(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2004-500810
(P2004-500810A)
(43)公表日　平成16年1月15日(2004.1.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/02	C12N 15/00	ZNAD	4B024
A61K 38/00	A61K 48/00		4B064
A61K 48/00	A61P 13/12		4B065
A61P 13/12	A61P 19/10		4C084
A61P 19/10	A61P 25/00		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 404 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-544356(P2001-544356)
(86)(22)出願日　平成12年12月7日(2000.12.7)
(85)翻訳文提出日　平成14年6月10日(2002.6.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2000/033134
(87)国際公開番号　WO2001/042484
(87)国際公開日　平成13年6月14日(2001.6.14)
(31)優先権主張番号　60/169,838
(32)優先日　平成11年12月9日(1999.12.9)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　597018381
ヒューマン　ジノーム　サイエンシーズ，インコーポレイテッド
Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国　メリーランド　２０８５０，ロックビル，　キー　ウエスト　アベニュー　９４１０
９４１０　Ｋｅｙ　Ｗｅｓｔ　Ａｖｅｎｕｅ，　Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，　Ｍａｒｙｌａｎｄ　２０８５０，　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＩＬ－６様ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体

(57)【要約】
本発明は、新規なヒトＩＬ－６様ポリペプチド、およびそのようなポリペプチドをコードする遺伝子のコード領域を含む単離された核酸に関する。ヒトＩＬ－６様ポリペプチドを産生するためのベクター、宿主細胞、および組換え方法がまた、提供される。本発明はさらに、これらの新規なヒトＩＬ－６様ポリペプチドに関する障害を診断および処置する方法に関し、詳細には、これらの新規なヒトＩＬ－６様ポリペプチドに関する障害を診断および処置するために有用な診断方法および治療方法に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
単離された核酸分子であって、以下：
（ａ）配列番号Ｘに示されるポリヌクレオチド、またはＡＴＣＣ受託番号Ｚに含まれるｃＤＮＡによってコードされるポリヌクレオチド；
（ｂ）配列番号Ｙの生物学的に活性なポリペプチドフラグメント、またはＡＴＣＣ受託番号Ｚに含まれるｃＤＮＡ配列によってコードされる生物学的に活性なポリペプチドフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；
（ｃ）配列番号Ｙのポリペプチドエピトープ、またはＡＴＣＣ受託番号Ｚに含まれるｃＤＮＡ配列によってコードされるポリペプチドエピトープをコードする、ポリヌクレオチド；
（ｄ）（ａ）～（ｃ）において特定されるポリヌクレオチドのいずれか１つにストリンジェント条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、ここで、該ポリヌクレオチドは、Ａ残基のみまたはＴ残基のみのヌクレオチド配列を有する核酸分子に、ストリンジェント条件下でハイブリダイズしない、ポリヌクレオチド、
からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。
【請求項２】
前記ポリヌクレオチドが、可溶性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項３】
前記ポリヌクレオチドが、配列番号Ｙとして同定される配列をコードするヌクレオチド配列、またはＡＴＣＣ受託番号Ｚに含まれるｃＤＮＡ配列によってコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項４】
前記ポリヌクレオチドが、配列番号Ｘの全体のヌクレオチド配列、またはＡＴＣＣ受託番号Ｚに含まれるｃＤＮＡを含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。
【請求項５】
前記ポリヌクレオチドがＤＮＡである、請求項２に記載の単離された核酸分子。
【請求項６】
前記ポリヌクレオチドがＲＮＡである、請求項３に記載の単離された核酸分子。
【請求項７】
請求項１に記載の単離された核酸分子を含む、ベクター。
【請求項８】
請求項７に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項９】
遺伝子発現を制御する異種調節エレメントに作動可能に連結されている請求項１に記載の核酸分子を含む、組換え宿主細胞。
【請求項１０】
請求項９に記載の宿主細胞からコードされたポリペプチドを発現する工程、および該ポリペプチドを回収する工程を包含する、ポリペプチドの産生方法。
【請求項１１】
単離されたポリペプチドであって、以下：
（ａ）配列番号Ｙに示されるポリペプチド、またはｃＤＮＡによってコードされるポリペプチド；
（ｂ）配列番号Ｙのポリペプチドフラグメント、またはｃＤＮＡによってコードされるポリペプチド；
（ｃ）配列番号Ｙのポリペプチドエピトープ、またはｃＤＮＡによってコードされるポリペプチド；および
（ｄ）配列番号Ｙの改変体、
からなる群より選択される配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、単離され

たポリペプチド。
【請求項１２】
配列番号Ｙを有するポリペプチドを含む、請求項１１に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項１３】
請求項１１に記載の単離されたポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。
【請求項１４】
請求項１１に記載の単離されたポリペプチドを発現する、組換え宿主細胞。
【請求項１５】
単離されたポリペプチドを作製する方法であって、以下：
（ａ）該ポリペプチドが発現されるような条件下で、請求項１４に記載の組換え宿主細胞を培養する工程；および
（ｂ）該ポリペプチドを回収する工程、
を包含する、方法。
【請求項１６】
請求項１５に記載の方法によって産生される、ポリペプチド。
【請求項１７】
医学的状態を予防、処置、または緩和する方法であって、請求項１に記載のポリヌクレオチドの治療有効量を、哺乳動物被験体に投与する工程を包含する、方法。
【請求項１８】
被験体における病理学的状態、または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：
（ａ）請求項１に記載のポリヌクレオチドにおける変異の存在または非存在を決定する工程；および
（ｂ）該変異の存在または非存在に基づいて病理学的状態、または病理学的状態に対する感受性を診断する工程、
を包含する、方法。
【請求項１９】
被験体において病理学的状態、または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：
（ａ）生物学的サンプルにおける請求項１１に記載のポリペプチドの発現の存在または量を決定する工程；および
（ｂ）該ポリペプチドの発現の存在または量に基づいて病理学的状態、または病理学的状態に対する感受性を診断する工程、
を包含する、方法。
【請求項２０】
請求項１１に記載のポリペプチドに対する結合パートナーを同定する方法であって、以下：
（ａ）請求項１１に記載のポリペプチドを結合パートナーと接触させる工程；および
（ｂ）該結合パートナーが該ポリペプチドの活性をもたらすか否かを決定する工程、
を包含する、方法。
【請求項２１】
請求項１１に記載のポリペプチドの活性を改変する分子をスクリーニングする方法であって、以下：
（ａ）該ポリペプチドを、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有すると疑われる化合物と接触させる工程；および
（ａ）該ポリペプチドの活性をアッセイする工程；
を包含する、方法。
【請求項２２】
医学的状態を予防、処置、または緩和する方法であって、請求項１１に記載のポリペプチドの治療有効量を、哺乳動物被験体に投与する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】
【０００１】
（発明の分野）
本発明は、新規のＩＬ－６様タンパク質に関する。より詳細には、新規ＩＬ－６様ポリペプチドをコードする単離された核酸分子が提供される。新規ＩＬ－６様ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに結合する抗体が提供される。ヒトＩＬ－６様ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドを産生するための、ベクター、宿主細胞、ならびに組換え法および合成法もまた提供される。本発明はさらに、これらの新規ＩＬ－６様ポリペプチドに関連する障害を診断、処置、予防および／または予後診断をするために有用な、診断方法および治療方法に関する。本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法に関する。本発明はさらに、本発明のポリペプチドの産生および機能を阻害するための方法および／または組成物に関する。
【０００２】
（発明の背景）
サイトカインは、広範な生物学的活性（免疫調節、免疫細胞の刺激および／または増殖、ならびにアレルギー反応の媒介を含む）において機能する、大きな群の分泌タンパク質である。サイトカインシグナルは、サイトカインレセプター（これは、クラスＩまたはクラスＩＩのいずれかとして分類される）として公知の膜貫通レセプターファミリーを介する（Ｏ’Ｓｈｅａ，Ｊ．Ｊ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，７：１－１１（１９９７））。サイトカインの適切なサイトカインレセプターへの結合は、サイトカインレセプターと関連するＪＡＫキナーゼの活性化を誘導し、レセプターのリン酸化およびＳＴＡＴのようなシグナル伝達分子（これは、次いで、これらが遺伝子調節の転写活性化因子として機能する核に移行される）のリクルーメントを生じる。
【０００３】
免疫系および造血系、肝細胞、および神経系上で広範な機能に関与する多機能サイトカインであるＩＬ－６が、分泌される（Ｓｉｍｐｓｏｎ，Ｒ．Ｊ．ら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．，６：９２９－９５５（１９９７）；Ｒａｋｅｍａｎｎ，Ｔ．ら、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，２７４：１２５７－６６（１９９９））。このような活性の例としては、Ｔ細胞および細胞傷害性Ｔリンパ球の増殖および分化、Ｉｇ産生、骨髄腫細胞の増殖、コリン作動性ニューロンの生存の支持、ならびにＰＣ１２細胞の神経分化が挙げられる（Ｋｉｓｈｉｍｏｔｏ，Ｔ．ら、Ｂｌｏｏｄ，８６：１２４３－１２５４（１９９５））。
【０００４】
天然形態のインターロイキン－６（ＩＬ－６）は、２１Ｋと３０Ｋとの間の分子量（M_r）（調製方法および細胞供給源に依存する）を有する単鎖糖タンパク質である。ＩＬ－６は、循環系において量が少ないことが見出されている（Ｓｉｍｐｓｏｎ，Ｒ．Ｊら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．，６：９２９－９５５（１９９７））。ＩＬ－６は、内皮細胞、特に免疫反応および前炎症応答において役割を果たし得ると考えられている。内皮細胞は、感染および炎症応答に重要な役割を果たし、そして、前炎症シグナル、ＩＬ－１、および腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）に応答して豊富な量のＩＬ－６を産生する（Ｒｏｍａｎｏ，Ｍ．ら、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，６：３１５－２５（１９９７））。
【０００５】
ＩＬ－６の増加した発現と関連する疾患としては、プラスマ細胞腫／骨髄腫、キャッスルマン病、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、骨粗しょう症、自己免疫疾患、およびＡＩＤＳが挙げられる（Ｋｒｅｂｓ，Ｂ．ら、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．，２７３：２８５８－６５（１９９８））。ＩＬ－６様遺伝子の翻訳産物に対する抗体は、このような疾患の改善または処置に有用であり得る。あるいは、この遺伝子の翻訳産物は、種々の疾患および／または障害（例えば、神経細胞死）の予防または処置のためのタンパク質治療剤として有用であり得る。
【０００６】

従って、新規ＩＬ－６様タンパク質を同定および探索するあきらかな必要性がある。構造的に関連するが、このようなタンパク質は、種々の細胞型および組織型において、多様な機能および多面性の機能を保有し得る。本発明の精製されたＩＬ－６様ポリペプチドは、標的結合分子の同定、特徴付けおよび精製のための有用な研究手段である。さらに、新規ＩＬ－６様タンパク質の同定は、核酸およびタンパク質レベルにおける、ある範囲での誘導体、アゴニストおよびアンタゴニストの発展を可能にし、これは次に、ある範囲の状態（例えば、多くの他の状態の間でも、癌、炎症、神経障害ならびに免疫疾患および／または障害）の処置および診断における適用を有する。

【０００７】

（発明の要旨）

本発明は、配列表に開示され、そして／または表１に記載されかつＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）に寄託されたヒトｃＤＮＡプラスミドに含まれる、ポリヌクレオチド配列を含むか、または代替的に、その配列からなる単離された核酸分子を含む。これらの核酸分子のフラグメント、改変体、および誘導体もまた、本発明に含まれる。本発明はまた、ＩＬ－６様ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むか、または代替的にそれらのポリヌクレオチドからなる単離された核酸分子を含む。本発明は、これらのポリヌクレオチドによってコードされるＩＬ－６様ポリペプチドをさらに含む。配列表に開示され、そして／または表１に記載されかつＡＴＣＣに寄託されたヒトｃＤＮＡプラスミドによってコードされるようなＩＬ－６様ポリペプチドを含むか、または代替的にそれらのポリペプチドからなるアミノ酸配列が、さらに提供される。これらのポリペプチドに結合する抗体もまた、本発明に含まれる。これらのアミノ酸配列のポリペプチドのフラグメント、改変体、および誘導体もまた、これらのポリペプチドおよびこれらのポリペプチドを結合する抗体をコードするポリヌクレオチドと同様に、本発明に含まれる。

【０００８】

（詳細な説明）

（表）

表１は、本願に関連してＡＴＣＣで成された寄託物のＡＴＣＣ寄託物、寄託日、およびＡＴＣＣ受託番号を要約する。表１はさらに、ｃＤＮＡクローンＩＤ、ｃＤＮＡクローンＩＤに含まれるベクターの種類、ヌクレオチド配列ＩＤ番号、開示される配列に含まれるヌクレオチド、開示された配列の開始コドンの５’ヌクレオチドの位置、アミノ酸配列ＩＤ番号、および開示された配列によってコードされるＯＲＦの最後のアミノ酸を含む、以下の各「遺伝子番号」に関する情報を要約する。

【０００９】

表２は、公開されたＥＳＴを示し、それらの少なくとも１、２、３、４、５、１０、またはそれ以上の任意の１以上のこれらの公開されたＥＳＴ配列は、必要に応じて本発明の特定の実施形態から除外される。

【００１０】

表３は、表１に開示されるクローンに対応するポリヌクレオチドの発現プロフィールを要約する。第１列は、表１に開示される各コンティグ配列に関連するｃＤＮＡクローンについて、特有のクローン識別子「クローンＩＤ番号Ｖ」を提供する。列２、「ライブラリーコード」は、本発明のポリヌクレオチドを発現する組織および／または細胞株ライブラリーの発現プロフィールを示す。列２の各ライブラリーコードは、表４において提供されるライブラリーコードおよびライブラリーの説明に対応する組織／細胞供給源の識別子を表す。これらのポリヌクレオチドの発現は、試験される他の組織および／または細胞ライブラリーにおいて観察されなかった。当業者は、本発明の対応するポリヌクレオチドの顕著な発現パターンを示す組織を同定するためか、または顕著なおよび／もしくは特異的な組織の発現を示すポリヌクレオチドを同定するためのこの情報を慣用的に使用し得る。

【００１１】

表４、列１は、表３、列２に開示されるＬｉｂｒａｒｙ　Ｃｏｄｅを提供する。列２は、

対応するライブラリーが由来する組織または細胞供給源の説明を提供する。疾患組織に対応するライブラリーコードは、単語「疾患」として３列目に示される。３列目の単語「疾患」の使用は、非限定的である。ライブラリーの組織供給源は、特定され得るか（例えば、新生物）、または疾患関連であり得る（例えば、疾患器官の正常な部分由来の組織サンプル）。さらに、「疾患」という指定を欠くライブラリーはなお、疾患状態または障害に直接的または間接的に関与する供給源由来であり得、従って、これらは、疾患状態または障害においてさらなる有用性を有し得る。

【００１２】

（定義）

以下の定義は、本明細書全体を通して使用される特定の用語の理解を容易にするために提供される。

【００１３】

本発明において、「単離された（単離した）」とは、その本来の環境（例えば、それが天然に存在する場合は天然の環境）から取り出された物質をいい、したがって、その天然の状態から「人間の手によって」変更されている。例えば、単離されたポリヌクレオチドは、ベクターまたは組成物の一部であり得るか、あるいは細胞中に含まれ得、そしてなお「単離されている」状態であり得る。なぜなら、そのベクター、組成物、または特定の細胞は、そのポリヌクレオチドの本来の環境ではないからである。用語「単離された」は、ゲノムライブラリーまたはｃＤＮＡライブラリー、細胞全体の総ＲＮＡ調製物またはｍＲＮＡ調製物、ゲノムＤＮＡ調製物（電気泳動により分離され、そしてブロットへトランスファーされたものを含む）、剪断された細胞全体のゲノムＤＮＡ調製物をも、本発明のポリヌクレオチド／配列の識別する特徴がないことが当該分野で示されている他の組成物をもいわない。

【００１４】

本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド」とは、（表１の第５列に記載にされる）配列番号Ｘ（配列番号Ｘ）に含まれる核酸配列を有する分子、または（表１の第２列に記載され、そしてＡＴＣＣ受託番号ＺでＡＴＣＣに寄託されたプラスミドのプール内に含まれる）ｃＤＮＡプラスミドＶをいう。例えば、このポリヌクレオチドは、５’および３’非翻訳配列、天然または人工のシグナル配列を伴うかまたは伴わないコード領域、タンパク質コード領域、ならびにこの核酸配列のフラグメント、エピトープ、ドメイン、および改変体を含む、全長ｃＤＮＡ配列のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」とは、広く定義される本発明のポリヌクレオチド（ｃＤＮＡに対応する配列のポリＡテールの翻訳から生じるポリフェニルアラニンペプチド配列もポリリジンペプチド配列も明らかに除く）によってコードされるアミノ酸配列を有する分子をいう。

【００１５】

本発明では、配列番号Ｘの配列を含む代表的プラスミドが、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（「ＡＴＣＣ」）に寄託され、そして／また表１に記載されている。表１に示すように、各プラスミドは、ｃＤＮＡクローンＩＤ（識別番号）およびＡＴＣＣ受託番号（ＡＴＣＣ受託番号Ｚ）によって同定される。単一の寄託物としてプールし、そして寄託したプラスミドは、同じＴＡＣＣ受託番号を有する。ＡＴＣＣは、１０８０１　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ　２０１１０－２２０９，ＵＳＡに位置する。ＡＴＣＣ寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に拠って行われた。

【００１６】

本発明の「ポリヌクレオチド」はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号Ｘに含まれる配列、またはその相補体（例えば、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドフラグメントのうちのいずれか１つ、２つ、３つ、４つ以上の相補体）、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶに含まれる配列（例えば、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドフラグメントのうちのいずれか１つ、２つ、３つ、４つ以上の相補体

）にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドを含む。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（７５０ｍＭ　ＮａＣｌ、７５ｍＭクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハルト溶液、１０％デキストラン硫酸、および２０μｇ／ｍｌ変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中での４２℃での一晩のインキュベーション、続いて０．１×ＳＳＣ中で約６５℃にてフィルターを洗浄することをいう。

【００１７】

本発明の「ポリヌクレオチド」には、より低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子もまた含まれる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーおよびシグナル検出の変更は、主として、ホルムアミド濃度（より低い百分率のホルムアミドが、低下したストリンジェンシーを生じる）；塩条件、または温度の操作を通じて達成される。例えば、より低いストリンジェンシー条件は、６×ＳＳＰＥ（２０×ＳＳＰＥ＝３Ｍ　ＮａＣｌ；０．２Ｍ　NaH_2PO_4；０．０２Ｍ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４）、０．５％　ＳＤＳ、３０％ホルムアミド、１００μｇ／ｍｌサケ精子ブロッキングＤＮＡを含む溶液中、３７℃で一晩のインキュベーション；次いで１×ＳＳＰＥ、０．１％　ＳＤＳを用いた５０℃での洗浄を含む。さらに、さらにより低いストリンジェンシーを達成するために、ストリンジェントなハイブリダイゼーション後に行われる洗浄は、より高い塩濃度（例えば、５×ＳＳＣ）で行われ得る。

【００１８】

上記の条件におけるバリエーションが、ハイブリダイゼーション実験においてバックグラウンドを抑制するために使用される代替的なブロッキング試薬の含有および／または置換によって達成され得ることに留意のこと。代表的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、ＢＬＯＴＴＯ、ヘパリン、変性サケ精子ＤＮＡ、および市販の特許処方物が挙げられる。特異的ブロッキング試薬の含有は、適合性の問題に起因して、上記のハイブリダイゼーション条件の改変を必要とし得る。

【００１９】

もちろん、ポリＡ＋配列（例えば、配列表に示されるｃＤＮＡの任意の３’末端ポリＡ＋領域（ｔｒａｃｔ））に、またはＴ（もしくはＵ）残基の相補的ストレッチにのみハイブリダイズするポリヌクレオチドは、「ポリヌクレオチド」の定義に包含されない。なぜなら、このようなポリヌクレオチドは、ポリ（Ａ）ストレッチまたはその相補体を含む任意の核酸分子（例えば、プライマーとしてオリゴｄＴを用いて生成される、事実上任意の二本鎖ｃＤＮＡクローン）にハイブリダイズするからである。

【００２０】

本発明のポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得、これは、非改変ＲＮＡもしくは非改変ＤＮＡまたは改変ＲＮＡもしくは改変ＤＮＡであり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖のＤＮＡ、一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるＤＮＡ、一本鎖および二本鎖のＲＮＡ、ならびに一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるＲＮＡ、一本鎖、またはより代表的には二本鎖もしくは一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であり得るＤＮＡおよびＲＮＡを含むハイブリッド分子から構成され得る。さらに、このポリヌクレオチドは、ＲＮＡもしくはＤＮＡまたはＲＮＡおよびＤＮＡの両方を含む、三本鎖領域から構成され得る。ポリヌクレオチドはまた、安定性のために、または他の理由のために改変された、１つ以上の改変された塩基またはＤＮＡ骨格もしくはＲＮＡ骨格を含み得る。「改変された」塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような普通でない塩基が挙げられる。種々の改変が、ＤＮＡおよびＲＮＡに対して行われ得；したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的に改変された形態を含む。

【００２１】

特定の実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも１５の、少なくとも３０の、少なくとも５０の、少なくとも１００の、少なくとも１２５の、少なくとも５

００の、または少なくとも１０００の連続するヌクレオチドであるが、３００ｋｂ未満、２００ｋｂ未満、１００ｋｂ未満、５０ｋｂ未満、１５ｋｂ未満、１０ｋｂ未満、７．５ｋｂ未満、５ｋｂ未満、２．５ｋｂ未満、２．０ｋｂ未満、または１ｋｂ未満の長さである。さらなる実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書中に開示されたコード配列の一部を含むが、任意のイントロンの全てまたは一部を含むわけではない。別の実施形態においては、コード配列を含むポリヌクレオチドは、ゲノムの隣接遺伝子のコード配列（すなわち、ゲノムにおける目的の遺伝子に対する５’または３’）を含まない。他の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、１０００、５００、２５０、１００、５０、２５、２０、１５、１０、５、４、３、２または１以上のゲノム隣接遺伝子のコード配列を含まない。

【００２２】

「配列番号Ｘ」とは、表１の５列目に記載されるポリヌクレオチド配列をいうが、「配列番号Ｙ」とは、表１の１０列目に記載されるポリペプチド配列をいう。配列番号Ｘは、表１の６列目において特定される整数によって同定される。配列番号Ｙのポリペプチド配列は、配列番号Ｘのポリヌクレオチドによってコードされる翻訳されたオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）である。ポリヌクレオチド配列は、配列リストに示され、直ちに全てのポリペプチド配列が続く。従って、配列番号２のポリヌクレオチド配列に対応するポリペプチド配列は、配列リストに示される第１のポリペプチド配列である。第２のポリペプチド配列は、配列番号３などとして示されるポリヌクレオチド配列に対応する。

【００２３】

本発明のポリペプチドは、ペプチド結合または改変されたペプチド結合、すなわち、ペプチドアイソスター（ｉｓｏｓｔｅｒｅ）によって互いに連結したアミノ酸から構成され得、そして遺伝子がコードする２０個のアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。ポリペプチドは、翻訳後プロセシングのような天然のプロセスによって、または当該技術分野で周知の化学的改変技術のいずれかによって、改変され得る。このような改変は、基本テキスト、およびより詳細な研究論文、ならびに多くの研究文献に十分に記載される。改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ末端またはカルボキシル末端、を含むポリペプチドのどこにでも生じ得る。同じ型の改変が、所定のポリペプチド中のいくつかの部位で、同じまたは種々の程度で存在し得ることが理解される。また、所定のポリペプチドは多くの型の改変を含み得る。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝状であり得、そしてそのポリペプチドは、分枝を含むかまたは含まない、環状であり得る。環状、分枝状および分枝した環状のポリペプチドは、天然の翻訳後プロセスから生じ得るか、または合成方法によって作製され得る。改変としては、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、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール（ｐｈｏｓｐｈｏｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ）の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、γ－カルボキシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化（ｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ）、タンパク質分解プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸のトランスファーＲＮＡ媒介付加、およびユビキチン化が挙げられる。（例えば、ＰＲＯＴＥＩＮＳ－ＳＴＲＵＣＴＵＲＥ ＡＮＤ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＰＲＯＰＥＲＴＩＥＳ、第２版、Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）；ＰＯＳＴＴＲＡＮＳＬＡＴＩＯＮＡＬ ＣＯＶＡＬＥＮＴ ＭＯＤＩＦＩＣＡＴＩＯＮ ＯＦ ＰＲＯＴＥＩＮＳ、Ｂ．Ｃ．Ｊｏｈｎｓｏｎ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１－１２頁（１９８３）；Ｓｅｉｆｔｅｒら、Ｍｅｔｈ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２：６２６－６４６（１９９０）；Ｒａｔｔａｎら、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６３：４８－６２（１９９２）を参照のこと）。

【００２４】

本発明のポリペプチドは、任意の適切な様式で調製され得る。そのようなポリペプチドとしては、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え的に生成されたポリペプチド、合成的に生成されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせによって生成されたポリペプチドが挙げられる。このようなポリペプチドを調製するための手段は、当該分野において十分に理解されている。

【００２５】

ポリペプチドは、分泌タンパク質の形態（成熟形態を含む）であり得るか、またはより大きなタンパク質（例えば、融合タンパク質）の一部であり得る（下記を参照のこと）。分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、精製において補助する配列（例えば、多重のヒスチジン残基）、または組換え生成の間の安定性のためのさらなる配列を含むさらなるアミノ酸配列を含むことは、しばしば有利である。

【００２６】

本発明のポリペプチドは、好ましくは単離された形態で提供され、そして好ましくは実質的に精製される。ポリペプチドの組換え的に生成されたバージョン（分泌ポリペプチドを含む）は、本明細書中で記載される技術か、または当該分野で別の公知の技術を使用して（例えば、ＳｍｉｔｈおよびＪｏｈｎｓｏｎ（Ｇｅｎｅ　６７：３１－４０（１９８８））により記載される１工程方法によって）、実質的に精製され得る。本発明のポリペプチドはまた、本明細書中で記載される技術、または当該分野における他の周知の方法を使用して（例えば、当該分野で周知の方法で本発明のポリペプチドに対して惹起された本発明の抗体を使用することによって）、天然の供給源、合成的な供給源または組換え供給源から精製され得る。

【００２７】

「機能的活性」を示すポリペプチドとは、本発明の全長（完全）タンパク質と関連した１つ以上の公知の機能的活性を示し得るポリペプチドを意味する。このような機能的活性としては、生物学的活性、抗原性［抗ポリペプチド抗体に結合する（または結合することについて、ポリペプチドと競合する）能力］、免疫原性（本発明のポリペプチドに結合する抗体を生成する能力）、本発明のポリペプチドと多量体を形成する能力、およびポリペプチドについてのレセプターまた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。

【００２８】

「機能的活性を有するポリペプチド」とは、特定のアッセイ（例えば、生物学的アッセイのような）で測定した場合、用量依存性を伴なっても伴なわなくても、本発明のポリペプチド（成熟形態を含む）の活性と類似であるが、必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいう。用量依存性が存在する場合、ポリペプチドの用量依存性と同一である必要はないが、むしろ本発明のポリペプチドと比較した場合に、所定の活性における用量依存性に実質的に類似する（すなわち、候補ポリペプチドは、本発明のポリペプチドと比較して、より大きな活性を示すか、または約１／２５以上、そして好ましくは約１／１０以上の活性、そして最も好ましくは約１／３以上の活性を示す）。

【００２９】

ポリペプチド、ならびにそれらのフラグメント、改変体、誘導体、およびアナログの機能的活性は、種々の方法によってアッセイされ得る。

【００３０】

例えば、全長ポリペプチドの抗体への結合について本発明の全長ポリペプチドに結合するか、またはそれと競合する能力についてアッセイする、１つの実施形態では、当該分野で公知の種々の免疫アッセイが、用いられ得る。このようなアッセイとしては、放射免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射分析アッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュ免疫アッセイ（例えば、コロイド金、酵素または放射性同位体標識を用いる）、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、プロテインＡアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどの

ような技術を用いる競合および非競合アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。１つの実施形態では、抗体結合が、一次抗体上の標識を検出することによって検出される。別の実施形態では、この一次抗体は、この一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態では、この二次抗体が標識される。多くの手段が、免疫アッセイにおける結合の検出について当該分野で公知であり、そして本発明の範囲内である。

【００３１】

別の実施形態では、同定されたリガンド、または本発明のポリペプチドフラグメント、改変体、または誘導体が多量体化する能力が評価される場合、結合が、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ーブロッティングのような当該分野で周知の手段によって、アッセイされ得る。一般には、Ｐｈｉｚｉｃｋｙ、Ｅ．ら、１９９５、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．５９：９４－１２３を参照のこと。別の実施形態では、その基質への本発明のポリペプチドの結合の生理学的相関（シグナル伝達）がアッセイされ得る。

【００３２】

さらに、本明細書中に記載のアッセイ（実施例を参照のこと）および当該分野で公知の他のアッセイは、本発明のポリペプチドならびにそれらのフラグメント、改変体、誘導体、およびアナログが、ポリペプチドの生物学的活性に関連した関連の生物学的活性を（インビトロまたはインビボのいずれかで）惹起する能力を測定するために、慣用的に適用され得る。他の方法は、当業者に公知であり、そして本発明の範囲内である。

【００３３】

（本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド）

（遺伝子番号１によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子に対応する翻訳産物は、腫瘍関連タンパク質ＰＲＯ１０１７（これは、種々の腫瘍組織、特に結腸腫瘍で観察された（国際出願番号ＷＯ９９／３５１７０を参照のこと））と配列相同性を共有し、この遺伝子を発現する細胞において増加した腫瘍形成に役割を果たすと考えられる。

【００３４】

本発明の好ましいポリペプチドは、以下のアミノ酸配列（ジスルフィド結合形成ならびに正確なタンパク質構造およびコンフォメーションに関与すると考えられる２つのシステイン残基を含む）：ＨＷＤＨＶＳＲＬＣＳＰＣＬＩＤＹＤＦＶ（配列番号４）を含むか、あるいはこれからなる。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また、これらのポリペプチドの１つ以上に結合する抗体と同様に、本発明により包含される。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書に記載のフラグメント、これらのポリペプチドに少なくとも、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるポリペプチド、およびこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、またはその相補体など）が、本発明により包含される。本発明のこれらのフラグメントおよび改変体に結合する抗体がまた、本発明により包含される。これらのフラグメントおよび改変体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。配列番号４のシステイン含有領域および配列番号３の少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、５０、または７５のさらなる連続アミノ酸残基を含むポリペプチドが、さらに好ましい。さらなる連続アミノ酸残基は、システイン含有領域に対してＮ末端またはＣ末端であり得る。あるいは、さらなる連続アミノ酸残基は、このシステイン含有領域に対してＮ末端およびＣ末端の両方であり得、ここで、Ｎ末端およびＣ末端の連続アミノ酸残基の総数は、特定数に等しい。

【００３５】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号３に残基：Ｈｉｓ－２１～Ｔｙｒ－２６、Ｇｌｕ－９６～Ａｌａ－１０２、Ａｒｇ－１１９～Ｔｈｒ－１３０、およびＧｌｎ－１４６～Ａｓｐ－１５２として示される免疫原性エピトープの１つ、２つ、３つ、４つまたは４

つ全てを含むか、あるいはこれからなる。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また、これらのポリペプチドの１つ以上に結合する抗体と同様に、本発明により包含される。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書に記載のフラグメント、これらのポリペプチドに少なくとも、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるポリペプチド、およびこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、またはその相補体など）が、本発明により包含される。本発明のこれらのフラグメントおよび改変体に結合する抗体がまた、本発明により包含される。これらのフラグメントおよび改変体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。

【００３６】

この遺伝子は、扁桃組織および小脳組織において発現される。

【００３７】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド（抗体を含む）は、生物学的サンプル中に存在する神経組織型または神経細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：神経系の疾患および／または障害、ならびに開示されたサイトカインによって促進される生物学的機能を含むが、これらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織型または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブを提供することに有用である。上記組織または細胞、特に中枢神経系の多くの障害について、標準的な遺伝子発現レベル、すなわち、障害を有さない個体からの健常組織または体液中の発現レベルに対して、有意により高いかまたはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された、特定の組織型または細胞型（例えば、神経組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）あるいは別の組織またはサンプル中で慣用的に検出され得る。

【００３８】

多数の神経組織における組織分布は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよびポリペプチドが、神経系の疾患および／または障害の、診断、検出および／または処置に有用であることを示す。扁桃組織および小脳組織における組織分布は、このクローンのタンパク質産物が、神経変性疾患状態および行動障害、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、ツレット症候群、精神分裂病、躁病、痴呆、妄想症、強迫性障害、恐慌性障害、学習障害、ＡＬＳ、精神病、自閉症、および行動変化（栄養補給、睡眠パターン、平衡、および知覚の障害を含む）の検出および／または処置に有用であることを示唆する。さらに、この遺伝子または遺伝子産物はまた、胚の発生と関連する発生障害、または性関連障害の処置および／または検出において役割を果たし得る。

【００３９】

より一般的には、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物、および抗体はまた、サイトカインと関連する生物学的活性の範囲、例えば、他のサイトカインの活性または誘導を調節する細胞増殖／細胞分化；免疫グロブリン産生細胞へのＢ細胞成熟の誘導；神経細胞分化の誘導；骨髄腫およびプラスマ細胞腫の増殖の誘導；免疫促進／免疫抑制の活性（例えば、ヒト免疫欠損ウイルス感染、癌、自己免疫疾患およびアレルギーを処置するため）；造血の調節（例えば、貧血を処置するため、または化学療法に対するアジュバントとして）；骨、軟骨、腱、靭帯および／または神経の刺激または増殖（例えば、創傷を処置するため、濾胞刺激ホルモンの刺激（受精の制御のため））；走化性活性およびケモキネシス活性（例えば、感染、腫瘍を処置するため）；鬱血活性または血栓崩壊活性（例えば、血友病、心筋梗塞などを処置するため）；抗炎症活性（例えば、敗血症性ショック、クローン病を処置するため）；抗菌性として；乾癬または他の過剰増殖疾患を処置するため；代謝調節のため、および行動に、影響を及ぼし得る。遺伝子治療手順におけるこの対応する核酸の使用がまた、意図される。タンパク質、ならびにこのタンパク質に対する抗体は、腫瘍マーカーおよび／または上記組織の免疫治療標的としての有用性を示し得る

。

【００４０】

【表１】

表1

遺伝子番号	cDNAクローンID番号V	ATCC受託番号Zおよび日付	ベクター	ヌクレオチド配列ID番号X	総ヌクレオチド配列	クローン配列の5'ヌクレオチド	クローン配列の3'ヌクレオチド	開始コドンの5'ヌクレオチド	アミノ酸配列ID番号Y	ORFの最後のアミノ酸
1	HCEVF95	PTA912 11/04/99	Uni-ZAP XR	2	1047	1	1047	72	3	171

表１は、上記の各「遺伝子番号」に対応する情報を要約する。「ヌクレオチド配列番号Ｘ」として同定されるヌクレオチド配列は、表１において同定される「ｃＤＮＡクローンＩＤ」から、およびいくつかの場合において、さらなる関連のＤＮＡクローンから得られる、部分的に相同な（「重複する」）配列から構築された。重複する配列は、高い冗長性の単一の連続した配列に構築され（通常、各ヌクレオチド位置で３～５個の重複する配列）、配列番号Ｘとして同定される最終的な配列を得た。

【００４１】

ｃＤＮＡクローンＩＤは、その日付に寄託され、そして「ＡＴＣＣ受託番号Ｚおよび日付」において列挙される対応する受託番号が与えられた。寄託物のいくつかは、同じ遺伝子に対応する複数の異なるクローンを含む。「ベクター」は、ｃＤＮＡクローンＩＤにおいて含まれるベクターの型をいう。

【００４２】

「総ヌクレオチド配列」は、「遺伝子番号」によって同定されるコンティグにおけるヌクレオチドの総数をいう。寄託されたプラスミドは、これらの配列の全てを含み得、この配列は、配列番号Ｘの「クローン配列の５’ヌクレオチド」および「クローン配列の３’ヌクレオチド」として示されるヌクレオチドの位置によって反映される。推定メチオニン開始コドンの配列番号Ｘのヌクレオチドの位置は（存在する場合）、「開始コドンの５’ヌクレオチド」として同定される。同様に、推定シグナル配列の配列番号Ｘのヌクレオチドの位置は（存在する場合）、「シグナルペプチドの第一のアミノ酸の５’ヌクレオチド」として同定される。

【００４３】

翻訳されたアミノ酸配列は、ポリヌクレオチド配列の第１翻訳コドンで始まり、「アミノ酸配列番号Ｙ」として同定されるが、他のリーディングフレームもまた、公知の分子生物学技術を使用して容易に翻訳され得る。これらの代替的オープンリーディングフレームによって産生されるポリペプチドは、本発明によって具体的に意図される。

【００４４】

配列番号Ｘ（ここで、Ｘは、配列表に開示されたポリヌクレオチド配列のいずれかであり得る）および翻訳される配列番号Ｙ（ここで、Ｙは、配列表に開示されたポリペプチド配列のいずれかであり得る）は、十分に正確であり、そしてそうでなければ、当該分野において周知でありかつ以下でさらに記載される種々の使用に適切である。例えば、配列番号Ｘは、配列番号Ｘにおいて含まれる核酸配列または寄託されたプラスミドに含まれるｃＤＮＡを検出する核酸ハイブリダイゼーションプローブを設計することを含む使用を有するが、これらに限定されない。これらのプローブはまた、生物学的サンプル中の核酸分子にハイブリダイズし、それによって本発明の種々の法医学の方法、および診断の方法を可能にする。同様に、配列番号Ｙから同定されるポリペプチドは、表１において同定されたｃ

ＤＮＡクローンによりコードされる分泌タンパク質に特異的に結合する抗体を産生することを含むが、これらに限定されない使用を有する。

【００４５】

それにもかかわらず、配列決定反応によって生じるＤＮＡ配列は、配列決定のエラーを含み得る。エラーは、誤って同定されたヌクレオチドとして、または生じたＤＮＡ配列におけるヌクレオチドの挿入または欠失として存在する。誤って挿入されたか、または欠失されたヌクレオチドは、推定アミノ酸配列のリーディングフレームにおいてフレームシフトを引き起こす。これらの場合において、生じたＤＮＡ配列は、実際のＤＮＡ配列と９９．９％（例えば、１０００塩基を超えるオープンリーディングフレームにおける１塩基の挿入または欠失）を超えて同一であり得るにもかかわらず、推定アミノ酸配列は、実際のアミノ酸配列とは異なる。

【００４６】

従って、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列における正確さを必要とするこれらの適用のために、本発明は、配列番号Ｘとして同定された作製されたヌクレオチド配列、および配列番号Ｙとして同定された推定の翻訳されたアミノ酸配列のみではなく、表１において記載されるような、ＡＴＣＣに寄託された本発明のヒトｃＤＮＡを含むプラスミドＤＮＡのサンプルもまた提供する。各々の寄託されたプラスミドのヌクレオチド配列は、公知の方法に従って寄託されたプラスミドの配列決定により容易に決定され得る。

【００４７】

次いで、推定アミノ酸配列は、このような寄託物から証明され得る。さらに、特定のプラスミドによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列はまた、ペプチド配列決定により、または寄託されたヒトｃＤＮＡを含む適切な宿主細胞中でタンパク質を発現し、このタンパク質を収集し、そしてその配列を決定することにより、直接的に決定され得る。

【００４８】

また、ｃＤＮＡプラスミドを含むベクターの名前を表１に提供する。各ベクターは、当該分野において、慣用的に使用される。以下のさらなる情報は、利便性のために提供される。

【００４９】

ベクターＬａｍｂｄａ　Ｚａｐ（米国特許第５，１２８，２５６号および同第５，２８６，６３６号）、Ｕｎｉ－Ｚａｐ　ＸＲ（米国特許第５，１２８，２５６号および同第５，２８６，６３６号）、Ｚａｐ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（米国特許第５，１２８，２５６号および同第５，２８６，６３６号）、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（ｐＢＳ）（Ｓｈｏｒｔ，Ｊ．Ｍ．ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　１６：７５８３－７６００（１９８８）；Ａｌｔｉｎｇ－Ｍｅｅｓ，Ｍ．Ａ．およびＳｈｏｒｔ，Ｊ．Ｍ．、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　１７：９４９４（１９８９））ならびにｐＢＫ（Ａｌｔｉｎｇ－Ｍｅｅｓ，Ｍ．Ａ．ら、Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ　５：５８－６１（１９９２））は、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．、１１０１１　Ｎ．Ｔｏｒｒｅｙ　Ｐｉｎｅｓ　Ｒｏａｄ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ，９２０３７から市販されている。ｐＢＳは、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてｐＢＫはネオマイシン耐性遺伝子を含む。ファージミドｐＢＳは、λＺａｐベクターおよびＵｎｉ－Ｚａｐ　ＸＲベクターから切り出され得、そしてファージミドｐＢＫは、Ｚａｐ発現ベクターから切り出され得る。両方のファージミドは、Ｅ．ｃｏｌｉ株ＸＬ－１　Ｂｌｕｅ（これもまた、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅから入手可能である）に形質転換され得る。

【００５０】

ベクターｐＳｐｏｒｔ１、ｐＣＭＶＳｐｏｒｔ　１．０、ｐＣＭＶＳｐｏｒｔ　２．０およびｐＣＭＶＳｐｏｒｔ３．０は、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｉｎｃ．、Ｐ．Ｏ．Ｂｏｘ　６００９、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ　２０８９７から得られた。全てのＳｐｏｒｔベクターはアンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてＥ．ｃｏｌｉ株ＤＨ１０Ｂ（これもまた、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能である）に形質転換され得る。例えば、Ｇｒｕｂｅｒ，Ｃ．Ｅ．ら、Ｆｏｃｕｓ　１５：５９（１９９３

）を参照のこと。ベクターｌａｆｍｉｄ ＢＡ（Ｂｅｎｔｏ Ｓｏａｒｅｓ、Ｃｏｌｕｍｂｉａ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、ＮＹ）は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてＥ．ｃｏｌｉ株ＸＬ－１ Ｂｌｕｅに形質転換され得る。ベクターｐＣＲ（登録商標）２．１（これはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１６００ Ｆａｒａｄａｙ Ａｖｅｎｕｅ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ ９２００８から入手可能である）は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてＥ．ｃｏｌｉ株ＤＨ１０Ｂ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能である）に形質転換され得る。例えば、Ｃｌａｒｋ，Ｊ．Ｍ．、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：９６７７－９６８６（１９８８）およびＭｅａｄ，Ｄ．ら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：（１９９１）を参照のこと。

【００５１】

本発明はまた、配列番号Ｘ、配列番号Ｙ、および／または寄託されたプラスミド（ｃＤＮＡプラスミドＶ）に対応する遺伝子に関する。対応する遺伝子は、本明細書中に開示される配列情報を使用して、公知の方法に従って単離され得る。このような方法は、開示された配列からプローブまたはプライマーを調製する工程、およびゲノム物質の適切な供給源から対応する遺伝子を同定または増幅する工程を包含するが、これらに限定されない。

【００５２】

本発明においてまた提供されるものは、対立遺伝子改変体、オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）、および／または種相同体である。当該分野において公知である手順は、本明細書中で開示された配列またはＡＴＣＣに寄託されたクローンからの情報を用いて、配列番号Ｘ、配列番号Ｙ、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶに対応する遺伝子の全長遺伝子、対立遺伝子改変体、スプライス改変体、全長コード部分、オルソログ、および／または種相同体を得るために使用され得る。例えば、対立遺伝子改変体および／または種相同体は、本明細書中に提供される配列から適切なプローブまたはプライマーを作製し、そして対立遺伝子改変体および／または所望の相同体について適切な核酸供給源をスクリーニングすることにより単離および同定され得る。

【００５３】

本発明は、配列番号Ｘの核酸配列および／またはｃＤＮＡプラスミドＶを含むか、あるいはこれらからなるポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、配列番号Ｙのポリペプチド配列、配列番号Ｘによりコードされるポリペプチド、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡによりコードされるポリペプチドを含むか、あるいはこれらからなるポリペプチドを提供する。配列番号Ｙのポリペプチド配列、配列番号Ｘによりコードされるポリペプチド、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡによりコードされるポリペプチドを含むか、あるいはこれらからなる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。本発明はさらに、配列番号Ｘの核酸配列の相補体、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡのコード鎖の相補体を含むか、あるいはこれらからなるポリヌクレオチドを包含する。

【００５４】

多くのポリヌクレオチド配列（例えば、ＥＳＴ配列）は、公に利用可能であり、そして配列データベースを通してアクセス可能であり、そして本発明の着想の前に公に利用可能であったかもしれない。好ましくは、このような関連するポリヌクレオチドは、本発明の範囲から特に除外される。全ての関連配列を列挙することは、本出願の開示では非常に煩わしい。従って、好ましくは、配列番号Ｘから、一般式ａ－ｂにより記載されるヌクレオチド配列（ここで、ａは配列番号Ｘの１と配列番号Ｘの最終ヌクレオチド－１５との間の任意の整数であり、ｂは１５～配列番号Ｘの最終ヌクレオチドの整数であり、ここでａおよびｂの両方は配列番号Ｘに示されるヌクレオチド残基の位置に対応し、そしてここでｂはａ＋１４以上である）を含む１つ以上のポリヌクレオチドが除外される。

【００５５】

（全長遺伝子の回収のためのＲＡＣＥプロトコル）

部分的ｃＤＮＡクローンは、Ｆｒｏｈｍａｎ，Ｍ．Ａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８５：８９９８－９００２（１９８８）に記載されたｃＤＮＡ末端

の高速増幅（ＲＡＣＥ）手順を利用することにより全長を作製し得る。５’末端または３’末端のいずれかが欠失しているｃＤＮＡクローンは、翻訳の開始コドンまたは終止コドンのそれぞれに伸長する欠失塩基対を含むように再構築され得る。いくつかの場合において、ｃＤＮＡは、そのために翻訳の開始を欠失している。以下に、この本来の５’ＲＡＣＥ手順の改変を簡単に記載する。ポリＡ＋または全ＲＮＡを、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩ（Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ）およびｃＤＮＡ配列に特異的なアンチセンスプライマーまたは相補的プライマーを用いて逆転写する。そのプライマーを、Ｍｉｃｒｏｃｏｎ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（Ａｍｉｃｏｎ）を用いて反応から除去する。次いで、第１鎖ｃＤＮＡを、ｄＡＴＰおよび末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ（Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ）を用いて、添付する。このように、アンカー配列を産生し、これは、ＰＣＲ増幅のために必要である。第２鎖をｄＡ－テイル含有ＰＣＲ緩衝液、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ Ｃｅｔｕｓ）、５’末端で３つの隣接制限部位（ＸｈｏＩ、ＳａｌＩおよびＣｌａＩ）を含むオリゴｄＴプライマーならびにこれらの制限部位を正しく含むプライマーから合成する。この２本鎖ｃＤＮＡを同じプライマーならびにネスティッドｃＤＮＡ特異的アンチセンスプライマーを用いて４０サイクルでＰＣＲ増幅する。このＰＣＲ産物を、エチジウムブロマイドアガロースゲル上でサイズ分離し、そして欠失しているタンパク質コードＤＮＡの推定サイズのｃＤＮＡ産物を含むゲルの領域を取り出す。ｃＤＮＡをＭａｇｉｃ ＰＣＲ Ｐｒｅｐ ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いてアガロースゲルから精製し、ＸｈｏＩまたはＳａｌＩを用いて制限消化し、そしてプラスミド（例えば、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ））にＸｈｏＩ部位およびＥｃｏＲＶ部位で連結する。このＤＮＡを細菌に形質転換し、そしてこのプラスミドクローンを配列決定して、正確なタンパク質コード挿入物を同定する。正確な５’末端を、推定的に同定された相同体を有するこの配列と部分的ｃＤＮＡクローンを有する重複を比較することにより確認する。当該分野において公知の同様の方法および／または市販のキットを使用して、増幅し、そして３’末端を回収する。

【００５６】

いくつかの、品質制御キットが購入のために市販されている。上記のそれらと同様の試薬および方法は、全長遺伝子を回収をするための５’ ＲＡＣＥおよび３’ＲＡＣＥの両方について、Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬからキットの形態で供給される。第２のキットは、Ｃｌｏｎｔｅｃｈから入手可能である。このキットは、Ｄｕｍａｓら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１９：５２２７－３２（１９９１）により開発された、関連技術の改変（ＳＬＩＣ（一本鎖ｃＤＮＡへの、一本鎖の連結））である。手順における主な違いは、ＲＮＡを、逆転写後にアルカリ加水分解し、そしてＲＮＡリガーゼを使用して、第１鎖ｃＤＮＡに、制限部位を含むアンカープライマーを連結することである。これは、過去に配列決定をするのが困難なポリＴの伸長を生じるｄＡテーリング反応における必要性を除去する。

【００５７】

ＲＮＡからの５’ｃＤＮＡまたは３’ｃＤＮＡを産生する代替法は、ｃＤＮＡライブラリー二本鎖ＤＮＡを使用することである。非対称性ＰＣＲ増幅アンチセンスｃＤＮＡ鎖を、アンチセンスｃＤＮＡ特異的プライマーおよびプラスミドアンカープライマーを用いて合成する。これらのプライマーを除去し、そして対称ＰＣＲ反応を、ネストしたｃＤＮＡ特異的アンチセンスプライマーおよびプラスミドアンカープライマーを用いて実施する。

【００５８】

（５’末端配列または３’末端配列を産生し、全長遺伝子を得るための、ＲＮＡリガーゼのプロトコル）

一旦、目的の遺伝子が同定されると、本来のｃＤＮＡプラスミド中には存在しないかもしれない遺伝子の５’部分または３’部分の同定のためのいくつかの方法が利用可能になる。これらの方法は、以下を含むがこれらに限定されない：フィルタープローブ探索、特異的プローブを使用するクローン富化、５’ ＲＡＣＥおよび３’ＲＡＣＥと類似および同一のプロトコル。全長遺伝子は、ライブラリー中に存在し得、そして探索によって同定さ

れ得るが、一方、５’末端または３’末端を生成するために有用な方法は、欠けている情報を生成するために、本来のｃＤＮＡからの既存の配列情報を、使用することである。５’ＲＡＣＥに類似する方法は、所望の全長遺伝子の欠けている５’末端を生成するために利用可能である（この方法は、Ｆｒｏｍｏｎｔ－Ｒａｃｉｎｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２１（７）：１６８３－１６８４（１９９３）によって発表された）。簡潔には、特定のＲＮＡオリゴヌクレオチドを、全長遺伝子ＲＮＡ転写物をおそらく含むＲＮＡの集団の５’末端に連結し、そして連結されたＲＮＡオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを含むプライマーセットを使用して、所望の全長遺伝子の５’部分をＰＣＲ増幅する。次いで、この増幅した産物を配列決定し得、そしてこれを使用して全長遺伝子を生成し得る。この方法は、所望の供給源から単離された総ＲＮＡを用いて開始し、この手順における必要条件ではないが、ポリＡ ＲＮＡを使用し得る。次いで、ＲＮＡ調製物を、必要ならばホスファターゼで処理して、後のＲＮＡリガーゼ工程を妨害し得る分解または損傷ＲＮＡの５’リン酸基を排除し得る。次いで、使用された場合、ホスファターゼを不活化し、そしてＲＮＡをメッセンジャーＲＮＡの５’末端に存在するキャップ構造を除去するために、タバコ酸性ピロホスファターゼを用いて処理する。この反応は、次いでＴ４ ＲＮＡリガーゼを用いてＲＮＡオリゴヌクレオチドに連結され得る、キャップ切断ＲＮＡの５’末端に５’リン酸基を残す。次いで、この改変型ＲＮＡ調製物を、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いる、第一鎖ｃＤＮＡ合成のためのテンプレートとして使用し得る。次いで、第一鎖合成反応物を、連結されたＲＮＡオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的のＩＬ－６様遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを用いる、所望の５’末端のＰＣＲ増幅のためのテンプレートとして使用し得る。次いで、得られた生成物を配列決定し、そして分析して５’末端配列が関連するＩＬ－６様遺伝子に属することを確認する。

【００５９】

（ポリヌクレオチドフラグメントおよびポリペプチドフラグメント）

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド（核酸）の、ポリヌクレオチドフラグメントに関する。本発明において、「ポリヌクレオチドフラグメント」とは、以下である核酸配列を有するポリヌクレオチドをいう：ｃＤＮＡプラスミドＶに含まれるｃＤＮＡの一部か、もしくはｃＤＮＡプラスミドＶに含まれるｃＤＮＡによりコードされるポリペプチドをコードするｃＤＮＡの一部；配列番号Ｘもしくはその相補鎖におけるポリヌクレオチド配列の一部；配列番号Ｙのポリペプチドの一部をコードするポリヌクレオチド配列；あるいは配列番号Ｘによりコードされるポリペプチドの一部をコードするポリヌクレオチド配列。本発明のヌクレオチドフラグメントは、好ましくは、少なくとも約１５ｎｔ、そしてより好ましくは少なくとも約２０ｎｔ、さらにより好ましくは少なくとも約３０ｎｔ、そしてなおより好ましくは少なくとも約４０ｎｔ、少なくとも約５０ｎｔ、少なくとも約７５ｎｔ、少なくとも約１００ｎｔ、少なくとも約１２５ｎｔ、または少なくとも約１５０ｎｔの長さである。例えば、「少なくとも約２０ｎｔの長さ」のフラグメントは、ｃＤＮＡプラスミドＶのｃＤＮＡ配列に含まれる配列または配列番号Ｘもしくはその相補鎖に示されるヌクレオチド配列由来の２０以上の連続する塩基を含むことが意図される。この文脈において「約（おおよそ）」は、特に記載された値、あるいはそれより数個（５、４、３、２、または１）のヌクレオチドだけ大きいかまたは小さな値を含む。これらのヌクレオチドフラグメントは、本明細書中で議論されるように、診断プローブおよびプライマーとしての使用を含むが、それらに限定されない使用を有する。もちろん、より大きなフラグメント（例えば、少なくとも１５０、１７５、２００、２５０、５００、６００、１０００または２０００のヌクレオチドの長さ）もまた、本発明に含まれる。

【００６０】

さらに、本発明のポリヌクレオチドフラグメントの代表例としては、例えば、配列番号Ｘ、またはその相補鎖の以下のおおよそのヌクレオチド数の配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる：１～５０、５１～１００、１０１～１５０、１５１～２００、２０１～２５０、２５１～３００、３０１～３５０、３５１～４００、４０１

～４５０、４５１～５００、５０１～５５０、５５１～６００、６５１～７００、７０１～７５０、７５１～８００、８０１～８５０、８５１～９００、９０１～９５０、９５１～１０００、および／または１００１～１０４７。この文脈において、「おおよそ（約）」は、特に記載された範囲、またはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（５、４、３、２、または１）のヌクレオチドだけ大きいか、または小さな範囲を含む。好ましくは、これらのフラグメントは、その配列が一部であるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの、機能的活性（例えば、生物学的活性）を有するポリペプチドをコードする。より好ましくは、これらのフラグメントは、本明細書中、上記で議論されるようにプローブまたはプライマーとして使用され得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシー条件下でこれらのフラグメントの１つ以上にハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明に含まれ、これらのポリヌクレオチドまたはフラグメントによりコードされるポリペプチドも同様に含まれる。

【００６１】

さらに、本発明のポリヌクレオチドフラグメントの代表例としては、例えば、ｃＤＮＡプラスミドＶに含まれるｃＤＮＡヌクレオチド配列、またはその相補鎖の以下のおおよそのヌクレオチド数の配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる：１～５０、５１～１００、１０１～１５０、１５１～２００、２０１～２５０、２５１～３００、３０１～３５０、３５１～４００、４０１～４５０、４５１～５００、５０１～５５０、５５１～６００、６５１～７００、７０１～７５０、７５１～８００、８０１～８５０、８５１～９００、９０１～９５０、９５１～１０００、および／または１００１～１０４７。この文脈において、「おおよそ（約）」は、特に記載された範囲、あるいはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（５、４、３、２、または１）のヌクレオチドだけ大きいか、または小さな範囲を含む。好ましくは、これらのフラグメントは、ｃＤＮＡプラスミドＶに含まれるｃＤＮＡヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの機能的活性（例えば、生物学的活性）を有するポリペプチドをコードする。より好ましくは、これらのフラグメントは、本明細書中で議論されるように、プローブまたはプライマーとして使用され得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシー条件下で１つ以上のこれらのフラグメントにハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明に含まれ、これらのポリヌクレオチドまたはフラグメントによりコードされるポリペプチドもまた、含まれる。

【００６２】

本発明において、「ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号Ｙに含まれるアミノ酸配列の一部、配列番号Ｘのポリヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列の一部、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡによってコードされるアミノ酸配列の一部であるアミノ酸配列をいう。タンパク質（ポリペプチド）フラグメントは、「自立構造（ｆｒｅｅ－ｓｔａｎｄｉｎｇ）」であり得るか、あるいはより大きなポリペプチド（このフラグメントが、部分または領域（最も好ましくは単一の連続した領域として）を形成する）内に含まれ得る。本発明のポリペプチドフラグメントの代表例としては、例えば、配列番号Ｙのコード領域の、以下のおおよそのアミノ酸数のアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる：１～２０、２１～４０、４１～６０、６１～８０、８１～１００、１０２～１２０、１２１～１４０、１４１～１６０、および／または１６１～１７１。さらに、本発明のポリペプチドフラグメントは、少なくとも約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、または１５０のアミノ酸の長さであり得る。この文脈において、「約（おおよそ）」とは、特に記載された範囲または値、あるいはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（５、４、３、２、または１）のアミノ酸だけ大きいかまたは小さな、範囲または値を含む。これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

【００６３】
タンパク質のＮ末端からの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の損失の改変を生じるとしても、他の機能的活性（例えば、生物学的活性、多量体化する能力、リガンドに結合する能力）は、なお保持され得る。例えば、ポリペプチドの完全な形態または成熟形態を認識する抗体を誘導するおよび／または抗体に結合する、短縮型ムテインの能力は、完全なポリペプチド、または成熟ポリペプチドの大部分より少ない残基が、Ｎ末端から除去される場合には、一般的に保持される。完全なポリペプチドのＮ末端残基を欠く特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するかどうかは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の別の方法によって容易に決定され得る。多数の欠失したＮ末端アミノ酸残基を有するムテインは、いくつかの生物学的活性または免疫原性活性を保持し得るようである。実際に、６つと同じくらい少ないアミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。

【００６４】
従って、本発明のポリペプチドフラグメントとしては、分泌タンパク質および成熟形態が挙げられる。さらに好ましいポリペプチドフラグメントとしては、アミノ末端もしくはカルボキシ末端またはその両方から、連続した一連の欠失した残基を有する分泌タンパク質、もしくは成熟形態が挙げられる。例えば、任意の数のアミノ酸（１～６０の範囲）は、分泌ポリペプチドもしくは成熟形態のいずれかのアミノ末端から欠失され得る。同様に、任意の数のアミノ酸（１～３０の範囲）が、分泌タンパク質もしくは成熟形態のカルボキシ末端から欠失され得る。さらに、上記のアミノ末端およびカルボキシ末端の欠失の任意の組み合わせは好ましい。同様に、これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドもまた好ましい。

【００６５】
本発明は、本明細書中で開示されるポリペプチド（例えば、配列番号Ｙのポリペプチド、配列番号Ｘに含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶに含まれるｃＤＮＡによりコードされるポリペプチド）のアミノ酸配列のアミノ末端から、１つ以上の欠失した残基を有するポリペプチドを、さらに提供する。特に、Ｎ末端の欠失は、一般式ｍ－ｑによって記載され得、ここでｑは、本発明のポリペプチド（例えば、配列番号Ｙに開示されるポリペプチド）におけるアミノ酸残基の総数を表す全整数であり、そしてｍは、２～ｑ－６の範囲の任意の整数として定義される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）もまた、本発明に含まれる。

【００６６】
また、上記のように、タンパク質のＣ末端からの１つ以上のアミノ酸の欠失が、このタンパク質の１つ以上の生物学的機能の損失の改変を生じるとしても、他の機能的活性（例えば、生物学的活性、多量体化する能力、リガンドに結合する能力）は、なお保持され得る。例えば、ポリペプチドの完全な形態または成熟形態を認識する抗体を誘導するおよび／またはこの抗体に結合する、短縮型ムテインの能力は、完全なポリペプチド、または成熟ポリペプチドの大部分より少ない残基が、Ｃ末端から除去される場合には、一般的に保持される。完全なポリペプチドのＣ末端残基を欠く特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するか否かは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の他の方法によって容易に決定され得る。多数の欠失したＣ末端アミノ酸残基を有するムテインは、いくつかの生物学的活性または免疫原性活性を保持し得るようである。実際に、６つと同じくらい少ないアミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。

【００６７】
従って、本発明は、本明細書中で開示されるポリペプチド（例えば、配列番号Ｙのポリペプチド、配列番号Ｘに含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶに含まれるｃＤＮＡによりコードされるポリペプチ

ド）のアミノ酸配列のカルボキシ末端からの１つ以上の残基を有するポリペプチドを、さらに提供する。特に、Ｃ末端の欠失は、一般式１－ｎによって記載され得、ここでｎは、６～ｑ－１の範囲の任意の全整数であり、そしてここでｎは、本発明のポリペプチドにおけるアミノ酸残基の位置に対応する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）もまた、本発明により含まれる。

【００６８】

さらに、上記のＮ末端またはＣ末端の欠失のいずれかを組み合わせて、Ｎ末端およびＣ末端欠失型ポリペプチドを産生し得る。本発明はまた、アミノ末端およびカルボキシ末端の両方から１つ以上の欠失したアミノ酸を有するポリペプチドを提供する。このポリペプチドは、一般的に、配列番号Ｘ（例えば、好ましくは配列番号Ｙとして開示されるポリペプチドを含むが、これに限定されない）および／またはｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡ、ならびに／あるいはそれらの相補鎖によってコードされるポリペプチドの、残基ｍ－ｎを有する場合に記載され得、ここでｎおよびｍは、上記のような整数である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）もまた、本発明に含まれる。

【００６９】

配列番号Ｙのポリペプチドに含まれる任意のポリペプチド配列、配列番号Ｘとして記載されるポリヌクレオチド配列によってコードされる、任意のポリペプチド配列、またはｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡによってコードされる任意のポリペプチド配列は、そのポリペプチドの特定の好ましい領域を決定するために、分析され得る。例えば、配列番号Ｘまたはｃ ＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡのポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、ＤＮＡＳＴＡＲコンピュータアルゴリズム（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．，１２２８　Ｓ．Ｐａｒｋ　Ｓｔ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ　５３７１５　ＵＳＡ；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｄｎａｓｔａｒ．ｃｏｍ／）のデフォルトパラメーターを使用して、分析され得る。

【００７０】

ＤＮＡＳＴＡＲコンピューターアルゴリズムを使用して慣用的に得られ得るポリペプチドの領域としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：Ｇａｒｎｉｅｒ－Ｒｏｂｓｏｎのα－領域、β－領域、ターン領域、およびコイル領域、Ｃｈｏｕ－Ｆａｓｍａｎのα－領域、β－領域、およびターン領域、Ｋｙｔｅ－Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅの親水性領域および疎水性領域、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇのα－両親媒性領域およびβ－両親媒性領域、Ｋａｒｐｌｕｓ－Ｓｃｈｕｌｚの可撓性領域、Ｅｍｉｎｉの表面形成領域ならびに高い抗原性指標のＪａｍｅｓｏｎ－Ｗｏｌｆの領域。この点で、本発明の非常に好ましいポリヌクレオチドの中に、いくつかの構造的特徴（例えば、上記の特徴のいくつか（例えば、１、２、３または４））と組み合わされる領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがある。

【００７１】

さらに、Ｋｙｔｅ－Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ親水性領域および疎水性領域、Ｅｍｉｎｉ表面形成領域、ならびに高い抗原性指標のＪａｍｅｓｏｎ－Ｗｏｌｆ領域（すなわち、Ｊａｍｅｓｏｎ－Ｗｏｌｆプログラムのデフォルトパラメーターを使用して同定されるような、１．５より大きいか、または１．５に等しい抗原性指標を有する、４つ以上の連続するアミノ酸を含む）を慣用的に使用して、抗原性に対する高い程度の潜在性を表すポリペプチドの領域を決定し得る。高い抗原性の領域は、免疫応答の開始プロセスにおいて、抗原認識が生じ得る環境中のポリペプチドの表面上に曝されるようであるポリペプチドの領域を表す値を選択することによって、ＤＮＡＳＴＡＲ分析によるデータから決定される。

【００７２】

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ポリペプチド配列の、機能的活性（例えば、生物学的活性）を示すアミノ酸配列を含むか、またはあるいは、これらからなるフラグメントである。「機能的活性」を示すポリペプチドとは、全長タンパク質と関連した１つ以上の公知の機能的活性（例えば、前述のよう

な、生物学的活性、抗原性、免疫原性、および／または多量体化など）を示し得るポリペプチドを意味する。

【００７３】

他の好ましいポリペプチドフラグメントは、生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントとは、本発明のポリペプチドの活性に対して、同一である必要はないが、類似する活性を示すフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性、または低下した望ましくない活性を含み得る。

【００７４】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号Ｙのポリペプチドの１、２、３、４、５以上の抗原性フラグメントか、またはその部分を含むか、またはあるいはそれらからなる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）もまた、本発明に含まれる。

【００７５】

本発明は、以下のポリペプチドを含むか、またはあるいは以下からなるポリペプチドを含む：配列番号Ｙに示されるポリペプチド配列のエピトープ、またはｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡによりコードされるポリペプチド配列のエピトープ、あるいは前述で定義されるように、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で、配列番号Ｘのエピトープコード配列またはｃＤＮＡプラスミドＶに含まれるエピトープコード配列の相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列のエピトープ。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号Ｘに開示される配列など）、本発明のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列の相補鎖のポリヌクレオチド配列、および前記で定義されるように、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシー条ハイブリダイゼーション件下で、この相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む。

【００７６】

用語「エピトープ」とは、本明細書中で使用される場合、動物において、好ましくは哺乳動物において、そして最も好ましくはヒトにおいて抗原性活性または免疫原性活性を有するポリペプチドの部分をいう。好ましい実施形態において、本発明は、エピトープを含むポリペプチド、およびこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。「免疫原性エピトープ」とは、本明細書中で使用される場合、当該分野で公知の任意の方法によって決定されるような（例えば、下記に記載される抗体を産生するための方法による）、動物における抗体応答を誘発するタンパク質の一部として定義される（例えば、Ｇｅｙｓｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：３９９８－４００２（１９８３）を参照のこと）。用語「抗原性エピトープ」とは、本明細書中で使用される場合、当該分野で周知の任意の方法（例えば、本明細書中に記載される免疫アッセイによる）によって決定されるような、抗体がその抗原に免疫特異的に結合し得るタンパク質の一部として定義される。免疫特異的結合は、非特異的結合は除外するが、他の抗原との交差反応を除外する必要はない。抗原性エピトープは、免疫原性である必要はない。

【００７７】

エピトープとして機能するフラグメントは、任意の従来の方法によって産生され得る。（例えば、Ｈｏｕｇｈｔｅｎ，Ｒ．Ａ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：５１３１－５１３５（１９８５）を参照のこと。これはさらに、米国特許第４，６３１，２１１号に記載される）。

【００７８】

本発明においては、抗原性エピトープは、好ましくは、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７アミノ酸配列を含み、より好ましくは、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０アミノ酸配列を含み、そして最も好ましくは約１５アミノ酸と約

３０アミノ酸との間の配列を含む。免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含有する好ましいポリペプチドは、少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５または１００アミノ酸残基の長さである。さらなる非排他的に好ましい抗原性エピトープは、本明細書中で開示される抗原性エピトープおよびその一部を含む。抗原性エピトープは、有用である（例えば、エピトープに特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体を含む）を惹起するため）。好ましい抗原性エピトープは、本明細書中で開示される抗原性エピトープ、および２、３、４、５以上のこれらの抗原性エピトープの任意の組合わせを含む。抗原性エピトープは、イムノアッセイにおいて、標的分子として使用され得る。（例えば、Ｗｉｌｓｏｎら、Ｃｅｌｌ　３７：７６７－７７８（１９８４）；Ｓｕｔｃｌｉｆｆｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２１９：６６０－６６６（１９８３）を参照のこと）。

【００７９】

同様に、免疫原性エピトープを使用して、例えば、当該分野で周知の方法に従う抗体を誘導し得る。（例えば、Ｓｕｔｃｌｉｆｆｅら、前出；Ｗｉｌｓｏｎら，前出；Ｃｈｏｗら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２：９１０－９１４；およびＢｉｔｔｌｅら、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．６６：２３４７－２３５４（１９８５）を参照のこと）。好ましい免疫原性エピトープは、本明細書で開示される免疫原性および２、３、４、５以上のこれらの免疫原性エピトープの任意の組合せを含む。１つ以上の免疫原性エピトープを含むポリペプチドは、キャリアタンパク質（例えば、アルブミン）とともに動物系（例えば、ウサギまたはマウス）に対する抗体応答を誘発するために提示され得るか、またはこのポリペプチドが十分に長い場合（少なくとも約２５アミノ酸）、そのポリペプチドはキャリアなしで提示され得る。しかし、８～１０個程度の少なさのアミノ酸を含む免疫原性エピトープは、少なくとも変性ポリペプチド中の直鎖状エピトープに結合し得る抗体を惹起するには十分であることが示されている（例えば、ウェスタンブロッティングにおいて）。

【００８０】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、当該分野で周知の方法に従って抗体を誘導するために使用され得る。これらの周知の方法としては、インビボ免疫、インビトロ免疫、およびファージディスプレイ法が挙げられるが、それらに限定されない。例えば、Ｓｕｔｃｌｉｆｆｅら、前出；Ｗｉｌｓｏｎら、前出、およびＢｉｔｔｌｅら、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．、６６：２３４７－２３５４（１９８５）を参照のこと。インビボ免疫を使用する場合、動物を遊離ペプチドを用いて免疫し得る；しかし、抗ペプチド抗体力価は、高分子キャリア（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）または破傷風トキソイド）にペプチドを結合させることによりブーストされ得る。例えば、システイン残基を含むペプチドは、マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）のようなリンカーを用いてキャリアに結合され得る。その一方、他のペプチドは、より一般的な結合剤（例えば、グルタルアルデヒド）を用いてキャリアに結合され得る。ウサギ、ラット、およびマウスのような動物は、遊離のペプチドまたはキャリア結合ペプチドのいずれかを用いて、例えば、約１００μｇのペプチドまたはキャリアタンパク質およびフロイントアジュバントまたは免疫応答を刺激することが公知である他のアジュバントを含むエマルジョンを腹腔内注射および／または皮内注射することにより免疫される。いくつかのブースター注射が、抗ペプチド抗体の有用な力価を提供するために、例えば、約２週間の間隔で、必要とされ得る。この力価は、例えば、固体表面に吸着した遊離のペプチドを用いるＥＬＩＳＡアッセイにより検出され得る。免疫した動物由来の血清中の抗ペプチド抗体の力価は、抗ペプチド抗体の選択（例えば、当該分野で周知の方法に従う固体支持体上のペプチドへの吸着および選択された抗体の溶出による）により上昇し得る。

【００８１】

当業者に理解されるように、そして上記で考察されるように、本発明のポリペプチドおよびその免疫原性エピトープフラグメントおよび／または抗原性エピトープフラグメントは、他のポリペプチド配列に融合され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブ

リン（ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＭ）の定常ドメインまたはそれらの部分（ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、またはそれらの任意の組み合わせ、およびこれらの部分）と融合し得、これがキメラポリペプチドを生じる。このような融合タンパク質は、精製を容易にし得、そしてインビボにおける半減期を増加し得る。このことは、ヒトＣＤ４ポリペプチドの最初の２つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示された。例えば、ＥＰ　３９４，８２７；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ，３３１：８４－８６（１９８８）を参照のこと。上皮の関門を横切っての免疫系への抗原の増強された送達は、ＦｃＲｎ結合パートナー（例えば、ＩｇＧフラグメントまたはＦｃフラグメント（例えば、ＰＣＴ公開　ＷＯ９６／２２０２４およびＷＯ　９９／０４８１３を参照のこと）に結合体化した抗原（例えば、インスリン）について実証されている。ジスルフィド架橋二量体構造を有するＩｇＧ融合タンパク質はまた、そのＩｇＧ部分ジスルフィド結合に起因して、単量体ポリペプチドまたはそれらのフラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和において効果的であることが見出された。例えば、Ｆｏｕｎｔｏｕｌａｋｉｓら、Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、２７０：３９５８－３９６４（１９９５）を参照のこと。

【００８２】

同様に、ＥＰ－Ａ－Ｏ　４６４　５３３（カナダ国対応出願２０４５８６９）は、別のヒトタンパク質またはその一部とともに免疫グロブリン分子の定常領域の種々の部分を含む、融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質中のＦｃ部分は、治療および診断において有利であり、従って、例えば改善された薬物動態学的特性を生じ得る（ＥＰ－Ａ　０２３２　２６２）。あるいは、融合タンパク質が発現、検出、および精製された後に、Ｆｃ部分が欠失され得ることが望ましい。例えば、融合タンパク質が、免疫の抗原として使用される場合、そのＦｃ部分は、治療および診断を妨げ得る。薬物探索において、例えばｈＩＬ－５のようなヒトタンパク質が、ｈＩＬ－５のアンタゴニストを同定するための高処理能力スクリーニングアッセイの目的のためにＦｃ部分と融合されている。（Ｄ．Ｂｅｎｎｅｔｔら、Ｊ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ　８：５２－５８（１９９５）；Ｋ．Ｊｏｈａｎｓｏｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：９４５９－９４７１（１９９５）を参照のこと。）

さらに、本発明のポリペプチドは、融合されたポリペプチドの精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列と融合され得る。好ましい実施形態において、このマーカーアミノ酸配列は、とりわけ、ｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，９２５９　Ｅｔｏｎ　Ａｖｅｎｕｅ，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ，９１３１１）において提供されるタグのようなヘキサ－ヒスチジンペプチドであり、それらの多くは市販されている。例えば、Ｇｅｎｔｚら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：８２１－８２４（１９８９）に記載されるように、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。精製に有用な他のペプチドタグである「ＨＡ」タグは、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（Ｗｉｌｓｏｎら、Ｃｅｌｌ　３７：７６７（１９８４））。

【００８３】

従って、これら上記の任意の融合物は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを用いて操作され得る。

【００８４】

上記のエピトープをコードする核酸はまた、エピトープタグ（例えば、血球凝集素（「ＨＡ」）タグまたはフラッグタグ（ｆｌａｇ　ｔａｇ））として目的の遺伝子と組換えられ、発現されたポリペプチドの検出および精製を補助し得る。例えば、Ｊａｎｋｎｅｃｈｔらによって記載された系は、ヒト細胞株において発現される非変性融合タンパク質の迅速な精製を可能にする（Ｊａｎｋｎｅｃｈｔら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：８９７２－８９７（１９９１））。この系において、目的の遺伝子は、遺伝子の読み取り枠（リーディングフレーム）が、６つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグと翻訳で融合されるように、ワクシニア組換えプラスミド中にサブクローンされる

。このタグは、融合タンパク質についての基質結合ドメインとしてはたらく。組換えワクシニアウイルスに感染した細胞由来の抽出物は、Ｎｉ２＋ニトリロ三酢酸アガロースカラムに充填され、そしてヒスチジンタグ化したタンパク質が、イミダゾール含有緩衝液を用いて選択的に溶出され得る。

【００８５】

本発明のさらなる融合タンパク質は、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（総称して「ＤＮＡシャッフリング」といわれる）の技術を通じて生成され得る。ＤＮＡシャッフリングを使用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、このような方法を用いて、変化した活性を有するポリペプチド、ならびにそのポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを生成し得る。一般には、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Ｐａｔｔｅｎら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：７２４－３３（１９９７）；Ｈａｒａｙａｍａ、Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６（２）：７６－８２（１９９８）；Ｈａｎｓｓｏｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８７：２６５－７６（１９９９）；ならびにＬｏｒｅｎｚｏおよびＢｌａｓｃｏ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２４（２）：３０８－１３（１９９８）（これらの特許および刊行物の各々は、本明細書によってその全体が参考として援用される）を参照のこと。１つの実施形態において、配列番号Ｘに対応するポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの改変は、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、相同組換えまたは部位特異的組換えにより、２つ以上のＤＮＡセグメントをアセンブリして、ポリヌクレオチド配列における変化を産生することを含む。別の実施形態において、本発明のポリヌクオチドまたはコードされるポリペプチドは、組換え前に、エラープローンＰＣＲ、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法による、ランダムな変異誘発に供されることによって改変され得る。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の１つ以上の成分、モチーフ、セクション（ｓｅｃｔｉｏｎ）、部分、ドメイン、フラグメントなどは、１つ以上の異種分子の１つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどと組み換えられ得る。

【００８６】

（ポリヌクレオチド改変体およびポリペプチド改変体）

本発明はまた、ＩＬ－６様改変体を含む。本発明は、配列番号Ｘに開示されるポリヌクレオチド配列の改変体またはそれらに対する相補鎖の改変体、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶ中に含まれるｃＤＮＡ配列の改変体に関する。

【００８７】

本発明はまた、配列番号Ｙに開示されるポリペプチド配列の改変体、配列番号Ｘのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列の改変体および／またはｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡによってコードされるポリペプチド配列の改変体を含む。

【００８８】

「改変体」とは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるがそれらの特性は保持している、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。一般的に、改変体は全体的に非常に類似しており、そして、多くの領域において、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと同一である。

【００８９】

従って、本発明の１つの局面は、以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子か、あるいはその代わりに以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドからなる単離された核酸分子を提供する：（ａ）配列番号Ｘに記載されるヌクレオチド配列、またはクローン番号ＶのｃＤＮＡ配列に含まれるヌクレオチド配列；（ｂ）配列番号Ｘのヌクレオチド配列、または配列番号Ｙの完全アミノ酸配列をコードするクローン番号ＶのｃＤＮＡ、またはクロー

ンＩＤ番号Ｖのｃ ＤＮＡによりコードされる完全アミノ酸配列；（ｃ）配列番号Ｘのヌクレオチド配列または成熟ＩＬ－６様ポリペプチドをコードするクローンＩＤ番号Ｖ中のｃＤＮＡ；（ｄ）配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはクローンＩＤ番号Ｖのｃ ＤＮＡ配列（これは、ＩＬ－６様ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントをコードする）；（ｅ）配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはクローンＩＤ番号Ｖのｃ ＤＮＡ配列（ＩＬ－６様ポリペプチドの抗原性フラグメントをコードする）；（ｆ）配列番号Ｙの完全アミノ酸配列またはクローンＩＤ番号Ｖのｃ ＤＮＡによってコードされた完全アミノ酸配列を含むＩＬ－６様ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；（ｇ）配列番号Ｙのアミノ酸配列またはクローンＩＤ番号Ｖのｃ ＤＮＡによってコードされたアミノ酸配列の成熟ＩＬ－６様ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；（ｈ）配列番号Ｙの完全アミノ酸配列またはクローンＩＤ番号Ｖのｃ ＤＮＡによってコードされた完全アミノ酸配列を有するＩＬ－６様ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントをコードするヌクレオチド配列；（ｉ）配列番号Ｙの完全アミノ酸配列またはクローンＩＤ番号Ｖのｃ ＤＮＡによってコードされた完全アミノ酸配列を有するＩＬ－６様ポリペプチドの抗原性フラグメントをコードするヌクレオチド配列；ならびに（ｊ）上記の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）、または（ｉ）における任意のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列。

【００９０】

本発明はまた、例えば上記の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）、（ｉ）または（ｊ）中の任意のヌクレオチド配列に少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一であるヌクレオチド配列、クローンＩＤ番号Ｖ中に含まれるｃ ＤＮＡの配列をコードするヌクレオチド、またはその相補鎖、配列番号Ｙのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、配列番号Ｘのヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列、配列番号Ｘのポリヌクレオチド配列の相補体によりコードされるポリペプチド配列、クローンＩＤ番号Ｖに含まれるｃ ＤＮＡによってコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、表１の１０列に規定されるポリペプチド配列をコードする配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはその相補鎖、表１の１０列に規定されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはその相補鎖、および／またはこれらの任意の核酸分子のポリヌクレオチドフラグメント（例えば、本明細書に記載のフラグメント）を含むか、あるいはこれらからなる、核酸分子に関する。これらの核酸分子に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下または低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた、これらのポリヌクレオチドおよび核酸分子によってコードされるポリペプチドがそうであるように、本発明によって包含される。

【００９１】

好ましい実施形態において、本発明は、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドがそうであるように、上記の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、（ｇ）、（ｈ）または（ｉ）中のポリヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするか、あるいは低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むか、あるいはこのようなポリヌクレオチドからなる核酸分子を包含する。別の好ましい実施形態において、これらの核酸分子の相補体に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下または低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた、これらのポリヌクレオチドおよび核酸分子によってコードされるポリペプチドがそうであるように、本発明によって包含される。

【００９２】

別の実施形態において、本発明は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはそれからなる、単離されたタンパク質を提供する：（ａ）配列番号Ｙの完全アミノ酸配列またはクローンＩＤ番号Ｖのｃ ＤＮＡによってコードされる完全アミノ酸配列；（ｂ）配列番号Ｙのアミノ酸配列を有するＩＬ－６様ポリペプチドの成熟形態のアミノ酸配列またはクローンＩＤ番号Ｖによってコードされるアミノ酸配列；

（ｃ）配列番号Ｙの完全アミノ酸配列またはクローンＩＤ番号Ｖによってコードされる完全アミノ酸配列を有するＩＬ－６様ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントのアミノ酸配列；ならびに（ｄ）配列番号Ｙの完全アミノ酸配列またはクローンＩＤ番号Ｖによりコードされる完全アミノ酸配列を有するＩＬ－６様ポリペプチドの抗原性フラグメントのアミノ酸配列。

【００９３】

本発明はまた、例えば、上記（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、または（ｄ）におけるアミノ酸配列、配列番号Ｙに示されるアミノ酸配列、クローンＩＤ番号Ｖに含まれるｃＤＮＡによってコードされるアミノ酸配列、表１の１０列目に規定されるアミノ酸配列、配列番号Ｘのヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、および配列番号Ｘのポリヌクレオチド配列の相補体によってコードされるアミノ酸配列のいずれかに少なくとも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かまたはそれからなる、タンパク質に関する。これらのポリペプチドによってのフラグメント（例えば、本明細書に記載のフラグメント）もまた提供される。これらのアミノ酸配列をコードする核酸分子の相補体に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるさらなるタンパク質もまた、本発明により包含され、同様に、これらのタンパク質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。

【００９４】

本発明の参照ヌクレオチド配列に、例えば、少なくとも９５％「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸とは、その核酸のヌクレオチド配列が、そのヌクレオチド配列がポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の各１００ヌクレオチドあたり５つまでの点変異を含み得ることを除いて、参照配列に対して同一であることを意図する。換言すれば、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも９５％同一のヌクレオチド配列を有する核酸を得るために、参照配列のヌクレオチドの５％までが、欠失され得るか、または別のヌクレオチドで置換され得るか、あるいは参照配列中の総ヌクレオチドの５％までの数のヌクレオチドが参照配列中に挿入され得る。問い合わせ（ｑｕｅｒｙ）配列は、表１に示される配列全体、ＯＲＦ（オープンリーディングフレーム）、または本明細書中で記載されるように特定される任意のフラグメントであり得る。

【００９５】

実際問題として、任意の特定の核酸分子またはポリペプチドが、本発明のヌクレオチド配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であるか否かは、公知のコンピュータープログラムを使用して従来的に決定され得る。問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間の最も良好な全体的な適合性（全体的な配列整列とも呼ばれる）を決定するための好ましい方法は、Ｂｒｕｔｌａｇら（Ｃｏｍｐ．Ａｐｐ．　Ｂｉｏｓｃｉ．６：２３７－２４５（１９９０））のアルゴリズムに基づくＦＡＳＴＤＢコンピュータープログラムを使用して決定され得る。配列整列において、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともにＤＮＡ配列である。ＲＮＡ配列は、ＵからＴに変換することによって比較され得る。この全体的な配列整列の結果は、同一性パーセント（％）で示される。同一性パーセントを算定するためにＤＮＡ配列のＦＡＳＴＤＢ整列において使用される好ましいパラメーターは：Ｍａｔｒｉｘ＝Ｕｎｉｔａｒｙ、ｋ－ｔｕｐｌｅ＝４、Ｍｉｓｍａｔｃｈ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝１、Ｊｏｉｎｉｎｇ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝３０、Ｒａｎｄｏｍｉｚａｔｉｏｎ　Ｇｒｏｕｐ　Ｌｅｎｇｔｈ＝０、Ｃｕｔｏｆｆ　Ｓｃｏｒｅ＝１、Ｇａｐ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝５、Ｇａｐ　Ｓｉｚｅ　Ｐｅｎａｌｔｙ　０．０５、Ｗｉｎｄｏｗ　Ｓｉｚｅ＝５００または対象ヌクレオチド配列の長さ（どちらかより短い方）である。

【００９６】

対象配列が、５’または３’欠失のために（内部欠失のためではなく）問い合わせ配列より短い場合、手動の補正が結果に対してなされなければならない。これは、同一性パーセントを計算する場合に、ＦＡＳＴＤＢプログラムが対象配列の５’および３’の短縮を考

慮しないからである。５’末端または３’末端で短縮されている対象配列について、問い合わせ配列に対して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして一致／整列されない対象配列の５’および３’である問い合わせ配列の塩基の数を計算することによって補正される。ヌクレオチドが一致／整列されるか否かは、ＦＡＳＴＤＢ配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントは、特定のパラメーターを用いて上記のＦＡＳＴＤＢプログラムによって算定された同一性パーセントから差し引かれ、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この補正されたスコアが、本発明の目的に使用されるものである。ＦＡＳＴＤＢ整列によって示されるように、問い合わせ配列と一致／整列されない、対象配列の５’および３’の塩基の外側の塩基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的で算定される。

【００９７】

例えば、９０塩基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために１００塩基の問い合わせ配列に整列される。欠失が、対象配列の５’末端で生じ、従って、ＦＡＳＴＤＢ整列は、５’末端の最初の１０塩基で一致／整列を示さない。１０個の不対合塩基は、配列の１０％（一致していない５’および３’の末端の塩基の数／問い合わせ配列の塩基の総数）を表し、そのため１０％が、ＦＡＳＴＤＢプログラムによって算定される同一性パーセントのスコアから差し引かれる。残りの９０塩基が完全に一致する場合は、最終的な同一性パーセントは９０％である。別の例では、９０塩基の対象配列が、１００塩基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、その結果、対象配列の５’または３’に問い合わせと一致／整列しない塩基が存在しない。この場合、ＦＡＳＴＤＢによって算定される同一性パーセントは手動で補正されない。再び、問い合わせ配列と一致／整列しない対象配列の５’または３’の塩基のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

【００９８】

本発明の問い合わせアミノ酸配列に、例えば、少なくとも９５％「同一」であるアミノ酸配列を有するポリペプチドにより、対象ポリペプチドのアミノ酸配列は、その対象ポリペプチド配列が問い合わせアミノ酸配列の各１００個のアミノ酸あたり５つまでのアミノ酸の変更を含み得ることを除いて、問い合わせ配列に同一であることが意図される。換言すれば、問い合わせアミノ酸配列に少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列におけるアミノ酸残基の５％までが、挿入、欠失、（インデル（挿入－欠失）（ｉｎｄｅｌｓ））または別のアミノ酸で置換され得る。参照配列のこれらの改変は、参照アミノ酸配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端位置で生じ得るか、またはそれらの末端位置の間のどこにでも生じ得、参照配列中の残基間で個々にかまたは参照配列内の１個以上連続する群の状態かのいずれかで、散在する。

【００９９】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、表１に示されるアミノ酸配列またはそのフラグメント、配列番号Ｘにおけるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメント、あるいはｃＤＮＡプラスミドＶにおけるｃＤＮＡによりコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメントに対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であるか否かは、公知のコンピュータープログラムを使用して従来のように決定され得る。問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間での最良の全体的な一致（全体的配列整列とも呼ばれる）を決定するための好ましい方法は、Ｂｒｕｔｌａｇら（Ｃｏｍｐ．Ａｐｐ．Ｂｉｏｓｃｉ．６：２３７－２４５（１９９０））のアルゴリズムに基づくＦＡＳＴＤＢコンピュータープログラムを使用して決定され得る。配列整列において、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともヌクレオチド配列であるかまたは両方ともアミノ酸配列であるかのいずれかである。上記の全体的配列整列の結果は、同一性パーセントで示される。ＦＡＳＴＤＢアミノ酸整列に用いられる好ましいパラメーターは：Ｍａｔｒｉｘ＝ＰＡＭ　０、ｋ－ｔｕｐｌｅ＝２、Ｍｉｓｍａｔｃｈ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝１、Ｊｏｉｎｉｎｇ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝２０、Ｒａｎｄｏｍｉｚａｔｉｏｎ　Ｇｒｏｕｐ　Ｌｅｎｇｔｈ＝０、Ｃｕｔｏｆｆ

Ｓｃｏｒｅ＝１、Ｗｉｎｄｏｗ　Ｓｉｚｅ＝配列の長さ、Ｇａｐ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝５、Ｇａｐ　Ｓｉｚｅ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝０．０５、Ｗｉｎｄｏｗ　Ｓｉｚｅ＝５００または対象アミノ酸配列の長さ（どちらかより短い方）である。

【０１００】

対象配列が、Ｎ末端またはＣ末端欠失により（内部の欠失のためではなく）問い合わせ配列よりも短い場合、手動の補正が結果に対してなされなければならない。これは、ＦＡＳＴＤＢプログラムが、全体的な同一性パーセントを算定する場合に、対象配列のＮ末端短縮およびＣ末端短縮を考慮しないからである。Ｎ末端およびＣ末端で短縮されている対象配列について、問い合わせ配列に対して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして、対応する対象残基と一致／整列しない、対象配列のＮ末端およびＣ末端である問い合わせ配列の残基の数を計算することによって補正される。残基が一致／整列されているか否かは、ＦＡＳＴＤＢ配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントは、上記のＦＡＳＴＤＢプログラムによって特定のパラメーターを使用して計算された同一性パーセントから差し引かれ、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この最終的な同一性パーセントのスコアが、本発明の目的で使用されるものである。問い合わせ配列と一致／整列していない対象配列のＮ末端側およびＣ末端側の残基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的のために考慮される。すなわち、対象配列の最も遠いＮ末端およびＣ末端残基の外側の問い合わせ残基位置のみである。

【０１０１】

例えば、９０アミノ酸残基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために１００残基の問い合わせ配列と整列される。欠失が対象配列のＮ末端で生じ、そしてそれゆえＦＡＳＴＤＢ整列は、Ｎ末端での最初の１０残基の一致／整列を示さない。この１０個の不対合残基は、配列の１０％（一致していないＮ末端およびＣ末端の残基の数／問い合わせ配列中の残基の総数）を表し、その結果ＦＡＳＴＤＢプログラムによって計算される同一性パーセントのスコアから１０％が差し引かれる。残りの９０残基が完全に一致した場合、最終的な同一性パーセントは９０％である。別の例において、９０残基の対象配列が、１００残基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、そのため問い合わせ配列と一致／整列しない対象配列のＮ末端またはＣ末端の残基は存在しない。この場合、ＦＡＳＴＤＢによって算定される同一性パーセントは、手動で補正されない。再び、ＦＡＳＴＤＢ整列において示される、問い合わせ配列と一致／整列しない対象配列のＮ末端およびＣ末端の外側の残基位置のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

【０１０２】

改変体は、コード領域、非コード領域、またはその両方における変化を含み得る。特に好ましいものは、サイレントな置換、付加、または欠失を生成するがコードされるポリペプチドの特性または活性を変化させない変化を含む、ポリヌクレオチド改変体である。遺伝コードの縮重に起因するサイレントな置換によって生成されるヌクレオチド改変体が、好ましい。さらに、５０アミノ酸未満、４０アミノ酸未満、３０アミノ酸未満、２０アミノ酸未満、１０アミノ酸未満、あるいは５～５０アミノ酸、５～２５アミノ酸、５～１０アミノ酸、１～５アミノ酸、または１～２アミノ酸が、任意の組合せで置換、欠失、または付加されている改変体もまた、好ましい。ポリヌクレオチド改変体は、種々の理由（例えば、特定の宿主についてのコドン発現を至適化する（ヒトｍＲＮＡにおけるコドンを、Ｅ．ｃｏｌｉのような細菌宿主によって好ましいコドンに変化させる））のために、生成され得る。

【０１０３】

天然に存在する改変体は、「対立遺伝子改変体」と呼ばれ、そして生物の染色体上の所定の遺伝子座を占有する遺伝子のいくつかの代替の形態のうちの１つをいう。（Ｇｅｎｅｓ　ＩＩ、Ｌｅｗｉｎ，Ｂ．，編　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８５））。これらの対立遺伝子改変体は、ポリヌクレオチドレベルおよび／またはポリペプチドレベルのいずれかで変化し得、そして本発明に含まれる。あるいは、天然

に存在しない改変体は、変異誘発技術によってまたは直接的な合成によって生成され得る。

【０１０４】

タンパク質工学および組換えＤＮＡ技術の公知の方法を使用して、改変体は、本発明のポリペプチドの特性を改善または変化させるために作製され得る。例えば、本明細書中に考察されるように、１つ以上のアミノ酸が、生物学的機能の実質的な欠損を伴わずに、本発明のポリペプチドのＮ末端またはＣ末端から欠失され得る。Ｒｏｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：２９８４－２９８８（１９９３）の著者らは、３個、８個、または２７個のアミノ末端アミノ酸残基を欠失させた後でさえもヘパリン結合活性を有する改変体ＫＧＦタンパク質を報告した。同様に、インターフェロンγ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た後、１０倍までのより高い活性を示した（Ｄｏｂｅｌｉら、Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　７：１９９－２１６（１９８８））。

【０１０５】

さらに、豊富な証拠は、改変体が、天然に存在するタンパク質の生物学的活性に類似する活性をしばしば保持することを実証する。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の広範囲にわたる変異分析を行った。彼らは、ランダムな変異誘発を使用して、分子の全長にわたって改変体当たり平均２．５アミノ酸の変化になる、３，５００個を超える個々のＩＬ－１ａ改変体を作製した。複数の変異が、全ての潜在的なアミノ酸の位置で試験された。この研究者らは、「分子の大部分は、［結合活性または生物学的活性］のいずれに対してもほとんど影響を伴わないで変化され得る」ことを見出した。（要約を参照のこと）。実際、試験された３，５００個を超えるヌクレオチド配列のうち、わずか２３個の独特なアミノ酸配列が、野生型と活性が有意に異なるタンパク質を生成した。

【０１０６】

さらに、本明細書において記載されるように、ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端からの１つ以上のアミノ酸の欠失が、１つ以上の生物学的機能の改変または欠失を生じたとしても、他の生物学的活性はなお保持され得る。例えば、分泌される形態を認識する抗体を誘導および／または結合する、欠失改変体の能力は、分泌される形態の大多数より少ない残基が、Ｎ末端またはＣ末端から除去される場合に保持されるようである。タンパク質のＮ末端またはＣ末端残基を欠損す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するか否かは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の慣用的な方法によって容易に決定され得る。

【０１０７】

従って、本発明はさらに、本発明のポリペプチド（それらが改変体である）の機能的な活性（例えば、生物学的活性）を示すポリペプチド改変体を含む。このような改変体としては、活性に対する影響をほとんど有さないように、当該分野において公知の一般的な法則に従って選択される、欠失、挿入、逆位、反復、および置換が挙げられる。

【０１０８】

本出願は、本明細書中に開示される核酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７、９８％、９９％または１００％同一の核酸分子に関し（例えば、Ｎおよび／Ｃ末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする）、それらが機能的活性を有するポリペプチドをコードするかどうかに関わらない。これは、特定の核酸分子が機能的活性を有するポリペプチドをコードしないためであり、当業者は、例えば、ハイブリダイゼーションプローブまたはポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）プライマーとして核酸分子をどのようにして使用するかを知る。機能的活性を有するポリペプチドをコードしない本発明の核酸分子の使用は、特に、（１）ｃＤＮＡライブラリー内で遺伝子または対立遺伝子またはそれらのスプライス変異体を単離する工程；（２）Ｖｅｒｍａら、Ｈｕｍａｎ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ：Ａ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｂａｓｉｃ　Ｔｅｃｈｎ

ｉｑｕｅｓ、Ｐｅｒｇａｍｏｎ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８８）に記載されるような、遺伝子の正確な染色体位置を提供するための、中期染色体拡散へのインサイチュハイブリダイゼーション（例えば、「ＦＩＳＨ」）；および（３）特定の組織内でｍＲＮＡ発現を検出するためのＮｏｒｔｈｅｒｎ　Ｂｌｏｔ分析。

【０１０９】

しかし、本明細書中に開示される核酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一の配列を有する核酸分子が好ましく、これは、実際に本発明のポリペプチドの機能的活性を有するポリペプチドをコードする。

【０１１０】

当然のことながら、遺伝子コードの縮重に起因して、例えば、ｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡの核酸配列、表１（配列番号Ｘ）に示される核酸配列またはそのフラグメントに対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を有する多数の核酸分子が、「機能活性を有する」ポリペプチドをコードするということを、当業者は、直ちに理解する。実際に、これらのヌクレオチド配列のいずれかの縮重改変体すべてが、同じポリペプチドをコードするので、多くの場合、このことは、上記の比較アッセイを実行しなくても、当業者に明らかである。縮重改変体でないような核酸分子について、合理的な数がまた、機能活性を有するポリペプチドをコードすることが、当該分野でさらに理解される。なぜならば、当業者が、さらに以下に記載されるように、タンパク質を有意に機能させるかまたは機能しそうにないアミノ酸置換（例えば、１つの脂肪族アミノ酸を第２の脂肪族アミノ酸と置換すること）を完全に知っているからである。

【０１１１】

例えば、表現型的にサイレントなアミノ酸置換の作製方法に関する手引きは、Ｂｏｗｉｅ，Ｊ．Ｕ．ら、「Ｄｅｃｉｐｈｅｒｉｎｇ　ｔｈｅ　Ｍｅｓｓａｇｅ　ｉｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ：Ｔｏｌｅｒａｎｃｅ　ｔｏ　Ａｍｉｎｏ　Ａｃｉｄ　Ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎｓ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４７：１３０６－１３１０（１９９０）に提供され、ここにおいてこの著者らは、アミノ酸配列の変化に対する寛容性を研究するための２つの主な戦略を示す。

【０１１２】

第１のストラテジーは、進化の過程の間の自然の選択によるアミノ酸置換の寛容を利用する。異なる種におけるアミノ酸配列を比較して、保存されるアミノ酸が同定され得る。これらの保存されるアミノ酸は、タンパク質の機能について重要であるようである。対照的に、置換が自然の選択によって寛容されたアミノ酸の位置は、これらの位置がタンパク質の機能に重要ではないことを示す。従って、アミノ酸置換を寛容する位置は改変され得るが、タンパク質の生物学的活性をなおも維持する。

【０１１３】

第２のストラテジーは、タンパク質機能に重要な領域を同定するために、クローン化された遺伝子の特定の位置でアミノ酸変化を導入するための遺伝子工学を使用する。例えば、部位指向性変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発（分子中の各残基で１つのアラニン変異の導入）が、使用され得る。（ＣｕｎｎｉｎｇｈａｍおよびＷｅｌｌｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４４：１０８１－１０８５（１９８９））。次いで、得られた変異分子は生物学的活性について試験され得る。

【０１１４】

著者らが言及するように、これらの２つのストラテジーは、タンパク質がアミノ酸置換に驚くほど寛容であることを明らかにした。著者らはさらに、どのアミノ酸変化が、タンパク質中の特定のアミノ酸位置で許容されるようであるかを示す。例えば、（タンパク質の三次構造内に）ほとんど埋もれているアミノ酸残基は、非極性側鎖を必要とするが、表面側鎖の特徴は、一般にほとんど保存されない。さらに、寛容される保存的なアミノ酸置換は、脂肪族または疎水性アミノ酸のＡｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、およびＩｌｅの置換；ヒド

ロキシル残基のＳｅｒおよびＴｈｒの置換；酸性残基のＡｓｐおよびＧｌｕの置換；アミド残基のＡｓｎおよびＧｌｎの置換、塩基性残基のＬｙｓ、Ａｒｇ、およびＨｉｓの置換；芳香族残基のＰｈｅ、Ｔｙｒ、およびＴｒｐの置換、ならびに小さなサイズのアミノ酸のＡｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｍｅｔ、およびＧｌｙの置換を含む。保存的なアミノ酸置換に加えて、本発明の改変体は、（ｉ）１つ以上の非保存的なアミノ酸残基との置換、ここでは置換されるアミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされるアミノ酸残基であってもよく、もしくはそうでなくてもよい、または（ｉｉ）置換基を有する１つ以上のアミノ酸残基での置換、または（ｉｉｉ）別の化合物（例えば、ポリペプチドの安定性および／もしくは可溶性を増加するための化合物（例えば、ポリエチレングリコール））との成熟ポリペプチドの融合、または（ｉｖ）さらなるアミノ酸（例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ融合領域ペプチド、またはリーダーもしくは分泌配列、または精製を容易にする配列のような）とのポリペプチドの融合、または（ｖ）アルブミン（組み換えアルブミンを含むがこれに限定されない（例えば、その全体が参考として本明細書に援用される、１９９９年３月２日発行、米国特許番号第５，８７６，９６９号、欧州特許番号第０４１３　６２２号、および１９９８年６月１６日発行、米国特許番号第５，７６６，８８３号）を参照のこと）のような別の化合物とのこのポリペプチドの融合を含む。このような改変体ポリペプチドは、本明細書中の教示から、当業者の範囲内であると考えられる。

【０１１５】

例えば、他の荷電されたアミノ酸または中性のアミノ酸での荷電されたアミノ酸のアミノ酸置換を含むポリペプチド改変体は、改善された特性（例えば、より少ない凝集性）を有するタンパク質を生成し得る。薬学的処方物の凝集は、凝集体の免疫原性活性に起因して、活性の減少およびクリアランスの増加の両方をもたらす。（Ｐｉｎｃｋａｒｄら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：３３１－３４０（１９６７）；Ｒｏｂｂｉｎｓら、Ｄｉａｂｅｔｅｓ　３６：８３８－８４５（１９８７）；Ｃｌｅｌａｎｄら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　１０：３０７－３７７（１９９３））。

【０１１６】

本発明のさらなる実施形態は、少なくとも１つのアミノ酸置換を含むが、５０アミノ酸置換を超えず、さらにより好ましくは、４０アミノ酸置換を超えず、なおより好ましくは、３０アミノ酸置換を超えず、そしてなおさらにより好ましくは、２０アミノ酸置換を超えないアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。もちろん、ポリペプチドが、配列番号Ｙのポリペプチドのアミノ酸配列、配列番号Ｘによってコードされるアミノ酸配列、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶ中のｃＤＮＡによってコードされるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有することが非常に好ましく、好ましさの増大する順番に、これは、少なくとも１つのアミノ酸置換を含むが、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、または１アミノ酸置換を超えない。特定の実施形態において、配列番号Ｙのアミノ酸配列またはそのフラグメント（例えば、本明細書に記載の成熟形態および／または他のフラグメント）、配列番号Ｘによってコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメント、ならびに／あるいはｃＤＮＡプラスミドＶまたはそのフラグメントによってコードされるアミノ酸配列における付加、置換、および／または欠失の数は、１～５、５～１０、５～２５、５～５０、１０～５０、または５０～１５０であり、保存的アミノ酸置換が好ましい。本明細書中で議論されるように、本発明の任意のポリペプチドは、融合タンパク質を産生するために使用され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、第２のタンパク質と融合される場合、抗原性タグとして使用され得る。本発明のポリペプチドに対して惹起される抗体は、ポリペプチドに結合することによって、第２のタンパク質を間接的に検出するために使用され得る。さらに、分泌されるタンパク質は、細胞位置を輸送シグナルに基づいて標的化するので、分泌されることが示される本発明のポリペプチドは、他のタンパク質に一旦融合されると標的化分子として使用され得る。

【０１１７】

本発明のポリペプチドと融合され得るドメインの例は、異種シグナル配列のみならず、ま

た他の異種機能性領域をも含む。融合は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。

【０１１８】

特定の好ましい実施形態において、本発明のタンパク質は、ポリペプチドがＮおよび／またはＣ末端欠失変異体である融合タンパク質を含む。好ましい実施形態において、本出願は、特定のＮおよびＣ末端欠失変異体のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一の核酸分子に関する。これらのポリペプチド（フラグメントおよび／または改変体を含む）をコードするポリヌクレオチドはまた、本発明によって包含される。

【０１１９】

さらに、融合タンパク質はまた、本発明のポリペプチドの特徴を改良するために操作され得る。例えば、さらなるアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域が、宿主細胞からの精製または続く取り扱いおよび貯蔵の間の安定性および持続性を改良するためにポリペプチドのＮ末端へ付加され得る。また、ペプチド部分は精製を容易にするためにポリペプチドへ付加され得る。このような領域は、ポリペプチドの最終調製の前に除去され得る。ポリペプチドの取り扱いを容易にするためのペプチド部分の付加は、当該分野でよく知られる慣用の技術である。

【０１２０】

当業者に理解されるように、上記の本発明のポリペプチドおよびそのエピトープ保有フラグメントは、異種ポリペプチド配列と連結させられ得る。例えば、本発明のポリペプチドは、異種ポリペプチド配列と融合され得、例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン（ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＭ）の定常ドメインまたはそれらの部分（ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、またはそれらの任意の組み合わせ（それらの全体領域および部分の両方を含む）と融合され得、キメラポリペプチドを生じる。これらの融合タンパク質は、精製を容易にし得、そしてインビボでの半減期を増大させ得る。これは、ヒトＣＤ４－ポリペプチドの最初の２つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている。（ＥＰ　３９４，８２７；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ，３３１：８４～８６（１９８８））。（ＩｇＧ部分に起因する）ジスルフィド結合二量体構造を有する融合タンパク質はまた、単量体タンパク質またはタンパク質のフラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和においてより効果的である（Ｆｏｕｎｔｏｕｌａｋｉｓら，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２７０：３９５８－３９６４（１９９５））。

【０１２１】

（ベクター、宿主細胞、およびタンパク質産生）

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、宿主細胞、および組換え技術によるポリペプチドの産生に関連する。例えば、ベクターは、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクター、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、複製コンピテント、または複製欠損であり得る。後者の場合、一般的にウイルス増殖は、補完性（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔｉｎｇ）宿主細胞にのみ生じる。

【０１２２】

本発明のポリヌクレオチドは、宿主における増殖のために選択マーカーを含むベクターに連結され得る。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈澱物のような沈澱物、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使用してインビトロ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。

【０１２３】

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λＰＬプロモーター、Ｅ．ｃｏｌｉ　ｌａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｐｈｏＡプロモーターおよびｔａｃプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーターおよびＳＶ４０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。他の適切なプロモーターは当業者に公知である。発現構築物はさらに、転写開始、転写終結のための部位、および転写領域において、翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。この構築物によって発現される転写物のコード部分は、好ましくは、始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）を含む。

【０１２４】

示されるように、発現ベクターは、好ましくは少なくとも１つの選択マーカーを含む。このようなマーカーは、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、Ｇ４１８、またはネオマイシン耐性遺伝子、ならびにＥ．ｃｏｌｉおよび他の細菌において培養するため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は、細菌細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓおよび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Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌｉａ Ｓ２およびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ Ｓｆ９細胞）；動物細胞（例えば、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、２９３細胞、およびＢｏｗｅｓメラノーマ細胞）；ならびに植物細胞を含むが、これらに限定されない。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および条件は、当該分野で公知である。

【０１２５】

細菌における使用のために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）を含む。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。酵母系における使用のために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（全てが、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｂａｄ，ＣＡから入手可能）が挙げられるがこれらに限定されない。他の適切なベクターは、当業者に容易に明らかである。

【０１２６】

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介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ってもたらされ得る。このような方法は、Ｄａｖｉｓら、Ｂａｓｉｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ （１９８６）のような多くの標準的実験マニュアルに記載される。本発明のポリペプチドが、実際、組換えベクターを欠損する宿主細胞によって発現され得ることが特に意図される。

【０１２７】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈澱またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって組換え細胞培養物から回収され得、そして精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（「ＨＰＬＣ」）が精製のために使用される。

【０１２８】

本発明のポリペプチドはまた、以下から回収され得る：直接単離されるかまたは培養されるかにかかわらず、体液、組織および細胞を含む天然の供給源から精製された産物；化学的合成手順の産物；ならびに、例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む、原核生物宿主または真核生物宿主から組換え技術によって産生された産物。組換え産生手順に使用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、グリコシル化されてもまたはグリコシル化されていなくてもよい。さらに、本発明のポリペプチドはまた、宿主媒介プロセスの結果として、いくつかの場合において、最初の改変されたメチオニン残基を含み得る。従って、一般に、翻訳開始コドンによってコードされるＮ末端メチオニンが、すべての真核生物細胞における翻訳後の任意のタンパク質から高い効率で除去されることは当該分野において周知である。ほとんどのタンパク質においてＮ末端メチオニンもまた、ほとんどの原核生物において効果的に除去されるが、いくつかのタンパク質について、この原核生物除去プロセスは、Ｎ末端メチオニンが共有結合するアミノ酸の性質に依存しており、非効率的である。

【０１２９】

１つの実施形態において、酵母Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓは、真核細胞系において、本発明のポリペプチドを発現させるために使用される。Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓは、メタノールをその唯一の炭素供給源として代謝し得るメチル栄養性（ｍｅｔｈｙｌｏｔｒｏｐｈｉｃ）酵母である。メタノール代謝経路における主要な工程は、O_2を使用してのホルムアルデヒドへのメタノールの酸化である。この反応は、酵素アルコールオキシダーゼによって触媒される。その唯一の炭素供給源としてメタノールを代謝するために、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓは、O_2に対するアルコールオキシダーゼの比較的低い親和性に部分的に起因して、高レベルのアルコールオキシダーゼを生成する。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およそ３０％までを含む。Ｅｌｌｉｓ，Ｓ．Ｂ．ら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：１１１１～２１（１９８５）；Ｋｏｕｔｚ，Ｐ．Ｊ．ら、Ｙｅａｓｔ　５：１６７～７７（１９８９）；Ｔｓｃｈｏｐｐ，Ｊ．Ｆ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１５：３８５９～７６（１９８７）。従って、ＡＯＸ１調節配列の全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など）は、メタノールの存在下で増殖したＰｉｃｈｉａ酵母において、指数関数的に高レベルで発現される。

【０１３０】

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およびＪ．Ｃｒｅｇｇ編（Ｔｈｅ　Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ，１９９８）において本質的に記載されるように、Ｐｉｃｈｅａ酵母系において、本明細書中に示されるように本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡを発現させるために使用される。この発現ベクターは、マルチクローニング部位の上流に位置するＰｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ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プロモーターの効力によって、本発明のポリペプチドの発現および分泌を可能にする。

【０１３１】

多くの他の酵母ベクター（例えば、ｐＹＥＳ２、ｐＹＤ１、ｐＴＥＦ１／Ｚｅｏ、ｐＹＥＳ２／ＧＳ、ｐＰＩＣＺ、ｐＧＡＰＺ、ｐＧＡＰＺα、ｐＰＩＣ９、ｐＰＩＣ３．５、ｐＨＩＬ－Ｄ２、ｐＨＩＬ－Ｓ１、ｐＰＩＣ３．５Ｋ、およびＰＡＯ８１５）は、当業者が容易に理解するように、提案された発現構築物が必要とされる場合インフレームのＡＵＧを含む転写、翻訳、分泌（所望される場合）などの適切に配置されたシグナルを提供する限り、ｐＰＩＣ９Ｋの代わりに使用され得る。

【０１３２】

別の実施形態において、異種コード配列（例えば、本発明のポリヌクレオチドなど）の高レベルの発現は、本発明の異種ポリヌクレオチドを発現ベクター（例えば、ｐＧＡＰＺまたはｐＧＡＰＺαなど）中にクローニングし、そしてメタノールの非存在下で酵母培養物を増殖させることによって達成され得る。

【０１３３】

本明細書において議論されるベクター構築物を含む宿主細胞を含むことに加えて、本発明はまた、脊椎動物起源（特に、哺乳動物起源）の一次（ｐｒｉｍａｒｙ）宿主細胞、二次（ｓｅｃｏｎｄａｒｙ）宿主細胞、および不死化宿主細胞を含む。これらの宿主細胞は、内因性の遺伝物質（例えば、コード配列）を欠失または置換するように操作されており、そして／または本発明のポリヌクレオチドと作動可能に連結された遺伝物質（例えば、異種ポリヌクレオチド配列）を含むように操作され、そして内因性のポリヌクレオチドを活性化、変更、および／または増幅する。例えば、当該分野で公知の技術は、相同組換えを介して、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）ならびに内因性ポリヌクレオチド配列を作動可能に連結するために使用され得る（例えば、１９９７年６月２４日に発行された米国特許番号第５，６４１，６７０号；１９９６年９月２６日に公開された国際公開第ＷＯ　９６／２９４１１号；１９９４年８月４日に公開された国際公開第ＷＯ　９４／１２６５０号；Ｋｏｌｌｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：８９３２－８９３５（１９８９）；およびＺｉｊｌｓｔｒａら，Ｎａｔｕｒｅ　３４２：４３５－４３８（１９８９）を参照のこと。これらの開示の各々は、それら全体において参考として援用される）。

【０１３４】

さらに、本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の技術を用いて化学合成され得る（例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，１９８３，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｎ．Ｙ．およびＨｕｎｋａｐｉｌｌｅｒら，Ｎａｔｕｒｅ，３１０：１０５－１１１（１９８４）を参照のこと）。例えば、本発明の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、ペプチド合成機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、以下が挙げられるがこれらに限定されない：通常のアミノ酸のＤ異性体、２，４－ジアミノ酪酸、ａ－アミノイソ酪酸、４－アミノ酪酸、Ａｂｕ、２－アミノ酪酸、ｇ－Ａｂｕ、ｅ－Ａｈｘ、６－アミノヘキサン酸、Ａｉｂ、２－アミノイソ酪酸、３－アミノプロピオン酸、オルニチン、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、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ｂ－アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸（例えば、ｂ－メチルアミノ酸）、Ｃａ－メチルアミノ酸、Ｎａ－メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸アナログ。さらに、アミノ酸はＤ（右旋性）またはＬ（左旋性）であり得る。

【０１３５】

本発明は、翻訳の間または翻訳後に、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子または他の細胞性リガンドへの結合などによって示差的に改変される本発明のポリペプチドを含む。任意の多数の化学的改変は、以下を含むがこれらに限定されない公知の技術によって実施され得る：臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、Ｖ８プロテアーゼ、$NaBH_4$による特異的化学的切断；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシンの存在下での代謝合成；など。

【０１３６】

本発明によって含まれるさらなる翻訳後修飾としては、例えば、以下などが挙げられる：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。このポ

リペプチドはまた、検出可能な標識（例えば、酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識）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。

【０１３７】

本発明によってまた、さらなる利点（例えば、このポリペプチドの溶解度、安定性および循環時間の増加、または免疫原性の減少）を提供し得る、本発明のポリペプチドの化学修飾誘導体が提供される（米国特許番号第４，１７９，３３７号を参照のこと）。誘導体化のための化学部分は、水溶性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなど）から選択され得る。このポリペプチドは、この分子内のランダムな位置で、またはこの分子内の所定の位置で改変され得、そして１、２、３以上の結合した化学部分を含み得る。

【０１３８】

このポリマーは、任意の分子量のポリマーであり得、そして分枝状であっても非分枝状であってもよい。ポリエチレングリコールに関しては、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の容易さのために、約１ｋＤａと約１００ｋＤａとの間（用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製において、いくつかの分子は示した分子量よりも重く、いくつかは示した分子量よりも軽いことを示す）である。所望の治療的プロフィール（例えば、所望される持続放出の持続時間、ある場合には生物学的活性に対する効果、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または抗原性がないこと、および治療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公知の効果）に依存して、他のサイズが用いられ得る。

【０１３９】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学的部分）は、このタンパク質の機能的ドメインまたは抗原性ドメインに対する効果を考慮してタンパク質に結合されるべきである。当業者に利用可能な多数の結合方法が存在する（例えば、本明細書中に参考として援用される、ＥＰ　０　４０１　３８４（Ｇ－ＣＳＦにＰＥＧを結合する）、Ｍａｌｉｋら，Ｅｘｐ．Ｈｅｍａｔｏｌ．２０：１０２８－１０３５（１９９２）（塩化トレシルを用いたＧＭ－ＣＳＦのペグ化（ｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ）を報告する）もまた参照のこと）。例えば、ポリエチレングリコールは、反応性基（例えば、遊離のアミノ基またはカルボキシル基）によってアミノ酸残基を介して共有結合され得る。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合し得る基である。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基としては、リジン残基およびＮ末端アミノ酸残基が挙げられ得る；遊離のカルボキシル基を有するアミノ酸残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびＣ末端アミノ酸残基が挙げられ得る。スルフヒドリル残基もまた、ポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として用いられ得る。治療目的のために好ましいのは、アミノ基での結合、例えば、Ｎ末端またはリジン基での結合である。

【０１４０】

Ｎ末端で化学修飾されたタンパク質を具体的に所望し得る。ポリエチレングリコールを本発明の組成の例示として用いて、種々のポリエチレングリコール分子から（分子量、分枝などによって）、反応混合物中でのポリエチレングリコール分子のタンパク質（ポリペプチド）分子に対する比、行われるべきペグ化反応の型、および選択されたＮ末端ペグ化タンパク質の獲得方法を選択し得る。Ｎ末端ペグ化調製物の獲得方法（すなわち、必要な場合、この部分を他のモノペグ化部分から分離すること）は、ペグ化タンパク質分子の集団からの、Ｎ末端ペグ化物質の精製により行われ得る。Ｎ末端修飾で化学修飾された選択的タンパク質は、特定のタンパク質における誘導体化に利用可能な異なる型の第１級アミノ基（リジン対Ｎ末端）の示差的反応性を利用する還元的アルキル化によって達成され得る。適切な反応条件下では、カルボニ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。

【０１４１】

本発明のポリペプチドは、単量体または多量体（すなわち、二量体、三量体、四量体およびより高度の多量体）であり得る。従って、本発明は、単量体および多量体の本発明のポ

リペプチド、それらの調製ならびにそれらを含む組成物（好ましくは治療薬）に関する。特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、単量体、二量体、三量体または四量体である。さらなる実施形態では、本発明の多量体は、少なくとも二量体、少なくとも三量体、または少なくとも四量体である。

【０１４２】

本発明によって含まれる多量体は、ホモマーまたはヘテロマーであり得る。本明細書中で用いられる場合、用語ホモマーは、配列番号Ｙのアミノ酸配列に対応するかまたは配列番号Ｘによってコードされるアミノ酸配列または配列番号Ｘの相補体、および／またはｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされるアミノ酸配列（本明細書中に記載されるこれらに対応する、フラグメント、改変体、スプライス改変体および融合タンパク質を含む）のみを含む多量体をいう。これらのホモマーは、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み得る。特定の実施形態では、本発明のホモマーは、同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドのみを含む多量体である。別の特定の実施形態では、本発明のホモマーは、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む多量体である。特定の実施形態では、本発明の多量体は、ホモ二量体（例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む）あるいはホモ三量体（例えば、同一および／または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む）である。さらなる実施形態では、本発明のホモマー性多量体は、少なくともホモ二量体、少なくともホモ三量体または少なくともホモ四量体である。

【０１４３】

本明細書中で用いられる場合、用語ヘテロマーとは、本発明のポリペプチドに加えて、１つ以上の異種ポリペプチド（すなわち、異なるタンパク質のポリペプチド）を含む多量体をいう。特定の実施形態では、本発明の多量体は、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体またはヘテロ四量体である。さらなる実施形態では、本発明のヘテロマー性多量体は、少なくともヘテロ二量体、少なくともヘテロ三量体または少なくともヘテロ四量体である。

【０１４４】

本発明の多量体は、疎水性、親水性、イオン性および／もしくは共有結合性の結合の結果であり得、ならびに／または例えば、リポソーム形成によって間接的に連結され得る。従って、１つの実施形態では、本発明の多量体（例えば、ホモ二量体またはホモ三量体など）は、本発明のポリペプチドが溶液中で互いに接触する場合に形成される。別の実施形態では、本発明のヘテロ多量体（例えば、ヘテロ三量体またはヘテロ四量体など）は、本発明のポリペプチドが、溶液中で本発明のポリペプチドに対する抗体（本発明の融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）と接触する場合に、形成される。他の実施形態では、本発明の多量体は、本発明のポリペプチドとの、および／または本発明のポリペプチド間での共有結合によって形成される。このような共有結合は、ポリペプチド配列（例えば、配列番号Ｙに列挙されるか、または配列番号Ｘおよび／もしくはｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされるポリペプチド中に含まれる、ポリペプチド配列）中に含まれる１以上のアミノ酸残基を含み得る。１例では、この共有結合は、ネイティブ（すなわち、天然に存在する）ポリペプチドにおいて相互作用するポリペプチド配列内に存在するシステイン残基間での架橋である。別の例では、この共有結合は、化学的操作または組換え操作の結果である。あるいは、このような共有結合は、融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列において含まれる、１以上のアミノ酸残基を含み得る。１例では、共有結合は、本発明の融合タンパク質に含まれる異種配列間にある（例えば、米国特許番号第５，４７８，９２５号を参照のこと）。特定の例では、この共有結合は、（本明細書中に記載されるような）本発明のＦｃ融合タンパク質に含まれる異種配列間にある。別の特定の例では、本発明の融合タンパク質の共有結合は、共有結合した多量体を形成し得る別のタンパク質（例えば、オステオプロテゲリン（ｏｓｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ）（例えば、国際公開第ＷＯ　９８／４９３０５号（この内容はその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）など）由来の異種ポリペプチド配列間にある。別の実施形態では、２以上の本発明のポリペプチドは、ペプチドリンカーを介して連結される。例と

しては、米国特許番号第５，０７３，６２７号（本明細書中に参考として援用される）に記載されるペプチドリンカーが挙げられる。ペプチドリンカーによって隔てられた本発明の複数のポリペプチドを含むタンパク質は、従来の組換えＤＮＡ技術を用いて生成され得る。

【０１４５】

本発明の多量体ポリペプチドを調製する別の方法は、ロイシンジッパーまたはイソロイシンジッパーのポリペプチド配列に融合した本発明のポリペプチドの使用を含む。ロイシンジッパードメインおよびイソロイシンジッパードメインは、それらが発見されたタンパク質の多量体化を促進するポリペプチドである。ロイシンジッパーは、本来、いくつかのＤＮＡ結合タンパク質（Ｌａｎｄｓｃｈｕｌｚら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１７５９（１９８８））において同定され、そしてそれ以来、種々の異なるタンパク質から見出されている。公知のロイシンジッパーは、共通して、二量体化または三量体化する天然に存在するペプチド、およびそれらの誘導体である。本発明の可溶性多量体タンパク質を産生するために適切なロイシンジッパードメインの例は、ＰＣＴ出願ＷＯ９４／１０３０８（本明細書中で参考として援用される）に記載されるロイシンジッパードメインである。溶液中で二量体化または三量体化するポリペプチド配列と融合した、本発明のポリペプチドを含む組換え融合タンパク質は、適切な宿主細胞において発現され、そして得られる可溶性多量体融合タンパク質は、当該分野で公知の技術を使用して、培養上清から回収される。

【０１４６】

本発明の三量体ポリペプチドは、増大した生物学的活性の利点を提供し得る。好ましいロイシンジッパー部分およびイソロイシン部分は、優先的に三量体を形成するものである。１つの例は、Ｈｏｐｐeら（ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３４４：１９１，（１９９４））および米国特許出願第０８／４４６，９２２号（本明細書中で参考として援用される）に記載されるような、肺サーファクタントタンパク質Ｄ（ＳＰＤ）から誘導されるロイシンジッパーである。天然に存在する三量体タンパク質から誘導される他のペプチドは、本発明の三量体ポリペプチドの調製において使用され得る。

【０１４７】

別の例において、本発明のタンパク質は、Ｆｌａｇ（登録商標）ポリペプチド配列を含む本発明の融合タンパク質に含まれるＦｌａｇ（登録商標）ポリペプチド配列間の相互作用によって結合される。さらなる実施形態において、本発明の結合タンパク質は、本発明のＦｌａｇ（登録商標）融合タンパク質に含まれる異種ポリペプチド配列と抗Ｆｌａｇ（登録商標）抗体との間の相互作用によって結合される。

【０１４８】

本発明の多量体は、当該分野で公知の化学技術を用いて生成され得る。例えば、本発明の多量体中に含まれることが所望されるポリペプチドは、当該分野で公知のリンカー分子およびリンカー分子長最適化技術を用いて化学的に架橋され得る（例えば、米国特許番号第５，４７８，９２５号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。さらに、本発明の多量体は、多量体中に含まれることが所望されるポリペプチドの配列中に位置するシステイン残基間に１つ以上の分子間架橋を形成するために、当該分野で公知の技術を用いて生成され得る（例えば、米国特許番号第５，４７８，９２５号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。さらに、本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドのＣ末端またはＮ末端へのシステインまたはビオチンの付加によって慣用的に改変され得、そして当該分野で公知の技術が、１つ以上のこれらの改変したポリペプチドを含む多量体を生成するために適用され得る（例えば、米国特許番号第５，４７８，９２５号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。さらに、当該分野で公知の技術は、本発明の多量体に含まれることが所望されるポリペプチド成分を含むリポソームを生成するために適用され得る（例えば、米国特許番号第５，４７８，９２５号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。

【０１４９】

あるいは、本発明の多量体は、当該分野で公知の遺伝子工学技術を用いて生成され得る。１つの実施形態において、本発明の多量体中に含まれるポリペプチドは、本明細書中に記載されるかまたはさもなくば当該分野で公知の融合タンパク質技術を用いて組換え産生される（例えば、米国特許番号第５，４７８，９２５号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。特定の実施形態において、本発明のホモ二量体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をコードするポリヌクレオチド配列を、リンカーポリペプチドをコードする配列に連結し、次いで、もともとのＣ末端からＮ末端へ逆方向にポリペプチドの翻訳産物をコードする合成ポリヌクレオチド（リーダー配列を欠く）に、さらに連結することによって生成される（例えば、米国特許番号第５，４７８，９２５号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。別の実施形態において、本明細書中に記載されるかまたはさもなくば当該分野で公知の組換え技術が適用されて、膜貫通ドメイン（あるいは疎水性ペプチドまたはシグナルペプチド）を含む本発明の組換えポリペプチドを生成し、そしてこれは、膜再構成技術によってリポソームに取り込まれ得る（例えば、米国特許番号第５，４７８，９２５号を参照のこと、これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。

【０１５０】

（抗体）

本発明のさらなるポリペプチドは、本発明の配列番号Ｙのポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、もしくは改変体、および／または本発明のエピトープに免疫特異的に結合する（特異的抗体－抗原結合をアッセイするための当該分野で周知のイムノアッセイにより決定されるような）抗体およびＴ－細胞抗原レセプター（ＴＣＲ）に関する。本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、単鎖抗体、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆａｂ発現ライブラリーによって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、本発明の抗体に対する抗Ｉｄ抗体が挙げられる）、および任意の上記抗体のエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、用語「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学的に活性な部分（すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子）をいう。本発明の免疫グロブリン分子は、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）またはサブクラスの分子であり得る。

【０１５１】

最も好ましくは、抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体フラグメントであり、そしてＦａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）２、Ｆｄ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、単鎖抗体、ジスルフィド連結Ｆｖ（ｓｄＦｖ）およびＶＬドメインまたは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、単独であるいは以下：ヒンジ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインの全体または部分との組み合わせで含み得る。ヒンジ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインと可変領域の任意の組み合わせをもまた含む抗原結合フラグメントもまた、本発明に含まれる。本発明の抗体は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源由来であり得る。好ましくは、この抗体は、ヒト、ネズミ（例えば、マウスおよびラット）、ロバ、ウサギ（ｓｈｉｐ　ｒａｂｂｉｔ）、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。本明細書中で使用される場合、「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、そしてヒト免疫グロブリンライブラリーから、または１つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックでかつ内因性免疫グロブリンを発現しない動物（以下および、例えば、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉらによる米国特許番号第５，９３９，５９８号に記載されるような）から単離された抗体を含む。

【０１５２】

本発明の抗体は、一重特異的、二重特異的、三重特異的またはより多価の多重特異的であり得る。多重特異的な抗体は、本発明のポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であり得るか、または本発明のポリペプチドおよび異種エピトープ（例えば、異種ポリペプチドまたは固体支持体物質）の両方に特異的であり得る。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ　９３／１７７１５；ＷＯ９２／０８８０２；ＷＯ　９１／００３６０；ＷＯ　９２／０５７９３；Ｔｕｔｔら、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ら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３（１９９２）を参照のこと。

【０１５３】

本発明の抗体は、この抗体により認識されるかまたは特異的に結合される本発明のポリペプチドのエピトープまたは部分によって、記載され得るかまたは特定化され得る。このエピトープまたはポリペプチド部分は、本明細書中に記載されるように、例えば、Ｎ末端およびＣ末端位置により、または連続するアミノ酸残基のサイズにより、特定化され得る。本発明の任意のエピトープまたはポリペプチドを特異的に結合する抗体はまた排除され得る。従って、本発明は、本発明のポリペプチドを特異的に結合し、そしてこのポリペプチドの排除を可能にする抗体を含む。

【０１５４】

本発明の抗体はまた、その交差反応性によって記載され得るか、または特定化され得る。本発明のポリペプチドの任意の他のアナログ、オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）またはホモログを結合しない抗体が、含まれる。本発明のポリペプチド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％の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書において記載された方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドを結合する抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトタンパク質のマウスホモログ、ラットホモログおよび／またはウサギホモログならびにそれらの対応するエピトープと交差反応する。本発明のポリペプチドに対して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％未満の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書において記載された方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドに結合しない抗体もまた、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、任意の単一特異的な抗原性ポリペプチドもしくは免疫原性ポリペプチド、または２、３、４、５もしくはそれより多くの本明細書中に開示される特異的な抗原性ポリペプチドおよび／または免疫原性ポリペプチドの組み合わせに関する。さらに本発明には、（本明細書中に記載されるような）ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で本発明の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を結合する抗体が含まれる。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドに対するその結合親和性によって記載または特定され得る。好ましい結合親和性としては、5×10^{-2} Ｍ、10^{-2} Ｍ、5×10^{-3} Ｍ、10^{-3} Ｍ、5×10^{-4} Ｍ、10^{-4} Ｍ、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、10^{-8} Ｍ、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Ｋｄを有する結合親和性が挙げられる。

【０１５５】

本発明はまた、競合的な結合を決定するための当該分野で公知の任意の方法（例えば、本明細書中に記載されるイムノアッセイ）によって決定されるような、本発明のエピトープに対する抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。好ましい実施形態において、この抗体は、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％、エピトープに対する結合を競合的に阻害する。

【０１５６】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド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、レセプター／リガンドと本発明のポリペプチドとの相互作用を部分的または完全にのいずれかで破壊する抗体を含む。好ましくは、本発明の抗体は、本明細書中に開示される抗原性のエピトープまたはその部分に結合する。本発明は、レセプター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、リガンド結合を妨げないがレセプターの活性化を妨げるレセプター特異的抗体を特徴とする。レセプターの活性化（すなわち、シグナル伝達）は、本明細書中に記載される技術、またはさもなくば当該分野で公知の技術によって決定され得る。例えば、レセプターの活性化は、（例えば、上記されたような）免疫沈降、続いてウエスタンブロット分析によって、レセプターのリン酸化（例えば、チロシンまたはセリン／スレオニン）あるいはその基質を検出することによって決定され得る。特定の実施形態において、抗体の非存在下の活性の少なくとも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％でリガンド活性またはレセプター活性を阻害する抗体を提供する。

【０１５７】

本発明はまた、リガンド結合およびレセプター活性化の両方を妨げるレセプター特異的抗体、ならびにレセプター－リガンド複合体を認識し、そして、好ましくは、結合していないレセプター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を特徴とする。同様に、本発明には、リガンドに結合し、そしてリガンドのレセプターへの結合を妨げる中和抗体、ならびにリガンドに結合し、それによってレセプター活性化を妨げるが、リガンドがレセプターに結合することは妨げない抗体が含まれる。さらに本発明に含まれるのは、レセプターを活性化する抗体である。これらの抗体は、レセプターアゴニストとして作用し得、すなわち、リガンド媒介のレセプター活性化の生物学的活性のすべてまたはサブセット（ｓｕｂｓｅｔ）のいずれかを増強または活性化し得る（例えば、レセプターの二量体化を誘導することによる）。この抗体は、本明細書中に開示される本発明のペプチドの特定の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インバース（ｉｎｖｅｒｓｅ）アゴニストとして特定化され得る。上記の抗体アゴニストは、当該分野で公知の方法を用いて作製され得る。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９６／４０２８１；米国特許第５，８１１，０９７号；Ｄｅｎｇら、Ｂｌｏｏｄ　９２（６）：１９８１－１９８８（１９９８）；Ｃｈｅｎら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８（１６）：３６６８－３６７８（１９９８）；Ｈａｒｒｏｐら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６１（４）：１７８６－１７９４（１９９８）；Ｚｈｕら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ：５８（１５）：３２０９－３２１４（１９９８）；Ｙｏｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６０（７）：３１７０－３１７９（１９９８）；Ｐｒａｔら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｓｃｉ．１１１（Ｐｔ２）：２３７－２４７（１９９８）；Ｐｉｔａｒｄら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　２０５（２）：１７７－１９０（１９９７）；Ｌｉａｕｔａｒｄら、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　９（４）：２３３－２４１（１９９７）；Ｃａｒｌｓｏｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２（１７）：１１２９５－１１３０１（１９９７）；Ｔａｒｙｍａｎら、Ｎｅｕｒｏｎ　１４（４）：７５５－７６２（１９９５）；Ｍｕｌｌｅｒら、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　６（９）：１１５３－１１６７（１９９８）；Ｂａｒｔｕｎｅｋら、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　８（１）：１４－２０（１９９６）（上記の文献はすべて、その全体が本明細書において参考として援用される）を参照のこと。

【０１５８】

本発明の抗体は、例えば、インビトロおよびインビボの両方における診断方法および治療方法を含む本発明のポリペプチドを精製、検出および標的化するのために使用され得るが、これに限定されない。例えば、この抗体は、生物学的サンプルにおいて本発明のポリペプチドのレベルを定性的および定量的に測定するためのイムノアッセイにおいて用途を有

する。例えば、Ｈａｒｌｏｗら，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，第２版，１９８８）（その全体が参考として本明細書中に援用される）を参照のこと。

【０１５９】

以下により詳細が議論されるように、本発明の抗体は、単独で、または他の組成物との組み合わせのいずれかで用いられ得る。この抗体は、さらに、Ｎ末端もしくはＣ末端で異種ポリペプチドに組換え的に融合され得るか、またはポリペプチドもしくは他の組成物に化学的に結合（共有結合および非共有結合を含む）され得る。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子およびエフェクター分子（例えば、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種または毒素）に、組換え的に融合または結合され得る。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０８４９５；ＷＯ９１／１４４３８；ＷＯ８９／１２６２４；米国特許第５，３１４，９９５号；およびＥＰ３９６，３８７号を参照のこと。

【０１６０】

本発明の抗体は、改変された（すなわち、共有結合性付着（ｃｏｖａｌｅｎｔ ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ）が、抗体が抗イディオタイプ応答を産生するのを妨げないような、抗体に対する任意の型の分子の共有結合性付着による）誘導体を含む。例えば、制限されないが、抗体誘導体としては、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化（ｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ）、リン酸化（ｐｈｏｓｐｈｙｌａｔｉｏｎ）、アミド化、既知の保護基／ブロック基（ｂｌｏｃｋｉｎｇ ｇｒｏｕｐ）による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって改変された抗体が挙げられる。多数の任意の化学的改変が、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含むが、これらに制限されない公知の技術によって実行され得る。さらに、誘導体は、１つ以上の非古典的アミノ酸を含み得る。

【０１６１】

本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適切な方法によって産生され得る。目的の抗原に対するポリクローナル抗体は、当該分野で周知の種々の手順によって産生され得る。例えば、本発明のポリペプチドが種々の宿主動物（ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない）に投与されて、抗原に対して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得る。種々のアジュバントが、宿主種に依存して、免疫学的応答を増加させるために使用され得、そしてフロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル（ｍｉｎｅｒａｌ ｇｅｌ）、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニック（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにＢＣＧ（カルメット－ゲラン杆菌）およびｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍのような潜在的に有用なヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない。このようなアジュバントはまた、当該分野で周知である。

【０１６２】

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術、またはそれらの組み合わせの使用を含む、当該分野で公知の広範な種々の技術を用いて調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、当該分野で公知の以下に挙げられるハイブリドーマ技術を使用して産生され得、例えば、Ｈａｒｌｏｗら、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，第２版、１９８８）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ５６３－６８１（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．１９８１）（上記の参考文献は、その全体が参考として援用される）に教示される。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ技術を通して生成された抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」とは、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む単一のクローンに由来する抗体をいい、そしてその生成される方法ではない。

【０１６３】
ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生およびスクリーニングする方法は、当該分野で慣用的かつ周知であり、そして実施例に詳細に議論される。非限定的な実施例において、マウスは、本発明のポリペプチドまたはそのようなペプチドを発現する細胞を用いて免疫され得る。一旦免疫応用が検出される（例えば、抗原に特異的な抗体がマウスの血清中に検出される）と、マウスの脾臓を収集しそして脾細胞を単離する。次に、その脾細胞を周知の技術によって任意の適切な骨髄腫細胞（例えば、ＡＴＣＣから入手可能な細胞株ＳＰ２０由来の細胞）に融合させる。ハイブリドーマを限界希釈によって選択およびクローン化する。次に、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、当該分野で公知の方法によってアッセイする。一般的に高いレベルの抗体を含む腹水（ａｓｃｉｔｅｓ　ｆｌｕｉｄ）が、陽性ハイブリドーマクローンを用いてマウスを免疫させることによって、産生され得る。
【０１６４】
従って、本発明は、モノクローナル抗体および本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する工程を包含する方法によって産生される抗体を、産生する方法を提供し、ここで、好ましくは、このハイブリドーマは、骨髄腫細胞と本発明の抗原で免疫したマウスから単離された脾細胞とを融合させることによって、次いで本発明のポリペプチドと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、融合物から生じるハイブリドーマをスクリーニングすることによって産生される。
【０１６５】
特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術によって産生され得る。例えば、本発明のＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２フラグメントは、（Ｆａｂフラグメントを産生するための）パパインまたは（Ｆ（ａｂ’）２フラグメントを産生するための）ペプシンのような酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって産生され得る。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。
【０１６６】
例えば、本発明の抗体はまた、当該分野で公知の種々のファージディスプレイ方法を用いて産生され得る。ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特定の実施形態において、そ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ー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用され得る。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて選択または同定され得る（例えば、標識した抗体あるいは固体表面またはビーズに結合または捕捉された抗原を使用する）。これらの方法において用いられるファージは、代表的には、ファージ遺伝子ＩＩＩタンパク質またはファージ遺伝子ＶＩＩＩタンパク質のいずれかに組換え的に融合されたＦａｂ、Ｆｖまたはジスルフィド安定化されたＦｖの抗体ドメインを有するファージから発現されたｆｄおよびＭ１３結合ドメインを含む糸状ファージ（ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ　ｐｈａｇｅ）である。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられる：Ｂｒｉｎｋｍａｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１８２：４１－５０（１９９５）；Ａｍｅｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１８４：１７７－１８６（１９９５）；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：９５２－９５８（１９９４）；Ｐｅｒｓｉｃら、Ｇｅｎｅ　１８７　９－１８（１９９７）；Ｂｕｒｔｏｎら、Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　５７：１９１－２８０（１９９４）；ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＧＢ９１／０１１３４；ＰＣＴ公開ＷＯ９０／０２８０９；ＷＯ　９１／１０７３７；ＷＯ　９２／０１０４７；ＷＯ　９２／１８６１９；ＷＯ　９３／１１２３６；ＷＯ　９５／１５９８２；ＷＯ　９５／２０４０１；ならびに米国特許第５，６９８，４２６号；同第５，２２３，４０９号；同第５，４０３，４８４号；同第５，５８０，７１７号；同第５，４２７，９０８号；同第５，７５０

，７５３号；同第５，８２１，０４７号；同第５，５７１，６９８号；同第５，４２７，９０８号；同第５，５１６，６３７号；同第５，７８０，２２５号；同第５，６５８，７２７号；同第５，７３３，７４３号および同第５，９６９，１０８号（これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される）。

【０１６７】

上記参考文献に記載されるように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体をコードする領域は、ヒト抗体を含む抗体の全体または任意の他の所望の抗原結合フラグメントを生成するために単離されかつ用いられ得、そして例えば、以下に詳細が記載されるように、哺乳動物細胞、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において発現され得る。例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）２フラグメントを組換え的に産生するための技術はまた、当該分野で公知の方法を用いて使用され得、このような方法は、以下に開示される：ＰＣＴ公開ＷＯ　９２／２２３２４；Ｍｕｌｌｉｎａｘら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１２（６）：８６４－８６９（１９９２）；およびＳａｗａｉら、ＡＪＲＩ　３４：２６－３４（１９９５）；およびＢｅｔｔｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４０：１０４１－１０４３（１９９８）（これらの参考文献は、その全体が参考として援用される）。

【０１６８】

単鎖のＦｖおよび抗体を産生するために用いられ得る技術の例としては、米国特許第４，９４６，７７８号および同第５，２５８，４９８号；Ｈｕｓｔｏｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　２０３：４６－８８（１９９１）；Ｓｈｕら、ＰＮＡＳ　９０：７９９５－７９９９（１９９３）；およびＳｋｅｒｒａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４０：１０３８－１０４０（１９８８）に記載される技術が挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボにおける使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の使用が好ましくあり得る。キメラ抗体とは、抗体の異なる部分が、異なる動物種に由来する分子（例えば、マウスモノクローナル抗体由来の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、当該分野において公知である。例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４（１９８６）；Ｇｉｌｌｉｅｓら、（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号を参照のこと（これらはそれらの全体が、参考として本明細書中に援用される）。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の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由来のフレームワーク領域を有する所望された抗原に結合する非ヒト種抗体由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基（ｆｒａｍｅｗｏｒｋ　ｒｅｓｉｄｕｅ）は、抗原結合を変化させるため（好ましくは改善させるために）ＣＤＲドナー抗体由来の対応残基と置換される。これらフレームワークの置換は、当該分野で周知の方法によって同定され、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのＣＤＲおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較による。（例えば、Ｑｕｅｅｎら、米国特許第５，５８５，０８９号；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３（１９８８）を参照のこと（これらはそれらの全体が参考として本明細書中に援用される）。）抗体は、以下を含む当該分野で公知の種々の技術を用いてヒト化され得る：例えば、ＣＤＲ－移植（欧州特許第２３９，４００号；ＰＣＴ公開ＷＯ　９１／０９９６７；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（ｖｅｎｅｅｒｉｎｇ）またはリサーフェイシング（ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ）（欧州特許第５９２，１０６号；同第５１９，５９６号；Ｐａｄｌａｎ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２８（４／５）：４８９－４９８（１９９１）；　Ｓｔｕｄｎｉｃｋａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　７（６）：８０５－８１４（１９９４）；Ｒｏｇｕｓｋａら、ＰＮＡＳ　９１：９６９－９７３（１９９４））、およびチェーン

シャッフリング（ｃｈａｉｎ　ｓｈｕｆｆｌｉｎｇ）（米国特許第５，５６５，３３２号）。

【０１６９】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置に対して特に所望される。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記のファージディスプレイ法を含む当該分野で公知の種々の方法により作製され得る。米国特許第４，４４４，８８７号、同第４，７１６，１１１号；およびＰＣＴ公開ＷＯ　９８／４６６４５、ＷＯ　９８／５０４３３、ＷＯ　９８／２４８９３、ＷＯ　９８／１６６５４、ＷＯ　９６／３４０９６、ＷＯ　９６／３３７３５、およびＷＯ　９１／１０７４１；（これらの各々はその全体が参考として本明細書中に援用される）もまた参照のこと。

【０１７０】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンの発現は出来ないが、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産生され得る。例えば、ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子およびヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子の複合体は、無作為にまたは相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入され得る。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域（ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｒｅｇｉｏｎ）は、ヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子に加えて、マウスの胚性幹細胞に導入され得る。マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子およびマウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによる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的にされ得る。特に、ＪＨ領域のホモ接合性の欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。改変された胚性幹細胞を発展させ、そしてキメラマウスを産生するために胚盤胞中に微量注入する。次に、キメラマウスを、ヒト抗体を発現するホモ接合性の子孫を産生するために繁殖させる。トランスジェニックマウスを、選択された抗原（例えば、本発明のポリペプチドの全体または部分）を用いて通常の様式で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いた免疫したトランスジェニックマウスから得られ得る。トランスジェニックマウスに保持されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、Ｂ細胞分化の間に再編成し、そしてその後、クラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。従って、そのような技術の使用によって、治療的に有用なＩｇＧ抗体、ＩｇＡ抗体、ＩｇＭ抗体およびＩｇＥ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術の概要については、ＬｏｎｂｅｒｇおよびＨｕｓｚａｒ、Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３（１９９５）を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術のならびにそのような抗体を産生するためのプロトコールの詳細な議論については、例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９８／２４８９３；ＷＯ９２／０１０４７；ＷＯ９６／３４０９６；ＷＯ９６／３３７３５；欧州特許第０　５９８　８７７；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；および同第５，９３９，５９８号を参照のこと（これらはその全体が本明細書中に参考として援用される）。さらに、Ａｂｇｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．（Ｆｒｅｅｍｏｎｔ，ＣＡ）およびＧｅｎｐｈａｒｍ（Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）のような企業は、上記の技術に類似した技術を用いて選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに従事し得る。

【０１７１】

選択されたエピトープを完全に認識するヒト抗体を、「ガイドされた（ｇｕｉｄｅｄ）選択」といわれる技術を用いて産生し得る。このアプローチにおいて、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）は、同じエピトープを完全に認識するヒト抗体の選択を導くために使用される。（Ｊｅｓｐｅｒｓら、Ｂｉｏ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１２：８９９－９０３（１９８８））。

【０１７２】

さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、当業者に周知の技術を用いて本発明のポリペプチドを「模倣する」抗イディオタイプ抗体を産生するために順々に利用され得る。

（例えば、ＧｒｅｅｎｓｐａｎおよびＢｏｎａ、ＦＡＳＥＢ Ｊ．７（５）：４３７－４４４；（１９８９）およびＮｉｓｓｉｎｏｆｆ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７（８）：２４２９－２４３８（１９９１）を参照のこと。）例えば、結合し、そしてポリペプチドの多量体化（ｍｕｌｔｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ）および／またはリガンドに対する本発明のポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体が、ポリペプチドの多量体化ドメインおよび／または結合ドメインを「模倣する」抗イディオタイプを産生するために使用され得、そして結果としてポリペプチドおよび／またはそのリガンドに結合し、そして中和する。このような抗イディオタイプまたはそのような抗イディオタイプのＦａｂフラグメントの中和は、ポリペプチドリガンドを中和するための治療的レジメンに使用され得る。例えば、そのような抗イディオタイプ抗体は、本発明のポリペプチドに結合するためおよび／またはそのリガンド／レセプターに結合するために使用され得、そしてそれによってその生物学的活性がブロックされる。

【０１７３】

（抗体をコードするポリヌクレオチド）

本発明はさらに、本発明の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、ストリンジェントな、またはより低いストリジェンシーな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）抗体（好ましくは、本発明のポリペプチドと特異的に結合する、好ましくは、配列番号Ｙ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を含む。

【０１７４】

ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の任意の方法によって得られ得、そしてそのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は決定される。例えば、抗体のヌクレオチド配列が知られている場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから構築され得（例えば、Ｋｕｔｍｅｉｅｒら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １７：２４２（１９９４）に記載されるような）、これは、簡単にいうと、以下の工程を包含する：この抗体をコードする配列の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、こ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ＰＣＲによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅。

【０１７５】

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源からの核酸から生成され得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、その免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源（例えば、抗体ｃＤＮＡライブラリー、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成されたｃＤＮＡライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリＡ＋ＲＮＡ））から、例えば、その抗体をコードするｃＤＮＡライブラリーからのｃＤＮＡクローンを同定するために、配列の３’末端および５’末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するＰＣＲ増幅によって、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使用するクローニングによって得られ得る。ＰＣＲによって生成された増幅された核酸は、次いで、当該分野で周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。

【０１７６】

一旦、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分野で周知の方法（例えば、組換えＤＮＡ技術、部位指向性変異誘発、ＰＣＲなど（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９９０，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹおよびＡｕｓｕｂｅｌら編、１９９８，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌ

ｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹに記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。））を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および／または挿入を作製するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成し得る。

【０１７７】

特定の実施形態において、重鎖および／または軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域（ＣＤＲ）の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって（例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖、および軽鎖の可変領域を既知のアミノ酸配列と比較することによって）調べられ得る。慣用的な組換えＤＮＡ技術を用いて、１つ以上のＣＤＲが、前述のようにフレームワーク領域内に（例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に）挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る（例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Ｃｈｏｔｈｉａら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７８：４５７－４７９（１９９８）を参照のこと）。好ましくは、フレームワーク領域およびＣＤＲの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、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、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、１つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するために、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置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

【０１７８】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」を産生するために開発された技術（Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１：８５１－８５５（１９８４）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６０４－６０８（１９８４）；Ｔａｋｅｄａら、Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２－４５４（１９８５））が使用され得る。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分子であり、このような分子は、マウスｍＡｂおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の可変領域を有する（例えば、ヒト化抗体）。

【０１７９】

あるいは、単鎖抗体の産生に関して記載された技術（米国特許第４，９４６，７７８号；Ｂｉｒｄ、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２（１９８８）；Ｈｕｓｔｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３（１９８８）；およびＷａｒｄら、Ｎａｔｕｒｅ ３３４：５４４－５４（１９８９））が、単鎖抗体の産生に適応され得る。単鎖抗体は、Ｆｖ領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されれることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。Ｅ．ｃｏｌｉにおける機能性Ｆｖフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る（Ｓｋｅｒｒａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：１０３８－１０４１（１９８８））。

【０１８０】

（抗体を産生する方法）

本発明の抗体は、抗体を合成するための当該分野で公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。

【０１８１】

本発明の抗体、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、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体）の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の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、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生

のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えＤＮＡ技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法には、例えば、インビトロの組換えＤＮＡ技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、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の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　ＷＯ８６／０５８０７；ＰＣＴ公開　ＷＯ８９／０１０３６；および米国特許第５，１２２，４６４号を参照のこと）をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体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。

【０１８２】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、そしてこのトランスフェクトされた細胞は、次いで、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、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、または本発明の単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、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

【０１８３】

種々の宿主発現ベクター系は、本発明の抗体分子を発現させるために利用され得る。このような宿主発現系は、目的のコード配列が産生され、かつ続いて精製され得るビヒクルを表わすが、また、適切なヌクレオチドをコードする配列で形質転換またはトランスフェクトされる場合に、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞を表わす。これらには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体をコードする配列を含む組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターを用いて形質転換された細菌（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）のような微生物；抗体をコードする配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｉｃｈｉａ）；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）に感染した昆虫細胞系；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）に感染した植物細胞系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）で形質転換された植物細胞系；あるいは哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物のウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）を含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＨＫ、２９３、３Ｔ３細胞）。好ましくは、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉのような細菌細胞、そしてより好ましくは、特に、組換え抗体分子全体の発現のために真核生物細胞が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組み合わされた、チャイニーズハムスターの卵巣細胞（ＣＨＯ）のような哺乳動物細胞が、抗体のための効果的な発現系である（Ｆｏｅｃｋｉｎｇら、Ｇｅｎｅ　４５：１０１（１９８６）；Ｃｏｃｋｅｔｔら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８：２（１９９０））。

【０１８４】

細菌系において、多くの発現ベクターが、抗体分子の発現を意図する使用に依存して有利に選択され得る。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、抗体分子の薬学的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

を指向するベクターが所望され得る。このようなベクターには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体をコードする配列がｌａｃＺをコードする領域と共にベクターにインフレーム（ｉｎ　ｆｒａｍｅ）で個別に連結され得、その結果、融合タンパク質が産生されるＥ．ｃｏｌｉ発現ベクターｐＵＲ２７８（Ｒｕｔｈｅｒら、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））など。ｐＧＥＸベクターもまた、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、外来性ポリペプチドを発現させるために使用され得る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、そして溶解した細胞から、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、それに続く遊離グルタチオン存在化での溶出によって容易に精製され得る。このｐＧＥＸベクターは、トロンビンまたはＸａ因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、その結果、このクローニングされた標的遺伝子産物は、ＧＳＴ部分から放出され得る。

【０１８５】

昆虫系においては、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多角体病ウィルス（ＡｃＮＰＶ）は、外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。このウィルスは、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞において増殖する。抗体をコードする配列は、このウィ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、そして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。

【０１８６】

哺乳動物宿主細胞においては、多数のウィルスに基づく発現系が利用され得る。アデノウィルスが発現ベクターとして使用される場合においては、目的の抗体をコードする配列は、アデノウィルスの転写／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、インビトロまたはインビボでの組換えによって、アデノウィルスゲノムに挿入され得る。ウィルスゲノムの非必須領域（例えば、Ｅ１またはＥ３領域）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ィルスを生じる（例えば、Ｌｏｇａｎ＆Ｓｈｅｎｋ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８１：３５５－３５９（１９８４）を参照のこと）。特異的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率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する配列を含む。さらに、この開始コドンは、挿入部分全体の翻訳を確実にするために、所望されるコード配列のリーディングフレームと相が同じ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、種々の起源（天然および合成の両方）であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター、などの含有によって高められ得る（Ｂｉｔｔｎｅｒら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１－５４４（１９８７）を参照のこと）。

【０１８７】

さらに、宿主細胞系統は、選択され得、これは挿入配列の発現を調節するか、または所望される特異的な様式で遺伝子産物を改変し、そしてプロセシングする。タンパク質産物のこのような改変（例えばグリコシル化）およびプロセシング（例えば切断）は、タンパク質の機能のために重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の、翻訳後プロセシングおよび改変のための、特徴的で特異的な機構を有する。適切な細胞株または宿主系は、発現された外来タンパク質の正確な改変およびプロセシングを確実にするように選択され得る。この目的のために、遺伝子産物の、第一の転写、グリコシル化、およびリン酸化の正確なプロセシングのための細胞機構を有する、真核生物宿主細胞が、使用され得る。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のような乳癌細胞株、ならびに、例えば、

ＣＲＬ７０３０およびＨｓ５７８Ｂｓｔのような正常な乳腺細胞株、を含むがこれらに限定されない。

【０１８８】

組換えタンパク質の長期間の高収率産生、安定発現が好ましい。例えば、安定に抗体分子を発現する細胞株が操作され得る。ウィルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、など）、および選択可能なマーカーによって制御されるＤＮＡで形質転換され得る。外来ＤＮＡの導入に続いて、操作された細胞は、１～２日間富化培地で増殖させられ得、次いで、選択培地に切り替えられる。組換えプラスミドにおける選択可能マーカーは、選択したものに耐性を与え、そして細胞が、プラスミドをその染色体内に安定に組み込み、そして増殖して、細胞増殖巣を形成し、これを今度はクローニングし得、細胞株に拡張され得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、有利に使用され得る。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。

【０１８９】

多数の選択系が使用され得、この選択系は、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒら、Ｃｅｌｌ　１１：２２３（１９７７））、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ＆Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ、Ｐｒｏｃ．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ら、Ｃｅｌｌ　２２：８１７（１９８０））を含むがこれらに限定されず、これらの遺伝子は、ｔｋ－、ｈｇｐｒｔ－またはａｐｒｔ－細胞においてそれぞれ使用され得る。また、代謝拮抗物質耐性は、以下の遺伝子の選択の根拠として使用され得る：ｄｈｆｒ、これはメトトレキサートに対する耐性を与える（Ｗｉｇｌｅｒら、Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：３５７（１９８０）；Ｏ’Ｈａｒｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：１５２７（１９８１））；ｇｐｔ、これはミコフェノール酸にに対する耐性を与える（Ｍｕｌｌｉｇａｎ＆Ｂｅｒｇ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：２０７２（１９８１））；ｎｅｏ、これはアミノグリコシドＧ－４１８に対する耐性を与える（Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　１２：４８８－５０５；ＷｕおよびＷｕ、Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ　３：８７－９５（１９９１）；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６（１９９３）；Ｍｕｌｌｉｇａｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０：９２６－９３２（１９９３）；ならびにＭｏｒｇａｎおよびＡｎｄｅｒｓｏｎ、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７（１９９３）；１９９３年5月、ＴＩＢ　ＴＥＣＨ　１１（５）：１５５－２１５）；ならびにｈｙｇｒｏ、これはハイグロマイシンにに対する耐性を与える（Ｓａｎｔｅｒｒｅら、Ｇｅｎｅ　３０：１４７（１９８４））。組換えＤＮＡ技術の分野で通常知られている方法は、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、そしてこのような方法は、以下に記載されている：例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９３）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ、Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ、Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ（１９９０）；ならびに１２章および１３章、Ｄｒａｃｏｐｏｌｉら（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９４）；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１（１９８１）（これらはその全体が本明細書中に参考として援用される）。

【０１９０】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大され得る（総説として、ＢｅｂｂｉｎｇｔｏｎおよびＨｅｎｔｓｃｈｅｌ、Ｔｈｅ　ｕｓｅ　ｏｆ　ｖｅｃｔｏｒｓ　ｂａｓ

ed 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インヒビター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。増副領域は抗体遺伝子と結合しているので、抗体の産生もまた増加する（Crouseら、Mol．Cell．Biol．３：２５７（１９８３））。

【０１９１】

宿主細胞は、本発明の二つの発現ベクター（重鎖由来のポリペプチドをコードする第一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二のベクター）で、同時トランスフェクトされ得る。この二つのベクターは、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。あるいは、単一のベクターが使用され得、これは重鎖および軽鎖両方のポリペプチドをコードし、そして発現することができる。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。

【０１９２】

一旦本発明の抗体分子が、動物によって産生されるか、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、当該分野で公知の、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、プロテインＡの後に特異的抗原に対する親和性（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術によって、精製され得る。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、本明細書中に記載されるかまたはそうでなければ当該分野において公知の、異種ポリペプチド配列に融合され得、精製を容易にする。

【０１９３】

本発明は、組換えにより融合されるかまたは化学的に、本発明のポリペプチド（もしくはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、もしくは１００個のアミノ酸）に結合されて（共有結合および非共有結合の両方を含む）、融合タンパク質を生成する抗体、を含む。この融合は、直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。この抗体は、本発明のポリペプチド（またはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、もしくは１００個のアミノ酸）以外の抗原に特異的であり得る。例えば、インビトロまたはインビボのいずれにおいても、本発明のポリペプチドを特定の細胞表面のレセプターに特異的な抗体に融合または結合させることによって、特定の細胞のタイプに対して、本発明のポリペプチドを標的にするために、抗体が使用され得る。本発明のポリペプチドに融合または結合される抗体はまた、インビトロ免疫アッセイおよび当該分野で公知の方法を使用する精製方法において使用され得る。例えば、Harborら、上記、およびＰＣＴ公開第ＷＯ９３／２１２３２号；ＥＰ４３９，０９５；Naramuraら、Immunol．Lett．３９：９１－９９（１９９４）；米国特許第５，４７４，９８１号；Gilliesら、ＰＮＡＳ８９：１４２８－１４３２（１９９２）；Fellら、Ｊ．Immunol．１４６：２４４６－２４５２（１９９１）を参照のこと。これらは、その全体が参考として援用される。

【０１９４】

本発明はさらに、可変領域以外の抗体のドメインに融合または結合された、本発明のポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体のＦｃ領域、またはその部分に融合または結合され得る。この抗体の本発明のポリペプチドに融合された部

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、またはそのドメイン全体もしくは部分任意の組合せを含み得る。これらのポリペプチドはまた、上記の抗体の部分に融合または結合され得、多重体を形成する。例えば、本発明のポリペプチドに融合されたＦｃ部分は、このＦｃ部分の間のジスルフィド結合を通して二量体を形成し得る。より高度の多重体形態は、ポリペプチドをＩｇＡおよびＩｇＭの部分に融合させることによって作製され得る。本発明のポリペプチドを抗体部分に融合または結合させるための方法は、当該分野において公知である。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；ＥＰ　３０７，４３４；ＥＰ　３６７，１６６；ＰＣＴ公開第ＷＯ９６／０４３８８号；第ＷＯ９１／０６５７０号；Ａｓｈｋｅｎａｚｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：１０５３５－１０５３９（１９９１）；Ｚｈｅｎｇら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５４：５５９０－５６００（１９９５）；およびＶｉｌら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：１１３３７－１１３４１（１９９２）（前記の参考文献はその全体が参考として援用される）を参照のこと。

【０１９５】

上で考察されたように、配列番号Ｙのポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、または変異体、に対応するポリペプチドは、このポリペプチドのインビボ半減期を増大させるため、または当該分野で公知の方法を使用する免疫アッセイにおいて使用するために、上記の抗体部分に融合または結合され得る。さらに、配列番号Ｙに対応するポリペプチドを、上記の抗体部分に融合または結合して、精製を容易にし得る。１つの報告された例は、ヒトＣＤ４ポリペプチドの最初の２つのドメイン、および哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載している（ＥＰ　３９４，８２７；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　３３１：８４－８６（１９８８））。ジスルフィド連結二量体構造（ＩｇＧに起因する）を有する抗体に融合または結合される、本発明のポリペプチドもまた、単量体分泌タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子に結合しそして中和するのにさらに効率的であり得る（Ｆｏｕｎｔｏｕｌａｋｉｓら、Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７０：３９５８－３９６４（１９９５））。多くの場合、融合タンパク質のＦｃ部分は、治療および診断において有益であり、従って、例えば、改良された薬物動態学的な特性を生じ得る（ＥＰ　Ａ　２３２，２６２）。あるいは、融合タンパク質が発現され、検出され、そして精製された後に、Ｆｃ部分を欠失させることが望ましい。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、Ｆｃ部分は、治療および診断を妨害し得る。例えば、薬物の発見において、ｈＩＬ－５のようなヒトタンパク質は、ｈＩＬ－５のアンタゴニストを同定するための高スループットスクリーニングアッセイの目的のためにＦｃ部分と融合されてきた（Ｂｅｎｎｅｔｔら、Ｊ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ　８：５２－５８（１９９５）；Ｊｏｈａｎｓｏｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：９４５９－９４７１（１９９５）を参照のこと）。

【０１９６】

さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、精製を容易にするペプチドのような、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。例えば、Ｇｅｎｔｚら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：８２１－８２４（１９８９）に記載されるように、ヘキサ－ヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグは、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ら、Ｃｅｌｌ３７：７６７（１９８４））、および「ｆｌａｇ」タグを含むが、これに限定されない。

【０１９７】

本発明は、診断剤または治療剤に結合される、抗体またはそのフラグメントをさらに含む。抗体は、例えば、臨床上の試験手順（例えば、所定の処置レジメン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モニターするために、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って容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、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使用する陽電子放射金属、および非放射性常磁性金属イオン、が挙げられる。この検出可能な物質は、抗体（またはそのフラグメント）に対して、直接的または間接的のいずれかで、当該分野で公知の技術を使用する媒介物（例えば、当該分野で公知のリンカーなど）を介して、連結または結合され得る。例えば、本発明に従う診断薬としての使用のための抗体に結合され得る金属イオンに関しては、米国特許第４，７４１，９００号を参照のこと。適切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；適切な補欠分子団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；適切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；ならびに、適切な放射性物質の例としては、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１１１Ｉｎまたは９９Ｔｃが挙げられる。

【０１９８】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、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殺傷性の薬剤））、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２１３Ｂｉ））に結合され得る。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、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、ならびにこれらのアナログまたはホモログ、が挙げられる。治療剤は、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）、アルキル化剤（例えば、クロルメチン（ｍｅｃｈｌｏｒｅｔｈａｍｉｎｅ）、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（ｃｙｃｌｏｔｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、ならびにｃｉｓ－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（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、およびアントラマイシン（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）、を含むが、それらに限定されない。

【０１９９】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を改変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、神経成長因子、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、アポトーシス剤（例えば、ＴＮＦ－α、ＴＮＦ－β、ＡＩＭ　Ｉ（国際公開第ＷＯ９

７／３３８９９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ら、Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：１５６７－１５７４（１９９４））、ＶＥＧＩ（国際公開第ＷＯ９９／２３１０５号を参照のこと））、血栓症薬もしくは抗脈管形成薬（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改変剤（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など）、が挙げられ得る。

【０２００】

抗体はまた、固体支持体に付着させられ得、この固体支持体は、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、が挙げられるがそれらに限定されない。

【０２０１】

このような治療部分を抗体に結合する技術は、周知であり、例えば、Ａｒｎｏｎら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ｆｏｒ　Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ｏｆ　Ｄｒｕｇｓ　Ｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ」、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ａｎｄ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｒｅｉｓｆｅｌｄら（編）、２４３－５６頁（Ａｌａｎ　Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９８５）；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍら、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ｆｏｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」、Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（第二版）、Ｒｏｂｉｎｓｏｎら（編）、６２３－５３頁（Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．１９８７）；Ｔｈｏｒｐｅ、「Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｃａｒｒｉｅｒｓ　Ｏｆ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ａｇｅｎｔｓ　Ｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ　Ｒｅｖｉｅｗ」、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ａｎｄ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｐｉｎｃｈｅｒａら（編）、４７５－５０６頁（１９８５）；「Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，Ａｎｄ　Ｆｕｔｕｒｅ　Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ　Ｏｆ　Ｔｈｅ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｕｓｅ　Ｏｆ　Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ」、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｂａｌｄｗｉｎら（編）、３０３－１６頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　１９８５）、およびＴｈｏｒｐｅら、「Ｔｈｅ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ａｎｄ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ　Ｏｆ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｔｏｘｉｎ　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．６２：１１９－５８（１９８２）を参照のこと。

【０２０２】

あるいは、抗体は、Ｓｅｇａｌにより米国特許第４，６７６，９８０号（その全体が参考として本明細書中で援用される）に記載されるように、二次抗体に結合され、抗体ヘテロ結合体を形成し得る。

【０２０３】

単独または細胞毒因子および／もしくはサイトカインと組合せて投与される抗体（その抗体に結合する治療部分を有するまたは有さない）は、治療剤として使用され得る。

【０２０４】

（免疫表現型分類（ｉｍｍｕｎｏｐｈｅｎｏｔｙｐｉｎｇ））

本発明の抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の遺伝子の翻訳生成物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、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するモノクロナール抗体は、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。種々の技術が、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、モノクロナール抗体を用いて利用され得、そしてその技術には、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Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｃｅｌｌ，９６：７３７－４９（１９９９）を参照のこと）が挙げられる。

【０２０５】

これらの技術は、血液学的悪性腫瘍（すなわち、急性白血病患者における最少残留疾患（ｍｉｎｉｍａｌ　ｒｅｓｉｄｕａｌ　ｄｉｓｅａｓｅ）（ＭＲＤ））および対宿主性移植片病（ＧＶＨＤ）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。あるいは、これらの技術は、ヒト臍帯血において見出され得るような増殖および／または分化を受け得る、造血幹細胞および前駆細胞のスクリーニングを可能にする。

【０２０６】

（抗体結合についてのアッセイ）

本発明の抗体は、当該分野において公知の任意の方法により、免疫特異的結合についてアッセイされ得る。用いられ得る免疫アッセイとしては、いくつかのものについてだけ名称を挙げると、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、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、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインＡ免疫アッセイのような技術を用いる競合アッセイ系および非競合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、そして当該分野において周知である（例えば、その全体が本明細書中に参考として援用される、Ａｕｓｕｂｅｌら編，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，第１巻、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋを参照のこと）。例示的な免疫アッセイが、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）。

【０２０７】

免疫沈降プロトコルは、一般に、タンパク質ホスファターゼインヒビターおよび／またはプロテアーゼインヒビター（例えば、ＥＤＴＡ、ＰＭＳＦ、アプロチニン、バナジン酸ナトリウム）を補充したＲＩＰＡ緩衝液（１％　ＮＰ－４０またはＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１％　デオキシコール酸ナトリウム、０．１％　ＳＤＳ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０１Ｍ　リン酸ナトリウム（ｐＨ７．２）、１％　Ｔｒａｓｙｌｏｌ）のような溶解緩衝液中で、細胞の集団を溶解する工程、目的の抗体を細胞溶解物に添加する工程、一定時間（例えば、１～４時間）４℃でインキュベートする工程、プロテインＡセファロースビーズおよび／またはプロテインＧセファロースビーズを細胞溶解物に添加する工程、約１時間以上４℃でインキュベートする工程、溶解緩衝液中でビーズを洗浄する工程、およびＳＤＳ／サンプル緩衝液中でビーズを再懸濁する工程を包含する。目的の抗体が特定の抗原を免疫沈降する能力は、例えば、ウエスタンブロット分析により、アッセイされ得る。当業者は、抗体の抗原への結合を増加するように、そしてバックグラウンドを減少させるように改変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事前にきれいにする工程）に関して、認識し得る。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ら編，１９９４、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，第１巻、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１０．１６．１を参照のこと。

【０２０８】

ウエスタンブロット分析は、一般に、タンパク質サンプルを調製する工程、ポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原の分子量に応じた８％～２０％　ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）中でのそのタンパク質サンプルの電気泳動、そのタンパク質サンプルをそのポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、ＰＶＤＦまたはナイロンのような膜に転写する工程、ブロッキング溶液（例えば、３％　ＢＳＡまたは脱脂粉乳を有するＰＢＳ）中でその膜をブロックする工程、洗浄緩衝液（例えば、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ　２０）中でその膜を洗浄する工程

、ブロッキング緩衝液中で希釈された一次抗体（目的の抗体）を用いてその膜をブロックする工程、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄する工程、ブロッキング緩衝液中で希釈された酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）あるいは放射性分子（例えば、３２Ｐまたは１２５Ｉ）に結合体化された二次抗体（一次抗体を認識する、例えば、抗ヒト抗体）を用いて、その膜をブロックする工程、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄する工程、ならびにその抗原の存在を検出する工程を包含する。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように、そしてバックグラウンドノイズを減少させるように改変され得るパラメータに関して、認識し得る。ウエスタンブロットプロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら編，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，第１巻、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１０．８．１を参照のこと。

【０２０９】

ＥＬＩＳＡは、抗原を調製する工程、９６ウェル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する工程、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のような検出可能な化合物に結合体化された目的の抗体をそのウェルに添加し、そして一定時間インキュベートする工程、およびその抗原の存在を検出する工程を包含する。ＥＬＩＳＡにおいて、目的の抗体は、検出可能な化合物に結合している必要はない；その代わり、検出可能な化合物に結合体化された二次抗体（目的の抗体を認識する）が、ウェルに添加され得る。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体がウェルにコーティングされ得る。この場合、検出可能な化合物に結合体化された二次抗体が、コーティングされたウェルへの目的の抗原の添加に続いて、添加され得る。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように改変され得るパラメータ、および当該分野において公知のＥＬＩＳＡの他のバリエーションに関して、認識し得る。ＥＬＩＳＡに関するさらなる考察については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら編，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，第１巻、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１１．２．１を参照のこと。

【０２１０】

抗原に対する抗体の結合親和性および抗体－抗原相互作用のオフレート（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）が、競合結合アッセイにより決定され得る。競合結合アッセイの一つの例は、ラジオイムノアッセイであり、ラジオイムノアッセイは、漸増量の非標識抗原の存在下での、目的の抗体との標識された抗原（例えば、３Ｈまたは１２５Ｉ）のインキュベーション、および標識抗原に結合体化された抗体の検出を含む。特定の抗原に対する目的の抗体の親和性、および結合オフレートは、スキャッチャードプロット分析によるデータから決定され得る。二次抗体との競合はまた、ラジオイムノアッセイを用いて決定され得る。この場合、抗原は、漸増量の非標識の二次抗体の存在下で、標識化合物（例えば、３Ｈまたは１２５Ｉ）に結合した目的の抗体とともにインキュベートされる。

【０２１１】

（治療用途）

本発明はさらに、抗体ベースの治療に関し、この治療は、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、本発明の抗体を投与する工程を包含する。本発明の治療化合物としては、本発明の抗体（本明細書中に記載されるような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む）ならびに本発明の抗体をコードする核酸（本明細書中に記載されるような、それらのフラグメント、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）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は、本発明のポリペプチド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（本明細書中に記載される任意の１つ以上の疾患、障害、または状態を含むがこれらに限定されない）を処置、阻害または予防するために使用され得る。本発明のポリペプチド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工程を含むが、これに限定されない。本発明の抗体は、当該分野で公知であるか、または本明細書中に記載されるように、薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

【０２１２】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の要約は、身体内で局所的にまたは全身的に、あるいは（例えば、補体（ＣＤＣ）により、またはエフェクター細胞（ＡＤＣＣ）により媒介されるような）抗体の直接的細胞傷害性により、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを結合させることを含む。これらのアプローチのいくつかは、より詳細に以下に記載される。本明細書中で提供される教示を与えられれば、当業者は、過度の実験なしに、診断上の目的、モニタリングの目的あるいは治療上の目的のために、本発明の抗体を使用する方法がわかる。

【０２１３】

本発明の抗体は、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加させるために役立つ、他のモノクローナル抗体またはキメラ抗体、あるいはリンホカインまたは造血増殖因子（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－３およびＩＬ－７のような）と組み合わせて有利に利用され得る。

【０２１４】

本発明の抗体は、単独で、または他の型の処置（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン治療、免疫治療および抗腫瘍剤）との組み合わせで投与され得る。一般的に、（抗体の場合には）患者の種と同じ種である種起源または種反応性の生成物の投与が好ましい。従って、好ましい実施形態においては、ヒトの抗体、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、ヒトの患者に投与される。

【０２１５】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に対するイムノアッセイ、およびそれらに関連した障害の治療の両方のために、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する、高親和性および／または強力な、インビボでの阻害抗体および／または中和抗体、それらのフラグメント、またはその領域を使用することが好ましい。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またはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に対して親和性を有する。好ましい結合親和性としては、5×10^{-2}Ｍ、10^{-2}Ｍ、5×10^{-3}Ｍ、10^{-3}Ｍ、5×10^{-4}Ｍ、10^{-4}Ｍ、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、10^{-8}Ｍ、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、および10^{-15}Ｍよりも小さい解離定数すなわちＫｄを有する結合親和性が挙げられる。

【０２１６】

（遺伝子治療）

特定の実施形態において、抗体またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現したか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

【０２１７】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法は、本発明に従って使用され得る。例示的な方法が以下に記載される。

【０２１８】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌら，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　１２：４８８－５０５（１９９３）；ＷｕおよびＷｕ，Ｂｉｏｔｈ

erapy 3：87－95（1991）；Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32：573－596（1993）；Mulligan, Science 260：926－932（1993）；ならびにMorganおよびAnderson, Ann. Rev. Biochem. 62：191－217（1993）；May, TIBTECH 11（5）：155－215（1993）を参照のこと。使用され得る、組換えDNA技術分野において一般的に公知である方法は、Ausubelら（編），Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY（1993）；およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY（1990）に記載される。

【0219】

好ましい局面において、化合物は抗体をコードする核酸配列を含有し、上記核酸配列は、適切な宿主において、抗体、あるいはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質、またはその重鎖もしくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸配列は、抗体コード領域に作動可能に連結したプロモーターを有し、上記プロモーターは誘導性であるかまたは構成性であり、そして必要に応じて組織特異的である。別の特定の実施形態においては、抗体をコードする配列および任意の他の所望の配列がゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接した核酸分子が使用され、それにより抗体をコードする核酸の染色体内の発現を提供する（KollerおよびSmithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86：8932－8935（1989）；Zijlstraら, Nature 342：435－438（1989））。特定の実施形態において、発現した抗体分子は単鎖抗体であるか；あるいはこの核酸配列は、この抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする配列またはそのフラグメントを含む。

【0220】

核酸の患者への送達は、直接的（この場合、患者は核酸または核酸保有ベクターに直接的に曝される）か、または間接的（この場合、細胞は最初にインビトロで核酸で形質転換され、次いで患者に移植される）のいずれかであり得る。これらの2つのアプローチは、インビボ遺伝子治療として、またはエキソビボ遺伝子治療としてそれぞれ公知である。

【0221】

特定の実施形態において、核酸配列はインビボで直接的に投与され、そこで核酸配列は発現されて、コードされた生成物を産生する。これは、当該分野で公知の多数の方法（例えば、それらを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれを細胞内になるように投与することにより（例えば、欠損性または弱毒化したレトロウイルスまたは他のウイルスベクター（米国特許第4，980，286号を参照のこと）を用いた感染により）、あるいは、裸のDNAの直接注射により、あるいは、微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Biolistic、Dupont）の使用により、あるいは脂質または細胞表面レセプターでコーティングするか、あるいは薬剤をトランスフェクトすること、リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセル中へのカプセル化により、あるいは、それらを核に入ることが公知であるペプチドと結合させて投与することにより、レセプター媒介のエンドサイトーシスを受けるリガンドと結合させて投与することにより（例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262：4429－4432（1987）を参照のこと）（レセプターを特異的に発現する細胞の型を標的にするために用いられ得る）などのいずれかにより達成され得る。別の実施形態において、核酸－リガンド複合体が形成され得、ここで、リガンドはエンドソームを破壊するフソジェニック（fusogenic）ウイルス性ペプチドを含み、核酸がリソソーム分解を回避することを可能にする。さらに別の実施形態において、核酸は、特異的なレセプターを標的化することにより、細胞特異的な取り込みおよび発現についてインビボで標的化され得る（例えば、PCT公開第WO92／06180号；同第WO92／22635号；同第WO92／20316号；同第WO93／14188号、同第WO93／20221号を参照のこと）。あるいは、

核酸は、細胞内部に導入され得、そして相同組換えにより、発現のために宿主細胞ＤＮＡ中に組み込まれ得る（ＫｏｌｌｅｒおよびＳｍｉｔｈｉｅｓ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８９３２－８９３５（１９８９）；Ｚｉｊｌｓｔｒａら，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：４３５－４３８（１９８９））。

【０２２２】

特定の実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが用いられ得る（Ｍｉｌｌｅｒら，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：５８１－５９９（１９９３）を参照のこと）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルス性ゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞ＤＮＡへの組込みのために必要な構成要素を含む。遺伝子治療において使用される抗体をコードする核酸配列は、一つ以上のベクター中にクローン化され、これは、患者内への遺伝子の送達を容易にする。レトロウイルスベクターに関するさらなる詳細は、Ｂｏｅｓｅｎら，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ６：２９１－３０２（１９９４）（これは、幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために、ｍｄｒ１遺伝子を造血性幹細胞に送達するための、レトロウイルスベクターの使用を記載する）に見出され得る。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献は、以下である：Ｃｌｏｗｅｓら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９３：６４４－６５１（１９９４）；Ｋｉｅｍら，Ｂｌｏｏｄ ８３：１４６７－１４７３（１９９４）；ＳａｌｍｏｎｓおよびＧｕｎｚｂｅｒｇ，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：１２９－１４１（１９９３）；ならびにＧｒｏｓｓｍａｎおよびＷｉｌｓｏｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．３：１１０－１１４（１９９３）。

【０２２３】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用され得る他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、特に、気道上皮へ遺伝子を送達するための魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、自然に気道上皮に感染し、そこで軽い疾患を起こす。アデノウイルスに基づく送達システムの他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという利点を有する。ＫｏｚａｒｓｋｙおよびＷｉｌｓｏｎ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ３：４９９－５０３（１９９３）は、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の概説を示す。Ｂｏｕｔら，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：３－１０（１９９４）は、アカゲザルの気道上皮に遺伝子を移入するためのアデノウイルスベクターの使用を証明した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５２：４３１－４３４（１９９１）；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら，Ｃｅｌｌ ６８：１４３－１５５（１９９２）；Ｍａｓｔｒａｎｇｅｌｉら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９１：２２５－２３４（１９９３）；ＰＣＴ公開第ＷＯ９４／１２６４９号；およびＷａｎｇら，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：７７５－７８３（１９９５）に見出され得る。好ましい実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。

【０２２４】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）はまた、遺伝子治療における使用について提案されてきた（Ｗａｌｓｈら，Ｐｒｏｃ．Ｓｏｃ．Ｅｘｐ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．２０４：２８９－３００（１９９３）；米国特許第５，４３６，１４６号）。

【０２２５】

遺伝子治療に対する別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、またはウイルス感染のような方法により、組織培養中の細胞へ遺伝子を移入する工程を含む。通常、移入の方法は、選択マーカーの細胞への移入を含む。次いで、細胞は、移入された遺伝子を取り込みそして発現している細胞を単離するために選択下に置かれる。それらの細胞は次いで、患者に送達される。

【０２２６】

この実施形態においては、得られた組換え細胞のインビボ投与の前に、核酸が細胞に導入

される。このような導入は、当該分野において公知の任意の方法により実施され得、それらの方法としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：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、核酸配列を含むウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介の遺伝子移入、マイクロセル（ｍｉｃｒｏｃｅｌｌ）媒介の遺伝子移入、スフェロプラスト融合など。外来遺伝子の細胞への導入については、当該分野において多数の技術が公知であり（例えば、ＬｏｅｆｆｌｅｒおよびＢｅｈｒ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：５９９－６１８（１９９３）；Ｃｏｈｅｎら，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：６１８－６４４（１９９３）；Ｃｌｉｎｅ，Ｐｈａｒｍａｃ．Ｔｈｅｒ．２９：６９－９２ｍ（１９８５）を参照のこと）、そしてレシピエント細胞の必要な発生的および生理学的機能が破壊されない場合、本発明に従って使用され得る。この技術は、核酸の細胞への安定した移入を提供するはずであり、その結果、核酸は、細胞により発現可能であり、そして好ましくは、その細胞の子孫により遺伝性でかつ発現可能である。

【０２２７】

得られた組換え細胞は、当該分野において公知の様々な方法により、患者へ送達され得る。組換え血球（例えば、造血幹細胞または造血前駆細胞）は、好ましくは、静脈内に投与される。使用が考えられる細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、そして当業者により決定され得る。

【０２２８】

遺伝子治療の目的のために核酸が導入され得る細胞は、任意の所望の入手可能な細胞型を包含し、そして以下を含むがそれらに限定されない：上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球のような血球；種々の幹細胞または前駆細胞、特に、造血幹細胞または造血前駆細胞（例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児の肝臓などから得られるような細胞）。

【０２２９】

好ましい実施形態において、遺伝子治療に使用される細胞は、患者に対して自己である。

【０２３０】

遺伝子治療において組換え細胞が使用される実施形態において、抗体をコードする核酸配列は、細胞またはそれらの子孫により核酸配列が発現可能であるように細胞に導入され、次いで組換え細胞は、治療的効果のためにインビボで投与される。特定の実施形態において、幹細胞または前駆細胞が用いられる。インビトロで単離され、かつインビトロで維持され得る任意の幹細胞および／または前駆細胞は、本発明のこの実施形態に従って潜在的に使用され得る（例えば、ＰＣＴ公開第ＷＯ９４／０８５９８号：ＳｔｅｍｐｌｅおよびＡｎｄｅｒｓｏｎ，Ｃｅｌｌ　７１：９７３－９８５（１９９２）；Ｒｈｅｉｎｗａｌｄ，Ｍｅｔｈ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏ．２１Ａ：２２９（１９８０）；ならびにＰｉｔｔｅｌｋｏｗおよびＳｃｏｔｔ，Ｍａｙｏ　Ｃｌｉｎｉｃ　Ｐｒｏｃ．６１：７７１（１９８６）を参照のこと）。

【０２３１】

特定の実施形態において、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コード領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含有し、その結果、核酸の発現は、適切な転写誘導因子の存在または非存在を制御することにより制御可能である。

【０２３２】

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の、治療有用性または予防有用性を証明するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および／または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術（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）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示されるかどうか

を決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養において増殖され、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

【０２３３】

（治療的／予防的な投与および組成物）

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物、好ましくは本発明のポリペプチドまたは抗体の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製される（例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）。被験体は好ましくは、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどのような動物が挙げられるがそれらに限定されない動物であり、そして好ましくは哺乳動物であり、そして最も好ましくはヒトである。

【０２３４】

化合物が核酸または免疫グロブリンを含む場合に使用され得る処方および投与方法は、上記に記載され；さらなる適切な処方および投与経路は、本明細書中で以下に記載されたものの中から選択され得る。

【０２３５】

種々の送達システムが公知であり、そして本発明の化合物を投与するために用いられ得る（例えば、リポソーム中でのカプセル化、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、レセプター媒介エンドサイトーシス（例えば、ＷｕおよびＷｕ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２（１９８７）を参照のこと）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築など）。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、および経口の経路が挙げられるがそれらに限定されない。化合物または組成物は、任意の好都合な経路により（例えば、注入またはボーラス注射により、上皮または粘膜内層（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）を通しての吸収により）投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さらに、本発明の薬学的化合物または組成物を、任意の適切な経路（脳室内注射および髄腔内注射を包含し；脳室内注射は、例えば、Ｏｍｍａｙａリザーバのようなリザーバに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易にされ得る）により中枢神経系に導入することが望まれ得る。例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアゾール化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

【０２３６】

特定の実施形態において、本発明の薬学的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れ得る；これは、制限する目的ではないが、例えば、手術中の局部注入、局所適用（例えば、手術後の創傷包帯との組み合わせて）により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラント（このインプラントは、シアラスティック（ｓｉａｌａｓｔｉｃ）膜のような膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、または膠様材料である）により達成され得る。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、タンパク質が吸収されない材料を使用するために注意が払われなければならない。

【０２３７】

別の実施形態において、化合物または組成物は、小胞、特に、リポソーム中へ送達され得る（Ｌａｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０）；Ｔｒｅａｔら，Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ，Ｌｏｐｅｚ－ＢｅｒｅｓｔｅｉｎおよびＦｉｄｌｅｒ（編），Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，３５３～３６５頁（１９８９）；Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ，同書３１７～３２７頁を参照のこと；広く同書を参照のこと）。

【０２３８】

さらに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システム中で送達され得る。１つの実施形態において、ポンプが用いられ得る（Ｌａｎｇｅｒ（前出）；Ｓｅｆｔｏｎ，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１（１９８７）；Ｂｕｃｈｗａｌｄら，Ｓｕｒｇｅｒｙ ８８：５０７（１９８０）；Ｓａｕｄｅｋら，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４（１９８９）を参照のこと）。別の実施形態において、ポリマー材料が用いられ得る（Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，ＬａｎｇｅｒおよびＷｉｓｅ（編），ＣＲＣ Ｐｒｅｓ．，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ（１９７４）；Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ，Ｄｒｕｇ Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ，ＳｍｏｌｅｎおよびＢａｌｌ（編），Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４）；ＲａｎｇｅｒおよびＰｅｐｐａｓ，Ｊ．，Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｓｃｉ．Ｒｅｖ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．２３：６１（１９８３）を参照のこと；Ｌｅｖｙら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１９０（１９８５）；Ｄｕｒｉｎｇら，Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．２５：３５１（１９８９）；Ｈｏｗａｒｄら，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．７１：１０５（１９８９）もまた参照のこと）。さらに別の実施形態において、制御された放出システムは、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、全身用量の一部のみを必要とする（例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ，Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ（前出），第２巻，１１５～１３８頁（１９８４）を参照のこと）。

【０２３９】

他の制御された放出システムは、Ｌａｎｇｅｒにより総説において議論される（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０））。

【０２４０】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である、具体的な実施形態において、その核酸は、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構成し、そしてそれが細胞内になるように投与することにより（例えば、レトロウイルスベクターの使用により（米国特許第４，９８０，２８６号を参照のこと）、または直接注射により、または微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ，Ｄｕｐｏｎｔ）の使用により、または脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト剤でコーティングすることにより、または核に入ることが公知であるホメオボックス様ペプチドと結合させて投与すること（例えば、Ｊｏｌｉｏｔら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：１８６４－１８６８（１９９１）を参照のこと）などにより、そのコードされたタンパク質の発現を促進するようにインビボで投与され得る。あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして、発現のために相同組換えにより宿主細胞ＤＮＡ内に組み込まれ得る。

【０２４１】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の化合物、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。具体的な実施形態において、用語「薬学的に受容可能な」とは、動物における、そしてさらに特にヒトにおける使用のために、連邦規制当局もしくは米国政府により認められたか、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に列挙されたことを意味する。用語「キャリア」とは、治療剤とともに投与される、希釈剤、アジュバンド、賦形剤、またはビヒクルをいう。このような薬学的なキャリアは、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、ゴマ油など）を含む）のような滅菌した液体であり得る。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合に、好ましいキャリアである。生理食塩水溶液、ならびにデキストロースおよびグリセロールの水溶液はまた、特に注射可能な溶液のために、液体キャリアとして使用され得る。適切な薬学的賦形剤としては、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、フラワー、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、滑石、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。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、持続放出処方物などの形態を取り得る。この組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリドのようなキャリアとともに、坐剤として処方され得る。経口処方物は、薬学的等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準キャリアを含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎによる「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」に記載される。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、適切な量のキャリアとともに含んで、患者への適切な投与のための形態を提供する。処方物は、投与形態に適するべきである。

【０２４２】

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薬学的組成物として、処方される。代表的には、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のような局部麻酔を含み得る。一般的には、成分は、別々にかまたは単一投薬形態で一緒に混合してのどちらかで、例えば、一定量の活性薬剤を示すアンプルまたは小袋（ｓａｃｈｅｔｔｅ）のような密封された容器中の凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。組成物が注入により投与されるべき場合には、組成物は、滅菌した薬学的等級の水または生理食塩水を含む注入ボトルに分配され得る。組成物が注射により投与される場合、成分が投与の前に混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【０２４３】

本発明の化合物は、中性のまたは塩の形態として処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもののようなアニオンとともに形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第２鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するもののようなカチオンとともに形成される塩が挙げられる。

【０２４４】

この処置（本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性と関連する疾患または障害の抑制および予防）において効果的である本発明の化合物の量は、標準的な臨床技術により決定され得る。さらに、インビトロアッセイは、必要に応じて、使用して最適な投薬量の範囲を同定するのを助け得る。処方において使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さに依存し、そして開業医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。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から外挿され得る。

【０２４５】

抗体に関して、患者に投与される投薬量は、代表的に、患者の体重１ｋｇあたり０．１ｍｇ～１００ｍｇである。好ましくは、患者に投与される投薬量は、患者の体重１ｋｇあたり０．１ｍｇと２０ｍｇとの間であり、より好ましくは、患者の体重１ｋｇあたり１ｍｇ～１０ｍｇである。一般に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドへの免疫応答に起因して、他種由来の抗体よりもヒト体内で長い半減期を有する。従って、ヒト抗体の低い投薬量および頻度の低い投与は、しばしば可能である。さらに、本発明の抗体の投与の投薬量および頻度は、改変（例えば、脂溶化（ｌｉｐｉｄａｔｉｏｎ）のような）による抗体の取り込みおよび組織浸透（例えば、脳への）を増強することにより減少され得る。

【０２４６】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の一つ以上の成分で満たされている一つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。薬学的製品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関により規定される形式における通告は、このような容器に、必要に応じて伴ない得る。この通告は、ヒトの投与のための製造、使用または販売のこの機関による認可を反映する。

【０２４７】
（診断および画像化）
目的のポリペプチドに特異的に結合する標識化抗体、ならびにその誘導体およびそのアナログは、診断目的のために使用されて、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連する疾患、障害および／または状態を検出、診断またはモニターし得る。本発明は、目的のポリペプチドの異常な発現の検出について提供し、これは、（ａ）目的のポリペプチドに特異的な１つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（ｂ）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、異常な発現を示す。
【０２４８】
本発明は、障害を診断するための診断アッセイを提供し、このアッセイは、（ａ）目的のポリペプチドに特異的な１つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（ｂ）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、特定の障害を示す。癌に関して、個体由来の生検組織における比較的高い量の転写物の存在は、疾患の発生のための素因を示し得るか、または実際の臨床症状の出現前に疾患を検出するための手段を提供し得る。この型のより決定的な診断は、保健専門家に予防手段を使用させること、または早期の積極的な処置を可能にし得、これにより、癌の発生またはさらなる進行を予防する。
【０２４９】
本発明の抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を使用して生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイし得る（例えば、Ｊａｌｋａｎｅｎら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７－３０９６（１９８７）を参照のこと）。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセイ（例えば、酵素結合イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ）および放射免疫測定法（ＲＩＡ））が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野において公知であり、そして酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）；放射性同位体（例えば、ヨウ素（１２５Ｉ、１２１Ｉ）、炭素（１４Ｃ）、硫黄（３５Ｓ）、トリチウム（３Ｈ）、インジウム（１１２Ｉｎ）、およびテクネチウム（９９Ｔｃ））；発光標識（例えば、ルミノール）；ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、ならびにビオチンが挙げられる。
【０２５０】
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、目的のポリペプチド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。１つの実施形態において、診断は、ａ）目的のポリペプチドに特異的に結合する有効量の標識化分子を被験体に（例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に）投与する工程；ｂ）このポリペプチドが発現する被験体内の部位でこの標識化分子が優先的に濃縮することを可能にするために（および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるために）投与後、時間間隔を待つ工程；ｃ）バックグラウンドレベルを決定する工程；およびｄ）この被験体中の標識化分子を検出する工程、を包含し、その結果、このバックグラウンドレベルを越える標識化分子の検出は、この被験体が目的のポリペプチド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、特定の系について以前に決定された標準的な値と、検出された標識化分子の量を比較する工程を包含する種々の方法により決定され得る。
【０２５１】
被験体の大きさおよび使用される画像化システムが、診断の画像を産生するために必要で

ある画像化部分の量を決定するということは、当該分野において理解される。放射性同位体部分の場合、ヒト被験体について、注入される放射能の量は、通常、約５～２０ｍキュリーの範囲の９９ｍＴｃである。次いで、標識化抗体または標識化抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置で優先的に蓄積する。インビボでの腫瘍の画像化は、Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌら、「Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ」（Ｔｕｍｏｒ Ｉｍａｇｉｎｇ、第１３章：Ｔｈｅ Ｒａｄｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，Ｓ．Ｗ．ＢｕｒｃｈｉｅｌおよびＢ．Ａ．Ｒｈｏｄｅｓ編、Ｍａｓｓｏｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｉｎｃ．（１９８２）において、記載される。

【０２５２】

使用する標識の型および投与の様式を含む、いくつかの変動に依存して、標識化分子が被験体中の部位に優先的に濃縮することを可能にするため、および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるための投与後の時間間隔は、６～４８時間もしくは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日間または５～１０日間である。

【０２５３】

１つの実施形態において、疾患および障害をモニターすることは、疾患または障害（ｄｉｓｅａｓｅ）を診断するための方法を繰り返すことによって実施される（例えば、最初の診断から１ヶ月後、最初の診断から６ヶ月後、最初の診断から１年後、など）。

【０２５４】

標識化分子の存在は、インビボスキャニングについての当該分野で公知の方法を使用して患者中で検出され得る。これらの方法は、使用される標識の型に依存する。当業者は、特定の標識を決定するための適切な方法を決定することができる。本発明の診断方法において使用され得る方法およびデバイスは、コンピュータ連動断層撮影法（ＣＴ）、体全体のスキャン（例えば、陽子（ｐｏｓｉｔｉｏｎ）放射断層撮影法（ＰＥＴ））、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、および超音波診断法を含むが、これらに限定されない。

【０２５５】

特定の実施形態において、分子を放射性同位体で標識し、そして放射応答外科的機器（ｒａｄｉａｔｉｏｎ ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ ｓｕｒｇｉｃａｌ ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ）（Ｔｈｕｒｓｔｏｎら、米国特許第５，４４１，０５０号）を使用して患者中で検出する。別の実施形態において、分子を蛍光化合物で標識し、そして蛍光応答スキャニング機器を使用して患者中で検出する。別の実施形態において、分子を陽電子射出金属で標識し、そして陽電子射出断層撮影法を使用して患者中で検出する。さらに別の実施形態において、分子を常磁性標識で標識し、そして磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）を使用して患者中で検出する。

（キット）

本発明は、上記の方法において使用され得るキットを提供する。１つの実施形態において、キットは、１つ以上の容器において、本発明の抗体、好ましくは精製した抗体を備える。特定の実施形態において、本発明のキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチドを備える。このエピトープは、キット中に含まれる抗体と特異的に免疫反応する。好ましくは、本発明のキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体をさらに備える。別の特定の実施形態において、本発明のキットは、目的のポリペプチドへの抗体の結合を検出するための手段を備える（例えば、この抗体は、検出可能な基質（例えば、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物もしくは発光化合物）に結合体化され得るか、または一次抗体を認識する二次抗体が、検出可能な基質と結合体化され得る）。

【０２５６】

本発明の別の特定の実施形態において、キットは、増殖性および／または癌性のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対して特異的な抗体を含む血清のスクリーニングに使用するための診断キットである。このようなキットは、目的のポリペプチドと反応しないコン

トロール抗体を備え得る。このようなキットは、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備え得る。このエピトープは、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する。さらに、このようなキットは、抗原に対する上記の抗体の結合を検出するための手段を備える（例えば、抗体は、蛍光化合物（例えば、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はたローダミン）と結合体化され得る）。特定の実施形態において、キットは、組換え的に産生されたポリペプチド抗原または化学的に合成されたポリペプチド抗原を備え得る。キットのポリペプチド抗原はまた、固体支持体に付着され得る。

【０２５７】

より特定の実施形態において、上記のキットの検出手段は、上記のポリペプチド抗原が付着する固体支持体を備える。このようなキットはまた、非付着レポーター標識化抗ヒト抗体を備え得る。この実施形態において、ポリペプチド抗原への抗体の結合は、上記のレポーター標識化抗体の結合によって検出され得る。

【０２５８】

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のスクリーニングにおいて使用するための、診断キットを含む。この診断キットは、ポリペプチド抗原またはポリヌクレオチド抗原と特異的に免疫反応する実質的に単離された抗体、およびこの抗体へのこのポリヌクレオチド抗原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備える。１つの実施形態において、抗体は、固体支持体に付着される。特定の実施形態において、抗体は、モノクロナール抗体であり得る。キットのこの検出手段は、二次標識化モノクロナール抗体を含み得る。あるいは、またはさらに、この検出手段は、標識化競合抗原を含み得る。

【０２５９】

１つの診断構成において、試験血清を、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させる。特定の抗原抗体とこの試薬との結合、および洗浄することによる結合していない血清成分の除去の後、この試薬をレポーター標識化抗ヒト抗体と反応させて、固体支持体上に、結合した抗抗原抗体の量に比例して、この試薬にレポーターを結合させる。この試薬を再び洗浄して、結合していない標識化抗体を除去し、そしてこの試薬と会合するレポーターの量を決定する。代表的に、レポーターは、酵素であり、この酵素は、適切な蛍光性基質、発光性基質または比色用基質（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）の存在下で固相をインキュベートすることにより検出される。

【０２６０】

上記のアッセイにおける固体表面試薬は、タンパク質材料を固体支持体材料（例えば、高分子ビーズ、計深棒、９６ウェルプレートまたは濾過材料）に付着させるための公知の技術により調製される。これらの付着方法としては、一般的に、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（ｃｏｖａｌｅｎｔ ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ）（代表的には、遊離アミン基を介する）が挙げられる。あるいは、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。

【０２６１】

従って、本発明は、この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。このキットは、一般的に、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、レポーター標識された抗ヒト抗体を備える。

【０２６２】

（ポリヌクレオチドの使用）

本明細書中で同定された各々のポリヌクレオチドは、試薬として多数の方法において使用され得る。以下の説明は例示的であるとみなされるべきであり、そして公知の技術を利用する。

【０２６３】

本発明のポリヌクレオチドは、染色体同定のために有用である。実際の配列データ（反復多型性）に基づく染色体マーキング試薬は現在ほとんど利用可能ではないため、新しい染色体マーカーを同定する必要性が存在するままである。各々の配列は、個々のヒト染色体上の特定の位置に特に標的化され、そしてこの位置にハイブリダイズされ得る。従って、本発明の各々のポリヌクレオチドは、当該分野で公知の技術を用いて染色体マーカーとして慣用的に使用され得る。

【０２６４】

簡単に言うと、配列は、配列番号Ｘで示される配列またはそれに対する相補体からＰＣＲプライマー（好ましくは、少なくとも１５ｂｐ（例えば、１５～２５ｂｐ））を調製することによって染色体にマッピングされ得る。プライマーが、ゲノムＤＮＡ中の１つより多くの予測されたエキソンにまたがらないように、プライマーは、コンピューター分析を使用して必要に応じて選択され得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのＰＣＲスクリーニングのために使用される。配列番号Ｘに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが、増幅されたフラグメントを産生する。

【０２６５】

同様に、体細胞ハイブリッドは、特定の染色体に対してポリヌクレオチドをＰＣＲマッピングする迅速な方法を提供する。単一のサーマルサイクラーを使用して１日あたり３つ以上のクローンが割り当てられ得る。さらに、ポリヌクレオチドの下位位置決定（ｓｕｂｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ）は、特定の染色体フラグメントのパネルを用いて達成され得る。使用され得る他の遺伝子マッピング戦略は、インサイチュハイブリダイゼーション、標識フローソート（ｌａｂｅｌｅｄ　ｆｌｏｗ　ｓｏｒｔｅｄ）染色体でのプレスクリーニング、染色体特異的ｃＤＮＡライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる前選択、およびコンピューターマッピング技術（例えば、その全体が本明細書中に参考として援用される、Ｓｈｕｌｅｒ，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１６：４５６－４５９（１９９８）など）を含む。

【０２６６】

ポリヌクレオチドの正確な染色体位置はまた、中期染色体スプレッド（ｓｐｒｅａｄ）の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）を使用して獲得され得る。この技術は５００または６００塩基ほどの短さのポリヌクレオチドを使用する；しかし２，０００～４，０００ｂｐのポリヌクレオチドが好ましい。この技術の総説に関しては、Ｖｅｒｍａら、「Ｈｕｍａｎ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ：ａ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｂａｓｉｃ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」，Ｐｅｒｇａｍｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　（１９８８）を参照のこと。

【０２６７】

染色体マッピングについては、ポリヌクレオチドは、個々に（単一染色体またはその染色体上の単一部位をマークするために）またはパネルで（複数部位および／または複数染色体をマークするために）使用され得る。

【０２６８】

従って、本発明はまた、染色体の位置決定のための方法も提供し、この方法は、（ａ）表１におけるポリヌクレオチド配列および配列番号ＸからＰＣＲプライマーを調製する工程、ならびに（ｂ）個々の染色体を含む体細胞ハイブリッドをスクリーニングする工程を包含する。

【０２６９】

本発明のポリヌクレオチドは、同様に、放射線ハイブリッドマッピング、ＨＡＰＰＹマッピング、および長範囲制限マッピングに有用である。これらの技術および当該分野で公知の他の技術の概説について、例えば、Ｄｅａｒ「Ｇｅｎｏｍｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ」ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ　ａｔ　Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｌｏｎｄｏｎ（１９９７）；Ａｙｄｉｎ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．７７：６９１～６９４（１９９９）；Ｈａｃｉａら、Ｍｏｌ．Ｐｓｙｃｈｉａｔｒｙ　３：４８３～４９２（１９９８）；Ｈｅｒｒｉｃｋら、Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ　Ｒ

ｅｓ．７：４０９～４２３（１９９９）；Ｈａｍｉｌｔｏｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．６２：２６５～２８０（２０００）；および／またはＯｔｔ、Ｊ．Ｈｅｒｅｄ．９０：６８～７０（１９９９）（これらの各々は、その全体が参考として本明細書中に援用される）を参照のこと。

【０２７０】

一旦、ポリヌクレオチドが正確な染色体位置にマップされると、ポリヌクレオチドの物理的位置は、連鎖分析において使用され得る。連鎖分析は、染色体位置と特定の疾患の提示との間の同時遺伝（ｃｏｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ）を確立する。（疾患マッピングデータは、例えば、Ｖ．ＭｃＫｕｓｉｃｋ，Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ（Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｗｅｌｃｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｌｉｂｒａｒｙを通してオンラインで利用可能である）において見い出される）。１メガベースマッピング解像度および２０ｋｂあたり１遺伝子と仮定すると、疾患と関連する染色体領域に正確に位置決定されるｃＤＮＡは、５０～５００の潜在的な原因遺伝子のうちの１つであり得る。

【０２７１】

従って、一旦、同時遺伝が確立されると、罹患個体と非罹患個体との間での本発明のポリヌクレオチドおよび対応する遺伝子における差異が試験され得る。まず、染色体中の可視的構造変化（例えば、欠失または転座）は染色体スプレッドにおいて、またはＰＣＲによって試験される。構造的変化が存在しない場合、点変異の存在が確認される。何人かのまたは全ての罹患個体で観察されたが、正常な個体では観察されなかった変異は、この変異がこの疾患を引き起こし得ることを示す。しかし、いくつかの正常な個体由来のポリペプチドおよび対応する遺伝子の完全な配列決定は、変異を多型性と区別するために要求される。新しい多型性が同定される場合、この多型ポリペプチドはさらなる連鎖分析のために使用され得る。

【０２７２】

さらに、非罹患個体と比較した、罹患個体の遺伝子の増加または減少した発現が、本発明のポリヌクレオチドを使用して評価され得る。任意のこれらの変化（変化した発現、染色体再配置、または変異）は、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。

【０２７３】

従って、本発明はまた、障害の診断の間に有用な診断方法を提供し、この方法は、個体由来の細胞または体液中の本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、および測定された遺伝子発現レベルを標準のポリヌクレオチド発現レベルと比較する工程を包含し、これによって、標準と比較して、遺伝子発現レベルの増加または減少が、障害の指標になる。

【０２７４】

なお別の実施形態では、本発明は、サンプルを、試験被験体に由来する増殖性および／またはガン性のポリヌクレオチドの存在について分析するためのキットを含む。一般的実施形態において、このキットは、本発明のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む少なくとも１つのポリヌクレオチドプローブ、および適切な容器を備える。この特定の実施形態では、このキットは、本発明のポリヌクレオチドの内部領域を規定する２つのポリヌクレオチドプローブを含み、ここで各プローブは、この領域に対して内部に３１’マー末端を含む１つの鎖を有する。さらなる実施形態では、このプローブは、ポリメラーゼ連鎖反応増幅のためのプライマーとして有用であり得る。

【０２７５】

例えば、腫瘍の診断を含む、関連障害の診断が既に従来方法によって行われている場合、本発明は、予後インジケーターとして有用であり、それによって増強または抑制された本発明のポリヌクレオチドの発現を示す患者が、標準レベルにより近いレベルでこの遺伝子を発現する患者と比較して悪い臨床結果を経験する。

【０２７６】

「本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する（こと）」によって、本発明のポリ

ペプチドのレベルまたは本発明のポリペプチドをコードするｍＲＮＡのレベルを、第１の生物学的サンプルにおいて直接的（例えば、絶対のタンパク質レベルまたはｍＲＮＡレベルを決定または評価することによって）または相対的（例えば、第２の生物学的サンプル中のポリペプチドレベルまたはｍＲＮＡレベルに対して比較することによって）のいずれかで定性的または定量的に測定または評価することが意図される。好ましくは、第１の生物学的サンプル中のポリペプチドレベルまたはｍＲＮＡレベルが測定または評価され、そして標準のポリペプチドレベルまたはｍＲＮＡレベルに対して比較され、この標準は、関連障害を有さない個体から得られる第２の生物学的サンプルから得られるかまたは関連障害を有さない個体の集団由来のレベルを平均することによって決定される。当該分野で認識されるように、一旦標準的なポリペプチドレベルまたはｍＲＮＡレベルが公知になれば、これを、比較のための標準として反復して用い得る。

【０２７７】

「生物学的サンプル」によって、本発明のポリペプチドまたは対応するｍＲＮＡを含む、個体、体液、細胞株、組織培養物または他の供給源から得られる任意の生物学的サンプルが意図される。示されるように、生物学的サンプルは、本発明のポリペプチドを含む体液（例えば、精液、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、本発明のポリペプチドを発現することが見出された組織供給源を含む。哺乳動物から組織生検および体液を得るための方法は、当該分野で周知である。生物学的サンプルがｍＲＮＡを含む場合、組織生検が好ましい供給源である。

【０２７８】

上記で提供された方法は好ましくは、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドが固体支持体に結合される、診断方法および／またはキットに適用され得る。１つの例示的な方法では、この支持体は、米国特許第５，８３７，８３２号、同第５，８７４，２１９号および同第５，８５６，１７４号に記載される、「遺伝子チップ」または「生物学的チップ」であり得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドが結合されたこのような遺伝子チップを用いて、単離された本発明のポリヌクレオチド配列と、試験被験体から単離されたポリヌクレオチドとの間の多型性を同定し得る。このような多型の知識（すなわち、その多型の位置、およびその多型の存在）は、多くの障害（例えば、神経障害、免疫系障害、筋肉障害、生殖障害、胃腸障害、肺障害、心血管障害、腎障害、増殖性障害、ならびに／または癌性疾患および癌性状態）について、疾患遺伝子座を同定する際に有益である。このような方法は、米国特許第５，８５８，６５９号および同第５，８５６，１０４号に記載される。上記に参照した米国特許は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【０２７９】

本発明は、化学的に合成された、または、ペプチド核酸（ＰＮＡ）として再現された）または当該分野で公知の他の方法に従って、本発明のポリヌクレオチドを包含する。ＰＮＡの使用は、本発明のポリヌクレオチドが固体支持体、または、遺伝子チップに取り込まれる場合、好ましい形態として役立つ。本発明の目的のために、ペプチド核酸（ＰＮＡ）は、ポリアミド型のＤＮＡアナログであり、そしてアデニン、グアニン、チミンおよびシトシンについてのモノマー単位が市販されている（Ｐｅｒｃｅｐｔｉｖｅ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）。ＤＮＡの特定の成分（例えば、リン、酸化リンまたはデオキシリボース誘導体）は、ＰＮＡ中に存在しない。Ｐ．Ｅ．Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ｍ．Ｅｇｈｏｌｍ，Ｒ．Ｈ．ＢｅｒｇおよびＯ．Ｂｕｃｈａｒｄｔ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５４，１４９７（１９９７）；ならびにＭ．Ｅｇｈｏｌｍ，Ｏ．Ｂｕｃｈａｒｄｔ，Ｌ．Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ，Ｃ．Ｂｅｈｒｅｎｓ，Ｓ．Ｍ．Ｆｒｅｉｅｒ，Ｄ．Ａ．Ｄｒｉｖｅｒ，Ｒ．Ｈ．Ｂｅｒｇ、Ｓ．Ｋ．Ｋｉｍ，Ｂ．ＮｏｒｄｅｎおよびＰ．Ｅ．Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ｎａｔｕｒｅ ３６５，６６６（１９９３）によって開示されるように、ＰＮＡは、相補的なＤＮＡ鎖に対して特異的かつ緊密に結合し、そしてヌクレアーゼによって分解されない。実際、ＰＮＡは、ＤＮＡ自体が結合するよりも強力にＤＮＡに結合する。これはおそらく、２つの鎖の間に静電斥力が存在せず、そしてまたポリアミド骨格がより可撓性が高いことによる。これに

よって、ＰＮＡ／ＤＮＡ二重鎖は、ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖よりも広範囲のストリンジェンシー条件下で結合し、多重鎖ハイブリダイゼーションを行うのをより容易にする。強力な結合に起因して、ＤＮＡを用いてよりも小さいプローブが用いられ得る。さらに、おそらく、単一の塩基ミスマッチが、ＰＮＡ／ＤＮＡハイブリダイゼーションを用いて決定され得る。なぜなら、ＰＮＡ／ＤＮＡの１５マーにおける単一のミスマッチは、ＤＮＡ／ＤＮＡの１５マー二重鎖については４℃～１６℃であるのに対して、融点（Ｔ．ｓｕｂ．ｍ）を８～２０℃低下させるからである。また、ＰＮＡ中に電荷基が存在しないことは、ハイブリダイゼーションが、低いイオン強度で行われ得、そして分析の間の塩によって可能な妨害を減少させることを意味する。

【０２８０】

本発明は、哺乳動物におけるガンの検出を含むがこれらに限定されない用途を有する。特に、本発明は、以下を含むがこれらに限定されない、病理学的細胞増殖新形成の診断の間に有用である：急性骨髄性白血病（急性単球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性赤白血病、急性巨核球性白血病、および急性未分化白血病などを含む）；および慢性骨髄性白血病（慢性骨髄単球性白血病、慢性顆粒球性白血病などを含む）。好ましい哺乳動物としては、有尾猿（ｍｏｎｋｅｙ）、無尾猿（ａｐｅ）、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギおよびヒトが挙げられる。特に好ましいのは、ヒトである。

【０２８１】

病理学的細胞増殖障害はしばしば、原癌遺伝子の不適切な活性化に関連する（Ｇｅｌｍａｎｎ，Ｅ．Ｐ．ら，「Ｔｈｅ Ｅｔｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ａｃｕｔｅ Ｌｅｕｋｅｍｉａ：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｖｉｒａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ」，Ｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ Ｄｉｓｅａｓｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｂｌｏｏｄ，第１巻，Ｗｉｅｒｎｉｋ，Ｐ．Ｈ．ら編，１６１－１８２（１９８５））。新形成は現在、ウイルス配列の染色体への挿入、より活性に転写される領域への遺伝子の染色体転座、または何らかの他の機構による、正常な細胞遺伝子産物の定性的変化から、または遺伝子発現の定量的改変から生じると考えられている（Ｇｅｌｍａｎｎら、前出）。特定の遺伝子の変異または変更された発現が、他の組織および他の細胞型の中でも、いくつかの白血病の病因と関与するようである（Ｇｅｌｍａｎｎら、前出）。実際、いくつかの動物新形成に関与する癌遺伝子のヒト対応物は、ヒトの白血病および癌のいくつかの症例において増幅または転座されている（Ｇｅｌｍａｎｎら、前出）。

【０２８２】

例えば、ｃ－ｍｙｃ発現は、非リンパ球性白血病細胞株ＨＬ－６０において高度に増幅される。ＨＬ－６０細胞が増幅を止めるように化学的に誘導される場合、ｃ－ｍｙｃのレベルは、ダウンレギュレートされることが見出される（国際公開番号ＷＯ９１／１５５８０）。しかし、ｃ－ｍｙｃまたはｃ－ｍｙｂの５’末端に相補的であるＤＮＡ構築物へのＨＬ－６０細胞の暴露が、ｃ－ｍｙｃタンパク質またはｃ－ｍｙｂタンパク質の発現をダウンレギュレートする対応するｍＲＮＡの翻訳をブロックし、処理した細胞の細胞増殖および分化の停止を引き起こすことが示されている（国際公開番号ＷＯ９１／１５５８０；Ｗｉｃｋｓｔｒｏｍら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８５：１０２８（１９８８）；Ａｎｆｏｓｓｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８６：３３７９（１９８９））。しかし、当業者は、増殖表現型を示すことが公知である種々の起源の多数の細胞および細胞型を考慮すれば、本発明の有用性が造血性の細胞および組織の増殖性障害の処置に限定されないことを認識する。

【０２８３】

前記に加えて、本発明のポリヌクレオチドは、三重らせん形成を通して、またはアンチセンスＤＮＡもしくはＲＮＡを通して遺伝子発現を制御するために使用され得る。アンチセンス技術は、例えば、Ｏｋａｎｏ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６：５６０（１９９１），「Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ」，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏ

ｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８）において考察される。三重らせん形成は例えば、Ｌｅｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６：３０７３（１９７９）；Ｃｏｏｎｅｙら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：４５６（１９８８）；およびＤｅｒｖａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：１３６０（１９９１）において考察される。両方の方法は、相補的ＤＮＡまたは相補的ＲＮＡへのポリヌクレオチドの結合に依存する。これらの技術に関して、好ましいポリヌクレオチドは通常、２０～４０塩基長のオリゴヌクレオチドであり、そして転写に関与する遺伝子領域（三重らせん－Ｌｅｅら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．６：３０７３（１９７９）；Ｃｏｏｎｅｙら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：４５６（１９８８）；およびＤｅｒｖａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：１３６０（１９９１）を参照のこと）またはｍＲＮＡ自体（アンチセンス－Ｏｋａｎｏ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６：５６０（１９９１）；Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙ－ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８））のいずれかに相補的である。三重らせん形成は、最適にはＤＮＡからのＲＮＡ転写の遮断を生じるが、アンチセンスＲＮＡハイブリダイゼーションは、ポリペプチドへのｍＲＮＡ分子の翻訳を阻止する。上記に記載のオリゴヌクレオチドはまた、アンチセンスＲＮＡまたはＤＮＡが、インビボで発現されて本発明の抗原のポリペプチド産生を阻害し得るように細胞に送達され得る。両方の技術は、モデル系において効果的であり、そして本明細書に開示される情報は、疾患を処置するための試みにおいて、特に、増殖性疾患および／または状態の処置のために、アンチセンスまたは三重らせんポリヌクレオチドを設計するために使用され得る。

【０２８４】

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つの目標は、遺伝欠損を修正する試みにおいて、欠損遺伝子を有する生物へ正常遺伝子を挿入することである。本発明に開示されるポリヌクレオチドは、高度に正確な様式でこのような遺伝欠損を標的とする手段を提供する。別の目標は、宿主ゲノム中には存在しなかった新しい遺伝子を挿入し、それによって宿主細胞中に新しい形質を生成することである。

【０２８５】

ポリヌクレオチドはまた、微小な生物学的サンプルから個体を同定するために有用である。例えば、米国軍は、その職員を同定するために制限フラグメント長の多型性（ＲＦＬＰ）の使用を考慮している。この技術において、個体のゲノムＤＮＡは１つ以上の制限酵素で消化され、そして職員を同定するため固有なバンドを生じるためのサザンブロットについてプローブされる。この方法は、「認識票（Ｄｏｇ ｔａｇ）」（これは、失われたり、交換されたり、または盗まれたりすることにより、ポジティブな同定を困難にし得る）の現在の限界を受けない。本発明のポリヌクレオチドは、ＲＦＬＰのためのさらなるＤＮＡマーカーとして使用され得る。

【０２８６】

本発明のポリヌクレオチドはまた、個体のゲノムの選択された部分の実際の塩基ごとのＤＮＡ配列を決定することによって、ＲＦＬＰに対する代替物として使用され得る。これらの配列は、このような選択されたＤＮＡを増幅しそして単離するためにＰＣＲプライマーを調製するために使用され得、次いで、この選択されたＤＮＡは、配列決定され得る。各個体が固有のセットのＤＮＡ配列を有するので、この技術を使用して、個体が同定され得る。一旦、固有のＩＤデータベースが個体について確立されると、その個体が生存していようとまたは死亡していようと、その個体のポジティブ同定が、極めて小さな組織サンプルからなされ得る。

【０２８７】

法医学生物学もまた、本明細書に開示されるようなＤＮＡに基づく同定技術を使用して利益を得る。組織（例えば、髪または皮膚）、または体液（例えば、血液、唾液、精液、滑液、羊水、乳汁、リンパ、肺痰（ｐｕｌｍｏｎａｒｙ ｓｐｕｔｕｍ）またはサーファクタント、尿、糞便物質など）のような非常に小さな生物学的サンプルから得られたＤＮＡ

配列は、ＰＣＲを使用して増幅され得る。ある先行技術において、ＤＱａクラスＩＩ　ＨＬＡ遺伝子のような多型性遺伝子座から増幅された遺伝子配列は、個体を同定するための法医学生物学において使用される。（Ｅｒｌｉｃｈ，Ｈ．，ＰＣＲ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．（１９９２））。一旦、これらの特異的多型性遺伝子座が増幅されると、これらは１つ以上の制限酵素で消化される。これは、ＤＱａクラスＩＩ　ＨＬＡ遺伝子に対応するＤＮＡでプローブされたサザンブロットについてのバンドの同定セットを生じる。同様に、本発明のポリヌクレオチドは、法医学的目的のための多型性マーカーとして使用され得る。

【０２８８】

また、特定の組織の供給源を同定し得る試薬についての必要性が存在する。例えば、未知の起源の組織が提供される場合、法医学においてこのような必要性が生じる。適切な試薬は、例えば、本発明の配列から調製される、ＤＮＡプローブまたはプライマーを含み得る。このような試薬のパネルは、種および／または器官型によって組織を同定し得る。同様の様式で、これらの試薬は、夾雑物について組織培養物をスクリーニングするために使用され得る。

【０２８９】

本発明のポリヌクレオチドはまた、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。同様に、本発明のポリペプチドに関するポリペプチドおよび抗体は、組織（例えば、免疫組織化学アッセイ）または細胞型（例えば、免疫細胞学アッセイ）の示差的同定のための免疫学的プローブを提供するのに有用である。さらに、「標準」遺伝子発現レベル（すなわち、障害を有しない個体由来の健康組織の発現レベル）と比較して、上記の組織または細胞の多くの障害に対して、本発明のポリヌクレオチド／ポリペプチドの有意に高いかまたは低いレベルの遺伝子発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織（例えば、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを発現する組織、および／または癌性組織および／または創傷組織）または体液（例えば、血清、血漿、尿、滑液または髄液）において検出され得る。

【０２９０】

従って、本発明は、以下の工程を含む障害の診断方法を提供する：（ａ）個体の細胞または体液中の遺伝子発現レベルをアッセイする工程；（ｂ）標準的な遺伝子発現レベルと、この遺伝子発現レベルを比較し、それにより、標準の発現レベルと比較して、アッセイされた遺伝子発現レベルの増加または減少が障害を示す、工程。

【０２９１】

少なくとも、本発明のポリヌクレオドは、サザンブロットのゲル上の分子量マーカーとして、特定の細胞型における特異的ｍＲＮＡの存在についての診断プローブとして、新規のポリヌクレオドを発見するプロセスにおける「減算した（ｓｕｂｔｒａｃｔ－ｏｕｔ）」公知の配列に対するプローブとして、「遺伝子チップ」または他の支持体に付着するためのオリゴマーを選択および作製するために、ＤＮＡ免疫技術を用いて抗ＤＮＡ抗体を惹起するために、および免疫応答を惹起する抗原として使用され得る。

【０２９２】

（ポリペプチドの使用）

本明細書中で同定される各々のポリペプチドは、多くの方法において使用され得る。以下の記述は、例示として考慮されるべきであり、そして公知の技術を利用する。

【０２９３】

本発明のポリペプチドに対して指向されるポリペプチドおよび抗体は、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ら、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）の差次的同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。

【０２９４】

抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的な方法を用いて、生物学的サンプル中の本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのレベルをアッセイし得る。（例えば、Ｊａｌｋａｎｅｎら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７－３０９６（１９８７）を参照のこと）。タンパク質の遺伝子発現を検出するのに有用な、他の抗体に基づく方法には、免疫学的検定（例えば、酵素結合イムノソルベント検定（ＥＬＩＳＡ）およびラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ））が含まれる。適切な抗体アッセイの標識は、当該分野で公知であり、そして酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）；放射性同位体（例えば、ヨウ素（^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{123}Ｉ、^{121}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{115m}Ｉｎ、^{113m}Ｉｎ、^{112}Ｉｎ、^{111}Ｉｎ）、およびテクネチウム（^{99}Ｔｃ、^{99m}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；発光標識（例えば、ルミノール）；ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）ならびにビオチンが挙げられる。

【０２９５】

生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドのレベルをアッセイすることに加えて、タンパク質はまた、画像化によりインビボで検出され得る。タンパク質のインビボ画像化のための抗体の標識またはマーカーは、Ｘ線撮影法、ＮＭＲ、またはＥＳＲにより検出可能なものを含む。Ｘ線撮影法のために適切な標識は、放射性同位体（例えば、バリウムまたはセシウム）を含み、これは検出可能な放射線を放射するが、被験体に対して明らかに有害ではない。ＮＭＲおよびＥＳＲのための適切なマーカーは、検出可能な特徴的なスピンを有するマーカー（例えば、重水素）を含み、これは、関連するハイブリドーマのための栄養分を標識することにより抗体中に取り込まれ得る。

【０２９６】

放射性同位体（例えば、^{131}Ｉ、^{112}Ｉｎ、^{99m}Ｔｃ、（^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{123}Ｉ、^{121}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{115m}Ｉｎ、^{113m}Ｉｎ、^{112}Ｉｎ、^{111}Ｉｎ）、およびテクネチウム（^{99}Ｔｃ、^{99m}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）、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴により検出可能な材料のような適切な検出可能な画像化部分で標識された、タンパク質特異的抗体または抗体フラグメントは、免疫系の障害について検査されるべき哺乳動物に（例えば、非経口的、皮下、または腹腔内に）導入される。被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、^{99m}Ｔｃの約５～２０ミリキュリーの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現する細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌら、「Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ」（Ｔｕｍｏｒ Ｉｍａｇｉｎｇの第１３章：Ｔｈｅ Ｒａｄｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ、Ｓ．Ｗ．ＢｕｒｃｈｉｅｌおよびＢ．Ａ．Ｒｈｏｄｅｓ編、Ｍａｓｓｏｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｉｎｃ．（１９８２））に記載される。

【０２９７】

１つの実施形態において、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ポ

リペプチド（例えば、本発明の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、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。１つの例において、本発明は、治療タンパク質を標的化細胞中へ送達するための方法を提供する。別の例において、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、標的化細胞に送達するための方法を提供する。

【０２９８】

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に関連する本発明のポリペプチド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。

【０２９９】

「毒素」とは、内因性の細胞傷害性エフェクタ系、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、以下が挙げられるが、これらに限定されない：当該分野で公知の放射性同位体、固有のまたは誘導された内因性の細胞傷害性エフェクタ系に結合する化合物（例えば、抗体（またはその補体固定含有部分））、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、ＲＮＡｓｅ、α毒素、リシン、アブリン、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）、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、αサルシン（ｓａｒｃｉｎ）およびコレラ毒素。「毒素」はまた、細胞分裂停止剤もしくは細胞破壊剤、治療薬または放射活性金属イオン（例えば、α－放射体（例えば、^{213}Ｂｉ））もしくは他の放射性同位体（例えば、^{103}Ｐｄ、^{133}Ｘｅ、^{131}Ｉ、^{68}Ｇｅ、^{57}Ｃｏ、^{65}Ｚｎ、^{85}Ｓｒ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{153}Ｓｍ、^{153}Ｇｄ、^{169}Ｙｂ、^{51}Ｃｒ、^{54}Ｍｎ、^{75}Ｓｅ、^{113}Ｓｎ、^{90}イットリウム、^{117}スズ、^{186}レニウム、^{166}ホルミウム、および^{188}レニウム）；発光標識（例えば、ルミノール）；および蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、ならびにビオチンを含む。

【０３００】

当該分野において公知の技術は、本発明のポリペプチド（抗体を含む）を標識化するために適用され得る。このような技術としては、二官能性結合剤の使用（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；これら各々の内容は、本明細書中に参考としてその全体を援用する）が挙げられるが、これに限定されない。

【０３０１】

従って、本発明は、障害の診断方法を提供し、これは以下を含む：（ａ）個体の細胞または体液における本発明のポリペプチドの発現レベルをアッセイする工程；および（ｂ）アッセイされたポリペプチドの発現レベルを標準のポリペプチドの発現レベルと比較し、それによって標準の発現レベルと比較してアッセイされたポリペプチドの発現レベルにおける増加または減少が障害を示す工程。癌に関しては、個体由来の生検された組織中の相対的に高い量の転写物の存在は、疾患の発症の素因を示し得るか、または実際の臨床的な症状が明らかとなる前に疾患を検出するための手段を提供し得る。より決定的なこのタイプの診断は、保健専門家がより早く予防策または積極的な処置を使用し、それによって癌の発症またはさらなる進行を防ぐことを可能にし得る。

【０３０２】

さらに、本発明のポリペプチドを用いて疾患または状態（例えば、神経障害、免疫系障害

、筋肉障害、生殖障害、胃腸障害、肺障害、心血管障害、腎臓障害、増殖障害ならびに／または癌性疾患および状態など）を処置または予防し得る。例えば、患者は、ポリペプチドの非存在またはレベルの減少を元に戻すこと（例えば、インスリン）、異なるポリペプチドの不在またはレベルの減少を補充すること（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）、ポリペプチドの活性を阻害すること（例えば、癌遺伝子または腫瘍抑制因子）、ポリペプチドの活性を活性化すること（例えば、レセプターに結合することによって）、遊離リガンドについて膜結合レセプターと競合させることによって膜結合レセプターの活性を減少させること（例えば、炎症を低減させる際に用いられる可溶性ＴＮＦレセプター）、または所望の応答をもたらすこと（例えば、血管の成長の阻害、増殖細胞または組織に対する免疫応答の増強）の試みにおいて、本発明のポリペプチドが投与され得る。

【０３０３】

同様に、本発明のポリペプチドに対して指向される抗体もまた用いられ、疾患（上記、および本明細書中のどこかに記載されるような）を処置し得る。例えば、本発明のポリペプチドに対して指向される抗体の投与には、ポリペプチドを結合して、そして／またはポリペプチドを中和し、そして／またはポリペプチドの過剰産生を低減し得る。同様に、抗体の投与は、例えば、膜に結合したポリペプチド（レセプター）へ結合することにより、ポリペプチドを活性化し得る。

【０３０４】

少なくとも、本発明のポリペプチドは、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。宿主細胞の形質転換を評価する方法として、ポリペプチドがまた用いられ、抗体を惹起し得、次いで、この抗体が使用され、組換え細胞からのタンパク質発現を測定する。さらに、本発明のポリペプチドが使用され、以下の生物学的活性を試験し得る。

【０３０５】

（診断アッセイ）

本発明の組成物は、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／または予後に有用である。このような障害は、神経性疾患（例えば、以下の「神経活性および神経性疾患」に記載される）、免疫系障害（例えば、以下の「免疫活性」に記載される）、筋障害（例えば、以下の「神経活性および神経性疾患」に記載される）、生殖障害（例えば、以下の「抗新脈管形成活性」に記載される）、肺障害（例えば、以下の「免疫活性」に記載される）、心臓血管障害（例えば、以下の「心臓血管障害」に記載される）、感染性疾患（例えば、以下の「感染性疾患」に記載される）、増殖性障害（例えば、以下の「過剰増殖性障害」、「抗新脈管形成活性」および「細胞レベルの疾患」に記載される）、および／または癌性疾患および状態（例えば、以下の「過剰増殖性障害」、「抗新脈管形成活性」および「細胞レベルの疾患」に記載される）を含むが、これらに限定されない。

【０３０６】

ＩＬ－６様タンパク質は、サイトカイン応答に関する生物学的活性に関与すると考えられている。したがって、本発明の組成物（ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび本発明の抗体およびフラグメントおよびこれらの改変体）は、異常なＩＬ－６様活性に関する疾患および／または障害の診断および／または予後に利用され得る。好ましい実施形態において、本発明の組成物（ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび本発明の抗体およびフラグメントおよびこれらの改変体）は、免疫系障害（例えば、炎症性障害、自己免疫障害、ＡＩＤＳ、Ｔ細胞増殖障害、および／または以下の「免疫活性」に記載される）、神経性障害（例えば、以下の「神経活性および神経性疾患」に記載される）、感染性疾患（例えば、以下の「感染性疾患」に記載される）、骨粗鬆症、および過剰増殖性障害（例えば、プラスマ細胞腫／骨髄腫、キャッスルマン病、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、および／または以下の「過剰増殖性障害」において記載される）に関連する疾患および／または障害の診断および／または予後に利用され得る。したがって、ポリペプチド、翻訳産物および

本発明の抗体は、免疫系障害、神経性障害、感染性疾患、炎症性障害、自己免疫障害、ＡＩＤＳ、Ｔ細胞増殖性障害、骨粗鬆症、過剰増殖性障害、プラスマ細胞腫／骨髄腫、キャッスルマン病、メサンギウム増殖性糸球体腎炎を含む活性に関する疾患および／または障害の診断、検出および／または処置に有用であるが、これら限定されない。

【０３０７】

より一般的には、ポリペプチド、翻訳産物およびこの遺伝子に対応する抗体は、以下の系に関する疾患および／または障害の診断、検出および／または処置に有用であり得る。

【０３０８】

別の実施形態において、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、抗体、このポリペプチドに対応するアゴニストまたはアンタゴニストは、本発明のポリペプチドが発現される組織（「本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド」に開示される組織を含む）に関する障害の診断、予後判定、予防、および／または処置に用いられ得る。

【０３０９】

多くの障害について、「標準」ＩＬ－６様遺伝子発現レベル（障害を有しない個体から採取された組織または体液におけるＩＬ－６様発現レベル）に比べ、ＩＬ－６様遺伝子発現の実質的に変化した（増加または減少）レベルは、このような障害を有する個体から採取された組織、細胞または体液（例えば、血清、血漿、尿、精液、滑液または髄液）において検出され得る。したがって、本発明は、障害の診断に有用な診断方法を提供し（個体由来の組織、細胞または体液におけるＩＬ－６様ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを測定することおよび標準ＩＬ－６様遺伝子発現レベルと測定した遺伝子発現レベル比較することを含む）、これによって標準に比べて増加または減少した遺伝子の発現レベルがＩＬ－６様障害の指標となる。これらの診断アッセイは、例えば、血液サンプル、生検または剖検のような、インビボまたはインビトロにおいて実施され得る。

【０３１０】

本発明は、予後の指示薬として有用であり、これによって、減少したＩＬ－６様遺伝子発現を示す患者は、標準に近いレベルで遺伝子を発現する患者と比較して、より悪い臨床結果を経験する。

【０３１１】

「ＩＬ－６様ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルをアッセイする」ことによって、第１の生物学的サンプルにおけるＩＬ－６様ポリペプチドのレベルあるいはＩＬ－６様ポリペプチドをコードするｍＲＮＡのレベルを、直接的（例えば、完全なタンパク質レベルまたはｍＲＮＡレベルを決定または推定することによる）または相対的（例えば、第２の生物学的サンプルにおけるＩＬ－６様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）のいずれかで、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の生物学的サンプルにおけるＩＬ－６様ポリペプチドレベルレベルまたはｍＲＮＡレベルは、測定されるかまたは推定され、そして標準のＩＬ－６様ポリペプチドレベルまたはｍＲＮＡレベルと比較される。標準は、癌を有さない個体から得られた第２の生物学的サンプルから得られ、または障害を有しない個体の集団由来の平均レベルによって決定された。当該分野で認識されるように、一旦標準のＩＬ－６様ポリペプチドレベルまたはｍＲＮＡレベルが知られると、これは、比較のための標準として繰り返し使用され得る。

【０３１２】

「生物学的サンプル」によって、ＩＬ－６様ポリペプチド（それらの部位をｐ含む）またはｍＲＮＡを含有する個体、細胞株、組織培養物または他の供給源から得られた任意の生物学的サンプルが意図される。示されるように、生物学的サンプルは、全長ＩＬ－６様ポリペプチドまたはそれらのフラグメントを含む体液（例えば、血清、血漿、尿、滑液、および髄液）、ならびに全長ＩＬ－６様ポリペプチドまたはそれらのフラグメントを発現することが見出された他の組織供給源を包含する。哺乳動物から組織生検および体液を得るための方法は、当該分野で周知である。

【０３１３】

細胞総ＲＮＡは、ＣｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉおよびＳａｃｃｈｉ、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６２：１５６－１５９（１９８７）に記載される一工程グアニジン－チオシアネート－フェノール－クロロホルム法を使用して生物学的サンプルから単離され得る。次いで、ＩＬ－６様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使用してアッセイされる。これらには、ノーザンブロット分析（Ｈａｒａｄａら、Ｃｓｌｌ　６３：３０３－３１２（１９９０））、Ｓ１ヌクレアーゼマッピング（Ｆｕｊｉｔａら、Ｃｅｌｌ　４９：３５７－３６７（１９８７））、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）（Ｍａｋｉｎｏら、Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ　２：２９５－３０１（１９９０））、およびリガーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写（ＲＴ－ＬＣＲ）が挙げられる。

【０３１４】

本発明はまた、生物学的サンプル（例えば、細胞および組織）において、例えば、定量的な診断アッセイおよびＩＬ－６様ポリペプチドにレベル検出についての診断アッセイに関連し、正常および異常ポリペプチドレベルの検出を含む。したがって、例えば、正常コントロール組織サンプルに比して過剰に発現したＩＬ－６様ポリペプチドの検出について、本発明に従う診断アッセイが用いて、腫瘍の存在を検出し得る。宿主由来のサンプルにおける本発明のＩＬ－６様ポリペプチドのようなポリペプチドのレベルを検出するために用いられ得るアッセイ技術は、当業者において周知である。このようなアッセイ方法は、放射免疫測定、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびＥＬＩＳＡアッセイを含む。生物学的サンプルにおけるＩＬ－６様ポリペプチドのアッセイは、当該分野で公知の任意の方法を用いて、実施され得る。

【０３１５】

生物学的サンプル中のＩＬ－６様ポリペプチドレベルのアッセイは、抗体に基づく技術を用いて起こり得る。例えば、組織におけるＩＬ－６様ポリペプチドのポリペプチドの発現は、古典的な免疫組織学的方法で研究され得る（Ｊａｌｋａｎｅｎら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎ，Ｍ．ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７－３０９６（１９８７））。ＩＬ－６様ポリペプチドの遺伝子発現を検出するための有用な他の抗体に基づく方法としては、イムノアッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）およびラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ））が挙げられる。適切な抗体アッセイの標識は、当該分野において公知であり、そしてグルコースオキシダーゼのような酵素標識、ならびに放射性同位元素（例えば、ヨウ素（^{125}Ｉ、^{121}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、イオウ（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{112}Ｉｎ）、およびテクネチウム（^{99m}Ｔｃ）、ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）ならびにビオチン）が挙げられる。

【０３１６】

分析される組織または細胞型としては、一般的に、ＩＬ－６様遺伝子を発現することが既知かまたは疑われる組織または細胞型（例えば、癌）が挙げられる。本明細書中で使用されるタンパク質の単離方法は、例えば、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ（Ｈａｒｌｏｗ，Ｅ．およびＬａｎｅ，Ｄ．，１９８８，「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ」，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）（これは、本明細書中においてその全体で参考として援用される）に記載されるものであり得る。単離された細胞は、細胞培養物または患者由来であり得る。培養物から採取された細胞の分析は、細胞に基づく遺伝子治療技術の一部として使用され得る細胞の評価において、あるいはＩＬ－６様遺伝子の発現に対する化合物の効果を試験するために必要な工程であり得る。

【０３１７】

例えば、本明細書中に記載されるような抗体、または抗体のフラグメントが、ＩＬ－６様遺伝子産物または保存的改変体またはそのペプチドフラグメントの存在を定量的または定性的に検出するために使用され得る。例えば、これは、光学顕微鏡、フローサイトメトリ

ー、または蛍光計検出に接続される蛍光標識された抗体を使用する免疫蛍光技術によって達成され得る。

【０３１８】

好ましい実施形態において、ＩＬ－６様ポリペプチドの予測されるエピトープドメインの１つもしくは全てに対して検出可能な抗体、または抗体のフラグメントは、ＩＬ－６様遺伝子産物もしくは保存された改変体もしくはそれらのペプチドフラグメントの存在を、定量的または定性的に検出するために、使用され得る。これは、例えば、蛍光標識された抗体を使用した免疫蛍光技術によって、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光計検出を用いて達成され得る。

【０３１９】

さらなる好ましい実施形態において、ＩＬ－６様ポリペプチドの構造エピトープに対する抗体または抗体のフラグメントは、ＩＬ－６様遺伝子産物もしくは保存された改変体もしくはそれらのペプチドフラグメントの存在を、定量的または定性的に検出するために、使用され得る。これは、例えば、蛍光標識された抗体を使用した免疫蛍光技術によって、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、または蛍光計検出を用いて達成され得る。

【０３２０】

本発明の抗体（またはそのフラグメント）および／またはＩＬ－６様のポリペプチドは、さらに、ＩＬ－６様遺伝子産物もしくは保存的改変体またはそのペプチドフラグメントのインサイチュで検出のために、免疫蛍光、免疫電子顕微鏡または非免疫学的アッセイとして組織学的に使用され得る。インサイチュ検出は、患者から組織学的試料を取り出し、そしてそこに本発明の標識された抗体またはＩＬ－６様ポリペプチドを適用することによって達成され得る。抗体（またはフラグメント）またはＩＬ－６様ポリペプチドは、好ましくは、標識された抗体（またはフラグメント）を生物学的サンプルに重ねることによって適用される。このような手順の使用によって、ＩＬ－６様遺伝子産物、または保存的改変体またはペプチドフラグメントの存在、またはＩＬ－６様ポリペプチドの結合のみだけではなく、試験された組織におけるその分布をも決定し得る。本発明を使用して、当業者は、任意の広範な種々の組織学的方法（例えば、染色手順）がこのようなインサイチュ検出を達成するために改変され得ることを容易に認知する。

【０３２１】

ＩＬ－６様遺伝子産物または保存的改変体またはそのペプチドフラグメントのイムノアッセイおよび非イムノアッセイは、代表的に、ニュートロカインα遺伝子産物または保存的改変体またはそのペプチドフラグメントに結合し得る検出可能に標識された抗体の存在下で、サンプル（例えば、生物学的流体、組織抽出物、新鮮に収集された細胞、または細胞培養物中でインキュベートされた細胞の溶解物）をインキュベートする工程、および結合された抗体を当該分野で周知の任意の多くの技術によって検出する工程を包含する。

【０３２２】

生物学的サンプルは、固相支持体またはキャリア（例えばニトロセルロース）、あるいは細胞、細胞粒子または可溶性タンパク質を固定化し得る他の固体支持体に接触され、そして固定化され得る。次いで、この支持体は、適切な緩衝液で洗浄され得、続いて検出可能に標識された抗ＩＬ－６様抗体または検出可能なＩＬ－６様ポリペプチドで処理される。次いで、固相支持体は、結合していない抗体またはポリペプチドを除くために、緩衝液で２回洗浄され得る。必要に応じて、抗体は、続いて標識される。次いで、固体支持体上に結合された標識の量が従来の手段によって検出され得る。

【０３２３】

「固相支持体またはキャリア」によって、抗原または抗体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キャリアには、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩、および磁鉄鉱が挙げられる。キャリアの性質は、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、結合された分子が抗原または抗体に結合し得る限り、実質的に任意の可能な構造的形状を

有し得る。従って、支持体の形状は、球形（ビーズのような）、または円筒形（試験管の内側表面または棒の外側表面のような）であり得る。あるいは、表面は、シート、試験ストリップなどのように平坦であり得る。好ましい支持体には、ポリスチレンビーズが挙げられる。当業者は、抗体または抗原を結合するための多くの他の適切なキャリアを知っているか、または慣用的な実験の使用によってこれを確認し得る。

【０３２４】

所与の多くの抗ＩＬ－６様ポリペプチド抗体またＩＬ－６様抗原ポリペプチドの結合活性は、周知の方法に従って決定され得る。当業者は、慣用的な実験を使用することによって、各決定のために、操作条件および最適のアッセイ条件を決定し得る。

【０３２５】

個体から得られる生物学的サンプルにおけるＩＬ－６様ポリペプチドレベルまたはポリヌクレオチドレベルをアッセイすることに加えて、ＩＬ－６様ポリペプチドまたはポリヌクレオチドはまた、イメージングによってインビボで検出され得る。例えば、本発明の１つの実施形態において、ＩＬ－６様ポリペプチドならびに／あるいは抗ＩＬ－６様抗原抗体は、新生物のような疾患細胞をイメージングするために使用される。別の実施形態において、本発明のＩＬ－６様ヌクレオチド（例えば、特定のＩＬ－６様ｍＲＮＡ転写物の全てまたは一部に相補的なポリヌクレオチド）ならびに／あるいは抗ＩＬ－６様抗体（例えば、本発明のＩＬ－６様ポリペプチドのエピトープの任意の１つもしくは組み合わせを検出する抗体、本発明のＩＬ－６様ポリペプチドの構造エピトープを検出する抗体、または哺乳類動物細胞の細胞表面上に発現する全長ポリペプチドを検出する抗体）が、疾患細胞または新生物細胞をイメージングするために使用される。

【０３２６】

ＩＬ－６様ポリペプチドのインビボイメージングのための抗体標識またはマーカーには、Ｘ線ラジオグラフィー、ＮＭＲ、ＭＲＩ、ＣＡＴ走査またはＥＳＲによって検出可能なものが挙げられる。Ｘ線ラジオグラフィーについては、適切な標識は、検出可能な放射線を放射するが、被験体に対して明白には有害ではないバリウムまたはセシウムのような放射性同位体を含む。ＮＭＲおよびＥＳＲに適切なマーカーには、重水素のような検出可能な特徴的なスピンを有するものが含まれ、これは、関連したハイブリドーマのための栄養素を標識することにより抗体に取り込まれ得る。インビボイメージングが、ヒトにおける診断のためにＩＬ－６様ポリペプチドの増加したレベルを検出するために使用される場合、ヒト抗体または「ヒト化」キメラモノクローナル抗体を使用することが好適であり得る。このような抗体は、本明細書中に記載される技術またはそうでなければ当該分野で公知の技術を使用して産生され得る。例えば、キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野で公知である。（総説については、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４（１９８６）；Ｃａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら、ＥＰ　１７１４９６；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、ＥＰ　１７３４９４；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、ＷＯ　８６０１５３３；Ｒｏｂｉｎｓｏｎら、ＷＯ　８７０２６７１；Ｂｏｕｌｉａｎｎｅら、Ｎａｔｕｒｅ　３１２：６４３（１９８４）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　３１４：２６８（１９８５）を参照のこと）。

【０３２７】

さらに、存在が検出され得る任意の本発明のＩＬ－６様ポリペプチドが、投与され得る。例えば、放射線不透過性または他の適切な化合物で標識されたＩＬ－６様ポリペプチドは、標識化抗体について上で議論したように、インビボで投与され、そして可視化され得る。さらに、このようなＩＬ－６様ポリペプチドは、インビボ診断手順のために利用され得る。

【０３２８】

放射性同位体（例えば、^{131}Ｉ、^{112}Ｉｎ、^{99m}Ｔｃ）、放射線不透過物質、または核磁気共鳴によって検出可能な物質のような、適切な検出可能なイメージング部分で標識された、ＩＬ－６様ポリペプチドに特異的な抗体または抗体フラグメントが、障害につ

いて試験するために、哺乳動物に（例えば、非経口的に、皮下的に、または腹腔内に）導入される。被験体の大きさおよび使用されるイメージングシステムが、診断的イメージングを生成するために必要とされるイメージング部分の量を決定することが、当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、約５～２０ミリキュリーの^{99m}Ｔｃの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、ＩＬ－６様タンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍イメージングは、Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌら、「Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ」（Ｔｕｍｏｒ Ｉｍａｇｉｎｇ：Ｔｈｅ Ｒａｄｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒの第１３章、Ｔｈｅ Ｒａｄｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ、Ｓ．Ｗ．ＢｕｒｃｈｉｅｌおよびＢ．Ａ．Ｒｈｏｄｅｓ編、Ｍａｓｓｏｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｉｎｃ．（１９８２）に記載される。

【０３２９】

抗体に関して、抗ＩＬ－６様ポリペプチド抗体が検出可能に標識され得る方法の１つは、これをレポーター酵素に連結し、そしてエンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡ）における連結産物を使用することによる（Ｖｏｌｌｅｒ，Ａ．，「Ｔｈｅ Ｅｎｚｙｍｅ Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ （ＥＬＩＳＡ）」，１９７８，Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｈｏｒｉｚｏｎｓ ２：１－７，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ Ｑｕａｒｔｅｒｌｙ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ；Ｖｏｌｌｅｒら， Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐａｔｈｏｌ．３１：５０７－５２０（１９７８）；Ｂｕｔｌｅｒ，Ｊ．Ｅ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．７３：４８２－５２３（１９８１）；Ｍａｇｇｉｏ，Ｅ．（編），１９８０，Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ，；Ｉｓｈｉｋａｗａ，Ｅ．ら，（編），１９８１，Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，Ｋｇａｋｕ Ｓｈｏｉｎ，Ｔｏｋｙｏ）。抗体に結合するレポーター酵素は、適切な基質、好ましくは、発色性基質と、例えば、分光測光的手段、蛍光測定的手段、または視覚的手段によって検出可能な化学的部分を生成するような様式で反応する。抗体を検出可能に標識するために使用され得るレポーター酵素には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、δ－５－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、α－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、β－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、この検出は、レポーター酵素に対する発色性基質を使用する比色法によって達成され得る。検出はまた、同様に調製された標準との比較における基質の酵素反応の程度についての視覚的比較によって達成され得る。

【０３３０】

検出はまた、任意の種々の他のイムノアッセイを使用して達成され得る。例えば、抗体または抗体フラグメントを放射性標識することによって、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）のを通じてＩＬ－６様ポリペプチドを検出し得る（例えば、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｂ．，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｔｒａｉｎｉｎｇ Ｃｏｕｒｓｅ ｏｎ Ｒａｄｉｏｌｉｇａｎｄ Ａｓｓａｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｔｈｅ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ，１９８６年3月を参照のこと；これは、本明細書中で参考として援用される）。放射性同位体は、γ線計数器、シンチレーション計数管、またはオートラジオグラフィーを含むが、これらに限定されない手段によって検出され得る。

【０３３１】

蛍光化合物で抗体を標識することがまた可能である。次いで蛍光標識された抗体を適切な波長の光に曝露する場合、その存在が、蛍光に起因して検出され得る。蛍光標識化合物に

最も一般的に使用される化合物は、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（ａｌｌｏｐｈｙｃｏｃｙａｎｉｎ）、オプトアルデヒド（ｏｐｈｔａｌｄｅｈｙｄｅ）およびフルオレサミンである。

【０３３２】

抗体はまた、^{152}Ｅｕまたはランタン系列の他のもののような蛍光放射金属を使用し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ペンタ酢酸（ＤＴＰＡ）またはエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）のような金属キレート化基を使用して抗体に接着され得る。

【０３３３】

抗体はまた、化学発光化合物に結合することによって検出可能に標識され得る。次いで、化学発光タグ化抗体の存在は、化学反応の過程の間に生じる発光の存在を検出することによって決定される。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（ｉｓｏｌｕｍｉｎｏｌ）、セロマティックアクリジニウムエステル（ｔｈｅｒｏｍａｔｉｃ　ａｃｒｉｄｉｎｉｕｍ　ｅｓｔｅｒ）、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がある。

【０３３４】

同様に、生物発光化合物が、本発明の抗体を標識するために使用され得る。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を増加する生物学的システムにおいて見出されるタイプの化学発光である。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って決定される。標識の目的のために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。

【０３３５】

（疾患を検出するための方法）

一般的に、疾患は、患者から得られる生物学サンプル（例えば、血液、血清、尿、および／または組織標本）中の本発明の１つ以上のＩＬ－６様タンパク質および／またはこのようなタンパク質をコードしているポリヌクレオチドの存在に基づいて検出される。言いかえれば、このようなタンパク質は、癌および／もしくは本明細書中の他の箇所で記載されるような疾患または障害の存在あるいは非存在を示すマーカーとして使用され得る。さらに、このようなタンパク質は、他の疾患および障害の検出のために有用であり得る。本明細書中で提供される結合試薬は一般的に、試薬に結合する生物学的サンプル中の抗原のレベルの検出を可能にする。ポリヌクレオチドプライマーおよびプローブは、ＩＬ－６様ポリペプチドをコードしているｍＲＮＡのレベルを検出するために使用され得、これはまた、癌を含む疾患または障害の存在ならびに非存在を暗示する。一般的に、ＩＬ－６様ポリペプチドは、正常組織中よりも少なくとも３倍高いレベルで疾患組織に存在する。

【０３３６】

サンプル中のポリペプチドマーカーを検出するための結合し約を使用する、当業者に公知の様々なアッセイ形態がある。例えば、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ（前出）を参照のこと。一般的に、患者の中の疾患の存在または非存在は、（ａ）結合試薬と患者から採取された生物学的サンプル接触する工程；（ｂ）結合試薬と結合するポリペプチドのレベルをサンプル中で検出する工程；および（ｃ）予め測定されたｃｕｔ－ｏｆｆ値でポリペプチドのレベルを比較する工程、によって決定される。

【０３３７】

好ましい実施形態において、アッセイは、固体支持体上で固定化され、サンプル中の残留物由来の本発明のＩＬ－６様ポリペプチドに結合させられ、そして除去された結合試薬（単数または複数）の使用を含む。従って、結合されたポリペプチドは、レポーター基を含み、そして結合試薬／ペプチド複合体に特異的に結合する検出試薬を用いて検出され得る。このような検出試薬は，例えばポリペプチドに特異的に結合する試薬または抗体または結合試薬に特異的に結合する他の試薬（例えば、抗イムノグロブリン、プロテインＧ、プロテインＡまたはレクチン）を含む。あるいは競争アッセイもまた利用され得、その中ではポリペプチドはレポーター基で標識され、そして結合試薬とサンプルをインキュベート

した後、
固定化された結合試薬へ結合することが可能になる。サンプルの成分が、標識されたポリペプチドの結合試薬への結合を阻害することに対する程度は、固定化された結合試薬とサンプルとの反応性を示す。このようなアッセイでの使用に適したポリペプチドは、上記に記載した結合試薬が結合するＩＬ－６様ポリペプチドおよびその一部、または抗体を含む。

【０３３８】
固体支持体は、本発明のＩＬ－６様ポリペプチドが接触し得る、当該分野で公知の任意の物質であり得る。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレート（ｍｉｃｒｏｔｉｔｅｒ　ｐｌａｔｅ）中の試験ウェルまたはニトロセルロースまたは他の適したメンブレンであり得る。あるいは、支持体はビーズ、ディスク、（例えば、ガラスグラスファイバー）、ラテックスまたはプラスチック物質（例えば、ポリスチレンまたは塩化ポリビニル）であり得る。支持体はまた、磁性粒子または光ファイバーセンサー（例えば、米国特許第５，３５９，６８１中で開示される）であり得る。結合試薬は、当業者に公知の種々の技術（それらは、十分に特許および科学文献中で記載される）を使用して、固体支持体に固定化され得る。本発明の文脈中において、用語「固定化」は非共有結合的な結合（例えば、吸着のような）、および共有結合的な結合（それは、試薬と支持体上の官能基の間の直接的な結合であり得、または架橋試薬による結合）。マイクロタイタープレート中のウェルまたはメンブレンへの吸着による固定化が好ましい。このような場合、適したバッファー中で、適した十分な時間、結合試薬を固体支持体と接触させることによって達成される。接触時間は、温度で変化するが、代表的には約１時間および約１日である。一般的に、プラスチックマイクロタイタープレート（例えば、ポリスチレンまたは塩化ポリビニル）のウェルを約１０ｎｇ～約１０μｇ、（好ましくは約１００ｎｇ～約１μｇ）の範囲の量の結合試薬と結合させることは、適切な量の結合試薬を固定化するのに十分である。

【０３３９】
一般的に、結合試薬の固体支持体への共有結合的な接触は、支持体および結合試薬上の官能基の両方と反応する２官能基試薬（例えば、ヒドロキシル基またはアミノ基）と支持体とを最初に反応させることによって達成される。例えば、結合試薬は、共有結合的に、ベンゾキノンを使用した、または結合パートナー上にアミンおよび活性水素を有する支持体上のアルデヒドキ基の濃縮による、適切なポリマーコーティングを有する支持体に接触され得る。（例えば、Ｐｒｉｃｅ　Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｃａｔａｌｏｇ　ａｎｄ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ，１９９１，Ａ１２－Ａ１３を参照のこと）。

【０３４０】
（遺伝子治療方法）
本発明の別の局面は、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方法である。この遺伝子治療方法は、本発明のポリペプチドの発現を達成するための、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。この方法は、標的組織によるこのポリペプチドの発現のために必要なプロモータ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ポリペプチド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術は当該分野において公知である（例えば、本明細書中に参考として援用される、ＷＯ９０／１１０９２を参照のこと）。

【０３４１】
従って、例えば、患者由来の細胞は、エキソビボで本発明の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）を用いて操作され得、次いで、操作された細胞は、本発明のポリペプチド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、当該分野において周知である。例えば、Ｂｅｌｌｄｅｇｒｕｎ，Ａ．ら、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．８５：２０７－２１６（１９９３）；Ｆｅｒｒａｎｔｉｎｉ，Ｍ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５３：１１０７－１１１２（１９９３）；Ｆｅｒｒａｎｔｉｎｉ，Ｍ．ら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ

１５３：４６０４－４６１５（１９９４）；Ｋａｉｄｏ，Ｔ．ら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ６０：２２１－２２９（１９９５）；Ｏｇｕｒａ，Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５０：５１０２－５１０６（１９９０）；Ｓａｎｔｏｄｏｎａｔｏ，Ｌ．ら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７：１－１０（１９９６）；Ｓａｎｔｏｄｏｎａｔｏ，Ｌ．ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：１２４６－１２５５（１９９７）；およびＺｈａｎｇ，Ｊ．－Ｆ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：３１－３８（１９９６）を参照のこと。これらは、本明細書中に参考として援用される。１つの実施形態においては、操作される細胞は、動脈細胞である。この動脈細胞は、動脈、動脈の周囲の組織への直接的な注射を介して、またはカテーテル注入を介して患者に再導入され得る。

【０３４２】

以下により詳細に考察されるように、この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、肝臓など）の間質空間への注射）により送達され得る。このポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性のキャリア中で送達され得る。

【０３４３】

１つの実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、裸のポリヌクレオチドとして送達される。用語「裸の」ポリヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡとは、細胞への侵入を補助し、促進し、または容易にするために作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチンまたは沈殿剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、本発明の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処方物中およびリポフェクチン処方物中などで送達され得る。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（これらは、本明細書中に参考として援用される）に記載される。

【０３４４】

遺伝子治療方法において使用されるポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノム中に組み込まれないかまたは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。他の適切なベクターは、当業者に容易に明らかである。

【０３４５】

当業者に公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。適切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）；ＲＳ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；ＡｐｏＡＩプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター）；レトロウイルスＬＴＲ；ｂ－アクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。このプロモーターはまた、本発明のポリヌクレオチドについてネイティブなプロモーターであり得る。

【０３４６】

他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する１つの主要な利点は、その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。研究によって、非複製ＤＮＡ配列が細胞に導入されて、６ヶ月までの期間の間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【０３４７】

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、および結合組織を包含する）の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、器官組織の細網線維間の、細胞間の液体ムコ多糖類基質、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは結合組織鞘性筋肉細胞（ｃｏｎｎｅｃｔｉｖｅ　ｔｉｓｓｕｅ　ｅｎｓｈｅａｔｈｉｎｇ　ｍｕｓｃｌｅ　ｃｅｌｌ）内または骨の裂孔中の同じ基質を包含する。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。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下で議論される理由のために好ましい。本発明のポリヌクレオチド構築物は、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。本発明のポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞）において達成され得る。インビボでの筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現する能力において、特に適格である。

【０３４８】

裸の核酸配列注射のために、ＤＮＡまたはＲＮＡの有効投薬量は、約０．０５ｍｇ／ｋｇ体重から約５０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約０．００５ｍｇ／ｋｇから約２０ｍｇ／ｋｇであり、そしてより好ましくは約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、この投薬量は、注射の組織部位に応じて変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。

【０３４９】

好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注射経路による。しかし、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処方物の吸入が挙げられる。さらに、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って動脈に送達され得る。

【０３５０】

裸のポリヌクレオチドは、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」を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の任意の方法によって送達される。これらの送達方法は、当該分野で公知である。

【０３５１】

この構築物はまた、ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、沈殿剤などのような送達ビヒクルを用いて送達され得る。このような送達方法は、当該分野で公知である。

【０３５２】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、リポソーム調製物中で複合体化している。本発明にて使用するためのリポソーム調製物は、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包含する。しかしながら、カチオン性リポ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、カチオン性リポソームが特に好ましい。カチオン性リポソームは、機能的形態において、プラスミドＤＮＡ（本明細書中で参考として援用される、Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８７）８４：７４１３～７４１６）；ｍＲＮＡ（本明細書中で参考として援用される、Ｍａｌｏｎｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８９）８６：６０７７～６０８１）；および精製された転写因子（本明細書中で参考として援用される、Ｄｅｂｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（１９９０）２６５：１０１８９～１０１９２）の細胞内送達を媒介することが示されている。

【０３５３】

カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、Ｎ［１－２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリエチルアンモニウム（ＤＯＴＭＡ）リポソームは特

に有用であり、そして商標Ｌｉｐｏｆｅｃｔｉｎのもとに ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，Ｎ．Ｙ．（本明細書中で参考として援用される、Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８７）８４：７４１３～７４１６をもまた参照のこと、）より入手可能である。他の市販のリポソームとしては、トランスフェクテース（ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｃｅ）（ＤＤＡＢ／ＤＯＰＥ）およびＤＯＴＡＰ／ＤＯＰＥ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ）が挙げられる。

【０３５４】

当該分野で周知の技術を使用して、他のカチオン性リポソームを、容易に入手可能な物質より調製し得る。ＤＯＴＡＰ（１，２－ビス（オレオイルオキシ）－３－（トリメチルアンモニオ）プロパン）リポソームの合成の記述に関して、例えばＰＣＴ公開番号ＷＯ９０／１１０９２（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。ＤＯＴＭＡリポソームの調製は文献にて説明されており、例えば、本明細書中で参考として援用される、Ｐ．Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８４：７４１３～７４１７を参照のこと。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ポソームを調製し得る。

【０３５５】

同様に、アニオン性リポソームおよび中性リポソームは、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簡単に調製され得る。そのような物質としてはとりわけ、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）が挙げられる。これらの物質はまた、ＤＯＴＭＡ出発物資およびＤＯＴＡＰ出発物質と適切な割合において混合され得る。これらの物質を使用してリポソームを生成する方法は、当該分野で周知である。

【０３５６】

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（ＤＯＰＥ）を種々の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しなくても、従来のリポソームを生成し得る。従って、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小胞を調製し得る。このサンプルを一晩真空ポンプ下に置き、そして次の日、脱イオン水で水和する。次いで、浴を、１５ＥＣで循環させながら、最大設定にて、逆位カップ（浴タイプ）プローブを装備したＨｅａｔ Ｓｙｓｔｅｍｓ モデル３５０超音波処理器を使用して、このサンプルを栓をしたバイアル中にて２時間超音波処理する。あるいは、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生成し得るか、または核孔膜（ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ ｍｅｍｂｒａｎｅ）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生成し得る。他の方法は、当業者に公知でありそして利用可能である。

【０３５７】

このリポソームとしては、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。当該分野で周知の方法を使用して、種々のリポソーム－核酸複合体が調製される。例えば、本明細書中で参考として援用される、Ｓｔｒａｕｂｉｎｇｅｒら、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９８３）、１０１：５１２～５２７を参照のこと。例えば、核酸を含有するＭＬＶは、ガラスチューブの壁面にリン脂質の薄膜を堆積させ、そしてその後、カプセル化されるべき物質の溶液で水和することによって調製され得る。ＳＵＶはＭＬＶの長期超音波処理により調製され、単膜リポソームの均質集団を生成する。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ポソームを使用する場合、乾燥した脂質膜を、滅菌水または１０ｍＭ Ｔｒｉｓ／ＮａＣｌのよ

うな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、予め形成されたリポソームをＤＮＡと直接混合する。正に荷電したリポソームのカチオン性ＤＮＡへの結合に起因して、リポソームおよびＤＮＡは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ての用途を見出す。ＬＵＶは、当該分野で周知の多く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、Ca^{2+}－ＥＤＴＡキレート化（Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓら、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ（１９７５）３９４：４８３；Ｗｉｌｓｏｎら、Ｃｅｌｌ（１９７９））１７：７７）；エーテル注入（Ｄｅａｍｅｒ，Ｄ．およびＢａｎｇｈａｍ，Ａ．、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ（１９７６）４４３：６２９；Ｏｓｔｒｏら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｍ．（１９７７）７６：８３６；Ｆｒａｌｅｙら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９７９）７６：３３４８）；界面活性剤透析（Ｅｎｏｃｈ，Ｈ．およびＳｔｒｉｔｔｍａｔｔｅｒ，Ｐ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９７９）７６：１４５）；および逆相エバポレーション（ＲＥＶ）（Ｆｒａｌｅｙら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（１９８０）２５５：１０４３１；Ｓｚｏｋａ、Ｆ．およびＰａｐａｈａｄｊｏｐｕｏｌｏｓ，Ｄ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９７８）７５：１４５；Ｓｃｈａｅｆｅｒ－Ｒｉｄｄｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８２）２１５：１６６）が挙げられ、これらの文献は本明細書中で参考として援用される。

【０３５８】

一般に、ＤＮＡのリポソームに対する割合は約１０：１から約１：１０までである。好ましくは、その割合（ｒａｔｉｏｎ）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。

【０３５９】

米国特許第５，６７６，９５４号（本明細書中で参考として援用される）はカチオン性リポソームキャリア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（これらは本明細書中で参考として援用される）は、ＤＮＡを細胞および哺乳動物にトランスフェクトする際に使用するためのカチオン性脂質を提供する。米国特許第５，５８９，４６６号、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（これらは本明細書中で参考として援用される）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。

【０３６０】

特定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配列を含むＲＮＡを含むレトロウイルス粒子を使用して、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。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ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３６１】

このレトロウイルスプラスミドベクターを使用して、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。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞株の例としては、その全体が本明細書中で参考として援用される、Ｍｉｌｌｅｒ、Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅａｐｙ、１：５～１４（１９９０）にて記載されるような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。このベクターは、当該分野で公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。そ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ＣａＰＯ$_4$沈殿が挙げられるが、それらに限定されない。１つの代替法において、この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。

【０３６２】

このプロデューサー細胞株は、本発明のポリペプチド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産生する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子を使用して、インビトロまたはインビボのどちらかで、真核生物細胞を形質導入し得る。この形質導入された真核生物細胞は、本発明のポリペプチドを発現する。

【０３６３】

特定の他の実施形態において、アデノウイルスベクター中に含まれるポリヌクレオチドを用いて、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。アデノウイルスは、それが本発明のポリペプチドをコードし、そして発現し、それと同時に通常の溶菌性ウイルス生活環にて複製するその能力に関して不活性化されるように操作され得る。アデノウイルス発現は、そのウイルスＤＮＡの宿主細胞染色体への組み込み無しに達成され、その結果、挿入性変異誘発についての心配が軽減される。さらに、アデノウイルスは、何年もの間、腸の生ワクチンとして優れた安全側面を伴って使用されている（Ｓｃｈｗａｒｔｚ，Ａ．Ｒ．ら（１９７４）、Ａｍ．Ｒｅｖ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｄｉｓ．、１０９：２３３－２３８）。最終的に、アデノウイルス媒介性遺伝子移入が、コトンラットの肺へのα－１－アンチトリプシンおよびＣＦＴＲの移入を含む多くの例において実証されている（Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ，Ｍ．Ａ．ら（１９９１）、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５２：４３１～４３４；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら（１９９２）、Ｃｅｌｌ、６８：１４３～１５５）。さらに、ヒト癌における原因物質としてアデノウイルスを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．ら（１９７９） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７６：６６０６）。

【０３６４】

本発明において有用である適切なアデノウイルスベクターが、例えば、ＫｏｚａｒｓｋｙおよびＷｉｌｓｏｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖｅｌ． ３：４９９～５０３（１９９３）；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、Ｃｅｌｌ ６８：１４３～１５５（１９９２）；Ｅｎｇｅｌｈａｒｄｔら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔ．Ｔｈｅｒ． ４：７５９～７６９（１９９３）；Ｙａｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ． ７：３６２～３６９（１９９４）；Ｗｉｌｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ ３６５：６９１～６９２（１９９３）；および米国特許第５，６５２，２２４号に記載されており、これらの文献および特許は本明細書中で参考として援用される。例えば、アデノウイルスベクターＡｄ２が有用であり、そしてヒト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領域を含み、そして構成的にＥｌａおよびＥｌｂ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って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。

【０３６５】

好ましくは、本発明において使用さ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助けを必要とする。得られたウイルスは、細胞に感染する能力があり、そしてプロモーターに作動可能に連結された目的のポリヌクレオチドを発現し得るが、ほとんどの細胞にて複製し得ない。複製欠損アデノウイルスは、次の遺伝子のすべてまたは一部のうちの１つ以上にて欠失され得る：Ｅ１ａ、Ｅ１ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｅ２ａまたはＬ１～Ｌ５。

【０３６６】

特定の他の実施形態において、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を使用して、エキソビボまたはインビボでこの細胞を操作する。ＡＡＶは、感染性粒子を生成するためにヘルパーウイルスを必要とする、天然に存在する欠損ウイルスである（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｎ．，Ｃ

ｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７（１９９２））。ＡＡＶ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。３００塩基対程度の小さいＡＡＶを含むベクターがパッケージされ得、そして組み込み得るが、外来性ＤＮＡのためのスペースは約４．５ｋｂに限られる。そのようなＡＡＶの生成および使用の方法は当該分野で公知である。例えば、米国特許第５，１３９，９４１号、同第５，１７３，４１４号、同第５，３５４，６７８号、同第５，４３６，１４６号、同第５，４７４，９３５号、同第５，４７８，７４５号および同第５，５８９，３７７号を参照のこと。

【０３６７】

例えば、本発明において使用するために適切なＡＡＶベクターは、ＤＮＡ複製、キャプシド形成、および宿主細胞組み込みに必要な配列すべてを含む。Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）において見い出される方法のような、標準的クローニング方法を使用して、ポリヌクレオチド構築物を、このＡＡＶベクターに挿入する。次いで、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む、任意の標準的技術を使用して、この組換えＡＡＶベクターを、ヘルパーウイルスに感染しているパッケージング細胞にトランスフェクトする。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、ワクシニアウイルス、またはヘルペスウイルスが挙げられる。一旦パッケージング細胞がトランスフェクト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む感染性ＡＡＶウイルス粒子を生成する。次いで、エキソビボまたはインビボのいずれかで、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。この形質導入細胞は、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み、そして本発明のポリペプチドを発現する。

【０３６８】

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；Ｋｏｌｌｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８９３２～８９３５（１９８９）；およびＺｉｊｌｓｔｒａら、Ｎａｔｕｒｅ 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工程を含む。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。

【０３６９】

当該分野で既知の標準的技術を使用して、ポリヌクレオチド構築物を作製する。この構築物は、プロモーターを、そのプロモーターに隣接した標的化配列とともに含む。適切なプロモーターが、本明細書中に記載されている。標的化配列は、プロモーター－標的化配列と内在性配列との相同組換えを可能にするに十分にその内在性配列に対して相補的である。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’末端の十分近くに存在し、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。

【０３７０】

このプロモーターおよび標的化配列は、ＰＣＲを使用して増幅され得る。好ましくは、この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む。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み、そして第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む。増幅されたプロモーターおよび標的化配列を消化し、そしてともに連結する。

【０３７１】

裸のポリヌクレオチドとしてか、もしくは上記により詳細に記載されるようなリポソーム

、ウイルス配列、ウイルス粒子、ウイルス全体、リポフェクション、沈殿剤などのようなトランスフェクション促進剤と一緒にかのいずれかで、このプロモーター－標的化配列構築物を細胞に送達する。直接針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、粒子加速器などを含む任意の方法により、Ｐプロモーター－標的化配列を送達し得る。この方法を、下記により詳細に記載する。

【０３７２】

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、内在性配列は、このプロモーターの制御下に配置される。次いで、このプロモーターは、内在性配列の発現を駆動する。

【０３７３】

好ましくは、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、そのタンパク質の分泌を促進する分泌シグナル配列を含む。代表的に、このシグナル配列は、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。このシグナル配列は、目的の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、そしてトランスフェクト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、当該分野で公知の方法を使用して、このシグナル配列は化学合成され得る。

【０３７４】

その投与形態によって、治療効果を提供するのに十分な量にて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）、他の市販デポー（ｄｅｐｏｔ）物質、浸透圧ポンプ（例えば、Ａｌｚａミニポンプ）、経口用または坐剤用の固形（錠剤または丸剤）薬学的処方物、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ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４３：３７５（１９８９））。

【０３７５】

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を形成した本発明の組換え分子は、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言う。

【０３７６】

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、患者は手術を経験し得、そしてこのポリヌクレオチド構築物がその創傷の内側の組織の表面上にコーティングされ得るか、またはこの構築物が、その創傷の内側の組織の領域に注入され得る。

【０３７７】

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を形成した本発明の組換え分子を含む。全身投与で使用するために適切な送達ビヒクルは、特定部位に対してそのビヒクルを標的化するリガンドを含むリポソームを含む。

【０３７８】

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。当該分野で標準的な方法を使用して、静脈内注射が実行され得る。当該分野で標準的な方法を使用して、エアロゾル送達もまた実行され得る（例えば、本明細書中で参考として援用される、Ｓｔｒｉｂｌｉｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１８９：１１２７７～１１２８１（１９９２）を参照のこと）。動物の腸内の消化酵素による分解に耐える能力をもつキャリアに対して本発明のポリヌクレオチ

ド構築物を複合体形成することにより、経口送達は実行され得る。そのようなキャリアの例としては、当該分野で公知であるもののような、プラスチックカプセルまたは錠剤が挙げられる。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って、局所的送達は実行され得る。

【０３７９】

送達される物質の有効量を決定することは、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、１用量あたりの投与されるポリヌクレオチド構築物の量ならびに被験体の健康および病歴のような、多くの因子に依存する。正確な量、投薬回数および投薬のタイミングは、主治医または主治獣医により決定される。

【０３８０】

本発明の治療的組成物は、任意の動物に、好ましくは哺乳動物および鳥類に投与され得る。好ましい哺乳動物としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマおよびブタが挙げられ、特にヒトが好ましい。

【０３８１】

（生物学的活性）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストをアッセイに使用し、１つ以上の生物学的活性について試験し得る。本発明のこれらのポリヌクレオチドもしくは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が特定のアッセイにおいて活性を示す場合、これらの分子はその生物学的活性に関連した疾患に関与し得るようである。従って、このポリヌクレオチドおよびポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、その関連した疾患を処置し得る。

【０３８２】

ＩＬ－６様ファミリーのタンパク質のメンバーは、サイトカイン応答と関連した生物学的活性に関与すると考えられる。従って、本発明の組成物（本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体を含む）は、異常なＩＬ－６様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使用され得る。好ましい実施形態において、本発明の組成物（本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体を含む）は、免疫系障害（例えば、炎症性障害、自己免疫疾患、ＡＩＤＳ、Ｔ細胞増殖障害、および／または以下の「免疫活性」で記載される障害）、神経障害（例えば、以下の「神経活性および神経学的疾患」で記載される障害）、感染疾患（例えば、以下の「感染疾患」で記載される疾患）、骨粗しょう症、および過剰増殖障害（例えば、プラスマ細胞腫／骨髄腫、キャッスルマン病、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、および／または以下の「過剰増殖性障害」で記載される障害）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用いられ得る。従って、本発明のポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体は、免疫系障害、神経障害、感染性障害、炎症性障害、自己免疫障害、ＡＩＤＳ、Ｔ細胞増殖障害、骨粗しょう症、過剰増殖障害、プラスマ細胞腫／骨髄腫、キャッスルマン病、およびメサンギウム増殖性糸球体腎炎を含むがこれ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／または処置に有用である。

【０３８３】

より一般的には、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体は、以下の系に関連する疾患および／または障害の診断、検出および／または処置に有用であり得る。

【０３８４】

（免疫活性）

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、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／または状態の処置、予防および／また

は診断において有用であり得る。免疫細胞は、造血と呼ばれるプロセスを介して発達し、多能性幹細胞から骨髄性細胞（血小板、赤血球、好中球およびマクロファージ）およびリンパ系細胞（Ｂリンパ球およびＴリンパ球）を生成する。これら免疫の疾患、障害および／または状態の病因は、遺伝的、体細胞的（ｓｏｍａｔｉｃ）（例えば、癌またはいくつかの自己免疫性の疾患）、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、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、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。

【０３８５】

別の実施形態において，本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、抗体、アゴニスト、またはそのポリペプチドに対応するアンタゴニストを用いて、免疫系の疾患および障害を処置して、そして／または組織（本発明のポリペプチドが発現される組織であって、「本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド」と表題されるセクションにおいて開示される組織を含む）に関連する細胞によって引き起こされる免疫応答を阻害または増強し得る。

【０３８６】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストあるいはアンタゴニストは、免疫不全（先天性および後天性免疫不全を含む）の処置、防止および／または診断に有用であり得る。免疫グロブリンレベルＢ細胞機能および／またはＢ細胞数が減少されるＢ細胞免疫不全の例としては以下が挙げられる：Ｘ連鎖無ガンマグロブリン血症（Ｂｒｕｔｏｎ’ｓ病）、Ｘ連鎖乳児無ガンマグロブリン血症、過剰ＩｇＭを伴うＸ連鎖免疫欠損、過剰ＩｇＭを伴う非Ｘ連鎖免疫欠損、Ｘ連鎖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を含む無ガンマグロブリン血症、成人発症無ガンマグロブリン血症、後期発症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、非特異的低ガンマグロブリン血症、退縮無ガンマグロブリン血症（Ｓｗｉｓｓ型）、選択的ＩｇＭ免疫欠損、選択的ＩｇＡ欠損、選択的ＩｇＧサブクラス欠損、ＩｇＧサブクラス欠損（ＩｇＡ欠損を伴うかまたは伴わない）、上昇したＩｇＭを伴うＩｇ欠損、上昇したＩｇＭを伴うＩｇＧ欠損およびＩｇＡ欠損、正常なＩｇまたは上昇したＩｇを伴う抗体欠損、Ｉｇ重鎖欠失、κ鎖欠損、Ｂ細胞リンパ球増殖性障害（ＢＬＰＤ）、分類不能性免疫不全症（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。

【０３８７】

特定の実施形態において、毛細血管拡張性運動失調または毛細血管拡張性運動失調と関連する状態は、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドおよび／またはそのアゴニストを投与することで緩和されるか処置される。

【０３８８】

Ｔ細胞および／もしくはＢ細胞機能、ならびに／または数が減少される免疫不全の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ディジョージ奇形、重症複合型免疫不全（ＳＣＩＤ）（Ｘ連鎖ＳＣＩＤ、常染色体ＳＣＩＤ、およびアデノシンデアミナーゼ不全症、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠損（ＰＮＰ）、ＭＨＣクラスＩＩ欠失（不全リンパ球症候群）、ヴィスコット－オールドリッチ症候群および毛細血管拡張性運動失調を含むが、これに限定されない）、胸腺発育不全、第３および第４咽頭嚢症候群、２２ｑ１１．２欠損、慢性粘膜皮膚カンジダ症、ナチュラルキラー細胞欠損（ＮＫ）、特発性ＣＤ４＋　Ｔリンパ球減少、顕著なＴ細胞欠損を伴う免疫欠損（不特定）、および細胞媒介免疫の不特定の免疫欠損が挙げられるがこれらに限定されない。

【０３８９】

特定の実施形態において、ディジョージ奇形またはディジョージ奇形に関連する状態は、例えば、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、またはそのアンタゴニストもしくはアゴニストを投与することによって、緩和されるか処置される。

【０３９０】

本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、および／またはそれらのアゴニストを投与することによって寛解または処置され得る他の免疫不全症としては、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、白血球グルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ欠損、Ｘ連鎖リンパ球増多症症候群（ＸＬＰ）、白血球接着不全、補体成分欠損（Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８および／またはＣ９欠損を含む）、網様発育不全、胸腺リンパ形成不全－発育不全、胸腺腫を伴う免疫欠損、重篤な先天性白血球減少症、免疫欠損を伴う形成異常、新生児好中球減少症、短肢（ｓｈｏｒｔ　ｌｉｍｂｅｄ）小人症およびＩｇを伴うネゼロフ症候群複合免疫欠損を含むがこれに限定されない。

【０３９１】

好ましい実施形態において、免疫欠損および／または上記に列挙される免疫欠損に関連する状態は、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはそのアンタゴニストを用いて処置、予防および／または診断される。

【０３９２】

好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを薬剤として用いて、免疫欠損個体間の免疫応答性をブーストし得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを薬剤として用いて、Ｂ細胞および／またはＴ細胞の免疫欠損個体間の免疫応答性をブーストし得る。

【０３９３】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストあるいはアンタゴニストは、自己免疫疾患の処置、防止および／または診断に有用であり得る。多数の自己免疫疾患は、免疫細胞による外来物質として、それ自体の不適用な認識から生じる。この不適用な認識から、宿主細胞の破壊を導く免疫応答が生じる。従って、免疫応答（特にＴ細胞の増殖、分化または走化）を阻害し得る本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの投与は、自己免疫疾患を処置する際の効果的治療法であり得る。

【０３９４】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストあるいはアンタゴニストによって処置、防止および／または診断され得る、自己免疫疾患および自己免疫障害には、以下の１つ以上が挙げられるがこれに限定されない：全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、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、自己免疫溶血性貧血、溶血性貧血、血小板減少、自己免疫血小板減少紫斑病、自己免疫性新生児血小板減少、特発性血小板減少性紫斑病、紫斑病（例えば、ヘノッホ－シェーンライン（Ｈｅｎｌｏｃｈ－Ｓｃｏｅｎｌｅｉｎ）紫斑病）、自己免疫性血球減少症、グッドパスチャー症候群、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、グレーヴズ病（甲状腺機能亢進）、およびインシュリン依存性糖尿病（ｍｅｌｌｉｔｉｓ）。

【０３９５】

本発明の組成物で処置、予防および／または診断され得る自己免疫成分を有し得るさらなる障害には、以下が挙げられるがこれに限定されない：ＩＩ型コラーゲン誘導関節炎、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、Ｓｔｉｆｆ－Ｍａｎ症候群、自己免疫肺炎症、自閉症、ギヤン－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。

【０３９６】

本発明の組成物で処置、予防および／または診断され得る自己免疫成分を有し得るさらなる障害には、以下が挙げられるがこれに限定されない：坑コラーゲン抗体を伴う強皮症（例えば、核小体および他の核小体抗体によって特徴付けられる）、混合結合組織病（例えば、可溶性核抗原（例えば、リボ核タンパク質）に対する抗体によってしばしば特徴付けられる）、多発性筋炎（例えば、非ヒストンＡＮＡによってしばしば特徴付けられる）、悪性貧血（例えば、抗壁細胞、ミクロソーム、および内因子抗体によってしばしば特徴付

けられる）、特発性アジソン病（例えば、体液および細胞媒介性副腎細胞傷害性によってしばしば特徴付けられる）、不妊症（例えば、抗精子抗体によってしばしば特徴付けられる）、糸球体腎炎（例えば、糸球体基底膜抗体または免疫複合体によってしばしば特徴付けられる）、水疱性類天疱瘡（例えば、基底膜中のＩｇＧおよび補体によってしばしば特徴付けられる）、シェーグレン症候群（例えば、多重組織抗体、および／または特定の非ヒストンＡＮＡ（ＳＳ－Ｂ）によってしばしば特徴付けられる）、糖尿病（例えば、細胞媒介性および体液性島細胞抗体によってしばしば特徴付けられる）、ならびにアドレナリン作動性薬剤抵抗性（喘息または嚢胞性線維症を伴うアドレナリン作動性薬剤抵抗性を含む）（例えば、βアドレナリンレセプター抗体によってしばしば特徴付けられる）。

【０３９７】

本発明の組成物で処置、予防および／または診断され得る自己免疫成分を有し得るさらなる障害には、以下が挙げられるがこれに限定されない：慢性活性肝炎（例えば、平滑筋抗体によってしばしば特徴付けられる）、原発性胆汁性肝硬変（例えば、ミトコンドリア抗体によってしばしば特徴付けられる）、他の内分泌腺不全（例えば、いくつかの場合は、特定の組織抗体によってしばしば特徴付けられる）、白斑（例えば、メラノサイト抗体によってしばしば特徴付けられる）、脈管炎（例えば、脈管壁におけるＩｇおよび補体ならびに／または低血清補体によってしばしば特徴付けられる）、ＭＩ後（例えば、心筋抗体によってしばしば特徴付けられる）、心臓切開症候群（例えば、心筋抗体によってしばしば特徴付けられる）、じんま疹（例えば、ＩｇＥに対するＩｇＧ抗体およびＩｇＭ抗体によってしばしば特徴付けられる）、アトピー性皮膚炎（例えば、ＩｇＥに対するＩｇＧ抗体およびＩｇＭ抗体によってしばしば特徴付けられる）、喘息（例えば、ＩｇＥに対するＩｇＧ抗体およびＩｇＭ抗体によってしばしば特徴付けられる）、ならびに多くの他の炎症性障害、肉芽種性障害、変性障害、および萎縮性障害。

【０３９８】

好ましい実施形態においては、自己免疫性疾患および障害ならびに／または上記に列挙された疾患および障害に関連する状態は、例えば、本発明のアンタゴニスト、またはアゴニスト、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、または抗体を用いて、処置、予防、および／または診断される。

【０３９９】

特定の好ましい実施形態においては、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、慢性関節リウマチは処置、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、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、特発性血小板減少性紫斑病は処置、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、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、ＩｇＡ腎症は処置、予防および／または診断される。

【０４００】

好ましい実施形態において、自己免疫疾患および自己免疫障害ならびに／または上に列挙される疾患および障害に関連する状態が、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはそれらのアンタゴニストによって処置、予防および／または診断され得る。

【０４０１】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはアンタゴニストは、免疫抑制性薬剤として使用され得る。

【０４０２】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、造血系の疾患、障害および／または状態の処置、予防および／または診断において有用であり得る。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、造血細胞（それらの疾患、障害および

／または特定の（または多数の）型の造血細胞を処置または予防するための多能性幹細胞を含み、これは白血球減少、好中球減少、貧血、血小板減少を含むが、これに限定されない）の分化または増殖を増加させ得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、造血系（それらの疾患、障害および／または特定の（または多数の）型の造血細胞を処置または予防するための多能性幹細胞を含み、これは組織球増殖を含むが、これに限定されない）の分化および増殖を増加するため使用され得る。

【０４０３】

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）はまた、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、処置、予防および／または診断され得る。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、予防および／または診断するために用いられ得る。

【０４０４】

さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、および／またはそのアゴニストは、ＩｇＥ媒介アレルギー応答を処置または予防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、ぜん息、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、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、インビボまたはインビトロにおいてＩｇＥ濃度を調節しうる。

【０４０５】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、炎症状態の診断、予後、予防、および／または処置に用途を有する。例えば、このポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、炎症応答に関与する細胞の活性、増殖および分化を阻害し得るので、これらの分子を使用して、慢性および急性の両方の状態の炎症状態を処置、予防および／または診断し得る。このような炎症状態には、例えば以下が挙げられるがそれらに限定されない：感染に関連する炎症（例えば、敗血症性ショック、敗血症、または全身炎症応答症候群）、虚血再灌流傷害に関連する炎症、内毒素致死に関連する炎症、補体媒介性超急性拒絶に関連する炎症、サイトカインまたはケモカインが誘導する肺傷害に関連する炎症、炎症性腸疾患に関連する炎症、クローン病に関連する炎症、サイトカイン（例えば、ＴＮＦまたはＩＬ－１）の過剰生成から生じる炎症、呼吸障害に関連する炎症（例えば、ぜん息およびアレルギー）；胃腸障害（例えば、炎症性腸障害）；癌（例えば、胃癌、卵巣癌、肺癌、膀胱癌、肝臓癌、および乳癌など）；ＣＮＳ障害（例えば、多発性硬化症、血液脳関門透過性、虚血性脳損傷、および／または脳梗塞、外傷性脳損傷、神経変性性障害（例えば、パーキンソン病およびアルツハイマー病など）、ＡＩＤＳ関連痴呆、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ど）；ならびに炎症によって特徴付けられる多くのさらなる疾患、状態、および障害（例えば、慢性肝炎（ＢおよびＣ）、慢性関節リウマチ、痛風、外傷、敗血性ショック、膵炎、サルコイドーシス、皮膚炎、腎虚血再還流障害、グレーヴス病、全身性エリテマトーデス、真性糖尿病（例えば、Ｉ型糖尿病）、および同種異系移植拒絶など）。

【０４０６】

炎症は、基本的な防御機構なので、炎症は実質的に任意の身体の組織で影響し得る。従って、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体、ならびにそれらのアゴニストまたはアンタゴニストは、以下を含むがそれらに限定されない組織特異的な炎症疾患に用途を有する：副腎炎、肺胞炎、胆管胆嚢炎、虫垂炎、亀頭炎、眼瞼炎、気管支炎、滑液包炎、心臓炎、蜂巣炎、子宮頸管炎、胆嚢炎、声帯炎、ｃｏｃｈｉｌｉｔｉｓ、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、毛包炎、胃炎、胃腸炎、歯肉炎、舌炎、肝脾炎、角膜炎、迷路炎、喉頭炎、リンパ管炎、乳腺

炎、媒介耳炎（ｍｅｄｉａ　ｏｔｉｔｉｓ）、髄膜炎、子宮筋層炎、粘膜炎、心筋炎、筋炎（ｍｙｏｓｉｔｉｔｉｓ）、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、ポリオ、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、静脈洞炎、脊椎炎（ｓｐｏｎｙｌｉｔｉｓ）、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。

【０４０７】

特定の実施形態において、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／またそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストは、器官移植拒絶または対宿主性移植片病（ＧＶＨＤ）を処置、診断および／または予防に有用である。器官拒絶は、免疫応答を介して宿主免疫細胞による移植組織の破壊によって起こる。同様に、免疫応答はＧＶＨＤにもまた関与しているが、この場合、外来性の移植免疫細胞が宿主組織を破壊する。免疫応答、特にＴ細胞の活性、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／またそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストは、器官拒絶またはＧＶＨＤの防止において効果的な治療であり得る。特定の実施形態において、免疫応答、特にＴ細胞の活性、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／またそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストは、実験的アレルギーおよび超急性異種移植拒絶において効果的な治療であり得る。

【０４０８】

他の実施形態において、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／またそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫複合体病（血清病、ｐｏｓｔｓｔｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ　糸球体腎炎および結節性多発性動脈炎、免疫複合体誘導脈管炎を含むがそれらに限定されない）処置、診断および／または予防に有用である。

【０４０９】

本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、感染因子を処置、検出、および／または予防し得る。例えば、免疫応答を上昇させることによって、特にＢ細胞および／またはＴ細胞の増殖活性および／または分化を増加させることによって、感染性疾患が処置、検出および／または予防され得る。免疫応答は、既存の免疫応答を上昇させるか、または新たな免疫応答を開始させるかのいずれかにより上昇され得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、必ずしも免疫応答を誘発することなく、感染因子（感染因子を列挙する応用の節で引用される）を直接阻害し得る。

【０４１０】

別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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特異的な免疫応答を上昇するワクチンアジュバントとして使用される。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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、癌特異的免疫応答を増強するアジュバントとして使用される。

【０４１１】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗ウイルス免疫応答を増強するアジュバントとして使用される。アジュバントとして本発明の組成物を用いて増強され得る抗ウイルス免疫応答としては、ウイルスおよび本明細書において記載されるかさもなければ当該分野で公知のウイルス関連疾患および症状が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下：ＡＩＤＳ、髄膜炎、デング、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、疾患または症状に対する免疫応答を増強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、以下：ＨＩＶ／ＡＩＤＳ、ＲＳウイルス、デング、ロタウイルス、日本脳炎、インフルエンザＡおよびＢ、パラインフルエンザ、麻疹、サイトメガロウイルス、狂犬病、Ｊｕｎ

ｉｎウイルス、チクングニヤウイルス、リフトバレー熱、単純疱疹、および黄熱病からなる群より選択されるウイルス、疾患または症状に対する免疫応答を増強するアジュバントとして用いられる。

【０４１２】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗細菌免疫応答または抗真菌免疫応答を増大し得るアジュバントとして使用される。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗細菌免疫応答または抗真菌免疫応答としては、細菌または真菌、および本明細書中に記載されるか、またはさもなくば当該分野で公知の疾患または症状に関連する細菌または真菌が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状（これは、破傷風、ジフテリア、ボツリスム、およびＢ型髄膜炎からなる群から選択される）に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

【０４１３】

別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状（これは、Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｐａｒａｔｙｐｈｉ、Ｍｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、Ｇｒｏｕｐ Ｂ ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｐｐ.、Ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｇｅｎｉｃ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ、Ｅｎｔｅｒｏｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ Ｅ.ｃｏｌｉ、およびＢｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉからなる群から選択される）に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

【０４１４】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗寄生生物免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗寄生生物免疫応答としては、寄生生物、および本明細書中に記載されるかまたはさもなくば当該分野で公知の疾患または症状に関連する寄生生物が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、寄生生物に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ（マラリア）またはＬｅｉｓｈｍａｎｉａに対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

【０４１５】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、例えば、単核食細胞の補充および活性化を妨げることによって、珪肺症、サルコイドーシス、特発性肺線維症を含む、感染性疾患を処置するために使用され得る。

【０４１６】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、本発明のポリペプチドに対する免疫媒介応答を阻害または増強するための抗体を生成するための抗原として使用される。

【０４１７】

１つ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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫系をブーストし、１つ以上の抗体（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、およびＩｇＥ）の量の増大を生じ、そして免疫グロブリンのクラススイッチ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭおよびＩｇＥ）を誘導し、および／または免疫応答を増大するための動物（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）へ投与される。

【０４１８】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、病原に対するＢ細胞応答性の刺激物質として使用される。
【０４１９】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、Ｔ細胞のアクチベーターとして使用される。
【０４２０】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫抑制性治療を受ける前の、個体の免疫状態を増大させる薬剤として使用される。
【０４２１】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、より高い親和性抗体を誘導するための薬剤として使用される。
【０４２２】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、血清免疫グロブリン濃度を増加するための薬剤として使用される。
【０４２３】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫無防備状態の個体の回復を促進するための薬剤として使用される。
【０４２４】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、高齢の集団の間の免疫応答性をブーストするための薬剤として使用される。
【０４２５】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、　骨髄移植および／または他の移植（例えば、同種異系または外因性の器官移植）の前、間、または後の免疫系エンハンサーとしてとして使用される。移植に関して、本発明の組成物は、移植の前、同時、および／または後に投与され得る。特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植の後、Ｔ細胞集団の回復の開始前に投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植の後、Ｔ細胞集団の回復の開始後であるが、Ｂ細胞集団の完全な回復の前に最初に投与される。
【０４２６】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、Ｂ細胞機能の後天的欠損を有する個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤としてとして使用される。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することによって寛解または処置され得る、Ｂ細胞機能の後天的欠損を生じる状態としては、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。
【０４２７】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、一時的な免疫不全を有する個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤としてとして使用される。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することに

よって寛解または処置され得る、一時的な免疫不全を生じる状態としては、ウイルス感染（例えば、インフルエンザ）からの回復、栄養失調に関連する状態、感染性単核細胞症からの回復、またはストレスに関連する状態、麻疹からの回復、輸血からの回復、手術からの回復が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４２８】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、単球、樹状細胞および／またはＢ細胞による抗原提示のレギュレーターとして使用される。１つの実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボで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、抗腫瘍処置としてかまたは免疫系を調節するために有用であり得る。

【０４２９】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、個体の免疫系を、ＴＨ１細胞性応答とは反対に、体液性応答（すなわち、ＴＨ２）の発生に指向するための薬剤として使用される。

【０４３０】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、腫瘍増殖を誘導し、従って、腫瘍を抗腫瘍性薬剤に対してより感受性にするための手段として使用される。例えば、多発性骨髄腫は、緩慢な細胞分裂（ｄｉｖｉｄｉｎｇ）の疾患であり、従って、実質的に全ての抗腫瘍性レジメンに対して不応性である。これらの細胞は、より迅速に増殖させた場合、これらの感受性プロフィールは、おそらく変化するであろう。

【０４３１】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、ＡＩＤＳ、慢性リンパ球障害および／または分類不能性免疫不全症（Ｃｏｍｍｏｎ　Ｖａｒｉａｂｌｅ　Ｉｍｍｕｎｏｄｉｆｉｃｉｅｎｃｙ）のような病理におけるＢ細胞の産生の刺激因子として使用される。

【０４３２】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、手術、外傷または遺伝的欠陥後のリンパ組織の生成および／または再生のための治療としてとして使用される。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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、移植前の骨髄サンプルの前処理として使用される。

【０４３３】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、ＳＣＩＤ患者の間で観察されるような免疫不全を生じる遺伝性の障害のための遺伝子ベースの治療として使用される。

【０４３４】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、単球に影響を及ぼす寄生生物疾患（リーシュマニア属（Ｌｅｓｈｍａｎｉａ））に対して防御するために単球／マクロファージを活性化する手段として使用される。

【０４３５】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、本発明のポリペプチドによって惹起される分泌サイトカインを調節する手段として用いられる。

【０４３６】

上記の適用の全ては、獣医学的医療に適用され得る。

【０４３７】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、外来性因子または自己に対する種々の局面の免疫応答をブロックする手段として用いられる。免疫応答の特定の局面が所望され得る疾患または条件の例としては、狼瘡および関節炎のような自己免疫障害、ならびに皮膚アレルギー、炎症、腸疾患、損傷および病原体に関連する疾患／障害に対する免疫応答が挙げられる。
【０４３８】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、自己免疫疾患（例えば、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）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として用いられる。
【０４３９】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、内皮細胞におけるＢ細胞および／またはＴ細胞の遊走のインヒビターとして用いられる。この活性は、組織構造または同属の応答を破壊し、そして例えば、免疫応答の破壊および敗血症のブロックにおいて有用である。
【０４４０】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、未定量有意性の単一クローン性高ガンマグロブリン血症（ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌｇａｍｍｏｐａｔｈｙ ｏｆ ｕｎｄｅｔｅｒｍｉｎｅｄ ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｃｅ）（ＭＧＵＳ）、ヴァルデンストレーム疾患、関連する特発性単一クローン性高ガンマグロブリン血症、およびプラスマ細胞腫のような疾患における、慢性の高ガンマグロブリン血症事象のための治療として用いられる。
【０４４１】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、例えば、特定の自己免疫疾患および慢性炎症疾患および感染性疾患における、マクロファージおよびその前駆体、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Ｔ細胞およびＣＤ８細胞傷害性Ｔ細胞ならびにナチュラルキラー細胞）の、ポリペプチド走化性および活性化を阻害するために使用され得る。自己免疫疾患の例は、本明細書中に記載され、これらには、多発性硬化症およびインスリン依存性糖尿病が挙げられる。
【０４４２】
本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、好酸球の産生および遊走を妨げることによって、特発性好酸球増多症候群を処置するために使用され得る。
【０４４３】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、補体媒介性細胞溶解を増強または阻害するために用いられる。
【０４４４】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗体依存性細胞傷害性を増強または阻害するために用いられる。
【０４４５】
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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、例えば、動脈壁における単球浸潤を妨げることによって、アテローム性動脈硬化症を処置するために使用され得る。
【０４４６】
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

／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、成人呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置するために使用され得る。

【０４４７】

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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、創傷および組織の修復の刺激、新脈管形成の刺激、血管またはリンパの疾患または障害の修復の刺激に有用であり得る。さらに、本発明のアゴニストおよびアンタゴニストは、粘膜表面の再生を刺激するために使用され得る。

【０４４８】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはそれらのアゴニストは、原発性または後天性の免疫不全症、欠損性の血清免疫グロブリン産生、再発性の感染および／または免疫機能不全によって特徴付けられる障害を処置または予防するために使用される。さらに、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびに／あるいはそれらのアゴニストは、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、本明細書中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を含むが、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。本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、予防、診断または処置され得る他の疾患および障害としては、ＨＩＶ感染、ＨＴＬＶ－ＢＬＶ感染、リンパ球減少症、食細胞殺菌性機能不全貧血、血小板減少症、およびヘモグロビン尿が挙げられるがこれらに限定されない。

【０４４９】

別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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、分類不能性免疫不全症（ｃｏｍｍｏｎ ｖａｒｉａｂｌｅ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｄｉｓｅａｓｅ）（「ＣＶＩＤ」；「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」としても公知である）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。

【０４５０】

特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに／あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、自己免疫細胞または組織関連癌もしくは新生物を含む癌または新生物を処置、診断、および／または予防するために用いられ得る。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに／あるいはアゴニストまたはアンタゴニストによって予防、診断、または処置され得る癌または新生物の例は、本明細書に記載されており、そして急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ球性貧血（ＡＬＬ）、慢性リンパ球性白血病、プラスマ細胞腫、多発性骨髄腫、バーキットリンパ腫、およびＥＢＶ変態疾患が挙げられる。好ましい実施形態において、毒素または放射性同位体に結合体化された本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに／あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、癌および新生物を処置、診断、および／または予防するために用いられ得る。さらに好ましい実施形態において、毒素または放射性同位体に結合体化された本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに／あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、本明細書に記載のように、急性骨髄性白血病を処置、診断、および／または予防するために用いられ得る。

【０４５１】

別の特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに／あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、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用いられる。

【０４５２】

別の特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、慢性骨髄性白血病に関連するＢ細胞およびＩｇの関与を減少する手段として用いられる。

【０４５３】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、例えば、部分的または完全な脾臓切除を蒙った個体のような、Ｂ細胞免疫不全個体の間で免疫反応性をブーストするための薬剤として用いられる。

【０４５４】

本発明のアンタゴニストとしては、例えば、本発明のポリペプチドの結合抗体および／または阻害性抗体、アンチセンス核酸、リボザイムまたは可溶性形態（例えば、Ｆｃ融合タンパク質）が挙げられる（例えば、実施例９を参照のこと）。本発明のアゴニストとしては、例えば、このポリペプチドの結合抗体および／または刺激性抗体、および可溶性形態（例えば、Ｆｃ融合タンパク質）が挙げられる（例えば、実施例９を参照のこと）。本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、例えば、本明細書に記載されるような、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて使用され得る。

【０４５５】

別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／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、例えば機能的な内因性抗体分子を産生し得ないか、またはさもなければ障害された内因性免疫系を有し、ただし、別の動物由来の再構成された、または部分的に再構成された免疫系によってヒト免疫グロブリン分子を産生し得る動物（上記した動物を含むがこれに限定されず、トランスジェニック動物も含む）に投与される（例えば、公開ＰＣＴ出願番号ＷＯ９８／２４８９３、ＷＯ／９６３４０９６、ＷＯ／９６３３７３５、およびＷＯ／９１１０７４１を参照のこと）。本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストをこのような動物へ投与することは、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストに対するモノクローナル抗体を生成するために有用である。

【０４５６】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストは、アポトーシスに影響し得、従って、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多くの疾患の処置において有用である。例えば、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、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、濾胞性リンパ腫、ｐ５３変異を有する癌腫、およびホルモン依存性腫瘍、これらは以下：結腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、肺癌、腸の癌、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、カポージ肉腫および卵巣癌を含むが、これらに限定されない）；自己免疫障害（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（Ｂｅｈｃｅｔ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）、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ならびに慢性関節リウマチ）およびウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス）、炎症、対宿主性移植片病、急性移植片拒絶、ならびに慢性移植片拒絶、が挙げられる。

【０４５７】

好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストは、特に上記に列挙される癌の増殖、進行、および／または転移を阻害するために使用される。

【０４５８】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、細胞生存の増大に関連するさらなる疾患または状態としては、悪性疾患ならびに以下のような関連する障害の進行および／または転移が挙げられるが、これらに限定されない：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、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む）を含む）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球性白血病））、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、Ｈ鎖病、ならびに固形腫瘍（肉腫および癌腫（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（ｅｎｄｏｔｈｅｌｉｏｓａｒｃｏｍａ）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、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、気管支原生癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫（ｍｅｎａｎｇｉｏｍａ）、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫）を含むが、これらに限定されない）。

【０４５９】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、アポトーシスの増大に関連するさらなる疾患としては、以下が挙げられる：ＡＩＤＳ；神経変性障害（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、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または以前に関連した疾患）；自己免疫障害（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（Ｂｅｈｃｅｔ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）、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ならびに慢性関節リウマチ）、脊髄形成異常症候群（例えば、再生不良性貧血）、対宿主性移植片病、虚血性傷害（心筋梗塞、発作および再灌流傷害によって生じるようなもの）、肝臓傷害（例えば、肝炎関連肝臓傷害、虚血／再灌流傷害、胆汁うっ滞（ｃｈｏｌｅｓｔｏｓｉｓ）（胆管傷害）および肝臓癌）；毒物誘導性肝臓疾患（アルコールによって引き起こされるようなもの）、敗血症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。

【０４６０】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ならびに／あるいはアンタゴニストによって検出および／または処置され得る過剰増殖の疾患および／または障害の例としては、肝臓、腹部、骨、乳房、消化器系、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部および頸部、神経（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部、ならびに泌尿生殖器に位置する新生物が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４６１】

同様に、他の過剰増殖障害もまた、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ならびに／あるいはアンタゴニストにより処置または検出され得る。このような過剰増殖性障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：高ガンマグロブリン血症、リンパ球増殖性障害、パラプロテイン血症、紫斑、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、ゴシェ病、組織球増殖症、および任意の他の過剰増殖性疾患、加えて上記に列挙した器官系に見出される新生物。

【０４６２】

（過剰増殖障害）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、新生物を含む過剰増殖障害を処置または検出し得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、直接的または間接的な相互作用を介してこの障害の増殖を阻害し得る。あるいは、本発明のポリヌク

レオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、過剰増殖障害を阻害し得る他の細胞を増殖し得る。

【０４６３】

例えば、免疫応答を増大させること、特に過剰増殖障害の抗原性の質を増大させることによって、またはＴ細胞を増殖、分化、もしくは動員することによって、過剰増殖障害を処置し得る。既存の免疫応答を増強するか、または新たな免疫応答を開始するかのいずれかによって、この免疫応答を増大させ得る。あるいは、免疫応答を減少させることもまた、化学療法剤のような、過剰増殖障害を処置する方法であり得る。

【０４６４】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置または検出され得る過剰増殖障害の例としては、結腸、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部および頸部、神経（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部、ならびに泌尿生殖器に位置する新生物が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４６５】

同様に、他の過剰増殖障害もまた、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置または検出され得る。このような過剰増殖性障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：高ガンマグロブリン血症、リンパ球増殖性障害、パラプロテイン血症、紫斑、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、ゴシェ病、組織球増殖症、および任意の他の過剰増殖性疾患、加えて上記に列挙した器官系に見出される新生物。

【０４６６】

本発明のポリヌクレオチドを利用する１つの好ましい実施形態は、本発明および／または融合タンパク質もしくはそのフラグメントを用いる遺伝子治療によって、異常な細胞分裂を阻害することである。

【０４６７】

従って、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを異常に増殖している細胞に挿入することによって、細胞増殖性障害を処置するための方法を提供し、ここでこのポリヌクレオチドはこの発現を示す。

【０４６８】

本発明の別の実施形態は、個体における細胞増殖性障害を処置する方法を提供し、この方法は、本発明の１以上の活性遺伝子コピーを異常に増殖している１つの細胞または複数の細胞に投与することを包含する。好ましい実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、このポリヌクレオチドをコードするＤＮＡ配列の発現において有効な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は、本発明のポリヌクレオチドをコードするＤＮＡ構築物は、レトロウイルスベクター、またはより好ましくは、アデノウイルスベクターを用いて、処理されるべき細胞に挿入される（Ｇ　Ｊ．Ｎａｂｅｌら、ＰＮＡＳ　１９９９　９６：３２４－３２６（これは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。最も好ましい実施形態においては、ウイルスベクターは不完全であり、非増殖性細胞ではなく増殖性細胞のみを形質転換する。さらに、好ましい実施形態においては、単独、または他のポリヌクレオチドと組み合わされたかもしくは融合されたかのいずれかで増殖性細胞に挿入される本発明のポリヌクレオチドは、次いで外部刺激（すなわち、磁気、特異的小分子、化学的、または薬物投与など）を介して調節され得、これはこのポリヌクレオチドの上流のプロモーターに作用し、コードされたタンパク質産物の発現を誘導する。このように、本発明の有益な治療効果は、この外部刺激に基づいて明確に調節され得る（すなわち、本発明の発現を増加、減少、または阻害する）。

【０４６９】

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、他の脈管形成タンパク質をコー

ドする他のポリヌクレオチドと一緒に投与され得る。脈管形成タンパク質としては、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αおよびβ、血小板由来の内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、腫瘍壊死因子α、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、および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。

【０４７０】

本発明のポリヌクレオチドは、発癌遺伝子または抗原の発現の抑制において有用であり得る。「発癌遺伝子の発現の抑制」によって、遺伝子の転写の抑制、遺伝子転写物の分解（プレメッセージ（ｐｒｅ－ｍｅｓｓａｇｅ）ＲＮＡ）、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修飾の予防、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が意図される。

【０４７１】

異常に増殖している細胞への局所的投与のために、本発明のポリヌクレオチドは当業者に公知の任意の方法によって投与され得、この方法としては、トランスフェクション、エレクトロポレーション、細胞の微量注入、またはビヒクル（例えば、リポソーム、リポフェクチン）中で、または裸のポリヌクレオチドとして、または本明細書を通し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、公知の遺伝子送達系（例えば、レトロウイルスベクター（Ｇｉｌｂｏａ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　４４：８４５（１９８２）；Ｈｏｃｋｅ，Ｎａｔｕｒｅ　３２０：２７５（１９８６）；Ｗｉｌｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８５：３０１４）、ワクシニアウイルス系（Ｃｈａｋｒａｂａｒｔｙら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．５：３４０３（１９８５））または当業者に公知の他の有効なＤＮＡ送達系（Ｙａｔｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ　３１３：８１２（１９８５））があるが、これらに限定されない）によって送達され得る。これらの参考文献は、例示のみであり、本明細書中に参考として援用される。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、そして非分裂細胞を使わないために、当業者に公知のレトロウイルス、またはアデノウイルス（当該分野および本明細書中の他のいずれかに記載のような）送達系を使用することが好ましい。宿主ＤＮＡ複製は、組み込みのためにレトロウイルスＤＮＡを必要とし、レトロウイルスはそのライフサイクルに必要なレトロウイルス遺伝子を欠くために自己複製できないからである。このようなレトロウイルス送達系を本発明のポリヌクレオチドのために用いることによって、この遺伝子および構築物は異常に増殖している細胞を標的とし、そして非分裂正常細胞を使用しない。

【０４７２】

本発明のポリヌクレオチドは、注射針を疾患部位に直接導くために使用される画像化デバイスの使用によって、内部器管、体腔などにおける細胞増殖性障害／疾患部位へ直接送達され得る。本発明のポリヌクレオチドはまた、外科的処置のときに疾患部位へ投与され得る。

【０４７３】

「細胞増殖性疾患」によって、器管、腔、または身体の部分の任意の１つまたは任意の組み合わせに影響を与える、任意のヒトまたは動物の疾患もしくは障害が意味され、これは良性であるか悪性であるかに関わらず、細胞、細胞の群、または組織の単一または複数の局所的異常増殖によって特徴付けられる。

【０４７４】

本発明のポリヌクレオチドが処置される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、本発明のポリヌクレオチドの任意の量が投与され得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドの１つより多くを、同じ部位へ同時に投与することが可能である。「生物学的に阻害する」によって、細胞の部分的または全体的な増殖阻害および細胞の増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）または成長（ｇｒｏｗｔｈ）の速度における減少が意味される。生物学的阻害用量は、組織培養物における標的悪性細胞増殖もしくは異常増殖細胞増殖

、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って、または当業者に公知の任意の他の方法によって決定され得る。

【０４７５】

本発明はさらに、抗体に基づく治療に関し、この治療は、１以上の記載された障害を処置するために、抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体を哺乳動物（好ましくは、ヒト）患者に投与する工程を包含する。抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体のポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体を生成するための方法は、本明細書中のいずれかに詳細に記載される。このような抗体は、当該分野において公知であるかまたは本明細書中に記載されるような薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

【０４７６】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の要旨は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを、身体中で局所的もしくは全体的に、または抗体の直接的な細胞傷害性によって（例えば、相補細胞（ＣＤＣ）またはエフェクター細胞（ＡＤＣＣ）によって媒介されるように）結合させる工程を包含する。これらのアプローチのいくつかは、以下により詳細に記載される。本明細書中に提供される教示によって、当業者は過度の実験なしで、本発明の抗体を診断目的、モニタリング目的または治療目的のために使用する方法を理解する。

【０４７７】

特に、本発明の抗体、フラグメントおよび誘導体は、本明細書中に記載されるような細胞増殖性障害および／または細胞分化障害を有しているかまたは発症している被験体を処置するために有用である。このような処置は、抗体もしくはフラグメント、誘導体またはそれらの結合体の単一または複数の用量を投与する工程を包含する。

【０４７８】

本発明の抗体は、例えば、他のモノクロナール抗体もしくはキメラ抗体と組み合わせて、またはリンホカインもしくは造血成長因子と組み合わせて有利に使用され得、これは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加させるために役立つ。

【０４７９】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して高親和性および／または強力なインビボ阻害および／または中和抗体、それらのフラグメントもしくは領域を、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に関するイムノアッセイおよびそれらに関連する障害の治療の両方のために使用することが好ましい。このような抗体、フラグメントまたは領域は、好ましくは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それら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としては、5×10^{-6}Ｍ、10^{-6}Ｍ、5×10^{-7}Ｍ、10^{-7}Ｍ、5×10^{-8}Ｍ、10^{-8}Ｍ、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および10^{-15}Ｍ未満の解離定数すなわちＫｄを伴う結合親和性が挙げられる。

【０４８０】

さらに、本明細書中のいずれかに記載されるように、本発明のポリペプチドは、単独で、融合タンパク質として、または他のポリペプチドと組み合わせて、直接的または間接的のいずれかで、増殖性細胞または組織の新脈管形成の阻害において有用である。最も好ましい実施形態においては、この抗新脈管形成効果は、例えば造血性細胞、腫瘍特異的細胞（例えば、腫瘍関連マクロファージ）の阻害を通して、間接的に達成され得る（Ｊｏｓｅｐｈ ＩＢら、Ｊ Ｎａｔｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ，９０（２１）：１６４８－５３（１９９８）（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを指向する抗体はまた、直接的または間接的に新脈管形成の阻害を生じ得る（Ｗｉｔｔｅ Ｌら、Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ Ｒｅｖ．１７（２）：１５５－６１（１９９８）（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。

【０４８１】
本発明のポリペプチド（融合タンパク質を含む）またはそのフラグメントは、アポトーシスの誘導を通した増殖性細胞または組織の阻害において有用であり得る。このポリペプチドは、デスドメインレセプター（例えば、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）レセプター１、ＣＤ９５（Ｆａｓ／ＡＰＯ－１）、ＴＮＦレセプター関連アポトーシス媒介タンパク質（ＴＲＡＭＰ）およびＴＮＦ関連アポトーシス誘導リガンド（ＴＲＡＩＬ）レセプター１およびレセプター２）の活性化において、直接的または間接的のいずれかで、増殖性細胞および組織のアポトーシスを誘導するために作用し得る（Ｓｃｈｕｌｚｅ－Ｏｓｔｈｏｆｆ Ｋら、Ｅｕｒ Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ ２５４（３）：４３９－５９（１９９８）（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。さらに、本発明の別の好ましい実施形態においては、このポリペプチドは、他の機構を通して（例えば、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いて）、あるいは単独または小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、チオレドキシン、抗炎症タンパク質）との組み合わせのいずれかで、このタンパク質の発現の刺激を通して、アポトーシスを誘導し得る（例えば、Ｍｕｔａｔ Ｒｅｓ ４００（１－２）：４４７－５５（１９９８）、Ｍｅｄ Ｈｙｐｏｔｈｅｓｅｓ．５０（５）：４２３－３３（１９９８）、Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ Ｉｎｔｅｒａｃｔ．Ａｐｒ ２４；１１１－１１２：２３－３４（１９９８）、Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．７６（６）：４０２－１２（１９９８）、Ｉｎｔ Ｊ Ｔｉｓｓｕｅ Ｒｅａｃｔ；２０（１）：３－１５（１９９８）（これらはすべて本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。

【０４８２】
本発明のポリペプチド（それとの融合タンパク質もしくはそのフラグメントを含む）は、増殖性細胞または組織の転移の阻害において有用である。阻害は、ポリペプチド、または本明細書中のいずれかに記載されるようなこのポリペプチドを指向する抗体の投与の直接的な結果として、あるいは間接的に（例えば、転移を阻害することが知られているタンパク質（例えば、α４インテグリン）の発現の活性化）生じ得る（例えば、Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９８；２３１：１２５－４１（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。本発明のこのような治療的効果は、単独、または小分子薬物もしくはアジュバントとの組み合わせのいずれかで達成され得る。

【０４８３】
別の実施形態においては、本発明は、本発明のポリペプチドを含有する組成物（例えば、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグに会合するポリペプチドまたはポリペプチド抗体を含有する組成物）を、本発明の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。本発明のポリペプチドまたはポリペプチド抗体は、疎水性、親水性、イオン性および／または共有結合性相互作用を介して、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグに会合し得る。

【０４８４】
本発明のポリペプチド、それらとの融合タンパク質またはそれらのフラグメントは、直接的（例えば、本発明のポリペプチドが増殖性抗原および免疫原に応答するために、免疫応答を「ワクチン接種した」場合に起こるように）、または間接的（例えば、この抗原および免疫原に対する免疫応答を増強することが知られているタンパク質（例えば、ケモカイン）の発現の活性化におけるように）のいずれかで、増殖細胞または組織の免疫原性および／または抗原性の増強において有用である。

【０４８５】
（心臓血管障害）
本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、四肢虚血のような末梢動脈疾患を含む、心臓血管障害を処置し得る。

【０４８６】
心臓血管障害としては、動動脈瘻（ａｒｔｅｒｉｏ－ａｒｔｅｒｉａｌ ｆｉｓｔｕｌａ

）、動静脈瘻、大脳動静脈先天異常、先天性心欠陥（ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌ ｈｅａｒｔ ｄｅｆｅｃｔｓ）、肺動脈弁閉鎖症、およびシミター症候群のような心臓血管異常が挙げられる。先天性心欠陥としては、大動脈縮窄、三房心、冠状脈管奇形（ｃｏｒｏｎａｒｙ ｖｅｓｓｅｌ ａｎｏｍａｌｉｅｓ）、交差心、右胸心、開存性動脈管（ｐａｔｅｎｔ ｄｕｃｔｕｓ ａｒｔｅｒｉｏｓｕｓ）、エブスタイン奇形、アイゼンメンガー複合体、左心室発育不全症候群、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、および心中隔欠損症（ｈｅａｒｔ ｓｅｐｔａｌ ｄｅｆｅｃｔｓ）（例えば、大動脈肺動脈中隔欠損症（ａｏｒｔｏｐｕｌｍｏｎａｒｙ ｓｅｐｔａｌ ｄｅｆｅｃｔ）、心内膜床欠損症、リュタンバッシェ症候群、ファロー三徴症、心室心中隔欠損症（ｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ ｈｅａｒｔ ｓｅｐｔａｌ ｄｅｆｅｃｔｓ））が挙げられる。

【０４８７】

心臓血管障害としてはまた、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、心臓水腫、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、心外膜炎（梗塞性および結核性を含む）、気心膜症、心膜切開後症候群、右心疾患、リウマチ性心疾患、心室機能不全、充血、心臓血管妊娠合併症（ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｐｒｅｇｎａｎｃｙ ｃｏｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）、シミター症候群、心血管梅毒、および心血管結核（ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）のような心臓病が挙げられる。

【０４８８】

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、アダムズ－ストークス症候群、脚ブロック、洞房ブロック、長ＱＴ症候群（ｌｏｎｇ ＱＴ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、副収縮、ローン－ギャノング－レヴァイン症候群、マヘーム型早期興奮症候群（Ｍａｈａｉｍ－ｔｙｐｅ ｐｒｅ－ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、ウルフ－パーキンソン－ホワイト症候群、洞不全症候群、頻拍、および心室性細動が挙げられる。頻拍としては、発作性頻拍、上室性頻拍、心室固有調律促進、房室結節性再入頻拍（ａｔｒｉｏｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ ｎｏｄａｌ ｒｅｅｎｔｒｙ ｔａｃｈｙｃａｒｄｉａ）、異所心房性頻拍、異所接合部頻拍、洞房結節性再入頻拍（ｓｉｎｏａｔｒｉａｌ ｎｏｄａｌ ｒｅｅｎｔｒｙ ｔａｃｈｙｃａｒｄｉａ）、洞性頻拍、トルサード・ド・ポワント、および心室性頻拍が挙げられる。

【０４８９】

心臓弁疾患としては、大動脈弁機能不全症、大動脈弁狭窄症、心雑音（ｈｅａｒ ｍｕｒｍｕｒｓ）、大動脈弁逸脱症、僧帽弁逸脱症、三尖弁逸脱症、僧帽弁機能不全、僧帽弁狭窄症、肺動脈弁閉鎖症、肺動脈弁機能不全、肺動脈弁狭窄症、三尖閉鎖症、三尖弁機能不全、および三尖弁狭窄症が挙げられる。

【０４９０】

心筋疾患としては、アルコール性心筋症、うっ血性心筋症、肥大型心筋症、弁下部性大動脈狭搾症、弁下部性肺動脈狭搾症、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、心筋再灌流障害、および心筋炎が挙げられる。

【０４９１】

心筋性虚血としては、狭心症、冠動脈瘤、冠動脈硬化、冠動脈血栓症、冠動脈血管痙攣、心筋梗塞、および心筋気絶（ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ ｓｔｕｎｎｉｎｇ）のような冠動脈疾患が挙げられる。

【０４９２】

心臓血管疾患としてはまた、動脈瘤、血管形成異常、血管腫症、細菌性血管腫症状、ヒッペル－リンダラ疾患（Ｈｉｐｐｅｌ－Ｌｉｎｄａｕ Ｄｉｓｅａｓｅ）、クリペル－トル

ノネーーウェーバー症候群、スタージーウェーバー症候群、血管運動神経性水腫、大動脈疾患、高安動脈炎、大動脈炎、ルリーシュ症候群、動脈閉塞疾患、動脈炎、動脈内膜炎（ｅｎａｒｔｅｒｉｔｉｓ）、結節性多発性動脈炎、脳血管障害、糖尿病性血管障害、糖尿病性網膜症、塞栓症、血栓症、先端紅痛症、痔、肝静脈閉塞障害、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管障害、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管疾患、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、レーノー病、ＣＲＥＳＴ症候群、網膜静脈閉塞、シミター症候群、上大静脈症候群、毛細血管拡張症、毛細血管拡張性運動失調（ａｔａｃｉａ　ｔｅｌａｎｇｉｅｃｔａｓｉａ）、遺伝性出血性毛細管拡張症、精索静脈瘤、拡張蛇行静脈、静脈瘤性潰瘍、脈管炎、および静脈機能不全のような血管疾患が挙げられる。

【０４９３】

動脈瘤としては、解離性動脈瘤、偽動脈瘤、感染した動脈瘤、破裂した動脈瘤、大動脈性動脈瘤、大脳性動脈瘤、冠動脈瘤、心動脈瘤、および腸骨性動脈瘤が挙げられる。

【０４９４】

動脈閉塞疾患としては、動脈硬化症、間欠性跛行、頸動脈狭窄症、線維筋性形成異常、腸間膜性血管閉塞、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。

【０４９５】

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、大脳動脈瘤、大脳無酸素症、大脳動脈硬化、大脳動静脈先天異常、大脳動脈疾患、大脳の塞栓症および血栓症、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、大脳出血、硬膜上血腫、硬膜下血腫、クモ膜下出血（ｓｕｂａｒａｘｈｎｏｉｄ　ｈｅｍｏｒｒｈａｇｅ）、大脳梗塞、大脳虚血（一過性を含む）、鎖骨下動脈盗血症候群、室周白軟化症（ｐｅｒｉｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ　ｌｅｕｋｏｍａｌａｃｉａ）、血管性頭痛、群発性頭痛、片頭痛、および椎骨基部（ｖｅｒｔｅｂｒｏｂａｓｉｌａｒ）機能不全が挙げられる。

【０４９６】

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、爪先チアノーゼ症候群、脂肪塞栓症、肺動脈塞栓症、および血栓塞栓症が挙げられる。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、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、および血栓性静脈炎が挙げられる。

【０４９７】

虚血としては、大脳虚血、虚血性大腸炎、仕切り症候群（ｃｏｍｐａｒｔｍｅｎｔ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、前仕切り症候群（ａｎｔｅｒｉｏｒ　ｃｏｍｐａｒｔｍｅｎｔ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、心筋虚血、再灌流傷害、および末梢四肢虚血が挙げられる。脈管炎としては、大動脈炎、動脈炎、ベーチェット（Ｂｅｈｃｅｔ）症候群、チャーグーストラウス症候群、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、シェーンライン－ヘーノホ紫斑病（Ｓｃｈｏｅｎｌｅｉｎ－Ｈｅｎｏｃｈ　ｐｕｒｐｕｒａ）、アレルギー性皮膚血管炎およびヴェーゲナー肉芽腫症が挙げられる。

【０４９８】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、危険な四肢虚血および冠状動脈疾患の処置に対して特に有効である。

【０４９９】

ポリペプチドは、当該分野で公知である任意の方法を使用して投与され得、これらの方法としては、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ー、他の市販デポー物質、浸透圧ポンプ、経口または坐剤の固形薬学的処方物、手術中のデカンティングまたは局所適用、エアロゾル送達が挙げられるが、これらに限定されない。そのような方法は当該分野で公知である。ポリペプチドは、下記でより詳細に記載される、治療剤（Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ）の一部として投与され得る。ポリヌクレオチドを送達する方法は本明細書中でより詳細に記載される。

【０５００】

（抗新脈管形成活性）
新脈管形成の内因性の、刺激因子とインヒビターとの間の天然に存在する平衡は、阻害影響が優勢である平衡である。Ｒａｓｔｉｎｅｊａｄら、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、新脈管形成は、厳密に調節され、そして空間的および時間的に定められる。病的な新脈管形成の条件（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。調節されていない新脈管形成は病的になり、そして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、異常な新生血管形成により支配される。例えば、Ｍｏｓｅｓら、Ｂｉｏｔｅｃｈ．９：６３０～６３４（１９９１）；Ｆｏｌｋｍａｎら、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．、３３３：１７５７～１７６３（１９９５）；Ａｕｅｒｂａｃｈら、Ｊ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．２９：４０１～４１１（１９８５）；Ｆｏｌｋｍａｎ、Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、ＫｌｅｉｎおよびＷｅｉｎｈｏｕｓｅ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、１７５～２０３頁（１９８５）；Ｐａｔｚ、Ａｍ．Ｊ．Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ．９４：７１５～７４３（１９８２）；およびＦｏｌｋｍａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２１：７１９～７２５（１９８３）による概説を参照のこと。多くの病的状態において、新脈管形成のプロセスは、その疾患状態に寄与する。例えば、固形腫瘍の増殖が新脈管形成に依存することを示唆する有意なデータが蓄積されている。ＦｏｌｋｍａｎおよびＫｌａｇｓｂｒｕｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３５：４４２～４４７（１９８７）。

【０５０１】
本発明は、本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド、ならびに本発明のアゴニストまたはアンタゴニストの投与による新生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状態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、ならびに当該分野で公知の他のもの（このような障害の総説については、Ｆｉｓｈｍａｎら、Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、第２版、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。従って、本発明は、新脈管形成関連疾患および／または障害の処置の方法を提供し、この方法は、治療有効量の、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを、その処置の必要な個体に投与する工程を包含する。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、癌または腫瘍を治療的に処置するために、種々のさらなる方法で利用され得る。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストで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；カポージ肉腫；平滑筋肉腫；非小細胞肺癌；結腸直腸癌；進行性（ａｄｖａｎｃｅｄ）悪性疾患；および血液から生じる腫瘍（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、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、皮膚癌、頭頸部腫瘍、乳房腫瘍およびカポージ肉腫のような癌を処置するために、局所送達され得る。

【０５０２】
なお他の局面において、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。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、腫瘍に直接的に、または注射もしくはカテーテルを介して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、適切な投与様式は、処置されるべき癌によって変化する。他の送達様式は本明細書中において議論される。

【０５０３】
ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、癌に加えて、他の障害（新脈管形成を含む）を処置する際に有用であり得る。これらの障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：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）；動脈硬化プラーク；眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、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（ｕｖｉｅｔｉｓ）および眼の翼状片（Ｐｔｅｒｙｇｉａ）（異常な血管増殖））；慢性関節リウマチ；乾癬；遅延型創傷治癒；子宮内膜症；脈管形成；顆粒化；過形成性瘢痕（ケロイド）；偽関節骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋の新脈管形成；冠状側副枝（ｃｏｒｏｎａｒｙ ｃｏｌｌａｔｅｒａｌｓ）；大脳側副枝；動静脈奇形；虚血性四肢新脈管形成；オースラー－ウェーバー（Ｏｓｌｅｒ－Ｗｅｂｂｅｒ）症候群；プラーク新生血管形成；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；創傷顆粒化；クローン病；およびアテローム性動脈硬化症。
【０５０４】
例えば、本発明の１つの局面において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを過形成性瘢痕またはケロイドに投与する工程を包含する、過形成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。
【０５０５】
本発明の１つの実施形態において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、過形成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、過形成性瘢痕およびケロイド（例えば、やけど）の発生を生じることが知られている状態の予防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（最初の傷害の約１４日後）を有した後であるが、過形成性瘢痕またはケロイドの発生の前に開始される。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を含む）を処置するための方法を提供する。
【０５０６】
さらに、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド（アゴニストおよび／またはアンタゴニストを含む）を用いて処置され得る新生血管形成に関連する眼の障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血管新生緑内障、糖尿病網膜症、網膜障害、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植新生血管形成、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生血管形成に関連する疾患。例えば、Ｗａｌｔｍａｎら、Ａｍ．Ｊ．Ｏｐｈｔｈａｌ．８５：７０４～７１０（１９７８）およびＧａｒｔｎｅｒら、Ｓｕｒｖ．Ｏｐｈｔｈａｌ．２２：２９１～３１２（１９７８）による総説を参照のこと。
【０５０７】
従って、本発明の１つの局面において、治療有効量の化合物（上記）を患者に対して、血管の形成が阻害されるように角膜に投与する工程を包含する、角膜新生血管形成（角膜移植新生血管形成を含む）のような眼の新生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、特定の病的状態において、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、患者の視力の衰えを生じる。角膜が完全に不透明になる（ｏｐａｃｉｔａｔｅ）場合に、視力喪失が完全になり得る。広範な種々の障害は、例えば、以下を含む角膜新生血管形成を生じ得る：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オンコセルカ症）、免疫学的プロセス（例えば、移植片拒絶およびスティーヴンズ－ジョンソン症候群）、アルカリやけど、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を装着することの合併症として。
【０５０８】

特に好ましい実施形態において、本発明は、生理食塩水（眼に用いる調製物において一般に使用される任意の保存剤および抗菌剤と組合せて）中で局所投与のために調製され得、そして点眼剤形態で投与され得る。溶液または懸濁液は、その純粋な形態で調製され得、そして１日に数回投与され得る。あるいは、上記のように調製される抗脈管形成組成物はまた、角膜に直接投与され得る。好ましい実施形態において、抗脈管形成組成物は、角膜に結合する粘膜接着性ポリマーとともに調製される。さらなる実施形態において、抗脈管形成因子または抗脈管形成組成物は、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、脈管形成応答（例えば、化学的やけど）を誘導する高い可能性を有することが公知であ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）は、その後の合併症を予防するのを補助するために直ちに開始され得る。

【０５０９】

他の実施形態において、上記の化合物は、角膜支質に直接、顕微鏡の案内の下で眼科医によって注入され得る。好ましい注射部位は、個々の病巣の形態で変化し得るが、投与の目標は、脈管構造の前進している面に組成物を置くこと（すなわち、血管と正常な角膜との間に分散される）である。ほとんどの場合において、これは、前進している血管から角膜を「防御」するための縁周囲（ｐｅｒｉｌｉｍｂｉｃ）角膜注射を含む。この方法はまた、角膜新生血管形成を予防的に防ぐために、角膜傷害の直後に利用され得る。この状況において、この物質は、角膜病巣とその所望されない潜在的な血液供給の縁との間に分散して縁周囲角膜に注射され得る。このような方法はまた、類似の様式で、移植された角膜の毛細血管浸潤を予防する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回のみ必要とされ得る。ステロイドもまた、注入溶液に添加され、その注射自体から生じる炎症を低減し得る。

【０５１０】

本発明の別の局面において、患者に、血管の形成を阻害するように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、血管新生緑内障を処置するための方法が提供される。１つの実施形態において、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、前方角（ａｎｔｅｒｉｏｒ　ｃｈａｍｂｅｒ　ａｎｇｌｅ）の領域に注入によって移植され得る。他の実施形態において、化合物はまた、化合物が眼房水に連続的に放出されるように、任意の位置に置かれ得る。本発明の別の局面において、患者に、血管の形成が阻害されるように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、増殖性糖尿病性網膜症を処置するための方法が提供される。

【０５１１】

本発明の特に好ましい実施形態において、増殖性糖尿病性網膜症は、網膜におけるポリヌクレオチド、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加させるために、眼房水または硝子体への注入によって処置され得る。好ましくは、この処置は、光凝固を必要とする重篤な疾患の獲得の前に開始されるべきである。

【０５１２】

本発明の別の局面において、血管の形成が阻害されるように、患者に、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、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、硝子体内注射を介して、および／または眼内移植を介して局所投与され得る。

【０５１３】

さらに、このポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストで処置され得る障害としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：血管腫、関節炎、乾癬、血管線維腫、アテローム性プラーク、遅延型創傷治癒、顆粒化、血友病性関節、過形成性瘢痕、偽関節骨折、オースラー－ウェーバー（Ｏｓｌｅｒ－Ｗｅｂｅｒ）症候群、化膿性肉芽腫、強皮症、トラコーマ、および血管接着。

【０５１４】
さらに、このポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストで処置され得る障害および／または状態としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：固形腫瘍、血液由来の（ｂｌｏｏｄ　ｂｏｒｎ）腫瘍（例えば、白血病）、腫瘍転移、カポージ肉腫、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）、慢性関節リウマチ、乾癬、眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、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、脈管形成、顆粒化、過形成性瘢痕（ケロイド）、偽関節骨折、強皮症、トラコーマ、血管接着、心筋の新脈管形成、冠状側副枝（ｃｏｒｏｎａｒｙ　ｃｏｌｌａｔｅｒａｌｓ）、大脳側副枝、動静脈奇形、虚血性四肢新脈管形成、オースラーウェーバー症候群、プラーク新生血管形成、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、創傷顆粒化、クローン病、アテローム性動脈硬化症、産児制限薬剤（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）、病原性の結果（例えば、ネコ引っかき病（Ｒｏｃｈｅｌｅ　ｍｉｎａｌｉａ　ｑｕｉｎｔｏｓａ）、潰瘍（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ）、バルトネラ症および細菌性血管腫症状）のような新脈管形成を有する疾患。

【０５１５】
出産制限方法の１つの局面において、胎芽着床をブロックするに十分な化合物の量は、性交および受精が起こる前またはその後に投与され、従って産児制限の有効な方法、おそらく「事後用（ｍｏｒｎｉｎｇ　ａｆｔｅｒ）」方法を提供する。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストはまた、月経を制御することにおいて使用され得るか、または子宮内膜症の処置における腹膜洗浄液として、もしくは腹膜移植のためのいずれかで投与され得る。

【０５１６】
本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストは、縫合（ｓｔｉｔｃｈ）肉芽腫を予防するために、外科縫合に組み込まれ得る。

【０５１７】
ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストは、広範な種々の外科手順において利用され得る。例えば、本発明の１つの局面において、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の組織を分離するため、そして／または周囲の組織への疾患の広がりを予防するために、腫瘍の除去の前に、領域をコートまたはスプレーするために利用され得る。本発明の他の局面において、組成物（例えば、スプレーの形態において）は、腫瘍をコートするため、または所望の場所において新脈管形成を阻害するために、内視鏡手順を介して送達され得る。本発明のなお他の局面において、本発明の抗脈管形成組成物でコートされている外科メッシュが、外科メッシュが利用され得る任意の手順において利用され得る。例えば、本発明の１つの実施形態において、抗脈管形成組成物を有した外科メッシュレーデン（ｌａｄｅｎ）は、構造に対する支持を提供するため、そして一定の量の抗脈管形成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。

【０５１８】
本発明のさらなる局面において、癌の局所的再発およびその部位での新しい血管の形成が阻害されるように、切除後にポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストを腫瘍の切除縁に投与する工程を包含する、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１つの実施形態において、抗脈管形成化合物は、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（ｂｒｕｓｈｉｎｇ）、または他の方法で抗脈管形成化合物で腫瘍の切除縁をコートすることによって適用される）。あるいは、抗脈管形成化合物は、投与前に公知の外科ペーストに組み込まれ得る。本発明の特に好ましい実施形態において、抗脈管形成化合物は、悪性疾患についての肝切除後および神経外科手術後に適用される。

【０５１９】
本発明の１つの局面において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストは、広範な種々の腫瘍（例えば、乳房腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍および肝腫瘍を含む）の切除縁に投与され得る。例えば、本発明の１つの実施形態において、抗脈管形成化合物は、切除後に、神経学的腫瘍の部位に、その部位での新しい血管の形成が阻害されるように投与され得る。

【０５２０】
本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストはまた、他の抗脈管形成因子とともに投与され得る。他の抗脈管形成因子の代表的な例としては以下が挙げられる：抗侵襲性因子、レチノイン酸およびその誘導体、パクリタキセル、スラミン、メタロプロテイナーゼ－１の組織インヒビター、メタロプロテイナーゼ－２の組織インヒビター、プラスミノーゲン活性化インヒビター－１、プラスミノーゲン活性化インヒビター－２および種々の形態のより軽い「ｄ群」遷移金属。

【０５２１】
より軽い「ｄ群」遷移金属には、例えばバナジウム、モリブデン、タングステン、チタン、ニオブおよびタンタル種が挙げられる。そ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適切な錯体としては、オキソ遷移金属錯体が挙げられる。

【０５２２】
バナジウム錯体の代表的な例としては、バナデート錯体およびバナジル錯体のようなオキソバナジウム錯体が挙げられる。適切なバナデート錯体としては、例えばメタバナジン酸アンモニウム、メタバナジン酸ナトリウムおよびオルトバナジン酸ナトリウムのようなメタバナデート錯体およびオルトバナデート錯体が挙げられる。適切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ネートおよび硫酸バナジル（硫酸バナジル一水和物および硫酸バナジル三水和物のような硫酸バナジル水和物を含む）が挙げられる。

【０５２３】
タングステン錯体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。適切なオキソタングステン錯体としては、タングステート錯体およびタングステンオキシド錯体が挙げられる。適切なタングステート錯体としては、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。適切なタングステンオキシドとしては、タングステン（ＩＶ）オキシドおよびタングステン（ＶＩ）オキシドが挙げられる。適切なオキソモリブデン錯体としては、モリブデート、モリブデンオキシドおよびモリブデニル錯体が挙げられる。適切なモリブデート錯体としては、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。適切なモリブデンオキシドとしては、モリブデン（ＶＩ）オキシド、モリブデン（ＶＩ）オキシドおよびモリブデン酸が挙げられる。適切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。他の適切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。

【０５２４】
広範な種々の他の抗脈管形成因子もまた、本発明の状況において利用され得る。代表的な例としては、以下が挙げられる：血小板因子４；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（クイーンクラブ（ｑｕｅｅｎ　ｃｒａｂ）の殻から調製される）（Ｍｕｒａｔａら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５１：２２～２６、１９９１）；硫酸化多糖ペプチドグリカン複合体（ＳＰ－ＰＧ）（この化合物の機能は、ステロイド（例えば、エストロゲン）およびクエン酸タモキシフェンの存在によって、増強され得る）；スタウロスポリン；基質代謝の調節因子（例えば、プロリンアナログ、シスヒドロキシプロリン、ｄ，Ｌ－３，４－デヒドロプロリン、チアプロリン、α，α－ジピリジル，アミノプロピオニトリルフマレートを含む）；４－プロピル－５－（４－ピリジニル）－２（３Ｈ）－オキサゾロン；メトトレキサート；ミトザントロン；ヘパリン；インターフェロン；２マクログロブリン－血清；

ＣｈＩＭＰ－３（Ｐａｖｌｏｆｆら、Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．２６７：１７３２１～１７３２６、１９９２）；キモスタチン（Ｔｏｍｋｉｎｓｏｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．２８６：４７５～４８０、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ら、Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５５～５５７、１９９０）；チオリンゴ酸金ナトリウム（「ＧＳＴ」；ＭａｔｓｕｂａｒａおよびＺｉｆｆ、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．７９：１４４０～１４４６、１９８７）；アンチコラゲナーゼ－血清；α２－抗プラスミン（Ｈｏｌｍｅｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２（４）：１６５９～１６６４、１９８７）；ビサントレン（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）；ロベンザリット二ナトリウム（Ｎ－（２）－カルボキシフェニル－４－クロロアントロニル酸（ｃｈｌｏｒｏａｎｔｈｒｏｎｉｌｉｃ ａｃｉｄ）二ナトリウム、すなわち「ＣＣＡ」；Ｔａｋｅｕｃｈｉら、Ａｇｅｎｔｓ Ａｃｔｉｏｎｓ ３６：３１２～３１６、１９９２）；サリドマイド；Ａｎｇｏｓｔａｔｉｃステロイド；ＡＧＭ－１４７０；カルボキシアミノイミダゾール（ｃａｒｂｏｘｙａｍｉｎｏｌｍｉｄａｚｏｌｅ）；およびメタロプロテイナーゼインヒビター（例えば、ＢＢ９４）。

【０５２５】

（細胞レベルでの疾患）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアンタゴニストもしくはアゴニストによって処置または検出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には、癌（例えば、濾胞性リンパ腫、ｐ５３変異を有する癌腫、およびホルモン依存性腫瘍、これらは以下：結腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、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、カポージ肉腫および卵巣癌を含むが、これらに限定されない）；自己免疫障害（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（Ｂｅｈｃｅｔ’ｓ ｄｉｓｅａｓｅ）、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ならびに慢性関節リウマチ）およびウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス）、炎症、対宿主性移植片病、急性移植片拒絶、ならびに慢性移植片拒絶、が挙げられる。好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアンタゴニストは、特に上記に列挙される、癌の増殖、進行、および／または転移（ｍｅｔａｓｉｓ）を阻害するために使用される。

【０５２６】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置あるいは検出され得る細胞生存の増大に関連するさらなる疾患または状態には、悪性疾患の進行および／または転移ならびに以下のような関連する障害が挙げられるが、これらに限定されない：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、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む）を含む）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球性白血病））、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、Ｈ鎖病、ならびに固形腫瘍（肉腫および癌腫（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（ｅｎｄｏｔｈｅｌｉｏｓａｒｃｏｍａ）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、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、気管支原生癌、腎細胞癌、肝細胞癌腫、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫（ｍｅｎａｎｇｉｏｍａ）、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫）を含むが、これらに限定

されない）。

【０５２７】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置あるいは検出され得るアポトーシスの増大に関連する疾患には、以下が挙げられる：ＡＩＤＳ；神経変性障害（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、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または以前に関連した疾患）；自己免疫障害（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（Ｂｅｈｃｅｔ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）、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ならびに慢性関節リウマチ）、脊髄形成異常症候群（例えば、再生不良性貧血）、対宿主性移植片病、虚血性傷害（心筋梗塞、発作および再灌流傷害によって生じるようなもの）、肝臓傷害（例えば、肝炎関連肝臓傷害、虚血／再灌流傷害、胆汁うっ滞（ｃｈｏｌｅｓｔｏｓｉｓ）（胆管傷害）および肝臓癌）；毒物誘導性肝臓疾患（アルコールによって引き起こされるようなもの）、敗血症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。

【０５２８】

（創傷治癒および上皮細胞増殖）

本発明のなおさらなる局面に従って、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストを、治療目的のため、例えば、創傷治癒の目的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するため、ならびに毛包生成および皮膚創傷の治癒を刺激するために、利用するプロセスが提供される。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、以下を含む創傷治癒を刺激する際に臨床的に有用であり得る：外科的創傷、切除の創傷、深い創傷（真皮および表皮の損傷を含む）、眼組織の創傷、歯組織の創傷、口腔創傷、糖尿病性潰瘍、皮膚の潰瘍、肘の潰瘍、動脈の潰瘍、静脈うっ滞潰瘍、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る全身性処置に関連する合併症。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、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。

【０５２９】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、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（ａｕｔｏｅｐｄｅｒｍｉｃ　ｇｒａｆｔ）、無血管性（ａｖａｃｕｌａｒ）移植片、ブレアーブラウン移植片、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、全層皮膚移植片、異種移植片（ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ　ｇｒａｆｔ）、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、オリエーティールシュ移植片、大網移植片、パッチの移植片（ｐａｔｃｈ　ｇｒａｆｔ）、茎状移植片、全層移植片（ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎｇ　ｇｒａｆｔ）、分層植皮片（ｓｐｌｉｔ　ｓｋｉｎ　ｇｒａｆｔ）、分層植皮片（ｔｈｉｃｋ　ｓｐｌｉｔ　ｇｒａｆｔ）。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、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。

【０５３０】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、肝細胞増殖、および肺、乳房、膵臓、胃、小腸（ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｓｔｉｎｇ）、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。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、

上皮細胞（例えば、皮脂細胞（ｓｅｂｏｃｙｔｅ）、毛包、肝細胞、ＩＩ型肺胞上皮細胞（ｔｙｐｅ　ＩＩ　ｐｎｅｕｍｏｃｙｔｅ）、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。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、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。

【０５３１】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、照射、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低減するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、小腸粘膜に対して細胞保護的な（ｃｙｔｏｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ）効果を有し得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、化学療法およびウイルス感染から生じる粘膜炎（ｍｕｃｏｓｉｔｉｓ）（口潰瘍）の治癒を刺激し得る。

【０５３２】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、熱傷を含む、完全な厚さ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）、乾癬のような他の皮膚欠損の処置においてさらに使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、表皮水疱症（これらの損傷の再上皮形成を促進することによる頻繁な開放性かつ疼痛性の水疱を生じる、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。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、胃潰瘍および十二指腸（ｄｏｕｄｅｎａｌ）潰瘍を処置し、そして粘膜の内層の瘢痕形成ならびに腺の粘膜および十二指腸の粘膜の内層の再生による治癒を、より迅速に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、それぞれ、小腸または大腸の粘膜表面の破壊を生じる疾患である。従って、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、粘膜表面の再表面形成（ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ）を促進して、より迅速な炎症性腸疾患の治癒を補助し、そして炎症性腸疾患の進行を予防するために、使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストを用いる処置は、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、そして摂取された有害な物質からかまたは外科手術後に、腸粘膜を有害な物質から保護するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたアンタゴニストは、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。

【０５３３】

さらに、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、種々の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。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、急性または慢性の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（ｂｒｏｃｈｉｏｌａｒ）上皮の増殖および分化を刺激し得、そしてその修復を促進し得る。例えば、肺胞（ａｖｅｏｌｉ）の進行性の損失を生じる気腫、および細気管支上皮および肺胞の壊死を生じる吸入傷害（ｉｎｈａｌａｔｉｏｎ　ｉｎｊｕｒｙ）（すなわち、煙の吸入および熱傷から生じる）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使用して、効果的に処置され得る。また、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、ＩＩ型肺胞上皮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、未熟な乳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）のような疾患を処置または予防するのを助け得る。

【０５３４】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニス

トは、肝細胞の増殖および分化を刺激し得、従って、肝臓の疾患および病状（例えば、肝硬変により生じる劇症肝不全、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（ｃａｒｂｏｎ　ｔｅｔｒａｈｏｌｏｒｉｄｅ）、および当該分野で公知の他の肝臓毒素）により生じる肝臓損傷）を緩和または処置するために用いられ得る。

【０５３５】

さらに、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、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型糖尿病およびＩＩ型糖尿病と診断された患者において、いくらかの島細胞機能が残っている場合、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、その疾患の永続的な発現を、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、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、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。

【０５３６】

（神経活性および神経学的疾患）

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよびアゴニストもしくはアンタゴニストは、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／または処置に用いられ得る。本発明の組成物（例えば、ＩＬ－６様ポリペプチド、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニスト）を用いて処置され得る神経系の障害としては、軸索の切断、ニューロンの減少もしくは変性、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または障害が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法に従って、患者（ヒト患者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には、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、神経系の一部分を切断する病変、または圧縮損傷を含む）；（３）悪性病変（ここで、神経系の一部分は、神経系関連悪性疾患もしくは非神経系組織由来の悪性疾患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、神経系の一部分は、例えば、膿瘍による感染の結果として、破壊または損傷されるか、あるい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と関連するか、ライム病、結核、梅毒に関連する）；（５）変性病変（ここで、神経系の一部分は、変性プロセスの結果として破壊または損傷され、これには、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンティングトン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）；（６）栄養性の疾患または障害に関連する病変（ここで、神経系の一部分は、栄養障害または代謝障害によって破壊または損傷され、これには、ビタミンＢ１２欠乏症、葉酸欠乏症、ヴェルニッケ病、タバコ－アルコール弱視、マルキアファーヴァ－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）；（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）毒性物質（アルコール、鉛または特定の神経毒を含む）により生じる病変；ならびに（９）脱髄性病変（ここで、神経系の一部分は、脱髄性執権によって破壊または損傷され、これには、多発性硬化症、ヒト免疫不全ウイルス関連脊髄障害、横断脊髄障害または種々の病因、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）。

【０５３７】

１つの実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳低酸素症の損傷効果から神経細胞を保護するために用い

られる。さらに好ましい実施形態では、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳低酸素症の損傷効果から神経細胞を防御するために用いられる。この実施形態によると、本発明の組成物は、大脳低酸素症に関連する神経細胞損傷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つの非排他的局面において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳虚血と関連する神経細胞損傷を処置、または予防するために用いられる。この実施形態の非限定的な別の局面において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳梗塞に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。

【０５３８】

別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、発作に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。特定の局面において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、発作に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。

【０５３９】

別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、心臓発作に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。特定の局面において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、心臓発作に関連する大脳神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。

【０５４０】

神経系障害を処置または予防するの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って、選択され得る。例えば、制限する目的ではないが、以下の効果のいずれかを誘発する本発明の組成物は、本発明によると有用であり得る：（１）低酸素症または低酸素状態の存在または非存在のいずれかにおいて、培地におけるニューロンの生存時間の増加；（２）培地またはインビボにおけるニューロンの出芽の増大；（３）培地またはインビボ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して、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）インビボにおけるニューロン機能障害の軽減した症状。このような効果は、当該分野で公知の任意の方法によって測定され得る。好ましくは、非制限的な実施形態において、ニューロンの生存の増大は、本明細書中に記載される方法、またはそうでなければ当該分野で公知の方法（例えば、Ｚｈａｎｇら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９７：３６３７～４２（２０００）、またはＡｒａｋａｗａら（Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．１０：３５０７～３５１５（１９９０））に記載される方法）を使用して慣用的に測定され得；ニューロンの増加した出芽は、当該分野で公知の方法（例えば、Ｐｅｓｔｒｏｎｋら（Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｌ．７０：６５～８２（１９８０））またはＢｒｏｗｎら（Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．４：１７～４２（１９８１））に記載される方法）によって検出され得；ニューロン関連分子の増加した産生は、当該分野で公知の技術を使用し、測定されるべき分子に基づいて、バイオアッセイ、酵素アッセイ、抗体結合、ノザンブロットアッセイなどによって、測定され得；そして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って、測定され得る。

【０５４１】

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の障害には、運動ニューロンおよび神経系の他の成分に影響を与え得る障害（例えば、梗塞、感染、毒素への暴露、外傷、外科的損傷、変性疾患、または悪性疾患）、ならびにニューロンに選択的に影響する障害（例えば、筋萎縮性側索硬化症）が挙げられるが、これらに限定されず、そしてこれには、進行性脊髄性筋萎縮症、進行性球延髄麻痺、原発性側索硬化症、小児筋

萎縮および若年性筋萎縮、小児期の進行性球麻痺（ファチオ－ロンデ病）、ポリオおよびポリオ後症状、ならびに遺伝性運動感覚性神経障害（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。

【０５４２】

さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、ニューロン生存、シナプス形成；伝達；神経分化などにおいて役割を果たし得る。従って、本発明の組成物（ＩＬ－６様ポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびアゴニストまたはアンタゴニストを含む）は、学習および／または認識の障害を含むがこれに限定されない、これらの役割に関連する疾患または障害を、診断、および／または処置または予防するのに用いられ得る。本発明の組成物は、神経変性性疾患状態および／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性疾患状態および／または行動障害としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ツレット症候群、精神分裂病、躁病、痴呆、偏執症、強迫性障害、恐慌性障害、学習障害、ＡＬＳ、精神病、自閉、および行動変化（栄養補給、睡眠パターン、平衡、および知覚の障害を含む）。さらに、本発明の組成物は、また発生中の胚、または伴性障害に関連する発生の障害の処置、予防および／または検出において役割を果たし得る。

【０５４３】

さらに、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、および／またはアゴニストまたはアンタゴニストは、以下を含むが挙げられるがこれらに限定されない脳血管障害に関連する、疾患、傷害、障害または、損傷から、神経細胞を防御するのに有用であり得る：頚動脈疾患（例えば、頚動脈血栓症、頚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、大脳動脈瘤、脳無酸素症、大脳動脈硬化症、大脳動静脈奇形、大脳動脈疾患、脳塞栓症および血栓（例えば、頚動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群）、脳内出血（例えば、硬膜外血腫もしくは硬膜下血腫、またはクモ膜下血腫）、脳虚血（例えば、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群、または椎骨脳底不全（ｖｅｒｔｅｂｒｏｂａｓｉｌａｒ　ｉｎｓｕｆｆｉｃｉｅｎｃｙ））、血管性痴呆（例えば、多発脳梗塞性痴呆）、脳室周囲白質軟化症、ならびに血管性頭痛（例えば、群発性頭痛）。

【０５４４】

本発明のなおさらなる局面によれば、治療目的で、例えば神経学的細胞増殖および／または分化を刺激するために、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストを利用するためのプロセスが提供される。従って、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストは、神経学的疾患を処置、および／または検出するために用いられ得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の神経系疾患または傷害のマーカーまたは検出因子として用いられ得る。

【０５４５】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得る神経学的疾患の例としては、以下が挙げられる：脳疾患（例えば、母系フェニルケトン尿症のようなフェニルケトン尿症を含む代謝性脳疾患）、ピルビン酸カルボキシラーゼ欠乏症、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠乏症、ヴェルニッケ脳障害、脳水腫、テント下（ｉｎｆｒａｔｅｎｔｏｒｉａｌ）新生物を含む小脳性新生物のような脳新生物、脈絡叢新生物のような脳室新生物、視床下部性新生物、テント上新生物、キャナヴァン病、毛細血管拡張性運動失調のような脊髄小脳性退化を含む小脳性運動失調のような小脳疾患、小脳性共同運動障害、フリードライヒ失調症、マチャドージョセフ病、オリーブ橋小脳萎縮、テント下新生物のような小脳性新生物、びまん性軸周囲性脳炎、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汎脳炎のようなびまん性脳硬化。

【０５４６】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストは、を用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：

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、大脳動脈瘤、脳無酸素症、大脳動脈硬化症、大脳動静脈奇形、大脳動脈疾患、脳塞栓症、ならびに頸動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群のような脳塞栓症および血栓症、硬膜上血腫、硬膜下血腫およびクモ膜下出血のような脳出血、脳亀裂骨折、一過性脳虚血のような脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群および椎骨脳底不全（ｖｅｒｔｅｂｒｏｂａｓｉｌａｒ　ｉｎｓｕｆｆｉｃｉｅｎｃｙ）、多発脳梗塞性痴呆のような血管性痴呆、脳室周囲白質軟化症、群発性頭痛および片頭痛のような血管性頭痛。

【０５４７】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては以下が挙げられる：エイズ痴呆複合症のような痴呆症、アルツハイマー病およびクロイツフェルト－ヤーコプ病のような初老期痴呆、アルツハイマー病および進行性核上性麻痺のような老年痴呆、多発脳梗塞性痴呆のような血管性痴呆、びまん性軸周囲性脳炎のような脳炎、流行性脳炎、日本脳炎、セントルイス脳炎、マダニ媒介性脳炎および西ナイル熱のようなウイルス性脳炎、急性播種性脳脊髄炎、ブドウ膜髄膜炎症候群、脳炎後パーキンソン病および亜球性硬化性汎脳炎のような髄膜脳脊髄炎、室周白斑症のような脳軟化症、点頭痙攣を含む全身てんかんのようなてんかん、アプサンスてんかん（ａｂｓｅｎｃｅ　ｅｐｉｌｅｐｓｙ）、ＭＥＲＲＦ症候群を含むミオクローヌスてんかん、強直・間代てんかん、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のような部分てんかん、外傷後てんかん、持続性部分てんかんのようなてんかん重積持続状態、ハレルフォルデン－シュパッツ症候群。

【０５４８】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：ダンディ－ウォーカー症候群および正常圧水頭症のような水頭症、視床下部性新生物のような視床下部性疾患、大脳マラリア、脱力発作を含むナルコレプシー、延髄ポリオ（ｂｕｌｂａｒ　ｐｏｉｏｍｙｅｌｉｔｉｓ）、大脳偽腫瘍、レット症候群、ライ症候群、視床疾患、大脳トキソプラスマ症、頭蓋内結核腫およびツェルヴェーガー症候群、エイズ痴呆複合症のような中枢神経系感染、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、ウマの脳脊髄炎のような脳脊髄炎、ベネズエラウマ脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、ビスナ、ならびに大脳マラリア。

【０５４９】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：クモ膜炎のような髄膜炎、リンパ球性脈絡髄膜炎を含むウイルス性髄膜炎のような無菌性髄膜炎、ヘモフィルス髄膜炎を含む細菌性髄膜炎、リステリア髄膜炎、ウォーターハウス－フリーデリックセン症候群のような髄膜炎菌性脳脊髄膜炎、肺炎球菌髄膜炎および髄膜結核症、クリプトコックス髄膜炎のような真菌性髄膜炎、硬膜下滲出、ブドウ膜髄膜脳炎症候群のような髄膜脳炎、横行脊髄炎（ｔｒａｎｓｖｅｒｓｅ　ｍｙｅｌｉｔｉｓ）のような脊髄炎、脊髄ろうのような神経梅毒、延髄ポリオおよびポリオ後症候群を含むポリオ、プリオン病（例えば、クロイツフェルト－ヤーコプ病、ウシの海綿状脳症、ゲルストコン－シュトロイスラー症候群、クールー、スクラピー）、ならびに大脳トキソプラスマ症。

【０５５０】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：テント下新生物のような小脳性新生物を含む脳新生物のような中枢神経系新生物、脈絡叢新生物、視床下部性新生物およびテント上新生物のような脳室新生物、髄膜新生物、硬膜外新生物を含む脊髄新生物、キャナヴァン病のような脱髄疾患、副腎脳白質ジストロフィーを含むびまん性大脳硬化症（ｄｉｆｆｕｓｅ　ｃｅｒｅｂｒａｌ　ｓｃｅｌｏｒｉｓ）、びまん性軸周囲性脳炎、球様細胞白質萎縮症、異染性白質萎縮症のようびまん性大脳硬化症、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、横行脊髄炎、視神経脊髄炎、スクラピー、脊柱前弯症、慢性疲労症候群、ビスナ、高圧神経質症候群（Ｈｉｇｈ　Ｐｒｅｓｓｕｒｅ　Ｎｅｒｖｏｕｓ　Ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、髄膜症、先天性筋無緊張症のような脊髄疾患、筋萎縮性側索硬化症、ヴェルドニッヒ－ホフマン病のような棘筋萎縮、脊髄圧搾、硬膜外新生物のような脊髄新生物、脊髄空洞症、脊髄ろう、スティッフマン症候群、母親由来１５　ｑ－１３微少欠損のような精神遅滞、ネコ鳴き症候群、ド・ランゲ症候群、ダウン症候群、ガングリオシドーシスＧ（Ｍ１）のようなガングリオシドーシス、ザントホフ病、テイ－サックス病、ハートナップ病、ホモシスチン尿症、ローレンス－ムーン－ビードル症候群、レッシュ－ナイハン症候群、カエデシロップ病、フコース蓄積症のようなムコリピドーシス、ニューロンセロイド脂褐素沈着症、眼脳腎症候群、母系フェニルケトン尿のようなフェニルケトン尿症、プラーダー－ヴィリ症候群、レット症候群、ルービンスタイン－テービ症候群、結節硬化症、ＷＡＧＲ症候群、全前脳症のような神経系異常、水無能症（ｈｙｄｒａｎｇｅｎｃｅｐｈａｌｙ）を含む無能症のような神経管不全、アルノルト－キアーリ奇形、脳ヘルニア、髄膜瘤、髄膜脊髄瘤、嚢胞性二分脊椎および潜在性二分脊椎のような脊髄癒合不全。

【０５５１】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：シャルコー－マリー疾患を含む遺伝性の運動および感覚ニューロン障害、遺伝性視覚萎縮症、レフスム病、遺伝性痙性対麻痺、ヴェルドニッヒ－ホフマン病、先天性痛覚脱失症および家族性自律神経障害のような遺伝性感覚および自律性ニューロパシー、神経学的症状発現（例えば、ゲルストマン症候群を含む失認）、逆向性健忘症のような健忘症、失行症、神経因性膀胱、脱力発作、難聴、部分聴覚欠失、大声（ｌｕｄｎｅｓｓ）レクルートメントおよび耳鳴を含む聴覚障害のような情報伝達障害、失書症、名称失語症、ブロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む失語症のような言語障害、急性失読症のような失読症、言語発達障害、名称失語症、ブロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む失語症のような発語障害、蓄積障害、構語障害、反響言語、無言症およびどもりを含む発語障害のような情報伝達障害、失声症および嗄声のような発声障害、除脳硬直状態、せん妄、線維束性攣縮、幻覚、髄膜症、母親由来１５　ｑ－１３微少欠損、運動失調、アテトーシス、舞踏病、失調症、運動低下症、筋肉緊張低下、ミオクローヌス、チック、斜頸および振せんのような運動障害、スティッフマン症候群のような筋肉硬直のような筋肉緊張亢進、筋肉痙性、耳帯状疱疹を含む顔面神経麻痺のような神経麻痺、胃不全麻痺、片麻痺、複視のような眼筋麻痺、デュエーン症候群、ホルナー症候群、キーンズ症候群のような慢性進行性外眼筋麻痺症、球麻痺、熱帯性痙攣不全対麻痺、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のような対麻痺、不全麻痺、幻肢、無味覚症および味覚不全のような味覚障害、弱視、失明、色覚異常、複視、半盲、視野暗点および準正常視覚（ｓｕｂｎｏｒｍａｌ　ｖｉｓｉｏｎ）のような視覚障害、クライネ－レヴィン症候群、不眠症および夢遊症を含む過眠症のような睡眠障害、開口障害のような痙縮、昏睡、持続性植物状態および失神およびめまいのような意識消失、先天性筋無緊張症のような神経筋疾患、筋萎縮性側索硬化症、ランバート－イートン筋無力症症候群、運動神経疾患、棘筋萎縮、シャルコー－マリー疾患およびヴェルドニッヒ－ホフマン病のような筋萎縮、後ポリオ症候群、筋ジストロフィー、重症筋無力症、萎縮性筋緊張症、先天性筋緊張症、ネマリンミオパシー、家族性期性四肢麻痺、多発性パラミロクローヌス（Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ　Ｐａｒａｍｙｏｃｌｏｎｕｓ）、熱帯性痙攣不全対麻痺およびスティッフマン症候群、先端肢端疼痛症のような末梢神経系疾患、腎アミロイドーシス、アーディー症候群、Ｂａｒｒｅ－Ｌｉｅｏｕ症候群、家族性自律神経障害、ホルナー症候群、反射性交感神経性ジストロフィーおよびシャイ－ドレーガー症候群のような自律神経系疾患、神経線維腫症２を含む聴神経腫のような内耳神経疾患のような脳神経疾患、顔面神経痛のような顔面神経疾患、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性障害、眼振、眼球運動麻痺、デュエーン症候群のような眼筋麻痺、ホルナー症候群、キーンズ症候群を含む慢性進行性外

眼筋麻痺症、内斜視および外斜視のような斜視、動眼神経麻痺、遺伝性眼萎縮症を含む眼萎縮症のような眼神経疾患、視神経円板結晶腔、視神経脊髄炎のような視神経炎、乳頭水腫、三叉神経痛、声帯麻痺、視神経脊髄炎および脊柱前弯症のような脱髄疾患、糖尿病性足のような糖尿病性ニューロパシー。

【０５５２】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：手根管症候群のような神経圧搾症候群、足根管症候群、頸肋症候群のような胸郭出口症候群、尺骨神経圧搾症候群、カウザルギー、頸腕神経痛、顔面神経痛および三叉神経痛のような神経痛、実験的アレルギー性神経炎、眼神経炎、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－マリエ疾患、遺伝性眼萎縮症、レフサム病、遺伝性痙性対麻痺およびヴェルドニッヒ－ホフマン病、遺伝性感覚および自律神経ニューロパシー（先天性痛覚脱失および．家族性自律神経障害を含む）、ＰＯＥＭＳ症候群、坐骨神経痛、味覚性発汗症候群およびテタニー））のような神経炎。

【０５５３】

（感染性疾患）

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、感染因子を処置または検出するために用いられ得る。例えば、免疫応答を増加させることによって、特にＢ細胞および／またはＴ細胞の増殖および分化を増加させることによって、感染性疾患が処置され得る。免疫応答は、既存の免疫応答を増加させるか、または新たな免疫応答を開始させるかのいずれかにより上昇され得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、必ずしも免疫応答を誘発することなく、感染因子を直接阻害し得る。

【０５５４】

ウイルスは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびに／あるいはアゴニストまたはアンタゴニストにより処置または検出され得る疾患または症状を引き起こし得る感染因子の一例である。ウイルスの例としては、以下のＤＮＡおよびＲＮＡのウイルスおよびウイルス科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、ブンヤウイルス科、カルシウイルス科、サルコウイルス科（Ｃｉｒｃｏｖｉｒｉｄａｅ）、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、帯状疱疹）、モノネガウイルス（Ｍｏｎｏｎｅｇａｖｉｒｕｓ）（例えば、パラミクソウイルス科、麻疹ウイルス、ラブドウイルス科）、オルソミクソウイルス科（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、痘瘡またはワクシニア）、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）。これらの科内に入るウイルスは、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：関節炎、細気管支炎（ｂｒｏｎｃｈｉｏｌｌｉｔｉｓ）、ＲＳ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）、日本脳炎、フニン、チングニア、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、バーキットリンパ腫、水痘、出血熱、麻疹、流行性耳下腺炎、パラインフルエンザ、狂犬病、感冒、ポリオ、白血病、風疹、性感染症、皮膚病（例えば、カポージ、いぼ）、およびウイルス血症。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患が処置または検出され得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、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は、以下の処置に使用される：髄膜炎、デング熱、ＥＢＶ、および／または肝炎（例え

ば、Ｂ型肝炎）。さらなる特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、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は、１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使用される。さらに特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、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は、ＡＩＤＳを処置するために使用される。

【０５５５】

同様に、疾患または症状を引き起こし得、かつ本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびに／またはアゴニストまたはアンタゴニストによって処置または検出され得る細菌性因子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の細菌および細菌科ならびに真菌を含むがこれらに限定されない：Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔａｌｅｓ（例えば、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｎｏｒｃａｒｄｉａ）、Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｏｓｉｓ、Ｂａｃｉｌｌａｃｅａｅ（例えば、Ａｎｔｈｒａｘ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄａｃｅａｅ、Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｏｓｉｓ、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ、Ｂｏｒｒｅｌｉａ（例えば、Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、Ｂｒｕｃｅｌｌｏｓｉｓ、Ｃａｎｄｉｄｉａｓｉｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｏｍｙｃｏｓｉｓ、Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｏｓｉｓ、Ｄｅｒｍａｔｏｃｙｃｏｓｅｓ、Ｅ．ｃｏｌｉ（例えば、Ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｇｅｎｉｃ Ｅ．ｃｏｌｉおよびＥｎｔｅｒｏｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（例えば、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ、およびＳａｌｍｏｎｅｌｌａ ｐａｒａｔｙｐｈｉ）、Ｓｅｒｒａｔｉａ、Ｙｅｒｓｉｎｉａ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌｏｓｉｓ、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒｏｓｉｓ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａｔａｌｅｓ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ、Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａｃｅａｅ（例えば、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ｇｏｎｏｒｒｈｅａ、Ｍｅｎｉｇｏｃｏｃｃａｌ）、Ｍｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａｃｅａの感染症（例えば、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｈｅａｍｏｐｈｉｌｕｓ（例えば、Ｈｅａｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ Ｂ型）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａｃｅａｅ、Ｃｈｌａｍｙｄｉａｃｅａｅ、Ｓｙｐｈｉｌｉｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｐｐ．、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃａｌ、Ｍｅｎｉｎｇｉｏｃｏｃｃａｌ、ＰｎｅｕｍｏｃｏｃｃａｌおよびＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ（例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅおよびＢ群Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）。これらの細菌または真菌の科は、以下を含むがこれらに限定されない疾患または症状を引き起こし得る：菌血症、心内膜炎、眼感染症（結膜炎、結核、ブドウ膜炎）、歯肉炎、日和見感染症（例えば、ＡＩＤＳに関連した感染症）、爪周囲炎、プロテーゼ関連感染症（ｐｒｏｓｔｈｅｓｉｓ－ｒｅｌａｔｅｄ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）、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、ネコ引っ掻き病、赤痢、パラチフス熱、食中毒、腸チフス、肺炎、淋病、髄膜炎（例えば、髄膜炎Ａ型およびＢ型）、クラミジア、梅毒、ジフテリア、らい病、パラ結核、結核、狼瘡、ボツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿痂疹、リウマチ熱、猩紅熱、性感染病、皮膚病（例えば、蜂巣炎、皮膚真菌症（ｄｅｒｍａｔｏｃｙｃｏｓｅｓ））、毒血症、尿路感染症、創傷感染症。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、アゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状もしくは疾患を処置または検出し得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、以下を処置するために使用される：破傷風、ジフテリア、ボツリスム、および／またはＢ型髄膜炎。

【０５５６】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、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処置または検出され得る、寄生生物性因子が引き起こす疾患または症状としては以下の科またはクラスが挙げられるがこれらに限定されない：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（Ｄｉｅｎｔａｍｏｅｂｉａｓｉｓ）、交疫、外部寄生生物性（Ｅｃｔｏｐａｒａｓｉｔｉｃ）、ジアルジア鞭毛虫症、蠕虫症、リーシュマニア症、タイレリア症、トキソプラスマ症、トリパノソーマ症、およびトリコモナス（Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ）症、ならびに胞子虫症（Ｓｐｏｒｏｚｏａｎ）（例えば、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｒａｘ、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｉｕｍ、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｍａｌａｒｉａｅおよびＰｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｏｖａｌｅ）。これらの寄生生物は、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：疥癬、ツツガムシ病、眼感染症、腸疾患（例えば、赤痢、ジアルジア鞭毛虫症）、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、およびトキソプラスマ症。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患を処置または検出し得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、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。

【０５５７】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、患者に有効量のポリペプチドを投与するか、または患者から細胞を取り出して、本発明のポリヌクレオチドをこの細胞に供給し、そして操作した細胞を患者に戻す（エキソビボ治療）かのいずれかによるものであり得る。さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドはワクチン中の抗原として用いられて、感染性疾患に対する免疫応答を惹起し得る。

【０５５８】

（再生）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、細胞を分化させ、増殖させ、そして誘引して、組織の再生を導き得る（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７６：５９－８７（１９９７）を参照のこと）。組織の再生を用いて、先天性欠損、外傷（創傷、熱傷、切開、または潰瘍）、加齢、疾患（例えば、骨粗鬆症、変形性関節症（ｏｓｔｅｏｃａｒｔｈｒｉｔｉｓ）、歯周病、肝不全）、美容形成手術を含む手術、線維症、再灌流傷害、もしくは全身性サイトカイン損傷により損傷を受けた組織を修復、置換、または保護し得る。

【０５５９】

本発明を用いて再生し得る組織としては、以下が挙げられる：器官（例えば、膵臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮）、筋肉（平滑筋、骨格筋、または心筋）、血管系（血管およびリンパ管を含む）、神経、造血、および骨格（骨、軟骨、腱、および靭帯）の組織。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、新脈管形成を含み得る。

【０５６０】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、治癒するのが困難な組織の再生を増加させ得る。例えば、腱／靭帯の再生を増大させることによって、損傷後の回復時間が早まる。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、損傷を回避する試みにおいて予防的に使用され得る。処置され得る特定の疾患は、腱炎、手根管症候群、および他の腱欠損または靭帯欠損を含む。非治癒創傷の組織再生のさらなる例としては、褥瘡性潰瘍（ｐｒｅｓｓｕｒｅ ｕｌｃｅｒ）、脈管不全、外科的創傷、および外傷性創傷に関連する潰瘍が挙げられる。

【０５６１】

同様に、神経および脳組織はまた、神経細胞を増殖および分化させるために本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストを使用することによって再生され得る。本方法を用いて処置され得る疾患としては、中枢神経系疾患および末梢神経系疾患、神経障害、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、および発作（ｓｔｏｋｅ）が挙げられる。詳細には、末梢神経傷害と関連する疾患、末梢神経障害（例えば、化学療法または他の医学的療法から生じる）、局在神経障害、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、ハンティングトン病、筋萎縮性側索硬化症、およびシャイ－ドレーガー症候群）はすべて、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置され得る。

【０５６２】

（走化性）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、走化性活性を有し得る。走化性分子は、細胞（例えば、単球、線維芽細胞、好中球、Ｔ細胞、肥満細胞、好酸球、上皮細胞および／または内皮細胞）を、身体内の特定の部位（例えば、炎症、感染、または過剰増殖の部位）に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性を撃退および／または治癒し得る。

【０５６３】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、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を使用して、身体内の特定の位置に標的化した細胞の数を増加させることによって、炎症、感染、過増殖障害、または任意の免疫系障害を処置し得る。例えば、走化性分子を使用して、傷害を受けた位置に免疫細胞を誘引することによって、組織に対する創傷および他の外傷を処置し得る。本発明の走化性分子はまた、線維芽細胞を誘引し得、これは創傷を処置するために使用され得る。

【０５６４】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストが走化性活性を阻害し得ることもまた意図される。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。従って、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、走化性のインヒビターとして使用され得る。

【０５６５】

（結合活性）

本発明のポリペプチドは、このポリペプチドに結合する分子、またはこのポリペプチド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。このポリペプチドとこの分子との結合は、結合したポリペプチド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。そ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、レセプター）、または低分子が挙げられる。

【０５６６】

好ましくは、この分子は、このポリペプチドの天然のリガンド（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ら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１（２）：第５章（１９９１）を参照のこと）。同様に、この分子は、このポリペプチドが結合する天然のレセプター、または少なくとも、このポリペプチドによって結合され得るレセプターのフラグメント（例えば、活性部位）に密接に関連し得る。いずれの場合においても、この分子は、公知の技術を用いて合理的に設計され得る。

【０５６７】

好ましくは、これらの分子についてのスクリーニングは、このポリペプチドを発現する適切な細胞を産生する工程を包含する。好ましい細胞としては、哺乳動物、酵母、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ、またはＥ．ｃｏｌｉ由来の細胞が挙げられる。次いで、このポリペプチドを発現する細胞（または、発現されたポリペプチドを含む細胞膜）を、好ましくは、このポリペプチドまたはこの分子のいずれかの結合、活性の刺激、または活性の阻害を観察するための分子を潜在的に含む試験化合物と接触させる。

【０５６８】

このアッセイは、このポリペプチドへの候補化合物の結合を単純に試験し得、ここで結合は、標識によって、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、候補化合物がこのポリペプチドへの結合によって生成されるシグナルを生じるか否かを試験し得る。

【０５６９】

あるいは、このアッセイは、無細胞調製物、固体支持体に接着されたポリペプチド／分子、化学ライブラリー、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、候補化合物を、ポリペプチドを含む溶液と混合する工程、ポリペプチド／分子の活性または結合を測定する工程、およびポリペプチド／分子の活性または結合を、標準と比較する工程を単純に包含し得る。

【０５７０】

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用いて、サンプル（例えば、生物学的サンプル）におけるポリペプチドのレベルまたは活性を測定し得る。抗体は、ポリペプチドへの直接的もしくは間接的のいずれかの結合、または基質についてのポリペプチドとの競合によって、ポリペプチドのレベルまたは活性を測定し得る。

【０５７１】

さらに、本発明のポリペプチドが結合するレセプターは、当業者に公知の多くの方法（例えば、リガンドパニングおよびＦＡＣＳソーティング（Ｃｏｌｉｇａｎら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎ．，１（２）、第５章（１９９１））によって同定され得る。例えば、ポリアデニル化ＲＮＡがこのポリペプチドに応答する細胞から調製される発現クローニングが用いられ、例えば、ＮＩＨ３Ｔ３細胞（これは、ＦＧＦファミリータンパク質に対する複数のレセプターを含むことが公知である）、およびＳＣ－３細胞、およびこのＲＮＡから作製されたｃＤＮＡライブラリーは、プールに分けられ、そしてこのポリペプチドに応答性でないＣＯＳ細胞または他の細胞をトランスフェクトするために使用される。ガラススライド上で増殖しているトランスフェクトされた細胞は、それらを標識化した後に、本発明のポリペプチドに曝露される。このポリペプチドは、種々の手段（部位特異的プロテインキナーゼに対する認識部位のヨウ素化または封入を含む）によって標識化され得る。

【０５７２】

固定化およびインキュベーション後、スライドは、オートラジオグラフィー分析に供される。陽性プールを同定し、そしてサブプールを、反復性のサププール化および再スクリーニングプロセスを使用して調製および再びトランスフェクトして、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生じる。

【０５７３】

レセプター同定のための代替のアプローチとして、標識ポリペプチドは、細胞膜と光親和性に連結し得るか、またはレセプター分子を発現する調製物を抽出し得る。架橋された材料は、ＰＡＧＥ分析によって分離され、そしてＸ線フィルムに曝露される。ポリペプチドのレセプターを含む標識複合体が切り出され得、ペプチドフラグメントへと分離され得、そしてタンパク質微量配列決定に供され得る。微量配列決定から得られるアミノ酸配列を使用して、１組の縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計してｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングし、推定レセプターをコードする遺伝子を同定する。

【０５７４】

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の技術（集合的に「ＤＮＡシャッフリング」という）を利用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、それによって本発明のポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを効果的に生成する。一般に、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Ｐａｔｔｅｎ，Ｐ．Ａ．ら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：７２４～３３（１９９７）；Ｈａ

ｒａｙａｍａ，Ｓ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６（２）：７６～８２（１９９８）；Ｈａｎｓｓｏｎ，Ｌ．Ｏ．ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８７：２６５～７６（１９９９）；ならびにＬｏｒｅｎｚｏ，Ｍ．Ｍ．およびＢｌａｓｃｏ，Ｒ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２４（２）：３０８～１３（１９９８）（これらの特許および刊行物の各々は、本明細書において参考として援用される）を参照のこと。１つの実施形態において、ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの変更は、ＤＮＡシャッフリングによって達成され得る。ＤＮＡシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的な組換えによる、２つ以上のＤＮＡセグメントの、本発明の分子の所望の分子への構築を含む。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドは、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、本発明のポリペプチドの１つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどは、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、フラグメントなどと組換えられ得る。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。さらに好ましい実施形態において、この異種分子は、例えば、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、インスリン様増殖因子（ＩＧＦ－Ｉ）、トランスホーミング増殖因子（ＴＧＦ）－α、表皮増殖因子（ＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、ＴＧＦ－β、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－７、アクチビンＡおよびアクチビンＢ、デカペンタプレジック（ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ）（ｄｐｐ）、６０Ａ、ＯＰ－２、ドーサリン（ｄｏｒｓａｌｉｎ）、増殖分化因子（ＧＤＦ）、結節（ｎｏｄａｌ）、ＭＩＳ、インヒビン－α、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β５、および神経膠由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）のような増殖因子である。

【０５７５】

他の好ましいフラグメントは、本発明のポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、本発明のポリペプチドの活性に類似の活性を示すが、必ずしも同一ではないフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性、または減少した所望されない活性を含み得る。

【０５７６】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドの作用を調節する化合物を同定するために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、哺乳動物線維芽細胞、本発明のポリペプチド、スクリーニングされるべき化合物および^{3}［Ｈ］チミジンを、線維芽細胞が通常増殖する細胞培養条件下で合わせる工程を包含する。コントロールアッセイは、スクリーニングされるべき化合物の非存在下で実施され得、そしてこの化合物の存在下での線維芽細胞の増殖の量と比較して、各々の場合における^{3}［Ｈ］チミジンの取り込みの決定によって、この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って測定される。アゴニスト化合物およびアンタゴニスト化合物の両方が、この手順により同定され得る。

【０５７７】

別の方法において、本発明のポリペプチドに対するレセプター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おいて標識化した本発明のポリペプチドとともにインキュベートされる。次いで、この化合物がこの相互作用を増強またはブロックする能力が、測定され得る。あるいは、スクリーニングされるべき化合物とレセプターとの相互作用に続く既知のセカンドメッセンジャー系の応答が測定され、そしてこの化合物がこのレセプターに結合し、そしてセカンドメッセンジャー応答を誘発する能力を測定して、この化合物が潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する。このようなセカンドメッセンジャー系には、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。

【０５７８】

これらの上記のアッセイの全ては、診断マーカー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、ポリペプチド／分子を活性化または阻害することによって、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ポリペプチドの産生を阻害または増強し得る因子を発見し得る。

【０５７９】

従って、本発明は、以下の工程を含む本発明のポリペプチドに結合する化合物を同定する方法を包含する：（ａ）候補結合化合物を本発明のポリペプチドとともにインキュベートする工程；および（ｂ）結合が生じたか否かを決定する工程。さらに、本発明は、以下の工程を含むアゴニスト／アンタゴニストを同定する方法を包含する：（ａ）候補化合物を本発明のポリペプチドとともにインキュベートする工程、（ｂ）生物学的活性をアッセイする工程、および（ｂ）ポリペプチド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。

【０５８０】

（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、本発明のポリペプチドについてのレセプターを発現する標的化細胞、または本発明のポリペプチドの細胞結合形態を発現する細胞に送達する方法を提供する。

【０５８１】

本明細書中で議論される場合、本発明のポリペプチドまたは抗体は、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／または共有結合性の相互作用を介して会合し得る。１つの実施形態において、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ポリペプチド（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。１つの例において、本発明は、治療タンパク質を標的化細胞中へ送達するための方法を提供する。別の例において、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）あるいは二本鎖核酸（例えば、細胞のゲノムに組み込まれ得るか、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、標的化細胞に送達するための方法を提供する。

【０５８２】

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ポリペプチド（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。

【０５８３】

「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、以下が挙げられるが、これらに限定されない：当該分野で公知の放射性同位体、固有のまたは誘導された内因性の細胞傷害性エフェクター系を結合する化合物（例えば、抗体（またはその補体固定を含む部分））、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、ＲＮＡｓｅ、α毒素、リシン、アブリン、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抗ウイルスタンパク質、α－サルシン（ｓａｒｃｉｎ）およびコレラ毒素。「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って、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。

【０５８４】

（薬物スクリーニング）

本発明のポリペプチド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、本発明のポリペプチド、またはこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用が、さらに意図される。このような方法は、本発明のポリペプチドを、アンタゴニスト活性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、および結合に続いてこれらのポリペプチドの活性をアッセイする工程を包含する。

【０５８５】

本発明は、種々の薬物スクリーニング技術のいずれかにおいて、本発明のポリペプチド、またはそれらの結合フラグメントを使用することによって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。このような試験に用いられるポリペプチドまたはフラグメントは、固体支持体に固定化され得、細胞表面上に発現され得、溶液中で遊離であり得、または細胞内に局在化され得る。薬物スクリーニングの１つの方法は、ポリペプチドまたはフラグメントを発現する組換え核酸を用いて安定に形質転換される真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を利用する。薬物は、競合結合アッセイにおいて、このような形質転換細胞に対してスクリーニングされる。例えば、試験されている薬剤と本発明のポリペプチドとの間の複合体の形成（ｆｏｒｍｕｌａｔｏｎ）を測定し得る。

【０５８６】

従って、本発明は、本発明のポリペプチドによって媒介される活性に影響を及ぼす薬物または任意の他の薬剤についてのスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、当該分野で周知の方法によって、このような薬剤を本発明のポリペプチドもしくはそのフラグメントと接触させる工程、およびこの薬剤とこのポリペプチドもしく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工程を包含する。このような競合結合アッセイにおいて、スクリーニングされる薬剤は、代表的に、標識化される。インキュベーション後に、遊離の薬剤は、結合形態で存在する薬剤から分離され、そして遊離または複合体化されていない標識の量は、特定の薬剤が本発明のポリペプチドに結合する能力の尺度である。

【０５８７】

薬物スクリーニングについての別の技術は、本発明のポリペプチドに対する適切な結合親和性を有する化合物に対するハイスループットスクリーニングを提供し、そして欧州特許出願８４／０３５６４（１９８４年９月１３日公開）（これは、本明細書中で参考として援用される）に非常に詳細に記載される。簡潔にいうと、大量の異なる小さなペプチド試験化合物は、固体基材（例えば、プラスチックピンまたは何らかの他の表面）上で合成される。ペプチド試験化合物を、本発明のポリペプチドと反応させ、そして洗浄する。次いで、結合したポリペプチドは、当該分野で周知の方法によって検出される。精製されたポリペプチドは、前述の薬物スクリーニング技術での使用のためにプレート上に直接コーディングされる。さらに、非中和抗体を使用して、このペプチドを捕捉し得、そして固体支持体上にそれを固定し得る。

【０５８８】

本発明はまた、競合薬物スクリーニングアッセイの使用を意図し、ここで、本発明のポリペプチドを結合し得る中和抗体は、ポリペプチドまたはそのフラグメントに対する結合について試験化合物と特異的に競合する。この様式において、抗体を使用して、本発明のポリペプチドと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。

【０５８９】

（アンチセンスおよびリボザイム（アンタゴニスト））

特定の実施形態において、本発明に従うアンタゴニストは、配列番号Ｘに含まれる配列またはその相補鎖に対応する核酸、および／あるいは表１で同定するｃＤＮＡプラスミドＶに含まれるヌクレオチド配列に対応する核酸である。１つの実施形態において、アンチセンス配列は、生物体により内部で生成され、別の実施形態において、アンチセンス配列は別々に投与される（例えば、Ｏ’Ｃｏｎｎｏｒ，Ｊ．，Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６：５６０（１９９１）を参照のこと）。Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，

ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８）。アンチセンス技術を使用して、アンチセンスＤＮＡもしくはＲＮＡを通してか、または３重らせんの形成を通して遺伝子発現を制御し得る。アンチセンス技術は、例えば、Ｏｋａｎｏ，Ｊ．，Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６：５６０（１９９１）；Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８）に考察される。３重らせん形成は、例えば、Ｌｅｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６：３０７３（１９７９）；Ｃｏｏｎｅｙら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４１：４５６（１９８８）；およびＤｅｒｖａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５１：１３００（１９９１）において考察される。これらの方法は、相補的なＤＮＡまたはＲＮＡへのポリヌクレオチドの結合に基づく。

【０５９０】

例えば、非リンパ性白血病細胞株ＨＬ－６０および他の細胞株の増殖を阻害するためのｃ－ｍｙｃおよびｃ－ｍｙｂアンチセンスＲＮＡ構築物の使用は、以前に記載された（Ｗｉｃｋｓｔｒｏｍら（１９８８）；Ａｎｆｏｓｓｉら（１９８９））。これらの実験は、細胞をオリゴリボヌクレオチドとインキュベーションすることによってインビトロで行われた。インビボ用途のための類似の手順は、ＷＯ９１／１５５８０に記載される。簡単には、所定のアンチセンスＲＮＡについてのオリゴヌクレオチドの対は、以下のように生成される：オープンリーディングフレームの最初の１５塩基に相補的な配列を、５末端のＥｃｏＲＩ部位および３末端のＨｉｎｄＩＩＩ部位に隣接させる。次に、オリゴヌクレオチドの対は、９０℃で１分間加熱され、次いで２×連結緩衝液（２０ｍＭ ＴＲＩＳ ＨＣｌ ｐＨ７．５、１０ｍＭ $MgCl_2$、１０ｍＭ ジチオスレイトール（ＤＴＴ）および０．２ｍＭ ＡＴＰ）中でアニーリングされ、次いで、レトロウイルスベクターＰＭＶ７のＥｃｏＲ１／ＨｉｎｄＩＩＩ部位に連結される（ＷＯ９１／１５５８０）。

【０５９１】

例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの５’コード部分を使用して、約１０～４０塩基対長のアンチセンスＲＮＡオリゴヌクレオチドを設計し得る。ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、転写に関与する遺伝子の領域に相補的であるように設計され、それにより転写およびレセプターの産生を阻害する。アンチセンスＲＮＡオリゴヌクレオチドは、インビボでｍＲＮＡにハイブリダイズし、そしてｍＲＮＡ分子のレセプターポリペプチドへの翻訳をブロックする。

【０５９２】

１つの実施形態において、本発明のアンチセンス核酸は、外来の配列からの転写により細胞内で産生される。例えば、ベクターまたはその一部が転写され、本発明のアンチセンス核酸（ＲＮＡ）を産生する。このようなベクターは、このアンチセンス核酸をコードする配列を含む。このようなベクターは、それが転写されて所望のアンチセンスＲＮＡを産生し得る限り、エピソームを保持し得るか、または染色体に組込まれ得る。このようなベクターは、当該分野において標準的な組換えＤＮＡ技術方法により構築され得る。ベクターは、脊椎動物細胞において複製および発現のために使用される、当該分野で公知のプラスミド、ウイルスなどであり得る。本発明のポリペプチドをコードする配列またはそのフラグメントの発現は、脊椎動物、好ましくはヒト細胞において作用することが当該分野で公知の任意のプロモーターにより得る。そのようなプロモーターは、誘導性または構成性であり得る。このようなプロモーターとしては、ＳＶ４０初期プロモーター領域（ＢｅｒｎｏｉｓｔおよびＣｈａｍｂｏｎ、Ｎａｔｕｒｅ、２９：３０４－３１０（１９８１））、ラウス肉腫ウイルスの３’長末端反復に含まれるプロモーター（Ｙａｍａｍｏｔｏら、Ｃｅｌｌ、２２：７８７－７９７（１９８０））、ヘルペスチミジンプロモーター（Ｗａｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７８：１４４１－１４４５（１９８１））、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Ｂｒｉｎｓｔｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ、２９６：３９－４２（１９８２））などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０５９３】
本発明のアンチセンス核酸は、少なくとも本発明の遺伝子のＲＮＡ転写物の一部に相補的な配列を含む。しかし、完全に相補的であることは好ましいが、必要ではない。本明細書中で言及される「少なくともＲＮＡの一部に相補的な」配列は、ＲＮＡとハイブリダイズし得るに十分な相補性を有し、安定な二重鎖を形成する配列を意味し；従って、本発明の二本鎖アンチセンス核酸の場合において、二重鎖ＤＮＡの一本鎖が試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、ＲＮＡとのより多くの塩基ミスマッチを含み得、これは、安定な二重鎖（または三重鎖の場合もあり得る）を含み得、そしてなお形成し得る。当業者は、ハイブリダイズ複合体の融点を決定するために標準的な手順を使用することによりミスマッチの許容の程度を確認し得る。

【０５９４】
メッセージの５’末端に相補的であるオリゴヌクレオチド（例えば、ＡＵＧ開始コドンまででかつＡＵＧ開始コドンを含む５’非翻訳配列）は、翻訳の阻害の際に最も効率的に働くべきである。しかし、ｍＲＮＡの３’非翻訳配列に相補的な配列は、同様にｍＲＮＡの翻訳を阻害する際に有効であることが示された。一般的に、Ｗａｇｎｅｒ，Ｒ．、Ｎａｔｕｒｅ　３７２：３３３－３３５（１９９４）を参照のこと。従って、本明細書中に記載されるポリヌクレオチド配列の５’－または３’－の非翻訳非コード領域のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性ｍＲＮＡの翻訳を阻害するアンチセンスアプローチに使用され得る。ｍＲＮＡの５’非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、ＡＵＧ開始コドンの相補物を含むべきである。ｍＲＮＡコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、翻訳のあまり効率的でないインヒビターであるが、本発明に従って使用され得る。本発明のｍＲＮＡの５’領域、３’領域またはコード領域にハイブリダイズするように設計されるか否かにかかわらず、アンチセンス核酸は、少なくとも６ヌクレオチド長であるべきであり、そして好ましくは６～約５０ヌクレオチド長にわたるオリゴヌクレオチドである。特定の局面において、このオリゴヌクレオチドは、少なくとも１０ヌクレオチド、少なくとも１７ヌクレオチド、少なくとも２５ヌクレオチドまたは少なくとも５０ヌクレオチドである。

【０５９５】
本発明のポリヌクレオチドは、ＤＮＡ、もしくはＲＮＡ、またはキメラ混合物、あるいはそれらの誘導体もしくは改変バージョン、一本鎖、または二本鎖であり得る。このオリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で改変されて、例えば、分子の安定性、ハイブリダーゼーションなどを改善し得る。このオリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加基（例えば、インビボにおいて宿主細胞レセプターを標的化するために）、または細胞膜を通した輸送を促進する因子（例えば、Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８６：６５５３－６５５６（１９８９）；Ｌｅｍａｉｔｒｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８４：６４８－６５２（１９８７）；ＰＣＴ公開番号ＷＯ８８／０９８１０（１９８８年１２月１５日公開）を参照のこと）、または血液脳関門（例えば、ＰＣＴ公開番号ＷＯ８９／１０１３４（１９８８年４月２５日公開）を参照のこと）、ハイブリダイゼーション誘引切断剤（ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ－ｔｒｉｇｇｅｒｅｄ　ｃｌｅａｖａｇｅ　ａｇｅｎｔ）（例えば、Ｋｒｏｌら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、６：９５８－９７６（１９８８）を参照のこと）、またはインターカレート剤（例えば、Ｚｏｎ，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．５：５３９－５４９（１９８８）を参照のこと）を含み得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダーゼーション誘引架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘引切断剤など）に結合体化され得る。

【０５９６】
アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの改変された塩基部分を含み得、この塩基部分は、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される：５－フルオロウラ

シル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルキューオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルキューオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン（ｗｙｂｕｔｏｘｏｓｉｎｅ）、プソイドウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、および２，６－ジアミノプリン。

【０５９７】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも１つの改変された糖部分を含み得る：アラビノース、２－フルオロアラビノース、キシルロース、およびヘキソース。

【０５９８】

さらなる別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも１つの改変されたリン酸骨格を含む：ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミデート（ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄａｔｅ）、ホスホロジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタール（ｆｏｒｍａｃｅｔａｌ）またはそれらのアナログ。

【０５９９】

さらに別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ａ－アノマーオリゴヌクレオチドである。ａ－アノマーオリゴヌクレオチドは、相補的なＲＮＡと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、通常のｂ－ユニットとは反対に、その鎖は互いに平行にする（Ｇａｕｔｉｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１５：６６２５－６６４１（１９８７））。このオリゴヌクレオチドは、２’－０－メチルリボヌクレオチドであるか（Ｉｎｏｕｅら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１５：６１３１－６１４８（１９８７））、またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡアナログである（Ｉｎｏｕｅら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．２１５：３２７－３３０（１９８７））。

【０６００】

本発明のポリヌクレオチドは当該分野で公知の標準的な方法（例えば、自動ＤＮＡ合成機（このような装置はＢｉｏｓｅａｒｃｈ，Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓなどから市販されている）の使用により）合成され得る。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Ｓｔｅｉｎらの方法（Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１６：３２０９（１９８８））により合成され得、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、コントロールドポアガラス（ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｐｏｒｅ ｇｌａｓｓ）ポリマー支持体（Ｓａｒｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．、８５：７４４８－７４５１（１９８８））などの使用により調製され得る。

【０６０１】

コード領域配列に相補的なアンチセンスヌクレオチドが使用され得るが、転写された非翻訳領域に相補的なアンチセンスヌクレオチドが最も好ましい。

【０６０２】

本発明による潜在的なアンタゴニストはまた、触媒ＲＮＡ、すなわちリボザイムを含む（例えば、ＰＣＴ国際公開ＷＯ９０／１１３６４、１９９０年１０月４日公開；Ｓａｒｖｅ

ｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４７：１２２２－１２２５（１９９０）を参照のこと）。一方、部位特異的認識配列でｍＲＮＡを切断するリボザイムを使用して、ｍＲＮＡを破壊し得るが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的ｍＲＮＡと相補的な塩基対を形成する隣接領域により決定される位置で、ｍＲＮＡを切断する。たった１つの必要条件は、標的ｍＲＮＡが以下の２つの塩基配列を有することである：５’－ＵＧ－３’。ハンマーヘッド型リボザイムの構築および生成は当該分野で周知であり、そしてＨａｓｅｌｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ、Ｎａｔｕｒｅ、３３４：５８５－５９１（１９８８）により十分に記載される。配列番号Ｘのヌクレオチド配列内に多くの潜在的なハンマーヘッド型リボザイム切断部位が存在する。好ましくは、このリボザイムは、切断認識部位がｍＲＮＡの５’末端付近に位置するように；すなわち、効率を増大し、そして非機能的ｍＲＮＡ転写物の細胞内蓄積を最小化するように、操作される。

【０６０３】

アンチセンスアプローチの場合、本発明のリボザイムは、改変されたオリゴヌクレオチド（例えば、安定性、標的化などを改良するために）から構成され得、そしてインビボにおいて本発明のポリペプチドを発現する細胞に送達されるべきである。リボザイムをコードするＤＮＡ構築物は、ＤＮＡをコードするアンチセンスの導入のための上記と同じ様式において細胞中に導入され得る。送達の好ましい方法は、強力な構成性プロモーター（例えば、ｐｏｌ　ＩＩＩまたはｐｏｌ　ＩＩプロモーターのような）の制御下で、リボザイムを「コードする」ＤＮＡ構築物を使用することを含み、その結果トランスフェクトした細胞が、内因性メッセージを破壊し、そして翻訳を阻害するに十分な量のリボザイムを生成する。リボザイムはアンチセンス分子と異なり触媒性であるので、より低い細胞内濃度が効率のために必要とされる。

【０６０４】

アンタゴニスト／アゴニスト化合物を利用して、腫瘍性の細胞および組織に対する本発明のポリペプチドの細胞増殖（ｇｒｏｗｔｈ）および増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）効果を阻害し得る。すなわち、腫瘍の新脈管形成を刺激し、それにより異常な細胞成長および増殖を（例えば、腫瘍形成または増殖において）遅延または防止する。

【０６０５】

アンタゴニスト／アゴニストをまた利用して、血管過多の疾患を予防し得、そして水晶体嚢外白内障（ｅｘｔｒａｃａｐｓｕｌａｒ　ｃａｔａｒａｃｔ）手術後の上皮レンズ細胞の増殖を防止し得る。本発明のポリペプチドのマイトジェン活性の防止はまた、例えば、バルーン血管形成術後の再狭窄のような場合に要求され得る。

【０６０６】

アンタゴニスト／アゴニストをまた利用して、創傷治癒の間の瘢痕組織の増殖防止し得る。

【０６０７】

アンタゴニスト／アゴニストをまた利用して、本明細書中に記載される疾患を処置し得る。

【０６０８】

従って、本発明は、障害または疾患（本発明のポリヌクレオチドの過剰発現に関連する、本願の全体に渡って列挙される障害または疾患が含まれるが、これらに限定されない）を処置する方法であって、（ａ）本発明のポリヌクレオチドに関するアンチセンス分子、および／または（ｂ）本発明のポリヌクレオチドに関するリボザイムを、患者に投与することによって処置する方法を提供する。発明、および／または（ｂ）本発明のポリヌクレオチドに関するリボザイム。

【０６０９】

（結合ペプチドおよび他の分子）

本発明はまた、ＩＬ－６様ポリペプチドに結合するポリペプチドおよび非ポリペプチドを同定するためのスクリーニング方法、およびそれによって同定されたＩＬ－６様結合分子を含む。これらの結合分子は、例えば、ＩＬ－６様ポリペプチドのアゴニストおよびアン

タゴニストとして有用である。そ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。

【０６１０】

この方法は、以下の工程を包含する：

ａ．ＩＬ－６様ポリペプチドを多数の分子と接触させる工程；および

ｂ．このＩＬ－６様ポリペプチドに結合する分子を同定する工程。

【０６１１】

ＩＬ－６様ポリペプチドを多数の分子と接触させる工程は、多数の方法によってもたらされ得る。例えば、当業者は、ＩＬ－６様ポリペプチドを固体支持体上に固定化させ、そして多数の分子の溶液を固定化ＩＬ－６様ポリペプチドと接触させることを考え得る。このような手順は、固定化ＩＬ－６様ポリペプチドから構成され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。次いで、ＩＬ－６様ポリペプチド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、ＩＬ－６様ポリペプチドのこの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、そして当業者に周知である。

【０６１２】

あるいは、当業者はまた、多数のポリペプチドを、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分画へ分離し得る。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などポリペプチドの分離に関して当業者に公知の方法によって、分離され得る。個々のポリペプチドはまた、宿主細胞の外部表面上またはほぼ外部表面に発現されるような様式で、形質転換された宿主細胞（例えば、組換えファージ）によって産生され得る。次いで、個々の単離物は、ＩＬ－６様ポリペプチドによって「プローブ化」され得、必要に応じて発現に必要とされるであろうインデューサーの存在下で、ＩＬ－６様ポリペプチド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否かが決定される。ＩＬ－６様ポリペプチドを個々のポリペプチドを含む各分画と接触させる前に、これらの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。そ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。この様式において、陽性クローンは、形質転換宿主細胞の発現ライブラリーの集団（これらは、ＩＬ－６様ポリペプチド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）から同定され得る。さらに、ＩＬ－６様ポリペプチド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、従来の手段によって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。次いで、一次配列が、対応するＤＮＡ配列から推定され得る。アミノ酸配列がポリペプチド自身から決定されるものである場合、微小配列決定技術を使用し得る。この配列決定技術は、質量分析法を含み得る。

【０６１３】

特定の状況において、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ＩＬ－６様ポリペプチドあるいは未結合ポリペプチドのいずれかを、ＩＬ－６様ポリペプチドおよび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、ＩＬ－６様ポリペプチドまたは多数のポリペプチドが固体支持体に結合している場合に、特に望ましくあり得る。

【０６１４】

本方法に従って提供される多数の分子は、多様性ライブラリー（例えば、ＩＬ－６様ポリペプチドへ特異的に結合する分子をスクリーニングし得る無作為またはコンビナトリアルの、ペプチドライブラリーまたは非ペプチドライブラリー）として提供され得る。使用され得る多くのライブラリー（例えば、化学合成ライブラリー、組換えライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）、およびインビトロ翻訳ベースのライブラリー）が、当該分野で公知である。化学合成ライブラリーの例は、以下に記載される：Ｆｏｄ

orら、１９９１、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：７６７－７７３；Ｈｏｕｇｈｔｅｎら、１９９１、Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８４－８６；Ｌａｍら、１９９１、Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４；Ｍｅｄｙｎｓｋｉ、１９９４、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １２：７０９－７１０；Ｇａｌｌｏｐら、１９９４、Ｊ．Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３７（９）：１２３３－１２５１；Ｏｈｌｍｅｙｅｒら、１９９３、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：１０９２２－１０９２６；Ｅｒｂら、１９９４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１１４２２－１１４２６；Ｈｏｕｇｈｔｅｎら、１９９２，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４１２；Ｊａｙａｗｉｃｋｒｅｍｅら、１９９４、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１６１４－１６１８；Ｓａｌｍｏｎら、１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：１１７０８－１１７１２；ＰＣＴ公開ＷＯ９３／２０２４２；ならびにＢｒｅｎｎｅｒおよびＬｅｒｎｅｒ、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：５３８１－５３８３。

【０６１５】

ファージディスプレイライブラリーの例は、以下に記載される：ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０；Ｄｅｖｌｉｎら、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４９：４０４－４０６；Ｃｈｒｉｓｔｉａｎ，Ｒ．Ｂ．ら、１９９２、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７１１－７１８）；Ｌｅｎｓｔｒａ、１９９２、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．１５２：１４９－１５７；Ｋａｙら、１９９３、Ｇｅｎｅ １２８：５９－６５；ならびにＰＣＴ公開番号ＷＯ９４／１８３１８（１９９４年８月１８日）。

【０６１６】

インビトロ翻訳ベースのライブラリーとしては、以下：ＰＣＴ公開番号ＷＯ９１／０５０５８（１９９１年４月１８日）；およびＭａｔｔｈｅａｋｉｓら、１９９４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：９０２２－９０２６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。

【０６１７】

非ペプチドライブラリーの例として、ベンゾジアゼピンライブラリー（例えば、Ｂｕｎｉｎら、１９９４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：４７０８－４７１２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ー（Ｓｉｍｏｎら、１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：９３６７－９３７１）がまた使用され得る。使用され得るライブラリーの別の例は、Ｏｓｔｒｅｓｈら（１９９４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１１１３８－１１１４２）によって記載され、ここでは、ペプチド中のアミド官能基が、過剰にメチル化（ｐｅｒｍｅｔｈｙｌａｔｅ）されて、化学的に形質転換されたコンビナトリアルライブラリーを生成する。

【０６１８】

本発明において有用である種々の非ペプチドライブラリーは、大きい。例えば、ＥｃｋｅｒおよびＣｒｏｏｋｅ（１９９５，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３：３５１－３６０）は、種々のライブラリーの基礎を形成する化学種の間として、ベンゾジアゼピン、ヒダントイン、ピペラジンジオン、ビフェニル、糖アナログ、β－メルカプトケトン、アリール酢酸、アシルピペラジン、ベンゾピラン、キューバン（ｃｕｂａｎｅ）、キサンチン、アミンイミドおよびオキサゾロンを列挙している。

【０６１９】

非ペプチドライブラリーは、２つの型に大きく分類され得る：修飾されたモノマーおよびオリゴマー。修飾モノマーライブラリーは、比較的単純な骨格構造を使用し、この上に種々の官能基が付加される。しばしば、骨格は、既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。

【０６２０】

非ペプチドオリゴマーライブラリーは、モノマーの順序に依存して新規な形状を作製する

様式で共にアセンブルされる、多数のモノマーを使用する。使用されるモノマー単位の間には、カルバメート、ピロリノン（ｐｙｒｒｏｌｉｎｏｎｅ）およびモルホリノがある。ペプトイド（側鎖がα炭素よりもαアミノ基に結合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ー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ーは、単一型のモノマーを使用し、従って、反復骨格を含む。近年のライブラリーは、１つより多くのモノマーを使用し、自由度が添加されたライブラリーを与える。

【０６２１】

ライブラリーをスクリーニングすることは、多様な一般的に公知の方法のいずれかによって達成され得る。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを開示する以下の参考文献：ＰａｒｍｌｅｙおよびＳｍｉｔｈ、１９８９、Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２５１：２１５－２１８；ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０；Ｆｏｗｌｋｅｓら、１９９２；ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４２２－４２７；Ｏｌｄｅｎｂｕｒｇら、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：５３９３－５３９７；Ｙｕら、１９９４、Ｃｅｌｌ ７６：９３３－９４５；Ｓｔａｕｄｔら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：５７７－５８０；Ｂｏｃｋら、１９９２、Ｎａｔｕｒｅ ３５５：５６４－５６６；Ｔｕｅｒｋら、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：６９８８－６９９２；Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎら、１９９２、Ｎａｔｕｒｅ ３５５：８５０－８５２；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（全てＬａｄｎｅｒらに対して）；ＲｅｂａｒおよびＰａｂｏ、１９９３、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６３：６７１－６７３；ならびにＰＣＴ公開番号ＷＯ９４／１８３１８を参照のこと。

【０６２２】

特定の実施形態において、ＩＬ－６様ポリペプチドを結合する分子を同定するためのスクリーニングは、ライブラリーのメンバーを固相に固定化されたＩＬ－６様ポリペプチドと接触させ、そしてＩＬ－６様ポリペプチドに結合するこれらのライブラリーのメンバーを収集することによって実行され得る。そのようなスクリーニング方法の例の、「パニング」と呼ばれる技術は、例として、ＰａｒｍｌｅｙおよびＳｍｉｔｈ，１９８８，Ｇｅｎｅ ７３：３０５－３１８；Ｆｏｗｌｋｅｓら、１９９２，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４２２－４２７；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９４／１８３１８；ならびにその中に引用される参考文献に記載される。

【０６２３】

別の実施形態において、酵母中の相互作用タンパク質を選択するためのツーハイブリッドシステム（ＦｉｅｌｄｓおよびＳｏｎｇ，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ ３４０：２４５－２４６；Ｃｈｉｅｎら、１９９１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：９５７８－９５８２）が、ＩＬ－６様ポリペプチドに特異的に結合する分子を同定するために使用され得る。

【０６２４】

ＩＬ－６様結合分子がポリペプチドである場合、このポリペプチドは、任意のペプチドライブラリー（ランダムペプチドライブラリー、コンビナトリアルペプチドライブラリー、またはバイアスペプチドライブラリーを含む）から簡便に選択され得る。用語「バイアス（ｂｉａｓｅｄ）」は、この場合のペプチドにおいて、ライブラリーを作製する方法が、生じる分子収集の多様性を支配する１つ以上のパラメーター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中に使用される。

【０６２５】

従って、本当にランダムなペプチドライブラリーは、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全て２０のアミノ酸に関して同じである、ペプチドの収集物を作製する。しかし、例えば、リジンが５番目のアミノ酸毎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ーの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

特定することによって、バイアスがライブラリーに導入され得る。ライブラリー中へ導入され得る。明らかに、バイアスの多くの型は、意図され得、そして本発明は、任意の特定のバイアスに制限されない。さらに、本発明は、特定の型のペプチドライブラリー（例えば、ファージディスプレイペプチドライブラリーおよびＤＮＡ挿入物と共にλファージベクターを含むＤＮＡ構築物を使用するライブラリー）を意図する。

【０６２６】

上記のように、ポリペプチドであるＩＬ－６様結合分子の場合、このポリペプチドは、約６から約６０より少ないアミノ酸残基を有し、好ましくは約６～約１０アミノ酸残基、そしてより好ましくは約６～約２２アミノ酸であり得る。別の実施形態において、ＩＬ－６様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。

【０６２７】

選択されたＩＬ－６様結合ポリペプチドは、化学合成または組換え発現によって得られ得る。

【０６２８】

（他の活性）

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニスト、またはアンタゴニストは、血管内皮細胞増殖を刺激する能力の結果として、種々の疾患状態（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。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニスト、またはアンタゴニストをまた利用して、上記で議論されるように新脈管形成および肢の再形成を刺激し得る。

【０６２９】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニスト、またはアンタゴニストを、傷害、火傷、手術後組織修復、および瘢痕に起因する創傷の処置にもまた利用し得る。なぜなら、それらは異なる起源の種々の細胞（例えば、線維芽細胞および骨格筋細胞）に対してマイトジェン性であり、それゆえダメージを受けた組織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。

【０６３０】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、ニューロンの成長を刺激し、そして特定の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用いられ得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、軟骨細胞増殖を刺激する能力を有し得、それゆえ、骨および歯周の再形成を増強し、そして組織移植片または骨の移植片における補助のために利用され得る。

【０６３１】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた利用して、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し得る。

【０６３２】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた、抜け毛を予防するために利用し得る。なぜなら、ＦＧＦファミリーのメンバーは、髪形成細胞を活性化し、そしてメラノサイト増殖を促進するからである。同じ方針で、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストを利用して、他のサイトカインと組み合わせて使用した場合、造血細胞および骨髄細胞の増殖および分化を刺激し得る。

【０６３３】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた、移植前の器官を維持するためか、または初代組織の細胞培養を支持するために使用し得る。

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、初期胚において分化するように中胚葉起源の組織を誘導するために利用され得る。

【０６３４】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストはまた、先に議論されるような造血系統に加えて、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。

【０６３５】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストはまた、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、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストは、異化作用、同化作用、プロセシング、利用、およびエネルギーの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。

【０６３６】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストは、バイオリズム、心臓（ｃａｒｉｃａｄｉｃ）リズム、うつ病（抑うつ性の障害を含む）、暴力の傾向、痛みへの耐性、生殖能力（好ましくは、アクチビンまたはインヒビン様活性によって）、ホルモンレベルもしくは内分泌レベル、食欲、性欲、記憶、ストレス、または他の認知の質に影響を及ぼすことによって、哺乳動物の精神状態または身体状態を変更するために使用され得る。

【０６３７】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストはまた、例えば、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。

【０６３８】

上記の適用は、広範な種類の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、マウス、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（ｍｉｃｒｏ－ｐｉｇ）、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、この宿主は、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、この宿主は哺乳動物である。最も好ましい実施形態において、この宿主はヒトである。

【０６３９】

（他の好ましい実施形態）

本願発明の他の好ましい実施形態は、配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはその相補鎖および／もしくはｃＤＮＡプラスミドＶのヌクレオチド配列中の少なくとも約５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を含む。

【０６４０】

上記連続したヌクレオチドの配列が、表１中の配列番号Ｘについて同定された位置の範囲で、配列番号Ｘのヌクレオチド配列に含まれる、核酸分子もまた好ましい。

【０６４１】

配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはその相補鎖および／もしくはｃＤＮＡプラスミドＶのヌクレオチド配列中の少なくとも約１５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた好ましい。

【０６４２】

配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはその相補鎖および／もしくはｃＤＮＡプラスミドＶのヌクレオチド配列中の少なくとも約５００個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子はさらに好ましい。

【０６４３】
さらに好ましい実施形態は、表１中の配列番号Ｘについて同定された位置の範囲で配列番号Ｘのヌクレオチド配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子である。
【０６４４】
さらに好ましい実施形態は、配列番号Ｘの完全なヌクレオチド配列またはその相補鎖および／もしくはｃＤＮＡプラスミドＶのヌクレオチド配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。
【０６４５】
ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはその相補鎖および／もしくはｃＤＮＡプラスミドＶのヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする単離された核酸分子もまた好ましく、ここで上記のハイブリダイズする核酸分子は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、Ａ残基のみまたはＴ残基のみからなるヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズしない。
【０６４６】
ｃＤＮＡプラスミドＶを含むＤＮＡ分子を含む組成物もまた好ましい。
【０６４７】
ｃＤＮＡプラスミドＶのヌクレオチド配列中の少なくとも５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子もまた好ましい。
【０６４８】
上記の少なくとも５０個連続したヌクレオチドの配列が、ｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされるオープンリーディングフレームの配列のヌクレオチド配列中に含まれる、単離された核酸分子もまた好ましい。
【０６４９】
ｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされるヌクレオチド配列中の少なくとも１５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた好ましい。
【０６５０】
さらに好ましい実施形態は、ｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされるヌクレオチド配列中の少なくとも５００個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。
【０６５１】
さらに好ましい実施形態は、ｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされる完全なヌクレオチド配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。
【０６５２】
さらに好ましい実施形態は、以下：配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはその相補鎖およびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるヌクレオチド配列からなる群から選択される配列中の少なくとも５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を、生物学的サンプルにおいて検出するための方法であって、上記の方法は、上記の群から選択される配列と、上記のサンプル中の少なくとも１つの核酸分子のヌクレオチド配列とを比較する工程、および上記サンプル中の上記核酸分子の配列が、上記の選択された配列に対して少なくとも９５％同一であるか否かを決定する工程を包含する。
【０６５３】
上記の配列を比較する工程が、上記サンプル中の核酸分子と、上記の群から選択される上記の配列を含む核酸分子との間の核酸ハイブリダイゼーションの程度を決定する工程を包含する、上記方法もまた好ましい。同様に、上記の配列を比較する工程が、上記サンプル中の核酸分子から決定されるヌクレオチド配列と、上記の群から選択される配列とを比較

する工程によって実施される、上記方法もまた好ましい。核酸分子は、ＤＮＡ分子またはＲＮＡ分子を含み得る。

【０６５４】

さらに好ましい実施形態は、生物学的サンプルの種、組織、または細胞型を同定するための方法であって、この方法は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む上記サンプル中の核酸分子を（もしあれば）検出する工程を包含する：配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはその相補鎖およびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるヌクレオチド配列。

【０６５５】

生物学的サンプルの種、組織、または細胞型を同定するための方法は、少なくとも２つのヌクレオチド配列のパネル中のヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出する工程を包含し得、ここで上記パネル中の少なくとも１つの配列は、上記の群から選択される配列中の少なくとも５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一である。

【０６５６】

タンパク質をコードする、配列番号Ｘのヌクレオチド配列もしくはその相補鎖またはｃＤＮＡプラスミドＶのヌクレオチド配列の、異常な構造または発現と関連する病理学的状態を、被験体において診断するための方法もまた好ましく、この方法は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、核酸分子を、（もしあれば）上記被験体から得られる生物学的サンプルにおいて検出する工程を包含する：配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはその相補鎖およびｃＤＮＡプラスミドＶのヌクレオチド配列。

【０６５７】

病理学的状態を診断するための方法は、少なくとも２つのヌクレオチド配列のパネル中のヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出する工程を包含し得、ここで、上記パネル中の少なくとも１つの配列は、上記群から選択される配列中の少なくとも５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一である。

【０６５８】

上記の核酸分子のヌクレオチド配列が、少なくとも２つのヌクレオチド配列のパネルを含む、単離された核酸分子を含む組成物もまた好ましく、ここで上記のパネル中の少なくとも１つの配列は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも５０個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも９５％同一である：配列番号Ｘのヌクレオチド配列またはその相補鎖およびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるヌクレオチド配列。この核酸分子は、ＤＮＡ分子またはＲＮＡ分子を含み得る。

【０６５９】

配列番号Ｙのポリペプチド配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよび／またはｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチド中の少なくとも約１０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた好ましい。

【０６６０】

配列番号Ｙのアミノ酸配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列および／またはｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約３０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた好ましい。

【０６６１】

配列番号Ｙのアミノ酸配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列および／またはｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約１００個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【０６６２】

配列番号Ｙの完全アミノ酸配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドの完全アミノ酸配列および／またはｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチドの完全アミノ酸配列と少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【０６６３】

ｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチドの完全アミノ酸配列中の少なくとも約１０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【０６６４】

上記の連続したアミノ酸の配列が、ｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされるポリペプチド；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよび／または配列番号Ｙのポリペプチド配列の一部のアミノ酸配列に含まれる、ポリペプチドもまた好ましい。

【０６６５】

ｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約３０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【０６６６】

ｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約１００個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【０６６７】

ｃＤＮＡプラスミドＶによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【０６６８】

以下からなる群から選択される配列中の、少なくとも１０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して特異的に結合する単離された抗体は、さらに好ましい：配列番号Ｙのポリペプチド；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチド配列およびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチド。

【０６６９】

以下：配列番号Ｙのポリペプチド配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチドからなる群から選択された配列中の、少なくとも１０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを、生物学的サンプルにおいて検出する方法はさらに好ましく；この方法は、このサンプル中における少なくとも１つのポリペプチド分子のアミノ酸配列をこの群から選択された配列と比較する工程およびこのサンプル中におけるこのポリペプチド分子の配列が、少なくとも１０個連続したアミノ酸のこの配列と少なくとも９０％同一であるかどうかを決定する工程を含む。

【０６７０】

このサンプル中における少なくとも１つのポリペプチド分子のアミノ酸配列を、この群から選択された配列と比較するこの工程が、このサンプル中のポリペプチドの、以下：配列番号Ｙのポリペプチド配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチドからなる群から選択された配列中の少なくとも１０個連続したアミノ酸の配列に対して、少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する抗体に対する特異的な結合の程度を決定することを含む、上記の方法もまた、好ましい。

【０６７１】

配列を比較する工程が、このサンプル中のポリペプチド分子から決定されたアミノ酸配列を、この群から選択されたこの配列と比較することによって行われる、上記の方法もまた

好ましい。

【０６７２】

生物学的サンプルの種、組織または細胞型を同定する方法もまた好ましく、ここでこの方法は、もし存在するならば、以下からなる群から選択される配列における少なくとも１０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子をこのサンプル中で検出する工程を含む：配列番号Ｙのポリペプチド配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチド。

【０６７３】

生物学的サンプルの種、組織または細胞型を同定する上記の方法もまた好ましく、ここでこの方法は、少なくとも２つのアミノ酸配列のパネルにおけるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子を検出する工程を含み、ここでこのパネル中の少なくとも１つの配列は、上記の群から選択された配列における少なくとも１０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一である。

【０６７４】

被験体において、表１において同定された、ポリペプチドをコードする核酸配列の異常な構造または発現に関連する病的状態を診断する方法もまた、好ましく、ここで、この方法は、この被験体から得られた生物学的サンプルにおいて、少なくとも２つのアミノ酸配列のパネルにおけるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子を検出する工程を含み、ここでこのパネル中の少なくとも１つの配列は、以下からなる群から選択される配列における少なくとも１０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一である：配列番号Ｙのポリペプチド配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチド。

【０６７５】

これらの方法のいずれかにおいて、上記ポリペプチド分子を検出する工程は、抗体を使用することを包含する。

【０６７６】

以下からなる群から選択された配列中の、少なくとも１０個連続したアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた、好ましい：配列番号Ｙのポリペプチド配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチド。

【０６７７】

上記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、原核生物宿主でのこのポリペプチドの発現について最適化されている、単離された核酸分子もまた、好ましい。

【０６７８】

上記ポリペプチドが以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離された核酸分子もまた、好ましい：配列番号Ｙのポリペプチド配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチド。

【０６７９】

上記の単離された核酸分子のいずれかをベクター中に挿入する工程を含む、組換えベクターの作製方法はさらに好ましい。この方法によって生成された組換えベクターも、好ましい。宿主細胞中にベクターを導入する工程を含む、組換え宿主細胞を作製する方法、ならびにこの方法によって生成された組換え宿主細胞もまた、好ましい。

【０６８０】

単離されたポリペプチドを作製する方法であって、このポリペプチドが発現されるような条件下でこの組換え宿主細胞を培養する工程、およびこのポリペプチドを回収する工程を包含する、方法もまた好ましい。この組換え宿主細胞が真核生物細胞であり、そしてこのポリペプチドが以下からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むヒトタンパク質である

、単離されたポリペプチドを作製するこの方法もまた好ましい：配列番号Ｙのポリペプチド配列；配列番号Ｘもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびｃＤＮＡプラスミドＶによりコードされるポリペプチド。この方法によって生成された単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【０６８１】

増加したレベルのタンパク質活性を必要とする個体を処置する方法もまた、好ましく、ここで、この方法は、このような個体に、この個体においてこのタンパク質の活性のレベルを増加させるのに有効な量の、本願発明の単離されたポリペプチド、ポリヌクレオチド、その免疫原性フラグメントもしくはアナログ、結合因子、抗体、あるいは抗原フラグメントを含む治療剤を投与する工程を包含する。

【０６８２】

減少したレベルのタンパク質活性を必要とする個体を処置する方法もまた、好ましく、ここで、この方法は、このような個体に、この個体においてこのタンパク質の活性のレベルを減少させるのに有効な量の、本願発明の単離されたポリペプチド、ポリヌクレオチド、その免疫原性フラグメントもしくはアナログ、結合因子、抗体、あるいは抗原フラグメントを含む治療剤を投与する工程を包含する。

【０６８３】

本発明の特定の実施形態では、表２の４番目の列に列挙される各「コンティグＩＤ」について、好ましくは、表２の５番目の列で参照されるヌクレオチド配列、および一般式ａ－ｂにより記載されるヌクレオチド配列（ここでａおよびｂは、表２の列３で参照される対応する配列番号Ｘについて独自に決定される）を含むか、またはそのようなヌクレオチド配列からなる、１つ以上のポリヌクレオチドが除外される。さらに特定の実施形態は、表２の５列目において言及される特定のポリヌクレオチド配列の１、２、３、４個、またはそれ以上を除外するポリヌクレオチド配列に関する。

【０６８４】

好ましくは、一般式ｃ－ｄによって記載されるヌクレオチド配列を含む１つ以上のポリヌクレオチドが本発明から除外され、ここでｃおよびｄの両方は、配列番号Ｘに示されるヌクレオチド残基の位置に対応し、そしてｄは、ｃ＋１４以上である。

【０６８５】

この列挙は、この一般式により除外され得る配列の全てを含むことを決して意味せず、この表は、単に例示的な例である。これらの登録を通じて利用可能な全ての文献は、本明細書中でその全体が参考として援用される。

【０６８６】

【表２】

表２

遺伝子番号	cDNA クローンID 番号 V	ヌクレオチド配列 ID番号 X	コンティグ ID	公開登録番号
1	HCEVF95	2	910114	AI955121, AI439352, AW294337, および AC005615.

【０６８７】

【表３】

表 3

クローンID番号 V	ライブラリーコード
HCEVF95	H0135 H0261 H0390 L1290

【０６８８】
【表４】

表 4

ライブラリーコード	ライブラリー 説明	疾患
H0135	Human Synovial Sarcoma	
H0261	H. cerebellum, Enzyme subtracted	
H0390	Human Amygdala Depression, re-excision	疾患
L1290	NCI_CGAP_Lym12	

概して、本発明を記載してきたが、例示の目的のために提供されかつ限定することを意図しない、以下の実施例を参照することによって、本発明はより容易に理解される。
【０６８９】
（実施例）
（実施例１：選択されたｃＤＮＡクローンの寄託されたサンプルからの単離）
引用されるＡＴＣＣ寄託物中の各ｃＤＮＡクローンは、プラスミドベクター中に含まれる。表１は、各クローンが単離されたｃＤＮＡライブラリーを構築するために用いられたベクターを示す。多くの場合において、ライブラリーを構築するために使用されたベクターは、プラスミドが切り出されたファージベクターである。直下の表は、ｃＤＮＡライブラリーを構築する際に使用される各ファージベクターについて関連するプラスミドを相関づける。例えば、特定のクローンがベクター「Ｌａｍｂｄａ　Ｚａｐ」中に単離されていると表１に示される場合、対応する寄託クローンは、「ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ」である。
【０６９０】
【表５】

ライブラリーを構築するために使用されるベクター　対応する寄託プラスミド

Lambda Zap	pBluescript (pBS)
Uni-Zap XR	pBluescript (pBS)
Zap Express	pBK
lafmid BA	plafmid BA
pSport1	pSport1
pCMVSport 2.0	pCMVSport 2.0
pCMVSport 3.0	pCMVSport 3.0
pCR®2.1	pCR®2.1

ベクターＬａｍｂｄａ　Ｚａｐ（米国特許第５，１２８，２５６号および同第５，２８６，６３６号）、Ｕｎｉ－Ｚａｐ　ＸＲ（米国特許第５，１２８，２５６号および同第５，２８６，６３６号）、Ｚａｐ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（米国特許第５，１２８，２５６号および同第５，２８６，６３６号）、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（ｐＢＳ）（Ｓｈｏｒｔら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　１６：７５８３－７６００（１９８８）；Ａｌｔｉｎｇ－Ｍｅｅｓら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　１７：９４９４（１９８９））ならびにｐＢＫ（Ａｌｔｉｎｇ－Ｍｅｅｓら、Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ　５：５８－６１（１９９２））は、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．、１１０１１　Ｎ．Ｔｏｒｒｅｙ　Ｐｉｎｅｓ　Ｒｏａｄ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ，９２０３７から市販されている。ｐＢＳは、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてｐＢＫはネオマイシン耐性遺伝子を含む。両方とも、Ｅ．ｃｏｌｉ株ＸＬ－１　Ｂｌｕｅ（これもまた、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅから入手可能である）に形質転換され得る。ｐＢＳは、ＳＫ＋、ＳＫ－、ＫＳ＋およびＫＳの４形態で入荷する。ＳおよびＫとは、ポリリンカー領域（「Ｓ」とはＳａｃＩであり、そして「Ｋ」とは、ＫｐｎＩのことであり、これらは、それぞれのリンカーの各末端での最初の部位である）に隣接するＴ７およびＴ３プライマー配列に対するポリリンカーの配向をいう。「＋」または「－」とは　、ある方向においてｆ１　ｏｒｉから開始される一本鎖レスキューがセンス鎖ＤＮＡを生成し、そして他方においてアンチセンスであるようなｆ１複製起点（「ｏｒｉ」）の配向をいう。

【０６９１】

ベクターｐＳｐｏｒｔ１、ｐＣＭＶＳｐｏｒｔ　２．０およびｐＣＭＶＳｐｏｒｔ３．０をＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｉｎｃ．、Ｐ．Ｏ．Ｂｏｘ６００９、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ　２０８９７から入手した。全てのＳｐｏｒｔベクターはアンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてＥ．ｃｏｌｉ株ＤＨ１０Ｂ（これもまた、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能である）に形質転換され得る。（例えば、Ｇｒｕｂｅｒ，Ｃ．Ｅ．ら、Ｆｏｃｕｓ　１５：５９（１９９３）を参照のこと）。ベクターｌａｆｍｉｄ　ＢＡ（Ｂｅｎｔｏ　Ｓｏａｒｅｓ、Ｃｏｌｕｍｂｉａ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、ＮＹ）は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてＥ．ｃｏｌｉ株ＸＬ－１　Ｂｌｕｅに形質転換され得る。ベクターｐＣＲ（登録商標）２．１（これはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１６００　Ｆａｒａｄａｙ　Ａｖｅｎｕｅ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ　９２００８から入手可能である）は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてＥ．ｃｏｌｉ株ＤＨ１０Ｂ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能である）に形質転換され得る（例えば、Ｃｌａｒｋ、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１６：９６７７－９６８６（１９８８）

およびＭｅａｄら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：（１９９１）を参照のこと）。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、表１における特定のクローンについて同定されたファージベクター配列、ならびに上記に示された対応するプラスミドベクター配列を含まない。

【０６９２】

表１に引用される、任意の所定のｃＤＮＡクローンについてＡＴＣＣ受託番号を与えられたサンプルにおける寄託された物質はまた、１つ以上のさらなるプラスミド（これは各々、その所定のクローンとは異なるｃＤＮＡクローンを含む）を含み得る。従って、同じＡＴＣＣ受託番号を共有する寄託物は、表１に示される各ｃＤＮＡクローンのためのプラスミドを少なくとも含む。代表的には、表１に引用される各ＡＴＣＣ寄託物のサンプルは、ほぼ等量（重量で）の約５０個のプラスミドＤＮＡ（これは各々、異なるｃＤＮＡクローンを含む）の混合物を含む；しかし、このような寄託サンプルは、５０個よりも多いかまたは少ないｃＤＮＡクローン（約５００個までのｃＤＮＡクローン）のためのプラスミドを含み得る。

【０６９３】

表１における特定のクローンについて引用されるプラスミドＤＮＡの寄託サンプルからそのクローンを単離するために２つのアプローチが使用され得る。第一に、プラスミドを、配列番号Ｘに対応するポリヌクレオチドプローブを使用して、クローンをスクリーニングすることによって直接単離する。

【０６９４】

特に、３０～４０ヌクレオチドを有する特定のポリヌクレオチドを、報告されている配列に従って、Ａｐｐｌｉｅｄ　ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓのＤＮＡ合成装置を使用して合成する。オリゴヌクレオチドを、例えば、^{32}Ｐ－γ－ＡＴＰで、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼを用いて標識し、そして慣用の方法に従って精製する。（例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ、ＮＹ（１９８２））。プラスミド混合物を、当業者に公知の技術（例えば、ベクター供給者によって提供される技術または上記で引用された関連の刊行物もしくは特許において提供される技術）を用いて、上記のような適切な宿主（例えば、ＸＬ－１　Ｂｌｕｅ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ））に形質転換する。形質転換体を１．５％寒天プレート（適切な選択薬剤、例えば、アンピシリンを含む）に、１プレートあたり約１５０の形質転換体（コロニー）の密度でプレーティングする。これらのプレートを、細菌コロニースクリーニングについての慣用の方法（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、第２版、（１９８９）、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、１．９３～１．１０４頁）または当業者に公知の他の技術に従って、ナイロンメンブレンを使用してスクリーニングする。

【０６９５】

あるいは、配列番号Ｘの両端（すなわち、表１に規定されるクローンの５’ＮＴおよび３’ＮＴによって囲まれる配列番号Ｘの領域内）に由来する、１７～２０ヌクレオチドの２つのプライマーを合成し、そしてこれらを使用して、寄託されたｃＤＮＡプラスミドをテンプレートとして使用して、所望のｃＤＮＡを増幅する。ポリメラーゼ連鎖反応を、慣用の条件下で、例えば、０．５μｇの上記ｃＤＮＡテンプレートとの反応混合物の２５μｌ中で実施する。便利な反応混合物は、１．５～５ｍＭ　$MgCl_2$、０．０１％（ｗ／ｖ）ゼラチン、それぞれ２０μＭのｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ、２５ｐｍｏｌの各プライマーおよび０．２５ユニットのＴａｑポリメラーゼである。３５サイクルのＰＣＲ（９４℃での変性を１分間；５５℃でのアニールを１分間；７２℃での伸長を１分間）を、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｃｅｔｕｓ自動化サーマルサイクラーを用いて実施する。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、そして予想される分子量のＤＮＡバンドを切り出し、そして精製する。ＰＣＲ産物を、ＤＮＡ産物をサブクローニングお

よび配列決定することによって選択された配列であることを確認する。

【０６９６】

寄託されたクローンに存在しないかもしれない遺伝子の５’非コード部分または３’非コード部分の同定のために、いくつかの方法が利用可能である。これらの方法は、以下を含むがこれらに限定されない：フィルタープローブ探索、特異的プローブを使用するクローン富化、および当該分野で周知である５’および３’「ＲＡＣＥ」プロトコルと類似するかまたは同一のプロトコル。例えば、５’ＲＡＣＥに類似する方法は、所望の全長転写物の失われた５’末端を生成するために利用可能である（Ｆｒｏｍｏｎｔ－Ｒａｃｉｎｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２１（７）：１６８３－１６８４（１９９３））。

【０６９７】

簡潔には、特定のＲＮＡオリゴヌクレオチドを、全長遺伝子ＲＮＡ転写物をおそらく含むＲＮＡの集団の５’末端に連結する。連結されたＲＮＡオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを含むプライマーセットを使用して、所望の全長遺伝子の５’部分をＰＣＲ増幅する。次いで、この増幅した産物を配列決定し得、そしてこれを使用して全長遺伝子を生成し得る。

【０６９８】

この上記の方法は、所望の供給源から単離された総ＲＮＡを用いて開始するが、ポリＡ＋ＲＮＡをも使用し得る。次いで、ＲＮＡ調製物を、必要ならばホスファターゼで処理して、後のＲＮＡリガーゼ工程を妨害し得る分解または損傷ＲＮＡの５’リン酸基を排除し得る。次いで、ホスファターゼを不活化するべきであり、そしてＲＮＡをメッセンジャーＲＮＡの５’末端に存在するキャップ構造を除去するために、タバコ酸性ピロホスファターゼを用いて処理するべきである。この反応は、次いでＴ４ ＲＮＡリガーゼを用いてＲＮＡオリゴヌクレオチドに連結され得る、キャップ切断ＲＮＡの５’末端に５’リン酸基を残す。

【０６９９】

この改変型ＲＮＡ調製物を、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いる、第一鎖ｃＤＮＡ合成のためのテンプレートとして使用する。第一鎖合成反応物を連結されたＲＮＡオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを用いる、所望の５’末端のＰＣＲ増幅のためのテンプレートとして使用する。次いで、得られた生成物を配列決定し、そして分析して５’末端配列が所望の遺伝子に属することを確認する。

【０７００】

（実施例２：ポリヌクレオチドに対応するゲノムクローンの単離）

ヒトゲノムＰ１ライブラリー（Ｇｅｎｏｍｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｉｎｃ．）を、実施例１に記載される方法に従って、配列番号Ｘに対応するｃＤＮＡ配列について選択されたプライマーを用いるＰＣＲによってスクリーニングする（Ｓａｍｂｒｏｏｋもまた参照のこと）。

【０７０１】

（実施例３：ポリペプチドの組織分布）

本発明のポリヌクレオチドのｍＲＮＡ発現の組織分布を、とりわけ、Ｓａｍｂｒｏｏｋらによって記載されるノーザンブロット分析についてのプロトコルを用いて決定する。例えば、実施例１に記載される方法によって生成されるｃＤＮＡプローブを、ｒｅｄｉｐｒｉｍｅ^{TM} ＤＮＡ ｌａｂｅｌｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて、製造者の指示に従って、Ｐ^{32}で標識する。標識後、プローブを、ＣＨＲＯＭＡ ＳＰＩＮ－１００^{TM}カラム（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｉｎｃ．）を使用して、製造者のプロトコル番号ＰＴ１２００－１に従って精製する。次いで、精製した標識プローブを使用して、種々のヒト組織をｍＲＮＡ発現について試験する。

【０７０２】

種々のヒト組織（Ｈ）またはヒト免疫系組織（ＩＭ）を含む多重組織ノーザン（ＭＴＮ）ブロット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を、ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ^{TM}ハイブリダイゼーション溶液（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて、製造者のプロトコル番号ＰＴ１１９０－１に従って、標識プローブで試験する。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、ブロットをマウントして、そして－７０℃で一晩フィルムに露出し、そしてフィルムを標準的な手順に従って現像する。

【０７０３】

（実施例４：ポリヌクレオチドの染色体マッピング）

オリゴヌクレオチドプライマーのセットを、配列番号Ｘの５’末端の配列に従って設計する。このプライマーは、好ましくは約１００ヌクレオチドにわたる。次いで、このプライマーセットを、以下のセットの条件下でポリメラーゼ連鎖反応に使用する：９５℃で３０秒；５６℃で１分；７０℃で１分。このサイクルを３２回反復し、次いで１回、７０℃で５分間のサイクルを行う。個々の染色体または染色体フラグメントを含む体細胞ハイブリッドパネル（Ｂｉｏｓ，Ｉｎｃ）に加えて、ヒト、マウス、およびハムスターのＤＮＡを鋳型として使用する。反応物を、８％ポリアクリルアミドゲルまたは３．５％アガロースゲルのいずれかで分析する。染色体マッピングを、特定の体細胞ハイブリッドにおける約１００ｂｐのＰＣＲフラグメントの存在によって決定する。

【０７０４】

（実施例５：ポリペプチドの細菌性発現）

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、実施例１に概説するように、ＤＮＡ配列の５’および３’末端に対応するＰＣＲオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅して挿入フラグメントを合成する。ｃＤＮＡ挿入物を増幅するために使用されるプライマーは、発現ベクターに増幅産物をクローニングするために、必要な場合は、制限部位（例えば、ＢａｍＨＩおよびＸｂａＩ）および開始コドン／終止コドンを好ましくは含むべきである。例えば、ＢａｍＨＩおよびＸｂａＩは、細菌性発現ベクターｐＱＥ－９（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ）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（Ａｍｐ^{r}）、細菌の複製起点（ｏｒｉ）、ＩＰＴＧで調節可能なプロモーター／オペレーター（Ｐ／Ｏ）、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）、６－ヒスチジンタグ（６－Ｈｉｓ）、および制限酵素クローニング部位をコードする。

【０７０５】

ｐＱＥ－９ベクターをＢａｍＨＩおよびＸｂａＩで消化し、そして、増幅されたフラグメントを細菌性ＲＢＳにおいて開始されるリーディングフレームを維持しながらｐＱＥ－９ベクターに連結する。次いで連結混合物を、ｌａｃＩリプレッサーを発現し、そしてまたカナマイシン耐性（Ｋａｎ^{r}）を与えるプラスミドｐＲＥＰ４の多重コピーを含む、Ｅ．ｃｏｌｉ株Ｍ１５／ｒｅｐ４（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．）を形質転換するために使用する。形質転換体を、それらのＬＢプレート上で生育する能力によって同定し、そしてアンピシリン／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、そして制限分析によって確認する。

【０７０６】

所望の構築物を含むクローンを、Ａｍｐ（１００μｇ／ｍｌ）およびＫａｎ（２５μｇ／ｍｌ）の両方を補充したＬＢ培地における液体培養で一晩（Ｏ／Ｎ）増殖させる。Ｏ／Ｎ培養物を、１：１００～１：２５０の比で大量培養物に接種するために使用する。細胞を、０．４と０．６との間の光学密度６００（Ｏ．Ｄ．$_{600}$）まで増殖させる。次いで、ＩＰＴＧ（イソプロピル－Ｂ－Ｄ－チオガラクトピラノシド）を最終濃度１ｍＭになるように加える。ＩＰＴＧは、ｌａｃＩリプレッサーの不活化により誘導し、Ｐ／Ｏの障害物を除去し、遺伝子発現の増加を導く。

【０７０７】

細胞を、さらに３～４時間増殖させる。次いで、細胞を遠心分離（６０００×ｇで２０分間）によって収集する。細胞ペレットを、カオトロピック剤である６ＭグアニジンＨＣｌ

中に、４℃で３～４時間攪拌することによって可溶化させる。細胞細片を遠心分離によって取り除き、そしてポリペプチドを含む上清を、ニッケル－ニトリロ三酢酸（「Ｎｉ－ＮＴＡ」）アフィニティー樹脂カラム（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．前出より入手可能）にロードする。６×Ｈｉｓタグを有するタンパク質は、Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂に高い親和性で結合し、そして単純な１工程手順で精製され得る（詳細には、Ｔｈｅ　ＱＩＡｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎｉｓｔ（１９９５）ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，前出を参照のこと）。

【０７０８】

手短に言えば、上清を、６Ｍグアニジン－ＨＣｌ、ｐＨ８のカラムにロードし、カラムを、最初に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で溶出する。

【０７０９】

次いで、精製したタンパク質を、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）または５０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６の緩衝液および２００ｍＭ　ＮａＣｌに対して透析することにより再生させる。あるいは、タンパク質はＮｉ－ＮＴＡカラムに固定化している間に、首尾よく再折畳みされ得る。推奨条件は以下の通りである：プロテアーゼインヒビターを含む、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０％グリセロール、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ　ｐＨ７．４中の６Ｍ～１Ｍ尿素の直線勾配を使用する再生。再生は１．５時間以上の時間をかけて行うべきである。再生後、タンパク質を２５０ｍＭイミダゾールの添加によって溶出させる。イミダゾールを、ＰＢＳまたは５０ｍＭ酢酸ナトリウム　ｐＨ６の緩衝液および２００ｍＭ　ＮａＣｌに対する最終の透析工程によって除去する。精製したタンパク質を、４℃で保存するか、または－８０℃で冷凍する。

【０７１０】

上記の発現ベクターに加えて、本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドに作動可能に連結され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み、ｐＨＥ４ａと呼ばれる発現ベクターを含む（ＡＴＣＣ受託番号２０９６４５、１９９８年2月２５日に寄託）。このベクターは以下を含む：１）選択マーカーとしてのネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、２）Ｅ．ｃｏｌｉ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－ダルガーノ配列、および６）ラクトースオペロンリプレッサー遺伝子（ｌａｑＩｑ）。複製起点（ｏｒｉＣ）は、ｐＵＣ１９（ＬＴＩ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）に由来する。プロモーター配列およびオペレーター配列を合成的に作製する。

【０７１１】

ＮｄｅＩおよびＸｂａＩ、ＢａｍＨＩ、ＸｈｏＩ、またはＡｓｐ７１８によってベクターを制限処理し、制限生成物をゲルで泳動し、そしてより大きな方のフラグメント（スタッファー（ｓｔｕｆｆｅｒ）フラグメントは約３１０塩基対であるべきである）を単離することによって、ＤＮＡをｐＨＥａに挿入し得る。ＤＮＡ挿入物を、ＮｄｅＩ（５’プライマー）およびＸｂａＩ、ＢａｍＨＩ、ＸｈｏＩ、またはＡｓｐ７１８（３’プライマー）に対する制限部位を有するＰＣＲプライマーを使用して、実施例１に記載のＰＣＲプロトコルに従って生成する。ＰＣＲ挿入物を、ゲル精製し、そして適合する酵素で制限処理する。挿入物およびベクターを標準的なプロトコルに従って連結する。

【０７１２】

操作されたベクターは、上記のプロトコルにおいて、細菌系でタンパク質を発現させるために容易に置換され得る。

【０７１３】

（実施例６：封入体からのポリペプチドの精製）

以下の別の方法は、ポリペプチドが封入体の形態で存在する場合に、Ｅ．ｃｏｌｉ中で発現されたポリペプチドを精製するために使用され得る。他に指定されない場合には、以下のすべての工程は４～１０℃で行われる。

【０７１４】

Ｅ．ｃｏｌｉ発酵の生産期の完了後、細胞培養物を４～１０℃に冷却し、そして１５，０００ｒｐｍの連続遠心分離（Ｈｅｒａｅｕｓ　Ｓｅｐａｔｅｃｈ）によって細胞を採集する。細胞ペーストの単位重量あたりのタンパク質の予想される収量および必要とされる精製タンパク質の量に基づいて、細胞ペーストの適切な量（重量による）を、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５０ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４を含む緩衝溶液に懸濁させる。細胞を、高剪断ミキサーを使用して均質な懸濁液に分散させる。

【０７１５】

次いで、細胞をマイクロフルイダイザー（ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚｅｒ）（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ，Ｃｏｒｐ．またはＡＰＶ　Ｇａｕｌｉｎ，Ｉｎｃ．）に2回、４０００～６０００ｐｓｉで溶液を通すことによって溶解させる。次いでホモジネートを、最終濃度０．５Ｍ　ＮａＣｌになるようにＮａＣｌ溶液と混合し、続いて７０００×ｇで１５分間遠心分離を行う。得られたペレットを、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５０ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４を使用して再度洗浄する。

【０７１６】

得られた洗浄した封入体を、１．５Ｍ　塩酸グアニジン（ＧｕＨＣｌ）で２～４時間可溶化する。７０００×ｇで１５分間の遠心分離の後、ペレットを廃棄し、そしてポリペプチドを含む上清を４℃で一晩インキュベートしてさらなるＧｕＨＣｌ抽出を可能にする。

【０７１７】

不溶性粒子を除去するための高速遠心分離（３０，０００×ｇ）に続き、ＧｕＨＣｌ可溶化タンパク質を、ＧｕＨＣｌ抽出物と、５０ｍＭ　ナトリウム、ｐＨ４．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡを含む２０容量の緩衝液とを、激しい攪拌で迅速に混合することによって、再折畳みさせる。再折畳みした希釈タンパク質溶液を、さらなる精製工程の前の１２時間、混合しないで４℃で保つ。

【０７１８】

再折畳みされたポリペプチド溶液を清澄にするために、４０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０で平衡化した、適切な表面積を有する０．１６μｍメンブレンフィルターを備えるあらかじめ準備した接線濾過ユニット（例えば、Ｆｉｌｔｒｏｎ）を使用する。濾過したサンプルを、カチオン交換樹脂（例えば、Ｐｏｒｏｓ　ＨＳ－５０，Ｐｅｒｓｅｐｔｉｖｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）上にロードする。カラムを４０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０で洗浄し、そして同じ緩衝液中の２５０ｍＭ、５００ｍＭ、１０００ｍＭ、および１５００ｍＭ　ＮａＣｌで、段階的な様式で溶出する。溶出液の２８０ｎｍにおける吸光度を連続的にモニターする。画分を収集し、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥによってさらに分析する。

【０７１９】

次いでポリペプチドを含む画分をプールし、そして４容量の水と混合する。次いで希釈されたサンプルを、あらかじめ準備した強アニオン（Ｐｏｒｏｓ　ＨＱ－５０，Ｐｅｒｓｅｐｔｉｖｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）交換樹脂および弱アニオン（Ｐｏｒｏｓ　ＣＭ－２０，Ｐｅｒｓｅｐｔｉｖｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）交換樹脂の直列カラムのセットにロードする。カラムを４０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０で平衡化する。両方のカラムを、４０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０、２００ｍＭ　ＮａＣｌで洗浄する。次いでＣＭ－２０カラムを１０カラム容量の直線勾配（０．２Ｍ　ＮａＣｌ、５０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０から１．０Ｍ　ＮａＣｌ、５０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６．５の範囲）を用いて溶出させる。画分を、溶出液の定常A_{280}モニタリング下で収集する。次いで、（例えば、１６％　ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって判明した）ポリペプチドを含む画分をプールする。

【０７２０】

得られたポリペプチドは、上記の再折畳みおよび精製工程の後で９５％より高い純度を示すはずである。５μｇの精製タンパク質がロードされる場合、いかなる主たる混在バンドも、クマシーブルー染色した１６％　ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルから観察されないはずである。精製タンパク質はまた、エンドトキシン／ＬＰＳ混在について試験され得、そして代表

的には、ＬＰＳ含量はＬＡＬアッセイに従って、０．１ｎｇ／ｍｌ未満である。
【０７２１】
（実施例７：バキュロウイルス発現系におけるポリペプチドのクローニングおよび発現）
この実施例では、ポリペプチドを発現するために、プラスミドシャトルベクターｐＡ２を使用してポリヌクレオチドをバキュロウイルスに挿入する。この発現ベクターは、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多核体ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）の強力なポリヘドリンプロモーター、続いてＢａｍＨＩ、Ｘｂａ　Ｉ、およびＡｓｐ７１８のような便利な制限部位を含む。シミアンウイルス４０（「ＳＶ４０」）のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために使用する。組換えウイルスの容易な選択のために、プラスミドは、同方向にある弱いＤｒｏｓｏｐｈｉｌａプロモーターの制御下でＥ．ｃｏｌｉ由来のβ－ガラクトシダーゼ遺伝子、続いてポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む。挿入された遺伝子は両方の側で、クローン化したポリヌクレオチドを発現する生存可能なウイルスを生成する、野生型ウイルスＤＮＡとの細胞媒介性の相同組換えのためのウイルス配列と隣接する。
【０７２２】
他の多くのバキュロウイルスベクター（例えば、ｐＡｃ３７３、ｐＶＬ９４１、およびｐＡｃＩＭ１）は、当業者が容易に理解するように、必要とされる場合、構築物が転写、翻訳、分泌などのために適切に配置されたシグナル（シグナルペプチドおよびインフレームなＡＵＧを含む）を提供する限りにおいて、上記のベクターの代わりに使用され得る。このようなベクターは、例えば、Ｌｕｃｋｏｗら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１７０：３１－３９（１９８９）に記載される。
【０７２３】
具体的には、適切な制限部位および開始コドン／終止コドンを有するプライマーを用い、実施例１に記載されるＰＣＲプロトコルを使用して、寄託されたクローンに含まれるｃＤＮＡ配列を、増幅させる。天然に存在するシグナル配列を使用して分泌タンパク質を産生する場合、ｐＡ２ベクターは第２のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、ベクターは、Ｓｕｍｍｅｒｓら（「Ａ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　Ｖｅｃｔｏｒｓ　ａｎｄ　Ｉｎｓｅｃｔ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ」、Ｔｅｘａｓ　Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｓｔａｔｉｏｎ　Ｂｕｌｌｅｔｉｎ　Ｎｏ．１５５５（１９８７））に記載される標準的な方法を用いて改変して、バキュロウイルスリーダー配列を含ませ得る（ｐＡ２　ＧＰ）。
【０７２４】
増幅されたフラグメントを、市販のキット（「Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ」，ＢＩＯ　１０１　Ｉｎｃ．，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，Ｃａ）を使用して、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切な制限酵素で消化し、そして再び１％アガロースゲルで精製する。
【０７２５】
プラスミドを対応する制限酵素で消化し、そして必要に応じて、当該分野で公知の慣用の手順を用いて、仔ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸化し得る。次いでＤＮＡを、市販のキット（「Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ」ＢＩＯ　１０１　Ｉｎｃ．，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，Ｃａ）を使用して、１％アガロースゲルから単離する。
【０７２６】
フラグメントおよび脱リン酸化したプラスミドを、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを用いて互いに連結する。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＢ１０１またはＸＬ－１　Ｂｌｕｅ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，Ｃａ）細胞のような他の適切なＥ．ｃｏｌｉ宿主を、連結混合液で形質転換し、そして培養プレート上に拡げる。プラスミドを含む細菌を、個々のコロニー由来のＤＮＡを消化し、そして消化産物をゲル電気泳動によって分析することにより同定する。クローニングしたフラグメントの配列をＤＮＡ配列決定によって確認する。

【０７２７】
このポリヌクレオチドを含む５μｇのプラスミドを、Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：７４１３－７４１７（１９８７）によって記載されたリポフェクション法を使用して、１．０μｇの市販の線状化バキュロウイルスＤＮＡ（「ＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ^{TM} ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ ＤＮＡ」，Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）とともに同時トランスフェクトする。１μｇのＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ^{TM}ウイルスＤＮＡおよび５μｇのプラスミドを、５０μｌの無血清グレース培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を含む、マイクロタイタープレートの滅菌したウェル中で混合する。その後、１０μｌのリポフェクチンおよび９０μｌグレース培地を加え、混合し、そして室温で１５分間インキュベートする。次いで、トランスフェクション混合液を、無血清グレース培地１ｍｌを加えた３５ｍｍ組織培養プレートに播種したＳｆ９昆虫細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １７１１）に滴下して加える。次いでプレートを２７℃で５時間インキュベートする。次いで、トランスフェクション溶液をプレートから除去し、そして１０％ウシ胎仔血清を補充した１ｍｌのグレース昆虫培地を添加する。次いで培養を２７℃で４日間継続する。

【０７２８】
４日後上清を収集し、ＳｕｍｍｅｒｓおよびＳｍｉｔｈ、前出によって記載されたようにプラークアッセイを行う。「Ｂｌｕｅ Ｇａｌ」（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ）を含むアガロースゲルを、ｇａｌが発現しているクローン（青色に着色したプラークを生ずる）の容易な同定および単離を可能にするために使用する。（この型の「プラークアッセイ」の詳細な説明はまた、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇによって配布される、昆虫細胞培養およびバキュロウイルス学のための使用者ガイドの中の９－１０頁に見出され得る）。適切なインキュベーションの後、青色に着色したプラークをマイクロピペッター（例えば、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）のチップで拾う。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、２００μｌのグレース培地を含む微小遠心分離チューブ中で再懸濁させ、そして組換えバキュロウイルスを含む懸濁液を、３５ｍｍディッシュに播種したＳｆ９細胞に感染させるために使用する。４日後、これらの培養ディッシュの上清を採集し、次いで４℃に貯蔵する。

【０７２９】
ポリペプチドの発現を確認するために、１０％熱非働化ＦＢＳを補充したグレース培地中でＳｆ９細胞を増殖させる。細胞を、約２の感染多重度（「ＭＯＩ」）でポリヌクレオチドを含む組換えバキュロウイルスで感染させる。放射性標識したタンパク質を所望する場合には、６時間後に培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを含まないＳＦ９００ ＩＩ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤから入手可能）に置き換える。４２時間後、５μＣｉの^{35}Ｓ－メチオニンおよび５μＣｉの^{35}Ｓ－システイン（Ａｍｅｒｓｈａｍから入手可能）を添加する。細胞をさらに１６時間インキュベートし、次いで遠心分離によって採集する。上清中のタンパク質および細胞内タンパク質を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、次いで（放射性標識した場合）オートラジオグラフィーによって分析する。

【０７３０】
精製タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列の微量配列決定法を使用して、産生されたタンパク質のアミノ末端配列を決定し得る。

【０７３１】
（実施例８：哺乳動物細胞におけるポリペプチドの発現）
本発明のポリペプチドを、哺乳動物細胞中で発現させ得る。代表的な哺乳動物発現ベクターは、ｍＲＮＡの転写の開始を媒介するプロモーターエレメント、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む。さらなるエレメントは、エンハンサー、コザック配列、および、ＲＮＡスプライシングのドナー部

位およびアクセプター部位に隣接する介在配列を含む。非常に効率的な転写は、ＳＶ４０由来の初期および後期プロモーター、レトロウイルス（例えばＲＳＶ、ＨＴＬＶＩ、ＨＩＶＩ）由来の長末端反復（ＬＴＲ）、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される。しかし、細胞エレメント（例えば、ヒトアクチンプロモーター）もまた、使用され得る。

【０７３２】

本発明を実施する際の使用に適切な発現ベクターは、例えば、ｐＳＶＬおよびｐＭＳＧ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）、ｐＲＳＶｃａｔ（ＡＴＣＣ ３７１５２）、ｐＳＶ２ｄｈｆｒ（ＡＴＣＣ ３７１４６）、ｐＢＣ１２ＭＩ（ＡＴＣＣ ６７１０９）、ｐＣＭＶＳｐｏｒｔ２．０、ならびにｐＣＭＶＳｐｏｒｔ３．０のようなベクターを含む。使用され得る哺乳動物宿主細胞は、ヒトＨｅｌａ細胞、２９３細胞、Ｈ９細胞およびＪｕｒｋａｔ細胞、マウスＮＩＨ３Ｔ３細胞およびＣ１２７細胞、Ｃｏｓ １細胞、Ｃｏｓ ７細胞およびＣＶ１細胞、ウズラＱＣ１－３細胞、マウスＬ細胞、ならびにチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を含む。

【０７３３】

あるいは、ポリペプチドは、染色体に組み込まれたポリヌクレオチドを含む、安定な細胞株中で発現され得る。ｄｈｆｒ、ｇｐｔ、ネオマイシン、ハイグロマイシンのような選択可能なマーカーを用いる同時トランスフェクションは、トランスフェクトされた細胞の同定および単離を可能にする。

【０７３４】

トランスフェクトされた遺伝子はまた、大量のコードされたタンパク質を発現するために増幅され得る。ＤＨＦＲ（ジヒドロ葉酸還元酵素）マーカーは、目的の遺伝子の数百または数千さえものコピーを有する細胞株の開発に有用である。（例えば、Ａｌｔら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５３：１３５７－１３７０（１９７８）；Ｈａｍｌｉｎ、Ｂｉｏｃｈｅｍ．ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ、１０９７：１０７－１４３（１９９０）：Ｐａｇｅ、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：６４－６８（１９９１）を参照のこと）。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ（ＧＳ）である（Ｍｕｒｐｈｙら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．２２７：２７７－２７９（１９９１）；Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１６９－１７５（１９９２））。これらのマーカーを使用して、哺乳動物細胞を選択培地中で増殖させ、そしてもっとも高い耐性を有する細胞を選択する。これらの細胞株は、染色体に組み込まれた、増幅された遺伝子を含む。チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）およびＮＳＯ細胞は、タンパク質の産生のためにしばしば使用される。

【０７３５】

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（Ｃｕｌｌｅｎら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，４３８－４４７（１９８５年３月））の強力なプロモーター（ＬＴＲ）、およびＣＭＶエンハンサー（Ｂｏｓｈａｒｔら、Ｃｅｌｌ ４１：５２１－５３０（１９８５））のフラグメントを含む。例えば、ＢａｍＨＩ、ＸｂａＩ、およびＡｓｐ７１８の制限酵素切断部位を有するマルチプルクローニングサイトは、目的の遺伝子のクローニングを容易にする。ベクターはまた、ラットプレプロインスリン遺伝子の３’イントロン、ポリアデニル化および終結シグナル、ならびに、ＳＶ４０初期プロモーターの制御下にあるマウスＤＨＦＲ遺伝子を含む。

【０７３６】

具体的には、例えば、プラスミドｐＣ６を、適切な制限酵素によって消化し、次いで当該分野で公知の手順によって、仔ウシ腸ホスファターゼ（ｐｈｏｓｐｈａｔｅ）を使用して脱リン酸化する。次いで、このベクターを１％アガロースゲルから単離する。

【０７３７】

本発明のポリヌクレオチドは、必要な場合、適切な制限部位および開始／停止コドンを有

するプライマーを用いて実施例１に概説するプロトコルに従って増幅される。このベクターは分泌のために必要な場合、異種シグナル配列を含むように改変され得る（例えば、ＷＯ９６／３４８９１を参照のこと）。

【０７３８】

増幅フラグメントを、市販のキット（「Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ」、ＢＩＯ　１０１　Ｉｎｃ．、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，Ｃａ．）を使用して、１％アガロースゲルから単離する。次いで、このフラグメントを、適切な制限酵素で消化し、そして再び１％アガロースゲルで精製する。

【０７３９】

次いで、増幅フラグメントを同じ制限酵素で消化し、そして１％アガロースゲルで精製する。次いで、単離されたフラグメントおよび脱リン酸したベクターを、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼで連結する。次いで、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＢ１０１細胞またはＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞を形質転換し、そしてプラスミドｐＣ６に挿入されたフラグメントを含む細菌を、例えば、制限酵素分析を用いて同定する。

【０７４０】

活性なＤＨＦＲ遺伝子を欠損するチャイニーズハムスター卵巣細胞を、トランスフェクションに使用する。５μｇの発現プラスミドｐＣ６を、リポフェクチン（Ｆｅｌｇｎｅｒら、前出）を用いて、０．５μｇのプラスミドｐＳＶｎｅｏと同時トランスフェクトする。プラスミドｐＳＶ２－ｎｅｏは、優性で選択可能なマーカーであるところの、Ｇ４１８を含む抗生物質の群に対する耐性を付与する酵素をコードするＴｎ５由来のｎｅｏ遺伝子を含む。この細胞を、１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を補充したαマイナスＭＥＭに播種する。２日後、この細胞をトリプシン処理し、そして１０、２５、または５０ｎｇ／ｍｌのメトトレキサートおよび１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を補充したαマイナスＭＥＭ中のハイブリドーマクローニングプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，Ｇｅｒｍａｎｙ）中に播種する。約１０～１４日後、単一のクローンをトリプシン処理し、次いで異なる濃度のメトトレキサート（５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、４００ｎＭ、８００ｎＭ）を使用して、６ウェルのペトリ皿または１０ｍｌのフラスコに播種する。次いで、最高濃度のメトトレキサートで増殖するクローンを、さらに高い濃度のメトトレキサート（１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０ｍＭ、２０ｍＭ）を含む新たな６ウェルプレートに移す。同じ手順を、１００～２００μＭの濃度で増殖するクローンが得られるまで繰り返す。所望の遺伝子産物の発現を、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットによって、または逆相ＨＰＬＣ分析によって分析する。

【０７４１】

（実施例９：タンパク質融合物）

本発明のポリペプチドは、好ましくは、他のタンパク質に融合される。これらの融合タンパク質は、種々の適用に使用され得る。例えば、本発明のポリペプチドの、Ｈｉｓタグ、ＨＡタグ、プロテインＡ、ＩｇＧドメイン、およびマルトース結合タンパク質への融合は、精製を容易にする（実施例５を参照のこと；ＥＰ　Ａ　３９４，８２７もまた参照のこと；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ、３３１：８４－８６（１９８８））。このポリペプチドはまた、異種ポリペプチド配列（例えば、ＫＤＥＬ）に融合して分泌および細胞内輸送を促進し得る。さらに、ＩｇＧ－１、ＩｇＧ－３、およびアルブミンへの融合は、インビボでの半減期を増大させる。本発明のポリペプチドに融合した核局在化シグナルは、タンパク質を特定の細胞内局在に標的化し得る。一方、共有結合ヘテロ二量体またはホモ二量体は、融合タンパク質の活性を増大または減少させ得る。融合タンパク質はまた、１つより多い機能を有するキメラ分子を作製し得る。最後に、融合タンパク質は、非融合タンパク質と比較して、融合タンパク質の可溶性および／または安定性を増大させ得る。上記の融合タンパク質の全ての型は、ＩｇＧ分子へのポリペプチドの融合を概説する以下のプロトコル、または実施例５に記載されるプロトコルを改変することによって作製され得る。

【０７４２】

簡単には、ＩｇＧ分子のヒトＦｃ部分は、以下に記載の配列の５’末端および３’末端にわたるプライマーを使用してＰＣＲ増幅され得る。これらのプライマーはまた、発現ベクター（好ましくは、哺乳動物発現ベクター）へのクローニングを容易にする都合の良い制限酵素部位、および必要な場合、開始／停止コドンを有するべきである。

【０７４３】

例えば、ｐＣ４（受託番号２０９６４６）が使用される場合、ヒトＦｃ部分は、ＢａｍＨＩクローニング部位に連結され得る。３’ＢａｍＨＩ部位が破壊されるべきであることに注意のこと。次に、ヒトＦｃ部分を含有するベクターが、ＢａｍＨＩを用いて再び制限され、ベクターを線状化し、そして実施例１に記載されるＰＣＲプロトコルによって単離された本発明のポリヌクレオチドが、このＢａｍＨＩ部位に連結される。ポリヌクレオチドは、終止コドンなしにクローニングされ、そうでなければ、融合タンパク質は産生されないことに注意すること。

【０７４４】

天然に存在するシグナル配列が分泌タンパク質を産生するために使用される場合、ｐＣ４は、第２のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、天然に存在するシグナル配列が使用されない場合、ベクターは、異種シグナル配列を含むように改変され得る（例えば、ＷＯ　９６／３４８９１を参照のこと）。

（ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域）

ＧＧＧＡＴＣＣＧＧＡＧＣＣＣＡＡＡＴＣＴＴＣＴＧＡＣＡＡＡＡＣＴＣＡＣＡＣＡＴＧ
ＣＣＣＡＣＣＧＴＧＣＣＣＡＧＣＡＣＣＴＧＡＡＴＴＣＧＡＧＧＧＴＧＣＡＣＣＧＴＣＡ
ＧＴＣＴＴＣＣＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣＡＡＡＡＣＣＣＡＡＧＧＡＣＡＣＣＣＴＣＡＴＧＡ
ＴＣＴＣＣＣＧＧＧＡＣＴＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＣＡＴＧＣＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＡＣＧＴ
ＡＡＧＣＣＡＣＧＡＡＧＡＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＡＧＴＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣＧＴＧ
ＧＡＣＧＧＣＧＴＧＧＡＧＧＴＧＣＡＴＡＡＴＧＣＣＡＡＧＡＣＡＡＡＧＣＣＧＣＧＧＧ
ＡＧＧＡＧＣＡＧＴＡＣＡＡＣＡＧＣＡＣＧＴＡＣＣＧＴＧＴＧＧＴＣＡＧＣＧＴＣＣＴ
ＣＡＣＣＧＴＣＣＴＧＣＡＣＣＡＧＧＡＣＴＧＧＣＴＧＡＡＴＧＧＣＡＡＧＧＡＧＴＡＣ
ＡＡＧＴＧＣＡＡＧＧＴＣＴＣＣＡＡＣＡＡＡＧＣＣＣＴＣＣＣＡＡＣＣＣＣＣＡＴＣＧ
ＡＧＡＡＡＡＣＣＡＴＣＴＣＣＡＡＡＧＣＣＡＡＡＧＧＧＣＡＧＣＣＣＣＧＡＧＡＡＣＣ
ＡＣＡＧＧＴＧＴＡＣＡＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＡＴＣＣＣＧＧＧＡＴＧＡＧＣＴＧＡＣＣ
ＡＡＧＡＡＣＣＡＧＧＴＣＡＧＣＣＴＧＡＣＣＴＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＡＧＧＣＴＴＣＴ
ＡＴＣＣＡＡＧＣＧＡＣＡＴＣＧＣＣＧＴＧＧＡＧＴＧＧＧＡＧＡＧＣＡＡＴＧＧＧＣＡ
ＧＣＣＧＧＡＧＡＡＣＡＡＣＴＡＣＡＡＧＡＣＣＡＣＧＣＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＧＡＣ
ＴＣＣＧＡＣＧＧＣＴＣＣＴＴＣＴＴＣＣＴＣＴＡＣＡＧＣＡＡＧＣＴＣＡＣＣＧＴＧＧ
ＡＣＡＡＧＡＧＣＡＧＧＴＧＧＣＡＧＣＡＧＧＧＧＡＡＣＧＴＣＴＴＣＴＣＡＴＧＣＴＣ
ＣＧＴＧＡＴＧＣＡＴＧＡＧＧＣＴＣＴＧＣＡＣＡＡＣＣＡＣＴＡＣＡＣＧＣＡＧＡＡＧ
ＡＧＣＣＴＣＴＣＣＣＴＧＴＣＴＣＣＧＧＧＴＡＡＡＴＧＡＧＴＧＣＧＡＣＧＧＣＣＧＣ
ＧＡＣＴＣＴＡＧＡＧＧＡＴ（配列番号１）。

【０７４５】

（実施例１０：ポリペプチドの処方）

ポリペプチド組成物は、個々の患者の臨床状態（特に、分泌ポリペプチド単独を用いた処置の副作用）、送達部位、投与の方法、投与の計画、ならびに開業医に公知の他の因子を考慮に入れて、良好な医療行為と一致した様式において、処方および投薬される。従って、本明細書中での目的のための「有効量」は、このような考慮によって、決定される。

【０７４６】

一般的な提案として、一用量あたりに非経口的に投与されるポリペプチドの薬学的に有効な総量は、患者の体重の約１μｇ／ｋｇ／日～１０ｍｇ／ｋｇ／日の範囲であるが、上記で注意したように、これは治療上の裁量を受ける。より好ましくは、この用量は、少なくとも０．０１ｍｇ／ｋｇ／日であり、そしてヒトに関して最も好ましくは、ホルモンについて、約０．０１ｍｇ／ｋｇ／日と１ｍｇ／ｋｇ／日との間である。連続して投与される場合、ポリペプチドは、代表的に、１日あたり１～４回の注射によるか、または、例えば

、ミニポンプを使用する連続皮下注入のいずれかにより、約１μｇ／ｋｇ／時間～約５０μｇ／ｋｇ／時間の投薬速度で投与される。静脈内バッグ溶液もまた、使用され得る。変化を観察するために必要である処置の長さ、および応答が生じるための処置後の間隔は、所望の効果に依存して変動するようである。

【０７４７】

本発明のポリペプチドを含む薬学的組成物は、経口的に、直腸に、非経口的に、槽内に（ｉｎｔｒａｃｉｓｔｅｍａｌｌｙ）、膣内に、腹腔内に、局所的に（粉末、軟膏、ゲル、ドロップまたは経皮性パッチによるように）、頬側に（ｂｕｃａｌｌｙ）、または経口スプレーもしくは鼻内スプレーとして投与され得る。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液状充填剤、希釈剤、カプセル化材料または任意の型の処方補助物を意味する。本明細書中で使用される場合、用語「非経口的（な）」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内（ｉｎｔｒａｓｔｅｒｎａｌ）、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【０７４８】

ポリペプチドはまた、持続放出系によって適切に投与される。持続放出性の組成物の適切な例としては、成形品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透性のポリマーマトリクスが挙げられる。持続放出マトリクスとしては、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号、ＥＰ　５８，４８１）、Ｌ－グルタミン酸とγ－エチル－Ｌ－グルタメートとの共重合体（Ｓｉｄｍａｎら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ　２２：５４７－５５６（１９８３））、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）（Ｌａｎｇｅｒら、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テート（Ｒ．Ｌａｎｇｅｒら）またはポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸（ＥＰ　１３３，９８８）が挙げられる。持続放出性組成物はまた、リポソームに封入された（ｌｉｐｏｓｏｍａｌｌｙ　ｅｎｔｒａｐｐｅｄ）ポリペプチドが挙げられる。分泌ポリペプチドを含むリポソームは、それ自体、公知の方法により調製される：ＤＥ３，２１８，１２１；Ｅｐｓｔｅｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２：３６８８－３６９２（１９８５）；Ｈｗａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：４０３０－４０３４（１９８０）；ＥＰ　５２，３２２；ＥＰ　３６，６７６；ＥＰ　８８，０４６；ＥＰ　１４３，９４９；ＥＰ　１４２，６４１；日本国特許出願８３－１１８００８；米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号；およびＥＰ　１０２，３２４。通常、リポソームは、脂質含有量が約３０ｍｏｌパーセントコレステロールより多い小さな（約２００～８００Å）単層型であり、選択された割合は、最適な分泌ポリペプチド療法について調整される。

【０７４９】

非経口的な投与に関して、１つの実施形態において、ポリペプチドは、一般に、薬学的に受容可能なキャリア（すなわち、使用される投薬量および濃度でレシピエントに非毒性であり、そしてこの処方の他の成分と適合性であるもの）と共に単位投薬量注入可能形態（溶液、懸濁液または乳濁液）において、所望の程度の純度でそれを混合することによって処方される。例えば、処方物は、好ましくは、酸化剤およびポリペプチドに対して有害であることが公知である他の化合物を含まない。

【０７５０】

一般に、処方物は、ポリペプチドを、液体キャリアもしくは細かく粉砕した固体キャリアまたは両方と、均一およびじかに接触させることにより調製される。次いで、必要である場合、産物は、所望の処方物へと成形される。好ましくは、このキャリアは、非経口的なキャリアであり、より好ましくは、レシピエントの血液と等張である溶液である。このようなキャリアビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンガー溶液、およびデキストロース溶液が挙げられる。非水溶性ビヒクル（例えば、不揮発性油およびオレイン酸エチル）はまた、リポソームと同様に、本明細書中で有用である。

【０７５１】

キャリアは、微量の添加物（例えば、等張性および化学的安定性を増強する物質）を適宜含む。このような物質は、使用される投薬量および濃度において、レシピエントに非毒性であり、そして緩衝液（例えば、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）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）；低分子量（約１０残基よりも小さい）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）；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはアルギニン）；単糖、二糖、および他の糖質（セルロースもしくはその誘導体、グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、ＥＤＴＡ）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート、ポロキサマー（ｐｏｌｏｘａｍｅｒｓ）、またはＰＥＧ）を含む。

【０７５２】

ポリペプチドは、このようなビヒクル中で、代表的に、約３～８のｐＨで、約０．１ｍｇ／ｍｌ～１００ｍｇ／ｍｌの濃度、好ましくは１～１０ｍｇ／ｍｌの濃度で処方される。上記の賦形剤、キャリア、または安定化剤の特定のものの使用は、ポリペプチド塩の形成をもたらすことが理解される。

【０７５３】

治療的な投与のために使用される任意のポリペプチドは、無菌であり得る。無菌性は、滅菌濾過膜（例えば、０．２ミクロン膜）による濾過により容易に達成される。治療ポリペプチド組成物は、一般に、無菌アクセスポートを有する容器（例えば、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する点滴溶液バッグまたはバイアル）に配置される。

【０７５４】

ポリペプチドは、通常、単位用量容器または多用量容器（例えば、密封アンプルまたは密封バイアル）中に水溶液としてか、または再構成のための凍結乾燥した処方物として保存される。凍結乾燥した処方物の例として、１０ｍｌバイアルを、５ｍｌの滅菌濾過した１％（ｗ／ｖ）水性ポリペプチド溶液で満たし、そして得られる混合物を凍結乾燥する。その注入溶液は、静菌注射用水を使用して、凍結乾燥したポリペプチドを再構成することにより調製される。

【０７５５】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の１つ以上の成分で満たされた１つ以上の容器を含む薬学的パックまたはキットを提供する。薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関により規定される形式における通告は、このような容器に伴い得る。この通告は、ヒトの投与のための製造、使用または販売の、この機関による認可を反映する。さらに、本発明のポリペプチドは、他の治療的化合物とともに使用され得る。

【０７５６】

（実施例１１：ポリペプチドのレベル低下を処置する方法）

個体におけるポリペプチドの標準の発現レベルまたは正常発現レベルの低下により引き起こされる状態は、本発明のポリペプチドを好ましくは分泌形態および／または可溶性形態で投与することにより処置し得ることが理解される。従って、本発明はまた、このポリペプチドのレベルの増加が必要な個体の処置方法を提供する。この方法は、このような個体に、このような個体でこのポリペプチドの活性レベルを増加させる量のポリペプチドを含む治療的組成物を投与する工程を包含する。

【０７５７】

例えば、ポリペプチドのレベルが低下した患者は、そのポリペプチドを、１日用量０．１～１００μｇ／ｋｇで６日間続けて服用する。好ましくは、ポリペプチドは分泌形態である。投与および処方物に基づく投薬計画の正確な詳細は、実施例１０に提供されている。

【０７５８】

（実施例１２：ポリペプチドのレベル上昇を処置する方法）

アンチセンス技術を使用して本発明のポリペプチドの産生を阻害する。この技術は、ガン

のような様々な病因に起因する、好ましくは分泌形態のポリペプチドのレベルを低下させる方法の１つの例である。

【０７５９】

例えば、ポリペプチドのレベルが異常に上昇したと診断された患者に、アンチセンスポリヌクレオチドを、０．５、１．０、１．５、２．０および３．０ｍｇ／ｋｇ／日で２１日間、静脈内投与する。この処置が十分に耐えられた場合は、７日間の休薬期間後に、この処置を繰り返す。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本明細書に記載されている技術および処方物（例えば、実施例１０を参照のこと）を用いて、さもなければ当該分野で公知の技術および処方物を用いて処方され得る。

【０７６０】

（実施例１３：遺伝子治療を使用する処置方法－エキソビボ）

遺伝子治療の１つの方法は、ポリペプチドを発現し得る線維芽細胞を患者に移植する。一般に、線維芽細胞は、皮膚生検により被験者から得られる。得られた組織を組織培養培地中に配置し、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に置き、約１０片を各フラスコに置く。このフラスコを倒置し、しっかりと閉め、そして、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、そして組織塊をフラスコの底に固定させたままにし、そして新鮮な培地（例えば、１０％ＦＢＳ、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するＨａｍのＦ１２培地）を添加する。次に、フラスコを３７℃で約１週間インキュベートする。

【０７６１】

この時点で、新鮮な培地を添加し、次いで数日ごとに取り換える。さらに二週間培養した後に、単層の線維芽細胞が出現する。この単層をトリプシン処理し、さらに大きなフラスコにスケールアップする。

【０７６２】

モロニーマウス肉腫ウイルスの長末端反復が隣接するｐＭＶ－７（Ｋｉｒｓｃｈｍｅｉｅｒ，Ｐ．Ｔ．ら、ＤＮＡ，７：２１９－２５（１９８８））をＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化した後、仔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、そしてガラスビーズを使用して精製する。

【０７６３】

本発明のポリペプチドをコードするｃＤＮＡを、プライマーを用い、そして必要な場合、適切な制限部位および開始／終止コドンを有する、実施例１に記載のそれぞれ５’末端配列および３’末端配列に対応するＰＣＲプライマーを使用して増幅し得る。好ましくは、この５’プライマーはＥｃｏＲＩ部位を含み、そしてこの３’プライマーはＨｉｎｄＩＩＩ部位を含む。等量の、モロニーマウス肉腫ウイルスの線状骨格および増幅した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、この２つのフラグメントを連結するのに適した条件下で維持する。次に、連結混合物を使用し、細菌ＨＢ１０１を形質転換する。次に、それを、カナマイシンを含む寒天上にプレーティングし、ベクターが正確に挿入された目的の遺伝子を有することを確認する。

【０７６４】

両種指向性ｐＡ３１７またはＧＰ＋ａｍ１２パッケージング細胞を、１０％仔ウシ血清（ＣＳ）、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、組織培養でコンフルエントな密度まで増殖させる。次に、その遺伝子を含むＭＳＶベクターを培地に加え、そしてパッケージング細胞をこのベクターで形質導入する。このとき、このパッケージング細胞は、その遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する（ここで、このパッケージング細胞をプロデューサー細胞という）。

【０７６５】

形質導入されたプロデューサー細胞に新鮮な培地を添加し、次いでこの培地を１０ｃｍプレートのコンフルエントなプロデューサー細胞から採取する。感染性ウイルス粒子を含む使用済み培地を、ミリポアフィルターを通して濾過し、はがれたプロデューサー細胞を除

去した後、この培地を使用して、線維芽細胞を感染させる。線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから培地を除去し、そしてプロデューサー細胞からの培地で速やかに置き換える。この培地を除去し、そして新鮮な培地と置き換える。ウイルスの力価が高ければ、実質的にすべての線維芽細胞が感染され、選択は必要ではない。力価が非常に低ければ、ｎｅｏまたはｈｉｓのような選択マーカーを有するレトロウイルスベクターを使用することが必要である。一旦、線維芽細胞が効率的に感染したなら、その線維芽細胞を分析し、タンパク質が産生されているか否かを決定する。

【０７６６】

次に、操作された線維芽細胞を、単独で、またはサイトデックス３マイクロキャリアビーズ上でコンフルエントに増殖させた後のいずれかで、宿主に移植する。

【０７６７】

（実施例１４：内因性ＩＬ－６様遺伝子を使用する遺伝子治療）

本発明に従う遺伝子治療の別の方法は、内因性ＩＬ－６様遺伝子配列を、例えば、米国特許番号５，６４１，６７０（１９９７年６月２４日発行）；国際公開番号ＷＯ　９６／２９４１１（１９９６年９月２６日公開）；国際公開番号ＷＯ　９４／１２６５０（１９９４年８月４日公開）；Ｋｏｌｌｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８６：８９３２～８９３５（１９８９）；およびＺｉｊｌｓｔｒａら、Ｎａｔｕｒｅ，３４２：４３５～４３８（１９８９）に記載されるように、相同組換えを介してプロモーターに作動可能に結合する工程を包含する。この方法は、その標的細胞中に存在するが、その細胞中では発現されないかまたは所望されるよりも低いレベルで発現される、遺伝子の活性化を包含する。

【０７６８】

プロモーターおよび標的化配列を含むポリヌクレオチド構築物を作製する。この標的化配列は、プロモーターに隣接する、内因性ＩＬ－６様遺伝子の５’非コード配列に相同である。この標的化配列は、このＩＬ－６様遺伝子の５’末端に十分に近く、その結果、このプロモーターは、相同組換えの際にこの内因性配列に作動可能に連結される。このプロモーターおよび標的化配列を、ＰＣＲを使用して増幅し得る。好ましくは、この増幅したプロモーターは、５’末端および３’末端上に異なる制限酵素部位を含む。好ましくは、第１の標的化配列の３’末端は、増幅したプロモーターの５’末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第２の標的化配列の５’末端は、増幅したプロモーターの３’末端と同じ制限部位を含む。

【０７６９】

この増幅したプロモーターおよび増幅した標的化配列を、適切な制限酵素で消化し、続いて仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。消化したプロモーターおよび消化した標的化配列を、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼの存在下でともに加える。生じた混合物を、これら２つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。この構築物をアガロースゲルでサイズ分画し、次いでフェノール抽出およびエタノール沈殿により精製する。

【０７７０】

この実施例において、このポリヌクレオチド構築物を、エレクトロポレーションを介して裸のポリヌクレオチドとして投与する。しかし、このポリヌクレオチド構築物はまた、トランスフェクション促進剤（例えば、リポソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、沈殿剤など）とともに投与され得る。送達のこのような方法は、当該分野で公知である。

【０７７１】

一旦、細胞をトランスフェクトすると、相同組換えが生じて、このプロモーターがこの内因性ＩＬ－６様遺伝子配列に作動可能に連結される。これは、この細胞中におけるこのＩＬ－６様の発現を生じる。発現は、免疫学的染色または当該分野で公知の他の任意の方法により、検出され得る。

【０７７２】

線維芽細胞を、皮膚生検により被験者から得る。得られた組織を、ＤＭＥＭ＋１０％ウシ胎仔血清中に配置する。対数増殖期または定常期初期の線維芽細胞を、トリプシン処理し

、そしてプラスチックの表面から栄養培地でリンスする。細胞懸濁液のアリコートを、計数のために取り出し、そして残りの細胞を遠心分離に供する。上清を吸引し、そしてペレットを５ｍｌのエレクトロポレーション緩衝液（２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．３、１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＫＣｌ、０．７ｍＭ　Na_2HPO_4、６ｍＭデキストロース）に再懸濁する。この細胞を再遠心分離し、上清を吸引し、そして細胞をアセチル化ウシ血清アルブミン１ｍｇ／ｍｌを含むエレクトロポレーション緩衝液に再懸濁する。この最終細胞懸濁物は、約3×10^6細胞／ｍｌを含む。エレクトロポレーションを、再懸濁直後に実施すべきである。

【０７７３】

プラスミドＤＮＡを、標準的技術に従って調製する。例えば、ＩＬ－６様遺伝子座に標的化するためのプラスミドを構築するために、プラスミドｐＵＣ１８（ＭＢＩ　Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ、Ａｍｈｅｒｓｔ、ＮＹ）をＨｉｎｄＩＩＩで消化する。ＣＭＶプロモーターを、５’末端にＸｂａＩ部位および３’末端にＢａｍＨＩ部位を備えてＰＣＲにより増幅する。２つのＩＬ－６様非コード遺伝子配列をＰＣＲを介して増幅する：一方のＩＬ－６様非コード配列（ＩＬ－６様フラグメント１）を、５’末端にＨｉｎｄＩＩＩ部位および３’末端にＸｂａ部位を備えて増幅する；他方のＩＬ－６様非コード配列（ＩＬ－６様フラグメント２）を、５’末端にＢａｍＨＩ部位および３’末端にＨｉｎｄＩＩＩ部位を備えて増幅する。このＣＭＶプロモーターおよびＩＬ－６様フラグメントを、適切な酵素（ＣＭＶプロモーター－ＸｂａＩおよびＢａｍＨＩ；ＩＬ－６様フラグメント１－ＸｂａＩ；ＩＬ－６様フラグメント２－ＢａｍＨＩ）で消化し、そしてともに連結する。生じた連結生成物をＨｉｎｄＩＩＩで消化し、そしてＨｉｎｄＩＩＩで消化したｐＵＣ１８プラスミドと連結する。

【０７７４】

プラスミドＤＮＡを、０．４ｃｍの電極ギャップを備える滅菌キュベット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に添加する。最終ＤＮＡ濃度は、一般的に、少なくとも１２０μｇ／ｍｌである。次いで、この細胞懸濁液の０．５ｍｌ（約1.5×10^6細胞を含む）をこのキュベットに添加し、そしてこの細胞懸濁液およびＤＮＡ溶液を、穏やかに混合する。エレクトロポレーションを、Ｇｅｎｅ－Ｐｕｌｓｅｒ装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて実施する。キャパシタンスおよび電圧を、それぞれ、９６０μＦおよび２５０～３００Ｖに設定する。電圧が増加すると、細胞の生存が減少するが、導入されたＤＮＡをそれらのゲノム中に安定に組込む生存細胞の割合が劇的に増加する。これらのパラメーターを考慮すると、パルス時間約１４～２０ｍＳｅｃが観察されるはずである。

【０７７５】

エレクトロポレーションした細胞を、室温で約５分間維持し、次いで、このキュベットの中身を、滅菌した移動ピペットを用いて穏やかに取り出す。この細胞を、１０ｃｍのディッシュ中の、予め温めた栄養培地（１５％仔ウシ血清を含むＤＭＥＭ）１０ｍｌに直接加え、そして３７℃でインキュベートする。翌日、この培地を吸引し、そして１０ｍｌの新鮮な培地で置換し、そしてさらに１６～２４時間インキュベートする。

【０７７６】

次いで、操作された線維芽細胞を、宿主中に、単独か、またはサイトデックス（ｃｙｔｏｄｅｘ）３マイクロキャリア（ｍｉｃｒｏｃａｒｒｉｅｒ）ビーズ上でコンフルエントになるまで増殖させた後かのいずれかで、注入する。ここで、この線維芽細胞は、タンパク質産物を生成する。次いで、この線維芽細胞を、上記のような患者に導入し得る。

【０７７７】

（実施例１５：遺伝子治療を使用する処置方法－インビボ）

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置するためにインビボ遺伝子治療方法を使用することである。この遺伝子治療法は、ＩＬ－６様ポリペプチドの発現を増大または減少させるための、動物への裸の核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ、およびアンチセンスＤＮＡまたはＲＮＡ）ＩＬ－６様配列の導入に関する。ＩＬ－６様ポリヌクレオチドは、プロモーター、または標的組織によるＩＬ－６様ポリペプチドの発現に必要な任意の他の遺伝子エ

レメントに、作動可能に連結され得る。このような遺伝子治療および送達の技術および方法は、当該分野で公知であり、例えば、ＷＯ９０／１１０９２、ＷＯ９８／１１７７９；米国特許第５６９３６２２号、同第５７０５１５１号、同第５５８０８５９号；Ｔａｂａｔａら、Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．３５（３）：４７０－４７９（１９９７）；Ｃｈａｏ　Ｊら、Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｓ．３５（６）：５１７－５２２（１９９７）；Ｗｏｌｆｆ、Ｎｅｕｒｏｍｕｓｃｕｌ．Ｄｉｓｏｒｄ．７（５）：３１４－３１８（１９９７）、Ｓｃｈｗａｒｔｚら、Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，３（５）：４０５－４１１（１９９６）；Ｔｓｕｒｕｍｉ　Ｙ．ら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ　９４（１２）：３２８１－３２９０（１９９６）（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

【０７７８】

ＩＬ－６様ポリヌクレオチド構築物は、注入可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法（例えば、組織（心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸など）の間隙空間への注入）によって送達され得る。ＩＬ－６様ポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリア中で送達され得る。

【０７７９】

用語「裸の」ポリヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡは、細胞への侵入を補助、促進、または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、または沈澱剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、ＩＬ－６様ポリヌクレオチドはまた、当業者に周知の方法によって調製され得るリポソーム処方物（例えば、Ｆｅｌｇｎｅｒら　Ａｎｎ．ＮＹ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，７７２：１２６－１３９（１９９５）およびＡｂｄａｌｌａｈら　Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ　８５（１）：１－７（１９９５）で教示されたもの）中で送達され得る。

【０７８０】

この遺伝子治療方法において使用されるＩＬ－６様ポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列も含まない構築物である。当業者に公知の任意の強力なプロモーターが、ＤＮＡの発現を駆動するために用いられ得る。他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する１つの主要な利点は、その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。研究によって、非複製ＤＮＡ配列が細胞に導入されて、６ヶ月までの間の期間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【０７８１】

ポリヌクレオチド構築物を、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）の間隙空間に送達され得る。組織の間隙空間は、細胞間液、器官組織の細網線維間のムコ多糖マトリクス、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは筋肉細胞を囲む結合組織内の同じマトリクス（ｔｈａｔ　ｓａｍｅ　ｍａｔｒｉｘ）または骨の裂孔中の結合組織内の同じマトリクス（ｔｈａｔ　ｓａｍｅ　ｍａｔｒｉｘ）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。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下に記載の理由のために好ましい。このポリヌクレオチド構築物を、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達し得る。このポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、持続性の分化した非分裂細胞に送達され、その細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞）において達成され得る。インビボ筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そしてこのポリヌクレオチドを発現する能力において、特に適格である。

【０７８２】

裸のＩＬ－６様ポリヌクレオチド注射のために、ＤＮＡまたはＲＮＡの有効投薬量は、約０．０５ｇ／ｋｇ体重～約５０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲にある。好ましくは、投薬量は、約０．００５ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇであり、そしてより好ましくは、約０．０５ｍ

ｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇである。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注射の組織部位に従って変動する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして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、組織の間隙空間への非経口注射経路によってである。しかし、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組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸のＩＬ－６様ポリヌクレオチド構築物を、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って動脈に送達し得る。

【０７８３】

インビボでの筋肉における注射されたＩＬ－６様ポリヌクレオチドの用量応答効果を、以下のようにして決定する。ＩＬ－６様ポリペプチドをコードするｍＲＮＡの生成のために適切なＩＬ－６様鋳型ＤＮＡを、標準的な組換えＤＮＡ方法論に従って調製する。鋳型ＤＮＡ（これは環状または直鎖状のいずれかであり得る）を裸のＤＮＡとして使用するか、またはリポソームと複合体化するかのいずれかを行う。次いで、マウスの四頭筋に、多様な量のこの鋳型ＤＮＡを注射する。

【０７８４】

５～６週齢の雌性および雄性のＢａｌｂ／Ｃマウスに、０．３ｍｌの２．５％Ａｖｅｒｔｉｎを腹腔内注射することにより麻酔する。１．５ｃｍの切開を大腿前部で行い、そして四頭筋を直接可視化する。ＩＬ－６様鋳型ＤＮＡを、０．１ｍｌのキャリアに入れて、１ｃｃ注射器で２７ゲージ針を通して１分間にわたって、この筋肉の遠位挿入部位から約０．５ｃｍの位置で膝に、約０．２ｃｍの深さで注射する。縫合を、将来の位置確認のために注射部位の上で行い、そして皮膚をステンレス鋼クリップで閉じる。

【０７８５】

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、四頭全体を切り出すことによって調製する。個々の四頭筋の５枚目毎の１５μｍ切片を、ＩＬ－６様タンパク質発現について組織化学的に染色する。ＩＬ－６様タンパク質発現についての時間経過は、異なるマウスから四頭筋を異なる時間に採取すること以外は、同様な様式で行い得る。注射後の筋肉中のＩＬ－６様ＤＮＡの持続性を、注射したマウスおよびコントロールマウスから総細胞性ＤＮＡおよびＨＩＲＴ上清を調製した後、サザンブロット分析によって決定し得る。マウスにおける上記実験の結果は、ＩＬ－６様の裸のＤＮＡを用いて、ヒトおよび他の動物において適切な投薬量および他の処置パラメーターを推定するために使用し得る。

【０７８６】

（実施例１６：抗体の産生）

ａ）ハイブリドーマ技術

本発明の抗体を、種々の方法によって調製し得る。（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ、第２章を参照のこと）。このような方法の１つの例として、ＩＬ－６様ポリペプチドを発現する細胞を、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために、動物に投与する。好ましい方法において、ＩＬ－６様ポリペプチドの調製物を調製し、そしてその調製物が、天然の夾雑物を実質的に含まないようにするために精製する。ついで、このような調製物を、より大きな比活性のポリクローナル抗体を産生するために、動物に導入する。

【０７８７】

ＩＬ－６様ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を、ハイブリドーマ技術を使用して調製する（Ｋｏｈｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５（１９７５）；Ｋｏｈｌｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５１１（１９７６）；Ｋｏｈｌｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：２９２（１９７６）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ｎ．Ｙ．、５６３～６８１頁（１９８１））。一般的に、動物（好ましくは、マウス）を、ＩＬ－６様ポリペプチドまたはより好ましくは分泌ＩＬ－６様ポリペ

プチド発現細胞で、免疫する。このようなポリペプチド発現細胞を、適切な任意の組織培養培地（好ましくは、１０％ウシ胎仔血清（約５６℃にて不活化）を補充し、そして約１０ｇ／ｌの非必須アミノ酸、約１，０００Ｕ／ｍｌのペニシリン、および約１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを補充した、Ｅａｒｌｅ’ｓ改変Ｅａｇｌｅ’ｓ培地）にて培養する。

【０７８８】

このようなマウスの脾細胞を抽出し、そして適切な骨髄腫細胞株と融合させる。適切な任意の骨髄腫細胞株を、本発明に従って使用し得るが、しかし、親骨髄腫細胞株（ＳＰ２Ｏ）（ＡＴＣＣから入手可能）を使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培地にて選択的に維持し、ついで、Ｗａｎｄｓら（Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ　８０：２２５～２３２（１９８１））により記載されるように、限界希釈によってクローン化する。ついで、このような選択を介して得たハイブリドーマ細胞をアッセイして、ＩＬ－６様ポリペプチドを結合し得る抗体を分泌するクローンを同定する。

【０７８９】

あるいは、ＩＬ－６様ポリペプチドに結合し得るさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を使用して２段階工程の手順において生成し得る。このような方法は、抗体それ自体が抗原であり、それゆえ二次抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用する。この方法に従って、タンパク質特異的抗体を使用して、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使用して、ハイブリドーマ細胞を産生する。そして、このハイブリドーマ細胞は、ＩＬ－６様タンパク質特異的抗体に結合する能力がＩＬ－６様ポリペプチドによってブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。このような抗体は、ＩＬ－６様タンパク質特異的抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、そして動物を免疫してさらなるＩＬ－６様タンパク質特異的抗体の形成を誘導するために使用される。

【０７９０】

ヒトにおける抗体のインビボ使用のために、抗体は、「ヒト化」される。このような抗体は、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に由来する遺伝的構築物を使用することによって産生され得る。キメラ抗体およびヒト化抗体を産生するための方法は当該分野で公知であり、そして本明細書に議論される（総説については、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４（１９８６）；Ｃａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら、ＥＰ　１７１４９６；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、ＥＰ　１７３４９４；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、ＷＯ　８６０１５３３；Ｒｏｂｉｎｓｏｎら、ＷＯ　８７０２６７１；Ｂｏｕｌｉａｎｎｅら、Ｎａｔｕｒｅ　３１２：６４３（１９８４）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　３１４：２６８（１９８５）を参照のこと）。

【０７９１】

ｂ）ｓｃＦｖのライブラリーからのＩＬ－６様ポリペプチドに対して指向される抗体フラグメントの単離

ヒトＰＢＬから単離した天然に存在するＶ遺伝子を、ＩＬ－６様ポリペプチド（ドナーは、これらに対して曝露されていても曝露されていなくともよい）に対する反応性を含む抗体フラグメントのライブラリーに構築する（例えば、米国特許第５，８８５，７９３号（その全体が参考として本明細書に援用される）を参照のこと）。

【０７９２】

（ライブラリーのレスキュー（ｒｅｓｃｕｅ））

ＰＣＴ公開ＷＯ　９２／０１０４７に記載のように、ヒトＰＢＬのＲＮＡからｓｃＦｖのライブラリーを構築する。抗体フラグメントを提示するファージをレスキューするため、ファージミドを保有する約10^9個のＥ．ｃｏｌｉを用いて、５０ｍｌの２×ＴＹ（１％グルコースおよび１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する）（２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＧＬＵ）を接種し、そして振盪しながら０．８のＯ．Ｄ．まで増殖させる。この培養物の５ｍｌを用いて５０ｍｌの２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＧＬＵに接種し、2×10^8 ＴＵのΔ遺伝子

３ヘルパー（Ｍ１３Δ遺伝子ＩＩＩ、ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０１０４７を参照のこと）を添加し、そして培養物を振盪なしで３７℃で４５分間インキュベートし、次いで振盪しながら３７℃で４５分間インキュベートする。この培養物を１０分間４０００ｒ．ｐ．ｍ．で遠心分離し、そしてペレットを２リットルの２×ＴＹ（１００μｇ／ｍｌアンピシリンおよび５０μｇ／ｍｌカナマイシンを含有する）中に再懸濁し、そして一晩増殖させる。ファージをＰＣＴ公開ＷＯ９２／０１０４７に記載のように調製する。

【０７９３】

Ｍ１３Δ遺伝子ＩＩＩを以下のように調製する：Ｍ１３Δ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しない。それゆえ、抗体フラグメントを提示するファージ（ファージミド）は、抗原に対するより大きい結合アビディティーを有する。ファージ形態形成の間、野生型遺伝子ＩＩＩタンパク質を供給するｐＵＣ１９誘導体を保有する細胞においてヘルパーファージを増殖させることにより、感染性Ｍ１３Δ遺伝子ＩＩＩ粒子を作製する。培養物を振盪なしで３７℃で１時間インキュベートし、次いで振盪しながら３７℃でさらに１時間インキュベートする。細胞を遠心沈殿（ＩＥＣ－Ｃｅｎｔｒａ　８，４００ｒ．ｐ．ｍ．で１０分間）し、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンおよび２５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有する２×ＴＹブロス（２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＫＡＮ）３００ｍｌ中で再懸濁し、そして３７℃で振盪しながら一晩増殖させた。ファージ粒子を、２回のＰＥＧ沈殿（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９９０）により培養培地から精製および濃縮し、２ｍｌ　ＰＢＳに再懸濁し、そして０．４５μｍのフィルター（Ｍｉｎｉｓａｒｔ　ＮＭＬ；Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）を通過させ、約10^{13}形質導入単位／ｍｌ（アンピシリン耐性クローン）の最終濃度を得る。

【０７９４】

（ライブラリーのパニング）

１００μｇ／ｍｌまたは１０μｇ／ｍｌのいずれかの本発明のポリペプチドの４ｍｌを用いてＰＢＳ中でイムノチューブ（Ｉｍｍｕｎｏｔｕｂｅ）（Ｎｕｎｃ）を、一晩コートした（被覆した）。チューブを、３７℃で２時間２％Ｍａｒｖｅｌ－ＰＢＳでブロックし、次いでＰＢＳ中で３回洗浄した。約１０１３ＴＵのファージを、このチューブに加え、そして反転ターンテーブル（回転盤）上で反転しながら室温で３０分間インキュベートし、次いでさらに１．５時間静置させた。チューブをＰＢＳ　０．１％　Ｔｗｅｅｎ－２０を用いて１０回そしてＰＢＳで１０回洗浄した。１ｍｌの１００ｍＭトリエチレンアミンを加え、そして反転ターンテーブル上で１５分間回転させ、その後この溶液を０．５ｍｌの１．０Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４で直ちに中和する。次いで、抽出したファージを３７℃で３０分間Ｅ．ｃｏｌｉとともに培養して用いて、１０ｍｌのｍｉｄ－ｌｏｇ　Ｅ．ｃｏｌｉ　ＴＧ１を感染させた。次いでこのＥ．ｃｏｌｉを１％グルコースおよび１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有するＴＹＥプレート上にプレートした。ついでこの得られた細菌のライブラリーを、上記のように、デルタ遺伝子３ヘルパーファージを用いてレスキューし、次の回の選択のためのファージを調製する。次いで、このプロセスを全部で４回のアフィニティー精製（ＰＢＳ、０．１％　Ｔｗｅｅｎ－２０での２０回まで、そして３回目および４回目のＰＢＳでの２０回まで増加したチューブ洗浄を伴う）のために繰り返す。

【０７９５】

（結合剤の特徴付け）

３回目および４回目の選択から抽出したファージを用いてＥ．ｃｏｌｉ　ＨＢ　２１５１を感染し、そしてアッセイのために単一のコロニーから可溶性ｓｃＦｖを生成する（Ｍａｒｋｓら、１９９１）。本発明の１０ｐｇ／ｍｌのポリペプチドを含有する５０ｍＭ重炭酸塩ｐＨ９．６を用いて被覆したマイクロタイタープレートで、ＥＬＩＳＡを実施する。ＥＬＩＳＡで陽性のクローンは、ＰＣＲフィンガープリント（例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０１０４７を参照のこと）によって、次いで配列決定によってさらに特徴付けられる。ＥＬＩＳＡ陽性のクローンはまた、当該分野で公知の技術（例えば、エピトープマッピング、結合親和性（バインディングアフィニティー）、レセプターシグナル伝達、抗体

／抗原結合をブロックするかまたは競合阻害する能力、および競合アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性など）によってさらに特徴付けられ得る。

【０７９６】

（実施例１７：ＩＬ－６バイオアッセイ）

本発明の精製したＩＬ－６様ポリペプチドの増殖効果を試験するため、Ｍａｒｚらによって記載されるＩＬ－６バイオアッセイを利用する（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，９５：３２５１～５６（１９９８）（これは、参考として本明細書に援用されている））。要するに、ＩＬ－６依存性Ｂ９マウス細胞をＩＬ－６なしの培地中で３回洗浄し、そして１ウェルあたり１０μｌで５，０００細胞の濃度にプレートし、そして５０μｌのＩＬ－６様ポリペプチドを添加する。６８時間後、３７℃で、チアゾリルブルーテトラゾリウム塩（ＭＴＴ）を添加し、そして３７℃でさらに４時間インキュベートすることにより、生存細胞の数を測定する。Ｂ９細胞をＳＤＳで溶解し、そして５７０ｎｍで至適密度を測定する。ＩＬ－６を含む（陽性）およびサイトカインを含まない（陰性）のコントロールを使用する。陰性コントロールに対して試験サンプルにおける増殖の増強は、本発明のＩＬ－６様ポリペプチドにより媒介された増殖効果の指標である。

【０７９７】

（実施例１８：ニワトリ胚ニューロン生存の支持）

交感神経細胞の生存度が本発明のＩＬ－６様ポリペプチドによって支持されるか否かを試験するため、Ｓｅｎａｌｄｉらのニワトリ胚神経生存アッセイを利用する（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９６：１１４５８～６３（１９９８）（これは、参考として本明細書に援用される））。要するに、運動ニューロンおよび交感神経ニューロンをニワトリ胚から単離し、Ｌ１５培地中（以下を含有：１０％ＦＣＳ、グルコース、セレン酸ナトリウム、プロゲステロン、コンアルブミン、プトレシン、およびインスリン；Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）およびダルベッコ改変イーグル培地［以下を含有：１０％ＦＣＳ、グルタミン、ペニシリン、および２５ｍＭ Ｈｅｐｅｓ緩衝液（ｐＨ７．２）；Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ］にそれぞれ、再懸濁し、そして本発明の精製ＩＬ－６様ポリペプチドの異なる濃度の存在下、およびサイトカインを含まない陰性コントロールの存在下で、３７℃で５％CO_2中で培養する。３日後、ニューロン生存を細胞形態の評価によって、およびＭｏｓｍａｎｎの比色アッセイの使用によって決定する（Ｍｏｓｓｍａｎ，Ｔ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、６５：５５～６３（１９８３））。サイトカインを含まないコントロールと比較したニューロン細胞生存度の強化は、本発明の精製ＩＬ－６様ポリペプチドがニューロン細胞の生存を増強する能力の指標である。

【０７９８】

本発明を、前述の説明および実施例に詳細に記載された以外の方法で実施し得ることは、明らかである。本発明の多数の改変およびバリエーションが、上記の教示を考慮して可能であり、従って、それは、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

【０７９９】

発明の背景、詳細な説明および実施例において引用された各文書の全開示（特許、特許出願、学術文献、要約、実験マニュアル、書籍または他の開示を含む）は、本明細書中に参考として援用される。さらに、本明細書にとともに提出された配列表のハードコピーおよび対応するコンピューター読み出し形態は、両方とも本明細書中にその全体が参考として援用される。

【０８００】

本発明の特定のＩＬ－６－様ポリヌクレオチドおよびポリペプチド（抗体を含む）は、米国仮出願シリアル番号第６０／１６９，８３８号に開示され、これは、その全体において参考として本明細書中で援用される。さらに、米国仮出願シリアル番号第６０／１６９，８３８号の配列表のハードコピーおよびコンピューター読み取り可能な形態はまた、その全体が参考として本明細書に援用される。

【０８０１】

【表６】

出願人または代理人の参照番号
PTO26PCT

国際出願番号
（未指定）

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

13 頁、 N/A 行

Ｂ．寄託物の表示 その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ☐

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日	登録番号
1999年11月4日	PTA-912

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く ☐

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

ヨーロッパ

欧州特許が求められる指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日までは、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる。（EPC規則28(4)）

添付の第２頁および第３頁に続く

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☑この用紙は国際出願とともに受理された	☐この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官

PCT/RO/134様式（1992年７月）

（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－９１２）
（第２頁）
（カナダ）
出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官（Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎｅｒ　ｏｆ　Ｐａｔｅｎｔｓ）が、長官により指名された独立の専門家に対してのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。
【０８０２】

（ノルウェー）
出願人はここにおいて、出願が（ノルウェー特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第２２条および第３３条（３）に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト（ｌｉｓｔ　ｏｆ　ｒｅｃｏｇｎｉｚｅｄ　ｅｘｐｅｒｔｓ）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【０８０３】
（オーストラリア）
出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄（ｌａｐｓｉｎｇ）、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者（ｓｋｉｌｌｅｄ　ａｄｄｒｅｓｓｅｅ）に対してのみ行われる旨を、告知するものである（オーストラリア国特許法第３．２５（３）号規定）。

【０８０４】
（フィンランド）
出願人はここにおいて、出願が（特許および統制委員会（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｂｏａｒｄ　ｏｆ　Ｐａｔｅｎｔｓ　ａｎｄ　Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎｓ）により）公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

【０８０５】
（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－９１２）
（第３頁）
（英国）
出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

【０８０６】
（デンマーク）
出願人はここにおいて、出願が（デンマーク特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第２２条および第３３条（３）に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト（ｌｉｓｔ　ｏｆ　ｒｅｃｏｇｎｉｚｅｄ　ｅｘｐｅｒｔｓ）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【０８０７】
（スウェーデン）
出願人はここにおいて、出願が（スウェーデン特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から１６ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする（好ましくはＰＣＴ　Ａｐｐｌｉｃａｎｔ’ｓ　ＧｕｉｄｅのＶｏｌｕｍｅ　Ｉのａｎｎｅｘ　Ｚに記載された書式ＰＣＴ／ＲＯ／１３４による）。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト（

ｌｉｓｔ ｏｆ ｒｅｃｏｇｎｉｚｅｄ ｅｘｐｅｒｔｓ）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【０８０８】

（オランダ）

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄（ｌａｐｓｅｄ）される日までは、特許法３１Ｆ（１）の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第２２Ｃ条または第２５条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
14 June 2001 (14.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/42484 A1

(51) International Patent Classification⁷: C12P 21/06, G01N 33/53, C07K 1/00, 16/00

(21) International Application Number: PCT/US00/33134

(22) International Filing Date: 7 December 2000 (07.12.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/169,838 9 December 1999 (09.12.1999) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): HUMAN GENOME SCIENCES, INC. [US/US]; 9410 Key West Avenue, Rockville, MD 20850 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): RUBEN, Steven, M. [US/US]; 18528 Heritage Hills Drive, Olney, MD 20832 (US). SIL, Yang-gu [US/US]; 437 West Side Drive, Apt. 102, Gaithersburg, MD 20878 (US).

(74) Agents: HOOVER, Kenley, K. et al.; Human Genome Sciences, Inc., 9410 Key West Avenue, Rockville, MD 20850 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
With international search report.
Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/42484 A1

(54) Title: IL-6 LIKE POLYNUCLEOTIDE

(57) Abstract: The present invention relates to novel human IL-6 like polypeptides and isolated nucleic acids containing the coding regions of the genes encoding such polypeptides. Also provided are vectors, host cells, and recombinant methods for producing human IL-6 like polypeptides.

IL-6-like Polynucleotides

Field of the Invention

The present invention relates to novel IL-6-like proteins. More specifically, isolated nucleic acid molecules are provided encoding novel IL-6-like polypeptides. Novel IL-6-like polypeptides and antibodies that bind to these polypeptides are provided. Also provided are vectors, host cells, and recombinant and synthetic methods for producing human IL-6-like polynucleotides and/or polypeptides. The invention further relates to diagnostic and therapeutic methods useful for diagnosing, treating, preventing and/or prognosing disorders related to these novel IL-6-like polypeptides. The invention further relates to screening methods for identifying agonists and antagonists of polynucleotides and polypeptides of the invention. The present invention further relates to methods and/or compositions for inhibiting the production and function of the polypeptides of the present invention.

Background of the Invention

Cytokines are a large group of secreted proteins that function in a wide range of biological activities, including immunomodulation, immune cell stimulation and/or proliferation, and mediation of allergic reactions. Cytokines signal through a family of transmembrane receptors known as the cytokine receptors, which are classified as either Class I or Class II. (O'Shea, J.J., *Immunity*, 7:1-11 (1997)). Binding of a cytokine to the appropriate cytokine receptor induces activation of JAK kinases associated with the cytokine receptor, resulting in receptor phosphorylation and recruitment of signal transduction molecules, such as STATs, which are then translocated to the nucleus where they function as transcriptional activators of gene regulation.

IL-6 is a secreted, multifunctional cytokine involved in a wide range of functions on the immune and hematopoietic systems, hepatocytes, and the nervous system (Simpson, R.J., et al., *Protein Sci.*, 6:929-955 (1997); Rakemann, T., et al., *J Biol Chem*, *274*:1257-66 (1999)). Examples of such activity include proliferation of and differentiation of T-cells and cytotoxic T-lymphocytes, Ig production, proliferation of myeloma cells, support of survival of cholinergic neurons, and neural differentiation of PC12 cells (Kishimoto, T., et al., *Blood*, *86*:1243-1254 (1995)).

The natural form of Interleukin-6 (IL-6) is a single-chain glycoprotein with a molecular mass (M_r) of between 21K and 30K, depending upon the method of preparation and the cellular source. IL-6 is found in low abundance in the circulatory system. (Simpson, R.J., et al., *Protein Sci., 6*:929-955 (1997)). It is thought that IL-6 may play a role in endothelial cells, particularly in immune reactions and proinflammatory responses. Endothelial cells play an important role in infection and the inflammatory response, and produce copious amounts of IL-6 in response to proinflammatory signals, IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) (Romano, M., et al., *Immunity, 6*:315-25 (1997)).

Diseases associated with increased expression of IL-6 include plasmacytoma/myeloma, Castleman's disease, mesangial proliferative glomerulonephritis, osteoporosis, autoimmune diseases, and AIDS (Krebs, B., et al., *J Biol Chem., 273*:2858-65 (1998)). Antibodies directed against the translation product of the IL-6-like gene may be useful for the amelioration or treatment of such diseases. Alternatively, the translation product of the gene may be useful as a protein therapeutic for the prevention or treatment of various diseases and/or disorders, such as neural cell death.

Thus there exists a clear need for identifying and exploiting novel IL-6-like proteins. Although structurally related, such proteins may possess diverse and multifaceted functions in a variety of cell and tissue types. The purified IL-6-like polypeptides of the invention are research tools useful for the identification, characterization and purification of target binding molecules. Furthermore, the identification of new IL-6-like proteins permits the development of a range of derivatives, agonists and antagonists at the nucleic acid and protein levels which in turn have applications in the treatment and diagnosis of a range of conditions such as cancer, inflammation, neurological disorders and immune diseases and/or disorders, amongst many other conditions.

Summary of the Invention

The present invention includes isolated nucleic acid molecules comprising, or alternatively, consisting of a polynucleotide sequence disclosed in the sequence listing and/or contained in a human cDNA plasmid described in Table 1 and deposited with the American Type Culture Collection (ATCC). Fragments, variants, and derivatives of these nucleic acid molecules are also encompassed by the invention. The present invention also includes

isolated nucleic acid molecules comprising, or alternatively, consisting of, a polynucleotide encoding IL-6-like polypeptides. The present invention further includes IL-6-like polypeptides encoded by these polynucleotides. Further provided for are amino acid sequences comprising, or alternatively, consisting of, IL-6-like polypeptides as disclosed in the sequence listing and/or encoded by the human cDNA plasmids described in Table 1 and deposited with the ATCC. Antibodies that bind these polypeptides are also encompassed by the invention. Polypeptide fragments, variants, and derivatives of these amino acid sequences are also encompassed by the invention, as are polynucleotides encoding these polypeptides and antibodies that bind these polypeptides.

Detailed Description

Tables

Table 1 summarizes ATCC Deposits, Deposit dates, and ATCC designation numbers of deposits made with the ATCC in connection with the present application. Table 1 further summarizes the information pertaining to each "Gene No." described below, including cDNA clone identifier, the type of vector contained in the cDNA clone identifier, the nucleotide sequence identifier number, nucleotides contained in the disclosed sequence, the location of the 5' nucleotide of the start codon of the disclosed sequence, the amino acid sequence identifier number, and the last amino acid of the ORF encoded by the disclosed sequence.

Table 2 indicates public ESTs, of which at least one, two, three, four, five, ten, or more of any one or more of these public EST sequences are optionally excluded from certain embodiments of the invention.

Table 3 summarizes the expression profile of polynucleotides corresponding to the clones disclosed in Table 1. The first column provides a unique clone identifier, "Clone ID NO:V", for a cDNA clone related to each contig sequence disclosed in Table 1. Column 2, "Library Code" shows the expression profile of tissue and/or cell line libraries which express the polynucleotides of the invention. Each Library Code in column 2 represents a tissue/cell source identifier code corresponding to the Library Code and Library description provided in Table 4. Expression of these polynucleotides was not observed in the other tissues and/or cell libraries tested. One of skill in the art could routinely use this information to identify tissues which show a predominant expression pattern of the corresponding polynucleotide of the

invention or to identify polynucleotides which show predominant and/or specific tissue expression.

Table 4, column 1, provides the Library Code disclosed in Table 3, column 2. Column 2 provides a description of the tissue or cell source from which the corresponding library was derived. Library codes corresponding to diseased tissues are indicated in column 3 with the word "disease". The use of the word "disease in column 3 is non-limiting. The tissue source of the library may be specific (e.g., a neoplasm), or may be disease-associated (e.g., a tissue sample from a normal portion of a diseased organ). Furthermore, libraries lacking the "disease" designation may still be derived from sources directly or indirectly involved in a disease state or disorder, and therefore may have a further utility in that disease state or disorder.

Definitions

The following definitions are provided to facilitate understanding of certain terms used throughout this specification.

In the present invention, "isolated" refers to material removed from its original environment (e.g., the natural environment if it is naturally occurring), and thus is altered "by the hand of man" from its natural state. For example, an isolated polynucleotide could be part of a vector or a composition of matter, or could be contained within a cell, and still be "isolated" because that vector, composition of matter, or particular cell is not the original environment of the polynucleotide. The term "isolated" does not refer to genomic or cDNA libraries, whole cell total or mRNA preparations, genomic DNA preparations (including those separated by electrophoresis and transferred onto blots), sheared whole cell genomic DNA preparations or other compositions where the art demonstrates no distinguishing features of the polynucleotide/sequences of the present invention.

As used herein, a "polynucleotide" refers to a molecule having a nucleic acid sequence contained in SEQ ID NO:X (as described in column 5 of Table 1), or cDNA plasmid:V (as described in column 2 of Table 1 and contained within a pool of plasmids deposited with the ATCC in ATCC Deposit No:Z). For example, the polynucleotide can contain the nucleotide sequence of the full length cDNA sequence, including the 5' and 3' untranslated sequences, the coding region, with or without a natural or artificial signal sequence, the protein coding region, as well as fragments, epitopes, domains, and variants of

the nucleic acid sequence. Moreover, as used herein, a "polypeptide" refers to a molecule having an amino acid sequence encoded by a polynucleotide of the invention as broadly defined (obviously excluding poly-Phenylalanine or poly-Lysine peptide sequences which result from translation of a polyA tail of a sequence corresponding to a cDNA).

In the present invention, a representative plasmid containing the sequence of SEQ ID NO:X was deposited with the American Type Culture Collection ("ATCC") and/or described in Table 1. As shown in Table 1, each plasmid is identified by a cDNA Clone ID (Identifier) and the ATCC Deposit Number (ATCC Deposit No:Z). Plasmids that were pooled and deposited as a single deposit have the same ATCC Deposit Number. The ATCC is located at 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA. The ATCC deposit was made pursuant to the terms of the Budapest Treaty on the international recognition of the deposit of microorganisms for purposes of patent procedure.

A "polynucleotide" of the present invention also includes those polynucleotides capable of hybridizing, under stringent hybridization conditions, to sequences contained in SEQ ID NO:X, or the complement thereof (e.g., the complement of any one, two, three, four, or more of the polynucleotide fragments described herein) and/or sequences contained in cDNA plasmid:V (e.g., the complement of any one, two, three, four, or more of the polynucleotide fragments described herein). "Stringent hybridization conditions" refers to an overnight incubation at 42 degree C in a solution comprising 50% formamide, 5x SSC (750 mM NaCl, 75 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 μg/ml denatured, sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 0.1x SSC at about 65 degree C.

Also included within "polynucleotides" of the present invention are nucleic acid molecules that hybridize to the polynucleotides of the present invention at lower stringency hybridization conditions. Changes in the stringency of hybridization and signal detection are primarily accomplished through the manipulation of formamide concentration (lower percentages of formamide result in lowered stringency); salt conditions, or temperature. For example, lower stringency conditions include an overnight incubation at 37 degree C in a solution comprising 6X SSPE (20X SSPE = 3M NaCl, 0.2M NaH_2PO_4; 0.02M EDTA, pH 7.4), 0.5% SDS, 30% formamide, 100 ug/ml salmon sperm blocking DNA; followed by washes at 50 degree C with 1XSSPE, 0.1% SDS. In addition, to achieve even lower

stringency, washes performed following stringent hybridization can be done at higher salt concentrations (e.g. 5X SSC).

Note that variations in the above conditions may be accomplished through the inclusion and/or substitution of alternate blocking reagents used to suppress background in hybridization experiments. Typical blocking reagents include Denhardt's reagent, BLOTTO, heparin, denatured salmon sperm DNA, and commercially available proprietary formulations. The inclusion of specific blocking reagents may require modification of the hybridization conditions described above, due to problems with compatibility.

Of course, a polynucleotide which hybridizes only to polyA+ sequences (such as any 3' terminal polyA+ tract of a cDNA shown in the sequence listing), or to a complementary stretch of T (or U) residues, would not be included in the definition of "polynucleotide," since such a polynucleotide would hybridize to any nucleic acid molecule containing a poly (A) stretch or the complement thereof (e.g., practically any double-stranded cDNA clone generated using oligo dT as a primer).

The polynucleotides of the present invention can be composed of any polyribonucleotide or polydeoxribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. For example, polynucleotides can be composed of single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, the polynucleotide can be composed of triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. A polynucleotide may also contain one or more modified bases or DNA or RNA backbones modified for stability or for other reasons. "Modified" bases include, for example, tritylated bases and unusual bases such as inosine. A variety of modifications can be made to DNA and RNA; thus, "polynucleotide" embraces chemically, enzymatically, or metabolically modified forms.

In specific embodiments, the polynucleotides of the invention are at least 15, at least 30, at least 50, at least 100, at least 125, at least 500, or at least 1000 continuous nucleotides but are less than or equal to 300 kb, 200 kb, 100 kb, 50 kb, 15 kb, 10 kb, 7.5kb, 5 kb, 2.5 kb, 2.0 kb, or 1 kb, in length. In a further embodiment, polynucleotides of the invention comprise a portion of the coding sequences, as disclosed herein, but do not comprise all or a

portion of any intron. In another embodiment, the polynucleotides comprising coding sequences do not contain coding sequences of a genomic flanking gene (i.e., 5' or 3' to the gene of interest in the genome). In other embodiments, the polynucleotides of the invention do not contain the coding sequence of more than 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, or 1 genomic flanking gene(s).

"SEQ ID NO:X" refers to a polynucleotide sequence described in column 5 of Table 1, while "SEQ ID NO:Y" refers to a polypeptide sequence described in column 10 of Table 1. SEQ ID NO:X is identified by an integer specified in column 6 of Table 1. The polypeptide sequence SEQ ID NO:Y is a translated open reading frame (ORF) encoded by polynucleotide SEQ ID NO:X. The polynucleotide sequences are shown in the sequence listing immediately followed by all of the polypeptide sequences. Thus, a polypeptide sequence corresponding to polynucleotide sequence SEQ ID NO:2 is the first polypeptide sequence shown in the sequence listing. The second polypeptide sequence corresponds to the polynucleotide sequence shown as SEQ ID NO:3, and so on.

The polypeptides of the present invention can be composed of amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres, and may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. The polypeptides may be modified by either natural processes, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature. Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched, for example, as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched, and branched cyclic polypeptides may result from posttranslation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphotidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cysteine, formation

of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, pegylation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination. (See, for instance, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL 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 NY Acad Sci 663:48-62 (1992)).

The polypeptides of the invention can be prepared in any suitable manner. Such polypeptides include isolated naturally occurring polypeptides, recombinantly produced polypeptides, synthetically produced polypeptides, or polypeptides produced by a combination of these methods. Means for preparing such polypeptides are well understood in the art.

The polypeptides may be in the form of the secreted protein, including the mature form, or may be a part of a larger protein, such as a fusion protein (see below). It is often advantageous to include an additional amino acid sequence which contains secretory or leader sequences, pro-sequences, sequences which aid in purification, such as multiple histidine residues, or an additional sequence for stability during recombinant production.

The polypeptides of the present invention are preferably provided in an isolated form, and preferably are substantially purified. A recombinantly produced version of a polypeptide, including the secreted polypeptide, can be substantially purified using techniques described herein or otherwise known in the art, such as, for example, by the one-step method described in Smith and Johnson, Gene 67:31-40 (1988). Polypeptides of the invention also can be purified from natural, synthetic or recombinant sources using techniques described herein or otherwise known in the art, such as, for example, antibodies of the invention raised against the polypeptides of the present invention in methods which are well known in the art.

By a polypeptide demonstrating a "functional activity" is meant, a polypeptide capable of displaying one or more known functional activities associated with a full-length (complete) protein of the invention. Such functional activities include, but are not limited to, biological activity, antigenicity [ability to bind (or compete with a polypeptide for binding)

to an anti-polypeptide antibody], immunogenicity (ability to generate antibody which binds to a specific polypeptide of the invention), ability to form multimers with polypeptides of the invention, and ability to bind to a receptor or ligand for a polypeptide.

"A polypeptide having functional activity" refers to polypeptides exhibiting activity similar, but not necessarily identical to, an activity of a polypeptide of the present invention, including mature forms, as measured in a particular assay, such as, for example, a biological assay, with or without dose dependency. In the case where dose dependency does exist, it need not be identical to that of the polypeptide, but rather substantially similar to the dose-dependence in a given activity as compared to the polypeptide of the present invention (i.e., the candidate polypeptide will exhibit greater activity or not more than about 25-fold less and, preferably, not more than about tenfold less activity, and most preferably, not more than about three-fold less activity relative to the polypeptide of the present invention).

The functional activity of the polypeptides, and fragments, variants derivatives, and analogs thereof, can be assayed by various methods.

For example, in one embodiment where one is assaying for the ability to bind or compete with full-length polypeptide of the present invention for binding to an antibody to the full length polypeptide, various immunoassays known in the art can be used, including but not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitation reactions, immunodiffusion assays, in situ immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, precipitation reactions, agglutination assays (e.g., gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labeled. Many means are known in the art for detecting binding in an immunoassay and are within the scope of the present invention.

In another embodiment, where a ligand is identified, or the ability of a polypeptide fragment, variant or derivative of the invention to multimerize is being evaluated, binding can be assayed, e.g., by means well-known in the art, such as, for example, reducing and non-

reducing gel chromatography, protein affinity chromatography, and affinity blotting. See generally, Phizicky, E., et al., Microbiol. Rev. 59:94-123 (1995). In another embodiment, physiological correlates polypeptide of the present invention binding to its substrates (signal transduction) can be assayed.

In addition, assays described herein (see Examples) and otherwise known in the art may routinely be applied to measure the ability of polypeptides of the present invention and fragments, variants derivatives and analogs thereof to elicit polypeptide related biological activity (either in vitro or in vivo). Other methods will be known to the skilled artisan and are within the scope of the invention.

Polynucleotides and Polypeptides of the Invention

FEATURES OF PROTEIN ENCODED BY GENE NO: 1

Translation products corresponding to this gene share sequence homology with a tumour-associated protein PRO1017, which was observed in various tumour tissues, especially colon tumours (See International Publication No. WO99/35170), and is thought to play a role in increased tumorigenesis in cells expressing the gene.

Preferred polypeptides of the invention comprise, or alternatively consist of, the following amino acid sequence, including two cysteine residues thought to be involved in disulfide bond formation and correct protein structure and conformation: HWDHVSRLCSPCLIDYDFV (SEQ ID NO: 4). Polynucleotides encoding these polypeptides are also encompassed by the invention, as are antibodies that bind one or more of these polypeptides. Moreover, fragments and variants of these polypeptides (e.g., fragments as described herein, polypeptides at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to these polypeptides and polypeptides encoded by the polynucleotide which hybridizes, under stringent conditions, to the polynucleotide encoding these polypeptides, or the complement thereof) are encompassed by the invention. Antibodies that bind these fragments and variants of the invention are also encompassed by the invention. Polynucleotides encoding these fragments and variants are also encompassed by the invention. Further preferred are polypeptides comprising the cysteine-containing region of SEQ ID NO: 4, and at least 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, or 75 additional contiguous amino acid residues of SEQ ID NO: 3. The additional contiguous amino acid residues may be N-terminal

or C-terminal to the cysteine containing region. Alternatively, the additional contiguous amino acid residues may be both N-terminal and C-terminal to the cysteine containing region, wherein the total N- and C-terminal contiguous amino acid residues equal the specified number.

Preferred polypeptides of the present invention comprise, or alternatively consist of, one, two, three, four, or all four of the immunogenic epitopes shown in SEQ ID NO: 3 as residues: His-21 to Tyr-26, Glu-96 to Ala-102, Arg-119 to Thr-130, and Gln-146 to Asp-152. Polynucleotides encoding these polypeptides are also encompassed by the invention, as are antibodies that bind one or more of these polypeptides. Moreover, fragments and variants of these polypeptides (e.g., fragments as described herein, polypeptides at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to these polypeptides and polypeptides encoded by the polynucleotide which hybridizes, under stringent conditions, to the polynucleotide encoding these polypeptides, or the complement thereof) are encompassed by the invention. Antibodies that bind these fragments and variants of the invention are also encompassed by the invention. Polynucleotides encoding these fragments and variants are also encompassed by the invention.

This gene is expressed in amygdala and cerebellum tissues.

Therefore, polynucleotides and polypeptides of the invention, including antibodies, are useful as reagents for differential identification of neural tissue(s) or cell type(s) present in a biological sample and for diagnosis of diseases and conditions which include but are not limited to: diseases and/or disorders of the neural system, as well as biological functions facilitated by the disclosed cytokine. Similarly, polypeptides and antibodies directed to these polypeptides are useful in providing immunological probes for differential identification of the tissue(s) or cell type(s). For a number of disorders of the above tissues or cells, particularly of the central nervous system, expression of this gene at significantly higher or lower levels may be routinely detected in certain tissues or cell types (e.g., neural, cancerous and wounded tissues) or bodily fluids (e.g., lymph, serum, plasma, urine, synovial fluid and spinal fluid) or another tissue or sample taken from an individual having such a disorder, relative to the standard gene expression level, i.e., the expression level in healthy tissue or bodily fluid from an individual not having the disorder.

The tissue distribution in a number of neural tissues indicates that polynucleotides and polypeptides corresponding to this gene are useful for the diagnosis, detection and/or

treatment of diseases and/or disorders of the neural system. The tissue distribution in amygdala and cerebellum tissues suggests that the protein product of this clone is useful for the detection and/or treatment of neurodegenerative disease states and behavioral disorders such as Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, Huntington's Disease, Tourette Syndrome, schizophrenia, mania, dementia, paranoia, obsessive compulsive disorder, panic disorder, learning disabilities, ALS, psychoses, autism, and altered behaviors, including disorders in feeding, sleep patterns, balance, and perception. In addition, the gene or gene product may also play a role in the treatment and/or detection of developmental disorders associated with the developing embryo, or sexually-linked disorders.

More generally, polynucleotides, translation products and antibodies corresponding to this gene may also influence a range of biological activities associated with cytokines, such as cell proliferation/differentiation modulating activity or induction of other cytokines; induction of B-cell maturation into immunoglobulin-producing cells; induction of nerve-cell differentiation; induction of myeloma and plasmacytoma growth; immunostimulating/immunosuppressant activities (e.g., for treating human immunodeficiency virus infection, cancer, autoimmune diseases and allergy); regulation of hematopoiesis (e.g., for treating anaemia or as adjunct to chemotherapy); stimulation or growth of bone, cartilage, tendons, ligaments and/or nerves (e.g., for treating wounds, stimulation of follicle stimulating hormone (for control of fertility); chemotactic and chemokinetic activities (e.g., for treating infections, tumors); hemostatic or thrombolytic activity (e.g., for treating haemophilia, cardiac infarction etc.); anti-inflammatory activity (e.g., for treating septic shock, Crohn's disease); as antimicrobials; for treating psoriasis or other hyperproliferative diseases; for regulation of metabolism, and behaviour. Also contemplated is the use of the corresponding nucleic acid in gene therapy procedures. Protein, as well as, antibodies directed against the protein may show utility as a tumor marker and/or immunotherapy targets for the above listed tissues.

TABLE 1

Gene No.	cDNA Clone ID NO:V	ATCC Deposit NO:Z and Date	Vector	NT SEQ ID NO: X	Total NT Seq.	5' NT of Clone Seq.	3' NT of Clone Seq.	5' NT of Start Codon	AA SEQ ID NO: Y	Last AA of ORF
1	HCEVF95	PTA912 11/04/99	Uni-ZAP XR	2	1047	1	1047	72	3	171

Table 1 summarizes the information corresponding to each "Gene No:" described above. The nucleotide sequence identified as "NT SEQ ID NO:X" was assembled from partially homologous ("overlapping") sequences obtained from the "cDNA clone ID NO:V" identified in Table 1 and, in some cases, from additional related DNA clones. The overlapping sequences were assembled into a single contiguous sequence of high redundancy (usually three to five overlapping sequences at each nucleotide position), resulting in a final sequence identified as SEQ ID NO:X.

The cDNA Clone ID NO:V was deposited on the date and given the corresponding deposit number listed in "ATCC Deposit No:Z and Date." Some of the deposits contain multiple different clones corresponding to the same gene. "Vector" refers to the type of vector contained in the cDNA Clone ID.

"Total NT Seq." refers to the total number of nucleotides in the contig identified by "Gene No:". The deposited plasmid contains all of these sequences, reflected by the nucleotide position indicated as "5' NT of Clone Seq." and the "3' NT of Clone Seq." of SEQ ID NO:X. The nucleotide position of SEQ ID NO:X of the putative methionine start codon (if present) is identified as "5' NT of Start Codon." Similarly , the nucleotide position of SEQ ID NO:X of the predicted signal sequence (if present) is identified as "5' NT of First AA of Signal Pep."

The translated amino acid sequence, beginning with the first translated codon of the polynucleotide sequence, is identified as "AA SEQ ID NO:Y," although other reading frames can also be easily translated using known molecular biology techniques. The polypeptides produced by these alternative open reading frames are specifically contemplated by the present invention.

SEQ ID NO:X (where X may be any of the polynucleotide sequences disclosed in the sequence listing) and the translated SEQ ID NO:Y (where Y may be any of the polypeptide sequences disclosed in the sequence listing) are sufficiently accurate and otherwise suitable for a variety of uses well known in the art and described further below. For instance, SEQ ID NO:X has uses including, but not limited to, in designing nucleic acid hybridization probes that will detect nucleic acid sequences contained in SEQ ID NO:X or the cDNA contained in a deposited plasmid. These probes will also hybridize to nucleic acid molecules in biological samples, thereby enabling a variety of forensic and diagnostic methods of the invention. Similarly, polypeptides identified from SEQ ID NO:Y have uses that include, but are not limited to generating antibodies, which bind specifically to the secreted proteins encoded by the cDNA clones identified in Table 1.

Nevertheless, DNA sequences generated by sequencing reactions can contain sequencing errors. The errors exist as misidentified nucleotides, or as insertions or deletions of nucleotides in the generated DNA sequence. The erroneously inserted or deleted nucleotides cause frame shifts in the reading frames of the predicted amino acid sequence. In these cases, the predicted amino acid sequence diverges from the actual amino acid sequence, even though the generated DNA sequence may be greater than 99.9% identical to the actual DNA sequence (for example, one base insertion or deletion in an open reading frame of over 1000 bases).

Accordingly, for those applications requiring precision in the nucleotide sequence or the amino acid sequence, the present invention provides not only the generated nucleotide sequence identified as SEQ ID NO:X, and the predicted translated amino acid sequence identified as SEQ ID NO:Y, but also a sample of plasmid DNA containing a human cDNA of the invention deposited with the ATCC, as set forth in Table 1. The nucleotide sequence of each deposited plasmid can readily be determined by sequencing the deposited plasmid in accordance with known methods.

The predicted amino acid sequence can then be verified from such deposits. Moreover, the amino acid sequence of the protein encoded by a particular plasmid can also be directly determined by peptide sequencing or by expressing the protein in a suitable host cell containing the deposited human cDNA, collecting the protein, and determining its sequence.

Also provided in Table 1 is the name of the vector which contains the cDNA plasmid. Each vector is routinely used in the art. The following additional information is provided for convenience.

Vectors Lambda Zap (U.S. Patent Nos. 5,128,256 and 5,286,636), Uni-Zap XR (U.S. Patent Nos. 5,128, 256 and 5,286,636), Zap Express (U.S. Patent Nos. 5,128,256 and 5,286,636), pBluescript (pBS) (Short, J. M. et al., *Nucleic Acids Res. 16*:7583-7600 (1988); Alting-Mees, M. A. and Short, J. M., *Nucleic Acids Res. 17*:9494 (1989)) and pBK (Alting-Mees, M. A. et al., *Strategies 5*:58-61 (1992)) are commercially available from Stratagene Cloning Systems, Inc., 11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037. pBS contains an ampicillin resistance gene and pBK contains a neomycin resistance gene. Phagemid pBS may be excised from the Lambda Zap and Uni-Zap XR vectors, and phagemid pBK may be excised from the Zap Express vector. Both phagemids may be transformed into *E. coli* strain XL-1 Blue, also available from Stratagene.

Vectors pSport1, pCMVSport 1.0, pCMVSport 2.0 and pCMVSport 3.0, were obtained from Life Technologies, Inc., P. O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20897. All Sport vectors contain an ampicillin resistance gene and may be transformed into *E. coli* strain DH10B, also available from Life Technologies. See, for instance, Gruber, C. E., et al., *Focus 15*:59 (1993). Vector lafmid BA (Bento Soares, Columbia University, New York, NY) contains an ampicillin resistance gene and can be transformed into *E. coli* strain XL-1 Blue. Vector pCR®2.1, which is available from Invitrogen, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008, contains an ampicillin resistance gene and may be transformed into *E. coli* strain DH10B, available from Life Technologies. See, for instance, Clark, J. M., *Nuc. Acids Res. 16*:9677-9686 (1988) and Mead, D. *et al., Bio/Technology 9*: (1991).

The present invention also relates to the genes corresponding to SEQ ID NO:X, SEQ ID NO:Y, and/or a deposited plasmid (cDNA plasmid:V). The corresponding gene can be isolated in accordance with known methods using the sequence information disclosed herein. Such methods include, but are not limited to, preparing probes or primers from the disclosed sequence and identifying or amplifying the corresponding gene from appropriate sources of genomic material.

Also provided in the present invention are allelic variants, orthologs, and/or species homologs. Procedures known in the art can be used to obtain full-length genes, allelic variants, splice variants, full-length coding portions, orthologs, and/or species homologs of

genes corresponding to SEQ ID NO:X, SEQ ID NO:Y, and/or cDNA plasmid:V, using information from the sequences disclosed herein or the clones deposited with the ATCC. For example, allelic variants and/or species homologs may be isolated and identified by making suitable probes or primers from the sequences provided herein and screening a suitable nucleic acid source for allelic variants and/or the desired homologue.

The present invention provides a polynucleotide comprising, or alternatively consisting of, the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:X and/or cDNA plasmid:V. The present invention also provides a polypeptide comprising, or alternatively, consisting of, the polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y, a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X, and/or a polypeptide encoded by the cDNA in cDNA plasmid:V. Polynucleotides encoding a polypeptide comprising, or alternatively consisting of the polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y, a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X and/or a polypeptide encoded by the cDNA in cDNA plasmid:V, are also encompassed by the invention. The present invention further encompasses a polynucleotide comprising, or alternatively consisting of the complement of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:X, and/or the complement of the coding strand of the cDNA in cDNA plasmid:V.

Many polynucleotide sequences, such as EST sequences, are publicly available and accessible through sequence databases and may have been publicly available prior to conception of the present invention. Preferably, such related polynucleotides are specifically excluded from the scope of the present invention. To list every related sequence would unduly burden the disclosure of this application. Accordingly, preferably excluded from SEQ ID NO:X are one or more polynucleotides comprising a nucleotide sequence described by the general formula of a-b, where a is any integer between 1 and the final nucleotide minus 15 of SEQ ID NO:X, b is an integer of 15 to the final nucleotide of SEQ ID NO:X, where both a and b correspond to the positions of nucleotide residues shown in SEQ ID NO:X, and where b is greater than or equal to a + 14.

RACE Protocol For Recovery of Full-Length Genes

Partial cDNA clones can be made full-length by utilizing the rapid amplification of cDNA ends (RACE) procedure described in Frohman, M.A., et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 85:8998-9002 (1988). A cDNA clone missing either the 5' or 3' end can be reconstructed to include the absent base pairs extending to the translational start or stop

codon, respectively. In some cases, cDNAs are missing the start of translation, therefor. The following briefly describes a modification of this original 5' RACE procedure. Poly A+ or total RNA is reverse transcribed with Superscript II (Gibco/BRL) and an antisense or complementary primer specific to the cDNA sequence. The primer is removed from the reaction with a Microcon Concentrator (Amicon). The first-strand cDNA is then tailed with dATP and terminal deoxynucleotide transferase (Gibco/BRL). Thus, an anchor sequence is produced which is needed for PCR amplification. The second strand is synthesized from the dA-tail in PCR buffer, Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus), an oligo-dT primer containing three adjacent restriction sites (XhoI, SalI and ClaI) at the 5' end and a primer containing just these restriction sites. This double-stranded cDNA is PCR amplified for 40 cycles with the same primers as well as a nested cDNA-specific antisense primer. The PCR products are size-separated on an ethidium bromide-agarose gel and the region of gel containing cDNA products the predicted size of missing protein-coding DNA is removed. cDNA is purified from the agarose with the Magic PCR Prep kit (Promega), restriction digested with XhoI or SalI, and ligated to a plasmid such as pBluescript SKII (Stratagene) at XhoI and EcoRV sites. This DNA is transformed into bacteria and the plasmid clones sequenced to identify the correct protein-coding inserts. Correct 5' ends are confirmed by comparing this sequence with the putatively identified homologue and overlap with the partial cDNA clone. Similar methods known in the art and/or commercial kits are used to amplify and recover 3' ends.

Several quality-controlled kits are commercially available for purchase. Similar reagents and methods to those above are supplied in kit form from Gibco/BRL for both 5' and 3' RACE for recovery of full length genes. A second kit is available from Clontech which is a modification of a related technique, SLIC (single-stranded ligation to single-stranded cDNA), developed by Dumas et al., Nucleic Acids Res., 19:5227-32 (1991). The major differences in procedure are that the RNA is alkaline hydrolyzed after reverse transcription and RNA ligase is used to join a restriction site-containing anchor primer to the first-strand cDNA. This obviates the necessity for the dA-tailing reaction which results in a polyT stretch that is difficult to sequence past.

An alternative to generating 5' or 3' cDNA from RNA is to use cDNA library double-stranded DNA. An asymmetric PCR-amplified antisense cDNA strand is synthesized with an antisense cDNA-specific primer and a plasmid-anchored primer. These primers are removed

and a symmetric PCR reaction is performed with a nested cDNA-specific antisense primer and the plasmid-anchored primer.

RNA Ligase Protocol For Generating The 5' or 3' End Sequences To Obtain Full Length Genes

Once a gene of interest is identified, several methods are available for the identification of the 5' or 3' portions of the gene which may not be present in the original cDNA plasmid. These methods include, but are not limited to, filter probing, clone enrichment using specific probes and protocols similar and identical to 5' and 3'RACE. While the full length gene may be present in the library and can be identified by probing, a useful method for generating the 5' or 3' end is to use the existing sequence information from the original cDNA to generate the missing information. A method similar to 5'RACE is available for generating the missing 5' end of a desired full-length gene. (This method was published by Fromont-Racine et al., Nucleic Acids Res., 21(7):1683-1684 (1993)). Briefly, a specific RNA oligonucleotide is ligated to the 5' ends of a population of RNA presumably containing full-length gene RNA transcript and a primer set containing a primer specific to the ligated RNA oligonucleotide and a primer specific to a known sequence of the gene of interest, is used to PCR amplify the 5' portion of the desired full length gene which may then be sequenced and used to generate the full length gene. This method starts with total RNA isolated from the desired source, poly A RNA may be used but is not a prerequisite for this procedure. The RNA preparation may then be treated with phosphatase if necessary to eliminate 5' phosphate groups on degraded or damaged RNA which may interfere with the later RNA ligase step. The phosphatase if used is then inactivated and the RNA is treated with tobacco acid pyrophosphatase in order to remove the cap structure present at the 5' ends of messenger RNAs. This reaction leaves a 5' phosphate group at the 5' end of the cap cleaved RNA which can then be ligated to an RNA oligonucleotide using T4 RNA ligase. This modified RNA preparation can then be used as a template for first strand cDNA synthesis using a gene specific oligonucleotide. The first strand synthesis reaction can then be used as a template for PCR amplification of the desired 5' end using a primer specific to the ligated RNA oligonucleotide and a primer specific to the known sequence of the IL-6-like gene of interest. The resultant product is then sequenced and analyzed to confirm that the 5' end sequence belongs to the relevant IL-6-like gene.

Polynucleotide and Polypeptide Fragments

The present invention is also directed to polynucleotide fragments of the polynucleotides (nucleic acids) of the invention. In the present invention, a "polynucleotide fragment" refers to a polynucleotide having a nucleic acid sequence which: is a portion of the cDNA contained in cDNA plasmid:V or encoding the polypeptide encoded by the cDNA contained in cDNA plasmid:V; is a portion of the polynucleotide sequence in SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto; is a polynucleotide sequence encoding a portion of the polypeptide of SEQ ID NO:Y; or is a polynucleotide sequence encoding a portion of a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X. The nucleotide fragments of the invention are preferably at least about 15 nt, and more preferably at least about 20 nt, still more preferably at least about 30 nt, and even more preferably, at least about 40 nt, at least about 50 nt, at least about 75 nt, at least about 100 nt, at least about 125 nt, or at least about 150 nt in length. A fragment "at least 20 nt in length," for example, is intended to include 20 or more contiguous bases from, for example, the sequence contained in the cDNA in cDNA plasmid:V, or the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:X or the complementary stand thereto. In this context "about" includes the particularly recited value, or a value larger or smaller by several (5, 4, 3, 2, or 1) nucleotides. These nucleotide fragments have uses that include, but are not limited to, as diagnostic probes and primers as discussed herein. Of course, larger fragments (e.g., at least 150, 175, 200, 250, 500, 600, 1000, or 2000 nucleotides in length) are also encompassed by the invention.

Moreover, representative examples of polynucleotide fragments of the invention, include, for example, fragments comprising, or alternatively consisting of, a sequence from about nucleotide number 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 601-650, 651-700, 701-750, 751-800, 801-850, 851-900, 901-950, 951-1000, and/or 1001-1047 of SEQ ID NO:X, or the complementary strand thereto. In this context "about" includes the particularly recited range or a range larger or smaller by several (5, 4, 3, 2, or 1) nucleotides, at either terminus or at both termini. Preferably, these fragments encode a polypeptide which has a functional activity (e.g. biological activity) of the polypeptide encoded by a polynucleotide of which the sequence is a portion. More preferably, these fragments can be used as probes or primers as discussed herein. Polynucleotides which hybridize to one or more of these fragments under stringent

hybridization conditions or alternatively, under lower stringency conditions, are also encompassed by the invention, as are polypeptides encoded by these polynucleotides or fragments.

Moreover, representative examples of polynucleotide fragments of the invention, include, for example, fragments comprising, or alternatively consisting of, a sequence from about nucleotide number 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 601-650, 651-700, 701- 750, 751-800, 801-850, 851-900, 901-950, 951-1000, and/or 1001-1047 of the cDNA nucleotide sequence contained in cDNA plasmid:V, or the complementary strand thereto. In this context "about" includes the particularly recited range or a range larger or smaller by several (5, 4, 3, 2, or 1) nucleotides, at either terminus or at both termini. Preferably, these fragments encode a polypeptide which has a functional activity (e.g. biological activity) of the polypeptide encoded by the cDNA nucleotide sequence contained in cDNA plasmid:V. More preferably, these fragments can be used as probes or primers as discussed herein. Polynucleotides which hybridize to one or more of these fragments under stringent hybridization conditions, or alternatively, under lower stringency conditions are also encompassed by the invention, as are polypeptides encoded by these polynucleotides or fragments.

In the present invention, a "polypeptide fragment" refers to an amino acid sequence which is a portion of that contained in SEQ ID NO:Y, a portion of an amino acid sequence encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:X, and/or encoded by the cDNA in cDNA plasmid:V. Protein (polypeptide) fragments may be "free-standing," or comprised within a larger polypeptide of which the fragment forms a part or region, most preferably as a single continuous region. Representative examples of polypeptide fragments of the invention, include, for example, fragments comprising, or alternatively consisting of, an amino acid sequence from about amino acid number 1-20, 21-40, 41-60, 61-80, 81-100, 101-120, 121-140, 141-160, and/or 161-171 of the coding region of SEQ ID NO:Y. Moreover, polypeptide fragments of the invention may be at least about 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, or 150 amino acids in length. In this context "about" includes the particularly recited ranges or values, or ranges or values larger or smaller by several (5, 4, 3, 2, or 1) amino acids, at either terminus or at both termini. Polynucleotides encoding these polypeptide fragments are also encompassed by the invention.

Even if deletion of one or more amino acids from the N-terminus of a protein results in modification of loss of one or more biological functions of the protein, other functional activities (e.g., biological activities, ability to multimerize, ability to bind a ligand) may still be retained. For example, the ability of shortened muteins to induce and/or bind to antibodies which recognize the complete or mature forms of the polypeptides generally will be retained when less than the majority of the residues of the complete or mature polypeptide are removed from the N-terminus. Whether a particular polypeptide lacking N-terminal residues of a complete polypeptide retains such immunologic activities can readily be determined by routine methods described herein and otherwise known in the art. It is not unlikely that a mutein with a large number of deleted N-terminal amino acid residues may retain some biological or immunogenic activities. In fact, peptides composed of as few as six amino acid residues may often evoke an immune response.

Accordingly, polypeptide fragments of the invention include the secreted protein as well as the mature form. Further preferred polypeptide fragments include the secreted protein or the mature form having a continuous series of deleted residues from the amino or the carboxy terminus, or both. For example, any number of amino acids, ranging from 1-60, can be deleted from the amino terminus of either the secreted polypeptide or the mature form. Similarly, any number of amino acids, ranging from 1-30, can be deleted from the carboxy terminus of the secreted protein or mature form. Furthermore, any combination of the above amino and carboxy terminus deletions are preferred. Similarly, polynucleotides encoding these polypeptide fragments are also preferred.

The present invention further provides polypeptides having one or more residues deleted from the amino terminus of the amino acid sequence of a polypeptide disclosed herein (e.g., a polypeptide of SEQ ID NO:Y, a polypeptide encoded by the polynucleotide sequence contained in SEQ ID NO:X, and/or a polypeptide encoded by the cDNA contained in cDNA plasmid:V). In particular, N-terminal deletions may be described by the general formula m-q, where q is a whole integer representing the total number of amino acid residues in a polypeptide of the invention (e.g., the polypeptide disclosed in SEQ ID NO:Y), and m is defined as any integer ranging from 2 to q-6. Polynucleotides encoding these polypeptides, including fragments and/or variants, are also encompassed by the invention.

Also as mentioned above, even if deletion of one or more amino acids from the C-terminus of a protein results in modification of loss of one or more biological functions of

the protein, other functional activities (e.g., biological activities, ability to multimerize, ability to bind a ligand) may still be retained. For example the ability of the shortened mutein to induce and/or bind to antibodies which recognize the complete or mature forms of the polypeptide generally will be retained when less than the majority of the residues of the complete or mature polypeptide are removed from the C-terminus. Whether a particular polypeptide lacking C-terminal residues of a complete polypeptide retains such immunologic activities can readily be determined by routine methods described herein and otherwise known in the art. It is not unlikely that a mutein with a large number of deleted C-terminal amino acid residues may retain some biological or immunogenic activities. In fact, peptides composed of as few as six amino acid residues may often evoke an immune response.

Accordingly, the present invention further provides polypeptides having one or more residues from the carboxy terminus of the amino acid sequence of a polypeptide disclosed herein (e.g., a polypeptide of SEQ ID NO:Y, a polypeptide encoded by the polynucleotide sequence contained in SEQ ID NO:X, and/or a polypeptide encoded by the cDNA contained in cDNA plasmid:V). In particular, C-terminal deletions may be described by the general formula 1-n, where n is any whole integer ranging from 6 to q-1, and where n corresponds to the position of an amino acid residue in a polypeptide of the invention. Polynucleotides encoding these polypeptides, including fragments and/or variants, are also encompassed by the invention.

In addition, any of the above described N- or C-terminal deletions can be combined to produce a N- and C-terminal deleted polypeptide. The invention also provides polypeptides having one or more amino acids deleted from both the amino and the carboxyl termini, which may be described generally as having residues m-n of a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X (e.g., including, but not limited to, the preferred polypeptide disclosed as SEQ ID NO:Y), and/or the cDNA in cDNA plasmid:V, and/or the complement thereof, where n and m are integers as described above. Polynucleotides encoding these polypeptides, including fragments and/or variants, are also encompassed by the invention.

Any polypeptide sequence contained in the polypeptide of SEQ ID NO:Y, encoded by the polynucleotide sequences set forth as SEQ ID NO:X, or encoded by the cDNA in cDNA plasmid:V may be analyzed to determine certain preferred regions of the polypeptide. For example, the amino acid sequence of a polypeptide encoded by a polynucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the cDNA in cDNA plasmid:V may be analyzed using the default

parameters of the DNASTAR computer algorithm (DNASTAR, Inc., 1228 S. Park St., Madison, WI 53715 USA; http://www.dnastar.com/).

Polypeptide regions that may be routinely obtained using the DNASTAR computer algorithm include, but are not limited to, Garnier-Robson alpha-regions, beta-regions, turn-regions, and coil-regions, Chou-Fasman alpha-regions, beta-regions, and turn-regions, Kyte-Doolittle hydrophilic regions and hydrophobic regions, Eisenberg alpha- and beta-amphipathic regions, Karplus-Schulz flexible regions, Emini surface-forming regions and Jameson-Wolf regions of high antigenic index. Among highly preferred polynucleotides of the invention in this regard are those that encode polypeptides comprising regions that combine several structural features, such as several (e.g., 1, 2, 3 or 4) of the features set out above.

Additionally, Kyte-Doolittle hydrophilic regions and hydrophobic regions, Emini surface-forming regions, and Jameson-Wolf regions of high antigenic index (i.e., containing four or more contiguous amino acids having an antigenic index of greater than or equal to 1.5, as identified using the default parameters of the Jameson-Wolf program) can routinely be used to determine polypeptide regions that exhibit a high degree of potential for antigenicity. Regions of high antigenicity are determined from data by DNASTAR analysis by choosing values which represent regions of the polypeptide which are likely to be exposed on the surface of the polypeptide in an environment in which antigen recognition may occur in the process of initiation of an immune response.

Preferred polypeptide fragments of the invention are fragments comprising, or alternatively, consisting of, an amino acid sequence that displays a functional activity (e.g. biological activity) of the polypeptide sequence of which the amino acid sequence is a fragment. By a polypeptide displaying a "functional activity" is meant a polypeptide capable of one or more known functional activities associated with a full-length protein, such as, for example, biological activity, antigenicity, immunogenicity, and/or multimerization, as described supra.

Other preferred polypeptide fragments are biologically active fragments. Biologically active fragments are those exhibiting activity similar, but not necessarily identical, to an activity of the polypeptide of the present invention. The biological activity of the fragments may include an improved desired activity, or a decreased undesirable activity.

In preferred embodiments, polypeptides of the invention comprise, or alternatively consist of, one, two, three, four, five or more of the antigenic fragments of the polypeptide of SEQ ID NO:Y, or portions thereof. Polynucleotides encoding these polypeptides, including fragments and/or variants, are also encompassed by the invention.

The present invention encompasses polypeptides comprising, or alternatively consisting of, an epitope of the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:Y, or an epitope of the polypeptide sequence encoded by the cDNA in cDNA plasmid:V, or encoded by a polynucleotide that hybridizes to the complement of an epitope encoding sequence of SEQ ID NO:X, or an epitope encoding sequence contained in cDNA plasmid:V under stringent hybridization conditions, or alternatively, under lower stringency hybridization, as defined supra. The present invention further encompasses polynucleotide sequences encoding an epitope of a polypeptide sequence of the invention (such as, for example, the sequence disclosed in SEQ ID NO:X), polynucleotide sequences of the complementary strand of a polynucleotide sequence encoding an epitope of the invention, and polynucleotide sequences which hybridize to this complementary strand under stringent hybridization conditions, or alternatively, under lower stringency hybridization conditions, as defined supra.

The term "epitopes," as used herein, refers to portions of a polypeptide having antigenic or immunogenic activity in an animal, preferably a mammal, and most preferably in a human. In a preferred embodiment, the present invention encompasses a polypeptide comprising an epitope, as well as the polynucleotide encoding this polypeptide. An "immunogenic epitope," as used herein, is defined as a portion of a protein that elicits an antibody response in an animal, as determined by any method known in the art, for example, by the methods for generating antibodies described infra. (See, for example, Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998- 4002 (1983)). The term "antigenic epitope," as used herein, is defined as a portion of a protein to which an antibody can immunospecifically bind its antigen as determined by any method well known in the art, for example, by the immunoassays described herein. Immunospecific binding excludes non-specific binding but does not necessarily exclude cross- reactivity with other antigens. Antigenic epitopes need not necessarily be immunogenic.

Fragments which function as epitopes may be produced by any conventional means. (See, e.g., Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135 (1985) further described in U.S. Patent No. 4,631,211.)

In the present invention, antigenic epitopes preferably contain a sequence of at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, more preferably at least 8, at least 9, at least 10, at least 11, at least 12, at least 13, at least 14, at least 15, at least 20, at least 25, at least 30, at least 40, at least 50, and, most preferably, between about 15 to about 30 amino acids. Preferred polypeptides comprising immunogenic or antigenic epitopes are at least 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, or 100 amino acid residues in length. Additional non-exclusive preferred antigenic epitopes include the antigenic epitopes disclosed herein, as well as portions thereof. Antigenic epitopes are useful, for example, to raise antibodies, including monoclonal antibodies, that specifically bind the epitope. Preferred antigenic epitopes include the antigenic epitopes disclosed herein, as well as any combination of two, three, four, five or more of these antigenic epitopes. Antigenic epitopes can be used as the target molecules in immunoassays. (See, for instance, Wilson et al., Cell 37:767-778 (1984); Sutcliffe et al., Science 219:660-666 (1983)).

Similarly, immunogenic epitopes can be used, for example, to induce antibodies according to methods well known in the art. (See, for instance, Sutcliffe et al., supra; Wilson et al., supra; Chow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914; and Bittle et al., J. Gen. Virol. 66:2347-2354 (1985). Preferred immunogenic epitopes include the immunogenic epitopes disclosed herein, as well as any combination of two, three, four, five or more of these immunogenic epitopes. The polypeptides comprising one or more immunogenic epitopes may be presented for eliciting an antibody response together with a carrier protein, such as an albumin, to an animal system (such as rabbit or mouse), or, if the polypeptide is of sufficient length (at least about 25 amino acids), the polypeptide may be presented without a carrier. However, immunogenic epitopes comprising as few as 8 to 10 amino acids have been shown to be sufficient to raise antibodies capable of binding to, at the very least, linear epitopes in a denatured polypeptide (e.g., in Western blotting).

Epitope-bearing polypeptides of the present invention may be used to induce antibodies according to methods well known in the art including, but not limited to, in vivo immunization, in vitro immunization, and phage display methods. See, e.g., Sutcliffe et al., supra; Wilson et al., supra, and Bittle et al., J. Gen. Virol., 66:2347-2354 (1985). If in vivo immunization is used, animals may be immunized with free peptide; however, anti-peptide antibody titer may be boosted by coupling the peptide to a macromolecular carrier, such as keyhole limpet hemacyanin (KLH) or tetanus toxoid. For instance, peptides containing

cysteine residues may be coupled to a carrier using a linker such as maleimidobenzoyl- N-hydroxysuccinimide ester (MBS), while other peptides may be coupled to carriers using a more general linking agent such as glutaraldehyde. Animals such as rabbits, rats and mice are immunized with either free or carrier- coupled peptides, for instance, by intraperitoneal and/or intradermal injection of emulsions containing about 100 μg of peptide or carrier protein and Freund's adjuvant or any other adjuvant known for stimulating an immune response. Several booster injections may be needed, for instance, at intervals of about two weeks, to provide a useful titer of anti-peptide antibody which can be detected, for example, by ELISA assay using free peptide adsorbed to a solid surface. The titer of anti-peptide antibodies in serum from an immunized animal may be increased by selection of anti-peptide antibodies, for instance, by adsorption to the peptide on a solid support and elution of the selected antibodies according to methods well known in the art.

As one of skill in the art will appreciate, and as discussed above, the polypeptides of the present invention and immunogenic and/or antigenic epitope fragments thereof can be fused to other polypeptide sequences. For example, the polypeptides of the present invention may be fused with the constant domain of immunoglobulins (IgA, IgE, IgG, IgM), or portions thereof (CH1, CH2, CH3, or any combination thereof and portions thereof) resulting in chimeric polypeptides. Such fusion proteins may facilitate purification and may increase half-life in vivo. This has been shown for chimeric proteins consisting of the first two domains of the human CD4-polypeptide and various domains of the constant regions of the heavy or light chains of mammalian immunoglobulins. See, e.g., EP 394,827; Traunecker et al., Nature, 331:84-86 (1988). Enhanced delivery of an antigen across the epithelial barrier to the immune system has been demonstrated for antigens (e.g., insulin) conjugated to an FcRn binding partner such as IgG or Fc fragments (see, e.g., PCT Publications WO 96/22024 and WO 99/04813). IgG Fusion proteins that have a disulfide-linked dimeric structure due to the IgG portion desulfide bonds have also been found to be more efficient in binding and neutralizing other molecules than monomeric polypeptides or fragments thereof alone. See, e.g., Fountoulakis et al., J. Biochem., 270:3958-3964 (1995).

Similarly, EP-A-O 464 533 (Canadian counterpart 2045869) discloses fusion proteins comprising various portions of constant region of immunoglobulin molecules together with another human protein or part thereof. In many cases, the Fc part in a fusion protein is beneficial in therapy and diagnosis, and thus can result in, for example, improved

pharmacokinetic properties. (EP-A 0232 262.) Alternatively, deleting the Fc part after the fusion protein has been expressed, detected, and purified, may be desired. For example, the Fc portion may hinder therapy and diagnosis if the fusion protein is used as an antigen for immunizations. In drug discovery, for example, human proteins, such as hIL-5, have been fused with Fc portions for the purpose of high-throughput screening assays to identify antagonists of hIL-5. (See, D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995).)

Moreover, the polypeptides of the present invention can be fused to marker sequences, such as a peptide which facilitates purification of the fused polypeptide. In preferred embodiments, the marker amino acid sequence is a hexa-histidine peptide, such as the tag provided in a pQE vector (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), among others, many of which are commercially available. As described in Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. Another peptide tag useful for purification, the "HA" tag, corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein. (Wilson et al., Cell 37:767 (1984).)

Thus, any of these above fusions can be engineered using the polynucleotides or the polypeptides of the present invention.

Nucleic acids encoding the above epitopes can also be recombined with a gene of interest as an epitope tag (e.g., the hemagglutinin ("HA") tag or flag tag) to aid in detection and purification of the expressed polypeptide. For example, a system described by Janknecht et al. allows for the ready purification of non-denatured fusion proteins expressed in human cell lines (Janknecht et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972- 897 (1991)). In this system, the gene of interest is subcloned into a vaccinia recombination plasmid such that the open reading frame of the gene is translationally fused to an amino-terminal tag consisting of six histidine residues. The tag serves as a matrix binding domain for the fusion protein. Extracts from cells infected with the recombinant vaccinia virus are loaded onto Ni2+ nitriloacetic acid-agarose column and histidine-tagged proteins can be selectively eluted with imidazole-containing buffers.

Additional fusion proteins of the invention may be generated through the techniques of gene-shuffling, motif-shuffling, exon-shuffling, and/or codon-shuffling (collectively referred to as "DNA shuffling"). DNA shuffling may be employed to modulate the activities

of polypeptides of the invention, such methods can be used to generate polypeptides with altered activity, as well as agonists and antagonists of the polypeptides. See, generally, U.S. Patent Nos. 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; and 5,837,458, and Patten et al., Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33 (1997); Harayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998); Hansson, et al., J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999); and Lorenzo and Blasco, Biotechniques 24(2):308- 13 (1998) (each of these patents and publications are hereby incorporated by reference in its entirety). In one embodiment, alteration of polynucleotides corresponding to SEQ ID NO:X and the polypeptides encoded by these polynucleotides may be achieved by DNA shuffling. DNA shuffling involves the assembly of two or more DNA segments by homologous or site-specific recombination to generate variation in the polynucleotide sequence. In another embodiment, polynucleotides of the invention, or the encoded polypeptides, may be altered by being subjected to random mutagenesis by error-prone PCR, random nucleotide insertion or other methods prior to recombination. In another embodiment, one or more components, motifs, sections, parts, domains, fragments, etc., of a polynucleotide encoding a polypeptide of the invention may be recombined with one or more components, motifs, sections, parts, domains, fragments, etc. of one or more heterologous molecules.

Polynucleotide and Polypeptide Variants

The invention also encompasses IL-6-like variants. The present invention is directed to variants of the polynucleotide sequence disclosed in SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto, and/or the cDNA sequence contained in cDNA plasmid:V.

The present invention also encompasses variants of the polypeptide sequence disclosed in SEQ ID NO:Y, a polypeptide sequence encoded by the polynucleotide sequence in SEQ ID NO:X and/or a polypeptide sequence encoded by the cDNA in cDNA plasmid:V.

"Variant" refers to a polynucleotide or polypeptide differing from the polynucleotide or polypeptide of the present invention, but retaining properties thereof. Generally, variants are overall closely similar, and, in many regions, identical to the polynucleotide or polypeptide of the present invention.

Thus, one aspect of the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising, or alternatively consisting of, a polynucleotide having a nucleotide sequence selected from the group consisting of: (a) a nucleotide sequence described in SEQ ID NO:X

or contained in the cDNA sequence of Clone ID NO:V; (b) a nucleotide sequence in SEQ ID NO:X or the cDNA in Clone ID NO:V which encodes the complete amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or the complete amino acid sequence encoded by the cDNA in Clone ID NO:V; (c) a nucleotide sequence in SEQ ID NO:X or the cDNA in Clone ID NO:V which encodes a mature IL-6-like polypeptide; (d) a nucleotide sequence in SEQ ID NO:X or the cDNA sequence of Clone ID NO:V, which encodes a biologically active fragment of an IL-6-like polypeptide; (e) a nucleotide sequence in SEQ ID NO:X or the cDNA sequence of Clone ID NO:V, which encodes an antigenic fragment of an IL-6-like polypeptide; (f) a nucleotide sequence encoding an IL-6-like polypeptide comprising the complete amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or the complete amino acid sequence encoded by the cDNA in Clone ID NO:V; (g) a nucleotide sequence encoding a mature IL-6-like polypeptide of the amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or the amino acid sequence encoded by the cDNA in Clone ID NO:V; (h) a nucleotide sequence encoding a biologically active fragment of an IL-6-like polypeptide having the complete amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or the complete amino acid sequence encoded by the cDNA in Clone ID NO:V; (i) a nucleotide sequence encoding an antigenic fragment of an IL-6-like polypeptide having the complete amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or the complete amino acid sequence encoded by the cDNA in Clone ID NO:V; and (j) a nucleotide sequence complementary to any of the nucleotide sequences in (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), or (i) above.

The present invention is also directed to nucleic acid molecules which comprise, or alternatively consist of, a nucleotide sequence which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100%, identical to, for example, any of the nucleotide sequences in (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), or (j) above, the nucleotide coding sequence in SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto, the nucleotide coding sequence of the cDNA contained in Clone ID NO:V or the complementary strand thereto, a nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:Y, a nucleotide sequence encoding a polypeptide sequence encoded by the nucleotide sequence in SEQ ID NO:X, a polypeptide sequence encoded by the complement of the polynucleotide sequence in SEQ ID NO:X, a nucleotide sequence encoding the polypeptide encoded by the cDNA contained in Clone ID NO:V, the nucleotide sequence in SEQ ID NO:X encoding the polypeptide sequence as defined in column 10 of Table 1 or the complementary strand thereto, nucleotide sequences encoding the polypeptide as defined in column 10 of Table 1 or the complementary strand thereto,

and/or polynucleotide fragments of any of these nucleic acid molecules (e.g., those fragments described herein). Polynucleotides which hybridize to the complement of these nucleic acid molecules under stringent hybridization conditions or alternatively, under lower stringency conditions, are also encompassed by the invention, as are polypeptides encoded by these polynucleotides and nucleic acids.

In a preferred embodiment, the invention encompasses nucleic acid molecules which comprise, or alternatively, consist of a polynucleotide which hybridizes under stringent hybridization conditions, or alternatively, under lower stringency conditions, to a polynucleotide in (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), or (i), above, as are polypeptides encoded by these polynucleotides. In another preferred embodiment, polynucleotides which hybridize to the complement of these nucleic acid molecules under stringent hybridization conditions, or alternatively, under lower stringency conditions, are also encompassed by the invention, as are polypeptides encoded by these polynucleotides.

In another embodiment, the invention provides a purified protein comprising, or alternatively consisting of, a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) the complete amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or the complete amino acid sequence encoded by the cDNA in Clone ID NO:V; (b) the amino acid sequence of a mature form of an IL-6-like polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or the amino acid sequence encoded by the cDNA in Clone ID NO:V; (c) the amino acid sequence of a biologically active fragment of an IL-6-like polypeptide having the complete amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or the complete amino acid sequence encoded by the cDNA in Clone ID NO:V; and (d) the amino acid sequence of an antigenic fragment of an IL-6-like polypeptide having the complete amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or the complete amino acid sequence encoded by the cDNA in Clone ID NO:V.

The present invention is also directed to proteins which comprise, or alternatively consist of, an amino acid sequence which is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100%, identical to, for example, any of the amino acid sequences in (a), (b), (c), or (d), above, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:Y, the amino acid sequence encoded by the cDNA contained in Clone ID NO:V, the amino acid sequence as defined in column 10 of Table 1, an amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence in SEQ ID NO:X, and an amino acid sequence encoded by the complement of the polynucleotide sequence in SEQ ID NO:X. Fragments of these polypeptides are also provided (e.g., those

fragments described herein). Further proteins encoded by polynucleotides which hybridize to the complement of the nucleic acid molecules encoding these amino acid sequences under stringent hybridization conditions or alternatively, under lower stringency conditions, are also encompassed by the invention, as are the polynucleotides encoding these proteins.

By a nucleic acid having a nucleotide sequence at least, for example, 95% "identical" to a reference nucleotide sequence of the present invention, it is intended that the nucleotide sequence of the nucleic acid is identical to the reference sequence except that the nucleotide sequence may include up to five point mutations per each 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence encoding the polypeptide. In other words, to obtain a nucleic acid having a nucleotide sequence at least 95% identical to a reference nucleotide sequence, up to 5% of the nucleotides in the reference sequence may be deleted or substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up to 5% of the total nucleotides in the reference sequence may be inserted into the reference sequence. The query sequence may be an entire sequence referred to in Table 1, the ORF (open reading frame), or any fragment specified as described herein.

As a practical matter, whether any particular nucleic acid molecule or polypeptide is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to a nucleotide sequence of the present invention can be determined conventionally using known computer programs. A preferred method for determining the best overall match between a query sequence (a sequence of the present invention) and a subject sequence, also referred to as a global sequence alignment, can be determined using the FASTDB computer program based on the algorithm of Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)). In a sequence alignment the query and subject sequences are both DNA sequences. An RNA sequence can be compared by converting U's to T's. The result of said global sequence alignment is in percent identity. Preferred parameters used in a FASTDB alignment of DNA sequences to calculate percent identiy are: Matrix=Unitary, k-tuple=4, Mismatch Penalty=1, Joining Penalty=30, Randomization Group Length=0, Cutoff Score=1, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty 0.05, Window Size=500 or the lenght of the subject nucleotide sequence, whichever is shorter.

If the subject sequence is shorter than the query sequence because of 5' or 3' deletions, not because of internal deletions, a manual correction must be made to the results. This is because the FASTDB program does not account for 5' and 3' truncations of the subject

sequence when calculating percent identity. For subject sequences truncated at the 5' or 3' ends, relative to the query sequence, the percent identity is corrected by calculating the number of bases of the query sequence that are 5' and 3' of the subject sequence, which are not matched/aligned, as a percent of the total bases of the query sequence. Whether a nucleotide is matched/aligned is determined by results of the FASTDB sequence alignment. This percentage is then subtracted from the percent identity, calculated by the above FASTDB program using the specified parameters, to arrive at a final percent identity score. This corrected score is what is used for the purposes of the present invention. Only bases outside the 5' and 3' bases of the subject sequence, as displayed by the FASTDB alignment, which are not matched/aligned with the query sequence, are calculated for the purposes of manually adjusting the percent identity score.

For example, a 90 base subject sequence is aligned to a 100 base query sequence to determine percent identity. The deletions occur at the 5' end of the subject sequence and therefore, the FASTDB alignment does not show a matched/alignment of the first 10 bases at 5' end. The 10 unpaired bases represent 10% of the sequence (number of bases at the 5' and 3' ends not matched/total number of bases in the query sequence) so 10% is subtracted from the percent identity score calculated by the FASTDB program. If the remaining 90 bases were perfectly matched the final percent identity would be 90%. In another example, a 90 base subject sequence is compared with a 100 base query sequence. This time the deletions are internal deletions so that there are no bases on the 5' or 3' of the subject sequence which are not matched/aligned with the query. In this case the percent identity calculated by FASTDB is not manually corrected. Once again, only bases 5' and 3' of the subject sequence which are not matched/aligned with the query sequence are manually corrected for. No other manual corrections are to made for the purposes of the present invention.

By a polypeptide having an amino acid sequence at least, for example, 95% "identical" to a query amino acid sequence of the present invention, it is intended that the amino acid sequence of the subject polypeptide is identical to the query sequence except that the subject polypeptide sequence may include up to five amino acid alterations per each 100 amino acids of the query amino acid sequence. In other words, to obtain a polypeptide having an amino acid sequence at least 95% identical to a query amino acid sequence, up to 5% of the amino acid residues in the subject sequence may be inserted, deleted, (indels) or substituted with another amino acid. These alterations of the reference sequence may occur

at the amino or carboxy terminal positions of the reference amino acid sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among residues in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

As a practical matter, whether any particular polypeptide is at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to, for instance, the amino acid sequence referred to in Table 1 or a fragment thereof, the amino acid sequence encoded by the nucleotide sequence in SEQ ID NO:X or a fragment thereof, or to the amino acid sequence encoded by the cDNA in cDNA plasmid:V, or a fragment thereof, can be determined conventionally using known computer programs. A preferred method for determing the best overall match between a query sequence (a sequence of the present invention) and a subject sequence, also referred to as a global sequence alignment, can be determined using the FASTDB computer program based on the algorithm of Brutlag et al. (Comp. App. Biosci.6:237- 245(1990)). In a sequence alignment the query and subject sequences are either both nucleotide sequences or both amino acid sequences. The result of said global sequence alignment is in percent identity. Preferred parameters used in a FASTDB amino acid alignment are: Matrix=PAM 0, k-tuple=2, Mismatch Penalty=1, Joining Penalty=20, Randomization Group Length=0, Cutoff Score=1, Window Size=sequence length, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty=0.05, Window Size=500 or the length of the subject amino acid sequence, whichever is shorter.

If the subject sequence is shorter than the query sequence due to N- or C-terminal deletions, not because of internal deletions, a manual correction must be made to the results. This is because the FASTDB program does not account for N- and C-terminal truncations of the subject sequence when calculating global percent identity. For subject sequences truncated at the N- and C-termini, relative to the query sequence, the percent identity is corrected by calculating the number of residues of the query sequence that are N- and C-terminal of the subject sequence, which are not matched/aligned with a corresponding subject residue, as a percent of the total bases of the query sequence. Whether a residue is matched/aligned is determined by results of the FASTDB sequence alignment. This percentage is then subtracted from the percent identity, calculated by the above FASTDB program using the specified parameters, to arrive at a final percent identity score. This final percent identity score is what is used for the purposes of the present invention. Only residues to the N- and C-termini of the subject sequence, which are not matched/aligned with the query sequence, are considered for the purposes of manually adjusting the percent identity

score. That is, only query residue positions outside the farthest N- and C- terminal residues of the subject sequence.

For example, a 90 amino acid residue subject sequence is aligned with a 100 residue query sequence to determine percent identity. The deletion occurs at the N-terminus of the subject sequence and therefore, the FASTDB alignment does not show a matching/alignment of the first 10 residues at the N-terminus. The 10 unpaired residues represent 10% of the sequence (number of residues at the N- and C- termini not matched/total number of residues in the query sequence) so 10% is subtracted from the percent identity score calculated by the FASTDB program. If the remaining 90 residues were perfectly matched the final percent identity would be 90%. In another example, a 90 residue subject sequence is compared with a 100 residue query sequence. This time the deletions are internal deletions so there are no residues at the N- or C-termini of the subject sequence which are not matched/aligned with the query. In this case the percent identity calculated by FASTDB is not manually corrected. Once again, only residue positions outside the N- and C-terminal ends of the subject sequence, as displayed in the FASTDB alignment, which are not matched/aligned with the query sequence are manually corrected for. No other manual corrections are to made for the purposes of the present invention.

The variants may contain alterations in the coding regions, non-coding regions, or both. Especially preferred are polynucleotide variants containing alterations which produce silent substitutions, additions, or deletions, but do not alter the properties or activities of the encoded polypeptide. Nucleotide variants produced by silent substitutions due to the degeneracy of the genetic code are preferred. Moreover, variants in which less than 50, less than 40, less than 30, less than 20, less than 10, or 5-50, 5-25, 5-10, 1-5, or 1-2 amino acids are substituted, deleted, or added in any combination are also preferred. Polynucleotide variants can be produced for a variety of reasons, e.g., to optimize codon expression for a particular host (change codons in the human mRNA to those preferred by a bacterial host such as E. coli).

Naturally occurring variants are called "allelic variants," and refer to one of several alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism. (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985).) These allelic variants can vary at either the polynucleotide and/or polypeptide level and are included in the present invention.

Alternatively, non-naturally occurring variants may be produced by mutagenesis techniques or by direct synthesis.

Using known methods of protein engineering and recombinant DNA technology, variants may be generated to improve or alter the characteristics of the polypeptides of the present invention. For instance, as discussed herein, one or more amino acids can be deleted from the N-terminus or C-terminus of the polypeptide of the present invention without substantial loss of biological function. The authors of Ron et al., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993), reported variant KGF proteins having heparin binding activity even after deleting 3, 8, or 27 amino-terminal amino acid residues. Similarly, Interferon gamma exhibited up to ten times higher activity after deleting 8-10 amino acid residues from the carboxy terminus of this protein. (Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988).)

Moreover, ample evidence demonstrates that variants often retain a biological activity similar to that of the naturally occurring protein. For example, Gayle and coworkers (J. Biol. Chem 268:22105-22111 (1993)) conducted extensive mutational analysis of human cytokine IL-1a. They used random mutagenesis to generate over 3,500 individual IL-1a mutants that averaged 2.5 amino acid changes per variant over the entire length of the molecule. Multiple mutations were examined at every possible amino acid position. The investigators found that "[m]ost of the molecule could be altered with little effect on either [binding or biological activity]." (See, Abstract.) In fact, only 23 unique amino acid sequences, out of more than 3,500 nucleotide sequences examined, produced a protein that significantly differed in activity from wild-type.

Furthermore, as discussed herein, even if deleting one or more amino acids from the N-terminus or C-terminus of a polypeptide results in modification or loss of one or more biological functions, other biological activities may still be retained. For example, the ability of a deletion variant to induce and/or to bind antibodies which recognize the secreted form will likely be retained when less than the majority of the residues of the secreted form are removed from the N-terminus or C-terminus. Whether a particular polypeptide lacking N- or C-terminal residues of a protein retains such immunogenic activities can readily be determined by routine methods described herein and otherwise known in the art.

Thus, the invention further includes polypeptide variants which show a functional activity (e.g. biological activity) of the polypeptide of the invention, of which they are a variant. Such variants include deletions, insertions, inversions, repeats, and substitutions

selected according to general rules known in the art so as have little effect on activity.

The present application is directed to nucleic acid molecules at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% identical to the nucleic acid sequences disclosed herein, (e.g., encoding a polypeptide having the amino acid sequence of an N and/or C terminal deletion), irrespective of whether they encode a polypeptide having functional activity. This is because even where a particular nucleic acid molecule does not encode a polypeptide having functional activity, one of skill in the art would still know how to use the nucleic acid molecule, for instance, as a hybridization probe or a polymerase chain reaction (PCR) primer. Uses of the nucleic acid molecules of the present invention that do not encode a polypeptide having functional activity include, inter alia, (1) isolating a gene or allelic or splice variants thereof in a cDNA library; (2) in situ hybridization (e.g., "FISH") to metaphase chromosomal spreads to provide precise chromosomal location of the gene, as described in Verma et al., Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988); and (3) Northern Blot analysis for detecting mRNA expression in specific tissues.

Preferred, however, are nucleic acid molecules having sequences at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% identical to the nucleic acid sequences disclosed herein, which do, in fact, encode a polypeptide having functional activity of a polypeptide of the invention.

Of course, due to the degeneracy of the genetic code, one of ordinary skill in the art will immediately recognize that a large number of the nucleic acid molecules having a sequence at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% identical to, for example, the nucleic acid sequence of the cDNA in cDNA plasmid:V, the nucleic acid sequence referred to in Table 1 (SEQ ID NO:X), or fragments thereof, will encode polypeptides "having functional activity." In fact, since degenerate variants of any of these nucleotide sequences all encode the same polypeptide, in many instances, this will be clear to the skilled artisan even without performing the above described comparison assay. It will be further recognized in the art that, for such nucleic acid molecules that are not degenerate variants, a reasonable number will also encode a polypeptide having functional activity. This is because the skilled artisan is fully aware of amino acid substitutions that are either less likely or not likely to significantly effect protein function (e.g., replacing one aliphatic amino acid with a second aliphatic amino acid), as further described below.

For example, guidance concerning how to make phenotypically silent amino acid substitutions is provided in Bowie et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," Science 247:1306-1310 (1990), wherein the authors indicate that there are two main strategies for studying the tolerance of an amino acid sequence to change.

The first strategy exploits the tolerance of amino acid substitutions by natural selection during the process of evolution. By comparing amino acid sequences in different species, conserved amino acids can be identified. These conserved amino acids are likely important for protein function. In contrast, the amino acid positions where substitutions have been tolerated by natural selection indicates that these positions are not critical for protein function. Thus, positions tolerating amino acid substitution could be modified while still maintaining biological activity of the protein.

The second strategy uses genetic engineering to introduce amino acid changes at specific positions of a cloned gene to identify regions critical for protein function. For example, site directed mutagenesis or alanine-scanning mutagenesis (introduction of single alanine mutations at every residue in the molecule) can be used. (Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989).) The resulting mutant molecules can then be tested for biological activity.

As the authors state, these two strategies have revealed that proteins are surprisingly tolerant of amino acid substitutions. The authors further indicate which amino acid changes are likely to be permissive at certain amino acid positions in the protein. For example, most buried (within the tertiary structure of the protein) amino acid residues require nonpolar side chains, whereas few features of surface side chains are generally conserved. Moreover, tolerated conservative amino acid substitutions involve replacement of the aliphatic or hydrophobic amino acids Ala, Val, Leu and Ile; replacement of the hydroxyl residues Ser and Thr; replacement of the acidic residues Asp and Glu; replacement of the amide residues Asn and Gln, replacement of the basic residues Lys, Arg, and His; replacement of the aromatic residues Phe, Tyr, and Trp, and replacement of the small-sized amino acids Ala, Ser, Thr, Met, and Gly. Besides conservative amino acid substitution, variants of the present invention include (i) substitutions with one or more of the non-conserved amino acid residues, where the substituted amino acid residues may or may not be one encoded by the genetic code, or (ii) substitution with one or more of amino acid residues having a substituent group, or (iii)

fusion of the mature polypeptide with another compound, such as a compound to increase the stability and/or solubility of the polypeptide (for example, polyethylene glycol), or (iv) fusion of the polypeptide with additional amino acids, such as, for example, an IgG Fc fusion region peptide, or leader or secretory sequence, or a sequence facilitating purification or (v) fusion of the polypeptide with another compound, such as albumin (including but not limited to recombinant albumin (see, e.g., U.S. Patent No. 5,876,969, issued March 2, 1999, EP Patent 0 413 622, and U.S. Patent No. 5,766,883, issued June 16, 1998, herein incorporated by reference in their entirety)). Such variant polypeptides are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

For example, polypeptide variants containing amino acid substitutions of charged amino acids with other charged or neutral amino acids may produce proteins with improved characteristics, such as less aggregation. Aggregation of pharmaceutical formulations both reduces activity and increases clearance due to the aggregate's immunogenic activity. (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).)

A further embodiment of the invention relates to a polypeptide which comprises the amino acid sequence of a polypeptide having an amino acid sequence which contains at least one amino acid substitution, but not more than 50 amino acid substitutions, even more preferably, not more than 40 amino acid substitutions, still more preferably, not more than 30 amino acid substitutions, and still even more preferably, not more than 20 amino acid substitutions. Of course it is highly preferable for a polypeptide to have an amino acid sequence which comprises the amino acid sequence of a polypeptide of SEQ ID NO:Y, an amino acid sequence encoded by SEQ ID NO:X, and/or the amino acid sequence encoded by the cDNA in cDNA plasmid:V which contains, in order of ever-increasing preference, at least one, but not more than 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid substitutions. In specific embodiments, the number of additions, substitutions, and/or deletions in the amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or fragments thereof (e.g., the mature form and/or other fragments described herein), an amino acid sequence encoded by SEQ ID NO:X or fragments thereof, and/or the amino acid sequence encoded by cDNA plasmid:V or fragments thereof, is 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 or 50-150, conservative amino acid substitutions are preferable. As discussed herein, any polypeptide of the present invention can be used to generate fusion proteins. For example, the polypeptide of the present invention, when fused

to a second protein, can be used as an antigenic tag. Antibodies raised against the polypeptide of the present invention can be used to indirectly detect the second protein by binding to the polypeptide. Moreover, because secreted proteins target cellular locations based on trafficking signals, polypeptides of the present invention which are shown to be secreted can be used as targeting molecules once fused to other proteins.

Examples of domains that can be fused to polypeptides of the present invention include not only heterologous signal sequences, but also other heterologous functional regions. The fusion does not necessarily need to be direct, but may occur through linker sequences.

In certain preferred embodiments, proteins of the invention comprise fusion proteins wherein the polypeptides are N and/or C- terminal deletion mutants. In preferred embodiments, the application is directed to nucleic acid molecules at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the nucleic acid sequences encoding polypeptides having the amino acid sequence of the specific N- and C-terminal deletions mutants. Polynucleotides encoding these polypeptides, including fragments and/or variants, are also encompassed by the invention.

Moreover, fusion proteins may also be engineered to improve characteristics of the polypeptide of the present invention. For instance, a region of additional amino acids, particularly charged amino acids, may be added to the N-terminus of the polypeptide to improve stability and persistence during purification from the host cell or subsequent handling and storage. Also, peptide moieties may be added to the polypeptide to facilitate purification. Such regions may be removed prior to final preparation of the polypeptide. The addition of peptide moieties to facilitate handling of polypeptides are familiar and routine techniques in the art.

As one of skill in the art will appreciate, polypeptides of the present invention of the present invention and the epitope-bearing fragments thereof described above can be combined with heterologous polypeptide sequences. For example, the polypeptides of the present invention may be fused with heterologous polypeptide sequences, for example, the polypeptides of the present invention may be fused with the constant domain of immunoglobulins (IgA, IgE, IgG, IgM) or portions thereof (CH1, CH2, CH3, and any combination thereof, including both entire domains and portions thereof), resulting in chimeric polypeptides. These fusion proteins facilitate purification and show an increased

half-life in vivo. One reported example describes chimeric proteins consisting of the first two domains of the human CD4-polypeptide and various domains of the constant regions of the heavy or light chains of mammalian immunoglobulins. (EP A 394,827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988).) Fusion proteins having disulfide-linked dimeric structures (due to the IgG) can also be more efficient in binding and neutralizing other molecules, than the monomeric protein or protein fragment alone. (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270:3958-3964 (1995).)

Vectors, Host Cells, and Protein Production

The present invention also relates to vectors containing the polynucleotide of the present invention, host cells, and the production of polypeptides by recombinant techniques. The vector may be, for example, a phage, plasmid, viral, or retroviral vector. Retroviral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case, viral propagation generally will occur only in complementing host cells.

The polynucleotides of the invention may be joined to a vector containing a selectable marker for propagation in a host. Generally, a plasmid vector is introduced in a precipitate, such as a calcium phosphate precipitate, or in a complex with a charged lipid. If the vector is a virus, it may be packaged in vitro using an appropriate packaging cell line and then transduced into host cells.

The polynucleotide insert should be operatively linked to an appropriate promoter, such as the phage lambda PL promoter, the E. coli lac, trp, phoA and tac promoters, the SV40 early and late promoters and promoters of retroviral LTRs, to name a few. Other suitable promoters will be known to the skilled artisan. The expression constructs will further contain sites for transcription initiation, termination, and, in the transcribed region, a ribosome binding site for translation. The coding portion of the transcripts expressed by the constructs will preferably include a translation initiating codon at the beginning and a termination codon (UAA, UGA or UAG) appropriately positioned at the end of the polypeptide to be translated.

As indicated, the expression vectors will preferably include at least one selectable marker. Such markers include dihydrofolate reductase, G418 or neomycin resistance for eukaryotic cell culture and tetracycline, kanamycin or ampicillin resistance genes for culturing in E. coli and other bacteria. Representative examples of appropriate hosts include, but are not limited to, bacterial cells, such as E. coli, Streptomyces and Salmonella

typhimurium cells; fungal cells, such as yeast cells (e.g., Saccharomyces cerevisiae or Pichia pastoris (ATCC Accession No. 201178)); insect cells such as Drosophila S2 and Spodoptera Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS, 293, and Bowes melanoma cells; and plant cells. Appropriate culture mediums and conditions for the above-described host cells are known in the art.

Among vectors preferred for use in bacteria include pQE70, pQE60 and pQE-9, available from QIAGEN, Inc.; pBluescript vectors, Phagescript vectors, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, available from Stratagene Cloning Systems, Inc.; and ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 available from Pharmacia Biotech, Inc. Among preferred eukaryotic vectors are pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 and pSG available from Stratagene; and pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL available from Pharmacia. Preferred expression vectors for use in yeast systems include, but are not limited to pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K, and PAO815 (all available from Invitrogen, Carlbad, CA). Other suitable vectors will be readily apparent to the skilled artisan.

Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, infection, or other methods. Such methods are described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986). It is specifically contemplated that the polypeptides of the present invention may in fact be expressed by a host cell lacking a recombinant vector.

A polypeptide of this invention can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography ("HPLC") is employed for purification.

Polypeptides of the present invention can also be recovered from: products purified from natural sources, including bodily fluids, tissues and cells, whether directly isolated or cultured; products of chemical synthetic procedures; and products produced by recombinant techniques from a prokaryotic or eukaryotic host, including, for example, bacterial, yeast, higher plant, insect, and mammalian cells. Depending upon the host employed in a

recombinant production procedure, the polypeptides of the present invention may be glycosylated or may be non-glycosylated. In addition, polypeptides of the invention may also include an initial modified methionine residue, in some cases as a result of host-mediated processes. Thus, it is well known in the art that the N-terminal methionine encoded by the translation initiation codon generally is removed with high efficiency from any protein after translation in all eukaryotic cells. While the N-terminal methionine on most proteins also is efficiently removed in most prokaryotes, for some proteins, this prokaryotic removal process is inefficient, depending on the nature of the amino acid to which the N-terminal methionine is covalently linked.

In one embodiment, the yeast *Pichia pastoris* is used to express polypeptides of the invention in a eukaryotic system. *Pichia pastoris* is a methylotrophic yeast which can metabolize methanol as its sole carbon source. A main step in the methanol metabolization pathway is the oxidation of methanol to formaldehyde using O_2. This reaction is catalyzed by the enzyme alcohol oxidase. In order to metabolize methanol as its sole carbon source, *Pichia pastoris* must generate high levels of alcohol oxidase due, in part, to the relatively low affinity of alcohol oxidase for O_2. Consequently, in a growth medium depending on methanol as a main carbon source, the promoter region of one of the two alcohol oxidase genes (*AOX1*) is highly active. In the presence of methanol, alcohol oxidase produced from the *AOX1* gene comprises up to approximately 30% of the total soluble protein in *Pichia pastoris*. *See*, 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). Thus, a heterologous coding sequence, such as, for example, a polynucleotide of the present invention, under the transcriptional regulation of all or part of the *AOX1* regulatory sequence is expressed at exceptionally high levels in *Pichia* yeast grown in the presence of methanol.

In one example, the plasmid vector pPIC9K is used to express DNA encoding a polypeptide of the invention, as set forth herein, in a *Pichea* yeast system essentially as described in "*Pichia* Protocols: Methods in Molecular Biology," D.R. Higgins and J. Cregg, eds. The Humana Press, Totowa, NJ, 1998. This expression vector allows expression and secretion of a polypeptide of the invention by virtue of the strong *AOX1* promoter linked to

the *Pichia pastoris* alkaline phosphatase (PHO) secretory signal peptide (i.e., leader) located upstream of a multiple cloning site.

Many other yeast vectors could be used in place of pPIC9K, such as, pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalpha, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, and PAO815, as one skilled in the art would readily appreciate, as long as the proposed expression construct provides appropriately located signals for transcription, translation, secretion (if desired), and the like, including an in-frame AUG as required.

In another embodiment, high-level expression of a heterologous coding sequence, such as, for example, a polynucleotide of the present invention, may be achieved by cloning the heterologous polynucleotide of the invention into an expression vector such as, for example, pGAPZ or pGAPZalpha, and growing the yeast culture in the absence of methanol.

In addition to encompassing host cells containing the vector constructs discussed herein, the invention also encompasses primary, secondary, and immortalized host cells of vertebrate origin, particularly mammalian origin, that have been engineered to delete or replace endogenous genetic material (e.g., coding sequence), and/or to include genetic material (e.g., heterologous polynucleotide sequences) that is operably associated with polynucleotides of the invention, and which activates, alters, and/or amplifies endogenous polynucleotides. For example, techniques known in the art may be used to operably associate heterologous control regions (e.g., promoter and/or enhancer) and endogenous polynucleotide sequences via homologous recombination (see, e.g., U.S. Patent No. 5,641,670, issued June 24, 1997; International Publication No. WO 96/29411, published September 26, 1996; International Publication No. WO 94/12650, published August 4, 1994; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); and Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989), the disclosures of each of which are incorporated by reference in their entireties).

In addition, polypeptides of the invention can be chemically synthesized using techniques known in the art (e.g., see Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y., and Hunkapiller et al., *Nature*, 310:105-111 (1984)). For example, a polypeptide corresponding to a fragment of a polypeptide can be synthesized by use of a peptide synthesizer. Furthermore, if desired, nonclassical amino acids or chemical amino acid analogs can be introduced as a substitution or addition into the

polypeptide sequence. Non-classical amino acids include, but are not limited to, to the D-isomers of the common amino acids, 2,4-diaminobutyric acid, a-amino isobutyric acid, 4-aminobutyric acid, Abu, 2-amino butyric acid, g-Abu, e-Ahx, 6-amino hexanoic acid, Aib, 2-amino isobutyric acid, 3-amino propionic acid, ornithine, norleucine, norvaline, hydroxyproline, sarcosine, citrulline, homocitrulline, cysteic acid, t-butylglycine, t-butylalanine, phenylglycine, cyclohexylalanine, b-alanine, fluoro-amino acids, designer amino acids such as b-methyl amino acids, Ca-methyl amino acids, Na-methyl amino acids, and amino acid analogs in general. Furthermore, the amino acid can be D (dextrorotary) or L (levorotary).

The invention encompasses polypeptides of the present invention which are differentially modified during or after translation, e.g., by glycosylation, acetylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule or other cellular ligand, etc. Any of numerous chemical modifications may be carried out by known techniques, including but not limited, to specific chemical cleavage by cyanogen bromide, trypsin, chymotrypsin, papain, V8 protease, $NaBH_4$; acetylation, formylation, oxidation, reduction; metabolic synthesis in the presence of tunicamycin; etc.

Additional post-translational modifications encompassed by the invention include, for example, e.g., N-linked or O-linked carbohydrate chains, processing of N-terminal or C-terminal ends), attachment of chemical moieties to the amino acid backbone, chemical modifications of N-linked or O-linked carbohydrate chains, and addition or deletion of an N-terminal methionine residue as a result of procaryotic host cell expression. The polypeptides may also be modified with a detectable label, such as an enzymatic, fluorescent, isotopic or affinity label to allow for detection and isolation of the protein.

Also provided by the invention are chemically modified derivatives of the polypeptides of the invention which may provide additional advantages such as increased solubility, stability and circulating time of the polypeptide, or decreased immunogenicity (see U.S. Patent No. 4,179,337). The chemical moieties for derivitization may be selected from water soluble polymers such as polyethylene glycol, ethylene glycol/propylene glycol copolymers, carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol and the like. The polypeptides may be modified at random positions within the molecule, or at predetermined

positions within the molecule and may include one, two, three or more attached chemical moieties.

The polymer may be of any molecular weight, and may be branched or unbranched. For polyethylene glycol, the preferred molecular weight is between about 1 kDa and about 100 kDa (the term "about" indicating that in preparations of polyethylene glycol, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight) for ease in handling and manufacturing. Other sizes may be used, depending on the desired therapeutic profile (e.g., the duration of sustained release desired, the effects, if any on biological activity, the ease in handling, the degree or lack of antigenicity and other known effects of the polyethylene glycol to a therapeutic protein or analog).

The polyethylene glycol molecules (or other chemical moieties) should be attached to the protein with consideration of effects on functional or antigenic domains of the protein. There are a number of attachment methods available to those skilled in the art, e.g., EP 0 401 384, herein incorporated by reference (coupling PEG to G-CSF), see also Malik et al., Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992) (reporting pegylation of GM-CSF using tresyl chloride). For example, polyethylene glycol may be covalently bound through amino acid residues via a reactive group, such as, a free amino or carboxyl group. Reactive groups are those to which an activated polyethylene glycol molecule may be bound. The amino acid residues having a free amino group may include lysine residues and the N-terminal amino acid residues; those having a free carboxyl group may include aspartic acid residues glutamic acid residues and the C-terminal amino acid residue. Sulfhydryl groups may also be used as a reactive group for attaching the polyethylene glycol molecules. Preferred for therapeutic purposes is attachment at an amino group, such as attachment at the N-terminus or lysine group.

One may specifically desire proteins chemically modified at the N-terminus. Using polyethylene glycol as an illustration of the present composition, one may select from a variety of polyethylene glycol molecules (by molecular weight, branching, etc.), the proportion of polyethylene glycol molecules to protein (polypeptide) molecules in the reaction mix, the type of pegylation reaction to be performed, and the method of obtaining the selected N-terminally pegylated protein. The method of obtaining the N-terminally pegylated preparation (i.e., separating this moiety from other monopegylated moieties if necessary) may be by purification of the N-terminally pegylated material from a population of pegylated protein molecules. Selective proteins chemically modified at the N-terminus

modification may be accomplished by reductive alkylation which exploits differential reactivity of different types of primary amino groups (lysine versus the N-terminal) available for derivatization in a particular protein. Under the appropriate reaction conditions, substantially selective derivatization of the protein at the N-terminus with a carbonyl group containing polymer is achieved.

The polypeptides of the invention may be in monomers or multimers (i.e., dimers, trimers, tetramers and higher multimers). Accordingly, the present invention relates to monomers and multimers of the polypeptides of the invention, their preparation, and compositions (preferably, Therapeutics) containing them. In specific embodiments, the polypeptides of the invention are monomers, dimers, trimers or tetramers. In additional embodiments, the multimers of the invention are at least dimers, at least trimers, or at least tetramers.

Multimers encompassed by the invention may be homomers or heteromers. As used herein, the term homomer, refers to a multimer containing only polypeptides corresponding to the amino acid sequence of SEQ ID NO:Y or an amino acid sequence encoded by SEQ ID NO:X or the complement of SEQ ID NO:X, and/or an amino acid sequence encoded by cDNA plasmid:V (including fragments, variants, splice variants, and fusion proteins, corresponding to these as described herein). These homomers may contain polypeptides having identical or different amino acid sequences. In a specific embodiment, a homomer of the invention is a multimer containing only polypeptides having an identical amino acid sequence. In another specific embodiment, a homomer of the invention is a multimer containing polypeptides having different amino acid sequences. In specific embodiments, the multimer of the invention is a homodimer (e.g., containing polypeptides having identical or different amino acid sequences) or a homotrimer (e.g., containing polypeptides having identical and/or different amino acid sequences). In additional embodiments, the homomeric multimer of the invention is at least a homodimer, at least a homotrimer, or at least a homotetramer.

As used herein, the term heteromer refers to a multimer containing one or more heterologous polypeptides (i.e., polypeptides of different proteins) in addition to the polypeptides of the invention. In a specific embodiment, the multimer of the invention is a heterodimer, a heterotrimer, or a heterotetramer. In additional embodiments, the heteromeric

multimer of the invention is at least a heterodimer, at least a heterotrimer, or at least a heterotetramer.

Multimers of the invention may be the result of hydrophobic, hydrophilic, ionic and/or covalent associations and/or may be indirectly linked, by for example, liposome formation. Thus, in one embodiment, multimers of the invention, such as, for example, homodimers or homotrimers, are formed when polypeptides of the invention contact one another in solution. In another embodiment, heteromultimers of the invention, such as, for example, heterotrimers or heterotetramers, are formed when polypeptides of the invention contact antibodies to the polypeptides of the invention (including antibodies to the heterologous polypeptide sequence in a fusion protein of the invention) in solution. In other embodiments, multimers of the invention are formed by covalent associations with and/or between the polypeptides of the invention. Such covalent associations may involve one or more amino acid residues contained in the polypeptide sequence (e.g., that recited in SEQ ID NO:Y, or contained in a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X, and/or the cDNA plasmid:V). In one instance, the covalent associations are cross-linking between cysteine residues located within the polypeptide sequences which interact in the native (i.e., naturally occurring) polypeptide. In another instance, the covalent associations are the consequence of chemical or recombinant manipulation. Alternatively, such covalent associations may involve one or more amino acid residues contained in the heterologous polypeptide sequence in a fusion protein. In one example, covalent associations are between the heterologous sequence contained in a fusion protein of the invention (see, e.g., US Patent Number 5,478,925). In a specific example, the covalent associations are between the heterologous sequence contained in a Fc fusion protein of the invention (as described herein). In another specific example, covalent associations of fusion proteins of the invention are between heterologous polypeptide sequence from another protein that is capable of forming covalently associated multimers, such as for example, osteoprotegerin (see, e.g., International Publication NO: WO 98/49305, the contents of which are herein incorporated by reference in its entirety). In another embodiment, two or more polypeptides of the invention are joined through peptide linkers. Examples include those peptide linkers described in U.S. Pat. No. 5,073,627 (hereby incorporated by reference). Proteins comprising multiple polypeptides of the invention separated by peptide linkers may be produced using conventional recombinant DNA technology.

Another method for preparing multimer polypeptides of the invention involves use of polypeptides of the invention fused to a leucine zipper or isoleucine zipper polypeptide sequence. Leucine zipper and isoleucine zipper domains are polypeptides that promote multimerization of the proteins in which they are found. Leucine zippers were originally identified in several DNA-binding proteins (Landschulz et al., Science 240:1759, (1988)), and have since been found in a variety of different proteins. Among the known leucine zippers are naturally occurring peptides and derivatives thereof that dimerize or trimerize. Examples of leucine zipper domains suitable for producing soluble multimeric proteins of the invention are those described in PCT application WO 94/10308, hereby incorporated by reference. Recombinant fusion proteins comprising a polypeptide of the invention fused to a polypeptide sequence that dimerizes or trimerizes in solution are expressed in suitable host cells, and the resulting soluble multimeric fusion protein is recovered from the culture supernatant using techniques known in the art.

Trimeric polypeptides of the invention may offer the advantage of enhanced biological activity. Preferred leucine zipper moieties and isoleucine moieties are those that preferentially form trimers. One example is a leucine zipper derived from lung surfactant protein D (SPD), as described in Hoppe et al. (FEBS Letters 344:191, (1994)) and in U.S. patent application Ser. No. 08/446,922, hereby incorporated by reference. Other peptides derived from naturally occurring trimeric proteins may be employed in preparing trimeric polypeptides of the invention.

In another example, proteins of the invention are associated by interactions between Flag® polypeptide sequence contained in fusion proteins of the invention containing Flag® polypeptide seuqence. In a further embodiment, associations proteins of the invention are associated by interactions between heterologous polypeptide sequence contained in Flag® fusion proteins of the invention and anti-Flag® antibody.

The multimers of the invention may be generated using chemical techniques known in the art. For example, polypeptides desired to be contained in the multimers of the invention may be chemically cross-linked using linker molecules and linker molecule length optimization techniques known in the art (see, e.g., US Patent Number 5,478,925, which is herein incorporated by reference in its entirety). Additionally, multimers of the invention may be generated using techniques known in the art to form one or more inter-molecule cross-links between the cysteine residues located within the sequence of the polypeptides

desired to be contained in the multimer (see, e.g., US Patent Number 5,478,925, which is herein incorporated by reference in its entirety). Further, polypeptides of the invention may be routinely modified by the addition of cysteine or biotin to the C-terminus or N-terminus of the polypeptide and techniques known in the art may be applied to generate multimers containing one or more of these modified polypeptides (see, e.g., US Patent Number 5,478,925, which is herein incorporated by reference in its entirety). Additionally, techniques known in the art may be applied to generate liposomes containing the polypeptide components desired to be contained in the multimer of the invention (see, e.g., US Patent Number 5,478,925, which is herein incorporated by reference in its entirety).

Alternatively, multimers of the invention may be generated using genetic engineering techniques known in the art. In one embodiment, polypeptides contained in multimers of the invention are produced recombinantly using fusion protein technology described herein or otherwise known in the art (see, e.g., US Patent Number 5,478,925, which is herein incorporated by reference in its entirety). In a specific embodiment, polynucleotides coding for a homodimer of the invention are generated by ligating a polynucleotide sequence encoding a polypeptide of the invention to a sequence encoding a linker polypeptide and then further to a synthetic polynucleotide encoding the translated product of the polypeptide in the reverse orientation from the original C-terminus to the N-terminus (lacking the leader sequence) (see, e.g., US Patent Number 5,478,925, which is herein incorporated by reference in its entirety). In another embodiment, recombinant techniques described herein or otherwise known in the art are applied to generate recombinant polypeptides of the invention which contain a transmembrane domain (or hyrophobic or signal peptide) and which can be incorporated by membrane reconstitution techniques into liposomes (see, e.g., US Patent Number 5,478,925, which is herein incorporated by reference in its entirety).

Antibodies

Further polypeptides of the invention relate to antibodies and T-cell antigen receptors (TCR) which immunospecifically bind a polypeptide, polypeptide fragment, or variant of SEQ ID NO:Y, and/or an epitope, of the present invention (as determined by immunoassays well known in the art for assaying specific antibody-antigen binding). Antibodies of the invention include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, multispecific, human, humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments, F(ab') fragments,

fragments produced by a Fab expression library, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies (including, e.g., anti-Id antibodies to antibodies of the invention), and epitope-binding fragments of any of the above. The term "antibody," as used herein, refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site that immunospecifically binds an antigen. The immunoglobulin molecules of the invention can be of any type (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and IgY), class (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2) or subclass of immunoglobulin molecule.

Most preferably the antibodies are human antigen-binding antibody fragments of the present invention and include, but are not limited to, Fab, Fab' and F(ab')2, Fd, single-chain Fvs (scFv), single-chain antibodies, disulfide-linked Fvs (sdFv) and fragments comprising either a VL or VH domain. Antigen-binding antibody fragments, including single-chain antibodies, may comprise the variable region(s) alone or in combination with the entirety or a portion of the following: hinge region, CH1, CH2, and CH3 domains. Also included in the invention are antigen-binding fragments also comprising any combination of variable region(s) with a hinge region, CH1, CH2, and CH3 domains. The antibodies of the invention may be from any animal origin including birds and mammals. Preferably, the antibodies are human, murine (e.g., mouse and rat), donkey, ship rabbit, goat, guinea pig, camel, horse, or chicken. As used herein, "human" antibodies include antibodies having the amino acid sequence of a human immunoglobulin and include antibodies isolated from human immunoglobulin libraries or from animals transgenic for one or more human immunoglobulin and that do not express endogenous immunoglobulins, as described infra and, for example in, U.S. Patent No. 5,939,598 by Kucherlapati et al.

The antibodies of the present invention may be monospecific, bispecific, trispecific or of greater multispecificity. Multispecific antibodies may be specific for different epitopes of a polypeptide of the present invention or may be specific for both a polypeptide of the present invention as well as for a heterologous epitope, such as a heterologous polypeptide or solid support material. See, e.g., PCT publications WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); U.S. Patent Nos. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Antibodies of the present invention may be described or specified in terms of the epitope(s) or portion(s) of a polypeptide of the present invention which they recognize or specifically bind. The epitope(s) or polypeptide portion(s) may be specified as described herein, e.g., by N-terminal and C-terminal positions, or by size in contiguous amino acid residues. Antibodies which specifically bind any epitope or polypeptide of the present invention may also be excluded. Therefore, the present invention includes antibodies that specifically bind polypeptides of the present invention, and allows for the exclusion of the same.

Antibodies of the present invention may also be described or specified in terms of their cross-reactivity. Antibodies that do not bind any other analog, ortholog, or homolog of a polypeptide of the present invention are included. Antibodies that bind polypeptides with at least 95%, at least 90%, at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 65%, at least 60%, at least 55%, and at least 50% identity (as calculated using methods known in the art and described herein) to a polypeptide of the present invention are also included in the present invention. In specific embodiments, antibodies of the present invention cross-react with murine, rat and/or rabbit homologs of human proteins and the corresponding epitopes thereof. Antibodies that do not bind polypeptides with less than 95%, less than 90%, less than 85%, less than 80%, less than 75%, less than 70%, less than 65%, less than 60%, less than 55%, and less than 50% identity (as calculated using methods known in the art and described herein) to a polypeptide of the present invention are also included in the present invention. In a specific embodiment, the above-described cross-reactivity is with respect to any single specific antigenic or immunogenic polypeptide, or combination(s) of 2, 3, 4, 5, or more of the specific antigenic and/or immunogenic polypeptides disclosed herein. Further included in the present invention are antibodies which bind polypeptides encoded by polynucleotides which hybridize to a polynucleotide of the present invention under stringent hybridization conditions (as described herein). Antibodies of the present invention may also be described or specified in terms of their binding affinity to a polypeptide of the invention. Preferred binding affinities include those with a dissociation constant or Kd less than 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 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, 10^{-8} M, 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, or 10^{-15} M.

The invention also provides antibodies that competitively inhibit binding of an antibody to an epitope of the invention as determined by any method known in the art for determining competitive binding, for example, the immunoassays described herein. In preferred embodiments, the antibody competitively inhibits binding to the epitope by at least 95%, at least 90%, at least 85 %, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 60%, or at least 50%.

Antibodies of the present invention may act as agonists or antagonists of the polypeptides of the present invention. For example, the present invention includes antibodies which disrupt the receptor/ligand interactions with the polypeptides of the invention either partially or fully. Preferrably, antibodies of the present invention bind an antigenic epitope disclosed herein, or a portion thereof. The invention features both receptor-specific antibodies and ligand-specific antibodies. The invention also features receptor-specific antibodies which do not prevent ligand binding but prevent receptor activation. Receptor activation (i.e., signaling) may be determined by techniques described herein or otherwise known in the art. For example, receptor activation can be determined by detecting the phosphorylation (e.g., tyrosine or serine/threonine) of the receptor or its substrate by immunoprecipitation followed by western blot analysis (for example, as described supra). In specific embodiments, antibodies are provided that inhibit ligand activity or receptor activity by at least 95%, at least 90%, at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 60%, or at least 50% of the activity in absence of the antibody.

The invention also features receptor-specific antibodies which both prevent ligand binding and receptor activation as well as antibodies that recognize the receptor-ligand complex, and, preferably, do not specifically recognize the unbound receptor or the unbound ligand. Likewise, included in the invention are neutralizing antibodies which bind the ligand and prevent binding of the ligand to the receptor, as well as antibodies which bind the ligand, thereby preventing receptor activation, but do not prevent the ligand from binding the receptor. Further included in the invention are antibodies which activate the receptor. These antibodies may act as receptor agonists, i.e., potentiate or activate either all or a subset of the biological activities of the ligand-mediated receptor activation, for example, by inducing dimerization of the receptor. The antibodies may be specified as agonists, antagonists or inverse agonists for biological activities comprising the specific biological activities of the peptides of the invention disclosed herein. The above antibody agonists can be made using

methods known in the art. See, e.g., PCT publication WO 96/40281; U.S. Patent No. 5,811,097; 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(Pt2):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) (which are all incorporated by reference herein in their entireties).

Antibodies of the present invention may be used, for example, but not limited to, to purify, detect, and target the polypeptides of the present invention, including both in vitro and in vivo diagnostic and therapeutic methods. For example, the antibodies have use in immunoassays for qualitatively and quantitatively measuring levels of the polypeptides of the present invention in biological samples. See, e.g., Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) (incorporated by reference herein in its entirety).

As discussed in more detail below, the antibodies of the present invention may be used either alone or in combination with other compositions. The antibodies may further be recombinantly fused to a heterologous polypeptide at the N- or C-terminus or chemically conjugated (including covalently and non-covalently conjugations) to polypeptides or other compositions. For example, antibodies of the present invention may be recombinantly fused or conjugated to molecules useful as labels in detection assays and effector molecules such as heterologous polypeptides, drugs, radionuclides, or toxins. See, e.g., PCT publications WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; U.S. Patent No. 5,314,995; and EP 396,387.

The antibodies of the invention include derivatives that are modified, i.e, by the covalent attachment of any type of molecule to the antibody such that covalent attachment does not prevent the antibody from generating an anti-idiotypic response. For example, but not by way of limitation, the antibody derivatives include antibodies that have been modified, e.g., by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, etc. Any of numerous chemical modifications may be carried out by known techniques, including, but not limited to specific chemical cleavage, acetylation, formylation,

metabolic synthesis of tunicamycin, etc. Additionally, the derivative may contain one or more non-classical amino acids.

The antibodies of the present invention may be generated by any suitable method known in the art. Polyclonal antibodies to an antigen-of- interest can be produced by various procedures well known in the art. For example, a polypeptide of the invention can be administered to various host animals including, but not limited to, rabbits, mice, rats, etc. to induce the production of sera containing polyclonal antibodies specific for the antigen. Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, and include but are not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and corynebacterium parvum. Such adjuvants are also well known in the art.

Monoclonal antibodies can be prepared using a wide variety of techniques known in the art including the use of hybridoma, recombinant, and phage display technologies, or a combination thereof. For example, monoclonal antibodies can be produced using hybridoma techniques including those known in the art and taught, for example, in Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (said references incorporated by reference in their entireties). The term "monoclonal antibody" as used herein is not limited to antibodies produced through hybridoma technology. The term "monoclonal antibody" refers to an antibody that is derived from a single clone, including any eukaryotic, prokaryotic, or phage clone, and not the method by which it is produced.

Methods for producing and screening for specific antibodies using hybridoma technology are routine and well known in the art and are discussed in detail in the Examples. In a non-limiting example, mice can be immunized with a polypeptide of the invention or a cell expressing such peptide. Once an immune response is detected, e.g., antibodies specific for the antigen are detected in the mouse serum, the mouse spleen is harvested and splenocytes isolated. The splenocytes are then fused by well known techniques to any suitable myeloma cells, for example cells from cell line SP20 available from the ATCC. Hybridomas are selected and cloned by limited dilution. The hybridoma clones are then

assayed by methods known in the art for cells that secrete antibodies capable of binding a polypeptide of the invention. Ascites fluid, which generally contains high levels of antibodies, can be generated by immunizing mice with positive hybridoma clones.

Accordingly, the present invention provides methods of generating monoclonal antibodies as well as antibodies produced by the method comprising culturing a hybridoma cell secreting an antibody of the invention wherein, preferably, the hybridoma is generated by fusing splenocytes isolated from a mouse immunized with an antigen of the invention with myeloma cells and then screening the hybridomas resulting from the fusion for hybridoma clones that secrete an antibody able to bind a polypeptide of the invention.

Antibody fragments which recognize specific epitopes may be generated by known techniques. For example, Fab and F(ab')2 fragments of the invention may be produced by proteolytic cleavage of immunoglobulin molecules, using enzymes such as papain (to produce Fab fragments) or pepsin (to produce F(ab')2 fragments). F(ab')2 fragments contain the variable region, the light chain constant region and the CH1 domain of the heavy chain.

For example, the antibodies of the present invention can also be generated using various phage display methods known in the art. In phage display methods, functional antibody domains are displayed on the surface of phage particles which carry the polynucleotide sequences encoding them. In a particular embodiment, such phage can be utilized to display antigen binding domains expressed from a repertoire or combinatorial antibody library (e.g., human or murine). Phage expressing an antigen binding domain that binds the antigen of interest can be selected or identified with antigen, e.g., using labeled antigen or antigen bound or captured to a solid surface or bead. Phage used in these methods are typically filamentous phage including fd and M13 binding domains expressed from phage with Fab, Fv or disulfide stabilized Fv antibody domains recombinantly fused to either the phage gene III or gene VIII protein. Examples of phage display methods that can be used to make the antibodies of the present invention include those disclosed in Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT application No. PCT/GB91/01134; PCT publications WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; and U.S. Patent Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908;

5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 and 5,969,108; each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

As described in the above references, after phage selection, the antibody coding regions from the phage can be isolated and used to generate whole antibodies, including human antibodies, or any other desired antigen binding fragment, and expressed in any desired host, including mammalian cells, insect cells, plant cells, yeast, and bacteria, e.g., as described in detail below. For example, techniques to recombinantly produce Fab, Fab' and F(ab')2 fragments can also be employed using methods known in the art such as those disclosed in PCT publication WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); and Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); and Better et al., Science 240:1041-1043 (1988) (said references incorporated by reference in their entireties).

Examples of techniques which can be used to produce single-chain Fvs and antibodies include those described in U.S. Patents 4,946,778 and 5,258,498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); and Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988). For some uses, including in vivo use of antibodies in humans and in vitro detection assays, it may be preferable to use chimeric, humanized, or human antibodies. A chimeric antibody is a molecule in which different portions of the antibody are derived from different animal species, such as antibodies having a variable region derived from a murine monoclonal antibody and a human immunoglobulin constant region. Methods for producing chimeric antibodies are known in the art. See e.g., Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; U.S. Patent Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 4,816397, which are incorporated herein by reference in their entirety. Humanized antibodies are antibody molecules from non-human species antibody that binds the desired antigen having one or more complementarity determining regions (CDRs) from the non-human species and a framework regions from a human immunoglobulin molecule. Often, framework residues in the human framework regions will be substituted with the corresponding residue from the CDR donor antibody to alter, preferably improve, antigen binding. These framework substitutions are identified by methods well known in the art, e.g., by modeling of the interactions of the CDR and framework residues to identify framework residues important for antigen binding and sequence comparison to identify unusual framework residues at particular positions. (See, e.g., Queen et al., U.S. Patent No. 5,585,089; Riechmann et al.,

Nature 332:323 (1988), which are incorporated herein by reference in their entireties.) Antibodies can be humanized using a variety of techniques known in the art including, for example, CDR-grafting (EP 239,400; PCT publication WO 91/09967; U.S. Patent Nos. 5,225,539; 5.530,101; and 5,585,089), veneering or resurfacing (EP 592,106; EP 519,596; 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)), and chain shuffling (U.S. Patent No. 5,565,332).

Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human patients. Human antibodies can be made by a variety of methods known in the art including phage display methods described above using antibody libraries derived from human immunoglobulin sequences. See also, U.S. Patent Nos. 4,444,887 and 4,716,111; and PCT publications WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, and WO 91/10741; each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Human antibodies can also be produced using transgenic mice which are incapable of expressing functional endogenous immunoglobulins, but which can express human immunoglobulin genes. For example, the human heavy and light chain immunoglobulin gene complexes may be introduced randomly or by homologous recombination into mouse embryonic stem cells. Alternatively, the human variable region, constant region, and diversity region may be introduced into mouse embryonic stem cells in addition to the human heavy and light chain genes. The mouse heavy and light chain immunoglobulin genes may be rendered non-functional separately or simultaneously with the introduction of human immunoglobulin loci by homologous recombination. In particular, homozygous deletion of the JH region prevents endogenous antibody production. The modified embryonic stem cells are expanded and microinjected into blastocysts to produce chimeric mice. The chimeric mice are then bred to produce homozygous offspring which express human antibodies. The transgenic mice are immunized in the normal fashion with a selected antigen, e.g., all or a portion of a polypeptide of the invention. Monoclonal antibodies directed against the antigen can be obtained from the immunized, transgenic mice using conventional hybridoma technology. The human immunoglobulin transgenes harbored by the transgenic mice rearrange during B cell differentiation, and subsequently undergo class switching and somatic mutation. Thus, using such a technique, it is possible to produce therapeutically

useful IgG, IgA, IgM and IgE antibodies. For an overview of this technology for producing human antibodies, see Lonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). For a detailed discussion of this technology for producing human antibodies and human monoclonal antibodies and protocols for producing such antibodies, see, e.g., PCT publications WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; European Patent No. 0 598 877; U.S. Patent Nos. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; and 5,939,598, which are incorporated by reference herein in their entirety. In addition, companies such as Abgenix, Inc. (Freemont, CA) and Genpharm (San Jose, CA) can be engaged to provide human antibodies directed against a selected antigen using technology similar to that described above.

Completely human antibodies which recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In this approach a selected non-human monoclonal antibody, e.g., a mouse antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope. (Jespers et al., Bio/technology 12:899-903 (1988)).

Further, antibodies to the polypeptides of the invention can, in turn, be utilized to generate anti-idiotype antibodies that "mimic" polypeptides of the invention using techniques well known to those skilled in the art. (See, e.g., Greenspan & Bona, FASEB J. 7(5):437-444; (1989) and Nissinoff, J. Immunol. 147(8):2429-2438 (1991)). For example, antibodies which bind to and competitively inhibit polypeptide multimerization and/or binding of a polypeptide of the invention to a ligand can be used to generate anti-idiotypes that "mimic" the polypeptide multimerization and/or binding domain and, as a consequence, bind to and neutralize polypeptide and/or its ligand. Such neutralizing anti-idiotypes or Fab fragments of such anti-idiotypes can be used in therapeutic regimens to neutralize polypeptide ligand. For example, such anti-idiotypic antibodies can be used to bind a polypeptide of the invention and/or to bind its ligands/receptors, and thereby block its biological activity.

Polynucleotides Encoding Antibodies

The invention further provides polynucleotides comprising a nucleotide sequence encoding an antibody of the invention and fragments thereof. The invention also encompasses polynucleotides that hybridize under stringent or alternatively, under lower stringency hybridization conditions, e.g., as defined supra, to polynucleotides that encode an

antibody, preferably, that specifically binds to a polypeptide of the invention, preferably, an antibody that binds to a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:Y.

The polynucleotides may be obtained, and the nucleotide sequence of the polynucleotides determined, by any method known in the art. For example, if the nucleotide sequence of the antibody is known, a polynucleotide encoding the antibody may be assembled from chemically synthesized oligonucleotides (e.g., as described in Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)), which, briefly, involves the synthesis of overlapping oligonucleotides containing portions of the sequence encoding the antibody, annealing and ligating of those oligonucleotides, and then amplification of the ligated oligonucleotides by PCR.

Alternatively, a polynucleotide encoding an antibody may be generated from nucleic acid from a suitable source. If a clone containing a nucleic acid encoding a particular antibody is not available, but the sequence of the antibody molecule is known, a nucleic acid encoding the immunoglobulin may be chemically synthesized or obtained from a suitable source (e.g., an antibody cDNA library, or a cDNA library generated from, or nucleic acid, preferably poly A+ RNA, isolated from, any tissue or cells expressing the antibody, such as hybridoma cells selected to express an antibody of the invention) by PCR amplification using synthetic primers hybridizable to the 3' and 5' ends of the sequence or by cloning using an oligonucleotide probe specific for the particular gene sequence to identify, e.g., a cDNA clone from a cDNA library that encodes the antibody. Amplified nucleic acids generated by PCR may then be cloned into replicable cloning vectors using any method well known in the art.

Once the nucleotide sequence and corresponding amino acid sequence of the antibody is determined, the nucleotide sequence of the antibody may be manipulated using methods well known in the art for the manipulation of nucleotide sequences, e.g., recombinant DNA techniques, site directed mutagenesis, PCR, etc. (see, for example, the techniques described in Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY and Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, which are both incorporated by reference herein in their entireties), to generate antibodies having a different amino acid sequence, for example to create amino acid substitutions, deletions, and/or insertions.

In a specific embodiment, the amino acid sequence of the heavy and/or light chain variable domains may be inspected to identify the sequences of the complementarity determining regions (CDRs) by methods that are well know in the art, e.g., by comparison to known amino acid sequences of other heavy and light chain variable regions to determine the regions of sequence hypervariability. Using routine recombinant DNA techniques, one or more of the CDRs may be inserted within framework regions, e.g., into human framework regions to humanize a non-human antibody, as described supra. The framework regions may be naturally occurring or consensus framework regions, and preferably human framework regions (see, e.g., Chothia et al., J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998) for a listing of human framework regions). Preferably, the polynucleotide generated by the combination of the framework regions and CDRs encodes an antibody that specifically binds a polypeptide of the invention. Preferably, as discussed supra, one or more amino acid substitutions may be made within the framework regions, and, preferably, the amino acid substitutions improve binding of the antibody to its antigen. Additionally, such methods may be used to make amino acid substitutions or deletions of one or more variable region cysteine residues participating in an intrachain disulfide bond to generate antibody molecules lacking one or more intrachain disulfide bonds. Other alterations to the polynucleotide are encompassed by the present invention and within the skill of the art.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (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)) by splicing genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. As described supra, a chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine mAb and a human immunoglobulin constant region, e.g., humanized antibodies.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent No. 4,946,778; Bird, Science 242:423- 42 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); and Ward et al., Nature 334:544-54 (1989)) can be adapted to produce single chain antibodies. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single

chain polypeptide. Techniques for the assembly of functional Fv fragments in E. coli may also be used (Skerra et al., Science 242:1038- 1041 (1988)).

Methods of Producing Antibodies

The antibodies of the invention can be produced by any method known in the art for the synthesis of antibodies, in particular, by chemical synthesis or preferably, by recombinant expression techniques.

Recombinant expression of an antibody of the invention, or fragment, derivative or analog thereof, (e.g., a heavy or light chain of an antibody of the invention or a single chain antibody of the invention), requires construction of an expression vector containing a polynucleotide that encodes the antibody. Once a polynucleotide encoding an antibody molecule or a heavy or light chain of an antibody, or portion thereof (preferably containing the heavy or light chain variable domain), of the invention has been obtained, the vector for the production of the antibody molecule may be produced by recombinant DNA technology using techniques well known in the art. Thus, methods for preparing a protein by expressing a polynucleotide containing an antibody encoding nucleotide sequence are described herein. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing antibody coding sequences and appropriate transcriptional and translational control signals. These methods include, for example, in vitro recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and in vivo genetic recombination. The invention, thus, provides replicable vectors comprising a nucleotide sequence encoding an antibody molecule of the invention, or a heavy or light chain thereof, or a heavy or light chain variable domain, operably linked to a promoter. Such vectors may include the nucleotide sequence encoding the constant region of the antibody molecule (see, e.g., PCT Publication WO 86/05807; PCT Publication WO 89/01036; and U.S. Patent No. 5,122,464) and the variable domain of the antibody may be cloned into such a vector for expression of the entire heavy or light chain.

The expression vector is transferred to a host cell by conventional techniques and the transfected cells are then cultured by conventional techniques to produce an antibody of the invention. Thus, the invention includes host cells containing a polynucleotide encoding an antibody of the invention, or a heavy or light chain thereof, or a single chain antibody of the invention, operably linked to a heterologous promoter. In preferred embodiments for the expression of double-chained antibodies, vectors encoding both the heavy and light chains

may be co-expressed in the host cell for expression of the entire immunoglobulin molecule, as detailed below.

A variety of host-expression vector systems may be utilized to express the antibody molecules of the invention. Such host-expression systems represent vehicles by which the coding sequences of interest may be produced and subsequently purified, but also represent cells which may, when transformed or transfected with the appropriate nucleotide coding sequences, express an antibody molecule of the invention in situ. These include but are not limited to microorganisms such as bacteria (e.g., E. coli, B. subtilis) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing antibody coding sequences; yeast (e.g., Saccharomyces, Pichia) transformed with recombinant yeast expression vectors containing antibody coding sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus) containing antibody coding sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid) containing antibody coding sequences; or mammalian cell systems (e.g., COS, CHO, BHK, 293, 3T3 cells) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter). Preferably, bacterial cells such as Escherichia coli, and more preferably, eukaryotic cells, especially for the expression of whole recombinant antibody molecule, are used for the expression of a recombinant antibody molecule. For example, mammalian cells such as Chinese hamster ovary cells (CHO), in conjunction with a vector such as the major intermediate early gene promoter element from human cytomegalovirus is an effective expression system for antibodies (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)).

In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the antibody molecule being expressed. For example, when a large quantity of such a protein is to be produced, for the generation of pharmaceutical compositions of an antibody molecule, vectors which direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily purified may be desirable. Such vectors include, but are not limited, to the E. coli expression vector pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)), in which the antibody coding sequence may be ligated individually into the

vector in frame with the lac Z coding region so that a fusion protein is produced; pIN vectors (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); and the like. pGEX vectors may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption and binding to matrix glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. The pGEX vectors are designed to include thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned target gene product can be released from the GST moiety.

In an insect system, Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes. The virus grows in *Spodoptera frugiperda* cells. The antibody coding sequence may be cloned individually into non-essential regions (for example the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter).

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the antibody coding sequence of interest may be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, e.g., the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by in vitro or in vivo recombination. Insertion in a non- essential region of the viral genome (e.g., region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing the antibody molecule in infected hosts. (e.g., see Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)). Specific initiation signals may also be required for efficient translation of inserted antibody coding sequences. These signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. Furthermore, the initiation codon must be in phase with the reading frame of the desired coding sequence to ensure translation of the entire insert. These exogenous translational control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of appropriate transcription enhancer elements, transcription terminators, etc. (see Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (e.g., glycosylation) and processing (e.g., cleavage) of protein products may be important for the function of the protein. Different host cells have

characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and gene products. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein expressed. To this end, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells include but are not limited to CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, and in particular, breast cancer cell lines such as, for example, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 and T47D, and normal mammary gland cell line such as, for example, CRL7030 and Hs578Bst.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express the antibody molecule may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (e.g., promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. This method may advantageously be used to engineer cell lines which express the antibody molecule. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that interact directly or indirectly with the antibody molecule.

A number of selection systems may be used, including but not limited to the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) genes can be employed in tk-, hgprt- or aprt- cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for the following genes: dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 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); and Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215); and hygro, which confers resistance to hygromycin (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology may be routinely applied to select the desired recombinant clone, and such methods are described, for example, in Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); and in 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), which are incorporated by reference herein in their entireties.

The expression levels of an antibody molecule can be increased by vector amplification (for a review, see Bebbington 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)). When a marker in the vector system expressing antibody is amplifiable, increase in the level of inhibitor present in culture of host cell will increase the number of copies of the marker gene. Since the amplified region is associated with the antibody gene, production of the antibody will also increase (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

The host cell may be co-transfected with two expression vectors of the invention, the first vector encoding a heavy chain derived polypeptide and the second vector encoding a light chain derived polypeptide. The two vectors may contain identical selectable markers which enable equal expression of heavy and light chain polypeptides. Alternatively, a single vector may be used which encodes, and is capable of expressing, both heavy and light chain polypeptides. In such situations, the light chain should be placed before the heavy chain to avoid an excess of toxic free heavy chain (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). The coding sequences for the heavy and light chains may comprise cDNA or genomic DNA.

Once an antibody molecule of the invention has been produced by an animal, chemically synthesized, or recombinantly expressed, it may be purified by any method known in the art for purification of an immunoglobulin molecule, for example, by chromatography (e.g., ion exchange, affinity, particularly by affinity for the specific antigen

after Protein A, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for the purification of proteins. In addition, the antibodies of the present invention or fragments thereof can be fused to heterologous polypeptide sequences described herein or otherwise known in the art, to facilitate purification.

The present invention encompasses antibodies recombinantly fused or chemically conjugated (including both covalently and non-covalently conjugations) to a polypeptide (or portion thereof, preferably at least 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 or 100 amino acids of the polypeptide) of the present invention to generate fusion proteins. The fusion does not necessarily need to be direct, but may occur through linker sequences. The antibodies may be specific for antigens other than polypeptides (or portion thereof, preferably at least 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 or 100 amino acids of the polypeptide) of the present invention. For example, antibodies may be used to target the polypeptides of the present invention to particular cell types, either in vitro or in vivo, by fusing or conjugating the polypeptides of the present invention to antibodies specific for particular cell surface receptors. Antibodies fused or conjugated to the polypeptides of the present invention may also be used in in vitro immunoassays and purification methods using methods known in the art. See e.g., Harbor et al., supra, and PCT publication WO 93/21232; EP 439,095; Naramura et al., Immunol. Lett. 39:91-99 (1994); U.S. Patent 5,474,981; Gillies et al., PNAS 89:1428-1432 (1992); Fell et al., J. Immunol. 146:2446-2452(1991), which are incorporated by reference in their entireties.

The present invention further includes compositions comprising the polypeptides of the present invention fused or conjugated to antibody domains other than the variable regions. For example, the polypeptides of the present invention may be fused or conjugated to an antibody Fc region, or portion thereof. The antibody portion fused to a polypeptide of the present invention may comprise the constant region, hinge region, CH1 domain, CH2 domain, and CH3 domain or any combination of whole domains or portions thereof. The polypeptides may also be fused or conjugated to the above antibody portions to form multimers. For example, Fc portions fused to the polypeptides of the present invention can form dimers through disulfide bonding between the Fc portions. Higher multimeric forms can be made by fusing the polypeptides to portions of IgA and IgM. Methods for fusing or conjugating the polypeptides of the present invention to antibody portions are known in the art. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,336,603; 5,622,929; 5,359,046; 5,349,053; 5,447,851; 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; PCT publications WO 96/04388; WO 91/06570;

Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Zheng et al., J. Immunol. 154:5590-5600 (1995); and Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341(1992) (said references incorporated by reference in their entireties).

As discussed, supra, the polypeptides corresponding to a polypeptide, polypeptide fragment, or a variant of SEQ ID NO:Y may be fused or conjugated to the above antibody portions to increase the in vivo half life of the polypeptides or for use in immunoassays using methods known in the art. Further, the polypeptides corresponding to SEQ ID NO:Y may be fused or conjugated to the above antibody portions to facilitate purification. One reported example describes chimeric proteins consisting of the first two domains of the human CD4-polypeptide and various domains of the constant regions of the heavy or light chains of mammalian immunoglobulins. (EP 394,827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988). The polypeptides of the present invention fused or conjugated to an antibody having disulfide- linked dimeric structures (due to the IgG) may also be more efficient in binding and neutralizing other molecules, than the monomeric secreted protein or protein fragment alone. (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270:3958-3964 (1995)). In many cases, the Fc part in a fusion protein is beneficial in therapy and diagnosis, and thus can result in, for example, improved pharmacokinetic properties. (EP A 232,262). Alternatively, deleting the Fc part after the fusion protein has been expressed, detected, and purified, would be desired. For example, the Fc portion may hinder therapy and diagnosis if the fusion protein is used as an antigen for immunizations. In drug discovery, for example, human proteins, such as hIL-5, have been fused with Fc portions for the purpose of high-throughput screening assays to identify antagonists of hIL-5. (See, Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995).

Moreover, the antibodies or fragments thereof of the present invention can be fused to marker sequences, such as a peptide to facilitate purification. In preferred embodiments, the marker amino acid sequence is a hexa-histidine peptide, such as the tag provided in a pQE vector (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), among others, many of which are commercially available. As described in Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. Other peptide tags useful for purification include, but are not limited to, the "HA" tag, which corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) and the "flag" tag.

The present invention further encompasses antibodies or fragments thereof conjugated to a diagnostic or therapeutic agent. The antibodies can be used diagnostically to, for example, monitor the development or progression of a tumor as part of a clinical testing procedure to, e.g., determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, radioactive materials, positron emitting metals using various positron emission tomographics, and nonradioactive paramagnetic metal ions. The detectable substance may be coupled or conjugated either directly to the antibody (or fragment thereof) or indirectly, through an intermediate (such as, for example, a linker known in the art) using techniques known in the art. See, for example, U.S. Patent No. 4,741,900 for metal ions which can be conjugated to antibodies for use as diagnostics according to the present invention. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include 125I, 131I, 111In or 99Tc.

Further, an antibody or fragment thereof may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, e.g., a cytostatic or cytocidal agent, a therapeutic agent or a radioactive metal ion, e.g., alpha-emitters such as, for example, 213Bi. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include paclitaxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (e.g., methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (e.g., mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclothosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and

cis- dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (e.g., daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (e.g., dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (e.g., vincristine and vinblastine).

The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response, the therapeutic agent or drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, a-interferon, ß-interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator, an apoptotic agent, e.g., TNF-alpha, TNF-beta, AIM I (See, International Publication No. WO 97/33899), AIM II (See, International Publication No. WO 97/34911), Fas Ligand (Takahashi *et al., Int. Immunol.*, 6:1567-1574 (1994)), VEGI (See, International Publication No. WO 99/23105), a thrombotic agent or an anti- angiogenic agent, e.g., angiostatin or endostatin; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

Antibodies may also be attached to solid supports, which are particularly useful for immunoassays or purification of the target antigen. Such solid supports include, but are not limited to, glass, cellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinyl chloride or polypropylene.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known, see, e.g., Amon 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. 475-506 (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), and Thorpe et al.,

"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982).

Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by Segal in U.S. Patent No. 4,676,980, which is incorporated herein by reference in its entirety.

An antibody, with or without a therapeutic moiety conjugated to it, administered alone or in combination with cytotoxic factor(s) and/or cytokine(s) can be used as a therapeutic.

Immunophenotyping

The antibodies of the invention may be utilized for immunophenotyping of cell lines and biological samples. The translation product of the gene of the present invention may be useful as a cell specific marker, or more specifically as a cellular marker that is differentially expressed at various stages of differentiation and/or maturation of particular cell types. Monoclonal antibodies directed against a specific epitope, or combination of epitopes, will allow for the screening of cellular populations expressing the marker. Various techniques can be utilized using monoclonal antibodies to screen for cellular populations expressing the marker(s), and include magnetic separation using antibody-coated magnetic beads, "panning" with antibody attached to a solid matrix (i.e., plate), and flow cytometry (See, e.g., U.S. Patent 5,985,660; and Morrison *et al., Cell, 96*:737-49 (1999)).

These techniques allow for the screening of particular populations of cells, such as might be found with hematological malignancies (i.e. minimal residual disease (MRD) in acute leukemic patients) and "non-self" cells in transplantations to prevent Graft-versus-Host Disease (GVHD). Alternatively, these techniques allow for the screening of hematopoietic stem and progenitor cells capable of undergoing proliferation and/or differentiation, as might be found in human umbilical cord blood.

Assays For Antibody Binding

The antibodies of the invention may be assayed for immunospecific binding by any method known in the art. The immunoassays which can be used include but are not limited to competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots, radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, precipitin reactions, gel diffusion precipitin

reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, immunoradiometric assays, fluorescent immunoassays, protein A immunoassays, to name but a few. Such assays are routine and well known in the art (see, e.g., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, which is incorporated by reference herein in its entirety). Exemplary immunoassays are described briefly below (but are not intended by way of limitation).

Immunoprecipitation protocols generally comprise lysing a population of cells in a lysis buffer such as RIPA buffer (1% NP-40 or Triton X- 100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate at pH 7.2, 1% Trasylol) supplemented with protein phosphatase and/or protease inhibitors (e.g., EDTA, PMSF, aprotinin, sodium vanadate), adding the antibody of interest to the cell lysate, incubating for a period of time (e.g., 1-4 hours) at 4° C, adding protein A and/or protein G sepharose beads to the cell lysate, incubating for about an hour or more at 4° C., washing the beads in lysis buffer and resuspending the beads in SDS/sample buffer. The ability of the antibody of interest to immunoprecipitate a particular antigen can be assessed by, e.g., western blot analysis. One of skill in the art would be knowledgeable as to the parameters that can be modified to increase the binding of the antibody to an antigen and decrease the background (e.g., pre-clearing the cell lysate with sepharose beads). For further discussion regarding immunoprecipitation protocols see, e.g., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.16.1.

Western blot analysis generally comprises preparing protein samples, electrophoresis of the protein samples in a polyacrylamide gel (e.g., 8%- 20% SDS-PAGE depending on the molecular weight of the antigen), transferring the protein sample from the polyacrylamide gel to a membrane such as nitrocellulose, PVDF or nylon, blocking the membrane in blocking solution (e.g., PBS with 3% BSA or non-fat milk), washing the membrane in washing buffer (e.g., PBS-Tween 20), blocking the membrane with primary antibody (the antibody of interest) diluted in blocking buffer, washing the membrane in washing buffer, blocking the membrane with a secondary antibody (which recognizes the primary antibody, e.g., an anti-human antibody) conjugated to an enzymatic substrate (e.g., horseradish peroxidase or alkaline phosphatase) or radioactive molecule (e.g., 32P or 125I) diluted in blocking buffer, washing the membrane in wash buffer, and detecting the presence of the antigen. One of skill in the art would be knowledgeable as to the parameters that can be modified to increase the

signal detected and to reduce the background noise. For further discussion regarding western blot protocols see, e.g., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.8.1.

ELISAs comprise preparing antigen, coating the well of a 96 well microtiter plate with the antigen, adding the antibody of interest conjugated to a detectable compound such as an enzymatic substrate (e.g., horseradish peroxidase or alkaline phosphatase) to the well and incubating for a period of time, and detecting the presence of the antigen. In ELISAs the antibody of interest does not have to be conjugated to a detectable compound; instead, a second antibody (which recognizes the antibody of interest) conjugated to a detectable compound may be added to the well. Further, instead of coating the well with the antigen, the antibody may be coated to the well. In this case, a second antibody conjugated to a detectable compound may be added following the addition of the antigen of interest to the coated well. One of skill in the art would be knowledgeable as to the parameters that can be modified to increase the signal detected as well as other variations of ELISAs known in the art. For further discussion regarding ELISAs see, e.g., Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1.

The binding affinity of an antibody to an antigen and the off-rate of an antibody-antigen interaction can be determined by competitive binding assays. One example of a competitive binding assay is a radioimmunoassay comprising the incubation of labeled antigen (e.g., 3H or 125I) with the antibody of interest in the presence of increasing amounts of unlabeled antigen, and the detection of the antibody bound to the labeled antigen. The affinity of the antibody of interest for a particular antigen and the binding off-rates can be determined from the data by scatchard plot analysis. Competition with a second antibody can also be determined using radioimmunoassays. In this case, the antigen is incubated with antibody of interest conjugated to a labeled compound (e.g., 3H or 125I) in the presence of increasing amounts of an unlabeled second antibody.

Therapeutic Uses

The present invention is further directed to antibody-based therapies which involve administering antibodies of the invention to an animal, preferably a mammal, and most preferably a human, patient for treating one or more of the disclosed diseases, disorders, or conditions. Therapeutic compounds of the invention include, but are not limited to,

antibodies of the invention (including fragments, analogs and derivatives thereof as described herein) and nucleic acids encoding antibodies of the invention (including fragments, analogs and derivatives thereof and anti-idiotypic antibodies as described herein). The antibodies of the invention can be used to treat, inhibit or prevent diseases, disorders or conditions associated with aberrant expression and/or activity of a polypeptide of the invention, including, but not limited to, any one or more of the diseases, disorders, or conditions described herein. The treatment and/or prevention of diseases, disorders, or conditions associated with aberrant expression and/or activity of a polypeptide of the invention includes, but is not limited to, alleviating symptoms associated with those diseases, disorders or conditions. Antibodies of the invention may be provided in pharmaceutically acceptable compositions as known in the art or as described herein.

A summary of the ways in which the antibodies of the present invention may be used therapeutically includes binding polynucleotides or polypeptides of the present invention locally or systemically in the body or by direct cytotoxicity of the antibody, e.g. as mediated by complement (CDC) or by effector cells (ADCC). Some of these approaches are described in more detail below. Armed with the teachings provided herein, one of ordinary skill in the art will know how to use the antibodies of the present invention for diagnostic, monitoring or therapeutic purposes without undue experimentation.

The antibodies of this invention may be advantageously utilized in combination with other monoclonal or chimeric antibodies, or with lymphokines or hematopoietic growth factors (such as, e.g., IL-2, IL-3 and IL-7), for example, which serve to increase the number or activity of effector cells which interact with the antibodies.

The antibodies of the invention may be administered alone or in combination with other types of treatments (e.g., radiation therapy, chemotherapy, hormonal therapy, immunotherapy and anti-tumor agents). Generally, administration of products of a species origin or species reactivity (in the case of antibodies) that is the same species as that of the patient is preferred. Thus, in a preferred embodiment, human antibodies, fragments derivatives, analogs, or nucleic acids, are administered to a human patient for therapy or prophylaxis.

It is preferred to use high affinity and/or potent in vivo inhibiting and/or neutralizing antibodies against polypeptides or polynucleotides of the present invention, fragments or regions thereof, for both immunoassays directed to and therapy of disorders related to

polynucleotides or polypeptides, including fragments thereof, of the present invention. Such antibodies, fragments, or regions, will preferably have an affinity for polynucleotides or polypeptides of the invention, including fragments thereof. Preferred binding affinities include those with a dissociation constant or Kd less than 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 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, 10^{-8} M, 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, and 10^{-15} M.

Gene Therapy

In a specific embodiment, nucleic acids comprising sequences encoding antibodies or functional derivatives thereof, are administered to treat, inhibit or prevent a disease or disorder associated with aberrant expression and/or activity of a polypeptide of the invention, by way of gene therapy. Gene therapy refers to therapy performed by the administration to a subject of an expressed or expressible nucleic acid. In this embodiment of the invention, the nucleic acids produce their encoded protein that mediates a therapeutic effect.

Any of the methods for gene therapy available in the art can be used according to the present invention. Exemplary methods are described below.

For general reviews of the methods of gene therapy, see Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIBTECH 11(5):155-215 (1993). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); and Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

In a preferred aspect, the compound comprises nucleic acid sequences encoding an antibody, said nucleic acid sequences being part of expression vectors that express the antibody or fragments or chimeric proteins or heavy or light chains thereof in a suitable host. In particular, such nucleic acid sequences have promoters operably linked to the antibody coding region, said promoter being inducible or constitutive, and, optionally, tissue-specific. In another particular embodiment, nucleic acid molecules are used in which the antibody coding sequences and any other desired sequences are flanked by regions that promote

homologous recombination at a desired site in the genome, thus providing for intrachromosomal expression of the antibody encoding nucleic acids (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989). In specific embodiments, the expressed antibody molecule is a single chain antibody; alternatively, the nucleic acid sequences include sequences encoding both the heavy and light chains, or fragments thereof, of the antibody.

Delivery of the nucleic acids into a patient may be either direct, in which case the patient is directly exposed to the nucleic acid or nucleic acid- carrying vectors, or indirect, in which case, cells are first transformed with the nucleic acids in vitro, then transplanted into the patient. These two approaches are known, respectively, as in vivo or ex vivo gene therapy.

In a specific embodiment, the nucleic acid sequences are directly administered in vivo, where it is expressed to produce the encoded product. This can be accomplished by any of numerous methods known in the art, e.g., by constructing them as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that they become intracellular, e.g., by infection using defective or attenuated retrovirals or other viral vectors (see U.S. Patent No. 4,980,286), or by direct injection of naked DNA, or by use of microparticle bombardment (e.g., a gene gun; Biolistic, Dupont), or coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, encapsulation in liposomes, microparticles, or microcapsules, or by administering them in linkage to a peptide which is known to enter the nucleus, by administering it in linkage to a ligand subject to receptor-mediated endocytosis (see, e.g., Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)) (which can be used to target cell types specifically expressing the receptors), etc. In another embodiment, nucleic acid-ligand complexes can be formed in which the ligand comprises a fusogenic viral peptide to disrupt endosomes, allowing the nucleic acid to avoid lysosomal degradation. In yet another embodiment, the nucleic acid can be targeted in vivo for cell specific uptake and expression, by targeting a specific receptor (see, e.g., PCT Publications WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188, WO 93/20221). Alternatively, the nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)).

In a specific embodiment, viral vectors that contains nucleic acid sequences encoding an antibody of the invention are used. For example, a retroviral vector can be used (see Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). These retroviral vectors contain the components necessary for the correct packaging of the viral genome and integration into the host cell DNA. The nucleic acid sequences encoding the antibody to be used in gene therapy are cloned into one or more vectors, which facilitates delivery of the gene into a patient. More detail about retroviral vectors can be found in Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), which describes the use of a retroviral vector to deliver the mdr1 gene to hematopoietic stem cells in order to make the stem cells more resistant to chemotherapy. Other references illustrating the use of retroviral vectors in gene therapy are: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); and Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993).

Adenoviruses are other viral vectors that can be used in gene therapy. Adenoviruses are especially attractive vehicles for delivering genes to respiratory epithelia. Adenoviruses naturally infect respiratory epithelia where they cause a mild disease. Other targets for adenovirus-based delivery systems are liver, the central nervous system, endothelial cells, and muscle. Adenoviruses have the advantage of being capable of infecting non-dividing cells. Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) present a review of adenovirus-based gene therapy. Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) demonstrated the use of adenovirus vectors to transfer genes to the respiratory epithelia of rhesus monkeys. Other instances of the use of adenoviruses in gene therapy can be found in Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143- 155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); PCT Publication WO94/12649; and Wang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995). In a preferred embodiment, adenovirus vectors are used.

Adeno-associated virus (AAV) has also been proposed for use in gene therapy (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); U.S. Patent No. 5,436,146).

Another approach to gene therapy involves transferring a gene to cells in tissue culture by such methods as electroporation, lipofection, calcium phosphate mediated transfection, or viral infection. Usually, the method of transfer includes the transfer of a selectable marker to the cells. The cells are then placed under selection to isolate those cells

that have taken up and are expressing the transferred gene. Those cells are then delivered to a patient.

In this embodiment, the nucleic acid is introduced into a cell prior to administration in vivo of the resulting recombinant cell. Such introduction can be carried out by any method known in the art, including but not limited to transfection, electroporation, microinjection, infection with a viral or bacteriophage vector containing the nucleic acid sequences, cell fusion, chromosome-mediated gene transfer, microcell-mediated gene transfer, spheroplast fusion, etc. Numerous techniques are known in the art for the introduction of foreign genes into cells (see, e.g., Loeffler and Behr, Meth. Enzymol. 217:599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92m (1985) and may be used in accordance with the present invention, provided that the necessary developmental and physiological functions of the recipient cells are not disrupted. The technique should provide for the stable transfer of the nucleic acid to the cell, so that the nucleic acid is expressible by the cell and preferably heritable and expressible by its cell progeny.

The resulting recombinant cells can be delivered to a patient by various methods known in the art. Recombinant blood cells (e.g., hematopoietic stem or progenitor cells) are preferably administered intravenously. The amount of cells envisioned for use depends on the desired effect, patient state, etc., and can be determined by one skilled in the art.

Cells into which a nucleic acid can be introduced for purposes of gene therapy encompass any desired, available cell type, and include but are not limited to epithelial cells, endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, muscle cells, hepatocytes; blood cells such as T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, megakaryocytes, granulocytes; various stem or progenitor cells, in particular hematopoietic stem or progenitor cells, e.g., as obtained from bone marrow, umbilical cord blood, peripheral blood, fetal liver, etc.

In a preferred embodiment, the cell used for gene therapy is autologous to the patient.

In an embodiment in which recombinant cells are used in gene therapy, nucleic acid sequences encoding an antibody are introduced into the cells such that they are expressible by the cells or their progeny, and the recombinant cells are then administered in vivo for therapeutic effect. In a specific embodiment, stem or progenitor cells are used. Any stem and/or progenitor cells which can be isolated and maintained in vitro can potentially be used in accordance with this embodiment of the present invention (see e.g. PCT Publication WO

94/08598; Stemple and Anderson, Cell 71:973-985 (1992); Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980); and Pittelkow and Scott, Mayo Clinic Proc. 61:771 (1986)).

In a specific embodiment, the nucleic acid to be introduced for purposes of gene therapy comprises an inducible promoter operably linked to the coding region, such that expression of the nucleic acid is controllable by controlling the presence or absence of the appropriate inducer of transcription. Demonstration of Therapeutic or Prophylactic Activity

The compounds or pharmaceutical compositions of the invention are preferably tested in vitro, and then in vivo for the desired therapeutic or prophylactic activity, prior to use in humans. For example, in vitro assays to demonstrate the therapeutic or prophylactic utility of a compound or pharmaceutical composition include, the effect of a compound on a cell line or a patient tissue sample. The effect of the compound or composition on the cell line and/or tissue sample can be determined utilizing techniques known to those of skill in the art including, but not limited to, rosette formation assays and cell lysis assays. In accordance with the invention, in vitro assays which can be used to determine whether administration of a specific compound is indicated, include in vitro cell culture assays in which a patient tissue sample is grown in culture, and exposed to or otherwise administered a compound, and the effect of such compound upon the tissue sample is observed.

Therapeutic/Prophylactic Administration and Composition

The invention provides methods of treatment, inhibition and prophylaxis by administration to a subject of an effective amount of a compound or pharmaceutical composition of the invention, preferably a polypeptide or antibody of the invention. In a preferred aspect, the compound is substantially purified (e.g., substantially free from substances that limit its effect or produce undesired side-effects). The subject is preferably an animal, including but not limited to animals such as cows, pigs, horses, chickens, cats, dogs, etc., and is preferably a mammal, and most preferably human.

Formulations and methods of administration that can be employed when the compound comprises a nucleic acid or an immunoglobulin are described above; additional appropriate formulations and routes of administration can be selected from among those described herein below.

Various delivery systems are known and can be used to administer a compound of the invention, e.g., encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules, recombinant cells

capable of expressing the compound, receptor-mediated endocytosis (see, e.g., Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construction of a nucleic acid as part of a retroviral or other vector, etc. Methods of introduction include but are not limited to intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, intranasal, epidural, and oral routes. The compounds or compositions may be administered by any convenient route, for example by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (e.g., oral mucosa, rectal and intestinal mucosa, etc.) and may be administered together with other biologically active agents. Administration can be systemic or local. In addition, it may be desirable to introduce the pharmaceutical compounds or compositions of the invention into the central nervous system by any suitable route, including intraventricular and intrathecal injection; intraventricular injection may be facilitated by an intraventricular catheter, for example, attached to a reservoir, such as an Ommaya reservoir. Pulmonary administration can also be employed, e.g., by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent.

In a specific embodiment, it may be desirable to administer the pharmaceutical compounds or compositions of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion during surgery, topical application, e.g., in conjunction with a wound dressing after surgery, by injection, by means of a catheter, by means of a suppository, or by means of an implant, said implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as sialastic membranes, or fibers. Preferably, when administering a protein, including an antibody, of the invention, care must be taken to use materials to which the protein does not absorb.

In another embodiment, the compound or composition can be delivered in a vesicle, in particular a liposome (see 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, ibid., pp. 317-327; see generally ibid.)

In yet another embodiment, the compound or composition can be delivered in a controlled release system. In one embodiment, a pump may be used (see Langer, supra; 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)). In another embodiment, polymeric materials can be used (see 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); see also Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J.Neurosurg. 71:105 (1989)). In yet another embodiment, a controlled release system can be placed in proximity of the therapeutic target, i.e., the brain, thus requiring only a fraction of the systemic dose (see, e.g., Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Other controlled release systems are discussed in the review by Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

In a specific embodiment where the compound of the invention is a nucleic acid encoding a protein, the nucleic acid can be administered in vivo to promote expression of its encoded protein, by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes intracellular, e.g., by use of a retroviral vector (see U.S. Patent No. 4,980,286), or by direct injection, or by use of microparticle bombardment (e.g., a gene gun; Biolistic, Dupont), or coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, or by administering it in linkage to a homeobox- like peptide which is known to enter the nucleus (see e.g., Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991)), etc. Alternatively, a nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination.

The present invention also provides pharmaceutical compositions. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of a compound, and a pharmaceutically acceptable carrier. In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients include starch,

glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules, powders, sustained-release formulations and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the compound, preferably in purified form, together with a suitable amount of carrier so as to provide the form for proper administration to the patient. The formulation should suit the mode of administration.

In a preferred embodiment, the composition is formulated in accordance with routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration to human beings. Typically, compositions for intravenous administration are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a solubilizing agent and a local anesthetic such as lignocaine to ease pain at the site of the injection. Generally, the ingredients are supplied either separately or mixed together in unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water free concentrate in a hermetically sealed container such as an ampoule or sachette indicating the quantity of active agent. Where the composition is to be administered by infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the composition is administered by injection, an ampoule of sterile water for injection or saline can be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration.

The compounds of the invention can be formulated as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include those formed with anions such as those derived from hydrochloric, phosphoric, acetic, oxalic, tartaric acids, etc., and those formed with cations such as those derived from sodium, potassium, ammonium, calcium, ferric hydroxides, isopropylamine, triethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, etc.

The amount of the compound of the invention which will be effective in the treatment, inhibition and prevention of a disease or disorder associated with aberrant expression and/or activity of a polypeptide of the invention can be determined by standard clinical techniques. In addition, in vitro assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and the seriousness of the disease or disorder, and should be decided according to the judgment of the practitioner and each patient's circumstances. Effective doses may be extrapolated from dose-response curves derived from in vitro or animal model test systems.

For antibodies, the dosage administered to a patient is typically 0.1 mg/kg to 100 mg/kg of the patient's body weight. Preferably, the dosage administered to a patient is between 0.1 mg/kg and 20 mg/kg of the patient's body weight, more preferably 1 mg/kg to 10 mg/kg of the patient's body weight. Generally, human antibodies have a longer half-life within the human body than antibodies from other species due to the immune response to the foreign polypeptides. Thus, lower dosages of human antibodies and less frequent administration is often possible. Further, the dosage and frequency of administration of antibodies of the invention may be reduced by enhancing uptake and tissue penetration (e.g., into the brain) of the antibodies by modifications such as, for example, lipidation.

The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention. Optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration.

Diagnosis and Imaging

Labeled antibodies, and derivatives and analogs thereof, which specifically bind to a polypeptide of interest can be used for diagnostic purposes to detect, diagnose, or monitor diseases, disorders, and/or conditions associated with the aberrant expression and/or activity of a polypeptide of the invention. The invention provides for the detection of aberrant expression of a polypeptide of interest, comprising (a) assaying the expression of the polypeptide of interest in cells or body fluid of an individual using one or more antibodies

specific to the polypeptide interest and (b) comparing the level of gene expression with a standard gene expression level, whereby an increase or decrease in the assayed polypeptide gene expression level compared to the standard expression level is indicative of aberrant expression.

The invention provides a diagnostic assay for diagnosing a disorder, comprising (a) assaying the expression of the polypeptide of interest in cells or body fluid of an individual using one or more antibodies specific to the polypeptide interest and (b) comparing the level of gene expression with a standard gene expression level, whereby an increase or decrease in the assayed polypeptide gene expression level compared to the standard expression level is indicative of a particular disorder. With respect to cancer, the presence of a relatively high amount of transcript in biopsied tissue from an individual may indicate a predisposition for the development of the disease, or may provide a means for detecting the disease prior to the appearance of actual clinical symptoms. A more definitive diagnosis of this type may allow health professionals to employ preventative measures or aggressive treatment earlier thereby preventing the development or further progression of the cancer.

Antibodies of the invention can be used to assay protein levels in a biological sample using classical immunohistological methods known to those of skill in the art (e.g., see Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell . Biol. 105:3087-3096 (1987)). Other antibody-based methods useful for detecting protein gene expression include immunoassays, such as the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the radioimmunoassay (RIA). Suitable antibody assay labels are known in the art and include enzyme labels, such as, glucose oxidase; radioisotopes, such as iodine (125I, 121I), carbon (14C), sulfur (35S), tritium (3H), indium (112In), and technetium (99Tc); luminescent labels, such as luminol; and fluorescent labels, such as fluorescein and rhodamine, and biotin.

One aspect of the invention is the detection and diagnosis of a disease or disorder associated with aberrant expression of a polypeptide of interest in an animal, preferably a mammal and most preferably a human. In one embodiment, diagnosis comprises: a) administering (for example, parenterally, subcutaneously, or intraperitoneally) to a subject an effective amount of a labeled molecule which specifically binds to the polypeptide of interest; b) waiting for a time interval following the administering for permitting the labeled molecule to preferentially concentrate at sites in the subject where the polypeptide is expressed (and for unbound labeled molecule to be cleared to background level); c)

determining background level; and d) detecting the labeled molecule in the subject, such that detection of labeled molecule above the background level indicates that the subject has a particular disease or disorder associated with aberrant expression of the polypeptide of interest. Background level can be determined by various methods including, comparing the amount of labeled molecule detected to a standard value previously determined for a particular system.

It will be understood in the art that the size of the subject and the imaging system used will determine the quantity of imaging moiety needed to produce diagnostic images. In the case of a radioisotope moiety, for a human subject, the quantity of radioactivity injected will normally range from about 5 to 20 millicuries of 99mTc. The labeled antibody or antibody fragment will then preferentially accumulate at the location of cells which contain the specific protein. In vivo tumor imaging is described in 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).

Depending on several variables, including the type of label used and the mode of administration, the time interval following the administration for permitting the labeled molecule to preferentially concentrate at sites in the subject and for unbound labeled molecule to be cleared to background level is 6 to 48 hours or 6 to 24 hours or 6 to 12 hours. In another embodiment the time interval following administration is 5 to 20 days or 5 to 10 days.

In an embodiment, monitoring of the disease or disorder is carried out by repeating the method for diagnosing the disease or disease, for example, one month after initial diagnosis, six months after initial diagnosis, one year after initial diagnosis, etc.

Presence of the labeled molecule can be detected in the patient using methods known in the art for in vivo scanning. These methods depend upon the type of label used. Skilled artisans will be able to determine the appropriate method for detecting a particular label. Methods and devices that may be used in the diagnostic methods of the invention include, but are not limited to, computed tomography (CT), whole body scan such as position emission tomography (PET), magnetic resonance imaging (MRI), and sonography.

In a specific embodiment, the molecule is labeled with a radioisotope and is detected in the patient using a radiation responsive surgical instrument (Thurston et al., U.S. Patent

No. 5,441,050). In another embodiment, the molecule is labeled with a fluorescent compound and is detected in the patient using a fluorescence responsive scanning instrument. In another embodiment, the molecule is labeled with a positron emitting metal and is detected in the patent using positron emission-tomography. In yet another embodiment, the molecule is labeled with a paramagnetic label and is detected in a patient using magnetic resonance imaging (MRI).

Kits

The present invention provides kits that can be used in the above methods. In one embodiment, a kit comprises an antibody of the invention, preferably a purified antibody, in one or more containers. In a specific embodiment, the kits of the present invention contain a substantially isolated polypeptide comprising an epitope which is specifically immunoreactive with an antibody included in the kit. Preferably, the kits of the present invention further comprise a control antibody which does not react with the polypeptide of interest. In another specific embodiment, the kits of the present invention contain a means for detecting the binding of an antibody to a polypeptide of interest (e.g., the antibody may be conjugated to a detectable substrate such as a fluorescent compound, an enzymatic substrate, a radioactive compound or a luminescent compound, or a second antibody which recognizes the first antibody may be conjugated to a detectable substrate).

In another specific embodiment of the present invention, the kit is a diagnostic kit for use in screening serum containing antibodies specific against proliferative and/or cancerous polynucleotides and polypeptides. Such a kit may include a control antibody that does not react with the polypeptide of interest. Such a kit may include a substantially isolated polypeptide antigen comprising an epitope which is specifically immunoreactive with at least one anti-polypeptide antigen antibody. Further, such a kit includes means for detecting the binding of said antibody to the antigen (e.g., the antibody may be conjugated to a fluorescent compound such as fluorescein or rhodamine which can be detected by flow cytometry). In specific embodiments, the kit may include a recombinantly produced or chemically synthesized polypeptide antigen. The polypeptide antigen of the kit may also be attached to a solid support.

In a more specific embodiment the detecting means of the above-described kit includes a solid support to which said polypeptide antigen is attached. Such a kit may also

include a non-attached reporter-labeled anti-human antibody. In this embodiment, binding of the antibody to the polypeptide antigen can be detected by binding of the said reporter-labeled antibody.

In an additional embodiment, the invention includes a diagnostic kit for use in screening serum containing antigens of the polypeptide of the invention. The diagnostic kit includes a substantially isolated antibody specifically immunoreactive with polypeptide or polynucleotide antigens, and means for detecting the binding of the polynucleotide or polypeptide antigen to the antibody. In one embodiment, the antibody is attached to a solid support. In a specific embodiment, the antibody may be a monoclonal antibody. The detecting means of the kit may include a second, labeled monoclonal antibody. Alternatively, or in addition, the detecting means may include a labeled, competing antigen.

In one diagnostic configuration, test serum is reacted with a solid phase reagent having a surface-bound antigen obtained by the methods of the present invention. After binding with specific antigen antibody to the reagent and removing unbound serum components by washing, the reagent is reacted with reporter-labeled anti-human antibody to bind reporter to the reagent in proportion to the amount of bound anti-antigen antibody on the solid support. The reagent is again washed to remove unbound labeled antibody, and the amount of reporter associated with the reagent is determined. Typically, the reporter is an enzyme which is detected by incubating the solid phase in the presence of a suitable fluorometric, luminescent or colorimetric substrate (Sigma, St. Louis, MO).

The solid surface reagent in the above assay is prepared by known techniques for attaching protein material to solid support material, such as polymeric beads, dip sticks, 96-well plate or filter material. These attachment methods generally include non-specific adsorption of the protein to the support or covalent attachment of the protein, typically through a free amine group, to a chemically reactive group on the solid support, such as an activated carboxyl, hydroxyl, or aldehyde group. Alternatively, streptavidin coated plates can be used in conjunction with biotinylated antigen(s).

Thus, the invention provides an assay system or kit for carrying out this diagnostic method. The kit generally includes a support with surface- bound recombinant antigens, and a reporter-labeled anti-human antibody for detecting surface-bound anti-antigen antibody.

Uses of the Polynucleotides

Each of the polynucleotides identified herein can be used in numerous ways as reagents. The following description should be considered exemplary and utilizes known techniques.

The polynucleotides of the present invention are useful for chromosome identification. There exists an ongoing need to identify new chromosome markers, since few chromosome marking reagents, based on actual sequence data (repeat polymorphisms), are presently available. Each sequence is specifically targeted to and can hybridize with a particular location on an individual human chromosome, thus each polynucleotide of the present invention can routinely be used as a chromosome marker using techniques known in the art.

Briefly, sequences can be mapped to chromosomes by preparing PCR primers (preferably at least 15 bp (e.g., 15-25 bp) from the sequences shown in SEQ ID NO:X. Primers can optionally be selected using computer analysis so that primers do not span more than one predicted exon in the genomic DNA. These primers are then used for PCR screening of somatic cell hybrids containing individual human chromosomes. Only those hybrids containing the human gene corresponding to SEQ ID NO:X will yield an amplified fragment.

Similarly, somatic hybrids provide a rapid method of PCR mapping the polynucleotides to particular chromosomes. Three or more clones can be assigned per day using a single thermal cycler. Moreover, sublocalization of the polynucleotides can be achieved with panels of specific chromosome fragments. Other gene mapping strategies that can be used include in situ hybridization, prescreening with labeled flow-sorted chromosomes, preselection by hybridization to construct chromosome specific-cDNA libraries, and computer mapping techniques (See, e.g., Shuler, Trends Biotechnol 16:456-459 (1998) which is hereby incorporated by reference in its entirety).

Precise chromosomal location of the polynucleotides can also be achieved using fluorescence in situ hybridization (FISH) of a metaphase chromosomal spread. This technique uses polynucleotides as short as 500 or 600 bases; however, polynucleotides 2,000-4,000 bp are preferred. For a review of this technique, see Verma et al., "Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques," Pergamon Press, New York (1988).

For chromosome mapping, the polynucleotides can be used individually (to mark a single chromosome or a single site on that chromosome) or in panels (for marking multiple sites and/or multiple chromosomes).

Thus, the present invention also provides a method for chromosomal localization which involves (a) preparing PCR primers from the polynucleotide sequences in Table 1 and SEQ ID NO:X and (b) screening somatic cell hybrids containing individual chromosomes.

The polynucleotides of the present invention would likewise be useful for radiation hybrid mapping, HAPPY mapping, and long range restriction mapping. For a review of these techniques and others known in the art, see, e.g. Dear, "Genome Mapping: A Practical Approach," IRL Press at Oxford University Press, London (1997); Aydin, J. Mol. Med. 77:691-694 (1999); Hacia et al., Mol. Psychiatry 3:483-492 (1998); Herrick et al., Chromosome Res. 7:409-423 (1999); Hamilton et al., Methods Cell Biol. 62:265-280 (2000); and/or Ott, J. Hered. 90:68-70 (1999) each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

Once a polynucleotide has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the polynucleotide can be used in linkage analysis. Linkage analysis establishes coinheritance between a chromosomal location and presentation of a particular disease. (Disease mapping data are found, for example, in V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (available on line through Johns Hopkins University Welch Medical Library).) Assuming 1 megabase mapping resolution and one gene per 20 kb, a cDNA precisely localized to a chromosomal region associated with the disease could be one of 50-500 potential causative genes.

Thus, once coinheritance is established, differences in a polynucleotide of the invention and the corresponding gene between affected and unaffected individuals can be examined. First, visible structural alterations in the chromosomes, such as deletions or translocations, are examined in chromosome spreads or by PCR. If no structural alterations exist, the presence of point mutations are ascertained. Mutations observed in some or all affected individuals, but not in normal individuals, indicates that the mutation may cause the disease. However, complete sequencing of the polypeptide and the corresponding gene from several normal individuals is required to distinguish the mutation from a polymorphism. If a new polymorphism is identified, this polymorphic polypeptide can be used for further linkage analysis.

Furthermore, increased or decreased expression of the gene in affected individuals as compared to unaffected individuals can be assessed using the polynucleotides of the invention. Any of these alterations (altered expression, chromosomal rearrangement, or mutation) can be used as a diagnostic or prognostic marker.

Thus, the invention also provides a diagnostic method useful during diagnosis of a disorder, involving measuring the expression level of polynucleotides of the present invention in cells or body fluid from an individual and comparing the measured gene expression level with a standard level of polynucleotide expression level, whereby an increase or decrease in the gene expression level compared to the standard is indicative of a disorder.

In still another embodiment, the invention includes a kit for analyzing samples for the presence of proliferative and/or cancerous polynucleotides derived from a test subject. In a general embodiment, the kit includes at least one polynucleotide probe containing a nucleotide sequence that will specifically hybridize with a polynucleotide of the invention and a suitable container. In a specific embodiment, the kit includes two polynucleotide probes defining an internal region of the polynucleotide of the invention, where each probe has one strand containing a 31'mer-end internal to the region. In a further embodiment, the probes may be useful as primers for polymerase chain reaction amplification.

Where a diagnosis of a related disorder, including, for example, diagnosis of a tumor, has already been made according to conventional methods, the present invention is useful as a prognostic indicator, whereby patients exhibiting enhanced or depressed polynucleotide of the invention expression will experience a worse clinical outcome relative to patients expressing the gene at a level nearer the standard level.

By "measuring the expression level of polynucleotides of the invention" is intended qualitatively or quantitatively measuring or estimating the level of the polypeptide of the invention or the level of the mRNA encoding the polypeptide of the invention in a first biological sample either directly (e.g., by determining or estimating absolute protein level or mRNA level) or relatively (e.g., by comparing to the polypeptide level or mRNA level in a second biological sample). Preferably, the polypeptide level or mRNA level in the first biological sample is measured or estimated and compared to a standard polypeptide level or mRNA level, the standard being taken from a second biological sample obtained from an individual not having the related disorder or being determined by averaging levels from a population of individuals not having a related disorder. As will be appreciated in the art,

once a standard polypeptide level or mRNA level is known, it can be used repeatedly as a standard for comparison.

By "biological sample" is intended any biological sample obtained from an individual, body fluid, cell line, tissue culture, or other source which contains polypeptide of the present invention or the corresponding mRNA. As indicated, biological samples include body fluids (such as semen, lymph, sera, plasma, urine, synovial fluid and spinal fluid) which contain the polypeptide of the present invention, and tissue sources found to express the polypeptide of the present invention. Methods for obtaining tissue biopsies and body fluids from mammals are well known in the art. Where the biological sample is to include mRNA, a tissue biopsy is the preferred source.

The method(s) provided above may preferrably be applied in a diagnostic method and/or kits in which polynucleotides and/or polypeptides of the invention are attached to a solid support. In one exemplary method, the support may be a "gene chip" or a "biological chip" as described in US Patents 5,837,832, 5,874,219, and 5,856,174. Further, such a gene chip with polynucleotides of the invention attached may be used to identify polymorphisms between the isolated polynucleotide sequences of the invention, with polynucleotides isolated from a test subject. The knowledge of such polymorphisms (i.e. their location, as well as, their existence) would be beneficial in identifying disease loci for many disorders, such as for example, in neural disorders, immune system disorders, muscular disorders, reproductive disorders, gastrointestinal disorders, pulmonary disorders, cardiovascular disorders, renal disorders, proliferative disorders, and/or cancerous diseases and conditions. Such a method is described in US Patents 5,858,659 and 5,856,104. The US Patents referenced supra are hereby incorporated by reference in their entirety herein.

The present invention encompasses polynucleotides of the present invention that are chemically synthesized, or reproduced as peptide nucleic acids (PNA), or according to other methods known in the art. The use of PNAs would serve as the preferred form if the polynucleotides of the invention are incorporated onto a solid support, or gene chip. For the purposes of the present invention, a peptide nucleic acid (PNA) is a polyamide type of DNA analog and the monomeric units for adenine, guanine, thymine and cytosine are available commercially (Perceptive Biosystems). Certain components of DNA, such as phosphorus, phosphorus oxides, or deoxyribose derivatives, are not present in PNAs. As disclosed by P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, Science 254, 1497 (1991); and M.

Egholm, O. Buchardt, L.Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, and P. E. Nielsen, Nature 365, 666 (1993), PNAs bind specifically and tightly to complementary DNA strands and are not degraded by nucleases. In fact, PNA binds more strongly to DNA than DNA itself does. This is probably because there is no electrostatic repulsion between the two strands, and also the polyamide backbone is more flexible. Because of this, PNA/DNA duplexes bind under a wider range of stringency conditions than DNA/DNA duplexes, making it easier to perform multiplex hybridization. Smaller probes can be used than with DNA due to the strong binding. In addition, it is more likely that single base mismatches can be determined with PNA/DNA hybridization because a single mismatch in a PNA/DNA 15-mer lowers the melting point (T.sub.m) by 8°-20° C, vs. 4°-16° C for the DNA/DNA 15-mer duplex. Also, the absence of charge groups in PNA means that hybridization can be done at low ionic strengths and reduce possible interference by salt during the analysis.

The present invention have uses which include, but are not limited to, detecting cancer in mammals. In particular the invention is useful during diagnosis of pathological cell proliferative neoplasias which include, but are not limited to: acute myelogenous leukemias including acute monocytic leukemia, acute myeloblastic leukemia, acute promyelocytic leukemia, acute myelomonocytic leukemia, acute erythroleukemia, acute megakaryocytic leukemia, and acute undifferentiated leukemia, etc.; and chronic myelogenous leukemias including chronic myelomonocytic leukemia, chronic granulocytic leukemia, etc. Preferred mammals include monkeys, apes, cats, dogs, cows, pigs, horses, rabbits and humans. Particularly preferred are humans.

Pathological cell proliferative disorders are often associated with inappropriate activation of proto-oncogenes. (Gelmann, E. P. et al., "The Etiology of Acute Leukemia: Molecular Genetics and Viral Oncology," in Neoplastic Diseases of the Blood, Vol 1., Wiernik, P. H. et al. eds., 161-182 (1985)). Neoplasias are now believed to result from the qualitative alteration of a normal cellular gene product, or from the quantitative modification of gene expression by insertion into the chromosome of a viral sequence, by chromosomal translocation of a gene to a more actively transcribed region, or by some other mechanism. (Gelmann et al., supra) It is likely that mutated or altered expression of specific genes is involved in the pathogenesis of some leukemias, among other tissues and cell types. (Gelmann et al., supra) Indeed, the human counterparts of the oncogenes involved in some

animal neoplasias have been amplified or translocated in some cases of human leukemia and carcinoma. (Gelmann et al., supra)

For example, c-myc expression is highly amplified in the non-lymphocytic leukemia cell line HL-60. When HL-60 cells are chemically induced to stop proliferation, the level of c-myc is found to be downregulated. (International Publication Number WO 91/15580). However, it has been shown that exposure of HL-60 cells to a DNA construct that is complementary to the 5' end of c-myc or c-myb blocks translation of the corresponding mRNAs which downregulates expression of the c-myc or c-myb proteins and causes arrest of cell proliferation and differentiation of the treated cells. (International Publication Number WO 91/15580; Wickstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:1028 (1988); Anfossi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3379 (1989)). However, the skilled artisan would appreciate the present invention's usefulness is not be limited to treatment of proliferative disorders of hematopoietic cells and tissues, in light of the numerous cells and cell types of varying origins which are known to exhibit proliferative phenotypes.

In addition to the foregoing, a polynucleotide of the present invention can be used to control gene expression through triple helix formation or through antisense DNA or RNA. Antisense techniques are discussed, for example, in Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Triple helix formation is discussed in, for instance Lee et al., Nucleic Acids Research 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241: 456 (1988); and Dervan et al., Science 251: 1360 (1991). Both methods rely on binding of the polynucleotide to a complementary DNA or RNA. For these techniques, preferred polynucleotides are usually oligonucleotides 20 to 40 bases in length and complementary to either the region of the gene involved in transcription (triple helix - see Lee et al., Nucl. Acids Res. 6:3073 (1979); Cooney et al., Science 241:456 (1988); and Dervan et al., Science 251:1360 (1991)) or to the mRNA itself (antisense - Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxy-nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988).) Triple helix formation optimally results in a shut-off of RNA transcription from DNA, while antisense RNA hybridization blocks translation of an mRNA molecule into polypeptide. The oligonucleotide described above can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed in vivo to inhibit production of polypeptide of the present invention antigens. Both techniques are effective in model systems, and the information disclosed herein can be used

to design antisense or triple helix polynucleotides in an effort to treat disease, and in particular, for the treatment of proliferative diseases and/or conditions.

Polynucleotides of the present invention are also useful in gene therapy. One goal of gene therapy is to insert a normal gene into an organism having a defective gene, in an effort to correct the genetic defect. The polynucleotides disclosed in the present invention offer a means of targeting such genetic defects in a highly accurate manner. Another goal is to insert a new gene that was not present in the host genome, thereby producing a new trait in the host cell.

The polynucleotides are also useful for identifying individuals from minute biological samples. The United States military, for example, is considering the use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) for identification of its personnel. In this technique, an individual's genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes, and probed on a Southern blot to yield unique bands for identifying personnel. This method does not suffer from the current limitations of "Dog Tags" which can be lost, switched, or stolen, making positive identification difficult. The polynucleotides of the present invention can be used as additional DNA markers for RFLP.

The polynucleotides of the present invention can also be used as an alternative to RFLP, by determining the actual base-by-base DNA sequence of selected portions of an individual's genome. These sequences can be used to prepare PCR primers for amplifying and isolating such selected DNA, which can then be sequenced. Using this technique, individuals can be identified because each individual will have a unique set of DNA sequences. Once an unique ID database is established for an individual, positive identification of that individual, living or dead, can be made from extremely small tissue samples.

Forensic biology also benefits from using DNA-based identification techniques as disclosed herein. DNA sequences taken from very small biological samples such as tissues, e.g., hair or skin, or body fluids, e.g., blood, saliva, semen, synovial fluid, amniotic fluid, breast milk, lymph, pulmonary sputum or surfactant, urine, fecal matter, etc., can be amplified using PCR. In one prior art technique, gene sequences amplified from polymorphic loci, such as DQa class II HLA gene, are used in forensic biology to identify individuals. (Erlich, H., PCR Technology, Freeman and Co. (1992).) Once these specific polymorphic loci are amplified, they are digested with one or more restriction enzymes,

yielding an identifying set of bands on a Southern blot probed with DNA corresponding to the DQa class II HLA gene. Similarly, polynucleotides of the present invention can be used as polymorphic markers for forensic purposes.

There is also a need for reagents capable of identifying the source of a particular tissue. Such need arises, for example, in forensics when presented with tissue of unknown origin. Appropriate reagents can comprise, for example, DNA probes or primers prepared from the sequences of the present invention. Panels of such reagents can identify tissue by species and/or by organ type. In a similar fashion, these reagents can be used to screen tissue cultures for contamination.

The polynucleotides of the present invention are also useful as hybridization probes for differential identification of the tissue(s) or cell type(s) present in a biological sample. Similarly, polypeptides and antibodies directed to polypeptides of the present invention are useful to provide immunological probes for differential identification of the tissue(s) (e.g., immunohistochemistry assays) or cell type(s) (e.g., immunocytochemistry assays). In addition, for a number of disorders of the above tissues or cells, significantly higher or lower levels of gene expression of the polynucleotides/polypeptides of the present invention may be detected in certain tissues (e.g., tissues expressing polypeptides and/or polynucleotides of the present invention and/or cancerous and/or wounded tissues) or bodily fluids (e.g., serum, plasma, urine, synovial fluid or spinal fluid) taken from an individual having such a disorder, relative to a "standard" gene expression level, i.e., the expression level in healthy tissue from an individual not having the disorder.

Thus, the invention provides a diagnostic method of a disorder, which involves: (a) assaying gene expression level in cells or body fluid of an individual; (b) comparing the gene expression level with a standard gene expression level, whereby an increase or decrease in the assayed gene expression level compared to the standard expression level is indicative of a disorder.

In the very least, the polynucleotides of the present invention can be used as molecular weight markers on Southern gels, as diagnostic probes for the presence of a specific mRNA in a particular cell type, as a probe to "subtract-out" known sequences in the process of discovering novel polynucleotides, for selecting and making oligomers for attachment to a "gene chip" or other support, to raise anti-DNA antibodies using DNA immunization techniques, and as an antigen to elicit an immune response.

Uses of the Polypeptides

Each of the polypeptides identified herein can be used in numerous ways. The following description should be considered exemplary and utilizes known techniques.

Polypeptides and antibodies directed to polypeptides of the present invention are useful to provide immunological probes for differential identification of the tissue(s) (e.g., immunohistochemistry assays such as, for example, ABC immunoperoxidase (Hsu et al., J. Histochem. Cytochem. 29:577-580 (1981)) or cell type(s) (e.g., immunocytochemistry assays).

Antibodies can be used to assay levels of polypeptides encoded by polynucleotides of the invention in a biological sample using classical immunohistological methods known to those of skill in the art (e.g., see Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Other antibody-based methods useful for detecting protein gene expression include immunoassays, such as the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the radioimmunoassay (RIA). Suitable antibody assay labels are known in the art and include enzyme labels, such as, glucose oxidase; radioisotopes, such as iodine (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), carbon (^{14}C), sulfur (^{35}S), tritium (^{3}H), indium (^{115m}In, ^{113m}In, ^{112}In, ^{111}In), and technetium (^{99}Tc, ^{99m}Tc), thallium (^{201}Ti), gallium (^{68}Ga, ^{67}Ga), palladium (^{103}Pd), molybdenum (^{99}Mo), xenon (^{133}Xe), fluorine (^{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; luminescent labels, such as luminol; and fluorescent labels, such as fluorescein and rhodamine, and biotin.

In addition to assaying levels of polypeptide of the present invention in a biological sample, proteins can also be detected in vivo by imaging. Antibody labels or markers for in vivo imaging of protein include those detectable by X-radiography, NMR or ESR. For X-radiography, suitable labels include radioisotopes such as barium or cesium, which emit detectable radiation but are not overtly harmful to the subject. Suitable markers for NMR and ESR include those with a detectable characteristic spin, such as deuterium, which may be incorporated into the antibody by labeling of nutrients for the relevant hybridoma.

A protein-specific antibody or antibody fragment which has been labeled with an appropriate detectable imaging moiety, such as a radioisotope (for example, ^{131}I, ^{112}In, ^{99m}Tc, (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), carbon (^{14}C), sulfur (^{35}S), tritium (^{3}H), indium (^{115m}In, ^{113m}In, ^{112}In, ^{111}In),

and technetium (^{99}Tc, ^{99m}Tc), thallium (^{201}Ti), gallium (^{68}Ga, ^{67}Ga), palladium (^{103}Pd), molybdenum (^{99}Mo), xenon (^{133}Xe), fluorine (^{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), a radio-opaque substance, or a material detectable by nuclear magnetic resonance, is introduced (for example, parenterally, subcutaneously or intraperitoneally) into the mammal to be examined for immune system disorder. It will be understood in the art that the size of the subject and the imaging system used will determine the quantity of imaging moiety needed to produce diagnostic images. In the case of a radioisotope moiety, for a human subject, the quantity of radioactivity injected will normally range from about 5 to 20 millicuries of ^{99m}Tc. The labeled antibody or antibody fragment will then preferentially accumulate at the location of cells which express the polypeptide encoded by a polynucleotide of the invention. *In vivo* tumor imaging is described in 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)).

In one embodiment, the invention provides a method for the specific delivery of compositions of the invention to cells by administering polypeptides of the invention (e.g., polypeptides encoded by polynucleotides of the invention and/or antibodies) that are associated with heterologous polypeptides or nucleic acids. In one example, the invention provides a method for delivering a therapeutic protein into the targeted cell. In another example, the invention provides a method for delivering a single stranded nucleic acid (e.g., antisense or ribozymes) or double stranded nucleic acid (e.g., DNA that can integrate into the cell's genome or replicate episomally and that can be transcribed) into the targeted cell.

In another embodiment, the invention provides a method for the specific destruction of cells (e.g., the destruction of tumor cells) by administering polypeptides of the invention in association with toxins or cytotoxic prodrugs.

By "toxin" is meant one or more compounds that bind and activate endogenous cytotoxic effector systems, radioisotopes, holotoxins, modified toxins, catalytic subunits of toxins, or any molecules or enzymes not normally present in or on the surface of a cell that under defined conditions cause the cell's death. Toxins that may be used according to the methods of the invention include, but are not limited to, radioisotopes known in the art, compounds such as, for example, antibodies (or complement fixing containing portions thereof) that bind an inherent or induced endogenous cytotoxic effector system, thymidine

kinase, endonuclease, RNAse, alpha toxin, ricin, abrin, *Pseudomonas* exotoxin A, diphtheria toxin, saporin, momordin, gelonin, pokeweed antiviral protein, alpha-sarcin and cholera toxin. "Toxin" also includes a cytostatic or cytocidal agent, a therapeutic agent or a radioactive metal ion, e.g., alpha-emitters such as, for example, ^{213}Bi, or other radioisotopes such as, for example, ^{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}Yttrium, ^{117}Tin, ^{186}Rhenium, ^{166}Holmium, and ^{188}Rhenium; luminescent labels, such as luminol; and fluorescent labels, such as fluorescein and rhodamine, and biotin.

Techniques known in the art may be applied to label polypeptides of the invention (including antibodies). Such techniques include, but are not limited to, the use of bifunctional conjugating agents (see e.g., U.S. Patent Nos. 5,756,065; 5,714,631; 5,696,239; 5,652,361; 5,505,931; 5,489,425; 5,435,990; 5,428,139; 5,342,604; 5,274,119; 4,994,560; and 5,808,003; the contents of each of which are hereby incorporated by reference in its entirety).

Thus, the invention provides a diagnostic method of a disorder, which involves (a) assaying the expression level of a polypeptide of the present invention in cells or body fluid of an individual; and (b) comparing the assayed polypeptide expression level with a standard polypeptide expression level, whereby an increase or decrease in the assayed polypeptide expression level compared to the standard expression level is indicative of a disorder. With respect to cancer, the presence of a relatively high amount of transcript in biopsied tissue from an individual may indicate a predisposition for the development of the disease, or may provide a means for detecting the disease prior to the appearance of actual clinical symptoms. A more definitive diagnosis of this type may allow health professionals to employ preventative measures or aggressive treatment earlier thereby preventing the development or further progression of the cancer.

Moreover, polypeptides of the present invention can be used to treat or prevent diseases or conditions such as, for example, neural disorders, immune system disorders, muscular disorders, reproductive disorders, gastrointestinal disorders, pulmonary disorders, cardiovascular disorders, renal disorders, proliferative disorders, and/or cancerous diseases and conditions. For example, patients can be administered a polypeptide of the present invention in an effort to replace absent or decreased levels of the polypeptide (e.g., insulin), to supplement absent or decreased levels of a different polypeptide (e.g., hemoglobin S for

hemoglobin B, SOD, catalase, DNA repair proteins), to inhibit the activity of a polypeptide (e.g., an oncogene or tumor supressor), to activate the activity of a polypeptide (e.g., by binding to a receptor), to reduce the activity of a membrane bound receptor by competing with it for free ligand (e.g., soluble TNF receptors used in reducing inflammation), or to bring about a desired response (e.g., blood vessel growth inhibition, enhancement of the immune response to proliferative cells or tissues).

Similarly, antibodies directed to a polypeptide of the present invention can also be used to treat disease (as described supra, and elsewhere herein). For example, administration of an antibody directed to a polypeptide of the present invention can bind, and/or neutralize the polypeptide, and/or reduce overproduction of the polypeptide. Similarly, administration of an antibody can activate the polypeptide, such as by binding to a polypeptide bound to a membrane (receptor).

At the very least, the polypeptides of the present invention can be used as molecular weight markers on SDS-PAGE gels or on molecular sieve gel filtration columns using methods well known to those of skill in the art. Polypeptides can also be used to raise antibodies, which in turn are used to measure protein expression from a recombinant cell, as a way of assessing transformation of the host cell. Moreover, the polypeptides of the present invention can be used to test the following biological activities.

Diagnostic Assays

The compounds of the present invention are useful for diagnosis, treatment, prevention and/or prognosis of various disorders in mammals, preferably humans. Such disorders include, but are not limited to, neural disorders (e.g., as described in "Neural Activity and Neurological Diseases" below), immune system disorders (e.g., as described in "Immune Activity" below), muscular disorders (e.g., as described in "Neural Activity and Neurological Diseases" below), reproductive disorders (e.g., as described in "Anti-Angiogenesis Activity" below), pulmonary disorders (e.g., as described in "Immune Activity" below), cardiovascular disorders (e.g., as described in "Cardiovascular Disorders" below), infectious diseases (e.g., as described in "Infectious Disease" below), proliferative disorders (e.g., as described in "Hyperproliferative Disorders", "Anti-Angiogenesis Activity" and "Diseases at the Cellular Level" below), and/or cancerous diseases and conditions (e.g., as described in "Hyperproliferative Disorders", "Anti-Angiogenesis Activity" and "Diseases

at the Cellular Level" below).

IL-6-like proteins are believed to be involved in biological activities associated with cytokine responses. Accordingly, compositions of the invention (including polynucleotides, polypeptides and antibodies of the invention, and fragments and variants thereof) may be used in the diagnosis and/or prognosis of diseases and/or disorders associated with aberrant IL-6-like activity. In preferred embodiments, compositions of the invention (including polynucleotides, polypeptides and antibodies of the invention, and fragments and variants thereof) may be used in the diagnosis and/or prognosis of diseases and/or disorders relating to immune system disorders (e.g., inflammatory disorders, autoimmune disorders, AIDS, T-cell proliferative disorders, and/or as described under "Immune activity" below), neural disorders (e.g., as described under "Neural Activity and Neurological Diseases" below), infectious diseases (e.g., as described in "Infectious Disease" below), osteoporosis, and hyperproliferative disorders (e.g., plasmacytoma/myeloma, Castleman's disease, mesangial proliferative glomerulonephritis, and/or as described under "Hyperproliferative Disorders" below). Thus, polynucleotides, translation products and antibodies of the invention are useful in the diagnosis, detection and/or treatment of diseases and/or disorders associated with activities that include, but are not limited to, immune system disorders, neural disorders, infectious diseases, inflammatory disorders, autoimmune disorders, AIDS, T-cell proliferative disorders, osteoporosis, hyperproliferative disorders, plasmacytoma/myeloma, Castleman's disease, and mesangial proliferative glomerulonephritis.

More generally, polynucleotides, translation products and antibodies corresponding to this gene may be useful for the diagnosis, detection and/or treatment of diseases and/or disorders associated with the following systems.

In another embodiment, a polypeptide of the invention, or polynucleotides, antibodies, agonists, or antagonists corresponding to that polypeptide, may be used to diagnose, prognose, prevent, and/or treat disorders associated with the tissue(s) in which the polypeptide of the invention is expressed, including the tissues disclosed in "Polynucleotides and Polypeptides of the Invention".

For a number of disorders, substantially altered (increased or decreased) levels of IL-6-like gene expression can be detected in tissues, cells or bodily fluids (e.g., sera, plasma, urine, semen, synovial fluid or spinal fluid) taken from an individual having such a disorder, relative to a "standard" IL-6-like gene expression level, that is, the IL-6-like expression level

in tissues or bodily fluids from an individual not having the disorder. Thus, the invention provides a diagnostic method useful during diagnosis of a disorder, which involves measuring the expression level of the gene encoding the IL-6-like polypeptide in tissues, cells or body fluid from an individual and comparing the measured gene expression level with a standard IL-6-like gene expression level, whereby an increase or decrease in the gene expression level(s) compared to the standard is indicative of a IL-6-like disorder. These diagnostic assays may be performed *in vivo* or *in vitro*, such as, for example, on blood samples, biopsy tissue or autopsy tissue.

The present invention is also useful as a prognostic indicator, whereby patients exhibiting enhanced or depressed IL-6-like gene expression will experience a worse clinical outcome relative to patients expressing the gene at a level nearer the standard level.

By "assaying the expression level of the gene encoding the IL-6-like polypeptide" is intended qualitatively or quantitatively measuring or estimating the level of the IL-6-like polypeptide or the level of the mRNA encoding the IL-6-like polypeptide in a first biological sample either directly (e.g., by determining or estimating absolute protein level or mRNA level) or relatively (e.g., by comparing to the IL-6-like polypeptide level or mRNA level in a second biological sample). Preferably, the IL-6-like polypeptide expression level or mRNA level in the first biological sample is measured or estimated and compared to a standard IL-6-like polypeptide level or mRNA level, the standard being taken from a second biological sample obtained from an individual not having the disorder or being determined by averaging levels from a population of individuals not having the disorder. As will be appreciated in the art, once a standard IL-6-like polypeptide level or mRNA level is known, it can be used repeatedly as a standard for comparison.

By "biological sample" is intended any biological sample obtained from an individual, cell line, tissue culture, or other source containing IL-6-like polypeptides (including portions thereof) or mRNA. As indicated, biological samples include body fluids (such as sera, plasma, urine, synovial fluid and spinal fluid) and tissue sources found to express the full length or fragments thereof of a IL-6-like polypeptide. Methods for obtaining tissue biopsies and body fluids from mammals are well known in the art. Where the biological sample is to include mRNA, a tissue biopsy is the preferred source.

Total cellular RNA can be isolated from a biological sample using any suitable technique such as the single-step guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform method

described in Chomczynski and Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987). Levels of mRNA encoding the IL-6-like polypeptides are then assayed using any appropriate method. These include Northern blot analysis, S1 nuclease mapping, the polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription in combination with the polymerase chain reaction (RT-PCR), and reverse transcription in combination with the ligase chain reaction (RT-LCR).

The present invention also relates to diagnostic assays such as quantitative and diagnostic assays for detecting levels of IL-6-like polypeptides, in a biological sample (e.g., cells and tissues), including determination of normal and abnormal levels of polypeptides. Thus, for instance, a diagnostic assay in accordance with the invention for detecting over-expression of IL-6-like polypeptides compared to normal control tissue samples may be used to detect the presence of tumors. Assay techniques that can be used to determine levels of a polypeptide, such as a IL-6-like polypeptide of the present invention in a sample derived from a host are well-known to those of skill in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays. Assaying IL-6-like polypeptide levels in a biological sample can occur using any art-known method.

Assaying IL-6-like polypeptide levels in a biological sample can occur using antibody-based techniques. For example, IL-6-like polypeptide expression in tissues can be studied with classical immunohistological methods (Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., *J. Cell Biol.*, 105:3087-3096 (1987)). Other antibody-based methods useful for detecting IL-6-like polypeptide gene expression include immunoassays, such as the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the radioimmunoassay (RIA). Suitable antibody assay labels are known in the art and include enzyme labels, such as, glucose oxidase, and radioisotopes, such as iodine (^{125}I, ^{121}I), carbon (^{14}C), sulfur (^{35}S), tritium (^{3}H), indium (^{112}In), and technetium (^{99m}Tc), and fluorescent labels, such as fluorescein and rhodamine, and biotin.

The tissue or cell type to be analyzed will generally include those which are known, or suspected, to express the IL-6-like gene (such as, for example, cancer). The protein isolation methods employed herein may, for example, be such as those described in Harlow and Lane (Harlow, E. and Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), which is incorporated herein by reference in its entirety. The isolated cells can be derived from cell culture or from a patient.

The analysis of cells taken from culture may be a necessary step in the assessment of cells that could be used as part of a cell-based gene therapy technique or, alternatively, to test the effect of compounds on the expression of the IL-6-like gene.

For example, antibodies, or fragments of antibodies, such as those described herein, may be used to quantitatively or qualitatively detect the presence of IL-6-like gene products or conserved variants or peptide fragments thereof. This can be accomplished, for example, by immunofluorescence techniques employing a fluorescently labeled antibody coupled with light microscopic, flow cytometric, or fluorimetric detection.

In a preferred embodiment, antibodies, or fragments of antibodies directed to any one or all of the predicted epitope domains of the IL-6-like polypeptides may be used to quantitatively or qualitatively detect the presence IL-6-like gene products or conserved variants or peptide fragments thereof. This can be accomplished, for example, by immunofluorescence techniques employing a fluorescently labeled antibody coupled with light microscopic, flow cytometric, or fluorimetric detection.

In an additional preferred embodiment, antibodies, or fragments of antibodies directed to a conformational epitope of a IL-6-like polypeptide may be used to quantitatively or qualitatively detect the presence of IL-6-like gene products or conserved variants or peptide fragments thereof. This can be accomplished, for example, by immunofluorescence techniques employing a fluorescently labeled antibody coupled with light microscopic, flow cytometric, or fluorimetric detection.

The antibodies (or fragments thereof), and/or IL-6-like polypeptides of the present invention may, additionally, be employed histologically, as in immunofluorescence, immunoelectron microscopy or non-immunological assays, for in situ detection of IL-6-like gene products or conserved variants or peptide fragments thereof. In situ detection may be accomplished by removing a histological specimen from a patient, and applying thereto a labeled antibody or IL-6-like polypeptide of the present invention. The antibody (or fragment thereof) or IL-6-like polypeptide is preferably applied by overlaying the labeled antibody (or fragment) onto a biological sample. Through the use of such a procedure, it is possible to determine not only the presence of the IL-6-like gene product, or conserved variants or peptide fragments, or IL-6-like polypeptide binding, but also its distribution in the examined tissue. Using the present invention, those of ordinary skill will readily perceive that any of a wide variety of histological methods (such as staining procedures) can be modified in order to

achieve such in situ detection.

Immunoassays and non-immunoassays for IL-6-like gene products or conserved variants or peptide fragments thereof will typically comprise incubating a sample, such as a biological fluid, a tissue extract, freshly harvested cells, or lysates of cells which have been incubated in cell culture, in the presence of a detectably labeled antibody capable of binding IL-6-like gene products or conserved variants or peptide fragments thereof, and detecting the bound antibody by any of a number of techniques well-known in the art.

The biological sample may be brought in contact with and immobilized onto a solid phase support or carrier such as nitrocellulose, or other solid support which is capable of immobilizing cells, cell particles or soluble proteins. The support may then be washed with suitable buffers followed by treatment with the detectably labeled anti-IL-6-like polypeptide antibody or detectable IL-6-like polypeptide. The solid phase support may then be washed with the buffer a second time to remove unbound antibody or polypeptide. Optionally the antibody is subsequently labeled. The amount of bound label on solid support may then be detected by conventional means.

By "solid phase support or carrier" is intended any support capable of binding an antigen or an antibody. Well-known supports or carriers include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, gabbros, and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration so long as the coupled molecule is capable of binding to an antigen or antibody. Thus, the support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip; etc. Preferred supports include polystyrene beads. Those skilled in the art will know many other suitable carriers for binding antibody or antigen, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

The binding activity of a given lot of anti-IL-6-like polypeptide antibody or IL-6-like antigen polypeptide may be determined according to well known methods. Those skilled in the art will be able to determine operative and optimal assay conditions for each determination by employing routine experimentation.

In addition to assaying IL-6-like polypeptide levels or polynucleotide levels in a

biological sample obtained from an individual, IL-6-like polypeptide or polynucleotide can also be detected *in vivo* by imaging. For example, in one embodiment of the invention, IL-6-like polypeptide and/or anti-IL-6-like antigen antibodies are used to image diseased cells, such as neoplasms. In another embodiment, IL-6-like polynucleotides of the invention (e.g., polynucleotides complementary to all or a portion of a particular IL-6-like mRNA transcript) and/or anti-IL-6-like antibodies (e.g., antibodies directed to any one or a combination of the epitopes of a IL-6-like polypeptide of the invention, antibodies directed to a conformational epitope of a IL-6-like polypeptide of the invention, or antibodies directed to the full length polypeptide expressed on the cell surface of a mammalian cell) are used to image diseased or neoplastic cells.

Antibody labels or markers for *in vivo* imaging of IL-6-like polypeptides include those detectable by X-radiography, NMR, MRI, CAT-scans or ESR. For X-radiography, suitable labels include radioisotopes such as barium or cesium, which emit detectable radiation but are not overtly harmful to the subject. Suitable markers for NMR and ESR include those with a detectable characteristic spin, such as deuterium, which may be incorporated into the antibody by labeling of nutrients for the relevant hybridoma. Where *in vivo* imaging is used to detect enhanced levels of IL-6-like polypeptides for diagnosis in humans, it may be preferable to use human antibodies or "humanized" chimeric monoclonal antibodies. Such antibodies can be produced using techniques described herein or otherwise known in the art. For example methods for producing chimeric antibodies are known in the art. See, for review, Morrison, *Science 229*:1202 (1985); Oi et al., *BioTechniques 4*:214 (1986); Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al., EP 173494; Neuberger et al., WO 8601533; Robinson et al., WO 8702671; Boulianne *et al., Nature 312*:643 (1984); Neuberger *et al., Nature 314*:268 (1985).

Additionally, any IL-6-like polypeptides whose presence can be detected, can be administered. For example, IL-6-like polypeptides labeled with a radio-opaque or other appropriate compound can be administered and visualized *in vivo*, as discussed, above for labeled antibodies. Further such IL-6-like polypeptides can be utilized for *in vitro* diagnostic procedures.

A IL-6-like polypeptide-specific antibody or antibody fragment which has been labeled with an appropriate detectable imaging moiety, such as a radioisotope (for example, ^{131}I, ^{112}In, ^{99m}Tc), a radio-opaque substance, or a material detectable by nuclear magnetic

resonance, is introduced (for example, parenterally, subcutaneously or intraperitoneally) into the mammal to be examined for a disorder. It will be understood in the art that the size of the subject and the imaging system used will determine the quantity of imaging moiety needed to produce diagnostic images. In the case of a radioisotope moiety, for a human subject, the quantity of radioactivity injected will normally range from about 5 to 20 millicuries of ^{99m}Tc. The labeled antibody or antibody fragment will then preferentially accumulate at the location of cells which contain IL-6-like protein. *In vivo* tumor imaging is described in 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)).

With respect to antibodies, one of the ways in which the anti-IL-6-like polypeptide antibody can be detectably labeled is by linking the same to a reporter enzyme and using the linked product in an enzyme immunoassay (EIA) (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, Kgaku Shoin, Tokyo). The reporter enzyme which is bound to the antibody will react with an appropriate substrate, preferably a chromogenic substrate, in such a manner as to produce a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorimetric or by visual means. Reporter enzymes which can be used to detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate, dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholinesterase. Additionally, the detection can be accomplished by colorimetric methods which employ a chromogenic substrate for the reporter enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

Detection may also be accomplished using any of a variety of other immunoassays. For example, by radioactively labeling the antibodies or antibody fragments, it is possible to

detect IL-6-like polypeptides through the use of a radioimmunoassay (RIA) (see, for example, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, which is incorporated by reference herein). The radioactive isotope can be detected by means including, but not limited to, a gamma counter, a scintillation counter, or autoradiography.

It is also possible to label the antibody with a fluorescent compound. When the fluorescently labeled antibody is exposed to light of the proper wave length, its presence can then be detected due to fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labeling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, ophthaldehyde and fluorescamine.

The antibody can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals such as ^{152}Eu, or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the antibody using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentacetic acid (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

The antibody also can be detectably labeled by coupling it to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged antibody is then determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent labeling compounds are luminol, isoluminol, theromatic acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester.

Likewise, a bioluminescent compound may be used to label the antibody of the present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in, which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labeling are luciferin, luciferase and aequorin.

Methods for Detecting Diseases

In general, a disease may be detected in a patient based on the presence of one or more IL-6-like proteins of the invention and/or polynucleotides encoding such proteins in a biological sample (for example, blood, sera, urine, and/or tumor biopsies) obtained from the patient. In other words, such proteins may be used as markers to indicate the presence or absence of a disease or disorder, including cancer and/or as described elsewhere herein. In

addition, such proteins may be useful for the detection of other diseases and cancers. The binding agents provided herein generally permit detection of the level of antigen that binds to the agent in the biological sample. Polynucleotide primers and probes may be used to detect the level of mRNA encoding IL-6-like polypeptides, which is also indicative of the presence or absence of a disease or disorder, including cancer. In general, IL-6-like polypeptides should be present at a level that is at least three fold higher in diseased tissue than in normal tissue.

There are a variety of assay formats known to those of ordinary skill in the art for using a binding agent to detect polypeptide markers in a sample. See, e.g., Harlow and Lane, *supra*. In general, the presence or absence of a disease in a patient may be determined by (a) contacting a biological sample obtained from a patient with a binding agent; (b) detecting in the sample a level of polypeptide that binds to the binding agent; and (c) comparing the level of polypeptide with a predetermined cut-off value.

In a preferred embodiment, the assay involves the use of a binding agent(s) immobilized on a solid support to bind to and remove the IL-6-like polypeptide of the invention from the remainder of the sample. The bound polypeptide may then be detected using a detection reagent that contains a reporter group and specifically binds to the binding agent/polypeptide complex. Such detection reagents may comprise, for example, a binding agent that specifically binds to the polypeptide or an antibody or other agent that specifically binds to the binding agent, such as an anti-immunoglobulin, protein G, protein A or a lectin. Alternatively, a competitive assay may be utilized, in which a polypeptide is labeled with a reporter group and allowed to bind to the immobilized binding agent after incubation of the binding agent with the sample. The extent to which components of the sample inhibit the binding of the labeled polypeptide to the binding agent is indicative of the reactivity of the sample with the immobilized binding agent. Suitable polypeptides for use within such assays include IL-6-like polypeptides and portions thereof, or antibodies, to which the binding agent binds, as described above.

The solid support may be any material known to those of skill in the art to which IL-6-like polypeptides of the invention may be attached. For example, the solid support may be a test well in a microtiter plate or a nitrocellulose or other suitable membrane. Alternatively, the support may be a bead or disc, such as glass fiberglass, latex or a plastic material such as polystyrene or polyvinylchloride. The support may also be a magnetic particle or a fiber optic

sensor, such as those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,359,681. The binding agent may be immobilized on the solid support using a variety of techniques known to those of skill in the art, which are amply described in the patent and scientific literature. In the context of the present invention, the term "immobilization" refers to both noncovalent association, such as adsorption, and covalent attachment (which may be a direct linkage between the agent and functional groups on the support or may be a linkage by way of a cross-linking agent). Immobilization by adsorption to a well in a microtiter plate or to a membrane is preferred. In such cases, adsorption may be achieved by contacting the binding agent, in a suitable buffer, with the solid support for the suitable amount of time. The contact time varies with temperature, but is typically between about 1 hour and about 1 day. In general, contacting a well of plastic microtiter plate (such as polystyrene or polyvinylchloride) with an amount of binding agent ranging from about 10 ng to about 10 ug, and preferably about 100 ng to about 1 ug, is sufficient to immobilize an adequate amount of binding agent.

Covalent attachment of binding agent to a solid support may generally be achieved by first reacting the support with a bifunctional reagent that will react with both the support and a functional group, such as a hydroxyl or amino group, on the binding agent. For example, the binding agent may be covalently attached to supports having an appropriate polymer coating using benzoquinone or by condensation of an aldehyde group on the support with an amine and an active hydrogen on the binding partner (see, e.g., Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, at A12-A13).

Gene Therapy Methods

Another aspect of the present invention is to gene therapy methods for treating or preventing disorders, diseases and conditions. The gene therapy methods relate to the introduction of nucleic acid (DNA, RNA and antisense DNA or RNA) sequences into an animal to achieve expression of the polypeptide of the present invention. This method requires a polynucleotide which codes for a polypeptide of the present invention operatively linked to a promoter and any other genetic elements necessary for the expression of the polypeptide by the target tissue. Such gene therapy and delivery techniques are known in the art, see, for example, WO90/11092, which is herein incorporated by reference.

Thus, for example, cells from a patient may be engineered with a polynucleotide (DNA or RNA) comprising a promoter operably linked to a polynucleotide of the present

invention ex vivo, with the engineered cells then being provided to a patient to be treated with the polypeptide of the present invention. Such methods are well-known in the art. For example, see 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); and Zhang, J.-F. et al., Cancer Gene Therapy 3: 31-38 (1996)), which are herein incorporated by reference. In one embodiment, the cells which are engineered are arterial cells. The arterial cells may be reintroduced into the patient through direct injection to the artery, the tissues surrounding the artery, or through catheter injection.

As discussed in more detail below, the polynucleotide constructs can be delivered by any method that delivers injectable materials to the cells of an animal, such as, injection into the interstitial space of tissues (heart, muscle, skin, lung, liver, and the like). The polynucleotide constructs may be delivered in a pharmaceutically acceptable liquid or aqueous carrier.

In one embodiment, the polynucleotide of the present invention is delivered as a naked polynucleotide. The term "naked" polynucleotide, DNA or RNA refers to sequences that are free from any delivery vehicle that acts to assist, promote or facilitate entry into the cell, including viral sequences, viral particles, liposome formulations, lipofectin or precipitating agents and the like. However, the polynucleotide of the present invention can also be delivered in liposome formulations and lipofectin formulations and the like can be prepared by methods well known to those skilled in the art. Such methods are described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,593,972, 5,589,466, and 5,580,859, which are herein incorporated by reference.

The polynucleotide vector constructs used in the gene therapy method are preferably constructs that will not integrate into the host genome nor will they contain sequences that allow for replication. Appropriate vectors include pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 and pSG available from Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL available from Pharmacia; and pEF1/V5, pcDNA3.1, and pRc/CMV2 available from Invitrogen. Other suitable vectors will be readily apparent to the skilled artisan.

Any strong promoter known to those skilled in the art can be used for driving the expression of the polynucleotide sequence. Suitable promoters include adenoviral promoters, such as the adenoviral major late promoter; or heterologous promoters, such as the cytomegalovirus (CMV) promoter; the respiratory syncytial virus (RSV) promoter; inducible promoters, such as the MMT promoter, the metallothionein promoter; heat shock promoters; the albumin promoter; the ApoAI promoter; human globin promoters; viral thymidine kinase promoters, such as the Herpes Simplex thymidine kinase promoter; retroviral LTRs; the b-actin promoter; and human growth hormone promoters. The promoter also may be the native promoter for the polynucleotide of the present invention.

Unlike other gene therapy techniques, one major advantage of introducing naked nucleic acid sequences into target cells is the transitory nature of the polynucleotide synthesis in the cells. Studies have shown that non-replicating DNA sequences can be introduced into cells to provide production of the desired polypeptide for periods of up to six months.

The polynucleotide construct can be delivered to the interstitial space of tissues within the an animal, including of muscle, skin, brain, lung, liver, spleen, bone marrow, thymus, heart, lymph, blood, bone, cartilage, pancreas, kidney, gall bladder, stomach, intestine, testis, ovary, uterus, rectum, nervous system, eye, gland, and connective tissue. Interstitial space of the tissues comprises the intercellular, fluid, mucopolysaccharide matrix among the reticular fibers of organ tissues, elastic fibers in the walls of vessels or chambers, collagen fibers of fibrous tissues, or that same matrix within connective tissue ensheathing muscle cells or in the lacunae of bone. It is similarly the space occupied by the plasma of the circulation and the lymph fluid of the lymphatic channels. Delivery to the interstitial space of muscle tissue is preferred for the reasons discussed below. They may be conveniently delivered by injection into the tissues comprising these cells. They are preferably delivered to and expressed in persistent, non-dividing cells which are differentiated, although delivery and expression may be achieved in non-differentiated or less completely differentiated cells, such as, for example, stem cells of blood or skin fibroblasts. In vivo muscle cells are particularly competent in their ability to take up and express polynucleotides.

For the naked nucleic acid sequence injection, an effective dosage amount of DNA or RNA will be in the range of from about 0.05 mg/kg body weight to about 50 mg/kg body weight. Preferably the dosage will be from about 0.005 mg/kg to about 20 mg/kg and more preferably from about 0.05 mg/kg to about 5 mg/kg. Of course, as the artisan of ordinary skill

will appreciate, this dosage will vary according to the tissue site of injection. The appropriate and effective dosage of nucleic acid sequence can readily be determined by those of ordinary skill in the art and may depend on the condition being treated and the route of administration.

The preferred route of administration is by the parenteral route of injection into the interstitial space of tissues. However, other parenteral routes may also be used, such as, inhalation of an aerosol formulation particularly for delivery to lungs or bronchial tissues, throat or mucous membranes of the nose. In addition, naked DNA constructs can be delivered to arteries during angioplasty by the catheter used in the procedure.

The naked polynucleotides are delivered by any method known in the art, including, but not limited to, direct needle injection at the delivery site, intravenous injection, topical administration, catheter infusion, and so-called "gene guns". These delivery methods are known in the art.

The constructs may also be delivered with delivery vehicles such as viral sequences, viral particles, liposome formulations, lipofectin, precipitating agents, etc. Such methods of delivery are known in the art.

In certain embodiments, the polynucleotide constructs are complexed in a liposome preparation. Liposomal preparations for use in the instant invention include cationic (positively charged), anionic (negatively charged) and neutral preparations. However, cationic liposomes are particularly preferred because a tight charge complex can be formed between the cationic liposome and the polyanionic nucleic acid. Cationic liposomes have been shown to mediate intracellular delivery of plasmid DNA (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416, which is herein incorporated by reference); mRNA (Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:6077-6081, which is herein incorporated by reference); and purified transcription factors (Debs et al., J. Biol. Chem. (1990) 265:10189-10192, which is herein incorporated by reference), in functional form.

Cationic liposomes are readily available. For example, N[1-2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-triethylammonium (DOTMA) liposomes are particularly useful and are available under the trademark Lipofectin, from GIBCO BRL, Grand Island, N.Y. (See, also, Felgner et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416, which is herein incorporated by reference). Other commercially available liposomes include transfectace (DDAB/DOPE) and DOTAP/DOPE (Boehringer).

Other cationic liposomes can be prepared from readily available materials using techniques well known in the art. See, e.g. PCT Publication No. WO 90/11092 (which is herein incorporated by reference) for a description of the synthesis of DOTAP (1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propane) liposomes. Preparation of DOTMA liposomes is explained in the literature, see, e.g., P. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, which is herein incorporated by reference. Similar methods can be used to prepare liposomes from other cationic lipid materials.

Similarly, anionic and neutral liposomes are readily available, such as from Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.), or can be easily prepared using readily available materials. Such materials include phosphatidyl, choline, cholesterol, phosphatidyl ethanolamine, dioleoylphosphatidyl choline (DOPC), dioleoylphosphatidyl glycerol (DOPG), dioleoylphoshatidyl ethanolamine (DOPE), among others. These materials can also be mixed with the DOTMA and DOTAP starting materials in appropriate ratios. Methods for making liposomes using these materials are well known in the art.

For example, commercially dioleoylphosphatidyl choline (DOPC), dioleoylphosphatidyl glycerol (DOPG), and dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE) can be used in various combinations to make conventional liposomes, with or without the addition of cholesterol. Thus, for example, DOPG/DOPC vesicles can be prepared by drying 50 mg each of DOPG and DOPC under a stream of nitrogen gas into a sonication vial. The sample is placed under a vacuum pump overnight and is hydrated the following day with deionized water. The sample is then sonicated for 2 hours in a capped vial, using a Heat Systems model 350 sonicator equipped with an inverted cup (bath type) probe at the maximum setting while the bath is circulated at 15EC. Alternatively, negatively charged vesicles can be prepared without sonication to produce multilamellar vesicles or by extrusion through nucleopore membranes to produce unilamellar vesicles of discrete size. Other methods are known and available to those of skill in the art.

The liposomes can comprise multilamellar vesicles (MLVs), small unilamellar vesicles (SUVs), or large unilamellar vesicles (LUVs), with SUVs being preferred. The various liposome-nucleic acid complexes are prepared using methods well known in the art. See, e.g., Straubinger et al., Methods of Immunology (1983), 101:512-527, which is herein incorporated by reference. For example, MLVs containing nucleic acid can be prepared by depositing a thin film of phospholipid on the walls of a glass tube and subsequently hydrating

with a solution of the material to be encapsulated. SUVs are prepared by extended sonication of MLVs to produce a homogeneous population of unilamellar liposomes. The material to be entrapped is added to a suspension of preformed MLVs and then sonicated. When using liposomes containing cationic lipids, the dried lipid film is resuspended in an appropriate solution such as sterile water or an isotonic buffer solution such as 10 mM Tris/NaCl, sonicated, and then the preformed liposomes are mixed directly with the DNA. The liposome and DNA form a very stable complex due to binding of the positively charged liposomes to the cationic DNA. SUVs find use with small nucleic acid fragments. LUVs are prepared by a number of methods, well known in the art. Commonly used methods include Ca^{2+}-EDTA chelation (Papahadjopoulos et al., Biochim. Biophys. Acta (1975) 394:483; Wilson et al., Cell (1979) 17:77); ether injection (Deamer, D. and Bangham, A., Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629; Ostro et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76:836; Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:3348); detergent dialysis (Enoch, H. and Strittmatter, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:145); and reverse-phase evaporation (REV) (Fraley et al., J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; Szoka, F. and Papahadjopoulos, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:145; Schaefer-Ridder et al., Science (1982) 215:166), which are herein incorporated by reference.

Generally, the ratio of DNA to liposomes will be from about 10:1 to about 1:10. Preferably, the ration will be from about 5:1 to about 1:5. More preferably, the ration will be about 3:1 to about 1:3. Still more preferably, the ratio will be about 1:1.

U.S. Patent No. 5,676,954 (which is herein incorporated by reference) reports on the injection of genetic material, complexed with cationic liposomes carriers, into mice. U.S. Patent Nos. 4,897,355, 4,946,787, 5,049,386, 5,459,127, 5,589,466, 5,693,622, 5,580,859, 5,703,055, and international publication no. WO 94/9469 (which are herein incorporated by reference) provide cationic lipids for use in transfecting DNA into cells and mammals. U.S. Patent Nos. 5,589,466, 5,693,622, 5,580,859, 5,703,055, and international publication no. WO 94/9469 (which are herein incorporated by reference) provide methods for delivering DNA-cationic lipid complexes to mammals.

In certain embodiments, cells are engineered, ex vivo or in vivo, using a retroviral particle containing RNA which comprises a sequence encoding a polypeptide of the present invention. Retroviruses from which the retroviral plasmid vectors may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, Rous sarcoma

Virus, Harvey Sarcoma Virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, Myeloproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus.

The retroviral plasmid vector is employed to transduce packaging cell lines to form producer cell lines. Examples of packaging cells which may be transfected include, but are not limited to, the PE501, PA317, R-2, R-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, RCRE, RCRIP, GP+E-86, GP+envAm12, and DAN cell lines as described in Miller, Human Gene Therapy 1:5-14 (1990), which is incorporated herein by reference in its entirety. The vector may transduce the packaging cells through any means known in the art. Such means include, but are not limited to, electroporation, the use of liposomes, and $CaPO_4$ precipitation. In one alternative, the retroviral plasmid vector may be encapsulated into a liposome, or coupled to a lipid, and then administered to a host.

The producer cell line generates infectious retroviral vector particles which include polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention. Such retroviral vector particles then may be employed, to transduce eukaryotic cells, either in vitro or in vivo. The transduced eukaryotic cells will express a polypeptide of the present invention.

In certain other embodiments, cells are engineered, ex vivo or in vivo, with polynucleotide contained in an adenovirus vector. Adenovirus can be manipulated such that it encodes and expresses a polypeptide of the present invention, and at the same time is inactivated in terms of its ability to replicate in a normal lytic viral life cycle. Adenovirus expression is achieved without integration of the viral DNA into the host cell chromosome, thereby alleviating concerns about insertional mutagenesis. Furthermore, adenoviruses have been used as live enteric vaccines for many years with an excellent safety profile (Schwartz, A. R. et al. (1974) Am. Rev. Respir. Dis.109:233-238). Finally, adenovirus mediated gene transfer has been demonstrated in a number of instances including transfer of alpha-1-antitrypsin and CFTR to the lungs of cotton rats (Rosenfeld, M. A. et al. (1991) Science 252:431-434; Rosenfeld et al., (1992) Cell 68:143-155). Furthermore, extensive studies to attempt to establish adenovirus as a causative agent in human cancer were uniformly negative (Green, M. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:6606).

Suitable adenoviral vectors useful in the present invention are described, for example, in 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); and U.S. Patent

No. 5,652,224, which are herein incorporated by reference. For example, the adenovirus vector Ad2 is useful and can be grown in human 293 cells. These cells contain the E1 region of adenovirus and constitutively express Ela and Elb, which complement the defective adenoviruses by providing the products of the genes deleted from the vector. In addition to Ad2, other varieties of adenovirus (e.g., Ad3, Ad5, and Ad7) are also useful in the present invention.

Preferably, the adenoviruses used in the present invention are replication deficient. Replication deficient adenoviruses require the aid of a helper virus and/or packaging cell line to form infectious particles. The resulting virus is capable of infecting cells and can express a polynucleotide of interest which is operably linked to a promoter, but cannot replicate in most cells. Replication deficient adenoviruses may be deleted in one or more of all or a portion of the following genes: E1a, E1b, E3, E4, E2a, or L1 through L5.

In certain other embodiments, the cells are engineered, ex vivo or in vivo, using an adeno-associated virus (AAV). AAVs are naturally occurring defective viruses that require helper viruses to produce infectious particles (Muzyczka, N., Curr. Topics in Microbiol. Immunol. 158:97 (1992)). It is also one of the few viruses that may integrate its DNA into non-dividing cells. Vectors containing as little as 300 base pairs of AAV can be packaged and can integrate, but space for exogenous DNA is limited to about 4.5 kb. Methods for producing and using such AAVs are known in the art. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,139,941, 5,173,414, 5,354,678, 5,436,146, 5,474,935, 5,478,745, and 5,589,377.

For example, an appropriate AAV vector for use in the present invention will include all the sequences necessary for DNA replication, encapsidation, and host-cell integration. The polynucleotide construct is inserted into the AAV vector using standard cloning methods, such as those found in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989). The recombinant AAV vector is then transfected into packaging cells which are infected with a helper virus, using any standard technique, including lipofection, electroporation, calcium phosphate precipitation, etc. Appropriate helper viruses include adenoviruses, cytomegaloviruses, vaccinia viruses, or herpes viruses. Once the packaging cells are transfected and infected, they will produce infectious AAV viral particles which contain the polynucleotide construct. These viral particles are then used to transduce eukaryotic cells, either ex vivo or in vivo. The transduced cells will contain the

polynucleotide construct integrated into its genome, and will express a polypeptide of the invention.

Another method of gene therapy involves operably associating heterologous control regions and endogenous polynucleotide sequences (e.g. encoding a polypeptide of the present invention) via homologous recombination (see, e.g., U.S. Patent No. 5,641,670, issued June 24, 1997; International Publication No. WO 96/29411, published September 26, 1996; International Publication No. WO 94/12650, published August 4, 1994; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); and Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989). This method involves the activation of a gene which is present in the target cells, but which is not normally expressed in the cells, or is expressed at a lower level than desired.

Polynucleotide constructs are made, using standard techniques known in the art, which contain the promoter with targeting sequences flanking the promoter. Suitable promoters are described herein. The targeting sequence is sufficiently complementary to an endogenous sequence to permit homologous recombination of the promoter-targeting sequence with the endogenous sequence. The targeting sequence will be sufficiently near the 5' end of the desired endogenous polynucleotide sequence so the promoter will be operably linked to the endogenous sequence upon homologous recombination.

The promoter and the targeting sequences can be amplified using PCR. Preferably, the amplified promoter contains distinct restriction enzyme sites on the 5' and 3' ends. Preferably, the 3' end of the first targeting sequence contains the same restriction enzyme site as the 5' end of the amplified promoter and the 5' end of the second targeting sequence contains the same restriction site as the 3' end of the amplified promoter. The amplified promoter and targeting sequences are digested and ligated together.

The promoter-targeting sequence construct is delivered to the cells, either as naked polynucleotide, or in conjunction with transfection-facilitating agents, such as liposomes, viral sequences, viral particles, whole viruses, lipofection, precipitating agents, etc., described in more detail above. The P promoter-targeting sequence can be delivered by any method, included direct needle injection, intravenous injection, topical administration, catheter infusion, particle accelerators, etc. The methods are described in more detail below.

The promoter-targeting sequence construct is taken up by cells. Homologous recombination between the construct and the endogenous sequence takes place, such that an

endogenous sequence is placed under the control of the promoter. The promoter then drives the expression of the endogenous sequence.

Preferably, the polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention contains a secretory signal sequence that facilitates secretion of the protein. Typically, the signal sequence is positioned in the coding region of the polynucleotide to be expressed towards or at the 5' end of the coding region. The signal sequence may be homologous or heterologous to the polynucleotide of interest and may be homologous or heterologous to the cells to be transfected. Additionally, the signal sequence may be chemically synthesized using methods known in the art.

Any mode of administration of any of the above-described polynucleotides constructs can be used so long as the mode results in the expression of one or more molecules in an amount sufficient to provide a therapeutic effect. This includes direct needle injection, systemic injection, catheter infusion, biolistic injectors, particle accelerators (i.e., "gene guns"), gelfoam sponge depots, other commercially available depot materials, osmotic pumps (e.g., Alza minipumps), oral or suppositorial solid (tablet or pill) pharmaceutical formulations, and decanting or topical applications during surgery. For example, direct injection of naked calcium phosphate-precipitated plasmid into rat liver and rat spleen or a protein-coated plasmid into the portal vein has resulted in gene expression of the foreign gene in the rat livers (Kaneda et al., Science 243:375 (1989)).

A preferred method of local administration is by direct injection. Preferably, a recombinant molecule of the present invention complexed with a delivery vehicle is administered by direct injection into or locally within the area of arteries. Administration of a composition locally within the area of arteries refers to injecting the composition centimeters and preferably, millimeters within arteries.

Another method of local administration is to contact a polynucleotide construct of the present invention in or around a surgical wound. For example, a patient can undergo surgery and the polynucleotide construct can be coated on the surface of tissue inside the wound or the construct can be injected into areas of tissue inside the wound.

Therapeutic compositions useful in systemic administration, include recombinant molecules of the present invention complexed to a targeted delivery vehicle of the present invention. Suitable delivery vehicles for use with systemic administration comprise liposomes comprising ligands for targeting the vehicle to a particular site.

Preferred methods of systemic administration, include intravenous injection, aerosol, oral and percutaneous (topical) delivery. Intravenous injections can be performed using methods standard in the art. Aerosol delivery can also be performed using methods standard in the art (see, for example, Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992, which is incorporated herein by reference). Oral delivery can be performed by complexing a polynucleotide construct of the present invention to a carrier capable of withstanding degradation by digestive enzymes in the gut of an animal. Examples of such carriers, include plastic capsules or tablets, such as those known in the art. Topical delivery can be performed by mixing a polynucleotide construct of the present invention with a lipophilic reagent (e.g., DMSO) that is capable of passing into the skin.

Determining an effective amount of substance to be delivered can depend upon a number of factors including, for example, the chemical structure and biological activity of the substance, the age and weight of the animal, the precise condition requiring treatment and its severity, and the route of administration. The frequency of treatments depends upon a number of factors, such as the amount of polynucleotide constructs administered per dose, as well as the health and history of the subject. The precise amount, number of doses, and timing of doses will be determined by the attending physician or veterinarian.

Therapeutic compositions of the present invention can be administered to any animal, preferably to mammals and birds. Preferred mammals include humans, dogs, cats, mice, rats, rabbits sheep, cattle, horses and pigs, with humans being particularly preferred.

Biological Activities

Polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention, can be used in assays to test for one or more biological activities. If these polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention, do exhibit activity in a particular assay, it is likely that these molecules may be involved in the diseases associated with the biological activity. Thus, the polynucleotides and polypeptides, and agonists or antagonists could be used to treat the associated disease.

Members of the IL-6-like family of proteins are believed to be involved in biological activities associated with cytokine responses. Accordingly, compositions of the invention (including polynucleotides, polypeptides and antibodies of the invention, and fragments and variants thereof) may be used in the diagnosis, detection and/or treatment of diseases and/or

disorders associated with aberrant IL-6-like activity. In preferred embodiments, compositions of the invention (including polynucleotides, polypeptides and antibodies of the invention, and fragments and variants thereof) may be used in the diagnosis, detection and/or treatment of diseases and/or disorders relating to immune system disorders (e.g., inflammatory disorders, autoimmune disorders, AIDS, T-cell proliferative disorders, and/or as described under "Immune activity" below), neural disorders (e.g., as described under "Neural Activity and Neurological Diseases" below), infectious diseases (e.g., as described in "Infectious Disease" below), osteoporosis, and hyperproliferative disorders (e.g., plasmacytoma/myeloma, Castleman's disease, mesangial proliferative glomerulonephritis, and/or as described under "Hyperproliferative Disorders" below). Thus, polynucleotides, translation products and antibodies of the invention are useful in the diagnosis, detection and/or treatment of diseases and/or disorders associated with activities that include, but are not limited to, immune system disorders, neural disorders, infectious diseases, inflammatory disorders, autoimmune disorders, AIDS, T-cell proliferative disorders, osteoporosis, hyperproliferative disorders, plasmacytoma/myeloma, Castleman's disease, and mesangial proliferative glomerulonephritis.

More generally, polynucleotides, translation products and antibodies corresponding to this gene may be useful for the diagnosis, detection and/or treatment of diseases and/or disorders associated with the following systems.

Immune Activity

Polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention may be useful in treating, preventing, and/or diagnosing diseases, disorders, and/or conditions of the immune system, by, for example, activating or inhibiting the proliferation, differentiation, or mobilization (chemotaxis) of immune cells. Immune cells develop through a process called hematopoiesis, producing myeloid (platelets, red blood cells, neutrophils, and macrophages) and lymphoid (B and T lymphocytes) cells from pluripotent stem cells. The etiology of these immune diseases, disorders, and/or conditions may be genetic, somatic, such as cancer and some autoimmune diseases, acquired (e.g., by chemotherapy or toxins), or infectious. Moreover, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention can be used as a marker or detector of a particular immune system disease or disorder.

In another embodiment, a polypeptide of the invention, or polynucleotides, antibodies, agonists, or antagonists corresponding to that polypeptide, may be used to treat diseases and disorders of the immune system and/or to inhibit or enhance an immune response generated by cells associated with the tissue(s) in which the polypeptide of the invention is expressed, including the tissues disclosed in the section entitled "Polynucleotides and Polypeptides of the Invention".

Polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention may be useful in treating, preventing, and/or diagnosing immunodeficiencies, including both congenital and acquired immunodeficiencies. Examples of B cell immunodeficiencies in which immunoglobulin levels B cell function and/or B cell numbers are decreased include: X-linked agammaglobulinemia (Bruton's disease), X-linked infantile agammaglobulinemia, X-linked immunodeficiency with hyper IgM, non X-linked immunodeficiency with hyper IgM, X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP), agammaglobulinemia including congenital and acquired agammaglobulinemia, adult onset agammaglobulinemia, late-onset agammaglobulinemia, dysgammaglobulinemia, hypogammaglobulinemia, unspecified hypogammaglobulinemia, recessive agammaglobulinemia (Swiss type), Selective IgM deficiency, selective IgA deficiency, selective IgG subclass deficiencies, IgG subclass deficiency (with or without IgA deficiency), Ig deficiency with increased IgM, IgG and IgA deficiency with increased IgM, antibody deficiency with normal or elevated Igs, Ig heavy chain deletions, kappa chain deficiency, B cell lymphoproliferative disorder (BLPD), common variable immunodeficiency (CVID), common variable immunodeficiency (CVI) (acquired), and transient hypogammablobulinemia of infancy.

In specific embodiments, ataxia-telangiectasia or conditions associated with ataxia-telangiectasia are ameliorated or treated by administering the polypeptides or polynucleotides of the invention, and/or agonists thereof.

Examples of congentital immunodeficiencies in which T cell and/or B cell function and/or number is decreased include, but are not limited to: DiGeorge anomaly, severe combined immunodeficiencies (SCID) (including, but not limited to, X-linked SCID, autosomal recessive SCID, adenosine deaminase deficiency, purine nucleoside phosphorylase (PNP) deficiency, Class II MHC deficiency (Bare lymphocyte syndrome), Wiskott-Aldrich syndrome, and ataxia telangiectasia), thymic hypoplasia, third and fourth pharyngeal pouch

syndrome, 22q11.2 deletion, chronic mucocutaneous candidiasis, natural killer cell deficiency (NK), idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia, immunodeficiency with predominant T cell defect (unspecified), and unspecified immunodeficiency of cell mediated immunity.

In specific embodiments, DiGeorge anomaly or conditions associated with DiGeorge anomaly are ameliorated or treated by, for example, administering the polypeptides or polynucleotides of the invention, or antagonists or agonists thereof.

Other immunodeficiencies that may be ameliorated or treated by administering polypeptides or polynucleotides of the invention, and/or agonists thereof, include, but are not limited to, Chronic granulomatous disease, Chédiak-Higashi syndrome, Myeloperoxidase deficiency, Leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase Deficiency, X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP), leukocyte adhesion deficiency, complement component deficiencies (including C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 and/or C9 deficiencies), reticular dysgenesis, thymic alymphoplasia-aplasia, immunodeficiency with thymoma, severe congenital leukopenia, dysplasia with immunodeficiency, neonatal neutropenia, short limbed dwarfism, and Nezelof syndrome-combined immunodeficiency with Igs.

In a preferred embodiment, the immunodeficiencies and/or conditions associated with the immunodeficiencies recited above are treated, prevented, and/or diagnosed using polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention.

In a preferred embodiment polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention could be used as an agent to boost immunoresponsiveness among immunodeficient individuals. In specific embodiments, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention could be used as an agent to boost immunoresponsiveness among B cell and/or T cell immunodeficient individuals.

The polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention may be useful in treating, preventing, and/or diagnosing autoimmune disorders. Many autoimmune disorders result from inappropriate recognition of self as foreign material by immune cells. This inappropriate recognition results in an immune response leading to the destruction of the host tissue. Therefore, the administration of polynucleotides and polypeptides of the invention that can inhibit an immune response,

particularly the proliferation, differentiation, or chemotaxis of T-cells, may be an effective therapy in preventing autoimmune disorders.

Autoimmune diseases or disorders that may be treated, prevented, and/or diagnosed by polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention include, but are not limited to, one or more of the following: systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, multiple sclerosis, autoimmune thyroiditis, Hashimoto's thyroiditis, autoimmune hemolytic anemia, hemolytic anemia, thrombocytopenia, autoimmune thrombocytopenia purpura, autoimmune neonatal thrombocytopenia, idiopathic thrombocytopenia purpura, purpura (e.g., Henloch-Scoenlein purpura), autoimmunocytopenia, Goodpasture's syndrome, Pemphigus vulgaris, myasthenia gravis, Grave's disease (hyperthyroidism), and insulin-resistant diabetes mellitus.

Additional disorders that are likely to have an autoimmune component that may be treated, prevented, and/or diagnosed with the compositions of the invention include, but are not limited to, type II collagen-induced arthritis, antiphospholipid syndrome, dermatitis, allergic encephalomyelitis, myocarditis, relapsing polychondritis, rheumatic heart disease, Neuritis, Uveitis Ophthalmia, Polyendocrinopathies, Reiter's Disease, Stiff-Man Syndrome, Autoimmune Pulmonary Inflammation, Autism, Guillain-Barre Syndrome, insulin dependent diabetes mellitis, and autoimmune inflammatory eye.

Additional disorders that are likely to have an autoimmune component that may be treated, prevented, and/or diagnosed with the compositions of the invention include, but are not limited to, scleroderma with anti-collagen antibodies (often characterized, e.g., by nucleolar and other nuclear antibodies), mixed connective tissue disease (often characterized, e.g., by antibodies to extractable nuclear antigens (e.g., ribonucleoprotein)), polymyositis (often characterized, e.g., by nonhistone ANA), pernicious anemia (often characterized, e.g., by antiparietal cell, microsomes, and intrinsic factor antibodies), idiopathic Addison's disease (often characterized, e.g., by humoral and cell-mediated adrenal cytotoxicity, infertility (often characterized, e.g., by antispermatozoal antibodies), glomerulonephritis (often characterized, e.g., by glomerular basement membrane antibodies or immune complexes), bullous pemphigoid (often characterized, e.g., by IgG and complement in basement membrane), Sjogren's syndrome (often characterized, e.g., by multiple tissue antibodies, and/or a specific nothistone ANA (SS-B)), diabetes millitus (often characterized, e.g., by cell-mediated and humoral islet cell antibodies), and adrenergic drug resistance (including adrenergic drug

resistance with asthma or cystic fibrosis) (often characterized, e.g., by beta-adrenergic receptor antibodies).

Additional disorders that may have an autoimmune component that may be treated, prevented, and/or diagnosed with the compositions of the invention include, but are not limited to, chronic active hepatitis (often characterized, e.g., by smooth muscle antibodies), primary biliary cirrhosis (often characterized, e.g., by mitchondrial antibodies), other endocrine gland failure (often characterized, e.g., by specific tissue antibodies in some cases), vitiligo (often characterized, e.g., by melanocyte antibodies), vasculitis (often characterized, e.g., by Ig and complement in vessel walls and/or low serum complement), post-MI (often characterized, e.g., by myocardial antibodies), cardiotomy syndrome (often characterized, e.g., by myocardial antibodies), urticaria (often characterized, e.g., by IgG and IgM antibodies to IgE), atopic dermatitis (often characterized, e.g., by IgG and IgM antibodies to IgE), asthma (often characterized, e.g., by IgG and IgM antibodies to IgE), and many other inflammatory, granulamatous, degenerative, and atrophic disorders.

In a preferred embodiment, the autoimmune diseases and disorders and/or conditions associated with the diseases and disorders recited above are treated, prevented, and/or diagnosed using for example, antagonists or agonists, polypeptides or polynucleotides, or antibodies of the present invention. In a specific preferred embodiment, rheumatoid arthritis is treated, prevented, and/or diagnosed using polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention. In another specific preferred embodiment, systemic lupus erythemosus is treated, prevented, and/or diagnosed using polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention. In another specific preferred embodiment, idiopathic thrombocytopenia purpura is treated, prevented, and/or diagnosed using polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention. In another specific preferred embodiment IgA nephropathy is treated, prevented, and/or diagnosed using polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention.

In a preferred embodiment, the autoimmune diseases and disorders and/or conditions associated with the diseases and disorders recited above are treated, prevented, and/or diagnosed using polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention

In preferred embodiments, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a immunosuppressive agent(s).

Polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention may be useful in treating, preventing, and/or diagnosing diseases, disorders, and/or conditions of hematopoietic cells. Polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention could be used to increase differentiation and proliferation of hematopoietic cells, including the pluripotent stem cells, in an effort to treat or prevent those diseases, disorders, and/or conditions associated with a decrease in certain (or many) types hematopoietic cells, including but not limited to, leukopenia, neutropenia, anemia, thrombocytopenia. Alternatively, Polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention could be used to increase differentiation and proliferation of hematopoietic cells, including the pluripotent stem cells, in an effort to treat or prevent those diseases, disorders, and/or conditions associated with a increase in certain (or many) types hematopoietic cells, including but not limited to, histiocytosis.

Allergic reactions and conditions, such as asthma (particularly allergic asthma) or other respiratory problems, may also be treated, prevented, and/or diagnosed using polypeptides, antibodies, or polynucleotides of the invention, and/or agonists or antagonists thereof. Moreover, these molecules can be used to treat, prevent, and/or diagnose anaphylaxis, hypersensitivity to an antigenic molecule, or blood group incompatibility.

Additionally, polypeptides or polynucleotides of the invention, and/or agonists thereof, may be used to treat or prevent IgE-mediated allergic reactions. Such allergic reactions include, but are not limited to, asthma, rhinitis, and eczema. In specific embodiments, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention may be used to modulate IgE concentrations in vitro or in vivo.

Moreover, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention have uses in the diagnosis, prognosis, prevention, and/or treatment of inflammatory conditions. For example, since polypeptides, antibodies, or polynucleotides of the invention, and/or agonists or antagonists of the invention may inhibit the activation, proliferation and/or differentiation of cells involved in an inflammatory response, these molecules can be used to diagnose, prognose, prevent, and/or treat chronic and acute inflammatory conditions. Such inflammatory conditions include, but are not limited to, for example, inflammation associated with infection (e.g., septic shock, sepsis, or systemic

inflammatory response syndrome), ischemia-reperfusion injury, endotoxin lethality, complement-mediated hyperacute rejection, nephritis, cytokine or chemokine induced lung injury, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, over production of cytokines (e.g., TNF or IL-1.), respiratory disorders (such as, e.g., asthma and allergy); gastrointestinal disorders (such as, e.g., inflammatory bowel disease); cancers (such as, e.g., gastric, ovarian, lung, bladder, liver, and breast); CNS disorders (such as, e.g., multiple sclerosis; ischemic brain injury and/or stroke; traumatic brain injury; neurodegenerative disorders, such as, e.g., Parkinson's disease and Alzheimer's disease; AIDS-related dementia; and prion disease); cardiovascular disorders (such as, e.g., atherosclerosis, myocarditis, cardiovascular disease, and cardiopulmonary bypass complications); as well as many additional diseases, conditions, and disorders that are characterized by inflammation (such as, e.g., hepatitis, rheumatoid arthritis, gout, trauma, pancreatitis, sarcoidosis, dermatitis, renal ischemia-reperfusion injury, Grave's disease, systemic lupus erythematosis, diabetes mellitus, and allogenic transplant rejection).

Because inflammation is a fundamental defense mechanism, inflammatory disorders can effect virtually any tissue of the body. Accordingly, polynucleotides, polypeptides, and antibodies of the invention, as well as agonists or antagonists thereof, have uses in the treatment of tissue-specific inflammatory disorders, including, but not limited to, adrenalitis, alveolitis, angiocholecystitis, appendicitis, balanitis, blepharitis, bronchitis, bursitis, carditis, cellulitis, cervicitis, cholecystitis, chorditis, cochlitis, colitis, conjunctivitis, cystitis, dermatitis, diverticulitis, encephalitis, endocarditis, esophagitis, eustachitis, fibrositis, folliculitis, gastritis, gastroenteritis, gingivitis, glossitis, hepatosplenitis, keratitis, labyrinthitis, laryngitis, lymphangitis, mastitis, media otitis, meningitis, metritis, mucitis, myocarditis, myositiis, myringitis, nephritis, neuritis, orchitis, osteochondritis, otitis, pericarditis, peritendonitis, peritonitis, pharyngitis, phlebitis, poliomyelitis, prostatitis, pulpitis, retinitis, rhinitis, salpingitis, scleritis, sclerochoroiditis, scrotitis, sinusitis, sponylitis, steatitis, stomatitis, synovitis, syringitis, tendonitis, tonsillitis, urethritis, and vaginitis.

In specific embodiments, polypeptides, antibodies, or polynucleotides of the invention, and/or agonists or antagonists thereof, are useful to treat, diagnose, and/or prevent organ transplant rejections and graft-versus-host disease. Organ rejection occurs by host immune cell destruction of the transplanted tissue through an immune response. Similarly, an immune response is also involved in GVHD, but, in this case, the foreign transplanted

immune cells destroy the host tissues. Polypeptides, antibodies, or polynucleotides of the invention, and/or agonists or antagonists thereof, that inhibit an immune response, particularly the activation, proliferation, differentiation, or chemotaxis of T-cells, may be an effective therapy in preventing organ rejection or GVHD. In specific embodiments, polypeptides, antibodies, or polynucleotides of the invention, and/or agonists or antagonists thereof, that inhibit an immune response, particularly the activation, proliferation, differentiation, or chemotaxis of T-cells, may be an effective therapy in preventing experimental allergic and hyperacute xenograft rejection.

In other embodiments, polypeptides, antibodies, or polynucleotides of the invention, and/or agonists or antagonists thereof, are useful to treat, diagnose, and/or prevent immune complex diseases, including, but not limited to, serum sickness, post steptococcal glomerulonephritis, and polyarteritis nodosa, immune complex-induced vasculitis,

Polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the invention can be used to treat, detect, and/or prevent infectious agents. For example, by increasing the immune response, particularly increasing the proliferation activation and/or differentiation of B and/or T cells, infectious diseases may be treated, detected, and/or prevented. The immune response may be increased by either enhancing an existing immune response, or by initiating a new immune response. Alternatively, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention may also directly inhibit the infectious agent (refer to section of application listing infectious agents, etc), without necessarily eliciting an immune response.

In another embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a vaccine adjuvant that enhances immune responsiveness to specific antigen. In a specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an adjuvant to enhance tumor-specific immune responses.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an adjuvant to enhance anti-viral immune responses. Anti-viral immune responses that may be enhanced using the compositions of the invention as an adjuvant, include virus and virus associated diseases or symptoms described herein or otherwise known in the art. In specific embodiments, the compositions of the invention are used as an adjuvant to enhance an immune response to a

virus, disease, or symptom selected from the group consisting of: AIDS, meningitis, Dengue, EBV, and hepatitis (e.g., hepatitis B). In another specific embodiment, the compositions of the invention are used as an adjuvant to enhance an immune response to a virus, disease, or symptom selected from the group consisting of: HIV/AIDS, Respiratory syncytial virus, Dengue, Rotavirus, Japanese B encephalitis, Influenza A and B, Parainfluenza, Measles, Cytomegalovirus, Rabies, Junin, Chikungunya, Rift Valley fever, Herpes simplex, and yellow fever.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an adjuvant to enhance anti-bacterial or anti-fungal immune responses. Anti-bacterial or anti-fungal immune responses that may be enhanced using the compositions of the invention as an adjuvant, include bacteria or fungus and bacteria or fungus associated diseases or symptoms described herein or otherwise known in the art. In specific embodiments, the compositions of the invention are used as an adjuvant to enhance an immune response to a bacteria or fungus, disease, or symptom selected from the group consisting of: tetanus, Diphtheria, botulism, and meningitis type B.

In another specific embodiment, the compositions of the invention are used as an adjuvant to enhance an immune response to a bacteria or fungus, disease, or symptom selected from the group consisting of: *Vibrio cholerae, Mycobacterium leprae, Salmonella typhi, Salmonella paratyphi, Meisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae*, Group B streptococcus, *Shigella spp.*, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Enterohemorrhagic *E. coli*, and *Borrelia burgdorferi*.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an adjuvant to enhance anti-parasitic immune responses. Anti-parasitic immune responses that may be enhanced using the compositions of the invention as an adjuvant, include parasite and parasite associated diseases or symptoms described herein or otherwise known in the art. In specific embodiments, the compositions of the invention are used as an adjuvant to enhance an immune response to a parasite. In another specific embodiment, the compositions of the invention are used as an adjuvant to enhance an immune response to Plasmodium (malaria) or Leishmania.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention may also be employed to treat infectious diseases including silicosis, sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis by, for example, by preventing the recruitment and activation of mononuclear phagocytes.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an antigen for the generation of antibodies to inhibit or enhance immune mediated responses against polypeptides of the invention.

In one embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are administered to an animal (e.g., mouse, rat, rabbit, hamster, guinea pig, pigs, micro-pig, chicken, camel, goat, horse, cow, sheep, dog, cat, non-human primate, and human, most preferably human) to boost the immune system to produce increased quantities of one or more antibodies (e.g., IgG, IgA, IgM, and IgE), to induce higher affinity antibody production and immunoglobulin class switching (e.g., IgG, IgA, IgM, and IgE), and/or to increase an immune response.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a stimulator of B cell responsiveness to pathogens.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an activator of T cells.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an agent that elevates the immune status of an individual prior to their receipt of immunosuppressive therapies.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an agent to induce higher affinity antibodies.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an agent to increase serum immunoglobulin concentrations.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an agent to accelerate recovery of immunocompromised individuals.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an agent to boost immunoresponsiveness among aged populations.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an an immune system enhancer prior to, during, or after bone marrow transplant and/or other transplants (e.g., allogeneic or xenogeneic organ transplantation). With respect to transplantation, compositions of the invention may be administered prior to, concomitant with, and/or after transplantation. In a specific embodiment, compositions of the invention are administered after transplantation, prior to the beginning of recovery of T-cell populations. In another specific embodiment, compositions of the invention are first administered after transplantation after the beginning of recovery of T cell populations, but prior to full recovery of B cell populations.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an agent to boost immunoresponsiveness among individuals having an acquired loss of B cell function. Conditions resulting in an acquired loss of B cell function that may be ameliorated or treated by administering the polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists thereof, include, but are not limited to, HIV Infection, AIDS, bone marrow transplant, and B cell chronic lymphocytic leukemia (CLL).

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an agent to boost immunoresponsiveness among individuals having a temporary immune deficiency. Conditions resulting in a temporary immune deficiency that may be ameliorated or treated by administering the polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists thereof, include, but are not limited to, recovery from viral infections (e.g., influenza), conditions associated with malnutrition, recovery from infectious mononucleosis, or conditions associated with stress, recovery from measles, recovery from blood transfusion, and recovery from surgery.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a regulator of antigen presentation by monocytes, dendritic cells, and/or B-cells. In one embodiment, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention enhance

antigen presentation or antagonizes antigen presentation in vitro or in vivo. Moreover, in related embodiments, said enhancement or antagonization of antigen presentation may be useful as an anti-tumor treatment or to modulate the immune system.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as an agent to direct an individual's immune system towards development of a humoral response (i.e. TH2) as opposed to a TH1 cellular response.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a means to induce tumor proliferation and thus make it more susceptible to anti-neoplastic agents. For example, multiple myeloma is a slowly dividing disease and is thus refractory to virtually all anti-neoplastic regimens. If these cells were forced to proliferate more rapidly their susceptibility profile would likely change.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a stimulator of B cell production in pathologies such as AIDS, chronic lymphocyte disorder and/or Common Variable Immunodificiency.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a therapy for generation and/or regeneration of lymphoid tissues following surgery, trauma or genetic defect. In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as pretreatment of bone marrow samples prior to transplant.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a gene-based therapy for genetically inherited disorders resulting in immuno-incompetence/immunodeficiceney such as observed among SCID patients.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a means of activating monocytes/macrophages to defend against parasitic diseases that effect monocytes such as Leshumania.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a means of regulating secreted cytokines that are elicited by polypeptides of the invention.

All of the above described applications as they may apply to veterinary medicine.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a means of blocking various aspects of immune responses to foreign agents or self. Examples of diseases or conditions in which blocking of certain aspects of immune responses may be desired include autoimmune disorders such as lupus, and arthritis, as well as immunoresponsiveness to skin allergies, inflammation, bowel disease, injury and diseases/disorders associated with pathogens.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a therapy for preventing the B cell proliferation and Ig secretion associated with autoimmune diseases such as idiopathic thrombocytopenic purpura, systemic lupus erythramatosus and multiple sclerosis.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a inhibitor of B and/or T cell migration in endothelial cells. This activity disrupts tissue architecture or cognate responses and is useful, for example in disrupting immune responses, and blocking sepsis.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a therapy for chronic hypergammaglobulinemeia evident in such diseases as monoclonalgammopathy of undetermined significance (MGUS),Waldenstrom's disease, related idiopathic monoclonalgammopathies, and plasmacytomas.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention may be employed for instance to inhibit polypeptide chemotaxis and activation of macrophages and their precursors, and of neutrophils, basophils, B lymphocytes and some T-cell subsets, e.g., activated and CD8 cytotoxic T cells and natural killer cells, in certain autoimmune and chronic inflammatory and infective diseases. Examples of autoimmune diseases are described herein and include multiple sclerosis, and insulin-dependent diabetes.

The polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention may also be employed to treat idiopathic hyper-eosinophilic syndrome by, for example, preventing eosinophil production and migration.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used to enhance or inhibit complement mediated cell lysis.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used to enhance or inhibit antibody dependent cellular cytoxicity.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention may also be employed for treating atherosclerosis, for example, by preventing monocyte infiltration in the artery wall.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention may be employed to treat adult respiratory distress syndrome. (ARDS).

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention may be useful for stimulating wound and tissue repair, stimulating angiogenesis, stimulating the repair of vascular or lymphatic diseases or disorders. Additionally, agonists and antagonists of the invention may be used to stimulate the regeneration of mucosal surfaces.

In a specific embodiment, polynucleotides or polypeptides, and/or agonists thereof are used to treat or prevent a disorder characterized by primary or acquired immunodeficiency, deficient serum immunoglobulin production, recurrent infections, and/or immune system dysfunction. Moreover, polynucleotides or polypeptides, and/or agonists thereof may be used to treat or prevent infections of the joints, bones, skin, and/or parotid glands, blood-borne infections (e.g., sepsis, meningitis, septic arthritis, and/or osteomyelitis), autoimmune diseases (e.g., those disclosed herein), inflammatory disorders, and malignancies, and/or any disease or disorder or condition associated with these infections, diseases, disorders and/or malignancies) including, but not limited to, CVID, other primary immune deficiencies, HIV disease, CLL, recurrent bronchitis, sinusitis, otitis media, conjunctivitis, pneumonia, hepatitis, meningitis, herpes zoster (e.g., severe herpes zoster), and/or pneumocystis carnii. Other diseases and disorders that may be prevented, diagnosed or

treated with polynucleotides or polypeptides, and/or agonists of the present invention include, but are not limited to, HIV infection, HTLV-BLV infection, lymphopenia, phagocyte bactericidal dysfunctionanemia, thrombocytopenia, and hemoglobinuria.

In another embodiment, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention are used to treat, and/or diagnose an individual having common variable immunodeficiency disease ("CVID"; also known as "acquired agammaglobulinemia" and "acquired hypogammaglobulinemia") or a subset of this disease.

In a specific embodiment, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention may be used to treat, diagnose, and/or prevent cancers or neoplasms including autoimmune cell or tissue-related cancers or neoplasms. Examples of cancers or neoplasms that may be prevented, diagnosed, or treated by polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention are described herein and include acute myelogenous leukemia, chronic myelogeneous leukemia, Hodgkins disease, non-Hodgkins lymphoma, acute lymphocytic anemia (ALL) Chronic lymphocyte leukemia, plasmacytomas, multiple myeloma, Burkitt's lymphoma, and EBV-transformed diseases. In a preferred embodiment, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention conjugated to a toxin or a radioactive isotope, as described herein, may be used to treat, diagnose, and/or prevent cancers and neoplasms. In a further preferred embodiment, polynucleotides, polypeptides, antibodies, and/or agonists or antagonists of the present invention conjugated to a toxin or a radioactive isotope, as described herein, may be used to treat, diagnose, and/or prevent, acute myelogenous leukemia.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a therapy for decreasing cellular proliferation of Large B-cell Lymphomas.

In another specific embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are used as a means of decreasing the involvement of B cells and Ig associated with Chronic Myelogenous Leukemia.

In specific embodiments, the compositions of the invention are used as an agent to boost immunoresponsiveness among B cell immunodeficient individuals, such as, for example, an individual who has undergone a partial or complete splenectomy.

Antagonists of the invention include, for example, binding and/or inhibitory antibodies, antisense nucleic acids, ribozymes or soluble forms of the polypeptides of the present invention (e.g., Fc fusion protein) (see e.g., Example 9). Agonists of the invention include, for example, binding or stimulatory antibodies, and soluble forms of the polypeptides (e.g., Fc fusion proteins) (see e.g., Example 9). polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention may be employed in a composition with a pharmaceutically acceptable carrier, e.g., as described herein.

In another embodiment, polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention are administered to an animal (including, but not limited to, those listed above, and also including transgenic animals) incapable of producing functional endogenous antibody molecules or having an otherwise compromised endogenous immune system, but which is capable of producing human immunoglobulin molecules by means of a reconstituted or partially reconstituted immune system from another animal (see, e.g., published PCT Application Nos. WO98/24893, WO/9634096, WO/9633735, and WO/9110741. Administration of polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention to such animals is useful for the generation of monoclonal antibodies against the polypeptides, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the present invention.

Additionally, polynucleotides, polypeptides, and/or antagonists of the invention may affect apoptosis, and therefore, would be useful in treating a number of diseases associated with increased cell survival or the inhibition of apoptosis. For example, diseases associated with increased cell survival or the inhibition of apoptosis that could be treated or detected by polynucleotides, polypeptides, and/or antagonists of the invention, include cancers (such as follicular lymphomas, carcinomas with p53 mutations, and hormone-dependent tumors, including, but not limited to colon cancer, cardiac tumors, pancreatic cancer, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, lung cancer, intestinal cancer, testicular cancer, stomach cancer, neuroblastoma, myxoma, myoma, lymphoma, endothelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, chondrosarcoma, adenoma, breast cancer, prostate cancer, Kaposi's sarcoma and ovarian cancer); autoimmune disorders such as, multiple sclerosis, Sjogren's syndrome, Hashimoto's thyroiditis, biliary cirrhosis, Behcet's disease, Crohn's disease, polymyositis, systemic lupus erythematosus and immune-related glomerulonephritis and rheumatoid arthritis) and viral infections (such as herpes viruses, pox viruses and

adenoviruses), inflammation, graft v. host disease, acute graft rejection, and chronic graft rejection.

In preferred embodiments, polynucleotides, polypeptides, and/or antagonists of the invention are used to inhibit growth, progression, and/or metastisis of cancers, in particular those listed above.

Additional diseases or conditions associated with increased cell survival that could be treated or detected by polynucleotides, polypeptides, and/or antagonists of the invention, include, but are not limited to, progression, and/or metastases of malignancies and related disorders such as leukemia (including acute leukemias (e.g., acute lymphocytic leukemia, acute myelocytic leukemia (including myeloblastic, promyelocytic, myelomonocytic, monocytic, and erythroleukemia)) and chronic leukemias (e.g., chronic myelocytic (granulocytic) leukemia and chronic lymphocytic leukemia)), polycythemia vera, lymphomas (e.g., Hodgkin's disease and non-Hodgkin's disease), multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia, heavy chain disease, and solid tumors including, but not limited to, sarcomas and carcinomas such as fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma,basal cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma, choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, Wilm's tumor, cervical cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, medulloblastoma, craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, emangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, and retinoblastoma.

Diseases associated with increased apoptosis that could be treated or detected by polynucleotides, polypeptides, and/or antagonists of the invention, include AIDS; neurodegenerative disorders (such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Amyotrophic lateral sclerosis, Retinitis pigmentosa, Cerebellar degeneration and brain tumor or prior associated disease); autoimmune disorders (such as, multiple sclerosis, Sjogren's syndrome,

Hashimoto's thyroiditis, biliary cirrhosis, Behcet's disease, Crohn's disease, polymyositis, systemic lupus erythematosus and immune-related glomerulonephritis and rheumatoid arthritis) myelodysplastic syndromes (such as aplastic anemia), graft v. host disease, ischemic injury (such as that caused by myocardial infarction, stroke and reperfusion injury), liver injury (e.g., hepatitis related liver injury, ischemia/reperfusion injury, cholestasis (bile duct injury) and liver cancer); toxin-induced liver disease (such as that caused by alcohol), septic shock, cachexia and anorexia.

Hyperproliferative diseases and/or disorders that could be detected and/or treated by polynucleotides, polypeptides, and/or antagonists of the invention, include, but are not limited to neoplasms located in the: liver, abdomen, bone, breast, digestive system, pancreas, peritoneum, endocrine glands (adrenal, parathyroid, pituitary, testicles, ovary, thymus, thyroid), eye, head and neck, nervous (central and peripheral), lymphatic system, pelvic, skin, soft tissue, spleen, thoracic, and urogenital.

Similarly, other hyperproliferative disorders can also be treated or detected by polynucleotides, polypeptides, and/or antagonists of the invention. Examples of such hyperproliferative disorders include, but are not limited to: hypergammaglobulinemia, lymphoproliferative disorders, paraproteinemias, purpura, sarcoidosis, Sezary Syndrome, Waldenstron's Macroglobulinemia, Gaucher's Disease, histiocytosis, and any other hyperproliferative disease, besides neoplasia, located in an organ system listed above.

Hyperproliferative Disorders

Polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention can be used to treat or detect hyperproliferative disorders, including neoplasms. Polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention may inhibit the proliferation of the disorder through direct or indirect interactions. Alternatively, Polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention may proliferate other cells which can inhibit the hyperproliferative disorder.

For example, by increasing an immune response, particularly increasing antigenic qualities of the hyperproliferative disorder or by proliferating, differentiating, or mobilizing T-cells, hyperproliferative disorders can be treated. This immune response may be increased by either enhancing an existing immune response, or by initiating a new immune response.

Alternatively, decreasing an immune response may also be a method of treating hyperproliferative disorders, such as a chemotherapeutic agent.

Examples of hyperproliferative disorders that can be treated or detected by Polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention include, but are not limited to neoplasms located in the: colon, abdomen, bone, breast, digestive system, liver, pancreas, peritoneum, endocrine glands (adrenal, parathyroid, pituitary, testicles, ovary, thymus, thyroid), eye, head and neck, nervous (central and peripheral), lymphatic system, pelvic, skin, soft tissue, spleen, thoracic, and urogenital.

Similarly, other hyperproliferative disorders can also be treated or detected by polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention. Examples of such hyperproliferative disorders include, but are not limited to: hypergammaglobulinemia, lymphoproliferative disorders, paraproteinemias, purpura, sarcoidosis, Sezary Syndrome, Waldenstron's Macroglobulinemia, Gaucher's Disease, histiocytosis, and any other hyperproliferative disease, besides neoplasia, located in an organ system listed above.

One preferred embodiment utilizes polynucleotides of the present invention to inhibit aberrant cellular division, by gene therapy using the present invention, and/or protein fusions or fragments thereof.

Thus, the present invention provides a method for treating cell proliferative disorders by inserting into an abnormally proliferating cell a polynucleotide of the present invention, wherein said polynucleotide represses said expression.

Another embodiment of the present invention provides a method of treating cell-proliferative disorders in individuals comprising administration of one or more active gene copies of the present invention to an abnormally proliferating cell or cells. In a preferred embodiment, polynucleotides of the present invention is a DNA construct comprising a recombinant expression vector effective in expressing a DNA sequence encoding said polynucleotides. In another preferred embodiment of the present invention, the DNA construct encoding the poynucleotides of the present invention is inserted into cells to be treated utilizing a retrovirus, or more preferrably an adenoviral vector (See G J. Nabel, et. al., PNAS 1999 96: 324-326, which is hereby incorporated by reference). In a most preferred embodiment, the viral vector is defective and will not transform non-proliferating cells, only proliferating cells. Moreover, in a preferred embodiment, the polynucleotides of the present

invention inserted into proliferating cells either alone, or in combination with or fused to other polynucleotides, can then be modulated via an external stimulus (i.e. magnetic, specific small molecule, chemical, or drug administration, etc.), which acts upon the promoter upstream of said polynucleotides to induce expression of the encoded protein product. As such the beneficial therapeutic affect of the present invention may be expressly modulated (i.e. to increase, decrease, or inhibit expression of the present invention) based upon said external stimulus.

The polynucleotides encoding a polypeptide of the present invention may be administered along with other polynucleotides encoding an angiogenic protein. Examples of angiogenic proteins include, but are not limited to, acidic and basic fibroblast growth factors, VEGF-1, VEGF-2, VEGF-3, epidermal growth factor alpha and beta, platelet-derived endothelial cell growth factor, platelet-derived growth factor, tumor necrosis factor alpha, hepatocyte growth factor, insulin like growth factor, colony stimulating factor, macrophage colony stimulating factor, granulocyte/macrophage colony stimulating factor, and nitric oxide synthase.

Polynucleotides of the present invention may be useful in repressing expression of oncogenic genes or antigens. By "repressing expression of the oncogenic genes " is intended the suppression of the transcription of the gene, the degradation of the gene transcript (pre-message RNA), the inhibition of splicing, the destruction of the messenger RNA, the prevention of the post-translational modifications of the protein, the destruction of the protein, or the inhibition of the normal function of the protein.

For local administration to abnormally proliferating cells, polynucleotides of the present invention may be administered by any method known to those of skill in the art including, but not limited to transfection, electroporation, microinjection of cells, or in vehicles such as liposomes, lipofectin, or as naked polynucleotides, or any other method described throughout the specification. The polynucleotide of the present invention may be delivered by known gene delivery systems such as, but not limited to, retroviral vectors (Gilboa, J. Virology 44:845 (1982); Hocke, Nature 320:275 (1986); Wilson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:3014), vaccinia virus system (Chakrabarty et al., Mol. Cell Biol. 5:3403 (1985) or other efficient DNA delivery systems (Yates et al., Nature 313:812 (1985)) known to those skilled in the art. These references are exemplary only and are hereby incorporated by reference. In order to specifically deliver or transfect cells which are abnormally

proliferating and spare non-dividing cells, it is preferable to utilize a retrovirus, or adenoviral (as described in the art and elsewhere herein) delivery system known to those of skill in the art. Since host DNA replication is required for retroviral DNA to integrate and the retrovirus will be unable to self replicate due to the lack of the retrovirus genes needed for its life cycle. Utilizing such a retroviral delivery system for polynucleotides of the present invention will target said gene and constructs to abnormally proliferating cells and will spare the non-dividing normal cells.

The polynucleotides of the present invention may be delivered directly to cell proliferative disorder/disease sites in internal organs, body cavities and the like by use of imaging devices used to guide an injecting needle directly to the disease site. The polynucleotides of the present invention may also be administered to disease sites at the time of surgical intervention.

By "cell proliferative disease" is meant any human or animal disease or disorder, affecting any one or any combination of organs, cavities, or body parts, which is characterized by single or multiple local abnormal proliferations of cells, groups of cells, or tissues, whether benign or malignant.

Any amount of the polynucleotides of the present invention may be administered as long as it has a biologically inhibiting effect on the proliferation of the treated cells. Moreover, it is possible to administer more than one of the polynucleotide of the present invention simultaneously to the same site. By "biologically inhibiting" is meant partial or total growth inhibition as well as decreases in the rate of proliferation or growth of the cells. The biologically inhibitory dose may be determined by assessing the effects of the polynucleotides of the present invention on target malignant or abnormally proliferating cell growth in tissue culture, tumor growth in animals and cell cultures, or any other method known to one of ordinary skill in the art.

The present invention is further directed to antibody-based therapies which involve administering of anti-polypeptides and anti-polynucleotide antibodies to a mammalian, preferably human, patient for treating one or more of the described disorders. Methods for producing anti-polypeptides and anti-polynucleotide antibodies polyclonal and monoclonal antibodies are described in detail elsewhere herein. Such antibodies may be provided in pharmaceutically acceptable compositions as known in the art or as described herein.

A summary of the ways in which the antibodies of the present invention may be used therapeutically includes binding polynucleotides or polypeptides of the present invention locally or systemically in the body or by direct cytotoxicity of the antibody, e.g. as mediated by complement (CDC) or by effector cells (ADCC). Some of these approaches are described in more detail below. Armed with the teachings provided herein, one of ordinary skill in the art will know how to use the antibodies of the present invention for diagnostic, monitoring or therapeutic purposes without undue experimentation.

In particular, the antibodies, fragments and derivatives of the present invention are useful for treating a subject having or developing cell proliferative and/or differentiation disorders as described herein. Such treatment comprises administering a single or multiple doses of the antibody, or a fragment, derivative, or a conjugate thereof.

The antibodies of this invention may be advantageously utilized in combination with other monoclonal or chimeric antibodies, or with lymphokines or hematopoietic growth factors, for example., which serve to increase the number or activity of effector cells which interact with the antibodies.

It is preferred to use high affinity and/or potent in vivo inhibiting and/or neutralizing antibodies against polypeptides or polynucleotides of the present invention, fragments or regions thereof, for both immunoassays directed to and therapy of disorders related to polynucleotides or polypeptides, including fragements thereof, of the present invention. Such antibodies, fragments, or regions, will preferably have an affinity for polynucleotides or polypeptides, including fragements thereof. Preferred binding affinities include those with a dissociation constant or Kd less than $5X10^{-6}$M, 10^{-6}M, $5X10^{-7}$M, 10^{-7}M, $5X10^{-8}$M, 10^{-8}M, $5X10^{-9}$M, 10^{-9}M, $5X10^{-10}$M, 10^{-10}M, $5X10^{-11}$M, 10^{-11}M, $5X10^{-12}$M, 10^{-12}M, $5X10^{-13}$M, 10^{-13}M, $5X10^{-14}$M, 10^{-14}M, $5X10^{-15}$M, and 10^{-15}M.

Moreover, polypeptides of the present invention are useful in inhibiting the angiogenesis of proliferative cells or tissues, either alone, as a protein fusion, or in combination with other polypeptides directly or indirectly, as described elsewhere herein. In a most preferred embodiment, said anti-angiogenesis effect may be achieved indirectly, for example, through the inhibition of hematopoietic, tumor-specific cells, such as tumor-associated macrophages (See Joseph IB, et al. J Natl Cancer Inst, 90(21):1648-53 (1998), which is hereby incorporated by reference). Antibodies directed to polypeptides or polynucleotides of the present invention may also result in inhibition of angiogenesis directly,

or indirectly (See Witte L, et al., Cancer Metastasis Rev. 17(2):155-61 (1998), which is hereby incorporated by reference)).

Polypeptides, including protein fusions, of the present invention, or fragments thereof may be useful in inhibiting proliferative cells or tissues through the induction of apoptosis. Said polypeptides may act either directly, or indirectly to induce apoptosis of proliferative cells and tissues, for example in the activation of a death-domain receptor, such as tumor necrosis factor (TNF) receptor-1, CD95 (Fas/APO-1), TNF-receptor-related apoptosis-mediated protein (TRAMP) and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-1 and -2 (See Schulze-Osthoff K, et.al., Eur J Biochem 254(3):439-59 (1998), which is hereby incorporated by reference). Moreover, in another preferred embodiment of the present invention, said polypeptides may induce apoptosis through other mechanisms, such as in the activation of other proteins which will activate apoptosis, or through stimulating the expression of said proteins, either alone or in combination with small molecule drugs or adjuviants, such as apoptonin, galectins, thioredoxins, antiinflammatory proteins (See for example, Mutat Res 400(1-2):447-55 (1998), Med Hypotheses.50(5):423-33 (1998), Chem Biol Interact. Apr 24;111-112:23-34 (1998), J Mol Med.76(6):402-12 (1998), Int J Tissue React;20(1):3-15 (1998), which are all hereby incorporated by reference).

Polypeptides, including protein fusions to, or fragments thereof, of the present invention are useful in inhibiting the metastasis of proliferative cells or tissues. Inhibition may occur as a direct result of administering polypeptides, or antibodies directed to said polypeptides as described elsewere herein, or indirectly, such as activating the expression of proteins known to inhibit metastasis, for example alpha 4 integrins, (See, e.g., Curr Top Microbiol Immunol 1998;231:125-41, which is hereby incorporated by reference). Such thereapeutic affects of the present invention may be achieved either alone, or in combination with small molecule drugs or adjuvants.

In another embodiment, the invention provides a method of delivering compositions containing the polypeptides of the invention (e.g., compositions containing polypeptides or polypeptide antibodes associated with heterologous polypeptides, heterologous nucleic acids, toxins, or prodrugs) to targeted cells expressing the polypeptide of the present invention. Polypeptides or polypeptide antibodes of the invention may be associated with with heterologous polypeptides, heterologous nucleic acids, toxins, or prodrugs via hydrophobic, hydrophilic, ionic and/or covalent interactions.

Polypeptides, protein fusions to, or fragments thereof, of the present invention are useful in enhancing the immunogenicity and/or antigenicity of proliferating cells or tissues, either directly, such as would occur if the polypeptides of the present invention 'vaccinated' the immune response to respond to proliferative antigens and immunogens, or indirectly, such as in activating the expression of proteins known to enhance the immune response (e.g. chemokines), to said antigens and immunogens.

Cardiovascular Disorders

Polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention, may be used to treat cardiovascular disorders, including peripheral artery disease, such as limb ischemia.

Cardiovascular disorders include cardiovascular abnormalities, such as arterio-arterial fistula, arteriovenous fistula, cerebral arteriovenous malformations, congenital heart defects, pulmonary atresia, and Scimitar Syndrome. Congenital heart defects include aortic coarctation, cor triatriatum, coronary vessel anomalies, crisscross heart, dextrocardia, patent ductus arteriosus, Ebstein's anomaly, Eisenmenger complex, hypoplastic left heart syndrome, levocardia, tetralogy of fallot, transposition of great vessels, double outlet right ventricle, tricuspid atresia, persistent truncus arteriosus, and heart septal defects, such as aortopulmonary septal defect, endocardial cushion defects, Lutembacher's Syndrome, trilogy of Fallot, ventricular heart septal defects.

Cardiovascular disorders also include heart disease, such as arrhythmias, carcinoid heart disease, high cardiac output, low cardiac output, cardiac tamponade, endocarditis (including bacterial), heart aneurysm, cardiac arrest, congestive heart failure, congestive cardiomyopathy, paroxysmal dyspnea, cardiac edema, heart hypertrophy, congestive cardiomyopathy, left ventricular hypertrophy, right ventricular hypertrophy, post-infarction heart rupture, ventricular septal rupture, heart valve diseases, myocardial diseases, myocardial ischemia, pericardial effusion, pericarditis (including constrictive and tuberculous), pneumopericardium, postpericardiotomy syndrome, pulmonary heart disease, rheumatic heart disease, ventricular dysfunction, hyperemia, cardiovascular pregnancy complications, Scimitar Syndrome, cardiovascular syphilis, and cardiovascular tuberculosis.

Arrhythmias include sinus arrhythmia, atrial fibrillation, atrial flutter, bradycardia, extrasystole, Adams-Stokes Syndrome, bundle-branch block, sinoatrial block, long QT

syndrome, parasystole, Lown-Ganong-Levine Syndrome, Mahaim-type pre-excitation syndrome, Wolff-Parkinson-White syndrome, sick sinus syndrome, tachycardias, and ventricular fibrillation. Tachycardias include paroxysmal tachycardia, supraventricular tachycardia, accelerated idioventricular rhythm, atrioventricular nodal reentry tachycardia, ectopic atrial tachycardia, ectopic junctional tachycardia, sinoatrial nodal reentry tachycardia, sinus tachycardia, Torsades de Pointes, and ventricular tachycardia.

Heart valve disease include aortic valve insufficiency, aortic valve stenosis, hear murmurs, aortic valve prolapse, mitral valve prolapse, tricuspid valve prolapse, mitral valve insufficiency, mitral valve stenosis, pulmonary atresia, pulmonary valve insufficiency, pulmonary valve stenosis, tricuspid atresia, tricuspid valve insufficiency, and tricuspid valve stenosis.

Myocardial diseases include alcoholic cardiomyopathy, congestive cardiomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy, aortic subvalvular stenosis, pulmonary subvalvular stenosis, restrictive cardiomyopathy, Chagas cardiomyopathy, endocardial fibroelastosis, endomyocardial fibrosis, Kearns Syndrome, myocardial reperfusion injury, and myocarditis.

Myocardial ischemias include coronary disease, such as angina pectoris, coronary aneurysm, coronary arteriosclerosis, coronary thrombosis, coronary vasospasm, myocardial infarction and myocardial stunning.

Cardiovascular diseases also include vascular diseases such as aneurysms, angiodysplasia, angiomatosis, bacillary angiomatosis, Hippel-Lindau Disease, Klippel-Trenaunay-Weber Syndrome, Sturge-Weber Syndrome, angioneurotic edema, aortic diseases, Takayasu's Arteritis, aortitis, Leriche's Syndrome, arterial occlusive diseases, arteritis, enarteritis, polyarteritis nodosa, cerebrovascular disorders, diabetic angiopathies, diabetic retinopathy, embolisms, thrombosis, erythromelalgia, hemorrhoids, hepatic veno-occlusive disease, hypertension, hypotension, ischemia, peripheral vascular diseases, phlebitis, pulmonary veno-occlusive disease, Raynaud's disease, CREST syndrome, retinal vein occlusion, Scimitar syndrome, superior vena cava syndrome, telangiectasia, atacia telangiectasia, hereditary hemorrhagic telangiectasia, varicocele, varicose veins, varicose ulcer, vasculitis, and venous insufficiency.

Aneurysms include dissecting aneurysms, false aneurysms, infected aneurysms, ruptured aneurysms, aortic aneurysms, cerebral aneurysms, coronary aneurysms, heart aneurysms, and iliac aneurysms.

Arterial occlusive diseases include arteriosclerosis, intermittent claudication, carotid stenosis, fibromuscular dysplasias, mesenteric vascular occlusion, Moyamoya disease, renal artery obstruction, retinal artery occlusion, and thromboangiitis obliterans.

Cerebrovascular disorders include carotid artery diseases, cerebral amyloid angiopathy, cerebral aneurysm, cerebral anoxia, cerebral arteriosclerosis, cerebral arteriovenous malformation, cerebral artery diseases, cerebral embolism and thrombosis, carotid artery thrombosis, sinus thrombosis, Wallenberg's syndrome, cerebral hemorrhage, epidural hematoma, subdural hematoma, subaraxhnoid hemorrhage, cerebral infarction, cerebral ischemia (including transient), subclavian steal syndrome, periventricular leukomalacia, vascular headache, cluster headache, migraine, and vertebrobasilar insufficiency.

Embolisms include air embolisms, amniotic fluid embolisms, cholesterol embolisms, blue toe syndrome, fat embolisms, pulmonary embolisms, and thromoboembolisms. Thrombosis include coronary thrombosis, hepatic vein thrombosis, retinal vein occlusion, carotid artery thrombosis, sinus thrombosis, Wallenberg's syndrome, and thrombophlebitis.

Ischemia includes cerebral ischemia, ischemic colitis, compartment syndromes, anterior compartment syndrome, myocardial ischemia, reperfusion injuries, and peripheral limb ischemia. Vasculitis includes aortitis, arteritis, Behcet's Syndrome, Churg-Strauss Syndrome, mucocutaneous lymph node syndrome, thromboangiitis obliterans, hypersensitivity vasculitis, Schoenlein-Henoch purpura, allergic cutaneous vasculitis, and Wegener's granulomatosis.

Polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention, are especially effective for the treatment of critical limb ischemia and coronary disease.

Polypeptides may be administered using any method known in the art, including, but not limited to, direct needle injection at the delivery site, intravenous injection, topical administration, catheter infusion, biolistic injectors, particle accelerators, gelfoam sponge depots, other commercially available depot materials, osmotic pumps, oral or suppositorial solid pharmaceutical formulations, decanting or topical applications during surgery, aerosol delivery. Such methods are known in the art. Polypeptides may be administered as part of a Therapeutic, described in more detail below. Methods of delivering polynucleotides are described in more detail herein.

Anti-Angiogenesis Activity

The naturally occurring balance between endogenous stimulators and inhibitors of angiogenesis is one in which inhibitory influences predominate. Rastinejad *et al.*, *Cell 56*:345-355 (1989). In those rare instances in which neovascularization occurs under normal physiological conditions, such as wound healing, organ regeneration, embryonic development, and female reproductive processes, angiogenesis is stringently regulated and spatially and temporally delimited. Under conditions of pathological angiogenesis such as that characterizing solid tumor growth, these regulatory controls fail. Unregulated angiogenesis becomes pathologic and sustains progression of many neoplastic and non-neoplastic diseases. A number of serious diseases are dominated by abnormal neovascularization including solid tumor growth and metastases, arthritis, some types of eye disorders, and psoriasis. See, e.g., reviews by Moses *et al.*, *Biotech. 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. Opthalmol. 94*:715-743 (1982); and Folkman *et al.*, Science *221*:719-725 (1983). In a number of pathological conditions, the process of angiogenesis contributes to the disease state. For example, significant data have accumulated which suggest that the growth of solid tumors is dependent on angiogenesis. Folkman and Klagsbrun, *Science 235*:442-447 (1987).

The present invention provides for treatment of diseases or disorders associated with neovascularization by administration of the polynucleotides and/or polypeptides of the invention, as well as agonists or antagonists of the present invention. Malignant and metastatic conditions which can be treated with the polynucleotides and polypeptides, or agonists or antagonists of the invention include, but are not limited to, malignancies, solid tumors, and cancers described herein and otherwise known in the art (for a review of such disorders, see Fishman *et al.*, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)).Thus, the present invention provides a method of treating an angiogenesis-related disease and/or disorder, comprising administering to an individual in need thereof a therapeutically effective amount of a polynucleotide, polypeptide, antagonist and/or agonist of the invention. For example, polynucleotides, polypeptides, antagonists and/or agonists may be utilized in a variety of additional methods in order to therapeutically treat a cancer or tumor. Cancers which may be treated with polynucleotides, polypeptides, antagonists and/or

agonists include, but are not limited to solid tumors, including prostate, lung, breast, ovarian, stomach, pancreas, larynx, esophagus, testes, liver, parotid, biliary tract, colon, rectum, cervix, uterus, endometrium, kidney, bladder, thyroid cancer; primary tumors and metastases; melanomas; glioblastoma; Kaposi's sarcoma; leiomyosarcoma; non- small cell lung cancer; colorectal cancer; advanced malignancies; and blood born tumors such as leukemias. For example, polynucleotides, polypeptides, antagonists and/or agonists may be delivered topically, in order to treat cancers such as skin cancer, head and neck tumors, breast tumors, and Kaposi's sarcoma.

Within yet other aspects, polynucleotides, polypeptides, antagonists and/or agonists may be utilized to treat superficial forms of bladder cancer by, for example, intravesical administration. Polynucleotides, polypeptides, antagonists and/or agonists may be delivered directly into the tumor, or near the tumor site, via injection or a catheter. Of course, as the artisan of ordinary skill will appreciate, the appropriate mode of administration will vary according to the cancer to be treated. Other modes of delivery are discussed herein.

Polynucleotides, polypeptides, antagonists and/or agonists may be useful in treating other disorders, besides cancers, which involve angiogenesis. These disorders include, but are not limited to: benign tumors, for example hemangiomas, acoustic neuromas, neurofibromas, trachomas, and pyogenic granulomas; atherosclerotic plaques; ocular angiogenic diseases, for example, diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, macular degeneration, corneal graft rejection, neovascular glaucoma, retrolental fibroplasia, rubeosis, retinoblastoma, uvietis and Pterygia (abnormal blood vessel growth) of the eye; rheumatoid arthritis; psoriasis; delayed wound healing; endometriosis; vasculogenesis; granulations; hypertrophic scars (keloids); nonunion fractures; scleroderma; trachoma; vascular adhesions; myocardial angiogenesis; coronary collaterals; cerebral collaterals; arteriovenous malformations; ischemic limb angiogenesis; Osler-Webber Syndrome; plaque neovascularization; telangiectasia; hemophiliac joints; angiofibroma; fibromuscular dysplasia; wound granulation; Crohn's disease; and atherosclerosis.

For example, within one aspect of the present invention methods are provided for treating hypertrophic scars and keloids, comprising the step of administering a polynucleotide, polypeptide, antagonist and/or agonist of the invention to a hypertrophic scar or keloid.

Within one embodiment of the present invention polynucleotides, polypeptides,

antagonists and/or agonists are directly injected into a hypertrophic scar or keloid, in order to prevent the progression of these lesions. This therapy is of particular value in the prophylactic treatment of conditions which are known to result in the development of hypertrophic scars and keloids (e.g., burns), and is preferably initiated after the proliferative phase has had time to progress (approximately 14 days after the initial injury), but before hypertrophic scar or keloid development. As noted above, the present invention also provides methods for treating neovascular diseases of the eye, including for example, corneal neovascularization, neovascular glaucoma, proliferative diabetic retinopathy, retrolental fibroplasia and macular degeneration.

Moreover, Ocular disorders associated with neovascularization which can be treated with the polynucleotides and polypeptides of the present invention (including agonists and/or antagonists) include, but are not limited to: neovascular glaucoma, diabetic retinopathy, retinoblastoma, retrolental fibroplasia, uveitis, retinopathy of prematurity macular degeneration, corneal graft neovascularization, as well as other eye inflammatory diseases, ocular tumors and diseases associated with choroidal or iris neovascularization. See, e.g., reviews by Waltman *et al.*, *Am. J. Ophthal. 85*:704-710 (1978) and Gartner *et al.*, *Surv. Ophthal. 22*:291-312 (1978).

Thus, within one aspect of the present invention methods are provided for treating neovascular diseases of the eye such as corneal neovascularization (including corneal graft neovascularization), comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of a compound (as described above) to the cornea, such that the formation of blood vessels is inhibited. Briefly, the cornea is a tissue which normally lacks blood vessels. In certain pathological conditions however, capillaries may extend into the cornea from the pericorneal vascular plexus of the limbus. When the cornea becomes vascularized, it also becomes clouded, resulting in a decline in the patient's visual acuity. Visual loss may become complete if the cornea completely opacitates. A wide variety of disorders can result in corneal neovascularization, including for example, corneal infections (e.g., trachoma, herpes simplex keratitis, leishmaniasis and onchocerciasis), immunological processes (e.g., graft rejection and Stevens-Johnson's syndrome), alkali burns, trauma, inflammation (of any cause), toxic and nutritional deficiency states, and as a complication of wearing contact lenses.

Within particularly preferred embodiments of the invention, may be prepared for

topical administration in saline (combined with any of the preservatives and antimicrobial agents commonly used in ocular preparations), and administered in eyedrop form. The solution or suspension may be prepared in its pure form and administered several times daily. Alternatively, anti-angiogenic compositions, prepared as described above, may also be administered directly to the cornea. Within preferred embodiments, the anti-angiogenic composition is prepared with a muco-adhesive polymer which binds to cornea. Within further embodiments, the anti-angiogenic factors or anti-angiogenic compositions may be utilized as an adjunct to conventional steroid therapy. Topical therapy may also be useful prophylactically in corneal lesions which are known to have a high probability of inducing an angiogenic response (such as chemical burns). In these instances the treatment, likely in combination with steroids, may be instituted immediately to help prevent subsequent complications.

Within other embodiments, the compounds described above may be injected directly into the corneal stroma by an ophthalmologist under microscopic guidance. The preferred site of injection may vary with the morphology of the individual lesion, but the goal of the administration would be to place the composition at the advancing front of the vasculature (i.e., interspersed between the blood vessels and the normal cornea). In most cases this would involve perilimbic corneal injection to "protect" the cornea from the advancing blood vessels. This method may also be utilized shortly after a corneal insult in order to prophylactically prevent corneal neovascularization. In this situation the material could be injected in the perilimbic cornea interspersed between the corneal lesion and its undesired potential limbic blood supply. Such methods may also be utilized in a similar fashion to prevent capillary invasion of transplanted corneas. In a sustained-release form injections might only be required 2-3 times per year. A steroid could also be added to the injection solution to reduce inflammation resulting from the injection itself.

Within another aspect of the present invention, methods are provided for treating neovascular glaucoma, comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of a polynucleotide, polypeptide, antagonist and/or agonist to the eye, such that the formation of blood vessels is inhibited. In one embodiment, the compound may be administered topically to the eye in order to treat early forms of neovascular glaucoma. Within other embodiments, the compound may be implanted by injection into the region of the anterior chamber angle. Within other embodiments, the compound may also be placed in

any location such that the compound is continuously released into the aqueous humor. Within another aspect of the present invention, methods are provided for treating proliferative diabetic retinopathy, comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of a polynucleotide, polypeptide, antagonist and/or agonist to the eyes, such that the formation of blood vessels is inhibited.

Within particularly preferred embodiments of the invention, proliferative diabetic retinopathy may be treated by injection into the aqueous humor or the vitreous, in order to increase the local concentration of the polynucleotide, polypeptide, antagonist and/or agonist in the retina. Preferably, this treatment should be initiated prior to the acquisition of severe disease requiring photocoagulation.

Within another aspect of the present invention, methods are provided for treating retrolental fibroplasia, comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of a polynucleotide, polypeptide, antagonist and/or agonist to the eye, such that the formation of blood vessels is inhibited. The compound may be administered topically, via intravitreous injection and/or via intraocular implants.

Additionally, disorders which can be treated with the polynucleotides, polypeptides, agonists and/or agonists include, but are not limited to, hemangioma, arthritis, psoriasis, angiofibroma, atherosclerotic plaques, delayed wound healing, granulations, hemophilic joints, hypertrophic scars, nonunion fractures, Osler-Weber syndrome, pyogenic granuloma, scleroderma, trachoma, and vascular adhesions.

Moreover, disorders and/or states, which can be treated with be treated with the the polynucleotides, polypeptides, agonists and/or agonists include, but are not limited to, solid tumors, blood born tumors such as leukemias, tumor metastasis, Kaposi's sarcoma, benign tumors, for example hemangiomas, acoustic neuromas, neurofibromas, trachomas, and pyogenic granulomas, rheumatoid arthritis, psoriasis, ocular angiogenic diseases, for example, diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, macular degeneration, corneal graft rejection, neovascular glaucoma, retrolental fibroplasia, rubeosis, retinoblastoma, and uvietis, delayed wound healing, endometriosis, vasculogenesis, granulations, hypertrophic scars (keloids), nonunion fractures, scleroderma, trachoma, vascular adhesions, myocardial angiogenesis, coronary collaterals, cerebral collaterals, arteriovenous malformations, ischemic limb angiogenesis, Osler-Webber Syndrome, plaque neovascularization, telangiectasia, hemophiliac joints, angiofibroma fibromuscular dysplasia, wound granulation,

Crohn's disease, atherosclerosis, birth control agent by preventing vascularization required for embryo implantation controlling menstruation, diseases that have angiogenesis as a pathologic consequence such as cat scratch disease (Rochele minalia quintosa), ulcers (Helicobacter pylori), Bartonellosis and bacillary angiomatosis.

In one aspect of the birth control method, an amount of the compound sufficient to block embryo implantation is administered before or after intercourse and fertilization have occurred, thus providing an effective method of birth control, possibly a "morning after" method. Polynucleotides, polypeptides, agonists and/or agonists may also be used in controlling menstruation or administered as either a peritoneal lavage fluid or for peritoneal implantation in the treatment of endometriosis.

Polynucleotides, polypeptides, agonists and/or agonists of the present invention may be incorporated into surgical sutures in order to prevent stitch granulomas.

Polynucleotides, polypeptides, agonists and/or agonists may be utilized in a wide variety of surgical procedures. For example, within one aspect of the present invention a compositions (in the form of, for example, a spray or film) may be utilized to coat or spray an area prior to removal of a tumor, in order to isolate normal surrounding tissues from malignant tissue, and/or to prevent the spread of disease to surrounding tissues. Within other aspects of the present invention, compositions (e.g., in the form of a spray) may be delivered via endoscopic procedures in order to coat tumors, or inhibit angiogenesis in a desired locale. Within yet other aspects of the present invention, surgical meshes which have been coated with anti- angiogenic compositions of the present invention may be utilized in any procedure wherein a surgical mesh might be utilized. For example, within one embodiment of the invention a surgical mesh laden with an anti-angiogenic composition may be utilized during abdominal cancer resection surgery (e.g., subsequent to colon resection) in order to provide support to the structure, and to release an amount of the anti-angiogenic factor.

Within further aspects of the present invention, methods are provided for treating tumor excision sites, comprising administering a polynucleotide, polypeptide, agonist and/or agonist to the resection margins of a tumor subsequent to excision, such that the local recurrence of cancer and the formation of new blood vessels at the site is inhibited. Within one embodiment of the invention, the anti-angiogenic compound is administered directly to the tumor excision site (e.g., applied by swabbing, brushing or otherwise coating the resection margins of the tumor with the anti-angiogenic compound). Alternatively, the anti-

angiogenic compounds may be incorporated into known surgical pastes prior to administration. Within particularly preferred embodiments of the invention, the anti-angiogenic compounds are applied after hepatic resections for malignancy, and after neurosurgical operations.

Within one aspect of the present invention, polynucleotides, polypeptides, agonists and/or agonists may be administered to the resection margin of a wide variety of tumors, including for example, breast, colon, brain and hepatic tumors. For example, within one embodiment of the invention, anti-angiogenic compounds may be administered to the site of a neurological tumor subsequent to excision, such that the formation of new blood vessels at the site are inhibited.

The polynucleotides, polypeptides, agonists and/or agonists of the present invention may also be administered along with other anti-angiogenic factors. Representative examples of other anti-angiogenic factors include: Anti-Invasive Factor, retinoic acid and derivatives thereof, paclitaxel, Suramin, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2, Plasminogen Activator Inhibitor-1, Plasminogen Activator Inhibitor-2, and various forms of the lighter "d group" transition metals.

Lighter "d group" transition metals include, for example, vanadium, molybdenum, tungsten, titanium, niobium, and tantalum species. Such transition metal species may form transition metal complexes. Suitable complexes of the above-mentioned transition metal species include oxo transition metal complexes.

Representative examples of vanadium complexes include oxo vanadium complexes such as vanadate and vanadyl complexes. Suitable vanadate complexes include metavanadate and orthovanadate complexes such as, for example, ammonium metavanadate, sodium metavanadate, and sodium orthovanadate. Suitable vanadyl complexes include, for example, vanadyl acetylacetonate and vanadyl sulfate including vanadyl sulfate hydrates such as vanadyl sulfate mono- and trihydrates.

Representative examples of tungsten and molybdenum complexes also include oxo complexes. Suitable oxo tungsten complexes include tungstate and tungsten oxide complexes. Suitable tungstate complexes include ammonium tungstate, calcium tungstate, sodium tungstate dihydrate, and tungstic acid. Suitable tungsten oxides include tungsten (IV) oxide and tungsten (VI) oxide. Suitable oxo molybdenum complexes include molybdate, molybdenum oxide, and molybdenyl complexes. Suitable molybdate complexes include

ammonium molybdate and its hydrates, sodium molybdate and its hydrates, and potassium molybdate and its hydrates. Suitable molybdenum oxides include molybdenum (VI) oxide, molybdenum (VI) oxide, and molybdic acid. Suitable molybdenyl complexes include, for example, molybdenyl acetylacetonate. Other suitable tungsten and molybdenum complexes include hydroxo derivatives derived from, for example, glycerol, tartaric acid, and sugars.

A wide variety of other anti-angiogenic factors may also be utilized within the context of the present invention. Representative examples include platelet factor 4; protamine sulphate; sulphated chitin derivatives (prepared from queen crab shells), (Murata et al., Cancer Res. 51:22-26, 1991); Sulphated Polysaccharide Peptidoglycan Complex (SP- PG) (the function of this compound may be enhanced by the presence of steroids such as estrogen, and tamoxifen citrate); Staurosporine; modulators of matrix metabolism, including for example, proline analogs, cishydroxyproline, d,L-3,4-dehydroproline, Thiaproline, alpha,alpha-dipyridyl, aminopropionitrile fumarate; 4-propyl-5-(4-pyridinyl)-2(3H)-oxazolone; Methotrexate; Mitoxantrone; Heparin; Interferons; 2 Macroglobulin-serum; ChIMP-3 (Pavloff et al., J. Bio. Chem. 267:17321-17326, 1992); Chymostatin (Tomkinson et al., Biochem J. 286:475-480, 1992); Cyclodextrin Tetradecasulfate; Eponemycin; Camptothecin; Fumagillin (Ingber et al., Nature 348:555-557, 1990); Gold Sodium Thiomalate ("GST"; Matsubara and Ziff, J. Clin. Invest. 79:1440-1446, 1987); anticollagenase-serum; alpha2-antiplasmin (Holmes et al., J. Biol. Chem. 262(4):1659-1664, 1987); Bisantrene (National Cancer Institute); Lobenzarit disodium (N-(2)-carboxyphenyl-4-chloroanthronilic acid disodium or "CCA"; Takeuchi et al., Agents Actions 36:312-316, 1992); Thalidomide; Angostatic steroid; AGM-1470; carboxynaminolmidazole; and metalloproteinase inhibitors such as BB94.

Diseases at the Cellular Level

Diseases associated with increased cell survival or the inhibition of apoptosis that could be treated or detected by polynucleotides or polypeptides, as well as antagonists or agonists of the present invention, include cancers (such as follicular lymphomas, carcinomas with p53 mutations, and hormone-dependent tumors, including, but not limited to colon cancer, cardiac tumors, pancreatic cancer, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, lung cancer, intestinal cancer, testicular cancer, stomach cancer, neuroblastoma, myxoma, myoma, lymphoma, endothelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, chondrosarcoma,

adenoma, breast cancer, prostate cancer, Kaposi's sarcoma and ovarian cancer); autoimmune disorders (such as, multiple sclerosis, Sjogren's syndrome, Hashimoto's thyroiditis, biliary cirrhosis, Behcet's disease, Crohn's disease, polymyositis, systemic lupus erythematosus and immune-related glomerulonephritis and rheumatoid arthritis) and viral infections (such as herpes viruses, pox viruses and adenoviruses), inflammation, graft v. host disease, acute graft rejection, and chronic graft rejection. In preferred embodiments, polynucleotides, polypeptides, and/or antagonists of the invention are used to inhibit growth, progression, and/or metasis of cancers, in particular those listed above.

Additional diseases or conditions associated with increased cell survival that could be treated or detected by polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the present invention include, but are not limited to, progression, and/or metastases of malignancies and related disorders such as leukemia (including acute leukemias (e.g., acute lymphocytic leukemia, acute myelocytic leukemia (including myeloblastic, promyelocytic, myelomonocytic, monocytic, and erythroleukemia)) and chronic leukemias (e.g., chronic myelocytic (granulocytic) leukemia and chronic lymphocytic leukemia)), polycythemia vera, lymphomas (e.g., Hodgkin's disease and non-Hodgkin's disease), multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia, heavy chain disease, and solid tumors including, but not limited to, sarcomas and carcinomas such as fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma, choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, Wilm's tumor, cervical cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, medulloblastoma, craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, hemangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, and retinoblastoma.

Diseases associated with increased apoptosis that could be treated or detected by polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention,

include AIDS; neurodegenerative disorders (such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Amyotrophic lateral sclerosis, Retinitis pigmentosa, Cerebellar degeneration and brain tumor or prior associated disease); autoimmune disorders (such as, multiple sclerosis, Sjogren's syndrome, Hashimoto's thyroiditis, biliary cirrhosis, Behcet's disease, Crohn's disease, polymyositis, systemic lupus erythematosus and immune-related glomerulonephritis and rheumatoid arthritis) myelodysplastic syndromes (such as aplastic anemia), graft v. host disease, ischemic injury (such as that caused by myocardial infarction, stroke and reperfusion injury), liver injury (e.g., hepatitis related liver injury, ischemia/reperfusion injury, cholestosis (bile duct injury) and liver cancer); toxin-induced liver disease (such as that caused by alcohol), septic shock, cachexia and anorexia.

Wound Healing and Epithelial Cell Proliferation

In accordance with yet a further aspect of the present invention, there is provided a process for utilizing polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, for therapeutic purposes, for example, to stimulate epithelial cell proliferation and basal keratinocytes for the purpose of wound healing, and to stimulate hair follicle production and healing of dermal wounds. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, may be clinically useful in stimulating wound healing including surgical wounds, excisional wounds, deep wounds involving damage of the dermis and epidermis, eye tissue wounds, dental tissue wounds, oral cavity wounds, diabetic ulcers, dermal ulcers, cubitus ulcers, arterial ulcers, venous stasis ulcers, burns resulting from heat exposure or chemicals, and other abnormal wound healing conditions such as uremia, malnutrition, vitamin deficiencies and complications associted with systemic treatment with steroids, radiation therapy and antineoplastic drugs and antimetabolites. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used to promote dermal reestablishment subsequent to dermal loss

Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used to increase the adherence of skin grafts to a wound bed and to stimulate re-epithelialization from the wound bed. The following are types of grafts that polynucleotides or polypeptides, agonists or antagonists of the present invention, could be used to increase adherence to a wound bed: autografts, artificial skin, allografts, autodermic

graft, autoepdermic grafts, avacular grafts, Blair-Brown grafts, bone graft, brephoplastic grafts, cutis graft, delayed graft, dermic graft, epidermic graft, fascia graft, full thickness graft, heterologous graft, xenograft, homologous graft, hyperplastic graft, lamellar graft, mesh graft, mucosal graft, Ollier-Thiersch graft, omenpal graft, patch graft, pedicle graft, penetrating graft, split skin graft, thick split graft. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, can be used to promote skin strength and to improve the appearance of aged skin.

It is believed that polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, will also produce changes in hepatocyte proliferation, and epithelial cell proliferation in the lung, breast, pancreas, stomach, small intesting, and large intestine. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could promote proliferation of epithelial cells such as sebocytes, hair follicles, hepatocytes, type II pneumocytes, mucin-producing goblet cells, and other epithelial cells and their progenitors contained within the skin, lung, liver, and gastrointestinal tract. Polynucleotides or polypeptides, agonists or antagonists of the present invention, may promote proliferation of endothelial cells, keratinocytes, and basal keratinocytes.

Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could also be used to reduce the side effects of gut toxicity that result from radiation, chemotherapy treatments or viral infections. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, may have a cytoprotective effect on the small intestine mucosa. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, may also stimulate healing of mucositis (mouth ulcers) that result from chemotherapy and viral infections.

Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could further be used in full regeneration of skin in full and partial thickness skin defects, including burns, (i.e., repopulation of hair follicles, sweat glands, and sebaceous glands), treatment of other skin defects such as psoriasis. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used to treat epidermolysis bullosa, a defect in adherence of the epidermis to the underlying dermis which results in frequent, open and painful blisters by accelerating reepithelialization of these lesions. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could also be used to treat gastric and doudenal ulcers and help heal by scar formation of the

mucosal lining and regeneration of glandular mucosa and duodenal mucosal lining more rapidly. Inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, are diseases which result in destruction of the mucosal surface of the small or large intestine, respectively. Thus, polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used to promote the resurfacing of the mucosal surface to aid more rapid healing and to prevent progression of inflammatory bowel disease. Treatment with polynucleotides or polypeptides, agonists or antagonists of the present invention, is expected to have a significant effect on the production of mucus throughout the gastrointestinal tract and could be used to protect the intestinal mucosa from injurious substances that are ingested or following surgery. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used to treat diseases associate with the under expression.

Moreover, polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used to prevent and heal damage to the lungs due to various pathological states. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, which could stimulate proliferation and differentiation and promote the repair of alveoli and brochiolar epithelium to prevent or treat acute or chronic lung damage. For example, emphysema, which results in the progressive loss of aveoli, and inhalation injuries, i.e., resulting from smoke inhalation and burns, that cause necrosis of the bronchiolar epithelium and alveoli could be effectively treated using polynucleotides or polypeptides, agonists or antagonists of the present invention. Also, polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used to stimulate the proliferation of and differentiation of type II pneumocytes, which may help treat or prevent disease such as hyaline membrane diseases, such as infant respiratory distress syndrome and bronchopulmonary displasia, in premature infants.

Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could stimulate the proliferation and differentiation of hepatocytes and, thus, could be used to alleviate or treat liver diseases and pathologies such as fulminant liver failure caused by cirrhosis, liver damage caused by viral hepatitis and toxic substances (i.e., acetaminophen, carbon tetraholoride and other hepatotoxins known in the art).

In addition, polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used treat or prevent the onset of diabetes mellitus. In patients

with newly diagnosed Types I and II diabetes, where some islet cell function remains, polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used to maintain the islet function so as to alleviate, delay or prevent permanent manifestation of the disease. Also, polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, could be used as an auxiliary in islet cell transplantation to improve or promote islet cell function.

Neural Activity and Neurological Diseases

The polynucleotides, polypeptides and agonists or antagonists of the invention may be used for the diagnosis and/or treatment of diseases, disorders, damage or injury of the brain and/or nervous system. Nervous system disorders that can be treated with the compositions of the invention (e.g., IL-6-like polypeptides, polynucleotides, and/or agonists or antagonists), include, but are not limited to, nervous system injuries, and diseases or disorders which result in either a disconnection of axons, a diminution or degeneration of neurons, or demyelination. Nervous system lesions which may be treated in a patient (including human and non-human mammalian patients) according to the methods of the invention, include but are not limited to, the following lesions of either the central (including spinal cord, brain) or peripheral nervous systems: (1) ischemic lesions, in which a lack of oxygen in a portion of the nervous system results in neuronal injury or death, including cerebral infarction or ischemia, or spinal cord infarction or ischemia; (2) traumatic lesions, including lesions caused by physical injury or associated with surgery, for example, lesions which sever a portion of the nervous system, or compression injuries; (3) malignant lesions, in which a portion of the nervous system is destroyed or injured by malignant tissue which is either a nervous system associated malignancy or a malignancy derived from non-nervous system tissue; (4) infectious lesions, in which a portion of the nervous system is destroyed or injured as a result of infection, for example, by an abscess or associated with infection by human immunodeficiency virus, herpes zoster, or herpes simplex virus or with Lyme disease, tuberculosis, or syphilis; (5) degenerative lesions, in which a portion of the nervous system is destroyed or injured as a result of a degenerative process including but not limited to, degeneration associated with Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's chorea, or amyotrophic lateral sclerosis (ALS); (6) lesions associated with nutritional diseases or disorders, in which a portion of the nervous system is destroyed or injured by a nutritional

disorder or disorder of metabolism including, but not limited to, vitamin B12 deficiency, folic acid deficiency, Wernicke disease, tobacco-alcohol amblyopia, Marchiafava-Bignami disease (primary degeneration of the corpus callosum), and alcoholic cerebellar degeneration; (7) neurological lesions associated with systemic diseases including, but not limited to, diabetes (diabetic neuropathy, Bell's palsy), systemic lupus erythematosus, carcinoma, or sarcoidosis; (8) lesions caused by toxic substances including alcohol, lead, or particular neurotoxins; and (9) demyelinated lesions in which a portion of the nervous system is destroyed or injured by a demyelinating disease including, but not limited to, multiple sclerosis, human immunodeficiency virus-associated myelopathy, transverse myelopathy or various etiologies, progressive multifocal leukoencephalopathy, and central pontine myelinolysis.

In one embodiment, the polypeptides, polynucleotides, or agonists or antagonists of the invention are used to protect neural cells from the damaging effects of hypoxia. In a further preferred embodiment, the polypeptides, polynucleotides, or agonists or antagonists of the invention are used to protect neural cells from the damaging effects of cerebral hypoxia. According to this embodiment, the compositions of the invention are used to treat or prevent neural cell injury associated with cerebral hypoxia. In one non-exclusive aspect of this embodiment, the polypeptides, polynucleotides, or agonists or antagonists of the invention, are used to treat or prevent neural cell injury associated with cerebral ischemia. In another non-exclusive aspect of this embodiment, the polypeptides, polynucleotides, or agonists or antagonists of the invention are used to treat or prevent neural cell injury associated with cerebral infarction.

In another preferred embodiment, the polypeptides, polynucleotides, or agonists or antagonists of the invention are used to treat or prevent neural cell injury associated with a stroke. In a specific embodiment, the polypeptides, polynucleotides, or agonists or antagonists of the invention are used to treat or prevent cerebral neural cell injury associated with a stroke.

In another preferred embodiment, the polypeptides, polynucleotides, or agonists or antagonists of the invention are used to treat or prevent neural cell injury associated with a heart attack. In a specific embodiment, the polypeptides, polynucleotides, or agonists or antagonists of the invention are used to treat or prevent cerebral neural cell injury associated with a heart attack.

The compositions of the invention which are useful for treating or preventing a nervous system disorder may be selected by testing for biological activity in promoting the survival or differentiation of neurons. For example, and not by way of limitation, compositions of the invention which elicit any of the following effects may be useful according to the invention: (1) increased survival time of neurons in culture either in the presence or absence of hypoxia or hypoxic conditions; (2) increased sprouting of neurons in culture or *in vivo*; (3) increased production of a neuron-associated molecule in culture or *in vivo*, *e.g.*, choline acetyltransferase or acetylcholinesterase with respect to motor neurons; or (4) decreased symptoms of neuron dysfunction *in vivo*. Such effects may be measured by any method known in the art. In preferred, non-limiting embodiments, increased survival of neurons may routinely be measured using a method set forth herein or otherwise known in the art, such as, for example, in Zhang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3637-42 (2000) or in Arakawa *et al.*, *J. Neurosci.*, *10*:3507-15 (1990); increased sprouting of neurons may be detected by methods known in the art, such as, for example, the methods set forth in Pestronk *et al.*, *Exp. Neurol.*, *70*:65-82 (1980), or Brown *et al.*, *Ann. Rev. Neurosci.*, *4*:17-42 (1981); increased production of neuron-associated molecules may be measured by bioassay, enzymatic assay, antibody binding, Northern blot assay, etc., using techniques known in the art and depending on the molecule to be measured; and motor neuron dysfunction may be measured by assessing the physical manifestation of motor neuron disorder, e.g., weakness, motor neuron conduction velocity, or functional disability.

In specific embodiments, motor neuron disorders that may be treated according to the invention include, but are not limited to, disorders such as infarction, infection, exposure to toxin, trauma, surgical damage, degenerative disease or malignancy that may affect motor neurons as well as other components of the nervous system, as well as disorders that selectively affect neurons such as amyotrophic lateral sclerosis, and including, but not limited to, progressive spinal muscular atrophy, progressive bulbar palsy, primary lateral sclerosis, infantile and juvenile muscular atrophy, progressive bulbar paralysis of childhood (Fazio-Londe syndrome), poliomyelitis and the post polio syndrome, and Hereditary Motorsensory Neuropathy (Charcot-Marie-Tooth Disease).

Further, polypeptides or polynucleotides of the invention may play a role in neuronal survival, synapse formation; conductance; neural differentiation, etc. Thus, compositions of the invention (including IL-6-like polynucleotides, polypeptides, and agonists or antagonists)

may be used to diagnose and/or treat or prevent diseases or disorders associated with these roles, including, but not limited to, learning and/or cognition disorders. The compositions of the invention may also be useful in the treatment or prevention of neurodegenerative disease states and/or behavioural disorders. Such neurodegenerative disease states and/or behavioral disorders include, but are not limited to, Alzheimers Disease, Parkinsons Disease, Huntingtons Disease, Tourette Syndrome, schizophrenia, mania, dementia, paranoia, obsessive compulsive disorder, panic disorder, learning disabilities, ALS, psychoses, autism, and altered behaviors, including disorders in feeding, sleep patterns, balance, and perception. In addition, compositions of the invention may also play a role in the treatment, prevention and/or detection of developmental disorders associated with the developing embryo, or sexually-linked disorders.

Additionally, polypeptides, polynucleotides and/or agonists or antagonists of the invention, may be useful in protecting neural cells from diseases, damage, disorders, or injury, associated with cerebrovascular disorders including, but not limited to, carotid artery diseases (e.g., carotid artery thrombosis, carotid stenosis, or Moyamoya Disease), cerebral amyloid angiopathy, cerebral aneurysm, cerebral anoxia, cerebral arteriosclerosis, cerebral arteriovenous malformations, cerebral artery diseases, cerebral embolism and thrombosis (e.g., carotid artery thrombosis, sinus thrombosis, or Wallenberg's Syndrome), cerebral hemorrhage (e.g., epidural or subdural hematoma, or subarachnoid hemorrhage), cerebral infarction, cerebral ischemia (e.g., transient cerebral ischemia, Subclavian Steal Syndrome, or vertebrobasilar insufficiency), vascular dementia (e.g., multi-infarct), leukomalacia, periventricular, and vascular headache (e.g., cluster headache or migraines).

In accordance with yet a further aspect of the present invention, there is provided a process for utilizing polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, for therapeutic purposes, for example, to stimulate neurological cell proliferation and/or differentiation. Therefore, polynucleotides, polypeptides, agonists and/or antagonists of the invention may be used to treat and/or detect neurologic diseases. Moreover, polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the invention, can be used as a marker or detector of a particular nervous system disease or disorder.

Examples of neurologic diseases which can be treated or detected with polynucleotides, polypeptides, agonists, and/or antagonists of the present invention include brain diseases, such as metabolic brain diseases which includes phenylketonuria such as

maternal phenylketonuria, pyruvate carboxylase deficiency, pyruvate dehydrogenase complex deficiency, Wernicke's Encephalopathy, brain edema, brain neoplasms such as cerebellar neoplasms which include infratentorial neoplasms, cerebral ventricle neoplasms such as choroid plexus neoplasms, hypothalamic neoplasms, supratentorial neoplasms, canavan disease, cerebellar diseases such as cerebellar ataxia which include spinocerebellar degeneration such as ataxia telangiectasia, cerebellar dyssynergia, Friederich's Ataxia, Machado-Joseph Disease, olivopontocerebellar atrophy, cerebellar neoplasms such as infratentorial neoplasms, diffuse cerebral sclerosis such as encephalitis periaxialis, globoid cell leukodystrophy, metachromatic leukodystrophy and subacute sclerosing panencephalitis.

Additional neurologic diseases which can be treated or detected with polynucleotides, polypeptides, agonists, and/or antagonists of the present invention include cerebrovascular disorders (such as carotid artery diseases which include carotid artery thrombosis, carotid stenosis and Moyamoya Disease), cerebral amyloid angiopathy, cerebral aneurysm, cerebral anoxia, cerebral arteriosclerosis, cerebral arteriovenous malformations, cerebral artery diseases, cerebral embolism and thrombosis such as carotid artery thrombosis, sinus thrombosis and Wallenberg's Syndrome, cerebral hemorrhage such as epidural hematoma, subdural hematoma and subarachnoid hemorrhage, cerebral infarction, cerebral ischemia such as transient cerebral ischemia, Subclavian Steal Syndrome and vertebrobasilar insufficiency, vascular dementia such as multi-infarct dementia, periventricular leukomalacia, vascular headache such as cluster headache and migraine.

Additional neurologic diseases which can be treated or detected with polynucleotides, polypeptides, agonists, and/or antagonists of the present invention include dementia such as AIDS Dementia Complex, presenile dementia such as Alzheimer's Disease and Creutzfeldt-Jakob Syndrome, senile dementia such as Alzheimer's Disease and progressive supranuclear palsy, vascular dementia such as multi-infarct dementia, encephalitis which include encephalitis periaxialis, viral encephalitis such as epidemic encephalitis, Japanese Encephalitis, St. Louis Encephalitis, tick-borne encephalitis and West Nile Fever, acute disseminated encephalomyelitis, meningoencephalitis such as uveomeningoencephalitic syndrome, Postencephalitic Parkinson Disease and subacute sclerosing panencephalitis, encephalomalacia such as periventricular leukomalacia, epilepsy such as generalized epilepsy which includes infantile spasms, absence epilepsy, myoclonic epilepsy which includes

MERRF Syndrome, tonic-clonic epilepsy, partial epilepsy such as complex partial epilepsy, frontal lobe epilepsy and temporal lobe epilepsy, post-traumatic epilepsy, status epilepticus such as Epilepsia Partialis Continua, and Hallervorden-Spatz Syndrome.

Additional neurologic diseases which can be treated or detected with polynucleotides, polypeptides, agonists, and/or antagonists of the present invention include hydrocephalus such as Dandy-Walker Syndrome and normal pressure hydrocephalus, hypothalamic diseases such as hypothalamic neoplasms, cerebral malaria, narcolepsy which includes cataplexy, bulbar poliomyelitis, cerebri pseudotumor, Rett Syndrome, Reye's Syndrome, thalamic diseases, cerebral toxoplasmosis, intracranial tuberculoma and Zellweger Syndrome, central nervous system infections such as AIDS Dementia Complex, Brain Abscess, subdural empyema, encephalomyelitis such as Equine Encephalomyelitis, Venezuelan Equine Encephalomyelitis, Necrotizing Hemorrhagic Encephalomyelitis, Visna, and cerebral malaria.

Additional neurologic diseases which can be treated or detected with polynucleotides, polypeptides, agonists, and/or antagonists of the present invention include meningitis such as arachnoiditis, aseptic meningitis such as viral meningitis which includes lymphocytic choriomeningitis, Bacterial meningitis which includes Haemophilus Meningitis, Listeria Meningitis, Meningococcal Meningitis such as Waterhouse-Friderichsen Syndrome, Pneumococcal Meningitis and meningeal tuberculosis, fungal meningitis such as Cryptococcal Meningitis, subdural effusion, meningoencephalitis such as uvemeningoencephalitic syndrome, myelitis such as transverse myelitis, neurosyphilis such as tabes dorsalis, poliomyelitis which includes bulbar poliomyelitis and postpoliomyelitis syndrome, prion diseases (such as Creutzfeldt-Jakob Syndrome, Bovine Spongiform Encephalopathy, Gerstmann-Straussler Syndrome, Kuru, Scrapie), and cerebral toxoplasmosis.

Additional neurologic diseases which can be treated or detected with polynucleotides, polypeptides, agonists, and/or antagonists of the present invention include central nervous system neoplasms such as brain neoplasms that include cerebellar neoplasms such as infratentorial neoplasms, cerebral ventricle neoplasms such as choroid plexus neoplasms, hypothalamic neoplasms and supratentorial neoplasms, meningeal neoplasms, spinal cord neoplasms which include epidural neoplasms, demyelinating diseases such as Canavan

Diseases, diffuse cerebral sceloris which includes adrenoleukodystrophy, encephalitis periaxialis, globoid cell leukodystrophy, diffuse cerebral sclerosis such as metachromatic leukodystrophy, allergic encephalomyelitis, necrotizing hemorrhagic encephalomyelitis, progressive multifocal leukoencephalopathy, multiple sclerosis, central pontine myelinolysis, transverse myelitis, neuromyelitis optica, Scrapie, Swayback, Chronic Fatigue Syndrome, Visna, High Pressure Nervous Syndrome, Meningism, spinal cord diseases such as amyotonia congenita, amyotrophic lateral sclerosis, spinal muscular atrophy such as Werdnig-Hoffmann Disease, spinal cord compression, spinal cord neoplasms such as epidural neoplasms, syringomyelia, Tabes Dorsalis, Stiff-Man Syndrome, mental retardation such as Angelman Syndrome, Cri-du-Chat Syndrome, De Lange's Syndrome, Down Syndrome, Gangliosidoses such as gangliosidoses G(M1), Sandhoff Disease, Tay-Sachs Disease, Hartnup Disease, homocystinuria, Laurence-Moon- Biedl Syndrome, Lesch-Nyhan Syndrome, Maple Syrup Urine Disease, mucolipidosis such as fucosidosis, neuronal ceroid-lipofuscinosis, oculocerebrorenal syndrome, phenylketonuria such as maternal phenylketonuria, Prader-Willi Syndrome, Rett Syndrome, Rubinstein-Taybi Syndrome, Tuberous Sclerosis, WAGR Syndrome, nervous system abnormalities such as holoprosencephaly, neural tube defects such as anencephaly which includes hydrangencephaly, Arnold-Chairi Deformity, encephalocele, meningocele, meningomyelocele, spinal dysraphism such as spina bifida cystica and spina bifida occulta.

Additional neurologic diseases which can be treated or detected with polynucleotides, polypeptides, agonists, and/or antagonists of the present invention include hereditary motor and sensory neuropathies which include Charcot-Marie Disease, Hereditary optic atrophy, Refsum's Disease, hereditary spastic paraplegia, Werdnig-Hoffmann Disease, Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathies such as Congenital Analgesia and Familial Dysautonomia, Neurologic manifestations (such as agnosia that include Gerstmann's Syndrome, Amnesia such as retrograde amnesia, apraxia, neurogenic bladder, cataplexy, communicative disorders such as hearing disorders that includes deafness, partial hearing loss, loudness recruitment and tinnitus, language disorders such as aphasia which include agraphia, anomia, broca aphasia, and Wernicke Aphasia, Dyslexia such as Acquired Dyslexia, language development disorders, speech disorders such as aphasia which includes anomia, broca aphasia and Wernicke Aphasia, articulation disorders, communicative disorders such as speech disorders which include dysarthria, echolalia, mutism and stuttering,

voice disorders such as aphonia and hoarseness, decerebrate state, delirium, fasciculation, hallucinations, meningism, movement disorders such as angelman syndrome, ataxia, athetosis, chorea, dystonia, hypokinesia, muscle hypotonia, myoclonus, tic, torticollis and tremor, muscle hypertonia such as muscle rigidity such as stiff-man syndrome, muscle spasticity, paralysis such as facial paralysis which includes Herpes Zoster Oticus, Gastroparesis, Hemiplegia, ophthalmoplegia such as diplopia, Duane's Syndrome, Horner's Syndrome, Chronic progressive external ophthalmoplegia such as Kearns Syndrome, Bulbar Paralysis, Tropical Spastic Paraparesis, Paraplegia such as Brown-Sequard Syndrome, quadriplegia, respiratory paralysis and vocal cord paralysis, paresis, phantom limb, taste disorders such as ageusia and dysgeusia, vision disorders such as amblyopia, blindness, color vision defects, diplopia, hemianopsia, scotoma and subnormal vision, sleep disorders such as hypersomnia which includes Kleine-Levin Syndrome, insomnia, and somnambulism, spasm such as trismus, unconsciousness such as coma, persistent vegetative state and syncope and vertigo, neuromuscular diseases such as amyotonia congenita, amyotrophic lateral sclerosis, Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome, motor neuron disease, muscular atrophy such as spinal muscular atrophy, Charcot-Marie Disease and Werdnig-Hoffmann Disease, Postpoliomyelitis Syndrome, Muscular Dystrophy, Myasthenia Gravis, Myotonia Atrophica, Myotonia Confenita, Nemaline Myopathy, Familial Periodic Paralysis, Multiplex Paramyloclonus, Tropical Spastic Paraparesis and Stiff-Man Syndrome, peripheral nervous system diseases such as acrodynia, amyloid neuropathies, autonomic nervous system diseases such as Adie's Syndrome, Barre-Liecu Syndrome, Familial Dysautonomia, Horner's Syndrome, Reflex Sympathetic Dystrophy and Shy-Drager Syndrome, Cranial Nerve Diseases such as Acoustic Nerve Diseases such as Acoustic Neuroma which includes Neurofibromatosis 2, Facial Nerve Diseases such as Facial Neuralgia,Melkersson-Rosenthal Syndrome, ocular motility disorders which includes amblyopia, nystagmus, oculomotor nerve paralysis, ophthalmoplegia such as Duane's Syndrome, Horner's Syndrome, Chronic Progressive External Ophthalmoplegia which includes Kearns Syndrome, Strabismus such as Esotropia and Exotropia, Oculomotor Nerve Paralysis, Optic Nerve Diseases such as Optic Atrophy which includes Hereditary Optic Atrophy, Optic Disk Drusen, Optic Neuritis such as Neuromyelitis Optica, Papilledema, Trigeminal Neuralgia, Vocal Cord Paralysis, Demyelinating Diseases such as Neuromyelitis Optica and Swayback, and Diabetic neuropathies such as diabetic foot.

Additional neurologic diseases which can be treated or detected with polynucleotides, polypeptides, agonists, and/or antagonists of the present invention include nerve compression syndromes such as carpal tunnel syndrome, tarsal tunnel syndrome, thoracic outlet syndrome such as cervical rib syndrome, ulnar nerve compression syndrome, neuralgia such as causalgia, cervico-brachial neuralgia, facial neuralgia and trigeminal neuralgia, neuritis such as experimental allergic neuritis, optic neuritis, polyneuritis, polyradiculoneuritis and radiculities such as polyradiculitis, hereditary motor and sensory neuropathies such as Charcot-Marie Disease, Hereditary Optic Atrophy, Refsum's Disease, Hereditary Spastic Paraplegia and Werdnig-Hoffmann Disease, Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathies which include Congenital Analgesia and Familial Dysautonomia, POEMS Syndrome, Sciatica, Gustatory Sweating and Tetany).

Infectious Disease

Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention can be used to treat or detect infectious agents. For example, by increasing the immune response, particularly increasing the proliferation and differentiation of B and/or T cells, infectious diseases may be treated. The immune response may be increased by either enhancing an existing immune response, or by initiating a new immune response. Alternatively, polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention may also directly inhibit the infectious agent, without necessarily eliciting an immune response.

Viruses are one example of an infectious agent that can cause disease or symptoms that can be treated or detected by a polynucleotide or polypeptide and/or agonist or antagonist of the present invention. Examples of viruses, include, but are not limited to Examples of viruses, include, but are not limited to the following DNA and RNA viruses and viral families: Arbovirus, Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Birnaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Dengue, EBV, HIV, Flaviviridae, Hepadnaviridae (Hepatitis), Herpesviridae (such as, Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Herpes Zoster), Mononegavirus (e.g., Paramyxoviridae, Morbillivirus, Rhabdoviridae), Orthomyxoviridae (e.g., Influenza A, Influenza B, and parainfluenza), Papiloma virus, Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae (such as Smallpox or Vaccinia), Reoviridae (e.g., Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I, HTLV-II, Lentivirus), and Togaviridae (e.g., Rubivirus).

Viruses falling within these families can cause a variety of diseases or symptoms, including, but not limited to: arthritis, bronchiollitis, respiratory syncytial virus, encephalitis, eye infections (e.g., conjunctivitis, keratitis), chronic fatigue syndrome, hepatitis (A, B, C, E, Chronic Active, Delta), Japanese B encephalitis, Junin, Chikungunya, Rift Valley fever, yellow fever, meningitis, opportunistic infections (e.g., AIDS), pneumonia, Burkitt's Lymphoma, chickenpox, hemorrhagic fever, Measles, Mumps, Parainfluenza, Rabies, the common cold, Polio, leukemia, Rubella, sexually transmitted diseases, skin diseases (e.g., Kaposi's, warts), and viremia. polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the invention, can be used to treat or detect any of these symptoms or diseases. In specific embodiments, polynucleotides, polypeptides, or agonists or antagonists of the invention are used to treat: meningitis, Dengue, EBV, and/or hepatitis (e.g., hepatitis B). In an additional specific embodiment polynucleotides, polypeptides, or agonists or antagonists of the invention are used to treat patients nonresponsive to one or more other commercially available hepatitis vaccines. In a further specific embodiment polynucleotides, polypeptides, or agonists or antagonists of the invention are used to treat AIDS.

Similarly, bacterial and fungal agents that can cause disease or symptoms and that can be treated or detected by a polynucleotide or polypeptide and/or agonist or antagonist of the present invention include, but not limited to, the following Gram-Negative and Gram-positive bacteria, bacterial families, and fungi: Actinomyces (e.g., Norcardia), Acinetobacter, *Cryptococcus neoformans*, Aspergillus, Bacillaceae (e.g., *Bacillus anthrasis*), Bacteroides (e.g., *Bacteroides fragilis*), Blastomycosis, Bordetella, Borrelia (e.g., *Borrelia burgdorferi*), Brucella , Candidia, Campylobacter, Chlamydia, Clostridium (e.g., *Clostridium botulinum*, *Clostridium dificile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*), Coccidioides, Corynebacterium (e.g., *Corynebacterium diptheriae*), Cryptococcus, Dermatocycoses, *E. coli* (e.g., Enterotoxigenic *E. coli* and Enterohemorrhagic *E. coli*), Enterobacter (e.g. *Enterobacter aerogenes*), Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella (e.g., *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*), Serratia, Yersinia, Shigella), Erysipelothrix, Haemophilus (e.g., *Haemophilus influenza* type B), Helicobacter, Legionella (e.g., *Legionella pneumophila*), Leptospira, Listeria (e.g., *Listeria monocytogenes*), Mycoplasma, Mycobacterium (e.g., *Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis)*, Vibrio (e.g., *Vibrio cholerae)*, Neisseriaceae (e.g., *Neisseria gonorrhea, Neisseria meningitidis*), Pasteurellacea, Proteus, Pseudomonas (e.g., *Pseudomonas aeruginosa*), Rickettsiaceae,

Spirochetes (e.g., Treponema spp., Leptospira spp., Borrelia spp.), Shigella spp., Staphylococcus (e.g., *Staphylococcus aureus*), Meningiococcus, Pneumococcus and Streptococcus (e.g., *Streptococcus pneumoniae* and Groups A, B, and C Streptococci), and Ureaplasmas. These bacterial, parasitic, and fungal families can cause diseases or symptoms, including, but not limited to: antibiotic-resistant infections, bacteremia, endocarditis, septicemia, eye infections (e.g., conjunctivitis), uveitis, tuberculosis, gingivitis, bacterial diarrhea, opportunistic infections (e.g., AIDS related infections), paronychia, prosthesis-related infections, dental caries, Reiter's Disease, respiratory tract infections, such as Whooping Cough or Empyema, sepsis, Lyme Disease, Cat-Scratch Disease, dysentery, paratyphoid fever, food poisoning, Legionella disease, chronic and acute inflammation, erythema, yeast infections, typhoid, pneumonia, gonorrhea, meningitis (e.g., mengitis types A and B), chlamydia, syphillis, diphtheria, leprosy, brucellosis, peptic ulcers, anthrax, spontaneous abortions, birth defects, pneumonia, lung infections, ear infections, deafness, blindness, lethargy, malaise, vomiting, chronic diarrhea, Crohn's disease, colitis, vaginosis, sterility, pelvic inflammatory diseases, candidiasis, paratuberculosis, tuberculosis, lupus, botulism, gangrene, tetanus, impetigo, Rheumatic Fever, Scarlet Fever, sexually transmitted diseases, skin diseases (e.g., cellulitis, dermatocycoses), toxemia, urinary tract infections, wound infections, nosocomial infections. Polynucleotides or polypeptides, agonists or antagonists of the invention, can be used to treat or detect any of these symptoms or diseases. In specific embodiments, polynucleotides, polypeptides, agonists or antagonists of the invention are used to treat: tetanus, diptheria, botulism, and/or meningitis type B.

Moreover, parasitic agents causing disease or symptoms that can be treated, prevented, and/or diagnosed by a polynucleotide or polypeptide and/or agonist or antagonist of the present invention include, but not limited to, the following families or class: Amebiasis, Babesiosis, Coccidiosis, Cryptosporidiosis, Dientamoebiasis, Dourine, Ectoparasitic, Giardias, Helminthiasis, Leishmaniasis, Schistisoma, Theileriasis, Toxoplasmosis, Trypanosomiasis, and Trichomonas and Sporozoans (e.g., *Plasmodium virax*, *Plasmodium falciparium*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*). These parasites can cause a variety of diseases or symptoms, including, but not limited to: Scabies, Trombiculiasis, eye infections, intestinal disease (e.g., dysentery, giardiasis), liver disease, lung disease, opportunistic infections (e.g., AIDS related), malaria, pregnancy complications, and toxoplasmosis. polynucleotides or polypeptides, or agonists or antagonists of the

invention, can be used to treat, prevent, and/or diagnose any of these symptoms or diseases. In specific embodiments, polynucleotides, polypeptides, or agonists or antagonists of the invention are used to treat, prevent, and/or diagnose malaria.

Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention of the present invention could either be by administering an effective amount of a polypeptide to the patient, or by removing cells from the patient, supplying the cells with a polynucleotide of the present invention, and returning the engineered cells to the patient (ex vivo therapy). Moreover, the polypeptide or polynucleotide of the present invention can be used as an antigen in a vaccine to raise an immune response against infectious disease.

Regeneration

Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention can be used to differentiate, proliferate, and attract cells, leading to the regeneration of tissues. (See, Science 276:59-87 (1997).) The regeneration of tissues could be used to repair, replace, or protect tissue damaged by congenital defects, trauma (wounds, burns, incisions, or ulcers), age, disease (e.g. osteoporosis, osteocarthritis, periodontal disease, liver failure), surgery, including cosmetic plastic surgery, fibrosis, reperfusion injury, or systemic cytokine damage.

Tissues that could be regenerated using the present invention include organs (e.g., pancreas, liver, intestine, kidney, skin, endothelium), muscle (smooth, skeletal or cardiac), vasculature (including vascular and lymphatics), nervous, hematopoietic, and skeletal (bone, cartilage, tendon, and ligament) tissue. Preferably, regeneration occurs without or decreased scarring. Regeneration also may include angiogenesis.

Moreover, polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, may increase regeneration of tissues difficult to heal. For example, increased tendon/ligament regeneration would quicken recovery time after damage. Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention could also be used prophylactically in an effort to avoid damage. Specific diseases that could be treated include of tendinitis, carpal tunnel syndrome, and other tendon or ligament defects. A further example of tissue regeneration of non-healing wounds includes pressure ulcers, ulcers associatedwith vascular insufficiency, surgical, and traumatic wounds.

Similarly, nerve and brain tissue could also be regenerated by using polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention, to proliferate and differentiate nerve cells. Diseases that could be treated using this method include central and peripheral nervous system diseases, neuropathies, or mechanical and traumatic disorders (e.g., spinal cord disorders, head trauma, cerebrovascular disease, and stoke). Specifically, diseases associated with peripheral nerve injuries, peripheral neuropathy (e.g., resulting from chemotherapy or other medical therapies), localized neuropathies, and central nervous system diseases (e.g., Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Shy-Drager syndrome), could all be treated using the polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention.

Chemotaxis

Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention may have chemotaxis activity. A chemotaxic molecule attracts or mobilizes cells (e.g., monocytes, fibroblasts, neutrophils, T-cells, mast cells, eosinophils, epithelial and/or endothelial cells) to a particular site in the body, such as inflammation, infection, or site of hyperproliferation. The mobilized cells can then fight off and/or heal the particular trauma or abnormality.

Polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention may increase chemotaxic activity of particular cells. These chemotactic molecules can then be used to treat inflammation, infection, hyperproliferative disorders, or any immune system disorder by increasing the number of cells targeted to a particular location in the body. For example, chemotaxic molecules can be used to treat wounds and other trauma to tissues by attracting immune cells to the injured location. Chemotactic molecules of the present invention can also attract fibroblasts, which can be used to treat wounds.

It is also contemplated that polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention may inhibit chemotactic activity. These molecules could also be used to treat disorders. Thus, polynucleotides or polypeptides, as well as agonists or antagonists of the present invention could be used as an inhibitor of chemotaxis.

Binding Activity

A polypeptide of the present invention may be used to screen for molecules that bind to the polypeptide or for molecules to which the polypeptide binds. The binding of the polypeptide and the molecule may activate (agonist), increase, inhibit (antagonist), or decrease activity of the polypeptide or the molecule bound. Examples of such molecules include antibodies, oligonucleotides, proteins (e.g., receptors),or small molecules.

Preferably, the molecule is closely related to the natural ligand of the polypeptide, e.g., a fragment of the ligand, or a natural substrate, a ligand, a structural or functional mimetic. (See, Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2):Chapter 5 (1991).) Similarly, the molecule can be closely related to the natural receptor to which the polypeptide binds, or at least, a fragment of the receptor capable of being bound by the polypeptide (e.g., active site). In either case, the molecule can be rationally designed using known techniques.

Preferably, the screening for these molecules involves producing appropriate cells which express the polypeptide. Preferred cells include cells from mammals, yeast, Drosophila, or *E. coli*. Cells expressing the polypeptide (or cell membrane containing the expressed polypeptide) are then preferably contacted with a test compound potentially containing the molecule to observe binding, stimulation, or inhibition of activity of either the polypeptide or the molecule.

The assay may simply test binding of a candidate compound to the polypeptide, wherein binding is detected by a label, or in an assay involving competition with a labeled competitor. Further, the assay may test whether the candidate compound results in a signal generated by binding to the polypeptide.

Alternatively, the assay can be carried out using cell-free preparations, polypeptide/molecule affixed to a solid support, chemical libraries, or natural product mixtures. The assay may also simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide, measuring polypeptide/molecule activity or binding, and comparing the polypeptide/molecule activity or binding to a standard.

Preferably, an ELISA assay can measure polypeptide level or activity in a sample (e.g., biological sample) using a monoclonal or polyclonal antibody. The antibody can measure polypeptide level or activity by either binding, directly or indirectly, to the polypeptide or by competing with the polypeptide for a substrate.

Additionally, the receptor to which the polypeptide of the present invention binds can be identified by numerous methods known to those of skill in the art, for example, ligand

panning and FACS sorting (Coligan, et al., Current Protocols in Immun., 1(2), Chapter 5, (1991)). For example, expression cloning is employed wherein polyadenylated RNA is prepared from a cell responsive to the polypeptides, for example, NIH3T3 cells which are known to contain multiple receptors for the FGF family proteins, and SC-3 cells, and a cDNA library created from this RNA is divided into pools and used to transfect COS cells or other cells that are not responsive to the polypeptides. Transfected cells which are grown on glass slides are exposed to the polypeptide of the present invention, after they have been labelled. The polypeptides can be labeled by a variety of means including iodination or inclusion of a recognition site for a site-specific protein kinase.

Following fixation and incubation, the slides are subjected to auto-radiographic analysis. Positive pools are identified and sub-pools are prepared and re-transfected using an iterative sub-pooling and re-screening process, eventually yielding a single clones that encodes the putative receptor.

As an alternative approach for receptor identification, the labeled polypeptides can be photoaffinity linked with cell membrane or extract preparations that express the receptor molecule. Cross-linked material is resolved by PAGE analysis and exposed to X-ray film. The labeled complex containing the receptors of the polypeptides can be excised, resolved into peptide fragments, and subjected to protein microsequencing. The amino acid sequence obtained from microsequencing would be used to design a set of degenerate oligonucleotide probes to screen a cDNA library to identify the genes encoding the putative receptors.

Moreover, the techniques of gene-shuffling, motif-shuffling, exon-shuffling, and/or codon-shuffling (collectively referred to as "DNA shuffling") may be employed to modulate the activities of the polypeptide of the present invention thereby effectively generating agonists and antagonists of the polypeptide of the present invention. *See generally*, U.S. Patent Nos. 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, and 5,837,458, and Patten, P. A., *et al., Curr. Opinion 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); and Lorenzo, M. M. and Blasco, R. *Biotechniques* 24(2):308-13 (1998) (each of these patents and publications are hereby incorporated by reference). In one embodiment, alteration of polynucleotides and corresponding polypeptides may be achieved by DNA shuffling. DNA shuffling involves the assembly of two or more DNA segments into a desired molecule by homologous, or site-specific, recombination. In another embodiment, polynucleotides and corresponding

polypeptides may be altered by being subjected to random mutagenesis by error-prone PCR, random nucleotide insertion or other methods prior to recombination. In another embodiment, one or more components, motifs, sections, parts, domains, fragments, etc., of the polypeptide of the present invention may be recombined with one or more components, motifs, sections, parts, domains, fragments, etc. of one or more heterologous molecules. In preferred embodiments, the heterologous molecules are family members. In further preferred embodiments, the heterologous molecule is a growth factor such as, for example, platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF-I), transforming growth factor (TGF)-alpha, epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), TGF-beta, bone morphogenetic protein (BMP)-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, activins A and B, decapentaplegic(dpp), 60A, OP-2, dorsalin, growth differentiation factors (GDFs), nodal, MIS, inhibin-alpha, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta5, and glial-derived neurotrophic factor (GDNF).

Other preferred fragments are biologically active fragments of the polypeptide of the present invention. Biologically active fragments are those exhibiting activity similar, but not necessarily identical, to an activity of the polypeptide of the present invention. The biological activity of the fragments may include an improved desired activity, or a decreased undesirable activity.

Additionally, this invention provides a method of screening compounds to identify those which modulate the action of the polypeptide of the present invention. An example of such an assay comprises combining a mammalian fibroblast cell, a the polypeptide of the present invention, the compound to be screened and ^{3}[H] thymidine under cell culture conditions where the fibroblast cell would normally proliferate. A control assay may be performed in the absence of the compound to be screened and compared to the amount of fibroblast proliferation in the presence of the compound to determine if the compound stimulates proliferation by determining the uptake of ^{3}[H] thymidine in each case. The amount of fibroblast cell proliferation is measured by liquid scintillation chromatography which measures the incorporation of ^{3}[H] thymidine. Both agonist and antagonist compounds may be identified by this procedure.

In another method, a mammalian cell or membrane preparation expressing a receptor for a polypeptide of the present invention is incubated with a labeled polypeptide of the

present invention in the presence of the compound. The ability of the compound to enhance or block this interaction could then be measured. Alternatively, the response of a known second messenger system following interaction of a compound to be screened and the receptor is measured and the ability of the compound to bind to the receptor and elicit a second messenger response is measured to determine if the compound is a potential agonist or antagonist. Such second messenger systems include but are not limited to, cAMP guanylate cyclase, ion channels or phosphoinositide hydrolysis.

All of these above assays can be used as diagnostic or prognostic markers. The molecules discovered using these assays can be used to treat disease or to bring about a particular result in a patient (e.g., blood vessel growth) by activating or inhibiting the polypeptide/molecule. Moreover, the assays can discover agents which may inhibit or enhance the production of the polypeptides of the invention from suitably manipulated cells or tissues.

Therefore, the invention includes a method of identifying compounds which bind to a polypeptide of the invention comprising the steps of: (a) incubating a candidate binding compound with a polypeptide of the present invention; and (b) determining if binding has occurred. Moreover, the invention includes a method of identifying agonists/antagonists comprising the steps of: (a) incubating a candidate compound with a polypeptide of the present invention, (b) assaying a biological activity, and (b) determining if a biological activity of the polypeptide has been altered.

Targeted Delivery

In another embodiment, the invention provides a method of delivering compositions to targeted cells expressing a receptor for a polypeptide of the invention, or cells expressing a cell bound form of a polypeptide of the invention.

As discussed herein, polypeptides or antibodies of the invention may be associated with heterologous polypeptides, heterologous nucleic acids, toxins, or prodrugs via hydrophobic, hydrophilic, ionic and/or covalent interactions. In one embodiment, the invention provides a method for the specific delivery of compositions of the invention to cells by administering polypeptides of the invention (including antibodies) that are associated with heterologous polypeptides or nucleic acids. In one example, the invention provides a method for delivering a therapeutic protein into the targeted cell. In another example, the invention

provides a method for delivering a single stranded nucleic acid (e.g., antisense or ribozymes) or double stranded nucleic acid (e.g., DNA that can integrate into the cell's genome or replicate episomally and that can be transcribed) into the targeted cell.

In another embodiment, the invention provides a method for the specific destruction of cells (e.g., the destruction of tumor cells) by administering polypeptides of the invention (e.g., polypeptides of the invention or antibodies of the invention) in association with toxins or cytotoxic prodrugs.

By "toxin" is meant compounds that bind and activate endogenous cytotoxic effector systems, radioisotopes, holotoxins, modified toxins, catalytic subunits of toxins, or any molecules or enzymes not normally present in or on the surface of a cell that under defined conditions cause the cell's death. Toxins that may be used according to the methods of the invention include, but are not limited to, radioisotopes known in the art, compounds such as, for example, antibodies (or complement fixing containing portions thereof) that bind an inherent or induced endogenous cytotoxic effector system, thymidine kinase, endonuclease, RNAse, alpha toxin, ricin, abrin, *Pseudomonas* exotoxin A, diphtheria toxin, saporin, momordin, gelonin, pokeweed antiviral protein, alpha-sarcin and cholera toxin. By "cytotoxic prodrug" is meant a non-toxic compound that is converted by an enzyme, normally present in the cell, into a cytotoxic compound. Cytotoxic prodrugs that may be used according to the methods of the invention include, but are not limited to, glutamyl derivatives of benzoic acid mustard alkylating agent, phosphate derivatives of etoposide or mitomycin C, cytosine arabinoside, daunorubisin, and phenoxyacetamide derivatives of doxorubicin.

Drug Screening

Further contemplated is the use of the polypeptides of the present invention, or the polynucleotides encoding these polypeptides, to screen for molecules which modify the activities of the polypeptides of the present invention. Such a method would include contacting the polypeptide of the present invention with a selected compound(s) suspected of having antagonist or agonist activity, and assaying the activity of these polypeptides following binding.

This invention is particularly useful for screening therapeutic compounds by using the polypeptides of the present invention, or binding fragments thereof, in any of a variety of

drug screening techniques. The polypeptide or fragment employed in such a test may be affixed to a solid support, expressed on a cell surface, free in solution, or located intracellularly. One method of drug screening utilizes eukaryotic or prokaryotic host cells which are stably transformed with recombinant nucleic acids expressing the polypeptide or fragment. Drugs are screened against such transformed cells in competitive binding assays. One may measure, for example, the formulation of complexes between the agent being tested and a polypeptide of the present invention.

Thus, the present invention provides methods of screening for drugs or any other agents which affect activities mediated by the polypeptides of the present invention. These methods comprise contacting such an agent with a polypeptide of the present invention or a fragment thereof and assaying for the presence of a complex between the agent and the polypeptide or a fragment thereof, by methods well known in the art. In such a competitive binding assay, the agents to screen are typically labeled. Following incubation, free agent is separated from that present in bound form, and the amount of free or uncomplexed label is a measure of the ability of a particular agent to bind to the polypeptides of the present invention.

Another technique for drug screening provides high throughput screening for compounds having suitable binding affinity to the polypeptides of the present invention, and is described in great detail in European Patent Application 84/03564, published on September 13, 1984, which is incorporated herein by reference herein. Briefly stated, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with polypeptides of the present invention and washed. Bound polypeptides are then detected by methods well known in the art. Purified polypeptides are coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. In addition, non-neutralizing antibodies may be used to capture the peptide and immobilize it on the solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of binding polypeptides of the present invention specifically compete with a test compound for binding to the polypeptides or fragments thereof. In this manner, the antibodies are used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic epitopes with a polypeptide of the invention.

Antisense And Ribozyme (Antagonists)

In specific embodiments, antagonists according to the present invention are nucleic acids corresponding to the sequences contained in SEQ ID NO:X, or the complementary strand thereof, and/or to nucleotide sequences contained in the cDNA plasmid:V identified in Table 1. In one embodiment, antisense sequence is generated internally, by the organism, in another embodiment, the antisense sequence is separately administered (see, for example, O'Connor, J., Neurochem. 56:560 (1991). Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Antisense technology can be used to control gene expression through antisense DNA or RNA, or through triple-helix formation. Antisense techniques are discussed for example, in Okano, J., Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Triple helix formation is discussed in, for instance, Lee et al., Nucleic Acids Research 6:3073 (1979); Cooney et al., Science 241:456 (1988); and Dervan et al., Science 251:1300 (1991). The methods are based on binding of a polynucleotide to a complementary DNA or RNA.

For example, the use of c-myc and c-myb antisense RNA constructs to inhibit the growth of the non-lymphocytic leukemia cell line HL-60 and other cell lines was previously described. (Wickstrom et al. (1988); Anfossi et al. (1989)). These experiments were performed in vitro by incubating cells with the oligoribonucleotide. A similar procedure for in vivo use is described in WO 91/15580. Briefly, a pair of oligonucleotides for a given antisense RNA is produced as follows: A sequence complimentary to the first 15 bases of the open reading frame is flanked by an EcoR1 site on the 5 end and a HindIII site on the 3 end. Next, the pair of oligonucleotides is heated at 90°C for one minute and then annealed in 2X ligation buffer (20mM TRIS HCl pH 7.5, 10mM MgCl2, 10MM dithiothreitol (DTT) and 0.2 mM ATP) and then ligated to the EcoR1/Hind III site of the retroviral vector PMV7 (WO 91/15580).

For example, the 5' coding portion of a polynucleotide that encodes the polypeptide of the present invention may be used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription thereby preventing transcription and the production of the receptor. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA in vivo and blocks translation of the mRNA molecule into receptor polypeptide.

In one embodiment, the antisense nucleic acid of the invention is produced intracellularly by transcription from an exogenous sequence. For example, a vector or a portion thereof, is transcribed, producing an antisense nucleic acid (RNA) of the invention. Such a vector would contain a sequence encoding the antisense nucleic acid. Such a vector can remain episomal or become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed to produce the desired antisense RNA. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology methods standard in the art. Vectors can be plasmid, viral, or others known in the art, used for replication and expression in vertebrate cells. Expression of the sequence encoding the polypeptide of the present invnetion or fragments thereof, can be by any promoter known in the art to act in vertebrate, preferably human cells. Such promoters can be inducible or constitutive. Such promoters include, but are not limited to, the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, Nature 29:304-310 (1981), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto et al., Cell 22:787-797 (1980), the herpes thymidine promoter (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445 (1981), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster, et al., Nature 296:39-42 (1982)), etc.

The antisense nucleic acids of the invention comprise a sequence complementary to at least a portion of an RNA transcript of a gene of the present invention. However, absolute complementarity, although preferred, is not required. A sequence "complementary to at least a portion of an RNA," referred to herein, means a sequence having sufficient complementarity to be able to hybridize with the RNA, forming a stable duplex; in the case of double stranded antisense nucleic acids, a single strand of the duplex DNA may thus be tested, or triplex formation may be assayed. The ability to hybridize will depend on both the degree of complementarity and the length of the antisense nucleic acid. Generally, the larger the hybridizing nucleic acid, the more base mismatches with a RNA it may contain and still form a stable duplex (or triplex as the case may be). One skilled in the art can ascertain a tolerable degree of mismatch by use of standard procedures to determine the melting point of the hybridized complex.

Oligonucleotides that are complementary to the 5' end of the message, e.g., the 5' untranslated sequence up to and including the AUG initiation codon, should work most efficiently at inhibiting translation. However, sequences complementary to the 3' untranslated sequences of mRNAs have been shown to be effective at inhibiting translation of

mRNAs as well. See generally, Wagner, R., 1994, Nature 372:333-335. Thus, oligonucleotides complementary to either the 5'- or 3'- non- translated, non-coding regions of polynucleotide sequences described herein could be used in an antisense approach to inhibit translation of endogenous mRNA. Oligonucleotides complementary to the 5' untranslated region of the mRNA should include the complement of the AUG start codon. Antisense oligonucleotides complementary to mRNA coding regions are less efficient inhibitors of translation but could be used in accordance with the invention. Whether designed to hybridize to the 5'-, 3'- or coding region of mRNA of the present invention, antisense nucleic acids should be at least six nucleotides in length, and are preferably oligonucleotides ranging from 6 to about 50 nucleotides in length. In specific aspects the oligonucleotide is at least 10 nucleotides, at least 17 nucleotides, at least 25 nucleotides or at least 50 nucleotides.

The polynucleotides of the invention can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. The oligonucleotide can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone, for example, to improve stability of the molecule, hybridization, etc. The oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors in vivo), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT Publication No. WO88/09810, published December 15, 1988) or the blood-brain barrier (see, e.g., PCT Publication No. WO89/10134, published April 25, 1988), hybridization-triggered cleavage agents. (See, e.g., Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958-976) or intercalating agents. (See, e.g., Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549). To this end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, hybridization-triggered cleavage agent, etc.

The antisense oligonucleotide may comprise at least one modified base moiety which is selected from the group including, but not limited to, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxylmethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-

D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine.

The antisense oligonucleotide may also comprise at least one modified sugar moiety selected from the group including, but not limited to, arabinose, 2-fluoroarabinose, xylulose, and hexose.

In yet another embodiment, the antisense oligonucleotide comprises at least one modified phosphate backbone selected from the group including, but not limited to, a phosphorothioate, a phosphorodithioate, a phosphoramidothioate, a phosphoramidate, a phosphordiamidate, a methylphosphonate, an alkyl phosphotriester, and a formacetal or analog thereof.

In yet another embodiment, the antisense oligonucleotide is an a-anomeric oligonucleotide. An a-anomeric oligonucleotide forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual b-units, the strands run parallel to each other (Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641). The oligonucleotide is a 2'-0-methylribonucleotide (Inoue et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148), or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327-330).

Polynucleotides of the invention may be synthesized by standard methods known in the art, e.g. by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, etc.). As examples, phosphorothioate oligonucleotides may be synthesized by the method of Stein et al. (1988, Nucl. Acids Res. 16:3209), methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451), etc.

While antisense nucleotides complementary to the coding region sequence could be used, those complementary to the transcribed untranslated region are most preferred.

Potential antagonists according to the invention also include catalytic RNA, or a ribozyme (See, e.g., PCT International Publication WO 90/11364, published October 4, 1990; Sarver et al, Science 247:1222-1225 (1990). While ribozymes that cleave mRNA at site specific recognition sequences can be used to destroy mRNAs, the use of hammerhead ribozymes is preferred. Hammerhead ribozymes cleave mRNAs at locations dictated by

flanking regions that form complementary base pairs with the target mRNA. The sole requirement is that the target mRNA have the following sequence of two bases: 5'-UG-3'. The construction and production of hammerhead ribozymes is well known in the art and is described more fully in Haseloff and Gerlach, Nature 334:585-591 (1988). There are numerous potential hammerhead ribozyme cleavage sites within the nucleotide sequence of SEQ ID NO:X. Preferably, the ribozyme is engineered so that the cleavage recognition site is located near the 5' end of the mRNA; i.e., to increase efficiency and minimize the intracellular accumulation of non-functional mRNA transcripts.

As in the antisense approach, the ribozymes of the invention can be composed of modified oligonucleotides (e.g. for improved stability, targeting, etc.) and should be delivered to cells which express polypeptides of the present invention in vivo. DNA constructs encoding the ribozyme may be introduced into the cell in the same manner as described above for the introduction of antisense encoding DNA. A preferred method of delivery involves using a DNA construct "encoding" the ribozyme under the control of a strong constitutive promoter, such as, for example, pol III or pol II promoter, so that transfected cells will produce sufficient quantities of the ribozyme to destroy endogenous messages and inhibit translation. Since ribozymes unlike antisense molecules, are catalytic, a lower intracellular concentration is required for efficiency.

Antagonist/agonist compounds may be employed to inhibit the cell growth and proliferation effects of the polypeptides of the present invention on neoplastic cells and tissues, i.e. stimulation of angiogenesis of tumors, and, therefore, retard or prevent abnormal cellular growth and proliferation, for example, in tumor formation or growth.

The antagonist/agonist may also be employed to prevent hyper-vascular diseases, and prevent the proliferation of epithelial lens cells after extracapsular cataract surgery. Prevention of the mitogenic activity of the polypeptides of the present invention may also be desirous in cases such as restenosis after balloon angioplasty.

The antagonist/agonist may also be employed to prevent the growth of scar tissue during wound healing.

The antagonist/agonist may also be employed to treat the diseases described herein.

Thus, the invention provides a method of treating disorders or diseases, including but not limited to the disorders or diseases listed throughout this application, associated with overexpression of a polynucleotide of the present invention by administering to a patient (a)

an antisense molecule directed to the polynucleotide of the present invention, and/or (b) a ribozyme directed to the polynucleotide of the present invention.

Binding Peptides and Other Molecules

The invention also encompasses screening methods for identifying polypeptides and nonpolypeptides that bind IL-6-like polypeptides, and the IL-6-like binding molecules identified thereby. These binding molecules are useful, for example, as agonists and antagonists of the IL-6-like polypeptides. Such agonists and antagonists can be used, in accordance with the invention, in the therapeutic embodiments described in detail, below.

This method comprises the steps of:

a. contacting IL-6-like polypeptides with a plurality of molecules; and

b. identifying a molecule that binds the IL-6-like polypeptides.

The step of contacting the IL-6-like polypeptides with the plurality of molecules may be effected in a number of ways. For example, one may contemplate immobilizing the IL-6-like polypeptides on a solid support and bringing a solution of the plurality of molecules in contact with the immobilized IL-6-like polypeptides. Such a procedure would be akin to an affinity chromatographic process, with the affinity matrix being comprised of the immobilized IL-6-like polypeptides. The molecules having a selective affinity for the IL-6-like polypeptides can then be purified by affinity selection. The nature of the solid support, process for attachment of the IL-6-like polypeptides to the solid support, solvent, and conditions of the affinity isolation or selection are largely conventional and well known to those of ordinary skill in the art.

Alternatively, one may also separate a plurality of polypeptides into substantially separate fractions comprising a subset of or individual polypeptides. For instance, one can separate the plurality of polypeptides by gel electrophoresis, column chromatography, or like method known to those of ordinary skill for the separation of polypeptides. The individual polypeptides can also be produced by a transformed host cell in such a way as to be expressed on or about its outer surface (e.g., a recombinant phage). Individual isolates can then be "probed" by the IL-6-like polypeptides, optionally in the presence of an inducer should one be required for expression, to determine if any selective affinity interaction takes place between the IL-6-like polypeptides and the individual clone. Prior to contacting the IL-6-like polypeptides with each fraction comprising individual polypeptides, the polypeptides

could first be transferred to a solid support for additional convenience. Such a solid support may simply be a piece of filter membrane, such as one made of nitrocellulose or nylon. In this manner, positive clones could be identified from a collection of transformed host cells of an expression library, which harbor a DNA construct encoding a polypeptide having a selective affinity for IL-6-like polypeptides. Furthermore, the amino acid sequence of the polypeptide having a selective affinity for the IL-6-like polypeptides can be determined directly by conventional means or the coding sequence of the DNA encoding the polypeptide can frequently be determined more conveniently. The primary sequence can then be deduced from the corresponding DNA sequence. If the amino acid sequence is to be determined from the polypeptide itself, one may use microsequencing techniques. The sequencing technique may include mass spectroscopy.

In certain situations, it may be desirable to wash away any unbound IL-6-like polypeptides, or alternatively, unbound polypeptides, from a mixture of the IL-6-like polypeptides and the plurality of polypeptides prior to attempting to determine or to detect the presence of a selective affinity interaction. Such a wash step may be particularly desirable when the IL-6-like polypeptides or the plurality of polypeptides is bound to a solid support.

The plurality of molecules provided according to this method may be provided by way of diversity libraries, such as random or combinatorial peptide or nonpeptide libraries which can be screened for molecules that specifically bind IL-6-like polypeptides. Many libraries are known in the art that can be used, e.g., chemically synthesized libraries, recombinant (e.g., phage display libraries), and in vitro translation-based libraries. Examples of chemically synthesized libraries are described in Fodor et al., 1991, Science 251:767-773; Houghten et al., 1991, Nature 354:84-86; Lam et al., 1991, Nature 354:82-84; Medynski, 1994, Bio/Technology 12:709-710;Gallop et al., 1994, J. Medicinal Chemistry 37(9):1233-1251; Ohlmeyer et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926; Erb et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426; Houghten et al., 1992, Biotechniques 13:412; Jayawickreme et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1614-1618; Salmon et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11708-11712; PCT Publication No. WO 93/20242; and Brenner and Lerner, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383.

Examples of phage display libraries are described in Scott and Smith, 1990, Science 249:386-390; Devlin et al., 1990, Science, 249:404-406; Christian, R. B., et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:711-718); Lenstra, 1992, J. Immunol. Meth. 152:149-157; Kay et al., 1993, Gene

128:59-65; and PCT Publication No. WO 94/18318 dated Aug. 18, 1994.

In vitro translation-based libraries include but are not limited to those described in PCT Publication No. WO 91/05058 dated Apr. 18, 1991; and Mattheakis et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026.

By way of examples of nonpeptide libraries, a benzodiazepine library (see e.g., Bunin et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712) can be adapted for use. Peptoid libraries (Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371) can also be used. Another example of a library that can be used, in which the amide functionalities in peptides have been permethylated to generate a chemically transformed combinatorial library, is described by Ostresh et al. (1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142).

The variety of non-peptide libraries that are useful in the present invention is great. For example, Ecker and Crooke, 1995, Bio/Technology 13:351-360 list benzodiazepines, hydantoins, piperazinediones, biphenyls, sugar analogs, beta-mercaptoketones, arylacetic acids, acylpiperidines, benzopyrans, cubanes, xanthines, aminimides, and oxazolones as among the chemical species that form the basis of various libraries.

Non-peptide libraries can be classified broadly into two types: decorated monomers and oligomers. Decorated monomer libraries employ a relatively simple scaffold structure upon which a variety functional groups is added. Often the scaffold will be a molecule with a known useful pharmacological activity. For example, the scaffold might be the benzodiazepine structure.

Non-peptide oligomer libraries utilize a large number of monomers that are assembled together in ways that create new shapes that depend on the order of the monomers. Among the monomer units that have been used are carbamates, pyrrolinones, and morpholinos. Peptoids, peptide-like oligomers in which the side chain is attached to the alpha amino group rather than the alpha carbon, form the basis of another version of non-peptide oligomer libraries. The first non-peptide oligomer libraries utilized a single type of monomer and thus contained a repeating backbone. Recent libraries have utilized more than one monomer, giving the libraries added flexibility.

Screening the libraries can be accomplished by any of a variety of commonly known methods. See, e.g., the following references, which disclose screening of peptide libraries: Parmley and Smith, 1989, Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218; Scott and Smith, 1990, Science 249:386-390; Fowlkes et al., 1992; BioTechniques 13:422-427; Oldenburg et al.,

1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5393-5397; Yu et al., 1994, Cell 76:933-945; Staudt et al., 1988, Science 241:577-580; Bock et al., 1992, Nature 355:564-566; Tuerk et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6988-6992; Ellington et al., 1992, Nature 355:850-852; U.S. Pat. No. 5,096,815, U.S. Pat. No. 5,223,409, and U.S. Pat. No. 5,198,346, all to Ladner et al.; Rebar and Pabo, 1993, Science 263:671-673; and CT Publication No. WO 94/18318.

In a specific embodiment, screening to identify a molecule that binds IL-6-like polypeptides can be carried out by contacting the library members with a IL-6-like polypeptides immobilized on a solid phase and harvesting those library members that bind to the IL-6-like polypeptides. Examples of such screening methods, termed "panning" techniques are described by way of example in Parmley and Smith, 1988, Gene 73:305-318; Fowlkes et al., 1992, BioTechniques 13:422-427; PCT Publication No. WO 94/18318; and in references cited herein.

In another embodiment, the two-hybrid system for selecting interacting proteins in yeast (Fields and Song, 1989, Nature 340:245-246; Chien et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582) can be used to identify molecules that specifically bind to IL-6-like polypeptides.

Where the IL-6-like binding molecule is a polypeptide, the polypeptide can be conveniently selected from any peptide library, including random peptide libraries, combinatorial peptide libraries, or biased peptide libraries. The term "biased" is used herein to mean that the method of generating the library is manipulated so as to restrict one or more parameters that govern the diversity of the resulting collection of molecules, in this case peptides.

Thus, a truly random peptide library would generate a collection of peptides in which the probability of finding a particular amino acid at a given position of the peptide is the same for all 20 amino acids. A bias can be introduced into the library, however, by specifying, for example, that a lysine occur every fifth amino acid or that positions 4, 8, and 9 of a decapeptide library be fixed to include only arginine. Clearly, many types of biases can be contemplated, and the present invention is not restricted to any particular bias. Furthermore, the present invention contemplates specific types of peptide libraries, such as phage displayed peptide libraries and those that utilize a DNA construct comprising a lambda phage vector with a DNA insert.

As mentioned above, in the case of a IL-6-like binding molecule that is a polypeptide,

the polypeptide may have about 6 to less than about 60 amino acid residues, preferably about 6 to about 10 amino acid residues, and most preferably, about 6 to about 22 amino acids. In another embodiment, a IL-6-like binding polypeptide has in the range of 15-100 amino acids, or 20-50 amino acids.

The selected IL-6-like binding polypeptide can be obtained by chemical synthesis or recombinant expression.

Other Activities

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention, as a result of the ability to stimulate vascular endothelial cell growth, may be employed in treatment for stimulating re-vascularization of ischemic tissues due to various disease conditions such as thrombosis, arteriosclerosis, and other cardiovascular conditions. The polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may also be employed to stimulate angiogenesis and limb regeneration, as discussed above.

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may also be employed for treating wounds due to injuries, burns, post-operative tissue repair, and ulcers since they are mitogenic to various cells of different origins, such as fibroblast cells and skeletal muscle cells, and therefore, facilitate the repair or replacement of damaged or diseased tissue.

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may also be employed stimulate neuronal growth and to treat and prevent neuronal damage which occurs in certain neuronal disorders or neuro-degenerative conditions such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and AIDS-related complex. A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may have the ability to stimulate chondrocyte growth, therefore, they may be employed to enhance bone and periodontal regeneration and aid in tissue transplants or bone grafts.

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may be also be employed to prevent skin aging due to sunburn by stimulating keratinocyte growth.

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may also be employed for preventing hair loss, since FGF family members activate hair-forming cells and promotes melanocyte growth. Along the same lines, a polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may be employed to stimulate growth and

differentiation of hematopoietic cells and bone marrow cells when used in combination with other cytokines.

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may also be employed to maintain organs before transplantation or for supporting cell culture of primary tissues. A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may also be employed for inducing tissue of mesodermal origin to differentiate in early embryos.

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may also increase or decrease the differentiation or proliferation of embryonic stem cells, besides, as discussed above, hematopoietic lineage.

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may also be used to modulate mammalian characteristics, such as body height, weight, hair color, eye color, skin, percentage of adipose tissue, pigmentation, size, and shape (e.g., cosmetic surgery). Similarly, a polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may be used to modulate mammalian metabolism affecting catabolism, anabolism, processing, utilization, and storage of energy.

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may be used to change a mammal's mental state or physical state by influencing biorhythms, caricadic rhythms, depression (including depressive disorders), tendency for violence, tolerance for pain, reproductive capabilities (preferably by Activin or Inhibin-like activity), hormonal or endocrine levels, appetite, libido, memory, stress, or other cognitive qualities.

A polypeptide, polynucleotide, agonist, or antagonist of the present invention may also be used as a food additive or preservative, such as to increase or decrease storage capabilities, fat content, lipid, protein, carbohydrate, vitamins, minerals, cofactors or other nutritional components.

The above-recited applications have uses in a wide variety of hosts. Such hosts include, but are not limited to, human, murine, rabbit, goat, guinea pig, camel, horse, mouse, rat, hamster, pig, micro-pig, chicken, goat, cow, sheep, dog, cat, non-human primate, and human. In specific embodiments, the host is a mouse, rabbit, goat, guinea pig, chicken, rat, hamster, pig, sheep, dog or cat. In preferred embodiments, the host is a mammal. In most preferred embodiments, the host is a human.

Other Preferred Embodiments

Other preferred embodiments of the claimed invention include an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a sequence of at least about 50 contiguous nucleotides in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto, and/or cDNA plasmid:V.

Also preferred is a nucleic acid molecule wherein said sequence of contiguous nucleotides is included in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:X in the range of positions identified for SEQ ID NO:X in Table 1.

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a sequence of at least about 150 contiguous nucleotides in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto, and/or cDNA plasmid:V.

Further preferred is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a sequence of at least about 500 contiguous nucleotides in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto, and/or cDNA plasmid:V.

A further preferred embodiment is a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:X in the range of positions identified for SEQ ID NO:X in Table 1.

A further preferred embodiment is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to the complete nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto, and/or cDNA plasmid:V.

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule which hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and/or cDNA plasmid:V, wherein said nucleic acid molecule which hybridizes does not hybridize under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence consisting of only A residues or of only T residues.

Also preferred is a composition of matter comprising a DNA molecule which comprises cDNA plasmid:V.

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in the nucleotide sequence of cDNA plasmid:V.

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule, wherein said sequence of at least 50 contiguous nucleotides is included in the nucleotide sequence of an open reading frame sequence encoded by cDNA plasmid:V.

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to sequence of at least 150 contiguous nucleotides in the nucleotide sequence encoded by cDNA plasmid:V.

A further preferred embodiment is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to sequence of at least 500 contiguous nucleotides in the nucleotide sequence encoded by cDNA plasmid:V.

A further preferred embodiment is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to the complete nucleotide sequence encoded by cDNA plasmid:V.

A further preferred embodiment is a method for detecting in a biological sample a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from the group consisting of: a nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a nucleotide sequence encoded by cDNA plasmid:V; which method comprises a step of comparing a nucleotide sequence of at least one nucleic acid molecule in said sample with a sequence selected from said group and determining whether the sequence of said nucleic acid molecule in said sample is at least 95% identical to said selected sequence.

Also preferred is the above method wherein said step of comparing sequences comprises determining the extent of nucleic acid hybridization between nucleic acid molecules in said sample and a nucleic acid molecule comprising said sequence selected from said group. Similarly, also preferred is the above method wherein said step of comparing sequences is performed by comparing the nucleotide sequence determined from a nucleic acid molecule in said sample with said sequence selected from said group. The nucleic acid molecules can comprise DNA molecules or RNA molecules.

A further preferred embodiment is a method for identifying the species, tissue or cell type of a biological sample which method comprises a step of detecting nucleic acid

molecules in said sample, if any, comprising a nucleotide sequence that is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from the group consisting of: a nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a nucleotide sequence encoded by cDNA plasmid:V.

The method for identifying the species, tissue or cell type of a biological sample can comprise a step of detecting nucleic acid molecules comprising a nucleotide sequence in a panel of at least two nucleotide sequences, wherein at least one sequence in said panel is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from said group.

Also preferred is a method for diagnosing in a subject a pathological condition associated with abnormal structure or expression of a nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto or cDNA plasmid:V which encodes a protein, wherein the method comprises a step of detecting in a biological sample obtained from said subject nucleic acid molecules, if any, comprising a nucleotide sequence that is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from the group consisting of: a nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a nucleotide sequence of cDNA plasmid:V.

The method for diagnosing a pathological condition can comprise a step of detecting nucleic acid molecules comprising a nucleotide sequence in a panel of at least two nucleotide sequences, wherein at least one sequence in said panel is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from said group.

Also preferred is a composition of matter comprising isolated nucleic acid molecules wherein the nucleotide sequences of said nucleic acid molecules comprise a panel of at least two nucleotide sequences, wherein at least one sequence in said panel is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from the group consisting of: a nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a nucleotide sequence encoded by cDNA plasmid:V. The nucleic acid molecules can comprise DNA molecules or RNA molecules.

Also preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to a sequence of at least about 10 contiguous amino acids in the polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and/or a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Also preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to a sequence of at least about 30 contiguous amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and/or a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Further preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to a sequence of at least about 100 contiguous amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and/or a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Further preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to the complete amino acid sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and/or a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Further preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to a sequence of at least about 10 contiguous amino acids in the complete amino acid sequence of a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Also preferred is a polypeptide wherein said sequence of contiguous amino acids is included in the amino acid sequence of a portion of said polypeptide encoded by cDNA plasmid:V; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and/or the polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y.

Also preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to a sequence of at least about 30 contiguous amino acids in the amino acid sequence of a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Also preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to a sequence of at least about 100 contiguous amino acids in the amino acid sequence of a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Also preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to the amino acid sequence of a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Further preferred is an isolated antibody which binds specifically to a polypeptide comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of: a polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

[91]

Further preferred is a method for detecting in a biological sample a polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of: a polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V; which method comprises a step of comparing an amino acid sequence of at least one polypeptide molecule in said sample with a sequence selected from said group and determining whether the sequence of said polypeptide molecule in said sample is at least 90% identical to said sequence of at least 10 contiguous amino acids.

Also preferred is the above method wherein said step of comparing an amino acid sequence of at least one polypeptide molecule in said sample with a sequence selected from said group comprises determining the extent of specific binding of polypeptides in said sample to an antibody which binds specifically to a polypeptide comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of: a polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Also preferred is the above method wherein said step of comparing sequences is performed by comparing the amino acid sequence determined from a polypeptide molecule in said sample with said sequence selected from said group.

Also preferred is a method for identifying the species, tissue or cell type of a biological sample which method comprises a step of detecting polypeptide molecules in said sample, if any, comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of: polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Also preferred is the above method for identifying the species, tissue or cell type of a biological sample, which method comprises a step of detecting polypeptide molecules comprising an amino acid sequence in a panel of at least two amino acid sequences, wherein at least one sequence in said panel is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the above group.

Also preferred is a method for diagnosing in a subject a pathological condition associated with abnormal structure or expression of a nucleic acid sequence identified in Table 1 encoding a polypeptide, which method comprises a step of detecting in a biological sample obtained from said subject polypeptide molecules comprising an amino acid sequence in a panel of at least two amino acid sequences, wherein at least one sequence in said panel is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of: polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

In any of these methods, the step of detecting said polypeptide molecules includes using an antibody.

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a nucleotide sequence encoding a polypeptide wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence that is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of: polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule, wherein said nucleotide sequence encoding a polypeptide has been optimized for expression of said polypeptide in a prokaryotic host.

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of: polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V.

Further preferred is a method of making a recombinant vector comprising inserting any of the above isolated nucleic acid molecule into a vector. Also preferred is the recombinant vector produced by this method. Also preferred is a method of making a recombinant host cell comprising introducing the vector into a host cell, as well as the recombinant host cell produced by this method.

Also preferred is a method of making an isolated polypeptide comprising culturing this recombinant host cell under conditions such that said polypeptide is expressed and recovering said polypeptide. Also preferred is this method of making an isolated

polypeptide, wherein said recombinant host cell is a eukaryotic cell and said polypeptide is a human protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: polypeptide sequence of SEQ ID NO:Y; a polypeptide encoded by SEQ ID NO:X or the complementary strand thereto and a polypeptide encoded by cDNA plasmid:V. The isolated polypeptide produced by this method is also preferred.

Also preferred is a method of treatment of an individual in need of an increased level of a protein activity, which method comprises administering to such an individual a Therapeutic comprising an amount of an isolated polypeptide, polynucleotide, immunogenic fragment or analogue thereof, binding agent, antibody, or antigen binding fragment of the claimed invention effective to increase the level of said protein activity in said individual.

Also preferred is a method of treatment of an individual in need of a decreased level of a protein activity, which method comprised administering to such an individual a Therapeutic comprising an amount of an isolated polypeptide, polynucleotide, immunogenic fragment or analogue thereof, binding agent, antibody, or antigen binding fragment of the claimed invention effective to decrease the level of said protein activity in said individual.

In specific embodiments of the invention, for each "Contig ID" listed in the fourth column of Table 2, preferably excluded are one or more polynucleotides comprising, or alternatively consisting of, a nucleotide sequence referenced in the fifth column of Table 2 and described by the general formula of a-b, whereas a and b are uniquely determined for the corresponding SEQ ID NO:X referred to in column 3 of Table 2. Further specific embodiments are directed to polynucleotide sequences excluding one, two, three, four, or more of the specific polynucleotide sequences referred to in the fifth column of Table 2.

Preferably excluded from the present invention are one or more polynucleotides comprising a nucleotide sequence described by the general formula of c - d, where both c and d correspond to the positions of nucleotide residues shown in SEQ ID NO:X, and where d is greater than or equal to c + 14.

In no way is this listing meant to encompass all of the sequences which may be excluded by the general formula, it is just a representative example. All references available through these accessions are hereby incorporated by reference in their entirety.

TABLE 2

Gene No.	cDNA Clone ID NO:V	NT SEQ ID NO: X	Contig ID	Public Accession Numbers
1	HCEVF95	2	910114	AI955121, AI439352, AW294337, and AC005615.

TABLE 3

Clone ID NO:V	Library Code
HCEVF95	H0135 H0261 H0390 L1290

TABLE 4

Library Code	Library Description	Disease
H0135	Human Synovial Sarcoma	
H0261	H. cerebellum, Enzyme subtracted	
H0390	Human Amygdala Depression, re-excision	disease
L1290	NCI_CGAP_Lym12	

Having generally described the invention, the same will be more readily understood by reference to the following examples, which are provided by way of illustration and are not intended as limiting.

Examples

Example 1: Isolation of a Selected cDNA Clone From the Deposited Sample

Each cDNA clone in a cited ATCC deposit is contained in a plasmid vector. Table 1 identifies the vectors used to construct the cDNA library from which each clone was isolated. In many cases, the vector used to construct the library is a phage vector from which a plasmid has been excised. The table immediately below correlates the related plasmid for each phage vector used in constructing the cDNA library. For example, where a particular clone is identified in Table 1 as being isolated in the vector "Lambda Zap," the corresponding deposited clone is in "pBluescript."

Vector Used to Construct Library	Corresponding Deposited Plasmid
Lambda Zap	pBluescript (pBS)
Uni-Zap XR	pBluescript (pBS)
Zap Express	pBK
lafmid BA	plafmid BA
pSport1	pSport1
pCMVSport 2.0	pCMVSport 2.0
pCMVSport 3.0	pCMVSport 3.0
pCR®2.1	pCR®2.1

Vectors Lambda Zap (U.S. Patent Nos. 5,128,256 and 5,286,636), Uni-Zap XR (U.S. Patent Nos. 5,128, 256 and 5,286,636), Zap Express (U.S. Patent Nos. 5,128,256 and 5,286,636), pBluescript (pBS) (Short et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:7583-7600 (1988); Alting-Mees et al., *Nucleic Acids Res.*, 17:9494 (1989)) and pBK (Alting-Mees et al., *Strategies*, 5:58-61 (1992)) are commercially available from Stratagene Cloning Systems, Inc., 11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037. pBS contains an ampicillin resistance gene and pBK contains a neomycin resistance gene. Both can be transformed into E. coli strain XL-1 Blue, also available from Stratagene. pBS comes in 4 forms SK+, SK-, KS+ and KS. The S and K refers to the orientation of the polylinker to the T7 and T3 primer sequences which flank the polylinker region ("S" is for SacI and "K" is for KpnI which are the first sites on each respective end of the linker). "+" or "-" refer to the orientation of the f1 origin of

replication ("ori"), such that in one orientation, single stranded rescue initiated from the f1 ori generates sense strand DNA and in the other, antisense.

Vectors pSport1, pCMVSport 2.0 and pCMVSport 3.0, were obtained from Life Technologies, Inc., P. O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20897. All Sport vectors contain an ampicillin resistance gene and may be transformed into E. coli strain DH10B, also available from Life Technologies. (See, for instance, Gruber, C. E., et al., Focus 15:59 (1993).) Vector lafmid BA (Bento Soares, Columbia University, NY) contains an ampicillin resistance gene and can be transformed into E. coli strain XL-1 Blue. Vector pCR®2.1, which is available from Invitrogen, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008, contains an ampicillin resistance gene and may be transformed into E. coli strain DH10B, available from Life Technologies. (See, for instance, Clark, *Nuc. Acids Res.*, 16:9677-9686 (1988) and Mead et al., *Bio/Technology*, 9 (1991).) Preferably, a polynucleotide of the present invention does not comprise the phage vector sequences identified for the particular clone in Table 1, as well as the corresponding plasmid vector sequences designated above.

The deposited material in the sample assigned the ATCC Deposit Number cited in Table 1 for any given cDNA clone also may contain one or more additional plasmids, each comprising a cDNA clone different from that given clone. Thus, deposits sharing the same ATCC Deposit Number contain at least a plasmid for each cDNA clone identified in Table 1. Typically, each ATCC deposit sample cited in Table 1 comprises a mixture of approximately equal amounts (by weight) of about 50 plasmid DNAs, each containing a different cDNA clone; but such a deposit sample may include plasmids for more or less than 50 cDNA clones, up to about 500 cDNA clones.

Two approaches can be used to isolate a particular clone from the deposited sample of plasmid DNAs cited for that clone in Table 1. First, a plasmid is directly isolated by screening the clones using a polynucleotide probe corresponding to SEQ ID NO:X.

Particularly, a specific polynucleotide with 30-40 nucleotides is synthesized using an Applied Biosystems DNA synthesizer according to the sequence reported. The oligonucleotide is labeled, for instance, with ^{32}P-γ-ATP using T4 polynucleotide kinase and purified according to routine methods. (E.g., Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982).) The plasmid mixture is transformed into a suitable host, as indicated above (such as XL-1 Blue (Stratagene)) using techniques known to those of skill in the art, such as those provided by

the vector supplier or in related publications or patents cited above. The transformants are plated on 1.5% agar plates (containing the appropriate selection agent, e.g., ampicillin) to a density of about 150 transformants (colonies) per plate. These plates are screened using Nylon membranes according to routine methods for bacterial colony screening (e.g., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edit., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pages 1.93 to 1.104), or other techniques known to those of skill in the art.

Alternatively, two primers of 17-20 nucleotides derived from both ends of the SEQ ID NO:X (i.e., within the region of SEQ ID NO:X bounded by the 5' NT and the 3' NT of the clone defined in Table 1) are synthesized and used to amplify the desired cDNA using the deposited cDNA plasmid as a template. The polymerase chain reaction is carried out under routine conditions, for instance, in 25 µl of reaction mixture with 0.5 ug of the above cDNA template. A convenient reaction mixture is 1.5-5 mM $MgCl_2$, 0.01% (w/v) gelatin, 20 µM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 25 pmol of each primer and 0.25 Unit of Taq polymerase. Thirty five cycles of PCR (denaturation at 94°C for 1 min; annealing at 55°C for 1 min; elongation at 72°C for 1 min) are performed with a Perkin-Elmer Cetus automated thermal cycler. The amplified product is analyzed by agarose gel electrophoresis and the DNA band with expected molecular weight is excised and purified. The PCR product is verified to be the selected sequence by subcloning and sequencing the DNA product.

Several methods are available for the identification of the 5' or 3' non-coding portions of a gene which may not be present in the deposited clone. These methods include but are not limited to, filter probing, clone enrichment using specific probes, and protocols similar or identical to 5' and 3' "RACE" protocols which are well known in the art. For instance, a method similar to 5' RACE is available for generating the missing 5' end of a desired full-length transcript. (Fromont-Racine et al., *Nucleic Acids Res.*, 21(7):1683-1684 (1993).)

Briefly, a specific RNA oligonucleotide is ligated to the 5' ends of a population of RNA presumably containing full-length gene RNA transcripts. A primer set containing a primer specific to the ligated RNA oligonucleotide and a primer specific to a known sequence of the gene of interest is used to PCR amplify the 5' portion of the desired full-length gene. This amplified product may then be sequenced and used to generate the full length gene.

This above method starts with total RNA isolated from the desired source, although poly-A+ RNA can be used. The RNA preparation can then be treated with phosphatase if

necessary to eliminate 5' phosphate groups on degraded or damaged RNA which may interfere with the later RNA ligase step. The phosphatase should then be inactivated and the RNA treated with tobacco acid pyrophosphatase in order to remove the cap structure present at the 5' ends of messenger RNAs. This reaction leaves a 5' phosphate group at the 5' end of the cap cleaved RNA which can then be ligated to an RNA oligonucleotide using T4 RNA ligase.

This modified RNA preparation is used as a template for first strand cDNA synthesis using a gene specific oligonucleotide. The first strand synthesis reaction is used as a template for PCR amplification of the desired 5' end using a primer specific to the ligated RNA oligonucleotide and a primer specific to the known sequence of the gene of interest. The resultant product is then sequenced and analyzed to confirm that the 5' end sequence belongs to the desired gene.

Example 2: Isolation of Genomic Clones Corresponding to a Polynucleotide

A human genomic P1 library (Genomic Systems, Inc.) is screened by PCR using primers selected for the cDNA sequence corresponding to SEQ ID NO:X., according to the method described in Example 1. (See also, Sambrook.)

Example 3: Tissue Distribution of Polypeptide

Tissue distribution of mRNA expression of polynucleotides of the present invention is determined using protocols for Northern blot analysis, described by, among others, Sambrook et al. For example, a cDNA probe produced by the method described in Example 1 is labeled with P^{32} using the rediprime™ DNA labeling system (Amersham Life Science), according to manufacturer's instructions. After labeling, the probe is purified using CHROMA SPIN-100™ column (Clontech Laboratories, Inc.), according to manufacturer's protocol number PT1200-1. The purified labeled probe is then used to examine various human tissues for mRNA expression.

Multiple Tissue Northern (MTN) blots containing various human tissues (H) or human immune system tissues (IM) (Clontech) are examined with the labeled probe using ExpressHyb™ hybridization solution (Clontech) according to manufacturer's protocol number PT1190-1. Following hybridization and washing, the blots are mounted and exposed to film at -70°C overnight, and the films developed according to standard procedures.

Example 4: Chromosomal Mapping of the Polynucleotides

An oligonucleotide primer set is designed according to the sequence at the 5' end of SEQ ID NO:X. This primer preferably spans about 100 nucleotides. This primer set is then used in a polymerase chain reaction under the following set of conditions : 30 seconds, 95°C; 1 minute, 56°C; 1 minute, 70°C. This cycle is repeated 32 times followed by one 5 minute cycle at 70°C. Human, mouse, and hamster DNA is used as template in addition to a somatic cell hybrid panel containing individual chromosomes or chromosome fragments (Bios, Inc). The reactions is analyzed on either 8% polyacrylamide gels or 3.5 % agarose gels. Chromosome mapping is determined by the presence of an approximately 100 bp PCR fragment in the particular somatic cell hybrid.

Example 5: Bacterial Expression of a Polypeptide

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention is amplified using PCR oligonucleotide primers corresponding to the 5' and 3' ends of the DNA sequence, as outlined in Example 1, to synthesize insertion fragments. The primers used to amplify the cDNA insert should preferably contain restriction sites, such as BamHI and XbaI and initiation/stop codons, if necessary, to clone the amplified product into the expression vector. For example, BamHI and XbaI correspond to the restriction enzyme sites on the bacterial expression vector pQE-9. (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). This plasmid vector encodes antibiotic resistance (Amp^r), a bacterial origin of replication (ori), an IPTG-regulatable promoter/operator (P/O), a ribosome binding site (RBS), a 6-histidine tag (6-His), and restriction enzyme cloning sites.

The pQE-9 vector is digested with BamHI and XbaI and the amplified fragment is ligated into the pQE-9 vector maintaining the reading frame initiated at the bacterial RBS. The ligation mixture is then used to transform the E. coli strain M15/rep4 (Qiagen, Inc.) which contains multiple copies of the plasmid pREP4, which expresses the lacI repressor and also confers kanamycin resistance (Kan^r). Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and ampicillin/kanamycin resistant colonies are selected. Plasmid DNA is isolated and confirmed by restriction analysis.

Clones containing the desired constructs are grown overnight (O/N) in liquid culture in LB media supplemented with both Amp (100 ug/ml) and Kan (25 ug/ml). The O/N culture is used to inoculate a large culture at a ratio of 1:100 to 1:250. The cells are grown to an optical density 600 ($O.D.^{600}$) of between 0.4 and 0.6. IPTG (Isopropyl-B-D-thiogalacto pyranoside) is then added to a final concentration of 1 mM. IPTG induces by inactivating the lacI repressor, clearing the P/O leading to increased gene expression.

Cells are grown for an extra 3 to 4 hours. Cells are then harvested by centrifugation (20 mins at 6000Xg). The cell pellet is solubilized in the chaotropic agent 6 Molar Guanidine HCl by stirring for 3-4 hours at 4°C. The cell debris is removed by centrifugation, and the supernatant containing the polypeptide is loaded onto a nickel-nitrilo-tri-acetic acid ("Ni-NTA") affinity resin column (available from QIAGEN, Inc., *supra*). Proteins with a 6 x His tag bind to the Ni-NTA resin with high affinity and can be purified in a simple one-step procedure (for details see: The QIAexpressionist (1995) QIAGEN, Inc., *supra*).

Briefly, the supernatant is loaded onto the column in 6 M guanidine-HCl, pH 8, the column is first washed with 10 volumes of 6 M guanidine-HCl, pH 8, then washed with 10 volumes of 6 M guanidine-HCl pH 6, and finally the polypeptide is eluted with 6 M guanidine-HCl, pH 5.

The purified protein is then renatured by dialyzing it against phosphate-buffered saline (PBS) or 50 mM Na-acetate, pH 6 buffer plus 200 mM NaCl. Alternatively, the protein can be successfully refolded while immobilized on the Ni-NTA column. The recommended conditions are as follows: renature using a linear 6M-1M urea gradient in 500 mM NaCl, 20% glycerol, 20 mM Tris/HCl pH 7.4, containing protease inhibitors. The renaturation should be performed over a period of 1.5 hours or more. After renaturation the proteins are eluted by the addition of 250 mM immidazole. Immidazole is removed by a final dialyzing step against PBS or 50 mM sodium acetate pH 6 buffer plus 200 mM NaCl. The purified protein is stored at 4° C or frozen at -80° C.

In addition to the above expression vector, the present invention further includes an expression vector comprising phage operator and promoter elements operatively linked to a polynucleotide of the present invention, called pHE4a. (ATCC Accession Number 209645, deposited on February 25, 1998.) This vector contains: 1) a neomycinphosphotransferase gene as a selection marker, 2) an E. coli origin of replication, 3) a T5 phage promoter

sequence, 4) two lac operator sequences, 5) a Shine-Delgarno sequence, and 6) the lactose operon repressor gene (lacIq). The origin of replication (oriC) is derived from pUC19 (LTI, Gaithersburg, MD). The promoter sequence and operator sequences are made synthetically.

DNA can be inserted into the pHEa by restricting the vector with NdeI and XbaI, BamHI, XhoI, or Asp718, running the restricted product on a gel, and isolating the larger fragment (the stuffer fragment should be about 310 base pairs). The DNA insert is generated according to the PCR protocol described in Example 1, using PCR primers having restriction sites for NdeI (5' primer) and XbaI, BamHI, XhoI, or Asp718 (3' primer). The PCR insert is gel purified and restricted with compatible enzymes. The insert and vector are ligated according to standard protocols.

The engineered vector could easily be substituted in the above protocol to express protein in a bacterial system.

Example 6: Purification of a Polypeptide from an Inclusion Body

The following alternative method can be used to purify a polypeptide expressed in *E coli* when it is present in the form of inclusion bodies. Unless otherwise specified, all of the following steps are conducted at 4-10°C.

Upon completion of the production phase of the *E. coli* fermentation, the cell culture is cooled to 4-10°C and the cells harvested by continuous centrifugation at 15,000 rpm (Heraeus Sepatech). On the basis of the expected yield of protein per unit weight of cell paste and the amount of purified protein required, an appropriate amount of cell paste, by weight, is suspended in a buffer solution containing 100 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7.4. The cells are dispersed to a homogeneous suspension using a high shear mixer.

The cells are then lysed by passing the solution through a microfluidizer (Microfuidics, Corp. or APV Gaulin, Inc.) twice at 4000-6000 psi. The homogenate is then mixed with NaCl solution to a final concentration of 0.5 M NaCl, followed by centrifugation at 7000 xg for 15 min. The resultant pellet is washed again using 0.5M NaCl, 100 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7.4.

The resulting washed inclusion bodies are solubilized with 1.5 M guanidine hydrochloride (GuHCl) for 2-4 hours. After 7000 xg centrifugation for 15 min., the pellet is discarded and the polypeptide containing supernatant is incubated at 4°C overnight to allow further GuHCl extraction.

Following high speed centrifugation (30,000 xg) to remove insoluble particles, the GuHCl solubilized protein is refolded by quickly mixing the GuHCl extract with 20 volumes of buffer containing 50 mM sodium, pH 4.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA by vigorous stirring. The refolded diluted protein solution is kept at 4°C without mixing for 12 hours prior to further purification steps.

To clarify the refolded polypeptide solution, a previously prepared tangential filtration unit equipped with 0.16 µm membrane filter with appropriate surface area (e.g., Filtron), equilibrated with 40 mM sodium acetate, pH 6.0 is employed. The filtered sample is loaded onto a cation exchange resin (e.g., Poros HS-50, Perseptive Biosystems). The column is washed with 40 mM sodium acetate, pH 6.0 and eluted with 250 mM, 500 mM, 1000 mM, and 1500 mM NaCl in the same buffer, in a stepwise manner. The absorbance at 280 nm of the effluent is continuously monitored. Fractions are collected and further analyzed by SDS-PAGE.

Fractions containing the polypeptide are then pooled and mixed with 4 volumes of water. The diluted sample is then loaded onto a previously prepared set of tandem columns of strong anion (Poros HQ-50, Perseptive Biosystems) and weak anion (Poros CM-20, Perseptive Biosystems) exchange resins. The columns are equilibrated with 40 mM sodium acetate, pH 6.0. Both columns are washed with 40 mM sodium acetate, pH 6.0, 200 mM NaCl. The CM-20 column is then eluted using a 10 column volume linear gradient ranging from 0.2 M NaCl, 50 mM sodium acetate, pH 6.0 to 1.0 M NaCl, 50 mM sodium acetate, pH 6.5. Fractions are collected under constant A_{280} monitoring of the effluent. Fractions containing the polypeptide (determined, for instance, by 16% SDS-PAGE) are then pooled.

The resultant polypeptide should exhibit greater than 95% purity after the above refolding and purification steps. No major contaminant bands should be observed from Commassie blue stained 16% SDS-PAGE gel when 5 µg of purified protein is loaded. The purified protein can also be tested for endotoxin/LPS contamination, and typically the LPS content is less than 0.1 ng/ml according to LAL assays.

Example 7: Cloning and Expression of a Polypeptide in a Baculovirus Expression System

In this example, the plasmid shuttle vector pA2 is used to insert a polynucleotide into a baculovirus to express a polypeptide. This expression vector contains the strong polyhedrin promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) followed by convenient restriction sites such as BamHI, Xba I and Asp718. The polyadenylation site of the simian virus 40 ("SV40") is used for efficient polyadenylation. For easy selection of recombinant virus, the plasmid contains the beta-galactosidase gene from *E. coli* under control of a weak Drosophila promoter in the same orientation, followed by the polyadenylation signal of the polyhedrin gene. The inserted genes are flanked on both sides by viral sequences for cell-mediated homologous recombination with wild-type viral DNA to generate a viable virus that express the cloned polynucleotide.

Many other baculovirus vectors can be used in place of the vector above, such as pAc373, pVL941, and pAcIM1, as one skilled in the art would readily appreciate, as long as the construct provides appropriately located signals for transcription, translation, secretion and the like, including a signal peptide and an in-frame AUG as required. Such vectors are described, for instance, in Luckow et al., Virology 170:31-39 (1989).

Specifically, the cDNA sequence contained in the deposited clone is amplified using the PCR protocol described in Example 1 using primers with appropriate restriction sites and initiation/stop codons. If the naturally occurring signal sequence is used to produce the secreted protein, the pA2 vector does not need a second signal peptide. Alternatively, the vector can be modified (pA2 GP) to include a baculovirus leader sequence, using the standard methods described in Summers et al., "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures," Texas Agricultural Experimental Station Bulletin NO: 1555 (1987).

The amplified fragment is isolated from a 1% agarose gel using a commercially available kit ("Geneclean," BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). The fragment then is digested with appropriate restriction enzymes and again purified on a 1% agarose gel.

The plasmid is digested with the corresponding restriction enzymes and optionally, can be dephosphorylated using calf intestinal phosphatase, using routine procedures known in the art. The DNA is then isolated from a 1% agarose gel using a commercially available kit ("Geneclean" BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.).

The fragment and the dephosphorylated plasmid are ligated together with T4 DNA ligase. *E. coli* HB101 or other suitable *E. coli* hosts such as XL-1 Blue (Stratagene Cloning

Systems, La Jolla, CA) cells are transformed with the ligation mixture and spread on culture plates. Bacteria containing the plasmid are identified by digesting DNA from individual colonies and analyzing the digestion product by gel electrophoresis. The sequence of the cloned fragment is confirmed by DNA sequencing.

Five μg of a plasmid containing the polynucleotide is co-transfected with 1.0 μg of a commercially available linearized baculovirus DNA ("BaculoGold™ baculovirus DNA", Pharmingen, San Diego, CA), using the lipofection method described by Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417 (1987). One μg of BaculoGold™ virus DNA and 5 μg of the plasmid are mixed in a sterile well of a microtiter plate containing 50 μl of serum-free Grace's medium (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). Afterwards, 10 μl Lipofectin plus 90 μl Grace's medium are added, mixed and incubated for 15 minutes at room temperature. Then the transfection mixture is added drop-wise to Sf9 insect cells (ATCC CRL 1711) seeded in a 35 mm tissue culture plate with 1 ml Grace's medium without serum. The plate is then incubated for 5 hours at 27° C. The transfection solution is then removed from the plate and 1 ml of Grace's insect medium supplemented with 10% fetal calf serum is added. Cultivation is then continued at 27° C for four days.

After four days the supernatant is collected and a plaque assay is performed, as described by Summers and Smith, *supra*. An agarose gel with "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburg) is used to allow easy identification and isolation of gal-expressing clones, which produce blue-stained plaques. (A detailed description of a "plaque assay" of this type can also be found in the user's guide for insect cell culture and baculovirology distributed by Life Technologies Inc., Gaithersburg, page 9-10.) After appropriate incubation, blue stained plaques are picked with the tip of a micropipettor (e.g., Eppendorf). The agar containing the recombinant viruses is then resuspended in a microcentrifuge tube containing 200 μl of Grace's medium and the suspension containing the recombinant baculovirus is used to infect Sf9 cells seeded in 35 mm dishes. Four days later the supernatants of these culture dishes are harvested and then they are stored at 4° C.

To verify the expression of the polypeptide, Sf9 cells are grown in Grace's medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS. The cells are infected with the recombinant baculovirus containing the polynucleotide at a multiplicity of infection ("MOI") of about 2. If radiolabeled proteins are desired, 6 hours later the medium is removed and is replaced with SF900 II medium minus methionine and cysteine (available from Life Technologies Inc.,

Rockville, MD). After 42 hours, 5 μCi of ^{35}S-methionine and 5 μCi ^{35}S-cysteine (available from Amersham) are added. The cells are further incubated for 16 hours and then are harvested by centrifugation. The proteins in the supernatant as well as the intracellular proteins are analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography (if radiolabeled).

Microsequencing of the amino acid sequence of the amino terminus of purified protein may be used to determine the amino terminal sequence of the produced protein.

Example 8: Expression of a Polypeptide in Mammalian Cells

The polypeptide of the present invention can be expressed in a mammalian cell. A typical mammalian expression vector contains a promoter element, which mediates the initiation of transcription of mRNA, a protein coding sequence, and signals required for the termination of transcription and polyadenylation of the transcript. Additional elements include enhancers, Kozak sequences and intervening sequences flanked by donor and acceptor sites for RNA splicing. Highly efficient transcription is achieved with the early and late promoters from SV40, the long terminal repeats (LTRs) from Retroviruses, e.g., RSV, HTLVI, HIVI and the early promoter of the cytomegalovirus (CMV). However, cellular elements can also be used (e.g., the human actin promoter).

Suitable expression vectors for use in practicing the present invention include, for example, vectors such as pSVL and pMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146), pBC12MI (ATCC 67109), pCMVSport 2.0, and pCMVSport 3.0. Mammalian host cells that could be used include, human Hela, 293, H9 and Jurkat cells, mouse NIH3T3 and C127 cells, Cos 1, Cos 7 and CV1, quail QC1-3 cells, mouse L cells and Chinese hamster ovary (CHO) cells.

Alternatively, the polypeptide can be expressed in stable cell lines containing the polynucleotide integrated into a chromosome. The co-transfection with a selectable marker such as dhfr, gpt, neomycin, hygromycin allows the identification and isolation of the transfected cells.

The transfected gene can also be amplified to express large amounts of the encoded protein. The DHFR (dihydrofolate reductase) marker is useful in developing cell lines that carry several hundred or even several thousand copies of the gene of interest. (See, e.g., 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)). Another useful selection

marker is the enzyme glutamine synthase (GS) (Murphy et al., *Biochem J.*, 227:277-279 (1991); Bebbington et al., *Bio/Technology*, 10:169-175 (1992). Using these markers, the mammalian cells are grown in selective medium and the cells with the highest resistance are selected. These cell lines contain the amplified gene(s) integrated into a chromosome. Chinese hamster ovary (CHO) and NSO cells are often used for the production of proteins.

Derivatives of the plasmid pSV2-dhfr (ATCC Accession No.: 37146), the expression vectors pC4 (ATCC Accession No.: 209646) and pC6 (ATCC Accession No.:209647) contain the strong promoter (LTR) of the Rous Sarcoma Virus (Cullen et al., *Molecular and Cellular Biology*, 438-447 (March, 1985)) plus a fragment of the CMV-enhancer (Boshart et al., *Cell*, 41:521-530 (1985).) Multiple cloning sites, e.g., with the restriction enzyme cleavage sites BamHI, XbaI and Asp718, facilitate the cloning of the gene of interest. The vectors also contain the 3' intron, the polyadenylation and termination signal of the rat preproinsulin gene, and the mouse DHFR gene under control of the SV40 early promoter.

Specifically, the plasmid pC6, for example, is digested with appropriate restriction enzymes and then dephosphorylated using calf intestinal phosphates by procedures known in the art. The vector is then isolated from a 1% agarose gel.

A polynucleotide of the present invention is amplified according to the protocol outlined in Example 1 using primers with appropriate restrictions sites and initiation/stop codons, if necessary. The vector can be modified to include a heterologous signal sequence if necessary for secretion. (See, e.g., WO 96/34891.)

The amplified fragment is isolated from a 1% agarose gel using a commercially available kit ("Geneclean," BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). The fragment then is digested with appropriate restriction enzymes and again purified on a 1% agarose gel.

The amplified fragment is then digested with the same restriction enzyme and purified on a 1% agarose gel. The isolated fragment and the dephosphorylated vector are then ligated with T4 DNA ligase. *E. coli* HB101 or XL-1 Blue cells are then transformed and bacteria are identified that contain the fragment inserted into plasmid pC6 using, for instance, restriction enzyme analysis.

Chinese hamster ovary cells lacking an active DHFR gene is used for transfection. Five μg of the expression plasmid pC6 is cotransfected with 0.5 μg of the plasmid pSVneo using lipofectin (Felgner et al., *supra*). The plasmid pSV2-neo contains a dominant selectable marker, the *neo* gene from Tn5 encoding an enzyme that confers resistance to a

group of antibiotics including G418. The cells are seeded in alpha minus MEM supplemented with 1 mg/ml G418. After 2 days, the cells are trypsinized and seeded in hybridoma cloning plates (Greiner, Germany) in alpha minus MEM supplemented with 10, 25, or 50 ng/ml of metothrexate plus 1 mg/ml G418. After about 10-14 days single clones are trypsinized and then seeded in 6-well petri dishes or 10 ml flasks using different concentrations of methotrexate (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Clones growing at the highest concentrations of methotrexate are then transferred to new 6-well plates containing even higher concentrations of methotrexate (1 μM, 2 μM, 5 μM, 10 mM, 20 mM). The same procedure is repeated until clones are obtained which grow at a concentration of 100 - 200 μM. Expression of the desired gene product is analyzed, for instance, by SDS-PAGE and Western blot or by reversed phase HPLC analysis.

Example 9: Protein Fusions

The polypeptides of the present invention are preferably fused to other proteins. These fusion proteins can be used for a variety of applications. For example, fusion of the present polypeptides to His-tag, HA-tag, protein A, IgG domains, and maltose binding protein facilitates purification. (See Example 5; see also EP A 394,827; Traunecker, et al., *Nature*, 331:84-86 (1988)) The polypeptides can also be fused to heterologous polypeptide sequences to facilitate secretion and intracellular trafficking (e.g., KDEL). Moreover, fusion to IgG-1, IgG-3, and albumin increases the halflife time in vivo. Nuclear localization signals fused to the polypeptides of the present invention can target the protein to a specific subcellular localization, while covalent heterodimer or homodimers can increase or decrease the activity of a fusion protein. Fusion proteins can also create chimeric molecules having more than one function. Finally, fusion proteins can increase solubility and/or stability of the fused protein compared to the non-fused protein. All of the types of fusion proteins described above can be made by modifying the following protocol, which outlines the fusion of a polypeptide to an IgG molecule, or the protocol described in Example 5.

Briefly, the human Fc portion of the IgG molecule can be PCR amplified, using primers that span the 5' and 3' ends of the sequence described below. These primers also should have convenient restriction enzyme sites that will facilitate cloning into an expression vector, preferably a mammalian expression vector, and initiation/stop codons, if necessary.

For example, if pC4 (Accession No.: 209646) is used, the human Fc portion can be ligated into the BamHI cloning site. Note that the 3' BamHI site should be destroyed. Next, the vector containing the human Fc portion is re-restricted with BamHI, linearizing the vector, and a polynucleotide of the present invention, isolated by the PCR protocol described in Example 1, is ligated into this BamIII site. Note that the polynucleotide is cloned without a stop codon, otherwise a fusion protein will not be produced.

If the naturally occurring signal sequence is used to produce the secreted protein, pC4 does not need a second signal peptide. Alternatively, if the naturally occurring signal sequence is not used, the vector can be modified to include a heterologous signal sequence. (See, e.g., WO 96/34891.)

Human IgG Fc region:

GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAATTCG
AGGGTGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACTC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTAAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAACCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC
AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGC
CGCGACTCTAGAGGAT (SEQ ID NO:1)

Example 10: Formulating a Polypeptide

The polypeptide composition will be formulated and dosed in a fashion consistent with good medical practice, taking into account the clinical condition of the individual patient (especially the side effects of treatment with the secreted polypeptide alone), the site of delivery, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to practitioners. The "effective amount" for purposes herein is thus determined by such considerations.

As a general proposition, the total pharmaceutically effective amount of polypeptide administered parenterally per dose will be in the range of about 1 μg/kg/day to 10 mg/kg/day

of patient body weight, although, as noted above, this will be subject to therapeutic discretion. More preferably, this dose is at least 0.01 mg/kg/day, and most preferably for humans between about 0.01 and 1 mg/kg/day for the hormone. If given continuously, the polypeptide is typically administered at a dose rate of about 1 µg/kg/hour to about 50 µg/kg/hour, either by 1-4 injections per day or by continuous subcutaneous infusions, for example, using a mini-pump. An intravenous bag solution may also be employed. The length of treatment needed to observe changes and the interval following treatment for responses to occur appears to vary depending on the desired effect.

Pharmaceutical compositions containing the polypeptide of the invention are administered orally, rectally, parenterally, intracistemally, intravaginally, intraperitoneally, topically (as by powders, ointments, gels, drops or transdermal patch), bucally, or as an oral or nasal spray. "Pharmaceutically acceptable carrier" refers to a non-toxic solid, semisolid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. The term "parenteral" as used herein refers to modes of administration which include intravenous, intramuscular, intraperitoneal, intrasternal, subcutaneous and intraarticular injection and infusion.

The polypeptide is also suitably administered by sustained-release systems. Suitable examples of sustained-release compositions include semi-permeable polymer matrices in the form of shaped articles, e.g., films, or mirocapsules. Sustained-release matrices include polylactides (U.S. Pat. NO: 3,773,919, EP 58,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma-ethyl-L-glutamate (Sidman et al., *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 (1981), and Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)), ethylene vinyl acetate (R. Langer et al.) or poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988). Sustained-release compositions also include liposomally entrapped polypeptides. Liposomes containing the secreted polypeptide are prepared by methods known per se: 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); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; Japanese Pat. Appl. 83-118008; U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and EP 102,324. Ordinarily, the liposomes are of the small (about 200-800 Angstroms) unilamellar type in which the lipid content is greater than about 30 mol. percent cholesterol, the selected proportion being adjusted for the optimal secreted polypeptide therapy.

For parenteral administration, in one embodiment, the polypeptide is formulated generally by mixing it at the desired degree of purity, in a unit dosage injectable form (solution, suspension, or emulsion), with a pharmaceutically acceptable carrier, i.e., one that is non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed and is compatible with other ingredients of the formulation. For example, the formulation preferably does not include oxidizing agents and other compounds that are known to be deleterious to polypeptides.

Generally, the formulations are prepared by contacting the polypeptide uniformly and intimately with liquid carriers or finely divided solid carriers or both. Then, if necessary, the product is shaped into the desired formulation. Preferably the carrier is a parenteral carrier, more preferably a solution that is isotonic with the blood of the recipient. Examples of such carrier vehicles include water, saline, Ringer's solution, and dextrose solution. Non-aqueous vehicles such as fixed oils and ethyl oleate are also useful herein, as well as liposomes.

The carrier suitably contains minor amounts of additives such as substances that enhance isotonicity and chemical stability. Such materials are non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, succinate, acetic acid, and other organic acids or their salts; antioxidants such as ascorbic acid; low molecular weight (less than about ten residues) polypeptides, e.g., polyarginine or tripeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids, such as glycine, glutamic acid, aspartic acid, or arginine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including cellulose or its derivatives, glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as polysorbates, poloxamers, or PEG.

The polypeptide is typically formulated in such vehicles at a concentration of about 0.1 mg/ml to 100 mg/ml, preferably 1-10 mg/ml, at a pH of about 3 to 8. It will be understood that the use of certain of the foregoing excipients, carriers, or stabilizers will result in the formation of polypeptide salts.

Any polypeptide to be used for therapeutic administration can be sterile. Sterility is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes (e.g., 0.2 micron membranes). Therapeutic polypeptide compositions generally are placed into a container

having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Polypeptides ordinarily will be stored in unit or multi-dose containers, for example, sealed ampoules or vials, as an aqueous solution or as a lyophilized formulation for reconstitution. As an example of a lyophilized formulation, 10-ml vials are filled with 5 ml of sterile-filtered 1% (w/v) aqueous polypeptide solution, and the resulting mixture is lyophilized. The infusion solution is prepared by reconstituting the lyophilized polypeptide using bacteriostatic Water-for-Injection.

The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention. Associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration. In addition, the polypeptides of the present invention may be employed in conjunction with other therapeutic compounds.

Example 11: Method of Treating Decreased Levels of the Polypeptide

It will be appreciated that conditions caused by a decrease in the standard or normal expression level of a polypeptide in an individual can be treated by administering the polypeptide of the present invention, preferably in the secreted and/or soluble form. Thus, the invention also provides a method of treatment of an individual in need of an increased level of the polypeptide comprising administering to such an individual a pharmaceutical composition comprising an amount of the polypeptide to increase the activity level of the polypeptide in such an individual.

For example, a patient with decreased levels of a polypeptide receives a daily dose 0.1-100 ug/kg of the polypeptide for six consecutive days. Preferably, the polypeptide is in the secreted form. The exact details of the dosing scheme, based on administration and formulation, are provided in Example 10.

Example 12: Method of Treating Increased Levels of the Polypeptide

Antisense technology is used to inhibit production of a polypeptide of the present invention. This technology is one example of a method of decreasing levels of a polypeptide, preferably a secreted form, due to a variety of etiologies, such as cancer.

For example, a patient diagnosed with abnormally increased levels of a polypeptide is administered intravenously antisense polynucleotides at 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 mg/kg day for 21 days. This treatment is repeated after a 7-day rest period if the treatment was well tolerated. The antisense polynucleotides of the present invention can be formulated using techniques and formulations described herein (e.g., see Example 10) or otherwise known in the art.

Example 13: Method of Treatment Using Gene Therapy - Ex Vivo

One method of gene therapy transplants fibroblasts, which are capable of expressing a polypeptide, onto a patient. Generally, fibroblasts are obtained from a subject by skin biopsy. The resulting tissue is placed in tissue-culture medium and separated into small pieces. Small chunks of the tissue are placed on a wet surface of a tissue culture flask, approximately ten pieces are placed in each flask. The flask is turned upside down, closed tight and left at room temperature over night. After 24 hours at room temperature, the flask is inverted and the chunks of tissue remain fixed to the bottom of the flask and fresh media (e.g., Ham's F12 media, with 10% FBS, penicillin and streptomycin) is added. The flasks are then incubated at 37°C for approximately one week.

At this time, fresh media is added and subsequently changed every several days. After an additional two weeks in culture, a monolayer of fibroblasts emerge. The monolayer is trypsinized and scaled into larger flasks.

pMV-7 (Kirschmeier, P.T. et al., DNA, 7:219-25 (1988)), flanked by the long terminal repeats of the Moloney murine sarcoma virus, is digested with EcoRI and HindIII and subsequently treated with calf intestinal phosphatase. The linear vector is fractionated on agarose gel and purified, using glass beads.

The cDNA encoding a polypeptide of the present invention can be amplified using PCR primers which correspond to the 5' and 3' end sequences respectively as set forth in Example 1 using primers and having appropriate restriction sites and initiation/stop codons, if necessary. Preferably, the 5' primer contains an EcoRI site and the 3' primer includes a HindIII site. Equal quantities of the Moloney murine sarcoma virus linear backbone and the

amplified EcoR1 and HindIII fragment are added together, in the presence of T4 DNA ligase. The resulting mixture is maintained under conditions appropriate for ligation of the two fragments. The ligation mixture is then used to transform bacteria HB101, which are then plated onto agar containing kanamycin for the purpose of confirming that the vector has the gene of interest properly inserted.

The amphotropic pA317 or GP+am12 packaging cells are grown in tissue culture to confluent density in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) with 10% calf serum (CS), penicillin and streptomycin. The MSV vector containing the gene is then added to the media and the packaging cells transduced with the vector. The packaging cells now produce infectious viral particles containing the gene (the packaging cells are now referred to as producer cells).

Fresh media is added to the transduced producer cells, and subsequently, the media is harvested from a 10 cm plate of confluent producer cells. The spent media, containing the infectious viral particles, is filtered through a millipore filter to remove detached producer cells and this media is then used to infect fibroblast cells. Media is removed from a sub-confluent plate of fibroblasts and quickly replaced with the media from the producer cells. This media is removed and replaced with fresh media. If the titer of virus is high, then virtually all fibroblasts will be infected and no selection is required. If the titer is very low, then it is necessary to use a retroviral vector that has a selectable marker, such as neo or his. Once the fibroblasts have been efficiently infected, the fibroblasts are analyzed to determine whether protein is produced.

The engineered fibroblasts are then transplanted onto the host, either alone or after having been grown to confluence on cytodex 3 microcarrier beads.

Example 14: Gene Therapy Using Endogenous IL-6-like Genes

Another method of gene therapy according to the present invention involves operably associating the endogenous IL-6-like gene sequence with a promoter via homologous recombination as described, for example, in U.S. Patent NO: 5,641,670, issued June 24, 1997; International Publication NO: WO 96/29411, published September 26, 1996; International Publication NO: WO 94/12650, published August 4, 1994; Koller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:8932-8935 (1989); and Zijlstra et al., *Nature*, 342:435-438 (1989).

This method involves the activation of a gene which is present in the target cells, but which is not expressed in the cells, or is expressed at a lower level than desired.

Polynucleotide constructs are made which contain a promoter and targeting sequences, which are homologous to the 5' non-coding sequence of the endogenous IL-6-like gene, flanking the promoter. The targeting sequence will be sufficiently near the 5' end of IL-6-like gene so the promoter will be operably linked to the endogenous sequence upon homologous recombination. The promoter and the targeting sequences can be amplified using PCR. Preferably, the amplified promoter contains distinct restriction enzyme sites on the 5' and 3' ends. Preferably, the 3' end of the first targeting sequence contains the same restriction enzyme site as the 5' end of the amplified promoter and the 5' end of the second targeting sequence contains the same restriction site as the 3' end of the amplified promoter.

The amplified promoter and the amplified targeting sequences are digested with the appropriate restriction enzymes and subsequently treated with calf intestinal phosphatase. The digested promoter and digested targeting sequences are added together in the presence of T4 DNA ligase. The resulting mixture is maintained under conditions appropriate for ligation of the two fragments. The construct is size fractionated on an agarose gel then purified by phenol extraction and ethanol precipitation.

In this Example, the polynucleotide constructs are administered as naked polynucleotides via electroporation. However, the polynucleotide constructs may also be administered with transfection-facilitating agents, such as liposomes, viral sequences, viral particles, precipitating agents, etc. Such methods of delivery are known in the art.

Once the cells are transfected, homologous recombination will take place which results in the promoter being operably linked to the endogenous IL-6-like gene sequence. This results in the expression of IL-6-like in the cell. Expression may be detected by immunological staining, or any other method known in the art.

Fibroblasts are obtained from a subject by skin biopsy. The resulting tissue is placed in DMEM + 10% fetal calf serum. Exponentially growing or early stationary phase fibroblasts are trypsinized and rinsed from the plastic surface with nutrient medium. An aliquot of the cell suspension is removed for counting, and the remaining cells are subjected to centrifugation. The supernatant is aspirated and the pellet is resuspended in 5 ml of electroporation buffer (20 mM HEPES pH 7.3, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na_2HPO_4, 6 mM dextrose). The cells are recentrifuged, the supernatant aspirated, and the cells

resuspended in electroporation buffer containing 1 mg/ml acetylated bovine serum albumin. The final cell suspension contains approximately $3X10^6$ cells/ml. Electroporation should be performed immediately following resuspension.

Plasmid DNA is prepared according to standard techniques. For example, to construct a plasmid for targeting to the IL-6-like locus, plasmid pUC18 (MBI Fermentas, Amherst, NY) is digested with HindIII. The CMV promoter is amplified by PCR with an XbaI site on the 5' end and a BamHI site on the 3'end. Two IL-6-like non-coding gene sequences are amplified via PCR: one IL-6-like non-coding sequence (IL-6-like fragment 1) is amplified with a HindIII site at the 5' end and an Xba site at the 3'end; the other IL-6-like non-coding sequence (IL-6-like fragment 2) is amplified with a BamHI site at the 5'end and a HindIII site at the 3'end. The CMV promoter and IL-6-like fragments are digested with the appropriate enzymes (CMV promoter - XbaI and BamHI; IL-6-like fragment 1 - XbaI; IL-6-like fragment 2 - BamHI) and ligated together. The resulting ligation product is digested with HindIII, and ligated with the HindIII-digested pUC18 plasmid.

Plasmid DNA is added to a sterile cuvette with a 0.4 cm electrode gap (Bio-Rad). The final DNA concentration is generally at least 120 µg/ml. 0.5 ml of the cell suspension (containing approximately $1.5.X10^6$ cells) is then added to the cuvette, and the cell suspension and DNA solutions are gently mixed. Electroporation is performed with a Gene-Pulser apparatus (Bio-Rad). Capacitance and voltage are set at 960 µF and 250-300 V, respectively. As voltage increases, cell survival decreases, but the percentage of surviving cells that stably incorporate the introduced DNA into their genome increases dramatically. Given these parameters, a pulse time of approximately 14-20 mSec should be observed.

Electroporated cells are maintained at room temperature for approximately 5 min, and the contents of the cuvette are then gently removed with a sterile transfer pipette. The cells are added directly to 10 ml of prewarmed nutrient media (DMEM with 15% calf serum) in a 10 cm dish and incubated at 37 degree C. The following day, the media is aspirated and replaced with 10 ml of fresh media and incubated for a further 16-24 hours.

The engineered fibroblasts are then injected into the host, either alone or after having been grown to confluence on cytodex 3 microcarrier beads. The fibroblasts now produce the protein product. The fibroblasts can then be introduced into a patient as described above.

Example 15: Method of Treatment Using Gene Therapy - In Vivo

Another aspect of the present invention is using *in vivo* gene therapy methods to treat disorders, diseases and conditions. The gene therapy method relates to the introduction of naked nucleic acid (DNA, RNA, and antisense DNA or RNA) IL-6-like sequences into an animal to increase or decrease the expression of the IL-6-like polypeptide. The IL-6-like polynucleotide may be operatively linked to a promoter or any other genetic elements necessary for the expression of the IL-6-like polypeptide by the target tissue. Such gene therapy and delivery techniques and methods are known in the art, see, for example, WO90/11092, WO98/11779; U.S. Patent NO: 5693622, 5705151, 5580859; Tabata et al., *Cardiovasc. Res.* 35(3):470-479 (1997), Chao J 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 Y. et al., *Circulation*, 94(12):3281-3290 (1996) (incorporated herein by reference).

The IL-6-like polynucleotide constructs may be delivered by any method that delivers injectable materials to the cells of an animal, such as, injection into the interstitial space of tissues (heart, muscle, skin, lung, liver, intestine and the like). The IL-6-like polynucleotide constructs can be delivered in a pharmaceutically acceptable liquid or aqueous carrier.

The term "naked" polynucleotide, DNA or RNA, refers to sequences that are free from any delivery vehicle that acts to assist, promote, or facilitate entry into the cell, including viral sequences, viral particles, liposome formulations, lipofectin or precipitating agents and the like. However, the IL-6-like polynucleotides may also be delivered in liposome formulations (such as those taught in Felgner et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 772:126-139 (1995) and Abdallah et al., *Biol. Cell* , 85(1):1-7 (1995)) which can be prepared by methods well known to those skilled in the art.

The IL-6-like polynucleotide vector constructs used in the gene therapy method are preferably constructs that will not integrate into the host genome nor will they contain sequences that allow for replication. Any strong promoter known to those skilled in the art can be used for driving the expression of DNA. Unlike other gene therapies techniques, one major advantage of introducing naked nucleic acid sequences into target cells is the transitory nature of the polynucleotide synthesis in the cells. Studies have shown that non-replicating DNA sequences can be introduced into cells to provide production of the desired polypeptide for periods of up to six months.

The polynucleotide constructs can be delivered to the interstitial space of tissues

within the an animal, including of muscle, skin, brain, lung, liver, spleen, bone marrow, thymus, heart, lymph, blood, bone, cartilage, pancreas, kidney, gall bladder, stomach, intestine, testis, ovary, uterus, rectum, nervous system, eye, gland, and connective tissue. Interstitial space of the tissues comprises the intercellular fluid, mucopolysaccharide matrix among the reticular fibers of organ tissues, elastic fibers in the walls of vessels or chambers, collagen fibers of fibrous tissues, or that same matrix within connective tissue ensheathing muscle cells or in the lacunae of bone. It is similarly the space occupied by the plasma of the circulation and the lymph fluid of the lymphatic channels. Delivery to the interstitial space of muscle tissue is preferred for the reasons discussed below. They may be conveniently delivered by injection into the tissues comprising these cells. They are preferably delivered to and expressed in persistent, non-dividing cells which are differentiated, although delivery and expression may be achieved in non-differentiated or less completely differentiated cells, such as, for example, stem cells of blood or skin fibroblasts. *In vivo* muscle cells are particularly competent in their ability to take up and express polynucleotides.

For the naked IL-6-like polynucleotide injection, an effective dosage amount of DNA or RNA will be in the range of from about 0.05 g/kg body weight to about 50 mg/kg body weight. Preferably the dosage will be from about 0.005 mg/kg to about 20 mg/kg and more preferably from about 0.05 mg/kg to about 5 mg/kg. Of course, as the artisan of ordinary skill will appreciate, this dosage will vary according to the tissue site of injection. The appropriate and effective dosage of nucleic acid sequence can readily be determined by those of ordinary skill in the art and may depend on the condition being treated and the route of administration. The preferred route of administration is by the parenteral route of injection into the interstitial space of tissues. However, other parenteral routes may also be used, such as, inhalation of an aerosol formulation particularly for delivery to lungs or bronchial tissues, throat or mucous membranes of the nose. In addition, naked IL-6-like polynucleotide constructs can be delivered to arteries during angioplasty by the catheter used in the procedure.

The dose response effects of injected IL-6-like polynucleotide in muscle *in vivo* is determined as follows. Suitable IL-6-like template DNA for production of mRNA coding for IL-6-like polypeptide is prepared in accordance with a standard recombinant DNA methodology. The template DNA, which may be either circular or linear, is either used as naked DNA or complexed with liposomes. The quadriceps muscles of mice are then injected

with various amounts of the template DNA.

Five to six week old female and male Balb/C mice are anesthetized by intraperitoneal injection with 0.3 ml of 2.5% Avertin. A 1.5 cm incision is made on the anterior thigh, and the quadriceps muscle is directly visualized. The IL-6-like template DNA is injected in 0.1 ml of carrier in a 1 cc syringe through a 27 gauge needle over one minute, approximately 0.5 cm from the distal insertion site of the muscle into the knee and about 0.2 cm deep. A suture is placed over the injection site for future localization, and the skin is closed with stainless steel clips.

After an appropriate incubation time (e.g., 7 days) muscle extracts are prepared by excising the entire quadriceps. Every fifth 15 um cross-section of the individual quadriceps muscles is histochemically stained for IL-6-like protein expression. A time course for IL-6-like protein expression may be done in a similar fashion except that quadriceps from different mice are harvested at different times. Persistence of IL-6-like DNA in muscle following injection may be determined by Southern blot analysis after preparing total cellular DNA and HIRT supernatants from injected and control mice. The results of the above experimentation in mice can be use to extrapolate proper dosages and other treatment parameters in humans and other animals using IL-6-like naked DNA.

Example 16: Production of an Antibody

a) Hybridoma Technology

The antibodies of the present invention can be prepared by a variety of methods. (See, Current Protocols, Chapter 2.) As one example of such methods, cells expressing IL-6-like polypeptide(s) are administered to an animal to induce the production of sera containing polyclonal antibodies. In a preferred method, a preparation of IL-6-like polypeptide(s) is prepared and purified to render it substantially free of natural contaminants. Such a preparation is then introduced into an animal in order to produce polyclonal antisera of greater specific activity.

Monoclonal antibodies specific for IL-6-like polypeptide(s) are prepared using hybridoma technology. (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., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 563-681 (1981)). In general, an animal (preferably a mouse) is immunized with IL-6-like polypeptide(s) or, more

preferably, with a secreted IL-6-like polypeptide-expressing cell. Such polypeptide-expressing cells are cultured in any suitable tissue culture medium, preferably in Earle's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (inactivated at about 56°C), and supplemented with about 10 g/l of nonessential amino acids, about 1,000 U/ml of penicillin, and about 100 µg/ml of streptomycin.

The splenocytes of such mice are extracted and fused with a suitable myeloma cell line. Any suitable myeloma cell line may be employed in accordance with the present invention; however, it is preferable to employ the parent myeloma cell line (SP2O), available from the ATCC. After fusion, the resulting hybridoma cells are selectively maintained in HAT medium, and then cloned by limiting dilution as described by Wands et al. (Gastroenterology 80:225-232 (1981)). The hybridoma cells obtained through such a selection are then assayed to identify clones which secrete antibodies capable of binding the IL-6-like polypeptide(s).

Alternatively, additional antibodies capable of binding to IL-6-like polypeptide(s) can be produced in a two-step procedure using anti-idiotypic antibodies. Such a method makes use of the fact that antibodies are themselves antigens, and therefore, it is possible to obtain an antibody which binds to a second antibody. In accordance with this method, protein specific antibodies are used to immunize an animal, preferably a mouse. The splenocytes of such an animal are then used to produce hybridoma cells, and the hybridoma cells are screened to identify clones which produce an antibody whose ability to bind to the IL-6-like protein-specific antibody can be blocked by IL-6-like polypeptide(s). Such antibodies comprise anti-idiotypic antibodies to the IL-6-like protein-specific antibody and are used to immunize an animal to induce formation of further IL-6-like protein-specific antibodies.

For in vivo use of antibodies in humans, an antibody is "humanized". Such antibodies can be produced using genetic constructs derived from hybridoma cells producing the monoclonal antibodies described above. Methods for producing chimeric and humanized antibodies are known in the art and are discussed herein. (See, for review, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; Taniguchi et al., EP 171496; Morrison et al., EP 173494; Neuberger et al., WO 8601533; Robinson et al., WO 8702671; Boulianne et al., Nature 312:643 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268 (1985).)

b) Isolation Of Antibody Fragments Directed Against IL-6-like Polypeptide(s) From A Library Of scFvs

Naturally occurring V-genes isolated from human PBLs are constructed into a library of antibody fragments which contain reactivities against IL-6-like polypeptide(s) to which the donor may or may not have been exposed (see e.g., U.S. Patent 5,885,793 incorporated herein by reference in its entirety).

Rescue of the Library.

A library of scFvs is constructed from the RNA of human PBLs as described in PCT publication WO 92/01047. To rescue phage displaying antibody fragments, approximately 109 E. coli harboring the phagemid are used to inoculate 50 ml of 2xTY containing 1% glucose and 100 µg/ml of ampicillin (2xTY-AMP-GLU) and grown to an O.D. of 0.8 with shaking. Five ml of this culture is used to inoculate 50 ml of 2xTY-AMP-GLU, 2 x 108 TU of delta gene 3 helper (M13 delta gene III, see PCT publication WO 92/01047) are added and the culture incubated at 37°C for 45 minutes without shaking and then at 37°C for 45 minutes with shaking. The culture is centrifuged at 4000 r.p.m. for 10 min. and the pellet resuspended in 2 liters of 2xTY containing 100 µg/ml ampicillin and 50 ug/ml kanamycin and grown overnight. Phage are prepared as described in PCT publication WO 92/01047.

M13 delta gene III is prepared as follows: M13 delta gene III helper phage does not encode gene III protein, hence the phage(mid) displaying antibody fragments have a greater avidity of binding to antigen. Infectious M13 delta gene III particles are made by growing the helper phage in cells harboring a pUC19 derivative supplying the wild type gene III protein during phage morphogenesis. The culture is incubated for 1 hour at 37° C without shaking and then for a further hour at 37°C with shaking. Cells are spun down (IEC-Centra 8,400 r.p.m. for 10 min), resuspended in 300 ml 2xTY broth containing 100 µg ampicillin/ml and 25 µg kanamycin/ml (2xTY-AMP-KAN) and grown overnight, shaking at 37°C. Phage particles are purified and concentrated from the culture medium by two PEG-precipitations (Sambrook et al., 1990), resuspended in 2 ml PBS and passed through a 0.45 µm filter (Minisart NML; Sartorius) to give a final concentration of approximately 1013 transducing units/ml (ampicillin-resistant clones).

Panning of the Library.

Immunotubes (Nunc) are coated overnight in PBS with 4 ml of either 100 µg/ml or 10 µg/ml of a polypeptide of the present invention. Tubes are blocked with 2% Marvel-PBS for 2 hours at 37°C and then washed 3 times in PBS. Approximately 1013 TU of phage is applied to the tube and incubated for 30 minutes at room temperature tumbling on an over and under turntable and then left to stand for another 1.5 hours. Tubes are washed 10 times with PBS 0.1% Tween-20 and 10 times with PBS. Phage are eluted by adding 1 ml of 100 mM triethylamine and rotating 15 minutes on an under and over turntable after which the solution is immediately neutralized with 0.5 ml of 1.0M Tris-HCl, pH 7.4. Phage are then used to infect 10 ml of mid-log E. coli TG1 by incubating eluted phage with bacteria for 30 minutes at 37°C. The E. coli are then plated on TYE plates containing 1% glucose and 100 µg/ml ampicillin. The resulting bacterial library is then rescued with delta gene 3 helper phage as described above to prepare phage for a subsequent round of selection. This process is then repeated for a total of 4 rounds of affinity purification with tube-washing increased to 20 times with PBS, 0.1% Tween-20 and 20 times with PBS for rounds 3 and 4.

Characterization of Binders.

Eluted phage from the 3rd and 4th rounds of selection are used to infect E. coli HB 2151 and soluble scFv is produced (Marks, et al., 1991) from single colonies for assay. ELISAs are performed with microtitre plates coated with either 10 pg/ml of the polypeptide of the present invention in 50 mM bicarbonate pH 9.6. Clones positive in ELISA are further characterized by PCR fingerprinting (see, e.g., PCT publication WO 92/01047) and then by sequencing. These ELISA positive clones may also be further characterized by techniques known in the art, such as, for example, epitope mapping, binding affinity, receptor signal transduction, ability to block or competitively inhibit antibody/antigen binding, and competitive agonistic or antagonistic activity.

Example 17: IL-6 Bioassay

To test the proliferative effects of the purified IL-6-like polypeptides of the invention, the IL-6 Bioassay as described by Marz *et al.* is utilized (*Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, *95*:3251-56 (1998), which is herein incorporated by reference). Briefly, IL-6 dependent B9 murine cells are washed three times in IL-6 free medium and plated at a concentration of 5,000 cells per well in 50 µl, and 50 µl of the IL-6-like polypeptide is added. After 68 hrs. at

37°C, the number of viable cells is measured by adding the tetrazolium salt thiazolyl blue (MTT) and incubating for a further 4 hrs. at 37°C. B9 cells are lysed by SDS and optical density is measured at 570 nm. Controls containing IL-6 (positive) and no cytokine (negative) are utilized. Enhanced proliferation in the test sample(s) relative to the negative control is indicative of proliferative effects mediated by IL-6-like polypeptides of the present invention.

Example 18: Support of Chicken Embryo Neuron Survival

To test whether sympathetic neuronal cell viability is supported by the purified IL-6-like polypeptides of the invention, the chicken embryo neuronal survival assay of Senaldi *et al* is utilized (*Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 96*:11458-63 (1998), which is herein incorporated by reference). Briefly, motor and sympathetic neurons are isolated from chicken embryos, resuspended in L15 medium (with 10% FCS, glucose, sodium selenite, progesterone, conalbumin, putrescine, and insulin; Life Technologies, Rockville, MD.) and Dulbecco's modified Eagles medium [with 10% FCS, glutamine, penicillin, and 25 mM Hepes buffer (pH 7.2); Life Technologies, Rockville, MD.], respectively, and incubated at 37°C in 5% CO_2 in the presence of different concentrations of the purified IL-6-like polypeptides of the invention, as well as a negative control lacking any cytokine. After 3 days, neuron survival is determined by evaluation of cellular morphology, and through the use of the colorimetric assay of Mosmann (Mossman, T., *J. Immunol. Methods, 65*:55-63 (1983)). Enhanced neuronal cell viability as compared to the controls lacking cytokine is indicative of the ability of the purified IL-6-like polypeptides of the invention to enhance the survival of neuronal cells.

It will be clear that the invention may be practiced otherwise than as particularly described in the foregoing description and examples. Numerous modifications and variations of the present invention are possible in light of the above teachings and, therefore, are within the scope of the appended claims.

The entire disclosure of each document cited (including patents, patent applications, journal articles, abstracts, laboratory manuals, books, or other disclosures) in the Background of the Invention, Detailed Description, and Examples is hereby incorporated herein by reference. Further, the hard copy of the sequence listing submitted herewith and the

corresponding computer readable form are both incorporated herein by reference in their entireties.

Certain IL-6-like polynucleotides and polypeptides of the present invention, including antibodies, were disclosed in U.S. provisional application serial number 60/169,838, which is herein incorporated by reference in its entirety. Moreover, the hard copy and computer readable form of the Sequence Listing of U.S. provisional application serial number 60/169,838 are also incorporated herein by reference in their entireties.

Applicant's or agent's file reference number	PT026PCT	International application N	UNASSIGNED

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page 13, line N/A.

B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐

Name of depositary institution American Type Culture Collection

Address of depositary institution *(including postal code and country)*
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
United States of America

Date of deposit	Accession Number
04 November 1999	PTA-912

C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)* This information is continued on an additional sheet ☐

D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*

Europe
In respect to those designations in which a European Patent is sought a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28 (4) EPC).
Continued on the Attached Pages 2 & 3

E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☑ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1992)

ATCC Deposit No. PTA-912
Page No. 2

CANADA

The applicant requests that, until either a Canadian patent has been issued on the basis of an application or the application has been refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, the Commissioner of Patents only authorizes the furnishing of a sample of the deposited biological material referred to in the application to an independent expert nominated by the Commissioner, the applicant must, by a written statement, inform the International Bureau accordingly before completion of technical preparations for publication of the international application.

NORWAY

The applicant hereby requests that the application has been laid open to public inspection (by the Norwegian Patent Office), or has been finally decided upon by the Norwegian Patent Office without having been laid open inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. The request to this effect shall be filed by the applicant with the Norwegian Patent Office not later than at the time when the application is made available to the public under Sections 22 and 33(3) of the Norwegian Patents Act. If such a request has been filed by the applicant, any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on the list of recognized experts drawn up by the Norwegian Patent Office or any person approved by the applicant in the individual case.

AUSTRALIA

The applicant hereby gives notice that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be effected prior to the grant of a patent, or prior to the lapsing, refusal or withdrawal of the application, to a person who is a skilled addressee without an interest in the invention (Regulation 3.25(3) of the Australian Patents Regulations).

FINLAND

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the National Board of Patents and Regulations), or has been finally decided upon by the National Board of Patents and Registration without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art.

ATCC Deposit No.: PTA-912
Page No. 3

UNITED KINGDOM

The applicant hereby requests that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be made available to an expert. The request to this effect must be filed by the applicant with the International Bureau before the completion of the technical preparations for the international publication of the application.

DENMARK

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the Danish Patent Office), or has been finally decided upon by the Danish Patent office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. The request to this effect shall be filed by the applicant with the Danish Patent Office not later that at the time when the application is made available to the public under Sections 22 and 33(3) of the Danish Patents Act. If such a request has been filed by the applicant, any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Danish Patent Office or any person by the applicant in the individual case.

SWEDEN

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the Swedish Patent Office), or has been finally decided upon by the Swedish Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. The request to this effect shall be filed by the applicant with the International Bureau before the expiration of 16 months from the priority date (preferably on the Form PCT/RO/134 reproduced in annex Z of Volume I of the PCT Applicant's Guide). If such a request has been filed by the applicant any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Swedish Patent Office or any person approved by a applicant in the individual case.

NETHERLANDS

The applicant hereby requests that until the date of a grant of a Netherlands patent or until the date on which the application is refused or withdrawn or lapsed, the microorganism shall be made available as provided in the 31F(1) of the Patent Rules only by the issue of a sample to an expert. The request to this effect must be furnished by the applicant with the Netherlands Industrial Property Office before the date on which the application is made available to the public under Section 22C or Section 25 of the Patents Act of the Kingdom of the Netherlands, whichever of the two dates occurs earlier.

What Is Claimed Is:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a polynucleotide selected from the group consisting of:

(a) the polynucleotide shown as SEQ ID NO:X or the polynucleotide encoded by a cDNA included in ATCC Deposit No:Z;

(b) a polynucleotide encoding a biologically active polypeptide fragment of SEQ ID NO:Y or a biologically active polypeptide fragment encoded by the cDNA sequence included in ATCC Deposit No:Z;

(c) a polynucleotide encoding a polypeptide epitope of SEQ ID NO:Y or a polypeptide epitope encoded by the cDNA sequence included in ATCC Deposit No:Z;

(d) a polynucleotide capable of hybridizing under stringent conditions to any one of the polynucleotides specified in (a)-(c), wherein said polynucleotide does not hybridize under stringent conditions to a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence of only A residues or of only T residues.

2. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence encoding a soluble polypeptide.

3. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence encoding the sequence identified as SEQ ID NO:Y or the polypeptide encoded by the cDNA sequence included in ATCC Deposit No:Z.

4. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, wherein the polynucleotide comprises the entire nucleotide sequence of SEQ ID NO:X or a cDNA included in ATCC Deposit No:Z.

5. The isolated nucleic acid molecule of claim 2, wherein the polynucleotide is DNA.

6. The isolated nucleic acid molecule of claim 3, wherein the polynucleotide is RNA.

7. A vector comprising the isolated nucleic acid molecule of claim 1.

8. A host cell comprising the vector of claim 7.

9. A recombinant host cell comprising the nucleic acid molecule of claim 1 operably limited to a heterologous regulating element which controls gene expression.

10. A method of producing a polypeptide comprising expressing the encoded polypeptide from the host cell of claim 9 and recovering said polypeptide.

11. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to a sequence selected from the group consisting of:

(a) the polypeptide shown as SEQ ID NO:Y or the polypeptide encoded by the cDNA;

(b) a polypeptide fragment of SEQ ID NO:Y or the polypeptide encoded by the cDNA;

(c) a polypeptide epitope of SEQ ID NO:Y or the polypeptide encoded by the cDNA; and

(d) a variant of SEQ ID NO:Y.

12. The isolated polypeptide of claim 11, comprising a polypeptide having SEQ ID NO:Y.

13. An isolated antibody that binds specifically to the isolated polypeptide of claim 11.

14. A recombinant host cell that expresses the isolated polypeptide of claim 11.

15. A method of making an isolated polypeptide comprising:

(a) culturing the recombinant host cell of claim 14 under conditions such that said polypeptide is expressed; and

(b) recovering said polypeptide.

16. The polypeptide produced by claim 15.

17. A method for preventing, treating, or ameliorating a medical condition, comprising administering to a mammalian subject a therapeutically effective amount of the polynucleotide of claim 1.

18. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

(a) determining the presence or absence of a mutation in the polynucleotide of claim 1; and

(b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or absence of said mutation.

19. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

(a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of claim 11 in a biological sample; and

(b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

20. A method for identifying a binding partner to the polypeptide of claim 11 comprising:

(a) contacting the polypeptide of claim 11 with a binding partner; and

(b) determining whether the binding partner effects an activity of the polypeptide.

21. A method of screening for molecules which modify activities of the polypeptide of claim 11 comprising:

(a) contacting said polypeptide with a compound suspected of having agonist or antagonist activity; and

(b) assaying for activity of said polypeptide.

22. A method for preventing, treating, or ameliorating a medical condition, comprising administering to a mammalian subject a therapeutically effective amount the polypeptide of claim 11.

1

<110> Human Genome Sciences, Inc.

<120> IL-6 Like Polynucleotides, Polypeptides, and Antibodies

<130> PT026PCT

<140> Unassigned
<141> 2000-12-07

<150> 60/169,838
<151> 1999-12-09

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 733
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
gggatccgga gcccaaattt tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg 60
aattcgaggg tgcaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga 120
tctcccggac cctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt aagccacgaa gaccctgagg 180
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 240
aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 300
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca acccccatcg 360
agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc 420
catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 480
atccaagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga 540
ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg 600
acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc 660
acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc 720
gactctagag gat 733

<210> 2
<211> 1047
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
ggcacgagct caagcgcctg gacaccttcg accgccaggg tatcttgcac cgtctcagca 60
cctaccaaa gatgctcttt gtccgcgagc ccttcgagag gctggtgtcc gccttccgcg 120
acaagtttga gcaccccaac agctactatc acccggtctt cggcaaggcc atcctggccc 180
ggtaccgcgc caatgcctct cgggaggccc tgcggaccgg ctctgggctg cgttttcccg 240
agttcgtcca gtacctgctg gacgtgcacc ggccgtggg gatggacatt cactgggacc 300
atgtcagccg gctctgcagc ccctgcctca tcgactacga tttcgtaggc aagttcgaga 360
gcatggagga cgatgccaac ttcttcctga gcctcatccg cgccgcgcgg aacctgacct 420
tccccggtt caaggaccgg cactcgcagg aggcgcggac cacagcgagg atcgcccacc 480
agtacttcgc ccaactctcg gccctgcaaa ggcagcgcac ctacgacttc tactacatgg 540
attacctgat gttcaactat tccaagccct ttgcagattt gtactgaggg gcgccgcagc 600
tggccggggc cgccctgccc cggtcactca cctgtgctcc cgggcatcct cctgtccctg 660
gctcctcatc ctgggagcaa cagggctctg aggacgtgag gagccatcgc tgtgggaggc 720
agcaggcccc gggtgaggag caaaggcgcc cagccttgga tggggacccc agcccctggc 780

ctgtacctgt ttcctcattc cttggctgag ggagaggctg agaactgggc agacacccct 840
ggagctcagc cgacagtttt gatgagcagg gaagtctgag gcccagagga cgggggccc 900
agcggtaagg gatgtccgc actcccttag ccattgcctt ggaccaaacc acgtggtttg 960
cagcttttct acgagccagg ggggaggttc ccttggatta aggttccaaa taaagcacat 1020
ggtttccaga aaaaaaaaaa aaaaaaa 1047

<210> 3
<211> 171
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Leu Phe Val Arg Glu Pro Phe Glu Arg Leu Val Ser Ala Phe Arg
1 5 10 15

Asp Lys Phe Glu His Pro Asn Ser Tyr Tyr His Pro Val Phe Gly Lys
20 25 30

Ala Ile Leu Ala Arg Tyr Arg Ala Asn Ala Ser Arg Glu Ala Leu Arg
35 40 45

Thr Gly Ser Gly Val Arg Phe Pro Glu Phe Val Gln Tyr Leu Leu Asp
50 55 60

Val His Arg Pro Val Gly Met Asp Ile His Trp Asp His Val Ser Arg
65 70 75 80

Leu Cys Ser Pro Cys Leu Ile Asp Tyr Asp Phe Val Gly Lys Phe Glu
85 90 95

Ser Met Glu Asp Asp Ala Asn Phe Phe Leu Ser Leu Ile Arg Ala Pro
100 105 110

Arg Asn Leu Thr Phe Pro Arg Phe Lys Asp Arg His Ser Gln Glu Ala
115 120 125

Arg Thr Thr Ala Arg Ile Ala His Gln Tyr Phe Ala Gln Leu Ser Ala
130 135 140

Leu Gln Arg Gln Arg Thr Tyr Asp Phe Tyr Tyr Met Asp Tyr Leu Met
145 150 155 160

Phe Asn Tyr Ser Lys Pro Phe Ala Asp Leu Tyr
165 170

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
His Trp Asp His Val Ser Arg Leu Cys Ser Pro Cys Leu Ile Asp Tyr
1 5 10 15

Asp Phe Val

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr application No.
PCT/US00/33134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12P 21/06, G01N 33/53, C07K 1/00, 16/00
US CL : 435/69.1, 7.1, 530/350, 387.1
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)
U.S. : 435/69.1, 7.1, 530/350, 387.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
STN search on CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EUROPATFULL, PCTFULL, USPATFULL
WEST search on USPAT and JPO

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Accession number: AC005615, Lamerdin et al., Joint Genome Istitute, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA94551, 4 September 1998.	1-10 and 15
X	Hirano et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature, November 1986, Vol 324, p73-76.	1-10 and 15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* 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 published on or after the international filing date
"L" 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 February 2001 (20.02.2001)	06 APR 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Jeanthessin Sebastseyon Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/33134

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim 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. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.: 1-10 and 15

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern . application No.
PCT/US00/33134

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING
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.

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, claim(s) 1-10 and 15, drawn to a nucleic acid, the polypeptide encoded by the nucleic acid, an expression vector containing the nucleic acid, a host cell expressing the polypeptide, a cell line transformed with the vector and a method of making the polypeptide..

Group II, claim(s) 11,12, 14 and 16 drawn to a polypeptide.

Group III, claim(s) 13, drawn to an antibody.

Group IV, claim(s) 17, drawn to a method of treating using polynucleotide.

Group V, claim(s) 18, drawn to a method of diagnosing using polynucleotide.

Group VI, claim(s) 19, drawn to a method of diagnosing using polypeptide.

Group VII, claim(s) 20 and 21, drawn to a method of identifying binding partners.

Group VIII, claim(s) 22, drawn to a method of treating using polypeptide.

Inventions I, II and III are compositions and are different the methods IV-VIII.
The compositions of Inventions I, II and III are different from each other as they are directed to nonequivalent types of compounds with different chemical characters. Invention I is nucleic acid and a cell containing it. Invention II is a polypeptide. Invention III is an antibody. Inventions IV-VII are different from each other as they are directed to nonequivalent methods. Invention IV uses polynucleotide and invention VIII uses polypeptide for treatment. Similarly, Invention V uses polynucleotide and Invention VI uses polypeptide for diagnosis. Invention VII is a method to identify binding partners.
The claims of these groups are directed to different inventions which are not linked to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. The claims in the different groups lack the same or corresponding special technical features. In particular, each group is directed to different compounds and /or methods. Accordingly, the claims are not so linked by a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 so as to form a single inventive concept and lack of unity is deemed proper.

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 25/00	Ａ６１Ｐ 29/00		
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 31/00		
Ａ６１Ｐ 31/00	Ａ６１Ｐ 31/18		
Ａ６１Ｐ 31/18	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 37/02		
Ａ６１Ｐ 37/02	Ｃ０７Ｋ 14/54		
Ｃ０７Ｋ 14/54	Ｃ０７Ｋ 16/24		
Ｃ０７Ｋ 16/24	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｋ	
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
Ｃ１２Ｐ 21/02	Ａ６１Ｋ 37/02		

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

(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 ルーベン, スティーブン エム.
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８３２, オルネイ, ヘリテイジ ヒルズ ドライブ １８５２８
(72)発明者 シ, ヤング
アメリカ合衆国 メリーランド ２０８７８, ゲイザースバーグ, ウエスト サイド ドライブ ４３７, アパートメント １０２

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA26 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA02
EA04 HA11 HA15
4B064 AG02 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA23 BA35 CA18 DA18 NA14
ZA022 ZA812 ZA962 ZA972 ZB072 ZB112 ZB262 ZB322 ZC552
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA01 DA75 EA20 EA50
FA72 FA74