

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4099829号
(P4099829)

(45) 発行日 平成20年6月11日 (2008. 6. 11)

(24) 登録日 平成20年3月28日 (2008. 3. 28)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/47 (2006. 01)

C O 7 K 14/47

C O 7 K 16/18 (2006. 01)

C O 7 K 16/18

C 1 2 P 21/02 (2006. 01)

C 1 2 P 21/02

C

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68

A

請求項の数 17 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-515372
 (86) (22) 出願日 平成7年10月27日 (1995. 10. 27)
 (65) 公表番号 特表平10-509866
 (43) 公表日 平成10年9月29日 (1998. 9. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1995/014024
 (87) 国際公開番号 W01996/014411
 (87) 国際公開日 平成8年5月17日 (1996. 5. 17)
 審査請求日 平成14年10月25日 (2002. 10. 25)
 (31) 優先権主張番号 08/336, 235
 (32) 優先日 平成6年11月3日 (1994. 11. 3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504397044
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
 12-3550 オークランド レイクサ
 イド ドライブ 300 トゥエンティー
 セカンド フロアー
 (74) 代理人 100081352
 弁理士 広瀬 章一
 (72) 発明者 ニューエン, タイ・ディー
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州949
 41、ミル・バレイ、セントラル・バレイ
 ・ドライブ17

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 緑内障の診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3 の配列 からなる 核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 3 に 高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、小柱網細胞に特異的結合能を有する小柱網誘導グルココルチコイド応答 (TIGR) タンパク質をコードする核酸。

【請求項 3】

配列番号 2 または配列番号 3 の配列 からなる ポリヌクレオチドの 連続した 15 ~ 250 ヌクレオチド断片を含む核酸分子。

【請求項 4】

請求項 3 記載の分子の相補物を含む核酸分子。

【請求項 5】

配列番号 1 の配列 からなる 精製された小柱網誘導グルココルチコイド応答 (TIGR) タンパク質。

【請求項 6】

配列番号 1 の配列 からなる ポリペプチドを含むタンパク質。

【請求項 7】

配列番号 1 の配列 からなる 精製された小柱網誘導グルココルチコイド応答 (TIGR) タンパク質に特異的に結合することができる、抗TIGR抗体もしくはその抗原結合断片、または単鎖抗原結合分子もしくはその抗原結合断片。

【請求項 8】

検出可能に標識されている、請求項 7 記載の抗体もしくはその抗原結合断片、または単鎖抗原結合分子もしくはその抗原結合断片。

【請求項 9】

配列番号 3 の配列によりコードされる mRNA および 配列番号 1 の配列からなる小柱網誘導グルココルチコイド応答 (TIGR) タンパク質からなる群より選ばれる分子の濃度を分析する方法であって、患者から取得した細胞および/または体液の試料中の、該分子の濃度を分析して患者分子濃度を得ることを含む、前記方法。

【請求項 10】

前記体液が緑内障性細胞の抽出物、前眼房液、血液、リンパ液および血清よりなる群から選ばれる請求項 9 記載の方法。

10

【請求項 11】

前記分子が配列番号 3 の配列によりコードされる mRNA 分子である請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】

前記濃度をポリメラーゼ連鎖反応を用いて分析する請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記分子が配列番号 1 の配列からなる小柱網誘導グルココルチコイド応答 (TIGR) タンパク質である請求項 9 記載の方法。

【請求項 14】

前記濃度を免疫検定を用いて分析する請求項 13 記載の方法。

20

【請求項 15】

前記体液が血液、血清、涙液および血漿からなる群より選ばれる請求項 9 記載の方法。

【請求項 16】

前記患者分子濃度を、緑内障に罹患しておらず、かつ緑内障に罹患する素因を持っていない者から得た分子濃度と比較する、請求項 9 記載の方法。

【請求項 17】

患者分子濃度が、緑内障に罹患しておらず、かつ緑内障に罹患する素因を持っていない者から得た分子濃度と異なる場合に、前記患者は緑内障に罹患していると決定する、請求項 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

発明の分野

本発明は診断学の分野に属し、緑内障および関連疾患の診断のための方法および試薬に関する。本発明は政府基金 (NIH EY02477 および NIH EY08905-02) により援助されたものである。政府は本発明に一定の権利を有する。

本発明の背景

「緑内障」は米国および他の先進国における予防可能な失明の主な原因である衰弱性の眼病である。原発開放角緑内障 (「POAG」) は緑内障で最もよくみられる形態である。この疾患は、小柱網の変質を特徴とし、これは、虹彩と角膜の間の空間 (即ち「角度」) を閉塞させずに眼を保つという房水の通常的能力に支障をきたすものである (Vaughan, D. 等、General Ophthalmology, Appleton & Lange, Norwalk, CT, 213-230 (1992) 参照)。この疾患におけるこのような障害の特徴は、眼内圧 (「IOP」) の上昇であり、これは適切な時期に適切な治療を行わないと進行性の視力の損失および失明に至る。

40

この疾患は 40 才以上の全成人の 0.4 ~ 3.3% がかかると推定されている (Leske, M.C. 等, Amer. J. Epidemiol. 113:1843-1846 (1986); Bengtsson, B., Br. J. Ophthalmol. 73:483-487 (1989); Strong, N.P., Ophthalm. Physiol. Opt. 12:3-7 (1992))。さらに、この疾患の有病率は年とともに上昇し、75 才以上の人の 6% を占める (Strong, N.P., Ophthalm. Physiol. Opt. 12:3-7 (1992))。

患者のグルココルチコイドに対する IOP 応答と、POAG 疾患との関連が以前から疑われてきた。局所グルココルチコイド試験に対して正常な人の 5% が高い IOP 上昇 (16 mmHg) を示すだけなのに対し、POAG 患者の 90% 以上がこの応答を示す。加えて、原発開放角緑内障は

50

グルココルチコイドに暴露することによって生じるのかもしれない。この観察は、小柱網細胞における高い、即ち異常なグルココルチコイド応答がPOAGに関連するかもしれないことを示唆した (Zhan, G.L. et al., *Exper. Eye Res.* 54:211-218 (1992); Yun, A.J. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30:2021-2022 (1989); Clark, A.F., *Exper. Eye Res.* 55:265 (1992); Klemetti, A., *Acta Ophthalmol.* 68:29-33 (1990); Knepper, P.A., 米国特許 4,617,299)。

グルココルチコイドが緑内障様の症状を引き起こす力を有するため、グルココルチコイドに応答して小柱網の細胞により誘導される遺伝子または遺伝子産物を同定する努力がなされた (Polansky, J.R. et al., *Glaucoma Update IV*, Springer-Verlag, ベルリン, pp.20-29 (1991))。デキサメタゾンへの短時間暴露を用いた初期の努力は、特定の蛋白合成における変化を明らかにしただけであった。しかし、比較的高濃度のデキサメタゾンへの長時間の暴露は、関連する66kDおよび55kDタンパク質の発現 - これはゲル電気泳動により目で確認できる - を誘導することが見いだされた (Polansky, J.R. et al., *Glaucoma Update IV*, Springer-Verlag, Berlin, pp.20-29 (1991))。これらのタンパク質の誘導動力学、およびその用量応答特性は、ヒト患者におけるステロイドによるIOP上昇に必要なものの動力学に類似している (Polansky, J.R. et al., *Glaucoma Update IV*, Springer-Verlag, Berlin, pp.20-29 (1991))。精製過程におけるタンパク質の凝集および明らかな不安定さまたは損失の問題は、直接タンパク質の配列を決定する際に障害となった。

高いIOPは、緑内障の測定容易な特徴であるので、この疾患の診断は眼圧の測定により広くスクリーニングされる (眼圧測定法) (Strong, N.P., *Ophthalm. Physiol. Opt.* 12:3-7 (1992); Greve, M., et al., *Can. J. Ophthalmol.* 28:201-206 (1993))。あいにく、緑内障と正常の眼圧は重複するので、複数の読みが得られない場合に、このような方法がある程度有効である (Hitchings, R.A., *Br. J. Ophthalmol.* 77:326 (1993); Tuck, M.W., et al., *Ophthalmol. Physiol. Opt.* 13:227-232 (1993); Vaughan, D. et al., *General Ophthalmology*, Appleton & Lange, Norwalk, CT, pp.213-230 (1992); Vernon, S.A., *Eye* 7:134-137 (1993)。このため、診断の正確さを改善するために、視神経円板の直接検査や患者の視野の程度の測定などの方法をさらに加えることがよく行われている (Greve, M., et al., *Can. J. Ophthalmol.* 28:201-206 (1993))。

緑内障の重大さ、および従来の診断方法が少なくとも一部不適切であることから、緑内障を診断するための改善されたより正確な方法が望ましいであろう。本発明はこのような改善された診断薬および診断方法を提供する。

本発明の要約

本発明は、ヒト小柱網の内皮内層細胞においてグルココルチコイドにより多量誘導されることが見いだされた新規なペプチド配列に関する。このタンパク質のcDNA、タンパク質自身、それに結合する分子、およびそれをコードする核酸分子は、緑内障および関連疾患、およびその他の疾患や状態 - 例えば心血管疾患、免疫疾患またはこのタンパク質の発現や活性に影響するその他の疾患や状態など - を診断するための改善された方法および試薬を提供する。実際、本発明の分子は、細胞外タンパク質の発現における変化を特徴とする疾患や状態の診断に用いてもよい。さらに、その細胞性機能とDNA結合性により、本発明の分子をそれらの機能を特徴とする疾患や状態の診断に用いてもよい。

クローンは、その分離の操作中に「II.2」と命名され、次いで「TIGR」(小柱網誘導グルココルチコイド応答)タンパク質と新たに命名された。

詳しくは、本発明は配列番号1の残基1 - 497または15 - 197の配列を有する、実質的に精製されたTIGRタンパク質を提供する。

本発明はさらに、TIGRタンパク質をコードする核酸分子、殊に配列番号2または配列番号3の配列を含む核酸分子を提供する。

本発明はまた、TIGRタンパク質に特異的に結合しうる抗体も提供する。

本発明はまた、患者の緑内障の診断方法であって、該患者の眼の小柱網に存在するTIGRタンパク質の量が、緑内障に罹患していない者の眼の小柱網に存在するTIGRタンパク質の量を超過しているか否かを決定することからなり、該TIGRタンパク質の増大量の検出が緑内障

の指標となることを特徴とする診断方法も提供する。

本発明はさらに、個人の眼の小柱網に存在するTIGRタンパク質の量を定量的にあるいは定性的に決定し、そしてその量が、緑内障に罹患していない者の眼の小柱網に存在するTIGRタンパク質の量を超過しているか否かを決定する方法であり、該TIGRタンパク質の増大量の検出が緑内障の指標となることを特徴とする方法も提供する。

【図面の簡単な説明】

図1A～1Dは、TIGRタンパク質のアミノ酸配列およびTIGRタンパク質をコードするcDNAの配列を提供する。

発明の詳細な記載

1. 発明の概要

上に示したように、これまでに、小柱網が房水の正常な流れにおいて重要な役割を果たしていることが提案され、また緑内障の眼において流出抵抗の主要な部位であることが推定されていた。ヒト小柱網（HTM）細胞は、房水が眼から出ていくための流出経路を覆う内皮様細胞であり、その細胞の変質した合成機能がステロイド緑内障およびその他の種類の緑内障の病因に関連しているかもしれない。これらの細胞を持続的にステロイド処理することは興味深い、というのは、1～2日のグルココルチコイド（GC）暴露に比べて重要な違いが見られ、これはステロイド緑内障の臨床的開始（1～6週間）に関連すると思われるからである。数十年の研究にもかかわらず、本発明前には、緑内障に対する分子レベルでの基礎は確立していなかった（Synder, R.W. et al., *Exper. Eye Res.* 57:461-468 (1993); Wiggs, J.L. et al., *Genomics* 21:299-303 (1994)）。

小柱網細胞がグルココルチコイドに応答して特異的タンパク質を誘導することが見出されていた（Polansky, J.R., *Schriftenreihe de Akademie der Wissenschaften und der Literature*, Mainz, 307-318 (1993) 参照）にもかかわらず、発現したタンパク質を精製する努力は、不溶性やその他の問題により妨げられていた。Nguyen, T.D. 等（*Schriftenreihe de Akademie der Wissenschaften und der Literature*, Mainz, 331-343 (1993) : 参照としてここに援用する）は、グルココルチコイド誘導ヒト小柱網細胞から多量に誘導されたmRNA種を分離するために分子クローニング法を用いた。このmRNAは、グルココルチコイド誘導タンパク質に似た誘導の経過を示す。クローンは「11.2」と命名された。

本発明は、分離された11.2クローンが、グルココルチコイドに暴露されると小柱網細胞中に誘導される新規分泌性タンパク質（「小柱網誘導グルココルチコイド応答」タンパク質、即ち「TIGR」と命名された）をコードするという認識に一部基づいている。このタンパク質が小柱網の細胞外空間に生じ、小柱網を覆う内皮細胞の表面に結合し、このようにして房水の流出の減少を引き起こすかもしれないことが提案されてきた。定量的ドットプロット分析およびPCR評価により、TIGR mRNAは経時的に徐々に誘導され、一方、他の系由来でHTM細胞にみられる他の既知のGC誘導物質（メタロチオニン、アルファ-1酸性糖蛋白およびアルファ-1アンチキモトリプシン）は、1日またはそれ以下で最大量に達することが分かった。特に興味深いのは、このクローンの誘導レベルが非常に高く（全細胞性mRNAの4～6%）、対照レベルはPCR法なしでは検出不可であったことである。³⁵Sメチオニン細胞標識の研究によれば、クローンはこれらの細胞において主なGC誘導細胞外糖蛋白 - これは推定イノシトールリン酸アンカーを持つシアレン化（sialenated）N-グルコシル化分子である - に最近見いだされた特徴を有する。TIGR RNAの誘導は全細胞性mRNAの4%に達した。mRNAは10日間のデキサメタゾン処理の間徐々に増加した。

11.2クローンは2.0kbであり、一方ノーザンブロッティングでは2.5kbのバンドを示す。ポリAテイルを含まないにもかかわらず、クローンの3'末端は2つの共通ポリアデニル化シグナルを含んでいる。サザン分析では2つのグループのゲノム配列が示され、2つのゲノミッククローンが分離された。ゲノムプローブを用いたin-situハイブリダイゼーションにより染色体1,p36および12,p13,p15上の遺伝子位置を示す。GCの不在下および存在下でのシクロヘキサミド処理の研究により、TIGRの誘導はGC受容体以外の因子も必要とするかもしれないことが示唆される。TIGR遺伝子は、H₂O₂、TAP、グルコースおよび熱などの刺激剤によっても誘導されるので、細胞性ストレス応答にも関連しているかもしれない。

10

20

30

40

50

この事実は緑内障の発病および治療に関係するかもしれない。

TIGRのアミノ酸配列、TIGRをコードするcDNA配列、およびこのコード領域を含む2.0kbのヌクレオチド配列を図1A～1Dに示す。TIGRのアミノ酸配列は図1A～1D（および配列番号1）に示される。配列番号2のヌクレオチド配列は図1A～1Dに示されるTIGRcDNA分子の配列である。図1A～1DにTIGRタンパク質をコードするとして示された配列番号2の一部は配列番号3として示される。

TIGRの一次構造はATG開始部位（配列番号2の残基1）から始まり、2番目のATG（配列番号2の残基15）で20個のアミノ酸の共通シグナル配列を含むが、これはこのタンパク質が分泌性タンパク質であることを示す。このタンパク質はN-グリコシル化部位を含み、これは分子中最も親水性な領域に位置する。タンパク質のアミノ末端部分は、そのヒドロパシープロファイルおよびガーニール-ロビンソン（Garnier-Robinson）構造分析により示されるように、高度に極在化し（polarized）、アルファヘリックス構造をとる。一方、このタンパク質はそのカルボキシ末端近辺では25個のアミノ酸からなる疎水性領域を含む。この領域はGIP固定化（アンカリング）配列を構成しているかもしれない。このように、本発明は2種のTIGRタンパク質、即ちTIGRおよびプロセスドTIGRに関する。

TIGRタンパク質はまた、その分子中に5個の推定O-結合グリコシル化部位を含む。「ロイシンジッパー」領域は、タンパク質-タンパク質結合を生じさせるらせん構造を決めている（一般論としてTso, J.Y. et al., PCT出願W093/11162; Land, K.H. et al., PCT出願W093/19176参照）。TIGRタンパク質は7つのロイシンジッパー単位を含む。ジッパー領域の存在は、TIGR分子が互いに結合して巨大分子凝集を可能にする手段を提供する。この分子のHTM細胞への特異的結合（繊維芽細胞へは結合しない）を示す研究により、これがHTM組織における流出経路に影響して、緑内障およびその関連疾患の特徴である高い眼圧を生じさせようという考えが支持される。TIGRタンパク質はまた、バキュロウィルス系およびSf9昆虫細胞を用いてうまく発現させることができた。主要な組み換えタンパク質は、TIGRcDNAによりコードされる2種の55kd細胞性タンパク質である。これらのタンパク質から製造される抗体は、デキサメタゾン処理HTM細胞および器官培養系において、細胞性55kdタンパク質およびこれらのタンパク質の分泌66kdグリコシル化型の両者を認識する。緑内障組織標本のin-situ分析により、正常対照に比較してこのタンパク質の高い発現レベルが示される。

TIGR分泌性タンパク質の存在、誘導およびレベルは、グルココルチコイドが緑内障を引き起こす兆候および動力学を反映し、この分泌性タンパク質のグルココルチコイドにより誘導される発現は、緑内障および関連疾患の分子基盤を構成する。このような分子基盤の理解により緑内障および関連疾患の診断試薬を決めることができる。

II. 本発明の好ましい試薬

ここで用いた「緑内障」の用語は、当分野で認められている通りの意味であり、原発緑内障、続発緑内障および家族性（即ち、遺伝性）緑内障を含む。本発明の方法は特に、POAG、OAG、若年性緑内障および遺伝性緑内障の診断に関連する。緑内障の症状 - 例えば房水流出抵抗による高い眼圧 - を有するか示す場合、その疾患または状態は緑内障に関連すると言える（Vaughan, D. et al., General Ophthalmology, Appleton & Lange, Norwalk, CT, PP.213-230（1992））。本発明の好ましい試薬を以下に詳細に述べる。

本発明の試薬は、緑内障に罹患した患者（緑内障患者）において緑内障およびその関連疾患の存在およびその程度を診断するのに用いることができる。このような試薬は天然でも非天然でもよい。ここでいう、天然の分子とは、所望により「実質的に精製された」ものであればよく、これは、その分子を含む天然の調製物中に存在するもしくは存在しているかもしれない1またはそれ以上の分子が除去されるか、あるいは通常見いだされるであろうよりも低い濃度で存在するようにしたものである。

本発明の試薬は好ましくは、核酸の別の核酸分子へのハイブリダイズ能などの構造上の特性、あるいはタンパク質の抗体結合能（またはこのような結合を別の分子と競合する能力）のいずれかに関して「生物学的に活性」であるのが好ましい。あるいは、このような特性は触媒的であってもよく、従って試薬の化学反応または応答を媒介する能力をも含む。

本発明の試薬は核酸分子、タンパク質および有機分子を含む。

A. 核酸分子

本発明の試薬の好ましい種類はTIGR核酸分子（「TIGR分子」）を含む。かかる分子はDNA、RNAのいずれであってもよい。

1つの態様において、この核酸分子はTIGRタンパク質の全部もしくは断片をコードするもの、その「プロモーター」またはそのフランキング遺伝子配列である。ここで用いた「プロモーター」の用語は、mRNA産生を制御する調節配列という広い意味で用いられる。かかる配列にはRNAポリメラーゼ結合部位、グルココルチコイド応答要素、エンハンサーなどがある。かかるTIGR分子はすべて緑内障の存在および緑内障の程度を診断するのに用いられる。

10

TIGR核酸分子断片は、TIGRタンパク質の重要な部分または実際殆どの部分をコードすればよい。あるいは、この断片はより小さいオリゴヌクレオチド（約15～約250ヌクレオチド残基、より好ましくは約15～約30ヌクレオチド残基）からなっているてもよい。このようなオリゴヌクレオチドはTIGRmRNAのプロープとして用いてもよい。この目的には、オリゴヌクレオチドはTIGR核酸分子に特異的にハイブリダイズ可能でなければならない。ここでは、2つの核酸分子が逆平行の二重鎖核酸構造を形成し、一方非TIGR核酸分子とインキュベートした場合に二重鎖を形成できない場合に、この2つの核酸分子は互いに特異的にハイブリダイズすると言う。ある核酸分子が別の核酸分子の「相補鎖」であるというのは、それらが完全な相補性を示す場合である。ここでは、分子の一方のヌクレオチドすべてが他方のヌクレオチドと相補的である場合に、これらの分子は完全な相補性を示すという。2つの分子が少なくとも慣用の「厳しくない（低ストリンジェンシー）」条件下で互いにアニールできる程度に互いに十分安定的にハイブリダイズできる場合に、これらは「最低限の相補性を有する」という。同様に、分子が少なくとも慣用の「厳しい（高ストリンジェンシー）」条件下で互いにアニールできる程度に互いに十分安定的にハイブリダイズできる場合に、これらは「相補性である」という。慣用のストリンジェンシー条件は、Sambrook, J. 等（Molecular Cloning, a Laboratory Manual第2版, Cold Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)）およびHaymes, B.D. 等（Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington (1985)）- 両者とも参照として援用 - により記載されている。従って、分子が二重鎖構造を形成する能力が完全に除かれるのではないが、完全相補性からはずれることも許容される。このように、オリゴヌクレオチドがプライマーとして働くためには、特定の溶媒および塩濃度の使用のもとで安定な二重鎖構造を形成できる程度に十分な配列の相補性があればよい。

20

30

これらのオリゴヌクレオチドは、その診断用途に加え、他のTIGR核酸分子を得るのに用いてもよい。かかる分子には、ヒト以外の動物（特にネコ、サル、ネズミおよびイヌ）のTIGRコーディング核酸分子、その断片、またそれらのプロモーターおよびフランキング配列がある。これらの分子は、上記プライマーを用いて、ヒト以外の種から得られたcDNAもしくは遺伝子ライブラリーをスクリーニングして容易に得ることができる。このようなライブラリーを作成する方法は当分野でよく知られている。安定なハイブリダイゼーションに完全な相補性は必要ないので、上記類似物は、そのヌクレオチド配列において配列番号1のものとは異なることがある。従って、本発明のTIGR核酸分子は、TIGR核酸分子とは特異的にハイブリダイズすることができるが「完全な相補性」はなくてもよい分子も含む。

40

上記核酸分子を得るために種々のいかなる方法を用いてもよい。TIGRタンパク質もしくはTIGRcDNAの全部または任意の一部を合成するのに配列番号2を用いることもできる（Zamechik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 83:4143 (1986); Goodchild, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5507 (1988); Wickstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:1028; Holt, J.T. et al., Molec. Cell. Biol. 8:963 (1988); Gerwitz, A.M. et al., Science 242:1303 (1988); Anfossi, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:3379 (1989); Becker, D., et al., EMBO J. 8:3679 (1989); これらの文献はすべて参照として援用される）。この目的のために自動核酸合成機を使用できる。このような合成の代わりに、開示された配列番号2を用いて、TIGRをコードす

50

る所望のDNA分子もしくは断片を増幅して得るためにポリメラーゼ連鎖反応 (Mullis, K. et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273 (1986); Erlich H. et al., EP 50,424; EP 84,796; EP 258,017, EP 237,362; Mullis K., EP 201,184; Mullis K., et al., US 4,683,202; Erlich H. US 4,582,788; およびSaiki, R. et al., US 4,683,194)) で使用できる一対のプライマーを決めてもよい。

本明細書で提供された配列番号 2 を用いて、TIGRプロモーター配列およびTIGRフランキン
グ配列を得ることもできる。1つの態様では、これらの配列はTIGRオリゴヌクレオチドの
オリゴヌクレオチドプローブをヒト遺伝子ライブラリーとともにインキュベートし、プロ
ープにハイブリダイズするクローン回収することにより得られる。第2の態様では、この
ような配列を得るために、「染色体歩行 (chromosome walking)」または3' もしくは5' 10
RACEを使用してもよい (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:8
998-9002 (1988); Ohara, O. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:5673-5677 (1
989)) 。

B. TIGRタンパク質およびペプチド

第2の好ましい種類の試薬 (「TIGR分子」) はTIGRタンパク質、そのペプチド断片、融合
タンパク質および類似体を含む。ここで用いた「TIGRタンパク質」の用語は、配列番号 1
のアミノ酸配列を有するタンパク質を意味する。TIGRタンパク質は化学合成により、また
はより好ましくは適宜細菌もしくは真核生物の宿主中でTIGRをコードするcDNAを発現させ
ることによって製造できる。最も好ましくは、TIGRをコードするかかるcDNAの副配列を用
いればよい (配列番号 3)。あるいは、図1A~1Dに示される全cDNA (配列番号 2) を用い 20
てもよい。発現のために適した方法は、Sambrook, J., et al., Molecular Cloning, a La
boratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York
(1989)) または類似のテキストに記載されている。

「TIGR断片」は、そのアミノ酸配列がTIGRタンパク質のアミノ酸配列のサブセットから
なるペプチドもしくはポリペプチドである。1またはそれ以上の非TIGRペプチド領域をさ
らに含むTIGRタンパク質もしくはその断片は、「TIGR融合」タンパク質である。かかる分
子は、炭水化物もしくは他の部分 (キーホールリンペットヘモシアニン等) を含むように
誘導体化してもよい。TIGRタンパク質の場合のように、本発明の断片および融合物は、組
み換え手段によって製造するのが好ましい。

TIGR分子の類似体は、必須でないか、あるいは関連しないアミノ酸残基が加えられ、置換 30
され、もしくは欠失したTIGRタンパク質、断片または融合物からなる。かかる類似体の 1
例は、霊長類、イヌ、ネコ等のヒト以外の種のTIGRタンパク質である。かかる類似体は種
々の方法のいずれによっても容易に得られる。最も好ましくは、上記したように開示され
た配列番号 2 を用いて、所望の任意の種よりTIGRをコードする分子を分離するのに用いる
一対のプライマーを決めればよい。かかる分子を発現させて、組み換え手段によりTIGR類
似体を製造することができる。

C. TIGRに対して反応性の抗体

本発明の1面は、TIGRタンパク質もしくはその類似体、融合物または断片に特異的に結合
する抗体、一本鎖抗原結合分子、またはその他のタンパク質に関する。かかる抗体は「抗
-TIGR抗体」であり、緑内障およびその関連疾患の診断に用いられる。ここで、抗体もし 40
しくはペプチドがTIGRに「特異的に結合している」というのは、この結合が非-TIGR分子の
存在によって競合的に阻害されない場合である。

TIGRタンパク質の全部または一部をコードする核酸分子を、組み換え手段によって発現さ
せ、TIGRタンパク質またはペプチドを産生させることができ、次いでこれをTIGRに結合し
うる抗体を産生させるのに用いることができる。かかる抗体は緑内障の免疫診断分析に用
いることができる。かかるTIGRコーディング分子またはその断片は、発現したときに融合
タンパク質が生産されるように「融合」分子 (即ち、より大きい核酸分子の一部) であっ
てもよい。

TIGRタンパク質およびタンパク質断片に特異的に結合する抗体はポリクローナルでもモノ
クローナルでもよく、また完全な免疫グロブリン、免疫グロブリンの抗原結合部分 (F(a 50

b')、F(ab')₂断片など)あるいは、例えば組み換え技術により生産しうる一本鎖免疫グロブリンからなっているてもよい。

マウスのモノクローナル抗体が特に好ましい。BALB/cマウスがこの目的には好ましいが、同等の株もまた使用できる。動物は好ましくは、適宜アジュバント (TiterMaxアジュバント (Vaxcel, Norcross, GA) など) で乳化しておいた約25 µg の精製TIGRタンパク質 (またはその断片) で免疫する。免疫は筋肉内部位2ヵ所、腹腔内1ヵ所および尾基部の皮下注射1ヶ所で行うのが好ましい。3週間後、通常の生理食塩水中の約25 µg の抗原の静脈注射を追加した行うのが好ましい。2回目の注射の11日後、マウスから採血し、血液を抗-TIGR抗体の存在についてスクリーニングする。好ましくはこの目的には直接結合ELISAを用いる。

10

最も好ましくは、最も高い抗体価を有するマウスに、TIGRタンパク質または断片約25 µg を静脈注射する (3回目)。この動物からの脾臓白血球を3日後に回収し、次いで最も好ましくはポリエチレングリコールを用いて適宜ミエローマ細胞系 (例えばP3×63Ag8.653ミエローマ細胞系) と融合させる。約1週間「HAT」 (ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミン) セレクションをかけて細胞を培養することによりハイブリドーマ細胞を選択する。得られたクローンを次いでTIGRタンパク質に対するモノクローナル抗体 (mAbs) の産生能を好ましくは直接ELISAによりスクリーニングすればよい。

1つの態様において、抗-TIGRモノクローナル抗体はTIGR融合物またはコンジュゲートを免疫原として用いて分離する。このように、例えば1群のマウスをフロイント完全アジュバントで乳化したTIGR融合タンパク質を用いて免疫できる (免疫1回につき約50 µg の抗原)。3週間の間隔で同量の抗原をフロイント不完全アジュバントで乳化し、動物の免疫に用いる。3回目の免疫の10日後、血清サンプルを採取し、抗体の存在を評価する。抗体価が低すぎる場合は、4回目のブースターを用いることができる。1:5,000希釈でTIGRに結合しうるポリセラムこの方法を用いて得ることができる。

20

モノクローナル抗体を得る好ましい操作では、上記免疫マウスの脾臓をとり、破碎し、免疫脾臓細胞をフィコール (ficoll) 勾配で分離する。この分離した脾臓細胞をポリエチレングリコールを用いてBALB/c由来のHGPRT (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) 欠損P3×63×Ag8.653プラズマサイトーマ細胞と融合させる。融合細胞を96ウェルマイクロタイタープレートに入れ、約2~3週間のヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを添加した培地での増殖能によってハイブリドーマ融合細胞をスクリーニングする。融合を受けた10⁶個の脾臓細胞から平均1個の変異ハイブリドーマが生じる。典型的脾臓は5~10×10⁷脾臓細胞を産生する。

30

上記インキュベーションから生じるハイブリドーマ細胞は、TIGRタンパク質に結合する免疫グロブリンの生産能によってスクリーニングするのが好ましい。この目的には間接ELISAを用いればよい。簡単に言えば、ハイブリドーマの上清を固定したTIGRタンパク質を含むマイクロタイターウェルでインキュベートする。洗浄後、結合免疫グロブリンの力価を、例えばセイヨウワサビのパーオキシダーゼに結合したヤギ抗-マウス抗体を用いて決定できる。さらに洗浄後、固定化酵素を定量する (例えば発色性基質を用いて)。かかるスクリーニングは、望ましいクローンが非分泌性の隣接物によって過増殖しないように、ハイブリドーマの同定後できるだけ早く行う。ハイブリドーマの増殖率は変化するので融合プレートを数回スクリーニングするのが望ましい。好ましい下位の態様では、異なる抗原型のTIGRをハイブリドーマのスクリーニングに用いてもよい。このように、例えば脾臓細胞を1種のTIGR免疫原で免疫してもよいが、得られるハイブリドーマは異なるTIGR免疫原を用いてスクリーニングできる。

40

以下に説明するように、上記抗体分子またはその断片は診断目的に用いられる。抗体が診断目的の場合は、例えばリガンド基 (ビオチンなど) または検出可能なマーカース基 (蛍光基、ラジオアイソトープもしくは酵素) でそれらを誘導体化しておくのが望ましいことがある。

TIGR分子に結合する抗体を産生する能力により、TIGRの模倣化合物を同定できる。TIGRの「模倣化合物」はTIGRもしくはTIGR断片ではないが、抗-TIGR抗体に特異的に結合する能

50

力を示すものである。このような分子は、抗-TIGR抗体を生産するのに使用でき、従って緑内障および関連疾患の診断の補助に使用されることもある。

III. 緑内障および関連疾患の診断における本発明分子の使用

本発明の特に望まれる用途は、緑内障、POAG、色素性緑内障、高眼圧緑内障および低眼圧緑内障ならびにそれらの関連疾患の診断に関する。ここで用いた「緑内障」という用語は、緑内障、POAG、色素性緑内障、および低眼圧緑内障ならびにそれらの関連疾患を意味する。上述したように、緑内障の診断方法は不正確であるという欠点があるか、または何回もの検査が必要である。本発明の分子は緑内障の優れた検定法を規定するのに使用することができる。かかる使用法から全く離れて、本発明の分子は、グルココルチコイドまたはコルチコステロイドのようなステロイドの投与による眼圧上昇に対する個人の感受性を診断または予測するのにも使用できる。デキサメタゾン、コルチゾールおよびプレドニゾロンがこの用途に好ましいステロイドである。炎症性およびアレルギー性の障害といった医学症状、ならびに器官移植を受けた患者は、グルココルチコイドによる治療が有効である。しかし個人によっては、かかるステロイドに対して高い感受性（即ち、ステロイド敏感症）を示し、それにより眼圧の望ましくない上昇が現れる。本発明はかかる感受性ならびに緑内障および関連疾患を診断または予測することができる。

第1の態様では、本発明のTIGR分子を用いて、個人が、TIGR発現のレベル（即ち、サンプル中のTIGR mRNAもしくはタンパク質の濃度等）またはパターン（即ち、発現の動力学、分解の速度、安定性プロファイル等）（細胞または体液の「TIGR応答」と総称する）に影響する突然変異（例えば、TIGR遺伝子の突然変異、またはTIGRの発現を制御もしくはこれに影響する調節領域または他の遺伝子の突然変異）を持っているか否かを決定し、そして緑内障、関連疾患もしくはステロイド敏感症に対する素因（疾病素質）を持っているかも知れない個人を予測する。ここで用いた細胞または体液に現れるTIGR応答とは、正常な個人の細胞または体液のTIGR応答と異なっているなら「変質」とであると言える。かかる変質は、異常に高いか、または異常に低いTIGR応答として現れることがある。TIGR応答が変質しているか否かを決定するには、患者の細胞または体液に現れるTIGR応答を正常な個人の類似の細胞サンプル（または体液サンプル）と比較する。かかる比較を行うごとに正常な個人の細胞サンプル（または体液サンプル）のTIGR応答を再決定する必要はなく、特定の個人のTIGR応答を既に得られた正常な個人の値と比較すればよいことは理解されよう。

1つの下位態様において、かかる分析は、緑内障に関連する、または緑内障、関連疾患、もしくはステロイド感受性に対する素因に関連するTIGR遺伝子もしくはそのフランキン

領域における多形性の存在および/または実体を決定することにより行われる。多様な分子のいずれもかかる多形性を同定するのに使用できる。1態様において、TIGR cDNA配列（またはそのサブ配列を）をかかる多形性を同定するためのマーカー核酸分子として使用することができる。或いは、かかる多形性の検出は、この多形性に遺伝的に関連するマーカー核酸分子またはマーカータンパク質〔即ち、この多形性と共分離（co-segregate）するポリヌクレオチド〕を用いて行うこともできる。上述したように、TIGR遺伝子は、染色体1のp36、ならびに染色体10, 11もしくは12のp13, q15にマップされている。この態様の好ましい側面では、かかるマーカー核酸分子はかかる多形性に密接に遺伝的に関連したポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を有していよう（例えば、染色体1, pおよび染色体12, p、ならびにより好ましくは染色体1, p34-p38および染色体12, p11-p17に位置するマーカー）。かかる位置にマップされるポリヌクレオチドマーカーは周知であり、かかる多形性を同定するのに使用することができる。

別の態様において、上記の多形性の検出は、かかる多形性に物理的に結合するマーカー核酸分子を使用して行うことができる。この目的には、この多形性の1mb以内、より好ましくはこの多形性の100kb以内、最も好ましくはこの多形性の10kb以内に位置するポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むマーカー核酸分子を使用することができる。

動物および植物のゲノムは、その引き続いている進化の過程で当然に自然突然変異を受ける〔Gusella, J.F., Ann. Rev. Biochem. 55:831-854 (1986)〕。

TIGR遺伝子またはそのフランキン領域における「多形性」は、或る1つの種の構成体の

一部に生ずるTIGR遺伝子またはそのフランキング領域の配列の変異または変化である。この変異配列と「元の」配列とはその種の集団に共存している。場合によっては、このような共存は安定または準安定な平衡状態にある。

このように、多形性の存在によって、或る1つの種の一部の構成体は元の配列〔即ち、元の「対立遺伝子」(allele)〕を持ち、別の構成体は変異配列(即ち、変異「対立遺伝子」)を持つことがある点で、多形性はアレリック(allelic)と呼ばれる。最も単純な場合には、変異配列が1つだけ存在し、従って多形性はジアレリック(di-allelic)であると呼ばれることがある。別の場合には、その種の集団が複数の対立遺伝子(アレレ)を含むことがあり、多形性はトリアレリック等と呼ばれる。1つの遺伝子が関連性のない複数の異なる多形性を持つことがある。例えば、この遺伝子が一方の部位ではジアレリックの多形性を、別の部位ではポリアレリックな多形性を持つことがある。

多形性を規定する変異は、一つのヌクレオチドの変異から1遺伝子内の長い領域の挿入または欠失までの範囲に及びうる。場合により、DNA配列の変異はヌクレオチドの縦列(tandem)ジまたはトリ-ヌクレオチド反復モチーフを含む短い縦列反復(STRs)により特徴づけられるゲノムの領域内にある。かかる縦列反復により特徴づけられる多形性は、可変数縦列反復(variable number tandem repeats, "VNRP")多形性と呼ばれる。VNRS多形性は、同定と血縁関係(paternality)の分析に使用されてきた〔Weber, J.L., 米国特許No.5,075,217; Armour, J.A.L. et al., FEBS Lett. 307:113-115 (1992); Jones, L. et al., Eur. J. Haematol. 39:144-147 (1987); Horn, G.T. et al., PCT 出願WO91/14003; Jeffreys, A.J., 欧州特許出願370,719; Jeffreys, A.J., 米国特許No.5,175,082; Jeffreys, A.J. et al., Amer. J. Hum. Genet. 39:11-24 (1986); Jeffreys, A.J. et al., Nature 316:76-79 (1985); Gray, I.C. et al., Proc. R. Acad. Soc. Lond. 243:241-253 (1991); Moore, S.S. et al., Genomics 10: 654-660 (1991); Jeffreys, A.J. et al., Anim. Genet. 18:1-15 (1987); Hillel, J. et al., Anim. Genet. 20:145-155 (1989); Hillel, J. et al., Genet. 124:783-789 (1990)〕。

DNAサンプル中の多形性部位の検出は、核酸増幅法の使用により容易になることがある。かかる方法は多形性部位にわたる、またはその部位とその遠方または近接位置にある配列とを含むポリヌクレオチドの濃度を特異的に増大させる。こうした増幅された分子はゲル電気泳動または他の手段により容易に検出することができる。

かかる増幅を達成する最も好ましい方法は、多形性をその二本鎖形態内に規定する近接配列にハイブリダイズすることができるプライマー対を使用したポリメラーゼ連鎖反応("PCR") (Mullis, K. et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273 (1986); Erlich H. et al., 欧州特許出願50,424; 欧州特許出願84,796; 欧州特許出願258,01724; 欧州特許出願237,362; Mullis, K. 欧州特許出願201,184; Mullis, K. et al., 米国特許No.4,683,202; Erlich, H. 米国特許No.4,582,788; およびSaiki, R. et al., 米国特許No.4,683,194)を採用する。

PCRの代わりに、「リガーゼ連鎖反応」("LCR")のような別の方法を使用することもできる〔Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:189-193 (1991)〕。LCRは、特定の標的を指数的に増幅させるために2対のオリゴヌクレオチドプローブを使用する。オリゴヌクレオチドの各対の配列は、その対が標的の同じ鎖の隣接する配列にハイブリダイズすることができるように選択する。かかるハイブリッド形成は鋳型依存性リガーゼに対する基質を形成する。PCRの場合と同様に、こうして得られた産物は次のサイクルにおいて鋳型として作用し、所望の配列の指数増幅が得られる。

LCRはある多形性部位の同じ鎖の近接および遠方配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて行うことができる。1態様において、いずれかのオリゴヌクレオチドは、その多形性の実際の多形性部位を含むように設計されよう。かかる態様では、標的分子がそのオリゴヌクレオチドに存在する多形性部位に対して相補性の特異的ヌクレオチドを含有するか、または欠損するかのいずれかの場合だけに2つのオリゴヌクレオチドが一体に連結することができるように反応条件を選択する。或いは、2つのオリゴヌクレオチドはこれらが多形性部位を含まないように選択することもできる (Segev, D., PCT出願WO 90/01069参照)。

「オリゴヌクレオチド連結アッセイ」("OLA")も別の方法として採用することができる [Landegren, U. et al., Science 241:1077-1080 (1988)]。このOLAプロトコルは、標的の単一鎖の隣接配列にハイブリダイズすることができるように設計された2つのオリゴヌクレオチドを使用する。LCRと同様にOLAも特に点突然変異の検出に適している。しかし、LCRと異なり、OLAは標的配列の指数増幅ではなく「直線」増幅を生ずる。

Nickerson, D.A. らは、PCRおよびOLAの属性を組合わせた核酸検出アッセイ法を提案した [Nickerson, D.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87:8923-8927 (1990)]。この方法では、PCRを用いて標的DNAの指数増幅を行い、次いでこのDNAをOLAを用いて検出する。複数の別個の処理工程が必要となる上、この組合わせに伴う1つの問題点は、PCRとOLAに付随する問題点の全てを引き継いでいることである。

2 (またはそれ以上) を得られる「ジオリゴヌクレオチド」の配列を持った核酸の存在下で連結することによりジオリゴヌクレオチドを増幅させることに基づくスキームも公知であり [Wu, D.Y. et al., Genomics 4:560 (1989)]、本発明の目的に容易に応用することができる。

アレレ特異的オリゴマー、分岐DNA法、転写型増幅システム、または等温増幅法といった他の公知の核酸増幅法も、上記の多形性を増幅および分析するために使用することができる [Malek, L.T. et al., 米国特許No.5,130,238; Davey, C. et al., 欧州特許出願329,822; Schuster et al., 米国特許No.5,169,766; Miller, H.I. et al., PCT出願WO 89/06700; Kwok, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:1173 (1989); Gingeras, T.R. et al., PCT出願WO 88/10315; Walker, G.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:392-396 (1989)]。前述した全ての核酸増幅法を緑内障の予測または診断に使用することができよう。

TIGR遺伝子の多形性の同定は多様な方法で決定することができる。個人における緑内障の有無をTIGR遺伝子およびそのフランキング領域における多形性の有無と相関させることにより、緑内障、関連疾患またはステロイド過敏症に対する無症候性患者の素因を診断することが可能となる。多形性が制限エンドヌクレアーゼ開裂部位を創出もしくは破壊するか、または多形性がDNAの欠損または挿入を生ずる (例、VNTR多形性) なら、多形性はその制限エンドヌクレアーゼによる切断により生じるDNA断片のサイズまたはプロファイルを変化させよう。その結果、制限断片分析により、変異配列を有する個人を元の配列を有する個人から識別することができる。このようにして同定できる多形性は、「制限断片長多形性」 (restriction fragment length polymorphisms, "RFLP") と呼ばれる。RFLPsはヒトおよび動物の遺伝子分析に広く使用されてきた [Glassberg, J., 英国特許出願2135774; Skolnick, M.H. et al., Cytogen. Cell Genet. 32:58-67 (1982); Botstein, D. et al., Ann. J. Hum. Genet. 32:314-331 (1980); Fischer, S.G. et al., PCT出願WO 90/13668; Uhlen, M. et al., PCT出願WO 90/11369]。緑内障の病因におけるTIGRの役割は、TIGR応答に影響する遺伝子変化 (例、DNA多形性) の存在を採用して緑内障を予測することができることを示唆している。

本発明のこの態様によれば、患者の細胞からサンプルDNAを得る。好適態様においては、このDNAサンプルを患者の血液から得る。しかし、任意のDNA供給源を使用することができる。このDNAに制限エンドヌクレアーゼ消化を受けさせる。TIGRを上記のRFLP法に従ってプローブとして使用する。正常な個人および緑内障性の患者から得られたTIGR遺伝子のRFLPパターンを比較することにより、その患者の緑内障に対する素因を決定することができる。この方法で得られた多形性を次いでクローニングして、タンパク質の構造を変化させるコード領域またはその発現レベルに影響する遺伝子の調節領域での変異を同定することができる。他の調節タンパク質とのプロモーター相互作用に関連する変化を、例えば、HTM細胞抽出物、前眼房液、血清等を使用したゲルシフトアッセイにより同定することができる。緑内障性の細胞抽出物、前眼房液、血清等に含まれるTIGRタンパク質の相互作用を対照サンプルと比較することにより、緑内障の病因に関連するTIGRの特性における変化を同定することができる。また、このような抽出物および体液ならびにその他 (例、血液等) をステロイド過敏症の診断または予測に使用することもできる。

かかる方法により、いくつかの異なる種類の多形性を同定することができる。このような種類の例としては、(1)異なる個人のTIGR cDNA中に存在する多形性、(2)TIGR遺伝子のプロモーターまたは他の調節領域を含む非翻訳TIGR遺伝子配列における多形性、(3)その産物がTIGR調節配列と相互作用する遺伝子における多形性、(4)その産物がTIGRタンパク質と相互作用するか、それにTIGRタンパク質が結合する遺伝子配列における多形性、が挙げられる。

別の下位態様において、その配列がTIGR mRNAの一部の配列と相補性のオリゴヌクレオチド「プローブ」を使用して評価を行う。かかる分子を次いで、患者の細胞抽出物と共に、核酸ハイブリッド形成させるのに十分な条件下でインキュベーションする。この下位態様にとっては、小柱網の細胞が好ましい。二本鎖のプローブmRNAハイブリッド分子の検出はTIGR mRNAの存在を示すものであり、生成したかかるハイブリッド分子の量はTIGR mRNAの量に比例する。従って、このプローブを使用して患者の細胞中のTIGR mRNA産生のレベルと程度を確認することができる。かかる核酸ハイブリッド形成は、定量的条件下で行うことができ(それにより存在するTIGR mRNAの量の数値を与えることができる)。或いは、このアッセイをTIGR mRNAが存在する、或いはそのレベルがユーザーがセットした予め決めた値を超える、のいずれかを表示する定性的アッセイとして行うこともできる。

第2の態様では、既述の「抗TIGR抗体」を緑内障およびその関連疾患の免疫診断学的アッセイに使用する。

上述したように、TIGRタンパク質は小柱網の細胞外マトリックス中に小柱網から細胞外分泌され、従って体液中に流出しうる。この特性により、血液、リンパ液または血清中のTIGR濃度を分析し、それにより患者のTIGR値が、緑内障に罹患しておらず、緑内障関連疾患やステロイド過敏症に対する素因も持っていない個人の血液に見出されるレベルを超えているかどうかを決定することができる。変化量のTIGRを持つことが見出された患者は、かくして緑内障であると診断しうる。

従って、本発明の第3の態様は、小柱網以外の細胞または組織のTIGR応答を決定することにより、緑内障、関連疾患またはステロイド過敏症の診断または予測が可能となるという認識に関連する。

本発明のこの側面の1下位態様において、生検(またはマクロファージもしくは他の血液細胞サンプル)中、或いは他の細胞サンプルまたはより好ましくは体液(特に、血液、血清、血漿、涙液等)中におけるTIGR応答を確認することにより、緑内障、関連疾患およびステロイド敏感症を診断または予測することができる。TIGR遺伝子はグルココルチコイドの存在に応答して誘発されるので、この方法の非常に好ましい態様は、グルココルチコイドの投与前、投与中、および/または投与後に、かかるTIGR応答を確認することからなる。例えば、例を示すと、グルココルチコイドの投与(局所、眼内、筋肉内、全身または他の投与経路)が、特定の個人のTIGR応答を正常な個人のそれに対して変質させるかどうかを決定することにより緑内障の診断または予測が可能となる。この目的にとって最も好ましくは、少なくとも「TIGR遺伝子誘導量」のグルココルチコイドを投与する。ここで用いた、グルココルチコイドのTIGR遺伝子誘導量とは、緑内障性または非緑内障性の個人の細胞におけるTIGR発現の検出しうる誘導を生ずるのに十分な量のグルココルチコイドの量である。

従って、本発明の抗TIGR抗体は、TIGRの存在を評価するための免疫検定(イムノアッセイ)に使用することもできる。広範囲のイムノアッセイ・フォーマットのいずれもこの目的に使用できる[Fackrell, J., Clin. Immunoassay 8:213-219 (1985); Yolken, R.H., Rev. Infect. Dis. 4:35 (1982); Collins, W.P. In: Alternative Immunoassays, John Wiley & Sons, NY (1985); Ngo, T.T. et al., In: Enzyme Mediated Immunoassay, Plenum Press, NY (1985)]。

最も単純なイムノアッセイは、所定の標的分子に結合することができる抗体をその標的分子を含有すると疑われるサンプルと一緒に単にインキュベーションするものである。標的分子の存在は、標的分子に結合した抗体が、濃度に比例して存在することにより決定される。標的に結合した抗体を最初から存在する未結合の抗体から容易に分離できるようにす

10

20

30

40

50

るため、典型的には固相を使用する。即ち、例えば、サンプルを固体の担体に受動的に結合させ、抗体と一緒にインキュベーションした後、担体を洗浄して未結合の抗体を全て除去することができる。

より複雑なイムノアッセイ法では、抗体を担体に結合させ、次いで担体を標的分子を含有することが疑われるサンプルと接触状態に保つことにより標的分子の濃度を決定する。固定化された抗体に結合されてしまった標的分子は、多様ないずれかの方法で検出することができる。例えば、標的分子の第2のエピトープに結合することができるラベルされた第2の抗体の存在下で担体をインキュベーションすることができる。担体へのラベルされた抗体の固定は、従って標的の存在を必要とし、サンプル中の標的の濃度に比例する。別のアッセイにおいて、標的をサンプルおよび既知量のラベルされた標的と一緒にインキュベ

10

ーションする。サンプル中の標的分子の存在は、抗体結合部位に対してラベルされた標的分子と競合する。従って、抗体に結合することができるラベルされた標的分子の量は、サンプル中の標的分子の濃度に反比例する。

一般に、イムノアッセイのフォーマットは放射性標識（"RIA"）または酵素標識（"ELISA"）のいずれかを採用する。RIAには単純、高感度および使用が容易という利点がある。放射性標識は原子寸法が比較的小さいので、通常は反応速度には影響しない。しかし、かかるアッセイ法は、放射性崩壊により試薬の半減期が短く、特別の取扱いおよび廃棄が必要で、複雑かつ高価な分析装置の使用を必要とするという難点がある。RIAは、Work, T. S. らのLaboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, NY (1978) に説明されており、特にChard, T.による "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" と題する章（これをここに援用する）を参照できる。ELISAsには、安価な装置を用いて多数の異なる酵素を用いて実施することができるので、多数の検出戦略--比色、pH、ガス発生等--をアッセイの定量に使用することができるという利点がある。また、酵素試薬は半減期が比較的長く、RIAの使用で留意すべき放射線汚染の危険がない。ELISAについては、ELISA and Other Solid Phase Immunoassays (kemeny, D.M. 編), John Wiley & Sons, NY (1988) に説明されており、これをここに援用する。

20

別の診断フォーマットでは、眼組織 [例えば、小柱網切除 (trabeculotomy) により得られた] を緑内障およびその関連疾患についてin situ免疫診断アッセイにおいて評価することができる。

30

かかるフォーマットでは、抗体（特にラベルされた抗体）または他のTIGR結合性ペプチドを、生検組織中の緑内障の臨床程度および顕著性を評価するため、眼組織の存在下でインキュベーションする。眼組織中のTIGRの強さ、位置または程度を、染色または他の視覚化方法により決定する。かかる情報を次いで、緑内障の診断または予測のために正常なまたは緑内障性の個人から得られた染色パターンを比較する。

抗TIGR抗体またはTIGR結合性分子を患者に投与し、そのin vivo TIGR結合能力を眼検査により決定することもできる。著しいことに、かかる診断試験は比較的迅速であるので、抗 [抗TIGR] 抗体の潜在的な誘発のような著しい時間を必要とする免疫応答、またはこのような抗体と抗TIGRとの複合体形成は重要ではない。好適態様においては、抗体は蛍光でラベルし、注射により患者の循環系に供給されよう。抗体は循環系から後方光室 (posterior optic chamber) に進む。抗体とTIGRとの複合体形成は、慣用のゴニオスコピーまたは他の適当な手段を用いて監視することができる。顕著なことに、かかるアッセイは小柱網を視覚化する手段と細胞外マトリックス中の沈着したTIGRの程度の決定手段の両方を与える。

40

上述したように、TIGRタンパク質は、少なくとも部分的には分子内のロイシンジッパーの存在により、自己凝集する能力を示す。かかるジッパー領域を有するTIGRの小ペプチド断片はTIGRに結合することができるので、このようなペプチドを診断アッセイにおいて抗TIGR抗体の代替品として使用することもできる。かかるペプチドの使用は、このペプチドを親油性基と親水性基の両方を持つように変性することができるので望ましい。かかる基の存在により、このペプチドは角膜を横断することが可能となろう。従って、この薬剤は点

50

眼剤または軟膏中に含有させた局所的に与えることができ、抗TIGR抗体と同様に緑内障の診断を行うために使用することができる。このペプチドは、検出を容易にするために蛍光性の基でラベルすることが望ましいであろう。

TIGRの任意の適当なペプチド断片をこの目的に使用することができるが、配列番号位置の残基85-92, 92-99, 121-128, 128-135, 135-142, 142-149, 149-156, 241-248および374-391の全部または一部に対応する断片を使用することが好ましい。適当な親油性および親水性の基は当該技術分野で公知であり (Remington's Pharmaceutical Sciencesを参照)、脂肪族基、脂質等 (親油性基)、ならびに有機酸、エステル、イオン性基等 (親水性基) を含んでいる。かかる基は本発明のTIGR分子に、例えば適当なアミノ酸の側鎖基を誘導体化することにより容易に付加することができる。

システニル残基はクロロ酢酸またはクロロアセトアミド等の α -ハロ酢酸 (および対応するアミン) と反応させて、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生ずることができる。システニル残基はまた、プロモトリフルオロ酢酸、 α -プロモ- β -(5-イミドゾイル) プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド類、3-ニトロ-2-ピリジルジサルファイド、メチル2-ピリジルジサルファイド、p-クロロマーキュリベンゾエート、2-クロロマーキュリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールと反応させることにより誘導体化することもできる。

ヒスチジル残基は、pH 5.5~7.0でジエチルプロカーボネートと反応させることにより誘導体化することができる。これは、この試薬がヒスチジル側鎖に対して比較的特異的であるためである。パラプロモフェナシルプロマイドも有用であり、この反応は好ましくはpH 6.0で0.1Mナトリウムカコジレート中で行う。

リシニルおよびアミノ末端残基はコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させることができる。これらの試薬による誘導体化はリシニル残基の電荷を逆転させる作用がある。 α -アミノ含有残基を誘導体化するための他の適当な試薬としては、メチルピコリニミデート、ピリドキサルホスフェート、ピリドキサル、クロロボロハイドライド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-エチルリス尿素、2,4-ペンタンジオン、およびグリオキレートとのトランスアミナーゼ触媒反応が挙げられる。

アルギニル残基は、フェニルグリオキサル、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサンジオン、およびニンヒドリンを含む1またはいくつかの慣用の試薬との反応により変性することができる。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高い pK_a のためにアルカリ性条件で行う。さらに、これらの試薬は、リシンの基ならびにアルギニンの ϵ -アミノ基とも反応できる。

カルボキシル側鎖基 (アスパルチルまたはグルタミル) は、1-シクロヘキシル3-(2-モルホリル)-(4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドのようなカルボジイミド類 ($R'-N-C-N-R'$) との反応により選択的に変性することができる。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基をアンモニウムイオンとの反応によりアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換してもよい。

IV. 投与方法

本発明の薬剤は、薬理学的に許容されうる組成物を調製するために既知の方法に従って処方することができる、この処方により、所望の程度の純度を有するこの材料またはその官能性誘導体を薬理学的に許容しうる担体、賦形剤、または安定剤と組合わせて混合する。かかる材料は採用する用量および濃度において受容者に無毒である。このような組成物の有効成分は、TIGRタンパク質、TIGR融合タンパク質もしくはTIGRタンパク質の断片またはかかる分子の類似物もしくは模擬物 (mimetics) でよい。核酸分子を使用する場合には、かかる分子はTIGR cDNAまたは遺伝子のセンス、アンチセンス、または三重 (triplex) オリゴヌクレオチドでよい。

組成物は、その投与を受容者の患者が耐えることができれば、「薬理学的に許容されうる」といえる。薬剤は、その存在が受容者の患者の生理に検出可能な変化を生じる場合に薬理学的に顕著である。

他のヒトタンパク質 (例、ヒト血清アルブミン) を含む適当なビヒクルおよびその処方が

、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences [第16版, Osol, A. 編, Mack, Easton PA (1980)] に記載されている。

組成物を水溶性にしたい場合には、好ましくはpH約7~8の磷酸塩緩衝液または他の有機酸塩緩衝液といった緩衝液中に処方してもよい。組成物が部分的にしか水溶性ではない場合には、これをその溶解度を増大させるために、例えば0.04~0.05% (w/v) の量のTween, PluronicまたはPEG (例、Tween 80) といったノニオン性界面活性剤と一緒に処方することにより、マイクロエマルジョンとして調製してもよい。多糖類およびポリエチレングリコールに適用される「水溶性」なる用語は、コロイド溶液および分散液を包含する意味である。一般に、セルロース誘導体の溶解度は、エーテル基の置換度により決定され、ここで有用な安定化用誘導体は、この誘導体を水溶性にするのに十分な量のかかるエーテル基をそのセルロース連鎖内のアンヒドログルコース単位当たり有しているべきである。アンヒドログルコース単位当たり少なくとも0.35エーテル基というエーテル置換度で一般に十分である。また、このセルロース誘導体はアルカリ金属塩、例えば、Li、Na、KまたはCs塩の形態でもよい。

酸化防止剤 (例、アスコルビン酸) ; 低分子量 (約10残基以下) のポリペプチド (例、ポリアルギニンもしくはトリペプチド) ; 血清アルブミン、ゼラチン、もしくはイムノ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、グルコース、マンノース、もしくはデキストリン等の単糖類、二糖類、および他の炭水化物 ; EDTAのようなキレート化剤 ; ならびにマンニトールもしくはソルビトール等の糖アルコールといった他の成分も任意に添加しうる。

作用の持続時間を制御するために別の製剤法を採用することもできる。薬剤放出が制御または持続された製剤は、組成物のTIGR分子と複合体形成するか、これを吸収するポリマーの使用により達成しうる。制御された薬剤供給は、適当な高分子の種類 (例、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはプロタミンサルフェート) および高分子の濃度ならびに放出を制御するための薬剤の混入方法により達成することができる。

持効性処方剤も調製することができ、これはマイクロカプセル状粒子と注入可能な物品の形成を包含する。持効性組成物を調製するには、組成物のTIGR分子を好ましくは生分解性のマトリックスまたはマイクロカプセル中に混入する。この目的に適した材料はポリラクチドであるが、ポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (EP 133,988A) のような他のポリ- (α-ヒドロキシカルボン酸) のポリマーも使用できる。他の生分解性ポリマーとしては、ポリ(ラクトン)、ポリ(オルトエステル)、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、またはポリ(オルトカーボネート) ポリ(アセタール) が挙げられる。このポリマー材料はまたポリエステル、ポリ(乳酸)、またはエチレンビニルアセテートコポリマーからなるものでもよい。持効性組成物の例については、米国特許No.3,773,919, EP 58,481A, 米国特許No.3,887,699, EP 158,277A, カナダ特許No.1176565, Sidman, U. et al., Biopolymers 22:547 (1983), およびLanger, R. et al., Chem. Tech. 121:98 (1982)。

或いは、組成物のTIGR分子をポリマー粒子に混入する代わりに、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ(メチルメタクリレート) マイクロカプセルで例示されるコアセルベーション法または界面重合法により製造されたマイクロカプセル中、または例えばリポソーム、アルブミン微球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセルといったコロイド状薬剤供給中、或いはマクロエマルジョン中に、これらの材料を捕捉することができる。かかる製剤法は、Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) に開示されている。

別の態様において、この分子の細胞内取り込みが可能なりポソーム処方剤および方法が採用されよう。適当な方法はこの分野で公知であり、例えば、Chicz, R.M. et al. (PCT出願WO 94/04557), Jaysena, S.D. et al. (PCT出願WO 93/12234), Yorosh, D.B. (米国特許No.5,190,762), Callahan, M.V. et al. (米国特許No.5,270,052) およびGonzalezro, R.J. (PCT出願WO 91/05771) を参照されたい。

本発明の薬剤組成物は、滅菌濾過膜（例、0.2ミクロン膜）を通す濾過といった方法で滅菌してもよい。この組成物は凍結乾燥形態で、または液体溶液として保存しうる。前述した賦形剤、担体、または安定剤のうち或る種のものを使用すると、該分子の塩を生ずることは理解されよう。

本発明の組成物は皮膚または角膜に対して局所投与することができる。局所投与の場合、この組成物の分子は担体および／またはアジュバントのような他の成分と適当に組合わせてもよい。このような他の成分の性質については、薬剤に許容され、その意図した投与に有効でなければならず、組成物の有効成分の活性を劣化させることがないという点を除くと、制限はない。適当なビヒクルの例としては、軟膏、クリーム、ゲル、または懸濁液が挙げられ、これらは精製コラーゲンを含有していても、また含有していなくてもよい。この組成物はまた、好ましくは液体または半液体形態で経皮パッチおよび包帯（バンデージ）中に含浸させてもよい。

ゲル処方剤を得るには、液体組成物として処方した組成物の分子を、有効量の水溶性の多糖類または合成ポリマー（例、ポリエチレングリコール）と混合して、局所投与に適当な粘土のゲルを形成すればよい。使用できる多糖類としては、例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロースおよびアルキルヒドロキシアルキルセルロース（例、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、およびヒドロキシプロピルセルロース）を含むエーテル化セルロース誘導体のようなセルロース誘導体；デンプンおよび分画デンプン；寒天；アルギン酸およびアルギネート；アラビアゴム；プルラン；アガロース；カラジINAN；デキストラン；デキストリン；フルクタン；イヌリン；マンナン；キシラン；アラビナン；キトサン；グリコーゲン；グルカン；および合成バイオポリマー；ならびにキサントガム、グアーガム、イナゴ豆ガム、アラビアゴム、トラガカントガム、およびカラヤガムのようなガム類；ならびにこれらの誘導体および混合物が挙げられる。ここで好ましいゲル化剤は、生体系に不活性で、無毒、調製が簡単であり、流動性（粘度）が極端に高かったり低かったりせず、その内部に保持したTIGR分子を不安定化しないようなモノマーである。好ましくは、多糖類はエーテル化セルロース誘導体であり、より好ましくは、正体が明らかで、精製され、USPに記載されているもの、例えば、メチルセルロース、ならびにヒドロキシアルキルセルロース誘導体（例、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースおよびヒドロキシプロピルメチルセルロース）である。本発明で最も好ましいのはメチルセルロースである。

ゲル化に有用なポリエチレングリコールは、典型的には適正な粘度を得るために低分子量と高分子量のポリエチレングリコール混合物である。例えば、分子量400～600のポリエチレングリコールと分子量1500およびポリエチレングリコールとの混合物が、ペーストを得るように適正な比率で混合すればこの目的に有効であろう。

本発明の組成物は、注射、迅速輸注、鼻咽頭吸収（鼻咽頭内経路）、経皮吸収による非腸（非経口）投与または経口投与用に処方することができる。或いは、この組成物はまた筋肉内または静脈内投与することもできる。非経口投与用の組成物は、滅菌水性または非水性の溶液、懸濁液、およびエマルジョンを含む。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、オレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルである。担体、アジュバントまたは密封包帯を使用して、組織透過性を増大させ、抗原吸収を高めることができる。経口投与用の液体投与形態は一般にその液体剤形を含有するリボソーム溶液からなるものでよい。リボソームを懸濁させるための適当な形態としては、精製水のような当該技術分野で普通に使用されている不活性希釈剤を含有するエマルジョン、懸濁液、溶液、シロップ、およびエリキシルが挙げられる。不活性希釈剤の他に、この組成物は、湿潤剤、乳化・懸濁剤、または甘味料、香味料、着色料もしくは香料も含有しうる。

ゲル中にメチルセルロースを使用する場合、これは好ましくはゲルの約2～5%、より好ましくは約3%を占め、この組成物のTIGR分子は、ゲル1ml当たり約300～1000μgの量で存在する。採用すべき剤形は、上述した要因に依存する。一般的な案として、組成物のTI

10

20

30

40

50

GR分子は、有効ではあるが不適当な毒性を生じない最大用量を組織内に確立することができる用量で処方され、標的サイトまたは組織に供給される。

最も好ましい態様において、本発明の分子は眼の角膜または表面に付与され、角膜を横断して前眼房に吸着させる。このような眼への薬剤供給を達成するのに使用できる方法は、Zun, L.S. [Emerg. Med. Clin. North. Amer. 6:121 (1988)], Lee, V.H. [J. Ocular Pharmacol. 6:157 (1990)], Ellis, P.P. [In: Ocular Therapeutics and Pharmacology, 第7版, Mosby (1987)], およびVaughan, C.T. [In: General Ophthalmology, Appleton & Lange, Norwalk, CT, pp.213-230 (1992)]に記載されている。

しかし、特に好ましくは、かかる薬剤投与は、有効量の本発明の薬剤を、Davis, J.P. (米国特許No.5,192,535、ここに援用する)に記載の持効性眼科用薬剤供給系のいずれかと組

10

合わせることににより達成されよう。
かかる好ましい持効性局所眼科用薬剤供給系は、1種もしくは2種以上のカルボキシル基含有モノエチレン性不飽和モノマーと、約5重量%未満(モノマーの重量%は重合させたモノマーの全重量に基づく値)の架橋剤とを重合させることにより製造されたカルボキシル基含有ポリマーを、懸濁液の全重量に基づいて約0.1~6.5重量%の量で含有する、pHが約3~6.5で、浸透圧が約10~400mOsmの水性懸濁液からなる。望ましくは、このポリマーは前記モノマーと架橋剤とを、等積球径で約50 μ m以下、好ましくは約30 μ m以下の粒度まで懸濁または乳化重合させることにより製造される。この懸濁液は初期粘度が約1,000~30,000センチポアズ(cp)であり、その初期粘度で点眼形態で眼に投与可能である。このポリマーは平均粒度が等積球径で約50 μ m以下、好ましくは約30 μ m以下である。一般

20

に、かかるポリマーの分子量範囲は、約250,000~4,000,000、好ましくは約500,000~2,000,000であると推定される。
懸濁または乳化重合により製造された平均乾燥粒度が等積球径で約50 μ mよりかなり大きいポリマー粒子を含有する水性懸濁液は、等積球径が平均で約50 μ m以下のポリマー粒子を含有するが、その他の点では組成が同一の懸濁液に比べて、眼に投与した時の快適さに劣る。さらに、平均粒径が50 μ mより大きいと、投与後に実質的に粘度が増大するという利点の実現されない。

この軽度架橋した懸濁液は点眼形態で投与可能であり、このpHがより低い懸濁液がpHがより高い眼の涙液と接触すると、懸濁液は急速にゲル化して、点眼形態で最初に投与された時の懸濁液の粘度より実質的に高粘度まで粘度が増大する。従って、生成したより粘

30

稠なゲルは、薬剤を放出するように眼内に長時間にわたってとどまることができる。
この好ましい眼内薬剤供給系のポリマーは、好ましくは少なくとも約50重量%、より好ましくは少なくとも約90重量%の1種もしくは2種以上のカルボキシル基含有モノエチレン性不飽和モノマーから製造される。アクリル酸が好ましいカルボキシル基含有モノエチレン性不飽和モノマーであるが、メタクリル酸、エタクリル酸、b-メチルアクリル酸(クロトン酸)、cis-a-メチルクロトン酸(アングリカ酸)、trans-a-メチルクロトン酸(チグリン酸)、a-ブチルクロトン酸、a-フェニルアクリル酸、a-ベンジルアクリル酸、a-シクロヘキシルアクリル酸、b-フェニルアクリル酸(桂皮酸)、クマリン酸(o-ヒドロキシ桂皮酸)、p-ヒドロキシクマリン酸(ウンベル酸)等の他の不飽和重合性カルボキシル基含有モノマーも、アクリル酸に加えてまたは代えて使用することができる。

40

かかるポリマーは、少量、即ち、存在するモノマーの全重量に基づいて約5%未満、例えば約0.5%または約0.1%から約5%まで、好ましくは約0.2~1%の多官能性架橋剤を用いて架橋させる。このポリマーの架橋剤としては、ジビニルグリコール、2,3-ジヒドロキシヘキサ-1,5-ジエン、2,5-ジメチル-1,5-ヘキサジエン、ジビニルベンゼン、N,N-ジアリルアクリルアミド、N,N-ジアリルメタクリルアミド等の非ポリアルケニルポリエーテル型の2官能性架橋剤モノマーが挙げられる。好ましい架橋剤はジビニルグリコールである。少なくとも3個のヒドロキシル基を有する炭素数4以上の多価アルコールを、臭化アリル等のハロゲン化アルケニルでエーテルすることにより製造される、1分子当たり2以上のアルケニルエーテル基、好ましくは末端 $H_2C=C<$ 基を含有するアルケニルエーテル基を含有するポリアルケニルポリエーテル型の架橋剤(例、ポリアリルスクロース、ポリアリル

50

ペンタエリスリトール等)も包含される。例えば、Brown, 米国特許No.2,798,053を参照。分子量約400~8,000のジオレフィン性の非親水性高分子架橋剤、例えば、ジオールおよびポリオールの不溶性ジオおよびポリアクリレートおよびメタクリレート、ジイソシアネート-ヒドロキシアルキルアクリレートもしくはメタクリレート反応生成物、およびポリエステルジオール、ポリエーテルジオールもしくはポリシロキサンジオールから誘導されたイソシアネート末端プレポリマーとヒドロキシアルキルメタクリレートとの反応生成物なども、架橋剤として使用することができる。例えば、Muellerら米国特許No.4,192,827および4,136,250を参照。

持効性局所眼科用薬剤供給系の好ましい製造方法では、前述した懸濁液を調製し、点眼形態での眼の投与に対しては1,000~30,000センチボアズの所望粘度でパッケージする。好ましい薬剤供給方法では、薬剤を含有する前記懸濁液を点眼形態における初期濃度で眼に投与すると、投与された懸濁液は、より高pHの眼の涙液と接触してその場で急速にゲル化し、点眼形態で最初に投与された時の懸濁液の粘度より実質的に高粘度化する。このより粘稠なゲルは、眼内で形成されたより粘稠なゲル中に捕捉された薬剤を持続して放出するように、眼内に長時間にわたってとどまる。

カルボキシル基含有モノエチレン性不飽和モノマーの約40重量%までを、カルボキシル基を含有せず、生理学および眼科学的に無害な置換基だけを含有する1種もしくは2種以上のモノエチレン不飽和モノマーで置換することが望ましいこともある。

望ましい浸透圧は、懸濁液の全重量に基づいて約0.01~1重量%の量の生理学および眼科学的に許容される塩を用いて達成することが好ましい。好ましい塩は塩化ナトリウムである。

一般に、有効量の組成物を与えるのに必要な用量は、受容者(患者)の年齢、状態、性別、および症状の程度(疾病の場合)などの因子、ならびにその他の変動因子に応じて変動し、当業者であれば調整および決定できる。本発明の組成物(分子)の有効量は、用量または投与当たり0.01~1,000mg/mlの範囲内とすることができるが、これよりずっと少ないか多い量も使用できる。眼科用懸濁液の場合、有効量は懸濁液の全重量に基づいて好ましくは約0.005~10重量%、特に好ましくは約0.01~5重量%であろう。

以上に本発明を一般的に説明したが、以下の実施例を参照することにより本発明をより容易に理解することができよう。実施例は例示の目的で示すものであり、明記のない限り本発明を制限するものではない。

実施例 1

TIGRcDNAのクローニング

HTM細胞の主要なDEX-誘導性cDNAをクローニングするために、消去スクリーニング法を用いた。このような消去スクリーニング法では、特異な発現を示し、従って各集団で誘導もしくは抑制されるmRNA分子を反映するクローンを同定するために、細胞の集団全体から作製されたcDNA分子を異なる細胞副次集団のRNAから作製されたcDNAライブラリーとハイブリダイズさせる(Lamar, E.E. et al., Cell 37:171-177 (1984); Rubenstein, J.L.R. et al., Nucleic Acids Res. 18:4833-4842 (1990); Hedric, S.M. et al., Science 308:149-153 (1984); Duguid, J.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5738-5742 (1988); Weiland, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2720-2724 (1990))。

従って、10日間100nMデキサメタゾン中でインキュベートしたヒト小柱網(HTM)細胞のmRNAから、また未処理HTM細胞のmRNAからcDNAを調製した。XL-1株を用いてラムダZap II中にcDNAライブラリーを作製した(ストラタジーン、サンディエゴ)。約30~50 µgのmRNAを、Nguyen, T.D.等(Schriftenreihe der Academie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz, 331-343 (1993):ここに参照として援用する)により記載されたようにして、 5×10^7 デキサメタゾン処理細胞から得た。

特異なスクリーニング法を用いて、それぞれ20,000ファージの2つの独立したスクリーニングを行った。未処理細胞および、1日および10日間のデキサメタゾン処理細胞のmRNAから調製した標識cDNAでファージを別々に検出した。誘導性応答(即ち、対照cDNAに比べ、

10

20

30

40

50

デキサメタゾン処理cDNAで検出した場合に高い標識)を示すクローンがさらに分析するための望ましい候補であった。

デキサメタゾン処理細胞中でより多く産生されたmRNAに対応するいくつかのcDNAクローンを得た。デキサメタゾン処理細胞中に存在するが、未処理細胞では存在しないmRNAに対応する1つのcDNAクローンを「クローンII.2」または「TIGR」と命名した(T.D.Nguyen et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:789 (1991)) 2番目のクローンはアルファ-1アンチキモトリプシンをコードした。

これらの変化のレベルをドット-プロットおよびPCR法で定量した。ドット-プロット分析では、クローンのDNAを連続的に希釈して膜に広げ、次いで対照、1日または10日間のデキサメタゾン処理HTM細胞の標識全DNAにハイブリダイズさせる。ドット-プロット分析によりTIGRmRNAが主要な誘導種であり、これは10日目で全細胞性mRNAの3~4%を占める。対照ではわずかな量のTIGRmRNAしか検出されなかった。2、4、7および10日間のDNA処理の経過から、TIGRは徐々に誘導されることが判明した(T.D.Nguyen et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:789 (1991))。シクロヘキシミドの研究により、誘導はタンパク質合成を必要とすることが示された。サザン分析およびin-situハイブリダイゼーションは、遺伝子の複数のコピー数を示す。PCR増幅分析では、連続希釈PCR法(Chelly, J. D. et al., Eur. J. Biochem. 187:691-698 (1990); Murphy, L.D. et al., Biochem. 29:10350-10356 (1990); Singer-Sam, J.O. et al., Nucl. Acids Res. 18:1255-1259 (1990))を変形して、10日間のデキサメタゾン誘導期間にわたってTIGRmRNAの主要な、そして徐々の誘導を測定し確認するために、定量操作中に指数範囲の増幅を維持した。定量的PCR分析では、デキサメタゾンで1日処理しただけの細胞中に見い出されたレベルに比べ約20倍の誘導レベルが明らかになった。

ノーザン分析により、クローンTIGRは約2.5kbであり、特異な配列のタンパク質をコードすることが示された。mRNAの誘導はタンパク質合成を必要とし、インシュリン様成長因子は誘導効果を50%低下させた。TIGRmRNA誘導は、デキサメタゾン処理繊維芽細胞、ケラチノサイトまたは毛様体内皮細胞では見られなかった。HTM細胞での誘導のパターンは、1日のデキサメタゾン処理で最大まで誘導された、メタロチオニン、アルファ₁-酸性糖蛋白などの、その他のステロイド誘導タンパク質とは区別された。デキサメタゾンの他、過酸化水素、TPAまたはグルコースに3~24時間暴露されてもHTM細胞中にTIGRmRNAが誘導された。デキサメタゾン処理によりグルココルチコイド受容体および熱ショックタンパク質のmRNAの実質的損失を生じた(例えば10日間のデキサメタゾン処理後、hps90 mRNA量は約20倍になった)。

実施例 2

TIGRの発現

実質的量のTIGRを発現させる能力があれば、機能分析のためのこのタンパク質の使用および、抗-TIGR抗体の産生を容易にするであろう。このような高い発現を達成するために、インビトロゲン社のPVL 1393バキュロウイルスのトランスファーベクターを用いた。TIGR cDNAの2Kb Eco-R1断片をPVL 1393のEco-R1クローニング部位に挿入した。PCRおよび配列決定分析により、挿入断片がベクターのポリヘドリンプロモーターに正しい開始位置で連結されたことが分かった。この作製物と野生型バキュロウイルスDNAをSf9昆虫細胞にコトランスフェクションすると、高力価の組み換えタンパク質を産生した。Sf9昆虫細胞系はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビル、MD, 米国から寄託番号ATC CRL 1711として入手できる。このようなベクターおよび細胞を用いる方法はSummers M. D.等(A Manual of Methods for Baculovirus Vector and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555 (1987))およびSummers, M.D. (米国特許第5,278,050号)により記載されている。

これらの組み換え体のPCR分析により、発現した遺伝子の陽性のシグナルが示された。Sf9トランスフェクティド細胞タンパク質のSDSゲル分析により、この新規な産物が約55KDaの分子量を有し、産生された全タンパク質の90~95%であることが判明した。これらの値はデキサメタゾン(DEX)により誘導されるHTM細胞タンパク質の大きさ(Polansky, J.R. et

al., Prog. Clin. Biol. Res. 312:113-138, 1989) および、分離されたcDNA配列から計算したMWにうまく対応した。このタンパク質のG-150 (ファルマシア) カラム精製およびエドマン分解配列決定によりTIGRcDNAのオープンリーディングフレーム (塩基の読み取り枠) が確認された。

このように、組み換えタンパク質の研究から、(1) 55kDのタンパク質が細胞および培地に存在した、(2) これはオリゴマー化、(3) リン酸化、(4) グリコシル化を受けた、(5) これはメタロプロテアーゼの作用を受けた、(6) これは細胞外マトリックスおよびヒト小柱網に対して高い親和結合性を示す、(7) これは細胞および器官培養の両方で経時的に徐々に誘導された、(8) これは正常人に比べて緑内障患者のHTMにおいて高い発現を示した、ことが示唆された。明らかに、この誘導は患者の眼圧に対する局所グルココルチロイド効果に関連し、1日のみのデキサメタゾン処理の最大誘導に近い他の既知のグルココルチロイド誘導パターンとは異なった。

実施例 3

TIGRの構造的特徴

TIGRクローンを配列決定し、2.0kb cDNA分子 (配列番号 2) からなることが見出された。トランスクリプトの全長はノザン分析で決定して約2.5kbであった。このcDNAは、HTMおよびSf9細胞の両方において2種の55kDタンパク質を産生する2つのATG開始部位を含んでいた。より大きいタンパク質は497個のアミノ酸であり、TIGRオープンリーディングフレーム (配列番号 1) と定義される。より大きいタンパク質は、TIGRの非プロセスト形態に基づき、より小さいタンパク質はTIGRシグナルペプチドのタンパク質分解を反映している。これらのタンパク質のアミノ末端配列は、アミノ酸配列分析により変化していた。これらのタンパク質の翻訳後修飾により、約66kDの高度にグリコシル化した形態のTIGRも生じた。

このクローンの構造分析により、これが約55kDの新規な細胞外タンパク質をコードすることが証明され、このタンパク質は配列番号 1 の残基57-60にN-グリコシル化部位、配列番号 1 の残基221-222; 222-223; 270-272; 305-306; 397-401; 453-457; 457-459にO-グリコシル化部位、ヘパリンサルフェイト結合 (配列番号 1 の残基110-113および146-150) および開始ドメイン (配列番号 1 の残基223-224、231-232および324-325)、2つのストレッチを形成する7つの共通ロイシンジッパー単位 - 1つは配列番号 1 の残基85-92および92-99、5つは配列番号 1 の残基121-128; 128-135; 135-142; 142-149および149-156に位置する - および潜在性GIP (グアニジルイノシトールホスフェイト) 連結を有する。55kD組み換えタンパク質は架橋の研究により示されるように、HTM媒体中で二量体かヘテロマーを形成し、また自己凝集しうる。組み換えタンパク質はSkatchrad分析から分かるように、小柱網細胞に特異的結合能 ($4.3 \times 10^{-9} \text{M}$ および $2.3 \times 10^{-8} \text{M}$) を有する。一方、このタンパク質は繊維芽細胞には非飽和性の低親和結合能しか示さなかった。組み換えタンパク質は72kDメタロプロテアーゼの基質であることが示された。

抗-TIGR抗体は、DEX処理HTM媒体中で66kDタンパク質を認識する。このタンパク質は55kD TIGRタンパク質の高度にグリコシル化された形態であることが分かった。この結論は、ツニカマイシン存在下で行われた発現では生産が66kDから55kDへ移動したという観察により支持された。66kDグリコシル化形態のTIGRは、ヒアルロン酸ビーズに結合しうることが見出されたので、ヒアルロン酸結合性タンパク質のようである。かかる結合性タンパク質は、上記ビーズに結合し、0.15および1.5M NaCl洗浄後に4Mグアニジンの存在下でビーズから溶離する能力を有するものとして定義される。

本発明はその特定の態様に関して記載されたが、さらに変形することが可能であり、本出願が、一般に本発明の原理に従うような、また、本発明の属する分野内で既知または慣用の実施の範囲内で、上記に示されるような必須の特徴に適用され、そして添付の特許請求の範囲内であれば、本開示からの逸脱をも含む、本発明の如何なる変形、用途または応用をも含むことを意図することは理解されよう。

【配列表】

(1) 一般情報

(i) 出願人：ニューエン，タイ
ポランスキー，ジョン・アール
ユアン，ウェイドン

(ii) 発明の名称：緑内障の診断方法

(iii) 配列の数：3

(iv) 宛て名：

(A) 受信人：ホーリー & サイモン

(B) 通り：1299 ペンシルバニア通り，N.W.

(C) 市：ワシントン

(D) 州：D.C.

10

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：20004

(V) コンピューター読み取り可能な形態：

(A) 媒体の種類：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PC コンパティブル

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン・リリース#1.0，バージョン# 1.25

(vi) 本出願データ：

(A) 出願番号：U S

(B) 出願日：

20

(C) 分類：

(viii) 代理人情報

(A) 氏名：アウアーバッハ，ジェフリー・アイ

(B) 登録番号：32,680

(ix) 通信情報

(A) 電話：(202) 383 - 7451

(B) ファクシミリ：(202) 383 - 6610

(2) 配列番号1の情報

(i) 配列の性質

(A) 長さ：497アミノ酸

30

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(iii) ハイポセティカル：NO

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：TIGR

(xi) 配列の記載：配列番号1

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

- (ii) 配列の種類 : cDNA
- (iii) ハイボセティカル : NO
- (iv) アンチセンス : NO
- (vii) 直接の起源 :
- (B) クローン : 11.2
- (xi) 配列の記載 : 配列番号 2

TTTTNAAGTN CATATCGAAT TCGGNACGAG GNAGAGCTTT CCAGAGGAAG CCTCACCAAG 60
 CCTCTGCAAT GAGGTTCTTC TGTGCACGTT GCTGCACGTT TGGGCTGAG ATGCCAGCTG 120
 TCCAGCTGCT GCTTCTGGCC TGCTTGGTGT GGGATGTGGG GGCCAGGACA GCTCAGCTCA 180
 GGAAGGCCAA TGACCAGAGT GCGCGATGCC AGTATACCTT CAGTGTGGCC AGTCCCAATG 240
 AATCCAGCTG CCCAGAGCAG AGCCAGGCCA TGTCAGTCAT CCATAACTTA CAGAGAGACA 300
 GCAGCACCCA ACGCTTAGAC CTGGAGGCCA CCAAAGCTCG ACTCAGCTCC CTGGAGAGCC 360
 TCCTCCACCA ATTGACCTTG GACCAGGCTG CCAGGCCCAG GAGACCCAGG AGGCGGGAGC 420
 GGGACCAGCT GGAAACCCAA ACCAGAGAGT TGGAGACTGC CTACAGCAAC CTCCTCCGAG 480
 ACAAGTCAGT TCTGGAGGAA GAGAAGAAGC GACTAAGGCA AGAAAATGAG AATCTGGCCA 540
 GGAGGTTGGA AAGCAGCAGC CAGGAGGTAG CAAGGCTGAG AAGGGGCCAG TGTCCAGTA 600
 CCCGAGACAC TGCTCGGGCT GTGCCACCAG GCTCCAGAGA AGTTTCTACG TGGAAATTTGG 660
 ACACTTTGGC CTTCAGGAA CTGAAGTCG AGCTAACTGA AGTTCTGCT TCCCGAATTT 720
 TGAAGGAGAG CCCATCTGCC TATCTCAGGA GTCTCAGGAG TGGAGAGGGA GACACCGGAT 780
 GTGGAGAACT AGTTTGGSTA GGAGAGCCTC TCACGCTGAG AACAGCAGAA ACAATTACTG 840
 GCAAGTATGG TGTGTGGATG CGAGACCCCA AGCCACCTA CCCCTACATC CCAGGAGACC 900
 ACGTGGAGAA TCGACACAGT TGGACCGAT GTCCGCCAGT TTTTGAGTAT GACCTCATCA 960
 GCCAGTTTAT GCAGGGCTAC CTTTCTAAGG TTCACATACT GCTAGGCCA CTGGAAAGCA 1020
 CGGGTCGTGT GGTGTACTCG GGGAGCCTCT ATTTCCAGGG CGGTGAGTCC AGAACTGTCA 1080
 TAAGATATGA GCTGAATACC GAGACAGTGA AGGCTGAGAA GGAAATCCCT GGAGCTGGCT 1140
 ACCACGGACA GTTCCCGTAT TCTTGGGGTG GCTACACGGA CATTGACTTG GCTGTGGATG 1200
 AAGCAGGCTT CTGGGTCAAT TACAGCACCG ATGAGGCCAA AGGTGCCATT GTCTCTCCA 1260
 AACTGAACCC AGAGAATCTG GAACTCGAAC AAACCTGGA GACAAACATC CGTAAGCAGT 1320
 CAGTCGCCAA TGCCCTCATC ATCTGTGGCA CTTGTACAC CGTCAGCAGC TACACCTCAG 1380
 CAGATGCTAC CGTCAACTTT GCTTATGACA CAGGCACAGG TATCAGCAAG ACCCTGACCA 1440
 TCCCATTTCAA GAACCGCTAT AAGTACAGCA GCATGATTGA CTACAACCC CTTGAGAAGA 1500
 AGCTCTTTGC CTGGGACAAC TTGAACATGG TCACTTATGA CATCAAGCTC TCCAAGATGT 1560
 GAAAAGCCTC CAAGCTGTAC AGGCAATGGC AGAAGGAGAT GCTCAGGGCT CCTGGGGGA 1620
 GAGGCTGAA GGGAGAGCCA GCCAGCCAGG GCCCAGGAGC TTTGACTGCT TTCCAAGTTT 1680
 TCATTAATCC AGAAGGATGA ACATGGTCAC CATCTAACTA TTCAGGAATT GTAGTCTGAG 1740
 GGCGTAGACC ATTTCATATA ATAAATATCC TTTATCTTCT GTCAGCATTT ATGGGATGTT 1800
 TAATGACATA GTTCAAGTTT TTCTGAAAA CCATTGCTCT TGCATGTTAC ATGGTTACCA 1860
 CAAGCCACAA TAAAAAGCAT AACTTCTAAA GGAAGCAGAA TAGCTCTCT GGCAGCATC 1920
 GAATATAAGT AAGATGCATT TACTACAGTT GGCTTCTAAT GCTTCAGA 1968

10

20

30

40

(2) 配列番号3の情報

(i) 配列の性質

(A) 長さ: 1491塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

50

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

(B) クローン：TIGRコーディング配列

(xi) 配列の記載：配列番号 3

ATGAGGTTCT TCTGTGCACG TTGCTGCAGC TTTGGGCGCTG AGATGCCAGC TGTCCAGCTG	60	
CTGCTTCTGG CCTGCCTGGT GTGGGATGTG GGGGCCAGGA CAGCTCAGCT CAGGAAGGCC	120	10
AATGACCAGA GTGGCCGATG CCAGTATACC TTCAGTGTGG CCAGTCCCAA TGAATCCAGC	180	
TGCCCAGAGC AGAGCCAGGC CATGTCAGTC ATCCATAACT TACAGAGAGA CAGCAGCACC	240	
CAACGCTTAG ACCTGGAGGC CACCAAAGCT CGACTCAGCT CCTGGAGAG CCTCCTCCAC	300	
CAATTGACCT TGGACCAGGC TGCCAGGCC AGGAGACCCA GGAGGCGGGA GCGGGACCAG	360	
CTGGAAACCC AAACCAGAGA GTTGGAGACT GCCTACAGCA ACCTCCTCCG AGACAAGTCA	420	
GTTCGTGAGG AAGAGAAGAA GCGACTAAGG CAAGAAAATG AGAATCTGGC CAGGAGGTTG	480	
GAAAGCAGCA GCCAGGAGGT AGCAAGGCTG AGAAGGGGCC AGTGTCCAG TACCCGAGAC	540	20
ACTGCTCGGG CTGTGCCACC AGGCTCCAGA GAAGTTTCTA CGTGGAAATT GGACACTTTG	600	
GCCTTCCAGG AACTGAAGTC CGAGCTAACT GAAGTTCTG CTTCCCGAAT TTTGAAGGAG	660	
AGCCCATCTG GCTATCTCAG GAGTCTCAGG AGTGGAGAGG GAGACACCGG ATGTGGAGAA	720	
CTAGTTTGGG TAGGAGAGCC TCTCAGCTG AGAACAGCAG AAACAATTAC TGGCAAGTAT	780	
GGTGTGTGGA TGGGAGACCC CAAGCCACCC TACCCCTACA TCCCAGGAGA CCACGTGGAG	840	
AATCGACACA GTTGGCAGG ATGTCCGCCA GTTTTTGAGT ATGACCTCAT CAGCCAGTTT	900	
ATGCAGGGCT ACCCTTCTAA GTTTCACATA CTGCCTAGGC CACTGGAAAG CACGGTCTGT	960	
GTGGTGTACT CGGGAGCCCT CTATTTCCAG GCGCTGAGT CCAGAACTGT CATAAGATAT	1020	30
GAGCTGAATA CCGAGACACT GAAGGCTGAG AAGGAAATCC CTGGAGCTGG CTACCACGGA	1080	
CAGTTCCTGT ATTCTTGGGG TGGCTACAGG GACATTGACT TGGCTGTGGA TGAAGCAGGC	1140	
CTCTGGGTCA TTTACAGCAC CGATGAGGCC AAAGGTGCCA TTGTCTCTTC CAAACTGAAC	1200	
CCAGAGAATC TGGAACTCCA ACAAACCTGG GAGACAAACA TCCGTAAGCA GTCAGTCGCC	1260	
AATGCCTTCA TCATCTGTGG CACCTTGTAC ACCGTACGCA GCTACAGCTC AGCAGATGCT	1320	
ACCGTCAACT TTGCTTATGA CACAGGCACA GGTATCAGCA AGACCCCTGAC CATCCCATTC	1380	
AAGAACCCTG ATAAGTACAG CAGCATGATT GACTACAACC CCTGGAGAA GAAGCTCTTT	1440	40
GCCTGGGACA ACTTGAACAT GGTCACCTAT GACATCAAGC TCTCCAAGAT G	1491	

【 図 1 A 】

Figure 1A

```

-1      -21      -41
T TTTTAAAGTNC ATATCGAATT CGGNACGAGG NAGAGCTTTC CAGAGGAAGC CTC
.....

-61      -81
ACCAAGC CTCTGCA ATG AGG TTC TTC TGT GCA CGT TGC TGC AGC TTT
..... met arg phe phe cys ala arg cys cys ser phe

-101     -121     -141
GGG CCT GAG ATG CCA GCT GTC CAG CTG CTG CTT CTG GCC TGC CTG
gly pro glu met pro ala val gln leu leu leu ala cys leu

-161     -181
GTG TGG GAT GTG GGG GCC /AGG ACA GCT CAG CTC AGG AAG GCC AAT
val trp asp val gly ala arg thr ala gln leu arg lys ala asn

-201     -221
GAC CAG AGT GGC CGA TGC CAG TAT ACC TTC AGT GTG GCC AGT CCC
asp gln ser gly arg cys gln tyr thr phe ser val ala ser pro

-241     -261
AAT GAA TCC AGC TGC CCA GAG CAG AGC CAG GCC ATG TCA GTC ATC
asn glu ser ser cys pro glu gln ser gln ala met ser val ile

-281     -301     -321
CAT AAC TTA CAG AGA GAC AGC AGC ACC CAA CGC TTA GAC CTG GAG
his asn leu gln arg asp ser ser thr gln arg leu asp leu glu

-341     -361
GCC ACC AAA GCT CGA CTC AGC TCC CTG GAG AGC CTC CTC CAC CAA
ala thr lys ala arg leu ser ser leu glu ser leu leu his gln

-381     -401
TTG ACC TTG GAC CAG GCT GCC AGG CCC AGG AGA CCC AGG AGG CGG
leu thr leu asp gln ala ala arg pro arg pro arg arg arg

-421     -441
GAG CGG GAC CAG CTG GAA ACC CAA ACC AGA GAG TTG GAG ACT GCC
glu arg asp gln leu glu thr gln thr arg glu leu glu thr ala

```

【 図 1 C 】

Figure 1C

```

-881     -901
CCC AAG CCC ACC TAC CCC TAC ATC CCA GGA GAC CAC GTG GAG AAT
pro lys pro thr tyr pro tyr ile pro gly asp his val glu asn

-921     -941
CGA CAC AGT TGG CAC GGA TGT CCG CCA GTT TTT GAG TAT GAC CTC
arg his ser trp his gly cys pro pro val phe glu tyr asp leu

-961     -981
ATC AGC CAG TTT ATG CAG GGC TAC CCT TCT AAG GTT CAC ATA CTG
ile ser gln phe met gln gly tyr pro ser lys val his ile leu

-1001    -1021    -1041
CCT AGG CCA CTG GAA AGC ACG GGT CGT GTG GTG TAC TCG GGG AGC
pro arg pro leu glu ser thr gly arg val val tyr ser gly ser

-1061    -1081
CTC TAT TTC CAG GGC GCT GAG TCC AGA ACT GTC ATA AGA TAT GAG
leu tyr phe gln gly ala glu ser arg thr val ile arg tyr glu

-1101    -1121
CTG AAT ACC GAG ACA GTG AAG GCT GAG AAG GAA ATC CCT GGA GCT
leu asn thr glu thr val lys ala glu lys glu ile pro gly ala

-1141    -1161
GGC TAC CAC GGA CAG TTC CCG TAT TCT TGG GGT GGC TAC ACG GAC
gly tyr his gly gln phe pro tyr ser trp gly gly tyr thr asp

-1181    -1201    -1221
ATT GAC TTG GCT GTG GAT GAA GCA GGC CTC TGG GTC ATT TAC AGC
ile asp leu ala val asp glu ala gly leu trp val ile tyr ser

-1241    -1261
ACC GAT GAG GCC AAA GGT GCC ATT GTC CTC TCC AAA CTG AAC CCA
thr asp glu ala lys gly ala ile val leu ser lys leu asn pro

-1281    -1301
GAG AAT CTG GAA CTC GAA CAA ACC TGG GAG ACA AAC ATC CGT AAG
glu asn leu glu leu glu gln thr trp glu thr asn ile arg lys

```

【 図 1 B 】

Figure 1B

```

-461     -481     -501
TAC AGC AAC CTC CTC CGA GAC AAG TCA GTT CTG GAG GAA GAG AAG
tyr ser asn leu leu arg asp lys ser val leu glu glu lys

-521     -541
AAG CGA CTA AGG CAA GAA AAT GAG AAT CTG GCC AGG AGG TTG GAA
lys arg leu arg gln glu asn glu asn leu ala arg arg leu glu

-561     -581
AGC AGC AGC CAG GAG GTA GCA AGG CTG AGA AGG GGC CAG TGT CCC
ser ser ser gln glu val ala arg leu arg arg gly gln cys pro

-601     -621
AGT ACC CGA GAC ACT GCT CGG GCT GTG CCA CCA GGC TCC AGA GAA
ser thr arg asp thr ala arg ala val pro pro gly ser arg glu

-641     -661     -681
GTT TCT ACG TGG AAT TTG GAC ACT TTG GCC TTC CAG GAA CTG AAG
val ser thr trp asn leu asp thr leu ala phe gln glu leu lys

-701     -721
TCC GAG CTA ACT GAA GTT CCT GCT TCC CGA ATT TTG AAG GAG AGC
ser glu leu thr glu val pro ala ser arg ile leu lys glu ser

-741     -761
CCA TCT GGC TAT CTC AGG AGT CTC AGG AGT GGA GAG GGA GAC ACC
pro ser gly tyr leu arg ser leu arg ser gly glu gly asp thr

-781     -801
GGA TGT GGA GAA CTA GTT TGG GTA GGA GAG CCT CTC ACG CTG AGA
gly cys gly glu leu val trp val gly glu pro leu thr leu arg

-821     -841     -861
ACA GCA GAA ACA ATT ACT GGC AAG TAT GGT GTG TGG ATG CGA GAC
thr ala glu thr ile thr gly lys tyr gly val trp met arg asp

```

【 図 1 D 】

Figure 1D

```

-1321    -1341
CAG TCA GTC GCC AAT GCC TTC ATC ATC TGT GGC ACC TTG TAC ACC
gln ser val ala asn ala phe ile ile cys gly thr leu tyr thr

-1361    -1381    -1401
GTC AGC AGC TAC ACC TCA GCA GAT GCT ACC GTC AAC TTT GCT TAT
val ser ser tyr thr ser ala asp ala thr val asn phe ala tyr

-1421    -1441
GAC ACA GGC ACA GGT ATC AGC AAG ACC CTG ACC ATC CCA TTC AAG
asp thr gly thr gly ile ser lys thr leu thr ile pro phe lys

-1461    -1481
AAC CGC TAT AAG TAC AGC AGC ATG ATT GAC TAC AAC CCC CTG GAG
asn arg tyr lys tyr ser ser met ile asp tyr asn pro leu glu

-1501    -1521
AAG AAG CTC TTT GCC TGG GAC AAC TTG AAC ATG GTC ACT TAT GAC
lys lys leu phe ala trp asp asn leu asn met val thr tyr arg

-1541    -1561    -1581
ATC AAG CTC TCC AAG ATG TGA AAGCCTCC AAGCTGTACA GGCAATGGCA
ile lys leu ser lys met

-1601    -1621
GAAGGAGATG CTCAGGGCTC CTGGGGGGAG CAGGCCTGAA GGGAGAGCCA

-1641    -1661
GCCAGCCAGC GCCCAGGAGC TTGTACTGCT TTCCAAG

-1681    -1701    -1721
TTT TCATTAATCC AGAAGGATGA ACATGGTCAC CATCTAACTA TTCAGGAATT G

-1741    -1761    -1781
TAGTCTGAG GGCCTAGACC ATTTCATATA ATAAATATCC TTATCTTCTT GTCAGC

-1801    -1821
ATTT ATGGGATGTT TAATGACATA GTTCAAGTIT TTCTGAAAA CCATTGCTCT

-1841    -1861    -1881
TGCACTTTAC ATGGTTACCA CAAGCCACAA TAAAGCAT AACTTCTAAA GGAAG

-1901    -1921    -1941
CAGAA TAGCTCTCTT GGCCAGCATC GAATATAAGT AAGATGCATT TACTACAGTT

-1961
GGCTTCTAAT GCTTCAGA

```

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D

- (72)発明者 ポランスキー , ジョン・アール
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 9 4 1、ミル・バレイ、スタントン・ウェイ 1 5
(72)発明者 ユアン , ウェイドン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 1 3 1、サン・フランシスコ、ベール・アベニュー 4 2

審査官 西 剛志

- (56)参考文献 Nguyen, T.D., et al., Schrifteneihe der Akademie der Wissenschaften und der Literatur,
Mainz, Schattauer, 1 9 9 3 年, p.331-343

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 15/00 - 15/90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed