脈障害;糖尿病性腎症;脳卒中;腎不全;急性および/または慢性腎不全;急性尿管管壊死;急性腎不全;腎臓病;腎糸	3618、3689、3690、3691、3692、3715、3716、3723、3724、3725、3736、3741、3769、3778、	特定の構造物については、表2の配列番号Zを参照のこと。

【 0 0 6 2 】

10

20

30

【表 1 - 5】

表 1

治療タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構造物 ID	治療タンパク質 Z
		載されるように、ラット心臓線維芽細胞を用いて対外での増殖アッセイを用いて)、測定され得る。血管拡張は、等圧の動脈造影システムでの腎小動脈の筋原性反応を測定することにより、動物において測定され得る (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002 Aug;283(2):R349-R355を参照のこと)。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウムの量を測定することにより決定される。	球体疾患; 組織の過剰な流体; 低血圧; 心容積の過負荷; 心代償不全; 左心室機能障害; 呼吸困難; 血管収縮、心拍出量低下および/または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の治療; 心血管疾患; 心不全; 心筋再かん流傷害; 左室リモデリング; 心筋梗塞後。	3783、3795、3796、3809、3896、3897、3898、3899、3900、3956、3957、3959、3961、3962、3965、3966、3967、3968、4005、4006、4007、4062、4130、4160、4161、4167、4168、4169、4170、4171、4172、4174。	
持続性ナトリウム利尿ペプチド(LANP; proANP(31-67);	腎臓の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拡張を調節するプロスタグランジン	腎臓のNa ⁺ -K ⁺ -ATPase活性はKu et al, 1987; Endocrinology 120:2166-2173等の当該技術分野で周知のアッセイを用いて測	高血圧; 食塩感受性高血圧; うっ血性心不全; 狭心症, 末梢動脈障害; 糖尿病性腎症; 脳卒中; 腎不全; 急性および/または慢性腎不全; 急性尿管壊死;	3886、3887。	特定の構築物については、表2の配列番号Zを参照のこと。また、

【0063】

10

20

30

【表 1 - 6】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
	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もたらし。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。血圧および体液破中の塩/水/電解質のバランスの調節に関与する;腎保護。	定され得る。血管拡張は、当該技術分野で周知のアッセイを用いて測定され得る (Ashton et al. Pharmacology 2000; 61(2):101-105)。プロスタグランジンE2合成は、当該技術分野で周知のアッセイを用いて測定され得る (Cheng et al., J Endocrinol. 2004 Aug;182(2):249-56)。血圧は、血圧計を用いて、またはReddy et al., Ultrasound Med Biol 2003 Mar; 29(3):379-85等の当該技術分野で周知の他の方法を用いて測定され得る。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウムの量を測定することにより決定	急性腎不全; 腎臓病; 腎糸球体疾患; 組織の過剰な流体; 低血圧; 心容積の過負荷; 心代償不全; 左心室機能障害; 呼吸困難; 血管収縮、心拍出量低下および/または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の治療; 心血管疾患; 心不全; 心筋再かん流傷害; 左室リモデリング; 心筋梗塞後。		Vesely Am J Physiol Renal Physiol 2003; 285:F167-177も参照のこと、これは、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 4 】

10

20

30

【表 1 - 7】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
血管拡張薬 (VDP:proANP-(79-98))	腎臓の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拡張を調節する 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; うっ血性心不全に罹患する患者におけるナトリウム利尿をもたらし、カリウム利尿をもたらし、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; 腎保護	腎臓のNa ⁺ -K ⁺ -ATPase活性は、Ku et al., 1987; Endocrinology 120:2166-2173等の当該技術分野で周知のアッセイを用いて測定され得る。血管拡張は、当該技術分野で周知のアッセイを用いて測定され得る (Ashton et al. Pharmacology 2000; 61(2):101-105)。プロスタグランジンE2合成は、当該技術分野で周知のアッセイを用いて測定され得る (Cheng et al., J Endocrinol. 2004 Aug; 182(2):249-56)。アルドステロンレベル	高血圧; 食塩感受性高血圧; うっ血性心不全; 狭心症, 末梢動脈障害; 糖尿病性腎症; 脳卒中; 腎不全; 急性および/または慢性腎不全; 急性尿管管壊死; 急性腎不全; 腎臓病; 腎糸球体疾患; 組織の過剰な流体; 低血圧; 心室室機能障害; 呼吸困難; 血管収縮; 心拍出量低下および/または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の治療; 心血管疾患; 心不全; 心筋再かん流傷害; 左室リモデリング; 心筋梗塞後。	3888, 3889。	特定の構築物については、表2の配列番号Zを参照のこと。 また、Vesely Am J Physiol Renal Physiol 2003; 285:F167-177も参照のこと、これは、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 5 】

10

20

30

【表 1 - 8】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構造物 ID	治療用タンパク質 Z
		ルは、例えば、 Yamato et al., Circ J 2003; May; 67(5):384- 90等の当該技術分野 で周知の方法を用い て測定され得る。血 圧は、血圧計を用い て、またはReddy et al., Ultrasound Med Biol 2003 Mar;29(3):379-85等の 当該技術分野で周知 の他の方法を用いて 測定され得る。ナト リウム利尿は、尿中 のナトリウムの量を 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 リウムの量を測定す ることにより決定さ れる。			
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	血圧は、血圧計を用 いて、または、Reddy et al., Ultrasound Med	高血圧; 食塩感受性高血 圧; うっ血性心不全; 狭心 症, 末梢動脈障害; 糖尿病	3890、3891。	特定の構造物につい ては、表2の配

【 0 0 6 6 】

10

20

30

【表 1 - 9】

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
	に關与する。	Biol 2003 Mar; 29(3):379-85等の当該技術分野で周知の他の方法を用いて測定され得る。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウムの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。	性腎症; 脳卒中; 腎不全; 急性および/または慢性腎不全; 急性尿細管壊死; 急性腎不全; 腎臓病; 腎糸球体疾患; 組織の過剰な流体; 低血圧; 心容積の過負荷; 心代償不全; 左心室機能障害; 呼吸困難; 血管収縮、心拍出量低下および/または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の治療; 心血管疾患; 心不全; 心筋再かん流傷害; 左室リモデリング; 心筋梗塞後。		列番号Zを参照のこと。また、Vesely Am J Physiol Renal Rhysiol 2003; 285:F167-177も参照のこと、これは、参照することにより本明細書に組み込まれる。
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關与する。骨の軟骨内骨化の調節に關与する。	ナトリウム利尿は、尿中のナトリウムの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。骨中のcGMP産生は、当該技術分野で周知のアッセイを用いて	高血圧; 食塩感受性高血圧; うっ血性心不全; 狭心症; 末梢動脈障害; 糖尿病性腎症; 脳卒中; 腎不全; 急性および/または慢性腎不全; 急性尿細管壊死; 急性腎不全; 腎臓病; 腎糸球体疾患; 組織の過剰な流体; 低血圧; 心容積の過負荷; 心代償不全; 左心室	3892、3893。	特定の構築物については、表2の配列番号Zを参照のこと。また、Vesely Am J Physiol Renal Rhysiol 2003;

10

20

30

【0067】

【表 1 - 1 0】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構造物 ID	治療用タンパク質 Z
マンバサトリウム利尿ペプチド (DNP)	腎臓の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；利尿およびナトリウム利尿をもたらし。血圧および体液中の塩/水/電解質のバランスの	腎臓のNa ⁺ -K ⁺ -ATPase活性は、Ku et al., 1987; Endocrinology 120:2166-2173等の当該技術分野で周知のアッセイを用いて測定される。血管拡張は、当該技術分野で周知のアッセイを用いて測定される (Ashton et al. Pharmacology 2000; 61(2):101-105)。プロ	高血圧；食塩感受性高血圧；うつ血性心不全；狭心症、末梢動脈障害；糖尿病性腎症；脳卒中；腎不全；急性および/または慢性腎不全；急性尿管壊死；急性腎不全；腎臓病；腎糸球体疾患；組織の過剰な流体、低血圧；心容積の過負荷；心代償不全；左心室機能障害；呼吸困難；血管収縮、心拍出量低下および/または高血圧を引き	3894、3895。	特定の構造物については、表2の配列番号Zを参照のこと。また、Vesely Am J Physiol Renal Physiol 2003; 285:F167-177も参照のこと、参照
		測定され得る (Yasoda et al., J. Biol. Chem. 1998; 273:11695-11700。	機能障害；呼吸困難；血管収縮、心拍出量低下および/または高血圧を引き起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の治療；心血管疾患；心不全；心筋再かん流傷害；左室リモデリング；心筋梗塞後；軟骨形成不全症、軟骨低形成症、および致死性骨異形成症を含む骨系統疾患		285:F167-177も参照のこと、これは、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 8 】

10

20

30

【表 1 - 1 1】

表 1

治療タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構造物 ID	治療タンパク質 Z
	調節に関与する;腎保護。	スタグラジンE2合成は、当該技術分野で周知のアッセイを用いて測定され得る (Cheng et al., J Endocrinol. 2004 Aug;182(2):249-56)。アルドステロンレベルは、例えば、Yamato et al., Circ J 2003 May; 67(5):384-90等の当該技術分野で周知のアッセイを用いて測定され得る。血圧は、血圧計を用いて、または Reddy et al., Ultrasound Med Biol 2003 Mar;29(3):379-85等の当該技術分野で周知の他の方法を用いて測定され得る。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウムの量を測定することにより	起こし得る、アルドステロン濃度の上昇の治療; 心血管疾患; 心不全; 心筋再かん流傷害; 左室リモデリング; 心筋梗塞後。		することにより本明細書に組み込まれる。

【0069】

10

20

30

【表 1 - 1 2】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
ベータデフェンシン-2 (ペーターデフェンシン 4; SAPI; DEFB2; HBD-2; DEFB-2; DEFB 102; 皮膚抗菌ペ プチド1)	抗微生物ペプチド として先天性防御 システムに関与す る; 大腸菌、緑膿 菌、黄色ブドウ球 菌、大便連鎖球 菌、およびカンジ ダ菌等のグラム陰 性およびグラム陽 性菌を殺す; 象牙芽 細胞分化を刺激す る	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。 抗菌作用は、当該技 術分野で周知のアッ ッセイを用いて測定さ れ得る (Bals et al., J. Clim. Invest. 1998 Sept 102(5):874-880)。	真菌、細菌、またはウイ ルス感染の処置; 免疫低 下の疾患状態における感 染; 炎症; 歯肉炎; 閉塞性細 気管支炎; 口腔扁平細胞 癌; 子宮感染; 乾癬; 新生児 感染; 肺癌; 炎症性腸疾患; 胃炎; 中耳炎	4173、4175、 4176、4177、 4178、4179、 4180、4181。	特定の構築 物について は、表2の配 列番号Zを参 照のこと。
ヒトケモカインHCC- 1 (ckBeta-1; CKB-1; HWFBD)	炎症、アレルギ ー、組織拒絶、ウ イルス感染、およ び腫瘍生物学に関 与する: CD34+骨 髄性前駆細胞の増 殖を増強する	ケモカイン活性は、 当該技術分野で周知 のアッセイを用いて 測定され得る: Methods in Molecular Biology, 2000, vol. 138: ケモカイン Protocols. Edited by: A.E.I. Proudfoot, T.N.C.	自己免疫障害; 免疫; 脈管 および炎症性障害; HIV; AIDS; 感染症。	1933、1934、 1947、1948、 1955、1998、 2355、2412、 2449、2837、 2838、2839、 2840、2841、 2842、2843、 2844、2845、	特定の構築 物について は、表2の配 列番号Zを参 照のこと。

【0070】

10

20

30

【表 1 - 1 3】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構造物 ID	治療用タンパク質 Z
		Wells, and C.A. Power. © Humana Press Inc., Totowa, NJ.		2849、2947、 3066、3105、 3124、3125、 3139、3152、 3153、3154、 3155、3156、 3169、3170、 3202、3203、 3204、3205、 3206、3207、 3272、3970。	
フラクタルカイン(ニ ューロタクチン;ケモ カイン CX3C)	フラクタルカイン は、走化性の白血 球遊走および神経 障害において役割 を果たすと考えら れる。	フラクタルカイン活 性は、例えば、J. Immunol. Methods 33, ((1980)); Nature 197 Jun 5;387(6633):611-7 等の当該技術分野で 周知の走化性の白血 球遊走アッセイを用 いて決定され得る。	免疫障害;白血病;リンパ 腫;細菌またはイースト 菌感染	4191、4192、 4193、4194。	特定の構築 物について は、表2の配 列番号Zを参 照のこと。
オキシントモジュリ ン	インスリン分泌を 刺激する;cAMP産 生を刺激する;食物 刺激による胃酸分 泌を阻害する;腸運	インスリン分泌にお けるオキシントモジ ュリンの効果は、 Ann. NY Acad. Sci. 805:44-51 (1996)に記	最も好ましくは以下であ る: 高血糖症;肥満;糖尿病; 尿崩症;真性糖尿病; I 型糖 尿症; I I 型糖尿病; インス リン耐性; インスリン欠損; 脂質異常症; 高ケトン血症;	3579、3580、 4213、4215、 4217、4232、 4240、4253。	特定の構築 物について は、表2の配 列番号Zを参 照のこと。

【0071】

10

20

30

【表 1 - 1 4】

表 1

治療タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療タンパク質 Z
	動性を調節する;食物摂取を阻害する。	載されるMIN6細胞アッセイを含む、当該技術分野で周知の方法により測定される。 cAMP蓄積は、Br J Pharmacol 138(4):660-70(2003)に記載の体外アッセイを含む、当該技術分野で周知の方法を用いて測定され得る。	非インスリン依存性糖尿病(NIDDM);インスリン依存性糖尿病(IDDM);肥満、心臓病、高血糖症、感染、網膜症、および/または潰瘍が挙げられるが、これらに限定されない糖尿病に関連する状態;代謝障害;免疫障害;肥満;血管障害;体重の抑制;食欲の抑制;症候群X。		
キラース毒素;キラース素ペプチド(KP)	イースト菌ピキアアノマラ (<i>Pichia anomala</i>) により産生されるキラース毒素(KT)は、特異的細胞壁受容体(KTR)を表わし、同一の生體的ニッチの自然の生息地において競合する他の微生物を殺すことができる糖タンパク質である。キラース	殺カンジダ活性は、Magliani et al., Nat. Biotechnol. 1997; 15:155-158;またはPolonelli et al, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1997; 4:142-146により開示されるもの等の当該技術分野に周知のアッセイを用いて体外で測定し得る。	カンジダ症	4227	特定の構築物について、表2の配列番号Zを参照のこと。

【 0 0 7 2 】

10

20

30

【表 1 - 1 5】

表 1

治療タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構造物 ID	治療タンパク質 Z
	毒素ペプチド(KP)は、組換え抗体抗イデオタイプ抗体に由来するペプチドであり、恐らく、標的微生物細胞におけるベータグルカンキラー毒素受容体との相互作用を介して、キラー毒素の殺菌作用を保持する。				
TIMP-4(金属プロテアーゼの組織阻害剤)	この遺伝子ファミリーによりコードされるタンパク質は、細胞外マトリックスの分解に関与する一種のペプチダーゼである、マトリックスメタロプロテイナーゼの天然阻害剤である。	TIMP阻害活性は、Murphy et al., Biochem J 1981 Apr 1;195(1):167-70、Suneel et al., J Biol Chem 1995 Jun 16;270(24):14313-8により開示されるもの等の当該技術分野に周知のアッセイを用いてアッセイされる。	抗癌適用;再発症;自己免疫障害;骨関節炎	4233、4234、4273、4274	特定の構造物については、表2の配列番号Zを参照のこと。
PYY(ペプチドYY)	食欲を減じる；満	食欲および食物摂取	最も好ましくは以下である。	3108、3109、	特定の構造物

【 0 0 7 3 】

10

20

30

【表 1 - 1 6】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
PYY ₃₋₃₆ を含む(全長 PYYのアミノ酸残基 31-64、成熟PYYのアミノ酸残基3-36);PYY(3-36)も含む (G9R)(配列番号780))	腹を増加させる；食物摂取量を減じる。	量は、当該技術分野に周知の方法により測定される (Batterham et al. Nature 2002; 418:650654)。	る。肥満の処置；糖尿病の処置；体重増加の抑制；食欲の抑制。 高血糖症；糖尿病；尿崩症；真性糖尿病；I 型糖尿病；I 型糖尿病；インスリン耐性；インスリン欠損；脂質異常症；高ケトン血症；インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM)；インスリン依存性糖尿病(IDDM)；肥満、心臓病、高血糖症、感染、網膜症、および/または潰瘍が挙げられるが、これらに限定されない糖尿病に関連する状態；代謝障害；免疫障害；肥満；血管障害；体重の抑制；食欲の抑制；症候群 X。 抗体、アంతゴニストに対する他の指標；体重減少の処置；AIDS 衰弱の処置；食欲刺激；悪液質の処置。	3281、3117、3118、3282、4215、4235、4236、4262、4267。	物について は、表2の配 列番号Zを参 照のこと。
アドレノメデュリン	血管拡張を刺激する；骨成長を促進する。	血管拡張は、当該技術分野で周知のアッ	うつ血性心不全；高血圧；心筋梗塞；敗血症性ショック	3144、4239、4260、4261。	特定の構築物について

【0074】

10

20

30

【表 1 - 1 7】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
	る	セイを用いて測定され得る(Ashton et al. Pharmacology 2000; 61(2):101-105)。骨成長の促進は、骨芽細胞増殖アッセイ(Cornish et al. Am J Physiol 1997 Dec;273(6 Pt 1):E1113-20)等の当該技術分野に周知のアッセイにより測定され得る。	ソック; 骨粗しょう症; 閉経後の骨粗しょう症; オステオペニアの処置。		は、表2の配列番号Zを参照のこと。
グレリン	脳下垂体前葉からの成長ホルモンの放出を刺激する。食欲を刺激し、脂肪燃焼を減少させる。	食欲および食物摂取量は、当該技術分野に周知の方法により測定され得る(Batterham et al. Nature 2002; 418:650654)。	内分泌; 体重の減少; 糖尿病; 神経性無食欲症に関連する体重の減少; 食欲の減衰; 過度の食欲; 体重増加; 肥満; 糖尿病; 末端肥大症; 成長障害; 成長ホルモン不全; 2歳以上の幼児における成長障害; 成長不全; 慢性腎不全に関連する成長不全; 閉経後の骨粗しょう症; 火傷; 悪液質; 癌悪液質; 小児症; 代謝障害; 肥満; 腎不全;	4241、4242、4268。	特定の構築物については、表2の配列番号Zを参照のこと。

【0075】

10

20

30

【表 1 - 1 8】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
カルシトニン遺伝子 関連ペプチド(CGRP)	CGRPは、強力な血管拡張剤であり、 内皮および骨芽細胞増殖の調整剤である。CGRPのさらなる効果は、胃液分泌の減少、体温の上昇、食欲抑制作用、ならびに心臓における陽性変力および変時効果を含む。	CGRPの血管拡張活性は、Pharmacol Res. 1999 Mar;39(3):217-20 に記載の大動脈輪血管拡張アッセイを用いてアッセイされ得る。内皮および骨芽細胞増殖活性は、体外で測定され得る(Eur J Pharmacol. 2000 Dec 15;409(3):273-8, Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 May;87(9):3299-303)。	ターナー症候群 (小児および大人) ; 線維筋痛; 骨折処置; 弱さ; AIDS 衰弱 肩痛; 狭心症; 不整脈; 心不全; 高血圧; 閉経後骨粗しょう症; レイノー病; くも膜下出血	4246、4247、 4248、4249。	特定の構築物について は、表2の配列番号Zを参照のこと。
インスリン様成長因子- I(メカセルミン; ソマ ゾン; IGF-1; IGF-1 複合 体; CEP 151; CGP 35126; FK 780; Mecar; RHIGF-I; ソマトメジ	IGF-Iは、中枢および末梢神経系の両方における広範囲の作用を伴う多面ポリペプチドである。それは、成長および発達に関与し、ホスファチジ	IGF-I活性は、血清枯 竭アポトーシス保護ア ッセイを用いて、体外 でアッセイされ得る(J Endocrinol 2000 Oct; 167(1):165-74)。乳癌 細胞株 MCF-7 を用いた増殖アッセイ(Karey 1988 Cancer Res. 48:	真性糖尿病; 成長障害; 衰弱; 筋萎縮性側索硬化症; 骨関節炎; 腎臓病 & 神経 障害; 小入症; HIV-1 感染; 心筋虚血; 骨粗しょう症; 多発性硬化症; 神経障害; 火傷; 糖尿病; 末梢神経障 害。	4251、4252。	特定の構築物について は、表2の配列番号Zを参照のこと。

10

20

30

【 0 0 7 6】

【表 1 - 1 9】

表 1

治療タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療タンパク質 Z
ン-1; ソマトメジン-C; SOMATOKINE; MYOTROPHIN; IGEF; DepoIGF-1)	ルイノシチド3/Akt キナーゼに関与す る細胞内経路の活 性化を介して細胞 死に対するニュー ロンを保護する。	4083)。			
ノイラミニダーゼ (イ ンフルエンザ A型ウイルス (A/Goose/ガンドン/1 /9 6(H5N 1)))	ノイラミニダーゼ は、インフルエン ザウイルスの表面 上の2つの糖タン パク質のうちの1 つであり、抗原と して、ウイルスの 特定株を画定す る。時間と共に、 ノイラミニダーゼ 分子の変異は、ウ イルスにヒト免疫 応答を回避させ、 ひいては、毎年、 新しいワクチンの 製剤化を余儀なく させる。ノイラミ ニダーゼは、細胞 受容体シアル酸残	ノイラミニダーゼ活 性は、Van Deusen et al., Avian Dis. 1983 Jul- Sep; 27(3):745-50、ま たは Wetherall et al., J. Clin. Microbiology 2003 Feb; 41(2):742- 750により開示される ものの等の当該技術分 野で周知のアッセイ を用いて体外でアッ セイされる。	インフルエンザA、H5N1 型、鳥インフルエンザに 対するワクチンまたは抗 原	4254、4255。	特定の構築 物について は、表2の配 列番号Zを参 照のこと。

【 0 0 7 7 】

10

20

30

【表 1 - 2 0】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構造物 ID	治療用タンパク質 Z
	基を開裂し、そこに、新しく形成された粒子は、接着される。この開裂は、ウイルスを放出し、これは、現在、新しい細胞に侵入し得る。ノイラミニダーゼなしで、感染は、1回の複製に限定され、疾患をもたらすことはめったにない。ノイラミニダーゼはまた、恐らく気道上皮細胞を洗浄するムチンにおけるシアル酸分子を開裂することにより上気道のウイルスの侵入を促進し得る。				
赤血球凝集素[インフルエンザ A 型ウイルス (A/ホンコン/213/03	赤血球凝集素 (HA)、主要なインフルエンザウイルス	補体結合 (CF) および赤血球凝集阻害 (HI) は、Prince et al., Clin.	インフルエンザ A、H5N1 型、鳥インフルエンザに対するワクチンまたは抗	4256、4257。	特定の構造物について は、表 2 の配

【 0 0 7 8】

10

20

30

【表 1 - 2 1】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
(HK213: H5 N1)]	ス表面の糖タンパク質は、感染における 2 つの機能を有する: (i) 細胞受容体、糖タンパク質のシアル酸残基にウイルスを結合する、および (ii) エンドサイトーシスに続き、ウイルスおよび細胞膜の低 pH-誘発融合を介在し、細胞にウイルスゲノムの侵入を可能にする。すべてのインフルエンザウイルスは、2 つの表面糖タンパク質 (赤血球凝集素およびノイラミニダーゼ) を担持し、それらは、インフルエンザの特定株を定義する抗原である。時間と	Diagn. Lab. Immunol. 2003 May; 10(3):481-482により開示されるもの等の当該技術分野で周知のアッセイを用いて体外でアッセイされる。	原		列番号 Z を参照のこと。

【 0 0 7 9 】

10

20

30

【表 1 - 2 2】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
	共にこれらの分子の変異は、ウイルスにヒト免疫応答を回避させ、ひいては、毎年、新しいワクチンの製剤化を余儀なくさせる。赤血球凝集素は、シアル酸受容体結合分子であり、ウイルスの侵入を標的細胞に介在させる。				
ブチリルコリンエステラーゼ (BchE、血清コリンエステラーゼ、偽コリンエステラーゼ El (CHE 1))	ブチリルコリンエステラーゼは、コリン代謝を加速させる。非ヒト霊長類およびヒトにおける体外および生体内での効果。 Camona GN, Jufer RA, Goldberg SR, Gorelick DA, Greig NH, Yu QS, Cone EJ, Schindler CW.	BchE 活性アッセイ "Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride; recognition of two new phenotypes." Nature 191: 496-498, 1961. "A rare genetically determined variant of pseudocholinesterase in two German families with high plasma	コカインの過剰摂取の解毒、スキサメトニウム過敏症、および無呼吸	4258、4259,	特定の構築物については、表 2 の配列番号 Z を参照のこと。

【 0 0 8 0 】

10

20

30

【表 1 - 2 3】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
	Drug Metab Dispos. 2000 Mar;28(3):367-71. ブチリルコリンエステラーゼの不定型またはその活性の不在は、骨格筋弛緩剤の投与の後に遅延性無呼吸をもたらし、早期分化の広範囲に及ぶCHEIの発現は、このタンパク質のための発達関連機能を示唆する。	enzyme activity." Europ. J. Biochem. 99: 65-69, 1979. "Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency." Ann. Hum. Genet. 61:491-496, 1997.			
エンドセリン(ET-1; Genbank 寄託番号 NP 001946)	エンドセリンは、強力な血管収縮剤である。それは、高血圧疾患および心不全の不適切に上昇する。ETAおよびETBエンドセリン受容体に対する強力なアゴニスト。低酸素	エンドセリン-I誘発の血管収縮は、非選択性陽イオンチャネルを介して、Ca ²⁺ 流入により介在される。それは、エンドセリン受容体ETAおよびETBにより介在され、それらの両方は、Gタンパク質共役	CHF、肺高血圧症、高血圧、腎不全、エンドセリンアンタゴニズムは、癌および黄斑変性症の処置のための抗血管新生または抗腫瘍剤として有用であり得る任意の疾患。		配列番号781および782

【 0 0 8 1 】

10

20

30

【表 1 - 2 4】

治療タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療タンパク質 Z
	誘導因子1 α 、および、VEGFの産生の誘導する。	型受容体である。ア ンタゴニストは、ET- 1ペプチドにより介在 されたCa-流束を防ぐ 能力により特定され 得、Wong-Dusting et al, J. Cardiovasc. Pharmacol. (1991) 17:5236-5238、Ono et al., Nature (1994) 370:252- 253、 Koyama, Y. et al., Neuroscience (2000) 101:219-227、Russell, F.D. and Molenaar, P., Trends Pharmacol. Sci. (2000) 21:353-359、 Masaki, T. et al., Eur. J. Pharmacol. (1999) 375:133-138、Inoue, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:2863-2867、および Spinella, F. et al., J. Biol. Chem. (2002) 277:27850- 27855に開			

10

20

30

表 1

【 0 0 8 2 】

【表 1 - 2 5】

表 1

治療用タンパク質 X	生物学的活性	代表的活性アッセイ	好適な適応症 Y	構築物 ID	治療用タンパク質 Z
メカノ成長因子(MGF; IGF-IEc; Genbank寄託番号P05019)	加齢に伴い、失うと考えられる筋成長因子。神経保護薬として役立てることもできる。成熟IGF-Iとは異なり、MGFは、筋芽細胞の増殖を増大させる一方、末端分化を阻害する。	示されるもの等の当該技術分野で周知のアッセイを用いて、体外でアッセイされ得る。 筋芽細胞の増殖および分化は、 Dluzniewska et al, FASEB J. (2005) Sep 6; Goldspink G. J Musculoskelet Neuronal Interact. (2004) Jun;4(2):143- 7、またはYang SY and Goldspink G, FEBS Lett. (2002) Jul 3, 522(1-3):156-60に開示されるもの等の当該技術分野で周知のアッセイを用いて、体外でアッセイされ得る。	消耗病、悪液質、脳卒中、MI、CHF、神経保護作用または筋肉(骨格または平滑)保護もしくは再生が有用であり得る疾患		配列番号783および784

【 0 0 8 3 】

10

20

30

【表 2 - 1】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	説明	発現ベクタ	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	リダー配 列
1	3422	pSAC35:APsp.HSA.1 FN _a	成熟HSAおよびIFN _a が後に続く 酸性ホスファターゼシグナルペ プチド	pSAC35	192	117	267	342	343	酸性ホスフ ァターゼ
2	3423	pSAC35:INV sp.HSA.1 FN _a	成熟HSAおよびIFN _a が後に続く インベルターゼシグナルペプチ ド	pSAC35	193	118	268	344	345	インベルタ ーゼ
3	3424	pSAC35:KTsp.HSA.1 FN _a	成熟HSAおよびIFN _a が後に続く キラー トキシンシグナルペプチ ド	pSAC35	194	119	269	346	347	キラー トキ シン
4	2249	pSAC35:IFN _a 2- HSA:pSAC23:IFN□2- HSAとも言う	成熟HSAの上流およびHSA/kex2 リダー配列の下流に融合され た成熟IFN _a 2	pSAC35	195	120	270	348	349	HSA/kex2
5	2343	pSAC35:INV- IFN _a 2.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	196	121	271	350	351	インベルタ ーゼ
6	2366	pSAC35:MAF- IFN _a 2.HSA	成熟HSAの上流および酵母接合 因子アルファリダー配列の下 流に融合された成熟IFN _a 2	pSAC35	197	122	272	352	353	MAF-1

表 2

【 0 0 8 4 】

10

20

30

【表 2 - 2】

表 2

融合物番号	構築物ID	構築物名	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(C 17-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273のアミノ酸C1ないしE165)に示すようなフラグメント	pC4	198	123	273	354	355	HSA
8	2382	pC4:IFNa2-HSA	成熟HSAの上流に融合されたIFNa2	pC4	199	124	274	356	357	天然IFNa2リーダー
9	2410	pSAC35INV:IFNa-HSA	インペ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	200	125	275	358	359	インペルターゼ
10	3165	pSAC35:HSA,IFNa CID 3165, pSAC35:HSA,INFaとも言う	IFNaの上流およびHSA/kex2リーダーの下流に融合されたHSA	pSAC35	201	126	276	なし	なし	HSA/kex2
11	3476	pSAC35:GI9Ksp.HSA,IFNa	修飾HSA/kex2シグナル配列の後に、INFアルファが続く、その後に、成熟HSAが続く	pSAC35	202	127	277	360	361	修飾HSA/Kex2
12	3690	pC4:MPIFSP.BNP/HS A	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	203	128	278	362	363	MPIF-1
13	3691	pC4:SPCON.BNP/HS A	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	204	129	279	364	365	コンセンサス

【 0 0 8 5 】

10

20

30

【表 2 - 3】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	リーダ配 列
14	3715	pSAC35:BNP29/HSA .S65	HSA(S65-L585)のN末端に融合さ れたヒトBNPの単一コピー(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	205	130	280	366	367	HSA/Kex2
15	3723	pEE12.1:MPIFSP.BN P/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	206	131	281	なし	なし	MPIF-1
16	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	pEE12.1	207	132	282	なし	なし	コンセンサ ス
17	3725	pEE12.1:SPCON2.BN P/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	pEE12.1	208	133	283	なし	なし	コンセンサ スシグナル ペプチド#2
18	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	pC4	209	134	284	368	369	コンセンサ スシグナル ペプチド#2
19	3769	pC4:BNP(R13G)/HS A	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	210	135	285	370	371	MPIF-1

【 0 0 8 6 】

10

20

30

【表 2 - 4】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
20	3778	pC4:SPCON.BNP29/ HSA.S65	HSA(S65-LS85)のN末端に融合さ れたヒトBNPの単一コピー(アミ ノ酸1-29)。HSA N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	211	136	286	372	373	コンセンサ ス
21	3783	pC4:SPCON.BNP(R 13G)/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(MPlP)シ グナル配列	pC4	212	137	287	374	375	コンセンサ ス
22	3795	pC4:SPCON.BNP(K 14G)/HSA	成熟HSAのN末端に融合された BNP変異(K14G)が後に続くコン センサスシグナル配列	pC4	213	138	288	376	377	コンセンサ ス
23	3796	pSAC35:HSA/BNP	BNPのN末端に融合された成熟 HSAが後に続く	pSAC35	214	139	289	378	379	HSA/Kex2
24	3809	pSAC35:BNP30(GG G)/HSA	成熟HSAのN末端に三つからな 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	215	140	290	380	381	HSA/Kex2
25	3886	pSAC35:HSA/KEX2 LANP.HSA	成熟HSAのN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 291(以後、LANPと言う)のアミ ノ酸26-55に対応する。	pSAC35	216	141	291	なし	なし	HSA/Kex2

表 2

【 0 0 8 7 】

10

20

30

【表 2 - 5】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	リーダ一配 列
26	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	217	142	292	なし	なし	HSA/Kex2
27	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 293(以後、VDPと言う)のアミノ 酸56-92に対応する。	pSAC35	218	143	293	なし	なし	HSA/Kex2
28	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	219	144	294	なし	なし	HSA/Kex2
29	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 295(以後、KUPと言う)のアミノ 酸104-123に対応する。	pSAC35	220	145	295	なし	なし	HSA/Kex2
30	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	221	146	296	なし	なし	HSA/Kex2
31	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 297(以後、KUPと言う)のアミノ 酸105-123に対応する。	pSAC35	222	147	297	なし	なし	HSA/Kex2.

【 0 0 8 8 】

10

20

30

【表 2 - 6】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
32	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	223	148	298	なし	なし	HSA/Kex2
33	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	224	149	299	なし	なし	HSA/Kex2
34	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	225	150	300	なし	なし	HSA/Kex2
35	3618	pC4:SPCON.BNP1- 32(2x)/HSA	成熟HSAのN末端に融合された 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	226	151	301	382	383	コンセンサ ス
36	3484	pSAC35:ANP/HSA	成熟HSAが後に続く心房性ナト リウム利尿ペプチドが後に続く HSA/kex2リーダー	pSAC35	227	152	302	384	385	HSA/kex2
37	1933	pSAC35:HCC-IT20- N93: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HCC-1のアミノ酸T20ないし N93	pSAC35	228	153	303	386	387	HSA/kex2

【 0 0 8 9 】

10

20

30

【表 2 - 7】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	リーダ配 列
38	1934	pSAC35:HCC- 1.C.O.T20-N93:HSA	成熟HSAの上流およびHSA/kex2 リーダ配列の下流に融合され たHCC-1のアミノ酸T20ないし N93。DNA配列は、酵母発現の ために最適化されたコードンであ る。	pSAC35	229	154	304	388	389	HSA/kex2
39	1947	pSAC35:d8HCC- 1.G28-N93:HSA	成熟HSAの上流およびHSA/kex2 リーダ配列の下流に融合され たHCC-1のアミノ酸G28ないし N93。	pSAC35	230	155	305	390	391	HSA/kex2
40	1948	pSAC35:d8HCC- 1.C.O.G28-N93:HSA	成熟HSAの上流およびHSA/kex2 リーダ配列の下流に融合され たHCC-1のアミノ酸G28ないし N93。DNA配列は、酵母発現に 対して最適化されたコードンであ る。	pSAC35	231	156	306	392	393	HSA/kex2
41	1955	pSAC35:t9HCC- 1.G28-N93:spcHSA	16アミノ酸スペーサーおよび成 熟HSAの上流ならびにHSA/kex2 リーダ配列の下流に融合され たHCC-1のアミノ酸G28ないし N93	pSAC35	232	157	307	394	395	HSA/kex2
42	1998	pC4:CKB 1.G28- N93:HSA	成熟HSAの上流およびHSAリー ダ配列の下流に融合された Ckβ1のアミノ酸G28ないしN93	pC4	233	158	308	396	397	HSA

表 2

【 0 0 9 0 】

10

20

30

【表 2 - 8】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	リーダ配 列
38	1934	pSAC35:HCC- 1.C.O.T20-N93:HSA	成熟HSAの上流およびHSA/kex2 リーダ配列の下流に融合され たHCC-1のアミノ酸T20ないし N93。DNA配列は、酵母発現の ために最適化されたコードンであ る。	pSAC35	229	154	304	388	389	HSA/kex2
39	1947	pSAC35:d8HCC- 1.G28-N93:HSA	成熟HSAの上流およびHSA/kex2 リーダ配列の下流に融合され たHCC-1のアミノ酸G28ないし N93。	pSAC35	230	155	305	390	391	HSA/kex2
40	1948	pSAC35:d8HCC- 1.C.O.G28-N93:HSA	成熟HSAの上流およびHSA/kex2 リーダ配列の下流に融合され たHCC-1のアミノ酸G28ないし N93。DNA配列は、酵母発現に 対して最適化されたコードンであ る。	pSAC35	231	156	306	392	393	HSA/kex2
41	1955	pSAC35:t9HCC- 1.G28-N93:spcHSA	16アミノ酸スペーサーおよび成 熟HSAの上流ならびにHSA/kex2 リーダ配列の下流に融合され たHCC-1のアミノ酸G28ないし N93	pSAC35	232	157	307	394	395	HSA/kex2
42	1998	pC4:CKB 1.G28- N93:HSA	成熟HSAの上流およびHSAリー ダ配列の下流に融合された Ckb1のアミノ酸G28ないしN93	pC4	233	158	308	396	397	HSA

表 2

【 0 0 9 1 】

10

20

30

【表 2 - 9】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	説明	発現ベクタ	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	2355	pSAC35:MATalpha. d8ckbetal.G28- N93: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Ckβ1のアミノ酸 G28ないしN93	pSAC35	234	159	309	398	399	MFO-1
44	2412	pSAC35:delKEX.d8c kbetal.G28- N93:HSA	HSAシグナル配列(リーダーの最 後の6個のアミノ酸が欠失した KEX部位を有する)の下流および 成熟HSAの上流に融合されたCk ペーダー1のアミノ酸G28ないし N93	pSAC35	235	160	310	400	401	HSA minus the KEX site
45	2449	pSAC35:INV.d8CKB 1.G28-N93:HSA	インペ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Ckペーダー1のアミ ノ酸G28ないしN93	pSAC35	236	161	311	402	403	インペルター ゼ
46	2837	pSAC35:CKB 1.K21- N93: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 CKB1のK21-N93(配列番号1735 のK2ないしN74として示すフラ グメント)	pScCHSA	237	162	312	404	405	HSA/kex2
47	2838	pSAC35:CKB 1.T22- N93: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 CKB1のT22-N93(配列番号1736 のT3ないしN74として示される フラグメント)	pScCHSA	238	163	313	406	407	HSA/kex2

【 0 0 9 2 】

10

20

30

【表 2 - 1 0】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	2839	pSAC35:CKB 1.E23- N93:HSA	HSA/kex2リーダ---の下流および 成熟HSAの上流に融合された CKB1のE23-N93(配列番号1737 のE4ないしN74として示される フラグメント)	pScCHSA	239	164	314	408	409	HSA/kex2
49	2840	pSAC35:CKB 1.S24- N93:HSA	HSA/kex2リーダ---の下流および 成熟HSAの上流に融合された CKB1のS24-N93(配列番号1738の S5ないしN74として示されるフ ラグメント)	pScCHSA	240	165	315	410	411	HSA/kex2
50	2841	pSAC35:CKB 1.S25- N93:HSA	HSA/kex2リーダ---の下流および 成熟HSAの上流に融合された CKB1のS25-N93(配列番号1739の S6ないしN74として示されるフ ラグメント)	pScCHSA	241	166	316	412	413	HSA/kex2
51	2842	pSAC35:CKB 1.S26- N93:HSA	HSA/kex2リーダ---の下流および 成熟HSAの上流に融合された CKB1のS26-N93(配列番号1740の S7ないしN74として示されるフ ラグメント)	pScCHSA	242	167	317	414	415	HSA/kex2

【 0 0 9 3 】

10

20

30

【表 2 - 1 1】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	リダー配 列
52	2843	pSAC35:CKB1.R27- N93:HSA	HSA/kex2リダーの下流および 成熟HSAの上流に融合された CKB1のR27-N93(配列番号1741 のR8ないしN74として示される フラグメント)	pScCHSA	243	168	318	416	417	HSA/kex2
53	2844	pSAC35:CKB1.P29- N93:HSA	HSA/kex2リダーの下流および 成熟HSAの上流に融合された CKB1のP29-N93(配列番号1742の P10ないしN74として示されるフ ラグメント)	pScCHSA	244	169	319	418	419	HSA/kex2
54	2845	pSAC35:CKB1.Y30- N93:HSA	HSA/kex2リダーの下流および 成熟HSAの上流に融合された CKB1のY30-N93(配列番号1743 のY11ないしN74として示される フラグメント)	pScCHSA	245	170	320	420	421	HSA/kex2
55	2849	pC4.MPIFsp:CKB1. G28-N93:HSA	MPIF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CKB1のG28-N93(配列番号 1744のG9ないしN74として示さ れるフラグメント)	pC4	246	171	321	422	423	MPIF

表 2

【 0 0 9 4 】

10

20

30

【表 2 - 1 2】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
56	2947	pSAC: CKb- 188(x2):HSA	インベルターゼシグナルペプチ ドの後に、全長CKβ1のアミノ酸 G28-N93(配列番号1769)が続き、 タンデムに反復され、成熟HSA が続く。	pSAC35	247	172	322	424	425	インベルタ ーゼ
57	3066	pSAC35:CKb- 148.GLP-1(7- 36):HSA	インベルターゼシグナルペプチ ドの後に、全長CKβ1のアミノ酸 G28-N9(配列番号1788)が続き、 その後に、GLP-1(7-36)が続き、 成熟HSAが続く。	pScCHSA	248	173	323	426	427	インベルタ ーゼ
58	3105	pSAC35:INV.19HCC- 1.G28-N93:spc.HSA	インベルターゼシグナルペプチ ドの後にHCC-1のアミノ酸G28 ないしN93が続き、スペーサー の上流および成熟HSAに融合さ れる。	pSAC35	249	174	324	428	429	インベルタ ーゼ
59	3124	pSAC35:INV.CKβ1. P29-N93:HSA	インベルターゼシグナルペプチ ドの後に、全長ckベータ1のアミ ノ酸29～93が続き、HSAのN末 端に融合される。	pSAC35	250	175	325	430	431	インベルタ ーゼ
60	3125	pSAC35:INV.CKb- 1.R27-N93:HSA	インベルターゼシグナルペプチ ドの後に全長ckベータ1のアミノ 酸27～93が続き、HSAのN末端 に融合される。	pSAC35	251	176	326	432	433	インベルタ ーゼ

【 0 0 9 5】

10

20

30

【表 2 - 1 3】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
61	3139	pSAC35:INV.CKB1. G28- N93.DAHK.HSA	インペルターゼシグナルペプチ ドの後に、全長ckペター1(例え ば、配列番号1788参照)のアミノ 酸G28-N93が続く、HSAのN末端 由来の16アミノ酸リンカーが続 き、成熟HSAが続く。	pSAC35	252	177	327	434	435	インペルタ ーゼ
62	3152	pSAC35:INV.CKB1. Met.R27-N93.HSA	インペルターゼシグナルペプチ ドの後に、Metが続き、その後 に、全長CKFB1のアミノ酸R27- N93が続き、成熟HSAが続く。	pSAC35	253	178	328	436	437	インペルタ ーゼ
63	3153	pSAC35:INV.CKB1. Met.S26-N93.HSA	インペルターゼシグナルペプチ ドの後に、Metが続き、その後 に、全長CKFB1のアミノ酸S26- N93が続き、成熟HSAが続く。	pSAC35	254	179	329	438	439	インペルタ ーゼ
64	3154	pSAC35:INV.CKB1. Met.S25-N93.HSA	インペルターゼシグナルペプチ ドの後に、Metが続き、その後 に、全長CKFB1のアミノ酸S25- N93が続き、成熟HSAが続く。	pSAC35	255	180	330	440	441	インペルタ ーゼ
65	3155	pSAC35:INV.CKB1. Met.G28-N93.HSA	インペルターゼシグナルペプチ ドの後に、Metが続き、その後 に、全長CKFB1のアミノ酸G28- N93が続き、成熟HSAが続く。	pSAC35	256	181	331	442	443	インペルタ ーゼ

【 0 0 9 6 】

10

20

30

【表 2 - 1 4】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	リダー配 列
66	3156	pSAC35:INV:CKB1. Met.P29-N93.HSA	インペルターゼシグナルペプチ ドの後に、Metが続き、その後 に、全長CKFβ1のアミノ酸P29- N93が続き、成熟HSAが続く。	pSAC35	257	182	332	444	445	インペルタ ーゼ
67	3169	pSAC35:KT:CKB1. G28-N93.HSA	CKB1のアミノ酸G28ないし N93(配列番号1822のアミノ酸G1 ないしとして示されるフラグメン ト)および成熟HSAの上流に融 合されたキラー毒素シグナル配 列	pSAC35	258	183	333	なし	なし	キラー毒素
68	3170	pSAC35:KT:HA:CK B1.G28-N93.HSA	キラー毒素シグナル配列の後 に、HA ジペプチドおよびCKB1 のアミノ酸G28ないしN93(配列 番号1823のアミノ酸G1ないし N66として示されるフラグメン ト)および成熟HSAが続く。	pSAC35	259	184	334	なし	なし	キラー毒素
69	3202	pSAC35:API:d8CKb1 /HSA	HSA/kex2 リダーの後に、アミ ノ酸「API」が続き、その後 に、d8CKb1および成熟HSAが続 く。CKB1のデルタ8の配列は、 配列番号1833において示され る。	pSAC35	260	185	335	446	447	HSA/kex2

【 0 0 9 7 】

10

20

30

【表 2 - 1 5】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
70	3203	pSAC35:ASL.d8CKb l/HSA	HSA/kex2リーダーの後に、アミ ノ酸「ASL」が続き、その後 に、d8CKb1および成熟HSAが続 く。	pSAC35	261	186	336	448	449	HSA/kex2
71	3204	pSAC35:SPY.d8CKb l/HSA	HSA/kex2リーダーの後に、アミ ノ酸「SPY」が続き、その後 に、d8CKb1および成熟HSAが続 く。	pSAC35	262	187	337	450	451	HSA/kex2
72	3205	pSAC35:MSPY.d8CK b1/HSA	HSA/kex2リーダーの後に、アミ ノ酸「MSPY」が続き、その後 に、d8CKb1および成熟HSAが続 く。	pSAC35	263	188	338	452	453	HSA/kex2
73	3206	pSAC35:CPYSC.d8 CKb1/HSA	HSA/kex2リーダーの後に、5ア ミノ酸リンカーが続き、その後 に、d8CKb1および成熟HSAが続 く。	pSAC35	264	189	339	454	455	HSA/kex2
74	3207	pSAC35:GPY.d8CK b1/HSA	HSA/kex2リーダーの後に、アミ ノ酸「GPY」が続き、その後 に、d8CKb1および成熟HSAが続 く。	pSAC35	265	190	340	456	457	HSA/kex2
75	3272	pSAC35:INV:(D)8C K(b1(x2)/HSA	CKbeta-1のタンデムリピート (x2)の、HSAのN末端に対する融 合体。インペルターゼシグナル ペプチド下。	pSAC35	266	191	341	458	459	インペルター ゼ

【 0 0 9 8 】

10

20

30

【表 2 - 1 6】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
76	3692	pC4:MPIFSP.cynoB NP/CSA	骨髄系前駆細胞阻害因子- 1(MPIF-1)シグナル配列の後に、 カニクイザル血清アルブミンの N末端に融合されたカニクイザ ルBNPが続く。	pC4 (哺乳類)	496	460	532	568	569	MPIF-1
77	3716	pC4:ratBNP45/RSA	HSA リーダー配列のブレプロ領 域の後に、ラット血清アルブミ ンのN末端で融合されたラット BNP(1-45)が続く。	pC4 (哺乳 類)	497	461	533	570	571	HSA
78	3741	pC4:MPIFSP.ratBNP 45/RSA	骨髄系前駆細胞阻害因子- 1(MPIF-1)シグナル配列の後に、 ラット血清アルブミンのN末端 で融合されたラットBNP(1-45)が 続く。	pC4 (哺乳類)	498	462	534	572	573	MPIF-1
79	3956	pSAC35:BNP(K3- H32).HSA	HSA/Kex2シグナル配列の後に、 成熟HSAのN末端で融合された BNP(アミノ酸3-32)が続く。	pSAC35	499	463	535	574	575	HSA/Kex2
80	3957	pSAC35:BNP(K3- R30).GGG.HSA	HSA/Kex2シグナル配列の後に、 成熟HSAのN末端への三部構造 を有するグリシンにより融合さ れたBNP(アミノ酸3-30)が続く。	pSAC35	500	464	536	576	577	HSA/Kex2
81	3959	pSAC35:HSA.BNP(S H-L29)	HSA/Kex2シグナル配列の後に、 そのC末端でBNP(アミノ酸1-29) に融合された成熟HSAが続く。	pSAC35	501	465	537	578	579	HSA/Kex2

【 0 0 9 9 】

10

20

30

【表 2 - 1 7】

表 2

【 0 1 0 0 】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	リーダ配 列
82	3960	pSAC35:HSA.IFNalp ha2a	HSA/Kex2シグナル配列の後に、 そのC末端でインターフェロン アルファ2aに融合された成熟 HSAが続く。	pSAC35	502	466	538	580	581	HSA/Kex2
83	3961	pSAC35:HSA.(BNP(S 1-L29))x2	HSA/Kex2シグナル配列の後に、 そのC末端でBNP(アミノ酸1-29) の2つのタンデムコピーに融合 された成熟HSAが続く。	pSAC35	503	467	539	582	583	HSA/Kex2
84	3962	pcDNA3.1-BNP(1- 32).HSA	プレプロ領域のHSAシグナル配 列の後に、成熟HSAのN末端で 融合されたBNP(アミノ酸1-32)が 続く。	pcDNA3.1	504	468	540	なし	なし	HSA
85	3965	pSAC35:HSA.BNP(S 1-R30)	HSA/Kex2シグナル配列の後に、 そのC末端でBNP(アミノ酸1-30) に融合された成熟HSAが続く。	pSAC35	505	469	541	584	585	HSA/Kex-2
86	3966	pSAC35:HSA.BNP(S 1-R31)	HSA/Kex2シグナル配列の後に、 そのC末端でBNP(アミノ酸1-31) に融合された成熟HSAが続く。	pSAC35	506	470	542	586	587	HSA/Kex-2
87	3967	pSAC35:HSA.sp.BN P(S 1-H32).HSA	HSAシグナル配列のプレ領域の 後に、成熟HSAのN末端に融合 されたBNP(アミノ酸1-32)が続 く。	pSAC35	507	471	543	なし	なし	HSA

10

20

30

【表 2 - 1 8】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	3968	pSAC35:INVsp.BNP (S1-H32).HSA	インベルターゼシグナルペプチ ドの後に、成熟HSAのN末端に 融合されたBNP(アミノ酸1-32) が続く。		508	472	544	588	589	インベルタ ーゼ
89	3970	pSAC35:INVsp.CKB I(T20- N93)(E34A).HSA	インベルターゼシグナルペプチ ドの後に、成熟HSAのN末端に 融合された成熟変異体CKベータ I(アミノ酸20-93(E34A))が続 く。	pSAC35	509	473	545	590	591	インベルタ ーゼ
90	4005	pSAC35:BNP(S1- R30).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、成熟HSAのN末端に融合さ れたBNP(アミノ酸1-30)が続く。	pSAC35	510	474	546	なし	なし	HSA/Kex-2
91	4006	pSAC35:BNP(S1- R30).HSA(D25- E40).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、HSA(アミノ酸25-40)由来の 16アミノ酸リンカーにより成熟 HSAのN末端に融合された BNP(アミノ酸1-30)が続く。	pSAC35	511	475	547	なし	なし	HSA/Kex-2
92	4007	pSAC35:BNP(S1- R30).HSA(D25- Q56).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、HSA (アミノ酸25-56)由来の 32アミノ酸リンカーにより成熟 HSAのN末端に融合された BNP(アミノ酸1-30)が続く。	pSAC35	512	476	548	なし	なし	HSA/Kex-2

【 0 1 0 1】

10

20

30

【表 2 - 1 9】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	説明	発現ベクタ ---	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	4062	pcDNA3.1:MPIF.sp. HSA.BNP(S1-H32)	骨髄系前駆細胞阻害因子- I(MPIF-1)シグナル配列の後に、 そのC末端でBNPに融合された 成熟HSAが続く。	pCDNA3.1-	513	477	549	なし	なし	MPIF-1
94	4130	pSAC35:HSA (C34S)- BNP (1-29)	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端でBNPに融合さ れた成熟HSA(C34S)が続く。	pSAC35	514	478	550	なし	なし	HSA/Kex-2
95	4160	pSAC35:BNP(S1- R30:P2A).HSA	HSA/Kex-2の後に、成熟HSAの N末端に融合された変異BNP(ア ミノ酸1-30(P2A))が続く。	pSAC35	515	479	551	なし	なし	HSA/Kex-2
96	4161	pSAC35:BNP(S1- R30:P2L).HSA	HSA/Kex-2の後に、成熟HSAの N末端に融合された変異BNP(ア ミノ酸1-30(P2L))が続く。	pSAC35	516	480	552	なし	なし	HSA/Kex-2
97	4167	pSAC35:DSA.dogB NP(1-32)	修飾HSA/Kex-2シグナル配列の 後に、そのC末端でイヌBNP(ア ミノ酸1-32)に融合されたイヌ血 清アルブミンが続く。	pSAC35	517	481	553	なし	なし	修飾 HSA/Kex-2
98	4168	pSAC35:DSA.dogB NP(1-29)	修飾HSA/Kex-2シグナル配列の 後に、そのC末端でBNP(アミノ 酸1-29)に融合されたイヌ血清ア ルブミンが続く。	pSAC35	518	482	554	なし	なし	修飾 HSA/Kex-2

10

20

30

表 2

【 0 1 0 2 】

【表 2 - 2 0】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	説明	発現ベクタ	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	リーダ配 列
99	4169	pSAC35:KTsp.CSA. cynoBNP(1-29)	キラー毒素シグナル配列の後に、そのC末端でサルBNP(1-29)に融合されたカニクイザル血清が続く。	pSAC35	519	483	555	なし	なし	キラー毒素
100	4170	pSAC35:KTsp.RSA.r auBNP(1-45)	キラー毒素シグナル配列の後に、そのC末端でラットBNP(アミノ酸1-45)に融合されたラット血清アルブミンが続く。	pSAC35	520	484	556	なし	なし	キラー毒素
101	4171	pSAC35:KTsp.RSA.r auBNP(14-42)	キラー毒素シグナル配列の後に、そのC末端でラットBNP(アミノ酸14-42)に融合されたラット血清アルブミンが続く。	pSAC35	521	485	557	なし	なし	キラー毒素
102	4172	pSAC35:MSA.mouse BNP(1-45)	インベルターゼシグナル配列の後に、そのC末端でマウスBNP(アミノ酸1-45)に融合されたマウス血清アルブミンが続く。	pSAC35	522	486	558	なし	なし	インベルターゼ
103	4173	pc4HSA:HSA.2xベータ デフェンシン-2	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、そのC末端でベータデフェンシン-2の2つのタンデムコピーに融合された成熟HSAが続く。	pc4 (哺乳類)	523	487	559	592	593	HSA

表 2

【 0 1 0 3 】

10

20

30

【表 2 - 2 1】

表 2

融合物番号	構築物ID	構築物名	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
104	4174	pSAC35:ANP.HSA.BNP(S1-L29)	HSA/Kex-2シグナル配列の後、成熟HSAのN末端に融合された成熟ANPおよび成熟HSAのC末端に融合されたBNP(アミノ酸1-29)が続く。	pSAC35	524	488	560	594	595	HSA/Kex-2
105	4175	pc4HSA:HSA.ペーターデフエンシン-2	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、そのC末端でペーターデフエンシン-2に融合された成熟HSAが続く。	pc4 (哺乳類)	525	489	561	596	597	HSA
106	4176	pc4HSA:HSA.Sp.ペーターデフエンシン-2.HSA	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、成熟HSAのN末端に融合されたペーターデフエンシン-2が続く。	pc4 (哺乳類)	526	490	562	598	599	HSA
107	4177	pc4HSA:HSA.Sp.2xペーターデフエンシン-2.HSA	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、成熟HSAのN末端に融合されたペーターデフエンシン-2の2つのタンデムコピーが続く。	pc4 (哺乳類)	527	491	563	600	601	HSA
108	4178	pSAC35:KEX2.2xペーターデフエンシン-2.HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後、成熟HSAのN末端に融合されたペーターデフエンシン-2の2つのタンデムコピーが続く。	pSAC35	528	492	564	なし	なし	HSA/Kex-2

【 0 1 0 4 】

10

20

30

【表 2 - 2 2】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	説明	発現ベクタ	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
109	4179	pSAC35:KEX2.ベ ータデフエンシン -2.HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、成熟HSAのN末端に融合さ れたベータデフエンシン-2が続 く。	pSAC35	529	493	565	なし	なし	HSA/Kex-2
110	4180	pSAC35:HSA.ベータ デフエンシン-2	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端でベータデフエ ンシンに融合された成熟HSAが 続く。	pSAC35	530	494	566	なし	なし	HSA/Kex-2
111	4181	pSAC35:HSA.2x.ベ ータデフエンシン-2	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端でベータデフエ ンシン-2の2つのタンデムコピ ーに融合された成熟HSAが続 く。	pSAC35	531	495	567	なし	なし	HSA/Kex-2
112	4191	pSAC35:HSA.Fractal kine.Q25-G 100	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端で可溶性フラク タルカイン(アミノ酸25-100)に 融合された成熟HSAが続く。	pSAC35	641	602	680	なし	なし	HSA/Kex-2
113	4192	pSAC35:Fractalkine. Q25-G 100.HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、成熟HSAのN末端に融合さ れた可溶性フラクタルカイン(ア ミノ酸25-100)が続く。	pSAC35	642	603	681	なし	なし	HSA/Kex-2

【 0 1 0 5】

10

20

30

【表 2 - 2 3】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	説明	発現ベクタ	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
114	4193	pSAC35:Fractalkine. Q25- G100(R48Q).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、成熟HSAのN末端に融合さ れた可溶性変異フラクタルカイ ン(アミノ酸25-100(全長フラク タルカインのR71Qに対応する R48Q))が続く。	pSAC35	643	604	682	なし	なし	HSA/Kex-2
115	4194	pSAC35:Fractalkine. V29-G100.HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端でフラクタルカ イン(アミノ酸29-100)の可溶性 ドミナントネガティブ型に融合 された成熟HSAが続く。	pSAC35	644	605	683	なし	なし	HSA/Kex-2
116	4213	pSAC35:INVsp.OXM. HSA	インベルターゼシグナル配列の 後に、HSAのN末端に融合され た全長オキシシントモジュリンが 続く。	pSAC35	645	606	684	なし	なし	インベルタ ーゼ
117	4215	pSAC35:INVsp.PYY 3-36.HSA(D25- E40).HSA.OXM	インベルターゼシグナル配列の 後に、HSA(アミノ酸25-40)由来 の16アミノ酸リンカーを介して 成熟HSA(そのC末端で全長オ キシシントモジュリンに融合され た)のN末端に融合された PYY(アミノ酸3-36)が続く。	pSAC35	646	607	685	719	720	インベルタ ーゼ

表 2

【 0 1 0 6 】

10

20

30

【表 2 - 2 4】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
118	4217	pC4:HSA.OXM	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、そのC末端で全長オキシントモジュリンに融合された成熟HSAが続く。	pC4 (哺乳類)	647	608	686	721	722	HSA
119	4227	pSAC35:Invsp.KP.HSA(D25-E40).HSA	インベルターゼシグナル配列の後に、HSA(アミノ酸25-40)由来の16アミノ酸リンカーを介して成熟HSAに融合されたキラー毒素ペプチドが続く。	pSAC35	648	609	687	なし	なし	インベルターゼ
120	4232	pCDNA3.1+ HSA.OXM	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、そのC末端で全長オキシントモジュリンに融合された成熟HSAが続く。	pCDNA3.1+	649	610	688	なし	なし	HSA
121	4233	pSAC35:KEX2.TIM P4.C30-G157.HSA	HSA/Kex-2リーダー配列の後に、成熟HSAのN末端に融合されたC末端切断型の成熟TIMP4(アミノ酸30-157)が続く。	pSAC35	650	611	689	723	724	HSA/Kex-2
122	4234	pSAC35:HSA.TIMP. C30-G 157	HSA/Kex-2リーダー配列の後に、そのC末端でC末端切断型の成熟TIMP4(アミノ酸30-157)に融合された成熟HSAが続く。	pSAC35	651	612	690	725	726	HSA/Kex-2

【 0 1 0 7 】

10

20

30

【表 2 - 2 5】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
123	4235	pC4:HSA.2x(PYY 3-36)	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、そのC末端でPYY(アミノ酸 3-36)のタンデムコピーに融合された成熟HSAが続く。	pC4 (哺乳類)	652	613	691	なし	なし	HSA
124	4236	pC4:SPCON2sp.PYY(3-36).HSA	コンセンサスシグナル配列の後に、成熟HSAのN末端に融合されたPYY(アミノ酸3-36)が続く。	pC4 (哺乳類)	653	614	692	727	なし	コンセンサス
125	4239	pSAC35: [HSA/KEX(RI9G)]sp.ADM.HSA	修飾HSA/Kex-2リーダー配列の後に、成熟HSAのN末端に融合されたアダメデュリンが続く。	pSAC35	654	615	693	なし	なし	修飾HSA/Kex
126	4240	pC4:SPCON2sp.OXM.HSA	コンセンサスシグナル配列の後に、成熟HSAのN末端に融合されたオキシントモジュリンが続く。	pC4 (哺乳類)	655	616	694	なし	なし	コンセンサス
127	4241	pC4: HSA.グレリン	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、そのC末端でグレリンに融合された成熟HSAが続く。	pC4 (哺乳類)	656	617	695	728	729	HSA
128	4242	pSAC35: HSA.グレリン	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、そのC末端でグレリンに融合された成熟HSAが続く。	pSAC35	657	618	696	730	731	HSA

10

20

30

表 2

【 0 1 0 8 】

【表 2 - 2 6】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
129	4246	pSAC35:CGRP(V8- F37).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、成熟HSAにN末端に融合さ れた切断型のCGRP(アミノ酸8- 37)が続く。	pSAC35	658	619	697	なし	なし	HSA/Kex-2
130	4247	pSAC35:HSA.CGRP (V8-F37)	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端で切断型の CGRP(アミノ酸8-37)に融合され た成熟HSAが続く。	pSAC35	659	620	698	なし	なし	HSA/Kex-2
131	4248	pSAC35:CGRP(L12- F37).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、成熟HSAの切断型のN末端 に融合されたCGRP(アミノ酸12- 37)が続く。	pSAC35	660	621	699	なし	なし	HSA/Kex-2
132	4249	pSAC35:HSA.CGRP (L12-F37)	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端で切断型の CGRP(アミノ酸12-37)に融合さ れた成熟HSAが続く。	pSAC35	661	622	700	なし	なし	HSA/Kex-2
133	4251	pSAC35:HSA.IGF1(G 49-M153)	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端で成熟型の IGF1(アミノ酸49-153)に融合さ れた成熟HSAが続く。	pSAC35	662	623	701	なし	なし	HSA/Kex-2
134	4252	pSAC35:IGF1(G49- M153).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、成熟HSAのN末端に融合さ れた成熟型のIGF1(アミノ酸49- 153)が続く。	pSAC35	663	624	702	なし	なし	HSA/Kex-2

表 2

【 0 1 0 9 】

10

20

30

【表 2 - 2 7】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
135	4253	pC4:SPCON2.OXM. OXM.HSA	コンセンサスシグナル配列の後 に、成熟HSAのN末端に融合さ れたオキシントモジュリンの2 つのタンデムコピーが続く。	pC4 (哺乳 類)	664	625	703	なし	なし	コンセンサ ス
136	4254	pSAC35:NA(S35- K469).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、Gly-Serリンカー (GGGGSGGGSGG)を介して成 熟HSAのN末端に融合されたイ ンフルエンザA/ホソコン /213/03(HK213:H5N1)由来のN末 端切断型のノイラミニダーゼ(ア ミノ酸35-469)が続く。	pSAC35	665	626	704	なし	なし	HSA/Kex-2
137	4255	pC4:SPCON2:NA(S35- K469).HSA	コンセンサスシグナル配列の後 に、Gly-Serリンカー (GGGGSGGGSGG)を介して成 熟HSAのN末端に融合されたイ ンフルエンザA/ホソコン /213/03(HK213:H5N1)由来のN末 端切断型のノイラミニダーゼ(ア ミノ酸35-469)が続く。	pC4 (哺乳 類)	666	627	705	なし	なし	コンセンサ ス

表 2

【 0 1 1 0 】

10

20

30

【表 2 - 2 8】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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
138	4256	pSAC35:HA(D17- Q531).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、Gly-Serリンカー (GGGGSGGGSGG)を介して成 熟HSAのN末端に融合された、 シグナルペプチドおよびC末端 疎水性ドメインを欠失している インフルエンザA/ホンコン /213/03(HK213;H5N1)由来の切断 型の赤血球凝集素(アミノ酸17- 531)が続く。	pSAC35	667	628	706	なし	なし	HSA/Kex-2
139	4257	pC4:SPCON2:HA(D1 7-Q531).HSA	pC4:SPCON2:HA(D17- Q531).HSA に、Gly-Serリンカー (GGGGSGGGSGG)を介して成 熟HSAのN末端に融合された、 シグナルペプチドおよびC末端 疎水性ドメインを欠失している インフルエンザA/ホンコン /213/03(HK213;H5N1)由来の切断 型の赤血球凝集素(アミノ酸17- 531)が続く。	pC4 (哺乳 類)	668	629	707	なし	なし	コンセンサ ス

10

20

30

表 2

【 0 1 1 1 】

【表 2 - 2 9】

表 2

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	リーダ配 列
140	4258	pSAC35:BChE(E29- V557).HSA	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、成熟HSAのN末端に融合さ れたブチリルコリンエステラー ゼ(BChE)(アミノ酸39- 529(A356W、Y360A、N45Q、 N483Q、N509Q、および N514Q))が続く。	pSAC35	669	630	708	なし	なし	HSA/Kex-2
141	4259	pC4:SPCON2.BChE(E29-V557).HSA	コンセンサスシグナル配列の後 に、成熟HSAのN末端に融合さ れたブチリルコリンエステラー ゼ(BChE)(アミノ酸39- 529(A356W、Y360A、N45Q、 N483Q、N509Q、および N514Q))が続く。	pC4 (哺乳 類)	670	631	709	なし	なし	コンセンサ ス
142	4260	pC4:HSA.ADM (Y1- G53)	プレプロ領域のHSAシグナル配 列の後に、そのC末端でさらに グリシン残基を含有するアデノ メデユリン(アミノ酸1-53)に融 合された成熟HSAが続く。	pC4 (哺乳 類)	671	632	710	なし	なし	HSA
143	4261	pSAC35:HSA.ADM (Y1-G53)	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端でさらにグリシ ン残基を含有するアデノメデユ リン(アミノ酸1-53)に融合され た成熟HSAが続く。	pSAC35	672	633	711	なし	なし	HSA/Kex-2

【 0 1 1 2 】

10

20

30

【表 2 - 3 0】

融合物番号	構築物ID	構築物名	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	リダー配列
144	4262	pC4:HSA.PYY(13-G37)	プレプロ領域のHSAシグナル配列の後に、そのC末端でさらにグリシン残基を含有するPYY(アミノ酸3-37)に融合された成熟HSAが続く。	pC4 (哺乳類)	673	634	712	なし	なし	HSA
145	4267	pSAC35:HSA.PYY(13-G37)	HSA/Kex-2シグナル配列の後に、そのC末端でさらにグリシン残基を含有するPYY(アミノ酸3-37)に融合された成熟HSAが続く。	pSAC35	674	635	713	なし	なし	HSA/Kex-2
146	4290	pSAC35:HSA(C34S).INFa	HSA/Kex-2シグナル配列の後に、そのC末端で成熟インターフェロニンアルファに融合された変異成熟HSA(成熟HSAのC34S)が続く。	pSAC35	675	636	714	なし	なし	HSA/Kex-2
147	4291	pSAC35:HSA.INFa(586S)	HSA/Kex-2シグナル配列の後に、そのC末端で変異型成熟インターフェロニンアルファ(成熟INFaのC1S)に融合された成熟HSAが続く。	pSAC35	676	637	715	なし	なし	HSA/Kex-2

表 2

【 0 1 1 3 】

10

20

30

【表 2 - 3 1】

融合 物番 号	構築物ID	構築物名	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	リーダ配 列
148	4292	pSAC35:HSA.INFa(C 614S)	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端で変異型成熟イ ンターフェロニンアルファ(成熟 IFNaのC29S)に融合された成熟 HSAが続く。	pSAC35	677	638	716	なし	なし	HSA/Kex-2
149	4295	pSAC35:HSA.INFa(C 683S)	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端で変異型成熟イ ンターフェロニンアルファ(成熟 IFNaのC98S)に融合された成熟 HSAが続く。	pSAC35	678	639	717	なし	なし	HSA/Kex-2
150	4296	pSAC35:HSA.INFa(C 723S)	HSA/Kex-2シグナル配列の後 に、そのC末端で変異型成熟イ ンターフェロニンアルファ(成熟 IFNaのC138S)に融合された成熟 HSAが続く。	pSAC35	679	640	718	なし	なし	HSA/Kex-2
151	3108	pSAC35HSA.PYY	成熟HSAおよびHSA/Kex2リーダ ーの下流に融合された成熟 PYY。	pSAC35	744	732	756	なし	なし	HSA/kex2
152	3109	pSAC35HSA.PYY3- 36	HSA/Kex2リーダーの後に、成熟 HSAが続き、その後に、PYY3- 36(配列番号1799)が続く。	pSAC35	745	733	757	なし	なし	HSA/kex2
153	3117	pC4:PYY3-36/HSA	HSAリーダーの後に、PYY3- 36(配列番号1800)および成熟 HSAが続く。	pC4	746	734	758	768	769	HSA

10

20

30

【 0 1 1 4】

【表 2 - 3 2】

表 2

融合番号	構築物ID	構築物名	説明	発現ベクター	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
154	3118	pSAC35:PYV3-36/HSA	HSA/kex2リーダーの後に、PYV3-36 (配列番号1801)および成熟HSAが続く。	pSAC35	735	759	770	771	HSA/kex2
155	3281	pSAC35:PYV3-36(x2)/HSA	HSAの上流およびHSA/kex2シグナルペプチドの下流に融合されたPYV3-36タンデムリピート(x2)	pSAC35	736	760	772	773	HSA/kex2
156	3282	pSAC35:HSA/PYV3-36(x2)	成熟HSAおよびHSA/kex2リーダーの下流に融合されたPYV3-36タンデムリピート(x2)	pSAC35	737	761	774	775	HSA/kex2
157	3144	pSAC35:adrenomedullin(27-52)/HSA	HSA/kex2リーダーの後に、アドメヂュリンのアミノ酸27-52が続き、その後に、成熟HSAが続く。	pSAC35	738	762	776	777	HSA/kex2
158	3579	pSAC35:HSA/kex2.HSA.オキシントモジュリン	HSA/kex2リーダーの後に、成熟HSAが続き、その後に、成熟オキシントモジュリンが続く。	pSAC35	739	763	なし	なし	HSA/kex2
159	3580	pSAC35:HSA/kex2.オキシントモジュリン.HSA	HSA/kex2リーダーの後に、成熟オキシントモジュリンが続き、その後に、成熟HSAが続く。	pSAC35	740	764	なし	なし	HSA/kex2
160	4268	pC4: SPCON2sp.グレルイン.HSA	コンセンサスシグナル配列の後に、HSAのN末端に融合されたグレルインが続く。	pC4 (哺乳類)	741	765	778	779	コンセンサス

【0115】

表 2 は、アルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子を含む、または代替として、それからなる本発明のポリヌクレオチドの非包括的なリストを提供する。初めの列の「融合番号」は、各ポリヌクレオチドの融合番号を与える。列 2 の「構築物 ID」は、本発明の各ポリヌクレオチドについて固有の数字による識別子を提供する。この構築物 ID は、表 1 の対応する列に列挙される所定の治療用タンパク質 X に対応する治療用タンパク質部分を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを特定するために使用され得る。ここでその構築物 ID は、第 5 列に列挙される。「構築物名」の列 (列 3) は、所定のアルブミン融合構築物またはポリヌクレオチドの名称を提供する。

【0116】

表 2 の 4 番目の列「説明」は、所定のアルブミン融合構築物の一般的な説明を提供し、

5番目の列の「発現ベクター」は、所定のアルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子を含む、または代替として、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で知られており、かつ購入可能であり、または他に記載されている。例えば、実施例に記載されるように、(1) 所定のアルブミン融合タンパク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つ以上を含む、または代替として、それらからなる「発現カセット」を、都合の良いクローニングベクターに構築し、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等の代替的なベクターに移動し得る。一実施形態において、パン酵母 (*S. cerevisiae*) における発現のために、アルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子を含む、または代替として、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。別の実施形態において、CHO細胞における発現のために、アルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子を含む、または代替として、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。さらなる実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分をコードする核酸分子を含む、または代替として、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。なおさらなる実施形態において、NSO細胞における発現のために、アルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子を含む、または代替として、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、本発明の範囲内である。

10

20

【0117】

列6の「配列番号Y」は、本発明のアルブミン融合タンパク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、コードされるアルブミン融合タンパク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、および特定の構築物によりコードされる治療用部分すべてを示す。特に、配列番号Yをコードするすべてのポリヌクレオチドが本発明により企図される。これらのポリヌクレオチドが、細胞からコードされるタンパク質を発現するために用いられる場合、細胞の自然な分泌およびプロセッシング工程は、表2の列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タンパク質を生じる。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で公知である。したがって、本発明の最も好ましい実施形態は、細胞により産生されるアルブミン融合タンパク質(表2の列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。また、表2の列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が、最も好ましい。これらの2つの好ましい実施形態を含む組成物(医薬組成物を含む)もまた好ましい。さらに、表2の列4および/または11に示されるシグナル配列を、異なるシグナル配列(例えば、プロセッシングされたアルブミン融合タンパク質の分泌を容易にするために、本明細書中で後に記載されるシグナル配列)で置換することは、十分に、当業者の能力の範囲内である。

30

【0118】

7番目の列の「配列番号X」は、所定のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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提供する。一実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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に示される治療用タンパク質をコードする野生型遺伝子配列を含む。代替的な実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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に示される治療用タンパク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、治療用タンパク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。

40

【0119】

8番目の列の「配列番号Z」は、親核酸配列(配列番号X)の予測される翻訳を提供する。この親配列は、特定の構築物、親タンパク質の成熟部分、野生型タンパク質の変異体

50

もしくはフラグメント、または記載の構築物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タンパク質であり得る。当業者は、配列番号Zに示されるこのアミノ酸配列を用いて、所定の構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質のどのアミノ酸残基が治療用タンパク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に示される配列を用いて同じ行に記載される構築物を作製することは、十分に当業者の能力の範囲内にある。例えば、配列番号Zが全長タンパク質に対応するが、そのタンパク質の一部分のみを用いて特定のC I Dを生成する場合、P C R等の分子生物学技法に依存して特定のフラグメントを増幅し、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。

【0120】

列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、所定のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分をコードする核酸分子を含む、または代替として、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例示的なプライマーである。本発明の一実施形態において、列9および／または10に示される配列（配列番号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、対応する列の列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、または代替として、それからなる核酸分子をテンプレートDNAとして用いて、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分をコードするポリヌクレオチドをP C R増幅するために用いられる。P C R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。

【0121】

別の実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマーをオーバーラッピングP C R反応に用いて、テンプレートDNA配列内に変異を生じさせてもよい。P C R方法は、当該技術分野で周知である。

【0122】

表3に示されるように、本明細書に開示される特定のアルブミン融合構築物は、A T C C（登録商標）に寄託されている。

表3

【0123】

【表3】

構築物ID	構築物名	ATCC寄託番号/寄託日
2249	pSAC35:IFNa2-HSA pSAC23:IFN α 2-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
3165	pSAC35:HSA.IFNa CID3165、pSAC35:HSA.INF α とも言う	PTA-4670 2002年9月16日

【0124】

さらに、当該技術分野で周知の技法および本明細書中に別記されている技法により、寄託物から所定のアルブミン融合構築物を回収することが可能である（実施例10を参照）。A T C Cは、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USAに所在する。A T C C寄託は、特許手続目的のための微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に拠って

行われた。

【0125】

本発明のさらなる実施形態において、(1) 特定のアルブミン融合タンパク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うちの1つ以上を含む、または代替として、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「サブクロニング」され得る。サブクロニングされるべきフラグメントは、当該技術分野で公知の方法、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生成され得る。

【0126】

好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、表1の対応する列に示されるアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質の治療活性および／または生物学的活性に対応する治療活性および／または生物学的活性の能力がある。さらなる好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療活性のあるタンパク質部分は、表2の配列番号Xの列に示される配列によりコードされるタンパク質のフラグメントもしくは変異体であり、対応する治療用タンパク質の治療活性および／または生物学的活性の能力がある。

【0127】

ポリペプチドおよびポリヌクレオチドフラグメントおよび変異体
フラグメント

本発明は、表1に記載の治療用タンパク質、アルブミンタンパク質、および／または本発明のアルブミン融合タンパク質のフラグメントをさらに対象にする。

【0128】

本発明は、表1に記載の治療用タンパク質、アルブミンタンパク質、および／または本発明のアルブミン融合タンパク質のフラグメントをコードするポリヌクレオチドも対象にする。

【0129】

タンパク質のN末端から1つ以上のアミノ酸の欠失が、本発明の治療用タンパク質、アルブミンタンパク質、および／またはアルブミン融合タンパク質のうちの1つ以上の生物学的機能を修飾または欠失をもたらせる場合であっても、他の治療活性、および／または機能活性（例えば、生物学的活性、多量体形成能、リガンド結合能）がなお保持され得る。例えば、N末端に欠失のあるポリペプチドの、完全または成熟形態のポリペプチド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能力は、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、概して保持され得る。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、このような免疫活性を保持しているかどうかは、本明細書に記載される、およびそうでなければ当該技術分野で周知の慣用法により容易に決定され得る。N末端のアミノ酸残基が多数欠失した変異が、いくつかの生物学的活性または免疫活性を保持し得ることは不可能ではない。実際に、わずか6個のアミノ酸残基からなるペプチドが、多くの場合、免疫応答を引き起こし得る。

【0130】

したがって、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質のフラグメントは、全長タンパク質、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タンパク質、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構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分）のアミノ酸配列のアミノ末端から1つ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タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分、または表2に記載のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分）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

10

20

30

40

50

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。

【0131】

加えて、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応する血清アルブミンポリペプチドのフラグメントは、全長タンパク質、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もしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク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つ以上の残基が欠失しているポリペプチドを含む。好ましい実施形態において、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。さらなる実施形態において、N末端の欠失は、一般式mから609で示され、ここで609は、成熟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。

【0132】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質のフラグメントは、全長アルブミン融合タンパク質、ならびにアルブミン融合タンパク質（例えば、表2に記載のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質、または表2の列6に開示されるアミノ酸配列を有するアルブミン融合タンパク質）のアミノ末端から1つ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、アルブミン融合タンパク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。

【0133】

上述のように、参照ポリペプチド（例えば、治療用タンパク質、血清アルブミンタンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質）のN末端またはC末端から1つ以上のアミノ酸の欠失が、タンパク質の1つ以上の生物学的機能を修飾または欠失をもたらせる場合であっても、他の機能活性（例えば、生物学的活性、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得る。例えば、C末端に欠失のあるポリペプチドの、完全または成熟形態のポリペプチド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能力は、完全または成熟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、概して保持され得る。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どうかは、本明細書に記載される、および／またはそうでなければ当該技術分野で周知の慣用法により容易に決定され得る。

【0134】

本発明はさらに、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質（例えば、表1で参照される治療用タンパク質、または表2に記載のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分）のアミノ酸配列のカルボキシ末端から1つ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タンパク質、または表2に記載のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分）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。

【0135】

加えて、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応するアルブミンタンパク質（例えば、血清アルブミン、または表2に記載のポリヌク

レオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分)のアミノ酸配列のカルボキシ末端から1つ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で示され得、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で示され得、ここで、nは、6から608の範囲の任意の整数値であり、608は、血清アルブミン(配列番号3)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。

10

【0136】

さらに、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質のカルボキシ末端から1つ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で示され得、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タンパク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。

【0137】

加えて、上記のNまたはC末端の欠失のいずれかを組み合わせて、NおよびC末端の欠失の参照ポリペプチドを産生することができる。本発明はまた、アミノおよびカルボキシル末端の両方から1つ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、概して、参照ポリペプチド(例えば、表1で参照される治療用タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分、または表2に記載のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされる治療用タンパク質部分、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タンパク質のアルブミンタンパク質部分、または表2に記載のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミンタンパク質部分、またはアルブミン融合タンパク質、または本発明のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質)のm~n個の残基を有するものとして示され得、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より包含される。

20

30

【0138】

本願はまた、本明細書に記述されている参照ポリペプチド配列(例えば、表1で参照される治療用タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分、または表2に記載のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされる治療用タンパク質部分、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タンパク質のアルブミンタンパク質部分、または表2に記載のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミンタンパク質部分、またはアルブミン融合タンパク質、または本発明のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質)、またはそれらのフラグメントと少なくとも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タンパク質も対象にする。好ましい実施形態において、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タンパク質も対象にする。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。

40

【0139】

本発明の好ましいポリペプチドフラグメントは、そのアミノ酸配列がフラグメントである治療用タンパク質または血清アルブミンタンパク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、生物学的活性)を示すアミノ酸配列を含む、または代替として、それらからなるフラグメントである。

50

【0140】

他の好ましいポリペプチドフラグメントは、生物学的活性のあるフラグメントである。生物学的活性のあるフラグメントは、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。フラグメントの生物学的活性は、所望の活性の改善または望ましくない活性の減少を含んでもよい。

【0141】

変異体

「変異体」とは、参照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指す。概して、変異体は、全体としてその参照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。

10

【0142】

本明細書に使用される「変異体」とは、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分、または本発明のアルブミン融合タンパク質であって、それぞれ治療用タンパク質（例えば、表1の「治療用」の列を参照のこと）、アルブミンタンパク質および／またはアルブミン融合タンパク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で周知の少なくともその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指す。概して、変異体は、全体としてアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質、アルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応するアルブミンタンパク質および／またはアルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列に非常に類似しており、ならびに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。

20

【0143】

本発明はまた、例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質のアミノ酸配列（例えば、表1に開示される治療用タンパク質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もしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分のアミノ酸配列、またはそのフラグメントもしくは変異体）、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応するアルブミンタンパク質（例えば、表1および2に記載のポリヌクレオチドもしくはアルブミン融合構築物によりコードされるアルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク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、またはそのフラグメントもしくは変異体）、および／またはアルブミン融合タンパク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、または代替として、それらからなるタンパク質も対象にする。これらのポリペプチドのフラグメント（例えば、本明細書に記載のフラグメント）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）、または当業者に周知の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. et al., eds., 1989 Current protocol in Molecular Biology, Green publishing associates, Inc., and John Wiley & Sons Inc., New York, at pages 6.3.1-6.3.6および2.10.3を参照のこと）にて、本発明のアルブミン融合タンパク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

30

40

50

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。

【0144】

クエリ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は、対象とするポリペプチドのアミノ酸配列が、クエリ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、そのクエリ配列に同一であることが意図される。つまり、クエリ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することができる。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つ以上の連続した群で散在していてもよい。

【0145】

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タンパク質またはそのフラグメント（アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分、またはアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分等）のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるかどうかは、既知のコンピュータプログラムを用いて慣用的に決定することができる。クエリ配列（本発明の1つの配列）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称され、Brutlagら（Comp. App. Biosci. 6:237-245（1990））のアルゴリズムに基づいたFASTDBコンピュータ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、クエリと対象配列は、共にヌクレオチド配列、あるいは共にアミノ酸配列のいずれかである。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表される。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（Joining Penalty）=20、ランダム化グループ長（Randomization Group Length）=0、カットオフスコア（Cutoff Score）=1、ウィンドウサイズ（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、ウィンドウサイズ=500または短い方の対象アミノ酸配列の長さ。

【0146】

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、クエリ配列の残基数をクエリ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どうかは、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、指定したパラメータを用いて上記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残基の位置のみである。

【0147】

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、したがって、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。

10

【0148】

通常、変異体は、その変異体と同じ長さである正常なHAもしくは治療用タンパク質と少なくとも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。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プログラムに採用されたアルゴリズム（Karlin et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990) および Altschul, J. Mol. Evol. 36:290-300 (1993)、参照することにより完全に組み込まれる）を用いたBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）分析により決定される。

20

【0149】

BLASTプログラムで用いられるアプローチは、まず、クエリ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、特定されたすべてのマッチの統計学的有意性を評価し、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、参照することにより完全に組み込まれる、Altschulら（Nature Genetics 6:119-129 (1994)）を参照のこと。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検索パラメータは、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 et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919 (1992)、参照することにより完全に組み込まれる）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パラメータを以下のように補正し得る：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（クエリ配列に沿ってwinkthの位置ごとにワードヒット（word hits）を作製する）、およびgapw=16（ウィンドウ（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パラメータの設定は、Q=9、R=2、wink=1、およびgapw=32であった。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、タンパク質の比較における等価な設定は、G

30

40

50

A P = 8 および L E N = 2 である。

【0150】

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、コードされる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が、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、細菌宿主（酵母または大腸菌等）により好ましいものに変更する）産生することができる。

10

【0151】

好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク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。さらに好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク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。

20

【0152】

代替的な実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、本明細書に記載の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、治療用タンパク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。さらなる実施形態において、アルブミン融合タンパク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、本明細書に記載の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、アルブミンタンパク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。別の実施形態において、アルブミン融合タンパク質をコードするコドン最適化ポリヌクレオチドは、本明細書に記載の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、治療用タンパク質部分またはアルブミンタンパク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。

30

【0153】

さらなる実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分をコードするポリヌクレオチドは、治療用タンパク質の自然に発生する配列を含まない、または代替として、それからならない。さらなる実施形態において、アルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分をコードするポリヌクレオチドは、アルブミンタンパク質の自然に発生する配列を含まない、または代替として、それからならない。代替的な実施形態において、アルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、治療用タンパク質部分もしくはアルブミンタンパク質部分の自然に発生する配列を含まない、または代替として、それからならない。

40

【0154】

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所定の座を占める遺伝子のいくつかの代替形態の1つを指す。（Genes II, 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り得、および本発明に含まれる。代替として、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することができる。

【0155】

タンパク質工学および組換えDNA技法の周知の方法を用いて、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することができる。例えば、1つ以上の

50

アミノ酸を、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タンパク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、このタンパク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(Dobelli et al., J. Biotechnology 7:199-216(1988))。

【0156】

さらに、十分な証拠により、変異体が、多くの場合、自然に発生するタンパク質のものと類似する生物学的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。すべての起こり得る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、「分子の大部分が、[結合または生物学的活性]のいずれかにほとんど作用することなく、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個の固有のアミノ酸配列のみが、野生型の活性とは有意に異なるタンパク質を生じた。

【0157】

さらに、ポリペプチドのN末端またはC末端から1つ以上のアミノ酸を欠失させることが、1つ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、他の生物学的活性はなお、保持され得る。例えば、欠失変異体の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能力は、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、保持されると可能性が高いであろう。タンパク質の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、このような免疫原性活性を保持しているかどうかは、本明細書に記載される、およびそうでなければ当該技術分野で周知の慣用法により容易に決定され得る。

【0158】

したがって、本発明はさらに、機能活性(例えば、生物学的活性および/または治療活性)を有するポリペプチド変異体を含む。一実施形態において、本発明は、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質の1つ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、生物学的活性および/または治療活性)を有するアルブミン融合タンパク質の変異体を提供する。別の実施形態において、本発明は、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質の1つ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、生物学的活性および/または治療活性)を有するアルブミン融合タンパク質の変異体を提供する。このような変異体は、活性にほとんど作用しないように、当該技術分野で周知の一般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。このような変異体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。

【0159】

好ましい実施形態において、本発明の変異体は、保存的置換を有する。「保存的置換」は、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Gln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の置換等の群内での交換が意図される。

【0160】

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 Acid Substitutions” *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。

【0161】

第1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を、特定することができる。これらの保存されているアミノ酸は、タンパク質機能にとっておそらく重要である。対照的に、置換が自然淘汰により寛容されるアミノ酸の位置は、これらの位置がそのタンパク質の機能のために重要ではないことを示す。したがって、タンパク質の生物学的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。

10

【0162】

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導入し、タンパク質機能にとって重要な領域を特定する。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（分子内のすべての残基に単一のアラニン変異を導入する）が用いられ得る。Cunningham and Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989) を参照のこと。次いで、得られた変異分子を、生物学的活性について試験することができる。

【0163】

上記の著者らが述べるように、これらの2つの戦略は、タンパク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。前記著者らはさらに、タンパク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、（タンパク質の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一方で、表面の側鎖の特徴は、概して、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Gln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つ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つ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）別の化合物、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等に融合されたまたは化学的に共役されたポリペプチド、（iv）例えば、IgGFc融合領域ペプチド等のさらなるアミノ酸を含むポリペプチドを含む。このような変異体ポリペプチドは、本明細書の教示から当業者の範囲内であると考えられる。

20

30

【0164】

例えば、電荷したアミノ酸と他の電荷した、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、凝集が少ない等の改善された特徴を有するタンパク質を産生し得る。医薬製剤の凝集は、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 et al., *Clin. Exp. Immunol.* 2:331-340 (1967)、Robbins et al., *Diabetes* 36:838-845 (1987)、Cleland et al., *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 10:307-377 (1993) を参照のこと。

40

【0165】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチドは、アルブミン融合タンパク質のアミノ酸配列、治療用タンパク質および／またはヒト血清アルブミンのアミノ酸配列のフラグ

50

メントもしくは変異体を含む、または代替として、それからなり、ここで、該フラグメントもしくは変異体は、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。好ましい実施形態において、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包含される。

【0166】

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、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等の自然な過程または当該技術分野で公知の化学的修飾技法により修飾されてもよい。このような修飾は、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。同種の修飾は、所定のポリペプチドのいく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。また、所定のポリペプチドは、多種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、それらは、分岐を有するまたは有し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、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしく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、タンパク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が介在するタンパク質へのアミノ酸の付加（例えばアルギニン化等）、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 and Company, New York (1993)、POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983)、Seifter et al., Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)、Rattan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)を参照のこと）。

【0167】

機能活性

「機能活性を有するポリペプチド」とは、治療用タンパク質の全長、プロタンパク質、および／または成熟形態に関連する1つ以上の周知の機能活性を示すことが可能なポリペプチドを指す。このような機能活性は、生物学的活性、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（本発明の特定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とともに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もしくはリガンドに結合する能力が挙げられるが、これらに限定されない。

【0168】

「生物学的活性を有するポリペプチド」とは、特定の生物学的アッセイにて測定される際に、用量依存性を伴い、または伴うことなく、成熟形態を含む本発明の治療用タンパク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指す。用量依存性が存在する場合、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場合、所定の活性において、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、より高い活性、または、約25分の1より低くない、好ましくは、約10分の1より低くない活性、また最も好ましくは、約3分の1より低くない活性を示し得る）。

【0169】

好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、アルブミンに融合されない場合、治療用タンパク質部分（またはそのフラグメントもしくは変異体）に関連する少なくとも1つの生物学的小および／または治療活性を有する。

【0170】

さらに好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、非融合状態の治療用タンパク質部分（またはそのフラグメントもしくは変異体）と比較し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タンパク質または非融合治療用タンパク質部分（またはそのフラグメントもしくは変異体）の血漿安定性は、当該技術分野で周知のアッセイを用いて、またはそれを慣例的に改変して用いて、アッセイできる。

【0171】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、当該技術分野で周知のアッセイ、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改変して用いて、機能活性（例えば、生物学的活性）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の列3）に参照されるアッセイを用いて、その活性について、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質のフラグメントを慣用的にアッセイしてもよい。さらに、当業者は、当該技術分野で周知の、および／または以下の実施例の項に記載されるアッセイを用いて、その活性について、アルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分に対応するアルブミンタンパク質のフラグメントを慣用的にアッセイしてもよい。

【0172】

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タンパク質に結合する、またはそれと競合するアルブミン融合タンパク質の能力についてアッセイする一実施形態において、当該技術分野で周知の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、原位置イムノアッセイ（例えば、金コロイド、酵素または放射性同位元素標識等を用いて）、ウェスタンブロット、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、タンパク質Aアッセイ、および免疫電気泳動アッセイ等の技術を用いた競合的および非競合的アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、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。別の実施形態において、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。さらなる実施形態において、二次抗体は、標識される。多くの方法が、イムノアッセイにおいて結合を検出するために当該技術分野で周知であり、本発明の範囲内である。

【0173】

治療用タンパク質の結合パートナー（例えば、受容体またはリガンド）が特定される好ましい実施形態において、その結合パートナーと、その治療用タンパク質を融合物の治療用タンパク質部分として含むアルブミン融合タンパク質の結合は、例えば、当該技術分野で公知の方法、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク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ブロッティングによりアッセイされ得る。概して、Phizicky et al., Microbiol. Rev. 59: 94-123 (1995)を参照のこと。別の実施形態において、アルブミン融合タンパク質と生理学的に相互に関連のあるものが、融合物の治療用タンパク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、当該技術分野で周知の技法を用いて慣用的にアッセイされ得る。

【0174】

アルブミン融合タンパク質の多量体化する能力を評価する代替的な実施形態において、多量体の他の成分との結合が、例えば、当該技術分野で公知の方法、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、ならびにアフィニティブロッティングを用いてアッセイされ得る。概して、上記 P h i z i c k y らを参照のこと。

【0175】

好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体のすべてまたは一部を含むアルブミン融合タンパク質は、アルブミンに融合されていない場合、治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）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。他の好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体のすべてまたは一部を含むアルブミン融合タンパク質の生物学活性および／または治療活性は、治療用タンパク質に結合する抗体に特異的に結合されたポリペプチドに関連する1つ以上の生物学活性および／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。

【0176】

治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、様々な方法で特徴付けられ得る。特に、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、本明細書に記載の技法または当該技術分野で周知の慣例的に改変する技法を用いて、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク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。

【0177】

特定のタンパク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タンパク質（例えば、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメント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, 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、同第5,403,484号、および同第5,223,409号）、プラスミド上で（例えば、Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869（1992））、またはフェージ上で（例えば、Scott and Smith, Science 249:386-390（1990）、Devlin, Science 249:404-406（1990）、Cwirlla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382（1990））、および Felici, J. Mol. Biol. 222:301-310（1991））で行われてもよい（これらの参考文献のそれぞれは、その全体が本明細書に参照することにより組み込まれる）。治療用抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、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で周知の技法を用いて、またはそれを慣例的に改変して、特定のタンパク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。

【0178】

治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、当該技術分野で周知の任意の方法により、他の抗原（例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）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。

【0179】

(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、例をいくつか挙げると、ウェスタンブロット、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、およびタンパク質Aイムノアッセイ等の技法を用いる競合的および非競合的アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。このようなアッセイは、慣用的であり、かつ当該技術分野で公知である(例えば、Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる)。例示的なイムノアッセイが、以下に簡潔に記載される(が、これらは限定を目的とすることが意図されない)。

【0180】

概して、免疫沈降プロトコルは、溶解緩衝液、例えば、タンパク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、パナジン酸ナトリウム)を追加したRIPA緩衝液(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タンパク質(例えば、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む)を細胞溶解物に加え、一定時間(例えば、1~4時間)、40℃で培養し、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℃で培養し、そのビーズを溶解緩衝液で洗浄し、次いで、SDS/試料緩衝液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タンパク質の能力は、例えば、ウェ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タンパク質の結合を増大させ、バックグラウンドを減少させるために変更され得るパラメータ(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考察については、例えば、Ausubel et al, 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。

【0181】

概して、ウェスタンブロット分析は、タンパク質試料を調製し、そのタンパク質試料を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)中で電気泳動し、そのタンパク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またはナイロン等の膜へ転写し、ブロッキング溶液(例えば、3%のBSAを伴うPBSまたは脱脂乳)中でその膜をブロッキングし、洗浄緩衝液(例えば、PBS-Tween20)中でその膜を洗浄し、本発明のアルブミン融合タンパク質(ブロッキング緩衝液中で希釈されている)をその膜に適用し、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄し、ブロッキング緩衝液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、32Pまたは125I)に共役させた二次抗体(例えば、抗ヒト血清アルブミン抗体等のアルブミン融合タンパク質を認識するもの)を適用し、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄し、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、バックグラウンドノイズを減少させるように変更できるパラメータについて認識することができよう。ウェスタンブロットプロトコルについてのさらなる考察については、例えば、Ausubel et al, 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。

【0182】

E L I S A 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）等の検出可能な化合物に共役させた本発明のアルブミン融合タンパク質（例えば、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む）をウェルに加え、次いで、一定時間培養し、結合しなかったもしくは非特異的に結合したアルブミン融合タンパク質を洗い流し、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タンパク質の存在を検出することを含む。E L I S A では、アルブミン融合タンパク質は、検出可能な化合物と共役させる必要がなく、その代わりに、検出可能な化合物に共役させた二次抗体（アルブミン融合タンパク質を認識する）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、アルブミン融合タンパク質を、ウェルに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）等の検出可能な化合物に共役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変更され得るパラメータならびに当該技術分野で周知のE L I S A の他のバリエーションについて認識できるだろう。E L I S A に関するさらなる考察については、例えば、Ausubel et al, 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。

10

20

【0183】

タンパク質、抗原、またはエピトープに対するアルブミン融合タンパク質の結合親和性およびアルブミン融合タンパク質—タンパク質／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タンパク質と標識抗原（例えば、 ^3H または ^{125}I ）とを培養し、次いで、標識抗原に結合した抗体を検出することを含む。特定のタンパク質、抗原、またはエピトープについてのアルブミン融合タンパク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することができる。アルブミン融合タンパク質と同じタンパク質、抗原、またはエピトープに結合する二次タンパク質との競合も、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、タンパク質、抗原、またはエピトープを、本発明のアルブミン融合タンパク質と同じタンパク質、抗原、またはエピトープに結合する増大量の非標識二次タンパク質の存在下、標識化合物（例えば、 ^3H または ^{125}I ）に共役させたアルブミン融合タンパク質と共に培養する。

30

【0184】

好ましい実施形態において、B I A c o r e 動態分析を用いて、タンパク質、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タンパク質の結合および解離速度を決定する。B I A c o r e 動態分析は、それらの表面上に固定化した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タンパク質をそれぞれ有するチップへの、アルブミン融合タンパク質、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解離を分析することを含む。

40

【0185】

アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質に結合する抗体は、所定のタンパク質または抗原、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、または特定されてもよい。好ましい結合親和性は、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、 10^{-2} M 、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、 10^{-3} M 、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 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、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 10^{-5} M 、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 10^{-6} M 、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 10^{-7} M 、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、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、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 10^{-9} M 、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 10^{-10} M 未満の解離定数またはKdを有するものを含む。

50

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。好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも 1 つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、アルブミン融合タンパク質の結合価（治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも 1 つのフラグメント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に入れて、治療用タンパク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、所定のタンパク質またはエピトープについての親和性を有する。加えて、本明細書に記載される（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で周知のアッセイを慣用的に適用して、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分および／またはアルブミン部分のいずれかに関連する生物学的活性および／または治療活性（体外または生体内のいずれかにおいて）を誘発するアルブミン融合タンパク質、ならびにそのフラグメント、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周知であり、かつ本発明の範囲内であり得る。

【0186】

アルブミン

上記のように、本発明のアルブミン融合タンパク質は、好ましくは遺伝子融合により互いに結合されている治療用タンパク質の少なくとも 1 つのフラグメントもしくは変異体、およびヒト血清アルブミンの少なくとも 1 つのフラグメントもしくは変異体を含む。

【0187】

さらなる実施形態は、化学的共役により互いに結合されている治療用タンパク質の少なくとも 1 つのフラグメントもしくは変異体、およびヒト血清アルブミンの少なくとも 1 つのフラグメントもしくは変異体を含む。

【0188】

ヒト血清アルブミン（HSA）およびヒトアルブミン（HA）という用語は、本明細書に同義的に用いられる。「アルブミン」および「血清アルブミン」という用語は、より広く、ヒト血清アルブミン（ならびにそのフラグメントおよび変異体）、ならびに他の種由来のアルブミン（ならびにそのフラグメントおよび変異体）を包含する。

【0189】

本明細書に使用される「アルブミン」とは、アルブミンの 1 つ以上の機能的活性（例えば、生物学的活性）を有する、アルブミンのタンパク質もしくはアミノ酸配列、またはアルブミンのフラグメントもしくは変異体を集合的に指す。特に、「アルブミン」とは、ヒトアルブミンまたはそのフラグメント（例えば、欧州特許出願第 201 239 号、同第 322 094 号、国際公開第 WO97/24445 号、同第 WO95/23857 号を参照のこと）を指し、特に、図 1 および配列番号 1 に示されるようなヒトアルブミンの成熟形態、あるいは他の脊椎動物由来のアルブミンもしくはそのフラグメント、またはこれらの分子のアナログもしくは変異体もしくはそのフラグメントを指す。

【0190】

好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク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 を参照として、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 Glu に、および Lys-414 を Glu に（例えば、国際公開第 WO95/23857 号を参照のこと、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる）。さらにより好ましい実施形態において、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タンパク質は、酵母 Yap3p タンパク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タンパク質の産生の増大が可能となる。

【0191】

本明細書に使用される治療用タンパク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と比較して、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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、タンパク質の治療活性または血漿安定性を安定化させるまたは長期化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指す。アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、上記したような全長のH A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つ以上のそのフラグメントを含んでもよい。このようなフラグメントは、10個以上のアミノ酸の長さであってもよく、またはH A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アミノ酸を含んでもよく、またはH Aの特定のドメインの一部またはすべてを含んでもよい。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つ以上のH Aのフラグメントが用いられてもよい。好ましい実施形態において、H Aフラグメントは、H Aの成熟形態である。

10

【0192】

本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、通常H Aの変異体であり得る。本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分は、本明細書に記載のような治療用タンパク質の変異体であってもよい。「変異体」という用語は、挿入、欠失および保存的あるいは非保存的のいずれかの置換を含み、ここで、このような変化は、アルブミンの浸透圧（oncotic）特性、有用なリガンド結合性および非免疫原性特性、または治療用タンパク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つ以上を実質的に改変しない。

【0193】

特に、本発明のアルブミン融合タンパク質は、ヒトアルブミンおよびヒトアルブミンのフラグメントの自然に発生する多形変異体、例えば欧州特許出願第322 094号において開示されたフラグメント（すなわち、H A（P_n）、ここで、nは369～419である）を含み得る。アルブミンは、任意の脊椎動物、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。非哺乳動物アルブミンとしては、メンドリおよびサケが挙げられるが、これらに限定されない。アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、治療用タンパク質部分とは異なる動物に由来してもよい。

20

【0194】

一般的に言うと、H Aフラグメントもしくは変異体は、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。H A変異体は、H Aの少なくとも1つの全ドメイン、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1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、または代替として、それらを含んでもよい。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の残基を含む可撓性のサブドメイン間リンカー領域を有する。

30

40

【0195】

好ましくは、本発明のアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、H A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一部またはすべてが、治療用タンパク質部分を連結するために用いられる。

【0196】

治療用タンパク質に特異的に結合する抗体も治療用タンパク質である

本発明はまた、表1に開示される治療用タンパク質に特異的に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質も包含する。特に、「治療用タンパク質」という用語が、治療用タンパク質（例えば、表1の列Iに記載さ

50

れるような)ならびにそのフラグメントおよび変異体に結合する抗体を包含することが企図される。したがって、本発明のアルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体、および/または抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含んでもよい。

【0197】

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量体を含むことが周知である。各4量体は、2つの同一のポリペプチド鎖の対からなり、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、主に抗原認識に参与する約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参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、抗体のアイソタイプをそれぞれ、IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして規定する。概して、Fundamental Immunology Chapters 3-5 (Paul, W., ed., 4th ed. Raven Press, N. Y. (1998)) (すべての目的のために、参照することにより、その全体が組み込まれる)を参照のこと。各軽鎖/重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。

【0198】

したがって、無傷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。

【0199】

該鎖はすべて、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、その特異性を決定する抗体の部分である。各対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 et al. Nature 342:878-883 (1989)の定義に従う。

【0200】

本明細書に使用される「抗体」とは、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つ以上のCDR領域を含む分子)を指す。アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体には、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フラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリにより産生されたフラグメント、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)、および上記の任意のエピトープ結合フラグメント(例えば、VHドメイン、VLドメインまたは1つ以上のCDR領域)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0201】

治療用タンパク質に結合する抗体

本発明は、治療用タンパク質(例えば、表1に開示したもの)またはそのフラグメントもしくは変異体に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質を包含する。

【0202】

治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）に結合する抗体は、鳥類および哺乳類を含む任意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。本明細書に使用される「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、ヒト免疫グロブリンライブラリ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。

【0203】

治療用タンパク質に結合する、および本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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、IgA1、およびIgA2）またはサブクラスであり得る。好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体分子は、IgG1である。他の好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る免疫グロブリン分子は、IgG2である。他の好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る免疫グロブリン分子は、IgG4である。

【0204】

最も好ましくは、治療用タンパク質に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体フラグメントであり、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あるいはVHドメインのいずれかを含むフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。単鎖抗体を含む抗原結合抗体フラグメントは、可変領域を、単独、またはヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインの全体もしくは部分と組み合わせて含み得る。

【0205】

治療用タンパク質に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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、治療用タンパク質の異なるエピトープについて特異的であり得、または治療用タンパク質、ならびに異種ポリペプチドもしくは固体支持物質等の異種エピトープの両方について特異的であり得る。例えば、PCT公開第WO93/17715号、同第WO92/08802号、同第WO91/00360号、同第WO92/05793号、Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991)、米国特許第4,474,893号、同第4,714,681号、同第4,925,648号、同第5,573,920号、同第5,601,819号、Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照のこと。

【0206】

治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）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'フラグメント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 et al. J. Immunol. 148:1547-1553 (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 et al. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments" PNAS US

10

20

30

40

50

A 90:6444-6448 (1993)) または「ジャニュシン (Janusins)」(Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10:3655-3659 (1991) および Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992)) として形成されてもよい。

【0207】

本発明はまた、本明細書に記載される、または当該技術分野で周知の抗体のフラグメントもしくは変異体（誘導体を含む）を含むアルブミン融合タンパク質も提供する。当業者に周知の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に、例えば、アミノ酸の置換をもたらす部位特異的変異誘発およびPCR介在変異誘発を含む変異を導入することができる。好ましくは、変異体（誘導体を含む）は、参照VHドメイン、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLドメイン、VLCDR1、VLCDR2、またはVLCDR3に対して、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。特定の実施形態において、変異体は、VHCDR3の置換をコードする。好ましい実施形態において、変異体は、必須でないと考えられている1つ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。

【0208】

治療用タンパク質に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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タンパク質のエピトープまたは部分に関して、記載または特定化され得る。治療用タンパク質または治療用タンパク質の特定のエピトープに特異的に結合する抗体はまた、排除され得る。したがって、本発明は、治療用タンパク質に特異的に結合する抗体を包含し、その排除を可能にする。好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、その抗体それ自体の融合されていないフラグメントもしくは変異体と同じエピトープに結合する。

【0209】

治療用タンパク質に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体はまた、それらが交差反応性に関して、記載または特定化され得る。治療用タンパク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が含まれる。治療用タンパク質に対して少なくとも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（当該技術分野で周知の、および本明細書に記載され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する抗体も本発明に含まれる。特定の実施形態において、治療用タンパク質に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体は、ヒトタンパク質のネズミ、ラットおよび／またはウサギホモログおよび対応するそのエピトープと交差反応する。治療用タンパク質に対して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（当該技術分野で周知の、および本明細書に記載され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。特定の実施形態において、上記の交差反応性は、本明細書に開示される、任意の単一の特定の抗原性もしくは免疫原性ポリペプチド、または特定の抗原性および／または免疫原性ポリペプチドのうちの2、3、4、5またはそれ以上の組み合わせに関する。好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメン

トもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、その特定の抗体自体のフラグメントもしくは変異体と比較して、類似するまたは実質的に同一な交差反応性を有する。

【0210】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（本明細書に記載のような）、治療用タンパク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。治療用タンパク質に結合する、および本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体はまた、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、記載または特定化され得る。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K_dを有するものを 10
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K_dを有するものを 20
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K_dを有するものを 30
含む。好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、アルブミン融合タンパク質の結合価（治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメント 40
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に入れて、治療用タンパク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、所定のタンパク質またはエピトープについての親和性を有する。

【0211】

本発明はまた、競合的結合を測定するために当該技術分野で周知の任意の方法、例えば本明細書に記載のイムノアッセイにより測定されるような、治療用タンパク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。好ましい実施形態において、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。好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質 30
は、治療用タンパク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。他の好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、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%で治療用タンパク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。

【0212】

治療用タンパク質に結合する、および本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体は、治療用タンパク質のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る。例えば、本発明は、本発明のポリペプチドと受容体／リガンドの相互作用を部分的あるいは完全に破壊する抗体を含む。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。本発明はまた、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、本明細書に記載される、またはそうでなければ当該技術分野で周知の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 40
実施形態において、抗体の不在下、リガンド活性または受容体活性を、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%阻害する抗体が提供される。好ま 50

しい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質に結合する抗体の融合されていないフラグメントもしくは変異体と比較して、リガンド結合の防止および／または受容体活性化の防止に関して、類似するまたは実質的に類似する特徴を有する。

【0213】

本発明はまた、リガンド結合および受容体活性化の両方を妨げる受容体特異的抗体、ならびに受容体ーリガンド複合体を認識し、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妨げる中和抗体、ならびにリガンドに結合し、それにより受容体活性化を妨げるが、リガンドが受容体へ結合するのを妨げない抗体も本発明に含まれる。さらに、その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、受容体の二量体化を誘発することにより、リガンド介在受容体活性化の生物学的活性のすべてあるいはサブセットのいずれかを増強または活性化し得る。該抗体は、治療用タンパク質（例えば、表1に開示される）の特異的生物学的活性を含む生物学的活性に対するアゴニスト、アンタゴニスト、または逆アゴニストとして特定化され得る。上記の抗体のアゴニストは、当該技術分野で周知の方法を用いて作製され得る。例えば、PCT公開第WO96/40281号、米国特許第5,811,097号、Deng et al., Blood 92(6):1981-1988(1998)、Chen et al., Cancer Res. 58(16):3668-3678(1998)、Harrop et al., J. Immunol. 161(4):1786-1794(1998)、Zhu et al., Cancer Res. 58(15):3209-3214(1998)、Yoon et al., J. Immunol. 160(7):3170-3179(1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt 2):237-247(1998)、Pitard et al., J. Immunol. Methods 205(2):177-190(1997)、Liautard et al., Cytokine 9(4):233-241(1997)、Carlson et al., J. Biol. Chem. 272(17):11295-11301(1997)、Taryman et al., Neuron 14(4):755-762(1995)、Muller et al., Structure 6(9):1153-1167(1998)、Bartunek et al., Cytokine 8(1):14-20(1996)（それは、参照することにより、その全体が本明細書にすべて組み込まれる）を参照のこと。好ましい実施形態において、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質に結合する抗体の融合されていないフラグメントもしくは変異体と、類似するか、または実質的に同一のアゴニストまたはアンタゴニスト特性を有する。

【0214】

治療用タンパク質に結合する、および本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体は、例えば、治療用タンパク質を精製、検出、および標的化するために用いられ得、これらは、体外および生体内の両方での診断および治療方法を含む。例えば、抗体は、生体試料中の治療用タンパク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ける有用性を有する。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)（参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。同様に、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、例えば、治療用タンパク質を精製、検出、および標的化するために用いられ得、これらは、体外および生体内の両方での診断および治療方法を含む。

【0215】

治療用タンパク質に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体は、改変される（すなわち任意の型の分子と抗体の共有結合により）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／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解的切断、細胞リガンド／または他のタンパク質への結合等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が、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等が挙げられるが、これらに限定されない周知の技法により行われてもよい。さらに、誘導体は、1つ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タンパク質も上記のように修飾されてもよい。

【0216】

治療用タンパク質に結合する抗体の産生方法

治療用タンパク質に結合する、および本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体は、当該技術分野で周知の任意の好適な方法により産生され得る。関心対象となる抗原に対するポリクローナル抗体は、当該技術分野で公知の様々な方法により産生できる。例えば、治療用タンパク質は、ウサギ、マウス、ラット等が挙げられるが、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、宿主種に応じて免疫応答を増加してもよく、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等のミネラルゲル、リゾレシチン等の界面活性物質、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、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*））が挙げられるが、これらに限定されない。このようなアジュバントはまた、当該技術分野で公知である。

【0217】

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で周知の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、当該技術分野で周知のもの、および例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)、Hammering, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)（該参考文献は、参照することにより、その全体が組み込まれる）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。本明細書に使用される「モノクローナル抗体」という用語は、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。「モノクローナル抗体」という用語は、単一のクローンに由来する抗体を指し、任意の真核、原核、またはファージクローンが挙げられるが、それを産生する方法は含まれない。

【0218】

ハイブリドーマ技法を用いる特定の抗体の産生およびスクリーニング方法は、慣用的であり、当該技術分野で公知である。非限定的な一例では、治療用タンパク質またはそのフラグメントもしくは変異体、アルブミン融合タンパク質、またはこのような治療用タンパク質もしくはそのフラグメントもしくは変異体、またはアルブミン融合タンパク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、抗原に特異的な抗体が、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、脾細胞を単離する。次いで、脾細胞を、公知の技法により任意の好適な骨髓腫細胞、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択し、限界希釈によりクローン化する。次いで、ハイブリドーマクローンを、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、当該技術分野で周知の方法によりアッセイする。概して高いレベルの抗体を含む腹水は、陽性ハイブリドーマク

10

20

30

40

50

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。

【0219】

したがって、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細胞を骨髓腫細胞と融合させ、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。

【0220】

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公知の別の方法は、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、当該技術分野で一般的に周知であり、例えば、Chapter 7.22 of Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., 1994, John Wiley & Sons, NYにおいて概説されているプロトコルであり、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。形質転換のためのB細胞源は、一般的にヒト末梢血であるが、形質転換のためのB細胞はまた、リンパ節、扁桃、脾臓、腫瘍組織、および感染組織が挙げられるが、これらに限定されない他の供給源に由来してもよい。組織は、概して、EBV形質転換前に、単一細胞懸濁液にされる。さらに、抗EBV抗体について血清陽性である個体に由来するT細胞が、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、シクロスポリリンAを用いる処置により）かのいずれかの工程が行われてもよい。

【0221】

一般に、ヒトB細胞を含む試料を、EBVと共に播種し、次いで、3～4週間培養する。EBVの典型的な供給源は、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、概して、3～4週の培養期間の終わり頃に認められ得る。位相差顕微鏡検査により、形質転換細胞は、大きく、透明で、有毛に見え得、密な細胞クラスター状態に凝集する傾向があり得る。最初は、EBV株は、概して、ポリクローナルである。しかしながら、長い細胞培養期間にわたって、EBV株は、特定のB細胞クローンの選択的成長の結果として、モノクローナルまたはポリクローナルになり得る。代替として、ポリクローナルEBV形質転換株を、好適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好適な融合パートナーは、マウス骨髓腫細胞株（例えば、SP2/0、X63-Ag8.653）、ヘテロミエローマ（heteromyeloma）細胞株（ヒト×マウス、例えば、SPAM-8、SBC-H20、およびCB-F7）、ならびにヒト細胞株（例えば、GM1500、SKO-007、RPMI8226、およびKR-4）を含む。したがって、本発明はまた、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フラグメント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。

【0222】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、周知の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フラグメントは、パパイン（Fabフラグメントを産生するために）またはペプシン（F(ab')₂フラグメントを産生するために）等の酵素を用いて、免疫グロブリン分子をタンパク質分解することにより産生されてもよい。F(ab')₂フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のCH1ドメインを含む。

【0223】

例えば、治療用タンパク質に結合する抗体はまた、当該技術分野で周知の様々なディス

10

20

30

40

50

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表示される。特定の実施形態において、このようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリ（例えば、ヒトもしくはマウス）から発現される抗原結合ドメインを表示するために利用され得る。関心対象となる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、または固体表面もしくはビーズ上に結合もしくは捕捉された抗原を用いて）を用いて選択または特定され得る。これらの方法に用いられるファージは、典型的に、ファージ遺伝子 I I I タンパク質またはファージ遺伝子 V I I I タンパク質のいずれかに組換え的に融合された F a b、F v、またはジスルフィド安定化された F v の抗体ドメインを有するファージから発現された f d および M 1 3 結合ドメインを含む糸状ファージ（f i l a m e n t o u s p h a g e）である。治療用タンパク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、B r i n k m a n e t a l . , J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 8 2 : 4 1 - 5 0 (1 9 9 5)、A m e s e t a l . , J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 8 4 : 1 7 7 - 1 8 6 (1 9 9 5)、K e t t l e b o r o u g h e t a l . , E u r . J . I m m u n o l . 2 4 : 9 5 2 - 9 5 8 (1 9 9 4)、P e r s i c e t a l . , G e n e 1 8 7 9 - 1 8 (1 9 9 7)、B u r t o n e t a l . , A d v a n c e s i n I m m u n o l o g y 5 7 : 1 9 1 - 2 8 0 (1 9 9 4)、P C T 出願第 P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4 号、P C T 公開第 W O 9 0 / 0 2 8 0 9 号、同第 W O 9 1 / 1 0 7 3 7 号、同第 W O 9 2 / 0 1 0 4 7 号、同第 W O 9 2 / 1 8 6 1 9 号、同第 W O 9 3 / 1 1 2 3 6 号、同第 W O 9 5 / 1 5 9 8 2 号、同第 W O 9 5 / 2 0 4 0 1 号、米国特許第 5, 6 9 8, 4 2 6 号、同第 5, 2 2 3, 4 0 9 号、同第 5, 4 0 3, 4 8 4 号、同第 5, 5 8 0, 7 1 7 号、同第 5, 4 2 7, 9 0 8 号、同第 5, 7 5 0, 7 5 3 号、同第 5, 8 2 1, 0 4 7 号、同第 5, 5 7 1, 6 9 8 号、同第 5, 4 2 7, 9 0 8 号、同第 5, 5 1 6, 6 3 7 号、同第 5, 7 8 0, 2 2 5 号、同第 5, 6 5 8, 7 2 7 号、同第 5, 7 3 3, 7 4 3 号、および同第 5, 9 6 9, 1 0 8 号（これらのそれぞれは、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる）に開示されるものを含む。

【0224】

上記の参考文献に記載されるように、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、ヒト抗体を含む全抗体、または任意の他の所望の抗原に結合するフラグメント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、F a b、F a b'、および F (a b') 2 フラグメントを組換え的に産生する技法は、P C T 公開第 W O 9 2 / 2 2 3 2 4 号、M u l l i n a x e t a l . , B i o T e c h n i q u e s 1 2 (6) : 8 6 4 - 8 6 9 (1 9 9 2)、および S a w a i e t a l . , A J R I 3 4 : 2 6 - 3 4 (1 9 9 5)、および B e t t e r e t a l . , S c i e n c e 2 4 0 : 1 0 4 1 - 1 0 4 3 (1 9 8 8)（該参考文献は、参照することにより、その全体が組み込まれる）において開示されているような当該技術分野で周知の方法を用いても行われ得る。

【0225】

一本鎖 F v s 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, 9 4 6, 7 7 8 号および第 5, 2 5 8, 4 9 8 号、H u s t o n e t a l . , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 0 3 : 4 6 - 8 8 (1 9 9 1)、S h u e t a l . , P N A S 9 0 : 7 9 9 5 - 7 9 9 9 (1 9 9 3)、および S k e r r a e t a l . , S c i e n c e 2 4 0 : 1 0 3 8 - 1 0 4 0 (1 9 8 8) において記載されるものを含む。ヒトにおける抗体の生体内での使用および体外での検出アッセイを含む一部の使用のために、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を用いることが所望され得る。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可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体である。キメラ抗体を産生するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、M o

rrison, Science 229:1202 (1985)、Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986)、Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202、米国特許第5,807,715号、同第4,816,567号、および同第4,816,397号（参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。ヒト化抗体は、所望の抗原に結合する非ヒト種の抗体に由来する抗原分子であり、ヒトでない種に由来する1つ以上の相補性決定領域（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、当該技術分野で公知の方法により、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特定し、特定位置における異常なフレームワーク残基を特定することにより特定される（例えば、Queen et al., 米国特許第5,585,089号、Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)（参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。抗体は、例えば、CDR-移植（欧州特許出願第239,400号、PCT公開第WO91/09967号、米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号、および同第5,585,089号）、ベニヤリング（veneer ing）またはリサーフェイシング（resurfacing）（欧州特許出願第592,106号、同第519,596号、Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991)、Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994)、Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)）、および鎖シャッフリング（chainshuffling）（米国特許第5,565,332号）を含む、当該技術分野で周知の様々な技法を用いてヒト化され得る。

10

20

【0226】

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を用いた上記のファージディスプレイ方法を含む当該技術分野で周知の様々な方法により作製され得る。また、米国特許第4,444,887号および第4,716,111号、およびPCT公開第WO98/46645号、同第WO98/50433号、同第WO98/24893号、同第WO98/16654号、同第WO96/34096号、同第WO96/33735号、および同第WO91/10741号（これらの各々は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

30

【0227】

ヒト抗体はまた、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を、ランダムまたは相同組換えによりマウス胚性幹細胞に導入してもよい。代替として、ヒト可変領域、定常領域、および多様性領域を、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してもよい。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にまたは同時に非機能性を付与してもよい。特に、JH領域のホモ接合型欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。修飾された胚性幹細胞を増殖させ、胚盤胞中に微量注入して、キメラマウスを産生する。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すべてまたは一部を用いて通常の様態で免疫する。その抗原に対して生成されるモノクローナル抗体は、従来の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遺伝子は、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。したがって、このような技法の使用によって、治療

40

50

的に有用な I g G 抗体、I g A 抗体、I g M 抗体、および I g E 抗体の産生が可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技法の概要については、Lonberg and 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、およびこのような抗体を産生するためのプロトコルの詳細な考察については、例えば、PCT 公開第 WO 98/24893 号、同第 WO 92/01047 号、同第 WO 96/34096 号、同第 WO 96/33735 号、欧州特許出願第 0 598 877 号、米国特許第 5,413,923 号、同第 5,625,126 号、同第 5,633,425 号、同第 5,569,825 号、同第 5,661,016 号、同第 5,545,806 号、同第 5,814,318 号、同第 5,885,793 号、同第 5,916,771 号、同第 5,939,598 号、同第 6,075,181 号、および同第 6,114,598 号（これらは、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) および Genpharm (San Jose, CA) 等の企業は、上記したものと類似する技法を用いて、選択された抗原に対して作製されたヒト抗体を提供することを受託することができる。

10

【0228】

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)」と称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、選択された非ヒト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。(Jespersen et al., Bio/technology 12: 899-903 (1988) 参照)。

20

【0229】

抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明はさらに、抗体およびそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ストリンジェントまたは代替として、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（例えば、上記に定義されるような）、好ましくは、治療用タンパク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」の列に開示されるような「治療用タンパク質 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にハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。

30

【0230】

当該技術分野で周知の任意の方法により、ポリヌクレオチドを得、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定することができる。例えば、抗体のヌクレオチド配列が周知であるならば、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く（例えば、Kutmeier et al., BioTechnology 17: 242 (1994) に記載のように）、これには、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プする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連結、次いで、連結されたオリゴヌクレオチドの PCR による増幅が含まれる。

【0231】

代替として、抗体をコードするポリヌクレオチドは、好適な供給源からの核酸から産生され得る。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が、その抗体分子の配列は周知であるならば、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 ライブラリに由来する cDNA クローンを特定することにより、化学的に合成される、または好適な供給源（例えば、抗体 cDNA ライブラリ、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、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。PCR により産生された増幅さ

40

50

れた核酸は、次いで、当該技術分野で公知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る（実施例65を参照のこと）。

【0232】

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で公知の方法、例えば、組換えDNA技法、部位特異的突然変異誘発、PCR等（例えば、Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載の技法（これらは共に、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）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。

【0233】

特定の実施形態において、重鎖および／または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、当該技術分野で公知の方法、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、配列の超可変領域を決定することにより、相補性決定領域（CDR）の配列を特定するために調べられ得る。慣用的な組換えDNA技法を用いて、1つ以上の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、上記のように非ヒト抗体をヒト化し得る。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り得る（例えば、ヒトフレームワーク領域のリストについては、Chothia et al., 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の組み合わせ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、上に述べられるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、その抗原と抗体の結合を改善する。さらに、このような方法を用いて、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ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つ以上の鎖内ジスルフィド結合を欠失している抗体分子を産生することができる。ポリヌクレオチドに対する他の修飾は、本発明により包含され、かつ当該技術分野の範囲内にある。

【0234】

加えて、適切な生物学的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 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984)、Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)、Takeda et al., Nature 314:452-454 (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に由来する可変領域および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。

【0235】

代替として、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 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)、およびWard et al., Nature 334:544-54 (1989)）は、一本鎖抗体を産生するために適用され得る。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重鎖フラグメントと軽鎖フラグメントを連結させることにより形成され、一本鎖ポリペプチドを生じる。大腸菌中での機能性Fvフラグメントのアセ

ンブリのための技法も用いられてもよい (Skerra et al., Science 242: 1038-1041 (1988))。

【0236】

抗体の組換え発現

抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ（例えば、抗体の重鎖もしくは軽鎖、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もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分（好ましくは重鎖もしくは軽鎖可変ドメインを含む）をコードする本発明のポリヌクレオチドが得られると、抗体分子を産生するためのベクターは、当該技術分野で公知の技法を用いる組換えDNA技法により生成され得る。したがって、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、タンパク質を調製するための方法が、本明細書に記載される。当業者に公知の方法を用いて、抗体をコードす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。これらの方法には、例えば、体外の組換えDNA技法、合成技法、および生体内の遺伝子組換えが挙げられる。したがって、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるい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。このようなベクターは、抗体分子の定常領域（例えば、PCT公開第WO86/05807号、PCT公開第WO89/01036号、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み得、該抗体の可変ドメインは、全重鎖または全軽鎖の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

【0237】

発現ベクターは、従来の技法により宿主細胞へと移入され、次いで、トランスフェクションされた細胞は、従来の技法により培養されて、抗体を生じる。したがって、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるい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ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、全免疫グロブリン分子の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

【0238】

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。このような宿主-発現系は、関心対象となるコード配列を産生させ、次いで精製され得る媒体を表わすが、さらに、適切なヌクレオチドをコードする配列を用いて形質転換または形質移入する場合、本発明の抗体分子を原位置で発現する細胞も表わす。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もしくはコスミド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)）等の微生物；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、サッカロミセス、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構築物を有する哺乳類細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、大腸菌等の細菌細胞、およびより好ましくは、特に、全組換え抗体分子の発現のために真核細胞が、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由来の主な中間初期遺伝子プロモーターエレメント (intermediate early gene promoter element) 等の

ベクターと組み合わせた、チャイニーズハムスターの卵巣細胞（CHO）等の哺乳動物細胞が、抗体に対する効果的な発現系である（Foecking et al., Gene 45:101 (1986)、Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)）。

【0239】

細菌系において、多数の発現ベクターは、発現されるべき抗体分子の使用目的に応じて有利に選択されてもよい。例えば、多量のこのようなタンパク質が産生されるべき場合、抗体分子の医薬組成物の生成のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を導くベクターが所望され得る。このようなベクターは、抗体をコードする配列が、lac Zをコードする領域を有するフレーム内でベクターに個々に連結され、その結果、融合タンパク質が産生される大腸菌発現ベクターpUR278（Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)）；pINベクター（Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985)；Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)）等が挙げられるが、これに限定されない。また、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）との融合タンパク質として、外来ポリペプチドを発現させてもよい。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着および結合、次いで、遊離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することができる。pGEXベクターをトロニンまたは因子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。

10

20

【0240】

昆虫系では、Autographa californicaの核多角体ウイルス（AcNPV）をベクターとして用いて、外来遺伝子を発現する。このウイルスは、Spodoptera frugiperda細胞において増殖する。抗体をコードする配列は、このウイルスの非必須の領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）に個々にクローニングされ得る。AcNPVプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に配置され得る。

【0241】

哺乳動物宿主細胞では、多数のウイルスに基づく発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合には、関心対象となる抗体をコードする配列は、アデノウイルスの転写／翻訳制御複合体（例えば、後期プロモーターおよび3つの部分に分かれるリーダー配列）に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、体外または生体内での組換えにより、アデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスのゲノムの非必須領域（例えば、領域E1またはE3）における挿入は、生存可能で、感染した宿主において抗体分子を発現する能力のある組換えウイルスを生じる（例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)）を参照のこと）。特定の開始シグナルはまた、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得る。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、該開始コドンは、挿入部分全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレーム（reading frame）と同相でなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、種々の天然および合成の両方の起源であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター等の含有により高められ得る（Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)）を参照のこと）。

30

40

【0242】

加えて、挿入された配列の発現を調節し、または所望の特定の状態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得る。タンパク質産物のこのような修飾（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、タンパク質の機能にとって重

50

要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の、翻訳後プロセッシングおよび修飾について、特徴的で特異的な機構を有する。発現される外来タンパク質の正確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、遺伝子産物の一次転写、グリコシル化、およびリン酸化の適当なプロセッシング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。このような哺乳動物宿主細胞は、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、そして特に、例えば、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、およびT47D等の乳癌細胞株、ならびに、例えば、CRL7030およびHs578Bst等の正常な乳腺細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0243】

組換えタンパク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を操作してもよい。ウイルスの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、適切な発現制御要素（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等）および選択可能なマーカーにより制御されるDNAで形質転換され得る。外来DNAの導入後、操作された細胞を富化培地中で1～2日間成長させ、次いで、選択培地に交換してもよい。組換えプラスミドにおける選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を与え、細胞が、プラスミドをその染色体内に安定的に組み込み、成長して、細胞巣を形成することができ、順に、クローニング化し、細胞株に増殖することを可能にする。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を操作するために有利に用いられ得る。このような操作された細胞株は、直接的または間接的に抗体分子と相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において、特に有用であり得る。

【0244】

多数の選択系が使用され得、この選択系は、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wigler et al., 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. Natl. 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 et al., Cell 22:817 (1980)）の遺伝子（これらの遺伝子は、tk-、hgprt-、またはaprt-細胞においてそれぞれ採用され得る）が挙げられるが、これらに限定されない。また、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：メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr（Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980)）、O'Hare et al., 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；Clinical Pharmacy 12:488-505；Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991)；Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993)；Mulligan, Science 260:926-932 (1993)；およびMorgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993)；May, 1993, TIB TECH 11(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 et al., Gene 30:147 (1984)）。組換えDNA技術の分野で一般に周知の方法は、所望の組換えクローンを選択するために、慣用的に適用され得、このような方法は、例えば、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)、Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Pre

10

20

30

40

50

ss, NY (1990)、および Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994)、Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981)に記載され、これらは、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0245】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅により増大され得る（総説については、Bebington and 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におけるマーカーが、増幅可能であると、宿主細胞の培養物に存在する阻害剤のレベルにおける増加は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加する。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 et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)）。

【0246】

グルタミンシンターゼ（GS）またはDHFRを選択可能なマーカーとして使用するベクターはそれぞれ、薬物メチオニンスルホキシミン（sulphoximine）またはメトトレキサートの存在下で、増幅され得る。グルタミンシンターゼベースのベクターの利点は、グルタミンシンターゼネガティブである細胞株（例えば、マウス骨髄腫細胞株、NSO）の利用可能性にある。グルタミンシンターゼ発現系はまた、内因性遺伝子の機能を妨げ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公開第W087/04462号、同第W086/05807号、同第W089/01036号、同第W089/10404号、および同第W091/06657号に詳述されており、これらは、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。さらに、本発明にしたがって使用され得るグルタミンシンターゼ発現ベクターは、例えば、Lonza Biologies, Inc. (Portsmouth, NH)を含む供給元から市販されている。マウス骨髄腫細胞においてGS発現系を使用する、モノクローナル抗体の発現および産生は、Bebington et al., Bio/technology 10:169 (1992)ならびにBiblia and Robinson Biotechnol. Prog. 11:1 (1995)（これらは、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される。

【0247】

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、同時形質移入され得る。この2つのベクターは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの等しい発現を可能にする、同一の選択可能なマーカーを含み得る。代替として、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方をコードし、発現することができる、単一のベクターが使用され得る。このような状況において、過剰の毒性の遊離重鎖を避けるために、重鎖の前に軽鎖が配置されるべきである（Proudfoot, Nature 322:52 (1986)、Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)）。重鎖および軽鎖のためのコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

【0248】

本発明の抗体分子が、動物により産生されるか、化学的に合成されるか、または組換えにより発現されると、当該技術分野で周知の、免疫グロブリン分子の精製のための任意の方法、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、プロ

10

20

30

40

50

テインAの後に特異的抗原に対するアフィニティーによる）、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製のための任意の他の標準的な技法により、精製され得る。加えて、治療用タンパク質に結合する、および本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に応答し得る抗体またはそのフラグメントは、本明細書に記載される、またはそうでなければ当該分野で周知の、異種ポリペプチド配列に融合され得、精製を容易にする。

【0249】

抗体の修飾

治療用タンパク質に結合する抗体またはそのフラグメントもしくは変異体は、精製を容易にするために、ペプチド等のマーカー配列に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、ヘキサーヒスチジンペプチド（例えば、pQEベクター（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）において提供されるタグ）であり、これらの多くは、市販されている。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989) において記載されるように、例えば、ヘキサーヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製のために有用な他のペプチドタグとしては、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する赤血球凝集素タグ（「HA」タグとも称される）（Wilson et al., Cell 37:767 (1984)）、および「flag」タグが挙げられるが、これらに限定されない。

【0250】

本発明はさらに、診断剤または治療剤に結合体化される、抗体またはそのフラグメントを包含する。抗体は、例えば、臨床上の試験手順（例えば、所定の処置療法の効力を決定するため）の一部として、腫瘍の発生または進行を監視するために、診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質と連結させることにより容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子放射断層撮影を用いる陽電子放射金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。検出可能な物質は、当該技術分野で周知の技法を用いて、直接的または中間体（例えば、当該技術分野で周知のリンカーのような）を介して間接的に抗体（またはそのフラグメント）に連結または共役されてもよい。本発明に従って診断剤として用いるための抗体に共役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。好適な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、好適な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ、好適な蛍光物質の例としては、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、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが挙げられ、発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ、生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ、好適な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、または ^{99}Tc が挙げられる。検出可能な物質の他の例は、本明細書の他の箇所に記載されている。

【0251】

さらに、本発明の抗体は、治療用部分（例えば、細胞毒（例えば、細胞増殖抑制性もしくは細胞破壊の薬剤））、治療剤または放射性金属イオン（例えば、 α -エミッター（例えば、 ^{213}Bi ）等）に共役され得る。細胞毒または細胞毒性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を含む。例としては、パクリタキセル（paclitaxol）、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、テニポシド（tenoposide）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン（colchicin）、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（dihydroxy anthracin dione）、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、ならびにそのアナログまたはホモログが挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、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（5-fluorouracil decarbazine）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ（thioepa）クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにcis-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アンスラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）およびドキシソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアンスラマイシン（anthramycin）（AMC））、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0252】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を修飾するために使用され得、治療剤または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されるものと解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、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）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経発育因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス薬（例えば、TNF- α 、TNF- β 、AIM I（国際公開第WO97/33899号を参照のこと）、AIM II（国際公開第WO97/34911号を参照のこと）、Fasリガンド（Takahashi et al., Int. Immunol. 6:1567-1574 (1994)）、VEGI（国際公開第WO99/23105号を参照のこと）、血栓症薬もしくは血管新生阻害剤（例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン）；または生物学的応答修飾剤（例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、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」）、または他の増殖因子等）が挙げられ得る。

【0253】

抗体はまた、固体支持体に付着させられ得、これは、標的抗原の免疫アッセイまたは精製に特に有用である。このような固体支持体としては、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、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0254】

このような治療部分を抗体に結合する技法は、公知である。例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)、Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)、Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 4

10

20

30

40

50

75-506 (1985), "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), および Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982) を参照のこと。

【0255】

代替として、抗体は、2次抗体に共役され、米国特許第4,676,980号（これは、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）において Segal により記載のような抗体の異種結合体 (heteroconjugate) を形成し得る。

【0256】

単独、あるいは細胞毒性因子および／またはサイトカインと組み合わせて投与される、抗体に結合する治療部分を有するかまたは有しない抗体が、治療薬として使用され得る。

【0257】

抗体-アルブミンの融合

治療用タンパク質に結合する、および本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応し得る抗体としては、表1の「治療用タンパク質X」の列に開示される治療用タンパク質に結合する抗体、またはそのフラグメントもしくは変異体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0258】

特定の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、VHドメインを含む、または代替として、それらからなる。他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、1、2または3個のVH CDRを含む、または代替として、それらからなる。他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、VH CDR1を含む、または代替として、それらからなる。他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、VH CDR2を含む、または代替として、それらからなる。他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、VH CDR3を含む、または代替として、それらからなる。

【0259】

特定の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、VLドメインを含む、または代替として、それらからなる。他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、1、2、または3個のVL CDRを含む、または代替として、それらからなる。他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、VL CDR1を含む、または代替として、それらからなる。他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、VL CDR2を含む、または代替として、それらからなる。他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブ

他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブ

10

20

30

40

50

ミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、V L C D R 3を含む、または代替として、それらからなる。

【0260】

他の実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、1、2、3、4、5、または6個のV Hおよび／またはV L C D Rを含む、または代替として、それらからなる。

【0261】

好ましい実施形態において、治療用タンパク質に免疫特異的に結合する、およびアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する抗体のフラグメントもしくは変異体は、ペプチドリンカー（例えば、(G l y 4 S e r) 3（配列番号4））により治療抗体のV Lドメインに連結された、治療抗体のV Hドメインを含むs c F vを含む、または代替として、それらからなる。

【0262】

免疫表現型分類 (i m m u n o p h e n o t y p i n g)

本発明の抗体、あるいは治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、細胞株および生物学的試料の免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の治療用タンパク質は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより具体的には、特定の細胞型の分化および／または成熟の種々の段階で差示的に発現される細胞マーカーとして有用であり得る。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対して作製されるモノクローナル抗体（あるいは治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントまたは変異体を含むアルブミン融合タンパク質）は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技法が、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクローナル抗体（あるいは治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントまたは変異体を含むアルブミン融合タンパク質）を用いて利用され得、その技術には、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、固体マトリクス（すなわち、プレート）に付着した抗体を用いる「パンニング」、ならびに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M o r r i s o n e t a l . , C e l l , 96:737-49（1999）を参照のこと）が挙げられる。

【0263】

これらの技法は、血液学的悪性腫瘍（すなわち、急性白血病患者における微小残存病変（M R D））および対宿主性移植片病（G V H D）を予防するための移植術における「非自己」細胞と共に見出され得るような、細胞の特定集団のスクリーニングを可能にする。代替として、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。

【0264】

治療用タンパク質ならびに治療用タンパク質に結合する抗体のフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質に結合する抗体の特徴付け

本発明の抗体、または治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、様々に特徴付けられ得る。特に、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、本明細書に記載の技法または当該技術分野で周知の慣例的に改変する技法を用いて、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク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。

【0265】

本発明の抗体、または治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン

10

20

30

40

50

融合タンパク質が、特異的タンパク質またはエピトープに（特異的に）結合する能力についてのアッセイは、溶液中で（例えば、Houghten, Bio/Techniques 13:412-421 (1992)）、ビーズ上で（例えば、Lam, Nature 354:82-84 (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、米国特許第5,571,698号、同第5,403,484号、および同第5,223,409号）、プラスミドで（例えば、Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869 (1992)）、またはファージで（例えば、Scott and Smith, Science 249:386-390 (1990)、Devlin, Science 249:404-406 (1990)、Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382 (1990)、および Felici, J. Mol. Biol. 222:301-310 (1991)）行なうことができる（これらの参考文献の各々は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。本発明の抗体、または治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質はまた、本明細書に記載される、またはそうでなければ、他の当該技術分野で周知の技法を使用または慣用的に改変して、特定のタンパク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、アッセイされ得る。

【0266】

治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、当該技術分野で周知の任意の方法により、他の抗原（例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する、治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）に結合する抗体により特異的に結合される分子との、配列保存／構造保存を有する分子）との交差反応性について、アッセイされ得る。

【0267】

（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、例をいくつか挙げると、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、およびタンパク質Aイムノアッセイ等の技法を用いる競合的および非競合的アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。このようなアッセイは、慣用的であり、かつ当該技術分野で公知である（例えば、Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。例示的なイムノアッセイが、以下に簡潔に記載される（が、これらは限定を目的とすることが意図されない）。

【0268】

概して、免疫沈降プロトコルは、溶解緩衝液、例えば、タンパク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、パナジン酸ナトリウム）を追加したRIPA緩衝液（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、本発明の抗体または治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質を細胞溶解物に加え、一定時間（例えば、1～4時間）40℃で培養し、タンパク質Aおよび／またはタンパク質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つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質の場合は、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℃で培養し、溶解緩衝液でビーズを洗浄し、次いで、SDS/試料緩衝液中にビーズを再懸濁することを含む。本発明の抗体またはアルブミン融合タンパク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タンパク質と抗原の結合を増大させ、バックグラウンドを減少させるように修飾され得るパラメータ(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)について認識できるだろう。免疫沈降プロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubel et al, 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。

10

【0269】

概して、ウエスタンブロット分析は、タンパク質試料を調製し、そのタンパク質試料を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)中で電気泳動し、そのタンパク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またはナイロン等の膜へ転写し、ブロッキング溶液(例えば、3%のBSAを伴うPBSまたは脱脂乳)中でその膜をブロッキングし、洗浄緩衝液(例えば、PBS-Tween 20)中でその膜を洗浄し、本発明の抗体またはアルブミン融合タンパク質(ブロッキング緩衝液中で希釈されている)をその膜に適用し、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄し、ブロッキング緩衝液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、³²Pまたは¹²⁵I)に共役させた二次抗体(例えば、抗ヒト血清アルブミン抗体等のアルブミン融合タンパク質を認識するもの)を適用し、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄し、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、バックグラウンドノイズを減少させるように改変できるパラメータ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考察については、例えば、Ausubel et al, 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。

20

【0270】

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)等の検出可能な化合物に共役させた本発明の抗体またはアルブミン融合タンパク質(治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む)をウェルに加え、次いで、一定時間培養し、結合しなかったもしくは非特異的に結合したアルブミン融合タンパク質を洗い流し、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抗体またはアルブミン融合タンパク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タンパク質は、検出可能な化合物と共役させる必要がなく、その代わりに、検出可能な化合物に共役させた二次抗体(抗体またはアルブミン融合タンパク質をそれぞれ認識する)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、抗体またはアルブミン融合タンパク質を、ウェルに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)等の検出可能な化合物に共役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修飾され得るパラメータならびに当該技術分野で周知のELISAの他のバリエーションについて認識できるだろう。ELISAに関するさらなる考察については、例えば、Ausubel et al, 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。

30

40

50

【0271】

タンパク質、抗原、またはエピトープに対するアルブミン融合タンパク質の結合親和性および抗体またはアルブミン融合タンパク質—タンパク質／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、本発明の抗体またはアルブミン融合タンパク質と標識抗原（例えば、 ^3H または ^{125}I ）とを培養し、次いで、標識抗原に結合した抗体を検出することを含む。特定のタンパク質、抗原、またはエピトープについての本発明の抗体またはアルブミン融合タンパク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することができる。抗体またはアルブミン融合タンパク質と同じタンパク質、抗原、またはエピトープに結合する二次タンパク質との競合も、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、タンパク質、抗原、またはエピトープを、本発明のアルブミン融合タンパク質と同じタンパク質、抗原、またはエピトープに結合する増大量の非標識二次タンパク質の存在下、標識化合物（例えば、 ^3H または ^{125}I ）に共役させた本発明の抗体またはアルブミン融合タンパク質と共にインキュベートする。

10

【0272】

好ましい実施形態において、BIAcore動態分析を用いて、タンパク質、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タンパク質の結合および解離速度を決定する。BIAcore動態分析は、それらの表面上に固定化特異的ポリペプチド、抗原もしくはエピトープ、抗体もしくはアルブミン融合タンパク質をそれぞれ有するチップへの、抗体、アルブミン融合タンパク質、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解離を分析することを含む。

20

【0273】

治療用途

本発明はさらに、1つ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、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトの患者に、本発明の抗体、または治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質を投与することを包含する、抗体に基づいた治療に関するものである。本発明の治療用化合物としては、本発明の抗体（本明細書に記載されるようなそのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む）、本発明の抗体（本明細書に記載されるようなそのフラグメント、アナログおよび誘導体、ならびに抗イディオタイプ抗体を含む）をコードする核酸、治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質、ならびにこのようなアルブミン融合タンパク質をコードする核酸が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体または治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、本明細書に記載される任意の1つ以上の疾患、障害、または状態が挙げられるが、これらに限定されない、治療用タンパク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。治療用タンパク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が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体または治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、当該技術分野で周知の、または本明細書に記載されるような医薬的に許容される組成物に提供され得る。

30

40

【0274】

特定かつ好ましい実施形態において、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／または本明細書に別記されているものが挙げられるが、これらに限定されない、1つ以上の疾患、障害、または状態を処置するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトの患者に、本発明の抗体、または治療用タンパク質に結合

50

する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質を投与することを含む、抗体に基づく治療を対象にする。本発明の治療用化合物としては、本発明の抗体（例えば、哺乳類細胞の細胞表面上に発現される全長タンパク質に対する抗体；治療用タンパク質のエピトープに対する抗体）および本発明の抗体（本明細書に記載されるようなそのフラグメント、アナログおよび誘導体、ならびに抗イディオタイプ抗体を含む）をコードする核酸が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は、本明細書に記載される任意の1つ以上の疾患、障害、または状態が挙げられるが、これらに限定されない、治療用タンパク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。治療用タンパク質の異常な発現および／または活性に関連した疾患、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、または状態に関連した症状を緩和することが挙げられるが、これに限定されない。本発明の抗体、または治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、当該技術分野で周知の、または本明細書に記載されるような医薬的に許容される組成物に提供され得る。

10

【0275】

本発明の抗体または治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質を治療的に用いてもよい方法の概要には、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り治療用タンパク質を結合させることが含まれる。これらのアプローチの一部は、以下により詳細に記載する。本明細書に提供される教示があれば、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タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質の使用方法を認識する。

20

【0276】

本発明の抗体、または治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、他のモノクローナル抗体もしくはキメラ抗体と組み合わせて、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等の）と組み合わせて、有利に利用され得る。

30

【0277】

本発明の抗体、または治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、単独で、または他の型の処置（例えば、放射線治療、化学療法、ホルモン性治療、免疫治療、および抗腫瘍薬剤）と組み合わせて投与され得る。概して、患者と同じ種である種起源または種の反応性（抗体の場合）を有する産物の投与が、好ましい。したがって、好ましい実施形態において、ヒト抗体、フラグメント誘導体、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。

【0278】

そのフラグメント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に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、治療用タンパク質、そのフラグメントまたは領域、（またはこのような抗体に相関するアルブミン融合タンパク質）に対して、高親和性および／または強力な生体内阻害抗体および／または中和抗体を用いることが、好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド（そのフラグメントを含む）に対する親和性を有する。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未満の解離定数すなわち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未満の解離定数すなわちKdを

40

50

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未満の解離定数すなわちK_dを有するものを含む。

【0279】

遺伝子治療

特定の実施形態において、治療用タンパク質、または治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク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、治療用タンパク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。遺伝子治療とは、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指す。本発明のこの実施形態において、核酸は、治療効果を媒介するこれらのコードしたタンパク質を産生する。

10

【0280】

当該技術分野で利用可能な遺伝子治療についての任意の方法は、本発明に従い使用され得る。例示的な方法は、本出願の他の部分により詳細に記載される。

【0281】

治療的または予防的活性の立証

本発明の化合物または医薬組成物は、好ましくは、ヒトにおいて使用する前に所望の治療活性または予防活性について体外で、および次いで生体内で試験される。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立証するための体外アッセイは、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が挙げられるが、これらに限定されない当業者に周知の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どうかを決定するために用いられ得る体外アッセイは、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、またはそうでなければ、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、体外細胞培養アッセイを含む。

20

【0282】

治療的／予防的な投与および組成物

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に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。好ましい実施形態において、化合物は、実質的に精製されている（例えば、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は実質的にない）。好ましくは、対象は、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ等の動物が挙げられるが、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。

30

【0283】

化合物が、核酸または免疫グロブリンを含む場合、採用され得る製剤および投与方法は、上で説明されている。さらなる適切な製剤および投与経路は、本明細書の以下に記載されているものから選択され得る。

40

【0284】

様々な送達系が知られており、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、この化合物の発現が可能な組換え細胞中でのカプセル化、受容体媒介エンドサイトーシス（例えば、Wu and 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一部としての核酸の構築な等）。導入方法としては、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられるが、これらに限定されない。化合物または組成物は、任意の簡便な経路、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、および小腸粘膜等）により投与されてもよく、他の生物活性剤と共に投与されてもよい。投与は、全身または局

50

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好適な経路により、本発明の医薬化合物または組成物を中枢神経系に導入することが望ましい場合がある。脳室内注入は、例えば、Ommaya リザーバー等の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得る。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製剤を用いた経肺投与も採用できる。

【0285】

特定の実施形態において、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望ましい場合がある。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等により成し遂げられてもよく、該インプラントは、シアラストック (sialastic) 膜等の膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、またはゼラチン様物質である。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する場合、タンパク質が吸収しない材料を用いるように注意が必要である。

【0286】

別の実施形態において、化合物または組成物は、ベシクル、特にリボソーム中において送達することができる (Langer, Science 249:1527-1533 (1990)、Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)、Lopez-Berestein, 同書, pp. 317-327を参照のこと、概して同書を参照のこと)。

【0287】

さらなる別の実施形態において、化合物または組成物は、制御された放出系において送達することができる。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る (Langer, 上記参照、Sef-ton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987)、Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980)、Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)を参照のこと)。別の実施形態において、ポリマー物質が用いられ得る (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)、Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)、Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)を、参照のこと、Levy et al., Science 228:190 (1985)、During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989)、Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)も参照のこと)。さらなる別の実施形態において、制御された放出系は、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、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release、上記参照、vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照のこと)。

【0288】

他の制御された放出系は、Langerによる総説にて論じられている (Science 249:1527-1533 (1990))。

【0289】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である特定の実施形態において、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

10

20

30

40

50

たは微粒子ボンバードメントを用いて（例えば、遺伝子銃；B i o l i s t i c、D u p o n t）、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等に連結させてこれを投与すること（例えば、J o l i o t e t a l., P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 88:1864-1868 (1991)を参照のこと）等により、細胞内に位置するように核酸を生体内において投与し、それがコードするタンパク質の発現を改善することができる。代替として、相同組換えにより、核酸は細胞内に導入され、発現のための宿主細胞DNA内に組み込まれる。

【0290】

本発明はまた、医薬組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の化合物、および医薬的に許容される担体を含む。特定の実施形態において、「医薬的に許容される」という用語は、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概して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。「担体」という用語は、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指す。このような医薬担体は、水および油（石油起源、動物起源、植物起源、または合成起源の油（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等）を含む）等の滅菌した液体であり得る。水は、医薬組成物が静脈内投与される場合、好ましい担体である。生理的食塩水溶液、ならびに水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた、液体担体、特に、注入可能な溶液として採用され得る。好適な医薬的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、イネ、小麦粉、白亜、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、乾燥脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が挙げられる。組成物はまた、所望されるならば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含み得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性処方等の形態をとり得る。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。経口処方物は、標準的な担体、例えば、医薬グレードのマニトール、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、炭酸マグネシウム等を含み得る。好適な医薬担体の例は、E. W. M a r t i nによる“R e m i n g t o n ’ s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e”に記載されている。このような組成物は、治療有効量の化合物を、好ましくは精製された形態で、好適な量の担体と共に含んで、患者への適切な投与のための形態を提供する。処方物は、投与形態に適すべきである。

【0291】

好ましい実施形態において、組成物は、慣用手順に従って、ヒトへの静脈内投与のために採用された医薬組成物として、処方される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤および注射の部位での痛みを緩和するリグノカイン等の局部麻酔を含み得る。概して、成分は、別々に、あるいは単一投薬形態と一緒に混合して、例えば、一定量の活性薬剤を示すアンプルまたはサシエット等の密封された容器中の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給される。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調剤される。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。

【0292】

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。医薬的に許容される塩としては、アニオン（例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等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、プロカイン等に由来するものを用いて形成されたもの）が挙

げられる。

【0293】

治療用タンパク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、任意に、体外アッセイを採用して、最適な投与範囲の決定に役立ててもよい。製剤において採用されるべき正確な用量はまた、投与の経路、および疾患または障害の重篤度に依存し、医療従事者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、体外で、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。

【0294】

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1kgあたり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1kgあたり0.1mg/kg～20mg/kgであり、より好ましくは、患者の体重1kgあたり1mg/kg～10mg/kgである。概して、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。したがって、多くの場合、ヒト抗体の低い投薬量および頻度の低い投与が可能である。さらに、例えば、脂質化等の修飾により、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得る。

【0295】

診断および画像化

治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）（治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質を含む）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、治療用タンパク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、または監視することができる。本発明は、治療用タンパク質の異常な発現の検出を提供するものであって、（a）着目ポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を用いて、個体の細胞または体液内の治療用タンパク質の発現をアッセイすることと、（b）標準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とを含み、これにより、標準発現レベルと比較して、アッセイした治療用タンパク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。

【0296】

本発明は、障害を診断するための診断アッセイを提供するものであって、（a）治療用タンパク質または治療用タンパク質に特異的な抗体の変異体の少なくとも1つのフラグメントを含むアルブミン融合タンパク質に特異的な1つ以上の抗体を用いて、個体の細胞または体液内の治療用タンパク質の発現をアッセイすることと、（b）標準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とを含み、これにより、標準発現レベルと比較して、アッセイした治療用タンパク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を示し得、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得る。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採用することができる。

【0297】

本発明の抗体、または治療用タンパク質に特異的な抗体の変異体の少なくとも1つのフラグメントを含むアルブミン融合タンパク質を用いて、当業者に周知の古典的な免疫組織学的方法により、生体試料中のタンパク質レベルをアッセイできる（例えば、Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985)、Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)を参照のこと）。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な他の抗

体ベースの方法は、酵素結合免疫吸着法（E L I S A）およびラジオイムノアッセイ（R I A）等のイムノアッセイを含む。好適な抗体アッセイ標識は、当該技術分野で知られており、グルコースオキシダーゼ等の酵素標識；放射性同位元素、例えば、ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{112}In ）、およびテクネチウム（ ^{99}Tc ）；ルミノール等の発光標識；ならびにフルオレセインおよびローダミン等の蛍光標識、ならびにビオチンが挙げられる。

【0298】

本発明の1つの局面は、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおける、治療用タンパク質の異常な発現と関連する疾患または障害の検出および診断である。一実施形態において、診断は、a) 関心対象となるポリペプチドに特異的に結合する有効量の標識分子を対象に（例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に）投与すること、b) 標識分子を治療用タンパク質を発現する対象における部位で、優先的に濃縮させるために（および非結合標識分子をバックグラウンドレベルまで排出させるために）投与後、時間間隔を待つこと、c) バックグラウンドレベルを決定すること、およびd) 対象における標識分子を検出すること、を含み、その結果、該バックグラウンドレベルを超える標識分子の検出は、対象が治療用タンパク質の異常な発現と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と、検出された標識分子の量を比較することを含む、種々の方法により決定され得る。

【0299】

対象のサイズおよび用いられる画像化システムが、診断画像を生成するために必要とされる画像化部分の量を決定することが当該技術分野で理解されよう。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 $^{99\text{mTc}}$ であり得る。標識抗体、抗体フラグメント、または治療用タンパク質に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質は、その後、特定の治療用タンパク質を含む細胞の位置に選択的に蓄積し得る。生体内での腫瘍画像化は、S. W. Burchiel et al., “Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments” (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel and B. A. Rhodes, ed., Masson Publishing Inc. (1982)) において記載される。

【0300】

用いる標識の型および投与方法を含むいくつかの可変要素に応じて、標識分子を対象における部位で、優先的に濃縮させるため、および非結合標識分子をバックグラウンドレベルまで排出させるための、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。別の実施形態において、投与後の時間間隔は、5～20日または5～10日である。

【0301】

一実施形態において、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年後等に、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。

【0302】

標識分子の存在は、生体内スキャンについて当該技術分野で周知の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、用いる標識の種類に依存する。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し得る。本発明の診断方法において用いられ得る方法および装置としては、コンピュータ連動断層撮影法（C T）、陽電子放出断層撮影法（P E T）等の全身スキャン、磁気共鳴画像法（M R I）、および超音波検査が挙げられるが、これらに限定されない。

【0303】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、分子は、放射性同位元素を用いて標識され、放射線応答手術装置を用いて患者において検出される（Thurstone et al.、米国特許第5,441,050号）。別の実施形態において、分子は、蛍光化合物を用いて標識され、蛍光応答スキニング装置を用いて患者において検出される。別の実施形態において、分子は、陽電子放出金属を用いて標識され、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。さらなる別の実施形態において、分子は、常磁性標識を用いて標識され、磁気共鳴画像法（MRI）を用いて患者において検出される。アルブミン融合タンパク質を特異的に検出し、アルブミンまたは治療用タンパク質単独では検出しない抗体が、好ましい実施形態である。本明細書にわたって記載されるように、これらは、アルブミン融合タンパク質を検出するために用いられ得る。

10

【0304】

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。一実施形態において、キットは、1つ以上の容器中に1つの抗体、好ましくは1つの精製された抗体を含む。特定の実施形態において、本発明のキットは、キットに含まれる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、関心対象となるポリペプチドと反応しない対照抗体を含む。別の実施形態において、本発明のキットは、関心対象となるポリペプチドとの抗体の結合（例えば、該抗体は、検出可能な基質を検出するための手段を含む（例えば、抗体は、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物、または発光化合物と共役され得るか、あるいは第1の抗体を認識する第2の抗体が、検出可能な基質と共役され得る）。

20

【0305】

本発明の別の実施形態において、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で用いる診断キットである。このようなキットは、関心対象となるポリペプチドと反応しない対照抗体を含んでもよい。このようなキットは、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んでもよい。さらに、このようなキットは、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等の蛍光化合物に共役されていてよい）。特定の実施形態において、該キットは、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また、固体支持体に付着させてもよい。

30

【0306】

さらに特定の実施形態において、上記のキットの検出手段は、該ポリペプチド抗原を付着させる固体支持体を含む。このようなキットはまた、非付着レポーター標識抗ヒト抗体を含み得る。本実施形態において、ポリペプチド抗原との抗体の結合は、該レポーター標識抗体の結合により検出され得る。

【0307】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清をスクリーニングするために用いる診断キットを含む。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、および抗体とのポリヌクレオチドまたはポリペプチド抗原の結合を検出するための手段を含む。一実施形態において、抗体は、固体支持体に付着させる。特定の実施形態において、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、第2の、標識モノクローナル抗体を含み得る。代替として、または加えて、検出手段は、標識された競合抗原を含み得る。

40

【0308】

1つの診断の構成においては、試験血清は、本発明の方法により得られる表面結合抗原を有する固相試薬と反応する。特定の抗原抗体を本試薬と結合させ、非結合血清成分を洗浄により除去した後、固体支持体上に結合する抗抗原抗体の量に比例して、レポーターを本試薬と結合させるために、本試薬をレポーター標識抗ヒト抗体と反応させる。本試薬を

50

再び洗浄し、非結合標識抗体を除去し、次いで、試薬に関連するレポーターの量を決定する。典型的に、該レポーターは、好適な蛍光性、発光、または比色分析用基質（S i g m a , S t . L o u i s , M O ）の存在下、固相を培養することにより検出される酵素である。

【0309】

上記のアッセイの固体表面試薬は、タンパク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の周知の技法により調製される。これらの付着方法としては、概して、支持体へのタンパク質の非特異的な吸着、または固体支持体上の化学的に活性な基（例えば、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基、またはアルデヒド基）とのタンパク質の共有結合（典型的には、遊離アミン基を介する）が挙げられる。代替として、ストレプトアビジンでコートされたプレートが、ビオチン化された抗原と共に使用され得る。

【0310】

したがって、本発明は、本診断方法を行うためのアッセイ系またはキットを提供する。該キットは、概して、表面結合された組換え抗原を有する支持体、および表面結合され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。

【0311】

アルブミン融合タンパク質

本発明は、概して、アルブミン融合タンパク質、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。本明細書に使用される「アルブミン融合タンパク質」とは、治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）の少なくとも1つの分子に対してアルブミン（またはそのフラグメントもしくは変異体）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タンパク質を指す。本発明のアルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質の少なくとも1つのフラグメント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つのフラグメントもしくは変異体を含み、それらは、好ましくは、遺伝子融合により互いに結合される（すなわち、アルブミン融合タンパク質は、核酸の翻訳により生じ、ここで、治療用タンパク質のすべてまたは一部をコードするポリヌクレオチドは、アルブミンのすべ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ている）、または互いに結合する。治療用タンパク質およびアルブミンタンパク質は、アルブミン融合タンパク質の一部となった際、それぞれ、アルブミン融合タンパク質の「一部（p o r t i o n）」、「領域」、または「部分（m o i e t y）」と称され得る。

【0312】

好ましい実施形態において、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タンパク質または表1または表2に記載のアルブミン融合構築物を提供する。これらのアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、本発明により包含される。

【0313】

本発明の好ましいアルブミン融合タンパク質としては、治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）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（またはそのフラグメントもしくは変異体）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、または代替として、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タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）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（またはそのフラグメントもしくは変異体）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、または代替として、それからなる核酸分子；または治療用タンパク質（またはそのフラグメントもしくは変異体）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（またはそのフラグメントもしくは変異体）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、または代替として

、それからなる核酸分子であって、さらに、例えば、1つ以上の以下の要素：（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／または複製系が挙げられるが、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等のプロモーター領域）、（３）転写終結領域、（４）リーダー配列、および（５）選択可能なマーカを含む核酸分子によりコードされるアルブミン融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

一実施形態において、本発明は、治療用タンパク質（例えば、表１に記載のような）および血清アルブミンタンパク質を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。他の実施形態において、本発明は、治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質の生物学的に活性なおよび／または治療的に活性なフラグメントを含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。他の実施形態において、本発明は、治療用タンパク質および血清アルブミンタンパク質の生物学的に活性なおよび／または治療的に活性な変異体を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク質の血清アルブミンタンパク質成分は、血清アルブミンの成熟部分である。

【０３１４】

さらなる実施形態において、本発明は、治療用タンパク質、ならびに血清アルブミンの生物学的に活性なおよび／または治療的に活性なフラグメントを含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。さらなる実施形態において、本発明は、治療用タンパク質、ならびに血清アルブミンの生物学的に活性なおよび／または治療的に活性な変異体を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分は、治療用タンパク質の成熟部分である。

【０３１５】

さらなる実施形態において、本発明は、治療用タンパク質の生物学的に活性なおよび／または治療的に活性なフラグメントもしくは変異体、ならびに血清アルブミンの生物学的に活性なおよび／または治療的に活性なフラグメントもしくは変異体を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。好ましい実施形態において、本発明は、治療用タンパク質の成熟部分および血清アルブミンの成熟部分を含む、または代替として、それからなるアルブミン融合タンパク質を提供する。

【０３１６】

好ましくは、アルブミン融合タンパク質は、N末端部分としてHAおよびC末端部分として治療用タンパク質を含む。代替として、C末端部分としてHA、およびN末端部分として治療用タンパク質を含むアルブミン融合タンパク質が、用いられてもよい。

【０３１７】

他の実施形態において、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タンパク質を有する。好ましい実施形態において、NおよびC末端に融合された治療用タンパク質は、同じ治療用タンパク質である。代替的な好ましい実施形態において、NおよびC末端に融合された治療用タンパク質は、異なる治療用タンパク質である。別の好ましい実施形態において、NおよびC末端に融合された治療用タンパク質は、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」の列に記載のような）を処置または予防するために用いられ得る異なる治療用タンパク質である。別の好ましい実施形態において、NおよびC末端に融合された治療用タンパク質は、当該技術分野で、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」の列に記載のような）を処置、改善、または予防するために用いられて得る異なる治療用タンパク質である。

【０３１８】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、本発明のアルブミン融合タンパク質の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末端に融合された所定の

10

20

30

40

50

治療用タンパク質Xまたはその変異体の1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の分子を含むタンパク質を包含する。所定の治療用タンパク質Xまたはその変異体の分子は、「頭部－頭部」の配向（例えば、治療用タンパク質Xの1つの分子のN末端が、治療用タンパク質Xの別の分子のN末端に融合されている）、または「頭部－尾部」の配向（例えば、治療用タンパク質Xの1つの分子のC末端が、治療用タンパク質Xの別の分子のN末端に融合されている）が挙げられるが、これらに限定されない、様々な配向性であってもよい。

【0319】

一実施形態において、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の立て連結に配向した治療用タンパク質Xポリペプチド（またはそのフラグメントもしくは変異体）は、本発明のアルブミン融合タンパク質の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。

【0320】

本発明のアルブミン融合タンパク質はさらに、本発明のアルブミン融合タンパク質の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末端に融合される所定の治療用タンパク質Xまたはその変異体の1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の分子を含むタンパク質も包含し、ここで、分子はペプチドリinkerにより連結される。例えば、米国特許第5,073,627号（参照することにより本明細書に組み込まれる）に記載されるペプチドリinkerを含む。ペプチドリinkerにより分離される複数の治療用タンパク質Xポリペプチドを含むアルブミン融合タンパク質は、従来の組換えDNA技法を用いて産生することができる。小さなペプチドを大きなHSA分子へ融合する場合、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、または他の周知のリンカーが用いられ得る。リンカーを組み込む構築物は、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。

【0321】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質はまた、分子内および／または分子間の多量体型を形成させるように、治療用タンパク質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。本発明の一実施形態において、アルブミン融合タンパク質は、単量体型または多量体型（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。本発明のさらなる実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分は、単量体型または多量体型（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。特定の実施形態において、アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分は、多量体型（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、アルブミンタンパク質部分は、単量体型である。

【0322】

アルブミン部分が、治療用タンパク質部分の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タンパク質に加えて、本発明のアルブミン融合タンパク質はまた、関心対象となる治療用タンパク質またはペプチド（例えば、表1に開示されるような治療用タンパク質X、または治療用タンパク質に結合する抗体またはそのフラグメントもしくは変異体）をHA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分子のタンパク質配列内には、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識別子1AO6、1BJ5、1BKE、1BM0、1E7E～1E7Iおよび1UOR）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生成するために有用である。

【0323】

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タンパク質を生成し得るヒトアルブミン構造中のループは：Val 54～Asn 61、Thr 76～Asp 89、Ala 92～Glu 100、Gln 170～Ala 176、His 247～Glu 252、Glu 266～Glu 277、Glu 280～His 288、Ala 362～Glu 368、Lys 439～Pro 447、Val 462～Lys 475、Thr 478～Pro 486およびLys 560～Thr 566を含む。より好ましい実施形態において、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Val 54～Asn 61、Gln 170～Ala 176、および／またはLys 560～Thr 566ループへ挿入される。

【0324】

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、あるいは所望の機能を有する分子の活性部分に由来され得る。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を生成してもよく、ここでは、アミノ酸のすべての可能な組み合わせが示される。

【0325】

かかるライブラリは、以下の方法の1つにより、HAまたはHAのドメインフラグメント上で生成することができる：HAまたはHAドメインフラグメントの1つ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以上またはすべての残基を突然変異させることができる；

長さXn（ここで、Xはアミノ酸であり、nは残基の数である）のランダム化ペプチドの、HAまたはHAのドメインフラグメント1つ以上のループの置換またはそのループへの挿入（すなわち、内部融合）；

（a）および／または（b）に加えて、N末端、C末端、またはN末端およびC末端ペプチド／タンパク質融合。

【0326】

HAまたはHAのドメインフラグメントはまた、同じHAまたはHAのドメインフラグメントへの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移植することにより、多官能性にされ得る。

【0327】

好ましい実施形態において、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タンパク質のペプチドフラグメント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フラグメントまたはペプチド変異体を含むアルブミン融合タンパク質を包含する。本発明はまた、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フラグメントまたはペプチド変異体を含むアルブミン融合タンパク質も包含する。本発明はまた、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フラグメントまたはペプチド変異体を含むアルブミン融合タンパク質も包含する。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。

【0328】

概して、本発明のアルブミン融合タンパク質は、1つのHAに由来する領域および1つの治療用タンパク質に由来する領域を有し得る。しかしながら、それぞれのタンパク質の複数の領域は、本発明のアルブミン融合タンパク質を作製するために用いられてもよい。同様に、1個より多い治療用タンパク質を、本発明のアルブミン融合タンパク質を作製するために用いてもよい。例えば、治療用タンパク質は、HAのNおよびC末端の両方に融合されてもよい。このような構成では、治療用タンパク質部分は、同じまたは異なる治療用タンパク質分子であってもよい。二官能性アルブミン融合タンパク質の構造は、 $X-HA-Y$ または $Y-HA-X$ として表され得る。

【0329】

例えば、抗-BLyS（商標）scFv-HA-IFN α -2b融合物を調製し、抗-BLyS（商標）scFvによるIFN α -2bに対する免疫応答を調節してもよい。代替法は、二（または多）官能性用量のHA融合物、例えば、官能、半減期等に応じて様々な比で、HA-抗-BLyS（商標）scFv融合物または他のHA-融合物と混合されたHA-IFN α -2b融合物を作製することである。

【0330】

また、二官能性または多官能性アルブミン融合タンパク質を作製して、HAの反対側の末端にあるタンパク質またはペプチドを介して、標的の器官または細胞型に、融合物の治療用タンパク質部分を標的化させてもよい。

【0331】

周知の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、もしくは25、または X_n （ここで、Xはアミノ酸（aa）であり、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末端、C末端、またはN末端およびC末端またはHAのドメインフラグメントとの融合物として構築されたライブラリ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、アミノ酸のすべ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分子上で原位置で選択してもよいこと、したがって、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に付着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。

【0332】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質は、融合された部分の間にリンカーペプチドを含み得、部分間のより大きい物理的距離を提供し得、ひいては、例えば、その同族受容体に対する結合についての治療用タンパク質の部分の接近可能性を最大化することができる。このリンカーペプチドは、アミノ酸からなり得、その結果、これは、可撓性またはより剛性である。

【0333】

リンカー配列は、プロテアーゼにより、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、このプロテアーゼは、宿主により天然に産生されるプロテアーゼ（例えば、S. cerevisiaeプロテアーゼkex2または等価なプロテアーゼ）である。

【0334】

したがって、上記のように、本発明のアルブミン融合タンパク質は、以下の式、すなわち $R1-L-R2$ ； $R2-L-R1$ ；または $R1-L-R2-L-R1$ を有し得、ここで、R1は、少なくとも1つの治療用タンパク質、ペプチド、またはポリペプチド配列であり、必ずしも同じ治療用タンパク質である必要はなく、Lは、リンカーであり、R2は、血清アルブミン配列である。

【0335】

好ましい実施形態において、治療用タンパク質を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、アルブミンに融合されていない同じ治療用タンパク質の血漿安定性と比較して、より高い血漿安定性を有する。典型的に、血漿安定性とは、治療用タンパク質が生体内投与され、血流中にもたらされてから、治療用タンパク質が分解され、血流から、腎臓または

10

20

30

40

50

肝臓等の器官中へ排除される、つまり、最終的に治療用タンパク質を体内から排除するまでの時間を指す。血漿安定性は、血流中の治療用タンパク質の半減期に関して算出される。血流中の治療用タンパク質の半減期は、当該技術分野で周知の一般的なアッセイにより容易に決定され得る。

【0336】

好ましい実施形態において、治療用タンパク質を含む本発明のアルブミン融合タンパク質は、アルブミンに融合されていない同じ治療用タンパク質の貯蔵寿命と比較して長期化した貯蔵寿命を有する。典型的に、貯蔵寿命とは、溶液中または一部の他の貯蔵用製剤中の治療用タンパク質の治療活性が、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指す。多くの治療用タンパク質は、非融合状態において非常に不安定である。以下に記載されるように、これらの治療用タンパク質の典型的な貯蔵寿命は、本発明のアルブミン融合タンパク質中に組み込まれると、著しく延長される。

10

【0337】

「延長された (prolonged)」または「長期化した (extended)」貯蔵寿命を有する本発明のアルブミン融合タンパク質は、同じ貯蔵および取扱い条件に供された標準型と比較して、より高い治療活性を示す。この標準型は、非融合の全長治療用タンパク質であってもよい。アルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分がアナログ、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、またはそのタンパク質についての完全な配列を含んでいない場合、代替として、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。一例として、本発明のアルブミン融合タンパク質は、所定の時点で比較した場合、標準と同じ貯蔵および取扱い条件に供された標準の治療活性の約100%よりも高い治療活性、または約105%、110%、120%、130%、150%、もしくは200%よりも高い治療活性を保持し得る。

20

【0338】

また、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、または長期化した貯蔵寿命を有する本発明のアルブミン融合タンパク質は、同じ条件に供される融合されていない対応する治療用タンパク質の治療活性の約50%よりも高い治療活性、約60%、70%、80%もしくは90%、またはそれ以上よりも高い治療活性を保持し得る。

30

【0339】

融合タンパク質の発現

本発明のアルブミン融合タンパク質は、酵母、細菌等の微生物、またはヒトもしく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。

【0340】

本発明の特定の実施形態は、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構築物と、本発明の第1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存在しない。

40

【0341】

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) インベルターゼシグナルは、酵母由来のシグナル配列の好ましい例である。

【0342】

別々に調製されたポリペプチドが、化学的架橋結合により連結されている、Poznanskyら (FEBS Lett. 239:18 (1988)) により調製される類の結合体は、企図されない。

【0343】

本発明はまた、本発明のアルブミン融合タンパク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、本発明はま

50

た、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企図する。ポリペプチドが分泌される場合、該培地は、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去される場合には、細胞を伴わずに、ポリペプチドを含み得る。細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*）および枯草菌（*Bacillus subtilis*））、酵母（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Kluyveromyces lactis*、および *Pichia pastoris*）、糸状菌（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、使用され得る。

【0344】

アルブミン融合タンパク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*、*can1*、*pral*、*ubc4*] は、親株AH22his+（DB1とも称される；例えば、Sleep et al. *Biotechnology* 8:42-46（1990）を参照のこと）の誘導体である。該株は、*leu2* 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監視する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。株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、短命および異常なタンパク質の標的化に関与する。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、該プラスミドから発現される所望のタンパク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、国際公開第W099/00504号を参照のこと。参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0345】

D88の誘導体であるDXY1は、以下の遺伝子型：[*leu2-3*、*leu2-122*、*can1*、*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、この株はまた、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、タンパク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（例えば、米国特許第5,965,386号およびKerry-Williams et al., *Yeast* 14:161-169（1998）を参照のこと。参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0346】

BXP10は、以下の遺伝子型：*leu2-3*、*leu2-122*、*can1*、*pral*、*ubc4*、*ura3*、*yap3::URA3*、*lys2*、*hsp150::LYS2*、*pmt1::URA3* を有する。DXY1において単離された突然変異に加えて、この株は、PMT1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-マンノースタンパク質O-マンノシルトランスフェラーゼ（Pmt）の進化的に保存されたファミリーのメンバーである。Pmt1pの膜貫通トポロジーは、O結合グリコシル化における役割を有する小胞体の内在性膜タンパク質であることを示唆する。この変異は、HSA融合物のO結合グリコシル化を、低減／排除するために役立つ（例えば、国際公開第W000/44772号を参照のこと。参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。研究は、Hsp150タンパク質が、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遺伝子における変異は、標準的な精製技法では除去が困難であるこ

10

20

30

40

50

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、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0347】

所望のタンパク質は、例えば、宿主染色体に挿入されたコード配列または遊離プラスミド上のコード配列から従来の方法で産生される。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、所望のタンパク質についてのコード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方法は、Becker & Guarente (1990) *Methods Enzymol.* 194, 182 に開示される。

【0348】

10

首尾よく形質転換した細胞、すなわち、本発明の DNA 構築物を含む細胞は、公知の技法により特定することができる。例えば、発現構築物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 et al. (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。代替として、抗体を用いて、上清中のタンパク質の存在を検出することができる。

【0349】

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、概して、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, 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 (YIp) であり、酵母選択可能なマーカーの HIS3、7RP1、LEU2、および URA3 を組み込んでいる。プラスミド pRS413-416 は、酵母動原体プラスミド (Ycp) である。

20

【0350】

酵母における発現のためのアルブミン融合タンパク質を作製するために好適なベクターは、pPPC0005、pScCHSA、pScNHSA、および pC4:HSA を含み、これらは実施例 1 に詳細に記載される。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、ここに、治療用タンパク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 融合物を形成し得る。それは、PRB1 *S. cerevisiae* プロモーター (PRB1p)、融合リーダー配列 (FL)、HA (rHA) をコードする DNA、および ADH1 *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最初の 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、欧州特許出願第 A-387 319 号を参照のこと、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる)。

30

【0351】

pPPC0005、pScCHSA、pScNHSA、および pC4:HSA のプラスミドは、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 に寄託され、それぞれ受託番号 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タンパク質を発現するために有用な別のベクターは、Sleep et al., *BioTechnology* 8:42 (1990) に記載される pSAC35 ベクターであり、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0352】

アルブミン融合タンパク質を発現させるために用いることが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 and Martin Funk. *Nucleic Acids Re*

50

search, 1994, Vol. 22, No. 25, pp. 5767-5768を参照のこと。Met 25プロモーターは、383塩基長（塩基-382~-1）であり、このプロモーターにより発現される遺伝子はまた、Met 15、Met 17、およびYLR303Wとしても知られている。好ましい実施形態は、以下の配列を使用し、ここで、以下の配列の5'末端において、クローニングに使用されるNot I部位に下線を付し、そして3'末端において、ATG開始コドンに下線を付している：

GCGGCCCGCCCGGATGCAAGGGTTTCGAATCCCTTAGCTCTCA
TTATT TTT TTTGCTTT TTTCTCTTGAAGGTCACATGATCGCAAA
ATGGCAAAATGGCACGCTGAAGCTGTCTGATATTGGGGAACTG
TGGTGGTTGGCAAAATGACTAAATTAAAGTTAGTCAAGGCGCC
ATCCTCATGAAAACTGTGTAAACATAATAACCGAAGTGTCTG
AAAAGGTGGCACCTTGTCCAATTGAACACGCTCGATGAAA
AAAATAAGATATATATAAGGTTAAAGTAAAGCGTCTGTTAG
AAGGAAGTTTTTTCTTTTCTTGTCTCTTGTCTTTTCA
TCTACTATTTCTTCTGTGTAAATACAGGGTCTGTCAGATACA
TAGATACAATTCTATTACCCCCCATCCATACAATG（配列番号5）

10

【0353】

酵母においてアルブミン融合タンパク質を発現させるために用いることができるさらなるプロモーターは、以下を含む。

20

a) cbh1プロモーター：

TCTAGAGTTGTGAAGTTCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATA
CGAGTCGCATCTAAATACTCCGAAGCTGCTGCGAACCCGG
AGAAATCGAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGCTAA
ATTAGCATGAAGAGGCTATGAGAAATTCTGGAGACGGCTTG
TTGAATCATGGCGTTTCCATTCTTTCGACAAAGCAAAGCGTTC
CGTCGCGAGTAGCAGGCACTCATTTCCCGAAAAAACTCGGAG
ATTCCTAAGTAGCGATGGAAACCGGAATAATAATAAGGCA
ATACATTGAGTTGCTTCGACGGGTTGCAATGCAGGGGTACT
GAGCTTTGGACATAACTGTTCGGTACCCCACTCTTCTCAA
CCTTTTGGCGTTTCCCTGATTTCAGCGTACCCGTACAAAGTCG
TAATCACTATTAAACCCAGACTGACCGGACGTGTTTTTGCC
TTCATTTTGGAGAAATAATGTCAATTGCGATGTGTAAATTTGC
CTGCTTTGACCGACTGGGGCTGTTCGAAGCCCGAATGTAGG
ATTGTTATCCGAACCTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAAT
CTGTGTCGGGCGAGGACACGCCCTCGAAGGTTACAGGCAAGG
GAAACCAACCGATAGCAGTGTCTAGTAGCAACCTGTAAAGC
CGCAATGCAGCATCACTGGAAAAATACAAACCAATGGCTAA
AAGTACATAAGTTAAATGCCCTAAAGAAGTCAATATACCAGCG
GCTAATAAATTGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCGTAAT
TTGCCAACGGCTTTGTGGGGTTTGCAGAAAGCAAACGGCAAAGC
CCCACTTCCCCACGTTTTGTTTTCTTCACTCAGTCCAATCTC
AGCTGGTGTATCCCCCAATTGGGTCGCTTTGTTTGTTCGGGT
AAGTGAAAGAAAGACAGAGGTAAGAAATGTCTGACTCGGAGC
GTTTTTGCAATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGAA
ATGTTTGACATTCAAAGGAGTATTTAGCCAGGGAATGCTTGA
TGTAATCGTGTAAAGGAGGTTTTGTCTGCCGATACGACGAATA
CTGTATAGTCACTTCTGTTGTGAAGTGGTCCATATTGAAATG
TAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAGATTGAGTTGAAACTG
CCTAAGATCTCGGGCCCTCGGGCCCTTTCGGCCCTTTGGGTGT

30

40

50

ACATGTTTGTGCTCCGGGCAAAATGCAAAAGTGTGGTAGGAT
CGAACACACTGCTGCCCTTTACCAAGCAGCTGAGGGGTATGT
GATAGGC AAAATGTTTCAGGGGGCCACTGCATGGTTTTCGAATA
GAAAGAGAAAGCTTAGCCAAAGAAACAATAGCCGATAAAGATA
GCCTCATTTAAACGGAATGAGCTAGTAGGC AAAAGTCCAGCGA
ATGTGTATATATAAAGGTTTCGAGGTCCGTGCCCTCCCTCAT
GCTCTCCCCATCTACTCATCAACTCAGATCCTCCAGGAGA
CTTGTTACACCATCTTTTGTAGGCGACAGAAACCCAAATAGTCA
ACCGCGGACTGGGCATC (配列番号113)

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

AGATCTGGTTCCTGAGTACATCTACCGATGCGCCTTCGATC
CCCCCTCTTAGCCGCGCATGAGATTCTTACCATTATGTCTTA
TCGTTTCAGGGTCCCTATTTGGACCGCTAGAAAATAGACTCTG
CTCGATTTTGTTCCTATTATTCACGCAATTACGATAGTATT
TGGCTCTTTTTCGTTTGGCCCGAGGTCAAATTCGGGTAAAGACG
CGATCACGCCATTGTGGCCGCGCGGCGTTGTGCTGCTGCTA
TTCCCCGCGCATATAAACCAACCCCTCCACCAGTTTCGTTGGGC
TTTTCGGAATGCTGTACTCTATTTCAAAGTTGTCAAAGAGA
GGATTCAA AAAAATTTATACCCCGAGTATCAAAGATATCAA
GCCATC (配列番号114)

c) 以下の配列を有する修飾 *cbh1* プロモーター:

TCTAGAGTTGTGAAGTCCGGTAATCCCGCTGTATAGTAATA
CGAGTCGCGATCTAAATACTCCGAAGCTGCTGCGAACCCGG
AGAAATCGAGATGTGCTGGAAAGCTTCTAGCGAGCGGGCTAA
ATTAGCATGAAGAGGCTATGAGAAATTCCTGGAGACGGGCTTG
TTGAATCATGGCGTTTCCATTCTTCGACAAAGCAAAGCGTTC
CGTCGCGAGTAGCAGGCACTCATTTCCCGAAAAAACTCGGAG
ATTCCTAAGTAGCGATGGAAACCGGAATAATAATAAGGCA
ATACATTGAGTTGCTTCGACGGGTTGCAATGCAGGGGGTACT
GAGCTTGGACATAACTGTTCCGTACCCCACTCTTCTCAA
CCTTTTGGCGTTTCCCTGATTTCAGCGTACCCGTACAAAGTCG
TAATCACTATTAAACCCAGACTGACCGGACGTGTTTTTGCC
TTTCATTTTGGAGAAATAATGTCAATTGCGATGTGTAAATTTGC
CTGCTTGGACCGACTGGGGGCTGTTTCGAAGCCCGAATGTAGG
ATTGTTATCCGAACCTCTGCTCGTAGAGGCATGTTGTGAAT
CTGTGTCGGGCGAGGACACGCCCTCGAAGGTTTCACGGCAAGG
GAAACCAACCGATAGCAGTGTCAGTAGCAACCTGTAAAGC
CGCAATGCAGCATCACTGGAAATAACAAACCAATGGCTAA
AAGTACATAAGTTAATGCCCTAAAGAAGTCAATATACCAGCG
GCTAATAAATTTGTACAATCAAGTGGCTAAACGTACCGTAAT
TTGCCAACGGCTTTGTGGGGTTTGCAGAAAGCAAACGGCAAAGC
CCCACTTCCCCACGTTTTGTTTCTTCACTCAGTCCAATCTC
AGCTGGTGATCCCCCAATTGGGGTCGCTTTGTTTGTTCGGGT
GAAGTGAAAGAAAGACAGAGGTAAGAAATGTCCTGACTCGGAG
CGTTTTTGCATACAACCAAGGGCAGTGATGGAAGACAGTGA
AATGTTTGACATTCAAAGGAGTATTTAGCCAGGGATGCTTGA
GTGTATCGTGTAAGGAGGTTTGTCTGCCGATACGACGAAT
ACTGTATAGTCACTTCTGGGTGAAGTGGTCCATATTGAAAT
GTAAGTCGGCACTGAACAGGCAAAAAGATTGAGTTGAAACT
GCCTAAGATCTCGGGGCCCTCGGGCCCTTCGGGCCCTTTGGGTG

10

20

30

40

50

T A C A T G T T T G T G C T C C G G G C A A A T G C A A A G T G T G G T A G G A
T C G A A C A C A C T G C T G C C T T T A C C A A G C A G C T G A G G G T A T G
T G A T A G G C A A A T G T T C A G G G G C C A C T G C A T G G T T T C G A A T
A G A A A G A G A A G C T T A G C C T G C A G C C T C T T A T C G A G A A A G A
A A T T A C C G T C G C T C G T G A T T T G T T T G C A A A A A G A A C A A A A
C T G A A A A A A C C C A G A C A C G C T C G A C T T C C T G T C T T C C T A T
T G A T T G C A G C T T C C A A T T T C G T C A C A C A A C A A G G T C C T A G
C T T A G C C A A G A A C A A T A G C C G A T A A A G A T A G C C T C A T T A A
A C G G A A T G A G C T A G T A G G C A A A G T C A G C G A A T G T G T A T A T
A T A A A G G T T C G A G G T C C G T G C C T C C C T C A T G C T C T C C C C A
T C T A C T C A T C A A C T C A G A T C C T C C A G G A G A C T T G T A C A C C
A T C T T T T G A G G C A C A G A A A C C C A A T A G T C A A C C G C G G A C T
G G C A T C (配列番号115)

10

d) 以下の配列を有する *Aspergillus nidulans* に由来する *cys D* プロモーター:

A G A T C T G G T T C C T G A G T A C A T C T A C C G A T G C G C C T C G A T C
C C C C T C T T A G C C G C A T G A G A T T C C T A C C A T T T A T G T C C T A
T C G T T C A G G G T C C T A T T T G G A C C G C T A G A A A T A G A C T C T G
C T C G A T T T T G T T T C C A T T A T T C A C G C A A T T A C G A T A G T A T T
T G G C T C T T T T C G T T T G G C C C A G G T C A A T T C G G G T A A G A C G
C G A T C A C G C C A T T G T G G C C G C C G G C G C T G C A G C C T C T T A T
C G A G A A A G A A A T T A C C G T C G C T C G T G A T T T G T T T G C A A A A
A G A A C A A A A C T G A A A A A A C C C A G A C A C G C T C G A C T T C C T G
T C T T C C T A T T G A T T G C A G C T T C C A A T T T C G T C A C A C A A C A
A G G T C C T A C G C C G G C G T T G T G C T G C T G C T A T T C C C C G C A T
A T A A A C A A C C C C T C C A C C A G T T C G T T G G G C T T T G C G A A T G
C T G T A C T C T A T T T T C A A G T T G T C A A A A G A G A G G A T T C A A A A
A A T T A T A C C C C A G A T A T C A A A G A T A T C A A A G C C A T C (配列番号116)

20

【0354】

30

相補的付着末端を介してDNAをベクターに作動可能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区域を、ベクターDNAに挿入されるべきDNAセグメントに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イル間での水素結合により連結され、組換えDNA分子を形成する。

【0355】

1つ以上の制限部位を含む合成リンカーは、DNAセグメントをベクターに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成されるDNAセグメントは、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼI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、突出したガンマー本鎖末端を除去し、その重合活性により、くぼんだ3'末端を充填する。

40

【0356】

したがって、これらの活性の組み合わせは、平滑末端のDNAセグメントを生成する。次いで、平滑末端セグメントを、平滑末端DNA分子の連結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T4 DNA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トする。したがって、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、DNAセグメントのものに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に連結される。

【0357】

50

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を含む多数の製造業者から市販されている。

【0358】

例えば、HA変異体を調製する必要がある場合、本発明に従ってDNAを修飾するために望ましい方法は、Saiki et al. (1988) Science 239、487-491により開示されているように、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、酵素的に増幅されるべきDNAは、それ自体増幅されたDNAに組み込まれる2つの特異的オリゴヌクレオチドプライマーによって隣接されるこの特定のプライマーは、当該技術分野で周知の方法を用いて、発現ベクター中にクローニングするために使用することができる制限エンドヌクレアーゼ認識部位に含み得る。

10

【0359】

アルブミン融合タンパク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ことが企図される酵母の例示的な属は、ピキア属 (*Pichia*) (ハンセンラ属 (*Hansenula*))、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、クルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、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 (*Schizosaccharomyces*)、サイテロミセス属 (*Citeromyces*)、パキシレン属 (*Pachysolen*)、デバロミセス属 (*Debaryomyces*)、ミチニコウィア属 (*Metschnikowia*)、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*)、ロイコスポリジウム属 (*Leucosporidium*)、ボトリオアスクス属 (*Botryosascus*)、スポリディオボルス属 (*Sporidiobolus*)、エンドミコプシス属 (*Endomycopsis*) 等である。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 (*Schizosaccharomyces*)、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。

20

【0360】

クルイベロミセス属の例は、*K. fragilis*、*K. lactis*、および *K. marxianus* である。好適な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、概して、欧州特許出願第251 744号、欧州特許出願第258 067号、および国際公開第WO90/01063号にて教示されており、これらのすべては参照することにより本明細書に組み込まれる。

30

【0361】

サッカロミセス属の好ましい例示的な種は、*S. cerevisiae*、*S. italicus*、*S. diastaticus*、および *Zygosaccharomyces rouxii* を含む。クルイベロミセス属の好ましい例示的な種は、*K. fragilis* および *K. lactis* を含む。ハンセンラ属の好ましい例示的な種は、*H. polymorpha* (現在は *Pichia angusta*)、*H. anomala* (現在は *Pichia anomala*)、および *Pichia capsulata* を含む。ピキア属のさらに好ましい例示的な種は、*P. pastoris* を含む。アスペルギルス属の好ましい例示的な種は、*A. niger* および *A. nidulans* を含む。ヤロウィア属の好ましい例示的な種は、*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は、ATCCから入手可能であり、アルブミン融合タンパク質の発現において有用である： サッカロミセスセ

40

50

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 受託番号 4022731) ; サッカロミセスレビシエハンセン、テレオモルフ株 BY4743 hsp150 突然変異体 (ATCC 受託番号 4021266) ; サッカロミセスレビシエハンセン、テレオモルフ株 BY4743 pmt1 突然変異体 (ATCC 受託番号 4023792) ; サッカロミセスレビシエハンセン、テレオモルフ (ATCC 受託番号 20626 ; 44773 ; 44774 ; および 62995) ; *Saccharomyces diastaticus* Andrews et Gilliland ex van der Walt、テレオモルフ (ATCC 受託番号 62987) ; *Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt、テレオモルフ (ATCC 受託番号 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 受託番号 26012) ; *Aspergillus niger* van Tieghem、アナモルフ (ATCC 受託番号 9029) ; *Aspergillus niger* van Tieghem、アナモルフ (ATCC 受託番号 16404) ; *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter、アナモルフ (ATCC 受託番号 48756) ; および *Yarrowia lipolytica* (Wickerhamら.) van der Wait et von Arx、テレオモルフ (ATCC 受託番号 201847) 。

【0362】

S. cerevisiae のための好適なプロモーターは、PGK I 遺伝子、GAL1 または GAL10 遺伝子、CYC I、PHO5、TRP I、ADH I、ADH2、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素についての遺伝子、ヘキソキナーゼ、ビ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、アルファー接合因子フェロモン、[接合因子フェロモン]、PRB I プロモーター、GUT2 プロモーター、GPD I プロモーター、および他のプロモーターの 5' 調節領域の部分または上流活性部位を有する 5' 調節領域の部分のハイブリッドを含むハイブリッドプロモーター (例えば、欧州特許出願第 A-258067 号のプロモーター) に関連するものが挙げられる。

【0363】

シゾサッカロミセスポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) で用いる簡便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 *j b p l* 遺伝子プロモーターである。

【0364】

異種遺伝子の発現のために *Pichia* を形質転換する方法は、例えば、Cregg et al. (1993)、および様々な Philip 特許 (例えば、参照することにより本明細書に組み込まれる、米国特許第 4,857,467 号) 等において教示され、*Pichia* 発現キットは、Invitrogen BV, Leek, Netherlands、および Invitrogen Corp., San Diego, California から市販されている。好適なプロモーターは、AOX I および AOX2 を含む。Gleeson et al. (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を含み、好適なプロモーターは、MOX1 および FMD1 であり ; 一方で、欧州特許出願第 361991 号、Fleer et al. (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タンパク質を発現させるための方法、適当なプロモーターが PGK I であることが教示されている。

【0365】

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'フランキンク配列である。好適な3'フランキンク配列は、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り得、すなわち、プロモーターに相当し得る。代替として、それらは、*S. cerevisiae* ADHI 遺伝子の終結シグナルが好ましい場合に異なり得る。

【0366】

所望のアルブミン融合タンパク質は、初めに、分泌リーダー配列で発現され得、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あり得る。酵母において有用なリーダーは、以下のいずれかを含む：

- a) MP I F-1シグナル配列（例えば、GenBank 寄託番号 A A B 5 1 1 3 4 のアミノ酸 1 ~ 2 1）M K V S V A A L S C L M L V T A L G S Q A（配列番号 6）
- b) スタニオカルシンシグナル配列（M L Q N S A V L L L L V I S A S A、配列番号 7）
- c) H S Aシグナル配列のプレプロ領域（例えば、M K W V T F I S L L F L F S S A Y S R G V F R R、配列番号 8）
- d) H S Aシグナル配列のプレプロ領域（例えば、M K W V T F I S L L F L F S S A Y S、配列番号 9）または例えば、M K W V S F I S L L F L F S S A Y S、（配列番号 10）等のその変異体
- e) インバルターゼシグナル配列（例えば、M L L Q A F L F L L A G F A A K I S A、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、M R F P S I F T A V L A F A A S S A L A A P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V S L E K R、配列番号 12 または M R F P S I F T A V L A F A A S S A L A A P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V S L D K R、配列番号 12）
- g) K. l a c t i s 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、M K W V S F I S L L F L F S S A Y S R S L E K R、配列番号 13）
- i) H S A / M F α - 1 ハイブリッドシグナル配列（H S A / k e x 2 としても知られている）（例えば、M K W V S F I S L L F L F S S A Y S R S L D K R、配列番号 14）
- j) K. l a c t i s キラー / M F α - 1 融合リーダー配列（例えば、M N I F Y I F L F L L S F V Q G S L D K R、配列番号 15）
- k) 免疫グロブリン I g シグナル配列（例えば、M G W S C I I L F L V A T A T G V H S、配列番号 16）
- l) フィブリン B 前駆体シグナル配列（例えば、M E R A A P S R R V P L P L L L L G G L A L L A A G V D A、配列番号 17）
- m) クラスター前駆体シグナル配列（例えば、M M K T L L L F V G L L L T W E S G Q V L G、配列番号 18）
- n) インスリン様成長因子-結合タンパク質 4 シグナル配列（例えば、M L P L C L V A A L L L A A G P G P S L G、配列番号 19）
- o) H S Aシグナル配列のプレプロ領域の変異体、例えば、M K W V S F I S L L F L F S S A Y S R G V F R R（配列番号 20）、M K W V T F I S L L F L F A G V L G（配列番号 21）、M K W V T F I S L L F L F S G V L G（配列番号 22）、M K W V T F I S L L F L F G G V L G（配列番号 23）、修飾された H S A リーダー H S A # 6 4 - M K W V T F I S L L F L F A G V S G（配列番号 24）；修飾された H S A リーダー H S A # 6 6 - M K W V T F I S L L F L F G G V S G（配列番号 25）；修飾された H S A（A 1 4）リーダー - M K W V T F I S L L F L F A G V S G（配列番号 26）；

10

20

30

40

50

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MKWVTFISLLFLFGLVLDLHK (配列番号29)

p) コンセンサスシグナル配列 (例えば、MPTWAWWLFLVLLALLWAPARG、配列番号30)

q) 酸ホスファターゼ (PH05) リーダー (例えば、MFKSVVYSILAAALLANA 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) MNIFYIFLFLLSFVQGLEHTHR RGS LDKR (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. carlsbergensis β -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) 欧州特許出願第A-387 319号 (参照することにより本明細書に組み込まれる) 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) 治療用タンパク質Xの天然リーダー;

cc) JP62-096086 (911036516として特許されている、参照することにより本明細書に組み込まれる) 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-MKLAYSLLPLAGVSASVINYKR (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-MKLKTVRS AVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAKR (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-MKLKTVRS AVLSSLFASQVLGQPIDDTESQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAEEGEPKR (配列番号35)

gg) コンセンサスシグナル配列-MWWRLWWLLLLLLLLLWPMVWA (配列番号111)

hh) 修飾された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-MRPTWAWWLFLVLLALLWAPARG (配列番号105)

【0367】

アルブミン融合タンパク質の組換えおよび合成による産生のさらなる方法

本発明はまた、本発明のアルブミン融合タンパク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タンパク質の産生にも関連する。例えば、ベクターは、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り得る。レトロウイルスベクターは、複製可能、または複製欠損であり得る。後者の場合、ウイルス増殖は、概して、宿主細胞を補完する場合にのみ生じる。

【0368】

10

20

30

40

50

本発明のアルブミン融合タンパク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ための選択可能なマーカーを含むベクターに連結され得る。概して、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈澱物等の沈澱物、または荷電脂質との複合体において導入される。ベクターがウイルスである場合、このベクターは、適切なパッケージング細胞株を用いて体外でパッケージングされ、次いで宿主細胞に形質導入され得る。

【0369】

ポリヌクレオチド挿入物は、適切なプロモーター（いくつか挙げれば、例えば、ファージラムダP_Lプロモーター、大腸菌lac、trp、phoAプロモーターおよびtacプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーター）に作動可能に連結されるべきである。他の好適なプロモーターは、当業者に周知である。発現構築物はさらに、転写開始、転写終結のための部位、および転写領域には、翻訳のためのリボソーム結合部位を含み得る。この構築物により発現される転写物のコード部分は、好ましくは、初めに翻訳開始コドン、および翻訳されるべきポリペプチドの末端に適切に位置される終結コドン（UAA、UGAまたはUAG）を含み得る。

【0370】

記載したように、発現ベクターは、好ましくは、少なくとも1つの選択可能な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。適切な宿主の代表的な例としては、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受託番号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；および植物細胞が挙げられるが、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、当該技術分野で周知である。

【0371】

細菌で用いる好ましいベクターの中には、pQE70、pQE60、およびpQE-9（QIAGEN, Inc. から入手可能）；pBluescriptベクター、Phagescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A（Stratagene Cloning Systems, Inc. から入手可能）；およびptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5（Pharmacia Biotech, Inc. から入手可能）が挙げられる。好ましい真核生物ベクターの中には、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、およびpSG（Stratageneから入手可能）；ならびにpSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVL（Pharmaciaから入手可能）がある。酵母系で用いる好ましい発現ベクターとしては、pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZalph、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、pPIC9K、およびPAO815（すべてが、Invitrogen, Carlsbad, CAから入手可能）が挙げられるが、これらに限定されない。他の好適なベクターは、当業者に容易に明らかである。

【0372】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質の局在化を原核生物細胞または真核生物細胞の特定の画分を導く、および／または原核生物細胞または真核生物細胞由来の本発明のタンパク質の分泌を導くシグナル配列に融合され得る。例えば、大腸菌において、周辺質空間にタンパク質の発現を導くことが望まれ得る。本発明のアルブミン融合タンパク質が、ポリペプチドの発現を細菌の周辺質空間に導くために融合され得るシグナル配列またはタンパク質（またはそのフラグメント）の例としては、pelBシグナル配列、マルトース結合タンパク質（

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、およびアルカリンホスファターゼのシグナル配列が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかのベクターは、New England Biolabs から入手可能な pMAL シリーズ (特に pMAL-p シリーズ) のベクター等のタンパク質の局在化を導く融合タンパク質の構築のために市販されている。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドアルブミン融合タンパク質は、pelB ベ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このような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 号および同第 5, 846, 818 号 (これらの内容は、参照することによりそれら全体が本明細書に組み込まれる) を参照のこと。

10

【0373】

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タンパク質に融合され得るシグナルペプチドの例は:

- a) MP1F-1 シグナル配列 (例えば、GenBank 寄託番号 AAB51134 のアミノ酸 1-21) MKVSVAAALSC LMLVTALGSQA (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、MKWVTFISLLFLFSSAYS RGVFR R、配列番号 8)
- d) HSA シグナル配列のプレプロ領域 (例えば、MKWVTFISLLFLFSSAYS、配列番号 9) または例えば、MKWVSFISLLFLFSSAYS、(配列番号 10) 等のその変異体
- 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、MRFPSIF TAVLAFAASSALAAPVNTTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLE GDFDVAVLPFSNSTNNGLLFLINTTTIASIAAKEEGVSL EKR、配列番号 12 または MRFPSIF TAVLAFAASSALAAPVNTTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLE GDFDVAVLPFSNSTNNGLLFLINTTTIASIAAKEEGVSLDKR、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、MKWVSFISLLFLFSSAYS RSL EKR、配列番号 13)
- i) HSA/MF α -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、MKWVSFISLLFLFSSAYS RSLDKR、配列番号 14)
- j) K. lactis キラー/MF α -1 融合リーダー配列 (例えば、MNIIFYIFLFLLSFVQGS LDKR、配列番号 15)
- k) 免疫グロブリン Ig シグナル配列 (例えば、MGWSCIIILFLVATATGVHS、配列番号 16)
- l) フィブリンB前駆体シグナル配列 (例えば、MERAAPSR RVPLPLLL LGG LALLAAGVDA、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-結合タンパク質 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、MKWVSFISLLFLFSSAYS RGVFR R (配列番号 20)、MKWVTFISLLFLFAGVLG (配列番号 21)、MKWVTFISLLFLFSGVLG (配列番号 22)、MKWVTFISLLFLFGVLG (配列番号 23)、修飾された HSA リーダー HSA # 6

20

30

40

50

4-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MKWVTFISLLFLFGGVLDLHKS (配列番号29)

p) コンセンサスシグナル配列 (MPTWAWWLFLVLLALLWAPARG、配列番号30)

q) 酸ホスファターゼ (PH05) リーダー (例えば、MFKSVVYSILAASSLANA 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) MNIFYIFLFLLSFVQGLEHTHRREGSLDKR (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.carlsbergensis β -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) 欧州特許出願第A-387 319号 (参照することにより本明細書に組み込まれる) 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) 治療用タンパク質Xの天然リーダー ;

cc) JP62-096086 (911036516として特許されている、参照することにより本明細書に組み込まれる) 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-MKLAYSLLPLAGVSASVINYKR (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-MKLKTVRS AVLSSLFASQVLGQPIDDTESEQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAKR (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-MKLKTVRS AVLSSLFASQVLGQPIDDTESEQTTSVNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLISMAEEGEPKR (配列番号35)

gg) コンセンサスシグナル配列-MWWRLWWLLLLLLLLLWPMVWA (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-MRPTWAWWLFLVLLALLWAPARG (配列番号105) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0374】

好ましい実施形態において、修飾されたHSA/kex2シグナル配列 (配列番号112) は、本明細書に記載されるアルブミンおよび治療用タンパク質を含むアルブミン融合タンパク質、ならびに国際公開第W093/15199号 ; 同第W097/24445号 ; 同第W003/60071号 ; 同第W003/59934号 ; およびPCT/US04/01369において開示されるアルブミン融合タンパク質のアミノ末端に融合され、こ

10

20

30

40

50

これらのそれぞれは、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。修飾されたHSA/kex2シグナル配列は、例えば、Sleep et al., 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、これらの双方は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に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タンパク質の発現量および/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。修飾されたHSA/kex2シグナルペプチドの変異体も本発明により包含される。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企図される。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より包含される。

【0375】

グルタミンシンターゼ(GS)またはDHFRを選択可能なマーカーとして使用するベクターはそれぞれ、薬物メチオニンスルホキシミン(sulphoximine)またはメトトレキサートの存在下で、増幅され得る。グルタミンシンターゼベースのベクターの利点は、グルタミンシンターゼネガティブである細胞株(例えば、マウス骨髄腫細胞株、NSO)の利用可能性にある。グルタミンシンターゼ発現系はまた、内因性遺伝子の機能を妨げ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公開第WO87/04462号、同第WO86/05807号、同第WO89/01036号、同第WO89/10404号、および同第WO91/06657号に詳述されており、これらは、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。さらに、グルタミンシンターゼ発現ベクターは、Lonza Biologicals, Inc. (Portsmouth, NH)から入手できる。マウス骨髄腫細胞においてGS発現系を使用する、モノクローナル抗体の発現および産生は、Bebbington et al., Bio/technology 10:169(1992)ならびにBiblia and Robinson Biotechnology 11:1(1995)(これらは、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載される。

【0376】

本発明はまた、本明細書に記載の上記したベクター構築物を含む宿主細胞にも関連し、さらに当該技術分野で周知の技法を用いて、1つ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)に作動可能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、細菌細胞等の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し、または所望の特定の状態で遺伝子産物を修飾および処理する宿主株が選択されてもよい。あるプロモーターに由来する発現が、ある誘導物質の存在下で高められ得る;したがって遺伝子操作されたポリペプチドの発現は制御され得る。さらに、異なる宿主細胞は、タンパク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、特徴的で特異的な機序を有する。発現される外来タンパク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。

【0377】

宿主細胞への本発明の核酸および核酸構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン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達

成され得る。このような方法は、多くの標準的な実験マニュアル、例えば、Davis et al., 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企図される。

【0378】

本明細書に論じられるベクター構築物を含む宿主細胞を包含することに加えて、本発明はまた、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、内因性遺伝物質を欠失または置換するように（例えば、治療用タンパク質に対応するコード配列は、治療用タンパク質に対応するアルブミン融合タンパク質を用いて置換されてもよい）、および／または遺伝物質を含むように（例えば、治療用タンパク質に対応する本発明のアルブミン融合タンパク質等の異種ポリヌクレオチド配列が含まれてもよい）操作される。内因性ポリヌクレオチドに作動可動に連結される遺伝物質は、内因性ポリヌクレオチドを活性化、改変、および／または増幅し得る。

【0379】

加えて、当該技術分野で周知の技法を用いて、相同組換えにより、異種ポリヌクレオチド（例えば、アルブミンタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはそのフラグメントもしくは変異体）、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、治療用タンパク質をコードする内因性ポリヌクレオチド配列と作動可能に連結してもよい（例えば、米国特許第5,641,670号（1997年6月24日公開）、国際公開第WO96/29411号、国際公開第WO94/12650号、Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935（1989）、およびZijlstra et al., Nature 342:435-438（1989）を参照のこと。これらの各文献の開示内容は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0380】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、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公知の方法により、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」）が精製のために採用される。

【0381】

好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、Q-セファロース、DEAEセファロース、poroshQ、porosDEAE、ToyopearlQ、ToyopearlQAE、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が挙げられるが、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。

【0382】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、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、ならびにそれらの等価物および同等物が挙げられるが、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。

【0383】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、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、Fr

actogel フェニル、ブチル、メチル、オクチル、ヘキシルカラム、ならびにそれらの等価物および同等物が挙げられるが、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。

【0384】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、セファロース 100、S200、S300、superdex 樹脂カラム、ならびにそれらの等価物および同等物が挙げられるが、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。

【0385】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、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クラムが挙げられるが、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。

【0386】

好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、上記の 1 つ以上のクロマトグラフィー法を用いて精製される。他の好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、以下のクロマトグラフィーカラム、すなわち 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うちの 1 つ以上を用いて精製される。

【0387】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質は、PCT 国際公開第 WO 00 / 44772 号において記載の過程を用いて精製されてもよい (参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる)。当業者は、本発明のアルブミン融合タンパク質の精製で用いるそこに記載される過程を容易に修正できよう。

【0388】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、化学合成手順による産物; 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。組換え製造手順に採用された宿主に応じて、本発明のポリペプチドをグリコシル化してもよいし、またはグリコシル化しなくてもよい。加えて、本発明のアルブミン融合タンパク質はまた、宿主媒介過程の結果として、場合によっては、開始改変メチオニン残基を含んでもよい。したがって、当該技術分野で公知の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、概して、すべての真核細胞において翻訳後の任意のタンパク質から高い効率で除去される。大部分のタンパク質上にある 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、一部のタンパク質について、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応じて、この原核生物の除去過程は効率が悪い。

【0389】

一実施形態において、酵母 *Pichia pastoris* (Pichia pastoris) を用いて、真核系における本発明のアルブミン融合タンパク質を発現させる。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フ酵母である。メタノール代謝経路における主要な工程は、O₂ 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 O₂ 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成しなければならない。結果的に、主要な炭素供給源としてメタノールに依存する増殖培地において、2 つのアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) のうちの 1 つのプロモーター領域は、非常に活性である。メタノールの存在下で、AOX1 遺伝子から産生されるアルコールオキシダーゼは、*Pichia pastoris* における総可溶性タンパク質のうちの約 30 % までを含む。Ellis, S. B. et al

. , Mol. Cell. Biol. 5:1111~21 (1985); Koutz, P. J. et al., Yeast 5:167~77 (1989); Tschopp, J. F. et al., Nucl. Acids Res. 15:3859~76 (1987) を参照のこと。したがって、AOX1 制御配列のすべてまたは一部の転写調節下の異種コード配列（例えば、本発明のポリヌクレオチド等）は、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。

【0390】

1つの例において、プラスミドベクター pPIC9K は、「*Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology*», D. R. Higgins and J. Cregg, eds. (The Humana Press, Totowa, NJ, 1998) において記載されるように、本質的に *Pichia* 酵母系において、本明細書に示されるように、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする DNA を発現させるために使用される。この発現ベクターは、マルチクロニング部位の上流に位置するピチアバ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）に連結された強力な AOX1 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。

【0391】

当業者には容易に理解されるように、考案した発現構築物が、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）のため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、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZ アルファ、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、および PAO815 等を用いることができる。

【0392】

別の実施形態において、例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド等の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 アルファ等の発現ベクター中にクロニングし、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達成することができる。

【0393】

加えて、本発明のアルブミン融合タンパク質は、当該技術分野で周知の技法（例えば、Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N. Y., および Hunkapiller et al., *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、ポリペプチドのフラグメントに対応するポリペプチドは、ペプチドシンセサイザーの使用により合成され得る。さらに、所望の場合、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸アナログが、置換または付加としてこのポリペプチド配列に導入され得る。非古典的アミノ酸としては、一般的なアミノ酸の D アイソマー、2, 4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -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、オルニチン、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、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -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、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸（例えば、 β -メチルアミノ酸）、 α -メチルアミノ酸、 N -メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸アナログが挙げられるが、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。

【0394】

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/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解的切断、抗体分子または他の細胞リガンドへの結合等により、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タン

パク質を包含する。多くの化学修飾のいずれも、臭化シアン、トリブシン、キモトリブシン、パバイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄による特異的化学開裂；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；等が挙げられるが、これらに限定されない周知の技法により行うことができる。

【0395】

本発明により包含されるさらなる翻訳後修飾としては、例えば、N結合型もしくはO結合型の炭水化物鎖（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部分の結合、N結合型もしくはO結合型の炭水化物鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加もしくは欠失が挙げられる。アルブミン融合タンパク質はまた、検出可能な標識（例えば、酵素、蛍光、同位体、または親和性標識）を用いて改変して、このタンパク質の検出および単離が可能にされ得る。

10

【0396】

好適な酵素の例は、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、好適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、好適な蛍光物質の例は、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、および好適な放射性物質の例は、ヨウ素（¹²¹I、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I）、炭素（¹⁴C）、硫黄（³⁵S）、トリチウム（³H）、インジウム（¹¹¹In、¹¹²In、^{113m}In、^{115m}In）、テクネチウム（⁹⁹Tc、^{99m}Tc）、タリウム（²⁰¹Tl）、ガリウム（⁶⁸Ga、⁶⁷Ga）、パラジウム（¹⁰³Pd）、モリブデン（⁹⁹Mo）、キセノン（¹³³Xe）、フッ素（¹⁸F）、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Lu、¹⁵⁹Gd、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁰La、¹⁷⁵Yb、¹⁶⁶Ho、⁹⁰Y、⁴⁷Sc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁴²Pr、¹⁰⁵Rh、および⁹⁷Ruを含む。

20

【0397】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質またはそのフラグメントもしくは変異体は、¹⁷⁷Lu、⁹⁰Y、¹¹⁶Ho、および¹⁵³Smが挙げられるが、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（macrocylic）キレート剤に付着させる。好ましい実施形態において、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、¹¹¹Inである。別の好ましい実施形態において、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、⁹⁰Yである。特定の実施形態において、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''，N'''-テトラ酢酸（DOTA）である。他の特定の実施形態において、DOTAは、リンカー分子を介して本発明の抗体またはそのフラグメントに付着させる。DOTAをポリペプチドに共役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で周知である。例えば、DeNardo et al., Clin Cancer Res. 4 (10): 2483-90 (1998); Peterson et al., Bioconj. Chem. 10 (4): 553-7 (1999); および Zimmerman et al., Nucl. Med. Biol. 26 (8): 943-50 (1999)を参照のこと；参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

【0398】

上記のように、本発明のアルブミン融合タンパク質は、自然な過程（例えば、翻訳後プロセッシング）または当該技術分野で周知の化学的改変技法のいずれかにより修飾され得る。同じ型の修飾が、所定のポリペプチドにおけるいくつかの部位で同じ程度または種々の程度で存在し得ることが、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していてもよく、それらは、分岐を有するまたは有し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

50

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、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしく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、タンパク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が介在するタンパク質へのアミノ酸の付加（例えばアルギニン化等）、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 and Company, New York (1993)、POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983)、Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990)、Rattan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)を参照のこと）。

【0399】

本発明のアルブミン融合タンパク質および治療用タンパク質に結合する抗体またはそのフラグメントもしくは変異体は、精製を容易にするために、ペプチド等のマーカー配列に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、ヘキサ-ヒスチジンペプチド（例えば、pQEベクター（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）において提供されるタグ）であり、これらの多くは、市販されている。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)において記載されるように、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製のために有用な他のペプチドタグとしては、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「HA」タグ（Wilson et al., Cell 37:767 (1984)）、および「flag」タグが挙げられるが、これらに限定されない。

【0400】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質は、治療用部分（例えば、細胞毒素（例えば、細胞増殖抑制性もしくは細胞破壊の薬剤））、治療剤または放射性金属イオン（例えば、 α -エミッター（例えば、 ^{213}Bi ）等）に共役され得る。細胞毒または細胞毒性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を含む。例としては、パクリタキセル（paclitaxol）、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、テニポシド（teniposide）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン（colchicin）、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（dihydroxy anthracin dione）、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、ならびにそのアナログまたはホモログが挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、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（5-fluorouracil decarbazine）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ（thioepa）クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにcis-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アンスラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）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（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアンスラマイシン（anthramycin）（AMC）、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0401】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を修飾するために使用され得、治療剤または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されるものと解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、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）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経発育因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス薬（例えば、TNF- α 、TNF- β 、AIM-1（国際公開第WO97/33899号を参照のこと）、AIM-2（国際公開第WO97/34911号を参照のこと）、Fasリガンド（Takahashi et al., Int. Immunol. 5:1567-1574（1994））、VEGF（国際公開第WO99/23105号を参照のこと）、血栓症薬もしくは血管新生阻害剤（例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン）；または生物学的応答修飾剤（例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、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」）、または他の増殖因子等）が挙げられ得る。このような治療用部分をタンパク質（例えば、アルブミン融合タンパク質）に共役するための技法は、当該技術分野で公知である。

【0402】

アルブミン融合タンパク質はまた、固体支持体に付着してもよく、これは、本発明のアルブミン融合タンパク質が結合する、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。このような固体支持体としては、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、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0403】

単独、あるいは細胞毒性因子および／またはサイトカインと組み合わせて投与される、それに共役する治療部分を有するかまたは有しないアルブミン融合タンパク質が、治療薬として使用され得る。

【0404】

本発明のアルブミン融合タンパク質が、治療用タンパク質に結合する抗体のVHドメインのみを含む実施形態において、融合タンパク質と治療用タンパク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アルブミン融合タンパク質およびVLタンパク質は、翻訳後に結合され得る（共有結合または非共有結合）。

【0405】

本発明のアルブミン融合タンパク質が、治療用タンパク質に結合する抗体のVLドメインのみを含む実施形態において、融合タンパク質と治療用タンパク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アルブミン融合タンパク質およびVHタンパク質は、翻訳後に結合され得る（共有結合または非共有結合）。

【0406】

一部の治療用抗体は、二重特異性抗体であり、これは、治療用タンパク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。その治療用タンパク質に対応するアルブミン融合タンパク質を作製するために、アルブミンタンパク質部分のN末端およびC末端の双方に融合されたscFvフラグメントを有するアルブミン融合タンパク質を作製することが可能である。よ

り具体的には、アルブミンのN末端に融合されたs c F vは、治療用タンパク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、アルブミンのC末端に融合されたs c F vは、治療用タンパク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。

【0407】

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等のさらなる利点を提供し得る、本発明のアルブミン融合タンパク質の化学修飾された誘導体も提供される（米国特許第4、179、337号を参照のこと）。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等から選択されてもよい。アルブミン融合タンパク質は、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、1つ、2つ、3つ、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。

【0408】

ポリマーは、任意の分子量のものであってよく、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1 kDa～約100 kDaである（「約」という用語は、ポリエチレングリコールの調製中、一部の分子が記載の分子量より大きな分子量を有し、いく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、該当する場合、生物活性への効果、取扱いの容易性、抗原性の程度または欠損、および治療用タンパク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周知の効果）に応じて、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100,000 kDaの平均分子量を有してもよい。

【0409】

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 et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996)；Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999)；およびCaliceti et al., Bioconj. Chem. 10:638-646 (1999)に記載されており、これらの各開示内容は、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0410】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学的部分）は、タンパク質の機能または抗原性ドメインへの効果を考慮して、タンパク質に付着させる必要がある。例えば、欧州特許出願第0401384号（G-CSFへのPEGの結合）において開示されている方法等の、当業者に利用可能な多数の付着方法があり、これは参照することにより本明細書に組み込まれる；トレスクロライドを用いるGM-CSFのペグ化（pegylation）を報告する、Malik et al., Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992), reporting pegylation of GM-CSF using tresyl chlorideもまた参照のこと。例えば、ポリエチレングリコールは、遊離のアミノ基またはカルボキシル基等の反応性基を経由してア

ミノ酸残基を通じて共有結合され得る。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得るものである。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み得、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み得る。スルフヒドリル基もまた、ポリエチレングリコール分子を付着するための反応性基として用いられ得る。治療目的のために、アミノ基における付着、例えば、N末端またはリジン基における付着が好ましい。

【0411】

上で示唆されるように、ポリエチレングリコールは、多くのアミノ酸残基のうちの任意のものへの結合を経由してタンパク質に付着され得る。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への共有結合を経由してタンパク質に結合され得る。1つ以上の反応化学が、ポリエチレングリコールを、タンパク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）、またはタンパク質の1つ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）に付着するために採用され得る。

【0412】

特に、N末端において化学修飾されたタンパク質を望む場合がある。本発明の組成物の例示として、ポリエチレングリコールを用いて、種々のポリエチレングリコール分子（分子量、分枝等により）から、反応混合物中のタンパク質（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、行われるペグ化反応の型、および選択されるN末端ペグ化タンパク質を得る方法を選択し得る。N末端ペグ化調製物を得る（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）方法は、ペグ化タンパク質分子の集団からN末端ペグ化物質を精製することであり得る。N末端修飾で化学修飾された選択性タンパク質は、特定のタンパク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達成され得る。適切な反応条件の下で、カルボキシル基含有ポリマーを用いたN末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

【0413】

上に記載したように、本発明のアルブミン融合タンパク質のペグ化は、任意の数の手段により達成され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、アルブミン融合タンパク質に、直接的または介在リンカーのいずれかにより結合され得る。ポリエチレングリコールをタンパク質に結合させるリンカーのない系は、Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992)、Francis et al., Intern. 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、国際公開第WO95/06058号、および同第WO98/32466号において記載されており、これらの内容のそれぞれは、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0414】

介在リンカーなしにポリエチレングリコールをタンパク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を採用し、それは、トレシルクロリド(ClSO₂CH₂CF₃)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とタンパク質の反応において、ポリエチレングリコールは、タンパク質のアミン基に直接結合される。したがって、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タンパク質の反応により生じる、タンパク質-ポリエチレングリコール結合体を含む。

【0415】

ポリエチレングリコールはまた、多数の異なる介在リンカーを用いてもタンパク質に結合され得る。例えば、米国特許第5,612,460号（この開示全体は、参照すること

により本明細書に組み込まれる)は、ポリエチレングリコールをタンパク質に連結するためのウレタンリンカーを開示する。タンパク質-ポリエチレングリコール結合体(ここで、該ポリエチレングリコールは、リンカーによりタンパク質に結合される)はまた、タンパク質と、MPEG-スクシニミジルスクシネート、1, 1'-カルボニルジイミダゾールで活性化されたMPEG、MPEG-2, 4, 5-トリクロロペニル(trichloropenyl)カーボネート、MPEG-p-ニトロフェノールカーボネート、および種々のMPEG-スクシネート誘導体等の化合物との反応により生成され得る。ポリエチレングリコールをタンパク質に結合するための、多くのさらなるポリエチレングリコール誘導体および反応化学は、国際公開第WO 98/32466号(この開示全体は、参照することにより本明細書に組み込まれる)において記載される。本明細書に記載される反応化学を用いて生成されるペグ化タンパク質産物は、本発明の範囲内に含まれる。

10

【0416】

本発明の各アルブミン融合タンパク質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)はまた、様々であってもよい。例えば、本発明のペグ化タンパク質は、平均して、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、12個、15個、17個、20個、またはそれ以上のポリエチレングリコール分子に連結され得る。同様に、平均置換度は、1個のタンパク質分子あたり、1~3個、2~4個、3~5個、4~6個、5~7個、6~8個、7~9個、8~10個、9~11個、10~12個、11~13個、12~14個、13~15個、14~16個、15~17個、16~18個、17~19個、または18~20個等のポリエチレングリコール部分の範囲である。

20

【0417】

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が挙げられるが、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。タンパク質の再折りたたみのための周知の技法は、そのポリペプチドが、単離および/または精製の間に変性される場合、活性なコンホメーションを再生するために採用され得る。

30

【0418】

本発明のアルブミン融合タンパク質の存在および量は、当該技術分野で周知のイムノアッセイであるELISAを用いて決定され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質を検出/定量化するために有用であり得るELISAプロトコルの1つには、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タンパク質(1つ以上の異なる濃度で)を含む溶液を加え、検出可能な標識(本明細書に記載される、またはそうでなければ当該技術分野で知られている)にカップリングされている二次抗治療用タンパク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的バージョンにおいて、ELISAプレートは、抗治療用タンパク質特異的抗体でコーティングされ得、その標識二次試薬は、抗ヒトアルブミン特異的抗体であり得る。

40

【0419】

ポリヌクレオチドの使用

本明細書にて特定されるポリヌクレオチドの各々は、多くの方法において試薬として使用され得る。以下の説明は、例示的であると見なされるべきであり、周知の技法を利用する。

50

【0420】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のアルブミン融合タンパク質を産生するために有用である。以下により詳細に記載されるように、本発明のポリヌクレオチド（アルブミン融合タンパク質をコードする）は、本発明のアルブミン融合タンパク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タンパク質を発現する細胞、細胞株、または組織を作製するために、遺伝子操作において有用な組換えDNA法において使用され得る。

【0421】

本発明のポリヌクレオチドはまた、遺伝子治療において有用である。遺伝子治療の1つの目的は、遺伝的欠損を矯正するために、欠損遺伝子を有する生物体に正常な遺伝子を挿入することである。本発明において開示されるポリヌクレオチドは、非常に正確な状態でこのような遺伝的欠損を標的化する手段を提供する。別の目的は、宿主ゲノムに存在しなかった新たな遺伝子を挿入し、それにより宿主細胞において新たな形質を生じさせることである。本発明により包含される遺伝子治療法のさらなる非限定的な例は、本明細書で他の箇所により綿密に記載される（例えば、「遺伝子治療」の項ならびに実施例61および62を参照のこと）。

【0422】

ポリペプチドの使用

本明細書にて特定されるポリペプチドの各々は、多くの方法において使用され得る。以下の記載は、例示的であると見なされるべきであり、周知の技法を利用する。

【0423】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、組織（例えば、ABC免疫ペルオキシダーゼのような免疫組織化学アッセイ（Hsu et al., J. Histochem. Cytochem. 29:577-580 (1981)）または細胞型（例えば、免疫細胞化学アッセイ）の識別特定のための免疫学的プローブを提供するために有用である。

【0424】

アルブミン融合タンパク質は、当業者に周知の古典的な免疫組織学的方法（例えば、Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985)、Jalkanen, et al., 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使用され得る。タンパク質の遺伝子発現を検出するために有用な他の方法には、酵素結合免疫吸着法（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）等のイムノアッセイが含まれる。好適なアッセイ標識は、当該技術分野で知られており、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（ ^3H ）、インジウム（ $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、およびテクネチウム（ $^{99\text{Tc}}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、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 ；ルミノール等の発光標識；ならびにフルオレセインおよびローダミン等の蛍光標識、ならびにビオチンを含む。

【0425】

本発明のアルブミン融合タンパク質はまた、画像化により生体内で検出され得る。タンパク質の生体内の画像化のための標識またはマーカーは、X線撮影法、核磁気共鳴（NMR）、または電子スピン共鳴（ESR）により検出可能なものを含む。X線撮影法については、好適な標識は、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等の放射性同位元素を含む。NMRおよびESRに好適なマーカーは、重水素等の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タンパク質を発現する細胞株に付与した栄養素の標識により、アルブミン融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質中に取り込まれ得る。

【0426】

適切な検出可能な画像化部分、例えば、放射性同位元素（例えば、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、およびテクネチウム ^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、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タンパク質は、哺乳類に導入され（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。対象のサイズおよび用いられる画像化システムが、診断画像を生成するために必要とされる画像化部分の量を決定することが当該技術分野で理解されよう。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 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ であり得る。次いで、標識されたアルブミン融合タンパク質は、1つ以上の受容体、リガンド、または基質（本発明のアルブミン融合タンパク質を作製するために用いられる治療用タンパク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。代替として、アルブミン融合タンパク質が、治療用抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む場合、標識されたアルブミン融合タンパク質は、次いで、（本発明のアルブミン融合タンパク質を作製するために用いられる）治療用抗体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。生体内での腫瘍画像化は、S. W. Burchiel et al., “Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments” (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))において記載される。本明細書に記載されるプロトコルは、本発明のアルブミン融合タンパク質について用いるために、当業者により容易に修正され得るだろう。

【0427】

一実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸と会合する本発明のアルブミン融合タンパク質（例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質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および／または抗体）を投与することによる、細胞への本発明のアルブミン融合タンパク質の特異的な送達のための方法を提供する。一例において、本発明は、治療用タンパク質を標的細胞に送達するための方法を提供する。別例において、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、細胞のゲノムに組み込み得るか、またはエピソームにて複製し得、そして転写され得るDNA）を、標的細胞に送達するための方法を提供する。

【0428】

別の実施形態において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラッグとともに本発明のアルブミン融合タンパク質を投与することによる細胞の特異的な破壊（例えば、腫瘍細胞の破壊）のための方法を提供する。

【0429】

「毒素」とは、内因性の細胞傷害性エフェクター系、放射性同位元素、ホロ毒素（holotoxin）、改変型毒素、毒素の触媒サブユニット、または規定の条件下で細胞死を引き起こす細胞中もしくは細胞表面には通常存在しない任意の分子もしくは酵素を結合および活性化する1つ以上の化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る毒素

としては、当該技術分野で周知の放射性同位元素、生来のまたは誘導された内因性細胞傷害性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*）外毒素A、ジフテリア毒素、サポリン、モモルジン（*momordin*）、ゲロニン（*gelonin*）、ヨウシュヤマゴボウ（*pokeweed*）抗ウイルスタンパク質、アルファサルシンおよびコレラ毒素挙げられるが、これらに限定されない。「毒素」はまた、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 等のアルファ放出体、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 、 $^{90}\text{イットリウム}$ 、 $^{117}\text{スズ}$ 、 $^{186}\text{レニウム}$ 、 $^{166}\text{ホルミウム}$ 、および $^{188}\text{レニウム}$ ；ルミノール等の発光標識；ならびにフルオレセインおよびローダミン等の蛍光標識、ならびにビオチンも含む。特定の実施形態において、本発明は、放射性同位元素 ^{90}Y とともに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。別の実施形態において、本発明は、放射性同位元素 ^{111}In とともに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。さらなる特定の実施形態において、本発明は、放射性同位元素 ^{131}I とともに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。

【0430】

当該技術分野で周知の技法を用いて、本発明のポリペプチドを標識してもよい。このような技法としては、二官能性結合体物質（例えば、米国特許第5,756,065号、同第5,714,631号、同第5,696,239号、同第5,652,361号、同第5,505,931号、同第5,489,425号、同第5,435,990号、同第5,428,139号、同第5,342,604号、同第5,274,119号、同第4,994,560号、および同第5,808,003号を参照のこと。これらの各々の内容は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

【0431】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、哺乳動物、好ましくはヒトにおける様々な障害の診断、処置、予防、および／または予後診断のために有用である。このような障害としては、以下の「生物学的活性」と題する項の下で本明細書に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0432】

したがって、本発明は、疾患の診断方法を提供するものであって、（a）本発明のアルブミン融合タンパク質を用いて、個体の細胞または体液内のあるポリペプチドの発現レベルをアッセイすることと、（b）標準的なポリペプチド発現レベルとそのアッセイしたポリペプチド発現レベルを比較することとを含み、これにより、標準発現レベルと比較して、アッセイしたポリペプチド発現レベルにおける増大または減少が、疾患の指標となる。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を示し得、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得る。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。

【0433】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質は、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等の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に対す

るヘモグロビンS、SOD、カタラーゼ、DNA修復タンパク質)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)の活性を活性化させる、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タンパク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。

【0434】

特に、治療用抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質を用いて、疾患(上記、および本明細書に別記されるような)を処置することもできる。例えば、治療用抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質の投与は、特異的に結合するアルブミン融合タンパク質を作製するために使用される治療用抗体がポリペプチドに結合および/もしくはそれをは中和し得、ならびに/または特異的に結合するアルブミン融合タンパク質を作製するために使用される治療用抗体が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つのフラグメントもしくは変異体を含むアルブミン融合タンパク質の投与は、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、アルブミン融合タンパク質を作製するために使用される治療用抗体が特異的に結合するポリペプチドを活性化することができる。

【0435】

少なくとも、本発明のアルブミン融合タンパク質は、当業者に周知の方法を用いるSDS-PAGEゲルまたは分子ふるいゲル濾過カラムの分子量マーカーとして使用され得る。また、本発明のアルブミン融合タンパク質を用いて、抗体を惹起し得、それによって、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、治療用タンパク質、アルブミンタンパク質、および/または組換え細胞に由来する本発明のアルブミン融合タンパク質のタンパク質発現を測定するために用いることができる。さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質は、本明細書に記載される生物活性を試験するために用いることができる。

【0436】

診断アッセイ

本発明の化合物は、哺乳動物、好ましくはヒトにおける様々な障害の診断、処置、予防、および/または予後診断のために有用である。このような障害は、表1の対応する行において各治療用タンパク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」、「生殖器系障害」、「感染症」、「再生」、および/または「胃腸障害」の項に記載のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0437】

多数の障害について、「標準の」遺伝子発現レベル、すなわち、障害を有し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、遺伝子発現の大幅に変化した(増大された、または減少された)レベルが、このような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、もしくは髄液)において検出され得る。したがって、本発明は、障害の診断中、有用な診断方法を提供し、それには、個体に由来する組織、細胞、もしく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、その測定された遺伝子発現レベルを標準遺伝子発現レベルと比較することを含み、これにより、標準と比較して、遺伝子発現レベルにおける増大および減少が、障害の指標となる。これらの診断アッセイは、生体内または体外で、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。

【0438】

本発明はまた、予後指標としても有用であり、これにより、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。

【0439】

「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タンパク質に対応するポリペプチド）のレベルまたは第1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、絶対タンパク質レベルまたは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、第1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、標準ポリペプチドレベルまたはmRNAレベルと比較され、該標準は、障害を有しない個体から得られた第2の生体試料から得られるものであるか、または障害を有しない個体の集団からのレベルを平均して決定されるものである。当該技術分野で理解されるように、標準ポリペプチドレベルまたはmRNAレベルが判明すると、比較のための標準として繰り返し使用することができる。

10

【0440】

「生体試料」とは、本発明のポリペプチド（その一部を含む）またはmRNAを含有する、個体、細胞株、組織培養、または他の供給源から得られた、任意の生体試料を意図する。示されるように、生体試料としては、ポリペプチドまたはmRNAの全長またはそのフラグメントを発現することが見出されている体液（例えば、血清、血漿、尿、滑液、および髄液）および組織供給源が挙げられる。哺乳動物から組織生検および体液を得る方法は、当該技術分野で公知である。生体試料が、mRNAを含む場合、組織生検が好ましい供給源である。

20

【0441】

全細胞RNAは、Chomczynski and Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987)において記載される単一工程のグアニウムチオシアネートフェノールクロロホルム法等の任意の好適な技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る。これらは、ノーザンブロット分析、S1スクリーンゼマッピング、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ポリメラーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写（RT-PCR）、およびリガーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写（RT-LCR）を含む。

30

【0442】

本発明はまた、ポリペプチドの正常なおよび異常なレベルの決定を含む、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タンパク質に結合する、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定量および診断アッセイ等の診断アッセイに関する。したがって、例えば、正常な対照組織試料と比較して、アルブミン融合タンパク質に結合する、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アッセイは、腫瘍の存在を検出するために用いられ得る。宿主に由来する試料における本発明のアルブミン融合タンパク質に結合する、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、当業者に公知である。このようなアッセイ方法は、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、任意の当該技術分野に周知の方法を用いて行うことができる。

40

【0443】

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を用いて研究され得る（Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985)、Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)）。ポリペプチド遺伝子発現を検出するた

50

めに有用な他の方法には、酵素結合免疫吸着法（E L I S A）およびラジオイムノアッセイ（R I A）等のイムノアッセイが含まれる。好適な抗体アッセイ標識は、当該技術分野で知られており、グルコースオキシダーゼ等の酵素標識、およびヨウ素（ ^{125}I 、 ^{127}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{112}In ）、およびテクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）等の放射性同位元素、ならびにフルオレセインおよびローダミン等の蛍光標識、ならびにビオチンを含む。

【0444】

分析されるべき組織または細胞型は、概して、関心対象となる遺伝子（例えば、癌等の）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。本明細書に利用されるタンパク質単離方法は、例えば、HarlowおよびLane（Harlow, E. and Lane, D., 1988, “Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York）において記載されるようなものを含み得、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。単離される細胞は、細胞培養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、または代替として、遺伝子の発現における化合物の効果を試験するために、必須な工程であり得る。

【0445】

例えば、アルブミン融合タンパク質は、本発明のアルブミン融合タンパク質に結合する、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、または蛍光分析による検出と共に、蛍光標識されたアルブミン融合タンパク質を利用する免疫蛍光技法により達成され得る。

【0446】

好ましい実施形態において、本明細書に開示される少なくとも1つの治療用タンパク質（表1に開示される治療用タンパク質）に特異的に結合する抗体の少なくとも1つのフラグメントもしくは変異体を含む、またはそうでなければ当該分野で周知のアルブミン融合タンパク質は、遺伝子産物、またはその保存された変異体もしくはペプチドフラグメントの存在を定量的にまたは定性的に検出するために用いられ得る。これは、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光分析による検出と共に、蛍光標識された抗体を利用する免疫蛍光技法によって達成され得る。

【0447】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質に結合する、結合される、または会合するポリペプチドの原位置検出のために、免疫蛍光、免疫電子顕微鏡法、または非免疫学的アッセイ等において、組織学的に利用され得る。原位置検出は、患者由来の組織学的標本を取り出すこと、およびそれに本発明の標識抗体またはポリペプチドを適用することによって達成され得る。アルブミン融合タンパク質は、好ましくは、生体試料上に標識されたアルブミン融合タンパク質を重層することにより適用される。このような手順を用いて、アルブミン融合タンパク質に結合する、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可能である。本発明を用いて、当業者は、多種多様の組織学的方法のいずれか（例えば、染色手順）が、例えば、原位置検出を達成するために改変され得ることを容易に認識するだろう。

【0448】

アルブミン融合タンパク質に結合する、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、遺伝子産物またはその保存変異体またはペプチドフラグメント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、または細胞培養にてインキュベートされた細胞の溶解物を培養し、次いで、当該技術分野で公知の多数の技法のうちの任意

の技法により結合された抗体を検出することを含む。

【0449】

生体試料は、ニトロセルロース等の固相支持体もしくは担体、または細胞、細胞粒子、もしくは可溶性タンパク質を固定化し得る他の固相支持体と接触させ、次いで、そこに固定化されてもよい。その後、この支持体を、好適な緩衝液で洗浄し、次いで、本発明の検出可能な標識を施したアルブミン融合タンパク質で処理し得る。その後、この固相支持体を、緩衝液で2度目の洗浄をし、非結合の抗体またはポリペプチドを除去し得る。必要に応じて、この抗体は、その後、標識される。その後、固相支持体上に結合された標識の量を、従来の手段を用いて検出することができる。

【0450】

「固相支持体または担体」とは、ポリペプチド（例えば、アルブミン融合タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質に結合する、結合される、もしくは会合するポリペプチド）を結合し得る任意の支持体を意図する。周知の支持体または担体としては、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、天然および改変したセルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、および磁鉄鉱が挙げられる。担体の性質は、本発明の目的のために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。支持体材料は、付着した分子が、ポリペプチドに結合し得る限り、事実上、任意の可能な構造配置を有し得る。したがって、支持体の形状は、ビーズにおけるような球状、ある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円柱状であってもよい。代替として、該表面は、平面（例えば、シート、試験ストリップ等）であり得る。好ましい支持体は、ポリスチレンビーズを含む。当業者には、抗体または抗原を結合し得る多くの他の好適な担体が知られているか、または慣用的な実験を用いてそれを確認することができよう。

【0451】

所定のロットのアルブミン融合タンパク質の結合活性は、公知の方法により決定され得る。当業者は、慣用的な実験を利用することにより、各々の決定のための有効かつ最適のアッセイ条件を決定することができよう。

【0452】

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、ポリペプチドはまた、画像化によっても生体内にて検出できる。例えば、本発明の一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、罹患細胞または新生物細胞を画像化するために用いられる。

【0453】

本発明のアルブミン融合タンパク質の生体内画像化のための標識またはマーカーは、X線撮影法、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線撮影法については、好適な標識は、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等の放射性同位元素を含む。NMRおよびESRに好適なマーカーは、重水素等の検出可能な特徴的なスピンを有するものを含み、これは、操作された細胞株（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、アルブミン融合タンパク質中に取り込んでもよい。

【0454】

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タンパク質が、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された本発明のアルブミン融合タンパク質は、標識抗体について、上で論じられたように、生体内において投与および可視化され得る。さらに、このようなポリペプチドは、体外診断手順においても利用され得る。

【0455】

適切な検出可能な画像化部分、例えば、放射性同位元素（例えば、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、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フラグメントを、障害について検査

10

20

30

40

50

しようとする哺乳動物に（例えば、非経口的、皮下または腹腔内に）導入される。対象のサイズおよび用いられる画像化システムが、診断画像を生成するために必要とされる画像化部分の量を決定することが当該技術分野で理解されよう。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 ^{99m}Tc であり得る。標識されたアルブミン融合タンパク質は、その後、本発明のアルブミン融合タンパク質に結合する、結合される、または会合する、ポリペプチドまたは他の基質を含む体内の位置に選択的に蓄積し得る。生体内での腫瘍画像化は、S. W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))において記載される。

10

【0456】

本発明のアルブミン融合タンパク質が、検出可能に標識され得る1つの方法は、レポーター酵素へそれを連結し、そしてこの連結された産物を酵素免疫アッセイ (EIA) に用いることによる (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD)、Voller et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978)、Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981)、Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL、Ishikawa, E. et al., (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo)。抗体に結合するレポーター酵素は、例えば、分光光度法、蛍光分析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な状態で、適切な基質（好ましくは色素基質）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としては、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が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、検出は、レポーター酵素のために発色性基質を利用する比色分析方法により達成することができる。検出はまた、同様に調製した標準物と比較して、基質の酵素反応の程度を目視比較することにより達成され得る。

20

30

【0457】

アルブミン融合タンパク質はまた、放射標識されてもよく、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、アルブミン融合タンパク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タンパク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、参照することにより本明細書に組み込まれる）。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が挙げられるが、これらに限定されない手段により検出され得る。

40

【0458】

さらに、キレート剤分子は、当該技術分野で知られており、アルブミン融合タンパク質

50

を標識するために使用され得る。キレート剤分子は、本発明のアルブミン融合タンパク質に付着され、放射線核種または蛍光標識を含む金属イオンを用いる該タンパク質の標識を容易にし得る。例えば、Subramanian, R. and 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 therapeutic agents: bifunctional radiopharmaceuticals." Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 75:209-244 (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 75:589-603 (1991)、およびLiu, S. and Edwards, D. S., "Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals." Bioconjug. Chem. 12:1-34 (2001)を参照のこと。該アルブミン融合タンパク質に共有結合され得る任意のキレート剤を、本発明に従って用いることができる。キレート剤はさらに、アルブミン融合タンパク質にキレート剤部分を接続するリンカー部分を含んでもよい。

10

20

【0459】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、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)であり得る。

30

【0460】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、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。

40

【0461】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質に結合される大環状キレート剤は、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸(DOTA)である。他の特定の実施形態において、DOTAは、リンカー分子を介して本発明のアルブミン融合タンパク質に結合される。DOTAをポリペプチドに共役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で周知である。例えば、DeNardo et al., Clin Cancer Res. 4(10):2483-90 (1998)、Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10(4):553-7 (1999)、およびZimmerman et al., Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50 (1999)を参照のこと、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。加えて、抗体に共役し得るキ

50

レート剤、ならびにそれらを製造するおよび使用するための方法を開示する、米国特許第5,652,361号および同第5,756,065号は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。米国特許第5,652,361号および同第5,756,065号は、抗体へのキレート剤の共役に焦点を合わせているが、当業者は、それらに開示される方法を容易に適合させ、他のポリペプチドにキレート剤を共役させ得る。

【0462】

共役が、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、大環状リガンドに基づく二官能性キレート剤が、M. Moiet al., J. Amer. Chem. Soc. 49:2639 (1989) (2-p-ニトロベンジル-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) 10、S. V. Deshpande et al., J. Nucl. Med 31:473 (1990)、G. Ruser et al., Bioconj. Chem. 1:345 (1990)、C. J. Broan et al., J. C. S. Chem. Comm. 23:1739 (1990)、およびC. J. Anderson et al., J. Nucl. Med. 36:850 (1995)に記載のように利用され得る。

【0463】

一実施形態において、大環状キレート剤（例えば、ポリアザ大環状キレート剤）（必要に応じて1つ以上のカルボキシル基、アミノ基、ヒドロキサメート基、ホスファネート基、またはリン酸基を含む）は、本発明のアルブミン融合タンパク質と結合する。別の実施形態において、キレート剤は、DOTA、DOTAのアナログ、およびDOTAの誘導体 20からなる群より選択されるキレート剤である。

【0464】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質に結合し得る好適なキレート剤分子としては、DOXA (1-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トリ酢酸)、TETA (1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカントリ酢酸)、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)、およびそれらのアナログおよび誘導体が挙げられる。例えば、Ohmono et al, J. Med. C 30hem. 35:157-162 (1992)、Kung et al, J. Nucl Med. 25:326-332 (1984)、Jurisson et al, Chem. Rev. 95:1137-1156 (1993)、および米国特許第5,367,080号を参照のこと。他の好適なキレート剤は、米国特許第4,647,447号、同第4,687,659号、同第4,885,363号、欧州特許出願第A-71564号、国際公開第WO89/00557号、および欧州特許出願第A-232751号において開示されるキレート剤を含む。

【0465】

別の実施形態において、本発明において用いられ得る好適な大環状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', 40N'', 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-プロモアセトアミド-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。

【0466】

本発明のアルブミン融合タンパク質に結合し得る好ましいキレート剤は、 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 (MeO-DOTA-NCSとしても知られている) 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 50

ー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また使用され得る。

【0467】

記載されるようなキレート剤が共有結合する本発明のアルブミン融合タンパク質は、治療、診断、または治療および診断の双方を目的として適している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、Fe、Gd、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、または ^{68}Ga を含む。別の実施形態において、診断目的のために用いられる放射線核種は、 ^{111}In または ^{67}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 、 $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 ^{52}Fe 、または ^{72}Ga である。一実施形態において、治療目的のために用いられる放射線核種は、 ^{166}Ho または ^{90}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。一実施形態において、放射線核種は、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{175}Yb 、または ^{159}Gd である。

10

【0468】

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

20

【0469】

特定の実施形態において、キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合タンパク質は、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 、 ^{215}Bi 、および ^{225}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。

【0470】

さらに、診断画像化のために、 γ -放出放射線核種、例えば、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、および ^{169}Yb が認可されているかまたは研究されている一方で、 β -放射物質、例えば、 ^{67}Cu 、 ^{111}Ag 、 ^{186}Re 、および ^{90}Y は、腫瘍治療に適用するために有用である。他の有用な放射線核種はまた、 γ -放射物質（例えば、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、および ^{169}Yb ）、および β -放射物質（例えば、 ^{67}Cu 、 ^{111}Ag 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、および ^{90}Y ）、ならびに関心対象とする他の放射線核種（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 ^{44}Sc ）も含む。キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合タンパク質は、上記の放射線核種を用いて標識されてもよい。

30

【0471】

別の実施形態において、キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合タンパク質は、遷移およびランタニド金属のイオン、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を有する元素を含む。

40

【0472】

別の実施形態において、キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合タンパク質は、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。

【0473】

50

別の実施形態において、キレート剤が共有結合される本発明のアルブミン融合タンパク質は、Mo、Bi、Si、およびWの原子を含み得る、重金属を含むレポーターを用いて標識されてもよい。

【0474】

蛍光化合物を用いてアルブミン融合タンパク質を標識することも可能である。蛍光標識抗体が適切な波長の光に曝される場合、その後、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、o-フタルアルデヒド、およびフルオレスカミンがある。

【0475】

アルブミン融合タンパク質はまた、 ^{152}Eu 等の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)等の金属キレート基を用いて抗体に結合され得る。

【0476】

アルブミン融合タンパク質はまた、それを化学発光化合物に結合することによっても検出可能に標識され得る。その後、化学発光タグ化アルブミン融合タンパク質の存在は、化学反応の経過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、テロマトニック(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。

【0477】

同様に、生物発光化合物は、本発明のアルブミン融合タンパク質を標識するために使用され得る。生物発光は、触媒タンパク質は化学発光反応の効率を増大する生物系において見出される化学発光の型である。生物発光タンパク質の存在は、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。

【0478】

トランスジェニック生物体

本発明のアルブミン融合タンパク質を発現するトランスジェニック生物体も本発明に含まれる。トランスジェニック生物体は、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遺伝学的に改変された生物体である。このような遺伝物質は、多くの場合、トランスジーンと称される。トランスジーンの核酸配列は、コードされたタンパク質の最適な発現および分泌のために必要とされ得る、1つ以上の転写制御配列およびイントロン等の他の核酸配列を含み得る。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状態で、コードされたタンパク質の発現を導くように設計され得る。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り得る。トランスジーンは、特定の核酸配列が他の正常に見出されないゲノムの遺伝子座、あるいはトランスジーンの正常な遺伝子座でのいずれかに組み込まれ得る。

【0479】

「生殖細胞系トランスジェニック生物体」という用語は、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体の能力を付与されたトランスジェニック生物体を指す。このような子孫が実際にその改変または遺伝情報の一部またはすべてを有するならば、それらもトランスジェニック生物体である。改変または遺伝情報は、レシピエントが属する生物体の種とは異なり得、特定の個体のレシピエントに対してのみ異なり得、またはレシピエントが既に保有される遺伝情報であり得る。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得る。

【0480】

トランスジェニック生物体は、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り得る。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、胚性幹細胞における遺伝子ターゲティング、ならびに組換えウイルス感染および組換えレトロウイルス感染を含む種々の異なる方法で産生できる（米国特許第4,736,866号、同第5,602,307号、Mullins et al. (1993) *Hypertension* 22(4):630-633、Brenin et al. (1997) *Surg. Oncol.* 6(2)99-110、Tuan (ed.), *Recombinant Gene Expression Protocols, Methods in Molecular Biology* No. 62, Humana Press (1997)を参照のこと）。組換えコンピテント哺乳類細胞中に核酸フラグメントを導入する方法は、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詳細な手順は、当業者に容易に入手可能であり、米国特許第5,489,743号および同第5,602,307号における開示を含む。

10

【0481】

多数の組換えまたはトランスジェニックマウスが産生されており、活性化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を示すもの（米国特許第5,723,719号）；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認め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 et al. (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。

20

【0482】

マウスおよびラットは、多くのトランスジェニック実験のために好んで使用される動物であるが、場合によっては、代替の動物種を使用することが好ましい、または必要でさえある。トランスジェニックの手順は、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非マウス動物において首尾よく利用されている（例えば、Kim et al. (1997) *Mol. Reprod. Dev.* 46(4):515-526、Houdebine (1995) *Reprod. Nutr. Dev.* 35(6):609-617、Petters (1994) *Reprod. Fertil. Dev.* 6(5):643-645、Schnieke et al. (1997) *Science* 278(5346):2130-2133、およびAmoah (1997) *J. Animal Science* 75(2):578-585を参照のこと）。

30

【0483】

トランスジェニック動物の乳汁中に、本発明のトランスジーンによりコードされたタンパク質の分泌を導くためには、哺乳類上皮細胞において優先的に活性化されたプロモーターの制御下に置かれ得る。乳タンパク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、 β -ラクトグロブリン、ホエー酸タンパク質、またはラクトアルブミンのプロモーターが好ましい（例えば、DiTullio (1992) *BioTechnology* 10:74-77、Clark et al. (1989) *BioTechnology* 7:487-492、Gorton et al. (1987) *BioTechnology* 5:1183-1187、およびSoulier et al. (1992) *FEBS Letts.* 297:13を参照のこと）。好んで使用されるトランスジェニック哺乳動物、例えば、ヤギ、ウシ、ラクダまたはヒツジは、大量の乳を産生し

40

50

、長い授乳期間を有する。

【0484】

本発明のアルブミン融合タンパク質はまた、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、当該技術分野で周知である。一般的に、Methods Enzymology Vol. 153 (“Recombinant DNA Part D”) 1987, Wu and Grossman Eds., Academic Press、および欧州特許出願第693 554号を参照のこと。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、および欧州特許出願第693 554号においてさらに記載されており、これらのすべては、参照することにより本明細書に組み込まれる。

10

【0485】

医薬または治療用組成物

本発明のアルブミン融合タンパク質またはそれらの製剤は、非経口（例えば、皮下または筋肉内）注入または静脈内注入を含む任意の従来の方法により投与され得る。処置は、期間にわたって、単一回投与または複数回投与からなり得る。

【0486】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、単独で投与されることが可能であるが、1つ以上の許容される担体と共に医薬製剤とすることが好ましい。該担体は、アルブミン融合タンパク質に適合し、かつその投与を受ける個体に有害ではないという意味において「許容される」べきである。典型的に、担体は、滅菌および無発熱物質である水または生理食塩水である。本発明のアルブミン融合タンパク質は、特に、溶液中のそれらの長期化した貯蔵寿命のために、水性担体（例えば、滅菌無発熱物質水、生理食塩水、または他の等張溶液）中の製剤によく適する。例えば、本発明の医薬組成物は、あらかじめ水性形態で、例えば、分散される数週間前または数ヶ月前、あるいはそれ以上の期間前に、十分に製剤化され得る。

20

【0487】

例えば、アルブミン融合タンパク質を含有する製剤は、水性製剤におけるアルブミン融合タンパク質の長期化した貯蔵寿命を考慮して調製され得る。上記のように、これら治療用タンパク質の多くの貯蔵寿命は、HAに融合した後、著しく増大されるか、または延期される。

30

【0488】

エアロゾル投与が適切な場合、本発明のアルブミン融合タンパク質は、標準的な手順を用いてエアロゾルとして製剤化され得る。「エアロゾル」という用語は、細気管支または鼻腔経路に吸入可能な、本発明のアルブミン融合タンパク質の任意のガスによって送達される懸濁相を含む。特に、エアロゾルは、定量吸入用量吸入器または噴霧器、あるいはミスト噴霧器において生成され得るような、本発明のアルブミン融合タンパク質の水滴からなるガスによって送達される懸濁液を含む。エアロゾルはまた、例えば、吸入デバイスからの吸入により送達され得る空気または他の担体ガスに懸濁された本発明の化合物の乾燥粉末組成物も含む。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Raeburn et al, (1992) Pharmacol. Toxicol. Methods 27:143-159を参照のこと。

40

【0489】

典型的に、本発明の製剤はまた、一つには、適切な種に由来するアルブミン融合タンパク質の成分を用いるため、非免疫原性であり得る。例えば、ヒトへの使用のために、治療用タンパク質およびアルブミン融合タンパク質のアルブミン部分の両方は、典型的にヒト

50

である。いずれかの成分が非ヒト由来であるような場合によっては、その成分は主要アミノ酸の置換によりヒト化され得、その結果、特異的なエピトープが、ヒト免疫系に対し、外来性ではなく、むしろ天然のヒトのようになる。

【0490】

製剤は、都合よく単位投与形態とし得、当該薬学分野で周知の任意の方法により調製され得る。このような方法は、1つ以上の付属成分を構成する担体とアルブミン融合タンパク質を会合させる工程を含む。一般的に、製剤は、活性成分と液体担体または微粉状の固体担体、またはそれら両方を均一にかつ親密に会合させ、その後、必要な場合、産物を形成することにより、調製する。

【0491】

非経口投与に適する製剤としては、意図されるレシピエントに適する製剤にする抗酸化物、緩衝液、静菌剤、および溶質を含有し得る水性滅菌注入溶液または非水性滅菌注入溶液；ならびに懸濁剤および濃化剤を含み得る水性滅菌注入溶液または非水性滅菌注入溶液が挙げられる。製剤は、単位用量容器または複数用量容器（例えば、密封されたアンプル、バイアルまたはシリンジ）中で調整し得、使用の直前に滅菌液体担体（例えば、注入用の水）の添加のみを必要とする凍結乾燥（親液性）状態で保存され得る。即席の注入溶液および懸濁液は、滅菌散剤から調製され得る。投与製剤は、本発明の多くのアルブミン融合タンパク質により示される長期化した血清半減期により、治療用タンパク質のための非融合標準製剤と比較して、低いモル濃度またはより低い投与量で治療用タンパク質部分を含有し得る。

【0492】

一例として、本発明のアルブミン融合タンパク質が、1つ以上の治療用タンパク質領域として、表1の「治療用タンパク質X」列に列挙されたタンパク質の1つを含む場合、投与形態は、天然の治療用タンパク質のものと比較して、アルブミン融合タンパク質の延長された血清半減期および貯蔵寿命を考慮しながら、治療用タンパク質単独の効力に対するアルブミン融合タンパク質の効力に基づいて計算することができる。例えば、治療用タンパク質が、典型的に、 $0.3 \sim 30.0 \text{ IU/kg/週}$ または $0.9 \sim 12.0 \text{ IU/kg/週}$ で投与されるならば、一年以上にわたって、3または7回に分けて投与される。治療用タンパク質に融合した全長HAからなるアルブミン融合タンパク質では、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。

【0493】

本発明の製剤または組成物は、アルブミン融合タンパク質成分の長期化した貯蔵寿命について言及する説明書または包装挿入物と共に包装されるか、または共にキットに納めることができる。例えば、このような説明書または包装挿入物は、本発明のアルブミン融合タンパク質の延期された、または長期化した貯蔵寿命を考慮して、推奨される貯蔵条件（例えば、時間、温度、および光）に注意を向け得る。このような説明書または包装挿入物はまた、本発明のアルブミン融合タンパク質の特定の利点（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製剤についての貯蔵の容易さ）に注意を向け得る。上記のように、本発明の製剤は、水性形態であり得、治療活性を有意に損なうことなく、理想に満たない状況下において、貯蔵され得る。

【0494】

本発明のアルブミン融合タンパク質はまた、栄養補助食品中に含めることができる。例えば、本発明の特定のアルブミン融合タンパク質は、アルブミン融合タンパク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、天然産物中にて投与され得る。このような組成物はまた、アルブミン融合タンパク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。アルブミン融合タンパク質はまた、他の周知の添加剤、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において記載される。

【0495】

本発明はまた、医薬的に許容される担体中の有効量の本発明のアルブミン融合タンパク質または本発明のアルブミン融合タンパク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、本明細書に開示される任意の1つ以上の疾患または障害等）を処置および／または予防する方法も提供する。

【0496】

アルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、個々の患者の臨床状態（特に、アルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドを単独で用いた処置の副作用）、送達部位、投与方法、投与スケジュール、および当業者に周知の他の要因を考慮して、良質の医療のための原則（good medical practice）を遵守する方式で製剤化および投薬する。したがって、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。

【0497】

一般的提案として、1用量あたりの非経口投与されるアルブミン融合タンパク質の医薬上の合計有効量は、患者体重1kgあたり約1ug/kg/日～10mg/kg/日の範囲であり得るが、上記のように、これは治療的裁量に委ねられる。より好ましくは、この用量は、少なくとも0.01mg/kg/日であり、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。連続投与する場合、典型的に、アルブミン融合タンパク質は、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また利用され得る。変化を観察するため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。

【0498】

上記のように、本発明のアルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質部分（またはそのフラグメントもしくは変異体）単独と比較して、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タンパク質の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タンパク質の投与が可能となり、または代替として、アルブミン融合タンパク質をより少ない頻度で投与することが可能となる得る。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タンパク質を低い頻度で投与することが可能となる。より好ましくは、アルブミン融合タンパク質は、2週間ごとに1回投与され得る。さらにより好ましくは、アルブミン融合タンパク質の薬物動態に応じて、アルブミン融合タンパク質は、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、上で論じられたように、IFN-α融合タンパク質の薬物動態は、2～4週以上ごとに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。

【0499】

1用量あたりの投与され得る有効量のアルブミン融合タンパク質はまた、1用量あたり与えられる全体の製剤化されたアルブミン融合タンパク質濃度として表わすことができる。一実施形態において、1用量あたり患者に投与される全体の製剤化されたアルブミン融合タンパク質濃度は、約10ug/用量から約2000ug/用量の範囲である。より好ましくは、全濃度は、約100ug/用量から約1000ug/用量であり、または代替として、約1000ug/用量から約1200ug/用量、または約900ug/用量から約1800ug/用量である。

【0500】

特定の実施形態において、本発明のIFN-α融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4

10

20

30

40

50

295、または4296により生成された)は、全体の製剤化された濃度の約90ug/用量から約2000ug/用量において投薬される。さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、全体の製剤化された濃度の約900ug/用量から約2000ug/用量、約900ug/用量から約1200ug/用量、約900ug/用量から約1800ug/用量、および最も好ましくは、全体の製剤化された濃度の約1200ug/用量から約1800ug/用量において投薬される。さらなる好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、全体の製剤化された濃度の約600ug/用量、720ug/用量、800ug/用量、900ug/用量、1000ug/用量、1200ug/用量、1500ug/用量、1800ug/用量、または2000ug/用量において投薬される。さらなる実施形態において、全体の製剤化された用量の本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、単独あるいはリバビリン等の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、投与される。さらなる好ましい実施形態において、全体の製剤化された用量の本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、リバビリンが挙げられるが、これに限定されない、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、投与される。

【0501】

さらなる実施形態において、全体の製剤化された濃度の本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、HCVに感染した患者を処置するために投与される。特定の実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、単独、あるいは有効量の抗ウイルス性化合物(リバビリン等)と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の約90ug/用量から約2000ug/用量において、HCVに罹患する未処置患者に投与される。さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、単独、あるいは有効量の抗ウイルス性化合物(リバビリン等)と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の約900ug/用量から約2000ug/用量、約900ug/用量から約1200ug/用量、約900ug/用量から約1800ug/用量、および最も好ましくは、全体の製剤化された濃度の約1200ug/用量から約1800ug/用量において、HCVに罹患する未処置患者に投与される。さらなる好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、単独、あるいは有効量の抗ウイルス性化合物(リバビリン等)と組み合

わせて、全体の製剤化された濃度の600ug/用量、720ug/用量、800ug/用量、900ug/用量、1000ug/用量、1200ug/用量、1500ug/用量、1800ug/用量、または2000ug/用量において、HCVに罹患する未処置患者に投与される。

【0502】

さらなる実施形態において、全体の製剤化された濃度の本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質は、有効量の1つ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の約90ug/用量から約2000ug/用量において、HCVに罹患する未処置患者に投与される。さらなる好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の約900ug/用量から約2000ug/用量、約900ug/用量から約1200ug/用量、約900ug/用量から約1800ug/用量、および最も好ましくは、全体の製剤化された濃度の約1200ug/用量から約1800ug/用量において、HCVに罹患する未処置患者に投与される。さらなる好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、有効量の1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の600ug/用量、720ug/用量、800ug/用量、900ug/用量、1000ug/用量、1200ug/用量、1500ug/用量、1800ug/用量、または2000ug/用量において、HCVに罹患する未処置患者に投与される。

【0503】

さらなる実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは、有効量の抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の約90ug/用量から約2000ug/用量において、HCVに罹患する処置経験のある患者に投与される。さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは、有効量の抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の約900ug/用量から約2000ug/用量、約900ug/用量から約1200ug/用量、約900ug/用量から約1800ug/用量、および最も好ましくは、全体の製剤化された濃度の約1200ug/用量から約1800ug/用量において、HCVに罹患する処置経験のある患者に投与される。さらなる好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは有効量の抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の600ug/用量、720ug/用量、800ug/用量、900ug/用量、1000ug/用量、1200ug/用量、1500ug/用量、1800ug/用量、または2000ug/用量において、HCVに罹患する処置経験のある患者に投与される。

10

20

30

40

50

【0504】

さらなる実施形態において、本発明の I F N－アルファ－H S A 融合タンパク質（例えば、C I D 2 2 4 9、2 3 4 3、2 3 6 6、2 3 8 1、2 3 8 2、2 4 1 0、3 1 6 5、3 4 2 2、3 4 2 3、3 4 2 4、3 4 7 6、3 9 6 0、4 2 9 0、4 2 9 1、4 2 9 2、4 2 9 5、または 4 2 9 6 により生成された）は、1 つ、2 つ、3 つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の約 9 0 u g / 用量から約 2 0 0 0 u g / 用量において、H C V に罹患する処置経験のある患者に投与される。さらに好ましい実施形態において、本発明の I F N－アルファ－H S A 融合タンパク質（例えば、C I D 2 2 4 9、2 3 4 3、2 3 6 6、2 3 8 1、2 3 8 2、2 4 1 0、3 1 6 5、3 4 2 2、3 4 2 3、3 4 2 4、3 4 7 6、3 9 6 0、4 2 9 0、4 2 9 1、4 2 9 2、4 2 9 5、または 4 2 9 6 により生成された）は、1 つ、2 つ、3 つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の約 9 0 0 u g / 用量から約 2 0 0 0 u g / 用量、約 9 0 0 u g / 用量から約 1 2 0 0 u g / 用量、約 9 0 0 u g / 用量から約 1 8 0 0 u g / 用量、および最も好ましくは、全体の製剤化された濃度の約 1 2 0 0 u g / 用量から約 1 8 0 0 u g / 用量において、H C V に罹患する処置経験のある患者に投与される。さらなる好ましい実施形態において、本発明の I F N－アルファ－H S A 融合タンパク質（例えば、C I D 2 2 4 9、2 3 4 3、2 3 6 6、2 3 8 1、2 3 8 2、2 4 1 0、3 1 6 5、3 4 2 2、3 4 2 3、3 4 2 4、3 4 7 6、3 9 6 0、4 2 9 0、4 2 9 1、4 2 9 2、4 2 9 5、または 4 2 9 6 により生成された）は、有効量の 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、全体の製剤化された濃度の 6 0 0 u g / 用量、7 2 0 u g / 用量、8 0 0 u g / 用量、9 0 0 u g / 用量、1 0 0 0 u g / 用量、1 2 0 0 u g / 用量、1 5 0 0 u g / 用量、1 8 0 0 u g / 用量、または 2 0 0 0 u g / 用量において、H C V に罹患する処置経験のある患者に投与される。

【0505】

アルブミン融合タンパク質の全体の製剤化された濃度およびアルブミン融合タンパク質が投与される投与間隔は、所望の効果および投与される特定の治療用タンパク質に応じて変化するであろう。一実施形態において、1 用量あたり患者に投与される全体の製剤化されたアルブミン融合タンパク質濃度は、週に 1 回、2 週間ごとに 1 回、3 週間ごとに 1 回、4 週間または 4 週以上ごとに 1 回、約 1 0 u g / 用量から約 2 0 0 0 u g / 用量の範囲である。より好ましくは、全体の濃度は、週に 1 回、2 週間ごとに 1 回、3 週間ごとに 1 回、4 週間または 4 週以上ごとに 1 回、約 1 0 0 u g / 用量から約 1 0 0 0 u g / 用量、または代替として、週に 1 回、2 週間ごとに 1 回、3 週間ごとに 1 回、4 週間または 4 週以上ごとに 1 回、約 1 0 0 0 u g / 用量から約 1 2 0 0 u g / 用量、または約 9 0 0 u g / 用量から約 1 8 0 0 u g / 用量の範囲である。

【0506】

特定の実施形態において、本発明の I F N－アルファ－H S A 融合タンパク質（例えば、C I D 2 2 4 9、2 3 4 3、2 3 6 6、2 3 8 1、2 3 8 2、2 4 1 0、3 1 6 5、3 4 2 2、3 4 2 3、3 4 2 4、3 4 7 6、3 9 6 0、4 2 9 0、4 2 9 1、4 2 9 2、4 2 9 5、または 4 2 9 6 により生成された）は、2 週間ごと、3 週間ごと、4 週間ごと、または 5 週間ごとに 1 回、全体の製剤化された濃度の約 9 0 u g / 用量から約 2 0 0 0 u g / 用量で投与される。さらに好ましい実施形態において、本発明の I F N－アルファ－H S A 融合タンパク質（例えば、C I D 2 2 4 9、2 3 4 3、2 3 6 6、2 3 8 1、2 3 8 2、2 4 1 0、3 1 6 5、3 4 2 2、3 4 2 3、3 4 2 4、3 4 7 6、3 9 6 0、4 2 9 0、4 2 9 1、4 2 9 2、4 2 9 5、または 4 2 9 6 により生成された）は、1 週間ごと、2 週間ごと、3 週間ごと、4 週間ごと、または 5 週間ごとに 1 回、全体の製剤化された濃度の約 9 0 0 u g / 用量から約 2 0 0 0 u g / 用量；1 週間ごと、2 週間ごと、3 週間ごと、4 週間ごと、または 5 週間ごとに 1 回、約 9 0 0 u g / 用量から約 1 2 0 0 u g

／用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、約900ug／用量から約1800ug／用量；および最も好ましくは、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約1200ug／用量から1800ug／用量において、投薬される。さらなる実施形態において、本発明のIFN-アルファ-ISA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約600ug／用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、800ug／用量、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、900ug／用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1000ug／用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1200ug／用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1500ug／用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1600ug／用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1800ug／用量；または1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、2000ug／用量で、投与される。さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-ISA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、2週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の900ug／用量、およびより好ましくは、2週間ごとに1回、全体の濃度の1200ug／用量、4週間ごとに1回、1200ug／用量、または4週間ごとに1回、1800ug／用量で、投与される。さらなる実施形態において、全体の製剤化された用量の本発明のIFN-アルファ-ISA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、投与される。さらなる好ましい実施形態において、全体の製剤化された用量の本発明のIFN-アルファ-ISA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリンを含む）および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、投与される。

【0507】

特定の実施形態において、本発明のIFN-アルファ-ISA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約90ug／用量から約2000ug／用量で、未処置のHCV患者に投与される。さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-ISA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは抗ウイルス性化合物（リバビリン等を含む）と組み合わせて、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約900ug／用量から約2000ug／用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと

と、4週間ごと、または5週間ごとに1回、約900ug/用量から約1200ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、約900ug/用量から約1800ug/用量；および最も好ましくは、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約1200ug/用量から約1800ug/用量において、未処置のHCV患者に投与される。さらなる実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約600ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、800ug/用量、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、900ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1000ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1200ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1500ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1600ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1800ug/用量；または1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、2000ug/用量において、未処置のHCV患者に投与される。

【0508】

好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約90ug/用量から約2000ug/用量で、未処置のHCV患者に投与される。さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、1つ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）と組み合わせて、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約900ug/用量から約2000ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、約900ug/用量から約1200ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、約900ug/用量から約1800ug/用量；および最も好ましくは、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約1200ug/用量から約1800ug/用量において、未処置のHCV患者に投与される。さらなる実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約600ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、また

10

20

30

40

50

は5週間ごとに1回、800ug/用量、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、900ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1000ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1200ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1500ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1600ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1800ug/用量；または1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、2000ug/用量で、未処置のHCV患者に投与される。

【0509】

さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、2週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の900ug/用量で、およびより好ましくは、2週間ごとに1回、全体の濃度の1200ug/用量で、4週間ごとに1回、1200ug/用量で、または4週間ごとに1回、1800ug/用量で、未処置のHCV患者に投与される。最も好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、2週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の900ug/用量で、およびより好ましくは、2週間ごとに1回、全体の濃度の1200ug/用量で、4週間ごとに1回、1200ug/用量で、または4週間ごとに1回、1800ug/用量で、未処置のHCV患者に投与される。

【0510】

さらなる特定の実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約90ug/用量から約2000ug/用量で、処置経験のあるHCV患者に投与される。さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約900ug/用量から約2000ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、約900ug/用量から約1200ug/用量；1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、約900ug/用量から約1800ug/用量；および最も好ましくは、1週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約1200ug/用量から約1800ug/用量、または最も好ましくは、2週間ごとに1回、約1200ug/用量から約1800ug/用量において、処置経験のあるHCV患者に投与される。さらなる実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、

10

20

30

40

50

4292、4295、または4296により生成された)は、単独、あるいは抗ウイルス性化合物(リバビリン等)と組み合わせて、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約600ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、800ug/用量、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、900ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1000ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1200ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1500ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1600ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1800ug/用量;または1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、2000ug/用量において、処置経験のあるHCV患者に投与される。

10

【0511】

さらに特定の実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物(例えば、リバビリン等を含む)、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約90ug/用量から約2000ug/用量で、処置経験のあるHCV患者に投与される。さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物(例えば、リバビリン等を含む)、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約900ug/用量から約2000ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、約900ug/用量から約1200ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、約900ug/用量から約1800ug/用量;および最も好ましくは、1週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約1200ug/用量から約1800ug/用量において、または最も好ましくは、2週間ごとに1回、約1200ug/用量から約1800ug/用量において、処置経験のあるHCV患者に投与される。さらなる実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質(例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された)は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物(例えば、リバビリン等を含む)、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の約600ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、800ug/用量、1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、900ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1000ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1200ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1500ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1600ug/用量;1週間ごと、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、1800ug/用量;または1週間ごと、2週間ごと

20

30

40

50

、3週間ごと、4週間ごと、または5週間ごとに1回、2000ug/用量で、処置経験のあるHCV患者に投与される。

【0512】

さらに好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、単独、あるいは抗ウイルス性化合物（リバビリン等）と組み合わせて、2週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の900ug/用量で、およびより好ましくは、2週間ごとに1回、全体の濃度の1200ug/用量で、4週間ごとに1回、1200ug/用量で、または4週間ごとに1回、1800ug/用量で、処置経験のあるHCV患者に投与される。最も好ましい実施形態において、本発明のIFN-アルファ-HSA融合タンパク質（例えば、CID2249、2343、2366、2381、2382、2410、3165、3422、3423、3424、3476、3960、4290、4291、4292、4295、または4296により生成された）は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の抗ウイルス性化合物（例えば、リバビリン等を含む）、および任意に別の抗ウイルス性化合物と組み合わせて、2週間ごとに1回、全体の製剤化された濃度の900ug/用量で、およびより好ましくは、2週間ごとに1回、全体の濃度の1200ug/用量で、4週間ごとに1回、1200ug/用量で、または4週間ごとに1回、1800ug/用量で、処置経験のあるHCV患者に投与される。

【0513】

アルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドは、経口、直腸内、非経口、槽内（intracistemally）、腔内、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、または経口または鼻腔スプレーとして投与され得る。「医薬的に許容される担体」とは、任意の非毒性の固体、半固体もしくは液体充填剤、希釈剤、カプセル化物質、または製剤補助剤を指す。本明細書に使用される「非経口」という用語は、静脈内、筋内、腹腔内、胸骨内、皮下、および関節内の注射および注入を含む投与形態を指す。

【0514】

本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドはまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性アルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドの例としては、経口、直腸内、非経口、槽内（intracistemally）、腔内、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、または経口または鼻腔スプレーとして投与され得る。「医薬的に許容される担体」とは、任意の型の非毒性の固体、半固体もしくは液体充填剤、希釈剤、カプセル化物質、または製剤補助剤を指す。本明細書に使用される「非経口」という用語は、静脈内、筋内、腹腔内、胸骨内、皮下、および関節内の注射および注入を含む投与形態を指す。徐放性アルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドのさらなる例としては、好適なポリマー物質（例えば、造形した物品の形態をした半透性ポリマー物質（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル））、好適な疎水性物質（例えば、許容される油中の乳剤として）またはイオン交換樹脂、および難溶性誘導体（例えば、難溶性塩等）が挙げられる。

【0515】

徐放性マトリックスとしては、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、欧州特許出願第58,481号）、L-グルタミン酸およびガンマーエチルーL-グルタメートのコポリマー（Sidman et al., Biopolymers 22:547-556 (1983)）、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（Langer et al., J. Biomed. Mater. 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 et al., Id.）またはポリ-D-

(一) - 3 - ヒドロキシ酪酸 (欧州特許出願第 1 3 3, 9 8 8 号) が挙げられる。

【0 5 1 6】

徐放性アルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドとしては、リポソーム封入された本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドが挙げられる (概して、Langer, Science 249:1527-1533 (1990)、Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 317-327 and 353-365 (1989) を参照のこと)。アルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドを含有するリポソームは、それ自体が知られている方法により調製される: DE 3, 218, 121、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692 (1985)、Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034 (1980)、欧州特許出願第 52, 322; 欧州特許出願第 36, 676 号、欧州特許出願第 88, 046 号、欧州特許出願第 143, 949 号、欧州特許出願第 142, 641 号、日本国特許出願第 83-118008 号、米国特許第 4, 485, 045 号および同第 4, 544, 545 号、ならびに欧州特許出願第 102, 324 号。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 30 モル% のコレステロールよりも多く、選択された割合が、最適な治療剤のために適合される。

【0 5 1 7】

さらなる追加の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、ポンプにより送達される (Langer、上記参照、Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987)、Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980)、Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989) を参照のこと)。

【0 5 1 8】

他の制御された放出系は、Langer による総説にて論じられている (Science 249:1527-1533 (1990))。

【0 5 1 9】

非経口投与のために、一実施形態において、アルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、概して、それを所望の程度の純度で、医薬的に許容される担体、すなわち、採用される用量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、かつ製剤の他の成分に適合するものと、単位用量の注射可能な形態 (溶液、懸濁液、または乳剤) で混合することにより製剤化される。例えば、製剤は、好ましくは、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。

【0 5 2 0】

概して、製剤は、アルブミン融合タンパク質および／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。その後、必要ならば、生成物は所望の製剤に成形される。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。このような担体ビヒクルの例としては、水、生理的食塩水、リンゲル溶液およびデキストロス溶液を含む。固定油およびオレイン酸エチル等の非水性ビヒクルもまた、リポソームと同様に本明細書において有用である。

【0 5 2 1】

担体は、等張性および化学安定性を亢進する物質のような微量の添加剤を適切に含有する。このような物質は、採用される用量および濃度で投与を受ける個体に対して毒性がなく、リン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸および他の有機酸またはそれらの塩類のような緩衝液; アスコルビン酸等の抗酸化剤; 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) ; 血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等のタンパク質 ; ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー ; グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、もしくはアルギニン等のアミノ酸 ; セルロースもしくはその誘導体、ブドウ糖、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物 ; EDTA等のキレート剤 ; マンニトールもしくはソルビトール等の糖アルコール ; ナトリウム等の対イオン ; ならびに / またはポリソルベート (例えば、Tween-20を含む)、ポロキサマーもしくはPEG等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0522】

アルブミン融合タンパク質は、典型的に、約 $0.1 \text{ mg/ml} \sim 100 \text{ mg/ml}$ 、好ましくは $1 \sim 10 \text{ mg/ml}$ の濃度、約 3~8 の pH で、このようなビヒクル中に製剤化される。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。

【0523】

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、滅菌濾過膜 (例えば、 $0.2 \mu\text{m}$ の膜) で濾過することにより容易に達成される。アルブミン融合タンパク質および / またはポリヌクレオチドは、概して、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下用注射針で穿刺可能なストッパー付の静脈内用溶液バッグまたはバイアルに配置される。

【0524】

アルブミン融合タンパク質および / またはポリヌクレオチドは、通常、単位用量または複数用量容器、例えば、密封アンプルまたはバイアルに、水溶液または再構成するための凍結乾燥製剤として貯蔵される。凍結乾燥製剤の例として、 10 ml のバイアルに、滅菌濾過した 1% (w/v) 治療剤水溶液 5 ml を充填し、そして得られる混合物を凍結乾燥する。注入溶液は、注射のための滅菌水を用いて、凍結乾燥されたアルブミン融合タンパク質および / またはポリヌクレオチドを再構成することにより調製される。

【0525】

特定および好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク質製剤は、 0.01 M のリン酸ナトリウム、 0.15 mM の塩化ナトリウム、融合タンパク質 1 mg あたり $0.16 \mu\text{mol}$ のオクタン酸ナトリウム、 1 ml あたり $15 \mu\text{g}$ のポリソルベート 80、pH 7.2 を含む。別の特定および好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク質製剤は、 0.01 M のリン酸ナトリウム、 0.15 mM の塩化ナトリウム、融合タンパク質 1 mg あたり $0.16 \mu\text{mol}$ のオクタン酸ナトリウム、 1 ml あたり $15 \mu\text{g}$ のポリソルベート 80、pH 7.2 を含む。pH および緩衝液は、生理学的条件に適合するように選択され、および等張化剤として塩を加える。オクタン酸ナトリウムは、溶液中のタンパク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、選択された。最後に、ポリソルベートは、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タンパク質の非特異的吸着を軽減する遺伝子界面活性剤として加えられた。

【0526】

本発明はまた、本発明のアルブミン融合タンパク質および / またはポリヌクレオチドの 1 つ以上の成分が充填された 1 つ以上の容器を含む医薬パックまたはキットも提供する。このような容器には、医薬または生物学的製剤の製造、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付属することができ、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、アルブミン融合タンパク質および / またはポリヌクレオチドを採用して、他の治療用化合物と組み合わせてもよい。

【0527】

本発明のアルブミン融合タンパク質および / 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投与され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および / ま

10

20

30

40

50

たはポリヌクレオチドと共に投与され得るアジュバントとしては、ミョウバン、ミョウバン+デオキシコール酸塩 (Immuno Ag)、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) 調製物が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得るさらなるアジュバントとしては、モノホスホリル脂質免疫調節剤、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) アジュバント技術が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得るワクチンとしては、MMR (はしか、おたふく風邪、風疹)、ポリオ、水痘瘡、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 (whooping cough)、肺炎、インフルエンザ、ライム病、ロタウイルス、コレラ、黄熱病、日本脳炎、ポリオ (poliomyelitis)、狂犬病、腸チフス、および百日咳 (pertussis) を防御するために行われるワクチンが挙げられるが、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、別々であるが同時にもしくは並行して、または連続して投与され得る。これは、組み合わせた薬剤を治療混合物として共に投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に (例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じての場合) 投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

【0528】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／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得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得るアルブミン融合タンパク質および／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、従来の免疫治療剤、および／または以下に記載の治療用処置が挙げられるが、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、別々であるが同時にもしくは並行して、または連続して投与され得る。これは、組み合わせた薬剤を治療混合物として共に投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に (例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じての場合) 投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

【0529】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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。本発明の組成物と共に投与され得る抗凝血剤は、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 (商標))、アセノクマロール (例えば、ニクマロン、SINTHROME (商標))、インダン-1、3-ジオン、フェンプロクモン (例えば、MARCUMAR (商標))、ビスクマセタートエチル (例えば、TROMEXAN (商標))、およびアスピリンが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、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。別の特定の実施形態において、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。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、ヘパリンと組み合わせて投与される。別の特定の実施形態において、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。

【0530】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、血栓溶解薬と組み合わせて投与される。本発明の組成物と共に投与され得る血栓溶解薬は、プラスミノゲン、l y sープラスミノゲン、アルファ2ー抗プラスミン、ストレプトキナーゼ（例えば、K A B I K I N A S E（商標））、抗レスプラス（a n t i r e s p l a c e）（例えば、E M I N A S E（商標））、組織プラスミノゲン活性化剤（t - P A、アルテパーゼ、A C T I V A S E（商標））、ウロキナーゼ（例えば、A B B O K I N A S E（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、A M I C A R（商標））が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の組成物は、組織プラスミノ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。

10

【0531】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、抗血小板薬と組み合わせて投与される。本発明の組成物と共に投与され得る抗血小板薬は、アスピリン、ジピリダモール（例えば、P E R S A N T I N E（商標））およびチクロピジン（例えば、T I C L I D（商標））が挙げられるが、これらに限定されない。

【0532】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせた抗凝血剤、血栓溶解薬、および／または抗血小板薬の使用は、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企図される。特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせた抗凝血剤、血栓溶解薬および／または抗血小板薬の使用は、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企図される。単独または抗血小板剤、抗凝血剤、および／または血栓溶解薬と組み合わせた本発明の治療剤の他の使用としては、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装置）における閉塞の予防が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0533】

ある実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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（N R T I）、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（N N R T I）および／またはプロテアーゼ阻害剤（P I）と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得るN R T Iとしては、R E T R O V I R（商標）（ジドブジン／A Z T）、V I D E X（商標）（ジダノシン／d d I）、H I V I D（商標）（ザルシタビン／d d C）、Z E R I T（商標）（スタブジン／d 4 T）、E P I V I R（商標）（ラミブジン／3 T C）、およびC O M B I V I R（商標）（ジドブジン／ラミブジン）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得るN N R T Iは、V I R A M U N E（商標）（ネビラピン）、R E S C R I P T O R（商標）（デラビルジン）、およびS U S T I V A（商標）（エファビレンツ）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得るプロテアーゼ阻害剤は、C R I X I V A N（商標）（インジナビル）、N O R V I R（商標）（リトナビル）、I N V I R A S E（商標）（サキナビル）、およびV I R A C E P T（商標）（ネルフィナビル）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、抗レトロウイルス薬剤、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、非

40

50

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感染を予防もしくは処置するために、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドとの任意の組み合わせで使用され得る。

【0534】

さらなるNNRTIは、LODENOSINE（商標）（F-ddA；酸安定性アデノシンNNRTI；Triangle/Abbott；COVIRACIL（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、体外で3～10倍より大きな活性を有する；Triangle/Abbott）；dOTC（BCH-10652もまた構造的にラミブジンに関連するが、ラミブジン耐性単離物の実質的比率に対して、活性を保持する；Biochem Pharma）；アデフォビル（FDAにより抗HIV治療に対する認可を拒絶された；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）；TENOFVIR（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）；ZIGAGEN（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；国際公開第WO99/66936号）；およびβ-L-FD4Cおよびβ-L-FddC（国際公開第WO98/17281号）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。

【0535】

さらなるNNRTIとしては、COACTINON（商標）（エンビリン／MKC-442、HEPTクラスの強力なNNRTI；Triangle/Abbott）；CAPRAVIRINE（商標）（AG-1549/S-1153、K103N変異体を含むウイルスに対する活性を有する次世代のNNRTI；Agouron）；PNU-142721（前駆体（デラビルジン）よりも20～50倍大きな活性を有し、そしてK103N変異体に対して活性である；Pharmacia & Upjohn）；DPC-961およびDPC-963（エファビレンツ（efavirenz）の第2世代誘導体、K103N変異を有するウイルスに対して活性であるように設計される；DuPont）；GW-420867X（HBY097よりも25倍大きな活性を有し、そしてK103N変異体に対して活性である；Glaxo Wellcome）；CALANOLIDEA（ラテックスの木由来の天然に存在する薬剤；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して活性）；ならびにプロポリス（国際公開第WO99/49830号）が挙げられる。

【0536】

さらなるプロテアーゼ阻害剤としては、LOPINAVIR（商標）（ABT378/r；Abbott Laboratories）；BMS-232632（アザペプチド；Bristol-Myers Squibb）；TIPRANAVIR（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する体外活性を有するペプチド模倣物；Agouron）；VX-175/GW-433908（アンブレナビルのリン酸プロドラッグ；Vertex & Glaxo Wellcome）；CGP61755（Ciba）；ならびにAGENERASE（商標）（アンブレナビル；Glaxo Wellcome Inc.）が挙げられる。

【0537】

さらなる抗レトロウイルス剤としては、融合阻害剤／g p 4 1 結合剤が挙げられる。融合阻害剤／g p 4 1 結合剤としては、T-20（その休止状態にてg p 4 1 に結合し、融合誘導状態への形質転換を阻止するH I V g p 4 1 膜貫通型タンパク質の外部ドメインの643～678残基に由来するペプチド；T r i m e r i s）ならびにT-1249（第2世代融合阻害剤；T r i m e r i s）が挙げられる。

【0538】

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としては、C X C R 4 アンタゴニスト、例えば、AMD3100（バイサイクラム（b i c y c l a m））、SDF-1およびそのアナログ、ならびにA L X 4 0 - 4 C（カチオン性ペプチド）、T22（18個のアミノ酸のペプチド；T r i m e r i s）およびT22アナログT134およびT140；C C R 5 アンタゴニスト、例えば、R A N T E S（9-68）、A O P - R A N T E S、N N Y - R A N T E S、およびT A K - 7 7 9；ならびにC C R 5 / C X C R 4 アンタゴニスト、例えば、N S C 6 5 1 0 1 6（ジスタマイシンアナログ）が挙げられる。C C R 2 B、C C R 3、およびC C R 6 アンタゴニストも含む。R A N T E S、SDF-1、M I P - 1 α、M I P - 1 β等のケモカイン受容体アゴニストもまた、融合を阻害し得る。

【0539】

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としては、ジカフェオイルキナ酸（D F Q A）；L-チコリ酸（ジカフェオイル酒石酸（D C T A））；キナリザリン（Q L C）および関連するアントラキノン；Z I N T E V I R（商標）（A R 1 7 7、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；A r o n d e x）；ならびにナフトール（例えば、国際公開第W O 9 8 / 5 0 3 4 7 号に開示されるもの）が挙げられる。

【0540】

さらなる抗レトロウイルス剤としては、ヒドロキシ尿素様化合物、例えば、B C X - 3 4（プリンヌクレオチドホスホリラーゼ阻害剤；B i o c r y s t）；リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤、例えば、D I D O X（商標）（M o l e c u l e s f o r H e a l t h）；イノシンモノホスフェートデヒドロゲナーゼ（I M P D H）阻害剤、例えば、V X - 4 9 7（V e r t e x）；およびミコフェノール酸、例えば、C e l l C e p t（ミコフェノラートモフェチル；R o c h e）が挙げられる。

【0541】

さらなる抗レトロウイルス剤としては、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；H I V 侵入の阻害剤、例えば、A O P - R A N T E S、N N Y - R A N T E S、R A N T E S - I g G 融合タンパク質、R A N T E S およびグリコサミノグリカン（G A G）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；H I V T a t および R e v の 標 的；ならびに薬学的エンハンサー、例えば、A B T - 3 7 8 が挙げられる。

【0542】

他の抗レトロウイルス治療剤および補助治療剤としては、サイトカインおよびリンホカイン、例えば、M I P - 1 α、M I P - 1 β、SDF-1 α、I L - 2、P R O L E U K I N（商標）（アルデスロイキン／L2-7001；C h i r o n）、I L - 4、I L - 1 0、I L - 1 2、およびI L - 1 3；インターフェロン、例えば、I F N - アルファ2 a、I F N - アルファ2 b、またはI F N - ベータ；T N F、N F κ B、G M - C S F、M - C S F、およびI L - 1 0 のアンタゴニスト；免疫活性を調節する薬剤、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、R e m u n e（商標）（H I V I m m u n o g e n）、A P L 4 0 0 - 0 0 3（A p o l l o n）、組換えg p 1 2 0 およびフラグメント、二価（B / E）組換えエンベロープ糖タンパク質、r g p 1 2 0 C M 2 3 5、M N r g p 1 2 0、S F - 2 r g p 1 2 0、g p 1 2 0 / 可溶性C D 4 複合体、デルタJ R - F L タンパク質、不連続g p 1 2 0 C 3 / C 4 ドメインに由来する分岐

10

20

30

40

50

合成ペプチド、融合ー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（GSE；国際公開第WO98/54366号）、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に標的化された遺伝子修飾CCケモカイン（Yang et al, PNAS 94: 11567-72 (1997)、Chen et al, 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-gp120抗体17b、48d、447-52D、257-D、268-Dおよび50.1、抗-Tat抗体、抗-TNF- α 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（国際公開第WO98/30213号）；ならびに抗酸化剤、例えば、 γ -L-グルタミル-L-システインエチルエステル（ γ -GCE；国際公開第WO99/56764号）が挙げられる。

【0543】

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、1つ以上の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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る抗ウイルス剤は、アシクロビル、リバビリン、リバビリンアナログ、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が挙げられるが、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タンパク質は、任意のこれらの薬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タンパク質も、任意のこれらの薬剤と共に投与され得、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アルブミン融合タンパク質が任意のこれらの薬剤と共に投与され得る。さらに、インターフェロンベータアルブミン融合タンパク質も、任意のこれらの薬剤と共に投与され得る。さらに、任意のIFNハイブリッドアルブミン融合タンパク質は、任意のこれらの薬剤と組み合わせて投与され得る。

【0544】

最も好ましい実施形態において、本発明のインターフェロンアルブミン融合タンパク質は、リバビリンまたはリバビリンアナログと組み合わせて投与される。好ましい実施形態において、インターフェロンアルブミン融合タンパク質と組み合わせて投与され得るリバビリンまたはリバビリンアナログとしては、COPEGUS（登録商標）（Hoffman-La Roche, Nutley, N. J.）、REBETOL（登録商標）（Schering Corp., Kenilworth, N. J.）、VIRAZOLE（登録商標）（Valeant, Costa Mesa, CA）、RIBAVIN（商標）（Lupin, Baltimore, MD）、RIBAZID（商標）（Epla, Karachi, Pakistan）、トリバビリン、VIRAMIDINE（商標）（Valeant, Costa Mesa, CA）、およびRIBASPHERE（商標）（Three Rivers Pharmaceuticals, Cranberry Township, PA）が挙げられる。さらに好ましい実施形態において、インターフェロンアルファアルブミン融合タンパク質は、リバビリンまたはリバビリンアナログと組み合わせて投与される。さらに好ましい実施形態において、インターフェロンアルファ2aアルブミン融合タンパク質は、リバビリンまたはリバビリンアナログと組み合わせて投与される。さらに好ましい実施形態において、インターフェロンアルファ2bアルブミン融合タンパク質は、リバビリンまたはリバビリンアナログと組み合わせて投与される。さらに好ましい実施形態において、インターフェロンベータアルブミン融合タンパク質は、リバビリンまたはリバビリンアナログと組み合わせて投与される。さらに好ましい実施形態において、ハイブリッドインターフェロンアルブミン融合タンパク質は、リバビリンまたはリバビリンアナログと組み合わせて投与される。

【0545】

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、ウイルス感染の処置のために、単独または1つ以上の抗ウイルス剤と組み合わせて投与され得る。好ましい実施形態において、本発明のインターフェロンアルブミン融合タンパク質は、1つ以上の抗ウイルス剤と組み合わせて投与され得る。さらなる好ましい実施形態において、ウイルス感染は、肝炎ウイルスの感染から生じる。最も好ましい実施形態において、肝炎ウイルスは、C型肝炎ウイルス（HCV）である。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る抗ウイルス剤としては、ウイルス酵素の小分子阻害剤、RNAポリメラーゼの小分子阻害剤、核酸ベースの抗ウイルス剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤、チアゾライド（thiazolidine）、新免疫調節剤、およびインターフェロンエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得る抗ウイルス酵素阻害剤としては、VX-950（プロテアーゼ阻害剤、Vertex, Cambridge, MA）、VX-497（メリメポディブ（merimepodib）、経口IMPDH阻害剤、Vertex, Cambridge, MA）、BILB 1941（プロテアーゼ阻害剤、Boehringer Ingelheim, Germany）、SCH7（プロテアーゼ阻害剤、Schering Corp., Kenilworth, N. J.）、MX-3253（グルコシダーゼ阻害剤、Migenix, Vancouver, BC）、IDN-6556（カスパーゼ阻害剤、Pfizer, New York, NY）、UT231B（グルコシダーゼ阻害剤、United Therapeutics, Silver Spring, MD）、R1626（ウイルスプロテアーゼ阻害剤、F. Hoffman-La Roche, Switzerland）、ITMN-B（ITMN-191、プロテアーゼ阻害剤、InterMune, Brisbane, CA）、セルゴシビル（Celgosivir）（MBI-3253、 α -グルコシダーゼ阻害剤、Migenix, Inc., Vancouver, B. C.）、SCH 503034（プロテアーゼ阻害剤、Schering Corp., Kenilworth, N. J.）、ACH 806（GS9132、経口プロテアーゼ阻害剤、Achillion, New Haven, CT/Gilead Sciences, Foster City, CA）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得る抗ウイルスポリメラーゼ阻害剤は、ヌクレオシドアナログまたは非ヌクレオシド阻害剤（NNI）であり得る。好ましい実施形態において、抗ウイルスポリメラーゼ阻害剤は、HCV RNAポリメラーゼを阻害する。一実施形態において、抗ウイルスポリメラーゼ阻害剤は、NM283（2'-C-メチルシチジンの経口プロドラッグ、Idenix, Cambridge, MA）および2'-C-メチルヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されないヌクレオシドアナログであり得る。別の実施形態において、抗ウイルスポリメラーゼ阻害剤は、JTK-103、JTK-003、およびJTK-109（Japan Tobacco, Tokyo, Japan）、R803（Rigel, South San Francisco, CA）、HCV-371、HCV-086、およびHCV-796（ViroPharm, Exton, PA/Wyeth, Madison, NJ）、およびXTL-2125（BC2125、XTLbio, New York, NY）が挙げられるが、これらに限定されない非ヌクレオシド阻害剤であり得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得る抗ウイルス核酸ベースの薬剤としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、およびsiRNAまたは短鎖ヘアピン型RNA（shRNA）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得る抗ウイルスアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤としては、NEUGENE（登録商標）AVI-4065（AVI Biopharma, Portland, OR）が挙げられるが、これに限定されない。別の実施形態において、チアゾライド（thiazolidine）は、本発明のアルブミン融合タンパク

10

20

30

40

50

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得る。好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得るチアゾライド (thiazolidine) は、ALINIA (登録商標) (ニタゾキサニド、Romark Laboratories, L. C., Tampa, FL) が挙げられるが、これに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得る抗ウイルス免疫調節剤としては、ZADIXIN (登録商標) (サイモシナルファ1、サイマルアシン (thymalfasin)、SciClone Pharmaceuticals Int'l, Hong Kong)、ならびにANA245 (TLR-7アゴニスト、Anadys Pharmaceuticals, San Diego, CA)、ANA975 (ANA245の経口プロドラッグ、Anadys Pharmaceuticals, San Diego, CA)、およびCPG-10101 (ACTILON (商標)、TLR-9アゴニスト、Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA) が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得るインターフェロンエンハンサーとしては、EMZ702 (Transition Therapeutics, Toronto, Ontario) が挙げられるが、これに限定されない。さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得る抗ウイルス抗体としては、Tarvacin (腫瘍内皮細胞の表面上にホスファチジルセリンを標的化するヒト化モノクローナル抗体、Peregrine Pharmaceuticals, Inc., Tustin, CA) が挙げられるが、これに限定されない。

【0546】

好ましい実施形態において、単独または本発明により包含される1つ以上の抗ウイルス剤と組み合わせて投与され得るアルブミン融合タンパク質は、インターフェロンアルブミン融合タンパク質である。さらなる実施形態において、インターフェロンアルブミン融合タンパク質のインターフェロン部分は、インターフェロンアルファである。本発明により包含されるインターフェロンアルファの非限定的な例としては、表1の治療用タンパク質の列に開示されるインターフェロンアルファタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、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-n1、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商業的に入手可能な形態、例えば、INTRON (登録商標) A (Schering Corp., Kenilworth, N. J.)、ROFERON (登録商標) A (Hoffman-La Roche, Nutley, N. J.)、Beroformアルファインターフェロン (Boehringer Ingelheim Pharmaceutical, Inc., Ridgefield, Conn.)、OMNIFERON (商標) (Viragen, Inc., Plantation, FL)、MULTIFERON (商標) (Viragen, Inc., Plantation, FL)、WELLFERON (登録商標) (GlaxoSmithKline, London, Great Britain)、INFERGEN (登録商標) (Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA)、SUMIFERON (登録商標) (Sumitomo, Japan)、BELEROFON (登録商標) (Nautilus Biotech, France)、MAXY-ALPHA (商標) (Maxygen, Redwood City, CA/Hoffman-La Roche, Nutley, N. J.)、または任意の精製インターフェロンアルファ産物もしくはそのフラグメントからなる、または代替として、それらを含む。さらなる実施形態において、IFN-アルファ-HSA融合タンパク質のインターフェロンアルファ部分は、持続放出、または制御放出に対して修飾された、または処方されたインターフェロンアルファからなる、または代替として、それらを含む。例えば

、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- α XL (Flamel Technologies, France) および LOCTERON (商標) (BioLex Therapeutics/OctoPlus, Pittsboro, NC) が挙げられるが、これらに限定されない、商業的に入手可能である持続放出、または制御放出インターフェロンアルファからなる、または代替として、それらを含む。さらなる実施形態において、IFN- α HSA 融合タンパク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。したがって、さらなる実施形態において、IFN- α HSA 融合タンパク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、または代替として、それらを含み、商業的に入手可能であ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 (商標) (Viragen, Inc., Plantation, FL) またはそのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。さらなる好ましい実施形態において、アルブミン融合タンパク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 または 2b インターフェロンであり、インターフェロンアルブミン融合タンパク質は、これらの薬剤と組み合わせ投与され得る。さらに、別の実施形態において、インターフェロンアルブミン融合タンパク質のインターフェロンアルファ部分は、インターフェロンベータまたはインターフェロンハイブリッドである。さらなる実施形態において、インターフェロンアルブミン融合タンパク質の非融合インターフェロン部分は、単独または本発明により包含される 1 つ以上の抗ウイルス剤と組み合わせ使用され得る。

【0547】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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投与され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと組み合わせ投与され得る抗日和見感染剤としては、TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE (商標)、ダブソン (商標)、PENTAMIDINE (商標)、ATOVAQUONE (商標)、ISONIAZID (商標)、RIFAMPIN (商標)、PYRAZINAMIDE (商標)、ETHAMBUTOL (商標)、RIFABUTIN (商標)、CLARITHROMYCIN (商標)、AZITHROMYCIN (商標)、GANCICLOVIR (商標)、FOSCARNET (商標)、CIDOFOVIR (商標)、FLUCONAZOLE (商標)、ITRACONAZOLE (商標)、ケトコナゾール (商標)、ACYCLOVIR (商標)、FAMCICLOVIR (商標)、PYRIMETHAMINE (商標)、ロイコボリン (商標)、NEUPOGEN (商標) (フィルグラスチム/G-CSF)、および LEUKINE (商標) (サルグラスチム/GM-CSF) が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、日和見ニューモシスチスカリニ (Pneumocystis carinii) 肺炎感染を予防的処置または予防するために、TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE (商標)、ダブソン (商標)、PENTAMIDINE (商標)、および／または ATOVAQUONE (登録商標) と任意に組み合わせ用いられる。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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 (商標)、RIFABUTIN (商標)、PYRAZINAMIDE TM (商標)、および／または ETHAMBUTOL (商標) と任意に組み合わせ用いられる。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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 (商標)、CLARITHRO

MYCIN（商標）、および／またはAZITHROMYCIN（商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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（商標）、FOSCARNET（商標）、および／またはCIDOFOVIR（商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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（商標）、ITRACONAZOLE（商標）、および／またはケトコナゾール（商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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（商標）および／またはFAMCICLOVIR（商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、日和見トキソプラズマ原虫（*Toxoplasma gondii*）感染を予防的処置または予防するために、PYRIMETHAMINE（商標）および／またはロイコボリン（商標）と任意に組み合わせて用いられる。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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（商標）および／またはNEUPOGEN（商標）と任意に組み合わせて用いられる。

10

【0548】

20

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、抗生物質製剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る抗生物質製剤は、アモキシシリン、ベータラクタマーゼ、アミノグリコシド、ベータラクタム（グリコペプチド）、ベータラクタマーゼ、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アメトキサゾール、およびバンコマイシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0549】

30

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る免疫賦活剤としては、レバミゾール（例えば、ERGAMISOL（商標））、イソプリノシン（例えば、INOSIPLEX（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）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0550】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る免疫抑制剤は、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-デオキシスベルグアリン、およびT細胞に应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が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る他の免疫抑制剤は、プレドニゾン、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（商標））、ブレキナル、デオキシスベルグアリン、およびアザスピラン（SKF105685）、ORTHOCLONEOKT（登録商標）3（ムロモナブ-CD3）、SANDIMMUNE（商標）、NEORAL（商標）、SANGDYA（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）（

40

50

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（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、DELTA SONE（商標）（プレドニゾン）およびHYDELTRASOL（商標）（プレドニゾロン））、FLEX（商標）およびMEXATE（商標）（メトトレキサート）、OXSORALEN-ULTRA（商標）（メトトレキサレン）ならびにRAPAMUNETM（シロリムス（sirolimus））が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、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使用され得る。

【0551】

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、単独または1つ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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る静脈内免疫グロブリン調製物は、GAMMAR（商標）、IVEEGAM（商標）、SANDOGLOBULIN（商標）、GAMMAGARDS/D（商標）、ATGAM（商標）（抗胸腺細胞グロブリン）、およびGAMIMUNE（商標）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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。

【0552】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、癌の治療のために、患者に生体内、あるいは細胞に体外のいずれかにおいて、単独で、または組み合わせ治療の一部として投与される。特定の実施形態において、アルブミン融合タンパク質、特に、IL-2-アルブミン融合は、Dudleyら（Science Express, 19 September 2002, www.scienceexpress.orgにて、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）において記載されるように、転移性メラノーマのための養子細胞移植療法等の、癌のための受動的免疫療法の間、繰り返し投与される。

【0553】

ある実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る抗炎症剤としては、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、ピラズロン、サリチル酸誘導体、チアジンカルボキサミド、 ϵ -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、およびテニダップが挙げられるが、これらに限定されない。

【0554】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、単独または血管新生阻害剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物と共に投与され得る血管新生阻害剤としては、アンジオスタチン（Entremed, Rockville, MD）、トロボニン-1（Bost

10

20

30

40

50

onLife 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ー1の組織阻害剤、メタロプロテイナーゼー2の組織阻害剤、VEGI、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤ー1、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤ー2、および様々な形態の軽い「d族」遷移金属が挙げられるが、これらに限定されない。

【0555】

軽い「d族」遷移金属としては、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antalの種が挙げられる。このような遷移金属種は、遷移金属錯体を形成し得る。上記の遷移金属種の好適な錯体としては、オキソ遷移金属錯体が挙げられる。

10

【0556】

バナジウム錯体の代表的な例としては、例えば、バナジン酸塩およびバナジル錯体等のオキソバナジウム錯体が挙げられる。好適なバナジン酸塩錯体としては、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等のメタバナジン酸塩およびオルトバナジン酸塩錯体が挙げられる。好適なバナジル錯体としては、例えば、バナジルアセチルアセトナート、ならびに硫酸バナジルーおよび三水和物等の硫酸バナジル水和物を含む硫酸バナジルが挙げられる。

【0557】

タングステンおよびモリブデン錯体の代表的な例としてはまた、オキソ錯体が挙げられる。好適なオキソタングステン錯体としては、タングステン酸および酸化タングステン錯体が挙げられる。好適なタングステン酸錯体としては、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が挙げられる。適切な酸化タングステンとしては、酸化タングステン(IV)および酸化タングステン(VI)が挙げられる。好適なオキソモリブデン錯体としては、モリブデン酸錯体、モリブデンオキシド錯体、およびモリブデニル錯体が挙げられる。好適なモリブデン酸錯体としては、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が挙げられる。好適な酸化モリブデンとしては、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が挙げられる。好適なモリブデニル錯体としては、例えば、モリブデニルアセチルアセトネートが挙げられる。他の好適なタングステン錯体およびモリブデン錯体としては、例えば、グリセロール、酒石酸、および糖由来のヒドロキソ誘導体が挙げられる。

20

30

【0558】

広範な種々の他の抗脈管形成因子もまた、本発明の文脈において利用され得る。代表的な例としては、血小板因子4；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体(ズワイガニの殻から調製)、(Murata et al., Canver 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、エストロゲン等の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増強される)；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、アルファージピリジル、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 et al., J. Bio. Chem. 267:17321-17326, (1992))；キモスタチン(Tomkinson et al., 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 et al., Nature 348:555-557, (1990))；金チオリンゴ酸ナトリウム(「GST」；Matsubara and 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(H

40

50

olmes et al., J. Biol. Chem. 262 (4) : 1659-1664, (1987)) ; ビサントレン (National Cancer Institute) ; ロベンザリット二ナトリウム (N-(2)-カルボキシフェニル-4-クロロアントロニル酸二ナトリウムまたは「CCA」 ; (Takeuchi et al., Agents Actions 36 : 312-316, (1992)) ; およびBB94等のメタロプロテインナーゼ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0559】

本発明の文脈において利用され得るさらなる抗血管新生因子としては、サリドマイド、(Celgene, Warren, NJ) ; アンジオスタティックスステロイド ; AGM-1470 (H. Brem and J. Folkman J. 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 et al., 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) ; CGP-41251 (PKC412) ; CM101 ; デクスラゾキササン (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。

【0560】

本発明の化合物と組み合わせて投与され得る血管新生阻害剤は、様々な機序を通じて作用し得、これらの機序としては、細胞外マトリックスのタンパク質分解の阻害、増殖因子等の血管新生誘導因子の機能を拮抗することによる内皮細胞-細胞外マトリックス接着分子の機能のブロック、および増殖性内皮細胞において発現されるインテグリン受容体の阻害が挙げられるが、これらに限定されない。細胞外マトリックスタンパク質分解を妨害し、そして本発明の組成物と組み合わせて投与され得る血管新生阻害剤の例としては、AG-3340 (Agouron, LaJolla, CA)、BAY-12-9566 (Bayer, West Haven, CT)、BMS-275291 (Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ)、CGS-27032A (Novartis, East Hanover, NJ)、Marimastat (British Biotech, Oxford, UK)、およびMetastat (Aeterna, St-Foy, Quebec) が挙げられるが、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クすることにより作用し、そして本発明の組成物と組み合わせて投与され得る抗血管新生阻害剤の例としては、EMD-121974 (Merck KgaA Darmstadt, Germany) およびVitaxin (Ixsys, LaJolla, CA/Medimmune, Gaithersburg, MD) が挙げられるが、これらに限定されない。血管新生誘導因子と直接拮抗するか、またはこの誘導因子を阻害することにより作用し、そして本発明の組成物と組み合わせて投与され得る血管新生阻害剤の例としては、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/PharmaciaUpjohn, Brid

10

20

30

40

50

gewater, NJ)、およびSU-6668 (Sugen)が挙げられるが、これらに限定されない。他の血管新生阻害剤は、血管新生を間接的に阻害するように作用する。本発明の組成物と組み合わせて投与され得る血管新生の間接的阻害剤の例としては、IM-862 (Cytran, Kirkland, WA)、インターフェロン- α 、IL-12 (Roche, Nutley, NJ)、およびペントサンボリスルフェート (Georgetown University, Washington, DC)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0561】

特定の実施形態において、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、本明細書に記載の自己免疫疾患）の処置、予防、および／または改善のために企図される。

10

【0562】

特定の実施形態において、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、関節炎の処置、予防、および／または改善のために企図される。さらに特定の実施形態において、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／または改善のために企図される。

【0563】

別の実施形態において、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、血管新生タンパク質または血管新生タンパク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。本発明の組成物と共に投与され得る血管新生タンパク質の例としては、酸性および塩基性の線維芽細胞増殖因子、VEGF-1、VEGF-2、VEGF-3、上皮増殖因子アルファおよびベータ、血小板由来内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、腫瘍壊死因子アルファ、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、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、ならびに一酸化窒素シンターゼが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0564】

さらなる実施形態において、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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る化学治療剤としては、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、シクロホスファミド、シクロホスファミドイホスファミド (Ifosfamide)、メルファラン (L-サルコリシン)、およびクロランブシル)、エチレンイミン類およびメチルメラミン類（例えば、ヘキサメチルメラミンおよびチオテパ）、アルキルスルホネート類（例えば、ブスルファン）、ニトロソウレア類（例えば、カルムスチン (BCNU)、ロムスチン (CCNU)、セムスチン (メチル-CCNU)、およびストレプトゾシン (ストレプトゾチン (streptozotocin))、トリアゼン類（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、メトトレキサート (アメトプテリン))、ピリミジンアナログ（例えば、フルオロウラシル (5-フルオロウラシル; 5-FU)、フロクスウリジン (Flouxuridine) (フルオロデオキシウリジン; FudR)、およびシタラビン (シトシンアラビノシド))、プリンアナログおよび関連阻害剤（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 (deoxycofomycin))、ビンカアルカロイド類（例えば、ビンブラスチン (VLB、硫酸ビンブラスチン))およびビンクリスチン (硫酸ビンクリスチン))、エポドフィロトキシン（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)、ドキシルビシン、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）、生物学的応答改変剤（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 (cis-DDP) およびカルボプラチン)、アントラセンジ

30

40

50

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、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、および酢酸メゲストロール）、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ピオネート（Testosterone propionate）、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）、性腺刺激ホルモン放出ホルモンアナログ（例えば、ロイプロリド）、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、エストラムスチン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、クロロトリアニセン、およびテストラクトン）、ならびにその他（例えば、ジカルバジン、グルタミン酸、およびミトタン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0565】

一実施形態において、本発明の組成物は、1つ以上の以下の薬剤：インフリキシマブ（Remicade（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 RousselからのArava（商標）としても知られている）、Kinere（商標）（Amgen, Inc. からのAnakinaとしても知られている）IL-1受容体アンタゴニスト）と組み合わせて投与される。

【0566】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、CHOP（シクロホスファミド、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、またはCHOPの1つ以上の成分との組み合わせで投与される。一実施形態において、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。別の実施形態において、本発明の組成物は、抗CD20抗体およびCHOPと組み合わせて、または抗CD20抗体とCHOPの1つ以上の成分（特に、シクロホスファミドおよび／またはプレドニゾン）との任意の組み合わせで投与される。特定の実施形態において、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。さらなる実施形態において、本発明の組成物は、リツキシマブおよびCHOPと共に、またはリツキシマブとCHOPの1つ以上の成分（特に、シクロホスファミドおよび／またはプレドニゾン）との任意の組み合わせと共に投与される。特定の実施形態において、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。さらなる実施形態において、本発明の組成物は、トシツモマブおよびCHOPと共に、またはトシツモマブとCHOPの1つ以上の成分（特に、シクロホスファミドおよび／またはプレドニゾン）との任意の組み合わせと共に投与される。抗CD20抗体は、必要に応じて、放射性同位元素、毒素または細胞毒性プロドラッグと会合し得る。

【0567】

別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、Zevalin（商標）との組み合わせで投与される。さらなる実施形態において、本発明の組成物は、Zevalin（商標）およびCHOPと共に、またはZevalin（商標）とCHOPの1つ以上の成分（特に、シクロホスファミドおよび／またはプレドニゾン）との任意の組み合わせと共に投与される。Zevalin（商標）は、1つ以上の放射性同位元素と会合し得る。特に好ましい同位体は、90Yおよび111Inである。

【0568】

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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タンパク質および／またはポリヌクレオチドとともに投与され得るサイトカインとしては、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL10、IL12、IL13、IL15、抗CD40、CD40L、IFN-ガンマおよびTNF-アルファが挙げられるが、

10

20

30

40

50

これらに限定されない。別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、任意のインターロイキン（IL-1アルファ、IL-1ベータ、IL-2、IL-3、IL-4、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が挙げられるが、これらに限定されない）と共に投与され得る。

【0569】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得るTNF、TNFに関連するまたはTNFに類似する分子としては、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（国際公開第WO96/14328号）、AIM-1（国際公開第WO97/33899号）、エンドカイン-アルファ（国際公開第WO98/07880号）、OPG、およびニューロカイン-アルファ（国際公開第WO98/18921号、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4-1BB、TR2（国際公開第WO96/34095号）、DR3（国際公開第WO97/33904号）、DR4（国際公開第WO98/32856号）、TR5（国際公開第WO98/30693号）、TRANK、TR9（国際公開第WO98/56892号）、TR10（国際公開第WO98/54202号）、312C2（国際公開第WO98/06842号）、およびTR12の可溶性形態、ならびにCD154、CD70、およびCD153の可溶性形態が挙げられるが、これらに限定されない。

【0570】

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、血管新生タンパク質と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る血管新生タンパク質としては、欧州特許出願第399816号に開示されるような神経膠腫誘導増殖因子（Glioma Derived Growth Factor）（GDGF）；欧州特許出願第682110号に開示されるような血小板誘導増殖因子-A（PDGF-A）；欧州特許出願第282317号に開示されるような血小板誘導増殖因子-B（PDGF-B）；国際公開第WO92/06194号に開示されるような胎盤増殖因子（PlGF）；Hauser et al., Growth Factors, 4:259-268（1993）に開示されるような胎盤増殖因子-2（PlGF-2）；国際公開第WO90/13649号に開示されるような血管内皮増殖因子（VEGF）；欧州特許出願第506477号に開示されるような血管内皮増殖因子-A（VEGF-A）；国際公開第WO96/39515号に開示されるような血管内皮増殖因子-2（VEGF-2）；血管内皮増殖因子-B（VEGF-3）；国際公開第WO96/26736号に開示されるような血管内皮増殖因子B-186（VEGF-B186）；国際公開第WO98/02543号に開示されるような血管内皮増殖因子-D（VEGF-D）；国際公開第WO98/07832号に開示されるような血管内皮増殖因子-D（VEGF-D）；およびドイツ国特許第DE19639601号に開示されるような血管内皮増殖因子-E（VEGF-E）が挙げられるが、これらに限定されない。上記の参考文献は、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0571】

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る線維芽成長因子は、FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FG

F-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、およびFGF-15が挙げられるが、これらに限定されない。

【0572】

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、造血増殖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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る造血増殖因子としては、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）（サルグラモスチン（sargramostim）、LEUKINE（商標）、PROKINE（商標））、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）（フィルグラスチン（filgrastim）、NEUPOGEN（商標））、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF、CSF-1）エリトロポイエチン（エポエチンアルファ、EPOGEN（商標）、PROCRIT（商標））、幹細胞因子（SCF、c-kitリガンド、スチール因子（steel factor））、巨核球コロニー刺激因子、PIXY321（GMCSF／IL-3融合タンパク質）、インターロイキン（特に、IL-1～IL-12のうちの任意の1つ以上）、インターフェロンガンマ、またはトロンボポエチン（thrombopoietin）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0573】

ある実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、アドレナリン作動遮断薬（例えば、アセプトロール、アテノロール、ベタキソロール、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。

20

【0574】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、抗不整脈薬（例えば、アデノシン、アミドアロン（amidoarone）、ブレチリウム、ジギタリス、ジゴキシン、ジギトキシン、ジリアゼン（diliazem）、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（moricizine）、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。

30

【0575】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、利尿薬（例えば、カルボニックアンヒドラーゼ阻害剤（例えば、アセタゾラミド、ジクロルフェナミド、およびメタゾラアミド）、浸透圧性利尿薬（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⁻シンポートを阻害する利尿薬（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）、チアジドおよびチアジド様利尿薬（例えば、ベンドロフルメチアジド、ベンズチアジド、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチクロチアジド、ポリチアジド、トリコルメチアジド（trichormethiazide）、クロルタリドン、インダパミド、メトラゾン、およびキネサゾン（quinethazone））、カリウム保持性利尿薬（例えば、アミロライドおよびトリウムテレン）、ならびに鉍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、およびカンレノ酸カリウム）と組み合わせて投与される。

40

【0576】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、内分泌物および／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。内分泌物および／またはホルモン不均衡障害のための処置としては、127I、ヨウ素の放射性同位元素（例えば、131Iおよび123I）；組換え成長ホルモン（例えば、HUMATROPE（商標）（組換えソマトロピン）；成長ホルモンアナログ（例え

50

ば、PROTROPIN（商標）（ソマトレム）；ドーパミンアゴニスト（例えば、PARLODEL（商標）（プロモクリプチン）；ソマトスタチンアナログ（例えば、SANDOSTATIN（商標）（オクトレオチド）；ゴナドトロピン調製物（例えば、PREGNYL（商標）、A. P. L.（商標）およびPROFASI（商標）（絨毛性ゴナドトロピン（CG））、PERGONAL（商標）（メノトロピン）、およびMETRODIN（商標）（尿性卵胞性刺激ホルモン（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（商標）およびLUTREPULSE（商標）（塩酸ゴナドレリン）；合成ゴナドトロピンアゴニスト（例えば、LUPRON（商標）（酢酸ロイプロリド）、SUPPRELIN（商標）（酢酸ヒストレリン（histrelin acetate））、SYNAREL（商標）（酢酸ナファレリン）、およびZOLADEX（商標）（酢酸ゴセレリン）；甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンの合成調製物（例えば、RELEFACT TRH（商標）およびTHYPINONE（商標）（プロチレリン）；組換えヒトTSH（例えば、THYROGEN（商標））；甲状腺ホルモンの天然異性体のナトリウム塩の合成調製物（例えば、L-T4（商標）、SYNTHROID（商標）およびLEVOTHROID（商標）（レボチロキシナトリウム）、L-T3（商標）、CYTOMEL（商標）、およびTRIOSTAT（商標）（リオチロインナトリウム（liothyroine sodium））、およびTHYROLAR（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TAPAZOLE（商標）（メチマゾール）、NEO-MERCIAZOLE（商標）（カルビマゾール）；ベータアドレナリン作動性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マロール）；Ca²⁺チャネル遮断薬；デキサメタゾンおよびヨウ素化放射線造影剤（例えば、TELEPAQUE（商標）（ヨーパン酸（iopanoic acid））およびORAGRAFIN（商標）（イボダートナトリウム（sodium ipodate））が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0577】

内分泌物および／またはホルモン不均衡障害のさらなる処置としては、エストロゲンまたは結合型エストロゲン（例えば、ESTRACE（商標）（エストラジオール）、ESTINYL（商標）（エチニルエストラジオール）、PREMARIN（商標）、ESTRATAB（商標）、ORTHO-EST（商標）、OGEN（商標）およびエストロピベート（estropipate）（エストロン）、ESTROVIS（商標）（キネストロール）、ESTRADERM（商標）（エストラジオール）、DELESTROGEN（商標）およびVALERGEN（商標）（吉草酸エストラジオール）、DEPO-ESTRADIOL CYPIONATE（商標）およびESTROJECT LA（商標）（サイピオン酸（cypionate）エストラジオール））；抗エストロゲン（例えば、NOLVADEX（商標）（タモキシフェン）、SEROPHENE（商標）およびCLOMID（商標）（クロミフェン）；プロゲスチン（例えば、DURALUTIN（商標）（カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン）、MPA（商標）およびDEPO-PROVERA（商標）（酢酸メドロキシプロゲステロン）、PROVERA（商標）およびCYCRIN（商標）（MPA）、MEGACE（商標）（酢酸メゲストロール）、NORLUTIN（商標）（ノルエチンドロン）、ならびにNORLUTATE（商標）およびAYGESTIN（商標）（酢酸ノルエチンドロン））；プロゲステロンインプラント（例えば、NORPLANT SYSTEM（商標）（ノルゲストレルの皮下移植体））；抗黄体ホルモン（例えば、RU486（商標）（ミフェプリストン）；ホルモン性避妊薬（例えば、ENOVID（商標）（ノルエチノドレル+メストラノール）、PROGESTASERT（商標）（プロゲステロンを放出する子宮内デバイス）、LOESTRIN（商標）、BREVICON（商標）、MODICON（商標）、GENORA（商標）、NELONA（商標）、NORINYL（商標）、OVACON-35（商標）およびOVACON-50（商標）（エチニルエストラジオール／ノルエチンドロン）、LEVLEN（商標）、NORDETTE（商標）、TRI-LEVEN（商標）およびT

RIPHASIL-21 (商標) (エチニルエストラジオール／レボノルゲストレル (Levonorgestrel) LO/OVRAL (商標) および OVRAL (商標) (エチニルエストラジオール／ノルゲストレル)、DEMULEN (商標) (エチニルエストラジオール／二酢酸エチノジオール)、NORINYL (商標)、ORTHO-NOVUM (商標)、NORETHIN (商標)、GENORA (商標)、および NELOVA (商標) (ノルエチンドロン／メストラノール)、DESOGEN (商標) および ORTHO-CEPT (商標) (エチニルエストラジオール／デスゲストレル)、ORTHO-CYCLEN (商標) および ORTHO-TRICYCLEN (商標) (エチニルエストラジオール／ノルゲスチメート (norgestimate))、MICRONOR (商標) および NOR-QD (商標) (ノルエチンドロン)、ならびに OVRETTE (商標) (ノルゲストレル) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0578】

内分泌物および／またはホルモン不均衡障害のためのさらなる処置としては、テストステロンエステル類 (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; 非経口および経口アンドロゲン (例えば、TESTOJECT-50 (商標) (テストステロン)、TESTEX (商標) (プロピオン酸テストステロン)、DELA TESTRYL (商標) (テストステロンエナンタート)、DEPO-TESTOSTERONE (商標) (サイピオン酸テストステロン)、DANOCRINE (商標) (ダナゾール)、HALOTESTIN (商標) (フルオキシメステロン)、ORETON METHYL (商標) (メチルテストステロン)、TESTRED (商標) および VIRILON (商標) (メチルテストステロン)、および OXANDRIN (商標) (オキサンドロロン (oxandrolone)); テストステロン経皮系 (例えば、TESTODERM (商標)); アンドロゲン受容体アンタゴニストおよび 5-α-アルファーレダクターゼ阻害剤 (例えば、ANDROCUR (商標) (酢酸シプロテロン)、EULEXIN (商標) (フルタミド)、および PROSCAR (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 (商標) (コシントロピン); 副腎皮質ステロイドおよびその合成アナログ (例えば、ACLOVATE (商標) (ジプロピオン酸アルクロメタゾン)、CYCLOCORT (商標) (アムシノニド)、BECLOVENT (商標) および VANCERIL (商標) (ジプロピオン酸ベクロメタゾン)、CELESTONE (商標) (ベタメタゾン)、BENISONE (商標) および UTICORT (商標) (安息香酸ベタメタゾン)、DIPROSONE (商標) (ジプロピオン酸ベタメタゾン)、CELESTONE PHOSPHATE (商標) (ベタメタゾンリン酸ナトリウム)、CELESTONE SOLUSPAN (商標) (ベタメタゾンリン酸ナトリウムおよび酢酸塩)、BETAVAL (商標) および VALISONE (商標) (吉草酸ベタメタゾン)、TEMOVATE (商標) (プロピオン酸クロベタゾール)、CLODERM (商標) (ピバル酸クロコルトロン)、CORTEF (商標) および HYDROCORTONE (商標) (コルチゾール (ヒドロコルチゾン))、HYDROCORTONE ACETATE (商標) (酢酸コルチゾール (ヒドロコルチゾン))、LOCOID (商標) (酪酸コルチゾール (ヒドロコルチゾン))、HYDROCORTONE PHOSPHATE (商標) (コルチゾール (ヒドロコルチゾン) リン酸ナトリウム)、A-HYDROCORT (商標) および SOLU CORTEF (商標) (コルチゾール (ヒドロコルチゾン) コハク酸ナトリウム)、WESTCORT (商標) (吉草酸コルチゾール (ヒドロコルチゾン))、CORTISONE ACETATE (商標) (酢酸コルチゾン)、DESOWEN (商標) および TRIDESILON (商標) (デソニド)、TOPICORT (商標) (デソキシメタゾン)、DECADRON (商標) (デキサメタゾン)、DECADRON LA (商標) (酢酸デキサメタゾン)、DECADRON PHOSPHATE (商標) および HEXADROL PHOSPHATE (商標) (デキサメタゾンリン酸ナトリウム)、FLORONE (商標) および MAXIFLOR (商標) (ジ酢酸ジフロラゾン)、FLORINEF ACETATE (商標) (酢酸フルドロコルチゾン)、AEROBID (商標) および NASALIDE (商標) (フルニソリド)、FLUONID (商標) お

20

30

40

50

よびSYNALAR（商標）（フルオシノロンアセトニド）、LIDEX（商標）（フルオシノニド）、FLUOR-OP（商標）およびFML（商標）（フルオロメトロン）、CORDRAN（商標）（フルランドレノリド）、HALOG（商標）（ハルシノニド）、HMS LIZUIFILM（商標）（メドリゾン）、MEDROL（商標）（メチルプレドニゾロン）、DEPO-MEDROL（商標）およびMEDROL ACETATE（商標）（酢酸メチルプレドニゾン）、A-METHAPRED（商標）およびSOLUMEDROL（商標）（メチルプレドニゾロンコハク酸ナトリウム）、ELOCON（商標）（フランカルボン酸モメタゾン（memotasone furoate））、HALDRONE（商標）（酢酸パラメタゾン）、DELTA-CORTEF（商標）（プレドニゾロン）、ECONOPRED（商標）（酢酸プレドニゾロン）、HYDELTRA SOL（商標）（プレドニゾロンリン酸ナトリウム）、HYDELTRA-T. B. A（商標）（プレドニゾロンテブテート（prednisolone tebutate））、DELTASONE（商標）（プレドニゾン）、ARISTOCORT（商標）およびKENACORT（商標）（トリアムシノロン（triamcinolone））、KENALOG（商標）（トリアムシノロンアセトニド）、ARISTOCORT（商標）およびKENACORT DIACETATE（商標）（トリアムシノロンジアセテート）、ならびにARISTOSPAN（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（商標）（アミノグルテチミド）、NIZORAL（商標）（ケトコナゾール）、MODRASTANE（商標）（トリロスタン）、およびMETOPIRONE（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（商標）およびNOVOLIN（商標））；経口血糖降下剤（例えば、ORAMIDE（商標）およびORINASE（商標）（トルブタミド）、DIABINESE（商標）（クロルプロバミド）、TOLAMIDE（商標）およびTOLINASE（商標）（トラザミド）、DYMELOR（商標）（アセトヘキサミド）、グリベンクラミド、MICRONASE（商標）、DIBETA（商標）およびGLYNASE（商標）（グリブリド）、GLUCOTROL（商標）（グリピジド）、およびDIAMICRON（商標）（グリクラジド）、GLUCOPHAGE（商標）（メトホルミン）、シグリタゾン、ピオグリタゾン、およびアルファー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（商標）（オクトレオチド））；ならびにジアゾキシド（例えば、PROGLYCEM（商標）（ジアゾキシド））が挙げられるが、これらに限定されない。

【0579】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、子宮運動性障害のための処置と共に投与される。子宮運動障害のための処置としては、エストロゲン薬剤、例えば、共役エストロゲン（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）（ノレチドロロンアセテート）、PROMETRIUM（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、共役エストロゲン／メドロキシプロゲステロン（例えば、PREMPRO（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（商標））が挙げられるが、これらに限定されない。

【0580】

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／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物と組み合わせて投与され、それには、硫酸第一鉄（硫酸鉄、FEOSOL（商標））、フマル酸第一鉄（例えば、FEOSTAT（商標））、グルコン酸第一鉄（例えば、FERGON（商標

))、多糖-鉄錯体(例えば、N I F E R E X (商標))、鉄デキストランの注入(例えば、I N F E D (商標))、硫酸第二銅、ピロキシジン、リボフラビン、ビタミンB12、シアンコバラミン注入(例えば、R E D I S O L (商標)、R U B R A M I N P C (商標))、ヒドロキシコバラミン、葉酸(例えば、F O L V I T E (登録商標))、ロイコボリン(ホリン酸、5-CH₂OH-4-Pt e G l u、シトロボルム因子)またはW E L L C O V O R I N (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が挙げられるが、これらに限定されない。

【0581】

ある実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドは、精神医学的障害を処置するために使用される薬剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドと共に投与され得る精神医学的薬物としては、抗精神病薬(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)、抗躁薬(例えば、カルバマゼピン、ジバルブロックスナトリウム(d i v a l p r o e x s o d i u m)、炭酸リチウム、およびクエン酸リチウム)、抗うつ剤(例えば、アミトリプチリン、アモキサピン、ブプロピオン(b u p r o p i o n)、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、ミルタザピン、ネファゾドン、ノルトリプチリン、パロキセチン、フェネルジン、プロトリプチリン、セルトラリン、トラニルシプロミン、トラゾドン、トリミプラミン、およびベンラファキシン)、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、クロラゼブ酸、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)、ならびに興奮剤(例えば、d-アンフェタミン、メチルフェニデート、およびペモリン)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0582】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドは、神経学的障害を処置するために使用される薬剤と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドと共に投与され得る神経剤としては、抗てんかん剤(例えば、カルバマゼピン、クロナゼパム、エトスクシミド、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、ジバルブロックスナトリウム、フェルバメート、ガバペンチン、ラモトリジン、レベチラセタム、オクスカルバゼピン、チアガビン(t i a g a b i n e)、トピラマート、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、セレジリン、アマンチジン(a m a n t i d i n e)、プロモクリプチン、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(t o l c a p o n e))、ならびにA L S治療剤(例えば、リルゾール(r i l u z o l e))が挙げられるが、これらに限定されない。

【0583】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および/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遮断薬と組み合わせて投与される。本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドと共に投与され得る血管拡張剤としては、アンギオテンシン変換酵素阻害薬(A C E)阻害剤(例えば、ババベリン、イソクスブリン、ベナゼプリル、カプトプリル、シラザプリル、エナラプリル、エナラプリラート、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)ならびに硝酸塩(例えば、イソソルビドジニトレート、イソソルビジドモノニトレート、およびニトログリセリン)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のアルブミン融合タンパク質および/またはポリヌクレオチドと組み合わせて投与され得るカルシウムチ

チャンネル遮断薬の例としては、アムロジピン、ベプリジル、フェロジピン、フルナリジン、イスラジピン、ニカルジピン、ニモジピン、およびベラパミルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0584】

ある実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、胃腸障害に対する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タンパク質および／またはポリヌクレオチドと共に投与され得る胃腸障害の処置剤としては、H₂ヒスタミン受容体アンタゴニスト（例えば、TAGAMET（商標）（シメチジン）、ZANTAC（商標）（ラニチジン）、PEPCID（商標）（ファモチジン）、およびAXID（商標）（ニザチジン））；H⁺、K⁺ATPase（例えば、PREVACID（商標）（ランソプラゾール））およびPRILOSEC（商標）（オメプラゾール））；ビスマス化合物（例えば、PEPTO-BISMOL（商標）（ビスマスサブサリシレート）およびDE-NOL（商標）（ビスマスサブシトレート））；種々の制酸剤；スクラルフェート；プロスタグランジンアナログ（例えば、CYTOTEC（商標）（ミソプロストール））；ムスカリンコリンアンタゴニスト；緩下剤（例えば、表面緩下剤、刺激緩下剤、生理食塩水および浸透性緩下剤）；抗下痢剤（例えば、LOMOTIL（商標）（ジフェノキシレート）、MOTOFEN（商標）（ジフェノキシシン）、およびIMODIUM（商標）（ロペルアミド塩化水素））、ソマトスタチンの合成アナログ（例えば、SANDOSTATIN（商標）（オクトレオチド）、抗嘔吐剤（例えば、ZOFIRAN（商標）（オンダンセトロン）、KYTRIL（商標）（グラニセトロン塩化水素））、トロピセトロン、ドラセトロン、メトクロプラミド、クロロプロマジン、ペルフェナジン、プロクロペラジン、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、メチルプレドニソロン、ドロナビノール、およびナビロン）；D₂アンタゴニスト（メトクロプラミド、トリメトベンザミド、およびクロロプロマジン）；胆汁塩；ケノデオキシコリン酸；ウルソデオキシコリン酸；および膵臓酵素調製物（例えば、膵臓および膵臓リパーゼ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0585】

さらなる実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、他の治療レジメンまたは予防レジメン（例えば、放射線治療）と組み合わせて投与される。

【0586】

本発明はまた、医薬組成物（本発明のアルブミン融合タンパク質を含む）の1つ以上の成分が充填された1つ以上の容器を含む医薬パックまたはキットも提供する。このような容器には、医薬または生物学的製剤の製造、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付属することができ、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任意に示すものである。

【0587】

遺伝子治療

本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする構築物は、遺伝子治療プロトコルの一部として使用され得、アルブミン融合タンパク質の治療有効投与量を送達し得る。細胞への核酸を生体内導入するための好ましいアプローチは、核酸を含み、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするウイルスベクターの使用による。ウイルスベクターを用いた細胞の感染は、標的細胞の大部分が、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、ウイルスベクター内にコードされる分子（例えば、ウイルスベクター内に含まれたcDNAとして）は、ウイルスベクターの核酸を取り込んだ細胞内で効果的に発現される。

【0588】

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、アルブミン融合タンパク質を生体内でコードする外因性核酸分子の輸送のための組換え遺伝子送達系として使用

され得る。これらのベクターは、細胞内への有効な核酸の送達を提供し、輸送された核酸は、宿主の染色体DNAに安定して組み込まれる。複製欠損レトロウイルスのみを産生する特殊化した細胞株（「パッケージ細胞」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が増大されており、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（総説については、例えば、Miller, A. D. (1990) Blood 76:271を参照のこと）。複製欠損レトロウイルスは、標準技術により、ヘルパーウイルスの使用を介して、標的細胞を感染させるために使用され得るビリオンに閉じ込められ得る。組換えレトロウイルスを産生するための、およびこのようなウイルスを用いて体外でまたは生体内にて細胞を感染させるためのプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al, (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。

【0589】

本発明において有用な別のウイルス遺伝子送達系は、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、その結果、関心対象となる遺伝子産物をコードし、かつ発現するが、正常の溶解性ウイルスのライフサイクルにおいて複製する能力の観点では、不活性化させることができる。例えば、Berkner et al, BioTechniques 6:616 (1988)、Rosenfeld et al, Science 252:431-434 (1991)、およびRosenfeld et al, Cell 68:143-155 (1992)を参照のこと。アデノウイルス株Ad型5d1324または他のアデノウイルスの株（例えば、Ad2、Ad3、Ad7等）に由来する好適なアデノウイルスベクターは、当業者に周知である。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、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 et al, (1992)）。さらに、ウイルス粒子は、精製および濃縮に対して比較的安定しており、かつ修正可能であり、上記のように、感染性のスペクトラムに影響するように、改変され得る。加えて、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取り込まれないが、エピソームに残り、それにより、導入されたDNAが宿主ゲノム（例えば、レトロウイルスDNA）中に取り込まれる場合に挿入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、他の遺伝子送達系に比べて大きい（最高8キロ塩基）（Berkner et al., 上記引用、Haj-Ahmand et al, J. Virol. 57:267 (1986)）。

【0590】

別の実施形態において、本発明の非ウイルス遺伝子送達系は、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。この型の例示的な遺伝子送達系としては、リポソーム由来系、ポリリジン結合体、および人工ウイルスエンベロープが挙げられる。代表的な実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする核酸分子は、表面上に陽電荷を保有するリポソーム（例えば、リポフェクチン）中にトラップされ得、（所望により、）標的組織の細胞表面抗原に対し、抗体でタグが付けられる（Mizuno et al. (1992) No Shinkei Geka 20:547-551、PCT公開第WO91/06309号；日本国特許出願第1047381号；および欧州特許公開第A-43075号）。

【0591】

本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする遺伝子の遺伝子送達系は、任意の多数の方法により、患者に導入され得る。例えば、遺伝子送達系の医薬調製物を、全身に（例えば、静脈内注射により）導入することができ、標的細胞へのタンパク質の特異的形質導入は、遺伝子送達ビヒクル、受容体遺伝子の発現を調節する転写制御配列による、細胞型

または組織型発現、あるいはそれらの組み合わせによる提供されるトランスフェクションの特異性から主に生じる。他の実施形態において、組換え遺伝子の初期送達は、確実に局在する動物に導入することにより、さらに制限される。例えば、遺伝子送達ビヒクルは、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 et al. (1994) PNAS 91:3054-3057）により導入され得る。遺伝子治療構築物の医薬調製物は、本質的に、許容される希釈剤中の遺伝子送達系からなり得、または遺伝子送達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。アルブミン融合タンパク質が組換え細胞、例えば、レトロウイルスベクターから無傷で生産できる場合、医薬調製物は、アルブミン融合タンパク質を産生する1つ以上の細胞を含むことができる。

10

【0592】

さらなる遺伝子治療法

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法も、本発明により包含される。遺伝子治療法は、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タンパク質の発現を達成することに関する。この方法は、標的組織による融合タンパク質の発現のために必要なプロモーターおよび他の任意の遺伝因子と、作動可能に連結した本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを必要とする。このような遺伝子治療および送達技法は、当該技術分野で知られており、例えば、国際公開第WO90/11092号を参照のこと、参照することにより本明細書に組み込まれる。

20

【0593】

したがって、例えば、患者由来の細胞は、生体外で本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結したプロモーターを含むポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）を用いて遺伝子操作され得、次いで、操作された細胞は、本発明の融合タンパク質を用いて処置される患者に提供される。このような方法は、当該技術分野で公知である。例えば、Belldegrun, A., et al., J. Natl. Cancer Inst. 85:207-216 (1993)、Ferrantini, M. et al., Cancer Research 53:1107-1112 (1993)、Ferrantini, M. et al., J. Immunology 153:4604-4615 (1994)、Kaido, T., et al., Int. J. Cancer 60:221-229 (1995)、Ogura, H., et al., Cancer Research 50:5102-5106 (1990)、Santodonato, L., et al., Human Gene Therapy 7:1-10 (1996)、Santodonato, L., et al., Gene Therapy 4:1246-1255 (1997)、およびZhang, J. F. et al., Cancer Gene Therapy 3:31-38 (1996))を参照のこと、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。一実施形態において、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得る。

30

【0594】

以下により詳細に論じられるように、ポリヌクレオチド構築物は、注射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、肝臓等）の間質腔への注射）により送達され得る。ポリヌクレオチド構築物は、医薬的に許容される液体または水性の担体中で送達され得る。

40

【0595】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク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。「裸の」ポリヌクレオチド、DNA、またはRNAという用語は、ウイルス配列、ウイルス粒子、リボソーム製剤、リポフェクシン、または沈殿剤等を含む、細胞への侵入を補助し、促進し、または容易にするように作用する任意の送達ビヒクルのない配列を指す。しかしながら、本発明のア

50

ルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、当業者に周知の方法により調製され得るリポソーム製剤中およびリポフェクチン製剤中等で送達され得る。このような方法は、例えば、米国特許第 5, 593, 972号、同第5, 589, 466号、および同第5, 580, 859号において記載され、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0596】

好ましくは、遺伝子治療法において用いられるポリヌクレオチドベクター構築物は、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構築物である。適切なベクターとしては、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、およびpSG;Pharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVL；ならびにInvitrogenから入手可能なpEF1/V5、pcDNA3.1、およびpRc/CMV2が挙げられる。他の好適なベクターは、当業者に容易に明らかである。

【0597】

当業者に周知の任意の強力なプロモーターは、ポリヌクレオチド配列の発現を駆動するために用いられ得る。好適なプロモーターとしては、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）；呼吸器合胞体ウイルス（RSV）プロモーター；誘導性プロモーター（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；ApoA I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LTR；b-アクトニンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。プロモーターはまた、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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り得る。

【0598】

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を提供し得ることが示されている。

【0599】

ポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（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）の間質腔に送達され得る。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、ムコ多糖マトリックス、ある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。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間質腔への送達は、以下で論じられる理由のために好ましい。それらは、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達され得る。好ましくは、それらは、分化した持続性の非分裂細胞中に送達され、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等の非分化または完全には分化していない細胞において達成され得る。生体内での筋肉細胞は、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、特に適格である。

【0600】

裸の核酸配列注射について、DNAまたはRNAの有効投薬量は、約0.05mg/体重kgから約50mg/体重kgの範囲にある。好ましくは、用量は、約0.005mg/kgから約20mg/kgであり、より好ましくは、約0.05mg/kgから約5mg/kgである。もちろん、当業者が認識するように、この用量は、注射の組織部位に応じて変化する。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得る。

【0601】

好ましい投与経路は、組織の間質腔への非経口注射経路による。しかしながら、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に、肺または気管支の組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル製剤の吸入が挙げられる。加えて、裸のDNA構築物が、血管形成術の間に、この手順において用いられるカテーテルにより動脈に送達され得る。

【0602】

裸のポリヌクレオチドとしては、送達部位での直接の針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、およびいわゆる「遺伝子銃」が挙げられるが、これらに限定されない、当該技術分野で周知の任意の方法により送達される。これらの送達方法は、当該技術分野

10

【0603】

構築物はまた、ウイルス配列、ウイルス粒子、リボソーム製剤、リボフェクチン、沈殿剤等の送達ビヒクルを用いて送達され得る。送達のこのような方法は、当該技術分野で周知である。

【0604】

ある実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、リボソーム調製物中で複合体化している。本発明で用いるリボソーム調製物は、カチオン性（正に荷電した）、アニオン性（負に荷電した）、および中性の調製物を含む。しかしながら、カチオン性リボソームとポリアニオン性核酸との間で強固な荷電複合体を形成し得るので、カチオン性リボソームが特に好ましい。カチオン性リボソームは、機能的形態において、プラスミドDNA（Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413~7416、参照することにより、本明細書に組み込まれる）、mRNA（Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:6077~6081、参照することにより、本明細書に組み込まれる）、および精製された転写因子（Debs et al., J. Biol. Chem. (1990) 265:10189~10192、参照することにより、本明細書に組み込まれる）の細胞内送達を媒介することが示されている。

20

【0605】

カチオン性リボ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）リボソームは特に有用であり、Lipofectinの商標で、GIBCO BRL, Grand Island, N. Y. から（Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416も参照のこと。参照することにより本明細書に組み込まれる）から入手可能である。他の市販されているリボソームは、トランスフェクターズ（DDAB/DOPE）およびDOTAP/DOPE（Boehringer）を含む。

30

【0606】

他のカチオン性リボソームは、当該技術分野で公知の技法を用いて、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）リボソームの合成の説明については、PCT公開第WO90/11092号（参照することにより、本明細書に組み込まれる）を参照のこと。DOTMAリボソームの調製は、文献にて説明されており、例えば、P. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417を参照のこと、参照することにより本明細書に組み込まれる。類似した方法を使用して、他のカチオン性脂質物質よりリボソームを調製し得る。

40

【0607】

同様に、アニオン性リボソームおよび中性リボソームは、例えば、Avanti Polar Lipids（Birmingham, Ala.）から容易に入手可能であり、または容易に入手可能な物質を使用して容易に調製され得る。このような物質としては、と

50

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 (DOP E) が挙げられる。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てリボソームを生成する方法は、当該技術分野で公知である。

【0608】

例えば、商業的に、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 (DOP E) を様々な組み合わせにおいて使用し、コレステロールを添加しても添加しなくても、従来のリボソームを生成し得る。したがって、例えば、超音波処理バイアル中への窒素ガス流下で、各50mgのDOPGおよびDOPCを乾燥することにより、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晚置き、次の日に脱イオン水で水和する。その後、槽を15℃で循環させながら、最大設定にて、逆転カップ (槽タイプ) プローブを装備したHeat Systemsモデル350ソニケーターを用いて、試料を、栓をしたバイアル中で2時間超音波処理する。代替として、負に荷電した小胞を、超音波処理なしで調製して多重膜小胞を産生し得るか、または核孔膜を通して押し出すことにより別々の大きさの単膜小胞を産生し得る。他の方法は、当業者に知られており、利用可能である。

【0609】

リボソームとしては、多重膜小胞 (MLV)、小さな単膜小胞 (SUV)、または大きな単膜小胞 (LUV) が挙げられ得、SUVが好ましい。当該技術分野で周知の方法を使用して、様々なリボソーム-核酸複合体が調製される。例えば、Straubinger et al., *Methods of Immunology* (1983)、101: 512-527を参照のこと、参照することにより、本明細書に組み込まれる。例えば、核酸を含有するMLVは、ガラス管の壁面にリン脂質の薄膜を付着させ、その後、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調製され得る。SUVは、MLVの延長された超音波処理により調製され、単膜リボソームの均質集団を産生する。封入されるべき物質を、予め形成されたMLVの懸濁液に添加し、次いで、超音波処理する。カチオン性脂質を含むリボソームを使用する場合、乾燥した脂質薄膜を、滅菌水または10 mM Tris/NaCl等の等張性緩衝溶液のような適切な溶液中に再懸濁し、超音波処理し、次いで、予め形成されたリボソームをDNAと直接混合する。リボソームおよびDNAは、正荷電リボ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。SUVは、小核酸フラグメントを用いる用途を見出す。LUVは、当該技術分野で公知の多数の方法により調製される。一般に使用される方法としては、Ca²⁺-EDTAキレート化 (Papahadjopoulos et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1975) 394:483、Wilson et al., *Cell* 17:77 (1979)) ; エーテル注入 (Deamer, D. and Bangham, A., *Biochim. Biophys. Acta* 443:629 (1976)、Ostro et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76:836 (1977)、Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3348 (1979)) ; 界面活性剤透析 (Enoch, H. and Strittmatter, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:145 (1979)) ; および逆相エバポレーション (REV) (Fraley et al., *J. Biol. Chem.* 255:10431 (1980)、Szoka, F. and Papahadjopoulos, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:145 (1978)、Schaefer-Ridder et al., *Science* 215:166 (1982)) が挙げられ、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【0610】

概して、リポソームに対するDNAの割合は、約10：1から約1：10までである。好ましくは、その割合（ratio）は、約5：1から約1：5までである。より好ましくは、その割合は、約3：1から約1：3までである。さらにより好ましくは、その割合は、約1：1である。

【0611】

米国特許第5,676,954号（参照することにより、本明細書に組み込まれる）は、カチオン性リポソーム担体と複合体化された遺伝物質のマウスへの注入について報告する。米国特許第4,897,355号、同第4,946,787号、同第5,049,386号、同第5,459,127号、同第5,589,466号、同第5,693,622号、同第5,580,859号、同第5,703,055号、および国際公開第WO94/9469号（参照することにより、本明細書に組み込まれる）は、DNAを細胞および哺乳動物に形質移入するために用いるカチオン性脂質を提供する。米国特許第5,589,466号、同第5,693,622号、同第5,580,859号、同第5,703,055号、および国際公開第WO94/9469号（参照することにより、本明細書に組み込まれる）は、DNA-カチオン性脂質複合体を哺乳動物に送達する方法を提供する。

【0612】

ある実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク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、生体外または生体内で細胞を操作する。レトロウイルスプラスミドベクターが由来し得るレトロウイルスとしては、モロニーマウス白血病毒、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、ニワトリ白血病毒、テナガザル白血病毒、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0613】

レトロウイルスプラスミドベクターを採用して、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。形質移入され得るパッケージング細胞株の例としては、Miller、Human Gene Therapy、1：5-14（1990）において記載される（参照することにより、本明細書に組み込まれる）ようなPE501、PA317、R-2、R-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、RCRE、RCRIP、GP+E-86、GP+envAm12、およびDAN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは、当該技術分野で周知の任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入し得る。このような手段としては、エレクトロポレーション、リポソームの使用、およびCaPO4沈殿が挙げられるが、これらに限定されない。1つの代替法において、レトロウイルスプラスミドベクターを、リポソームにカプセル化し得るか、または脂質に結合し得て、次いで宿主に投与し得る。

【0614】

プロデューサー細胞株は、本発明のアルブミン融合タンパク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。このようなレトロウイルスベクター粒子を採用して、体外で、あるいは生体内のいずれかにおいて、真核細胞を形質導入し得る。形質導入された真核細胞は、本発明の融合タンパク質を発現し得る。

【0615】

ある他の実施形態において、アデノウイルスベクター中に含有されるポリヌクレオチドを用いて、生体外、あるいは生体内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タンパク質をコードおよび発現すると同時に、正常な溶菌性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遺伝子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達成され、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、優れた安全性プロファイルを有する腸溶性生ワクチンとして長年使用されている（Schwartz et al. 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. et al. (1991) Science 252: 431-434、Rosenfeld et al., (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確立しようとする広範な研究は、一様に否定的であった (Green, M. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6606)。

【0616】

本発明において有用である好適なアデノウイルスベクターが、例えば、Kozarsky and Wilson, Curr. Opin. Genet. Devel. 3: 499-503 (1993)、Rosenfeld et al., Cell 68: 143-155 (1992)、Engelhardt et al., Human Genet. Ther. 4: 759-769 (1993)、Yang et al., Nature Genet. 7: 362-369 (1994)、Wilson et al., Nature 365: 691-692 (1993)、および米国特許第5, 652, 224号において記載されており、参照することにより、本明細書に組み込まれる。例えば、アデノウイルスベクターAd2が有用であり、ヒト293細胞にて増殖され得る。これらの細胞は、アデノウイルスのE1領域を含有し、構成的にE1aおよびE1bを発現し、このことは、このベクターから欠失している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、他の多様なアデノウイルス (例えば、Ad3、Ad5、およびAd7) もまた、本発明において有用である。

【0617】

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、複製欠損性である。複製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。得られたウイルスは、細胞に感染する能力があり、プロモーターに作動可能に連結された関心対象となるポリヌクレオチドを発現し得るが、ほとんどの細胞において複製し得ない。複製欠損アデノウイルスは、次の遺伝子: E1a、E1b、E3、E4、E2a、またはL1～L5のすべてまたは一部のうちの1つ以上において欠失され得る。

【0618】

ある他の実施形態において、アデノ関連ウイルス (AAV) を用いて、生体外、あるいは生体内において細胞を操作する。AAVは、感染性粒子を産生するためにヘルパーウイルスを必要とする、自然に存在する欠損ウイルスである (Muzyczka, N., Curr. Topics in Microbiol. Immunol. 158: 97 (1992))。それはまた、非分裂細胞の中にそのDNAを組み込み得る数少ないウイルスの中の1つである。わずか300塩基対のAAVを含有するベクターがパッケージされ得、組み込み得るが、外来性DNAのためのスペースは、約4.5 kbに限られる。このようなAAVの生成および使用方法は、当該技術分野で周知である。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。

【0619】

例えば、本発明で用いる適切な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すべての配列を含む。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 et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989) に見出されるものを用いて、AAVベクター中に挿入される。その後、組換えAAVベクターを、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等を含む任意の標準的な技法を用いて、ヘルパーウイルスに感染するパッケージング細胞中に形質移入する。適切なヘルパーウイルスとしては、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が挙げられる。パッケージング細胞が形質移入および感染されると、それらは、その

ポリヌクレオチド構築物を含有する感染性A A Vウイルス粒子を産生する。その後、生体外あるいは生体内のいずれかで、これらのウイルス粒子を使用して真核生物細胞を形質導入する。形質導入細胞は、そのゲノムに組み込まれたポリヌクレオチド構築物を含有し、本発明の融合タンパク質を発現する。

【0620】

遺伝子治療の別の方法は、相同組換え（例えば、米国特許第5,641,670号、1997年6月24日発行；国際公開第WO96/29411号、1996年9月26日公開；国際公開第WO94/12650号、1994年8月4日公開；K o l l e r e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 86:8932-8935 (1989)；およびZ i j l s t r a e t a l . , N a t u r e 342:435-438 (1989)を参照のこと）を介して、異種制御領域および内在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している配列）を作動可能に連結することを含む。この方法は、標的細胞中に存在しているが、通常はその細胞中で発現しないか、または所望するよりも低いレベルで発現する、遺伝子の活性化を含む。

【0621】

当該技術分野で周知の標準的技法を用いて、プロモーターに隣接する標的化配列を有するプロモーターを含む、ポリヌクレオチド構築物を作製する。好適なプロモーターは、本明細書に記載される。標的化配列は、内因性配列とプロモーター標的化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。標的化配列は、所望される内在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、それゆえ、相同組換えに際して、そのプロモーターは、その内在性配列に作動可能に連結される。

【0622】

プロモーターおよび標的化配列は、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'末端および3'末端に別の制限酵素部位を含有する。好ましくは、第1の標的化配列の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有し、第2の標的化配列の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有する。増幅されたプロモーターおよび標的化配列を消化し、共に連結する。

【0623】

プロモーター標的化配列構築物は、裸のポリヌクレオチドとしてか、もしくは上記に詳細に記載されるようなリボソーム、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、沈殿剤等のトランスフェクション促進剤と共に組み合わせのいずれかにより、細胞に送達される。Pプロモーター標的化配列は、直接針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、粒子加速器等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。

【0624】

プロモーター標的化配列構築物は、細胞により取り込まれる。この構築物と内在性配列との間に相同組換えが起こり、その結果、内因性配列は、このプロモーターの制御下に置かれる。その後、プロモーターは内因性配列の発現を駆動する。

【0625】

本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、タンパク質の分泌を促進する分泌シグナル配列を含み得る。典型的に、シグナル配列は、コード領域の5'末端に向かってかまたは5'末端で発現される、そのポリヌクレオチドのコード領域に位置する。シグナル配列は、関心対象となるポリヌクレオチドに対して同種であってもよいし、または異種であってもよく、形質移入される細胞に対して同種であってもよいし、または異種であってもよい。さらに、当該技術分野で周知の方法を用いて、このシグナル配列は、化学合成され得る。

【0626】

その投与形態によって、治療効果を与えるために十分な量において1つ以上の分子が発現される限り、上記のポリヌクレオチド構築物のうちのいずれかの任意の投与形態が使用

され得る。これは、直接針注射、全身性注射、カテーテル注入、バイオリスティック (biolistic) 注射器、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 (depot)、他の市販のデポー (depot) 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 (錠剤または丸剤) 医薬製剤、および手術中のデカンティング (decanting) または局所適用を含む。例えば、ラット肝臓およびラット脾臓へのリン酸カルシウム沈澱した裸のプラスミドの直接注射、または門脈へのタンパク質被覆プラスミドの直接注射は、ラット肝臓における外来遺伝子の遺伝子発現をもたらした (Kaneda et al., Science, 243: 375 (1989))。

【0627】

局所投与の好ましい方法は、直接注射によるものである。好ましくは、送達ビヒクルと複合体化させた本発明のアルブミン融合タンパク質は、動脈領域内部に直接注射により投与されるか、または動脈領域内部に局所投与される。動脈領域内部での組成物の局所投与とは、その組成物を動脈内に数センチメートル、好ましくは数ミリメートルで注射することを指す。

【0628】

局所投与の別の方法は、本発明のポリヌクレオチド構築物を外科的創傷中または外科的創傷の周囲に接触させることである。例えば、患者は手術を受け、そしてポリヌクレオチド構築物をその創傷の内側の組織の表面上にコーティングするか、またはこの構築物をその創傷の内側の組織の領域に注入することができる。

【0629】

全身投与に有用な治療組成物は、本発明の標的化された送達ビヒクルと複合体化させた本発明の融合タンパク質を含む。全身投与で使用するために好適な送達ビヒクルは、特定部位に対してそのビヒクルを標的化するためのリガンドを含むリボソームを含む。特定の実施形態において、全身投与で使用するために好適な送達ビヒクルは、特定の部位に対してそのビヒクルを標的化するための本発明のアルブミン融合タンパク質を含むリボソームを含む。

【0630】

全身投与の好ましい方法としては、静脈内注射、エアロゾル、経口および経皮 (局所的) 送達が挙げられる。当該技術分野で標準的な方法を用いて、静脈内注射が実行され得る。当該技術分野で標準的な方法を用いて、エアロゾル送達もまた実行され得る (例えば、Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189: 11277-11281, 1992 を参照のこと、参照することにより本明細書に組み込まれる)。動物の腸内の消化酵素による分解に耐える能力をもつ担体に対して本発明のポリヌクレオチド構築物を複合体化させることにより、経口送達は実行され得る。このような担体の例としては、当該技術分野で周知のもの等のような、プラスチックカプセルまたは錠剤が挙げられる。局所的送達は、皮膚内へ通過可能な親油性試薬 (例えば、DMSO) と本発明のポリヌクレオチド構築物を混合することにより実行され得る。

【0631】

送達される物質の有効量の決定は、例えば、その物質の化学構造および生物学的活性、動物の年齢および体重、処置を必要とする正確な状態およびその重症度、ならびに投与経路を含む、多数の因子に依存し得る。処置の頻度は、例えば、1 用量あたり投与されるポリヌクレオチド構築物の量ならびに対象の健康および病歴のような、多数の因子に依存する。正確な量、投薬回数、および投薬のタイミングは、担当の医師または獣医により決定され得る。

【0632】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、任意の動物、好ましくは哺乳類および鳥類に投与され得る。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。

【0633】

生物学的活性

本発明のアルブミン融合タンパク質および／またはアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、1つ以上の生物学的活性を試験するアッセイにおいて使用され得る。アルブミン融合タンパク質および／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した場合、その融合タンパク質に対応する治療用タンパク質が、その生物学的活性に関連する疾患に関与している可能性がある。したがって、融合タンパク質を用いて、関連疾患を処置することができよう。

【0634】

好ましい実施形態において、本発明は、表1の「好適な適応症Y」の列に挙げた疾患または障害の処置方法を包含し、該方法は、このような処置、予防、または改善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」の列に挙げた処置すべき疾患または障害と同じ行にある）表1の「治療用タンパク質X」の列に開示された治療用タンパク質に対応する治療用タンパク質部分を含む本発明のアルブミン融合タンパク質を投与することを含む。

10

【0635】

さらに好ましい実施形態において、本発明は、表1の「好適な適応症Y」の列の特定の治療用タンパク質に挙げた疾患または障害の処置方法を包含し、該方法は、このような処置、予防、または改善が所望される患者に、実施例の適応症に関連する、治療用タンパク質に対応する治療用タンパク質部分を含む本発明のアルブミン融合タンパク質を、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。

20

【0636】

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タンパク質が、本発明により特に企図される。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タンパク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工程は、表2の列4および／または11に明確に列挙されるシグナル配列を欠損しているタンパク質を生じる。列挙されたシグナル配列の特定のアミノ酸配列は、本明細書中に示されているか、当該技術分野で公知である。したがって、本発明の最も好ましい実施形態は、細胞により産生されるアルブミン融合タンパク質（表2の列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。また、表2の列4および／または11に列挙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も最も好ましい。これらの2つの好ましい実施態様を含む組成物（医薬組成物を含む）もまた好ましい。これらのアルブミン融合タンパク質は、表1の「好適な適応症Y」の列において特定の治療用タンパク質について列挙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、特に企図される。

30

【0637】

好ましい実施形態において、本発明の融合タンパク質は、内分泌系（例えば、以下の「内分泌性障害」の項を参照のこと）、神経系（例えば、以下の「神経障害」の項を参照のこと）、免疫系（例えば、以下の「免疫活性」の項を参照のこと）、呼吸器系（例えば、以下の「呼吸器疾患」の項を参照のこと）、心血管系（例えば、以下の「心血管疾患」の項を参照のこと）、生殖器系（例えば、以下の「生殖器系障害」の項を参照のこと）、消化器系（例えば、以下の「胃腸障害」の項を参照のこと）、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」の項を参照のこと）、ならびに／あるい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」の項を参照のこと）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、予後診断、予防、および／または処置において使用され得る。

40

【0638】

ある実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、本発明の融合タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する遺伝子が発現する組織に関連する疾患および／または障害の診断および／または予後診断するために使用され得る。

【0639】

50

したがって、本発明の融合タンパク質および本発明のアルブミン融合タンパク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、および細胞遊走が挙げられるが、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。

【0640】

より一般的には、本発明の融合タンパク質および本発明のアルブミン融合タンパク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、予後診断、予防、および／または治療において有用であり得る。

【0641】

免疫活性

本発明のアルブミン融合タンパク質および本発明のアルブミン融合タンパク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、分化もしくは動員（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／または状態を処置、予防、診断および／または予後診断において有用であり得る。免疫細胞は、造血と呼ばれる過程を通して発達し、多能性幹細胞から骨髄性（血小板、赤血球、好中球、およびマクロファージ）およびリンパ系（Bリンパ球およびTリンパ球）細胞を生成する。これらの免疫疾患、障害、および／または状態の病因は、遺伝的、身体的（somatic）（例えば、癌およびいくつかの自己免疫性障害）、後天的（例えば、化学療法もしくは毒素による）、または感染的であり得る。さらに、本発明の融合タンパク質および本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、特定の免疫系の疾患または障害のマーカーまたは検出物質（detector）として使用され得る。

【0642】

別の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、免疫系の疾患および障害を処置するため、ならびに／あるいは本発明のポリペプチドが発現される組織に関連する細胞により生じた免疫応答を阻害または亢進するために使用され得る。

【0643】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、免疫不全（先天性または後天性の免疫不全症の両方を含む）の処置、予防、診断、および／または予後診断において有用であり得る。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細胞免疫不全の例としては、X連鎖性無ガンマグロブリン血症（ブルートン病）、X連鎖性乳児無ガンマグロブリン血症、過剰IgMを伴うX連鎖性免疫不全、過剰IgMを伴う非X連鎖性免疫不全、X連鎖性リンパ球増殖症候群（XLP）、先天性および後天性無ガンマグロブリン血症、成人発症型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、異常ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症、不特定（unspecified）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欠損症、選択的IgA欠損症、選択的IgGサブクラス欠損症、IgGサブクラス欠損症（IgA欠損症を伴うまたは伴わない）、IgM増大を伴うIg欠損症、IgM増大を伴うIgGおよびIgA欠損症、正常または増加Igを伴う抗体欠損症、Ig重鎖欠失、カップ鎖欠損症、B細胞リンパ球増殖障害（BLPD）、分類不能型免疫不全（CVID）、分類不能型免疫不全（CVI）（後天性）、および一過性乳児低ガンマグロブリン血症が挙げられるが、これらに限定されない。

【0644】

特定の実施形態において、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が、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断される。

【0645】

T細胞および／またはB細胞の機能および／または数が減少している先天性の免疫不全

の例としては、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損症、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）欠損症、クラスII MHC欠損症（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が挙げられるが、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、22q11.2欠損、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ナチュラルキラー細胞欠損症（NK）、特発性CD4+Tリンパ球減少症、主要T細胞欠損（不特定）を伴う免疫不全、および細胞媒介免疫の不特定免疫不全が挙げられるが、これらに限定されない。

【0646】

特定の実施形態において、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が、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断される。

10

【0647】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断され得る、他の免疫不全としては、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損症、白血球グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損症、X連鎖リンパ球増殖症候群（XLP）、白血球接着欠損症、補体成分欠損症（C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8および／またはC9欠損症を含む）、網様发育不全、胸腺リンパ形成不全、胸腺腫を伴う发育不全、重篤な先天性白血球減少症、免疫不全症を伴う異形成症、新生児好中球減少症、短肢小人症、およびIgを伴うネゼロフ症候群複合型免疫不全が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0648】

好ましい実施形態において、免疫不全および／または上記した免疫不全に関連する状態は、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断される。

【0649】

好ましい実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、免疫不全の個体において免疫応答性を増進する薬剤として使用され得る。特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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増進する薬剤として使用され得る。

30

【0650】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断において有用であり得る。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。したがって、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タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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治療法であり得る。

40

【0651】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断され得る自己免疫疾患または障害としては、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、ヘーノホーシェンライン紫斑病）、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うちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定

50

されない。

【0652】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドで処置、予防、および／または診断され得る自己免疫成分を有すると考えられるさらなる障害としては、ⅠⅠ型コラーゲン誘導性関節炎、抗リン脂質症候群、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、多発性内分泌腺症、ライター病、スティッフマン症候群、自己免疫肺炎、自閉症、ギランバレー症候群、インスリン依存性糖尿病、および自己免疫炎症性眼障害が挙げられるが、これらに限定されない。

【0653】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドで処置、予防、診断、および／または予後診断され得る自己免疫成分を有すると考えられるさらなる障害としては、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）、混合性結合組織病（多くの場合、例えば、可溶性核抗原（例えば、リボ核タンパク質）に対する抗体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A N A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）、特発性アジソン病（多くの場合、例えば、体液性および細胞媒介性の副腎細胞傷害性により特徴付けられる）、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、基底膜におけるI g Gおよび補体により特徴付けられる）、シューグレン症候群（多くの場合、例えば、多組織抗体および／または特定の非ヒストンA N A（S S-B）により特徴付けられる）、真性糖尿病（多くの場合、例えば、細胞媒介性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物耐性（喘息または嚢胞性線維症を伴うアドレナリン薬物耐性を含む）（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）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0654】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドで処置、予防、診断、および／または予後診断され得る自己免疫成分を有し得るさらなる障害としては、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）、他の内分泌腺不全（例えば、特異的組織抗体に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、血管壁におけるI g および補体ならびに／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（p o s t-M I）（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、I g Eに対するI g GおよびI g M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、I g Eに対するI g GおよびI g M抗体により特徴付けられる）、喘息（多くの場合、例えば、I g Eに対するI g GおよびI g M抗体により特徴付けられる）、ならびに多くの他の炎症性、肉芽腫性、変性および萎縮性障害が挙げられるが、これらに限定されない。

【0655】

好ましい実施形態において、自己免疫疾患および障害ならびに／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、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断される。特定の好ましい実施形態において、関節リウマチが、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。

【0656】

別の特定の好ましい実施形態において、全身性エリテマトーデスが、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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形態において、特発性血小板減少症紫斑が、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。

【0657】

別の特定の好ましい実施形態において、IgAネフロパシーが、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。

10

【0658】

好ましい実施形態において、自己免疫疾患および障害ならびに／または上記した疾患および障害と関連する状態が、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断される。

【0659】

好ましい実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、免疫抑制剤として用いられる。

【0660】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、予後診断、および／または診断において有用であり得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、白血球減少症、好中球減少症、貧血、および血小板減少症が挙げられるが、これらに限定されない、特定の（または多くの）型の造血細胞の減少に関連した疾患、障害、および／または状態を処置または予防する試みにおいて、多能性幹細胞を含む造血細胞の分化および増殖を増加させるために用いられ得る。代替として、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、組織球増殖症が挙げられるが、これらに限定されない、特定の（または多くの）型の造血細胞の減少に関連した疾患、障害、および／または状態を処置または予防する試みにおいて、多能性幹細胞を含む造血細胞の分化および増殖を増加させるために用いられ得る。

20

30

【0661】

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）または他の呼吸障害）もまた、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断され得る。さらに、これらの分子は、アナフィラキシー、抗原性分子に対する過敏性、または血液型不適合を処置、予防、予後診断、および／または診断するために用いられ得る。

【0662】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、IgE媒介アレルギー応答を処置、予防、診断、および／または予後診断するために使用され得る。このようなアレルギー反応としては、喘息、鼻炎、および湿疹が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、体外または生体内においてIgE濃度の調節するために使用され得る。

40

【0663】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、炎症状態の診断、予後診断、予防、および／または処置における用途も有する。例えば、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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

50

化、増殖、および／または分化を阻害し得るので、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。このような炎症状態としては、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、補体媒介性超急性拒絶、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）；胃腸障害（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、外傷性脳損傷、神経変性障害（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；およびプリオン病）；心血管障害（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、状態および障害が挙げられるが、これらに限定されない。

【0664】

炎症は、基礎的な防御機構であるので、炎症性障害は、実質的に、身体の任意の組織に影響を与え得る。したがって、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、副腎炎、肺炎、胆管胆嚢炎、虫垂炎、龟头炎、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、蝸牛炎（cochleitis）、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、および膣炎が挙げられるが、これらに限定されない組織特異的炎症性障害の処置において用いられる。

【0665】

特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、予後診断、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り生じる。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、本発明のポリペプチド、抗体またはポリヌクレオチド、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、器官拒絶反応またはGVHDを予防するために有効な治療法であり得る。特定の実施形態において、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、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、実験的アレルギーおよび超急性異種移植拒絶反応を予防するために有効な治療法であり得る。

【0666】

他の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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が挙げられるが、これらに限定されない免疫複合体疾患を診断、予後診断、予防、および／または処置するために有用である。

【0667】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／もしくはT細胞の増殖活性化ならびに／または分化を増大させることにより、感染症は処置、検出

、ならびに／または予防され得る。免疫応答は、存在する免疫応答を高めるか、あるいは新しい免疫応答を惹起するかのいずれかにより、増大され得る。代替として、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、必ずしも免疫応答を惹起することなく、感染物質（感染物質等を列挙する本明細書の項を参照のこと）を直接阻害し得る。

【0668】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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亢進するためのアジュバントとして用いられる。

10

【0669】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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亢進す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亢進され得る抗ウイルス免疫応答は、ウイルスおよび本明細書に記載される、またはそうでなければ当該技術分野で周知の疾患または徴候に関連するウイルスを含む。特定の実施形態において、本発明の組成物は、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ウイルス、疾患、または徴候に対する免疫応答を亢進するためのアジュバントとして用いられる。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、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ウイルス、疾患、または徴候に対する免疫応答を亢進するためのアジュバントとして用いられる。

20

【0670】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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亢進す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得る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に記載される、またはそうでなければ当該技術分野で周知の疾患または徴候に関連する細菌または真菌を含む。特定の実施形態において、本発明の組成物は、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細菌もしくは真菌、疾患または徴候に対する免疫応答を亢進するためのアジュバントとして用いられる。

30

【0671】

別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、コレラ菌 (*Vibrio 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 (*Neisseria 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もしくは真菌、疾患または徴候に対する免疫応答を亢進するためのアジュバントとして用いられる。

40

【0672】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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亢進す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得る抗寄生虫免疫応答は、寄生虫および本明細書に記載される、またはそうでなければ当該技術分野で周知の疾患または徴候に関連する寄生虫を含む。特定の実施形態

50

において、本発明の組成物は、寄生虫に対する免疫応答を亢進するためのアジュバントとして用いられる。別の特定の実施形態において、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亢進するためのアジュバントとして用いられる。

【0673】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、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、珪肺症、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採用され得る。

【0674】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。

【0675】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、非ヒト霊長類、およびヒト、最も好ましくはヒト）に投与され、免疫系を増進し、1つ以上の抗体（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転換（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。

【0676】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。

【0677】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。

【0678】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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薬剤として用いられる。

【0679】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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薬剤として用いられる。

【0680】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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薬剤として用いられる。

【0681】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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薬剤として用いられる。

【0682】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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増進するための薬剤として用いられる。

【0683】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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得る。特定の実施形態において、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。別の特定の実施形態において、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、最初に投与される。

【0684】

10

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、B細胞機能の後天性欠損を有する個体において免疫応答性を増進するための薬剤として用いられる。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明の融合タンパク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得るB細胞機能の後天性欠損をもたらす状態としては、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）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0685】

20

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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増進するための薬剤として用いられる。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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得る一時的な免疫欠損の状態としては、ウイルス感染（例えば、インフルエンザ）からの回復、栄養不良に関連する状態、感染性単核細胞増加症からの回復、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、ならびに手術からの回復が挙げられるが、これらに限定されない。

【0686】

30

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、体外または生体内において、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、関連する実施形態において、この抗原提示の増強またはアンタゴナイズは、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り得る。

【0687】

40

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、TH1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、個体の免疫系を導く薬剤として用いられる。

【0688】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、腫瘍増殖を誘導し、ひいては、抗新生物剤に対してさらに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、緩慢に細胞分裂する疾患であり、それしたがって、実質的にすべての抗腫瘍性レジメンに対して不応性である。これらの細胞を、より迅速に増殖させた場合、これらの感受性プロファイルは、恐らく変化するであろう。

【0689】

50

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、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等の病理におけるB細胞の産生の刺激因子として用いられる。

【0690】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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治療法として用いられる。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、移植前の骨髓試料の前処置において用いられる。

【0691】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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治療法として用いられる。

【0692】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、レーシュマニア等の単球に影響を及ぼす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方法として用いられる。

【0693】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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方法として用いられる。

【0694】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本明細書に記載の1つ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。

【0695】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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クする方法として用いられる。免疫応答の特定の態様のブロックが所望され得る疾患または状態の例としては、狼瘡等の自己免疫疾患、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／障害が挙げられる。

【0696】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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等の自己免疫疾患に関連するB細胞増殖およびIg分泌を妨げるための治療法として用いられる。

【0697】

別の特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／もしくは本発明の融合タンパク質のアゴニストまたはアンタゴニスト、ならびに／または本発明のアルブミン融合タンパク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、例えば、免疫応答の破壊および敗血症のブロックにおいて有用である。

【0698】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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)、ヴァルデンストレーム疾患、関連する特

10

20

30

40

50

発性単クローン性免疫グロブリン血症、および形質細胞腫等の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治療法として用いられる。

【0699】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、ならびに好中球、好塩基球、Bリンパ球およびいくつかの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等のポリペプチド走化性および活性化を阻害するために採用され得る。自己免疫疾患の例は、本明細書に記載されており、多発性硬化症およびインスリン依存性糖尿病を含む。

10

【0700】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、例えば、好酸球の産生および遊走を妨げることに、特発性好酸球増加症候群を処置するために採用され得る。

【0701】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、補体媒介性細胞溶解を高める、または阻害するために使用される。

【0702】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、抗体依存性細胞性細胞毒性を高める、または阻害するために使用される。

20

【0703】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、例えば、動脈壁における単球浸潤を妨げることに、アテローム性動脈硬化症を処置するために採用され得る。

【0704】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、成人呼吸促進症候群（ARDS）を処置するために採用され得る。

30

【0705】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、創傷および組織の修復の刺激、血管新生の刺激、および／または血管もしくはリンパの疾患もしくは障害の修復の刺激において有用であり得る。さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明の融合タンパク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使用され得る。

【0706】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、原発性もしくは後天性の免疫不全、欠損性の血清免疫グロブリン産生、再発性の感染、および／または免疫系機能不全により特徴付けられる障害を診断、予測、処置、ならびに／または予防するために使用される。さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、関節、骨、皮膚、および／または耳下腺の感染、血液由来の感染（例えば、敗血症、髄膜炎、敗血症性関節炎、および／または骨髄炎）、自己免疫疾患（例えば、本明細書に開示されるような自己免疫疾患）、炎症性障害、および悪性疾患、ならびに／あるいはこれらの感染、疾患および／または悪性疾患に関連する任意の疾患または障害または状態（CVID、他の原発性免疫不全、HIV疾患、CLL、再発性気管支炎、静脈洞炎、中耳炎、結膜炎、肺炎、肝炎、髄膜炎、帯状ヘルペス（例

40

50

えば、重篤な帯状ヘルペス）および／またはニューモシスティスが挙げられるが、これらに限定されない）を処置または予防するために使用され得る。本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにより予防、診断、予後診断、および／または処置され得る他の疾患および傷害としては、H I V感染、H T L V－B L V感染、リンパ球減少、食細胞殺細菌機能不全、血小板減少、ならびにヘモグロビン尿症が挙げられるが、これらに限定されない。

【0707】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、分類不能型免疫不全（「C V I D」；「後天性無ガンマグロブリン血症」および「後天性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使用される。

10

【0708】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、免疫細胞もしくは免疫組織関連癌もしくは新生物を含む癌または新生物を診断、予後診断、予防、および／または処置するために使用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにより、予防、診断、または処置され得る癌または新生物の例としては、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、急性リンパ性白血病（A L L）、慢性リンパ性白血病、プラズマ細胞腫、多発性骨髄腫、バーキットリンパ腫、E B V変換性（E B V－t r a n s f o r m e d）疾患、ならびに／または本明細書の他の箇所で「過増殖性疾患」と題される項に記載される疾患および障害が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0709】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ラージB細胞リンパ腫の細胞増殖を減少するための治療として使用される。

【0710】

別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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I gの関与を減少させる手段として使用される。

30

【0711】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、B細胞免疫不全の個体（例えば、部分的または完全な脾臓摘出術を受けた個体等）の間で免疫応答性を増進するための薬剤として使用される。

【0712】

血液関連障害

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、止血性活性（出血を止めること）または血栓溶解活性（血栓を溶解すること）を調節するために使用され得る。例えば、止血活性または血栓溶解活性を増大させることにより、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、血液凝固の疾患、障害および／または状態（例えば、無線維素原血症、因子欠損症、血友病）、血液血小板の疾患、障害および／または状態（例えば、血小板減少症）、あるいは外傷、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使用され得る。代替として、止血活性または血栓溶解活性を減少させ得る本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、凝固を阻害または溶解するために使用され得る。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重要であり得る。

40

【0713】

50

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、予後診断、および／または処置するために使用され得る。特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、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使用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの10 ための他の使用としては、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装置）における閉塞の予防が挙げられるが、これらに限定されない。

【0714】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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している組織に関連する血液および／または血液形成器官の疾患および障害を予防、診断、予後診断、および／または処置するために使用され得る。

【0715】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、造血活性（血球の形成）を調節するために使用され得る。例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、すべての、またはサブセットの血球（例えば、赤血球、リンパ球（BまたはT細胞）、骨髄性細胞（例えば、好塩基球、好酸球、好中球、肥満細胞、マクロファージ）および血小板等）の量を増大させるために使用され得る。血球もしくは血球のサブセットの量を減少させる能力は、以下に記載される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り得る。代替として、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、すべての、またはサブセットの血球（例えば、赤血球、リンパ球（B細胞またはT細胞）、脊髄細胞（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）の量を減少させるために使用され得る。血球もしくは血球のサブセットの量を減少させる能力は、白血球増加症（例えば、好酸球増加症等）の20 予防、検出、診断、および／または処置において有用であり得る。

【0716】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、血液悪液質を予防、処置、または診断するために使用され得る。

【0717】

貧血は、赤血球の数またはその中のヘモグロビン（酸素を運ぶタンパク質）の量が正常を下回る状態である。貧血は、過度の出血、減少した赤血球細胞産生、または増加した赤血球細胞破壊（溶血）により引き起こされ得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、貧血を処置、予防、および／または診断するために有用であり得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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得る貧血としては、鉄欠乏性貧血、低色素性貧血、小球性貧血、萎黄病、遺伝性鉄芽球性貧血、特発性後天性鉄芽球性貧血、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）および葉酸欠乏性貧血）、再生不良性貧血、溶血性貧血（例えば、自己免疫溶血性貧血、微小血管症性溶血性貧血、および発作性夜間血色素尿症）が挙げられる。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、および脾臓肥大等に関連する貧血が挙げられるが40 50

、これらに限定されない疾患に関連する貧血を処置、予防、および／または診断するために有用であり得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、メチルドパ、ダブソン、および／またはサルファ剤に関連する貧血等の薬物処置から生じる貧血を処置、予防、および／または診断するために有用であり得る。さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、遺伝性球状赤血球、遺伝性楕円赤血球症、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損、および鎌状赤血球貧血が挙げられるが、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を処置、予防、および／または診断するために有用であり得る。

【0718】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ヘモグロビン異常（例えば、鎌状赤血球貧血、ヘモグロビンC症、ヘモグロビンS-C症、およびヘモグロビンE症に関連した異常）を処置、予防、および／または診断するために有用であり得る。さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、サラセミア（アルファ-サラセミアおよびベータ-サラセミアのメジャー形態およびマイナー形態が挙げられるが、これらに限定されない）を診断、予後診断、予防、および／または処置するために有用であり得る。

【0719】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、チェディアック東症候群およびヘルマンスキーパドラック症候群等の貯蔵プール疾患（storage pool disease）、トロンボキサンA2機能障害、血小板無力症、およびベルナルススーリエ症候群）、溶血性尿毒症症候群、血友病Aまたは第VII因子欠損およびクリスマス病または第IX因子欠損等の血友病、遺伝性出血性末梢血管拡張症（ランデュオースラーウェーバー症候群としても知られている）、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症候群が挙げられるが、これらに限定されない出血性障害を診断、予後診断、予防、および／または処置するために有用であり得る。

【0720】

血液の凝固時間における、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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）、活性凝固時間（ACT）、再石灰化活性凝固時間またはリーホワイト凝固時間が挙げられるが、これらに限定されない、当該技術分野で周知の任意の凝固試験を用いて監視され得る。

【0721】

いくつかの疾患および様々な薬物は、血小板機能障害を引き起こし得る。したがって、特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、後天性血小板機能障害（例えば、腎不全、白血病、多発性骨髄腫、肝臓の肝硬変、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、ならびに薬物処置（高用量でのアスピリン、チクロピジン、非ステロイド性抗炎症薬（関節炎、疼痛、および捻挫のために用いられる）、およびペニシリンによる処置を含む）に関連する血小板機能障害）を診断、予後診断、予防、および／または処置するために有用であり得る。

【0722】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、白血球数の増加もしくは減少により特徴付けられる、またはそれに関連する疾患および障害を診断、予後診断、予防、および／または処置するために有用であり得る。白血球減少症は、白血球数が正常値より

10

20

30

40

50

も減少する場合に生じる。白血球減少症としては、好中球減少症およびリンパ球減少症が挙げられるが、これらに限定されない。正常値と比較した白血球数の増加は、白血球増加症として周知である。身体は、感染中、白血球数の増大を生じる。したがって、白血球増加症は、単純に、感染を反映する通常の生理的パラメータであり得る。代替として、白血球増加症は、損傷または癌のような他の疾患の指標であり得る。白血球増加症としては、好酸球増加症およびマクロファージの蓄積が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、白血球減少症を診断、予後診断、予防および／または処置するために有用であり得る。他の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、白血球増加症を診断、予後診断、予防、および／または処置する際に有用であり得る。

10

【0723】

白血球減少症は、すべての型の白血球の全般的な減少であり得る、または特定の型の白血球の特異的枯渇であり得る。したがって、特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、好中球数の減少を診断、予後診断、予防、および／または処置するために有用であり得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後診断、予防、および／または処置され得る好中球減少症としては、小児遺伝性顆粒球減少症 (*infantile genetic agranulocytosis*)、家族性好中球減少症、周期性好中球減少症、食事性欠損 (例えば、ビタミンB12欠損または葉酸欠損) から生じるかまたはこれに関連する好中球減少症、薬物処置 (例えば、抗生物質レジメン (例えば、ペニシリン処置)、スルホンアミド処置、抗凝血薬処置、抗癌剤、抗甲状腺性薬物、および癌化学療法) から生じるかまたはこれに関連する好中球減少症、およびいくつかの細菌感染またはウイルス感染、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、個体が脾臓肥大を有する状態 (例えば、フェルティ症候群、マラリア、およびサルコイドーシス)、そしていくつかの薬物処置レジメンに関連して生じ得る好中球破壊の増加から生じる好中球減少症が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0724】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ストレス、薬物処置 (例えば、コルチコステロイドを用いる薬物処置、癌化学療法および／もしくは放射線治療)、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、いく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、重症複合型免疫不全、毛細血管拡張性失調症) から生じるか、またはこれらに関連するリンパ球減少症が挙げられるが、これに限定されないリンパ球減少症 (Bおよび／もしくはTリンパ球の数の減少) を診断、予後診断、予防、ならびに／または処置するために有用であり得る。

30

【0725】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、レテラージェーヴェ病、およびハンドシュラークリスチャン病が挙げられるが、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を診断、予後診断、予防、および／または処置するために有用であり得る。

40

【0726】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、好酸球増加筋痛症候群、およびハンドシュラークリスチャン病が挙げられるが、これらに限定されない、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を診断、予後

50

診断、予防、および／または処置するために有用であり得る。

【0727】

さらに別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、急性リンパ性（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（骨髄性（myeloid）、骨髄性（myelogenous）または顆粒球性）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、および菌状息肉腫が挙げられるが、これらに限定されない白血病およびリンパ腫を診断、予後診断、予防、および／または処置するために有用であり得る。

10

【0728】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、形質細胞疾患、単クローン性高ガンマグロブリン血症、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、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が挙げられるが、これらに限定されない、形質細胞の疾患および障害を診断、予後診断、予防、および／または処置するために有用であり得る。

【0729】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、二次的赤血球増加症（secondary polycythemia）、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（一次的および二次的血小板血症の両方を含む）、および慢性骨髄性白血病が挙げられるが、これらに限定されない、骨髄増殖性障害を処置、予防、および／または診断するために有用であり得る。

20

【0730】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、外科手術の前に、血球産生を増大させるための処置として有用であり得る。

30

【0731】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、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薬剤として有用であり得る。

【0732】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、幹細胞フェレーシスの前に、循環系の幹細胞数を増大させるための薬剤として有用であり得る。別の特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、血小板フェレーシスの前に、循環系の幹細胞数を増大させるための薬剤として有用であり得る。

40

【0733】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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薬剤として有用であり得る。

【0734】

他の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、一次造血障害を予防、診断、および／または処置するために有用であり得る。

50

【0735】

過増殖性疾患

ある実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、過増殖性疾患（新生物を含む）を処置または検出するために使用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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を通して、障害の増殖を阻害し得る。代替として、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、過増殖性疾患を阻害し得る他の細胞を増殖し得る。

【0736】

例えば、免疫応答を増大させることにより、特に、過増殖性疾患の抗原性の質を増大させること、またはT細胞を増殖、分化、もしくは動員させることにより、過剰増殖性疾患は処置され得る。この免疫応答は、既存の免疫応答を高めるか、あるいは新たな免疫応答を開始させるかのいずれかにより増大され得る。代替として、免疫応答を減少させることはまた、化学療法剤等の過増殖性疾患を処置する方法であり得る。

【0737】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、結腸、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（腎上体、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭頸部、神経（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸郭、ならびに泌尿性器管に位置づけられる新生物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0738】

同様に、他の過増殖性疾患もまた、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。このような過増殖性疾患の例としては、急性小児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、星状細胞腫、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳幹グリオーマ、脳腫瘍、乳房癌、腎盂および尿管の癌、中枢神経系（原発性）リンパ腫、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫、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、小児小脳星状細胞腫、小児大脳星状細胞腫、小児頭蓋外胚細胞腫瘍、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、小児髓芽腫、小児非ホジキンリンパ腫、小児松果体およびテント上未分化神経外胚葉腫瘍、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、結腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、内分泌膵臓島細胞癌腫、子宮内膜癌、上皮細胞腫、上皮癌、食道癌、ユーイング肉腫および関連する腫瘍、膵外分泌癌、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管癌、眼癌、女性乳癌、ゴーシェ病、胆嚢癌、胃癌、胃腸カルチノイド腫瘍、胃腸腫瘍、胚細胞腫瘍、妊娠期栄養膜腫瘍、有毛細胞白血病、頭頸部の癌、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、カボジ肉腫、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、髓芽腫、メラノーマ、中皮腫、転移性潜在性原発性扁平上皮頸癌、転移性原発性扁平上皮頸癌、転移性扁平上皮頸癌、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫／形質細胞新生物、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、鼻腔および副鼻腔の癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、妊娠期の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癌

10

20

30

40

50

、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、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性潜在性腫瘍、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、形質細胞新生物／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、扁平上皮頸癌、胃癌、テント上身分か神経外胚葉性および松果体腫瘍、T細胞リンパ腫、精巣癌、胸腺腫、甲状腺癌、腎盂および尿管の移行細胞癌、腎盂および尿管の移行性癌、絨毛性腫瘍、尿管および腎盂細胞癌、尿道癌、子宮癌、子宮肉腫、腔癌、視覚伝導路および視床下部グリオーマ、外陰部の癌、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍、ならびに上記の

10

列挙された器官系に位置付けられる新生組織形成以外の任意の他の過増殖性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0739】

別の好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、前癌状態を診断、予後診断、予防、および／または処置するため、ならびに上に記載されるような障害が挙げられるが、これらに限定されない腫瘍性状態または悪性状態への進行を妨げるために使用される。このような使用は、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増殖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、または先行する疑いがある状態において必要とされる（このような異常な増殖状態の

20

総説については、Robbins and Angel1, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79を参照のこと）。

【0740】

過形成は、制御された細胞増殖形態であり、これは、構造または機能において有意な変化を伴わない、組織または器官における細胞数の増大を含む。本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、診断、予後診断、予防、および／または処置し得る過形成障害としては、血管濾胞性縦隔リンパ節過形成、好酸球増加随伴性血管類リンパ組織過形成、異型メラニン細胞過形成、基底細胞過形成、良性巨大リンパ節過形成、セメント質過形成、先天性副腎過形成、先

30

天性脂腺過形成、嚢胞性過形成、乳房嚢胞性過形成、義歯性線維症、脈管過形成、子宮内膜過形成、線維筋過形成、局所性上皮過形成、歯肉増殖症、炎症性線維性過形成、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、老人性脂腺過形成、ならびに疣贅性肥厚が挙げられるが、これらに限定されない。

【0741】

化生は、成人または完全に分化した細胞の1つの型が、別の型の成人の細胞に置換される制御された細胞増殖形態である。本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、診断、予後診断、予防、および／または処置し得る化生障害としては、原因不明骨髄様化生、アポクリン化生、非

40

定型化性 (atypical metaplasia)、自己実質化生、結合組織化生、上皮化生、腸上皮化生、化生性貧血、変形骨化、化生性ポリープ、骨髄様化生、原発性骨髄様化生、二次性骨髄様化生、扁平上皮化生、羊膜の扁平上皮化生、および症候性骨髄様化生が挙げられるが、これらに限定されない。

【0742】

異形成症は、癌の前兆であることが多く、主に上皮において見出される。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、深く染色される核を有し、そして多形態性を呈する、異形成症は、特色として、慢性過敏または炎症があるところに生じる。本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコ

50

ードするポリヌクレオチドを用いて診断、予後診断、予防および／または処置され得る異形成障害としては、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、先天性外胚葉異形成症、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（faciodigital togenital）異形成症、家族性繊維性顎異形成症、家族性白色癍（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、偽軟骨發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が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0743】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて診断、予後診断、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、良性の異常増殖障害（例えば、良性腫瘍、線維嚢胞状態、組織肥大、腸ポリープ、結腸ポリープ、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、ならびに日光角化症が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0744】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、組織に関連する障害を診断および／または予後診断するために使用され得る。

【0745】

別の実施形態において、本明細書において記載されるように毒素または放射性同位元素に共役した本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない癌および新生物を処置するために使用され得る。さらなる好ましい実施形態において、本明細書において記載されるように毒素または放射性同位元素に共役した本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。

30

【0746】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、アポトーシスに影響し得、したがって、細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関する多くの疾患を処置するために有用であり得る。例えば、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストにより診断、予後診断、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としては、癌（例えば、結腸癌、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、乳癌、前立腺癌、カポジ肉腫、および卵巣癌が挙げられるが、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、免疫関連糸球体腎炎、および関節リウマチ）ならびにウイルス感染（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、ならびに慢性移植拒絶反応が挙げられる。

40

50

【0747】

好ましい実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、癌（特に上に列挙したもの）の増殖、進行、および／または転移を阻害するために使用される。

【0748】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後診断、予防、および／または処置され得る、細胞の生存を増大させることに関するさらなる疾患または状態としては、例えば、白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性白血病、前骨髄性白血病（*promyelocytic*））、骨髄単球性白血病、単球性白血病および赤白血病を含む）、ならびに慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ性白血病）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、重鎖病、ならびに肉腫および癌（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、内皮性肉腫（*endotheliosarcoma*）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、ヘパトーム、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫、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、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経鞘腫（*acoustic neuroma*）、乏突起膠腫、髄膜腫（*menangioma*）、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫が挙げられるが、これらに限定されない固形腫瘍）の悪性腫瘍および関連疾患の進行および／または転移が挙げられるが、これらに限定されない。

【0749】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後診断、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としては、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原発性関連疾患）；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、虚血性障害（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）、肝障害（例えば、肝炎に関連する肝障害、虚血／再灌流傷害、胆汁鬱滞（胆管障害）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が挙げられるが、これらに限定されない。

【0750】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後診断、予防、および／または処置され得る過増殖性疾患および／または障害としては、肝臓、腹部、骨、乳房、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、頭頸部、神経系（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部、ならびに泌尿生殖管に位置づけられる新生物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0751】

同様に、他の過増殖性疾患もまた、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにより診断、予後診断、予防、および／または処置され得る。このような過増殖性疾患の例としては、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、ヴァルデンス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

の器官系に位置付けられる新生組織形成以外の任意の他の過増殖性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0752】

別の好ましい実施形態は、本発明および／またはタンパク質融合またはそのフラグメント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タンパク質をコードするポリヌクレオチドを利用する。

【0753】

したがって、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを異常な増殖性細胞に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、該発現を抑制する。

10

【0754】

本発明の別の実施形態は、個体において細胞増殖性疾患を処置する方法を提供し、それには、本発明の1つ以上の活性遺伝子コピーを異常な増殖性細胞または細胞に投与することを含む。好ましい実施形態において、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配列を発現するために有効である組換え発現ベクターを含むDNA構築物である。本発明の別の好ましい実施形態において、本発明の融合タンパク質をコードするDNA構築物は、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を利用して処置されるべき細胞に挿入される（G. J. Nabel, et al., PNAS 1999 96:324-326を参照のこと、参照することにより本明細書に組み込まれる）。最も好ましい実施形態において、ウイルスベクターは、欠損性であり、非増殖細胞を形質転換せず、増殖する細胞のみ形質転換する。さらに、好ましい実施形態において、単独あるいは他のポリヌクレオチドと組み合わせ、あるいはそれに融合された増殖性細胞に挿入される本発明のポリヌクレオチドは、その後、外部刺激（すなわち、磁気、特定の小分子、化学物質または薬物の投与等）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、コードされるタンパク質産物の発現を誘導する。したがって、本発明の有用な治療効果は、該外部刺激に基づいて、明らかに調節され得る（すなわち、本発明の発現を増大、減少、または阻害する）。

20

【0755】

本発明のポリヌクレオチドは、腫瘍性遺伝子または抗原の発現を抑制するために有用であり得る。「腫瘍性遺伝子の発現を抑制する」とは、遺伝子の転写の抑制、遺伝子転写物（プレメッセンジャーRNA）の破壊、スプライシングの阻害、メッセンジャーRNAの破壊、タンパク質の翻訳後改変の妨害、タンパク質の破壊、またはタンパク質の正常な機能の阻害を意図する。

30

【0756】

異常な増殖性細胞への局所投与のために、本発明のポリヌクレオチドは、当業者に周知の任意の方法により投与され得、この方法には、トランスフェクション、エレクトロポレーション、細胞のマイクロインジェクション、もしくはリポソーム、リポフェクション、または裸のポリヌクレオチド等のビヒクル、あるいは、本明細書にわたって記載される任意の他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリヌクレオチドは、当業者に周知のレトロウイルスベクター（Gilboa, J. Virology 44:845 (1982)、Hocke, Nature 320:275 (1986)、Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:3014)、ワクシニアウイルス系（Chakrabarty et al., Mol. Cell Biol. 5:3403 (1985)、または他の効率的なDNA送達系（Yates et al., Nature 313:812 (1985)）等）に限定されない周知の遺伝子送達系により送達され得る。これらの参考文献は、例示のみであり、参照することにより本明細書に組み込まれる。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トし、そして非分裂の細胞を残すために、当業者に周知のレトロウイルス、またはアデノウイルス（当該技術分野において説明され、本明細書の他の箇所において説明されるような）送達系を利用することが好ましい。宿主DNA複製は、レトロウイルスDN

40

50

Aを組み込むために必要とされ、レトロウイルスは、その生活環に必要とされるレトロウイルス遺伝子を欠損するので、自律複製し得ない。本発明のポリヌクレオチドのためにこのようなレトロウイルス送達系を利用することは、該遺伝子および構築物を異常に増殖している細胞へと標的化し、そして非分裂の正常な細胞を残す。

【0757】

本発明のポリヌクレオチドは、疾患部位に直接的に注射針を誘導するために使用される画像化デバイスを使用することにより、内部の器官、体腔等における細胞増殖性障害／疾患の部位に直接的に送達され得る。本発明のポリヌクレオチドはまた、外科的介入時に、疾患部位に投与され得る。

【0758】

「細胞増殖性疾患」とは、良性であろうと悪性であろうと、細胞、細胞群、もしくは組織の単一もしくは複数の局所的異常増殖により特徴付けられる、器官、腔、もしくは身体部分のうちのいずれか1つ、またはいずれかの組み合わせに罹患する、任意のヒトまたは動物の疾患または障害を意味する。

【0759】

本発明のポリヌクレオチドの任意の量が、それらが処理された細胞の増殖に対して生物学的に阻害する効果を有する限り、投与され得る。さらに、同じ部位に同時に、本発明の1つ以上のポリヌクレオチドを投与することが可能である。「生物学的に阻害する」とは、部分的または全体的な増殖阻害、ならびに細胞の増殖または成長の速度減少を意味する。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増殖、動物および細胞培養物における腫瘍増殖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、または当業者に周知の任意の他の方法により、決定され得る。

【0760】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、タンパク質融合物として単独か、または本明細書の他の箇所に記載されるように直接的または間接的に他のポリペプチドと組み合わせるかのいずれかで、増殖性細胞または組織の血管新生を阻害するために有用である。最も好ましい実施形態において、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等の阻害により、間接的に達成され得る (Joseph I B, et al. J Natl Cancer Inst, 90 (21): 1648-53 (1998) を参照のこと、参照することにより、本明細書に組み込まれる)。

【0761】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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を通して増殖性の細胞または組織を阻害するために有用であり得る。これらの融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、例えば、死ドメイン (death-domain) 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媒介性タンパク質 (TRAMP)、およびTNF関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) 受容体-1および-2 (Schulze-Osthoff K, et al., Eur J Biochem 254 (3): 439-59 (1998) を参照のこと、参照することにより、本明細書に組み込まれる) 等) の活性化において、増殖性の細胞および組織のアポトーシスを誘導するように、直接的あるいは間接的のいずれかで作用し得る。さらに、本発明の別の好ましい実施形態において、これらの融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドは、アポトーシスを活性化する他のタンパク質の活性化におけるような他の機構を通してか、あるいは単独または低分子薬物もしくはアジュバント (例えば、アポプトニン (apoptonin)、ガレクチン (galectin)、チオレドキシン、抗炎症性タンパク質 (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),

10

20

30

40

50

Int J Tissue React; 20 (1) : 3-15 (1998) を参照のこと、これらはすべて、参照することにより本明細書に組み込まれる) と組み合わせるか、いずれかで、これらのタンパク質の発現を刺激することを通して、アポトーシスを誘導し得る。

【0762】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、増殖性の細胞または組織の転移を阻害するために有用である。阻害は、これらのアルブミン融合タンパク質および／またはポリヌクレオチドの投与の直接的結果として、または間接的に（例えば、転移を阻害することで知られているタンパク質（例えば、アルファ4インテグリン）の発現を活性化する）生じ得る（例えば、Curr Top Microbiol Immunol 1998; 231: 125-41 を参照のこと、これは、参照することにより本明細書に組み込まれる）。本発明のこのような治療的影響は、単独または低分子薬物もしくはアジュバントと組み合わせるか、いずれかで達成され得る。

10

【0763】

別の実施形態において、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する組成物を、本発明のアルブミン融合タンパク質により結合される、結合する、もしくは会合するポリペプチドを発現する標的細胞に送達する方法を提供する。本発明のアルブミン融合タンパク質は、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグと、疎水性、親水性、イオン性および／または共有結合的な相互作用を通じて会合され得る。

20

【0764】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、増殖性抗原および免疫原に対して、直接的（例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質が「ワクチン接種」された場合、増殖性の抗原および免疫原に対して応答するように免疫応答を生じる）、あるいは間接的（例えば、該抗原および免疫原に対して、免疫応答を増強することで知られているタンパク質（例えば、ケモカイン）の発現を活性化する）のいずれかで、増殖性の細胞または組織の免疫原性および／または抗原性を高めるために有用である。

【0765】

腎障害

30

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、腎臓系の障害を、処置、予防、診断、および／または予後診断するために使用され得る。本発明の組成物を用いて診断、予後診断、予防、および／または処置され得る腎臓障害としては、腎不全、腎炎、腎臓の血管障害、代謝性および先天性腎臓障害、腎臓の尿障害、自己免疫障害、硬化症および壊死、電解質異常、ならびに腎臓癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0766】

本発明の組成物を用いて診断、予後診断、予防および／または処置され得る腎臓疾患としては、急性腎不全、慢性腎不全、アテローム性塞栓性腎障害、末期腎疾患、腎臓の炎症性疾患（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 II、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、急性溶血性連鎖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、および溶血性連鎖球菌感染後糸球体腎炎)、腎臓の血管障害（例えば、腎梗塞、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）、ならびに尿道疾患に起因する腎障害（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、および急性もしくは慢性片側性閉塞性尿路疾患）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0767】

50

加えて、本発明の組成物は、腎臓の代謝および先天性障害（例えば、尿毒症、腎アミロイドーシス、腎性骨形成異常症、尿細管性アシドーシス、腎性糖尿、腎原性尿崩症、シスチン尿症、ファンコーニ症候群、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、多嚢胞性腎疾患、髄質嚢胞病、髄質海綿腎、アルポート症候群、爪－膝蓋骨症候群、先天性ネフローゼ症候群、クラッシュ症候群、馬蹄腎、糖尿病性ニューロパシー、腎原性尿崩症、鎮痛薬性腎症、腎結石、および膜性腎症）、ならびに腎臓の自己免疫障害（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腎症、およびIgMメサングウム増殖性糸球体腎炎）を診断、予後診断、予防、および／または処置するために使用され得る。

【0768】

本発明の組成物はまた、腎臓の硬化性または壊死性障害（例えば、糸球体硬化症、糖尿病性腎症、巣状分節状糸球体硬化症（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、移行上皮癌、腎増腺癌、扁平上皮細胞癌、およびウィルムス腫瘍）、ならびに電解質異常（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、低リン酸血症、および高リン酸血症）を診断、予後診断、予防、および／または処置するために使用され得る。

【0769】

本発明の組成物は、送達部位における直接的針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、微粒子銃（biolistic）注射、粒子加速器、ゲルフォームスポンジデポ、他の市販デポ物質、浸透圧ポンプ、経口または坐剤用固形医薬製剤、デカンティングまたは手術中の局所適用、エアロゾル送達が挙げられるが、これらに限定されない、当該技術分野で周知の任意の方法を用いて投与され得る。このような方法は、当該技術分野で周知である。本発明の組成物は、以下でより詳細に記載される、治療剤の一部として投与され得る。本発明のポリヌクレオチドを送達する方法は、本明細書でより詳細に記載される。

【0770】

心血管疾患

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、四肢虚血等の末梢動脈疾患が挙げられるが、これに限定されない心血管疾患を処置、予防、診断、および／または予後診断するために使用され得る。

【0771】

心血管疾患としては、心血管異常、例えば、動脈－動脈瘻、動静脈瘻、脳動静脈奇形、先天性心欠陥、肺動脈閉鎖、およびシミター症候群が挙げられるが、これらに限定されない。先天性心欠陥としては、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、エブスタイン奇形、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、大血管転位症、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、ルタンバッシュ症候群、ファロー三徴症、心室中隔欠損が挙げられるが、これらに限定されない。

【0772】

心血管疾患としてはまた、心臓病、例えば、不整脈、カルチノイド心臓病、高心拍出量（high cardiac output）、低心拍出量（low cardiac output）、心タンポナーデ、心内膜炎（細菌性を含む）、心臓動脈瘤、心停止、うっ血性心不全、うっ血性心筋症、発作性呼吸困難、心臓性浮腫、心肥大、うっ血性心筋症、左心室肥大、右心室肥大、梗塞後心破裂（post-infarction heart rupture）、心室中隔破裂、心臓弁疾患、心筋疾患、心筋虚血、心内膜液浸出、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、リウマチ性心疾患、心室機能不全、充血、心血管妊娠合併症（cardiovascular pregnancy complications）、シミター症候群、心血管梅毒、お

10

20

30

40

50

よび心血管結核 (cardiovascular tuberculosis) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0773】

不整脈としては、洞性不整脈、心房性細動、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、および心室細動が挙げられるが、これらに限定されない。頻脈としては、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脈、異所性心房性頻脈、異所性接合部性頻脈、洞房結節リエントリー性頻拍、トルサードポアント、および心室性頻脈が挙げられる。

10

【0774】

心臓弁疾患としては、大動脈弁閉鎖不全症、大動脈弁狭窄、心雑音、大動脈弁逸脱症、僧帽弁逸脱症、三尖弁逸脱症、僧帽弁閉鎖不全、僧帽弁狭窄症、肺動脈閉鎖症、肺動脈弁不全、肺動脈弁狭窄症、三尖弁閉鎖症、三尖弁閉鎖不全症、および三尖弁狭窄が挙げられるが、これらに限定されない。

【0775】

心筋疾患としては、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、キーンズ症候群、心筋再灌流傷害、および心筋炎が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0776】

心筋虚血としては、冠状動脈性疾患、例えば、狭心症、冠動脈瘤、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、および気絶心筋が挙げられるが、これらに限定されない。

【0777】

心血管疾患としては、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нда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、ルリッシュ症候群、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、糖尿病網膜症、塞栓症、血栓症、肢端紅痛症、痔、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、CREST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症、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。

30

【0778】

動脈瘤としては、解離性動脈瘤、偽動脈瘤、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、および腸骨動脈瘤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0779】

動脈閉塞性疾患としては、動脈硬化症、間欠性跛行、頸動脈狭窄症、線維筋性異形成症、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が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0780】

脳血管障害としては、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、ワレンベルク症候群、脳出血症、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、群発性頭痛、片頭痛および椎骨脳底動脈循環不全が挙げられるが、これらに限定されない。

【0781】

50

塞栓症としては、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、および血栓塞栓症が挙げられるが、これらに限定されない。血栓症としては、冠状動脈血栓症、肝静脈血栓症、網膜静脈閉塞、頸動脈血栓症静脈、洞血栓症、ワレンベルク症候群、および静脈血栓症が挙げられるが、これらに限定されない。

【0782】

虚血性障害としては、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、および末梢肢虚血が挙げられるが、これらに限定されない。脈管炎としては、大動脈炎、動脈炎、ベーチェット症候群、チャージストラウス症候群、粘膜皮膚リンパ節症候群、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が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0783】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、送達部位における直接的針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、微粒子銃注射、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製剤、デカンティングまたは手術中の局所適用、エアロゾル送達が挙げられるが、これらに限定されない、当該技術分野で周知の任意の方法を用いて投与され得る。このような方法は、当該技術分野で周知である。ポリヌクレオチドの送達方法は、本明細書でより詳細に記載される。

【0784】

呼吸器疾患

20

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、呼吸系の疾患および／または障害を処置、予防、診断、および／または予後診断するために使用され得る。

【0785】

呼吸系の疾患および障害としては、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、血管運動神経性鼻炎）、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乳頭腫、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、ウイルス性および細菌性）、扁桃炎、扁桃蜂巣炎、副咽頭間隙膿瘍、喉頭炎、喉頭気腫、ならびに咽頭癌（例えば、鼻咽頭の癌、扁桃癌、咽頭癌）、肺癌（例えば、扁平上皮細胞腫、小細胞腫（燕麦細胞腫）、大細胞腫、および腺癌腫）、アレルギー性疾患（好酸球性肺炎、過敏性肺炎（例えば、外因性アレルギー性肺炎、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、ヴェーゲナー肉芽腫症（肉芽腫性脈管炎）、グッドパスチャー症候群））、肺炎（例えば、細菌性肺炎（例えば、肺炎連鎖球菌（*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（*Pseudomonas* 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））、ならびにウイルス肺炎（例えば、インフルエンザ、水痘（水疱瘡））が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0786】

呼吸器系のさらなる疾患および障害としては、細気管支炎、ポリオ（灰白髄炎）、クループ、呼吸器合胞体ウイルス感染、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、風疹、および亜急性硬化性全脳炎）、真菌肺炎（例えば、ヒストプラズマ症、コクシジオイデス真菌症、プラストミセス症、重篤に抑制される免疫系を有するヒトにおける真菌感染（例えば、クリプトコッカスネオフォルマンズ（*Cryptococcus*

50

ccus 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)、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、院内感染肺炎、化学肺臓炎および吸引性肺炎、胸膜疾患 (例えば、胸膜炎、胸水、および気胸症 (例えば、単純自然気胸症、合併した自然気胸症、緊張性気胸症))、閉塞性気道疾患 (例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、肺気腫、慢性もしくは急性気管支炎)、職業性肺疾患 (例えば、ケイ肺症、黒色肺 (炭坑作業員塵肺症)、石綿肺症、ベリリウム症、職業性喘息、綿肺症、ならびに良性塵肺症)、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、レテラージューヴェ疾患、ハンドシュラークリスチャン病、好酸球性肉芽腫)、特発性肺ヘモジデリン沈着症、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が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0787】

抗血管新生活性

20

内因性刺激因子と血管新生阻害剤との間の天然に発生する平衡は、阻害的影響が優勢である。Rastinejad et al., *Cell* 56:345-355 (1989)。新生血管形成が正常な生理学的条件下において生じるまれな場合 (例えば、創傷治癒、器官再生、胚発生、および雌性生殖プロセス) において、血管新生は、厳密に調節され、空間的および時間的に定められる。病的な血管新生の条件 (例えば、固形腫瘍増殖を特徴付ける) の下において、これらの調節の制御はできない。調節されていない血管新生は病的になり、多くの新生物性疾患および非新生物性疾患の進行を維持する。多くの重篤な疾患は、固形腫瘍の増殖および転移、関節炎、いくつかの型の眼の障害、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、Moses et al., *Bio tech.* 9:630-634 (1991)、Folkman et al., *N. Engl. J. Med.*, 333:1757-1763 (1995)、Auerbach et al., *J. Microvasc. Res.* 29:401-411 (1985)、Folkman, *Advances in Cancer Research*, eds. Klein and Weinhouse, Academic Press, New York, pp. 175-203 (1985)、Patz, *Am. J. Ophthalmol.* 94:715-743 (1982)、および Folkman et al., *Science* 227:719-725 (1983) による総説を参照のこと。多くの病的状態において、血管新生の過程は、その疾患状態に寄与する。例えば、固形腫瘍の増殖が、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 and Klagsbrun, *Science* 255:442-447 (1987)。

30

40

【0788】

本発明は、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの投与による新血管形成に関連する疾患または障害の処置を提供する。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置し得る悪性および転移性状態には、本明細書に記載の悪性疾患、固形腫瘍、および癌、ならびにそうでなければ当該技術分野で周知のもの (このような障害の総説については、Fishman et al., *Medicine*, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985) を参照のこと) が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、本発明は、新血管新生関連疾患および／または障害の処置の方法を提供し、これには、治療有効量の本発明

50

のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、その処置の必要な個体に投与する工程を含む。例えば、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、癌または腫瘍を治療的に処置するために、様々なさらなる方法で利用され得る。本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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癌としては、前立腺癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、膵臓癌、喉頭癌、食道癌、精巣癌、肝臓癌、耳下腺癌、胆管癌、結腸癌、直腸癌、頸部癌、子宮癌、子宮内膜癌、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌を含む固形腫瘍；原発性腫瘍および転移；黒色腫；膠芽腫；カポジ肉腫；平滑筋肉腫；非小細胞肺癌；結腸直腸癌；進行性悪性疾患；ならびに血液由来の腫瘍（例えば、白血病）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、皮膚癌、頭頸部腫瘍、乳房腫瘍、およびカポジ肉腫等の癌を処置するために局所送達され得る。

【0789】

なお他の態様において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、膀胱内投与によって膀胱癌の表面形態を処置するために利用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、注射またはカテーテルを介して、腫瘍に直接的に、または腫瘍部位付近に送達され得る。当然のことながら、当業者が理解するように、適切な投与形態は、処置されるべき癌により変化する。他の送達形態は、本明細書において述べられる。

【0790】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、癌に加えて、他の障害（新血管新生が関与する）を処置するために有用であり得る。これらの障害としては、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）；動脈硬化性プラーク；眼の血管新生疾患（例えば、糖尿病網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性症、角膜移植拒絶反応、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、眼のブドウ膜炎（uveitis）および翼状片（Pterygia）（異常な血管増殖））；関節リウマチ；乾癬；遅延型創傷治癒；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；心筋の血管新生；冠状側副枝（coronary collaterals）；大脳側副枝；動静脈奇形；虚血性四肢血管新生；オースラーウェーバー症候群；プラーク新血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；血管線維腫；線維筋性異形成症；創傷肉芽形成；クローン病；ならびにアテローム性動脈硬化症が挙げられるが、これらに限定されない。

【0791】

例えば、本発明の一態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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に投与する工程を含む、肥厚性瘢痕およびケロイドを処置するための方法が提供される。

【0792】

本発明の一実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、肥厚性瘢痕またはケロイドに、これらの病変の進行を妨げるために直接注射される。この治療は、肥厚性瘢痕およびケロイド（例えば、やけど）の発達を生じる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あり、そして好ましくは、増殖期が進行する時間（最初の傷害から約14日後）を有した後であるが、肥厚性瘢痕またはケロイドの発達の前に開始される。上述のように、本発明はまた、眼の新生血管形成疾患（例えば、角膜新生血管形成、血管新生緑内障、増殖性糖尿病網膜症、水晶体後線維増殖、および黄斑変性症を含む）を処置するための方法を提供する。

【0793】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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疾患としては、血管新生緑内障、糖尿病網膜症、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟児網膜症、黄斑変性症、角膜移植新血管形成、ならびに他の眼の炎症性疾患、眼の腫瘍、および脈絡膜または虹彩の新血管形成に関連する疾患が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Wal tman et al., Am. J. Ophthal. 55:704-710 (1978) および Gartner et al., Surv. Ophthal. 22:291-312 (1978) による総説を参照のこと。

【0794】

したがって、本発明の一態様において、血管形成を阻害するように、患者の角膜に治療有効量の化合物（本発明の融合タンパク質および／または本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド）を投与する工程を含む、角膜の新血管形成（角膜移植新血管形成を含む）等の眼の新血管形成疾患を処置するための方法が提供される。簡潔には、角膜は、通常には血管を欠く組織である。しかし、ある病的状態において、毛細血管は、縁の角膜周囲脈管叢から角膜に伸長し得る。角膜が血管化されるようになる場合、角膜はまた混濁されるようになり、患者の視力低下を生じる。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、ならびにコンタクトレンズ装着による合併症を含む、多種多様な障害が、角膜の新血管形成をもたらし得る。

【0795】

本発明の特に好ましい実施形態において、生理食塩水（眼調製物中にて一般的に用いられる任意の保存剤および抗菌剤と組み合わせる）中にて局所投与のために調製され得、点眼剤形態にて投与され得る。溶液または懸濁液は、その純粋な形態で調製され得、1日に数回投与され得る。代替として、上記のように調製される抗血管新生組成物はまた、角膜に直接投与され得る。好ましい実施形態において、抗血管新生組成物は、角膜に結合する粘膜接着性ポリマーと共に調製される。さらなる実施形態において、抗血管新生因子または抗血管新生組成物は、従来のステロイド治療に対する補助剤として利用され得る。局所治療はまた、血管新生応答（例えば、化学的やけど）を誘導する可能性が高いことが知られている角膜病変において、予防的に有用であり得る。これらの場合において、処置（おそらくステロイドと組み合わせられる）を直ちに開始し、その後の合併症の予防に役立て得る。

【0796】

他の実施形態において、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、個々の病巣の形態で変化し得るが、投与の目標は、進行する脈管構造の前部に組成物を置く（すなわち、血管と正常な角膜との間に散在させる）ことであろう。ほとんどの場合において、これは、進行している血管から角膜を「保護する」するための角膜周囲辺縁への注入を含み得る。この方法はまた、角膜新血管形成を予防的に防ぐために、角膜損傷の直後に利用され得る。この状況において、該物質を、角膜病巣とその所望でない潜在的な辺縁系への血液供給との間に散在した角膜周囲辺縁系に注入することができる。このような方法はまた、類似の様態で、移植された角膜の毛細血管浸潤を防ぐために利用され得る。徐放形態において、注入は、1年に2～3回しか注入が必要とされないだろう。ステロイドもまた、注入溶液に加えられ、その注射自体から生じる炎症を軽減し得るだろう。

【0797】

本発明の別の態様において、血管の形成を阻害するように、治療有効量の本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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工程を含む、血管新生緑内障を処置するための方

法が提供される。一実施形態において、化合物は、血管新生緑内障の早期形態を処置するために、眼に局所投与され得る。他の実施形態において、化合物は、前房隅角領域中に注入により移植され得る。他の実施形態において、化合物はまた、化合物が房水中に連続的に放出されるように、任意の位置に置かれ得る。本発明の別の態様において、血管の形成が阻害されるように、治療有効量の本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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工程を含む、増殖性糖尿病網膜症を処置するための方法が提供される。

【0798】

本発明の特に好ましい実施形態において、増殖性糖尿病網膜症は、網膜におけるポリヌクレオチドポリヌクレオチド、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の注入により処置され得る。好ましくは、この処置は、光凝固を必要とする重篤な疾患となる前に開始されるべきである。

【0799】

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、治療有効量の本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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工程を含む、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／または眼内移植を介して局所投与され得る。

【0800】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、血管腫、関節炎、乾癬、血管線維腫、動脈硬化性プラーク、遅延型創傷治癒、肉芽形成、血友病性関節、肥厚性瘢痕、癒着不能骨折、オー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、および血管接着が挙げられるが、これらに限定されない。

【0801】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断され得る障害および／または状態としては、固形腫瘍、血液由来の腫瘍（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、眼の血管新生疾患（例えば、糖尿病網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性症、角膜移植拒絶反応、血管新生緑内障、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）、遅延型創傷治癒、子宮内膜症、血管新生、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、心筋の血管新生、冠状側副枝（coronary collaterals）、大脳側副枝、動静脈奇形、虚血性四肢新血管新生、オースラーウェーバー症候群、プラーク新血管形成、毛細血管拡張症、血友病性関節、血管線維腫、線維筋性異形成症、創傷肉芽形成、クローン病、アテローム性動脈硬化症、避妊剤（月経を制御する、胎芽着床のために必要な血管新生を予防することによる）、病理学的結果として血管新生を有する疾患（例えば、ネコ引っかけ病（*Rochelle minalia quintosa*）、潰瘍（*Helicobacter pylori*）、バルトネラ症、および細菌性血管腫症）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0802】

避妊法の一態様において、胎芽着床をブロックするのに十分な化合物の量を、性交および受精が起こる前またはその後に投与し、ひいては、有効な避妊法、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タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、月経を制御することにおいて使用され得る、または子宮内膜症の処置における腹膜洗浄液として、あるいは腹膜移植のためのいずれかで投与され得る。

【0803】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質

10

20

30

40

50

をコードするポリヌクレオチドは、縫合部（s t i t c h）肉芽腫を予防するために、外科縫合に組み込まれ得る。

【0804】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、広範な種々の外科的処置において利用され得る。例えば、本発明の一態様において、組成物（例えば、スプレーまたはフィルムの形態において）は、悪性組織から正常な周囲組織を分離するため、および／または周囲組織への疾患の広がりを防ぐために、腫瘍の除去の前に、領域をコーティングまたはスプレーするために利用され得る。本発明の他の態様において、組成物（例えば、スプレーの形態において）は、腫瘍をコーティングするため、または所望の場所において新血管新生を阻害するために、内視鏡的処置を介して送達され得る。本発明のなお他の態様において、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が、外科用メッシュが利用され得る任意の処置において利用され得る。例えば、本発明の一実施形態において、抗血管新生組成物を有した外科用メッシュレーデン（l a d e n）は、構造を支持し、一定量の抗血管新生因子を放出するために、腹部癌切除手術の間（例えば、結腸切除の後）に利用され得る。

10

【0805】

本発明のさらなる態様において、癌の局所的再発およびその部位での新しい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タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを腫瘍の切除縁に投与する工程を含む、腫瘍切除部位を処置するための方法が提供される。本発明の一実施形態において、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、塗布、ブラッシング（b r u s h i n g）、またはそうでなければ抗血管新生化合物を用いて腫瘍の切除縁をコーティングすることにより適用される）。代替として、抗血管新生化合物は、投与前に、周知の外科用ペーストに組み込まれてもよい。本発明の特に好ましい実施形態において、抗血管新生化合物は、悪性腫瘍の肝切除後および神経外科手術後に適用される。

20

【0806】

本発明の一態様において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、乳房、結腸、脳、および肝腫瘍を含む広範な種々の腫瘍の切除縁に投与され得る。例えば、本発明の一実施形態において、抗血管新生化合物は、その部位での新しい血管形成が阻害されるように、切除後、神経腫瘍の部位に投与され得る。

30

【0807】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、他の抗血管新生因子と共に投与され得る。他の抗血管新生因子の代表的な例としては、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、メタロプロテインナーゼ抗侵襲性因子、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、メタロプロテインナーゼ１の組織阻害剤、メタロプロテインナーゼ２の組織阻害剤、プラスミノゲン活性化因子阻害剤－１、プラスミノゲン活性化因子阻害剤－２、および様々な形態の軽い「d族」遷移金属が挙げられる。

40

【0808】

軽い「d族」遷移金属としては、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が挙げられる。このような遷移金属種は、遷移金属錯体を形成し得る。上記の遷移金属種の好適な錯体としては、オキソ遷移金属錯体が挙げられる。

【0809】

バナジウム錯体の代表的な例としては、例えば、バナジン酸塩およびバナジル錯体等のオキソバナジウム錯体が挙げられる。好適なバナジン酸塩錯体としては、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等のメタバナジン酸塩およびオルトバナジン酸塩錯体が挙げられる。好適なバナジ

50

ル錯体としては、例えば、バナジルアセチルアセトナート、ならびに硫酸バナジルーおよび三水和物等の硫酸バナジル水和物を含む硫酸バナジルが挙げられる。

【0810】

タングステンおよびモリブデン錯体の代表的な例としてはまた、オキソ錯体が挙げられる。好適なオキソタングステン錯体としては、タングステン酸および酸化タングステン錯体が挙げられる。好適なタングステン酸錯体としては、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が挙げられる。適切な酸化タングステンとしては、酸化タングステン（IV）および酸化タングステン（VI）が挙げられる。好適なオキソモリブデン錯体としては、モリブデン酸錯体、モリブデンオキシド錯体、およびモリブデニル錯体が挙げられる。好適なモリブデン酸錯体としては、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が挙げられる。好適な酸化モリブデンとしては、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が挙げられる。好適なモリブデニル錯体としては、例えば、モリブデニルアセチルアセトネートが挙げられる。他の好適なタングステン錯体およびモリブデン錯体としては、例えば、グリセロール、酒石酸、および糖由来のヒドロキソ誘導体が挙げられる。

10

【0811】

広範な種々の他の抗脈管形成因子もまた、本発明の文脈において利用され得る。代表的な例としては、血小板因子4；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（ズワイガニの殻から調製）、（Murata et al., Canver 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、エストロゲン等の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増強され得る）；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、アルファージピリジル、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 et al., J. Bio. Chem. 267:17321-17326, (1992)）；キモスタチン（Tomkinson et al., Biochem J. 286:475-480, (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 et al., Nature 348:555-557, 1990）；金チオリンゴ酸ナトリウム（「GST」；Matsubara and 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 et al., J. Biol. Chem. 262(4):1659-1664, (1987)）；ビスアントレン（National Cancer Institute）；ロベンザリット二ナトリウム（N-（2）-カルボキシフェニル-4-クロロアントロニル酸二ナトリウムまたは「CCA」；（Takeuchi et al., Agents Actions 36:312-316, (1992)）；AGM-1470；カルボキシアミノルミダゾール；およびBB94等のメタロプロテイナーゼ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0812】

細胞レベルでの疾患

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予後診断され得る細胞生存の増大あるいはアポトーシスの阻害に関連する疾患としては、癌（例えば、結腸癌、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、乳癌、前立腺癌、カボジ肉腫、および卵巣癌が挙げられるが、こ

50

れらに限定されない、濾胞性リンパ腫、p 5 3 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、免疫関連糸球体腎炎、および関節リウマチ）ならびにウイルス感染（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、ならびに慢性移植拒絶反応が挙げられる。

【0813】

好ましい実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、癌（特に上に列挙したもの）の増殖、進行、および／または転移を阻害するために使用される。

10

【0814】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、細胞の生存を増大させることに関するさらなる疾患または状態としては、例えば、白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性白血病、前骨髄性白血病（*promyelocytic*）、骨髄単球性白血病、単球性白血病および赤白血病を含む）、ならびに慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ性白血病）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、重鎖病、ならびに肉腫および癌（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、内皮性肉腫（*endotheliosarcoma*）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、ヘパトーム、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌腫、小細胞肺癌、膀胱癌腫、上皮癌腫、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経鞘腫（*acoustic neuroma*）、乏突起膠腫、髄膜腫（*menangioma*）、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫が挙げられるが、これらに限定されない固形腫瘍）の悪性腫瘍および関連疾患の進行および／または転移が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0815】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて診断、予防、処置、および／または予後診断され得るアポトーシスの増大に関連する疾患としては、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原発性関連疾患）；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、虚血性障害（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）、肝障害（例えば、肝炎に関連する肝障害、虚血／再灌流障害、胆汁鬱滞（胆管障害）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が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0816】

創傷治癒および上皮細胞増殖

本発明のなおさらなる態様に従って、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、治療目的のため、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、毛包生成および皮膚創傷の治癒を刺激するために、利用する過程が提供される。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド

50

は、外科的創傷、切除創傷、深い創傷（真皮および表皮の損傷を含む）、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、熱への曝露または化学物質から生ずる熱傷、および他の異常な創傷治癒状態（例えば、尿毒症、栄養失調、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性薬物および代謝拮抗物質を用いた全身処置に関連する合併症を含む創傷治癒を刺激するために臨床的に有用であり得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、皮膚損失後の皮膚の回復を促進するために使用され得る。

【0817】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、創傷床（wound bed）への皮膚移植片の接着を増大するため、および創傷床からの再上皮形成を刺激するために使用され得る。以下は、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが創傷床への接着を増大するために使用され得る、移植片の型である： 自家移植片、人工皮膚、同種移植片（allograft）、自己植皮片、自己表皮移植片（autoepidermic graft）、無血管性（avascular）移植片、ブレアブラウン移植片、骨移植片、胚胎組織移植片、真皮移植片、遅延移植片、皮膚移植片、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（xenograft）、同種移植片（homologous graft）、増殖性移植片、層板状移植片、網状移植片、粘膜移植片、オリアティールシュ移植片、大網移植片、パッチ移植片（patch graft）、茎状移植片、穿通性移植片（penetrating graft）、中間層皮膚移植片（split skin graft）、分層植皮片（thick split graft）。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、皮膚の強度を助長するため、および加齢した皮膚の外見を改善するために使用され得る。

【0818】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、肝細胞増殖、および肺、乳房、脾臓、胃、小腸、および大腸における上皮細胞増殖における変化を生じると考えられる。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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（sebocyte）、毛包、肝細胞、II型肺細胞、ムチン産生杯細胞、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）の増殖を促進し得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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促進し得る。

【0819】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、放射線、化学療法処置またはウイルス感染から生じる腸の毒性の副作用を軽減するために使用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、小腸粘膜に対して細胞保護的効果を有し得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、化学療法およびウイルス感染から生じる粘膜炎（口潰瘍）の治癒を刺激し得る。

【0820】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、やけどを含む、完全なおよび部分的な厚さの皮膚欠損における皮膚の完全な再生（すなわち、毛包、汗腺、および皮脂腺の再増殖）、乾癬等の他の皮膚欠損の処置においてさらに使用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、表皮水疱症（これらの病変の再上皮形成を加速することにより、頻繁な開放性かつ疼痛性の水

膨れを生じる、下層の真皮への表皮の接着の欠損)を処置するために使用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、胃潰瘍および十二指腸潰瘍を処置し、粘膜内層の瘢痕形成ならびに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ために使用され得る。炎症性腸疾患、例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎は、小腸または大腸それぞれの粘膜表面の破壊を生じる疾患である。したがって、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、粘膜表面の再表面の形成を促進して、より迅速な治癒を補助し、炎症性腸疾患の進行を防ぐために使用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いる処置は、胃腸管全体の粘液の産生に対して有意な効果を有すると予期され、摂取された有害な物質から、または外科手術後に、腸粘膜を保護するために使用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、その発現不足に関連する疾患を処置するために使用され得る。

10

【0821】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、様々な病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使用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、急性もしくは慢性肺損傷を予防または処置するために、肺胞および細気管支上皮の増殖および分化を刺激し得、その修復を促進し得る。例えば、肺胞の進行性の損失を生じる肺気腫、ならびに細気管支上皮および肺胞の壊死を生じる吸入傷害（すなわち、煙の吸入およびやけどから生じる）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、効果的に処置され得る。また、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、I I型肺細胞の増殖および分化を刺激するために使用され得、これは、早産児における肺硝子膜症（例えば、乳児呼吸窮迫症候群および気管支肺異形成症）等の疾患を処置または予防するために役立ち得る。

20

【0822】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、したがって、肝硬変により惹起される激症肝不全、ウイルス性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で周知の他の肝臓毒素）により惹起される肝臓損傷等の肝臓疾患および病理学的状態を緩和または処置するために使用され得る。

30

【0823】

加えて、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、真性糖尿病の発症を処置または予防するために使用され得る。新たに、I型およびI I型糖尿病と診断された患者において、いくつかの島細胞機能が残っている場合、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、その疾患の永続的な兆候を、緩和、遅延、または予防するように、その島機能を維持するために使用され得る。また、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、島細胞機能を改善または促進するための島細胞移植における補助として使用され得る。

40

【0824】

神経活性および神経疾患

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、または傷害の診断および／または処置のために使用され得る。本発明の組成物（例えば、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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疾患としては、軸索の切断、ニューロンの減少

50

もしくは変性、または脱髄のいずれかを引き起こす、神経系損傷および疾患、障害または状態が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法に従って、患者（ヒトおよび非ヒト哺乳動物患者を含む）において処置され得る神経系病変としては、以下の中枢神経系（脊髄、脳を含む）または末梢神経系のいずれかの病変が挙げられるが、これらに限定されない。（１）虚血病変（ここで、神経系の一部における酸素不足により、ニューロンの損傷または死が生じ、これには大脳梗塞もしくは虚血、または脊髄梗塞もしくは虚血が挙げられる）、（２）外傷病変（身体的損傷により生じるかまたは手術に関連する病変、例えば、神経系の一部を切断する病変、または圧縮損傷を含む）、（３）悪性病変（ここで、神経系の一部は、神経系関連悪性腫瘍もしくは非神経系組織由来の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、膿瘍による、またはヒト免疫不全ウイルス、帯状ヘルペスもしくは単純ヘルペスウイルスによる感染か、あるいはライム病、結核、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）に関連する変性が挙げられるが、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欠乏症、葉酸欠乏症、ウェルニッケ病、タバコアルコール性弱視、マルキアファーパービニャーミ病（脳梁の一次変性）およびアルコール小脳変性が挙げられるが、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）全身性疾患に関連する神経性病変（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、癌または類肉腫症が挙げられるが、これらに限定されない）、（８）アルコール、鉛または特定の神経毒を含む、毒性物質により生じる病変、ならびに（９）脱髄性病変（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、進行性多病巣性白質脳障害、および橋中央ミエリン溶解が挙げられるが、これらに限定されない、脱髄性執権により破壊または損傷される）。

【0825】

一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。さらに好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、大脳低酸素症の損傷硬化から神経細胞を保護するために用いられる。この実施形態に従って、本発明の組成物は、大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。この実施形態の1つの非限定態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、大脳虚血と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。この実施形態の別の非限定態様において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、大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。

【0826】

別の好ましいこの実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、脳卒中に関連する大脳神経細胞傷害を処置または予防するために用いられる。

【0827】

別の好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。特定の実施形態において、本発明

のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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大脳神経細胞傷害を処置または予防するために用いられる。

【0828】

神経系障害を処置または予防する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促進における生物学的活性について試験することにより選択され得る。例えば、これらに限定されないが、以下の任意の効果を誘発する本発明の組成物は、本発明に従って有用であり得る。(1) 低酸素症または低酸素状態の存在または非存在下のいずれかの培養におけるニューロンの生存時間の増大、(2) 培地または生体内におけるニューロンの発芽の増大、(3) 培地または生体内におけるニューロン関連分子(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ステラーゼ)の産生の増大、あるいは(4) 生体内におけるニューロン機能障害の症状の軽減。このような効果は、当該技術分野で周知の任意の方法により測定され得る。好ましい非制限的な実施形態において、ニューロンの生存時間の増大は、本明細書に記載される方法、ないしは別様に、例えば、Zhang et al., Proc Natl Acad Sci USA 97:3637-42 (2000)、または、Arakawa et al., J. Neurosci., 10:3507-3515 (1990) 等における、当該技術分野で周知の方法を使用して慣用的に測定され得、ニューロンの発芽の増大は、例えば、Pestronk et al., Exp. Neurol., 70:65-82 (1980)、またはBrown et al., Ann. Rev. Neurosci., 4:17-42 (1981) 等に記載される当該技術分野で周知の方法により検出され得、ニューロン関連分子の産生の増大は、当該技術分野で公知の技術を使用し、測定されるべき分子に応じて、バイオアッセイ、酵素アッセイ、抗体結合、ノーザンブロットアッセイ等により測定され得、運動ニューロンの機能障害は、運動ニューロン障害の物理的発現(例えば、弱さ、運動ニューロンの伝導速度、または機能障害)を評価することにより測定され得る。

【0829】

特定の実施形態において、本発明に従って処置され得る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得る変性疾患または悪性腫瘍等の障害、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)が挙げられるが、これらに限定されない障害が挙げられるが、これらに限定されない。

【0830】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ニューロンの生存、ナプス形成、コンダクタンス、神経分化等において役割を果たし得る。したがって、本発明の組成物(本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または認識が挙げられるが、これらに限定されない、これらの役割に関連する疾患もしくは障害を診断および／または処置または予防するために使用され得る。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り得る。このような神経変性疾患状態および／または行動障害としては、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、ならびに摂食、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変化が挙げられるが、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得る。

【0831】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、またはワレンベルク症候群）、脳出血症（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、鎖骨下動脈盗血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、群発性頭痛または片頭痛）が挙げられるが、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ために有用であり得る。

10

【0832】

本発明のなおさらなる一態様に従って、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、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを利用するための過程が提供される。したがって、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。

20

【0833】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、脳疾患、例えば、母性フェニルケトン尿症等のフェニルケトン尿症を含む代謝脳疾患、ビ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等の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が挙げられる。

30

【0834】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、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ワレンベルク症候群、脳出血症、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、鎖骨下動脈盗血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、群発性頭痛および片頭痛が挙げられる。

40

【0835】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、認知症、例えば、AIDS認知症合併症、初老期認知症、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、老年性認知症、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、ブドウ膜炎候群、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

50

、例えば、幼児性けいれん、欠神発作、M E R R F 症候群を含むミオクロノステんかん、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、例えば、持続性部分てんかん等を含むてんかん重積状態、ならびにハレルフォルデンスパッツ症候群のてんかんを含む全般てんかんが挙げられる。

【0836】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、ダンディウォーカー症候群および正常圧水頭症等の水頭症、視床下部性新生物等の視床下部性疾患、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、A I D S 痴呆複合症等の中枢神経系感染、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、馬脳脊髄炎等の脳脊髄炎、ベネズエラ馬脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、ビスナ、ならびに脳マラリアが挙げられる。

10

【0837】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、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、横断性脊髄炎等の脊髄炎、脊髄癆等の神経梅毒、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）、ならびに脳トキソプラズマ症が挙げられる。

20

【0838】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、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、ローレンスムーニャードル症候群、レッシュナイハン症候群、メーブルシロップ尿症、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、W A G R 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が挙げられる。

30

40

【0839】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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

50

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、バレーリユー（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等の斜視、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、糖尿病足が挙げられる。

【0840】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、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（先天性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が挙げられる。

【0841】

内分泌障害

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質

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、ならびに／あるいは内分泌系の障害または疾患を処置、予防、診断、および／または予後診断するために使用され得る。

【0842】

内分泌系の腺により分泌されるホルモンは、身体発育、性機能、代謝、および他の機能を制御する。障害は、2通り、すなわちホルモンの産生における障害、およびホルモンに応答する組織の不全に分類され得る。これらのホルモン異常および内分泌系の疾患、障害または状態の病因は、遺伝的、体細胞性（例えば、癌およびいくつかの自己免疫疾患）、後天性（例えば、化学治療、損傷または毒素によって）、または感染性であり得る。さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。

10

【0843】

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、子宮運動の障害を包含し、これには、妊娠および陣痛に伴う合併症（例えば、早期陣痛、過期妊娠、自然流産、ならびに遅延陣痛および停止した陣痛）、ならびに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）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0844】

内分泌系および／またはホルモン異常の障害および／または疾患としては、膵臓の障害および／または疾患（例えば、真性糖尿病、尿崩症、先天性白内障欠損、褐色細胞腫—島細胞腫瘍症候群）、副腎の障害および／または疾患（例えば、アジソン病、コルチコステロイド欠損、男性化作用疾患、多毛症、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、下垂体性小人症、下垂体腺腫、汎下垂体機能低下症、先端巨大症、巨人症）、甲状腺の障害および／または疾患（甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症、プラマー病、グレーヴス病（毒性散在甲状腺腫）、毒性小結節甲状腺腫、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、クレチン病、甲状腺中毒症、甲状腺ホルモン縮合障害、チミン形成不全症、甲状腺のヒュルトレ細胞腫瘍、甲状腺癌、甲状腺悪性腫瘍、髄様甲状腺癌が挙げられるが、これらに限定されない）、副甲状腺の障害および／または疾患（例えば、上皮小体機能亢進症、上皮小体機能低下症）、視床下部の障害および／または疾患が挙げられる。

20

30

【0845】

加えて、内分泌系および／またはホルモン異常の障害および／または疾患はまた、癌を含む、精巣または卵巣の障害および／または疾患を含み得る。精巣または卵巣の他の障害および／または疾患としては、例えば、卵巣癌、多嚢胞性卵巣症候群、クラインフェルター症候群、消失精巣症候群（両側無辜丸症）、ライディッヒ細胞の先天性欠損、停留辜丸、ヌーナン症候群、筋緊張性ジストロフィー、精巣の毛細血管腫（良性）、精巣および新精巣の新生組織形成がさらに挙げられる。

【0846】

さらに、内分泌系および／またはホルモン異常の障害および／または疾患はまた、例えば、多内分泌腺機能低下症候群、褐色細胞腫、神経芽細胞腫、多発性内分泌腺腫症等の障害および／または疾患、ならびに内分泌組織の障害および／または癌を含み得る。

40

【0847】

別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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タンパク質の治療用タンパク質部分に対応する治療用タンパク質が発現される、組織に関連する内分泌疾患および／または障害を診断、予後診断、予防、および／または処置するために使用され得る。

【0848】

生殖器系障害

50

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。本発明の組成物により処置され得る生殖器系障害としては、生殖器系傷害、感染、腫瘍性障害、先天性欠損、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が挙げられるが、これらに限定されない。

【0849】

生殖器系障害および／または疾患としては、精巣萎縮症、精巣性女性化症候群、停留睾丸（片側および両側）、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、結核症および梅毒等の感染から生じる）、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）を含む精巣の疾患および／または障害が挙げられる。

10

【0850】

生殖器系障害としてはまた、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肥厚、および前立腺腫瘍性障害（腺癌をふくむ）、移行上皮癌、腺管癌、および扁平上皮癌等の前立腺の障害が挙げられ得る。

20

【0851】

さらに、本発明の組成物は、炎症性障害（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；前癌性病変（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）；陰茎癌（扁平上皮細胞癌腫、原位置の癌腫、疣状癌腫および播種性陰茎癌腫を含む）；尿道性腫瘍性障害（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）；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り得る。

30

【0852】

さらに、輸精管の疾患および／または障害としては、脈管炎およびCBAVD（輸精管の先天性両側性精管欠損）が挙げられ、さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、包虫症、先天性塩素下痢および多発性嚢胞腎臓疾患を含む、精囊の疾患および／または障害の診断、処置および／または予防において使用され得る。

【0853】

男性生殖器系の他の障害および／または疾患としては、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、および女性化乳房が挙げられる。

40

【0854】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、融合タンパク質、および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、膣瘻、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、

50

処置および／または予防において有用であり得る。

【0855】

子宮の障害および／または疾患としては、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、胎状奇胎、アッシエルマン症候群、早期閉経、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、平滑筋肉腫、および肉腫）が挙げられる。さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、双角子宮、中隔子宮、単純単角子宮、非空腔性不全角を有する単角子宮、非交通空腔不全角を有する単角子宮、交通空腔角を有する単角子宮、弓状子宮、子宮二空洞およびT型子宮等の子宮異常のマーカーまたは

10

【0856】

卵巣疾患および／または障害としては、無排卵、多嚢胞性卵巣症候群（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（一次および二次癌増殖、セルトリライディッヒ腫瘍、卵巣の類内膜癌、卵巣乳頭漿液性腺癌、卵巣粘液性腺癌、および卵巣クルッケンベルグ腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられる。

【0857】

子宮頸疾患および／または障害としては、子宮頸管炎、慢性子宮頸管炎、粘液膿性子宮頸管炎、子宮頸部形成異常、頸部ポリープ、ナボット嚢胞、子宮腔部びらん、子宮腔部不全、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）が挙げられる。

20

【0858】

さらに、生殖器系の疾患および／または障害としては、流産および死産（例えば、早期の中絶、後期の中絶、自然流産、人工流産、治療的流産、切迫流産、稽留流産、不全流産、完全流産、習慣性流産、稽留流産、および敗血性流産）、異所性妊娠、貧血、Rh不適合、妊娠中の腔内出血、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／または疾患を含む。さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、心臓疾患、心不全、リウマチ性心臓疾患、先天性心臓疾患、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、感染性肝炎、クラミジア、HIV、AIDS、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使用され得る。

30

【0859】

陣痛および分娩に関連する合併症としては、膜の早期破裂、早期陣痛、過期妊娠、過熟妊娠症、非常に遅く進行する陣痛（labor that progresses too slowly）、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が挙げられる。

【0860】

さらに、出産後期間の疾患および／または障害としては、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、伏在静脈血栓性静脈炎、乳腺炎、膀胱炎、分娩後出血、および子宮反転症が挙げられる。

【0861】

50

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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／または予防され得る女性生殖系の他の障害および／または疾患としては、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）が挙げられる。

【0862】

感染症

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。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、感染症は処置され得る。免疫応答は、存在する免疫応答を高めるか、あるいは新しい免疫応答を開始させるかのいずれかにより、増大され得る。代替として、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、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得る。

【0863】

ウイルスは、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。ウイルスの例としては、以下のDNAおよびRNAウイルスおよびウイルスファミリーが挙げられるが、これらに限定されないウイルスの例が挙げられるが、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、サルコウイルス科、コロナウイルス科、デング熱、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、带状疱疹）、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、インフルエンザA、インフルエンザB、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-II、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、眼感染症（例えば、結膜炎、角膜炎）、慢性疲労症候群、肝炎（A型、B型、C型、E型、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、日和見感染症（例えば、AIDS）、肺炎、パーキットリンパ腫、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、性感染症、皮膚疾患（例えば、カボジ肉腫、いぼ）、およびウイルス血症が挙げられるが、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タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。追加の特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、1つ以上の他の市販の肝炎ワクチンに非応答性の患者を処置するために用いられる。さらに特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、AIDSを処置するために用いられる。

【0864】

同様に、疾患または症状を引き起こし得、かつ本発明のアルブミン融合タンパク質およ

び／または本発明のアルブミン融合タンパク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性あるいは真菌性因子は、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（*Nocardia*））、アシネトバクター属、クリプトコッカスネオフォルマンズ（*Cryptococcus neoformans*）、アスペルギルス、バシラス科（例えば、炭疽菌（*Bacillus anthracis*））、バクテロイデス属（例えば、*Bacteroides fragilis*）、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 difficile*）、クロストリジウムパーフリンジェンス（*Clostridium perfringens*）、*Clostridium tetani*）、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 diphtheriae*））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（*Shigella*）、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（*Vibrio cholerae*）、ナイセリア科（例えば、淋菌（*Neisseria gonorrhoea*）、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*））、パスツレラ属、プロテウス属、シュドモナス（例えば、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*））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（*Meningiobacillus*）、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*））、ならびにA、BおよびC群の連鎖球菌）、ならびにウレアプラズマ属が挙げられるが、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としては、抗生物質耐性感染、菌血症、心内膜炎、敗血症、眼感染症（例えば、結膜炎）、ブドウ膜炎、結核症、歯肉炎、細菌下痢、日和見感染症（例えば、AIDS関連感染）、爪周囲炎、プロテゼ関連感染、虫歯、ライター病、気道感染症（例えば、百日咳または蓄膿症）、敗血症、ライム病、ネコ引っかき病、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、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、大腸炎、膣炎、不妊、骨盤内炎症性疾患、カンジダ症、バラ結核、結核症、狼瘡、ボツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿瘍、リウマチ熱、猩紅熱、性感染症、皮膚疾患（例えば、蜂巣炎、皮膚腫瘍）、毒血症、尿道感染、創傷感染、院内感染が挙げられるが、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タンパク質および／または

10

20

30

40

50

本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。

【0865】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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性因子は、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、瘧疾、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 vivax*）、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）、四日熱マラリア原虫（*Plasmodium malariae*）および卵形マラリア原虫（*Plasmodium ovale*））が挙げられるが、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、眼感染症、腸疾患（例えば、赤痢、ランブル鞭毛虫症）、肝臓疾患、肺疾患、日和見感染症（例えば、AIDS関連）、マラリア、妊娠合併症、およびトキソプラズマ症が挙げられるが、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タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。特定の実施形態において、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。

【0866】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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タンパク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に戻す（生体外治療）かのいずれかによるものであり得る。さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、感染症に対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使用され得る。

【0867】

再生

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、細胞を分化させ、増殖させ、誘引させ、組織の再生を導くために使用され得る（*Science* 276:59-87（1997）を参照のこと）。組織の再生は、先天性欠損、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、肝不全）、美容形成術を含む手術、線維症、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使用され得る。

【0868】

本発明を用いて再生され得る組織としては、器官（例えば、脾臓、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、および靱帯）組織が挙げられる。好ましくは、再生は、瘢痕なく、または瘢痕が低減されて生じる。再生はまた、血管新生も含み得る。

【0869】

さらに、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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得る。例えば、腱／靱帯

の再生の増大は、損傷後の回復時間を早める。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。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損を含む。治癒しない創傷の組織再生のさらなる一例としては、床擦れ、血管不全、手術および外傷性創傷に関連する潰瘍が挙げられる。

【0870】

同様に、神経および脳組織も、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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としては、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）が挙げられる。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医学的療法から生じる）、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）に関連する疾患はすべて、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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。

10

【0871】

胃腸障害

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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（小腸のカリチノイド腫瘍、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）を含む胃腸障害を処置、予防、診断、および／または予後診断するために使用され得る。

20

【0872】

胃腸障害としては、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、胃のポリープ、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、慢性びらん性、萎縮性、血漿細胞、およびメネトリエ病）、ならびに腹膜疾患（例えば、乳び腹膜、腹腔内出血、腸間膜嚢胞、腸間膜リンパ節炎、腸間膜血管閉塞、皮下脂肪組織炎、新生物、腹膜炎、気腹、乳児横隔膜下腫瘍（bubphrenic abscess））を含む。

30

【0873】

胃腸障害としてはまた、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な回転障害、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（*Ascaris lumbricoides*）、鉤虫（*Ancylostoma duodenale*）、線虫（*Enterobius vermicularis*）、条虫（*Taenia saginata*）、単包条虫（*Echinococcus granulosus*）、裂頭条虫類（*Diphyllobothrium spp.*）、および有鉤条虫（*T. solium*）による感染）が挙げられる。

40

【0874】

肝臓疾患および／または障害としては、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）、肝膿瘍（アメーバ性肝膿瘍）、肝硬変（アルコール性、胆汁性および実験的）、アルコール性肝臓疾患（脂肪肝、肝炎、肝硬変）、寄生虫（肝包虫症、肝蛭症、アメーバ性肝膿瘍）、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

50

、薬物誘導性）、毒性肝炎、ウイルス性肝炎（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、肝性脳症、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、胆汁石、肝不全（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、線維性層状肝細胞癌、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、間葉過誤腫、肝臓の間葉腫瘍、結節性再生式過形成、良性肝臓腫瘍（肝嚢胞〔単純嚢胞、多嚢胞性肝臓疾患、肝胆汁性嚢胞腺腫、総胆管嚢胞〕、間葉腫瘍〔間葉過誤腫、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、ミスセラネウス（Miscellaneous）〕、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、カボジ肉腫、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。

10

【0875】

膵臓疾患および／または障害としては、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、島一細胞腫瘍、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、機能不全））が挙げられる。

20

【0876】

胆嚢疾患としては、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、胆管腫瘍および涙嚢腫が挙げられる。

【0877】

大腸の疾患および／または障害としては、抗生物質関連大腸炎、憩室炎、潰瘍性大腸炎、後天性巨大結腸、膿瘍、真菌および細菌感染、肛門直腸疾患（例えば、裂溝、痔）、結腸疾患（大腸炎、結腸新生物（結腸癌、腺腫様結腸ポリープ（例えば、絨毛腺腫）、結腸癌腫（colon carcinoma）、結腸直腸癌）、結腸憩室炎、結腸憩室症、巨大結腸（ヒルシュスプルング病、有害な巨大結腸）；S状疾患（sigmoid diseases）〔直腸結腸炎、S字結腸新生物〕）、便秘症、クローン病、下痢（乳児期下痢、赤痢）、十二指腸疾患（十二指腸新生物、十二指腸閉塞症、十二指腸潰瘍、十二指腸炎）、腸炎（全腸炎）、HIV腸症、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（潰瘍性大腸炎、クローン病）、腸閉鎖、寄生虫病（アニサキス症、バランチジウム症、プラストシスティス属感染症、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症（dientamoebiasis）、アメーバ赤痢、ランブル鞭毛虫症）、腸瘻（直腸瘻）、腸新生物（盲腸新生物、結腸新生物、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（intestinal pseudo-obstruction）〔盲腸捻転〕、腸重積症）、腸穿孔（intestinal perforation）、腸ポリープ（結腸ポリープ、ガードナー症候群、ポイツジェガーズ症候群）、空腸疾患（空腸新生物）、吸収不良症候群（盲係蹄症候群、セリアック病、乳糖不耐症、短腸症候群、熱帯性スブルー、ウィップル病）、腸間膜血管閉塞、腸壁嚢胞状気腫、タンパク喪失性腸症（腸リンパグリエクタシス（intestinal lymphagiectasis））、腸疾患（肛門疾患、便失禁、痔、直腸炎、腸瘻、脱腸、直腸瘤）、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、塩酸欠乏症、胃十二指腸の逆流（胆汁逆流）、胃洞血管膨張（gastric antral vascular ectasia）、胃瘻、胃排出口閉塞（gastric outlet obstruction）、胃炎（

30

40

50

萎縮性または肥大性)、胃不全麻痺、胃拡張、胃憩室、胃新生物(胃癌、胃ポリープ、胃腺癌、増殖性胃ポリープ)、胃破裂、胃潰瘍、胃腸軸捻)、結核、内臓下垂症、嘔吐(例えば、吐血、妊娠悪阻、手術後悪心および嘔吐)および出血性大腸炎が挙げられる。

【0878】

胃腸系のさらなる疾患および／または障害としては、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、ヘソヘルニア、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))が挙げられる。

10

【0879】

走化性

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、走化性活性を有し得る。走化性分子は、炎症、感染、または増殖過剰部位等の体内の特定部位に、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。

20

【0880】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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得る。次いで、これらの走化性分子は、体内の特定位置に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使用され得る。例えば、走化性分子は、免疫細胞を損傷位置に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使用され得る。本発明の走化性分子は、線維芽を誘引することもでき、これは、創傷を処置するために使用され得る。

30

【0881】

本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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得ることも企図される。これらの分子はまた、障害を処置するために使用され得る。したがって、本発明の融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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使用され得る。

【0882】

結合活性

本発明のアルブミン融合タンパク質は、この融合タンパク質の治療用タンパク質部分に結合する分子、またはこの融合タンパク質の治療用タンパク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使用され得る。融合タンパク質と分子との結合は、結合した融合タンパク質または分子の活性を活性化(アゴニスト)、増大、阻害(アンタゴニスト)、または減少させ得る。このような分子の例としては、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質(例えば、受容体)、または低分子が挙げられる。

40

【0883】

好ましくは、分子は、本発明の融合タンパク質の治療用タンパク質部分の天然のリガンド、例えば、リガンドのフラグメント、または天然の基質、リガンド、構造的模倣物、もしくは機能的模倣物に密接に関連する。(Coligan et al., Curren

50

t 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タンパク質の治療用タンパク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タンパク質の治療用タンパク質部分（例えば、活性部位）が結合できる少なくとも1つの受容体フラグメントに密接に関連し得る。いずれの場合でも、該分子は、周知の技法を用いて合理的に設計され得る。

【0884】

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タンパク質を発現する適切な細胞を産生する工程を含む。好ましい細胞としては、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエ、または大腸菌由来の細胞が挙げられる。

10

【0885】

アッセイは、本発明のアルブミン融合タンパク質への候補化合物の結合を単純に試験し得、ここで、結合は、標識により、または標識された競合物との競合に関するアッセイにおいて検出される。さらに、アッセイは、候補化合物がこの融合タンパク質への結合により生成されるシグナルを生じるか否かを試験し得る。

【0886】

代替として、アッセイは、無細胞調製物、固体支持体に担持させた融合タンパク質／分子、化学ライブラリ、または天然産物の混合物を用いて実施され得る。アッセイはまた、候補化合物とアルブミン融合タンパク質を含有する溶液と混合する工程、融合タンパク質／分子の活性または結合を測定する工程、および融合タンパク質／分子の活性または結合を、標準と比較する工程を単純に含み得る。

20

【0887】

好ましくは、ELISAアッセイは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用して、試料（例えば、生体試料）における融合タンパク質のレベルまたは活性を測定することができる。抗体は、アルブミン融合タンパク質への直接的もしくは間接的に結合させるか、あるいは基質についてのアルブミン融合タンパク質との競合させることにより、融合タンパク質のレベルまたは活性を測定することができる。

【0888】

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分が結合する受容体は、当業者に周知の多くの方法（例えば、リガンドパニングおよびFACSソーティング（Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1 (2), Chapter 5, (1991)）により特定され得る。例えば、応答する細胞から調製される場合に用いられ、融合タンパク質の治療用タンパク質部分がFGFに対応する場合、発現クロニングが採用されてもよく、ここで、ポリアデニル化されたRNAは、アルブミン融合タンパク質に応答する細胞、例えば、FGFファミリータンパク質について複数の受容体を含有することが知られているNIH3T3細胞およびSC-3細胞から調製し、このRNAから作製したcDNAライブラリをプールに分割し、次いで、COS細胞またはアルブミン融合タンパク質に応答しない他の細胞をトランスフェクトするために用いる。ガラススライド上で成長させた形質移入した細胞を、それらを標識化した後に、本発明のアルブミン融合タンパク質に曝露させる。アルブミン融合タンパク質は、部位特異的なタンパク質キナーゼの認識部位に対するヨウ素化または含有を含む、様々な手段により標識化され得る。

30

40

【0889】

固定化および培養後、スライドを、オートラジオグラフィ分析に供する。陽性プールを特定し、およびサブプールを調製し、次いで、反復のサブプール化および再スクリーニングの過程を用いて再度形質移入し、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。

【0890】

受容体特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タンパク質を、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質成分の受容体分子を発現する細胞

50

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線フィルムに曝露され得る。融合タンパク質の受容体を含有する標識された複合体を切り出し、ペプチドフラグメントに分解し、次いで、タンパク質微量配列決定に供し得る。微量配列決定から得られたアミノ酸配列を用いて、縮重オリゴヌクレオチドプローブの対を設計し、cDNAライブラリ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特定することができる。

【0891】

さらに、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリングおよび／またはコドンシャッフリング（「DNAシャッフリング」と総称される）の技法を採用して、融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク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タンパク質のアゴニストおよびアンタゴニストを効果的に生成し得る。概して、米国特許第5,605,793号、同第5,811,238号、同第5,830,721号、同第5,834,252号、および同第5,837,458号、ならびにPatton, P. A., et al, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 (1997)、Harayama, S. Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998)、Hansson, L. O., et al, J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999)、およびLorenzo, M. M. and Blasco, R. Biotechniques 24(2):308-13 (1998)を参照のこと、これらの特許および刊行物の各々は、参照することにより本明細書に組み込まれる。一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク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タンパク質の改変は、DNAシャッフリングにより達成され得る。DNAシャッフリングは、相同または部位特異的組換えにより、所望の分子中への2つ以上のDNAセグメントのアセンブリを含む。別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、およびコードされたアルブミン融合タンパク質は、組換えの前に、誤りがちな（error-prone）PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム変異誘発に供することによって、変更され得る。別の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質の1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメント等は、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメント等と組換えられ得る。好ましい実施形態において、この異種分子は、ファミリーのメンバーである。好ましい実施形態において、異種分子は、ファミリーメンバーである。さらなる好ましい実施形態において、異種分子は、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）、形質転換成長因子（TGF）-アルファ、上皮成長因子（EGF）、線維芽成長因子（FGF）、TGF-ベータ、骨形成タンパク質（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（GDF）、ノーダル（nodal）、MIS、インヒビン-アルファ、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ5、ならびにグリアに由来する神経栄養因子（GDNF）である。

【0892】

他の好ましいフラグメントは、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分および／またはアルブミン成分の生物学的活性のあるフラグメントである。生物学的活性のあるフラグメントは、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分および／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。フラグメントの生物学的活性は、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。

【0893】

さらに、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質の作用を調節するものを特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。このようなアッセイの例は、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タンパク質、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工程を含む。対照アッセイを、スクリーニングされるべき化合物の非存在下にて行い、次いで、化合物の存在下にて線維芽細胞の増殖の量と比較し、各々の場合における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得る。線維芽細胞の増殖の量は、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、この手順により特定され得る。

【0894】

別の方法において、本発明の融合タンパク質の治療用タンパク質成分に対する受容体を発現する哺乳動物細胞または膜調製物は、この化合物の存在下にて本発明の標識化された融合タンパク質と共にインキュベートされる。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。代替として、スクリーニングされるべき化合物と受容体の相互作用後、周知の第2のメッセンジャー系の応答を測定し、受容体に結合し、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タンパク質であるか否かを決定する。このような第2のメッセンジャー系としては、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が挙げられるが、これらに限定されない。

【0895】

これらの上記のアッセイのすべては、診断または予後マーカーとして使用され得る。これらのアッセイを用いて発見される分子は、融合タンパク質／分子を活性化または阻害することにより、疾患を処置するか、あるいは患者に特定の結果（例えば、血管増殖）をもたらすために使用され得る。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の本発明のアルブミン融合タンパク質の産生を阻害または亢進し得る因子を発見し得る。

【0896】

したがって、本発明は、（a）候補結合化合物を本発明のアルブミン融合タンパク質と共に培養する工程、（b）結合が生じたか否かを決定する工程を含む、本発明のアルブミン融合タンパク質に結合する化合物を特定する方法を含む。さらに、本発明は、（a）候補化合物を本発明のアルブミン融合タンパク質と共に培養する工程、（b）生物学的活性をアッセイする工程、および（b）融合タンパク質の生物学的活性が改変されているか否かを決定する工程を含む、アゴニスト／アンタゴニストを特定する方法を含む。

【0897】

標的化された送達

別の実施形態において、本発明は、組成物を、本発明のアルブミン融合タンパク質の成分についての受容体を発現する標的細胞に送達する方法を提供する。

【0898】

本明細書で論じられるように、本発明の融合タンパク質は、疎水性、親水性、イオン性および／または共有結合性の相互作用を介して、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素またはプロドラッグと会合し得る。一実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸と会合した本発明の融合タンパク質（抗体を含む）を投与することによる、本発明の組成物の細胞への特異的な送達のための方法を提供する。一例において、本発明は、治療用タンパク質を標的細胞に送達するための方法を提供する。別例において、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、細胞のゲノムに組み込み得るか、またはエピソームにて複製し得、そして転写され得るDNA）を、標的細胞に送達するための方法を提供する。

【0899】

別の実施形態において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラッグと会合した本発明のアルブミン融合タンパク質（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る細胞の特異的破壊（例えば、腫瘍細胞の破壊）のための方法を提供する。

【0900】

「毒素」とは、内因性の細胞傷害性エフェクター系、放射性同位体、ホロ毒素（holotoxin）、改変型毒素、毒素の触媒サブユニット、または規定の条件下で細胞死を引き起こす細胞中もしくは細胞表面には通常存在しない任意の分子もしくは酵素を、結合および活性化する化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る毒素としては、当該技術分野で公知の放射性同位体、生来のまたは誘導された内因性細胞傷害性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）外毒素A、ジフテリア毒素、サポリン、モモルジン（momordin）、ゲロニン（gelonin）、ヨウシュヤマゴボウ（pokeweed）抗ウイルスタンパク質、アルファサルシンおよびコレラ毒素挙げられるが、これらに限定されない。

10

「細胞傷害性プロドラッグ」とは、通常細胞内に存在する酵素により、細胞傷害性化合物へと変換される非毒性の化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る細胞傷害性プロドラッグとしては、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のリン酸誘導体、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、およびドキシソルビシンのフェノキシアセトアミド誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0901】

薬物スクリーニング

本発明のアルブミン融合タンパク質またはアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分に相当するタンパク質の活性を改変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タンパク質、またはこれらの融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用が、さらに企図される。このような方法は、融合タンパク質を、アンタゴニストまたはアゴニスト活性を有することが疑われる選択された化合物と接触させる工程、および結合後、融合タンパク質の活性をアッセイする工程を含む。

20

【0902】

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タンパク質、またはその結合フラグメント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。このような試験にて採用されるアルブミン融合タンパク質は、固体支持体へ担持され得、細胞表面上で発現され得、溶液中に遊離であり得、または細胞内に位置付けられ得る。薬物スクリーニングの一方法は、アルブミン融合タンパク質を発現している組換え核酸を用いて安定に形質転換される真核または原核宿主細胞を利用する。薬物は、競合的結合アッセイにおいて、このような形質転換細胞またはこのような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、試験されるべき薬剤と本発明のアルブミン融合タンパク質との間の複合体の形成を測定し得る。

30

【0903】

したがって、本発明は、本発明のアルブミン融合タンパク質に仲介される活性に作用する薬物または任意の他の薬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、当該技術分野で公知の方法により、本発明のアルブミン融合タンパク質またはそのフラグメントとこのような薬剤を接触させ、次いで、該薬剤とアルブミン融合タンパク質またはそのフラグメントとの間の複合体の存在についてアッセイすることを含む。このような競合的結合アッセイにおいて、スクリーニングのための薬剤は、典型的に標識化されている。培養後、遊離の薬剤は、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タンパク質に結合する特定の薬剤の能力の尺度である。

40

【0904】

薬物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タンパク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、および欧州特許出願第84/03564号（1984年9月13日発行）にて非常に詳細に記載され、参照することにより本明細書に組み込まれる。簡潔に述べると、大量の異

50

なる小ペプチド試験化合物は、固体基質（例えば、プラスチックピン）またはいくつかの他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タンパク質と反応させ、洗浄する。次いで、結合ペプチドは、当該技術分野で公知の方法により検出される。精製されたアルブミン融合タンパク質は、前記の薬物スクリーニング技法で用いるために、プレート上に直接コーティングされ得る。加えて、非中和抗体を用いて、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定し得る。

【0905】

本発明はまた、競合的薬物スクリーニングアッセイの使用も企図され、ここで、本発明のアルブミン融合タンパク質に結合し得る中和抗体は、アルブミン融合タンパク質またはそのフラグメントに結合する試験化合物と特異的に競合する。この方法で、抗体は、本発明のアルブミン融合タンパク質と1つ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。

【0906】

結合ペプチドおよび他の分子

本発明はまた、本発明のアルブミン融合タンパク質に結合するポリペプチドおよび非ポリペプチドを特定するためのスクリーニング方法、ならびにそれによって特定された結合分子を包含する。これらの結合分子は、例えば、本発明のアルブミン融合タンパク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。このようなアゴニストおよびアンタゴニストは、本発明に従って、以下に詳細に記載される治療実施形態において使用され得る。

【0907】

この方法は、本発明のアルブミン融合タンパク質を多数の分子と接触させる工程、およびアルブミン融合タンパク質に結合する分子を特定する工程を含む。

【0908】

本発明のアルブミン融合タンパク質を多数の分子と接触させる工程は、多数の方法によりもたらされ得る。例えば、アルブミン融合タンパク質を固体支持体上に固定化させ、多数の分子の溶液を固定したポリペプチドと接触させることを企図し得る。このような手順は、固定した本発明のアルブミン融合タンパク質からなる親和性マトリックスを用いるアフィニティークロマトグラフィープロセスに類似している。その後、アルブミン融合タンパク質に対して選択的な親和性を有する分子が、親和性選択によって精製され得る。固体支持体の性質、アルブミン融合タンパク質の該固体支持体への付着に関するプロセス、溶媒、および親和性単離または親和性選択の条件は、大部分が慣用的であり、当業者に公知である。

【0909】

代替として、多数のポリペプチドはまた、ポリペプチドのサブセットまたは個々のポリペプチドを含む実質的に別々の画分へ分離され得る。例えば、多数のポリペプチドは、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー等によるポリペプチドの分離に関して当業者に公知の方法により分離され得る。個々のポリペプチドはまた、形質転換された宿主細胞（例えば、組換えファージ）により、その外表面上またはその周囲で発現されるように生成することができる。次いで、個々の単離物は、アルブミン融合タンパク質により「プローブ化」され得、必要に応じて発現に必要とされ得るであろう誘導物質の存在下で、アルブミン融合タンパク質と個々のクローンとの間で任意の選択的親和性相互作用が起こったかどうかを決定することができる。アルブミン融合タンパク質を個々のポリペプチドを含む各画分と接触させる前に、該ポリペプチドは、まず、さらなる簡便性のために固体支持体に移され得る。このような固体支持体は、単に、例えば、ニトロセルロースまたはナイロンでできたフィルター膜の断片であり得る。この方法で、陽性クローンは、発現ライブラリの形質転換された宿主細胞の集団（これらは、本発明のアルブミン融合タンパク質に対して選択的親和性を有するポリペプチドをコードするDNA構築物を持つ）から特定され得る。さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質に対して選択的親和性を有するポリペプチドのアミノ酸配列が、従来の手段により直接決定され得るか、またはこのポリペプチドを

コードするDNAのコード配列が、頻繁により簡便に決定され得る。その後、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ものである場合、マイクロ配列決定技法を使用し得る。該配列決定技法は、質量分析法を含み得る。

【0910】

ある状況において、選択的親和性相互作用の存在を決定または検出しようと試みる前に、未結合のポリペプチドを、本発明のアルブミン融合タンパク質と多数のポリペプチドの混合物から洗浄除去することが望ましくあり得る。このような洗浄工程は、本発明のアルブミン融合タンパク質または多数のポリペプチドが固体支持体に結合する場合に、特に望ましくあり得る。

10

【0911】

本方法に従って提供される多数の分子は、多様性ライブラリ（例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質へ特異的に結合する分子をスクリーニングし得るランダムまたはコンビナトリアルペプチドもしくは非ペプチドライブラリ）として提供され得る。使用され得る多くのライブラリ（例えば、化学合成ライブラリ、組換えライブラリ（例えば、ファージディスプレイライブラリ）、および体外翻訳ベースのライブラリ）が、当該技術分野で周知である。化学合成ライブラリの例は、Fodor et al., Science 251:767-773 (1991)、Houghten et al., Nature 354:84-86 (1991)、Lam et al., Nature 354:82-84 (1991)、Medynski, Bio/Technology 12:709-710 (1994)、Gallop et al., J. Medicinal Chemistry 37(9):1233-1251 (1994)、Ohlmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926 (1993)、Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426 (1994)、Houghten et al., Biotechniques 13:412 (1992)、Jayawickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1614-1618 (1994)、Salmon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11708-11712 (1993)、PCT公開第WO93/20242号、およびBrenner and Lerner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383 (1992)において記載される。

20

30

【0912】

ファージディスプレイライブラリの例は、Scott et al., Science 249:386-390 (1990)、Devlin et al., Science 249:404-406 (1990)、Christian et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:711-718 (1992)、Lenstra, J. Immunol. Meth. 152:149-157 (1992)、Kay et al., Gene 128:59-65 (1993)、およびPCT公開第WO94/18318号（1994年8月18日）において記載される。

【0913】

体外での翻訳ベースのライブラリとしては、PCT公開第WO91/05058号（1991年4月18日）およびMattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026 (1994)に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0914】

非ペプチドライブラリの例として、ベンゾジアゼピンライブラリ（例えば、Bunin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712 (1994)を参照のこと）が、使用のために適応され得る。ペプトイドライブラリ（Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371 (1992)）がまた使用され得る。使用され得るライブラリの別

50

の例は、Ostreshら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142 (1994)) により記載され、ここでは、ペプチド中のアミド官能基が、ペルメチル化されて、化学的に形質転換され、コンビナトリアルライブラリを生成する。

【0915】

本発明において有用な非ペプチドライブラリの多様性は大きい。例えば、Eckers and Crooke (Bio/Technology 13:351-360 (1995)) は、様々なライブラリ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、ピフェニル、糖アナログ、ペーターメルカプトケトン、アリアル酢酸、アシルピペリジン、ベンゾピラン、クバン、キサントニン、アミニミドおよびオキサゾロンを列挙している。

10

【0916】

非ペプチドライブラリは、2つの型、すなわち修飾されたモノマーおよびオリゴマーに大きく分類され得る。修飾モノマーライブラリは、比較的単純な骨格構造を使用し、この上に様々な官能基が付加される。しばしば、骨格は、周知の有用な薬理学的活性を有する分子である。例えば、骨格は、ベンゾジアゼピン構造であり得る。

【0917】

非ペプチドオリゴマーライブラリは、モノマーの順序に依存して新たな形状を作製する状態で共に構築される、多数のモノマーを利用する。使用されるモノマー単位の中には、カルバメート、ピロリノン、およびモルホリノがある。ペプトイド (側鎖がアルファ炭素よりもアルファアミノ基に付着するペプチド様オリゴマー) は、非ペプチドオリゴマーライブラリの別のバージョンの基礎を形成する。最初の非ペプチドオリゴマーライブラリは、単一型のモノマーを利用し、したがって、反復骨格を含有した。最近のライブラリは1より多くのモノマーを利用し、ライブラリには柔軟性がある。

20

【0918】

ライブラリをスクリーニングすることは、様々な一般的に周知の方法のいずれかにより達成され得る。例えば、ペプチドライブラリのスクリーニングを開示する以下の参考文献は、Parmley et al., Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218 (1989)、Scott et al., Science 249:386-390 (1990)、Fowlkes et al., BioTechniques 13:422-427 (1992)、Oldenburg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5393-5397 (1992)、Yue et al., Cell 76:933-945 (1994)、Staudt et al., Science 241:577-580 (1988)、Bock et al., Nature 355:564-566 (1992)、Tuerk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6988-6992 (1992)、Ellington et al., Nature 355:850-852 (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5,198,346号 (すべてLadnerらによる)、Rebar et al., Science 263:671-673 (1993)、ならびにPCT公開第WO94/18318号を参照のこと。

30

40

【0919】

特定の実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質を結合する分子を特定するためのスクリーニングは、ライブラリのメンバーを固相に固定化された本発明のアルブミン融合タンパク質と接触させ、アルブミン融合タンパク質に結合するこれらのライブラリメンバーを回収することにより実行され得る。「パニング」技法と言われる、このようなクリーニング方法の例は、Parmley et al., Gene 73:305-318 (1988)、Fowlkes et al., BioTechniques 13:422-427 (1992)、PCT公開第WO94/18318号、および本明細書に引用された参考文献に例として記載される。

50

【0920】

別の実施形態において、酵母において相互作用タンパク質を選択するための2ハイブリッド法（（Fields et al., Nature 340:245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. 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特定するために使用され得る。

【0921】

結合分子がポリペプチドである場合、ポリペプチドは、ランダムペプチドライブラリ、コンビナトリアルペプチドライブラリ、またはバイアスペプチドライブラリを含む任意のペプチドライブラリから簡便に選択され得る。「バイアス（biased）」という用語は、この場合のペプチドにおいて、ライブラリを作製する方法が、生じる分子回収の多様性を支配する1つ以上のパラメータを制限するように操作されることを意味するために本明細書に使用される。

【0922】

したがって、真のランダムペプチドライブラリは、ペプチドの所定の位置に特定のアミノ酸を見出す可能性がすべて20のアミノ酸に関して同じである、ペプチドの回収物を作製する。しかしながら、例えば、リジンがアミノ酸5つごとに生じることを特定するか、またはデカペプチドライブラリの4位、8位および9位がアルギニンのみを含むように固定して特定化することにより、バイアスをライブラリ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企図され得、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、例えば、ファージディスプレイペプチドライブラリおよびDNA挿入物を有するラムダファージベクターを含むDNA構築物を利用するものを企図する。

【0923】

上記のように、結合分子（ポリペプチドである）の場合、ポリペプチドは、約6から約60未満のアミノ酸残基を有し、好ましくは約6～約10のアミノ酸残基、より好ましくは約6～約22のアミノ酸であり得る。別の実施形態において、結合ポリペプチドは、15～100の範囲のアミノ酸、または20～50の範囲のアミノ酸を有する。

【0924】

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。

【0925】

他の活性

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、血管内皮細胞増殖を刺激する能力の結果として、様々な疾患状態（例えば、血栓症、動脈硬化、および他の心臓血管の状態）に起因する虚血組織の再血管再生を刺激するための処置において利用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、上記で論じられるように、血管新生および肢の再形成を刺激するために利用され得る。

【0926】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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採用され得、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、したがって、損傷または疾患組織の修復または置換を促進するからである。

【0927】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、ニューロンの成長を刺激し、あるニューロンの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関連複合体）におい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利用され得る。

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、軟骨細胞増殖を刺激する能力を有し得、したがって、これらは、骨および歯周の再形成を増強し、組織移植または骨の移植片における補助のために利用され得る。

【0928】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、ケラチノサイト増殖を刺激することにより、日焼けに起因する皮膚の老化を予防するために利用され得る。

【0929】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、脱毛を予防するために利用され得る。同じように、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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利用され得る。

【0930】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、移植前の器官を維持するため、または一次組織の細胞培養を支持するために採用され得る。本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、初期の胚における分化のために、中胚葉起源の組織を誘導するために採用され得る。

【0931】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、上記に論じられるように、造血系統に加えて、胚性幹細胞の分化もしくは増殖を増加または減少し得る。

【0932】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、哺乳動物の特徴（例えば、身長、体重、毛の色、眼の色、皮膚、脂肪組織の割合、色素沈着、大きさ、および形（例えば、美容外科））を調節するために使用され得る。同様に、本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク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、および貯蔵に影響を及ぼす哺乳動物の代謝を調節するために使用され得る。

【0933】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、バイオリズム、カリカディック（*caricadic*）リズム、鬱病（鬱障害を含む）、暴力の傾向、疼痛への耐性、生殖能力（好ましくは、アクチビンもしくはインヒビン様活性により）、ホルモンもしくは内分泌レベル、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使用され得る。

【0934】

本発明のアルブミン融合タンパク質および／または本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、貯蔵能力、脂肪含有量、脂質、タンパク質、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加または減少させるような食品添加物または保存剤として使用され得る。

【0935】

上記で引用される適用は、広範な様々な宿主における用途を有する。このような宿主としては、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、非ヒト霊長類、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、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。好ましい実施形態において、宿主は哺乳類である。最も好ましい実施形態において、宿主はヒトである。

【0936】

本発明を概括的に説明したが、以下の実施例を参照することにより、より容易に理解される。該実施例は、例示のために提供されており、制限することを意図されない。

【0937】

さらなる記載がなくとも、当業者は、前記および以下の例示的な実施例を用いて、本発明におい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る。したがって、以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を特に示しているが、残りの開示内容をいかようにも限定するものではない。

【実施例】

【0938】

実施例1：pScNHSAおよびpScCHSAの生成

ベクターpScNHSA（ATCC信託番号PTA-3279）およびpScCHSA（ATCC信託番号PTA-3276）は、pPPC0005（ATCC信託番号PTA-3278）の誘導体であり、そして治療用タンパク質またはそれらのフラグメントもしく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を有する翻訳フレームに隣接して、または翻訳フレーム中に挿入されるクローニングベクターとして使用される。pScCHSAは、治療用タンパク質HSA融合を生じるために使用され得る一方、pScNHSAは、HSA治療用タンパク質融合を生じるために使用され得る。

【0939】

pScCHSA：アルブミン部分C末端と治療用部分のアルブミン融合物の生成

治療用タンパク質のN末端をコードするDNAの成熟アルブミンタンパク質をコードするDNAのクローニングを促進するためのベクターを、pPPC0005のキメラHSAシグナルペプチドをコードする核酸配列がXhoIおよびClaI制限酵素部位を含むように変更することにより作製した。

【0940】

まず、pPPC0005に固有のXhoIおよびClaI部位（ADH1終結配列の3'に位置する）を、XhoIおよびClaIでpPPC0005を消化し、T4 DNAポリメラーゼで突出末端を充填し、平滑末端を再連結することで取り除き、pPPC0006を作製した。

【0941】

次に、XhoIおよびClaI制限酵素部位を、2ラウンドのPCRを用いて、pPPC0006中のHSA（HSAリーダーのキメラおよび接合因子α「MAF」由来のkex2部位）のシグナルペプチドをコードする核酸配列中に操作した。第1ラウンドのPCRにおいて、配列番号36および配列番号37として示した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配列の一部、接合因子アルファのリーダー配列由来のkex2部位、および成熟型HSAのアミノ末端の一部を含む。4つの点変異を配列に導入し、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。これらの4つの点変異は、以下に示した配列中に下線を引いて示す。pPPC0005において、5'から3'までのこれらの4つの位置のヌクレオチドは、T、G、T、およびGである。

5' - G C C T C G A G A A A G A G A T G C A C A C A A G A G T G A G G T T G C T C A T C G A T T T A A A G A T T T G G G - 3'（配列番号36）および

5' - A A T C G A T G A G C A A C C T C A C T C T T G T G T G C A T C T C T T T T C T C G A G G C T C C T G G A A T A A G C - 3'（配列番号37）。その後、第2ラウンドのPCRは、上流の隣接プライマー5' - T A C A A A C T T A A G A G T C C A A T T A G C - 3'（配列番号38）および下流の隣接プライマー5' - C A C T T C T C T A G A G T G G T T T C A T A T G T C T T - 3'（配列番号39）を用いて実施

10

20

30

40

50

された。その後、得られたPCR産物を精製し、A f l I IおよびX b a Iで消化し、p P P C 0 0 0 6中の同じ部位に連結して、p S c C H S Aを作製した。得られたプラスミドは、シグナル配列に操作された、X h o IおよびC l a I部位を有する。X h o I部位の存在により、L D K RからL E K Rへのシグナル配列の末端に1アミノ酸の変化を生じる。このDからEへの変化は、5' S a l I部位（これは、X h o I部位と適合性である）および3' C l a I部位を有する、アルブミン融合タンパク質の治療剤部分をコードするポリヌクレオチドを含む核酸配列が、p S c C H S AのX h o IおよびC l a I部位に連結される場合、最終的なアルブミン融合タンパク質発現プラスミド中に存在しない。S a l IのX h o Iへの連結は、シグナルペプチド配列の元のアミノ酸配列を回復させる。アルブミン融合タンパク質の治療用部分をコードするDNAを、K e x 2部位（K e x 2は、シグナルペプチドの末端の二塩基性アミノ酸配列K Rの後ろで切断する）の後ろで、かつC l a I部位の前に挿入され得る。

【0942】

p s c N H S A：アルブミン部分のN末端と治療用タンパク質のアルブミン融合物の生成
治療用タンパク質部分のC末端をコードするDNAを、成熟アルブミンタンパク質をコードするDNAにクローニングするのを促進するベクターを、3つの8塩基対制限酵素部位をp S c C H S Aに加えることにより作製した。成熟H S Aタンパク質をコードする核酸配列の末端のB s u 3 6 IとH i n d I I I部位の間に、A s c I、F s e I、およびP m e I制限酵素部位を加えた。これは、下線を引いて示したA s c I、F s e I、およびP m e I制限酵素部位を含有する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）の使用により達成され得た。5' - A A G C T G C C T T A G G C T T A T A A T A A G G C G C G C C G G C C G G C C G T T T A A A C T A A G C T T A A T T C T - 3'（配列番号40）および

5' - A G A A T T A A G C T T A G T T T A A A C G G C C G G C C G G C G C G C C T T A T T A T A A G C C T A A G G C A G C T T - 3'（配列番号41）。これらのプライマーを、B s u 3 6 IおよびH i n d I I Iを用いてアニールし、消化し、p S c C H S Aの同じ部位に連結して、p S c N H S Aを作製した。

【0943】

実施例2：酵母形質転換のための一般的な構築物生成

ベクターp S c N H S Aおよびp S c C H S Aは、治療用タンパク質またはそれらのフラグメントもしく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「H S A」をコードするポリヌクレオチドに隣接して挿入されるクローニングベクターとして使用され得る。p S c C H S Aは、治療用タンパク質H S A融合を生じるために使用される一方、p S c N H S Aは、H S A治療用タンパク質融合を生じるために使用され得る。

【0944】

H S A-治療用タンパク質融合産物を含むアルブミン融合構築物の生成

治療用タンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号Xで示される、または当該技術分野で周知の配列）を、融合構築物の生成を促進するプライマー（例えば、制限酵素部位を加えることにより、継ぎ目のない融合をコードすることにより、リンカー配列をコードすることにより、等）を用いて、PCR増幅し得る。例えば、当業者は、治療用タンパク質をコードするDNAの5'末端に、成熟型H S Aの最後の4つのアミノ酸をコードする（かつB s u 3 6 I部位を含む）ポリヌクレオチドを加える5'プライマー、ならびに治療用タンパク質コード配列の3'末端に、終止コドンおよび適当なクローニング部位を加える3'プライマーを設計し得る。例えば、治療用タンパク質をコードするDNAを増幅するために用いられる順方向プライマーは、配列5' - a a g c t G C C T T A G G C T T A (N)₁₅ - 3'（配列番号42）を有し得、ここで下線が引かれた配列は、B s u 3 6 I部位であり、大文字のヌクレオチドは、成熟H S Aタンパク質の最後の4つのアミノ酸（A L G L）をコードし、(N)₁₅は、関心対象となる治療用タンパク質をコードする最初の15のヌクレオチドと同一である。同様に、治療用タンパク質をコードする

DNAを増幅するために用いられる逆方向プライマーは、配列5' - G C G C G C G T T T A A A C G G C C G G C C G G C G C G C C T T A T T A (N)₁₅ - 3' (配列番号43)を有し得、ここでイタリック体で書かれた配列は、Pme I部位であり、二重に下線が引かれた配列は、Fse I部位であり、単一の下線が引かれた配列は、Asc I部位であり、囲まれたヌクレオチドは、2個の直列の停止コドンの逆相補体であり、(N)₁₅は、関心対象となる治療用タンパク質をコードする最後の15個のヌクレオチドの逆相補体と同一である。PCR産物が増幅されると、Bsu36 Iおよび(Asc I、Fse I、またはPme I)のうちの1つで切られ、pScNHSAに連結され得る。

【0945】

HSAキメラリーダー配列中のXho I部位の存在は、キメラシグナル配列（すなわち、LDKR（配列番号44）からLEKR（配列番号45）へのHSA-kex2シグナル配列）の末端における単一のアミノ酸変化を作製する。

【0946】

遺伝子-HSA融合産物を含むアルブミン融合構築物の生成

上記の方法と同様に、治療用タンパク質をコードするDNAは、以下のプライマー：Sal I部位を含有し、治療用タンパク質をコードするDNAの5'末端上にHSAリーダー配列、DKRの最後の3つのアミノ酸をコードするポリヌクレオチドを加える5'プライマー、および治療用タンパク質をコードするDNAの3'末端上にCla I部位を含有する成熟HSAの最初のいくつかのアミノ酸をコードするポリヌクレオチドを加える3'プライマーを用いてPCR増幅され得る。例えば、治療用タンパク質をコードするDNAを増幅するために用いられる順方向プライマーは、配列5' - a g g a g c g t c G A C A A A A G A (N)₁₅ - 3' (配列番号46)を有し得、ここで下線が引かれた配列は、Sal I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つのアミノ酸(DKR)をコードし、(N)₁₅は、関心対象となる治療用タンパク質をコードする最初の15のヌクレオチドと同一である。同様に、治療用タンパク質をコードするDNAを逆方向プライマーは、配列5' - C T T T A A A T C G A T G A G C A A C C T C A C T C T T G T G T G C A T C (N)₁₅ - 3' (配列番号47)であり、ここでイタリック体の配列は、Cla I部位であり、下線が引かれたヌクレオチドは、HSA(DAHKSEVAH、配列番号48)の成熟形態の初めの9のアミノ酸をコードするDNAの逆相補体であり、(N)₁₅は、関心対象となる治療用タンパク質をコードする最後の15個のヌクレオチドの逆相補体である。PCR産物が増幅されると、それは、Sal IおよびCla Iで切られ、Xho IおよびCla Iで消化されたpScCHSAに連結される。異なるシグナルまたはリーダー配列が、所望され得、例えば、インペルターゼ「INV」(Swiss-Prot受託番号P00724)、交配因子アルファ「MAF」(Genbank受託番号AAA18405)、MPIF(遺伝子配列AAF82936)、フィブリンB(Swiss-Prot受託番号P23142)、クラスチリン(Swiss-Prot受託番号P10909)、インスリン様増殖因子結合タンパク質4(Swiss-Prot受託番号P22692)、およびHSAリーダー配列の順列は、当該技術分野で周知の標準的な方法により適切なベクターにサブクローニングされ得る。

【0947】

パン酵母(yeast *S. cerevisiae*)における発現に適合するアルブミン融合構築物の生成

次いで、pScNHSAまたはpScCHSAから作製されるN末端あるいはC末端アルブミン融合タンパク質のいずれかをコードするDNAを含有するNot Iフラグメントが、LEU2選択可能なマーカーを有するpSAC35のNot I部位にクローニングされ得る。次いで、生じるベクターは、パン酵母の発現システムの形質転換に用いられる。

【0948】

実施例3：酵母*S. cerevisiae*の一般的発現

酵母発現に適合する発現ベクターは、酢酸リチウム形質転換、エレクトロポレーション、または当該技術分野で周知の他の方法、およびもしくははSambrook, Frits

10

20

30

40

50

ch, and Maniatis. 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition", volumes 1-3、および Ausubel et al. 2000. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School "Current Protocols in Molecular Biology", volumes 1-4の一部に記載されるような他の方法により、酵母 *S. cerevisiae* に形質転換され得る。発現ベクターは、形質転換により、*S. cerevisiae* 株 DXY1、D88、または BXP20 に導入され、個々の形質転換体が、例えば、10 mL の 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) 中、30℃で3日間増殖され得、細胞は、増殖してから60時間後、固定相で、採取することができる。上清は、10分間、3000gで、細胞を除去することで採取される。

10

【0949】

pSAC35 (Sleep et al., 1990, Biotechnology 8:42 および 図3を参照のこと) は、LEU2 選択マーカーに加えて、完全酵母 2 μm プラスミドを含み、複製機能、PRB1 プロモーター、および ADH1 終止シグナルを提供する。

【0950】

実施例4：酵母 *S. cerevisiae* におけるアルブミン融合から発現されるアルブミン融合タンパク質の一般的精製

20

好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質またはその部分の成熟形態（例えば、表1に列挙される治療用タンパク質の成熟形態、または表2に配列番号Zとして示される治療用タンパク質の成熟形態）のN末端あるいはC末端のいずれかに融合するHSAの成熟形態を含む。本発明の一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、発現のために使用される宿主の分泌経路における発生期の融合ポリペプチドを導くシグナル配列をさらに含む。好ましい実施形態において、シグナル配列によりコードされるシグナルペプチドが除去され、成熟アルブミン融合タンパク質が、培養培地中に直接分泌される。本発明のアルブミン融合タンパク質は、好ましくは、MAF、INV、Ig、フィブリンB、クラスレリン、インスリン様増殖因子結合タンパク質4が挙げられるが、これらに限定されない異種シグナル配列（例えば、特定の治療用タンパク質の非天然シグナル配列）、変異体HSAリーダー配列（キメラHSA/MAFリーダー配列が挙げられるが、これに限定されない）、または当該分野で周知の他の異種シグナル配列を含む。表2に列挙されるシグナル配列ならびに／または上の本明細書の「融合タンパク質の発現」および／もしくは「アルブミン融合タンパク質の組換えおよび合成による産生のさらなる方法」の項において列挙されるシグナル配列として、特に好ましい。好ましい実施形態において、本発明の融合タンパク質は、N末端メチオニン残基をさらに含む。フラグメントおよび／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はまた、本発明により包含される。

30

【0951】

上記のような酵母中で発現されるアルブミン融合タンパク質は、以下のようなDyxペプチド親和カラム上に小規模で精製され得る。アルブミン融合タンパク質を発現する酵母由来の上清を、3 mM リン酸緩衝液 pH 6.2、20 mM NaCl、および 0.01% Tween 20 に対して分別濾過して体積を減らし、色素を除去する。次に、溶液を、0.22 μm のデバイスに通して濾過する。濾液を、Dyxペプチド親和カラム上に装填する。カラムを、100 mM トリス/HCl 緩衝液、pH 8.2 で溶出する。タンパク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。

40

【0952】

大規模な精製のために、以下の方法を利用し得る。2 L を超える上清を、分別濾過し、20 mM トリス/HCl pH 8.0 の 500 mL に濃縮する。濃縮されたタンパク質溶液を、予め平衡化した 50 mL DEAE-セファロースファーストフローカラムに充

50

填し、カラムを洗浄し、タンパク質を、20 mM トリス／HCl、pH 8.0における0～0.4 M NaClからのNaClの直線的勾配で溶出する。タンパク質を含有するこれらの画分をプールし、0.5 M リン酸ナトリウム (NaH_2PO_4) を用いて pH 6.8 に調節する。最終濃度 0.9 M の (NRt)₂ SO_4 をタンパク質溶液に加え、全溶液を予め平衡化した 50 mL ブチル 650 S カラムに充填する。タンパク質を、硫酸アンモニウム (0.9～0 M (NRt)₂ SO_4) の直線的勾配で溶出する。アルブミン融合を有するこれらの画分を再びプールし、10 mM Na_2HPO_4 / クエン酸緩衝液 pH 5.75 に対して分別濾過し、50 mL の予め平衡化した SP-セファロースファーストフローカラムに装填する。タンパク質を、0～0.5 M NaCl 直線勾配で溶出する。関心対象となるタンパク質を含有する画分を混合し、この緩衝液を、Amicon 濃縮器で 10 mM Na_2HPO_4 / クエン酸 pH 6.25 に変え、伝導率は、2.5 mS / cm より低い。タンパク質溶液は、15 mL の予め平衡化した Q-セファロース高性能カラムに装填され、カラムを洗浄し、タンパク質を、0～0.15 M NaCl の NaCl 直線勾配で溶出する。次いで、精製されたタンパク質を、緩衝液交換により特異的な緩衝液組成物に製剤化し得る。

10

【0953】

実施例 5：哺乳類細胞の形質移入のための一般的な構築物の生成

哺乳類細胞株における発現に適合するアルブミン融合構築物の生成

哺乳動物細胞培養系で用いるためのアルブミン融合構築物が、発現ベクターにおいて生成され得る。治療用タンパク質をコードする DNA が、当該技術分野で周知の標準的方法（例えば、PCR 増幅、制限消化、および連結）により、哺乳類の発現ベクターにおいて HSA の N 末端または C 末端にクローニングされ得る。発現ベクターが構築されると、哺乳類発現系へのトランスフェクションを行うことができる。例えば、pC4 ベクター、および／または Lonza Biologicals, Inc. (Portsmouth, NH) より入手可能なベクターが挙げられるが、これらに限定されない好適なベクターが、当該技術分野で周知である。

20

【0954】

ヒト血清アルブミンをコードする DNA を、哺乳動物培養系に適切な、プラスミド pC4 : HSA (ATCC 寄託番号 PTA-3277) を作製する pC4 ベクターにクローニングする。このベクターは、メトトレキサートの存在下、選択を可能にする遺伝子、ジヒドロ葉酸レダクターゼ「DHFR」を有する。

30

【0955】

pC4 : HSA ベクターは、CHO 細胞におけるアルブミン融合タンパク質の発現について適切である。発現のために、他の哺乳動物細胞培養系において、アルブミン融合タンパク質をコードする DNA を含む、または代替として、これから成るフラグメントを代替の発現ベクターにサブクローニングすることが所望され得る。例えば、成熟アルブミン融合タンパク質をコードする DNA を含む、または代替として、これから成るフラグメントを、別の発現ベクター（本明細書に記載される任意の哺乳動物発現ベクターが挙げられるが、これらに限定されない）にサブクローニングさせ得る。

40

【0956】

好ましい実施形態において、アルブミン融合構築物をコードする DNA 構築物は、NS0 細胞における発現のため、当該技術分野で周知の手順により、Lonza Biologicals, 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。

【0957】

HSA-治療用タンパク質融合産物を含むアルブミン融合構築物の生成

pC4 : HSA (ATCC 寄託番号 PTA-3277) を用いて、治療用タンパク質部分が、成熟アルブミン配列の C 末端である、アルブミン融合構築物を生成することができる。例えば、治療用タンパク質、またはそのフラグメントもしくは変異体をコードする DNA を、ベクターの Bsu36I と AscI 制限酵素部位との間にクローニングすること

50

ができる。B s u 3 6 I および A s c I にクローニングする場合、酵母ベクター系へのクローニングするために用いられる同じプライマー設計（配列番号 4 2 および 4 3）が、利用され得る（実施例 2 を参照のこと）。

【0958】

遺伝子-H S A 融合産物を含むアルブミン融合構築物の生成

p C 4 : H S A (A T C C 寄託番号 P T A - 3 2 7 7) を用いて、治療用タンパク質部分が、成熟アルブミン配列の N 末端である、アルブミン融合構築物を生成することができる。例えば、p C 4 : H S A の B a m H I (または H i n d I I I) と C l a I との間に治療用タンパク質自体のシグナル配列を有する治療用タンパク質をコードする DNA をすることができる。B a m H I あるいは H i n d I I I 部位のいずれかにクローニングする場合、治療用タンパク質をコードする DNA の翻訳開始コドンの前にコザック配列 (C C G C C A C C A T G 、配列番号 4 9) を含むことが好ましい。治療用タンパク質が、シグナル配列を有しない場合、治療用タンパク質をコードする DNA は、p C 4 : H S A の X h o I と C l a I 部位との間にクローニングされ得る。X h o I 部位を用いる場合、以下の 5 ' (配列番号 5 0) および 3 ' (配列番号 5 1) の例示的プライマー、

5 ' - C C G C C G C T C G A G G G T G T G T T T C G T C G A (N) ₁₈ - 3 ' (配列番号 5 0)

5 ' - A G T C C C A T C G A T G A G C A A C C T C A C T C T T G T G T G C A T C (N) ₁₈ - 3 ' (配列番号 5 1) が、用いられ得る。

【0959】

5 ' プライマー (配列番号 5 0) において、下線が引かれた配列は、X h o I 部位であり、X h o 部位および X h o I 部位に続く DNA は、天然のヒト血清アルブミンのリーダー配列の最後の 7 つのアミノ酸をコードする。配列番号 5 0 では、「(N) ₁₈」が、関心対象となる治療用タンパク質をコードする最初の 1 8 のヌクレオチドをコードする最初の 1 8 ヌクレオチドと同一な DNA である。3 ' プライマー (配列番号 5 1) では、下線が引かれた配列は、C l a I 部位であり、C l a I 部位およびそれに続く DNA は、成熟 H S A タンパク質 (配列番号 1) の初めの 1 0 個のアミノ酸をコードする DNA の逆相補体である。配列番号 5 1 では、「(N) ₁₈」が、関心対象となる治療用タンパク質をコードする最後の 1 8 のヌクレオチドをコードする DNA の逆相補体である。これら 2 つのプライマーを用いて、関心対象となる治療用タンパク質を P C R 増幅し得、P C R 産物を精製し得、それを X h o I および C l a I 制限酵素で消化し得、p C 4 : H S A ベクターの X h o I および C l a I 部位にクローニングし得る。

【0960】

代替的なリーダー配列が所望される場合、天然のアルブミンリーダー配列は、当該技術分野で周知の標準的方法により、キメラアルブミンリーダー、すなわち、H S A - k e x 2 シグナルペプチド、または代替的なリーダーで置き換えることができる（例えば、当業者は、通常、代替的なリーダーを P C R 増幅し、リーディングフレームを維持しながら、P C R 産物をアルブミンリーダーの代わりにアルブミン融合構築物にサブクローニングすることができる）。

【0961】

実施例 6 : 哺乳類細胞株における一般的発現

哺乳動物細胞株における発現に適合する発現ベクターにおいて生成されるアルブミン融合構築物が、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクトアミン (l i p o f e c t a m i n e) 、エレクトロポレーション、または当該技術分野で周知の、および／または S a m b r o o k , F r i t s c h , a n d M a n i a t i s . 1 9 8 9 . “ M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , 2 ^{n d} e d i t i o n ” および A u s u b e l e t a l . 2 0 0 0 . M a s s a c h u s e t t s G e n e r a l H o s p i t a l a n d H a r v a r d M e d i c a l S c h o o l “ C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y ” , v o l u m e s 1 - 4 に記載されるような、他のトランスフェクション法により、適

切な細胞株に形質移入することができる。次に、形質移入した細胞を、発現ベクターにおける選択可能なマーカーにより決定される選択剤の存在により選択する。

【0962】

pC4 発現ベクター (ATCC 受託番号 209646) は、プラスミド pSV2-DHFR (ATCC 受託番号 37146) の誘導体である。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 et al., March 1985, Molecular and Cellular Biology, 438-447) およびサイトメガロウイルス「CMV」エンハンサーのフラグメント (Bosch et al., 1985, Cell 41: 521-530) を含有する。ベクターはまた、SV40 初期プロモーターの調節下で、3' イントロン、ラットプレプロインスリン遺伝子の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 遺伝子を欠失している他の細胞株が、形質移入のために用いられる。当該技術分野で周知の方法による pC4 におけるアルブミン融合構築物の CHO 細胞へのトランスフェクションが、CHO 細胞中のアルブミン融合タンパク質の発現を可能にし、これにリーダー配列開裂および上清への分泌が続く。次いで、アルブミン融合タンパク質を、上清からさらに精製する。

【0963】

pEE12.1 発現ベクターが、Lonza Biologies, Inc. (Portsmouth, NH) により提供され、これは、pEE6 (Stephens and Cockett, 1989, Nucl. Acids Res. 17: 7110) の誘導体である。このベクターは、関心対象となる配列の上流である、ヒトサイトメガロウイルスの主要初期遺伝子「hCMV-MIE」(国際公開第 WO89/01036 号) のプロモーター、エンハンサー、および完全 5' 非翻訳領域、ならびに選択的なメチオニンスルホキシミン含有媒体における形質移入した細胞の選択の目的のためのグルタミン合成遺伝子 (Murphy et al., 1991, Biochem J. 227: 277-279, Bebbington et al., 1992, Bio/Technology 10: 169-175, 米国特許第 US5, 122, 464 号) を含む。当該技術分野で周知の方法により、pEE12.1 において作製されるアルブミン融合構築物の NS0 細胞 (国際公開第 WO86/05807) へのトランスフェクションが、NS0 細胞におけるアルブミン融合タンパク質の発現を可能にし、これにリーダー配列開裂、および上清への分泌が続く。次いで、アルブミン融合タンパク質を、本明細書に記載される、またはそうでなければ当該技術分野で周知の技法を用いて、上清からさらに精製する。

【0964】

アルブミン融合タンパク質の発現が、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周知の他の方法により、分析され得る。

【0965】

アルブミン融合タンパク質で形質移入される安定な CHO および NS0 細胞株が、当該技術分野で周知の方法 (例えば、リポフェクトアミン形質移入法) により生成され、例えば、選択可能なマーカーとして、ジヒドロ葉酸レダクターゼ「DHFR」を有するベクターについて 100 nM メトトレキサートを用いて、またはグルタミンの非存在下で、増殖を介して選択される。発現レベルが、例えば、第一に、一次抗体として抗 HSA 血清を用いて、または、第二に、一次抗体として所定のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分を対象にする血清含有抗体を用いて、免疫プロットすることにより、試験され得る。

【0966】

発現レベルが、一次抗体として抗 HSA 血清で免疫プロット検出することにより、試験される。特異的な生産性は、ELISA を経て決定され、捕捉抗体は、アルブミン融合の治療用タンパク質部分に向かうモノクローナル抗体であり得、検出抗体が、モノクローナル抗 HSA ビオチン化抗体であり (または逆)、次いで、これに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、製造者のプロトコルにより分析する。

【0967】

実施例7：哺乳類細胞株におけるアルブミン融合タンパク質の発現

本発明のアルブミン融合タンパク質を、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（mRNAの転写の開始を仲介する）、タンパク質コード配列、ならびに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を含有する。さらなるエレメントは、エンハンサー、コザック配列、ならびにRNAスプライシングのドナーおよび受容体部位に隣接する介在配列を含む。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、HTLV I、HIV I、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）。 10

【0968】

本発明の実施で用いるために好適な発現ベクターは、例えば、pSVLおよびpMSG（Pharmacia, Uppsala, Sweden）、pRSVcat（ATCC 37152）、pSV2dhfr（ATCC 37146）、pBC12MI（ATCC 67109）、pCMV Sport 2.0、およびpCMV Sport 3.0等のベクターを含む。使用され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QC1-3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）細胞が挙げられるが、これらに限定されない。 20

【0969】

代替として、アルブミン融合タンパク質を、染色体内に一体化したアルブミン融合タンパク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、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等の選択可能なマーカーとの共トランスフェクションにより、トランスフェクト細胞の特定および単離が可能になる。

【0970】

また、融合タンパク質をコードする形質移入したポリヌクレオチドを増幅し、大量のコード化された融合タンパク質を発現させることもできる。DHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）マーカーは、関心対象となる遺伝子を数百または数千のコピーを有する細胞株の開発において有用である（例えば、Alt et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978)、Hamlin et al., Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107-143 (1990)、Page et al., Biotechnology 9:64-68 (1991)を参照のこと）。別の有用な選択可能なマーカーは、酵素グルタミンシンターゼ（GS）である（Murphy et al., Biochem J. 227:277-279 (1991)、Bebbington et al., 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、最も耐性のある細胞を選択する。これらの細胞株は、染色体内に一体化した増幅遺伝子を含有する。しばしばタンパク質の産生のために、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）およびNS0細胞を用いる。 30 40

【0971】

プラスミドpSV2-dhfr（ATCC受託番号37146）の誘導体である、発現ベクターpC4（ATCC受託番号209646）およびpC6（ATCC受託番号209647）は、ラウス肉腫ウイルスの強力なプロモーター（LTR）（Cullen et al., Molecular and Cellular Biology, 438-447 (March, 1985)）およびCMV-エンハンサーのフラグメント（Boschart et al., Cell 41:521-530 (1985)）を含有する。例えば、制限酵素切断部位BamHI、XbaI、およびAsp718を含む多重クローニング部位は、関心対象となる遺伝子のクローニングを促進する。ベクターはまた、S 50

V40 初期プロモーターの調節下で、3'イントロン、ラットプレプロインスリン遺伝子のポリアデニル化および終結シグナル、およびマウスDHFR遺伝子も含有する。

【0972】

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、次いで、当該技術分野で周知の方法により、子ウシ腸リン酸塩を用いて脱リン酸化する。次いで、ベクターを、1%アガロースゲルから単離する。

【0973】

本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、当該技術分野で周知の技法を用いて生成し、当該技術分野で周知のPCR技法を用いて、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タンパク質の産生に用いる場合、ベクターは、第2のシグナルペプチドを必要としない。代替として、天然に存在するシグナル配列を用いない場合、ベクターは、異種性シグナル配列を含むように修飾され得る（例えば、国際公開第WO96/34891号を参照のこと）。

【0974】

本発明の融合タンパク質をコードする増幅フラグメントを、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単離する。次いで、フラグメントを、適当な制限酵素で消化し、1%アガロースゲルにて再び精製する。

【0975】

次いで、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする増幅フラグメントを、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。次いで、単離フラグメントと脱リン酸化ベクターを、T4 DNAリガーゼで連結する。次いで、大腸菌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に挿入されたフラグメントを含有するバクテリアを特定する。

【0976】

活性なDHFR遺伝子を欠くチャイニーズハムスター卵巢細胞を形質移入のために用いる。5μgの発現プラスミドpC6またはpC4を、リポフェクチンを用いて、0.5μgのプラスミドpSVneoと共に同時形質移入する（Felgner et al., 上記参照）。プラスミドpSV2-neoは、優性選択可能なマーカーである、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を追加した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を追加した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、単一クローンをトリプシン処理し、次いで、異なる濃度（50nM、100nM、200nM、400nM、800nM）のメトトレキセートを用いて、6ウェルペトリ皿または10mlのフラスコに播種する。次いで、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、同じ手順を繰り返す。所望の融合タンパク質の発現は、例えば、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットにより、または逆相HPLC分析により分析される。

【0977】

実施例8：哺乳類細胞株におけるアルブミン融合構築物から発現したアルブミン融合タンパク質の一般的精製

好ましい実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、治療用タンパク質またはその部分の成熟形態（例えば、表1に列挙される治療用タンパク質の成熟形態、または表2に配列番号Zとして示される治療用タンパク質の成熟形態）のN末端あるいはC末端のいずれかに融合するHSAの成熟形態を含む。本発明の一実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質は、発現のために使用される宿主の分泌経路における発生の融合ポリペプチドを導くシグナル配列をさらに含む。好ましい実施形態において、シ

10

20

30

40

50

グナル配列によりコードされるシグナルペプチドが除去され、成熟アルブミン融合タンパク質が、培養培地中に直接分泌される。本発明のアルブミン融合タンパク質は、好ましくは、M A F、I N V、I g、フィブリンB、クラステリン、インスリン様増殖因子結合タンパク質4が挙げられるが、これらに限定されない異種シグナル配列（例えば、特定の治療用タンパク質の非天然シグナル配列）、変異体H S Aリーダー配列（キメラH S A／M A Fリーダー配列が挙げられるが、これに限定されない）、または当該分野で周知の他の異種シグナル配列を含む。表2に列挙されるシグナル配列ならびに／または上の本明細書の「融合タンパク質の発現」および／もしくは「アルブミン融合タンパク質の組換えおよび合成による産生のさらなる方法」の項において列挙されるシグナル配列等が、特に好ましい。好ましい実施形態において、本発明の融合タンパク質は、N末端メチオニン残基をさらに含む。フラグメントおよび／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はまた、本発明により包含される。

10

【0978】

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タンパク質を精製する。

【0979】

C H Oおよび293T細胞株からの精製

C H O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タンパク質の精製は、リン酸ナトリウム緩衝液およびリン酸塩勾配溶出を用いて、アニオン性H Q樹脂での初期の補足、次いで、塩勾配溶出を用いたブルーセファロースF Fカラムでの親和性クロマトグラフィーを含み得る。ブルーセファロースF Fは、主なB S A／フェチュイン混入物を除去する。リン酸塩勾配を用いたP o r o s P I 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、ならびにアルブミン融合タンパク質を濃縮する。

20

【0980】

N S O細胞株からの精製

N S O細胞上清からのアルブミン融合タンパク質の精製は、Q－セファロースアニオン交換クロマトグラフィー、次いで、溶出工程を含むS P－セファロース精製、溶出工程を含むフェニル－650M精製、最後に、分別濾過を含み得る。

【0981】

30

次いで、精製タンパク質を、緩衝液交換により製剤化し得る。

【0982】

実施例9：アルブミン融合タンパク質のバクテリア発現

D N A配列の5'および3'末端に対応するP C R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タンパク質をコードするポリヌクレオチドを増幅し、挿入フラグメントを合成する。挿入をコードするポリヌクレオチドを増幅するため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'末端にて、B a m H IおよびX b a I等の制限酵素部位を含有するべきである。例えば、B a m H IおよびX b a Iは、バクテリア発現ベクターp Q E－9（Q i a g e n, I n c., C h a t s w o r t h, C A）の制限酵素部位に対応する。このプラスミドベクターは、抗生物質耐性（A m p^r）、バクテリアの複製起点（o r i）、I P T G制御プロモーター／オペレーター（P／O）、リボソーム結合部位（R B S）、6－ヒスチジンタグ（6－H i s）、および制限酵素クローニング部位をコードする。

40

【0983】

p Q E－9ベクターを、B a m H IおよびX b a Iで消化し、バクテリアR B Sにて開始するリーディングフレームを維持するp Q E－9ベクターに増幅フラグメントを連結する。次いで、連結混合物を用いて、プラスミドp R E P 4の複数コピーを含有する大腸菌株M 1 5／r e p 4（Q i a g e n, I n c.）を形質導入し、それは、l a c Iリプレッサーを発現し、カナマイシン耐性（K a n^r）ももたらす。形質転換体をL Bプレート

50

上での成長能により特定し、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認する。

【0984】

所望の構築物を含有するクローンを、Amp (100 μ g/ml) および Kan (25 μ g/ml) の両方を追加したLB培地における液体培養にて、一晚(O/N)成長させる。O/N培養物を用いて、1:100から1:250の比で大規模培養物を播種する。細胞を、光学濃度600 (O.D. ^{600}) を0.4から0.6の間に成長させる。次いで、IPTG (イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド) を加え、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、遺伝子発現の増大をもたらす。

10

【0985】

細胞を、さらに3~4時間成長させる。次いで、細胞を、遠心分離(6000xgにて20分)により採取する。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 et al., Eur. J. Biochem. 179:379-387 (1989)を参照のこと)。細胞片を、遠心分離により除去し、ポリペプチドを含有する上清を、ニッケル-ニトリロトリ-酢酸(「Ni-NTA」)親和性樹脂カラム(QIAGEN, Inc. より入手可能、上記参照)に充填する。6xHisタグを有するタンパク質は、Ni-NTA樹脂と高親和性で結合し、単純な一工程方法で精製することができる(詳細については、The Q1A expressionist (1995) QIAGEN, Inc. を参照のこと、上記)。

20

【0986】

簡潔には、6M グアニジン-HCl、pH8中の上清をカラムに充填する。カラムを、まず、10容量の6M グアニジン-HCl、pH8で洗浄し、次いで、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。

【0987】

次いで、リン酸緩衝食塩水(PBS)、または50mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH6および200mM NaClに対して透析することにより、精製タンパク質を還元する。代替として、タンパク質を、Ni-NTAカラムに固定化しながら、十分に再折りたたみ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を含有する20mMのトリス/HCl、pH7.4を用いて還元させる。還元は、1.5時間以上かけて行われなければならない。還元後、250mMのイミダゾールを加えることにより、タンパク質を溶出する。PBSまたは50mM 酢酸ナトリウム緩衝液、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。精製タンパク質を、4℃で保存するか、あるいは-80℃で凍結する。

30

【0988】

上記の発現ベクターに加えて、本発明は、pHE4a (ATCC受託番号209645、1998年2月25日付で寄託)と呼ばれる発現ベクターをさらに含み、それは、pHE4a (ATCC受託番号209645、1998年2月25日付で寄託)と呼ばれる、本発明のアルブミン融合タンパク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。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。

40

【0989】

50

Nde I および Xba I、BamH I、Xho I、または Asp 718 でベクターを制限し、制限産物をゲル泳動し、次に、より大きなフラグメント（詰込みフラグメントは、約 310 塩基対である）を単離することにより、DNA を pHE 4 a に挿入することができる。本明細書に記載の PCR プロトコルまたはそうでなければ、当該技術分野で周知の他のものにより、Ndc I（5' プライマー）および Xba I、BamH I、Xho I、または Asp 718（3' プライマー）の制限酵素部位を有する PCR プライマーを用いて、DNA 挿入物を生成する。PCR 挿入物をゲル精製し、適合する酵素で制限する。標準的プロトコルにより、挿入物とベクターを連結する。

【0990】

操作したベクターを、上記のプロトコルで置換し、バクテリアシステムにおいてタンパク質を発現させ得る。

【0991】

実施例 10：寄託試料からの選択 cDNA クローンの単離

表 3 に示されるように、本発明の多くのアルブミン融合構築物は、ATCC に寄託されたものである。アルブミン融合構築物は、発現ベクター：酵母（*S. cerevisiae*）発現ベクター pSAC 35、哺乳類発現ベクター pC 4、または哺乳類発現ベクター pEE 12.1 のうちのいずれか 1 つを含み得る。

【0992】

pSAC 35（Sleep et al, 1990, Biotechnology 8 : 42）、pC 4（ATCC 受託番号 209646、Cullen et al, Molecular and Cellular Biology, 438-447（1985））、Boshart et al, Cell 41:521-530（1985））、および pEE 12.1（Lonza Biologies, Inc., Stephens and Cockett, Nucl. Acids Res. 17:7110（1989））、国際公開第 WO89/01036 号、Murphy et al, Biochem J. 227:277-279（1991）、Bebbington et al, Bio/Technology 10:169-175（1992）、米国特許第 US5,122,464 号、国際公開第 WO86/05807 号）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。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構築物を、Hanahan 等の当該技術分野で記載された技法を用いて、Stratagene XL-1 Blue（Stratagene Cloning Systems, Inc., 11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037）等の大腸菌株に形質導入し、100 μg/mL アンピシリンを含有するルリア培地（Luria-Broth）アガープレートに播種し、37 °C で一晩成長させる。

【0993】

任意の所定のアルブミン融合構築物について表 3 に引用した ATCC 寄託番号を指定した試料中の寄託材料はまた、1 つ以上のさらなるアルブミン融合構築物を含有し得、それらは、それぞれ異なるアルブミン融合タンパク質をコードする。したがって、同じ ATCC 寄託番号を共有する寄託物は、表 3 の対応の列において特定された少なくとも 1 つのアルブミン融合構築物を含有する。

【0994】

2 種類のアプローチを用いて、表 3 のアルブミン融合構築物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構築物を単離できる。

【0995】

方法 1：スクリーニング

まず、アルブミン融合構築物を、当該技術分野で周知の方法を用いて、表 1 の個々の構築物 ID 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 の試料をスクリーニングすることにより、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

10

20

30

40

50

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得る。オリゴヌクレオチドを、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、例えば、 $^3\text{ }^2\text{P}-\gamma\text{-ATP}$ で標識化し、通常の方法により精製することができる（例えば、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)）。所与のATCC寄託物由来のアルブミン融合構築物を、当業者に周知の技法（例えば、バ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刊行物もしくは特許）を用いて、上記の好適な宿主（XL-1 Blue (Stratagene) 等）に形質転換する。形質転換体を、1.5%のアガープレート（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（コロニー）の密度でプレーティングされる。これらのプレートを、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 et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edit., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pages 1.93 to 1.104）、または当業者に周知の他の技法により、ナイロン膜を用いて、スクリーニングする。

10

【0996】

方法2：PCR

代替として、所定のアルブミン融合タンパク質をコードするDNAを、例えば、所与のアルブミン融合タンパク質をコードするDNAに対して、寄託したアルブミン融合構築物5'および3'をハイブリッド形成する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構築物試料から、増幅し得る。ポリメラーゼ連鎖反応を、通常の下条件下、例えば、0.5 μg の上記のcDNAテンプレートとの反応混合物25 μl において行う。簡便な反応混合物は、1.5～5mMのMgCl₂、0.01% (w/v) のゼラチン、20 μM の各dATP、dCTP、dGTP、dTTP、25 pmolの各プライマー、および0.25 Unit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；アニール55℃、1分；伸長72℃、1分）を行う。増幅産物を、アガロースゲル電気泳動により分析し、予測分子量を有するDNAバンドを切り出し、精製する。PCR産物は、DNA産物をサブクロニングし、配列決定することにより、選択配列のものであることを証明する。

20

30

【0997】

いくつかの方法を、寄託クローンに存在し得ない遺伝子の5'または3'非コード部分の特定に使用可能である。これらの方法は、フィルター探索、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周知の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が挙げられるが、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を生成するために使用可能である（Fromont-Racine et al., Nucleic Acids Res., 21(7):1683-1684 (1993)）。

【0998】

簡潔には、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'末端に連結する。連結したRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび関心対象となる遺伝子の周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。次いで、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。

40

【0999】

上記の方法は、ポリ-A+RNAを用いることができるが、所望の供給源から単離した総RNAで開始する。次いで、RNA調製物は、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である場合、ホスファターゼで処理することができる。次いで、ホスファターゼを不活性化し、メッセンジャーRNAの

50

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を処理するべきである。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連結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。

【1000】

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第1の鎖cDNA合成のテンプレートとして用いる。第1の鎖合成反応物は、連結したRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび関心対象となる遺伝子の周知の配列に特異的なプライマーを用いて、所望の5'末端のPCR増幅のテンプレートとして、用いられる。次いで、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。

10

【1001】

実施例11：複数融合した融合物

アルブミン融合タンパク質（例えば、アルブミン（またはそのフラグメントまたは変異体）に融合された治療用タンパク質（またはそのフラグメントまたは変異体）を含有する）を、さらに他のタンパク質に融合させ、「複数融合した融合物」を生成し得る。これらの複数融合したタンパク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タンパク質のHisタグ、HAタグ、タンパク質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、欧州特許第A394,827号、Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988)を参照のこと）。本発明のポリペプチドに融合した核局在性シグナルは、特定の細胞内局在性にタンパク質を標的とすることができるが、共有結合ヘテロ2量体もしくはホモ2量体は、アルブミン融合タンパク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タンパク質とのさらなるタンパク質配列の融合物は、融合タンパク質の溶解性および／または安定性をさらに増大させ得る。当該技術分野で周知の技法を用いて、またはそれを一般的に変形して、および／または以下のプロトコルを変形することにより、上記の融合タンパク質を作製することができ、それは、IgG分子とのポリペプチドの融合物を概説する。

20

【1002】

簡潔には、IgG分子のヒトFc部分を、下記の配列の5'および3'末端に及ぶプライマーを用いて、PCR増幅することができる。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簡便な制限酵素部位を有するべきである。

30

【1003】

例えば、pC4（ATCC受託番号209646）を用いる場合、ヒトFc部分を、BamHIクローニング部位に連結することができる。3' BamHI部位を破壊しないよう注意されたい。次に、ヒトFc部分を含有するベクターを、BamHIで再び制限し、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タンパク質をコードするポリヌクレオチド（当該技術分野で周知の技法を用いて生成し、単離したもの）を連結する。本発明の融合タンパク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、融合タンパク質を含有するFcが生成されないことに注意されたい。

40

【1004】

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タンパク質を産生する場合、pC4は、第2のシグナルペプチドを必要としない。代替として、天然に存在するシグナル配列を用いない場合、ベクターは、異種性シグナル配列を含むように修飾され得る（例えば、国際公開第WO96/34891号を参照のこと）。

【1005】

ヒトIgG Fc領域：

GGGATCCGGAGCCCAAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATG

50

CCCACCGTGCCCCAGCACCTGAAATTCGAGGGTGCAACCGTCA
GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGA
TCTCCCGGACTCCTGAGGTCAACATGCGTGGTGGTGGACGT
AAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAAGTTCAAACCTGGTACGTG
GACGGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCCCT
CACCGTCTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAAGGTCTTCCAACAAAGCCCTTCCAACCCCAATCG
AGAAAACCAATCTTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAACC
ACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCTCCGGGATGAGCTGACC
AAGAACCAAGGTCAAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCAAGCGACATCTGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAAACAACCTACAAGACCAACGCCCTCCCGTGGTGGAC
TCCGACGGGCTCCTTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCAGCGGCCGC
GACTCTAGAGGAT (配列番号52)

10

【1006】

実施例12: アルブミン融合タンパク質からの抗体の生成
ハイブリドーマ技術

20

本発明のアルブミン融合タンパク質、および本発明のアルブミン融合タンパク質の部分(例えば、治療用タンパク質部分、または融合タンパク質のアルブミン部分)に結合する抗体を、様々な方法により調製することができる(Current Protocols, Chapter 2を参照のこと)。このような方法の1つの例として、本発明のアルブミン融合タンパク質または本発明のアルブミン融合タンパク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。次いで、このような調製物を、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、動物に導入する。

【1007】

本発明のアルブミン融合タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の部分に特異的なモノクローナル抗体を、ハイブリドーマ技術(Kohler et al., Nature 256:495 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y., pp. 563-681 (1981))を用いて、調製する。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タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の部分を用いて免疫する。このようなマウスの脾細胞を抽出し、好適な骨髓腫細胞株と融合する。任意の好適な骨髓腫細胞株を、本発明に従って、採用し得るが、ATCCから入手可能な親骨髓腫細胞株(SP2O)を利用することが好ましい。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、次いで、Wandra (Gastroenterology 80:225-232 (1981))により記載されるように、限界希釈により、クローニングする。次いで、この選択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タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の部分と結合可能な抗体を分泌するクローンを特定する。

30

40

【1008】

代替として、本発明のアルブミン融合タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の部分と結合可能なさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を用いた2工程方法において、生成することができる。このような方法は、抗体がそれ自体抗原であり、したが

50

って、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。この方法に従って、タンパク質特異的な抗体を用い、動物、好ましくは、マウスを免疫する。次いで、このような動物の脾細胞を用いて、ハイブリドーマ細胞を産生し、ハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、本発明のアルブミン融合タンパク質（または本発明のアルブミン融合タンパク質の部分）特異的な抗体と結合する能力が、本発明の融合タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク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特定する。このような抗体は、本発明の融合タンパク質（または、本発明のアルブミン融合タンパク質の部分）特異的な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タンパク質（または本発明のアルブミン融合タンパク質の部分）特異的な抗体の形成を誘導する。

10

【1009】

ヒトにおける抗体の生体内使用のため、抗体を「ヒト化」する。このような抗体を、上記の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構築物を用いて、産生することができる。キメラおよびヒト化抗体を産生する方法は、当該技術分野で周知であり、本明細書で論じられる（総説については、Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986), Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号、Taniguchi et al., 欧州特許第171496号、Morrison et al., 欧州特許第173494号、Neuberger et al., 国際公開第WO8601533号、Robinson et al., 国際公開第WO8702671号、Boulianne et al., Nature 312:643 (1984)、Neuberger et al., Nature 314:268 (1985)を参照のこと）。

20

【1010】

s c F v sライブラリからの本発明のアルブミン融合タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の部分に対する抗体フラグメントの単離。ヒトPBLから単離した天然のV遺伝子を、本発明のアルブミン融合タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の部分に対する反応性を含有する抗体フラグメントのライブラリに構築し、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号（参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

30

【1011】

ライブラリのレスキュー。s c F v sライブラリを、国際公開第WO92/01047号において記載されるように、ヒトPBLのRNAから構築する。抗体フラグメントを示す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 個を用いて、1%のグルコースおよび $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアmpiシリンを含有する50mlの $2\times\text{TY}$ ($2\times\text{TY}-\text{AMP}-\text{GLU}$)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、50mlの $2\times\text{TY}-\text{AMP}-\text{GLU}$ に播種し、 $2\times 10^8\text{ TU}$ のデルタ遺伝子3ヘルパー (M13デルタ遺伝子III、国際公開第WO92/01047号を参照)を加え、培養物を 37°C で45分間、振盪せずにインキュベートし、次いで、 37°C で45分間、振盪しながらインキュベートする。培養物を 4000 rpm にて10分間遠心分離し、ペレットを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアmpiシリンおよび $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含有する2Lの $2\times\text{TY}$ 中に再懸濁し、一晚成長させる。ファージを、国際公開第WO92/01047号に記載されるように調製する。

40

【1012】

M13デルタ遺伝子IIIを次の通り調製する。M13デルタ遺伝子IIIヘルパーファージは、遺伝子IIIタンパク質をコードせず、ゆえに、抗体フラグメントを示すファージ (ミド) は、抗原により結合するより高い親和性を有する。感染性M13デルタ遺伝子III粒子は、ファージ形態形成中に野生型遺伝子IIIタンパク質を供給する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作製される。培養物を、 37°C で1時間、振盪せずにインキュベートし、次いで、 37°C でさらに1時間

50

、振盪しながらインキュベートする。細胞を、スピンドウン（I E C - C e n t r a 8, 400 r. p. m.、10分間）し、100 μ g/ml のアンピシリンおよび25 μ g/ml のカナマイシンを含有する2 $\times$ TYブロス（2 $\times$ TY-AMP-KAN）に再懸濁し、37 $^{\circ}$ Cで一晩、振盪しながら成長させる。2回のPEG-沈殿（Sambrook et al., 1990）によりファージ粒子を培養培地から精製、濃縮し、2mlのPBSに再懸濁し、0.45 μ mのフィルター（Minisart NML; Sartorius）を通し、最終濃度約10¹³ 形質導入ユニット/mlの（アンピシリン耐性クローン）を得る。

【1013】

ライブラリのパニング。イムノチューブ（Nunc）を、100 μ g/mlあるいは10 μ g/mlのいずれかの本発明のアルブミン融合タンパク質、または本発明のアルブミン融合タンパク質の部分の4mlを含むPBSで一晩コーティングする。チューブを、2%のMarvel-PBSを用いて37 $^{\circ}$ Cで2時間ブロッキングし、次いで、PBSにて3回洗浄する。ファージの約10¹³ TUを、チューブに適用し、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トし、次いで、さらに1.5時間立てたままで培養する。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を加え、上下方向の回転板上で15分間回転させることにより、ファージを溶出し、その後、直ちに、0.5mlの1.0Mのトリス-HCl、pH7.4を用いて溶液を中和する。次いで、ファージは、溶出したファージをバクテリアと37 $^{\circ}$ Cで30分間培養することにより、10mlのmid-log大腸菌TGIに感染させるために用いられる。次いで、大腸菌を、1%のグルコースおよび100 μ g/mlのアンピシリンを含有するTYEプレート上にプレーティングされる。次いで、生じたバクテリアライブラリを、上記のデルタ遺伝子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。次いで、この工程は、合計4ラウンドの親和性精製のために繰り返され、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ラウンドにおいてはPBSでの洗浄を20回に増やす。

【1014】

結合体の特徴付け。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を産生する（Marks et al., 1991）。ELISAは、50mMの重炭酸塩、pH9.6中の10 μ g/mlの本発明のアルブミン融合タンパク質、あるいは本発明のアルブミン融合タンパク質の部分のいずれかでコーティングしたマイクロタイタープレートを用いて、行われる。ELISAで陽性のクローンは、PCRフィンガープリント（例えば、国際公開第WO92/01047号を参照のこと）により、次いで、配列決定により、さらに特徴付けられる。これらのELISAポジティブクローンはまた、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競合的に阻害する能力、および競合的アゴニストまたはアンタゴニスト活性等の当該技術分野で周知の技法を用いて、さらに特徴付けられる。

【1015】

実施例13：[3H]-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、最終的には、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。

【1016】

[3H]-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、真性糖尿病の処置のために列挙された治療剤の任意の1種以上の組み合わせの不存または存在下で、グルコース取り込み/輸送活性

10

20

30

40

50

を試験することができる。具体的には、3T3-L1マウス線維芽細胞およびL6マウス骨格筋細胞を、 $[^3\text{H}]$ -2-デオキシグルコース取り込みアッセイの適当な体外でモデルとなるように、3T3-L1脂肪細胞および筋管にそれぞれ、分化させ得る(Urso et al., J Biol Chem, 274(43):30864-73(1999)、Wang et al., J Mol Endocrinol, 19(3):241-8(1997)、Haspel et al., J Membr Biol, 169(1):45-53(1999)、Tsakiridis et al., Endocrinology, 136(10):4315-22(1995))。簡潔には、 2×10^5 細胞/ $100 \mu\text{L}$ の脂肪細胞または分化したL6細胞を、分化後培地中にプレーティング(すなわち、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ のポリ-L-リジンでコーティング)された96ウェル組織培養「TC」に移し、 37°C 、5% CO_2 にて一晚インキュベートする。まず、細胞を、無血清低グルコースDMAM培地で1回洗浄し、次いで、 $100 \mu\text{L}/$ ウェルの同じ培地、および $100 \mu\text{L}/$ ウェルの緩衝液あるいは真性糖尿病の処置のために列挙された治療剤の任意の1種以上の組み合わせ、例えば、 1 nM 、 10 nM 、および 100 nM の漸増する濃度の本発明の治療剤(例えば、配列番号Yとして開示された特定の融合物、ならびにそのフラグメントおよび変異体)のいずれかと、 1 nM のインスリンの不存または存在下、 37°C で16時間飢餓状態におく。プレートを、 $100 \mu\text{L}/$ 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 1 nM にて、 $10 \mu\text{M}$ の標識 $[^3\text{H}]$ -2-デオキシグルコース(Amercham、#TRK672)および $10 \mu\text{M}$ の非標識2-デオキシグルコース(SIGMA、D-3179)の存在下で、 37°C で30分間加える。対照として、インスリン不存下を除いて同じ条件を行う。最終濃度 $10 \mu\text{M}$ のサイトカラシンB(SIGMA、C6762)を、別々のウェルに $100 \mu\text{L}/$ ウェルにて加え、非特異的な取り込みを測定する。細胞を、HEPES緩衝食塩水を用いて3回洗浄する。標識、すなわち、 $10 \mu\text{M}$ の $[^3\text{H}]$ -2-デオキシグルコース、および非標識、すなわち、 $10 \mu\text{M}$ の2-デオキシグルコースを、室温にて10分間加える。細胞を、冷リン酸緩衝食塩水「PBS」で3回洗浄する。細胞を、 $150 \mu\text{L}/$ ウェルの0.2N NaOHを加えて溶解し、次いで、室温で20分間振盪しながら培養する。次いで、試料を、シンチレーションバイアルに移し、それに5mLのシンチレーション溶液を加える。バイアルを、ベーターシンチレーションカウンターにて計数する。インスリンの不存または存在が異なる重複条件下での取り込みを、以下の方程式： $[(1 \text{ 分間当たりのインスリン数「cpm」}- \text{非特異的cpm}) / (\text{インスリンなしのcpm}- \text{非特異的cpm})]$ を用いて決定する。応答平均は、脂肪細胞および筋管のそれぞれについて、対照の約5倍から3倍の範囲内となる。

【1017】

細胞の分化

細胞を、 $T-75 \text{ cm}^2$ フラスコ中で完全な集約状態とする。培地を除去し、 25 mL の前分化培地と置き換え、48時間培養する。細胞を、 37°C 、5%の CO_2 、湿度85%にてインキュベートする。48時間後、前分化培地を除去し、 25 mL の分化培地と置き換え、48時間培養する。細胞を、 37°C 、5%の CO_2 、湿度85%にて再びインキュベートする。48時間後、培地を除去し、 30 mL の分化後培地と置き換える。分化後培地を、14~20日間、あるいは分化を完全に達成するまで維持する。培地を、2~3日毎に交換する。ヒト脂肪細胞は、Zen-Bio, INC (#SA-1096)から購入することができる。

【1018】

実施例14：膵臓細胞株への $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みの体外でのアッセイ

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 et al., 2001, Diabetes, 50(4):785-96)。IDX-1は次いで、GLP-1受容体のmRNAレベルを増大させる。

10

20

30

40

50

【1019】

試験した細胞型

R I N-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。R I N-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A P U D、活性を有する細胞のマーカー）を産生する。

【1020】

A R I P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。また、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. et al., "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., et al. "The cell-specific transcription factor PTF1 contains two different subunits that interact with the DNA" *Genes Dev.* 3:1613-1624, (1989)、およびHui, H., et al., "Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells," *Diabetes* 50:785-796 (2001)を参照のこと。

【1021】

細胞の調製

R I N-M細胞株を、10%のウシ胎児血清 (HyClone、#SH30088.03)を含むRPMI 1640培地 (HyClone、#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。

【1022】

A R I P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された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。A R I P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、3~4日毎に交換する。

【1023】

アッセイプロトコル

細胞を、96ウェルプレート中4000細胞/ウェルにて播種し、50%の集密まで48~72時間培養する。細胞を、100μL/ウェルの無血清培地に切り換える。培養してから48~72時間後、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タンパク質、ならびにそのフラグメントおよび変異体)をウェルに加える。培養を、さらに36時間続ける。 [³H]-チミジン (5~20Ci/mmol) (Amersham Pharmacia、#TRK120)を、1マイクロキュリー/5マイク

10

20

30

40

50

ロリットルに希釈する。培養してから36時間後、1ウェル当たり5マイクロリットルを、さらに24時間、加える。反応は、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により、終結させる。次いで、細胞を、100マイクロリットルの10%の氷冷TCAを用いて、4℃にて15分間固定する。PBSを除去し、200マイクロリットルの0.2N NaOHを加える。プレートを、室温にて1時間、振盪しながらインキュベートする。溶液を、シンチレーションバイアルに移し、水溶液に適合する5mLのシンチレーション液を加え、勢いよく混合する。バイアルを、ベータシンチレーションカウンターにて計数する。負対照として、緩衝液のみを用いる。正対照として、ウシ胎児血清を用いる。

【1024】

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、これは真性糖尿病の疾患状態の指標を提供する。正常な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。結果として生じる尿中の過剰なグルコースの量の低減により、IDDMおよびNIDDMを有するこのような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形態において、患者由来の尿試料を、当該技術分野で周知の技法を用いて、グルコースの存在についてアッセイする。ヒトにおける糖尿は、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。糖尿を示すこれらの患者における過剰な糖濃度を、血液試料を採取し、血清グルコースをアッセイすることにより、より正確に測定することができる。

【1025】

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

機能的な体液性免疫応答の生成には、B連結細胞とそれらの微小環境との間に溶解性と同族シグナル伝達の双方を必要とする。シグナルは、B連結細胞が、そのプログラムされた発達を持続し得る正の刺激か、または細胞にその現在の発達経路を停止するように指示する負の刺激を与え得る。今日まで、多くの刺激性および阻害性シグナルが、B細胞応答に影響を及ぼすことが見出されている（IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-13、IL-14およびIL-15を含む）。興味深いことに、これらのシグナルは、それら単独では弱いエフェクターであるが、様々な同時刺激性タンパク質と組み合わせると、B細胞集団の間で、活性化、増殖、分化、ホーミング、寛容性および死を誘導し得る。

【1026】

B細胞同時刺激性タンパク質の最もよく研究されたクラスの1つは、TNFスーパーファミリーである。このファミリーにおいて、それぞれのリガンドであるCD154、CD70、およびCD153を伴うCD40、CD27、およびCD30は、様々な免疫応答を調節することが見出されている。これらのB細胞集団およびこ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、増殖および分化の点において、これらのB細胞集団に対する様々なタンパク質の効果を決定する価値あるツールである。以下に列挙される2つのアッセイは、B細胞集団およびこ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に設計される。

【1027】

体外アッセイ—本発明のアルブミン融合タンパク質（治療用タンパク質のフラグメントもしくは変異体ならびに／またはアルブミンあるいはアルブミンのフラグメントもしくは変異体を含む融合タンパク質を含む）は、B細胞集団およびこ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／もしくは死を誘導するそれらの能力について評価され得る。精製されたヒト扁桃B細胞に対する本発明のアルブミン融合タンパク質の活性（用量範囲0.1～10,000ng/mLの範囲の定量的に測定）を、標準的なBリンパ細胞同時刺激アッセイにおいて評価し、ここで、精製された扁桃B細胞を、プライム剤としての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 aureus* Cowan）I（SAC）あるいは固定化抗ヒトIgM抗体

10

20

30

40

50

のいずれかの存在下で培養する。I L-2 および I L-15 等の第2のシグナルは、S A C と I g M との架橋結合と共同作用して、トリチウム化チミジン取り込みにより測定されるように、B細胞増殖を誘導する。新規な相乗効果剤は、このアッセイを用いて、容易に特定され得る。アッセイは、C D 3 が正の細胞の磁気ビーズ (M A C S) の減少により、ヒト扁桃B細胞を単離する工程を含む。得られる細胞集団は、C D 4 5 R (B 2 2 0) の発現により評価して、B細胞が95%より多い。

【1028】

各試料の様々な希釈物を、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150 μ l の培養培地 (10%のF B S、 5×10^{-5} Mの2 M E、100 U / m l のペニシリン、10 μ g / m l のストレプトマイシン、および 10^{-5} のS A C希釈液を含有するR P M I 1640) に懸濁したB細胞 10^5 個を加える。因子を加えてから72時間後に、 ^{3} H-チミジン (6.7 C i / m M) による20時間のパルス (1 μ C i / ウェル) を開始することにより、増殖または阻害を定量する。正および負対照はそれぞれ、I L 2 および培地である。

【1029】

生体内アッセイ-1日に2回、緩衝液のみか、または2 m g / K g の本発明のアルブミン融合タンパク質 (治療用タンパク質のフラグメントもしくは変異体ならびに/またはアルブミンあるいはアルブミンのフラグメントもしくは変異体を含有する融合タンパク質を含む) を、B A L B / c マウスに注射 (i. p.) する。マウスは、4日連続してこの処理を受け、この時点で、それらを屠殺して、様々な組織および血清を分析のために採取する。正常脾臓および本発明のアルブミン融合タンパク質により処理された脾臓からのH & Eセクションの比較により、脾臓細胞に対する融合タンパク質の活性の結果 (例えば、動脈周囲リンパ鞘の拡散、および/または赤脾髄の有核細胞の有意な増加) が特定され、このことは、B細胞集団の分化および増殖の活性化を示し得る。B細胞マーカーである抗C D 4 5 R (B 2 2 0) を用いる免疫組織化学的研究を使用して、脾臓細胞に対する任意の生理学的変化 (例えば、脾臓分離) が、確立されたT細胞領域に浸潤するべく規定されたB細胞領域内での増加したB細胞提示に起因するか否かを決定する。

【1030】

アルブミン融合タンパク質で処理されたマウス由来の脾臓のフローサイトメトリ分析を用いて、アルブミン融合タンパク質が、対照マウスにおいて観察される以上に、T h B +、C D 4 5 R (B 2 2 0) d u l l B細胞部分の比率を増大させるか否かを示す。

【1031】

同様に、予測した結果である生体内での成熟B細胞顕現の増大は、血清I g 滴定濃度の相対的増加によるものである。したがって、血漿I g MおよびI g Aのレベルは、緩衝液で処理されたマウスと融合タンパク質で処理されたマウスとの間で比較する。

【1032】

実施例17: T細胞増殖アッセイ

C D 3 誘導性増殖アッセイをP B M C について行ない、 ^{3} H-チミジンの取り込みにより測定する。アッセイは、以下のように行なう。96ウェルプレートを、C D 3 に対して100 μ l / ウェルのm A b (H I T 3 a, P h a r m i n g e n) か、またはイソ型一致対照m A b (B 3 3. 1) を用いて、4°Cで一晩コーティング (0.05 M 炭酸塩緩衝液中1 μ g / m l、p H 9.5) し、次いで、P B S で3回洗浄する。F / H 勾配遠心分離により、ヒト末梢血からP B M C を単離し、R P M I (10% F C S およびP / S を含有する) 中、様々な濃度の本発明のアルブミン融合タンパク質 (治療用タンパク質のフラグメントもしくは変異体ならびに/またはアルブミンあるいはアルブミンのフラグメントもしくは変異体を含有する融合タンパク質を含む) (全容量200 μ l) の存在下で、m A b コーティングプレートの4組のウェル (5×10^4 / ウェル) に加える。関連タンパク質緩衝液および培地のみを対照とする。37°Cで48時間培養後、1000 r p m で2分間回転させ、100 μ l の上清を除去し、増殖に対する影響が観察される場合、I L-2 (または他のサイトカイン) の測定のために-20°Cで保存する。ウェルに0.5 u

C i の ^3H -チミジンを含む $100\ \mu\text{l}$ の培地を追加し、 37°C で $18\sim 24$ 時間培養する。ウェルを採取し、 ^3H -チミジンの取り込みを増殖の評価基準として用いる。抗 CD 3 のみが、増殖の正対照である。IL-2 ($100\ \text{U}/\text{ml}$) をまた、増殖を増強する対照として用いる。T 細胞の増殖を誘導しない対照抗体を、本発明の融合タンパク質の効果の負対照として用いる。

【1033】

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、ならびに単球および単球由来ヒト樹状細胞の細胞分化に関する本発明の融合タンパク質の影響

樹状細胞を、末梢血において見出される増殖前駆体の拡大により生成する：接着 PBC M または浄化した単球画分を、GM-CSF ($50\ \text{ng}/\text{ml}$) および IL-4 ($20\ \text{ng}/\text{ml}$) と共に $7\sim 10$ 日間培養する。これらの樹状細胞は、未成熟細胞 (CD 1、CD 80、CD 86、CD 40、および MHC クラス II 抗原の発現) の特徴的な表現型を有する。TNF- α 等の活性化因子での処理により、表面表現型の急激な変化 (NHC クラス I および II、同時刺激分子および細胞接着分子の発現の増大、FC γ RII の下方調節、CD 83 の上方調節) 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相関する。

【1034】

表面抗原の FACS 分析を次の通りに行なう。細胞を、漸増する濃度の本発明のアルブミン融合タンパク質または LPS (正対照) で $1\sim 3$ 日間処理し、 1% の BSA および $0.02\ \text{mM}$ のアジ化ナトリウムを含む PBS で洗浄し、次いで、 $1:20$ 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°C にて 30 分間インキュベートする。さらに洗浄後、標識細胞を、FACSscan (Becton Dickinson) でのフローサイトメトリーにより分析する。

【1035】

サイトカインの産生における影響 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 および NK 細胞機能を誘導する。ELISA を用いて、以下の通りに IL-12 の放出を測定する。樹状細胞 ($10^6/\text{ml}$) を、漸増する濃度の本発明のアルブミン融合タンパク質で 24 時間処理する。正対照として、LPS ($100\ \text{ng}/\text{ml}$) を細胞培養物に加える。次いで、細胞培養物からの上清を採取し、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。キットに添付された標準的なプロトコルを用いる。

【1036】

MHC クラス II、同時刺激分子、および接着分子の発現における影響 細胞表面抗原の 3 つの主要なファミリーすなわち接着分子、抗原提示に関与する分子、および Fc 受容体が、単球上で特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 等の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 受容体の発現増大は、単球の細胞傷害性活性、サイトカイン放出および食作用の改善に関連し得る。

【1037】

FACS 分析を用いて、以下の通りに表面抗原を調べる。単球を、漸増する濃度の本発明のアルブミン融合タンパク質または LPS (正対照) で $1\sim 5$ 日間処理し、 1% の BSA および $0.02\ \text{mM}$ のアジ化ナトリウムを含む PBS で洗浄し、次いで、 $1:20$ 希釈の適当な FITC または PE 標識モノクローナル抗体で、 4°C にて 30 分間インキュベートする。さらに洗浄後、標識細胞を、FACSscan (Becton Dickinson) 上でのフローサイトメトリーにより分析する。

【1038】

単球の活性化および／または生存率の増大 単球を活性化 (または代替として、不活性化)、および／または単球の生存率を増大させる (または代替として、単球の生存率の低

10

20

30

40

50

減) 分子についてのアッセイは、当該技術分野で周知であり、通常には、本発明の分子が、単球の阻害剤または活性剤として機能するかどうかの決定するために適用され得る。下記の3種類のアッセイを用いて、本発明のアルブミン融合タンパク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各々について、Histopaque 勾配 (Sigma) による遠心分離により、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。単球を、向流遠心分離洗浄により、PBMC から単離する。

【1039】

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場合、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 等の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 のフラグメント化を防ぐ。ヨウ化プロピジウム (PI) 染色を用いて、以下の通りにアポトーシスを測定する。単球を、無血清培地 (正対照) 中で、100 ng/ml の TNF- α (負対照) の存在下、および試験される各濃度の融合タンパク質の存在下で、ポリプロピレンチューブにて48時間培養する。細胞を、最終濃度5 μ g/ml のPIを含有するPBS中で、 2×10^6 /ml の濃度で懸濁し、次いで、FACSscan 分析する前、室温にて5分間インキュベートする。PIの取り込みは、この実験パラダイムにおいて、DNAフラグメント化と相関することが実証されている。

【1040】

サイトカイン放出における影響 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する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、以下の通りに行なう。ヒト単球を、漸増する濃度の本発明のアルブミン融合タンパク質と共に同じ条件下であるが融合タンパク質の非存在下で、密度 5×10^5 細胞/mlにてインキュベートする。IL-12 産生のため、細胞を、融合タンパク質の存在下で、IFN (100 U/ml) を用いて一晚刺激する。次いで、LPS (10 ng/ml) を加える。24時間後、条件培地を採取し、使用するまで凍結保存する。次いで、TNF- α 、IL-10、MCP-1、およびIL-8の測定を、市販のELISAキット (例えば、R&D Systems (Minneapolis, MN)) を用いて行ない、キットに添付された標準的なプロトコルを適用する。

【1041】

酸化バースト 精製した単球が、96ウェルプレートに $2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞/ウェルにてプレーティングされる。漸増する濃度の本発明のアルブミン融合タンパク質を、合計容量0.2 mlの培養培地 (10%のFCS、グルタミン、および抗生物質を含むRPMI) 中のウェルに加える。3日間インキュベーションした後、プレートを遠心分離し、培地をウェルから除去する。単層のマクロファージに、0.2 ml/ウェルのフェノールレッド溶液 (140 mMのNaCl、10 mMのリン酸カリウム緩衝液、pH 7.0、5.5 mMのデキストロース、0.56 mMのフェノールレッド、および19 U/mlのHRPO) を、刺激剤 (200 nMのPMA) と共に加える。プレートを、37°Cで2時間インキュベートし、1ウェルあたり20 μ lの1NのNaOHを加えることにより、反応を停止させる。吸光度を610 nmで読み取る。マクロファージにより産生されるH₂O₂の量を測定するために、周知のモル濃度のH₂O₂ 溶液の標準曲線を、各実験について作成する。

【1042】

実施例19：血管内皮細胞の成長における本発明のアルブミン融合タンパク質の影響

1日目に、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を、4% ウシ胎児血清 (FBS)、16単位/mlのヘパリン、および50単位/mlの内皮細胞成長補助剤 (ECGS、Biotechnology, Inc.) を含有するM199培地中で、 $2 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/35 mmの皿密度にて播種する。2日目に、培地を、10% FBS、8単位/mlのヘパリンを含有するM199と置き換える。本発明のアルブミン融合タンパク質、およびVEGFおよび塩基性FGF (bFGF) 等の正対照を、各濃度にて加える。4日目およ

び6日目に、培地を交換する。8日目に、細胞数を、コールターカウンターを用いて決定する。

【1043】

HUVEC細胞数の増加は、融合タンパク質が、血管内皮細胞を増殖させ得ることを示す一方、HUVEC細胞数の減少は、融合タンパク質が、血管内皮細胞を阻害することを示す。

【1044】

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タンパク質の血管新生における影響を示す。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）を作ること、

本発明のアルブミン融合タンパク質の50ng～5μgを含有するペレットのくぼみ内の位置付けること、を含む。

また、本発明のアルブミン融合タンパク質による処置を、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。

【1045】

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タンパク質が治癒過程を加速するかどうかを示すために、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、臨床的に関連する、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. et al., J. Surg. Res. 52:389 (1992)、Greenhalgh, D. G. et al., Am. J. Pathol. 136:1235 (1990)）。

【1046】

糖尿病動物は、II型糖尿病で観察される多くの特徴的特性を有する。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）同腹子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 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:283-293 (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 et al., J. Immunol. 120:1375 (1978)、Debray-Sachs, M. et al., Clin. Exp. Immunol. 51(1):1-7 (1983)；Leiter et al., 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記載されている（Norido, F. et al., Exp. Neurol. 83(2):221-232 (1984)、Robertson et al., Diabetes 29(1):60-67 (1980)、Giacomelli et al., 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、ヒトII型糖尿病に類似しているインスリンに耐性を示す高血糖を発症する（Mandel et al., J. Immunol. 120:1375-1377 (1978)）。

【1047】

これらの動物において観察される特徴は、このモデルにおける治癒が、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, et al.

10

20

30

40

50

, Am. J. of Pathol. 136:1235-1246 (1990))。

【1048】

遺伝的に糖尿病のメスC57BL/KsJ (db+/db+) マウスおよびそれらの非糖尿病 (db+/+m) ヘテロ接合型同腹子を、本研究に用いる (Jackson Laboratories)。動物は、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。すべての操作を、無菌法を用いて行なう。実験を、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、行なう。

10

【1049】

創傷プロトコルを、既に報告された方法 (Tsuboi, R. and Rifkin, D. B., J. Exp. Med. 172:245-251 (1990)) に従い、行なう。簡潔には、創傷した日に、動物を、アーバティン (0.01mg/mL)、脱イオン水に溶解した2, 2, 2-トリプ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、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。次いで、8mmの全層創傷を、キース組織パンチを用いて作製する。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、開いた状態である。処置の適用は、創傷の日から始めて連続して5日間、局所的に投与される。処置する前に、創傷を、滅菌生理食塩水およびガーゼスポンジで優しく拭く。

20

【1050】

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。創傷の閉鎖は、1~5日目および8日目の毎日の測定により決定する。損傷を、目盛付きジュームソンカリパスを用いて、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、創傷が一枚の上皮で覆われると、創傷は、治癒したとみなされる。

【1051】

本発明のアルブミン融合タンパク質は、異なる用量範囲、ビヒクル中の4mg~500mg/創傷/日を用いて、8日間投与される。ビヒクル対照群には、ビヒクル溶液50mLを投与する。

30

【1052】

動物は、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、安楽死させる。次いで、創傷および周辺の皮膚を、組織学および免疫組織化学のために採取する。組織標本を、さらに処理するために、生検スポンジ間の組織カセット中、10%の中性緩衝ホルマリンに入れる。

【1053】

各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。

【1054】

創傷閉鎖を、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ることにより分析する。次いで、最初の創傷領域 (0日目) と処置後のもの (8日目) との差を確定することにより、萎縮を評価する。1日目の創傷領域は、皮膚の穿孔に対応する大きさの64mm²である。計算は、以下の式を用いて行なわれる:

40

a. [8日目の開口領域] - [1日目の開口領域] / [1日目の開口領域]

【1055】

標本を、10%の緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィン包埋ブロックを、Reichert-Jungミクロトームを用いて、創傷表面に垂直に薄切 (5mm) する。二分した創傷の断面において、通常のヘマトキシリン-エオジン (H&E) 染色を行なう。創傷の組織学的検査を用いて、治癒過程および修復された皮膚の形態学的外観が、本発明のア

50

ルブミン融合タンパク質による処置により、変化するかどうかを評価する。この評価は、細胞蓄積、炎症性細胞、毛細血管、線維芽細胞、再上皮形成、および表皮成熟の存在の検証を含む (Greenhalgh, D. G. et al., 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。

【1056】

組織切片はまた、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、免疫組織化学的に染色される。ヒトの皮膚を、正の組織対照として用いる一方、非免疫 IgG を、負対照として用いる。ケラチノサイトの成長を、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により決定する。

【1057】

皮膚標本における増殖性細胞核抗原／サイクリン (PCNA) を、ABC Elite 検出システムを用いて、抗 PCNA 抗体 (1:50) を用いることにより決定する。ヒト結腸癌は、正の組織対照としての役割を果たし、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んだ。これらの切片のランキングは、増殖の程度の 0~8 の階級に基づき、低い階級ほど増殖がわずかなであることを反映し、高いほど急激な増殖を反映する。

【1058】

実験データを、不對の t 検定を用いて、分析する。0.05 未満の p 値を有意とみなす。

【1059】

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障害は、様々な体外および生体内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 et al., J. Immunol. 115:476-481 (1975)、Werb et al., J. Exp. Med. 147:1684-1694 (1978))。糖質コルチコイドは、血管新生を障害し、血管透過性 (Ebert et al, 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 et al., Growth Factors. 5:295-304 (1991)、Haynes et al., 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 et al., J. Clin. Invest. 61:703-797 (1978)、Wahl, "Glucocorticoids and wound healing", In: Anti-inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, pp. 280-302 (1989)) により、創傷治癒を遅延させる。障害のある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 et al., Growth Factors. 5:295-304 (1991)、Haynes et al., J. Clin. Invest. 61:703-797 (1978)、Wahl, "Glucocorticoids and wound healing", In: Anti-inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, pp. 280-302 (1989)、Pierce et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2229-2233 (1989))。

【1060】

本発明のアルブミン融合タンパク質が、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タンパク質の複数局所適用の効果を、評価する。

10

20

30

40

50

【1061】

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、この実施例において用いる。動物は、8週齢にて購入し、研究の開始時に9週齢とする。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）により阻害する。動物を、個々に収容し、餌と水を自由に摂取させる。すべての操作を、無菌法を用いて行なう。この研究は、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、行なわれる。

10

【1062】

創傷のプロトコルは、上記に従う。創傷させる日に、動物を、ケタミン（50mg/kg）およびキシラジン（5mg/kg）の筋肉内注射で麻酔する。動物の背部を剃り、皮膚を70%の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。8mmの全層創傷を、キース組織パンチを用いて作製する。創傷は、実験期間中、開いた状態である。試験物質の適用は、創傷の日から始めて連続して7日間、局所的に投与され、次いで、メチルプレドニゾロンを投与される。処置する前に、創傷を、滅菌生理食塩水およびガーゼスポンジで優しく拭く。

20

【1063】

創傷を、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。創傷の閉鎖は、1～5日目および8日目の毎日の測定により決定する。損傷を、目盛付きジェームソンカリパスを用いて、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、創傷が一枚の上皮で覆われると、創傷は、治癒したとみなされる。

【1064】

本発明の融合タンパク質は、異なる用量範囲、ビヒクル中の4mg～500mg/創傷/日を用いて、8日間投与される。ビヒクル対照群には、ビヒクル溶液50mLを投与する。

【1065】

動物は、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、安楽死させる。次いで、創傷および周辺の皮膚を、組織学のために採取する。組織標本を、さらに処理するために、生検スポンジ間の組織カセット中、10%の中性緩衝ホルマリンに入れる。

30

【1066】

各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）処置群を評定する。

【1067】

創傷閉鎖を、縦軸および横軸間の領域を測定し、創傷の領域の合計を得ることにより分析する。次いで、最初の創傷領域（0日目）と処置後のもの（8日目）との差を確定することにより、閉鎖を評価する。1日目の創傷領域は、皮膚の穿孔に対応する大きさの64mm²である。計算は、以下の式を用いて行なわれる：

40

b.
$$[8 \text{ 日目の開口領域}] - [1 \text{ 日目の開口領域}] / [1 \text{ 日目の開口領域}]$$

【1068】

標本を、10%の緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィン包埋ブロックを、Olympusミクロトームを用いて、創傷表面に垂直に薄切（5mm）する。二分した創傷の断面において、通常のヘマトキシリン-エオジン（H&E）染色を行なう。創傷の組織学的検査は、治癒過程および修復された皮膚の形態学的外観が、本発明のアルブミン融合タンパク質による処置により、改善されるかどうかを評価することを可能にする。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。

50

【1069】

実験データを、不對の t 検定を用いて、分析する。0.05未満の p 値を有意とみなす。

【1070】

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管形成および再確立における本発明のアルブミン融合タンパク質の治療効果を試験するための適切かつ一貫した、リンパ浮腫モデルを作製することである。有効性は、罹患した足の浮腫容積、リンパ脈管構造の量の定量、総血漿タンパク質の量、および組織病理により測定される。急性リンパ浮腫は、7～10日間観察される。おそらくより重要なことは、浮腫の慢性進行は、3～4週間まで続く。

10

【1071】

手術を開始する前に、血液試料を、タンパク質濃度分析のために採血する。約350gの体重のオスのラットに、ペントバルビタールを投薬する。次いで、右足を膝から股関節部まで剃毛する。剃毛した範囲を70%のEtOHに浸したガーゼで拭く。血液を、血清総タンパク質試験のために採血する。2つの測定レベル（踵の0.5cm上、足背の中間点）に印をつけた後、足へ色素を注射する前に、周径および体積測定を行なう。右足および左足の両方の背側皮内に、1%のエバンスブルー0.05mlを注射する。次いで、後足への色素を注射した後、周径および体積測定を行なう。

【1072】

目印として膝関節を用いて、中肢鼠径部切開を、大腿血管の位置を確認できるように環状に行なう。鉗子および止血剤を用いて、皮膚弁を切開し、分取する。大腿血管の位置を確認した後、血管の横に沿って、かつ血管の下に走るリンパ管を位置確認する。次いで、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。

20

【1073】

顕微鏡を用いて、足の後ろの筋肉（半膜様筋および内転筋の近く）を平滑に切開する。次いで、膝窩リンパ節の位置を確認する。次いで、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部を縫合糸により結紮する。次いで、膝窩リンパ節および任意の付随の脂肪組織を、結合組織を切断することにより除去する。

【1074】

この手順で生じるいかなる軽度の出血をも制御するように注意する。リンパ管を閉塞した後、皮膚弁を、液体皮膚（Vetbond）（A J Buck）を使用することにより密封する。別々の皮膚縁を、足の周囲に約0.5cmの隙間を残しながら、その下の筋肉組織に密封する。皮膚はまた、必要な場合には、その下の筋肉に縫合することにより固定してもよい。

30

【1075】

感染を回避するために、動物を、網を用いて個別に収容する（床敷きなし）。回復した動物を、最適な浮腫ピークを通して毎日チェックし、これは、典型的には、5～7日までに生じる。次いで、プラトーの浮腫ピークを観察する。リンパ浮腫の程度を評定するために、各足の周囲および2ヶ所の指定地点の体積を、手術前、そして7日間毎日測定する。血漿タンパク質のリンパ浮腫における効果を決定し、タンパク質分析が、有用な試験視野計であるかどうか調べる。対照および浮腫の足の両方の重さを、2地点で評価する。盲検で分析する。

40

【1076】

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。測定を、距骨および足背面にて、2人の異なる人物により行ない、これらの2つの読み取りを平均する。読み取りを、対照肢および水腫肢の両方から得る。

【1077】

体積の測定：手術日に、動物を、ペントバルビタールで麻酔し、手術前に試験する。毎日の体積の測定のためには、動物を、簡単なハロタン麻酔（迅速な固定化かつ回復）下に

50

おき、両足を剃毛し、防水マーカーを用いて足に等しく印を付ける。足を、最初に水に漬け、次いで、各々印をしたレベルまで装置に漬け、次いで、Buxco水腫ソフトウェア（Chen/Victor）により測定する。データを一人によって記録する一方、もう一人が、印を付けた領域まで足を漬ける。

【1078】

血液－血漿タンパク質の測定：手術の前に、血液を採血し、遠心分離し、血清を分離させ、次いで、全タンパク質および Ca^{2+} を比較する。

【1079】

足重量の比較：採血後、動物に組織採取の準備をする。キリチン（quillitin）を用いて足を切断し、次いで、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。脛踵関節を外し、足の体重を測定することで、第2の重量測定を行う。

10

【1080】

組織学的調製：膝（膝窩）領域の後ろに位置する横筋を切り出し、金属型に配置し、凍結ゲルを充填し、冷メチルブタンに漬け、切断するまで、 $-80^{\circ}C$ にて標識試料バッグに入れる。切断の際に、筋肉を、蛍光顕微鏡の下で、リンパ管について観察する。

【1081】

実施例23：本発明のアルブミン融合タンパク質によるTNF α 誘導性接着分子の発現の抑制

炎症および血管新生の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－リガンド相互作用が関与する。接着プロセスは、正常および病理学的設定の両方において、細胞間接着分子－1（ICAM－1）、血管細胞接着分子－1（VCAM－1）、および内皮細胞（EC）における内皮白血球接着分子－1（E－セレクチン）の発現を含む、多段階カスケードに続く。血管内皮におけるこれらの分子および他の分子の発現は、白血球が、局所脈管構造に接着し得、炎症応答の発生中、局所組織に溢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CAMの発現の調節に関与する。

20

【1082】

強力なプロ炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 α （TNF－ α ）は、内皮細胞における3つすべてのCAMの刺激因子であり、多種多様の炎症応答に関与し得、しばしば病理学的結果をもたらす。

30

【1083】

TNF－ α 誘導性CAM発現の抑制を媒介する本発明のアルブミン融合タンパク質の潜在能力を試験し得る。改変型ELISAアッセイ（これは、固相吸着剤としてECを使用する）を採用して、FGFファミリーメンバーのタンパク質と共に同時刺激した場合に、TNF－ α 処理ECにおけるCAM発現の量を測定する。

【1084】

この実験を行うために、ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）培養物を、プールした索採取物から得、10%のFCSおよび1%のペニシリン／ストレプトマイシンを追加した増殖培地（EGM－2；Clonetics, San Diego, CA）中で、5%の CO_2 を含有する37℃の加湿インキュベーター内において維持する。HUVECを、EGM培地中、 1×10^4 細胞／ウェルの濃度にて、96ウェルプレート中に、37℃で18～24時間または集約状態になるまで播種する。次いで、単層を、100U／mlペニシリンおよび100mg／mlストレプトマイシンを追加したRPMI－1640の無血清溶液で3回洗浄し、所定のサイトカインおよび／または増殖因子を用いて、24時間37℃にて処理する。インキュベーション後、次いで、この細胞を、CAM発現について評価する。

40

【1085】

ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）を、標準的な96ウェルプレート中で集密まで成長させる。増殖培地を、細胞から取り除き、90 μ lの199培地（10%のFBS）と置き換える。試験のための試料および正または負対照を、このプレートに三連で添加する（

50

10 μ l 容量中)。プレート、37℃にて、5時間（セレクトインおよびインテグリン発現）あるいは24時間（インテグリン発現のみ）のいずれかでインキュベートする。プレートを吸引して、培地を除去し、100 μ l の0.1%のパラホルムアルデヒド-PBS（Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を有する）を各ウェルに加える。プレートを、4℃にて30分間保持する。

【1086】

次いで、固定剤をウェルから除去し、ウェルをPBS（+Ca、Mg）+0.5%のBSAを用いて、1回洗浄し、排水する。ウェルを乾燥させないこと。10 μ l の希釈した一次抗体を、試験および対照ウェルに加える。抗ICAM-1-ビオチン、抗VCAM-1-ビオチン、および抗E-セレクトイン-ビオチンを、10 μ g/ml の濃度（0.1 mg/ml のストック抗体の1:10希釈）で用いる。細胞を、加湿した環境において、37℃にて30分間インキュベートする。ウェルを、PBS（+Ca、Mg）+0.5%のBSAを用いて、3回洗浄する。

【1087】

次いで、20 μ l の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）を各ウェルに加え、37℃で30分間インキュベートする。ウェルを、PBS（+Ca、Mg）+0.5%のBSAを用いて、3回洗浄する。1錠のp-ニトロフェノールホスフェートpNPPを、5ml のグリシン緩衝液（pH10.4）に溶解させる。グリシン緩衝液中の100 μ l のpNPP基質を、各試験ウェルに加える。三連の標準ウェルを、グリシン緩衝液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 ） $> 10^{-0.5} > 10^{-1} > 10^{-1.5}$ から調製する。5 μ l の各希釈物を、三連ウェルに加え、各ウェル中で生じたAP含有量は、5.50 ng、1.74 ng、0.55 ng、0.18 ngである。次いで、100 μ l のpNPP試薬を、各標準ウェルに加えなければならない。プレートを、37℃にて4時間インキュベートしなければならない。50 μ l の3M NaOHの容量を、すべてのウェルに加える。結果を、プレートリーダーにおいて405 nmにて定量する。バックグラウンド減算オプションを、グリシン緩衝液のみで充填したブランクウェルにおいて使用する。テンプレートを、各々の標準ウェルにおけるAP結合体の濃度を示すように設定する[5.50 ng、1.74 ng、0.55 ng、0.18 ng]。結果を、各試料中の結合したAP結合体の量として示す。

【1088】

実施例24：GASレポーター構築物の構築

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経路の活性化されたタンパク質は、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」）に結合する。タンパク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。

【1089】

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Iの細胞において見出されている。Stat5は、元々は、乳成長因子と呼ばれたが、骨髓細胞を含む他の細胞においてより高濃度で見出されている。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。

【1090】

STATは、ヤヌスキナーゼ（「Jak」）ファミリーとして知られている一連のキナーゼによるチロシンリン酸化において、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独特のファミリーを表し、Tyk2、Jak1、Jak2、

および J a k 3 を含む。これらのキナーゼは、有意な配列類似性を示し、概して、休止細胞において触媒的に不活性である。

【1091】

J a k は、以下の表により概説される広範な受容体により活性化される (S c h i d l e r and D a r n e l l, Ann. Rev. Biochem. 64:621-51 (1995) による総説から適応)。J a k 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、I L-2、I L-3、I L-4、I L-6、I L-7、I L-9、I L-11、I L-12、I L-15、E p o、P R L、G H、G-C S F、G M-C S F、L I F、C N T F、およびトロンボポエチンの受容体を含み、(b) クラス2は、I F N-a、I F N-g、および I L-10 を含む。クラス1受容体は、保存されたシステインモチーフ(4個の保存されたシステインおよび1個のトリプトファンのセット)および W S X W S モチーフ (T r p-S e r-X a a-T r p-S e r (配列番号53) をコードする膜近接領域) を共有する。

10

【1092】

したがって、リガンドの受容体との結合において、J a k は活性化され、それは、次いで S T A T を活性化し、転位し、G A S エlement に結合する。この全過程が、J a k-S T A T シグナル伝達経路に包含される。したがって、G A S または I S R E Element の結合により反映される J a k-S T A T 経路の活性化を用いて、細胞の増殖および分化に参与するタンパク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、J a k-S T A T 経路を活性化することが知られている(以下の表5を参照のこと)。したがって、受容体分子に連結した G A S Element を用いることにより、J a k-S T A T 経路の活性化因子を特定することができる。

20

【1093】

【表 4 - 1】

表 5

<u>リガンド</u>	<u>JAK</u>				<u>STAT</u>	<u>GAS (エレメント) またはISRE</u>	
	<u>tyk2</u>	<u>Jak1</u>	<u>Jak2</u>	<u>Jak3</u>			
<u>IFNファミリー</u>							
IFN-a/B	+	+	-	-	1,2,3	ISRE	10
IFN-g		+	+	-	1	GAS (IRF1>Lys6>IFP)	
II-10	+	?	?	-	1,3		
<u>gp130ファミリー</u>							
IL-6(多形質)	+	+	+	?	1,3	GAS(IRF1>Lys6>IFP)	20
II-11(多形質)	?	+	?	?	1,3		
OnM(多形質)	?	+	+	?	1,3		
LIF(多形質)	?	+	+	?	1,3		
CNTF(多形質)	-/+	+	+	?	1,3		
G-CSF(多形質)	?	+	?	?	1,3		
IL-12(多形質)	+	-	+	+	1,3		
<u>g-Cファミリー</u>							
IL-2 (リンパ球)	-	+	-	+	1,3,5	GAS	
IL-4 (リンパ／骨髄)	-	+	-	+	6	GAS(IRF1=IFP>>Ly6)(IgH)	
IL-7 (リンパ球)	-	+	-	+	5	GAS	

【1094】

【表 4 - 2】

表 5

IL-9 (リンパ球)	-	+	-	+	5	GAS
IL-13 (リンパ球)	-	+	?	?	6	GAS
IL-15	?	+	?	+	5	GAS

gp140ファミリー

IL-3(骨髄)	-	-	+	-	5	GAS(IRF1>IFP»Ly6)
IL-5(骨髄)	-	-	+	-	5	GAS
GM-CSF(骨髄)	-	-	+	-	5	GAS

10

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)

20

受容体チロシンキナーゼ

EGF	?	+	+	-	1,3	GAS(IRF1)
PDGF	?	+	+	-	1,3	
CSF-1	?	+	+	-	1,3	GAS(IRF1ではない)

【1095】

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を含有する合成 GAS を構築するために、PCR ベースのストラテジーを採用し、GAS-SV40 プロモーター配列を生成する。5' プライマーは、IRF1 プロモータに見出され、広範なサイトカインでの誘導の際、STAT に結合することが既に示されている GAS 結合部位の 4 個のタンデムコピーを含有するが (Rothman et al., Immunity 1:457-468 (1994))、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 18 bp を含有し、XhoI 部位と隣接する。5' プライマーの配列は、5' : GCGCCTCGAGATTTC C C C G A A A T C T A G A T T T C C C C G A A A T G A T T T C C C C G A A A T G A T T T C C C C G A A A T A T C T G C C A T C T C A A T T A G : 3' (配列番号 54) である。

30

【1096】

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' : GCGGCAAGCTTTT T T T G C A A A G C C T A G G C : 3' (配列番号 55)。

40

【1097】

PCR 増幅を、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、行なう。得られた PCR フラグメントを、XhoI/HindIII で消化し、BLSK2- (Stratagene) にサブクローニングする。正方向および逆方向のプライマーを用いる配列決定により、挿入物が以下の配列、

5' : C T C G A G A T T T T C C C C G A A A T C T A G A T T T T C C C C G A A A T G A T T T C C C C G A A A T G A T T T C C C C G A A A T A T C T G C C A T C T C A

50

A T T A G T C A G C A A C C A T A G T C C C G C C C C T A A C T C C G C C C A T
C C C G C C C C T A A C T C C G C C C A G T T C C G C C C A T T C T C C G C C C
C A T G G C T G A C T A A T T T T T T T T A T T T A T G C A G A G G C C G A G G
C C G C C T C G G C C T C T G A G C T A T T C C A G A A G T A G T G A G G A G G
C T T T T T T G G A G G C C T A G G C T T T T G C A A A A A G C T T : 3' (配列
番号56)を含むことを確認する。

【1098】

次に、SV40プロモーターと連結したこのGASプロモーターエレメントを用いて、
GAS:SEAP2受容体構築物进行操作する。ここで、レポーター分子は、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、明らかに、本実施例または
他の実施例のいずれにおいても、任意の受容体分子が、SEAPの代わりとなり得る。S
EAPの代わりに使用され得る公知の受容体分子としては、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、β-ガラ
クトシダーゼ、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、または抗体により検出可能な任意の
タンパク質が挙げられる。

【1099】

上記の配列により確認された合成GAS-SV40プロモーターエレメントを、GAS
-SEAPベクターを作製するために、HindIIIおよびXhoIを用いて、増幅し
たGAS:SV40プロモーターエレメントでSV40プロモーターを有効に置換し、C
lon t e c hから得られたpSEAP-プロモーターベクターにサブクローニングする
。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まず、したがって、哺乳
動物の発現系には好ましくない。

【1100】

したがって、GAS-SEAPレポーターを発現する哺乳動物の安定な細胞株を作製す
るために、GAS-SEAPカセットを、SalIおよびNotIを用いて、GAS-S
EAPベクターから取り出し、GAS-SEAP/Neoベクターを作製するために、マ
ルチクローニング部位におけるこれらの制限部位を用いて、ネオマイシン耐性遺伝子を含
有する骨格ベクター(例えば、pGFP-1(Clon t e c h)等)に挿入する。この
ベクターを哺乳動物細胞に形質移入すれば、次いで、このベクターは、実施例27~29
に記載されるように、GAS結合のレポーター分子として使用され得る。

【1101】

他の構築物を、上記の説明を用い、異なるプロモーター配列でGASを置換して、作製
し得る。例えば、EGRおよびNF-KBプロモーター配列を含有するレポーター分子の
構築を、実施例27~31に記載する。しかしながら、多くの他のプロモーターを、これ
らの実施例に記載のプロトコルを用いて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のプロモーターを単独で、または組み合わせて(例
えば、GAS/NF-KB/EGR、GAS/NF-KB、IL-2/NFAT、またはNF-KB/GAS)置換することが
できる。同様に、他の細胞株(例えば、HELA
(上皮細胞)、HUVEC(内皮細胞)、Reh(B細胞)、Saos-2(骨芽細胞)
、HUVAC(大動脈細胞)、または心筋細胞等)を用いて、レポーター構築物の活性を
試験することができる。

【1102】

実施例25:SEAP活性についてのアッセイ

本明細書に開示される実施例に記載のアッセイの受容体分子として、SEAP活性を、
以下の一般的な手順に従って、Tropix Phospho-lightキット(カタ
ログ番号BP-400)を用いて、アッセイする。Tropix Phospho-li
g h tキットは、以下で使用される希釈緩衝液、アッセイ緩衝液、および反応緩衝液を供
給する。

【1103】

容器に2.5×希釈緩衝液を入れ、15μlの2.5×希釈緩衝液を、本発明のアルブ

10

20

30

40

50

ミン融合タンパク質を含有する 35 μ l の上清を含むオプティプレート (Optiplate) に分配する。プレートを、プラスチックシーラーで密封し、65 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートする。不均一な加熱を避けるため、光学プレートを離しておく。

【1104】

試料を室温まで 15 分間冷却する。容器を空にし、アッセイ緩衝液を入れる。アッセイ緩衝液 50 ml を加え、室温で 5 分間インキュベートする。容器を空にし、反応緩衝液 (以下の表を参照のこと) を入れる。反応緩衝液 50 μ l を加え、室温で 20 分間インキュベートする。化学発光シグナルの強度は、時間に依存し、ルミノメーターでプレート 5 枚を読み取るためには、約 10 分間を費やすので、プレート 5 枚を同時に処理し、10 分後に次のセットを開始すべきである。

【1105】

ルミノメーターでは、相対的な光の単位 (light unit) を読み取る。ブランクとして H12 をセットし、結果を印字する。化学発光の増加は、レポーター活性を示す。

【表 5】

表 6

プレート番号	反応緩衝希釈液 (ml)	CSPD (ml)	プレート番号	反応緩衝希釈液 (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			

【1106】

実施例 26 : ニューロン活性を特定するアッセイ

細胞が、分化および増殖する場合、1 群の遺伝子が、多くの異なるシグナル伝達経路を介して、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、活性化の際様々な組織および細胞型で誘導される。EGFR1 のプロモーターは、このような誘導に関与する。レポーター分子と連結した EGFR1 プロモーターを用いて、本発明の融合タンパク質の細胞を活性化する能力を評価することができる。

【1107】

特に、以下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) 等の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。EGFR1 遺伝

子発現は、この処置の間に活性化される。したがって、SEAPレポーターに連結したEGRプロモーターを含有する構築物で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タンパク質によるPC12細胞の活性化を評価することができる。

【1108】

EGR/SEAPレポーター構築物を、以下のプロトコルにより構築される。ヒトゲノムDNAからEGR-1プロモーター配列（-633から+1）（Sakamoto K et al., Oncogene 6:867-871（1991））を、以下のプロモーター、

第1プロモーター：5' GCGCTCGAGGGATGACAGCGATAGAACCCCGG-3'（配列番号57）

第2プライマー：5' GCGAAGCTTTCGCGACTCCCCGGATCCGCCCTC-3'（配列番号58）を用いて、PCR増幅する。

【1109】

次いで、実施例24で産生した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。これらと同じ酵素を用いて、EGR1増幅産物を制限する。ベクターとEGR1プロモーターを連結する。

【1110】

細胞培養のための96ウェルプレートを調製するために、30% エタノール（滅菌濾過）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ウェルあたり50mlを加え、2時間空気乾燥させる。

【1111】

PC12細胞を、予めコーティングした10cm組織培養皿上で、100単位/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシンを追加した、10% ウマ血清（JRH BIOSCIENCES、カタログ番号#12449-78P）、5% 熱非働化ウシ胎仔血清（FBS）を含有するRPMI-1640培地（Bio Whittaker）中で、通常の方法で、成長させる。1つから4つへの分割を、3~4日毎に行う。細胞を、掻き取ることによりプレートから取り出し、15回以上、上下にピペティングして再懸濁する。

【1112】

EGR/SEAP/Neo構築物を、当該技術分野で周知の技法を用いて、PC12に形質移入する。EGR-SEAP/PC12安定細胞を、300μg/mlのG418中で細胞を増殖させることにより得る。G418を含まない培地を、慣用的な増殖のために使用するが、1~2ヶ月毎に、細胞を2継代の間、300μg/mlのG418中で再増殖させるべきである。

【1113】

ニューロン活性についてアッセイするために、約70から80%の集約状態で細胞を有する10cmプレートを、古い培地を除去することによりスクリーニングする。細胞をPBS（リン酸緩衝生理食塩水）を用いて1回洗浄する。次いで、細胞を、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を含有するRPMI-1640）にて一晚飢餓状態におく。

【1114】

翌朝、培地を除去し、PBSを用いて細胞を洗浄する。プレートから細胞を掻き取り、細胞を2mlの低血清培地中で懸濁する。細胞数を計数し、より低血清の培地を加え、 5×10^5 細胞/mlの最終細胞密度に到達させる。

【1115】

200μlの細胞懸濁液を96ウェルプレートの各ウェルに加える（ 1×10^5 細胞/ウェルに等しい）。一連の異なる濃度の本発明のアルブミン融合タンパク質を、37℃で

10

20

30

40

50

48～72時間加える。正対照として、EGF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、50 ng/μlの神経成長因子（NGF）等）を使用することができる。典型的には、50倍を超えるSEAP誘導が、正対照において見られる。通常、SEAPアッセイを、当該分野において周知の技法を用いて、および／または実施例25に記載されるように、行ない得る。

【1116】

実施例27：T細胞活性についてのアッセイ

以下のプロトコルを用いて、因子を特定し、本発明のアルブミン融合タンパク質が、T細胞を増殖および／または分化させるかどうかを決定することにより、T細胞活性を評価する。T細胞活性を、実施例24で産生したGAS/SEAP/Neo構築物を用いて、
10
評価する。したがって、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受託番号TIB-152）であるが、Molt-3細胞（ATCC受託番号CRL-1552）、およびMolt4細胞（ATCC受託番号CRL-1582）も用いることができる。

【1117】

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、ジャーカット細胞約200万個を、DMRIE-C（Life Technologies）を用いて、GAS-SEAP/neoベクターでトランスフェクションする（下記のトランスフェクション法）。トランスフェクション細胞を、1ウェルあたり約20,000細胞密度で播種し、1 mg/mlのゲンチシン（gentamicin）に抵抗性の形質移入体を選択する。耐性コロニーを増殖させ、次いで、漸増する濃度のインターフェロンガンマ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。
20

【1118】

特に、以下のプロトコルにより、200 μlの細胞を含有する75ウェルに十分な細胞を産出する。したがって、これをスケールアップするか、あるいは複数回行ない、複数の96ウェルプレートに十分な細胞を生成する。ジャーカット細胞を、1%のペニシリン/ストレプトマイシンを添加した、RPMI+10%の血清にて維持する。T25フラスコ中で、2.5 mlのOPTI-MEM（Life Technologies）とプラスミドDNA 10 μgとを組み合わせる。50 μlのDMRIE-Cを含有するOPTI-MEM 2.5 mlを加え、室温にて15～45分間インキュベートする。
30

【1119】

インキュベーション期間中、細胞濃度を計数し、必要な数の細胞（1回の形質移入あたり10⁷個）をスピンドウンし、OPTI-MEM中に再懸濁し、最終濃度10⁷細胞/mlとする。次いで、OPTI-MEM中1×10⁷細胞1 mlを、T25フラスコに加え、37℃で6時間インキュベートする。インキュベーション期間後、10 mlのRPMI+15%の血清を加える。

【1120】

ジャーカット：GAS-SEAP安定レポーター株を、RPMI+10%の血清、1 mg/ml ゲンチシン、および1%のペニシリン/ストレプトマイシンにて維持する。これらの細胞を、様々な濃度の本発明の1種類以上の融合タンパク質で処理する。
40

【1121】

融合タンパク質での処理日に、細胞を洗浄し、新しいRPMI+10%の血清中に再懸濁し、1 mlあたり500,000細胞の密度とすべきである。必要な細胞の正確な数は、スクリーニングされる融合タンパク質の数、および異なる濃度の融合タンパク質の数に依存する。1枚の96ウェルプレートに対して、約1000万個の細胞（10プレートに対して、1億個の細胞）を必要とする。

【1122】

融合タンパク質で処理したジャーカット細胞を含有するウェル皿を、インキュベーター
50

内に48時間置く（注意：この時間は、48～72時間の間で変更可能である）。次いで、各ウェルから試料35μlを、12チャンネルのピペットを用いて、半透明の96ウェルプレートに移す。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アッセイを行なうまで、-20℃にて保存するべきである。残りの処理した細胞を含有するプレートを4℃に置き、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の供給源として供する。

【1123】

正対照として、ジャーカットT細胞を活性化することが知られている100単位/mlのインターフェロンガンマを使用することができる。典型的には、30倍を超える誘導が、正対照ウェルにおいて観察される。

【1124】

上記のプロトコルは、一過性、ならびに安定な形質移入細胞の生成において、使用され得、これは当業者に明らかだろう。

【1125】

実施例28：T細胞活性についてのアッセイ

NF-κB（核因子κB）は、多種多様の薬剤（炎症性サイトカインである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）により、LPSまたはトロニンへの曝露により、ならびに特定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-κBは、免疫細胞の活性化、アポトーシスの制御（NF-κBは、アポトーシスから細胞を保護するようである）、BおよびT細胞の発生、抗ウイルスおよび抗菌応答、ならびに複数のストレス応答に関与する遺伝子の発現を調節する。

【1126】

刺激されない条件において、NF-κBは、I-κB（阻害剤κB）を有する細胞質に保持される。しかしながら、刺激の際に、I-κBはリン酸化され、そして分解され、NF-κBの核への往復（shuttle）を引き起こし、これにより標的遺伝子の転写を活性化する。NF-κBにより活性化される標的遺伝子としては、IL-2、IL-6、GM-CSF、ICAM-1、およびクラス1MHCが挙げられる。

【1127】

その中心的な役割および一定の範囲の刺激に応答する能力に起因して、NF-κBプロモーターエレメントを利用するレポーター構築物を用いて、融合タンパク質をスクリーニングする。NF-κBの活性剤または阻害剤は、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-κBの阻害剤を用いて、関節リウマチ等の急性または慢性的なNF-κBの活性化に関連する疾患を処置することができる。

【1128】

NF-κBプロモーターエレメントを含有するベクターを構築するために、PCRに基づいたストラテジーを採用する。上流プライマーは、NF-κB結合部位

（GGGGACTTTCC）（配列番号59）の4個のタンデムコピー、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' : GCGGCCCTCGAGGGGACTTTTCCCGGGGACTTTTCCGGGGACTTTTCCGGGACTTTTCCGGGACTTTTCCATCCTGCCATCTCAATTAG : 3'（配列番号60）。

【1129】

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' : GCGGCCAAGCTTTTGGCAAAGCCTAGGC : 3'（配列番号55）。

【1130】

PCR増幅を、Clontechから得たpB-gal：プロモータープラスミドに存

10

20

30

40

50

在するSV40プロモーターテンプレートをを用いて、行なう。生じたPCRフラグメントを、XhoIおよびHindIIIで消化し、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、挿入物が以下の配列、

5' : CTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCCGGGACTTTCCCATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCA
TAGTCCCGCCCCCTAACTCCCGCCCCATCCCGCCCCCTAACTCC
GCCCCAGTTCCCGCCCCATTCTCCCGCCCCATGGCTGACTAATT
TTTTTTTATTTATGCAAGAGGCCGAGGCCGCGCTCGGGCCTCTG
AGCTATTTCAGAAAGTAGTAGGAGGCTTTTTTTTGGAGGCCCT
AGGCTTTTTGCAAAAAGCTTT : 3' (配列番号61)を含有することを確認する。

10

【1131】

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最小プロモーターエレメントを、このNF-KB/SV40フラグメントで置換する。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まず、したがって、哺乳動物の発現系には好ましくない。

【1132】

安定な哺乳動物細胞株を生成するために、NF-KB/SV40/SEAPカセットを、制限酵素SalIおよびNotIを用いて、上記のNF-KB/SEAPベクターから取り出し、ネオマイシン耐性を含有するベクターに挿入する。特に、NF-KB/SV40/SEAPカセットを、pGFP-1(Clontech)に挿入し、SalIおよびNotIでpGFP-1を制限処理した後に、GFP遺伝子を置換した。

20

【1133】

NF-KB/SV40/SEAP/Neoベクターを作製すると、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細胞を用いて融合タンパク質をアッセイする方法も実施例25に記載される。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に加え、典型的には、5~10倍の活性化が観察される。

【1134】

実施例29：ニューロン活性を特定するアッセイ

以下のプロトコルを用いて、融合タンパク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タンパク質の骨髄活性を評価する。骨髄細胞活性を、実施例24で産生したGAS/SEAP/Neo構築物を用いて、評価する。したがって、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。

30

【1135】

U937細胞を、実施例24で産生したGAS/SEAP/Neo構築物で、一過性に形質移入するために、DEAE-Dextran法(Kharbanda et al., 1994, Cell Growth & Differentiation, 5:259-265)を用いる。まず、U937細胞 2×10^7 個を採取し、PBSで洗浄する。U937細胞を、通常、100単位/mlのペニシリンおよび100mg/mlのストレプトマイシンを追加した10%の熱不活性化ウシ胎仔血清(FBS)を含有するRPMI 1640培地中で成長させる。

40

【1136】

次に、0.5mg/mlのDEAE-Dextran、8 μ gのGAS-SEAP2プラスミドDNA、140mMのNaCl、5mMのKCl、375 μ MのNa₂HPO₄ 7H₂O、1mMのMgCl₂、および675 μ MのCaCl₂を含有する1mlの20mM トリス-HCl (pH7.4)緩衝液に、細胞を懸濁する。37℃で45分間イン

50

キュベートする。

【1137】

10%のFBSを含有するRPMI 1640培地で細胞を洗浄し、次いで、完全培地10ml中に再懸濁し、37℃で36時間インキュベートする。

【1138】

GAS-SEAP/U937安定細胞を、400μg/mlのG418中で細胞を成長させることにより得る。G418を含まない培地を、慣用的な増殖のために使用するが、1~2ヶ月毎に、細胞を2継代の間、400μg/mlのG418中で再増殖させるべきである。

【1139】

10

これらの細胞を、 1×10^8 個の細胞（これは10枚の96ウェルプレートアッセイのために十分である）を採取することにより試験し、PBSで洗浄する。上記の成長培地200ml中に細胞を懸濁し、最終密度 5×10^5 細胞/mlとする。96ウェルプレートにおいて1ウェルあたり200μlの細胞（または 1×10^5 細胞/ウェル）をプレーティングする。

【1140】

20

異なる濃度の融合タンパク質を加える。37℃で48~72時間インキュベートする。正対照として、U937細胞を活性化することが知られている100単位/mlのインターフェロンガンマを使用することができる。典型的には、30倍を超える誘導が、正対照ウェルにおいて観察される。SEAPは、当該技術分野で周知の方法および/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。

【1141】

実施例30：小分子濃度および膜透過性の変化を特定するアッセイ

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。これらの変化を、特定細胞の受容体に結合する融合タンパク質を特定するためのアッセイにおいて測定することができる。以下のプロトコルは、カルシウムについてのアッセイを記載するが、このプロトコルは、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低分子の変化を検出するように容易に改変され得る。

【1142】

30

以下のアッセイは、蛍光測定画像化プレートリーダー（Fluorometric Imaging Plate Reader）（「FLIPR」）を使用して、小分子と結合する蛍光分子（Molecular Probes）の変化を測定する。明らかに、小分子を検出する任意の蛍光分子を、本明細書で用いるカルシウム蛍光分子、fluo-4（Molecular Probe, Inc.、カタログ番号：F-14202）の代わりに使用することができる。

【1143】

40

接着細胞については、細胞を10,000~20,000細胞/ウェルで、底が透明なCostar黒色96ウェルプレートに播種する。プレートを、CO₂インキュベーターにて20時間インキュベートする。接着細胞を、Biotek洗浄器内で、200μlのHBSS（ハンクス緩衝塩溶液）で2回洗浄し、最後の洗浄後、100μlの緩衝液を残す。

【1144】

1mg/mlのfluo-4のストック溶液を、10%のプルロン酸（pluronic acid）DMSO中で作製する。細胞にfluo-4を負荷するため、12μg/mlのfluo-4（50μl）を各ウェルに加える。プレートを、CO₂インキュベーターにて、37℃で60分間インキュベートする。プレートを、Biotek洗浄器で、HBSSで4回洗浄し、100μlの緩衝液を残す。

【1145】

50

非接着細胞については、細胞を培養培地からスピンドウンする。細胞を、50mlのコ

ニカルチューブ内でHBSSを用いて $2 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mlに再懸濁する。10%のプルロン酸DMSO中の1mg/mlのfluor-4ストック溶液4 μ lを、細胞懸濁液各1mlに加える。次いで、チューブを37℃の水浴中に30～60分間置く。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、10 μ l/ウェルとする。プレートを1000rpmで5分間遠心分離する。次いで、プレートを、Denley細胞洗浄機にて、200 μ lで1回洗浄した後、吸引工程により最終容量を100 μ lとする。

【1146】

非細胞ベースのアッセイについて、各ウェルは、fluor-4等の蛍光分子を含有する。本発明の融合タンパク質をウェルに加え、蛍光の変化を検出する。

10

【1147】

細胞内カルシウムの蛍光を測定するために、FLIPRを以下のパラメーターについて設定する。(1)システムゲイン(System gain)は、300～800mWであり、(2)曝露時間は、0.4秒であり、(3)カメラF/ストップは、F/2であり、(4)励起は488nmであり、(5)発光は530nmであり、(6)試料添加は50 μ lである。530nmでの放出の増大は、本発明のアルブミン融合タンパク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タンパク質により誘発される分子を示し、それは細胞内Ca⁺⁺濃度の増加を生じる。

【1148】

実施例31：チロシンキナーゼ活性を特定するアッセイ

20

タンパク質チロシンキナーゼ(PTK)は、多様な群の膜貫通および細胞質キナーゼを表す。受容体タンパク質チロシンキナーゼ(RPTK)群内に、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、一連の分裂促進および代謝成長因子の受容体がある。加えて、対応するリガンドが未知である大きなRPTKのファミリーがある。RPTKについてのリガンドは、主に、分泌される小タンパク質を含むが、膜結合型および細胞外マトリックスタンパク質も含む。

【1149】

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、これは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の活性化をもたらす。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Jakファミリー等の非受容体結合および細胞質ゾルタンパク質チロシンキナーゼを含み、これらのメンバーは、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)により誘発されるシグナル伝達を媒介する。

30

【1150】

チロシンキナーゼ活性を刺激し得る広範な周知の因子のために、本発明のアルブミン融合タンパク質または本発明のアルブミン融合タンパク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し得るかどうかを特定することは興味深い。したがって、以下のプロトコルを設計して、チロシンキナーゼシグナル伝達経路を活性化し得るこのような分子を特定する。

40

【1151】

標的細胞(例えば、初代ケラチノサイト)を、約25,000細胞/ウェルの密度で、Nalge Nunc(Naperville, IL)から購入した96ウェルLoprodyne Silent Screen Plateに播種する。プレートを、100%のエタノールで30分間ずつ2回すすぐことにより滅菌し、水ですすぎ、一晚乾燥させる。いくつかのプレートを、100mlの細胞培養グレードI型コラーゲン(50mg/ml)、ゼラチン(2%)またはポリリシン(50mg/ml)(これらはすべて、Sigma Chemicals(St. Louis, MO)から購入し得る)で、またはBecton Dickinson(Bedford, MA)から購入した10%のマトリゲル、あるいは仔ウシ血清で2時間コーティングし、PBSですすぎ、4℃で保存する。

50

これらのプレート上の細胞増殖を、成長培地に5,000細胞/ウェルを播種し、製造業者のAlamar Biosciences, Inc. (Sacramento, CA) に記載されるように、アラマブルー (alamarBlue) を使用して、48時間後に細胞数を間接計量することによりアッセイする。Becton Dickinson (Bedford, MA) のFalconプレートカバー#3071を用いて、Loprodyn Silent Screen Plateを覆う。Falcon Microtest III細胞培養プレートもまた、いくつかの増殖実験において使用され得る。

【1152】

抽出物を調製するために、A431細胞をLoprodynプレートのナイロン膜上に播種し(20,000/200ml/ウェル)、完全培地中で一晚培養する。細胞を、無血清基本培地中で24時間インキュベートして静止状態とする。EGF(60ng/ml)または異なる濃度の本発明のアルブミン融合タンパク質で5~20分間処理した後、培地を除去し、100mlの抽出緩衝液(20mM HEPES pH7.5、0.15M NaCl、1%のトリトンX-100、0.1%のSDS、2mM Na3VO4、2mM Na4P2O7、およびBoehringer Mannheim (Indianapolis, IN) から入手したプロテアーゼ阻害剤のカクテル(#1836170))を各ウェルに加え、プレートを、回転振盪器上、4℃で5分間振盪する。次いで、プレートを、真空トランスファーマニホールド(vacuum transfer manifold)に設置し、抽出物を、ハウスバキュームを用いて、各ウェルの底の0.45mm膜を通して濾過する。抽出物を、バキュームマニホールドの底の96ウェル捕獲/アッセイプレートに採取し、直ちに氷上に置く。遠心分離により浄化した抽出物を得るために、界面活性剤で5分間可溶化した後、各ウェルの含有物を取り出し、4℃、16,000xgにて、15分間遠心分離する。

【1153】

濾過抽出物を、チロシンキナーゼ活性のレベルについて試験する。チロシンキナーゼ活性を検出する多数の方法が知られているが、本明細書では、1つの方法を記載する。

【1154】

概して、本発明のアルブミン融合タンパク質のチロシンキナーゼ活性を、特定の基質(ビオチン化されたペプチド)上のチロシン残基をリン酸化する能力を決定することにより、評価する。この目的に使用され得るビオチン化されたペプチドとしては、PSK1(細胞分裂キナーゼcdc2-p34のアミノ酸6~20に相当)およびPSK2(ガストリンのアミノ酸1~17に相当)が挙げられる。両ペプチドは、一連のチロシンキナーゼの基質であり、Boehringer Mannheimから入手可能である。

【1155】

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設定する。まず、5μM ビオチン化されたペプチド10μl、次いで、10μlのATP/Mg₂₊(5mMのATP/50mMのMgCl₂)、次いで、10μlの5×アッセイ緩衝液(40mMの塩酸イミダゾール、pH7.3、40mMのベータグリセロリン酸塩、1mMのEGTA、100mMのMgCl₂、5mMのMnCl₂、0.5mg/mlのBSA)、次いで、5μlのバナジン酸ナトリウム(1mM)、次いで、水5μlを加える。成分を穏やかに混合し、反応混合物を、30℃で2分間プレインキュベートする。10μlの対照酵素または濾過上清を加えることにより、反応を開始させる。

【1156】

次いで、チロシンキナーゼアッセイ反応を、120mM EDTA(10μl)を加えることにより停止し、その反応物を氷上に置く。

【1157】

チロシンキナーゼ活性を、マイクロタイタープレート(MTP)モジュールに反応混合物の50μlのアリコートをし、37℃で20分間インキュベートすることにより、決定する。これにより、ストレプトアビジン(streptavidin)でコーティングされた96ウェルプレートをビオチン化されたペプチドと会合させることが可能である。

MTPモジュールを300 μ l / ウェルのPBSで4回洗浄する。次に、75 μ l の西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化した抗ホスホチロシン (phosphotyrosine) 抗体 (抗-P-Tyr-POD (0.5 u/ml)) を、各ウェルに加え、37℃で1時間インキュベートする。ウェルを上記のように洗浄する。

【1158】

次に、100 μ l のペルオキシダーゼ基質溶液 (Boehringer Mannheim) を加え、室温で少なくとも5分間 (最長30分間) インキュベートする。ELISAリーダーを用いて、405 nmにおける試料の吸光度を測定する。結合したペルオキシダーゼ活性のレベルを、ELISAリーダーを用いて定量し、チロシンキナーゼ活性のレベルを反映する。

10

【1159】

実施例32：リン酸化活性を特定するアッセイ

実施例31に記載されるタンパク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、下記のように、1つ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することができる。しかしながら、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、またはホストレオニン分子等のリン酸化は、以下のアッセイにおいて、Erk-1またはErk-2の代わりに、これらの分子を用いることにより検出することができる。

20

【1160】

特に、アッセイプレートを、0.1 ml のタンパク質G (1 μ g/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、作製する。次いで、そのプレートを、PBSですすぎ、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、タンパク質Gプレートを、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 (100 ng/ウェル) (Santa Cruz Biotechnology) を用いて処理する (室温で1時間) (他の分子を検出するために、この工程を、任意の上記の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、容易に修飾することができる)。PBSですすいしてから3～5時間後、そのプレートを、使用時まで4℃で貯蔵する。

30

【1161】

A431細胞を、20,000 / ウェルにて96ウェルのLoprodynеフィルタープレートに播種し、成長培地中で一晚培養する。次いで、その細胞を、基本培地 (DMEM) 中で、48時間かけて飢餓状態とし、次いで、EGF (6 ng/ウェル) または様々な濃度の本発明の融合タンパク質を用いて、5～20分間処理する。次いで、細胞を可溶化し、抽出物を、アッセイプレート中に直接濾過する。

【1162】

抽出物を1時間室温でインキュベーションした後、ウェルを再度すすぐ。正対照として、市販のMAPキナーゼ調製物 (10 ng/ウェル) を、A431抽出物の代わりに用いる。次いで、プレートを、Erk-1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 (1 μ g/ml) を用いて処理する (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。次に、結合ポリクローナル抗体を、Wallac DELFIA装置内で、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剤と連続的にインキュベートする (時間分解性蛍光) ことにより定量する。バックグラウンドを超える蛍光シグナルの増加は、本発明の融合タンパク質によるリン酸化または本発明のアルブミン融合タンパク質により誘導される分子を示す。

40

【1163】

実施例33：リン酸化アッセイ

50

本発明のアルブミン融合タンパク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、参照することにより本明細書に組み込まれる）に記載されるリン酸化アッセイを利用する。簡潔には、リン酸化活性を、ガンマ標識 ^{32}P -ATPを用いて、タンパク質基質をリン酸化し、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、測定することができる。本発明の融合タンパク質を、タンパク質基質、 ^{32}P -ATPおよびキナーゼ緩衝液と一緒にインキュベートする。次いで、基質に取り込まれた ^{32}P を、電気泳動により、遊離の ^{32}P -ATPから分離し、取り込まれた ^{32}P を計数し、負対照と比較する。負対照を超える放射能計数は、融合タンパク質のリン酸化活性の指標となる。

【1164】

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タンパク質のリン酸化活性〔活性化〕の検出

当該技術分野で周知の、または本明細書に記載される方法を用いて、本発明のアルブミン融合タンパク質のリン酸化活性を測定し得る。リン酸化活性を決定する好ましい方法は、米国特許第5,817,471号（参照することにより本明細書に組み込まれる）に記載されるように、チロシンリン酸化アッセイを用いることによる。

【1165】

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、CD34+細胞の増殖を刺激する本発明の融合タンパク質の能力を評価する。

【1166】

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。したがって、広範な始原細胞の造血活性への本発明の融合タンパク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所定の融合タンパク質を含有する。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、このような条件下では、「生存」因子としてのみ作用するという、骨髄（BM）細胞の増殖における非常に限られた効果を有する。しかしながら、これらの細胞（例えば、IL-3）における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。したがって、試験される融合タンパク質が造血始原細胞における刺激効果を有する場合、このような活性を、容易に検出することができる。正常なBM細胞は、低レベルのサイクリング細胞を有するので、所定の融合タンパク質のいかなる阻害効果も検出されない可能性がある。したがって、好ましくは、始原細胞における阻害効果のためのアッセイは、初めに、SCF+IL+3による体外で刺激に曝し、次いで、このような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。

【1167】

簡潔には、CD34+細胞を、当該技術分野で周知の方法を用いて、単離する。細胞は、解凍され、培地（1%のL-グルタミン（500ml）Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD Cat#; 160-204-101を加えた、QBSF 60無血清培地）に再懸濁される。200xg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 2.5×10^5 細胞/mlに調節する。この間、100 μl の滅菌水を96ウェルプレートの周壁に加える。このアッセイにおいて、本発明のアルブミン融合タンパク質を用いて試験できるサイトカインは、50ng/mlのrhSCF（R&D System, Minneapolis, MN, Cat# 255-SC）のみ、および30ng/mlのrhSCFとrhIL-3（R&D System, Minneapolis, MN, Cat# 203-ML）との組み合わせである。1時間後、10 μl 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タンパク質、および20 μl の希釈した細胞を、100 μl の最終容量となるように、ウェル中に既に存在する培地に加える。次いで、そのプレートを、37 $^{\circ}\text{C}$ /5%の

10

20

30

40

50

CO₂ インキュベーターに5日間置く。

【1168】

アッセイ物を採取する18時間前に、0.5 μCi / ウェルの [³H] チミジンを、各ウェルに10 μl 容量で加え、増殖速度を測定する。実験を、Tomtec Harvester 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終了する。採取後、フィルターマットを乾燥し、トリミングし、1つのOmni filter プレートと1つのOmni filter トレイからなるOmni filter アセンブリに置く。60 μl のMicroscint を各ウェルに加え、プレートを、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密封する。バーコード15ステッカーを、カウンティングのために、第1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、放射能レベルを、Packard トップカウントにより測定し、印刷されたデータを、解析のために収集する。放射能のレベルは、細胞増殖の量を反映する。

10

【1169】

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、所定の融合タンパク質の活性を試験するものである。当業者は、本発明の融合タンパク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ために、例示された研究を容易に改変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タンパク質の能力は、アルブミン融合タンパク質および／またはその融合タンパク質に対応するポリヌクレオチドが、免疫系および造血に影響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。代表的な用途は、上記の「免疫活性」および「感染症」の項および本明細書の別の箇所に記載される。

20

【1170】

実施例36：細胞外マトリックス増強細胞応答（EMECR）についてのアッセイ

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本発明の融合タンパク質の能力を評定することである。

【1171】

細胞は、周囲のミクロ環境から受け取ったシグナルに関連して、制御因子に応答する。例えば、線維芽細胞、ならびに内皮幹細胞および上皮幹細胞は、ECMからのシグナルの非存在下で、複製することができない。造血幹細胞は、骨髄中で自己再生を起こし得るが、体外懸濁液培養では自己再生を起こさない。体外で自己再生を起こす幹細胞の能力は、間質細胞およびECMタンパク質フィブロネクチン（fn）とのそれらの相互作用に依存する。細胞のfnへの吸着は、α₅-β₁およびα₄-β₁インテグリン受容体により媒介され、これらの受容体は、ヒトおよびマウス造血幹細胞により発現される。ECM環境との一体化、幹細胞の自己再生の刺激に関与する因子は、まだ特定されていない。このような因子の発見は、遺伝子治療および脊髄移植適用において非常に興味深いだろう。

30

【1172】

簡潔には、ポリスチレンの組織培養処理されていない96ウェルプレートは、0.2 μg / cm² のコーティング濃度で、fnフラグメントを用いてコーティングされる。マウス骨髄細胞を、0.2 ml の無血清培地（1,000細胞 / ウェル）にプレーティングされる。IL-3（5 ng / ml）+ SCF（50 ng / ml）の存在下で培養された細胞は、幹細胞の自己再生が期待されず、明確な分化が期待される条件で、正対照として作用する。本発明のアルブミン融合タンパク質は、SCF（5.0 ng / ml）の存在下、または非存在下で、適切な負対照と共に試験され、ここで、本発明のアルブミン融合タンパク質を含有する投与される組成物の容量は、全アッセイ体積の10%を示す。次いで、プレーティングされた細胞を、低酸素環境（5%のCO₂、7%のO₂、および88%のN₂）の組織培養インキュベーターで、7日間インキュベートすることにより成長させる。次いで、ウェル内の増殖細胞の数を、細胞DNAへのチミジン組込みを測定することにより定量する。アッセイにおける陽性ヒットの確認には、細胞の表現型の特徴付けを必要とし、この特徴付けは、培養系をスケールアップし、そして細胞表面抗原およびFACS

40

50

a n に対する適切な抗体試薬を使用することにより達成される。

【1173】

本発明の特定の融合タンパク質が、造血始原細胞の刺激薬であることが見出される場合、融合タンパク質および融合タンパク質に対応するポリヌクレオチドは、例えば、免疫系および造血に影響する障害の診断および処置に有用であり得る。代表的な用途は、上記の「免疫活性」および「感染症」の項および本明細書の別の箇所に記載される。融合タンパク質はまた、様々な血液系の幹細胞および先駆細胞 (committed progenitor) 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り得る。

【1174】

10

さらに、本発明のアルブミン融合タンパク質および本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、造血細胞の増殖および分化を阻害するために採用され、したがって、化学療法の間、化学療法剤から骨髓幹細胞を保護するために採用され得る。この抗増殖効果は、より高い用量の化学療法剤の投与、およびしたがって、より有効な化学治療処置が可能となる。

【1175】

さらに、本発明の融合タンパク質および本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、間質細胞が、造血系の細胞の産生において重要であるため、造血関連障害 (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) の処置および診断に有用であり得る。用途としては、骨髓細胞生体外培養、骨髓移植、骨髓再形成、新生組織形成の放射線療法または化学療法が、挙げられる。

20

【1176】

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タンパク質を、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) の培養液に加え、2つの共アッセイを、各試料について行なう。第1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) の増殖における融合タンパク質の効果を調べる。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いく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の産生を調べる。IL6の産生は、機能的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、共刺激性または阻害性活性を調べるために、共TNFa刺激を伴うおよび伴わずに行なう。

30

【1177】

簡潔には、1日目、100 μ l 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設置する。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、0.5 μ g/ml のhEGF、5mg/ml のインスリン、1 μ g/ml のhFGF、50mg/ml のゲンタマイシン、50 μ g/ml のアンホテリシンB、5%のFBSを含む。37°Cで少なくとも4~5時間インキュベーション後、培養培地を吸引し、成長停止培地と置換する。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、50 μ g/ml のアンホテリシンB、0.4%のFBSを含む。2日目まで37°Cでインキュベートする。

40

【1178】

2日目、本発明のアルブミン融合タンパク質の段階希釈液およびテンプレートを、培地対照および既知のタンパク質対照が常に含まれるように、設計する。刺激および阻害の実験の両方のために、タンパク質を成長停止培地で希釈する。阻害実験のために、TNFa

50

を最終濃度が 2 ng/ml (NHDF) または 5 ng/ml (A o SMC) 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タンパク質を含有する培地の $1/3$ を加え、5日目まで、 $37^\circ\text{C}/5\%$ の CO_2 でインキュベートする。

【1179】

各ウェルから $60 \mu\text{l}$ を、別の標識した96ウェルプレートに移し、プレートシーラーで覆い、6日目まで 4°C で貯蔵する (IL6 ELISA用)。細胞培養プレート中の残りの $100 \mu\text{l}$ に、培養容量の 10% に等しい容量 ($10 \mu\text{l}$) の 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に戻す。次いで、Cyt o Fluorを用いて、 530 nm での励起および 590 nm での放射を伴う蛍光を測定する。これにより、成長刺激/阻害データを得る。

10

【1180】

5日目、IL6 ELISAを、PBS ($\text{pH} 7.4$) で希釈した $50 \sim 100 \mu\text{l}$ /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することにより行うために、室温でONをインキュベートする。

【1181】

6日目、プレートの中身を流しに空け、ペーパータオル上で吸い取る。 4% のBSAと共にPBSを含有するアッセイ緩衝液を調製する。PBS中の $200 \mu\text{l}$ /ウェルの Pierce Super Blockブロッキング緩衝液を用いて、プレートを1~2時間ブロックし、洗浄緩衝液 (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上で吸い取る。次いで、 $50 \mu\text{l}$ /ウェルの希釈された抗ヒトIL-6モノクローナルビオチン標識抗体、 0.50 mg/ml を加える。培地中でIL-6ストックの希釈液を作製する (30 、 10 、 3 、 1 、 0.3 、 0 ng/ml)。プレートの最上列に二重の試料を加える。プレートを覆い、攪拌器上で、2時間室温でインキュベートする。

20

【1182】

プレートを洗浄緩衝液で洗浄し、ペーパータオル上で吸い取る。EU標識ストレプトアビジンをアッセイ緩衝液中に $1:1000$ 希釈し、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルを加える。プレートを覆い、室温で1時間インキュベートする。プレートを再び洗浄緩衝液で洗浄し、ペーパータオル上で吸い取る。

【1183】

$100 \mu\text{l}$ /ウェルの増強溶液を加える。5分間振盪する。Wallac DELFIA 蛍光測定器でプレートを読み取る。各アッセイでの三連の試料からの読み取りを、表にし、平均をとる。

30

【1184】

このアッセイにおける陽性の結果は、A o SMC細胞増殖を示唆し、アルブミン融合タンパク質が皮膚線維芽細胞増殖および/または平滑筋細胞増殖に関与し得ることを示唆する。陽性の結果はまた、融合タンパク質およびアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの多くの潜在的な用途も示唆する。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、融合タンパク質は、創傷治癒および皮膚再生、ならびに血管およびリンパ管の両方の脈管形成の改善において用いられ得る。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タンパク質は、抗血管剤 (例えば、抗血管新生) 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り得る。これらの疾患、障害および/または状態は、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; 眼の血管新生疾患 (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、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、ブドウ膜炎 (uveitis) および翼状片 (pterygia) (異常な血管増殖) ; 関節リウマチ; 乾癬; 遅延型創傷治癒; 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

40

50

着；心筋の血管新生；冠状側副枝；大脳側副枝；動静脈奇形；虚血性四肢血管新生；オー
スラーウェーバー症候群；プラーク新血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；血管線
維腫；線維筋性形成異常；創傷肉芽形成；クローン病；ならびにアテローム性動脈硬化症
等の当該技術分野に周知であり、そして／または本明細書に記載される。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タンパク質は、当該技術
分野で周知であり、そして／または本明細書に記載され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り得る。

【1185】

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の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ーリガンド相互作用が関与する。接着プロセスは、正常および病理学的設定の両方において、細胞間接着分子-1（ICAM-1）、血管細胞接着分子-1（VCAM-1）、および内皮細胞（EC）における内皮白血球接着分子-1（E-セレクトリン）の発現を含む、多段階カスケードに続く。血管内皮におけるこれらの分子および他の分子の発現は、白血球が、局所脈管構造に接着し得、炎症応答の発生中、局所組織に溢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CAMの発現の調節に関与する。

【1186】

簡潔には、内皮細胞（例えば、ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC））を標準的な96ウェルプレート中で集密まで成長させ、成長培地を細胞から除き、100 μ lの199培地（10%のウシ胎児血清（FBS））に交換する。試験のための試料（本発明のアルブミン融合タンパク質を含有する）および正または負対照を、このプレートに三連で添加する（10 μ l容量中）。次いで、プレートを、37℃にて、5時間（セレクトリンおよびインテグリン発現）あるいは24時間（インテグリン発現のみ）のいずれかでインキュベートする。プレートを吸引して、培地を除去し、100 μ lの0.1%のパラホルムアルデヒド-PBS（Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を有する）を各ウェルに加える。プレートを4℃で30分間保持する。固定剤をウェルから除去し、ウェルをPBS（+Ca, Mg）+0.5%のBSAを用いて1回洗浄し、排水する。10 μ lの希釈した一次抗体を、試験および対照ウェルに加える。抗ICAM-1ービオチン、抗VCAM-1ービオチン、および抗E-セレクトリンービオチンを、10 μ g/mlの濃度（0.1mg/mlのストック抗体の1:10希釈）で用いる。細胞を、加湿した環境において、37℃にて30分間インキュベートする。ウェルを、PBS（+Ca, Mg）+0.5%のBSAを用いて、3回洗浄する。20 μ lの希釈したエキストラアビジンーアルカリホスファターゼ（1:5, 000希釈、本明細書中、使用希釈と称する）を各ウェルに加え、37℃で30分間インキュベートする。ウェルを、PBS（+Ca, Mg）+0.5%のBSAを用いて、3回洗浄する。5mlのグリシン緩衝液（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。グリシン緩衝液中の100 μ lのpNPP基質を、各試験ウェルに加える。三連の標準的なウェルを、グリシン緩衝液中のエキストラアビジンーアルカリホスファターゼの実用的希釈物：1:5, 000（10⁰）>10^{-0.5}>10⁻¹>10^{-1.5}から調製する。5 μ lの各希釈物を、三連ウェルに加え、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。次いで、100 μ lのpNPP試薬を、各標準ウェルに加える。プレートを、37℃にて4時間インキュベートする。50 μ lの3M NaOHの容量を、すべてのウェルに加える。プレートを、グリシン緩衝液のみを充填したブランクウェルでのバックグラウンド除去オプションを用いて、405nmのプレートリーダーにより読み取る。さらに、テンプレートを、各々の標準ウェルにおけるAP結合体の濃度を示すように設定する[5.50ng、1.74ng、0.55ng、0.18ng]。結果を、各試料中の結合したAP結合体の量として示す。

【1187】

実施例39：Alamar Blue内皮細胞増殖アッセイ

10

20

30

40

50

このアッセイを用いて、ウシリンパ内皮細胞（LEC）、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誘導増殖のタンパク質介在阻害を定量的に測定し得る。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、内皮細胞刺激の供給源として添加される10ng/mlのbFGFを有するEGM-2MV中で調製される。このアッセイは、成長培地および細胞濃度を若干変化させて、様々な内皮細胞と共に使用され得る。試験されるタンパク質バッチの希釈物を、適宜、希釈する。bFGF不含の無血清培地（GIBCO SFM）を非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を既知の阻害対照として用いる。

10

【1188】

簡潔には、LEC、BAEC、またはUTMECを、96ウェルプレートに、5000～2000細胞/ウェルの密度で、成長培地に播種し、37℃で一晩放置する。細胞を一晩インキュベーションした後、成長培地を除去し、GIBCO EC-SFMと交換する。細胞を、追加のbFGFを含む3連のウェル中で、本発明のアルブミン融合タンパク質または対照タンパク質試料の適切な希釈物（SFM中で調製）で、10ng/mlの濃度まで処理する。細胞を試料で処理すると、プレートを、37℃のインキュベーターに戻し、3日間放置する。3日後、10mlのストックalamar blue（Biosource Cat#DAL1100）を、各ウェルに加え、プレートを、37℃のインキュベーターに戻し、4時間放置する。次いで、プレートを、Cytofluor蛍光リーダーを用いて、530nmでの励起および590nmでの放射で読みとる。直接出力を、相対的な蛍光単位で記録する。

20

【1189】

Alamar 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、増殖の阻害は、より弱いシグナルを生じ、全シグナルは、全細胞数、ならびにそれらの代謝活性に比例する）。活性のバックグラウンドレベルは、飢餓培地のみで観察される。これを、正対照試料（成長培地中のbFGF）およびタンパク質希釈物から観察された結果と比較する。

30

【1190】

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、本発明の融合タンパク質による混合リンパ球反応（MLR）の阻害を検出および評定することができる。MLRの阻害は、細胞増殖および生存率における直接的効果、相互作用細胞におけ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得る。複数の細胞が、このアッセイで用いられる末梢血単核画分は、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タンパク質により標的され得る。

40

【1191】

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タンパク質は、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応用され得る。これらとしては、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、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、肝硬変、移植片対宿主疾患、宿主対移植片疾患、肝炎、白血病、およびリンパ腫等の疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【1192】

簡潔には、ヒトドナーに由来するPBMCを、リンパ球分離培地（LSM（登録商標））、密度1.0770g/ml、Organon Teknika Corporation

50

n, West Chester, PA) を用いて、密度勾配遠心分離により精製する。2 人のドナーに由来の PBMC を、10% の FCS および 2 mM のグルタミンを追加した RPMI-1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) 中、 2×10^6 細胞/ml となるように調整する。第 3 のドナーに由来の PBMC を、 2×10^5 細胞/ml に調整する。各ドナーからの 50 マイクロリットルの PBMC を、96 ウェルの丸底マイクロタイタープレートのウェルに加える。融合タンパク質試験材料の希釈物 (50 μ l) を、3 連でマイクロタイターウェルに加える。試験試料 (関心対象となるタンパク質の) を、1:4 の最終希釈になるまで加え; rhu IL-2 (R&D System, Minneapolis, MN, カタログ番号 202-IL) を 1 μ g/ml の最終濃度になるまで加え; 抗 CD4mAb (R&D System, クローン 34930.11, カタログ番号 MAB379) を 10 μ g/ml の最終濃度になるまで加える。細胞を、5% の CO₂ 中、37°C で 7~8 日間培養し、1 μ C の [³H] チミジンを、培養の最後の 16 時間でウェルに加える。細胞を採取し、Packard Top Count を用いて、チミジンの取り込みを測定する。データを、3 連の測定の平均および標準偏差として表す。

10

【1193】

関心対象となる融合タンパク質試料を、別の実験にてスクリーニングし、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 (組換え物質あるいは上清のいずれかとして) と比較する。

20

【1194】

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タンパク質のプロテアーゼ活性を評価し得る。

【1195】

ゼラチンおよびカゼイン酵素電気泳動法を、記載のように本質的に行なう (Heusen et al., Anal. Biochem., 102:196-202 (1980)、Wilson et al., Journal of Urology, 149:653-658 (1993))。試料を、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 ゲルで泳動し、2.5% のトリトン中に室温で 1 時間浸漬し、0.1M グリシン (pH 8.3) 中に 37°C で 5~16 時間浸漬する。アミド中での染色後、タンパク質分解の黒色領域が、濃紺のバックグラウンドに対する明瞭な領域として出現する。トリプシン (Sigma T8642) を、正対照として使用する。

30

【1196】

プロテアーゼ活性はまた、n- α -ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル (BAEE) (Sigma B-4500) の開裂をモニタリングすることにより決定される。反応を、(25mM NaPO₄、1mM EDTA、および 1mM BAEE)、pH 7.5 に設定される。試料を加え、時間駆動モードの Beckman DU-6 分光光度計にて、260nm で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、正対照として使用する。

40

【1197】

280nm での吸光度または 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、Bergrmeyer, et al., Methods of Enzymatic Analysis, 5 (1984) に記載されるように行なう。他のアッセイは、発色性基質の溶解を含む (Ward, Applied Science, 251-317 (1983))。

【1198】

実施例 42: セリンプロテアーゼ基質特異性の特定

当該技術分野で周知の、または本明細書に記載される方法を用いて、セリンプロテアー

50

ゼ活性を有する本発明のアルブミン融合タンパク質の基質特異性を測定し得る。基質特異性測定の好ましい方法は、GB 2 324 529（参照することにより本明細書に組み込まれる）に記載されているように、位置的スキャンニング合成コンビナトリアルライブラリの使用による方法である。

【1199】

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タンパク質のリガンド結合活性を評価し得る。

【1200】

リガンド結合アッセイは、受容体薬理学を確認するための直接的方法を提供し、ハイスループット方式に適応可能である。本発明のアルブミン融合タンパク質に対する精製リガンドを放射性同位体標識して、結合研究のために高い比放射能（50～2000 Ci/mmol）にする。次いで、放射性同位体標識の過程が融合タンパク質に対するリガンドの活性を低減させないように、決定を行なう。緩衝液、イオン、pHおよび他の調節因子（例えば、ヌクレオチド）に関するアッセイ条件を最適化して、膜および全細胞のポリペプチド源の両方についての有効なシグナル対ノイズ比を構築する。これらのアッセイについて、特異的なポリペプチド結合を、過剰の非標識競合リガンドの存在下で測定した放射活性を全結合放射能から引いた値として規定する。可能な場合は、1つ以上の競合リガンドを用いて残留非特異的結合を規定する。

【1201】

実施例44：アフリカツメガエル卵母細胞における機能アッセイ

本発明のアルブミン融合タンパク質をコードする線状化プラスミドテンプレートからのキャップRNA転写物を、標準的な手順に従って、RNAポリメラーゼを用いて、体外で合成する。体外転写物を、0.2 mg/mlの最終濃度で水中に懸濁する。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、RNA転写物（10 ng/卵母細胞）を、マイクロインジェクション装置を用いて、50 nl ボールスで注射する。2電極電圧クランプを用いて、融合タンパク質およびポリペプチドアゴニストの曝露に応答する、個々のアフリカツメガエル卵母細胞からの電流を測定する。室温で、Ca²⁺含まないバルト培地で記録を行なう。アフリカツメガエル系を用いて、周知の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。

【1202】

実施例45：マイクロフィジオメトリック（Microphysiometric）アッセイ

多種多様な二次メッセンジャー系の活性化により、細胞から少量の酸の放出をもたらす。形成された酸は、主に、細胞内シグナル伝達過程を刺激するのに必要な代謝活性の増大の結果である。細胞周囲の培地のpH変化は非常に小さいが、CYTOSENSOR微量生理機能測定器（Molecular Devices Ltd., Menlo Park, Calif.）により検出可能である。したがって、CYTOSENSORは、エネルギーを利用する細胞内シグナル伝達系と共役する二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タンパク質の能力を検出可能である。

【1203】

実施例46：抽出物/細胞上清スクリーニング

今のところ同系の活性化リガンド（アゴニスト）が存在しない多数の哺乳類受容体が存在する。したがって、これらの受容体に対する活性リガンドは、今日まで特定されたとしてリガンドバンク内に含まれていない可能性がある。したがって、本発明のアルブミン融合タンパク質はまた、本発明のアルブミン融合タンパク質の治療用タンパク質部分および/またはアルブミンタンパク質部分についての天然のリガンドを特定するために、組織抽出物に対して、（カルシウム、cAMP、微量生理機能測定器、卵母細胞電気生理学等機能的スクリーニングを用いて）機能的にスクリーニングされ得る。陽性の機能的応答を生

じる抽出物は、活性化リガンドが単離および特定されるまで、連続して細分画され得る。

【1204】

実施例47：ATP結合アッセイ

以下のアッセイを用いて、本発明の融合タンパク質のATP結合活性を評価することができる。

【1205】

本発明のアルブミン融合タンパク質のATP結合活性は、米国特許第5,858,719号に記載のATP結合アッセイを用いて検出され得、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。簡潔には、本発明のアルブミン融合タンパク質に対するATP結合を、競合アッセイで、8-アジド-ATPにおける光親和性標識を介して測定する。10
1mg/mlのABC輸送タンパク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のATPアナログであるアデニル-5'-イミドニリン酸と、4℃で10分間インキュベートする。8-アジド-ATP (Sigma Chem. Corp., St. Louis, MO.) および8-アジド-ATP (³²P-ATP) (5mCi/μmol, ICN, Irvine CA.) の混合物を、100μMの最終濃度になるまで加え、0.5mlアリコートを上記の磁器スポットプレートのウェルに入れる。プレートを、短波254nmのUVランプを用いて、プレートから2.5cmの距離で、1分間の冷却時間をはさんで1分間の照射を2回行なう。反応を、2mMの最終濃度までジチオスレイトールを添加することにより停止する。インキュベーションを、SDS-PAGE電気泳動に供し、乾燥し、オートラジオグラフィーを行なう。本発明のアルブミン融合タンパク質に対応するタンパク質バンドを切り取り、放射能を定量する。ATPまたはアデニル-5'-イミドニリン酸を増大することによる放射能の低下は、融合タンパク質に対するATP親和性の尺度を提供する。20

【1206】

実施例48：本発明のアルブミン融合タンパク質と相互作用するシグナル伝達タンパク質の特定

本発明のアルブミン融合タンパク質を、シグナル伝達経路タンパク質または受容体タンパク質の特定、特徴付け、および精製のための研究ツールとして用いることができる。簡潔には、本発明の標識された融合タンパク質は、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実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク質をクロマトグラフィーカラムに共有結合させる。癌腫組織等の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、適切な親和性を有する分子を、アルブミン融合タンパク質に結合させる。タンパク質複合体をカラムから回収し、分離し、回収した分子をN末端タンパク質配列決定に供する。次いで、このアミノ酸配列を用いて、捕捉分子を特定するか、または適切なcDNAライブラリから関連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。30

【1207】

実施例49：IL-6 バイオアッセイ

様々なアッセイが、本発明のアルブミン融合タンパク質の増殖性効果を試験するために、当該技術分野で周知である。例えば、このようなアッセイは、Marzら. (Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 95:3251-56 (1998)) 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、生存細胞の数を、テトラゾリウム塩チアゾリルブルー (MTT) を加え、37℃でさらに4時間インキュベートすることにより、測定する。B9細胞を、SDSにより溶解させ、光学密度を570nmで測定する。簡潔には、対照は、IL-6 (正対照) を含有するものおよびサイトカインを含まないもの (負対照) である。IL-6 依存性B9ネズミ細胞をIL-6を含まない培地で3回洗浄し、50μl中5,000細胞/ウェルの濃度でプレーティングし、50μlの本発明の融合タンパク質を加え、利用する。負対照と比較して増強された試験試料 (本発明のアルブミン融合タンパク質を含有する) における増殖は、融合タンパク質により媒介された増殖性効果の指標40
50

である。

【1208】

実施例50：ニワトリ胚ニューロン生存の支持

交感神経細胞の生存率が、本発明のアルブミン融合タンパク質によって支持されるかどう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が利用され得る(Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 96:11458-63 (1998)、参照することにより本明細書に組み込まれる)。簡潔には、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、およびインスリンを含む; Life Technologies, Rockville, MD.) 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緩衝液(pH7.2)を含む; Life Technologies, Rockville, MD.]中に再懸濁し、本発明の異なる濃度の精製融合タンパク質の存在下で、5%のCO₂中にて37℃でインキュベートし、サイトカインを含まない負対照も同様とする。3日後、ニューロン生存を、細胞形態学の評価により、およびMosmannの比色分析アッセイ(Mosmann, T., J. Immunol. Methods, 65:55-63 (1983))を使用して決定する。サイトカインを含まない対照と比較して増強された神経細胞の生存率は、アルブミン融合タンパク質が神経細胞の生存を高める能力の指標である。

【1209】

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タンパク質のセリン／トレオニンホスファターゼ(PTPase)活性を評価し得る。

【1210】

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利用することができる。例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質のセリン／トレオニンホスファターゼ(PSase)活性を、New England Biolabs, Inc.からのPSaseアッセイキットを用いて、測定してもよい。PSaseのための基質であるミエリン塩基性タンパク質(MyBP)を、[³²P]ATPの存在下、cAMP依存性タンパク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、タンパク質セリン／トレオニンホスファターゼ活性を、³²P-標識MyBPからの無機リン酸の放出を測定することにより、測定する。

【1211】

実施例52：他のタンパク質とセリン／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タンパク質は、例えば、さらなる相互作用タンパク質もしくは受容体タンパク質、または他のシグナル伝達経路タンパク質の特定、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。簡潔には、本発明の標識された融合タンパク質は、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実施形態において、本発明のアルブミン融合タンパク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等の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、適切な親和性を有する分子を、融合タンパク質に結合させる。融合タンパク質複合体をカラムから回収し、分離し、回収した分子をN末端タンパク質配列決定に供する。次いで、このアミノ酸配列を用いて、捕捉分子を特定するか、または適切なcDNAライブラリから関連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。

【1212】

実施例53：ヘパラナーゼ活性のアッセイ

本発明のアルブミン融合タンパク質のヘパラナーゼ活性をアッセイするために採用され

得る当該技術分野で周知の多数のアッセイがある。一例として、本発明のアルブミン融合タンパク質のヘパラーゼ活性を、Vlodavskyら (Vlodavsky et al., Nat. Med., 5:793-802 (1999)) により記載されているように、アッセイする。簡潔には、細胞溶解物、馴化培地、無傷細胞 (35mmディッシュあたり 1×10^6 細胞)、細胞培養上清、または精製融合タンパク質を、 ^{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°C で 18 時間、 pH 6.2~6.6 でインキュベートする。インキュベーション培地を遠心分離し、上清をセファロース CL-6B カラム ($0.9 \times 30\text{cm}$) でゲル濾過することにより、分析する。画分を、PBS で溶出し、その放射能を測定する。ヘパラン硫酸側鎖の分解フラグメントを、 $0.5 < K, V < 0.8$ (ピーク II) でセファロース 6B から溶出する。各実験を、少なくとも 3 回行なう。Vlodavsky らにより記載されるように、「ピーク II」に対応する分解フラグメントは、ヘパラン硫酸の開裂における本発明のアルブミン融合タンパク質の活性の指標である。

10

【1213】

実施例 54：生体分子の固定化

本実施例は、非宿主細胞脂質二重層構築物中の本発明のアルブミン融合タンパク質の安定化のための方法 (例えば、Bieri et al., Nature Biotech 17:1105-1108 (1999)) を参照のこと、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる) を提供し、この方法は、上記の様々な機能的アッセイにおける本発明の融合タンパク質の研究のために適合され得る。簡潔には、ビオチン化についての糖質特異的化学を用いて、本発明のアルブミン融合タンパク質にビオチンタグを拘束し、ひいては、固定化の際の均一な配向を可能にする。洗浄された膜中の本発明のアルブミン融合タンパク質の $50\text{ }\mu\text{M}$ 溶液を、 20mM NaIO_4 、 1.5mg/ml (4mM) BACH または 2mg/ml (7.5mM) ビオチン-ヒドラジド (反応容量、 $150\text{ }\mu\text{l}$) と共に、室温で 1 時間インキュベートする。次いで、試料を、まず 4°C で 5 時間、1 時間後毎に緩衝液を交換して透析 (Pierce Slidealizer Cassette, 10kDa カットオフ; Pierce Chemical Co., Rockford IL) を行ない、最終的に 500ml 緩衝液 R (0.15M NaCl 、 1mM MgCl_2 、 10mM リン酸ナトリウム、 pH 7) で 12 時間、透析する。キュベットに加える直前に、この試料を緩衝液 ROG50 (50mM オクチルグルコシドを追加した緩衝液 R) で 1:5 に希釈する。

20

30

【1214】

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、金属イオン (例えば、 Zn^{2+}) を触媒機序として用い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タンパク質のメタロプロテイナーゼ活性を、当該技術分野で公知の方法に従ってアッセイし得る。以下の例示的方法が提供される。

【1215】

アルファー 2-マクログロブリンのタンパク質分解

プロテアーゼ活性を確認するために、本発明の精製融合タンパク質を、 $1 \times$ アッセイ緩衝液 (50mM の HEPES 、 pH 7.5、 0.2M の NaCl 、 10mM の CaCl_2 、 $25\text{ }\mu\text{M}$ の ZnCl_2 および 0.05% の Brij-35) 中、基質アルファー 2-マクログロブリン (0.2 単位/ ml ; Boehringer Mannheim, Germany) と混合し、 37°C で 1~5 日間インキュベートする。トリプシンを、正対照として用いる。負対照は、アッセイ緩衝液中、アルファー 2-マクログロブリンのみを含有する。試料を採取し、 5% の 2-メルカプトエタノールを含有する SDS-PAGE 試料緩衝液中で 5 分間煮沸し、次いで、 8% の SDS -ポリアクリルアミドゲルに充填する。電気泳動した後、タンパク質を銀染色により視覚化する。タンパク質分解は、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、実証される。

40

【1216】

50

メタロプロテイナーゼ阻害剤によるアルファ-2-マクログロブリンタンパク質分解の阻害

また、周知の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タンパク質のタンパク質分解活性を特徴付けることができる。使用し得る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、 $\text{IC}_{50} = 1.0 \mu\text{M}$ ；MMP-9に対して、 $\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{M}$ ；MMP-3に対して、 $\text{IC}_{50} = 150 \mu\text{M}$]；MMP-3（ストロメリシン-1）阻害剤I [MMP-3に対して、 $\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$]、およびMMP-3阻害剤II [MMP-3に対して、 $\text{Ki} = 130 \text{nM}$]；Calbiochemを通じて入手可能な阻害剤（各々、カタログ番号444250、444218、および444225）である。簡潔には、異なる濃度の小分子MMP阻害剤を、 $22.9 \mu\text{l}$ の $1 \times \text{HEPES}$ 緩衝液（ 50mM の HEPES 、 $\text{pH} 7.5$ 、 0.2M の NaCl 、 10mM の CaCl_2 、 $25 \mu\text{M}$ の ZnCl_2 、および 0.05% の Brij-35 ）中、本発明の精製融合タンパク質（ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）と混合し、室温（ 24°C ）で2時間インキュベートし、 $7.1 \mu\text{l}$ の基質アルファ-2-マクログロブリン（ 0.2 単位/ ml ）を加え、 37°C で20時間インキュベートする。4×試料緩衝液を加え、その直後に5分間煮沸することにより、反応を停止させる。SDS-PAGEの後、タンパク質バンドを銀染色により視覚化する。

10

【1217】

20

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タンパク質の基質特異性は、当該技術分野で周知の技法、例えば、合成蛍光性ペプチド基質（BACHEM Bioscience Incから購入）を用いて測定され得る。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、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。これらの基質を、好ましくは、1：1ジメチルスルフォキシド（DMSO）および水中において調製する。ストック溶液は、 $50 \sim 500 \mu\text{M}$ である。恒温水浴を備えたPerkin Elmer LS 50BLミネセンス分光計を用いて、蛍光アッセイを行なう。励起 λ は、 328nm であり、および放出 λ は、 393nm である。簡潔には、アッセイは、 $176 \mu\text{l}$ の $1 \times \text{HEPES}$ 緩衝液（ 0.2M の NaCl 、 10mM の CaCl_2 、 0.05% の Brij-35 、および 50mM の HEPES 、 $\text{pH} 7.5$ ）を $4 \mu\text{l}$ の基質溶液（ $50 \mu\text{M}$ ）と共に、 25°C で15分間インキュベーションし、次いで、 $20 \mu\text{l}$ の本発明の精製融合タンパク質をアッセイキュベットに加えることにより、行なわれる。基質の最終濃度は、 $1 \mu\text{M}$ である。初期の加水分解速度を30分間モニタリングする。

30

【1218】

実施例56：NODマウスにおける糖尿病の発症

雌NOD（非肥満糖尿病）マウスは、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、特徴付けられるが、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、「NODマウス」という用語は、雌NODマウスを指す。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。したがって、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。しかしながら、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。したがって、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。

40

【1219】

免疫化レジメンの効力の生体内アッセイは、雌NOD/LtJマウス（The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me. から市販されている）

50

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、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、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。

【1220】

これらのマウスは、未処置(対照)とするか、本発明の治療剤(例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質、ならびにそのフラグメントおよび変異体)を単独または上記の他の治療用化合物と組み合わせて、処置され得る。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。

【1221】

14週齢にて、雌NODマウスは、グルコース耐性に従って表現型化することができる。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。簡潔には、血液を、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、眼窩周囲神経叢から取り出す。正常な耐性を、0分で144mg%未満の、または60分で160mg%未満の血漿グルコースとして定義される。血中グルコースレベルは、Glucometer Elite装置を用いて決定される。

【1222】

この表現型分析に基づき、動物を異なる実験グループに配分し得る。特に、より血中グルコースレベルを上昇させた動物を、耐糖能異常の群に割り当て得る。マウスに、適宜給餌し得、酸性化水(pH2.3)を供給し得る。

【1223】

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タンパク質、およびアルブミン融合タンパク質/治療用化合物組み合わせ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、ビヒクルを腹腔内注入され得る。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タンパク質ならびにそのフラグメントおよび変異体)を腹腔内注入され得る。アルブミン融合タンパク質/治療用化合物組み合わせ群のマウスは、アルブミン融合タンパク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。

【1224】

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、隔週ごとに測定することができる。体重および液体取り込みもまた、隔週ごとに測定することができる。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。処置から10週間後、さらなるIPGTTを行なうことができ、動物は、次の日に屠殺される。

【1225】

10週間にわたる処置の間、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)。したがって、処置介入がなされない場合に、初めにグルコース耐性であるNODマウスにおいて、糖尿病が、高い割合で発症する。

【1226】

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。血液グルコースレベルを、記載した全群のグルコース耐性および不耐性マウスの両方において、上記のように測定する。

【1227】

代替的な実施形態において、本発明の治療剤(例えば、配列番号Yに開示される特定の融合タンパク質ならびにそれらのフラグメントおよび変異体)を分光学的分析を用いて定量し得、適切なタンパク質量を、注射前に、1用量あたり50.μlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中に再懸濁し得る。各マウス背部の皮膚下に、1週間の間隔をあけ

10

20

30

40

50

て2回の注射を皮下投与し得る。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、処置全体を通して1週間に1回行い、それ以降も継続し得る。毎週、尿のグルコースについて試験することができ (Ket o-D i a s t i x. R T M. ; M i l e s I n c. , K a n k a k e e, I l l.)、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 (E x a c T e c h. R T M. , M e d i S e n s e, I n c. , W a l t h a m, M a s s.)。空腹時の血糖値が2. 5 g / L よりも高い場合、糖尿病と診断される。

【1228】

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、本発明の組成物および／または本発明の組成物および糖尿病のための他の治療剤との組み合わせが、膵臓中のベータ細胞の相対濃度を増大させる能力を、実証し得る。実験的方法は、以下の通りである。

【1229】

実施例56からのマウスを、処置期間の終わりに屠殺でき、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、ワックス中に包埋できる。5つの連続した5 μ m断片の2セットを、免疫標識のために150 μ mの切断間隔で切断することができる。その断片を、インスリン (モルモット抗インスリン抗血清希釈1:1000, I C N T h a m e s 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、ペルオキシダーゼ接合抗モルモット (D a k o, H i g h W y c o m b e, U. K.) またはペルオキシダーゼ接合抗ウサギ抗血清 (希釈1:50, D a k o) を用いて検出することができる。

【1230】

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しなくともよい。

【1231】

実施例58：NIDDMの生体内マウスモデル

J a c k s o n L a b o r a t o r y (B a r H a r b o r, M E) からの雄C57BL/6Jマウスは、3週齢から入手でき、慣用的な食飼、または脂肪 (35. 5重量%; B i o s e r v. F r e n c h t o w n, N J) あるいはフルクトース (60重量%; H a r l a n T e k l a d, M a d i s o n, W I) のいずれかが豊富な食飼を与える。標準食飼は、4. 5重量%の脂肪、23重量%のタンパク質、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%のタンパク質、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%のタンパク質、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匹ずつ飼育することができる (L u o e t a l. , 1998, M e t a b o l i s m 47 (6): 663-8, "Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus"; L a r s e n e t a l. , D i a b e t e s 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」 (S i g m a, S t. L o u i s, M O) またはビヒクル (0. 05mol/Lクエン酸, pH4. 5) のいずれかを用い

10

20

30

40

50

て、マウスに腹腔内注入でき、次いで、次の4週間は同じ食飼を与えることができる。非空腹条件下にて、血液を、STZの1、2および4週間後に、尾部の遠位部を挟むことにより採取する。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。体重および食飼取り込みを1週間に1回記録する。

【1232】

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飼の効果を直接決定するために、実験を、脂肪食飼を与えられた、食飼を与えられ、ビヒクルを注入された、および脂肪食飼を与えられ、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、マウスを、メトキシフルラン (Pitman-Moor, Mundelein, IL) 吸入を用いて、麻酔することができる。レギュラーインスリン (Sigma) は、尾静脈から静脈内注入でき ($[IV] 0.1 U/kg$ 体重)、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することができる。血漿グルコース濃度は、これらの試料にて測定でき、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、算出することができる。

【1233】

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することができる。腹腔を開き、主要な腹腔内静脈を曝露させ、24ゲージのIVカテーテル (Johnson-Johnson Medical, 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、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。このアプローチにより、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 ($24.1 mg/kg/分$) およびインスリン ($10 mU/kg/分$) を $10 \mu L/分$ の注入量にて、マウスに連続的に注入することができる。眼窩後部の血液試料 (各 $70 \mu L$) を、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、採取することができる。これら4つの試料の平均を用いて、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。

【1234】

最後に、単独あるいは真性糖尿病の処置のために記載した任意の1つ以上の治療用薬剤と組み合わせたアルブミン融合タンパク質、本出願の治療用組成物の、血漿グルコースを減少させる能力を評定するための実験は、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において行なうことができる。これらの研究について、マウスの血漿グルコース濃度は、 $255 \sim 555 mg/dL$ の範囲にわたり得る。マウスは、ランダムに割り当てて、ビヒクル、単独あるいは真性糖尿病の処置のために記載した任意の1つ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て処置する。全部で3用量を投与することができる。尾静脈の血液試料を、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から3時間後に、採取することができる。

【1235】

血漿グルコース濃度を、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、測定することができる。血漿インスリンレベルは、Linc 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、測定することができる。

【1236】

実施例59：インスリン作用における関与を確立する、体外でのH4IIE-SEAPレポーターアッセイ

10

20

30

40

50

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、インスリン経路に存在するPPAR-ガンマエレメントを含有する。このレポーター構築物を、肝臓H4IIe細胞株に安定に形質移入される。

【1237】

H4IIe/SREBP-SEAP：ステロール制御エレメント結合タンパク質（SREBP-lc）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。脂肪細胞決定分化因子I（ADD-1）としても知られているSREBP-lcは、脂肪細胞における遺伝子発現に対するインスリン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、およびグルコースのレベルにより調節される。このレポーター構築物を、肝臓H4IIe細胞株に安定に形質移入される。

【1238】

H4IIe/FAS-SEAP：脂肪酸合成酵素レポーター構築物は、最小限のSREBP応答性FASプロモーターを含有する。このレポーター構築物を、肝臓H4IIe細胞株に安定に形質移入される。

【1239】

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活性を調節するPEPCK遺伝子転写のホルモン調節の主な部位である。PEPCKは、肝臓の糖新生における、統合され且つ速度制御する段階を触媒し、したがって、正常な限定内で血中グルコースレベルを維持するために、注意深く制御されねばならない。このレポーター構築物を、肝臓H4IIe細胞株に安定に形質移入される。

【1240】

これらのレポーター構築物をまた、3T3-L1線維芽細胞およびL6筋芽細胞に安定に形質移入することができる。次いで、これらの安定細胞系を、実施例13において前記したように、3T3-L1脂肪細胞およびL6筋管に分化する。次いで、分化した細胞系を、以下に記載のSEAPアッセイにおいて、用いることができる。

【1241】

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%のウシ血清、1%のNEAA、1x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/mL G418（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緩衝液生理的食塩水、および0.50mg/mLのG418からなる。

【1242】

H4IIe/rFAS-SEAP、H4IIe/SREBP-SEAP、および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、1x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% FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンおよび15mM HEPES緩衝化生理食塩水からなる。

【1243】

方法

96ウェルプレートに、対数増殖期の細胞が接着するまで、ウェルあたり100μLの成長培地中に、あたり75,000細胞/ウェルで播種する。細胞を、アッセイ培地、200μL/ウェルと成長培地を交換することにより、48時間飢餓させる。（H4IIe

10

20

30

40

50

／PEPCK－SEAPのために、0.5 μ Mのデキサメタゾンを含むアッセイ培地を、100 μ L／ウェルに加え、約20時間インキュベートする。アッセイ培地を、その後100 μ L／ウェルの新鮮なアッセイ培地と交換し、本発明の治療剤（例えば、本発明のアルブミン融合タンパク質ならびにそのフラグメントおよび変異体）を発現する形質移入した細胞株から得られた細胞上清の50 μ Lのアリコートをし、ウェルに加える。空のベクターを形質移入した細胞株からの上清を、負対照として使用する。ウェルへの10 nMおよび／または100 nMのインスリンの添加を、正対照として使用する。48時間のインキュベーション後、馴化培地を採取し、SEAP活性を測定する（Phosphatase Assay Systemプロトコル、Tropix #BP2500）。簡潔には、試料を希釈緩衝液で希釈し、65℃で30分間インキュベートして、内因性の非胎盤形態のSEAPを不活性化させる。50 μ Lの希釈した試料のアリコートを、非胎盤性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、50 μ LのSEAPアッセイ緩衝液と混合し、さらに5分間インキュベートする。Emerald発光増強剤中に1：20に希釈したCSPD化学発光基質の50 μ Lのアリコートをその混合物に加え、15～20分間インキュベートする。プレートを、DyneXプレートルミノメーターで読み取る。

【1244】

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タンパク質はまた、トランスジェニック動物において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）が挙げられるが、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得る。特定の実施形態において、本明細書に記載されているまたは当該技術分野で周知の技法を用いて、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タンパク質を発現させる。

【1245】

当該技術分野で知られている任意の技法を用いて、本発明のアルブミン融合タンパク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樹立系統（founder line）を作製し得る。このような技法は、前核マイクロインジェクション（Paterson et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:691-698 (1994)、Carver et al., Biotechnology (NY) 11:1263-1270 (1993)、Wright et al., Biotechnology (NY) 9:830-834 (1991)、およびHoppe et al., 米国特許第4,873,191号（1989））；生殖細胞系（Van der Putten et al., 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ティング（Thompson et al., 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 et al., 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 et al., Cell 57:717-723 (1989)）；等が挙げられるが、これらに限定されない。このような技法の総説については、Gordon, "Transgenic Animals," Intl. Rev. Cytol. 115:171-229 (1989)を参照のこと、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。

【1246】

当該技術分野で周知の任意の方法を用いて、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む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（Campbell et al., Nature 380: 64-66 (1996); Wilmut et al., Nature 385: 810-813 (1997)）。

【1247】

本発明は、細胞全体に本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有するトランスジェニック動物、ならびに細胞全体ではないが、いくらかこれらのポリヌクレオチドを保有する動物（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、単一のトランスジーンとしてか、またはコンカタマー（concatamer）等における複数のコピー（例えば、頭頭連結または頭尾連結）として組み込まれ得る。トランスジーンはまた、例えば、Laskoら（Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236 (1992)）の教示に従うことにより、特定の細胞型へと選択的に導入され、活性化され得る。細胞型特異的活性化に必要な調節配列は、関心対象となる特定の細胞型に依存し、当業者には明らかであろう。本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、治療用タンパク質部分または本発明のアルブミン融合タンパク質に対応する内因性遺伝子の染色体部位に組み込まむことが望まれる場合、遺伝子ターゲティングが好ましい。簡潔には、このような技法が、利用される場合、内因性遺伝子に相同性のいくつかのヌクレオチド配列を含有するベクターは、染色体配列による相同性組換えを介する、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の破壊する目的のために、設計される。トランスジーンはまた、特定の細胞型に選択的に導入され、それにより、例えば、Guら（Gu et al., Science 265: 103-106 (1994)）の教示に従うことにより、その細胞型においてのみ内因性遺伝子を不活性化し得る。このような細胞特異的不活性化に必要な調節配列は、関心対象となる特定の細胞型に依存し、当業者には明らかであろう。

【1248】

トランスジェニック動物が生成されると、組換え遺伝子の発現を、標準的技法を利用してアッセイし得る。初期スクリーニングは、動物組織を分析するためのサザンブロット分析またはPCR技術により達成され、本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの組み込みが生じたことを検証し得る。トランスジェニック動物の組織における、本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドのmRNA発現のレベルはまた、動物から得られる組織試料のノーザンブロット分析、原位ハイブリダイゼーション分析、および逆転写酵素PCR（reverse PCR）が挙げられるが、これらに限定されない技法を用いて評価され得る。融合タンパク質発現組織の試料はまた、融合タンパク質に特異的な抗体を用いて、免疫細胞化学的に、または免疫組織化学的に評価され得る。

【1249】

樹立動物が生成されると、それらを繁殖し、同系交配し、異種交配し、または交雑育種して、特定の動物のコロニーを生成し得る。このような繁殖戦略の例としては、樹立動物と1つ以上の組み込み部位とを異種交配して、別々の系統を確立する；別々の系統を同系交配して、各トランスジーンのさらなる発現の効果に起因して、より高いレベルでトランスジーンを発現する化合物トランスジェニック体を生成する；所定の組み込み部位にヘテロ接合性の動物を生成するように、ヘテロ接合トランスジェニック動物を交配させて、発現を補強し、かつ、DNA分析による動物のスクリーニングの必要性を排除する；別個のヘテロ接合体系統を交配させて、化合物ヘテロ接合体系統またはホモ接合体系統を生成する；ならびに関心対象となる実験モデルに適切な別個のバックグラウンドに対してトランスジーン（すなわち、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド）を配置するように繁殖する等が挙げられるが、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、本発明の融合タンパク質の生物学的機能を推定するのに有用な動物モデル系ならびに本発明の融合タンパク質の治療用タンパク質および／またはアルブミン成分、異常な発現に関連する状態および／または障害の研究、ならびにこ

のような状態および／または障害を改善するのに有効な化合物のスクリーニング等が挙げられるが、これらに限定されない用途を有する。

【1250】

実施例61：生体外での遺伝子治療を用いる治療方法

遺伝子治療の一方法では、本発明のアルブミン融合タンパク質を発現し得る線維芽細胞が患者に移植される。概して、線維芽細胞は、皮膚生検により対象から得られる。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し、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（例えば、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's F12培地）を加える。次いで、フラスコを37℃で約1週間インキュベートする。

10

【1251】

この時点で、新鮮な培地を加え、続いて、さらに数日ごとに入れ替える。さらに2週間培養した後、線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を合わせる。

【1252】

Moloneyマウス肉腫ウイルスの長末端反復配列により隣接したpMV-7 (Kirschmeier, P. T. et al., DNA, 7:219-25 (1988)) をEcoRIおよびHindIIIで消化させ、続いて、子ウシ腸ホスファターゼで処理する。線状ベクターをアガロースゲル上で分画し、ガラスビーズを用いて精製する。

20

【1253】

本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該技術分野で周知の技法を用いて生成され得、PCRプライマーを用いて増幅され得、これは、5'末端配列および3'末端配列に対応し、任意に適切な制限部位を有し、必要であれば、開始コドン／終止コドンを有する。好ましくは、5'プライマーは、EcoRI部位を含有し、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フラグメントを、T4 DNAリガーゼの存在下で、一緒に加える。得られた混合物を、2つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。次いで、連結混合物を用いて、細菌HB101を形質転換し、次いで、ベクターが適切に挿入された関心対象となる遺伝子を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。

30

【1254】

両性 (amphotropic) pA317またはGP+am12パッケージング細胞を、10%の子ウシ血清 (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、集密濃度まで組織培養により成長させる。次いで、その遺伝子を含有するMSVベクターを、培地に加え、ベクターをパッケージ細胞に形質導入する。こうすると、パッケージ細胞は、その遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を産生する（ここで、パッケージ細胞は、プロデューサー細胞と称される）。

【1255】

新鮮な培地を形質導入されたプロデューサー細胞に加え、続いて、培地を集密状態のプロデューサー細胞の10cmのプレートから採取する。感染性ウイルス粒子を含有する使用済み培地を、ミリポアフィルターから濾過し、分離したプロデューサー細胞を除去し、次いで、この培地を用いて、線維芽細胞に感染させる。培地を、線維芽細胞の半集密状態のプレートから除去し、プロデューサー細胞からの培地と迅速に交換する。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、実質的にすべての線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等の選択可能な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。線維芽細胞に効率的に感染させると、線維芽細胞を分析して、アルブミン融合タンパク質が産生されるか否かを決定する。

40

50

【1256】

次いで、操作された線維芽細胞を、単独か、またはcytodex 3マイクロ担体ビーズ上で集密状態になるまで増殖させた後に、宿主に移植する。

【1257】

実施例62：生体内での遺伝子治療を使用する処置の方法

本発明の別の態様は、生体内遺伝子治療法を用いて、障害、疾患および状態を処置することである。遺伝子治療法は、本発明のアルブミン融合タンパク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）配列の動物への導入に関する。本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、標的組織により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子エレメントに作動可能に連結（すなわち、会合）され得る。このような遺伝子治療および送達技法および方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、国際公開第WO90/11092号、同第WO98/11779号、米国特許第5693622号、同第5705151号、同第5580859号、Tabata et al., Cardiovasc. Res. 35(3):470-479(1997)、Chao et al., Pharmacol. Res. 35(6):517-522(1997)、Wolff, Neuromuscul. Disord. 7(5):314-318(1997)、Schwartz et al., Gene Ther. 3(5):405-411(1996)、Tsurumi et al., Circulation 94(12):3281-3290(1996)を参照のこと（参照することにより本明細書に組み込まれる）。 10 20

【1258】

ポリヌクレオチド構築物は、注射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、腸等）の間質腔への注射により送達され得る。ポリヌクレオチド構築物は、医薬的に許容される液体または水性の担体中で送達され得る。

【1259】

「裸の」ポリヌクレオチド、DNA、またはRNAという用語は、ウイルス配列、ウイルス粒子、リボソーム製剤、リポフェクチン、または沈殿剤等を含む、細胞への侵入を補助し、促進し、または簡便化するように作用する任意の送達ビヒクルのない配列を指す。しかしながら、本発明のアルブミン融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、リボソーム製剤で送達され得（例えば、Feigner P. L. et al., (1995) Ann. NY Acad. Sci. 772:126-139およびAbdallah B. et al., (1995) Biol. Cell 85(1):1-7にて教示されているもの）、これらは、当業者に公知の方法により調製され得る。 30

【1260】

遺伝子治療法において用いられるポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、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構築物である。当業者に周知の任意の強力なプロモーターは、DNAの発現を駆動させるために使用され得る。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を提供し得ることが示されている。 40

【1261】

ポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（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）の間質腔に送達され得る。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、ムコ多糖マトリックス、ある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。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間質腔への送達は、以下で論じられる理由 50

のために好ましい。それらは、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達され得る。好ましくは、それらは、分化した持続性の非分裂細胞中に送達され、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等の非分化または完全には分化していない細胞において達成され得る。生体内での筋肉細胞は、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、特に適格である。

【1262】

裸のポリヌクレオチド注射について、DNAまたはRNAの有効投薬量は、約0.05 g/体重kg～約50 mg/体重kgの範囲にある。好ましくは、用量は、約0.005 mg/kgから約20 mg/kgであり、より好ましくは、約0.05 mg/kgから約5 mg/kgである。もちろん、当業者が認識するように、この用量は、注射の組織部位に応じて変化する。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得る。好ましい投与経路は、組織の間質腔への非経口注射経路による。しかしながら、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に、肺または気管支の組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル製剤の吸入が挙げられる。加えて、裸のポリヌクレオチド構築物が、血管形成術の間に、この手順において用いられるカテーテルにより動脈に送達され得る。

【1263】

生体内で筋肉に注射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の産生に好適なテンプレート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テンプレートDNAを、裸のDNAとして使用するか、またはリボソームと複合化させる。次いで、マウスの大腿四頭筋に、様々な量のテンプレートDNAを注射する。

【1264】

5～6週齢の雌および雄Balb/Cマウスを、0.3 mlの2.5%のAvertinを腹腔内注射することにより、麻酔をかける。1.5 cmの切開を大腿前部に行ない、大腿四頭筋を直接視覚化する。テンプレートDNAを、1 cc注射器の27ゲージ針を通して1分間にわたり、膝への筋肉の遠位注射部位から約0.5 cmおよび深さ約0.2 cmで、0.1 mlの担体により、注射する。今後の局在化のために注射部位上で縫合を行ない、ステンレス鋼クリップを用いて皮膚を閉鎖する。

【1265】

適切なインキュベーション時間（例えば、7日）後、筋肉抽出物を、大腿四頭筋全体を切除することにより調製する。個々の大腿四頭筋の15 μm断面を5つごとに、タンパク質発現について組織化学的に染色する。融合たんぱく質発現についての時間経過は、異なるマウスからの大腿四頭筋を異なる時間において採取することを除いて、類似の様態で実施し得る。注射後の筋肉内のDNAの持続性は、注射したマウスおよび対照マウスからの全細胞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決定され得る。マウスにおける上述の実験の結果を用いて、ヒトおよび他の動物における、裸のDNAを用いる適切な用量および他の処置パラメーターを推定することができる。

【1266】

実施例63：本発明の融合タンパク質の生物学的効果
星状細胞およびニューロンアッセイ

本発明のアルブミン融合タンパク質は、皮質神経細胞の生存、神経突起伸長、または表現型の分化を促進する活性について、およびグリア繊維性酸性タンパク質免疫陽性細胞である、星状細胞の増殖の誘導について試験することができる。バイオアッセイについての皮質細胞の選択は、皮質構造におけるFGF-1およびFGF-2の優勢な発現、ならびに以前に報告されているFGF-2処理による皮質神経細胞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、これらの細胞における本発明のアルブミン融合タンパク質の活性を解明することができる。

【1267】

さらに、体外での皮質神経細胞または海馬神経細胞におけるFGF-2（塩基性FGF

10

20

30

40

50

）の生物学的効果を記載する以前の報告は、神経細胞の生存および神経突起伸長の両方の増大を実証している（Wallicke et al., "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、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）。しかしながら、PC-12細胞に関して行われた実験による報告は、これらの2つの反応は、必ずしも同じ意味ではなく、試験されたFGFだけでなく、標的細胞上に発現される受容体にも依存し得ることを示唆する。初代皮質神経細胞培養パラダイムを用いて、神経突起伸長を誘導する本発明のアルブミン融合タンパク質の能力を、例えば、チミジン取り込みアッセイを用いて、FGF-2で達成された反応と比較することができる。

10

【1268】

線維芽細胞および内皮細胞アッセイ

ヒト肺線維芽細胞を、Clonetics (San Diego, CA) から入手し、Cloneticsからの成長培地で維持する。皮膚微小血管内皮細胞を、Cell Applications (San Diego, CA) から入手する。増殖アッセイについては、ヒト肺線維芽細胞および皮膚微小血管内皮細胞を、96ウェルプレートの成長培地中で1日間、5,000細胞/ウェルで培養することができる。次いで、細胞を、0.1%のBSA基礎培地中で1日間インキュベートする。培地を新鮮な0.1%のBSA培地と交換した後、細胞を、本発明の試験融合タンパク質と共に3日間インキュベートする。Alamar Blue (Almar 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時間インキュベートする。細胞生存度を、Cytofluor蛍光リーダーでの読み取りにより測定する。PGE₂アッセイについては、ヒト肺線維芽細胞を、96ウェルプレート中で1日間、5,000細胞/ウェルで培養する。培地を0.1%のBSA基礎培地と入れ替えた後、細胞を、IL-1 α と共に、またはそれをともなわずに、FGF-2または本発明の融合タンパク質と共に24時間インキュベートする。上清を採取し、EIAキット (Cayman, Ann Arbor, MI) によりPGE₂についてアッセイする。IL-6アッセイについては、ヒト肺線維芽細胞を、96ウェルプレート中で1日間、5,000細胞/ウェルで培養する。培地を0.1%のBSA基礎培地と入れ替えた後、細胞を、FGF-2と共に、または本発明のアルブミン融合タンパク質および/もしくはIL-1 α と共に、またはそれをともなわずに、24時間インキュベートする。上清を採取し、ELISAキット (Endogen, Cambridge, MA) によりIL-6についてアッセイする。

20

30

【1269】

ヒト肺線維芽細胞を、線維芽細胞の成長に対する影響を評価するためのAlamar Blueを加える前に、FGF-2または本発明のアルブミン融合タンパク質と共に基礎培地中で3日間培養する。FGF-2は、10~2500 ng/mlの刺激を示すはずであり、これを用いて、本発明のアルブミン融合タンパク質と比較することができる。

40

【1270】

[3H] チミジン取り込みに基づく細胞増殖

以下の[3H] チミジン組み込みアッセイを用いて、細胞（例えば、線維芽細胞、上皮細胞、または未成熟筋細胞）の増殖に対する治療用タンパク質（例えば、成長因子タンパク質）の効果を測定することができる。

【1271】

半集密状態の培養物を、無血清培地中で18時間インキュベートすることにより、G1期で停止させる。次いで、治療用タンパク質を、24時間にわたり添加し、その最後の4時間で、培養物を、0.33 μ Mの最終濃度の[3H] チミジン (25 Ci/mmol, Amersham, Arlington Heights, IL) で標識する。取り込まれ

50

た〔3H〕チミジンは、24時間、10%の氷冷トリクロロ酢酸で沈殿される。次いで、細胞を、10%の氷冷トリクロロ酢酸、次いで、氷冷水の順次で連続的にすすぐ。0.5M NaOHでの溶解した後、溶解物およびPBSリンス(500ml)をプールし、放射能の量を測定する。

【1272】

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。広範に特徴付けされているパーキンソン病の動物モデルは、1-メチル-4-フェニル1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)の全身投与を含む。CNSにおいて、MPTPは、星状細胞により取り込まれ、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：ユビキノン酸化還元酵素(複合体I)を選択的に阻害し、これにより電子伝達を妨害し、最終的に活性酸素を生成する。

【1273】

FGF-2(塩基性FGF)が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パラダイムにおいて実証されている(Ferrari et al., Dev. Biol. 1989)。近年、Unsicker博士のグループは、線条体のゲル型インプラントでのFGF-2の投与が、MPTP曝露と関連する毒性から黒質のドーパミン作動性ニューロンのほぼ完全な防御を生じることを実証している(Otto and Unsicker, J. Neuroscience, 1990)。

【1274】

FGF-2を用いたデータに基づいて、本発明のアルブミン融合タンパク質は、体外におけるドーパミン作動性ニューロン生存を増強することにおいて、本発明のアルブミン融合タンパク質が、FGF-2の作用と類似の作用を有するか否かを決定するために評価することができ、そして、本発明のアルブミン融合タンパク質はまた、線条体において、MPTP処理と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ついて生体内で試験することもできる。本発明のアルブミン融合タンパク質の潜在的効果を、まず、ドーパミン性ニューロン細胞培養パラダイムにおいて体外で試験する。妊娠14日目のWistarラット胚に由来する中脳底板を解離することにより、培養物を調製する。組織をトリプシンで分離し、ポリオルチニン-ラミニンでコーティングしたカバーガラスに200,000細胞/cm²の密度で接種する。細胞をダルベッコ改変イーグル培地およびホルモン補充物(N1)を含有するF12培地中で維持する。体外で8日後、培養物をパラホルムアミドで固定し、そしてチロシンヒドロキシラーゼ(ドーパミン作動性ニューロンについての特異的マーカー)での免疫組織化学的染色のための処理を施す。分離した細胞培養物を、胚性ラットから調製する。培養培地を3日ごとに入れ替え、因子をまた、その時に加える。

【1275】

ドーパミン作動性ニューロンを妊娠14日目(ドーパミン作動性前駆細胞が増殖する段階を過ぎる発生時間)で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、体外で生存しているドーパミン作動性ニューロンの数の増加を表わすであろう。したがって、本発明の治療用タンパク質が、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、この融合タンパク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。

【1276】

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

10

20

30

40

50

および島細胞移植は、I D D Mのための一般的な処置選択である（例えば、Stewart et al., Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86 (3) : 984-988 (2001)、Bruni card i, Transplant. Proc. 28 : 2138-40 (1996)、Kendall & Robertson, Diabetes Metab. 22 : 157-163 (1996)、Hamano et al., Kobe J. Med. Sci. 42 : 93-104 (1996)、Larsen & Stratta, Diabetes Metab. 22 : 139-146 (1996)、およびKinkhabwala, et al., Am. J. Surg. 171 : 516-520 (1996)を参照のこと）。いかなる移植方法にもあてはまるように、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。しかしながら、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ふさらなる独立した危険性を含む。したがって、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タンパク質を用いて、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。

【1277】

本発明に従って、上記のアルブミン融合に基づく組成物および製剤を投与して、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。

【1278】

A I - 4 0 1、C D P - 5 7 1（抗T N Fモノクローナル抗体）、C G - 1 0 8 8、D i a m y d（糖尿病ワクチン）、I C M 3（抗-I C A M - 3モノクローナル抗体）、l i n o m i d e（Roquinimex）、N B I - 6 0 2 4（改変ペプチドリガンド）、T M - 2 7、V X - 7 4 0（H M R - 3 4 8 0）、カスパーゼ8プロテアーゼ阻害剤、サリドマイド、h O K T 3ガンマ1（A l a - a l a）（抗C D 3モノクローナル抗体）、経口用インターフェロナーアルファ、経口用乳酸菌、およびL y m p h o s t a t - B（商標）が挙げられるが、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。

【1279】

実施例65：V HおよびV Lドメインの特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V HおよびV Lドメインを特定およびクローニングする一方法は、抗体発現細胞株から作製されたc D N AについてV HおよびV Lに特異的なプライマーを用いて、P C Rを行うことである。簡潔には、R N Aを、細胞株から単離し、E B V細株により発現される抗体のV HおよびV Lドメインを増幅するように設計されたR T - P C R用のテンプレートとして用いる。細胞を、T R I z o l（登録商標）試薬（L i f e T e c h n o l o g i e s ; R o c k v i l l e, M D）中で溶解して、1／5容量のクロロホルムで抽出し得る。クロロホルムを加えた後、溶液を室温で10分間インキュベートさせ、次いで、卓上用遠心機にて、14,000rpm、15分間、4℃で遠心分離する。上清を採取し、R N Aを、等量のイソプロパノールを用いて沈澱させる。沈澱させたR N Aを、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、ペレット化する。遠心分離した後、上清を捨て、75%のエタノールで洗浄する。洗浄した後、R N Aを、800rpm、5分間、4℃で再び遠心分離する。上清を捨て、ペレットを空気乾燥させる。R N AをD E P C水に溶解させ、10分間で60℃まで加熱する。R N Aの量は、光学密度測定を用いて、決定することができる。

【1280】

c D N Aは、当技術分野で公知の方法に従って、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R N Aから合成し得る。次いで、

cDNAを、VHおよびVLドメインのPCR増幅のために、テンプレートとして用いる。VHおよびVL遺伝子の増幅するため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テンプレートの量が限られているか、または効率を高める場合、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VH 5'プライマーおよびすべてのJH 3'プライマーが、単一のPCR反応で用いられる。PCR反応は、1×PCR緩衝液、2mMの各dNTP、0.7単位の高忠実性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を含有する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22 pmolおよび28 pmol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：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である。反応が終了した後、試料チューブを4℃で保存する。

10

【1281】

【表 6 - 1】

表 7 : V HおよびV Lドメインの増幅に使用されるプライマー配列

<u>プライマー名</u>	<u>配列番号</u>	<u>プライマー配列 (5' - 3')</u>	
V Hプライマー			
Hu VH1-5'	62	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTG G	10
Hu VH2-5'	63	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTG G	
Hu VH3-5'	64	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG G	
Hu VH4-5'	65	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG GG	
Hu VH5-5'	66	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTG C	
Hu VH6-5'	67	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG G	20
Hu JH1,2-5'	68	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT GCC	
Hu JH3-5'	69	TGAAGAGACGGTGACCATTGTC CC	
Hu JH4,5-5'	70	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT TCC	
Hu JH6-5'	71	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTC CC	
V Lプライマー			
Hu Vカップ1-5'	72	GACATCCAGATGACCCAGTCTC C	30
Hu Vカップ2a-5'	73	GATGTTGTGATGACTCAGTCTC C	
Hu Vカップ2b-5'	74	GATATTGTGATGACTCAGTCTC C	
Hu Vカップ3-5'	75	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTC C	
Hu Vカップ4-5'	76	GACATCGTGATGACCCAGTCTC C	

【 1 2 8 2 】

【表 6 - 2】

表 7 : V H および V L ドメインの増幅に使用されるプライマー配列

Hu V カ ッ パ 5-5'	77	GAAACGACACTCACGCAGTCTC C	
Hu V カ ッ パ 6-5'	78	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC	
Hu V ラ ム ダ 1-5'	79	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC	
Hu V ラ ム ダ 2-5'	80	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC	
Hu V ラ ム ダ 3-5'	81	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC	
Hu V ラ ム ダ 3b-5'	82	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC	10
Hu V ラ ム ダ 4-5'	83	CACGTTATACTGACTCAACCGCC	
Hu V ラ ム ダ 5-5'	84	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC	
Hu V ラ ム ダ 6-5'	85	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA	
Hu J カ ッ パ 1-3'	86	ACGTTTGATTTCACCTTGGTCC C	
Hu J カ ッ パ 2-3'	87	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCC C	
Hu J カ ッ パ 3-3'	88	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCC C	
Hu J カ ッ パ 4-3'	89	ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCC C	20
Hu J カ ッ パ 5-3'	90	ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCC C	
Hu J ラ ム ダ 1-3'	91	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC	
Hu J ラ ム ダ 2-3'	92	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC	
Hu J ラ ム ダ 3-3'	93	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC	
Hu J ラ ム ダ 3b-3'	94	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC	
Hu J ラ ム ダ 4-3'	95	CACGTTATACTGACTCAACCGCC	
Hu J ラ ム ダ 5-3'	96	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC	30
Hu J ラ ム ダ 6-3'	97	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA	

次いで、P C R 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（V H ドメインについては約 5 0 6 塩基対および V L ドメインについては 3 4 4 塩基対）の D N A バンドを、ゲルから切り取り、当該技術分野で公知の方法を用いて、精製することができる。精製された P C R 産物は、P C R クローニングベクター（I n v i t r o g e n I n c . , C a r l s b a d , C A 製の T A ベクター）中に連結することができる。個々にクローニングされた P C R 産物を、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、単離することができる。次に、クローニングされた P C R 産物を、当該技術分野で一般的に周知の方法を用いて配列決定してもよい。

【 1 2 8 3 】

また、V H ドメインおよび V L ドメインを含有する P C R バンドを用いて、全長 I g 発現ベクターを作製することもできる。適切な宿主細胞に形質移入した場合に、V H および V L ドメインを、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、重鎖（たとえば、ヒト I g G 1 もしくはヒト I g G 4）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有する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 つの細胞株で（1 つもしくは 2 つのベクターから）発現させる場合、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構築することができる。完全な抗体分子をコードする発現ベクターを生成するために、V H および V L 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、当該技術分野で公知である。

【1284】

実施例66：HA-サイトカインまたはHA-成長因子融合タンパク質（例えば、NGF、BDNF a、BDNF bおよびBDNF c）の調製

NGF等の関心対象となるサイトカインまたは成長因子についてのcDNAは、cDNAライブラリから、RT-PCRにより、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より（すべて標準的な方法を用いる）を含む様々な手段により、単離され得る。これらのタンパク質のすべ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、cDNAの5'および3'末端を調節して、HAのcDNAを含有するベクター中に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用いることができるように、制限部位を生成することができる。これは、スパーサー配列の使用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タンパク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タンパク質を採取し、培地から精製し、その生物学的活性について試験することができる。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いて、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。

【1285】

実施例67：HA-IFN融合タンパク質（例えば、IFN α ）の調製

IFN α 等の関心対象となるインターフェロンについてのcDNAは、cDNAライブラリから、RT-PCRにより、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により（すべて標準的な方法を用いる）等が挙げられるが、これらに限定されない、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、IFN α ）の核酸配列は、例えば、米国特許第5,326,859号および第4,588,585号において、および欧州特許第32,134号において、ならびにGenBankのような公のデータベースにおいて、周知であり、かつ利用可能である。cDNAを、オリゴヌクレオチドリンカーを用いて、cDNAを、HAのcDNAを含有するベクター中にクローニングすることができるように、5'末端および3'末端において調整して、制限部位を生成し得る。これは、スパーサー配列の使用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。IFN α （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タンパク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タンパク質を採取し、培地から精製し、その生物学的活性について試験することができる。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いて、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。

【1286】

バイアルからの最大のタンパク質回収

本発明のアルブミン融合タンパク質は、低濃度で包装された場合であっても、高度に安定である。加えて、低タンパク質濃度にも関わらず、水溶液がバイアルの壁に対する結合を最小限にするための他のタンパク質を含まない場合であっても、良好な融合タンパク質の回収が、観察される。バイアルに保存されたHA-IFN溶液の回収を、ストックしておいた溶液と比較した。6または30 μ g/mlのHA-IFN溶液を、バイアル中に入

れて、4℃で保存した。48または72時間後、最初の10ngの試料に相当する容量を取り出し、IFNサンドイッチELISAで測定した。推定値を、高濃度ストック溶液の値と比較した。示されるように、これらのバイアル中では、本質的に試料の損失はなく、バイアル壁に対する試料の損失を防ぐために、アルブミン等の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。

【1287】

生体内におけるHA- α -IFN融合物の安定性およびバイオアベイラビリティ

生体内における、HA- α -IFN融合分子の安定性およびバイオアベイラビリティを決定するために、(酵母より)精製された融合分子を、サルに投与した。HA- α -IFN融合物から製剤化された医薬組成物は、延長された血清半減期およびバイオアベイラビリティの理由となり得る。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有するように製剤化され得る。

10

【1288】

HA- α -IFN融合物を含有する医薬組成物を用いて、 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ける疾患を、処置または予防し得る。このような疾患としては、有毛細胞白血病、カボジ肉腫、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、卵巣および子宮頸癌、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、膠芽細胞腫等(Interferon Alpha、AHFS Drug Information, 1997を参照のこと)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【1289】

したがって、本発明は、ヒト投与のための適切な投薬量を用いて製剤化された、HA- α -IFN融合タンパク質、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。本発明はまた、少なくとも1つのHA- α -IFN融合タンパク質、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、このような処置の必要な患者を処置する方法も包含する。

【1290】

二重機能性HA- α -IFN融合物

30

HA- α -IFN発現ベクターを改変して、二重機能性HA- α -IFN融合タンパク質の発現のための挿入物を含ませてもよい。例えば、関心対象となる第2のタンパク質のcDNAを、二重の終止コドンを除くか、またはコード配列の下流に移動させた後、「rHA-IFN」配列の下流にフレームを合わせて、挿入し得る。

【1291】

二機能性HA- α -IFN融合タンパク質の1つの形態において、Bリンパ球刺激タンパク質に対する抗体もしくはフラグメント(GenBank寄託番号4455139)、またはポリペプチドを、融合分子のHA成分の1つの末端に融合し得る。この二機能性タンパク質は、融合物の α -IFN成分により生じる任意の免疫応答を調節するために有用である。

40

【1292】

実施例68：HA-ホルモン融合タンパク質の調製

関心対象となるホルモンについてのcDNAは、cDNAライブラリから、RT-PCRにより、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により(すべて標準的な方法を用いる)等が挙げられるが、これらに限定されない、様々な手段により、単離され得る。これらのタンパク質のすべてのヌクレオチド配列は、知られており、例えば、GenBank等の公共のデータベースにて入手可能である。cDNAを、cDNAの5'および3'末端を調節して、HAのcDNAを含有するベクター中に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用いることができるように、制限部位を生成することができる。これは、スパーサー配列の使用を伴う

50

または伴わないNまたはC末端であり得る。ホルモン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タンパク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タンパク質を採取し、培地から精製し、その生物学的活性について試験することができる。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）を利用することを出いて、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。

10

【1293】

実施例69：HA-可溶性受容体またはHA-結合タンパク質の融合タンパク質の調製

関心対象となる可溶性受容体または結合タンパク質についてのcDNAは、cDNAライブラリから、RT-PCRにより、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により（すべて標準的な方法を用いる）等が挙げられるが、これらに限定されない、様々な手段により、単離され得る。これらのタンパク質のすべてについてのヌクレオチド配列は、知られており、例えば、GenBankにて入手可能である。cDNAを、cDNAの5'および3'末端を調節して、HAのcDNAを含むベクター中に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用いることができるように、制限部位を生成することができる。これは、スペーサー配列の使用を伴うまたは伴わないNまたはC末端であり得る。受容体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タンパク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タンパク質を採取し、培地から精製し、その生物学的活性について試験することができる。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）を利用することを出いて、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。

20

30

【1294】

実施例70：HA-成長因子の調製

関心対象となる成長因子についてのcDNAは、cDNAライブラリから、RT-PCRにより、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により（すべて標準的な方法を用いる）等が挙げられるが、これらに限定されない、様々な手段により、単離され得る（GenBank寄託番号NP_000609を参照のこと）。cDNAを、cDNAの5'および3'末端を調節して、HAのcDNAを含むベクター中に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用いることができるように、制限部位を生成することができる。これは、スペーサー配列の使用を伴うまたは伴わないNまたはC末端であり得る。成長因子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タンパク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タンパク質を採取し、培地から精製し、その生物学的活性について試験することができる。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）を利用することを出いて、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。

40

【1295】

50

実施例 7 1 : H A ー 本鎖抗体融合タンパク質の調製

一本鎖抗体は、ファージライブラリからの選択、抗体の c D N A 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が挙げられるが、これらに限定されない、いくつかの方法により産生される。c D N A を、c D N A の 5 ' および 3 ' 末端を調節して、H A の c D N A を含有するベクター中に c D N A 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用いることができるように、制限部位を生成することができる。これは、スパーサー配列の使用を伴うまたは伴わない N または C 末端であり得る。細胞 c D N A は、ベクター、例えば、p P P C 0 0 0 5 (図 2)、p S c C H S A、p S c N H S A、または p C 4 : H S A 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 p S A C 3 5 中に挿入し、酵母におけるアルブミン融合タンパク質の発現を可能にする。

【 1 2 9 6 】

本発明の融合分子において、V_H および V_L は、V_H の C 末端と V_L 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 V_H と V_L との間の K e x 2 p プロテアーゼ開裂部位；ならびに V_H および V_L 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チン残基のうちの 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。代替的なオプションは、V_H を H A または H A ドメインフラグメントの N 末端に配置し、そして V_L を H A または H A ドメインフラグメントの C 末端に配置することである。

【 1 2 9 7 】

次いで、酵母から分泌されたアルブミン融合タンパク質を採取し、培地から精製し、その活性について試験することができる。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いて、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。この状態において産生された抗体を、培地から精製して、標準的な免疫化学的方法を用いて、その抗原との結合について試験し得る。

【 1 2 9 8 】

実施例 7 2 : H A ー 細胞接着分子融合タンパク質の調製

関心対象となる細胞接着分子についての c D N A は、c D N A ライブラリから、R T - P C R により、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 P C R により（すべて標準的な方法を用いる）等が挙げられるが、これらに限定されない、様々な手段により、単離され得る。周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、G e n B a n k にて入手可能である。c D N A を、c D N A の 5 ' および 3 ' 末端を調節して、H A の c D N A を含有するベクター中に c D N A 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用いることができるように、制限部位を生成することができる。これは、スパーサー配列の使用を伴うまたは伴わない N または C 末端であり得る。細胞接着分子 c D N A は、ベクター、例えば、p P P C 0 0 0 5 (図 2)、p S c C H S A、p S c N H S A、または p C 4 : H S A 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 p S A C 3 5 中に挿入し、酵母におけるアルブミン融合タンパク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タンパク質を採取し、培地から精製し、その生物学的活性について試験することができる。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いて、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。

【 1 2 9 9 】

実施例 7 3 : H A 融合タンパク質としての阻害因子およびペプチド（例えば、H A ー 抗ウ

イルス剤、H A－抗生物質、H A－酵素阻害剤およびH A－抗アレルギー性タンパク質)の調製

抗生物質ペプチド等の関心対象となるペプチドについてのcDNAは、cDNAライブラリから、R T－P C Rにより、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P C Rにより(すべて標準的な方法を用いる)等が挙げられるが、これらに限定されない、様々な手段により、単離され得る。cDNAを、cDNAの5'および3'末端を調節して、H AのcDNAを含有するベクター中に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用いることができるように、制限部位を生成することができる。これは、スパーサー配列の使用を伴うまたは伴わないNまたはC末端であり得る。ペプチドcDNAは、ベクター、例えば、p P P C 0 0 0 5 (図2)、p S S c C H S A、p S c N H S A、またはp C 4 : H S A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p S A C 3 5中に挿入し、酵母におけるアルブミン融合タンパク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タンパク質を採取し、培地から精製し、その生物学的活性について試験することができる。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いて、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。

10

【1300】

実施例74: 標的H A融合タンパク質の調製

20

関心対象となるタンパク質についてのcDNAは、標準的な分子生物学的手法を用いて、cDNAライブラリから単離され得る、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、cDNA中で操作して、簡便な制限部位を形成し得、アルブミンcDNAへのタンパク質cDNAの付着をも可能にし得る。標的タンパク質またはペプチドのcDNA(例えば、一本鎖抗体、あるいは細胞内にタンパク質を導く核局在化シグナルのようなペプチド)を、アルブミンの他の末端に融合し得る。関心対象となるタンパク質および標的化ペプチドを、アルブミンcDNAとの融合を可能にするベクター(例えば、p P P C 0 0 0 5 (図2)、p S S c C H S A、p S c N H S A、またはp C 4 : H S A)中にクローニングする。この状態において、アルブミンのN末端およびC末端の両方を、他のタンパク質と融合する。次いで、融合したcDNAを、p P P C 0 0 0 5から切り出し、p S A C 3 5等のプラスミド中に挿入して、酵母中でのアルブミン融合タンパク質の発現を可能にする。上記の手順のすべては、分子生物学の標準的な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タンパク質を、培地から採取し、精製して、適切な生化学的試験および生物学的試験を用いて、その生物学的活性および標的活性について試験することができる。

30

【1301】

実施例75: H A－酵素融合物の調製

関心対象となる酵素についてのcDNAは、cDNAライブラリから、R T－P C Rにより、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P C Rにより(すべて標準的な方法を用いる)等が挙げられるが、これらに限定されない、様々な手段により、単離され得る。cDNAを、cDNAの5'および3'末端を調節して、H AのcDNAを含有するベクター中に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用いることができるように、制限部位を生成することができる。これは、スパーサー配列の使用を伴うまたは伴わないNまたはC末端であり得る。酵素cDNAは、ベクター、例えば、p P P C 0 0 0 5 (図2)、p S S c C H S A、p S c N H S A、またはp C 4 : H S A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p S A C 3 5中に挿入し、酵母におけるアルブミン融合タンパク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タンパク質を採取し、培地から精製し、その生物学的活性について試験することができる。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

40

50

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いて、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。

【1302】

実施例 76：構築物 ID 番号 2249、IFNa2-HSA の生成

構築物番号 2249、pSAC35：IFNa₂-HSA は、HSA キメラリーダー配列を有する IFNa₂ アルブミン融合タンパク質をコードする DNA を含み、その後、IFNa₂ タンパク質の成熟形態、すなわち、酵母 *S. cerevisiae* 発現ベクター pSAC35 において、HSA の成熟形態のアミノ末端に融合された C1-E165 が続く。

10

【1303】

IFNa₂ cDNA のクローニング

IFNa₂ 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 IFNa₂-1 および IFNa₂-2 を用いて PCR 増幅された。PCR アンプライマー (amplimer) を、SalI/ClaI で切断し、XhoI/ClaI で切断した pScCHSA に連結した。構築物 ID 番号 2249 は、IFNa₂ の成熟形態の後に、成熟 HSA タンパク質が続く、HSA のキメラリーダー配列を含有するアルブミン融合タンパク質をコードする。

【1304】

IFNa₂、IFNa₂-1、および IFNa₂-2 の成熟形態をコードするポリヌクレオチドの PCR 増幅に適している 2 つのオリゴヌクレオチドを合成した。

20

IFNa₂-1：5'-CGCGCGCGCGTCGACAAAAAGATGTGATCTGCCTCAAAACCCACA-3' (配列番号 348)

IFNa₂-2：

5'-GCGCGCGCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCTTCTCTTACTTCTTAACTTTCT-3' (配列番号 349)

【1305】

IFNa₂-1 プライマーは、SalI クローニング部位 (下線で示される)、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 IFNa₂ の成熟形態の初めの 7 個のアミノ酸残基をコードする 22 個のヌクレオチド (太字で示される) を組み込む。IFNa₂-2 において、ClaI 部位 (下線で示される) およびそれに続く DNA は、成熟 HSA タンパク質の初めの 10 個のアミノ酸をコードする DNA の逆相補体であり、最後の 22 個のヌクレオチド (太字で示される) は、IFNa₂ の最後の 7 個のアミノ酸残基をコードする DNA の逆相補体である (実施例 2 を参照のこと)。IFNa₂-HSA の PCR アンプライマーは、これらのプライマーを用いて生成され、精製され、SalI および ClaI 制限酵素で消化され、pScCHSA ベクターの XhoI および ClaI 部位にクローニングされた。配列を確認した後、この IFNa₂ アルブミン融合タンパク質をコードする発現カセットを、pSAC35 で消化された NotI にサブクローニングした。

30

【1306】

さらに、アミノ酸配列決定による、発現したアルブミン融合タンパク質の N 末端の分析は、予想される IFNa₂ 配列 (以下を参照のこと) の存在を確認し得る。

40

【1307】

異なるリーダー配列を用いて他の IFNa₂ アルブミン融合タンパク質が、当該技術分野で周知の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としては、インベルターゼ「INV」(構築物 2343 および 2410) および交配因子アルファ「MAF」(構築物 2366) が挙げられるが、これらに限定されない。これらの IFNa₂ アルブミン融合タンパク質は、前記のように、pC4 (構築物 2382) および pEE12.1 等の哺乳類の発現ベクターにサブクローニングすることができる (実施例 5 を参照のこと)。HSA の C 末端と融合した治療用部分を有する IFNa₂ アル

50

ブミン融合タンパク質はまた、構築することができる（構築物2381）。

【1308】

本発明のIFNa2アルブミン融合タンパク質は、好ましくは、IFNa2の成熟形態（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したHSAの成熟形態（すなわち、Asp-25ないしLeu-609）を含む。本発明の一実施形態において、本発明のIFNa2アルブミン融合タンパク質は、さらに、発現のために使用した宿主の分泌経路において新生融合ポリペプチドを導くシグナル配列を含む。さらに好ましい実施形態において、シグナル配列によりコードされるシグナルペプチドが除去され、成熟IFNa2アルブミン融合タンパク質が、培養培地中に直接分泌される。本発明のIFNa2アルブミン融合タンパク質は、異種シグナル配列（MAF、INV、Ig、フィブリンB、クラスτεリン（Clusterin）、インスリン様成長因子結合タンパク質4、HSAリーダー配列変異体（キメラHSA/MAFリーダー配列が挙げられるが、これに限定されない）または当該技術分野で周知の他の異種シグナル配列が挙げられるが、これらに限定されない）を含み得る。好ましい実施形態において、本発明のIFNa2アルブミン融合タンパク質は、天然IFNa2を含む。さらに好ましい実施形態において、本発明のIFNa2アルブミン融合タンパク質は、N末端メチオニン残基をさらに含む。フラグメントおよび／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はまた、本発明により包含される。

10

【1309】

構築物ID2249の発現および精製

20

酵母*S. cerevisiae*における発現

酵母*S. cerevisiae*株BXP10への構築物2249の形質転換を、当該技術分野で周知の方法により行った（実施例3を参照のこと）。細胞を、成長の72時間後の静止期に採取することができる。上清を、3000gで10分間、細胞を澄清化することにより採取する。発現レベルが、一次抗体として抗HSA血清（Kent Laboratories）で免疫ブロット検出を検出することにより、試験される。適切な分子量、88.5kDaのIFNa2アルブミン融合タンパク質を得ることができる。

【1310】

酵母*S. cerevisiae*細胞上清からの精製

酵母*S. cerevisiae*細胞の構築物ID番号2249から発現されたIFNa2アルブミン融合タンパク質を含有する細胞上清は、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：分別濾過、DEAE-セファロースFast Flow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アルブミン融合タンパク質は、100～250mMのNaCl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、IFNa2の成熟形態に対応する配列CDLPQ（配列番号98）を産出するはずである。

30

40

【1311】

IFNa2の活性は、体外でISRE-SEAPアッセイを用いてアッセイすることができる。

方法

構築物ID番号2249によりコードされるIFNa2アルブミン融合タンパク質は、実施例76にて既に述べたように、ISRE-SEAPアッセイにおいて、活性について試験することができる。簡潔には、調整された酵母の上澄みを1：1000希釈にて、I

50

SRE-SEAP/293Fレポーター細胞株上におけるISRE信号伝達を促進する能力について試験した。処置する1日前に、ISRE-SEAP/293Fレポーター細胞を、96ウェルのポリ-D-リジンでコーティングされたプレート中に、 3×10^4 細胞/ウェルでプレATINGした。次いで、レポーター細胞を、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、40 μ Lを取り出す前に、18または24時間インキュベーションした。組換えヒトインターフェロンベータ「rhIFNb」(Biogen)を、正対照として使用した。

【1312】

結果

IFNa2-HSAの精製した調製物は、 $10^{-1} \sim 10^1$ ng/mL (図4を参照のこと) または $10^{-10} \sim 10^{-8}$ ng/mL (図5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。

【1313】

構築物ID2249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の生体内誘導

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。インターフェロン構築物の効果は、処置するサルから血液試料を得、これらの試料を2つのOAS mRNA、p41およびp69の転写活性化について分析することにより、測定することができる。全血液の0.5 mL量を、動物につき7つの異なる時点、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匹の動物から得た。様々な群は、ビヒクル対照、1日目における30 μ g/kgのHSA-IFNの静脈内注射、1日目における30 μ g/kgのHSA-IFNの皮下注射、1日目における300 μ g/kgのHSA-IFNの皮下注射、および1、3、5日目の正対照としての40 μ g/kgのインターフェロンアルファ (Schering-Plough) の皮下注射を含む。p41およびp69 mRNA転写物のレベルを、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、決定した。OAS mRNAレベルは、18SリボソームRNA内因性対照に対して定量された。構築物2249によりコードされるアルブミン融合物に類似する実験を行うことができる。

【1314】

結果

IFNaで処置したサルと対照的に、HSAインターフェロンで処置したサルにおいて、p41およびp69 OAS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6を参照のこと)。効果は、約10日間続いた。

【1315】

実施例77: IFNa2アルブミン融合タンパク質のための適応症

IFNアルファアルブミン融合タンパク質 (構築物2249、2343、2410、2366、2382、および2381によりコードされたものが挙げられるが、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が挙げられるが、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、マクボウイルス、Guanaritoウイルスが挙げられるが、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が挙げられるが、これらに限定されないブンヤウイルス; 黄熱病、Banzai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

10

20

30

40

50

病ウイルスが挙げられるが、これらに限定されないフラビウイルス；ベネズエラ、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が挙げられるが、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、およびサル痘が挙げられるが、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 S i n c y t i a l 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が挙げられるが、これらに限定されないパラミキソウイルス；ならびに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特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ら、Emerg. Med. Clin. North Am. 2002；20（2）：273－309 を参照のこと）を含むウイルス感染が挙げられるが、これらに限定されない。

【 1 3 1 6 】

好ましくは、IFNαアルブミン融合タンパク質またはIFNハイブリッド融合タンパク質は、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と関連して、処置が施されていない成人患者および小児患者ならびに処置が施された成人患者および小児患者におけるHIV-1感染、HCV、またはHIV-1とHCVの共感染の処置のための薬剤の調製のために、ペンタフサイド（pentafuside）単独または抗HIV薬物療法（例えば、HAART）と組み合わせて、投与される。

【 1 3 1 7 】

実施例 78 : 構築物 I D 番号 3691、BNP-HSA の生成

構築物ID番号3691、pC4:SPCON、BNP1-32/HSAは、哺乳類の発現ベクターpC4中のHSAの成熟形態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、セクレコンを有するBNPアルブミン融合タンパク質をコードするDNAを含む。

【 1 3 1 8 】

構築物 3691 についての BNP cDNA 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、BamHI/ClaIを用いて開裂し、次いで、BamHI/ClaIで開裂されたpC4:HS Aに連結し、構築物ID番号3691を生じる。構築物ID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HS Aタンパク質が後に続く、BNPのプロセッシングされた、活性形態を含有するアルブミン融合タンパク質をコードする（構築物3691については表2の配列番号204を参照のこと）。

【 1 3 1 9 】

BNP、BNP-1、およびBNP-2の活性のある処理形態をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に適している2つのオリゴヌクレオチドを合成した。

B N P - 1 : 5 ' -

G A G C G C G G A T C C A A G C T T C C G C C A T C A T G T G G T G G C G C C T
G T G G T G G C G C T G C T G C T G C T G C T G C T G T G G C C C A T G G
T G T G G G C C A G C C C C A A G C T G G T G C A A G G - 3' (配列番号364)

B N P - 2 : 5 ' -

A G T C C C A T C G A T G A G C A A C C T C A C T C T T G T G T G C A T C A T G
C C G C C T C A G C A C T T T G C - 3' (配列番号 365)。

【 1 3 2 0 】

BNP-1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、C l a 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HSAタンパク質の初めの10個のアミノ酸をコードするDNAの逆相補体を含む。これらの2つのプライマーを用いて、BNPタンパク質をPCR増幅した。アニール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テンプレートについて実験に基づいて決定される必要がある。

【1321】

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で消化させた。ゲル電気泳動によりBam HI-Cla Iフラグメント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、構築物ID番号3691を生じた。発現構築物の配列を確認した。

10

【1322】

構築物ID3691の発現および精製

293F細胞における発現

当該技術分野で周知の方法により、構築物ID番号3691、pC4:SPCON、BNP1-32/HSAを、293F細胞にトランスフェクションした（実施例6を参照のこと）。

【1323】

293F細胞上清からの精製

2リットルの上清を、トランスフェクションから3日後、採取した。組み換えタンパク質を、5mlのBlueセファロースCL-6Bカラム（Amersham Biosciences、Piscataway、NJ、USA）により捕捉され、2MのNaClにより溶出した。その物質は、HiPrep16/10フェニルFF（high sub）カラムに結合され、20mMのMES、pH6.7により溶出した。BNP-HSAを、リン酸ナトリウム緩衝液勾配（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、さらに精製した。最終産物を、HiPrep26/10脱塩カラム（Amersham Biosciences）により、PBS pH7.2中へ交換した。

20

【1324】

BNP-HSAの活性は、体外でNPR-A/cGMPアッセイを用いてアッセイすることができる。

30

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、したがって、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に変換する、NPR-Aグアニリルシクラーゼドメインにより介される。BNP活性のための簡便なアッセイは、NPR-Aを安定に過剰発現する293F細胞株のBNP刺激を測定することである。BNPに曝露した後の該細胞におけるcGMP産生を、cGMP ELISAにより測定することができる。

【1325】

NPR-A 293F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（Invitrogen）中に構築した。293F細胞は、リポフェクタミン法により安定にプラスミドDNAにトランスフェクションされ、0.8μg/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。

40

【1326】

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、Catch Point 環状-GMP蛍光アッセイキット（Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA）により測定した。簡潔には、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、80μlの予備刺激緩衝

50

液（10 mMのグルコース、pH 7.4、15 nMの重炭酸ナトリウム、および0.75 mMの3-イソブチル-1-メチルキサンチンを加えたKrebs-Ringer重炭酸塩緩衝液）中で洗浄した。40 μ lの予備刺激緩衝液中のBNP-HSAまたは組換えBNPを、37℃で10分間、細胞に加えた。細胞を、40 μ lの溶解緩衝液を用いて、10分間振盪しながら溶解した。溶解物中のcGMPの量を、製造元の指示に従って定量した。

【1327】

結果

BNP-HSAおよび組換えBNPの用量反応関係を決定した（図7を参照のこと）。構築物ID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 $\pm$ 0.016、対して、1.80 $\pm$ 0.016 pm）、それぞれ、28.4 $\pm$ 1.2、および0.46 $\pm$ 1.1 nMのEC50値を有した。

【1328】

BNP-HSAは、生体内にて血圧を減少させる。

方法

BNPは、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、血圧を減少させる。動脈圧を減少させるBNP-HSAの能力を、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、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。BNP-HSAまたは組換えBNPを、ラット1匹あたり0.3 ccのPBS中に復元した。薬物を、尾部への静脈注入により投与した。収縮期および拡張期血圧を、cuff-tail法により、XBP-1000系（Kent Scientific, Torrington, CT, USA）を用いて、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、平均した。平均動脈圧（MAP）を、1/3の収縮期血圧+2/3の拡張期血圧として算出した。用量応答の判定については、血圧を、0.5、2、6および18 nmol/kgの用量で、pC4:SPCON. BNP1-32/HSAを投与してから20時間後に測定した。

【1329】

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、180～200 mmHgであった。尾部への静脈内注入により投与された単一ボラスの6 nmol/kgのBNP-HSAは、収縮期および拡張期血圧を共に低下させ、30 mmHg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、1日間持続し、次いで、数日かけて徐々に基線へと戻った（図8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、単一ボラスの6 nmol/kgの組換えBNPは、非常に一過性である約15 mmHgのMAPの減少のみを生じた。

【1330】

加えて、BNP-HSAボラスを注入してから20時間後の用量応答を、4匹の自然発生的な高血圧ラットにおいて判定した。0.5 nmol/kgのBNP-HSAは、平均7 mmHgのMAP減少を有したが、一方で、6 nmol/kgのBNP-HSAは、平均30 mmHgのMAP減少を有し、高用量の18 nmol/kgのBNP-HSAは、6 nmol/kgよりわずかに高い血圧のみを低下させた。

【1331】

BNP-HSAによる血漿cGMPの生体内誘導

方法

BNPによる細胞内cGMP活性化は、細胞から循環への放出をもたらす。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、生体内BNP作用のためのバイオマーカーとして用いられている。生体内でのBNP-HSA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、単一ボラスの組換えBNPまたはBNP-HSAを、6nmol/kg用量で、尾部静脈へ投与した。血漿を、組換えBNP投与群については、5、10、20、40および80分の時点にて、BNP-HSA群については、さらに640、1440、2880、および5760分にて、尾部血液から調製した。ビヒクル対照として、PBSにより処置したマウスからの血漿試料を、ゼロ時点にて採取した。cGMPレベルを、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判定した。

【1332】

結果

6nmol/kgの組換えBNPまたはBNP-HSAの単一静脈内ボラスの後、ピーク血漿cGMPレベルはそれぞれ、基線の3.9または5.6倍に増大した（図9を参照のこと）。加えて、組換えBNP処置後の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）であった。

【1333】

構築物ID3691によりコードされるBNPアルブミン融合物の生体内薬物動態分析方法

11～12週齢の雄C57/BL6マウス（Ace Animals, Boyertown, PA, USAから入手）は、研究時に、25.1±0.12gの体重であった。すべての動物は、10ml/体重kgの容量で投与された。予め投与の動物には、PBSを注射した。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。

【1334】

薬物動態分析を、以下の群において行った。

【1335】

【表7】

表8

群	薬物	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	皮下	3	予め投与

【1336】

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。

【1337】

血漿試料中のBNP-HSA濃度を、BNP EIAキット（Phoenix Pharmaceutical, Belmont, CA, USA）を用いて判定した。標準曲線を、試験試料を用いて、同じプレート上で同じ時間にて、作成した。組換えBNPについて検出限界は、0.11ng/mLであった。アッセイは、組換えBNPを検出し、マウスBNPと交差反応しない。

【1338】

分析を、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) により行った。各時間での平均血漿濃度を、その分析に用いた。linear up/log down trapezoidal 方法を用いて、 AUC_{0-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 $AUC_{0-\infty}$ への外挿を行った。データを、これらの分析のために、一様に重み付けした。

【1339】

結果

予め投与した試料中に検出される、血漿中の BNP-HSA の平均基線濃度は、約 0.081~0.095 $\mu\text{g/ml}$ であった。単一の静脈内または皮下注入した後、BNP-HSA は、11.2 (静脈内送達) または 19.3 時間 (皮下送達) の終末排泄半減期を有し、一方で、マウスにおける組換え BNP の半減期は、3.1 分であった。BNP-HSA のノンコンパートメント分析は、BNP-HSA が以下の特徴を有することを明らかにした。

【1340】

【表 8】

表 9

	単位	静脈内	皮下
$t_{\max}$	h	NA	16
$C_{\max}$	$\mu\text{g/ml}$	NA	11.2
$T_{1/2, \text{term}}$	H	11.2	19.3
$AUC_{0-\infty}$	$(\text{h} \cdot \mu\text{g/ml})(\text{mg/kg})$	658.9	227.9
V_{ss}	ml/kg	37	NA
V_2 または V_2/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
バイオアベイラビリティ	%		34.6
$C_{\max}$, 薬物ピーク血漿濃度; $t_{\max}$, 最大血漿濃度の時間; $AUC_{0-\infty}$, 時間 0 ~ 無限大までの血漿薬物濃度-時間曲線下面積; $t_{1/2, \text{term}}$, 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 : 静脈内投与後の終末期における分布量; V_2/F , 皮下投与後の終末期における分布量; NA, 適用せず			

【1341】

静脈内プロファイルの終末期における 5 ポイントおよび皮下プロファイ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。この終末相における得られた AUC は、静脈内および皮下プロファイルのそれぞれについて、全 AUC の約 10% であった。これは、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、静脈内および皮下プロファイルのそれぞれについて、全 AUC のわずか 2% および 4% の値と比較される。

【1342】

実施例 79: 構築物 ID 番号 3618、BNP (2x) - HSA の生成

構築物 ID 番号 3618、pC4:SPCON. BNP1-32 (2x) / HSA は、哺乳類の発現ベクター pC4 中の HSA の成熟形態のアミノ末端にタンデム融合した 2 つの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、セクレコンを有する BNP アルブミン融合タンパク質をコードする DNA

【 1 3 4 3 】

複製 B N P 部分をコードするポリヌクレオチドを、初めに、以下に記載される、4つのプライマー B N P-1、B N P-2、B N P-3および B N P-4を用いて、B N P（アミノ酸 1-32）の処理された活性形態から P C R 増幅して、2つのフラグメント A および B を作製する。増幅後、2つの精製されたフラグメント（A および B）を、等モル量で混合し、P C R テンプレートとして用い、以下に記載されるように、プライマー B N P-5 および B N P-6 を用いて増幅した。次いで、B N P（2×）挿入物を、B a m H I および C l a I で消化し、B a m H I および C l a I を用いて予め消化された p C 4 H S A ベクターに連結し、構築物 3618 を生じる。構築物 I D 番号 3618 は、成熟 H S A 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 111）および B N P の処理された活性形態の2つのタンデムコピーを含有するアルブミン融合タンパク質をコードする（構築物 3618 については、表 2 の配列番号 226 を参照のこと）。

BNPタンパク質の2つのフラグメントをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に適している4つのオリゴヌクレオチドを、初めに合成した。

BNP-4 5' - AGTCCCATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTTG
TGCAATCATGCCGCCCTCAGCACTTTGCG - 3' (配列番号463)

プライマーセット B N P - 1 / B N P - 2 および B N P - 3 / B N P - 4 を用いて、2 つの B N P タンパク質フラグメント（それぞれ A および B）を、P C R 増幅した。アニール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テンプレートについて実験に基づいて決定される必要がある。フラグメント A および B を精製し（例えば、W i z a r d P C R P r e p s D N A 精製システム（P r o m e g a C o r p）を用いて）、等モル量で混合し、P C R 増幅に適しているさらなる 2 つのオリゴヌクレオチド、B N P - 5 および B N P - 6 を用いる P C R 増幅のためのテンプレートとして用いた。

5' - AGTCCC ATCGAT GAGCAACCTCACTCTTGTTGTCATC
ATGCCGCCCTCAGCACTTTGC - 3' (配列番号383)

B N P-5は、B a m H I 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B N P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。B N P-6では、下線を引いた配列は、C l a I 部位であり、それに続くポリヌクレオチドは、B N P（太字）の最後の6個のアミノ酸および成熟H S Aタンパク質の初めの10個のアミノ酸をコードするD N Aの逆相補体を含む。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。アニール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テンプレートについて実験に基づいて決定される必要がある。

【1347】

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、BamHIおよびClaIフラグメントで消化した。ゲル電気泳動によりBamHIおよびClaIフラグメントをさらに精製した後、その産物を、BamHI/ClaIで消化したpC4: HSA中にクローニングし、構築物ID番号3618を生じた。発現構築物の配列を確認した。

【1348】

構築物ID番号3618の発現および精製
293F細胞における発現

当該技術分野で周知の方法により、構築物ID番号3618、pC4: SPCON、BNP1-32 (2×)/HSAを、293F細胞にトランスフェクションした（実施例6を参照のこと）。

【1349】

293F細胞上清からの精製

当該技術分野で周知の方法により、構築物ID番号3618によりコードされるpC4: SPCON、BNP1-32 (2×)/HSAを、実施例78、「203F細胞上清からの精製」と題する小項下で既に記載されるように、精製した。

【1350】

BNP (2×)-HSAの活性は、体外でNPR-A/cGMPアッセイを用いてアッセイすることができる。

構築物ID番号3618によりコードされるBNP (2×)-HSAの活性は、実施例78、「BNP-HSAの活性は、体外でNPR-A/cGMPアッセイを用いてアッセイすることができる」および「NPR-A 203F安定クローンのスクリーニング法」と題する小項下で既に記載されるように、NPR-A/cGMPアッセイを用いて、体外でアッセイすることができる。

結果

BNP (2×)-HSAおよび組換えBNPの用量反応関係を決定した（図7を参照のこと）。構築物ID番号3618および組換えBNPによりコードされるBNP (2×)-HSAの最大活性は、類似しており（それぞれ、 1.63 ± 0.021 、対して、 1.80 ± 0.016 pm）、それぞれ、 9.8 ± 1.1 、および 0.46 ± 1.1 nMのEC50値を有した。

【1351】

実施例80: BNPの体外でのNPR-A/cGMPアッセイ

バックグラウンドおよび方法:

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、したがって、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に変換する、NPR-Aグアニリルシクラーゼドメインにより介される。BNP活性のための簡便なアッセイは、NPR-Aを安定に過剰発現する293F細胞株のBNP刺激を測定することである。BNPに曝露した後の該細胞におけるcGMP産生を、cGMP ELISAにより測定することができる。

【1352】

NPR-A 293F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 (Invitrogen) 中に構築した。293F細胞は、リポフェクタミン法により安定にプラスミドDNAにトランスフェクションされ、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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。

10

20

30

40

50

【1353】

c G M P 活性化の測定

BNPによるc G M P活性化を、293F/NPR-A細胞にて行い、Catch Point 環状-GMP蛍光アッセイキット (Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA) により測定した。簡潔には、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、80 μ lの予備刺激緩衝液 (10 mMのグルコース、pH 7.4、15 nMの重炭酸ナトリウム、および0.75 mMの3-イソブチル-1-メチルキサンチンを加えたKrebs-Ringer 重炭酸塩緩衝液) 中で洗浄した。40 μ lの予備刺激緩衝液中のBNP-HSAまたは組換えBNPを、37°Cで10分間、細胞に加えた。細胞を、40 μ lの溶解緩衝液を用いて、10分間振盪しながら溶解した。溶解物中のc G M Pの量を、製造元の指示に従って定量した。EC50値を決定した。このアッセイでは、c G M Pレベルが高いほど、より低いシグナルをもたらす (相対蛍光単位またはRFU)。

10

【1354】

構築物ID番号3796の生成

構築物ID番号3796、pSAC35:HSA.BNP(1-32)は、酵母発現ベクターpSAC35中のBNPペプチド (アミノ酸1-32) の処理された成熟形態のN末端に融合される、HSAの処理された成熟形態が続く、HSA sp/KEK2リーダー配列を有するBNPアルブミン融合タンパク質をコードするDNAを含む (構築物3796については、表2の配列番号214を参照のこと)。

20

【1355】

構築物3796についてのBNP cDNAのクローニング

BNPをコードするポリヌクレオチドを、以下に記載される、プライマーBNP-102689およびBNP-102692を用いて、PCR増幅し、Bsu36I/AscIで切断し、Bsu36I/AscIで切断したpSAC-NECに連結し、構築物ID番号3796を得た。PCR増幅のテンプレートは、全成熟BNP(1-32配列)をコードするポリヌクレオチドであった。

【1356】

BNP、BNP-102689、およびBNP-102692の活性のある処理形態をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に適している2つのオリゴヌクレオチドを合成した。

30

BNP-102689: 5' - AAGCTG CCTTAGGC TTAAAGCCCCAAGATGGTGCAAGGGTC - 3' (配列番号378)

BNP-102692: 5' - GCACCG GGCGCGCC TTAAATGCGCGCTCAGCACTTTGCAGC - 3' (配列番号379)

【1357】

BNP-102689は、Bsu36Iクローニング部位 (下線)、HSAの最後の5個のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド (イタリック体)、およびBNPの初めの8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-102692では、下線を引いた配列は、AscI部位であり、それに続くポリヌクレオチドは、BNPの最後の8個のアミノ酸をコードするDNA (太字) および終止コドン (イタリック体) の逆相補体を含む。これらの2つのプライマーを用いて、HSA/BNPタンパク質をPCR増幅した。アニール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テンプレートについて実験に基づいて決定される必要がある。

40

【1358】

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、Bsu36IおよびAscIで消化した。ゲル電気泳動によりBsu36I/AscIフラグメントをさらに精製した後、その産物を、Bsu36I/AscIで消化させたpC4:HSAへクローニングし、構築物ID番号3796を生じた。発現構築物の配列を確認した。

50

【1359】

構築物ID3796の発現および精製

*S. cerevisiae*における発現

当該技術分野で周知の方法により、構築物ID番号3796、pSAC35:HSA.BNP(1-32)を、BXP10細胞にトランスフェクションした(実施例4を参照のこと)。

【1360】

BXP10細胞上清からの精製

約84時間後、培養物を、採取し、遠心分離および0.2μmフィルターに通して、細胞を浄化した。組換えタンパク質を、5mlのBlueセファロースファーストフローカラム(GE Healthcare)により捕捉され、塩化ナトリウムとオクタン酸ナトリウムの組み合わせにより溶出した。いくつかの調製物は、セラミックヒドロキシルアパタイトカラム(ceramic hydroxyl appetite column)(BioRad)にタンパク質を結合させ、リン酸塩の濃度の増加で溶出することにより完了した。他の調製物は、DEAEセファロースファーストフローカラム(GE Healthcare)に結合させ、塩化ナトリウムの直線的勾配により溶出した。次いで、溶出プールを、Qセファロース高速カラム(GE Healthcare)に結合させ、塩化ナトリウムの勾配を用いて溶出した。最終産物を濃縮し、接線フロー濾過(tangential flow filtration)により製剤緩衝液に交換した。

【1361】

構築物ID番号3959の生成およびクローニング

構築物ID番号3959、pSAC35:HSA.BNP(1-29)は、酵母発現ベクターpSAC35中の最後の3個のアミノ酸(S1-L29)が欠失するBNPペプチドの処理された成熟形態のN末端に融合される、HSAの処理された成熟形態が続く、HSA sp/KEX2リーダー配列を有するBNPアルブミン融合タンパク質をコードするDNAを含む(構築物3959については、表2の配列番号501を参照のこと)。

【1362】

BNPをコードするポリヌクレオチドは、以下に記載される、プライマーBNP-103801およびBNP-104315を用いて、PCR増幅し、Bsu36I/AscIで切断し、Bsu36I/AscIで切断したpSAC-NECに連結し、構築物ID番号3959を得た。PCR増幅のテンプレートは、プライマー構築物ID番号3796であった(下記参照)。

【1363】

BNP、BNP-103801、およびBNP-104315の活性のある処理形態をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に適している2つのオリゴヌクレオチドを合成した。

BNP-103801: 5'-

CAGGAGCC CCTTAGG CTTAAGCCCCAAGATGGTGCAAGGGTCT-3' (配列番号578)

BNP-104315: 5'-

CCTCACTC GGCGCGCC TTACAGCACTTTGCAGCCCCAGGCCACTGGA-3' (配列番号579)

【1364】

BNP-103801は、Bsu36Iクローニング部位(下線)、HSAの最後の5個のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド(イタリック体)、およびBNPの初めの8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-104315では、下線を引いた配列は、AscI部位であり、それに続くポリヌクレオチドは、BNPのS21からL29のアミノ酸をコードするDNA(太字)および終止コドン(イタリック体)の逆相補体を含む。これらの2つのプライマーを用いて、HSA/BNPタンパク質をPCR増幅した。アニールおよび伸長温度および回数は、それぞれの特定のプ

10

20

30

40

50

ライマー対およびテンプレートについて実験に基づいて決定される必要がある。

【1365】

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、Bsu36IおよびAscIで消化した。ゲル電気泳動によりBsu36I/AscIフラグメントをさらに精製した後、その産物を、Bsu36I/AscIで消化したpC4:HSAへクローニングし、構築物ID番号3959を生じた。発現構築物の配列を確認した。

【1366】

構築物ID3959の発現および精製

S. cerevisiaeにおける発現

当該技術分野で周知の方法により、構築物ID番号3959、pSAC35:HSA.BNP（S1-L29）を、BXP10細胞にトランスフェクションした（実施例4を参照のこと）。

【1367】

BXP10細胞上清からの精製

約84時間後、培養物を、採取し、遠心分離および0.2μmフィルターに通して、細胞を浄化した。組換えタンパク質を、5mlのBlueセファロースファーストフローカラム（GE Healthcare）により捕捉され、塩化ナトリウムとオクタン酸ナトリウムの組み合わせにより溶出した。いくつかの調製物は、セラミックヒドロキシルアパタイトカラム（ceramic hydroxyl appetite column）（BioRad）にタンパク質を結合させ、リン酸塩の濃度の増加で溶出することにより完了した。他の調製物は、DEAEセファロースファーストフローカラム（GE Healthcare）に結合させ、塩化ナトリウムの直線的勾配により溶出した。次いで、溶出プールを、Qセファロース高速カラム（GE Healthcare）に結合させ、塩化ナトリウムの勾配を用いて溶出した。最終産物を濃縮し、接線フロー濾過（tangential flow filtration）により製剤緩衝液に交換した。

【1368】

結果

HSA-BNP（1-29）およびHSA-BNP（1-32）および組換えBNPの用量反応関係を決定した（図10を参照のこと）。HSA-BNP（1-29）およびHSA-BNP（1-32）のEC50値は、組換えBNPのEC50値よりも数倍大きかった（それぞれ、467.9、45.06、および0.2227）。加えて、HSA-BNP（1-29）融合タンパク質は、HSA-BNP（1-32）融合タンパク質よりも10倍大きいEC50値を有した。

【1369】

実施例81：ANPおよびBNPの分解についての体外でのアッセイ

背景および方法：

ネプライシン（MME、CALLA、CD10、一般的な急性リンパ球白血病抗原、エンケファリナーゼ、EPN、NEP、中性エンドペプチダーゼ、または中性エンドペプチダーゼ24.11としても知られている）は、前立腺、腎臓、腸、子宮内膜、副腎、および肺が挙げられるが、これらに限定されない、多数の組織により発現される743個のアミノ酸（MW90,000～110,000kD）細胞表面メタロペプチダーゼである。ネプライシンは、疎水性残基のアミノ側を開裂することにより、ANP、BNP、CNP、サブスタンスP、ブラジキニン、オキシトシン、Leu-およびMet-エンケファリン、ニューロテンシン、ボンベシン、エンドセリン-1、ならびにボンベシン様ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない様々な生理活性ペプチドを不活性化する。

【1370】

ネプライシン加水分解に対する相対的感受性は、CNPに対して約4～5分間、ANPに対して8分間、およびBNPに対して2時間であると測定されている（Kenny, A. J. et al., Biochem J. 291(1):83-8(1993)）。

10

20

30

40

50

【1371】

ANPおよびBNPペプチドにおけるネブライシンの効果

ANPおよびBNPペプチドは、プロテアーゼネブライシンへの曝露を有する、または有しないCatchPoint cGMPアッセイ (Molecular Devices) の活性に対してアッセイされた。特に、5 μ MのANPまたはBNPを、10 nMネブライシン (R&D Systems) を有するまたは有しないMES緩衝液 (0.1 M 2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (Sigma)) 中で37℃で24時間インキュベートした。次いで、実施例80に記載されるように、NPR-Aで安定にトランスフェクトされている293F細胞を、様々な濃度のプロテアーゼ処理されたANPまたはBNPで刺激した。次いで、細胞溶解物は、実施例80に記載されるように、CatchPoint cGMPアッセイ (Molecular Devices) を用いて、cGMP活性化について分析した。

10

【1372】

結果

用量反応曲線は、ネブライシンを用いてインキュベーションを行う、または行わないBNPおよびANPについて計算した (図11Aを参照)。ネブライシンを用いてインキュベーションを行う、または行わないBNPは、それぞれ、0.2966および0.2702のEC50値を有する類似のBNP活性を示した。しかしながら、ネブライシンを用いたANPのインキュベーションは、未処置のANPと比較して、それぞれ、0.2965および60.47のEC50値を有するANP活性の有意な減少をもたらした。選択された試料は、当該技術分野で周知の技法を用いて、逆相HPLCによりさらに分析された。割合 (%) の比較は、ネブライシンの不在下で、同期間インキュベートされた試料に対して行う (図11Dを参照)。ANPタンパク質分解は、ネブライシンで処置してから20分以内に生じ、有意なBNPタンパク質分解は、ネブライシンを用いたインキュベーションから24時間後でさえ観察されなかった。

20

【1373】

ANPおよびBNP融合タンパク質におけるネブライシンの効果

ANPおよびANP-HSA (CID3484) を、10 nMネブライシン (R&D Systems) を有するまたは有しないMES緩衝液 (0.1 M 2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (Sigma)) 中で37℃で20分間、1時間、または24時間インキュベートした。次いで、実施例80に記載されるように、NPR-Aで安定にトランスフェクトされている293F細胞を、様々な濃度のプロテアーゼ処理されたANPまたはANP-HSAで刺激した。次いで、細胞溶解物は、実施例80に記載されるように、CatchPoint cGMPアッセイ (Molecular Devices) を用いて、cGMP活性化について分析した。

30

【1374】

結果

用量反応曲線は、ネブライシンでインキュベーションを行う、または行わないANPおよびANP-HSAについて計算した。(図11Bおよび11Cをそれぞれ参照のこと)。ANPペプチドは、ネブライシンで処置してから1時間以内に有意な活性の低下を示した。しかしながら、ANP-HSA (CID3484) は、ネブライシンで処置してから24時間後でさえ、有意な活性の低下を示さなかった。選択された試料は、当該技術分野で周知の技法を用いて、逆相HPLCによりさらに分析された。割合の比較は、ネブライシンの不在下で、同期間インキュベートされた試料に対して行う (図11Dを参照)。ANPタンパク質分解は、ネブライシンで処置してから20分以内に生じるが、ANP-HSA (CID3484) のタンパク質分解は、ネブライシンを用いたインキュベーションから24時間後でさえ観察されなかった。

40

【1375】

実施例82：遺伝子型1、インターフェロン未処置の慢性C型肝炎 (HCV) 患者におけるリバビリンと組み合わせた、HSA-IFN α 2bの抗ウイルス活性

50

背景：

遺伝子型 1、インターフェロン未処置（IFN-未処置）HCV 患者に対する従来の治療は、48 週間、リバビリン（RBV）と組み合わせて、インターフェロン α を利用する。しかしながら、この処置は、著しい実際的制限がある。現行のインターフェロン療法の公知の副作用に起因して、患者の生活の質は、インターフェロンの各投与後、大幅に低下する。現行のプロトコルは、少なくとも週に 1 度の投薬を必要とし、長期において生活の質の低下をもたらす。多くの患者は、結果として、処置を中止し、いくつかの研究では、50%を超える中止率を報告する。さらに、現行のインターフェロン療法はまた、相当な有意な血液学的低下率を有し、これは、血液学的数値が正常化するまで、RBV 用量の減量、またはさらに有意には、インターフェロンの治療レジメンの一時的な停止を必要とし得る。したがって、IFN 未処置の患者における遺伝子型 1 HCV の処置についての改善した治療用プロトコルの必要性は明らかである。

【1376】

論理的根拠：

HSA-IFN α 2b は、その C 末端にて、成熟アルブミンを遺伝的に融合することにより、成熟インターフェロン α -2b の N 末端に生成された。RBV と組み合わせた HSA-IFN α 2b による処置の安全性および有効性は、遺伝子型 1、IFN 未処置の HCV ヒト患者における能動的に制御された臨床研究において、評価され、能動的制御として、RBV と組み合わせた PEG-IFN α -2a（PEG-IFN）による従来の処置と比較された。

【1377】

方法

遺伝子型 1、IFN 未処置であるヒト HCV 患者は、HSA-IFN α 2b、あるいはリバビリン（RBV）と組み合わせて、能動的制御である PEG-IFN のいずれかにより処置された。さらに具体的には、458 人のヒト被験者は、4 つの皮下（sc）処置群：（a）1 週間ごとに 1 回、180 μ g で PEG-IFN の投与（Q1w）、（b）2 週間ごとに 1 回、900 μ g で HSA-IFN α 2B の投与（Q2w）、（c）1200 μ g で HSA-IFN α 2b の投与 Q2w、または（d）4 週間ごとに 1 回、1200 μ g で HSA-IFN α 2b の投与（Q4w）に、ランダム化された。

【1378】

各処置群の各被験者はまた、体重に基づいて 1000~1200 mg/日の RBV を与えられた。層別の基準は、ボディーマス指数（BMI）（ $< 25 \text{ kg/m}^2$ または $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ）および HCV RNA 滴定濃度（ < 800 , 000 IU/mL または ≥ 800 , 000 IU/mL ）を含んだ。

【1379】

研究の処置継続期間は、24 週間のフォローアップを伴い 48 週間である。研究の一次有効エンドポイントは、持続性ウイルス学的著効（SVR）である。

【1380】

HCV RNA 滴定濃度は、43 IU~6900 万 IU/mL の感度範囲（定量のレベル（LOQ））および 10 IU/mL の検出のレベル（LOD）がある、リアルタイム PCR アッセイ、Quantascore（商標）（Labcorp）を用いて測定された。アラントランスフェラーゼ（ALT）および血液学的影響（絶対好中球数（ANC）、ヘモグロビン、および血小板数を含む）は、当該技術分野で周知の標準的な技法を用いて測定された。

【1381】

包括解析（ITT）患者は、該患者が、いずれかのデータを欠落している、または研究から脱落しているかどうかにかかわらず、各処置群のすべてのランダム化および処置された被験者として定義される。修正包括解析（MITT）患者は、研究における登録日に基づいて 24 週間の訪問を行い得る患者として定義される。

【1382】

10

20

30

40

50

結果および考察：

被験者のプロフィール、抗ウイルス反応、および血液学的減少を、表10（予備の中間解析）および表11（最終の中間解析）にまとめる。全体的に、すべての4つの処置プロトコルは、良好な耐容性を示し、3～4級の実験値に関して処置群間で有意な差異がない、または有害事象に起因して、中止されることはなかった。

【1383】

【表9-1】

表10 層、抗ウイルス反応、および血液学的影響の予備の中間解析

	PEG-IFN 180 μg Q1w(n=114)	HSA-IFNα2b 1200μg Q2w (n=110)	HSA-IFNα2b 900μg Q2w (n=118)	HSA-IFNα2b 1200μg Q4w (n=116)
プロフィール				
男性	58%	58%	55%	67%
平均BMI(kg/m ²)	25.1	25.7	25.4	26.1
・BMI≥25kg/m ²	53%	49%	49%	51%
HCV RNAの中央値(log IU/ml)	6.0	6.0	6.1	6.1
・RNA≥800,000IU/ml	62%	55%	56%	62%
12週目での有効性				
HCV RNA陰性(<LOQ)	70/112 (62.5%) [†]	77/104 (74.0%) [†]	74/112 (66.1%)	57/109 (52.3%)*
・BMI<25kg/m ² 対 ≥25kg/m ²	71.1% 対 54.2%	74.1% 対 74.0%	70.7% 対 61.1%	55.6% 対 49.1%
EVR12(≥2log減少)	96/112 (85.7%)	91/104 (87.5%)	90/112 (80.4%)	80/109 (73.4%)
第2の相勾配>0.6log/週	49%	58%	52%	42%
ALTの正規化	12/73 (16.4%)	17/80 (21.2%)	18.81 (22.2%)	27/83 (32.5%) [#]

【1384】

【表 9 - 2】

表 10 層、抗ウイルス反応、および血液学的影響の予備の中間解析

	PEG-IFN 180 μg Q1w(n=114)	HSA-IFNα2b 1200μg Q2 w (n=110)	HSA-IFNα2b 900μg Q2w (n=118)	HSA-IFNα2b 1200μg Q4w (n=116)
12週目での研究室				
ANC<750/mm ³	17.5%	20.0%	22.0%	4.3%**
ANC<500/mm ³	2.6%	3.6%	3.4%	0.9%
Hb<12g/dL	64%	70.0%	69.5%	49.1%**
血小板<50,000/ mm ³	3.5%	2.7%	1.7%	0.9%

* p 値 < 0.05 HSA-IFNα2b 1200 μg Q2w 対 Q4w、[†]p 値 0.068 HSA-IFNα2b 1200 μg Q2w 対 PEG-IFN; # p 値 < 0.05 HSA-IFNα2b 1200 μg Q4w 対 PEG-IFN; ** p 値 < 0.05 HSA-IFNα2b 1200 μg Q4w 対 すべての他の群

10

20

【1385】

【表 10 - 1】

表 1 1 層、抗ウイルス反応、および血液学的影響の最終の中間解析

	PEG-IFN 180 μg Q1w(n=114)	HSA-IFNα2b 1200μg Q2 w (n=110)	HSA-IFNα2b 900μg Q2w (n=118)	HSA-IFNα2b 1200 μg Q4w (n=116)
プロフィール 男性	58%	58%	56%	67%
平均BMI(kg/m ²)	25.1	25.7	25.6	26.0
・BMI≥25kg/m ²	50%	48%	51%	50%
HCV RNAの中 央値(log IU/ml)	6.1	6.0	6.1	6.1
・RNA≥800,000I U/ml	62%	55%	56%	62%
12週目のITTの 有効性				
HCV RNA 負(< LOQ)	75/114 (65.8%) [¶]	82/110 (74.5%) [¶]	82/118 (69.5%)	62/116 (53.4%)*
・BMI<25kg/m ² 対 ≥25kg/m ²	71.9% 対 59. 6%	77.2% 対 71. 7%	74.1% 対 65. 0%	56.9% 対 50. 0%
EVR12(≥2 log 減少)	101/114 (88.6 %)	99/110 (90.0 %)	99/118 (83.9 %)	88/116 (75.9 %)
第2の相勾配>0 .6 log/週	49%	58%	52%	42%
ALTの正規化	11/73 (15.1%)	17/79 (21.5%)	17/80 (21.3%)	26/83 (31.3%) [#]

10

20

30

【1386】

【表 10-2】

表 11 層、抗ウイルス反応、および血液学的影響の最終の中間解析

	PEG-IFN 180 μg Q1w(n=114)	HSA-IFNα2b 1200μg Q2 w (n=110)	HSA-IFNα2b 900μg Q2w (n=118)	HSA-IFNα2b 1200 μg Q4w (n=116)
20週目のITTの有効性 HCV RNA <LOD(検出せず)	77/114 (67.5%)	82/110 (74.5%)	83/118 (70.3%)	70/116 (60.3%)
24週目でのMITTの有効性 HCV RNA<LOD(検出せず)	57/90 (63.3%)	64/91 (70.3%)	58/87 (66.7%)	58/83 (69.9%)
12週目での研究室 ANC<750/mm ³ ANC<500/mm ³ Hb<12g/dL 血小板<50,000/mm ³	20.2% 3.5% 65% 3.5%	21.8% 3.6% 74% 2.7%	22.0% 3.4% 70% 1.7%	6.0%** 1.7% 52%** 0.9%

* p 値 < 0.05 HSA-IFNα2b 1200 μg Q2w 対 Q4w、[†] p 値 0.15 HSA-IFNα2b 1200 μg Q2w 対 PEG-IFN；[#] p 値 < 0.05 HSA-IFNα2b 1200 μg Q4w 対 PEG-IFN；** p 値 < 0.05 HSA-IFNα2b 1200 μg Q4w 対 すべての他の群

【1387】

SVRの抗ウイルス反応の予測

SVRの抗ウイルス反応の予測因子は、第2の相勾配 > 0.6 log/週（第2の勾配）による12週目の処置にて、負のHCV RNA 滴定濃度（すなわち、HCV RNA 滴定濃度 < LOQ を有する）として定義された。抗ウイルス反応曲線勾配の相は、2つの活性の指標となる。第1の相は、反応の直接的な抗ウイルス活性を示す。第2の相は、処置された化合物によりHCV感染細胞の破壊を予測する。したがって、> 0.6 log/週にて、第2の相勾配の値は、SVRの良好な予測因子（陽性適中率（PPV）> 90%）である。

【1388】

12週目のITTにて、SVRの抗ウイルス反応の予測因子は、PEG-IFN対照処置において、75/114被験者または65.8%（（最終の中間解析）（70/112または62.5%（予備の中間解析）））および49%と比較する場合、82/110被験者または74.5%（（最終の中間解析）（77/104または74.0%（予備の中間解析）））が、HCV RNAの負のレベル（すなわち、LOQを下回るレベル（< 43 IU/mL））を有し、58%が、第2の相勾配 > 0.6 log/週を示す、HSA-IFNα2b 1200 μg Q2w処置群において、最大であった。これらのデータは、HSA-IFNα2b 1200 μg Q2w処置プロトコルが、12週目にて、PEG-IFNによる従来の処置に少なくとも相当する抗ウイルス活性を有することを示す。HSA-IFNα2b 1200 μg Q2w処置プロトコルにおいて、12週目にて、RNA否定性（すなわち、LOQを下回るHCV RNA 滴定濃度レベルを有する患者数

）が、PEG-IFN対照処置と比較して、約9%（最終の中間解析）、および12%（予備の中間解析）多く、第2の相勾配は、約9%（最終および予備の中間解析の両方に対して）多いため、HSA-IFN α 2b 1200 μ g Q2w処置プロトコルは、従来のPEG-IFN処置を超える優勢な有効性をもたらし得る可能性がある。HSA-IFN α 2b 900 μ g Q2wおよびHSA-IFN α 2b 1200 μ g Q4w処置群において、HCV RNA陰性を有する患者数は、PEG-IFNによる従来の処置に類似していた。

【1389】

20週目および24週目にて、SVRの抗ウイルス反応の予測因子は、検出のレベル（LOD）を下回るHCV RNA滴定濃度（すなわち、 $<10\text{ IU/mL}$ ）を有する被験者として示される。20週目にて、SVRの抗ウイルス反応の予測因子は、PEG-IFN対照処置において、77/114または67.5%（最終の中間解析）と比較する場合、82/110被験者または74.5%（最終の中間解析）が、検出できないHCV RNAレベル（すなわち、 $<10\text{ IU/mL}$ ）を有し、HSA-IFN α 2b 1200 μ g Q2w処置群において、最大であった。同様に、24週目にて、SVRの抗ウイルス反応の予測因子は、PEG-IFN対照処置が、検出できないHCV RNAレベルを有する57/90または63.3%であったのに対し、64/91または70.3%（最終の中間解析）が、検出できないHCV RNAレベルを有する場合、IFN α 2b 1200 μ g Q2w処置群において、最大であった。20週目および24週目のデータの両方は、HSA-IFN α 2b 1200 μ g Q2w処置プロトコルが、改善された投薬スケジュールを伴うPEG-IFNによる従来の処置に少なくとも相当する抗ウイルス活性および安全性を有することを示す。

【1390】

ALTレベルの正常化

患者における肝機能の一般的な測定は、アラニントランスフェラーゼのレベル（ALT）である。HCVに感染した患者の顕著な特徴のうちの1つは、肝臓損傷の指標である高い血清ALTレベルである。したがって、ALTレベルの正常化は、肝機能の改善に対応し、処置を受けて有利な予後を有する。すべての処置プロトコルは、ALTレベルを正常化するいくつかの能力を示すが、最も劇的効果は、HSA-BFN α 2b 1200 μ g Q4w処置プロトコルにおいて観察され、PEG-IFNによる従来の処置と比較して

、2倍を超える患者（最終および予備の中間解析）が、正常化ALTレベルを達成した。したがって、1200 μ g、Q4wで投与されたHSA-IFN α 2bは、驚くことに、遺伝子型1、IFN未処置のHCV患者において、肝機能を正常化する際、従来のPEG-IFNよりもさらに有効である。

【1391】

血液学的効果

併用療法のプロトコルにおける遵守の確保およびIFNおよびRBVの全用量への曝露は、SVR率の最大化にとって重要である。

【1392】

血液学的減少は、IFNおよびRBVによる従来の処置中、一般的である。RBV誘導される溶血に起因してヘモグロビン（Hb）の減少は、RBVの減量を必要とする。特に、 $\text{Hb} < 12\text{ g/dL}$ は、1000~1200mg/日から800mg/日のRBVの減少を必要とする。RBV用量は、HCVの再発を予防するために重要である。HSA-IFN α 2b 1200 μ g Q4W処置プロトコルは、驚くことに、 $\text{Hb} < 12\text{ g/dL}$ （PEG-IFNに対して、52%対65%（最終の中間解析）；PEG-IFNに対して、49.1対64%（予備の中間解析））の有意に少ない減少であった。これは、HSA-IFN α 2b 1200 μ g Q4W処置プロトコルを有するより低い再発率に変換し得、改善されたSVRを可能にする。

【1393】

ANC $<750/\text{mm}^3$ の減少は、併用療法のIFN成分を軽減する用量を必要とする

。驚くことに、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 4 W 処置プロトコルは、P E G - I F N (6 % 対 2 0 . 2 %、それぞれ (最終の中間解析) ; 4 . 3 % 対 1 7 . 5 % (予備の中間解析)) と比較して、有意に少ない A N C < 7 5 0 / m m ³ を有していた。これはまた、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 4 W 処置プロトコルと共に必要とされる少ない減量と考えると、より高い S V E 率に変換し得る。

【 1 3 9 4 】

同様に、血液学的減少は、1 2 週目にて、H S A - I F N α 2 b Q 2 w および P E G - I F N 処置群にわたって生じた。しかしながら、驚くことに、1 2 週目にて、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 4 w 処置群に観察された血液学的減少は、P E G - I F N 処置群において観察されるものよりも約 7 5 % 低かった。これらの結果は、H S A - I F N α 2 b Q 4 w が、従来の P E G - I F N 処置と比較して、優れた安全プロファイルおよび改善された再発率を提供し得ることを示す。

10

【 1 3 9 5 】

結論

1 2 週目にて、遺伝子型 1、I F N 未処置の H C V における最大の最大抗ウイルス活性が、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 2 w 処置群において観察された。血液学的減少における類似の影響はまた、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 2 w および P E G - I F N 処置群において観察された。さらに、2 0 週目および 2 4 週目にて、最大抗ウイルス活性はまた、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 2 w 処置群において観察された。同等の抗ウイルス活性は、2 0 週目および 2 4 週目にて、H S A - I F N α 2 b 9 0 0 μ g Q 2 w 処置群において、継続して観察された。したがって、H S A - I F N α 2 b 9 0 0 μ g Q 2 w は、改善された投薬スケジュールと共に、現行の標準治療である P E G - I F N に対して少なくとも同等の有効性および安全性を提供し、患者に対してより簡便さを生み出し得る。したがって、1 2 0 0 μ g Q 2 w は、可能な優勢な有効性および改善された投薬スケジュールと共に、現行の標準治療である P E G - I F N に対して少なくとも同等の安全性のプロファイルを提供し、患者に対してより簡便さを生み出し得る。

20

【 1 3 9 6 】

驚くことに、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 4 w プロトコルにより処置は、被験者が、投薬スケジュールに起因して、3 回の追加の用量を得た P E G - I F N の従来の処置を受けたにもかかわらず、従来の P E G - I F N 処置と比較して、1 2 週目にて、相当する有効性を示した。従来の P E G - I F N 処置と比較して、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 4 w の相当する有効性は、2 0 週目から 2 4 週目まで継続した。肝機能を安定させ、血液学的因子の減少を劇的に軽減する改善された能力はまた、これらの患者において、1 2 週目にて、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 4 w 処置群で観察され、肝臓損傷の改善および減量または一時的な停止の発生率の減少、ならびに処置後の再発の可能性を示す。したがって、これらの結果は、H S A - I F N α 2 b 1 2 0 0 μ g Q 4 w による処置が、改善された投薬スケジュール、肝機能を正常化するより優れた能力、およびより低い血液学的減少の利点を有する、P E G - I F N による併用療法に相当する有効性を提供し得、患者に対するより大きな遵守および簡便さ、および治療後のより良好な転帰の利点をもたらすことを示唆する。要約すれば、H C V 治療の分野における最近の利点を考えると、H S A - I F N α 2 b Q 4 W 処置プロトコルは、理想的な特性 (例えば、同等の有効性、優勢な耐性、より大きなコンプライアンスをもたらす優勢な簡便さ) を有し、インターフェロン抗ウイルス併用療法に対する好みのインターフェロン骨格になり得る。

30

40

【 1 3 9 7 】

総合すれば、これらの結果は、遺伝子型 1、I F N 未処置の H C V 患者への H S A - I F N α 2 b および R B V による併用療法は、改善された投薬スケジュールの利点を有する、従来の P E G - I F N および R B V の併用療法による処置と少なくとも同じくらい有効であることを示唆する。特に、これらの結果は、R B V と組み合わせた H S A - I F N α

50

2bによる処置が、類似の安全性プロファイルを有する優勢な有効性、あるいは優勢な安全性プロファイルを有する類似の有効性のいずれか、またはRBVを用いるが、従来のPEG-IFN併用療法と比較して、改善され、非常に有益な投薬スケジュールを用いる、優勢な有効性および安全性プロファイルの両方を有し得ることを示唆する。

【1398】

実施例83：リバビリンと組み合わせた、HSA-IFNα2bに対して非応答患者の慢性C型肝炎（HCV）への応答

背景

米国において400万人を超える人々が、C型肝炎（HCV）に感染し、米国において、このウイルスが肝臓疾患の最も一般的な原因となっている。抗ウイルス分子、リバビリン（RBV）の同時処置を伴う、または伴わない、インターフェロンアルファ（IFNα）は、患者に対して最も有効な処置として、歴史的に認識されている。さらに最近では、インターフェロンアルファのペグ化された形態は、RBVと組み合わせたHCVの処置として認可されている。これらのペグ化されたインターフェロンは、標準的なインターフェロンまたはリバビリン療法と組み合わせたインターフェロンよりもHCVを処理する場合、さらに有効であることが示され、HCVの従来の処置になっている。

【1399】

しかしながら、この処置は、著しい実際の制限がある。治療中、患者の生活の質を大幅に低下する公知の副作用および従来の治療に関連する考慮すべき有意な血液学的減少率に加えて、この従来の治療は、HCVの現行の処置を行なっている患者の大部分に有効ではない。IFNα-RBV療法を以前受けていないHCV患者の治療の臨床的研究は、従来の治療を開始する約45%の患者は、HCVを取り除き、慢性的に感染したままである（例えば、非応答者）ことを示している。このグループでは、治療に応答する患者の割合は、相当少ない。

【1400】

臨床研究者は、IFNαによる前処置、またはペグ化されたIFNαおよびRBVの従来の治療法を用いて、これらの患者を再度処置することにより、RBVと組み合わせた、応答しなかったHCV患者の非応答者の集団の必要性に応答している。Shiffman et al., "Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment," Gastroenterology 126(4):1015-23(2004)を参照のこと。この試験に登録した35%の患者が、従来の治療による再処置から20週間後に、HCV RNAの証拠がなかったが、これらの患者の多くは、処置が中止された後に再発した。したがって、わずか18%の患者が、実際には、持続性ウイルス学的著効（SVR）を達成し、HCVを治癒した。同様に、従来のペグ化IFNα療法による前処置が行えなかった非応答患者が、別のペグ化IFNαにより再処置された場合、これらの患者のうちのわずか約5~10%が、事例の証拠に基づいてSVRを達成することができた。したがって、1つのインターフェロン療法が行えなかっただけでなく、すべての現行のインターフェロン療法が行えなかった患者の集団が、著しく増加し続けている。したがって、一般に、HCVの処置のみでなく、インターフェロン療法により前に処置されたことがある（例えば、IFNα処置が施された）患者および非応答者、特に、処置するのが最も難しいこれらの非応答患者（例えば、前処置、または現行の従来の医療による再処置が行えなかった患者）に対する治療のための代替的な療法のために、改善された治療用プロトコルの明確な必要性がある。

【1401】

論理的根拠

HSA-IFNα2bは、そのC末端にて、成熟アルブミンを遺伝的に融合することにより、成熟インターフェロンα-2bのN末端に生成された。RBVと組み合わせたHSA-IFNα2bによる処置の安全性、耐性、および有効性は、IFNα処置が施された

、非応答のHCVヒト患者におけるランダム化された、非盲検臨床研究において、評価された。この研究の目的のために、非応答者とは、HCV RNAレベルにおいて2ログの減少を達成できなかったため、12週目にて前の治療を中止したHCV患者（例えば、早期ウイルス反応、12週目もしくはEVR12）、あるいは処置プロトコルが完了した後、SVRを達成できなかった患者のいずれかとして定義された。治療を中止した後、再発した患者は、研究から除外された。加えて、研究における少なくとも50%の患者は、ペグ化されたIFN α 処置プロトコルが成功しなかった。

【1402】

方法

以前に少なくとも1つのIFN α 処置プロトコルが成功しかったヒトIFN α 処置が施された、非応答のHCV患者は、3つの皮下（sc）のHSA-IFN α 2b処置群にランダム化された。（a）900 μ g、2週間ごとに1回（Q2w）、（b）1200 μ g、Q2w、および（c）1200 μ g、4週間ごとに1回（Q4w）。各処置群の各被験者はまた、1000～1200mg/日のRBVを与えられた。これらの初期の3つのコホートからの安全データを評価した後、HSA-IFN α 2bは、1000～1200mg/日のRBVと組み合わせた、1500 μ g Q2w、あるいは、1800 μ g Q2wのいずれかで、HSA-IFN α 2bを施された2つの追加のコホートの継続的な追加と共に用量を漸増した。

【1403】

研究の処置継続期間は、24週間のフォローアップを含めて48週間である。研究の一次有効エンドポイントは、持続性ウイルス学的著効（SVR）である。

【1404】

HCV RNA滴定濃度は、10IU～1億IU/mLの感度範囲がある、リアルタイムPCRアッセイ、Quantascore（商標）（Labcorp）を用いて測定された。アラントランスフェラーゼ（ALT）および血液学的影響（絶対好中球数（ANC）、ヘモグロビン、および血小板数を含む）は、当該技術分野で周知の標準的な技法を用いて測定された。

【1405】

結果および考察

プロフィール

多くのプロフィール特性は、処置に対して非応答である有病率を有する患者の個々の指標として役に立つことが確認されている。非応答性のこれらの重要な前処置の予測因子は、（1）遺伝子型1、（2）HCV RNAレベルの高い基線の中央値、（3）PEG+RBV療法に対して非応答である前、（4）アフリカ系アメリカ人、（5）F3-F4の進行性の線維レベル（METAVIR（登録商標）分類を用いて）、および（6）高いBMI（例えば、>25mg/kg）を含む。恐らく、非応答性の最も良好な全体的な指標は、PEG-RBV処置が前回できなかったものであって、前のIFNベースのレジメンができなかった数を背景とする。

【1406】

被験者のプロフィールを、表12に要約する。全体的に、すべての被験者のプロフィールは、すべての処置群において類似する。対象の大部分は、1つ以上のIFN α を含有するレジメンに曝露され、前にPEG+RBVによる治療法ができなかった。加えて、基準の疾患特性は、5つの処置群で同等であり、1800 μ g Q2w処置群は、有意に高い前処置HCV RNAおよび事前のPEG+RBVの失敗の最も高い割合を有した。したがって、1800 μ g Q2w処置群における被験者は、最も処置し難い患者の集団を示した。

【1407】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 1 2. プロフィールおよび基準の特性

	900μg Q 2w N= 23	1200μg Q2w N=24	1200 μg Q4w N=24	1500μg Q2w N=22	1800μg Q2w N=22	P値
遺伝子型 1	20 (87.0%)	24 (100%)	22 (91.7%)	21 (95.5%)	21 (95.5%)	0.4531
HCV RNAの 中央値(log ₁₀ I U/mL)	7.1	6.6	6.2	7.0	7.6	<0.0001
PEG+RBV	14 (60.9%)	16 (66.7%)	15 (62.5%)	16 (72.2%)	20 (90.9%)	0.137
アフリカ系 アメリカ人	2 (8.7%)	3 (12.5 %)	1 (4.2%)	7 (31.8 %)	2 (9.1%)	0.0940
F3-F4	7 (30.4 %)	7 (29.2 %)	4 (16.7 %)	9 (40.9 %)	7 (31.8 %)	0.5012
BMI≥25kg/m2	20 (87.0 %)	21 (87.5 %)	18 (75.0 %)	18 (81.8 %)	17 (77.3 %)	0.7637

10

20

【1 4 0 8】

有効性および生物学的活性

処置の持続時間にわたり前処置レベルからのHCV RNAの減少を、遺伝子型 1、PEG+RBVの非応答者、最も処置し難いHCV患者の集団について表 1 3 に示す。2～12週目にて、HCV RNAの減少の大きさは、900～1500 μg の処置群で同等であった。しかしながら、最大のウイルス量の減少が、1800 μg 処置群において観察された。これは、本処置群における前処置HCV RNAの最高レベルおよびPEG+RBVの不成功を考慮に入れると、驚くべきことであった。治療法の開始から12週間にわたって抗ウイルス応答の大きさは、ウイルス動態の第2の相勾配を反映し、SVRの正の予測因子である。

30

【1 4 0 9】

図 1 2 に示されるように、HCV RNA減少の勾配は、12週目にて、遺伝子型 1、PEG+RBVの非応答者における900～1500 μg 処置群では同等である。驚くことに、HCV RNA減少の大きさは、1800 μg 処置群で最大である。1500および1800 μg 処置群でのHCV RNAの減少は、24週目にて、患者のこの副集団の中で同等である。

【1 4 1 0】

24週目にて、HCV RNA陰性である被験者の割合は、900～1500 μg 処置群において同等であった。被験者は、治験者の判断により有効性の欠如のため、24週目にて、中止させ、インターフェロンベースのレジメンからの所定の累積データは、EVR 1 2 の欠如およびSVRの24週目のRNA陰性の高い負の予測価値を示す。全体的な処置終了時の応答（ETR、48週目にて、HCV陰性）は、900～1200 μg 処置群に対して30%（22/73）であった。したがって、12週目（例えば、EVR 1 2）または24週目にて、HCV RNA陰性になった被験者の高い割合が、ETRを達成した。加えて、被験者の大部分（13/22）は、処置から48週間後の12週目の追跡治療にて、HCV RNA陰性であった。これは、HSA-IFNα2b/RBVにより処置された後、潜在的なSVRが18%であることを示す。

40

【1 4 1 1】

要約すれば、これらのデータは、IFNα処置が施された、高率のPEG+RBVの失

50

敗を伴う非応答HCV患者のRBVと組み合わせた、900～1200 μ gのHSA-I
FN α 2bによる処置は、強力な、同等の抗ウイルス活性をもたらす。低ウイルスブレイ
クスルー（例えば、HCV RNAが検出できないが、その後2つ以上の時点にて、陽性
になる）および再発率はまた、この処置抵抗性の非応答集団において観察された。加えて
、有意に大きな減少はまた、治療を開始してから12週目に1800 μ g処置群において
観察され、リバビリンと組み合わせて、HSA-I FN α 2bを用いて、この用量にて処
置された患者は、SVR率の有意な増加を有し得ることを示した。

【1412】

【表12】

表13 GT1およびPEG+RBVの非応答者についての抗ウイルス反応

	900 μ g Q2 w N=12	1200 μ g Q2 w N=16	1200 μ g Q4 w N=13	1500 μ g Q2 w N=15	1800 μ g Q2 w N=19
<u>12週目</u>					
EVR12 ^a	5 (41.7%)	4 (25%)	3 (23.1%)	5 (33.3)	12 (63.2%)
95% C.I. ^b	(15.1%、72 .3%)	(7.3%、52. 4%)	(7.2%、52. 4%)	(11.8%、61 .6%)	(38.4%、83 .7%)
<u>24週目</u>					
検出できな いHCV RNA	2 (16.7%)	3 (18.8%)	2 (15.4%)	4 (26.7%)	6 (31.6%)
95% C.I. ^b	(2.1%、48. 4%)	(4.0%、45. 6%)	(1.9%、45. 4%)	(7.8%、55. 1%)	(12.6%、56 .6%)
<u>48週目</u>					
ETR ^a	3 (25%)	3 (18.8%)	2 (15.4%)		
95% C.I. ^b	(5.5%、57. 2%)	(4.0%、45. 6%)	(1.9%、45. 4%)		

^a検出できないHCV RNAまたは $\geq$ HCV RNAの2ログ減少として定義される

^b正確な95%信頼区間

【1413】

血液学的影響

併用療法のプロトコルにおける遵守の確保およびIFNおよびRBVの全用量への曝露
は、SVR率の最大化にとって重要である。

【1414】

血液学的減少は、IFNおよびRBVによる従来の処置中、一般的である。RBV用量
は、HCVの再発を予防するために重要である。しかしながら、RBV誘導される溶血に
起因して、ヘモグロビン(Hb)および血小板(PLT)数の減少は、RBVの減量を必要
とする。絶対好中球数(ANC) < 750/mm³の減少は、併用療法のIFN成分を
軽減する用量を必要とする。

【1415】

一部のANCおよびPLTの減少が観察されたが、これらの減少は、すべてのQ2w処
置群で同等であり、4週から8週目でプラトーに到達した。同様に、基準からのHbの減
少は、12週目を過ぎるまで、すべてのQ2w処置群(1800 μ g処置群を含む)で同
等であった。血液学的数値の減少は、Q4w処置群において少なかった。全体的に、有害

10

20

30

40

50

事象の制御のために用量を減少された被験者は、12/115であった。HSA-IFN α 2bのほとんどの減量は、処置プロトコルで概説されるように、ANCの減少に起因した。Q2w処置群の間で、用量反応は観察されなかった。したがって、高投与量の処置群において観察された減量の必要性の増大はなかった。

【1416】

要約すれば、RBVと組み合わせたHSA-IFN α 2bの処置を用いて観測された血液学的数値の減少はあったが、これらの減少は、処置群にわたって同等であり、RBVと組み合わせた、900~1800 μ gのHSA-IFN α 2bにより処置するIFN α 処置が施された、非応答HCV患者の間で、安全性において有意な差異はないことを示した。

10

【1417】

結論

総合すれば、これらの結果は、HSA-IFN α 2bおよびRBVによる処置は、SVRを達成するのに有効であり得、したがって、IFN α 処置が施された、非応答HCV患者の（PEG+RBV処置プロトコルを前にできなかったこれらの患者を含む）かなりの割合において、HCVを根絶することを示唆する。特に、これらの結果は、RBVと組み合わせたHSA-IFN α 2bの900~1200 μ gによる処置が、PEG+RBVが前回できなかった後でさえ、SVRを達成する18%の患者をもたらし得ることを示唆する。さらに、1800 μ g処置群は、24週目にて、最も処置し難い患者の集団において、HCV RNA陰性率を示し、この処置は、これらの患者に対して、さらに高いSVR率をもたらし得ることを示した。加えて、安全性プロファイルは、HSA-IFN α 2bのすべての処置群に類似であった。さらに、これらの結果は、HSA-IFN α 2bが、2週間から4週間ごとに有効に投与され得、改善された投薬スケジュールを提供することを示す。したがって、これらの結果は、RBVを組み合わせたHSA-IFN α 2bの処置が、インターフェロンをベースとする治療ができない患者、特に、当該技術分野で現在不足している従来のペグ化インターフェロン-RBV療法ができなかった患者のために、非常に有益かつ改善された投薬スケジュールを伴う代替的な有効かつ安全な処置を提供することを示す。

20

【1418】

実施例84．遺伝子型2または3、インターフェロン未処置の慢性C型肝炎（HCV）患者におけるリバビリンと組み合わせたHSA-IFN α 2bの抗ウイルス活性背景

30

世界中で、C型肝炎（HCV）に感染した人は1億7000万人以上であり、このウイルスは、著しい公衆衛生上の憂慮事項として、明らかになり、急速に、世界中で肝臓疾患の最も一般的な病因となった。急性HCV感染は、通常、自覚症状がなく、早期診断が難しい。実際には、HCV感染は、慢性状態になる傾向があり、その中で、急性感染のうちの約70%が持続的となる。したがって、新しい感染の発生率は、減少しているが、HCV感染の有病率は、近い将来、一定のままであることが予測される。

【1419】

抗ウイルス分子、リバビリン（RBV）の同時処置を伴う、または伴わない、インターフェロンアルファ（IFN α ）は、慢性C型肝炎（CHC）に罹患する患者に対して最も有効な処置として、歴史的に認識されている。さらに最近では、インターフェロンアルファのペグ化された形態は、RBVと組み合わせたHCVの処置として認可されている。これらのペグ化されたインターフェロンは、標準的なインターフェロンまたはリバビリン療法と組み合わせたインターフェロンよりもHCVを処理する場合、さらに有効であることが示され、HCVの従来の処置になっている。

40

【1420】

現在推奨される治療に対する全体的な持続するウイルス学的著効（SVR）は、CHC患者において大きく異なり、ウイルスおよび宿主の特徴、特に、ウイルス遺伝子型に依存する。例えば、SVR率は、さらに一般的な遺伝子型1を有する患者において、約42~

50

46%の範囲である。一方、あまり一般的でない遺伝子型2または3を有する患者は、76～80%のSVR率が認められる。加えて、遺伝子型1の患者よりも処置が難しくないと考えられる遺伝子型2または3の患者は、低用量のリバビリンを用いて、より短い治療期間で処置することができる。

【1421】

24週間、続いて、24週間のフォローアップ期間の、RBVと組み合わせたペグ化インターフェロンの遺伝子型2または3に対する現在推奨される治療は、SVRを達成するかなりの割合の患者をもたらすが、この処置プロトコルは、未だに、IFNに基づく治療に共通である大きな実用上の制限を有する。特に、現在推奨される治療は、各投与後、患者の生活の質を大幅に低下する副作用により悩まされている。したがって、遺伝子型2または3のHCVに感染する患者により有効かつより良好な耐性を示す新しい処置レジメンが継続的に必要である。

10

【1422】

論理的根拠

HSA-IFN α 2bは、そのC末端にて、成熟アルブミンを遺伝的に融合することにより、成熟インターフェロン α -2bのN末端に生成された。RBVと組み合わせたHSA-IFN α 2bによる処置の安全性および有効性は、遺伝子型2または3のIFN未処置のCHCヒト患者におけるランダム化された、多中心の非盲検臨床研究において、評価された。

【1423】

方法

遺伝子型2あるいは3のいずれかのIFN未処置であった43人のヒトHCV患者は、2つの皮下(sc)のHSA-IFN α 2b処置群にランダム化された。(a)1500 μ g、2週間ごとに1回(Q2w)または(2)1500 μ g、4週間ごとに1回(Q4w)。各処置群の各被験者はまた、800mg/日のRBVを与えられた。階層化の第1の基準は、遺伝子型(2または3)およびHCV RNA(<800,000IU/mLまたは>800,000IU/mL)を含んだ。

20

【1424】

研究の処置継続期間は、24週間のフォローアップを伴い24週間である。一次有効エンドポイントは、持続性ウイルス学的著効(SVR)である。

30

【1425】

HCV RNA滴定濃度は、43IU～6900万IU/mLの感度範囲(定量限界(LOQ))がある、リアルタイムPCRアッセイ、Quantasure(商標)(Labcorp)を用いて測定された。インスリン耐性は、ホメオスタシス評価モデル(HOMA)を用いて評価された。

【1426】

包括解析(ITT)患者は、該患者が、いずれかの欠測点を有する、または研究から脱落しているかどうかにかかわらず、各処置群のすべてのランダム化および処置された被験者として定義される。修正包括解析(MITT)患者は、研究における登録日に基づいて12週間の訪問を行い得る患者として定義される。

40

【1427】

結果および考察

4週目および12週目にて、被験者プロフィールおよび抗ウイルス反応を、表14にまとめる。全体的に、HSA-IFN α 2bは、両方の処置群において、良好な耐容性を示した。

【1428】

【表 1 3】

表 1 4. プロフィールおよび抗ウイルス反応

	HSA-IFN α 2b 1500 μ g Q2w (N=21)	HSA-IFN α 2b 1500 μ g Q4w (N=21)
プロフィール		
男性の割合 (%)	71.4%	68.2%
HCV RNA $\geq$ 800,000の割合 (%)	71.4%	59.1%
平均HOMAの前処置	2.2	2.5
4週目(<LOQ) ITT	16/21 (76.2%)	15/22 (68.2%)
遺伝子型2	8/10	6/10
遺伝子型3	8/11	9/12
12週目(<LOQ) MITT	14/17 (82.4%)	16/18 (88.9%)
遺伝子型2	7/9	9/9
遺伝子型3	7/8	7/9

ITT＝包括解析；MITT＝修正包括解析（12週目の訪問に適格な被験者）

【1 4 2 9】

HCV RNAの減少の大きさおよびHCV RNA<LOQを有する遺伝子型2または3の患者の割合は、HSA-IFN α 2b Q2wおよびHSA-IFN α 2b Q4w処置群のにわたって同等であった。4週目にて、HCV RNA<LOQを有する遺伝子型2または3の患者の割合は、1500 μ g Q2wにおいて、76.2%であり、1500 μ g Q4w処置群において、68.2%であった。12週目にて、両方の処置群において、遺伝子型2または3の患者の高い割合が、HCV RNA<LOQ（1500 Q2wにおいて、82.4%および1500 Q4wにおいて、88.9%）であった。

【1 4 3 0】

したがって、これらの結果は、Q2wあるいはQ4w週目のいずれかにて、1500 μ g HSA-IFN α 2bにより遺伝子型2または3のCHC患者の処置が、協力的な抗ウイルス反応率をもたらすことを示す。さらに、HSA-IFN α 2b 1500 μ g Q4wプロトコルによる処置は、遺伝子型2または3の患者において、HSA-IFN α 2b 1500 μ g Q2wプロトコルによる処置と同等の有効性を示した。したがって、これらの結果は、Q2wあるいはQ4wのいずれかにて、HSA-IFN α 2b 1500 μ gによる処置が、大いに改善された投薬スケジュールの利点を伴い、HCV遺伝子型2または3に感染した患者に対する現在推奨される治療と少なくとも同じくらい有効であり、優れた耐容性および患者に対する簡便さを潜在的にもたらすことを示唆する。

【1 4 3 1】

実施例 8 5. リバビリン患者と組み合わせた、HSA-IFN α 2bで処置された遺伝子型1，インターフェロン未処置の慢性C型肝炎（HCV）患者の生活の質（QOL）背景

先述の通り、リバビリン（RBV）と組み合わせてペグ化インターフェロン α を用いた、遺伝子型1、インターフェロン未処置（IFN未処置）のHCV患者に対する48週間の従来の処置は、著しい実用上の制限がある。現在推奨されたインターフェロン療法の公知の副作用に起因して、患者の生活の質は、インターフェロンの各投与後、大幅に低下す

る。現行のプロトコルは、少なくとも週に1度の投薬を必要とし、処置に起因して、長期において生活の質の低下および障害日数の増加をもたらす。多くの患者は、結果として、処置を中止し、いくつかの研究では、50%を超える中止率を報告する。したがって、現行の標準治療と比較して、生活の質に対する改善された影響がある、IFN未処置の患者における遺伝子型1 HCVの処置についての改善した治療用プロトコルの必要性は明らかである。

【1432】

論理的根拠

RBVと組み合わせたHSA-IFN α 2bによる処置の安全性および有効性は、遺伝子型1、IFN未処置のHCVヒト患者における能動的に制御された臨床研究において、評価され、実施例82に記載されるように、能動的制御として、RBVと組み合わせたPEG-IFN α -2a (PEG-IFN) による従来の処置と比較された。治療を始めてから12週間、RBVと組み合わせたHSA-IFN α 2bによる処置のQOLおよび障害日数（例えば、欠勤日数）における効果は、RBVと組み合わせたPEG-IFNと比較された。

10

【1433】

方法

458人のヒト、遺伝子型1のHCV患者は、ランダム化され、実施例82に記載されるように、処置された。SF-36v2（登録商標）測定モデル（Quality Metric, Lincoln, RI）により決定されるQOLおよび障害日数は、前処理、処置から4週目および12週目にて、評価された。具体的には、8つのSF-36v2ドメインを評価した。身体機能（PF）、身体に関する日常役割機能（RP）、体の痛み（BP）、全身的健康感（GH）、活力（VT）、社会生活機能（SF）、日常役割機能（RE）、および心の健康（MH）。初めの4つのドメイン（PF、RP、BP、およびGH）は、身体的健康度に対応し、残りの4つのドメイン（VT、SF、RE、およびMH）は、QOLモデルの精神的健康度に対応する。

20

【1434】

8つのSF-36v2ドメインの変換された（素）点、ならびに正規化ベースの身体的健康度（PCS）のスコアおよび精神的健康度（MCS）のスコアを、処置してから12週間にわたり評価した。

30

結果および考察

【1435】

【表 1 4】

表 1 5. 生活の質の測定

	PEG-IFN 180μg Qw (n=114)	HSA-IFNα2 b 900μg Q2w (n=118)	HSA-IFNα2 b 1200μg Q2 w (n=110)	HSA-IFNα2 b 1200μg Q4 w (n=116)
SF-36ドメイン(MCID)	SF-36 QOLパラメータにおける基準から12週目までの平均の変化(悪化)			
PCS(2.6)	-8.0	-5.6*	-6.5	-6.0
身体機能(5)	-18	-14	-16	-13
体の痛み(4)	-21	-11* [#]	-14 [#]	-15 [#]
MCS(2.7)	-6.3	-3.6* [#]	-4.9	-5.0
活力(4.2)	-19	-13* [#]	-17	-16
心の健康(4)	-11	-4* [#]	-7 [#]	-4* [#]
社会生活機能(6)	-20	-10* [#]	-15	-19
4週目での欠勤	評価の時点で、被験者が前月において仕事を欠勤した日数			
欠勤した平均日数	4	1*	3	3
≥3日	21/63 (33%)	5/66 (8%)*	17/61 (28%)	15/62 (24%)
≥7日	14/63 (22%)	3/66 (5%)*	8/61 (13%)	7/62 (11%)
12週目での欠勤				
欠勤した平均日数	4	1*	3	3
≥3日	21/69 (30%)	7/70 (10%)*	13/59 (22%)	17/72 (24%)
≥7日	12/69 (17%)	3/70 (4%)*	7/59 (12%)	8/72 (11%)

* p 値 < 0.05 対 Peg-IFN; # は、(MCID) 最小限の臨床的に重要な差異を超える。

【1 4 3 6】

12週目にて、900μg HSA-IFNα2b Q2wを受けている患者のQOLは、PEG-IFNに対して、すべての測定について改善され、MCSおよびPCS、ならびに8つの個人ドメインのうちの5つにおいて、統計的に有意性を達成した。1200μg Q2wおよび1200μg Q4w HSA-IFNα2bの処置群において、QOLの悪化は、体の痛みおよび心の健康の両方に観察された臨床的に有意な差異と共に、実質的にすべての測定において、PEG-IFNに対して減少した。

【1 4 3 7】

全体的には、HSA-IFNα2b処置群のいずれにおける遺伝子型1 HCV患者も、PEG-IFN処置群における遺伝子型1 HCV患者よりも、それらのHCV感染およびそれに続く治療に起因して、欠勤した日数が少なかった。特に、900μg HSA-IFNα2b Q2wを受けている患者は、MDWが75%少なく、1200μg HSA-IFNα2b Q2wまたは1200μg HSA-IFNα2b Q4wを受けている患者は、PEG-IFNを受けている患者よりもMDWが25%少なかった。

【1 4 3 8】

実施例82に示されるHSA-IFNα2bの抗ウイルス活性と共に総合すれば、これ

らの結果は、H S A－I F N α 2 b および R B V による遺伝子型 1、I F N 未処置の H C V 患者の併用療法は、改善された投薬スケジュールおよび改善された Q O L の利点を伴って、従来の P E G－I F N および R B V の併用療法による処置と少なくとも同じくらい有効であることを示唆する。特に、これらの結果は、R B V と組み合わせた H S A－I F N α 2 b による処置が、R B V との P E G－I F N 併用療法によって得られるものよりも、Q O L の兆候の悪化の減少およびより少ない欠勤日数を患者にもたらすことにより、従来の R B V との P E G－I F N 併用療法における改善され、非常に有益な処置プロトコルを提供し得ることを示唆する。

【1439】

実施例 86. 正常なブタモデルにおける H S A－B N P（構築物 I D 番号 3959）による c G M P の生体内誘導

論理的根拠

腎機能および血管緊張の修正等の細胞効果を調節する脳（B 型）ナトリウム利尿ペプチド（B N P）の能力は、当該技術分野で公知である。B N P の活性は、そのグアニル酸シクラーゼであるナトリウム利尿受容体 A（N P R－A）への結合、およびそれに続く、その活性化に依存する。B N P による N P R－A の活性化は、例えば、E L I S A 等の当該技術分野で周知のアッセイにより測定され得る細胞内 c G M P レベルの上昇をもたらす。生体内での c G M P の産生を誘発する H S A－B N P（C I D 3959）の能力が、正常なブタモデルにおいて試験された。

【1440】

方法

H S A－B N P（C I D 3959）は、B N P（アミノ酸 1～29）の C 末端の切断型の N 末端に、成熟アルブミンを C 末端にて遺伝的に融合することにより、生成された。

【1441】

正常な血圧の健全ブタ（n = 4～6 / 群）は、単一ボーラスの 5 m g / k g の H S A－B N P（C I D 3959）または 0 時間で製剤ビヒクルのみを投与された。血清および尿は、注射してから 1、8、16、24、48、および 72 時間後に採取された。採取された血清および尿中の c G M P レベルは、市販の E L I S A（M o l e c u l a r D y n a m i c s）により測定された。

【1442】

結果

5 m g / k g の H S A－B N P（C I D 3959）の単一 I V ボーラスは、I V 投与されてから 1 時間後、血清（図 13A）および尿（図 13B）の両方の c G M P レベルの有意な上昇をもたらした。C G M P レベルは、血清中で 24 時間で基準レベルまで、および尿中で 48～72 時間で徐々に低下した。

【1443】

実施例 87. 心不全の生体内ペーシングモデルにおける B N P－H S A 融合構築物のナトリウム利尿活性

背景

うっ血性心不全（C H F）におけるナトリウム利尿を促進するために外因性 B N P の投与が利用されている。しかしながら、最近の研究は、B N P 投与は、腎機能に悪影響を及ぼし得ることを示唆している。H S A－B N P（C I D 3959）の腎臓または左室（L V）における効果は、生体内での重度の C H F ブタモデルにおいて評価された。驚くことに、この研究の結果は、B N P 投与とは異なり、H S A－B N P（C I D 3959）の急性注入は、左室または腎機能に悪影響を及ぼすことなく、ナトリウム利尿を誘発することができることを示す。

【1444】

方法

H S A－B N P（C I D 3959）は、B N P（アミノ酸 1～29）の C 末端の切断型の N 末端に、C 末端にて成熟アルブミンを遺伝的に融合することにより、生成された。

10

20

30

40

50

【1445】

CHFは、240bpmで、3週間、慢性的にペーシングすることにより18頭のブタに誘導された。8頭のブタは、参照対照としての役割を果たした。以下の基準特性は、参照対照と比較して、CHFと共に有意に減少した。基準値測定は、当該技術分野で周知の技法を用いて行なわれた。

【1446】

【表15】

表16. CHF誘発されたブタ対参照対照ブタにおける基準値の測定

	CHF誘発されたブタ	対照ブタ
心エコー検査法(LVFS)による左室短縮率(%)	21 ± 2	32 ± 2
マイクロフェア(RenFlow)を用いた腎血管の血流量(mL/分/g)	1.73 ± 0.09	2.23 ± 0.26
ナトリウムクリアランス(Na_{CL}) (mL/分)	0.43 ± 0.11	4.35 ± 2.45
ナトリウムの分画排出率(FE_{Na})(%)	0.25 ± 0.07	0.80 ± 0.32

10

【1447】

基準値測定の後、心不全の兆候（例えば、短縮率のその後の減少と共に生じるLV拡張）がある動物を、この研究のためにランダム化した。動物は、麻酔をかけ（ $n = 10$ /群）、ビヒクル、2mg/kgのHSA-BNP（CID3959）あるいは6mg/kgのHSA-BNP（CID3959）IVのいずれかで投与され、4時間監視した。心エコー検査法により、拡張末期径を測定した。

20

【1448】

結果および考察

HSA-BNP（CID3959）の用量は共に、心拍数、平均動脈圧、左室収縮末期圧、平均肺動脈圧、左室ピーク圧、ピーク正值dp/dt、または心拍出量（データは図示せず）においても有意な効果がなかった。冠状動脈血流量の変化は、HSA-BNP（CID3959）の用量のいずれを注入した動物においても見られなかった（データは図示せず）。加えて、6mg/kgのHSA-BNP（CID3959）を動物に注入することは、注入してから30分後、クレアチニンのクリアランスおよび分画ナトリウム排出の増加をもたらしたが、いずれも基準値を超える統計的有意性に達しなかった（データは図示せず）。同様に、6mg/kgのHSA-BNP（CID3959）の注入は、ビヒクルと比較して、血清レニン活性およびエンドセリンの血漿レベルの非有意な減少をもたらした（データは図示せず）。

30

【1449】

ビヒクルにおけるナトリウムクリアランスの有意な増加（注入してから30分後、 $492 \pm 281\%$ および注入してから60分後、 $950 \pm 483\%$ ）が、6mg/kgのHSA-BNP（CID3959）を注入した動物に見られた。さらに、ペーシングにより生じる拡張末期径の変化は、ビヒクル（図14A）と比較して、HSA-BNP（CID3959）のいずれかの投薬後、有意に減少した。さらに、ペーシングにより生じる左室短縮率の変化は、ビヒクル（図14B）に対して有意である2mg/kgのHSA-BNP（CID3959）の投薬により生じる減少を伴い、ビヒクルと比較して、HSA-BNP（CID3959）のいずれかの投薬後、減少した。

40

【1450】

したがって、総合すれば、これらの結果は、HSA-BNP（CID3959）の急性注入が、生体内のCHFモデルにおいて、左室または腎機能に悪影響を及ぼすことなく、ナトリウム利尿を誘発することができることを示す。

50

【1451】

実施例88. 麻酔状態の正常なイヌの心腎臓機能におけるHSA-BNP（構築物ID番号3959）の効果

論理的根拠

腎機能および血管緊張の変更を調節する脳（B型）ナトリウム利尿ペプチド（BNP）の能力は、当該技術分野で公知である。心腎臓機能におけるBNPの効果の研究するための特に有用なモデルは、イヌである。したがって、血行動態、腎臓、およびホルモン効果を含むHSA-BNP（CID3959）の心腎臓の効果の広範な評価が、麻酔状態の正常なイヌモデルにおいて行われた。

【1452】

方法

HSA-BNP（CID3959）は、BNP（アミノ酸1～29）のC末端の切断型のN末端に、C末端にて成熟アルブミンを遺伝的に融合することにより、生成された。

【1453】

心腎臓機能の血行動態、腎臓、およびホルモン効果が、この研究において評価された。具体的に、血行動態パラメータは、心拍出量、平均動脈圧、肺毛細血管楔入圧、および平均肺動脈圧の測定を含んだ。腎臓パラメータは、尿流量、ナトリウム排出、糸球体濾過量（GFR）、および腎血流量の測定を含んだ。ホルモンパラメータは、血漿cGMP、レニン、アンジオテンシンII、アルドステロン、および尿cGMPの測定を含んだ。

【1454】

正常で健全な雑種イヌ（ $n = 8$ / 群）は、研究を開始する5日前、一定のナトリウム食を与えられた。急性実験を行う前夜に、動物は、空腹とし、尿細管機能の評価のために、300mgの炭酸リチウムを与えられた。急性実験を行う日に、イヌは、ペントバルビタールナトリウム（15mg/kg）をIVを介して麻酔をかけ、挿管し、酸素補給と共に人工呼吸器を装着した。

【1455】

流動方向性（flow-directed）のバルーンが先端に付いた熱希釈カテーテルを、心臓血行動態の測定のために外頸静脈を介して肺動脈に入れた。大腿動脈に、血圧モニタリング、血液採取、ならびにイヌリンおよび生理食塩水の注入のためにカニユーレを挿入した。左腎の尿管に、採尿のためにカニユーレを挿入した。目盛付きの電磁流量プローブを、腎動脈周辺に置き、腎血流量（RBF）を測定した。

【1456】

急性実験の日に、イヌには、0.5mg/kgあるいは5mg/kg（ $n = 8$ / 群）のいずれかにて、HSA-BNP（CID3959）の単一IVボラスを投与した。心腎臓機能における効果を、4.5時間監視した。

【1457】

測定された心血管パラメータは、平均動脈圧（MAP）、腎動脈圧（RAP）、肺動脈圧（PAP）、心拍出量（CO）、および肺毛細血管楔入圧（PCWP）を含んだ。COは、熱希釈により判定された。MAPは、大腿動脈カテーテルからの直接測定を介して評価された。GFRは、イヌリンクリアランスにより測定された。

【1458】

心血管血行動態は、各クリアランスの開始時に測定された。動脈血を、ヘパリンおよびEDTA管中に採取し、各クリアランスの途中で、氷上に直ちに置いた。2,500rpm、4℃にて、遠心分離した後、血漿をデカントし、分析するまで-20℃で貯蔵した。尿量、電解質、およびイヌリンの評価のために、各クリアランスの全期間中、氷上で採尿した。cGMP分析のための採尿は、貯蔵する前に、90℃以上に加熱した。

【1459】

結果および考察

血行動態の効果

【1460】

図15A～Hは、基線の読み取りと比較して、注入してから4.5時間にわたり、血行動態性能における、0.5mg/kg（図15A、C、E、およびG）または5mg/kg（図15B、D、F、およびH）で投与されたHSA-BNP（CID3959）の効果を示す。血行動態パラメータは、HSA-BNP（CID3959）のIVボラス前の基線、および注入してから30、60、90、150、210、および270分後に測定した。

【1461】

HSA-BNP（CID3959）の血行動態の効果は、4.5時間の観察期間にわたり維持された。0.5および5mg/kgの両方のHSA-BNP（CID3959）のIVボラスは、肺毛細血管楔入圧（PCWP）の統計的に有意かつ持続的な減少をもたらした（図15EおよびF）。これらの2つの用量でのPCWPの減少の大きさには、有意な差異はなかった。

10

【1462】

HSA-BNP（CID3959）の効果は、肺動脈圧（PAP）（図15GおよびH）ならびに平均動脈圧（MAP）（図15CおよびD）に対して用量依存的であった。PAPの有意な減少は、動物が5mg/kgで投薬された場合（図15H）、観察された。同様に、MAPにおける有意な効果は、5mg/kg処置群において、注入してから270分後に観察された（図15D）。

【1463】

腎臓の効果

20

【1464】

図16A～Hは、基準の読み取りと比較して、注入してから4.5時間にわたり、腎臓の出力量および血流量における、0.5mg/kg（図16A、C、E、およびG）または5mg/kg（図16B、D、F、およびH）で投与されたHSA-BNP（CID3959）の効果を示す。腎臓性能パラメータは、HSA-BNP（CID3959）のIVボラス前の基線、および注入してから30、60、90、150、210、および270分後に測定した。

【1465】

HSA-BNP（CID3959）の投与は、腎機能における有意な効果をもたらした。腎血流量（図16EおよびF）、利尿（図16AおよびB）、ナトリウム利尿（図CおよびD）の有意な上昇は、0.5および5mg/kgの両方のHSA-BNP（CID3959）にて観察された。増加したGFRの用量依存的な動向もまた、明らかであった（図16GおよびH）。

30

【1466】

腎臓パラメータにおけるHSA-BNP（CID3959）の最大効果までの時間は、血行動態の効果と比較して、若干遅延する傾向があった。加えて、ナトリウム利尿および利尿の増加の大きさは、0.5mg/kg処置群よりも5mg/kg処置群が有意に高かった。

【1467】

ホルモン効果

40

【1468】

図17A～Fは、基線の読み取りと比較して、注入してから4.5時間にわたる、RAASホルモンにおける、0.5mg/kg（図17A、C、およびE）、または5mg/kg（図17B、D、およびF）で投与されたHSA-BNP（CID3959）の効果を示す。血漿アルドステロン、レニン、およびアンジオテンシンIIレベルは、HSA-BNP（CID3959）のIVボラス前の基線、および30、60、90、150、210、および270分後に測定した。

【1469】

0.5および5mg/kgの両方のHSA-BNP（CID3959）のIVボラスによる投与は、注入してから4.5時間の観察期間中、レニン、アンジオテンシン、およ

50

びアルドステロンレベルの減少をもたらした。アルドステロンレベルにおける効果は、270分間の研究を通して、有意かつ持続的であった。レニンおよびアンジオテンシンⅠⅠにおける効果は、HSA-BNP (CID3959) の両方の用量で投与してから30分から90分間有意であったが、観察期間の終わりに回復した。

【1470】

結論

この研究は、HSA-BNP (CID3959) が、非融合BNPとして類似の薬理学的な方法において作用することを示す。0.5および5mg/kgで、HSA-BNP (CID3959) の単一IVボラスの投与は、BNPの長時間型として、その作用と一致する多数の心腎臓パラメータの用量依存的で、有意な、持続敵的な変化をもたらした。特に、HSA-BNP (CID3959) の投与は、5mg/kg用量で、血漿および尿cGMPレベルの増加、PCWPおよびPAPの減少、ナトリウム利尿、利尿、腎血流量および糸球体濾過量の増加、血漿、アルドステロン、レニンおよびアンジオテンシンⅠⅠの減少、ならびにMAPのわずかな減少をもたらした。レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の成分における異なった効果は、いくぶん予想外であり、HSA-BNP (CID3959) の好ましい特性であり得る。

【1471】

全体として見ると、これらの結果は、体血圧の実質的な望ましくない減少がなく、心腎臓機能を改善する用量で投与され得ることを示唆する。

【1472】

実施例89. 遠隔計測されたビーグルにおけるHSA-BNP (構築物ID番号3959) の効果

論理的根拠

血管緊張を調節する脳(B型)ナトリウム利尿ペプチド(BNP)の能力は、当該技術分野で公知である。血圧を含む心血管機能におけるBNPの効果を研究するための特に有用なモデルは、イヌである。したがって、収縮期および平均動脈圧ならびに心拍数を含む心血管機能におけるHSA-BNP (CID3959) の静脈内(IV)投与の効果が、意識のある正常なビーグルにおいて評価された。さらに、HSA-BNP (CID3959) の皮下(SC)投与の有効性および反応時間もまた、評価された。

【1473】

方法

健全なビーグル(n=4/群)は、全身動脈血圧、心拍数、およびECGデータ収集能力を有する、Data Sciences International社製の無線遠隔送信機を外科的に埋め込んだ。埋め込んだ後、イヌは、単一IVボラスの0.1、0.5、もしくは5mg/kgのHSA-BNP (CID3959) またはビヒクルのいずれかを受けた。

【1474】

ECGパラメータおよび全身血圧の連続的記録は、注入してから48時間監視された。イヌは、断続的なモニタリングと共に、さらに9日間(総時間=11日間)、継続された。

【1475】

全身血圧におけるHSA-BNP (CID3959) の皮下投与の有効性および反応時間を、HSA-BNP (CID3959) のSC投与の投与(10mg/kg)に対する非融合BNP(0.02mg/kg)のIVボラスの投与の効果と比較することにより評価した。

【1476】

結果および考察

収縮期および平均動脈圧におけるHSA-BNP (CID3959) の効果

【1477】

図18A~Cは、覚醒中のイヌの収縮期および平均動脈圧におけるHSA-BNP (C

10

20

30

40

50

I D 3 9 5 9) の単一 I V ボーラスの効果を示す。5 m g / k g の H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) の投与は、約 1 6 時間でピーク効果を有する全身血圧の漸減および 4 8 時間までに基準値への回帰をもたらした。約 1 5 m m H g の全身血圧の持続的な減少は、薬物投与してから 8 時間後に開始し、投与してから 2 0 時間まで継続することが明らかであった。

【1 4 7 8】

H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) の投与は、同一の観察期間にわたる拡張期血圧または心拍数における明らかな効果は何もなかった（データは図示せず）。

【1 4 7 9】

H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) の低用量（例えば、0. 5 および 0. 1 m g / k g ）は、血圧あるいは心拍数のいずれかにおける明らかな効果はなかった。加えて、H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) のいずれの用量でも、観察された E C G パラメータにおける処置に関連した変化はなかった。

【1 4 8 0】

S C 投与された H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) に対する I V 投与された非融合 B N P ペプチドの比較

【1 4 8 1】

図 1 9 A および B は、H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) の S C 注射と比較して、正常で健全なビーグルの全身血圧における非融合 B N P の I V ボーラスの効果を示す。H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) および非融合 B N P の両方は、健常ビーグルの全身血圧を減少した。非融合 B N P の効果は、約 3 0 分で最大となり、数時間以内に基準値に戻った。対照的に、H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) の効果は、S C 投与してから約 1 0 時間で明らかであり、約 4 0 時間で最大に達し、注射してから 4 8 から 7 2 時間後に基準値に戻った。血圧における H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) の遅発性効果は、その緩慢な吸収と一致する（イヌにおける T m a x ~ 3 6 時間）。H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) の長期効果は、その長半減期と一致する（イヌにおける 7 2 時間）。

【1 4 8 2】

全体として見ると、これらの結果は、H S A - B N P (C I D 3 9 5 9) が、全身血圧における効果なしに、心腎臓機能を改善する十分に低い用量で、心不全患者に投与され得ることを示唆する。

【1 4 8 3】

実施例 9 0. コカインによる崩壊および解毒のための B C h E アルブミン融合物の使用

この実験の目的は、コカインによる崩壊および解毒におけるアルブミン B c h E 融合物の効果を判定することである。

【1 4 8 4】

A. アルブミン B c h E 融合物：A l b u - C o c H の構築および精製

ヒト B C h E (C 末端の、四量化ドメインの最後の 4 5 のアミノ酸を欠失する) の変異の、c 末端の切断型が、H S A (g i : 2 8 5 9 2) の成熟形態の N 末端に融合された。図 2 0 (本実施例において、「A l b u - C o c H」と称する)。シグナルペプチドコンセンサス配列 (図 2 0 のアミノ酸 1 ~ 2 3) はまた、融合物の B c h E 部分の N 末端に融合された。融合物における成熟 B c h E タンパク質の初めのアミノ酸は、未処理の、全長 B C h E タンパク質の E 2 9 に対応する。融合物の B c h E 部分の変異は、以下の通りである (アミノ酸の位置は、未処理の、全長 B c h E に関連する)。A 2 2 7 S、S 3 1 5 G、A 3 5 6 W、Y 3 6 0 G (図 2 0 の太字、下線を引いたアミノ酸)。融合物の H S A 部分は、図 2 0 のアミノ酸 5 5 3 で始まる。

【1 4 8 5】

単量体タンパク質を、チャイニーズハムスター卵巣細胞に発現し、ブルーアフィニティーおよびイオン交換クロマトグラフィーを用いて、ほぼ均一に精製した。タンパク質の純度は、N 末端のシーケンシング、高性能のサイズ排除クロマトグラフィー、および活性部位滴定に基づいて、9 5 % を超えるものとして評価された。

【1486】

B. 物質および方法

1. 動物

動物は、IACUCプロトコルA9306 (Mayo Clinic) および0410 A64760 (University of Minnesota) 下で、米国実験動物管理評価認定協会により正式認可を受けた施設において、実験動物の世話の原理 (Principles of Laboratory Animal Care) (National Research Council, 2003) に従い取扱われた。Wistarラットは、Harlan Sprague-Dawley (Madison WI) から入手した。メス (合計20匹、研究開始にて体重約225 g) を、行動実験に使用した。オス (94匹、体重250~300 g) を、他の実験に使用した。

10

【1487】

行動研究室に到着時に、ラットを、プラスチック製のケージにペア飼育し、少なくとも3日で、馴化させた。初めに、すべてのラットは、餌 (Purina Laboratory Chow, Purina Mills, Minneapolis, MN) と水を自由に摂取させた。実験中、毎日、午後3時に16 gの餌を与え、自由に餌を摂取した年齢に合わせた対照の体重の85%に維持した。室内照明は、午前6時から午後6時までとした。温度 (24℃) および湿度を、狭い範囲内に維持した。運動研究のためのラットは、試験する手順を除いてはペア飼育を続けた (午前9時~9時30分で活動、午後1時~3時で餌強化)。強化のために、タスクラットは、オペラント箱 (operant chamber) に永久的に移された (行動装置を参照のこと)。

20

【1488】

2. 薬物、試薬、および酵素

薬物を、0.9% NaCl (生理食塩水) 中で調製した。コカインHClは、Mallinckrodt (St. Louis MO) から得た。Other drugs including 硫酸アトロピン、ケタミン、硫酸アンフェタミン、フルオロリン酸ジイソプロピル (DFP)、およびペントバルビタールナトリウムを含む他の薬物は、Sigma Aldrich (St. Louis) から得た。酵素の各バッチは、異なる量の不可逆阻害剤、DFPを用いた24時間のインキュベーションに続いて、残留放射能の判定 (Sun et al., 2002a) により滴定された。

30

【1489】

3. 血漿および組織試料の放射アッセイ

血液 (100~300 μ l) を、尾静脈または大腿動脈からヘパリン処置された管に採取し、遠心分離し (8,000 gで10分間)、血漿を得た。脳および心臓を、0.5% Tween-20を用いて、10容量の10mM リン酸ナトリウム、pH7.4にて、均質化し、上記のように遠心分離した。50 μ lの上清のアリコート中のコカイン加水分解酵素を、 ^{3} Hコカイン (18 μ M、基質反応速度を除く) を用いて30分間インキュベートし、遊離した ^{3} H-安息香酸を測定することによりアッセイした (Brimijoin et al., (2002) Analytical Biochemistry 309:200-205)。

40

【1490】

薬物代謝を評価するために、ペントバルビタール麻酔状態のラット (45 mg/kg、腹腔内) に、 ^{3} Hコカイン (3.5 mg/kg、30 μ Ci、静脈内) を与えた。30秒から2時間で、血液 (約150 μ l) を、BchEおよびカルボキシエステラーゼを阻害するために加えたDFP (10 μ l、 10^{-2} M) を用いて、大腿動脈から管に採取した。血漿試料を、同日後ほど、アッセイのために液体窒素上で凍結した。100 mlの等張NaClに加えてDFP、 10^{-5} Mを用いて大動脈灌流した後凍結させた脳および心臓を、その後、同一の阻害剤を用いて、リン酸塩Tween緩衝液中で均質化した。コカイン (1 mlの0.2 N HClを用いて酸性化) または安息香酸 (300 μ lの1 M Na₂CO₃を用いてアルカリ化) の判定のためのアリコートを、シンチレーション計数の

50

ためにトルエンに直接抽出した。

【1491】

4. 血圧の記録

血圧の連続的なモニタリングのために、ラットを、ウレタン（1.45 g/kg、腹腔内）で麻酔をかけた。滅菌したPE-50カニュレを、その後、1つの大腿動脈中に入れ、目盛付き圧力トランスジューサー（Gould TA240）に接続した。体温を、太陽灯により維持した。動物は、薬物投与する30分前、固定した。

【1492】

5. コカインの過剰摂取の毒性

ラットは、30~1000 mg/kgのコカインを腹腔内投与された。100 mg/kgを用いた曝露は、非保護動物において、定期的に致死が認められた。死は、本研究のエンドポイントではなく、代わりに、重度の毒性の指標として、発作を用いた。一連のケージの脇での観察は、姿勢、歩行、運動活性、肢なめ、頭を上下させる動き、立毛、および呼吸困難を書き留めた。痙攣の発症を記録した。ラットは、60秒間に1回、または2分以内に2回、痙攣した場合、安楽死させた（ペントバルビタールナトリウム、250 mg/kg 腹腔内）。

【1493】

6. 行動装置

オペラント箱を、ステンレス鋼またはプレキシグラスの交互のパネルおよび鋼グリッド床を備える、特注の8角形のユニットであった。それらは、それらの上に刺激光を有する2つの反応レバー、天井灯、餌ペレットディスペンサー、および外側に取り付けられた水ボトルを含んだ。タイゴン（Tygon）チューブは、試験室を取り囲んだ木製の囲いの外側に取り付けられた注射器ポンプにケージの上部でテザーおよびスイベルに接続された。データ収集および実験プログラミングは、MED-PCソフトウェア（Med Associates, St. Albans, VT）により制御された。

【1494】

既に述べたように（Perry et al., (2005) Psychopharmacology (Berl) 178:193-201）、運動用のトラックは、直径71 cmの円形のステンレス鋼であった。それは、0°、90°、180°、および270°で内周囲に4つの赤外線センサーが装備され、VersaMaxプログラム可能な論理制御器（IC200UDR001, GE Fanuc Automation, Charlottesville, VA）に接続された。

【1495】

7. コカインの自己投与のための外科的調製

ケタミン（60 mg/kg）およびキシラジン（10 mg/kg）を用いた麻酔下で、呼吸を促進するアトロピン（0.15 ml）およびドキサプラム（5 mg/kg）を用いて、15匹のラットは、15 cmのシリラスティック（silastic）カテーテル（0.51 mm 皮内、0.94 mm 過剰摂取；Helix Medical Inc., Carpinteria, CA）を埋め込まれた。一端から3ないし3.5 cmの人工シリコンエラストマーの2つのビーズを備えたカテーテル（MDX4-4210; Factor II, Inc. Lakeside, AZ）を、右頸静脈に導入し、無菌絹縫合により固定した。遊離端を、内側の切開出口および肩甲骨まで尾側1 cmのところに導いた。ヘパリン（10 IU/kg 静脈投与）およびゲントマイシン（gentomycin）（12.0 mg/kg、静脈投与）を、凝固を防ぐために3日間投与した。

【1496】

8. 行動訓練および回復

カテーテルを挿入したラットは、定率1回（FR1）スケジュールの下で、レバー押しを習得し、それは、1回のレバー押しを条件とするコカインの1回の注入を送達した。行動期間は、毎日、午後1時に開始し、午後3時に終了した。反応が14日間安定した場合、コカインを、生理食塩水に置き換えた。自己投与行動は、その後、21日間、断絶させ

、その間、反応が継続し、注入による刺激および生理食塩水注入を生じさせた。次に、3日のキュー消滅期間後、薬物注入ポンプおよび小屋の光の電源を切り、反応を完全に失わせ、回復が、特に、薬物刺激 (drug priming) を示すことを確実にした。

【1497】

次の回復期間は、コカインもしくは食塩水の自己投与、または注入による刺激を含まなかった。各期間を開始するために、実験者は、生理食塩水 (S)、コカイン (C)、またはアンフェタミン (A) を、以下の順序: S C S C S A S A S C S A に従って、毎日、午後1時に、12日間、腹腔内の注射で薬物刺激した。4日目 (C) および6日目 (A) に、ラットを、午前9時に、2 mg/kg の Albu-CocH により前処置し、注入装置を通して投与し、0.3 ml の無菌食塩水で洗い流した。

10

【1498】

9. 運動活性および食物強化行動

運動活性は、Perryら (2005) により記載されるように、赤外線ビーム中断を検出することにより、午前11時に開始の30分間、毎日評価された。別のビームの前に生じる1つのビームの2つ以上の中断は、単一反応として計数された。行動を安定化させた後 (3日間、着実に増加または減少の傾向がない)、ラットに、午前9時に、4日間、生理食塩水 (尾静脈)、その後、1日間、Albu-CocH、および最終日に再度、生理食塩水を注射した。

【1499】

ラットを、毎日、午後1時に、3時間の食事期間、オペラント条件付けの箱に入れた。食物ペレット (45 mg) はFR1 調節遅延無考慮スケジュール下のいずれかのレバーにおける反応を条件とした (Perry et al., 2005)。「即時レバー」における反応は、1つのペレットを即座に生じるが、「遅延レバー」反応は、動物の行動に基づく期間中、変更された遅延後、3つのペレットをもたらした。遅延は、6秒で開始し、「遅延レバー」反応レバーから1秒後に増加し、「即時レバー」反応から1秒後に減少した。期間は、60回の試行完了または3時間後の、どちらか先に起こった時点で終了した。期間後、ラットは、さらに食物を与えられ、それは、1日あたり合計16 gに達した。各日、遅延時間は、それが前日終了した値から開始された。

20

【1500】

各期間は、15の4回試行のブロックに分けられた。各ブロックの第1および第2の試行は、各レバーへの曝露を強制し (平衡させた順序における即座および遅延状態)、一方、第3および第4の試行は、即時または遅延の自由選択であり、いずれかのレバーにおける反応は、それぞれ、1つまたは3つのペレットを産出した。調整された遅延の平均 (MAD) は、「遅延」レバーにおいて完了した、すべての自由選択試行 (最大=30) における効果があった遅延を平均化することにより算出された。MAD値は、食物に対する衝動性の定量的尺度としての役割を果たし、得た食物量に加えて、食物の報酬を受けた行動の別の要因を提供した。

30

【1501】

10. 統計的分析および薬物動態学的算出

血圧の変化は、StatView 4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA) を用いて、統計的に分析された。処置効果は、因子として、時間および処置を用いた二元配置分散分析を行った; $p < 0.05$ は、統計的に有意であると見なされた。自己投与および他の行動データは、一元および二次配置分散分析、次いで、ポストホックテストにより分析された。酵素血漿濃度-時間プロファイルは、t Sigma Plot 4.1 (Jandel Scientific, Temecula, CA) で分析され、末期半減期を推定した二次指数の遅延曲線にデータを当てはめた。酵素動的データ (V = 速度、 S = 基質濃度) を、ミカエリスメンテン式: $V = V_{max} * (S / (S + K_m))$ に直接当てはめることにより分析された。

40

【1502】

C. 結果

50

放射アッセイ（方法を参照）は、非融合変異体（Pan et al., 2005）に類似するコカインkcat（ $2700 \pm 190 \text{分}^{-1}$ ）およびKm（ $2.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ）を明らかにした。比較すると、細菌酵素は、 470分^{-1} のkcatおよび $0.64 \mu\text{M}$ のKmを有することが報告される（Turner et al., 2002）。kcat/Kmの比として測定された触媒効率は、したがって、変異BchEにおいて、75%高い。

【1503】

純Albu-CocHを、尾静脈からオスWistarラット（250～300g）に注射した場合、 3mg/kg までの用量では識別できる効果はなかったが、 10mg/kg では、1時間、軽度の昏睡状態を引き起こした。5匹のラットから繰り返される血液試料の酵素アッセイは、注射活性が、 8 ± 0.5 時間の血中濃度半減期を伴い、安定していたことを示した（図23）。さらになお、Albu-CocHは、それ自体が血圧を低下させる、またはノルエピネフリンの血圧上昇効果を妨害することなく、中等量のコカインに対して血圧上昇反応を遮断した（図24）。これらの所見は、Albu-CocHが、ヒトにおいて毒性および過剰摂取を緩和することが可能であり得るという仮説を導いた。動物において、その可能性を試験することは、意識がしっかりしている、非抑制ラットに、重度の毒性（発作として定義される）を引き起こす可能性がある用量のコカインへの曝露を必要とした。

【1504】

過去の知見では、コカイン（ 100mg/kg ）を用いた腹腔内チャレンジは、安楽死を施さなければ、定期的に痙攣を引き起こし、2分以内に死亡することを示している。ここで苦痛を最小限にするために、60秒間の連続的な痙攣、または、2分以内に15秒を超える痙攣を示すいかなるラットをも安楽死させることを指示するIACUCで認可されたプロトコルに従った。コカインチャレンジを受けた後、10匹の非保護ラットのそれぞれが、頭を上下させる動き、過剰な運動、次いで、痙攣（発症時間、 $170 \pm 30 \text{秒}$ ）を発症し、安楽死の判断基準に達した。しかしながら、静脈投与のAlbu-CocHによる前処置は、劇的な、用量依存的な保護を与えた（図25）。少用量（ 1mg/kg ）では、発作を遅延したが、4匹ラットのうち4匹において、覚醒または発作を防げなかった（発症時間、 $380 \pm 70 \text{秒}$ ）；中用量（ 3mg/kg ）では、発作は防げたが、覚醒の兆候は防げなかった（6匹ラットのうち6匹）；大量用量（ 10mg/kg ）では、覚醒および発作を解消し（6匹ラットのうち6匹）、ほぼ10倍でこの毒性に対するコカインのED50を上昇させた。

【1505】

いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、同一のコカインチャレンジが、すべての偽処置された動物（3回の所与の 10mg/kg ヒト血清アルブミンおよび2回所与のジイソプロピルフルオロリン酸塩で不活性化される、 10^{-4}M 、1時間）において痙攣を起こしたため、促進したコカイン加水分解がこの保護に対する最も簡単な説明であると考えられる。保護は、非保護ラットにおいて一定の発作を生じるため、閾値（ 150mg/kg ）で、アンフェタミンを用いてチャレンジする3匹のラットにおいて、 10mg/kg で活性酵素が、痙攣を遅延する、または防ぐことができなかったのも、コカインに対して特異的であった。コカインからの保護は、持続的であった。 10mg/kg のAlbu-CocHを受けてから12時間までチャレンジされたいずれのラットも発作を引き起こさなかった（1から6時間の間に、4匹のラットおよび12時間で4匹のラット）。24時間後にチャレンジされた5匹ラットのうち、2匹は、発作を回避し、1匹は、回復する前に15秒間、発作を起こし、2匹は、安楽死の判断基準に達する発作を起こした。したがって、この実験では、24時間が、保護の外側限界となった。

【1506】

ヒトの過剰摂取は、救助を必要とする。ラットにおける潜在的な救助を評定するため、 100mg/kg のコカインを、ラットに注射した。痙攣の発症が始まる場合、ラットは、その後、Albu-CocH（3または 10mg/kg ）を迅速に投与された。 10m

10

20

30

40

50

g / k g を与えられた 3 匹のラットのそれぞれは、1 分以内に痙攣がおさまリ、2 分以内に直立の姿勢を再開し、コカイン誘導される覚醒のさらなる兆候を示さなかった。その後、1 ~ 2 時間（「時間」）、不活発な状態、および軽度の肢の腫れがあることを別にすれば、未処置の対照に類似していた。3 m g / k g を与えられた 3 匹のラットのうち 3 匹はまた、1 分以内に痙攣がおさまリ、直立の姿勢を迅速に取り戻した。これらの動物は、約 1 時間、頭を上下させる動きおよび過剰な運動を示した。翌日、両方の処置群は、コカインを受けたことがないラットとは区別ができなかった。1 0 m g / k g で、A l b u - C o c H はまた、より多量のコカインの過剰摂取に対して部分的に有効であり、3 0 0 m g / k g の腹腔内のコカインを用いてチャレンジした 6 匹のラットのうち 4 匹を救助した。対照的に、野生型 B c h E、3 m g / k g は、3 匹のラットのうちの 3 匹において、標準コカインチャレンジ（1 0 0 m g / k g）の後でさえ、救助で有効ではなく、それらのすべては、早期の安楽死の判断基準に達した。

10

【1507】

これらの結果は、コカイン中毒からの用量依存的かつ加水分解酵素に特異的な救助を確立した。救助は、脳（血漿活性の組織活性 < 1 %）から大きく排除される薬剤に対して急速であり、コカインを排除し、組織からの薬物解離を促進することにより、役目を果たすと考えられた。さらに、A l b u - C o c H は、ほぼ瞬時に血漿からコカインを除去した。³ H - コカイン（3 . 5 m g / k g、静脈投与）により処置された 4 匹の対照ラットにおいて、血漿薬物半減期は、5 0 ± 5 分であったが、事前に、3 m g / k g の A l b u - C o c H を与えられた 4 匹のラットにおいて、9 8 % の遊離薬物は、3 0 秒以内に安息香酸に変換され（図 2 6）、心臓および脳に負荷された薬物は、大幅に減少した（図 2 7）。

20

【1508】

コカイン毒性からラットを救うのに十分強力な酵素はまた、薬物報酬を軽減し、コカイン中毒を制御するのに有用であり得る。その可能性を評定するために、A l b u - C o c H を、コカインを自己投与するように訓練されているラットにおいて試験した。コカイン中毒の最も処置し難い、厄介な態様の 1 つは、禁断後の再発である。1 つの目標は、脳の報酬センターへ行く途中で、コカインの高代謝が、コカインの静脈投与での薬物刺激により引き起こされる再発を防げるかどうかを判定することである。コカインを予め自己投与し、次いで、コカインが生理食塩水に交換されると、反応を消失したラットにおける、薬物探索行動のコカインで薬物刺激された回復における A l b u - C o c H の前処置の効果を、検査した。

30

【1509】

ラットは、定率 1 回（F R 1）スケジュールの下で、毎日の期間中、各コカイン注入（0 . 4 m g / k g、静脈投与）に対して 1 回のレバー押しをするように訓練された。行動を安定化させてから 1 4 日間、生理食塩水を、2 1 日間、コカインの代用とし、行動を消失させることを可能にした。次の回復相において、コカインの薬物刺激の注射を与えた（日々の交互に、生理食塩水の薬物刺激の注射を伴う）。選択された日に、ラットは、回復期間から 2 時間前、A l b u - C o c H（2 m g / k g）を受けた。コカインの薬物刺激の注射（1 0 m g / k g、腹腔内）は、前処置のない 2 日において、3 0 ~ 4 0 の反応を生じた（図 2 8）。しかしながら、A l b u - C o c H 後、コカインの薬物刺激は、ごくわずかな反応を生じた。介在日における生理食塩水の薬物刺激は、コカインに前に関連したレバーにおける最小限の反応（2 ~ 5）をもたらした。非特異的な行動抑制の可能性を考えて調整を行うために、d - アンフェタミンの薬物刺激の注射が、加水分解酵素基質でないことも試験した。アンフェタミンの薬物刺激（2 m g / k g、腹腔内）は、約 6 0 回の回復反応を誘発し、それは、選択的代謝に依存する効果と一致し、A l b u - C o c H により有意に減少しなかった。

40

【1510】

A l b u - C o c H が、コカインの薬物刺激後、回復を該する恐れがある全般的な行動抑制を生じなかったことをさらに確認するために、運動活性および食物に対する反応にお

50

ける *Albu-CocH* の効果を調査した。これらの研究については、5匹のラットを、静脈投与での生理食塩水、*Albu-CocH*、および生理食塩水を用いて、交互に処置した。各日の注射をしてから2時間後、円周に等間隔で4つの赤外線ビームを有する、円形のオープンフィールド中で、運動を監視した (*Piazza et al.*, (1989) *Behav Brain Res* 31:267-271)。ビーム中断データは、処置効果がないことを示した (表17)。

【1511】

生理食塩水または酵素注射をしてから4時間後、同一のラットを、報酬に対して衝動性を評価するように設計されたパラダイムにおいて、FR1のレバー押しに反応することを条件とする食物送達を有するオペラント条件付け実験で研究した (*Perry et al.*, 2005)。このタスクは、2つのレバーを必要とした。1つのレバーは、単一の45mgの食物ペレットを直ちに生じ、もう1つは、遅延後、3つのペレットを生じた。遅延は、6秒で開始し、遅延レバー反応レバーにおけるそれぞれの反応から1秒後に増加し、即時レバーにおけるそれぞれの反応から1秒後に減少した。*Albu-CocH* 後の結果は、完了した試行において、60回の選択試行に対して、得たペレット数、食物摂取、または調整された遅延の平均の有意な差異 (対、生理食塩水) は示されなかった (表17)。

【1512】

【表16】

	運動	食物強化行動			
注射	ビーム中断	完了した試行	ペレット数	食物摂取	調整された遅延の平均*(秒)
生理食塩水	23.8 ± 2.4	57.2 ± 2.8	110 ± 4.9	4.93 ± 2.2	14.0 ± 5.0
<i>Albu-CocH</i>	21.2 ± 4.2	57.8 ± 1.4	115 ± 6.2	5.15 ± 2.7	7.44 ± 0.45
生理食塩水	21.0 ± 2.6	54.2 ± 5.8	108 ± 10.3	4.88 ± 4.6	6.84 ± 1.5

*食物に対する衝動性の自己判定した測定

表17. *Albu-CocH* は、運動活性または食物強化反応を変化させない。5匹のラットは、3日連続で、午後9時に、生理食塩水または *Albu-CocH* を受けた。平均値 (±標準誤差) は、運動活性 (午前11時) および食物報酬行動 (午後1時) に対して示した。酵素処置は、統計的に有意な効果はなかった。

【1513】

BCHE 触媒されたコカイン加水分解は、2つの崩壊産物である、安息香酸およびエクゴニンメチルエステルを生成する。ノルコカインおよびベンジルエコゴニンを含む他の代謝産物と比較すると、これらの産物は、生物活性を大幅に軽減している。したがって、反応は、解毒作用である。

【1514】

これらの結果は、*BCHE*-アルブミン融合物が、心臓および脳を含む臨界生物学的標的へのコカインの侵入を妨げることができるが、一方、いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、救助の注射が、その高い局部血流量と共に、体の至るところの部位から、特に、脳からのコカインの喪失を助ける急な拡散勾配を作成することを示唆すると考えられる。したがって、*Albu-CocH* は、コカインの過剰摂取の緊急処置によく適している。

【1515】

非常時使用に加えて、A l b u - C o c Hの反復される、または連続的な送達は、一般に短期間のささいな過ちが後に続く、中毒者が完全な再発を回避するために役立ち得る。長期の血漿半減期は、このような目的のために望ましい。ラットデータからの相対成長率は、他のアルブミン融合タンパク質との経験を考慮に入れると、ヒトにおけるA l b u - C o c Hの数日の半減期に適合し、再発を防ぐことを目的として、持続的に加速したコカイン加水分解を可能にする。

【1516】

再発または「復帰」は、恐らく、薬物乱用を処置する場合には、最大の課題である。復帰の確立された動物モデルにおける薬物探索行動は、薬物関連の環境信号への曝露により、定期的に引き起こされる。復帰を予測する、または亢進する要因としては、女性であること、エストロゲン状態、より高い薬剤投与量、衝動性または甘味嗜好性等の中毒傾向がある表現型、ならびに食事制限が挙げられる。特に、強力なものは、関連した薬理学的機序による薬物の「薬物刺激の曝露」である。上記の実験は、A l b u - C o c Hが、コカインの薬物刺激の注射により引き起こされた回復を遮断するために十分に有効であることを示す。

【1517】

コカインの薬物刺激によるコカイン探索行動の復帰をもたらすもの等の条件下で、A l b u - C o c Hは、運動行動、食物報酬行動、食物に対する衝動性、またはアンフェタミンの薬物刺激の強化に影響を及ぼさなかった。再発の動物モデルからのこれらの結果は、脳へのコカインの進入を妨げることにより、加速した代謝が、毒性だけでなく、この薬物の報酬探索効果を鈍らせ得るという仮説を支持する。コカインの薬物刺激の回復の事実上の排除は、有効な加水分解の持続的な送達が、切望を抑制しなかったが、回復中の中毒患者における、再発の可能性を軽減することを示唆する。投与に関しては、B C h E - アルブミン融合物の週に1回の投与が、コカイン中毒の療法として、コカインの連続的な、迅速除去を提供し得ると考えられる。さらになお、タンパク質のさらなる改変が、なお良好な薬物動態を提供し得る。

【1518】

追加としてまたは代替として、B C h Eアルブミン融合物のウイルス遺伝子の導入は、治療戦略として使用され得る。標準的なE1欠失したアデノウイルスベクターは、ラットの血流および脳において、数日間、コカイン加水分解酵素の有効なレベルを持続することを示し、一方、ヘルパー依存性のアデノウイルスベクターを伴う継続している作業が、数ヶ月以上の期間、発現を示している。

【1519】

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、要約、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G e n B a n k、G e n s e qまたはC A S R e g i s t r y等の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、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【1520】

さらになお、以下の国際出願および米国出願の各々の明細書および配列表は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。2002年12月23日出願の国際出願第P C T / U S 0 2 / 4 0 8 9 1号、2004年1月20日出願の国際出願第P C T / U S 2 0 0 4 / 0 0 1 3 6 9号、2005年2月9日出願の国際出願第P C T / U S 2 0 0 5 / 0 0 4 0 4 1号、2004年2月11日出願の米国出願第10 / 7 7 5、2004号、2005年7月7日出願の米国出願第11 / 1 7 5、690号、2006年5月8日出願の米国出願第11 / 4 2 9、373号、2006年5月8日出願の米国出願第11 / 4 2 9、276号、2006年5月8日出願の米国出願第11 / 4 2 9、374号、ならびに2005年8月12日出願の米国仮出願第60 / 7 0 7、521号、2005年8月31日出願の同第60 / 7 1 2、386号、2005年11月3日出願の同第60 / 7 3 2、724号、2006年2月28日出願の同第60 / 7 7 6、914号、2006年3月13日出願の同第60 / 7 8 1、361号、ならびに2006年6月2日出願の同第60 /

810, 182号、および2006年6月15日出願の同第60/813, 682号。

【図 1 A】

[illegible]

Figure 1A

【 図 1 B 】

[illegible]

Figure 1B

【 1 C 】

961 GAG GAG GAG GAT CTC TTC CCG AGG TTT TTG TAT GAA TAT GAA AGG GAT CTT GAT 1020
 321 E A K D V F L G H F L Y E A R R H P D 340
 1021 TAC TTC GAT CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG 1080
 341 Y E V F L G H F L Y E A R R H P D 360
 1081 TTT GGT GCA GAT CTT CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG 1140
 361 C A A D P N E C Y A K V P D E F K P L 380
 1141 GTG GAG GAT CCG GAG GAT TTA ATC AAA GAA TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT 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 CCG GAT CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG 1260
 401 F K F Q N A L L V K Y T K X P Q V S T 420
 1261 GCA GAT CTT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 1320
 421 P L V E S N A L G H F L Y E A R R H P D 440
 1321 CTT GAG GAA AAA ATG CCG TGT GGA GAT TAT CTA TTC GTC GTC GTC GTC GTC 1380
 441 F E A K R M P C A E D Y L S V V L N Q L 460
 1381 TTT CTT TTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT 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

【 1 D 】

1441 TTG CCG AAC AGG CCA TCC TTT TCA GCT CCG GAA GTC GAT GAA ACT TAC GTC CCG AAA 1500
 481 L V H R P C F S A L E V D E T Y F R 500
 1501 GAG ATT ATT GAT TAC ACC TTC GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 1560
 501 E P R A E T F E H A D L C T L G H E 520
 1561 ACA GAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT TAT 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 CCA CTA AAA GAT ATT ATG GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 1680
 541 K R Q L K A V H D P A A F V B C C K 560
 1681 GGT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 1740
 561 A D D K E T C F A E G K L V A A S Q 580
 1741 GGT GGT TTT GGT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 1800
 581 A L Q L

Figure 1D

【 2 】

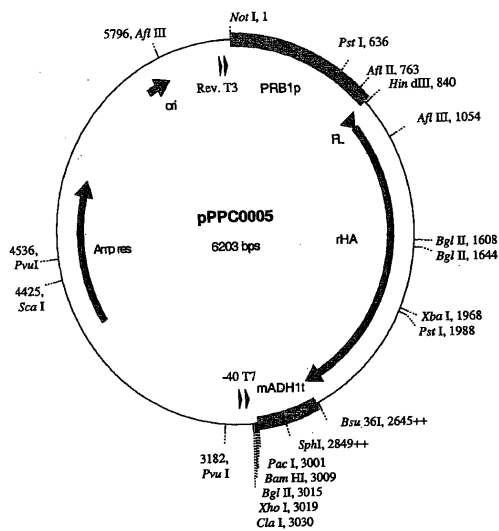


Figure 2

【 3 】

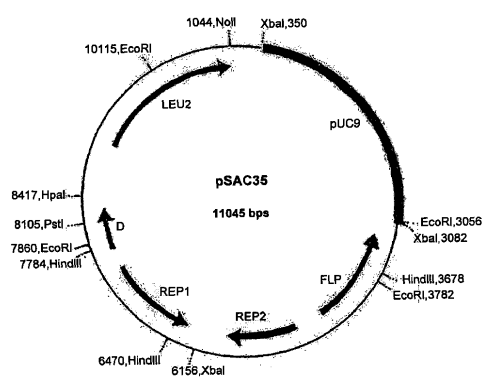
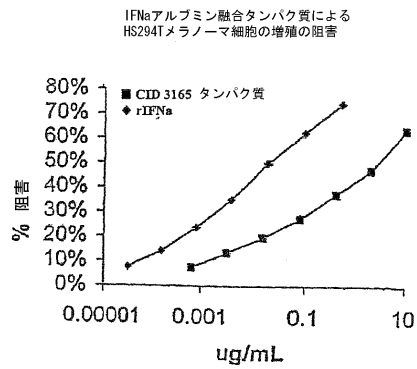
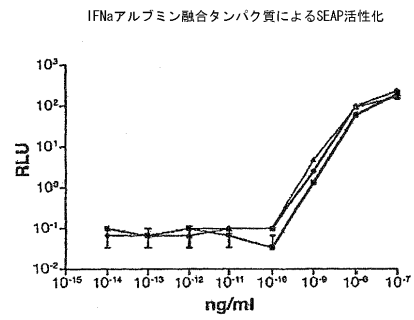


Figure 3

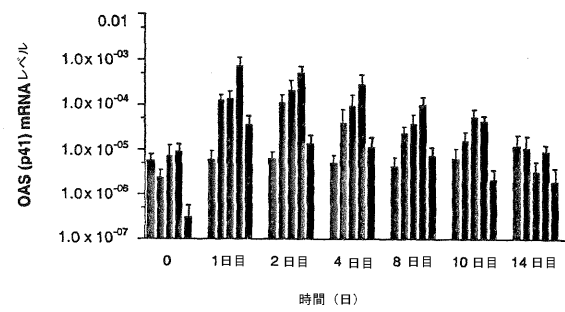
【図 4】



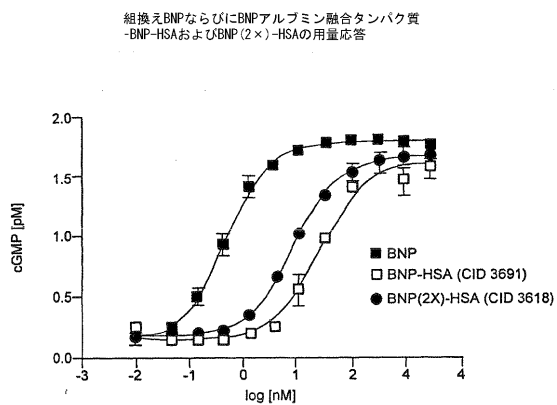
【図 5】



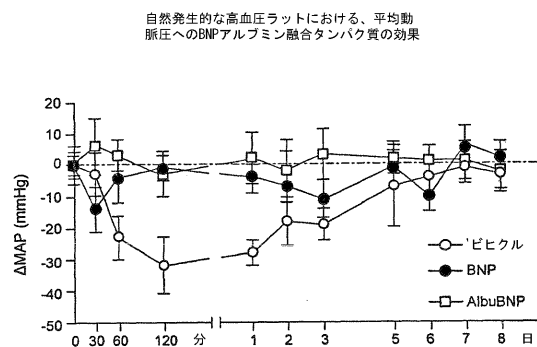
【図 6】



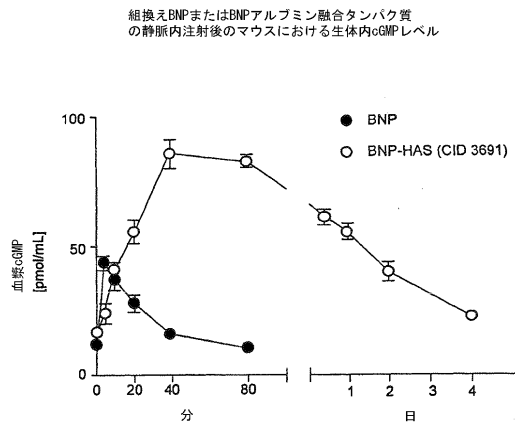
【図 7】



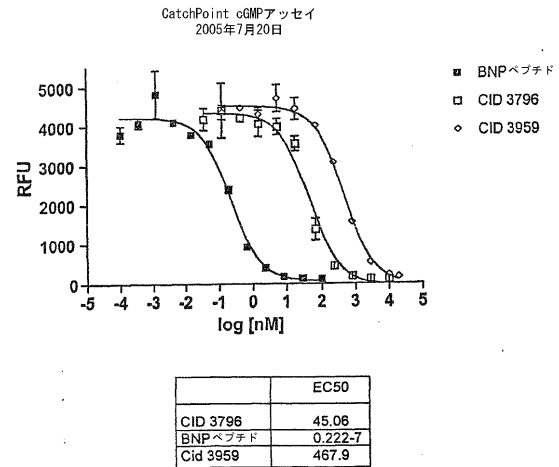
【図 8】



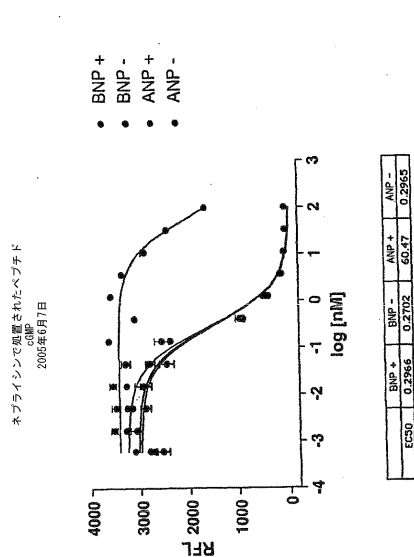
【図 9】



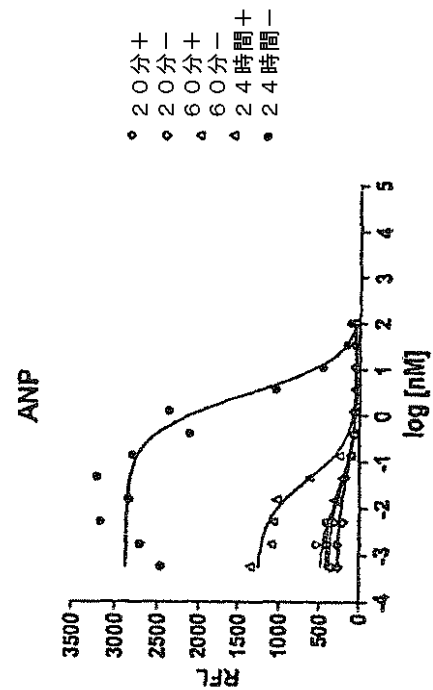
【図 10】



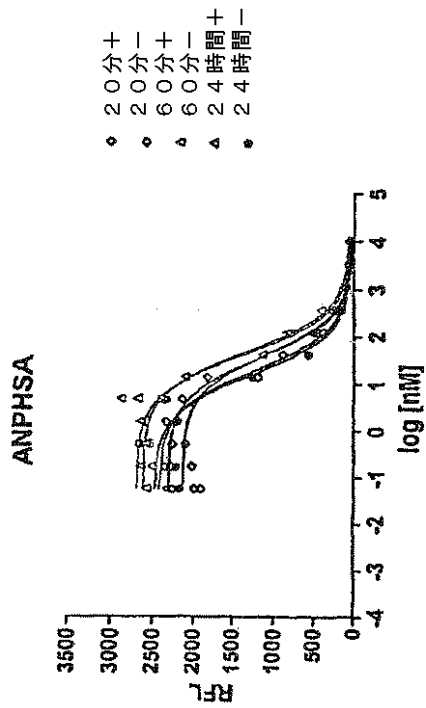
【図 11 A】



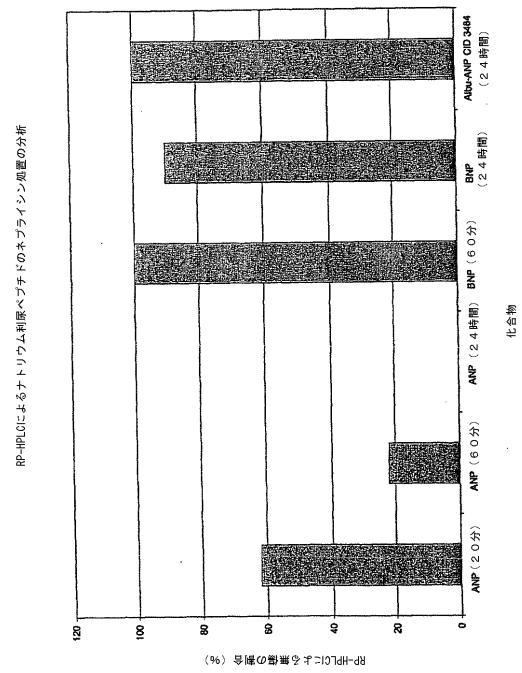
【図 11 B】



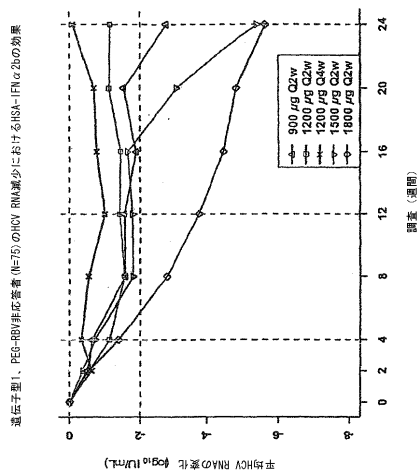
【図 1 1 C】



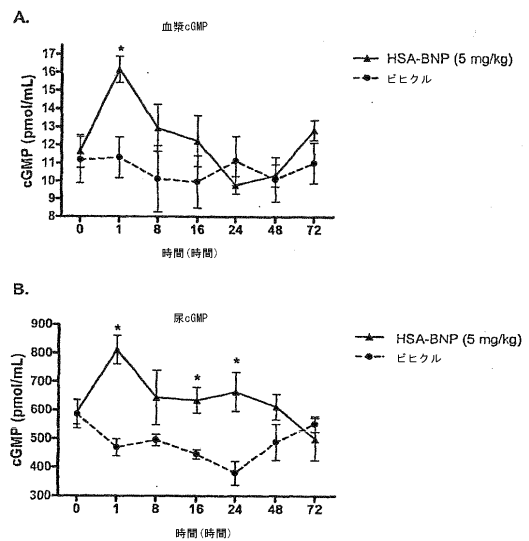
【図 1 1 D】



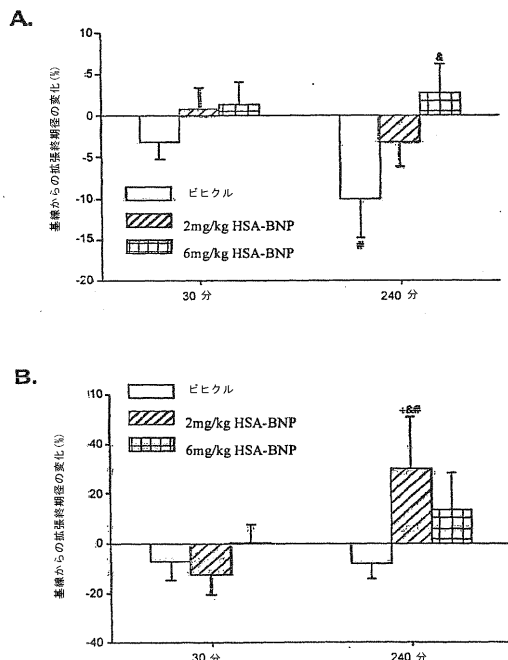
【図 1 2】



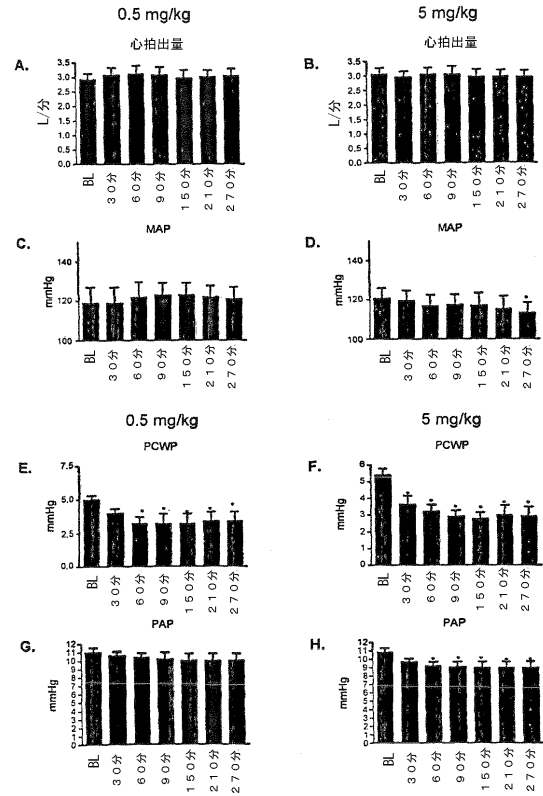
【図 1 3】



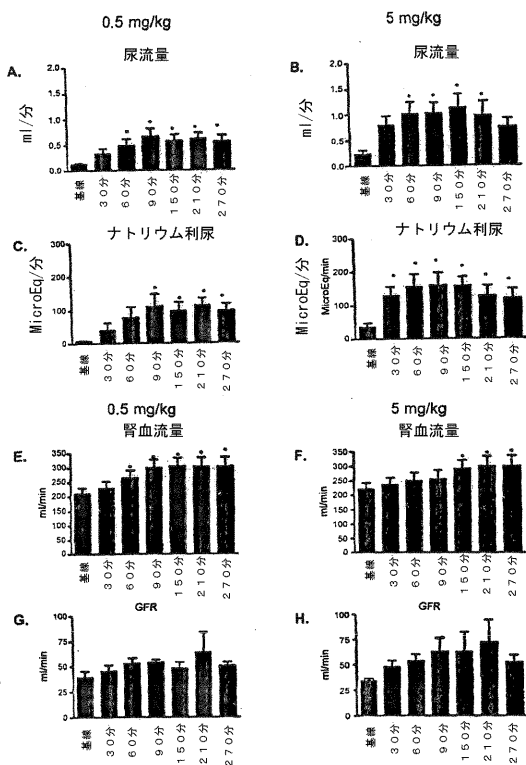
【図 14】



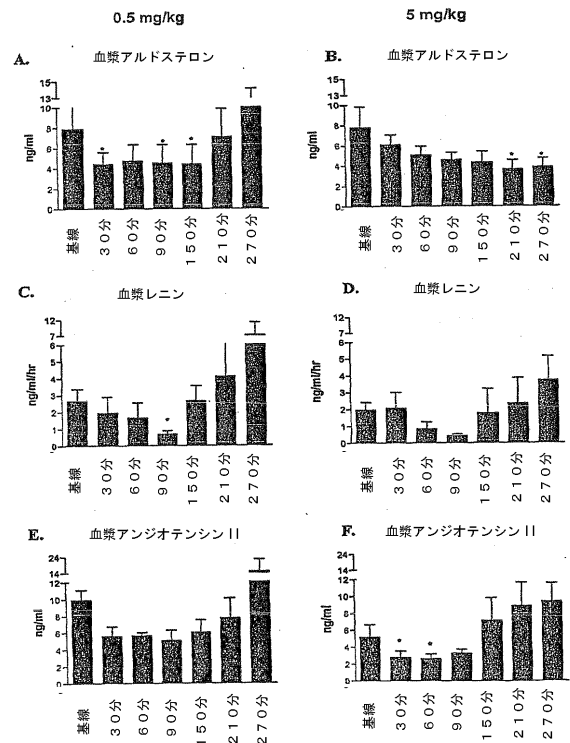
【図 15】



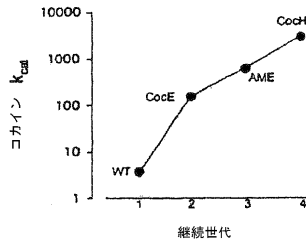
【図 16】



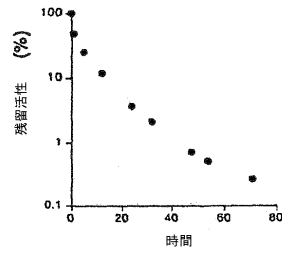
【図 17】



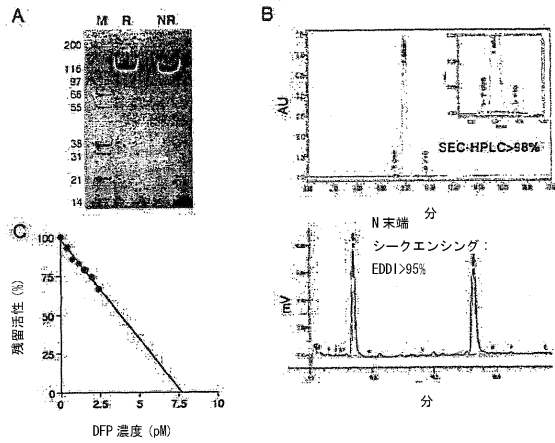
【図 2 1】



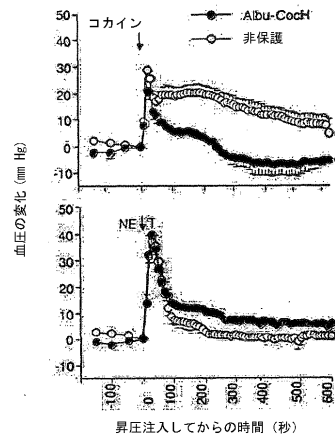
【図 2 3】



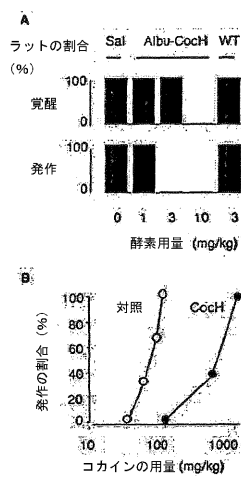
【図 2 2】



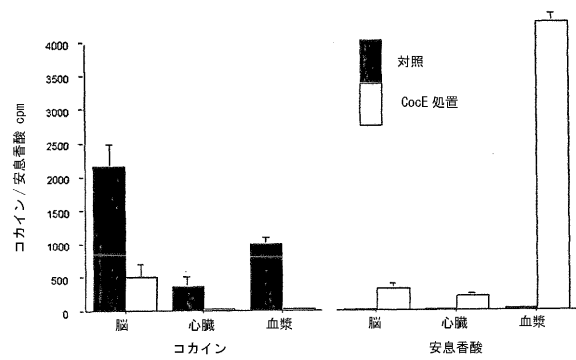
【図 2 4】



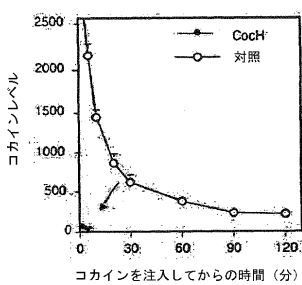
【図 2 5】



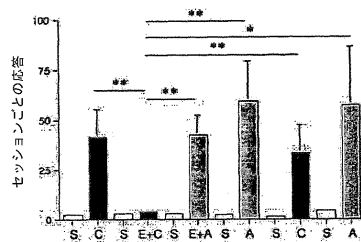
【図 2 7】



【図 2 6】



【図 2 8】



【配列表】

2011501959000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成22年6月29日(2010.6.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2011501959000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/12306															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/00; C07K 17/00 (2009.01) USPC - 530/324; 530/363 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 38/00; C07K 17/00 (2009.01) USPC: 530/324; 530/363 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 530/362; 514/12; 514/776; 435/320.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB): albumin, fusion, atrial natriuretic, half-life, leader, kex, ANP, ANF esp@cenet: albumin, ANP, human genome science, rosen, atrial natriuretic Google Scholar: albumin fusion atrial natriuretic leader kex2																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 2006/0014254 A1 (HASLITINE et al.) 19 January 2006 (19.01.2006), abstract; para [0007], [0009], [0010], [0025], [0026], [0027], [0035], [0037], [0045], [0056], [0074], [0139], [0197], [0198], [0252], [0279], [0348], [0371], [0450], [0529], [0530], [0531], [0805], [0846].</td> <td>1, 3-6, 11, 13-20, and 44 2</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>EP 0 147 193 A2 (MATSUO) 3 July 1985 (03.07.1985), abstract; pg 1, in 34-pg 2, in 3; pg 17, in 19-27.</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2003/0219875 A1 (ROSEN et al.) 27 November 2003 (27.11.2003)</td> <td>1-6, 11, 13-20, and 44</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2007/0162986 A1 (DE BOLD et al.) 12 July 2007 (12.07.2007)</td> <td>1-6, 11, 13-20, and 44</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	US 2006/0014254 A1 (HASLITINE et al.) 19 January 2006 (19.01.2006), abstract; para [0007], [0009], [0010], [0025], [0026], [0027], [0035], [0037], [0045], [0056], [0074], [0139], [0197], [0198], [0252], [0279], [0348], [0371], [0450], [0529], [0530], [0531], [0805], [0846].	1, 3-6, 11, 13-20, and 44 2	Y	EP 0 147 193 A2 (MATSUO) 3 July 1985 (03.07.1985), abstract; pg 1, in 34-pg 2, in 3; pg 17, in 19-27.	2	A	US 2003/0219875 A1 (ROSEN et al.) 27 November 2003 (27.11.2003)	1-6, 11, 13-20, and 44	A	US 2007/0162986 A1 (DE BOLD et al.) 12 July 2007 (12.07.2007)	1-6, 11, 13-20, and 44
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X — Y	US 2006/0014254 A1 (HASLITINE et al.) 19 January 2006 (19.01.2006), abstract; para [0007], [0009], [0010], [0025], [0026], [0027], [0035], [0037], [0045], [0056], [0074], [0139], [0197], [0198], [0252], [0279], [0348], [0371], [0450], [0529], [0530], [0531], [0805], [0846].	1, 3-6, 11, 13-20, and 44 2															
Y	EP 0 147 193 A2 (MATSUO) 3 July 1985 (03.07.1985), abstract; pg 1, in 34-pg 2, in 3; pg 17, in 19-27.	2															
A	US 2003/0219875 A1 (ROSEN et al.) 27 November 2003 (27.11.2003)	1-6, 11, 13-20, and 44															
A	US 2007/0162986 A1 (DE BOLD et al.) 12 July 2007 (12.07.2007)	1-6, 11, 13-20, and 44															
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 9 March 2009 (09.03.2009)		Date of mailing of the international search report 26 MAR 2009															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/12306

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-6, 11, 13-20, and 44 are directed to either an ANP-albumin fusion protein or a method of treating Alzheimer's disease by administering an albumin fusion protein, where claim 2 is limited to SEQ ID NO: 302 and where claim 3 is limited to members of the markush group which are not referenced by SEQ ID. Applicant may have the additional sequence searched for an additional fee.

Group II: Claims 1, 3-6, 11, 13-20, and 44 are directed to either an ANP-albumin fusion protein or a method of treating Alzheimer's disease by administering an albumin fusion protein, where claim 3 is limited to SEQ ID NO: 1

— Please see continuation on attached additional sheet —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6, 11, 13-20, and 44

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/12306

Continuation of Box (II): Lack of Unity -

Group III+: Claims 1, 3-20, and 44 are directed to either an ANP-albumin fusion protein or a method of treating Alzheimer's disease by administering an albumin fusion protein where claims 7-10 and 12 are limited to SEQ ID NO: 227 and 152 and Construct ID: 3484 and where claim 3 is limited to members of the markush group which are not referenced by SEQ ID. Applicant may have additional sequence(s) or the additional construct searched for additional fee(s).

Group IV+: Claims 21-26, 31, and 33-44 are directed to either a BchE-albumin fusion protein, a method of using a BchE-albumin fusion protein, or a method of treating Alzheimer's disease by administering an albumin fusion protein where claim 22 is limited to SEQ ID NO: 708 and where claim 23 is limited to members of the markush group which are not referenced by SEQ ID. Applicant may have the additional sequence searched for an additional fee.

Group V: Claims 21, 23-26, 31, and 33-44 are directed to either a BchE-albumin fusion protein, a method of using a BchE-albumin fusion protein, or a method of treating Alzheimer's disease by administering an albumin fusion protein where claim 23 is limited to SEQ ID NO: 1

Group VI+: claim 21, 23-31, and 33-44 are directed to either a BchE-albumin fusion protein, a method of using a BchE-albumin fusion protein, or a method of treating Alzheimer's disease by administering an albumin fusion protein where claims 27-30 are limited to SEQ ID NOS: 689 and 630 and where claim 3 is limited to members of the markush group which are not referenced by SEQ ID. Applicant may have additional sequence(s) searched for additional fee(s).

Group VII+: claims 1, 3-6, 11, 13-20, 32, and 44, are directed to either an ANP-albumin fusion protein or a method of treating Alzheimer's disease by administering an albumin fusion protein where claim 32 is limited to Construct ID 4258 and where claim 3 is limited to members of the markush group which are not referenced by SEQ ID. Applicant may have the additional Construct ID searched for an additional search fee.

The groups listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons.

The special technical feature of Groups I-III and VII is an albumin fusion protein comprising an atrial natriuretic polypeptide (ANP) fused to albumin while the special technical feature of Groups IV-VI is an albumin fusion protein comprising a butyrylcholinesterase polypeptide (BchE) fused to albumin. Although the two sets of Groups are linked by the common feature of: an albumin fusion protein, this does not represent an improvement over the prior art of US 2003/0219875 A1 to Rosen et al which teaches an albumin fusion protein (abstract). In addition, each Group is considered distinct because each is directed to a distinct SEQ ID and because these SEQ IDs represent peptides or nucleic acids with different structure and function.

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13.2 because the groups do not share a same or corresponding special technical feature providing a contribution over the prior art.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	
C 1 2 N	9/16	(2006.01)	C 1 2 N	9/16		
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02		
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04		
A 6 1 P	25/36	(2006.01)	A 6 1 P	25/36		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, T R), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, K G, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(72)発明者 クレイグ・エイ・ローゼン

アメリカ合衆国 2 0 8 8 2 メリーランド州レイトンスビル、ローリング・ヒル・レイン 2 2 4 0 0 番

(72)発明者 アダム・ベル

アメリカ合衆国 2 0 8 7 4 メリーランド州ジャーマンタウン、バート・ウッズ・プレイス 1 3 3 1 2 番

(72)発明者 ポール・エイ・ムーア

アメリカ合衆国 2 0 8 5 2 メリーランド州ノース・ベセスダ、オールド・ゲート・ロード 7 0 1 3 番

(72)発明者 ヤング・シ

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州ゲイザーズバーグ、サフィールド・ドライブ 7 1 0 番

(72)発明者 デイビッド・ラフルーア

アメリカ合衆国 2 0 0 1 5 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、クエサダ・ストリート 3 1 4 2 番

(72)発明者 ジェイソン・ビー・ボック

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州ノース・ポトマック、セクルーディッド・レイン 1 4 2 0 0 番

(72)発明者 マイケル・ダブリュー・レアード

アメリカ合衆国 9 4 5 8 2 カリフォルニア州サン・ラモン、シルク・ヒル・コート 2 4 4 番

(72)発明者 ウィリアム・エイ・ヘイゼルトイン

アメリカ合衆国 2 0 0 0 7 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 3 0 5 3 番

(72)発明者 ダグラス・ビー・ウッズ

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州ゲイザーズバーグ、シェイラ・ストリート 4 2 6 番

(72)発明者 マニ・サブ라마ニアン

アメリカ合衆国 2 1 0 4 2 メリーランド州エリコット・シティ、スタッフォード・レイン 1 0 2 1
7 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA04 BA11 BA40 BA80 CA07 DA02 DA05 DA12 EA04

GA11 HA01

4B050 CC03 DD11 EE10 HH02 LL01

4B064 AG15 AG24 CA02 CA06 CA10 CA19 CA21 CC24 DA01

4B065 AA15X AA26X AA77X AA79X AA90X AA91X AB01 AC14 BA02 CA24

CA44

4C084 AA02 AA06 BA02 BA22 BA41 DA36 DB02 NA03 ZA162 ZA362

ZA392 ZA422 ZA432 ZA592 ZA812 ZB132 ZC082 ZC372 ZC392

4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA32 DA70 DA89 EA26 EA30

FA74