(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2014-64585
(P2014-64585A)
(43)公開日　平成26年4月17日(2014.4.17)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C07K 14/715	(2006.01)	C07K	14/715		4B024
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B063
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B064
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B065

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 123 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-253098 (P2013-253098)
(22)出願日　平成25年12月6日 (2013.12.6)
(62)分割の表示　特願2002-529502 (P2002-529502)の分割
原出願日　平成13年9月6日 (2001.9.6)
(31)優先権主張番号　60/233,152
(32)優先日　平成12年9月18日 (2000.9.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/234,140
(32)優先日　平成12年9月21日 (2000.9.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/268,499
(32)優先日　平成13年2月13日 (2001.2.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)

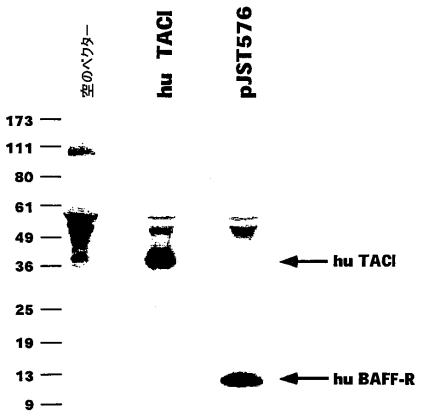
(71)出願人　592221528
バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，ケンブリッジ，ケンブリッジ　センター　１４
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　クリスティーヌ　エム.　アンブローズ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１８６７，　リーディング，　ウェイクフィールド　ストリート　１９７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規のレセプター核酸およびポリペプチド

(57)【要約】　（修正有）
【課題】Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）に対する新規のレセプター核酸およびポリペプチドの提供。
【解決手段】特定のアミノ酸配列を含有しているポリペプチドに対して、少なくとも５０％同一であるか、または少なくとも９０％同一であるポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸。ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドをコードする核酸、ならびにＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドに対する抗体、およびそれを含有している薬学的組成物。核酸、ポリペプチド、抗体、および薬学的組成物を使用する、腫瘍形成性状態および自己免疫性状態を処置する。
【選択図】図８

Figure 8:



【特許請求の範囲】
【請求項１】
本願明細書に記載された発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（発明の分野）
本発明は、新規のレセプタータンパク質を提供する。本発明は、一般には、核酸およびポリペプチドに関する。より詳細には、本発明は、腫瘍壊死因子（「ＴＮＦ」）ファミリーに属するＢ細胞活性化因子（これは、Ｂ細胞および免疫グロブリンの発現に関係している）である、ＢＡＦＦに対するレセプターに関係しているポリペプチドをコードする核酸に関する。このレセプターは、癌、リンパ腫、自己免疫性疾患、Ｂ細胞に関係している遺伝性の遺伝的障害の処置に使用され得る。
【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
本発明は、ＴＮＦファミリーの新規のレセプターに関する。新規のレセプターは、ＢＡＦＦレセプター（「ＢＡＦＦ－Ｒ」）として同定されている。
【０００３】
ＴＮＦファミリーは、ＴＮＦファミリーリガンドおよびＴＮＦファミリーレセプターと呼ばれる、リガンドおよびその特異的なレセプターの対から構成される（ＢａｚｚｏｎｉおよびＢｅｕｔｌｅｒ（１９９６）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３３４（２６）：１７１７－１７２５）。このファミリーは、免疫系の調節、およびおそらく、他の非免疫学的系の調節に関係している。調節は、しばしば、「マスタースイッチ」レベルであり、その結果、ＴＮＦファミリーのシグナル伝達は、ＴＮＦによって最も代表される多数の引き続く事象を生じ得る。ＴＮＦは、外部からの侵襲に対する器官の全体的な防御性の炎症応答を開始し得、これには、細胞輸送、特定の区画中に特定の細胞を駆動するためのケモカイン産生、および種々のエフェクター細胞の感作に関係している接着性分子の異なった提示が含まれる。このように、これらの経路の調節は、臨床的な可能性を有する。
【０００４】
このようなＴＮＦファミリーのサイトカインによって媒介される種々の細胞応答の誘導は、特異的な細胞レセプターへのそれらの結合によって開始されると考えられている。少なくとも２つの異なるＴＮＦレセプター（約５５ｋＤａ（ＴＮＦＲ１）および７５ｋＤａ（ＴＮＦＲ２））が同定されている（Ｈｏｈｍａｎら（１９８９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：１４９２７－１４９３４；およびＢｒｏｃｋｈａｕｓら（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：３１２７－３１３１）。多数の多型が、両方のＴＮＦレセプター遺伝子に関連している。両方のＴＮＦＲが、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含む細胞表面レセプターの典型的な構造を共有している。１型および２型のＴＮＦＲの細胞外部分は、４個のシステインリッチドメイン（ＣＤＲ）の反復的なアミノ酸配列のパターンを含む。ＣＤＲの同様の反復的なパターンが、とりわけ、ｐ７５神経増殖因子レセプター、Ｂ細胞抗原ＣＤ４０を含むいくつかの他の細胞表面タンパク質中に存在している。
【０００５】
レセプターは、免疫グロブリン融合タンパク質へのそれらの容易な転換に起因して、生物学的経路を解明するための強力な道具である。これらの二量体可溶性レセプター形態は、分泌リガンドまたは表面結合リガンドのいずれかによって媒介される事象の良好なインヒビターである。これらのリガンドへの結合によって

、これらは、リガンドが、細胞が関連するシグナル伝達し得るレセプターと相互作用することを妨げる。これらのレセプター－Ｆｃ融合タンパク質は、実験上の意味で有用であるだけではなく、炎症性腸疾患、慢性関節リウマチ、およびＯＫＴ３の投与に付随する急性の臨床上の症候群を処置するために、ＴＮＦ－Ｒ－Ｆｃの場合において臨床的に首尾よく使用されている（Ｅａｓｏｎら（１９９６）Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ６１（２）：２２４－２２８；Ｆｅｌｄｍａｎｎら（１９９６）Ｉｎｔ．Ａｒｃｈ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１１（４）：３６２－３６５；およびｖａｎ Ｄｕｌｌｅｍｅｎら（１９９５）Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．１０９（１）：１２９－１３５）。ＴＮＦファミリーのレセプターを通じるシグナル伝達によって媒介される多くの事象の操作が、免疫に基づく疾患の処置において、そして免疫系の関与に起因して病理学的な後遺症を有する広範囲の人の疾患においてもまた、広範囲の適用を有することを想定し得る。最近記載されたレセプターである、オステオプロテゲリン（ｏｓｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ）の可溶性形態は、骨量の減失をブロックすることが可能であり、そして従って、ＴＮＦファミリーレセプターのシグナル伝達によって制御されている事象は、免疫系の調節には必ずしも限定されない（Ｓｉｍｏｎｅｔら（１９９７）Ｃｅｌｌ ８９（２）：３０９－３１９）。レセプターに対する抗体はリガンドの結合をブロックすることが可能であり、従って、これはまた、臨床上の適用を有し得る。このような抗体は、たいてい、非常に長命であり、そしてより短い血液での半減期を有する可溶性レセプター－Ｆｃ融合タンパク質を上回る利点を有し得る。

【０００６】

レセプターによって媒介される経路の阻害は、これらのレセプターの最も開発された治療上の適用を示すが、当初、臨床的な見込みを示したのは、ＴＮＦレセプターの活性化であった（ＡｇｇａｒｗａｌおよびＮａｔａｒａｊａｎ（１９９６）Ｅｕｒ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｎｅｔｗ．７（２）：９３－１２４）。ＴＮＦレセプターの活性化は標的細胞において細胞死を開始し得、従って、腫瘍への適用は、魅力的であったし、今なお魅力的である（Ｅｇｇｅｒｍｏｎｔら（１９９６）Ａｎｎ．Ｓｕｒｇ．２２４（６）：７５６－７６５）。レセプターは、リガンドの投与（すなわち、天然の経路）によって活性化され得るか、またはレセプターを架橋することができるいくつかの抗体もまた、強力なアゴニストであるかのいずれかである。抗体は、腫瘍学において利点を有する。なぜなら、リガンドは一般的には、血液中で短い寿命を有するにもかかわらず、抗体は、長期間の間血液中で存続することが可能であるからである。これらのレセプターの多くが腫瘍中でより選択的に発現され得るか、またはこれらは腫瘍中の細胞死もしくは分化をシグナル伝達するのみであり得るので、アゴニスト抗体は、癌の処置の良好な武器であり得る。同様に、多くのポジティブな免疫学的事象（例えば、宿主の炎症反応、抗体の産生など）がＴＮＦファミリーのレセプターによって媒介され、従って、アゴニスト抗体は、他の腫瘍学以外の適用においても有用な作用を有する可能性がある。

【０００７】

逆説的に、経路の阻害は、腫瘍の処置において臨床的な利点を有し得る。例えば、Ｆａｓリガンドはいくつかの腫瘍によって発現され、そしてこの発現は、Ｆａｓポジティブであるリンパ球の死を導き得、これによって免疫系を逃れる腫瘍の能力を促進する。この場合には、次いで、Ｆａｓ系の阻害は、免疫系が、現在利用することが可能である他の経路において腫瘍に対して反応することを可能にし得る（ＧｒｅｅｎおよびＷａｒｅ（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４（１２）：５９８６－９０）。

【０００８】

ＴＮＦファミリーのリガンドであるＢＡＦＦ（ＴＡＬＬ－１、ＴＨＡＮＫ、Ｂ

ＬｙＳ、およびｚＴＮＦ４）としてもまた公知である）（Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒら（１９９９）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８９（１１）：１７４７－１７５６；Ｓｈｕら（１９９９）Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．６５（５）：６８０－６８３；Ｍｕｋｈｏｐａｄｈｙａｙら（１９９９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７４（２３）：１５９７８－１５９８１；Ｍｏｏｒｅら、（１９９９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８５（５４２５）：２６０－２６３；Ｇｒｏｓｓら（２０００）Ｎａｔｕｒｅ ４０４（６７８１）：９５５－９９９）は、インビトロでのＢ細胞の生存を増進し（Ｂａｔｔｅｎら（２０００）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９２（１０）：１４５３－１４６６）、そしてインビボでの末梢Ｂ細胞の集団の重要な調節因子であることが明らかになっている。マウスでのＢＡＦＦの過剰発現は、成熟Ｂ細胞過形成症および全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）の徴候を示す（Ｍａｃｋａｙら（１９９９）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９０（１１）：１６９７－１７１０）。同様に、いくらかのＳＬＥ患者は、その血清中のＢＡＦＦレベルの有意な増大を有する（Ｚｈａｎｇら（２００１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６６（１）：６－１０）。従って、異常に高いこのリガンドのレベルが、自己反応性Ｂ細胞の生存を増進することによって自己免疫性疾患の病因に寄与し得ることが提案されている（Ｂａｔｔｅｎら（２０００）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９２（１０）：１４５３－１４６６）。

【０００９】

ＩＩ型膜タンパク質であるＢＡＦＦは、骨髄起源の細胞によって産生され（Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒら（１９９９）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８９（１１）：１７４７－１７５６；Ｍｏｏｒｅら（１９９９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８５（５４２５）：２６０－２６３）、そして細胞表面上にか、または可溶性形態でのいずれかで発現される（Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒら（１９９９）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８９（１１）：１７４７－１４５６）。２つのＴＮＦレセプターファミリーのメンバーであるＢＣＭＡおよびＴＡＣＩは、ＢＡＦＦと相互作用することが以前に示されている（Ｇｒｏｓｓら（２０００）Ｎａｔｕｒｅ ４０４：９９５－９９９；Ｔｈｏｍｐｓｏｎら（２０００）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９２（１）：１２９－１３５；Ｘｉａら（２０００）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９２：１３７－１４３；Ｍａｒｓｔｅｒｓら（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．１０（１３）：７８５－７８８；Ｓｈｕら（２０００）Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．６５（５）：６８０－６８３；Ｗｕら（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：３５４７８－３５４８５）。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

（発明の要旨）

本発明は、一部、ＢＡＦＦレセプタータンパク質である「ＢＡＦＦ－Ｒ」、ポリヌクレオチド配列、およびこれらの核酸配列によってコードされるＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの発見に基づく。

【００１１】

１つの局面においては、本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドをコードする単離された核酸、またはそれらのフラグメントもしくは誘導体を提供する。核酸は、例えば、図２Ｄ（配列番号５）のアミノ酸配列を含有しているポリペプチドに対して、少なくとも５０％同一であるか、または少なくとも９０％同一であるポリペプチドをコードする核酸配列を含み得る。

【００１２】

本発明はまた、ハイブリダイゼーションプローブに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含有している、実質的に純粋な核酸分子を提供する。プローブの核酸配列は、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）

のコード配列、または上記のコード配列の相補物体から構成される。
【００１３】
いくつかの実施形態においては、核酸配列は、少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する、図２Ｄ（配列番号５）の配列を有しているポリペプチドをコードする。
【００１４】
いくつかの実施形態においては、核酸配列は、ＢＡＦＦを結合するポリペプチドをコードする。
【００１５】
核酸は、例えば、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）に示されているヌクレオチド配列を含む核酸を含み得る。
【００１６】
核酸は、例えば、ゲノムＤＮＡフラグメントであり得るか、またはｃＤＮＡ分子であり得る。本発明には、本明細書中に記載されている核酸の１つ以上を含有しているベクター、および本明細書中に記載されているベクターまたは核酸を含有している細胞もまた、含まれる。
【００１７】
別の局面においては、本発明は、少なくとも２つのセグメントを含有している融合タンパク質をコードする、実質的に純粋な核酸分子を提供する。ここでは、セグメントの１つは、本発明の上記の実施形態に示されているアミノ酸配列に記載されているような、ポリペプチドまたはそのフラグメントを含有する。本発明はまた、少なくとも２個または３個のセグメントを含有している融合タンパク質を提供する。ここでは、第１のセグメントは、異種シグナルポリペプチドを含み、第２のセグメントは、本発明の上記の実施形態に示されているＢＡＦＦ－Ｒアミノ酸配列に記載されているような、ポリペプチドまたはそのフラグメントを含み、そして第３のセグメントは、免疫グロブリンポリペプチドを含む。あるいは、第１のセグメントは、シグナル配列を含有している免疫グロブリンポリペプチドフラグメントを含み、そして第２のセグメントは、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドフラグメントを含む。
【００１８】
他の局面においては、本発明は、本発明の上記の実施形態のポリペプチドに特異的に結合する、実質的に純粋な結合剤を提供する。
【００１９】
本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかを含有している組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞にも関する。
【００２０】
別の局面においては、本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸、および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含有する、薬学的組成物を含む。
【００２１】
さらなる局面においては、本発明は、実質的に精製されたＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸によってコードされるポリペプチドのいずれか）を含む。
【００２２】
本発明には、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド、および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含有する薬学的組成物もまた、含まれる。
【００２３】
なおさらなる局面においては、本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。抗体は、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。本発明には、ＢＡＦＦ－Ｒ抗体、および薬学的に受容

可能なキャリアまたは希釈剤を含有している薬学的組成物もまた含まれる。本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチド上のエピトープに結合する、単離された抗体にも関する。

【００２４】

本発明はさらに、上記の核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチドに結合する抗体、およびネガティブコントロール抗体を含有しているキットに関する。

【００２５】

本発明はさらに、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの産生のための方法を提供する。この方法は、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸を含むベクター）を含有している細胞を提供する工程、および核酸によってコードされるＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを発現させるために十分な条件下で細胞を培養する工程を包含する。次いで、発現されたＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドは、細胞から回収される。好ましくは、細胞は、内因性のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドをほとんど産生しないか、または全く産生しない。細胞は、例えば、原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。

【００２６】

本発明は、免疫応答を誘導するために十分なポリペプチドの量を、哺乳動物に投与することによる、上記に開示されている核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチドに対して、哺乳動物中の免疫応答を誘導する方法を提供する。

【００２７】

本発明はまた、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを化合物と接触させる工程、および化合物がＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドに結合するかどうかを決定する工程による、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドに結合する化合物を同定する方法に関する。

【００２８】

本発明はまた、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸を化合物と接触させる工程、および化合物が核酸分子に結合するかどうかを決定することによる、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドをコードする核酸分子に結合する化合物を同定する方法にも関する。

【００２９】

本発明はさらに、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを化合物と接触させる工程、およびＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド活性が改変されるかどうかを決定することによる、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法を提供する。

【００３０】

本発明はまた、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを化合物と接触させる工程、および化合物がＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの活性を改変するかどうか、化合物がＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドに結合するかどうか、またはＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドをコードする核酸分子に結合するかどうかを決定することによって同定される、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド活性を調節する化合物にも関する。

【００３１】

別の局面においては、本発明は、被験体のＢ細胞によって媒介される状態（例えば、自己免疫性障害またはガン）の診断方法を提供する。この方法は、被験体由来のタンパク質サンプルを提供する工程、および被検サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの量を測定する工程を包含する。次いで、被検サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒの量が、コントロールタンパク質サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの量に対して比較される。コントロールタンパク質サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの量と比較した、被験タンパク質サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの量の変化は、被験体がＢ細胞によって媒介される状態を有することを示す。コントロールサンプルは、好ましくは、適合する個体（例えば、類似の年齢、性別、または他の一般的な状態の個体であるが、その状態を有しているとの疑

いのない個体）から採取される。あるいは、コントロールサンプルは、被験体が障害を有しているとの疑いのない時に被験体から採取されることがある。いつくかの実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドは、ＢＡＦＦ－Ｒ抗体を使用して検出される。

【００３２】

さらなる局面においては、本発明は、被験体のＢ細胞によって媒介される状態（例えば、自己免疫性障害）を診断する方法を含む。この方法は、被験体由来の核酸サンプル（例えば、ＲＮＡもしくはＤＮＡ、またはそれらの両方）を提供する工程、および被験核酸サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸の量を測定する工程を包含する。次いで、被検核酸中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸サンプルの量が、コントロールサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸の量に対して比較される。コントロールサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒの量と比較したサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸の量における変化は、被験体が自己免疫性状態を有することを示す。

【００３３】

さらなる局面においては、本発明は、被験体の腫瘍形成性または自己免疫性状態の診断方法を含む。この方法は、被験体由来の核酸サンプルを提供する工程、および被検核酸サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸のヌクレオチド配列の少なくとも一部を同定する工程を包含する。次いで、被検サンプルのＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列が、コントロールサンプルのＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列に対して比較される。上記のコントロールサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列と比較したサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列における変化は、被験体がこのような状態を有することを示す。

【００３４】

なおさらなる局面においては、本発明は、Ｂ細胞によって媒介される状態を処置する、または予防する、または遅延させる方法を提供する。この方法は、このような処置または予防または遅延が所望される被験体に対して、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド、または抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体を、被験体の腫瘍形成性または免疫調節状態を処置、予防、または遅延させるために十分な量で投与することを含む。

【００３５】

ＢＡＦＦ－Ｒ核酸分子、ポリペプチド、または抗体を使用して診断される、処理される、予防される、または遅延させられる状態は、ガン、または免疫調節障害であり得る。これらの疾患には、自己免疫性の性質の疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、慢性間接リウマチ、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、突発性血小板減少症紫斑、抗リン脂質（ａｎｔｉ－ｐｈｏｓｐｈｏｌｉｐｉｄ）症候群、シャーガス病、グレーブズ病、ヴェーゲナー肉芽種症、結節性多発動脈炎、および結節性進行性糸球体腎炎）が含まれる。治療薬はまた、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、原発性アミロイド症または免疫細胞関連アミロイド症、および意義不明性クローン性高ガンマグロブリン血症（ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ｇａｍｍｏｐａｔｈｙ　ｏｆ　ｕｎｄｅｔｅｒｍｉｎｅｄ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｃｅ；ＭＧＵＳ）のような、血漿細胞の障害における適用を有する。腫瘍学の標的には、Ｂ細胞ガン腫、白血病、およびリンパ腫が含まれる。

【００３６】

本発明の核酸、ポリペプチド、および抗体を使用する組成物および処置方法は、所望されない細胞増殖に関係している任意の状態に使用され得る。詳細には、本発明は、ＢＡＦＦおよび／またはＢＡＦＦ－Ｒを発現する腫瘍細胞を処置するために使用され得る。

【００３７】

ＢＡＦＦ－Ｒアゴニスト（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒに結合し、そしてＢＡＦＦを

模倣する抗体）を含有している本発明の組成物はまた、例えば、少量のＢ細胞によって特徴付けられる免疫不全を処置するためにも使用され得る。このような障害は、例えば、放射線治療および／または化学療法によって引き起こされる場合がある。

【００３８】

本発明の別の局面においては、組換え発現されたタンパク質の凝集を減少させる方法が提供される。この方法は、保存されているドメイン、および保存されている領域内の同一ではないアミノ酸を決定するための、タンパク質またはその融合タンパク質の相同の比較を含む。一般的には、少なくとも１つの非極性のアミノ酸が、荷電していない極性のアミノ酸に、またはプロリン、アラニン、もしくはセリンに変更される。

【００３９】

他の場所で特に記載されていない限りは、本明細書中で使用されている全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書中に記載されているものと同様または同等の方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料が以下に記載される。本明細書中に記載されている全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献が、それらの全体において参考として援用されている。コンフリクトの場合には、定義を含む本明細書が統制となる、さらに、材料、方法、および実施例は、説明にすぎず、そして限定としては意図されない。

【００４０】

本発明の他の特徴および利点が、以下の詳細な記載および特許請求の範囲から明らかである。

例えば、本願発明は以下の項目を提供する。

（項目１）　配列番号５のアミノ酸配列を含有しているポリペプチドに対して少なくとも５０％同一であるポリペプチドをコードする配列を含有している、単離された核酸。

（項目２）　前記核酸が、配列番号５に対して少なくとも９０％同一であるポリペプチドをコードする、項目１に記載の核酸。

（項目３）　前記コードされるポリペプチドがＢＡＦＦを結合する、項目１に記載の核酸。

（項目４）　前記核酸がＤＮＡである、項目１に記載の核酸。

（項目５）　前記核酸がＲＮＡである、項目１に記載の核酸

（項目６）　前記核酸がｃＤＮＡ分子である、項目１に記載の核酸。

（項目７）　配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、または配列番号６の少なくとも一部に対して相補的であるヌクレオチド配列を含有している、単離された核酸。

（項目８）　項目１または２に記載の核酸を含有している、ベクター。

（項目９）　項目８に記載のベクターを含有している、細胞。

（項目１０）　項目１に記載の核酸および薬学的に受容可能なキャリアを含有している、薬学的組成物。

（項目１１）　項目１または２に記載の核酸によってコードされる、実質的に精製されたポリペプチド。

（項目１２）　項目１１に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含有している、薬学的組成物。

（項目１３）　項目１２に記載のポリペプチドに特異的に結合する、抗体。

（項目１４）　項目１２に記載のポリペプチド上のエピトープに結合する、抗体。

（項目１５）　項目１２に記載のポリペプチドに結合する抗体、および必要に応じて、ネガティブコントロール抗体を含有している、キット。
（項目１６）　項目１３に記載の抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含有している、薬学的組成物。
（項目１７）　ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを産生する方法であって、該方法は、以下：
項目９に記載の細胞を提供する工程；
該ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの発現に十分な条件下で該細胞を培養する工程；および
該ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを回収し、それによって該ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを産生する工程、
を包含する、方法。
（項目１８）　前記細胞が原核生物細胞である、項目１７に記載の方法。
（項目１９）　前記細胞が真核生物細胞である、項目１７に記載の方法。
（項目２０）　被検体のＢ細胞によって媒介される状態を診断する方法であって、該方法は、以下：
該被験体由来のタンパク質サンプルを提供する工程；
該被検体サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの量を測定する工程；および
コントロールタンパク質サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの量に対して、該被験体タンパク質サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの量を比較する工程であって、ここで、該コントロールタンパク質サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの量と比較した該被験体タンパク質サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドの量の変化が、該被験体がＢ細胞によって媒介される状態を有することを示す、工程、
を包含する、方法。
（項目２１）　前記Ｂ細胞によって媒介される状態が自己免疫性障害である、項目２０に記載の方法。
（項目２２）　前記Ｂ細胞によって媒介される状態が癌である、項目２０に記載の方法。
（項目２３）　被検体のＢ細胞によって媒介される状態を診断する方法であって、該方法は、以下：
該被験体由来の核酸サンプルを提供する工程；
該被験体核酸サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸の量を測定する工程；および
コントロールサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸の量に対して、該被験体核酸中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸サンプルの量を比較する工程であって、ここで、該コントロールサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒの量と比較した、該サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸の量の変化が、該被験体がＢ細胞によって媒介される状態を有すること示す、工程、
を包含する、方法。
（項目２４）　前記測定されたＢＡＦＦ－Ｒ核酸がＢＡＦＦ－Ｒ　ＲＮＡである、項目２３に記載の方法。
（項目２５）　前記測定されたＢＡＦＦ－Ｒ核酸がＢＡＦＦ－Ｒ　ＤＮＡである、項目２３に記載の方法。
（項目２６）　前記ＢＡＦＦ－Ｒ核酸が項目１に記載の核酸を使用して測定される、項目２３に記載の方法。
（項目２７）　前記ＢＡＦＦ－Ｒ核酸が、項目１に記載の核酸を増幅する１つ以上の核酸を使用することによって測定される、項目２３に記載の方法。
（項目２８）　被検体のＢ細胞によって媒介される状態を診断する方法であって、該方法は、以下：
該被験体由来の核酸サンプルを提供する工程；

該被験体核酸サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ核酸のヌクレオチド配列の少なくとも一部を同定する工程；および
コントロールサンプルのＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列に対して、該被検体サンプルのＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列を比較する工程であって、ここで、該コントロールサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列と比較した、該サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列の変化が、該被験体がＢ細胞によって媒介される状態を有すること示す、工程、
を包含する、方法。
（項目２９） 自己免疫性状態または腫瘍形成性状態を、処置または予防または遅延させる方法であって、該方法は、以下：
このような処置または予防または遅延が所望される被験体に、該被験体の自己免疫性状態または腫瘍形成性状態の処置、予防または遅延に十分な量の項目１に記載の核酸を投与する工程、
を包含する、方法。
（項目３０） 自己免疫性状態または腫瘍形成性状態を、処置または予防または遅延させる方法であって、該方法は、以下：
このような処置または予防または遅延が所望される被験体に、該被験体の自己免疫性状態または腫瘍形成性状態の処置、予防または遅延に十分な量の項目１２に記載のポリペプチドを投与する工程、
を包含する、方法。
（項目３１） 自己免疫性状態または腫瘍形成性状態を、処置または予防または遅延させる方法であって、該方法は、以下：
このような処置または予防または遅延が所望される被験体に、該被験体の自己免疫性状態または腫瘍形成性状態の処置、予防または遅延に十分な量の項目１６に記載の抗体を投与する工程、
を包含する、方法。
（項目３２） ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を結合する化合物を同定するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を化合物と接触させる工程；および
ｂ）該化合物がＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を結合するかどうかを決定する工程、
を包含する、方法。
（項目３３） 前記化合物のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質への結合が、タンパク質結合アッセイによって決定される、項目３２に記載の方法。
（項目３４） 項目３２に記載の方法によって同定される、化合物。
（項目３５） ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする核酸を結合する化合物を同定するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）該ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする核酸を化合物と接触させる工程；および
ｂ）該化合物が該核酸分子を結合するかどうかを決定する工程、
を包含する、方法。
（項目３６） 項目３５に記載の方法によって同定される、化合物。
（項目３７） ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の活性を調節する化合物を同定するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を化合物と接触させる工程；および
ｂ）ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質活性が調節されているかどうかを決定する工程、
を包含する、方法。
（項目３８） 項目３７に記載の方法によって同定される、化合物。
（項目３９） 組換え発現されたタンパク質の凝集を減少させる方法であって、該方法は、以下：
ａ）組換え発現されたタンパク質として凝集する標的タンパク質のホモログ間

で保存されているアミノ酸の領域を同定する工程；
ｂ）該標的タンパク質中の少なくとも１つの保存されていないアミノ酸で置換を行って、変異した標的タンパク質を形成する工程；
を包含し、
ここで、該変異した標的タンパク質は、組換え発現された場合に減少した凝集を示す、方法。
（項目４０）　前記保存されていないアミノ酸が非極性のアミノ酸である、項目３９に記載の方法。
（項目４１）　前記非極性のアミノ酸が、荷電していない極性のアミノ酸に変更される、項目３９に記載の方法。
（項目４２）　前記非極性のアミノ酸が、プロリン、セリン、またはアラニンからなる群より選択されるアミノ酸に変更される、項目３９に記載の方法。
（項目４３）　前記非極性のアミノ酸がプロリンに変更される、項目３９に記載の方法。
（項目４４）　以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含有しているＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の少なくとも一部をコードする、単離された核酸分子：配列番号１３；配列番号１５；配列番号１６；配列番号１７；配列番号１８；配列番号１９；配列番号２０；配列番号２１；配列番号２２；配列番号２３；配列番号２４；配列番号２５；配列番号２６；配列番号２７；配列番号２８；配列番号２９；配列番号３０；配列番号３１；および配列番号３２。
（項目４５）　前記核酸が、キメラタンパク質の一部として前記ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする、項目４４に記載の単離された核酸分子。
（項目４６）　前記キメラタンパク質が、免疫グロブリン定常領域を含む、項目４５に記載の単離された核酸。
（項目４７）　配列番号１４のアミノ酸配列を含有しているＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする、単離された核酸分子。
（項目４８）　前記核酸が、キメラタンパク質の一部として前記ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする、項目４７に記載の単離された核酸分子。
（項目４９）　前記キメラタンパク質が、免疫グロブリン定常領域を含む、項目４８に記載の単離された核酸。
（項目５０）　以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含有している、単離されたポリペプチド：配列番号１３；配列番号１５；配列番号１６；配列番号１７；配列番号１８；配列番号１９；配列番号２０；配列番号２１；配列番号２２；配列番号２３；配列番号２４；配列番号２５；配列番号２６；配列番号２７；配列番号２８；配列番号２９；配列番号３０；配列番号３１；および配列番号３２。
（項目５１）　前記ポリペプチドがキメラタンパク質である、項目５０に記載の単離されたポリペプチド。
（項目５２）　前記キメラタンパク質が免疫グロブリン定常領域を含む、請求項５１に記載の単離されたポリペプチド。
（項目５３）　配列番号１４のアミノ酸配列を含有している、単離されたマウスＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド。
（項目５４）　前記ポリペプチドがキメラタンパク質である、項目５３に記載の単離されたポリペプチド。
（項目５５）　前記キメラタンパク質が免疫グロブリン定常領域を含む、請求項５４に記載の単離されたポリペプチド。

【図面の簡単な説明】

【００４１】

【図１Ａ】図１Ａは、ｐＪＳＴ５７６中にクローン化されたＢＪＡＢ　ｃＤＮＡのＤＮＡ配列（配列番号１）を示す。

【図１Ｂ】図１Ｂは、ＩＭＡＧＥクローン２０００２７１（ＥＳＴ　ＡＩ２５０２８９）のｃＤＮＡ（配列番号２）の完全なＤＮＡ配列を示す。
【図２Ａ】図２Ａは、ＧＥＮＥＳＣＡＮプログラムによって推定された、イントロンを含まないＪＳＴ５７６のヌクレオチド配列（配列番号３）を示す。
【図２Ｂ】図２Ｂは、ＢＪＡＢもしくはＩＭ－９　ＲＮＡから作製された、またはＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡについてのいずれかの１本鎖のｃＤＮＡを使用して、ＢＡＦＦ－Ｒについて得られたＰＣＲ産物の１％アガロースゲルを示す。レーン１は、λＤＮＡ　ＨｉｎｄＩＩＩ消化物である。レーン２は、ＢＪＡＢオリゴｄＴでプライムしたＢＡＦ－２２５／ＢＡＦ－１９１である。レーン３は、ＢＪＡＢオリゴｄＴでプライムしたＢＡＦ－２２６／ＢＡＦ－１９１である。レーン４は、ＢＪＡＢでランダムプライムしたＢＡＦ－２２５／ＢＡＦ－１９１である。レーン５は、ＢＪＡＢでランダムプライムしたＢＡＦ－２２６／ＢＡＦ－１９１である。レーン６は、ＩＭ－９オリゴｄＴでプライムしたＢＡＦ－２２５／ＢＡＦ－１９１である。レーン７は、ＩＭ－９オリゴｄＴでプライムしたＢＡＦ－２２６／ＢＡＦ－１９１である。レーン８は、ＩＭ－９でランダムプライムしたＢＡＦ－２２５／ＢＡＦ－１９１である。レーン９は、ＩＭ－９でランダムプライムしたＢＡＦ－２２６／ＢＡＦ－１９１である。レーン１０は、ＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡ　ＢＡＦ－２２５／ＢＡＦ－１９１である。レーン１１は、ＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡ　ＢＡＦ－２２６／ＢＡＦ－１９１である。レーン１２は、鋳型を含まないＢＡＦ－２２５／ＢＡＦ－１９１である。レーン１３は、鋳型を含まないＢＡＦ－２２６／ＢＡＦ１９１である。
【図２Ｃ】図２Ｃは、ＢＪＡＢの１本鎖ｃＤＮＡから推定されたイントロンに隣接している、バルクなＰＣＲ産物の集団の配列決定によって決定した、成熟ＪＳＴ５７６（ＢＡＦＦ－Ｒ）配列（配列番号４）（また、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号第ＡＦ３７３８４６）を示す。
【図２Ｄ】図２Ｄは、ＢＡＦＦ－Ｒ（ＪＳＴ５７６）のアミノ酸配列（配列番号５）を示す。太字のＡ（Ａｌａ）残基は、別のスプライシングアクセプター部位の使用によって生じる配列を示す。推定される膜貫通ドメインは四角で囲み、そして推定の停止導入シグナルは下線で示す。
【図３】図３は、ヒト脾臓の１本鎖ｃＤＮＡからＲＴ－ＰＣＲによって得られた、５’ＵＴＲ配列を含有しているＪＳＴ５７６のスプライシングされたバージョン（配列番号６）、および推定されるアミノ酸配列（配列番号７）を示す。この配列は、ＡＴＧを有するフレーム中に上流の停止コドンを含む。
【図４Ａ】図４Ａは、マウスのＢＡＦＦ－Ｒ　ｃＤＮＡの配列（配列番号８）（また、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号第ＡＦ３７３８４７）を示す。
【図４Ｂ】図４Ｂは、マウスＢＡＦＦ－Ｒのアミノ酸配列（配列番号９）を示す。Ｃｙｓ残基は太字および下線で、そして推定される膜貫通領域は四角で囲って示す。
【図４Ｃ】図４Ｃは、ヒトＢＡＦＦ－Ｒタンパク質配列（配列番号１０）およびマウスＢＡＦＦ－Ｒタンパク質配列（配列番号９）間の相同性を示す。
【図５】図５は、ＪＳＴ５７６トランスフェクト細胞に対するヒトＢＡＦＦの結合を示す。２９３ＥＢＮＡ細胞を、ｐＪＳＴ５７６またはＣＡ３３６（ｈｕＴＡＣＩ）、およびＧＦＰレポーター構築物で同時トランスフェクトした。細胞を、１μｇ／ｍｌのビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦと、続いてＳＡＶ－ＰＥとの、ＢＡＦＦの結合についてアッセイした。
【図６】図６は、ＪＳＴ５７６トランスフェクト細胞へのヒトおよびマウスのＢＡＦＦの結合を示す。２９３ＥＢＮＡ細胞を、ｐＪＳＴ５７６およびＧＦＰレポーター構築物で同時トランスフェクトした。細胞を、５μｇ／ｍｌのｆｌａｇ－ｈｕＢＡＦＦまたはｆｌａｇ－ｍｕＢＡＦＦ、続く抗ｆｌａｇモノクローナル抗体Ｍ２およびロバ抗－マウスＩｇＧ－ＰＥとの、ＢＡＦＦの結合について、２４時間後にアッセイした。
【図７】図７は、ＡＰＲＩＬがＪＳＴ５７６トランスフェクト細胞には結合しないことを示す。２９３ＥＢＮＡ細胞を、ｐＪＳＴ５７６またはＣＡ３３６（ｈｕＴＡＣＩ）およびＧＦＰレポーター構築物で同時トランスフェクトした。細胞を、１μｇ／ｍｌのｍｙｃ－

ｍｕＡＰＲＩＬと、続いて抗ｍｕ－ＡＰＲＩＬラット－ＩｇＧ２ｂ、ビオチン化抗ラットＦｃＧ２ｂ、およびＳＡＶ－ＰＥとのＡＰＲＩＬ結合についてアッセイした。

【図８】図８は、ＢＡＦＦがＪＳＴ５７６トランスフェクト細胞由来のタンパク質を沈殿させることを示す。２９３ＥＢＮＡ細胞を、ＢＡＦＦ－Ｒ（ｐＪＳＴ５７６）、ベクターのみ（ＣＨ２６９）、またはｈｕＴＡＣＩ（ＣＡ３３６）のいずれかでトランスフェクトし、そして^{35}Ｓシステインおよびメチオニンでパルスした。抽出物を、ｆｌａｇ－ｈｕＢＡＦＦとともに免疫沈降させ、そして還元性ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で泳動した。分子量マーカーを左に示す。

【図９】図９は、ヒトＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃをコードする遺伝子の核酸配列（配列番号１１）、およびその誘導されるアミノ酸配列（配列番号１２）を示す：核酸残基１～６３は、マウスＩｇＧ－κシグナル配列をコードする；核酸残基６４～６６は、制限酵素部位を導入するために使用した；核酸残基６７～２７６は、ＢＡＦＦ－Ｒ細胞外ドメインの一部をコードする；核酸残基２７７～２７９は、制限酵素部位を導入するために使用した；そして核酸残基２８０～９６０は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードする。

【図１０Ａ】図１０Ａは、プローブとしてＪＳＴ５６のＥｃｏＮＩフラグメントを使用した、ノーザンブロット分析の結果を示す。すべての露光は４日間である。１０Ａは、Ｃｌｏｎｔｅｃｈヒトｉｍｍｕｎｅ　ＩＩブロットである。

【図１０Ｂ】図１０Ｂは、プローブとしてＪＳＴ５６のＥｃｏＮＩフラグメントを使用した、ノーザンブロット分析の結果を示す。すべての露光は４日間である。１０Ｂは、Ｃｌｏｎｔｅｃｈヒト１２レーン多組織ブロットである。

【図１０Ｃ】図１０Ｃは、プローブとしてＪＳＴ５６のＥｃｏＮＩフラグメントを使用した、ノーザンブロット分析の結果を示す。すべての露光は４日間である。１０Ｃは、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　ヒト多組織ＩＩブロットである。

【図１１】図１１は、種々の細胞株から単離した２０μｇの全ＲＮＡのノーザンブロット分析の結果を示す。ブロットを、ＪＳＴ５７６のＥｃｏＮＩ制限フラグメントでプローブし、そして４日間露光させた。ＦＡＣＳ分析によって決定した、細胞株のＢＡＦＦに結合する能力を、レーンの下に示す。

【図１２】図１２は、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃを使用する免疫沈降の結果を示す。ヒトＢＡＦＦは、ＢＡＦＦ－Ｒ：ＦｃまたはＢＣＭＡ：Ｆｃで沈降させられたが、Ｆｎ１４－Ｆｃではそうではなかった。コントロールＢＡＦＦタンパク質をレーン１に示す。

【図１３】図１３は、ヒトＢＡＦＦ：Ｆｃが、ＢＪＡＢ細胞へのヒトＢＡＦＦの結合をブロックすることを示す。ＦＡＣＳ分析の結果を、図１３Ａに示す。曲線Ｅは、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃの非存在下でのＢＪＡＢ細胞へのビオチン化ＢＡＦＦの結合を示す。曲線Ｂ～Ｄは、それぞれ、５μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌ、または０．２μｇ／ｍｌの存在下でのＢＪＡＢ細胞に結合するＢＡＦＦの能力を示す。曲線Ａは、第２工程のみの曲線である。図１３Ｂは、ＴＡＣＩ：Ｆｃ（三角）、または非特異的融合タンパク質ＬＴ＿Ｒ：Ｆｃ（丸）と比較した、種々の濃度のＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ（四角）の、レセプターを発現するＢＪＡＢ細胞へのＢＡＦＦの結合をブロックする能力を示す。

【図１４】図１４は、脾臓Ｂ細胞のＢＡＦＦによって誘導される同時刺激をブロックする、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃの能力を示す。漸増量のｈＢＡＦＦ（ｎｇ／ｍｌ）に対する［^{3}Ｈ］チミジンの取り込み（ｃｐｍ）のグラフを示す。

【図１５】図１５は、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ１での処置が正常なマウスにおいて末梢Ｂ細胞の減少を生じることを示す。

【図１６】図１６は、ヒトＢＡＦＦ－Ｒ：ＦｃおよびマウスＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃでのマウスの処置が、脾臓Ｂ２２０＋Ｂ細胞の数を減少させることを示す。

【図１７】図１７は、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃのマウスへの投与がリンパ節Ｂ２２０＋Ｂ細胞の割合を減少させることを示す。

【図１８】図１８は、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃのマウスへの投与が末梢血Ｂ２２０＋細胞を減少させることを示す。

【図１９】図１９Ａは、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する抗体を産生する４個のクローンの上清か

らのＦＡＣＳデータを示す。ＢＡＦＦ－Ｒに結合する抗体を含まないコントロール上清もまた示す。図１９Ｂは、ＢＡＦＦ－ＲへのＢＡＦＦの結合をブロックする２個のクローンを示すヒストグラムである。（ａ）は、ＢＡＦＦコントロールなしを示す；（ｂ）は、クローン２による抗体のブロック能力を示す；（ｃ）は、クローン９による抗体のブロック能力を示す；そして（ｄ）は、ＢＡＦＦ－Ｒには結合しないコントロール抗体による曲線を示す。

【図２０】図２０は、ヒトＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ（ｈＢＡＦＦ－Ｒ）およびマウスＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ（ｍＢＡＦＦ－Ｒ）細胞外ドメインのアミノ酸配列のアラインメント、ならびに示した配列を含有しているＦｃ融合タンパク質の発現の際に観察される凝集の割合を示す。番号を付けたＪＳＴクローンは、親配列において変異を示すアミノ酸配列（下線で示す）、およびそれによって生じる発現されたタンパク質の凝集を示す。ヒト（配列番号１０のアミノ酸２～７１；配列番号１３）およびマウス（配列番号９のアミノ酸２～７１；配列番号１４）のＢＡＦＦ－Ｒについての部分的な配列；ならびに以下のクローンについての対応している部分を示す：ＪＳＴ６５９（配列番号１５）、ＪＳＴ６６０（配列番号１６）、ＪＳＴ６６１（配列番号１７）、ＪＳＴ６６２（配列番号１８）、ＪＳＴ６６３（配列番号１９）、ＪＳＴ６７３（配列番号２０）、ＪＳＴ６７４（配列番号２１）、ＪＳＴ６７５（配列番号２２）、ＪＳＴ６７２（配列番号２３）、ＪＳＴ６７６（配列番号２４）、ＪＳＴ６７１（配列番号２５）、ＪＳＴ６７７（配列番号２６）、ＪＳＴ６７８（配列番号２７）、ＪＳＴ６６４（配列番号２８）、ＪＳＴ６６８（配列番号２９）、ＪＳＴ６６５（配列番号３０）、ＪＳＴ６６６（配列番号３１）、およびＪＳＴ６６７（配列番号３２）。

【図２１】図２１は、ＢＡＦＦ－Ｒ－ｉ．ｃ．ｄ．（ＢＡＦＦ－Ｒ細胞内ドメイン）でトランスフェクトした細胞（レーン１）またはコントロールベクターでトランスフェクトした細胞（レーン２）から調製した溶解物を使用して免疫沈降させたタンパク質のオートラジオグラフを示す。約6×10^{6}個の２９３Ｅ細胞を、ＢＡＦＦＲ－ｉ．ｃ．ｄ．をコードする構築物または模擬プラスミドでトランスフェクトした。４８時間後に、細胞を、^{35}Ｓで代謝によって２４時間標識し、溶解緩衝液で溶解させ、予め明澄化させ、そして抗ｍｙｃ　ｍＡｂ、９Ｅ１０で免疫沈降させた。免疫沈降物を、還元条件下での１０～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離させた。

【発明を実施するための形態】

【００４２】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で援用されている、参考文献、特許、特許出願、および学術文献（ＧｅｎＢａｎｋデータベース配列についての登録番号を含む）は、当業者の知見を確立し、そしてそれぞれが詳細にそして個々に参考として援用されていることが示されるかのように同じ程度で、それらの全体において本明細書中で参考として援用されている。本明細書中で引用されているいずれかの参考文献と、本明細書の特異的な教示との間での全てのコンフリクトは、本明細書の恩恵と考えるべきである。同様に、当該分野で理解されている用語または句の定義と、本明細書中での詳細な教示としての用語または句の定義との間での全てのコンフリクトは、本発明の恩恵と考えるべきである。

【００４３】

当業者に公知である組換えＤＮＡ技術の一般原理を示す標準的な参考文献には、Ａｕｓｕｂｅｌら、ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９９８）；Ｓａｍｂｒｏｏｋら、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ　ＭＡＮＵＡＬ、第２版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８９）；Ｋａｕｆｍａｎら編、ＨＡＮＤＢＯＯＫ　ＯＦ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＡＮＤ　ＣＥＬＬＵＬＡＲ　ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　Ｂ

ＩＯＬＯＧＹ ＡＮＤ ＭＥＤＩＣＩＮＥ、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ（１９９５）；ＭｃＰｈｅｒｓｏｎ編、ＤＩＲＥＣＴＥＤ ＭＵＴＡＧＥＮＥＳＩＳ：Ａ ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ ＡＰＰＲＯＡＣＨ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９９１）が含まれる。

【００４４】

本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドをコードする単離された核酸またはその一部、ＢＡＦＦ－Ｐポリペプチド、これらの核酸を含有しているベクター、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸で形質転換された宿主細胞、抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体、および薬学的組成物を開示する。ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを作製する方法、ならびに、これらの化合物を使用する症状のスクリーニング、診断、処置方法、およびＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド活性を調節する化合物をスクリーニングする方法もまた、開示される。

【００４５】

本明細書中で議論されているＢＡＦＦ－Ｒ核酸およびポリペプチド、ならびにＢＡＦＦ－Ｒ抗体、ならびに薬学的組成物は、とりわけ、ガンおよび／または免疫調節状態の処置に有用である。これらの障害には、例えば、自己免疫性の性質であるＢ細胞によって媒介される疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、慢性間接リウマチ、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、突発性血小板減少症紫斑、抗リン脂質症候群、シャーガス病、グレーブズ病、ヴェーゲナー肉芽腫症、結節性多発動脈炎、および結節性進行性糸球体腎炎）が含まれる。この治療薬はまた、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、原発性アミロイド症または免疫細胞関連アミロイド症、および意義不明性クローン性高ガンマグロブリン血症（ＭＧＵＳ）のような、プラスマ細胞の障害における適用を有する。腫瘍学の標的には、Ｂ細胞ガン腫、白血病、およびリンパ腫が含まれる。

【００４６】

（ＢＡＦＦ-Ｒ核酸）

本発明の１つの局面は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分をコードする、単離された核酸分子に関する。ＢＡＦＦ－Ｒをコードする核酸（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ ｍＲＮＡ）を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分な核酸フラグメント、およびＢＡＦＦ－Ｒ核酸分子の増幅もしくは変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）プライマーとしての使用のためのフラグメントもまた、含まれる。本明細書中で使用される場合には、用語「核酸分子」は、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）、ヌクレオチドアナログを使用して作製したＤＮＡまたはＤＮＡのアナログ、ならびにそれらの誘導体、フラグメント、およびホモログが意図される。核酸分子は、１本鎖または２本鎖であり得るが、好ましくは、２本鎖のＤＮＡである。

【００４７】

「プローブ」は、用途に応じた種々の長さの（好ましくは、少なくとも約１０ヌクレオチド（ｎｔ）またはそれ以上（例えば、約６０００ｎｔ））核酸配列をいう。プローブは、同一の、類似の、または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長いプローブは、通常は、天然のまたは組換えの供給源から得られ、オリゴマーよりも高く特異的であり、そしてはるかにゆっくりとハイブリダイズする。プローブは、１本鎖または２本鎖であり得、そしてＰＣＲ、膜に基づくハイブリダイゼーション技術、またはＥＬＩＳＡ様技術における特異性を有するように設計され得る。

【００４８】

「単離された核酸分子」は、核酸の天然の供給源に存在する他の核酸分離から分離されたものである。単離された核酸分子の例には、ベクター中に含まれる組

換えＤＮＡ分子、異種宿主細胞中で維持される組換えＤＮＡ分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成のＤＮＡまたはＲＮＡ分子が含まれるがこれらに限定されない。好ましくは、「単離された」核酸は、核酸が由来する生物体のゲノムＤＮＡ中で天然の状態で核酸に隣接している配列（すなわち、核酸の５’および３’末端に存在する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態においては、単離されたＢＡＦＦ－Ｒ核酸分子は、約５０ｋｂ、２５ｋｂ、５ｋｂ、４ｋｂ、３ｋｂ、２ｋｂ、１ｋｂ、０．５ｋｂ、または０．１ｋｂ未満のヌクレオチド配列を含有し得る。これは、核酸が由来する細胞のゲノムＤＮＡ中の核酸分子に天然の状態で隣接している。さらに、「単離された」核酸分子（例えば、ｃＤＮＡ分子）は、組換え技術によって産生される場合には、他の細胞の材料または培養培地を、あるいは化学的に合成される場合には化学的な前駆体または他の化合物を、実質的に含有し得ない。

【００４９】

本発明の核酸分子（例えば、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のヌクレオチド配列、またはこれらのヌクレオチド配列のいずれかの相補物を有している核酸分子）は、標準的な分子生物学的技術、および本明細書中で提供される配列情報を使用して単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして図１Ａ、Ｂ、２Ａ、Ｃ、および３の核酸配列の全てまたは一部を使用して、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸配列が、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニング技術を使用して単離され得る（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら編、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ、第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ，１９８９；およびＡｕｓｕｂｅｌら編、ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ，１９９３に記載されている）。

【００５０】

本発明の核酸は、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、あるいはゲノムＤＮＡを鋳型として、そして適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、標準的なＰＣＲ増幅技術に従って増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され得、そしてＤＮＡ配列分析によって特徴付けられ得る。さらに、ＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列に対応しているオリゴヌクレオチドは、例えば、自動ＤＮＡ合成装置を使用して、標準的な合成技術によって調製され得る。

【００５１】

本明細書中で使用される場合には、用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいう。オリゴヌクレオチドは、ＰＣＲ反応において使用される十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノムもしくはｃＤＮＡ配列に基づき得るか、またはゲノムもしくはｃＤＮＡ配列から設計され得、そして特定の細胞または組織中の同一の、類似の、または相補的なＤＮＡもしくはＲＮＡを増幅、確認、またはその存在を明らかにするために使用され得る。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約１０ｎｔそして多くても５０ｎｔ（好ましくは、約１５ｎｔから３０ｎｔ）を有している核酸配列の一部を含む。これらは、化学的に合成され得、そしてプローブとして使用され得る。

【００５２】

別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）に示されているヌクレオチド配列の相補物である核酸分子を含む。別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、図１Ａ

（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）に示されているヌクレオチド配列の相補物、またはこのヌクレオチド配列の一部である核酸分子を含む。図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）に示されているヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）に示されているヌクレオチド配列に対して十分に相補的であるものである。これは、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）に示されているヌクレオチド配列と、わずかな不適合を有してまたは不適合を有さずに水素結合し得、それによって安定な２本鎖を形成し得る。

【００５３】

本明細書中で使用される場合には、用語「相補性」は、核酸分子のヌクレオチド単位間でのワトソンクリックまたはＨｏｏｇｓｔｅｅｎの塩基対合をいい、そして用語「結合」は、２つのポリペプチドもしくは化合物、または関連するポリペプチドもしくは化合物、あるいはそれらの組合せ間での物理的または化学的な相互作用を意味する。結合には、イオン結合、非イオン結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用などが含まれる。物理的な相互作用は、直接的または間接的のいずれかであり得る。間接的な相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物の作用を通じてであり得るか、またはそれに起因し得る。直接的な結合は、別のポリペプチドまたは化合物の作用は利用しないか、またはそれには起因しないが、その代わりに、他の実質的な化学的な中間体を伴わない相互作用をいう。

【００５４】

さらに、本発明の核酸分子は、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）の核酸配列の一部（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒの生物学的に活性な部分をコードするプローブまたはプライマーまたはフラグメントとして使用され得るフラグメント）のみを含み得る。本明細書中で提供されるフラグメントは、少なくとも６個の（連続する）核酸または少なくとも４個の（連続する）アミノ酸の配列として定義され、これは、核酸の場合には特異的なハイブリダイゼーション、またはアミノ酸の場合にはエピトープの特異的な認識をそれぞれ可能にするに十分な長さであり、そして多くても、全長の配列よりもいくつか少ない。フラグメントは、選択される核酸またはアミノ酸配列の任意の連続している部分に由来し得る。誘導体は、直接、または改変もしくは部分的な置換のいずれかによって、天然の化合物から形成された核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、天然の化合物と同様であるが同一ではない構造を有する、核酸配列またはアミノ酸配列であるが、特定の成分または側鎖を含む点でそれとは異なる。アナログは、合成であり得るかまたは種々の進化上の起源に由来し得、そして野生型と比較して同様のまたは反対の代謝活性を有する場合がある。

【００５５】

誘導体およびアナログは、全長であり得るか、または誘導体もしくはアナログが、下記のような改変された核酸またはアミノ酸を含む場合には、全長ではない場合がある。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、種々の実施形態において、同一の大きさの核酸またはアミノ酸配列の全体にわたって、または、アラインメントが当該分野で公知のコンピューターによる相同プログラムによって行われた並べられた配列に対して比較される場合、またはそのコードする核酸が、上記のタンパク質をコードする配列の相補物に対して、ストリンジェントな、中程度のストリンジェントな、または低いストリンジェントの条件下でハイブリダイズすることができる場合に、少なくとも約４５％、５０％、７０

％、８０％、９５％、９８％、またなお９９％の同一性（８０～９９％の同一性が好ましい）によって、本発明の核酸またはタンパク質と実質的に相同である領域を含有している分子を含むが、これに限定されない。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら、ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ、１９９３、および下記を参照のこと。例示的なプログラムは、デフォルトセッティングを使用するＧａｐプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ、バージョン ８ ｆｏｒ ＵＮＩＸ（登録商標）、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ、Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）である。これは、ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎ（１９８１）Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２－４８９（これは、その全体において本明細書中で参考として援用されている）のアルゴリズムを使用する。

【００５６】

「相同核酸配列」もしくは「相同アミノ酸配列」、またはそれらのバリエーションは、上記に議論されているようなヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同ヌクレオチド配列は、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドのイソ型をコードするそのような配列をコードする。イソ型は、例えば、ＲＮＡの選択的スプライシングの結果として、同じ生物体の異なる組織中で発現され得る。あるいは、イソ型は、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明においては、相同ヌクレオチド配列には、哺乳動物を含むがこれらに限定されないヒト以外の種（従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、および他の生物体が含まれ得る）のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が含まれる。相同ヌクレオチド配列には、天然に存在している対立遺伝子のバリエーション、および本明細書中に示されているヌクレオチド配列の変異体もまた含まれるが、これらに限定されない。しかし、相同ヌクレオチド配列には、ヒトＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードするヌクレオチド配列は含まれない。相同核酸配列は、図２Ｄ（配列番号５）の保存的アミノ酸置換（以下に示される）、ならびにＢＡＦＦ－Ｒ活性を有しているポリペプチドをコードするそのような核酸配列が含まれる。相同アミノ酸配列は、ヒトＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドのアミノ酸配列はコードしない。

【００５７】

ヒトＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子のクローニングによって決定したヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織から）中のＢＡＦＦ－Ｒホモログ、および他の哺乳動物からのＢＡＦＦ－Ｒホモログの、同定および／またはクローニングにおける使用のために設計された、プローブおよびプライマーの作製を可能にする。プローブ／プライマーは、典型的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、典型的には、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のいずれかの連続しているセンス鎖のヌクレオチド配列、または図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）いずれかのアンチセンス鎖のヌクレオチド配列、または図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のいずれかの天然に存在している変異体の、少なくとも約１２、２５、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、または４００個に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【００５８】

ヒトＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列に基づくプローブは、同じタンパク質または相同タンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用さ

れ得る。種々の実施形態においては、プローブはさらに、それに付着させられた標識基を含む。例えば、標識基は放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断用試験キットの一部として、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒをコードする核酸のレベルを測定することによって（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡのレベルを検出することによって）、あるいは、ゲノムＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子が変異させられているかまたは欠失させられているかどうかを決定することによって、使用され得る。

【００５９】

「ＢＡＦＦ－Ｒの生物学的に活性な部分を有しているポリペプチド」は、特定の生物学的アッセイにおいて測定された場合に、用量依存的にまたはそうではなく、本発明のポリペプチドの活性と同様の（必ずしも同一である必要はない）活性を示すポリペプチド（成熟形態を含む）をいう。「ＢＡＦＦ－Ｒの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）（これは、ＢＡＦＦ－Ｒの生物学的活性（ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の生物学的活性は以下に記載される）を有しているポリペプチドをコードする）のいずれかの一部を単離すること、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のコードされる部分を発現させること（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてＢＡＦＦ－Ｒのコードされる部分の活性を評価することによって調製され得る。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒの生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、必要に応じて、ＢＡＦＦ結合ドメインを含む。別の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒの生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、１つ以上の領域を含む。

【００６０】

（ＢＡＦＦ－Ｒ改変体）

本発明はさらに、遺伝子コードの縮重に起因して、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）に示されているヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を含む。従って、これらの核酸は、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）に示されているヌクレオチド配列によってコードされるものと同じＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする。別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、図２Ｄ（配列番号５）に示されているアミノ酸配列を有しているタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【００６１】

図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のいずれかに示されているヒトＢＡＦＦ－Ｒヌクレオチド配列に加えて、ＢＡＦＦ－Ｒのアミノ酸配列中の変化を導くＤＮＡ配列の多形現象が集団（例えば、ヒトの集団）中に存在し得ることが、当業者に理解される。このような、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の遺伝子多形現象は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団中の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合には、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質（好ましくは、哺乳動物のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質）をコードするオープンリーディングフレームを含有している核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のバリエーションは、典型的には、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子のヌクレオチド配列中に１～５％の相違を生じ得る。ＢＡＦＦ－Ｒにおけるこのようなヌクレオチドのバリエーションおよび得られるアミノ酸の多形現象のいずれかおよび全て（これらは、天然の対立遺伝子のバリエーションの結果であり、そしてＢＡＦＦ－Ｒの機能的活性は変更しない）が、本発明の範囲内であること

が意図される。
【００６２】
さらに、他の種に由来し、従って、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする核酸分子が、本発明の範囲内であることが意図される。本発明のＢＡＦＦ－Ｒ　ｃＤＮＡの天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子が、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下での標準的なハイブリダイゼーション技術に従って、ハイブリダイゼーションプローブとしてヒトｃＤＮＡまたはその一部を使用して、本明細書中に開示されているヒトＢＡＦＦ－Ｒ核酸に対するそれらの相同性に基づいて単離され得る。例えば、可溶性のヒトＢＡＦＦ－Ｒ　ｃＤＮＡが、ヒトの膜に結合したＢＡＦＦ－Ｒに対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜に結合したヒトＢＡＦＦ－Ｒ　ｃＤＮＡが、可溶性のヒトＢＡＦＦ－Ｒに対するその相同性に基づいて単離され得る。
【００６３】
従って、別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも６ヌクレオチドの長さであり、そしてストリンジェントな条件下で、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のいずれかのヌクレオチド配列を含有している核酸分子に対してハイブリダイズする。別の実施形態においては、核酸は、少なくとも１０、２５、５０、１００、２５０、または５００ヌクレオチドの長さである。別の実施形態においては、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で使用される場合には、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、互いに少なくとも６０％相同であるヌクレオチド配列が、典型的には互いにハイブリダイズしたままである、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を記載するように意図される。
【００６４】
ホモログ（すなわち、ヒト以外の種に由来するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする核酸）または他の関連する配列（例えば、パラログ）は、核酸のハイブリダイゼーションおよびクローニングのための当該分野で周知の方法を使用して、プローブとして特定のヒト配列の全てまたは一部を用いて、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって得ることができる。
【００６５】
本明細書中で使用される場合には、句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、プローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は、配列に依存し、そして種々の環境下で異なる。より長い配列は、より短い配列よりも高温で特異的にハイブリダイズする。一般的には、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度およびｐＨでの、特異的な配列についての融点（Ｔｍ）よりも約５℃低くなるように選択される。Ｔｍは、標的配列に相補的なプローブの５０％が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度（定義されたイオン強度、ｐＨ、および核酸濃度下で）である。標的配列は、一般的には、過剰に存在するので、Ｔｍでは、プローブの５０％が平衡状態で占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、ｐＨ７．０～８．３で、塩濃度が約１．０Ｍ未満のナトリウムイオン（典型的には、約０．０１Ｍ～１．０Ｍのナトリウムイオン（または他の塩））であり、そして温度は、短いプローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチド（例えば、１０ｎｔ～５０ｎｔ）については少なくとも約３０℃、そしてより長いプローブ、プライマー、およびオリゴヌクレオチドについては少なくとも約６０℃である。ストリンジェン

トな条件はまた、不安定化剤（ｄｅｓｔａｂｉｌｉｚｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）（例えば、ホルムアミド）の添加によって達成され得る。

【００６６】

ストリンジェントな条件は当業者に公知であり、そしてＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９８）、６．３．１－６．３．６に見出され得る。好ましくは、典型的には、互いに少なくとも約６５％、７０％、７５％、８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％相同である配列が、互いにハイブリダイズしたままである条件である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の限定的ではない例は、６×ＳＳＣ、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．０２％のＰＶＰ、０．０２％のＦｉｃｏｌｌ、０．０２％のＢＳＡ、および５００ｍｇ／ｍｌの変性させたサケ精子ＤＮＡを含有している高塩緩衝液中で６５℃でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションには、０．２×ＳＳＣ、０．０１％のＢＳＡ中で５０℃での、１回以上の洗浄が続く。配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号６の配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする本発明の単離された核酸は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合には、「天然に存在する」核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド配列を有しているＲＮＡ分子またはＤＮＡ分子をいう（例えば、天然のタンパク質をコードする）。

【００６７】

第２の実施形態においては、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のいずれかのヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメント、アナログ、もしくは誘導体を含有している核酸分子に対して、中程度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする核酸配列が、提供される。中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の限定的ではない例は、６×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．５％のＳＤＳ、および１００ｍｇ／ｍｌの変性させたサケ精子ＤＮＡ中で５５℃でのハイブリダイゼーション、これに続く、１×ＳＳＣ、０．０１％のＳＤＳ中で３７℃での、１回以上の洗浄である。使用され得る他の中程度のストリンジェンシーの条件は、当該分野で周知である。例えば、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を参照のこと。

【００６８】

第３の実施形態においては、図１Ａ（配列番号１）、図２Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のいずれかのヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメント、アナログ、もしくは誘導体を含有している核酸分子に対して、低いストリンジェンシーオ条件下でハイブリダイズする核酸が、提供される。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の限定的ではない例は、３５％のホルムアミド、５×ＳＳＣ、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．０２％のＰＶＰ、０．０２％のＦｉｃｏｌｌ、０．２％のＢＳＡ、１００ｍｇ／ｍｌの変性させたサケ精子ＤＮＡ、１０％（ｗｔ／ｖｏｌ）のデキストラン硫酸中で４０℃でのハイブリダイゼーション、これに続く、２×ＳＳＣ、２５ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、５ｍＭのＥＤＴＡ，および０．１％のＳＤＳ中で５０℃での１回以上の洗浄である。使用され得る他の低いストリンジェンシーの条件は、当該分野で周知である（例えば、交差種ハイブリダイゼーションのために使用

される）。例えば、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；ＳｈｉｌｏおよびＷｅｉｎｂｅｒｇ（１９８１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：６７８９－６７９２を参照のこと。

【００６９】

（保存的変異）

集団中に存在し得るＢＡＦＦ－Ｒ配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、変化が、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、図３（配列番号６）のヌクレオチド配列中への変異によって導入され得、それによって、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の機能的な能力を変更することなく、コードされるＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のアミノ酸配列中に変化を導き得ることが、当業者にさらに明らかである。例えば、「必須ではない」アミノ酸残基でのアミノ酸置換を導くヌクレオチド置換が、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のいずれかの配列中に作製され得る。「必須ではない」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更させることなくＢＡＦＦ－Ｒの野生型配列から変更させられ得る残基であるが、「必須の」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要である。例えば、本発明のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質間で保存されているアミノ酸残基は、特に、変更されいくいと推定される。

【００７０】

さらに、本発明のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のファミリーのメンバーの間で保存されているアミノ酸残基もまた、変更されにくいと推定される。例えば、本発明のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、ＴＮＦファミリーのメンバーにおいて典型的に保存されている領域である少なくとも１つのドメインを含み得る。このように、これらの保存されたドメインは、おそらく、変異されやすい。しかし、他のアミノ酸残基（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のメンバーの間で保存されていないかまたは半分だけ保存されている（ｏｎｌｙ ｓｅｍｉ－ｃｏｎｓｅｒｖｅｄ）アミノ酸残基）は、活性に必須ではなく、従って、おそらく、変更されやすい。

【００７１】

本発明の別の局面は、活性のためには必須ではないアミノ酸残基に変化を含む、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、図２Ｄ（配列番号５）のアミノ酸配列とは異なるが、なお生物学的活性を保持している。１つの実施形態においては、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここでは、タンパク質は、図２Ｄ（配列番号５）のアミノ酸配列に対して、少なくとも約４５％相同であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、核酸分子によってコードされるタンパク質は、図２Ｄ（配列番号５）に対して少なくとも約６０％相同、より好ましくは、図２Ｄ（配列番号５）に対して少なくとも約７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、そして最も好ましくは、少なくとも約９９％相同である。

【００７２】

図２Ｄのタンパク質に対して相同であるＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする単離された核酸分子は、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のヌクレオチド配列中に１つ以上のヌクレオチドの置換、付加、または欠失を導入することによって作製される。その結果、１つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失がコードされるタンパク質中に導入される。

【００７３】

変異は、標準的な技術（例えば、部位特異的変異誘発、およびＰＣＲによって媒介される変異誘発によって）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）

、または図３（配列番号６）中に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、１つ以上の推定される必須ではないアミノ酸残基で作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有しているアミノ酸残基で置きかえられる置換である。類似の側鎖を有しているアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーには、以下が含まれる：塩基性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、荷電していない極性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β－分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。このように、ＢＡＦＦ－Ｒ中の推定される必須ではないアミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリーに由来する別のアミノ酸残基で置きかえられる。あるいは、別の実施形態においては、変異は、ＢＡＦＦ－Ｒをコードする配列の全てまたは一部にわたってランダムに（例えば、飽和変異誘発によって）導入され得、そして得られた変異体は、活性を保持している変異体を同定するために、ＢＡＦＦ－Ｒの生物学的活性についてスクリーニングされ得る。図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のいずれかの変異誘発後、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現させられ得、そしてタンパク質の活性が決定され得る。

【００７４】

１つの実施形態においては、変異体ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、以下についてアッセイされ得る：（１）他のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、他の細胞表面タンパク質、またはそれらの生物学的に活性な部分とのタンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力；（２）変異体ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質とＢＡＦＦ－Ｒリガンドとの間での複合体の形成；（３）細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分（例えば、アビジンタンパク質）に結合する、変異体ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の能力；（４）ＢＡＦＦに結合する能力；あるいは（５）ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質抗体に特異的に結合する能力。

【００７５】

本発明は、ＢＡＦＦ結合活性を維持しながら、発現されるタンパク質の凝集を緩和するように設計された、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドをコードする特異的な変異体を提供する。このような変異体には、例えば、ＪＳＴ６６１（配列番号１７）、ＪＳＴ６６２（配列番号１８）、ＪＳＴ６６３（配列番号１９）、ＪＳＴ６７３（配列番号２０）、ＪＳＴ６７４（配列番号２１）、ＪＳＴ６７５（配列番号２２）、ＪＳＴ６７２（配列番号２３）、ＪＳＴ６７６（配列番号２４）、ＪＳＴ６７１（配列番号２５）、ＪＳＴ６７７（配列番号２６）、およびＪＳＴ６７８（配列番号２７）のアミノ酸配列をコードするクローンが含まれる。他の実施形態には、ＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドをコードする変異体が含まれる。これは、天然のヒトＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドの特徴と同様の凝集特性を有するが、これはまた、例えば、ＪＳＴ６５９（配列番号１５）、ＪＳＴ６６０（配列番号１６）、ＪＳＴ６６４（配列番号２８）、ＪＳＴ６６８（配列番号２９）、ＪＳＴ６６５（配列番号３０）、ＪＳＴ６６６（配列番号３１）、およびＪＳＴ６６７（配列番号３２）のアミノ酸配列を含有している配列を含むＢＡＦＦにも結合する。他の実施形態には、ＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドをコードする変異体が含まれる。ここでは、ヒトのＢＡＦＦ－Ｒとマウスの ＢＡＦＦ－Ｒとの間で保存されるアミノ酸は、他の保存されるアミノ酸に変化させられており、そしてここ

では、ＢＡＦＦに対するＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドの結合活性は保持されている。他の実施形態においては、変異体は、他のアミノ酸に変化させられている、ヒトのＢＡＦＦ－ＲとマウスのＢＡＦＦ－Ｒとの間では保存されていないアミノ酸を有している、ＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドをコードする。好ましくは、少なくとも１つの非極性のアミノ酸が、プロリン残基に、または荷電していない極性のアミノ酸に変化させられている。

【００７６】

（アンチセンス）

本発明の別の局面は、図２Ａ、Ｃ、３のヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメント、アナログ、もしくは誘導体を含有している核酸分子にハイブリダイズし得るか、またはそれと相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、２本鎖ｃＤＮＡ分子のコード鎖に相補的であるか、またはｍＲＮＡ配列に相補的である）ヌクレオチド配列を含む。特定の局面においては、ＢＡＦＦ－Ｒコード鎖の少なくとも約１０、２５、５０、１００、２５０、もしくは５００ヌクレオチド、またはその全体に対して、あるいはその一部だけに相補的な配列を含むアンチセンス核酸分子が提供される。図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、図３（配列番号６）のいずれかのＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体、およびアナログをコードする核酸分子、または図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、図３（配列番号６）のＢＡＦＦ－Ｒ核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

【００７７】

１つの実施形態においては、アンチセンス核酸分子は、ＢＡＦＦ－Ｒをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」は、アミノ酸残基（例えば、ヒトＢＡＦＦ－Ｒのタンパク質コード領域は、図２Ａ（配列番号３）のヌクレオチド１３～５６８、または図２Ｃ（配列番号４）のヌクレオチド１３～５６５、または図３（配列番号６）のヌクレオチド２９８～８４９に対応する）に翻訳されるコドンを含有しているヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態においては、アンチセンス核酸分子は、ＢＡＦＦ－Ｒをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」は、アミノ酸に翻訳されないコード領域に隣接している５’および３’配列をいう（すなわち、５’および３’非翻訳領域とも呼ばれる）。

【００７８】

本明細書中で開示されているＢＡＦＦ－Ｒをコードするコード鎖の配列を仮定すると、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソンクリックまたはＨｏｏｇｅｓｔｅｅｎの塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡのコード領域全体に相補的であり得るが、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡのコード領域または非コード領域の一部だけに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドが、より好ましい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡの翻訳開始部位の周辺領域に対して相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０ヌクレオチドの長さであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用して、化学合成または酵素連結反応を使用して構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在しているヌクレオチドを使用して化学的に合成され得るか、あるいは、分子の生物学的安定性を増大させるように、またはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される２本鎖の物理的な安定性を増大させるように設計された種々の改変されたヌクレオチド（例えば、

ホスホロチオエート誘導体およびアクリジンで置換されたヌクレオチド）が、使用され得る。

【００７９】

アンチセンス核酸を作製するために使用され得る改変されたヌクレオチドの例には、以下が含まれる：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（ｇａｌａｃｔｏｓｙｌｑｕｅｏｓｉｎｅ）、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（ｍａｎｎｏｓｙｌｑｕｅｏｓｉｎｅ）、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）、シュードウラシル、キューオシン（ｑｕｅｏｓｉｎｅ）、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。あるいは、アンチセンス核酸は、その中に核酸がアンチセンス方向でサブクローン化されている発現ベクターを使用して生物学的に産生され得る（すなわち、挿入された核酸から転写されるＲＮＡは、以下の節でさらに記載される目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である）。

【００８０】

本発明のアンチセンス核酸は、典型的には、被験体に投与されるか、またはインサイチュで作製され、その結果、これらは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする細胞性ｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡとハイブリダイズするかまたはそれに結合して、それにより、例えば、転写および／または翻訳の阻害によってタンパク質の発現を阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な２本鎖を形成するための従来のヌクレオチド相補性により得るか、または例えば、ＤＮＡ２本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重螺旋の主溝における特異的相互作用を介する。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例には、組織部位での直接の注射が含まれる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身的に投与され得る。例えば、全身的投与については、アンチセンス分子は、それらが、選択された細胞表面上で発現されるレセプターまたは抗原に特異的に結合するように、例えば、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に対してアンチセンス核酸分子を連結することによって、改変され得る。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書中で記載されているベクターを使用して細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、アンチセンス核酸分子が、強力なｐｏｌＩＩまたはｐｏｌＩＩＩプロモーターの制御下に配置されているベクター構築物が好ましい。

【００８１】

なお別の実施形態においては、本発明のアンチセンス核酸分子は、ａ－アノマー核酸分子である。ａ－アノマー核酸分子は、鎖が互いに平行に伸びる通常のｂユニットとは対照的に、相補ＲＮＡと特異的な２本鎖のハイブリッドを形成する（Ｇａｕｌｔｉｅｒら（１９８７）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１５：６６

２５－６６４１）。アンチセンス核酸分子はまた、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチドクレオチド（Ｉｎｏｕｅら（１９８７）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１５：６１３１－６１４８）またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡアナログ（Ｉｎｏｕｅら（１９８７）ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．２１５：３２７－３３０）を含むことが可能である。

【００８２】

（リボザイムおよびＰＮＡ部分）

なお別の実施形態においては、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、１本鎖の核酸（例えば、ｍＲＮＡ）を切断し得る（リボザイムは、この１本鎖の核酸に対して相補性を有する）リボヌクレアーゼ活性を有している触媒性ＲＮＡ分子である。このように、リボザイム（例えば、ハンマーヘッドリボザイム（ＨａｓｅｌｈｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ　３３４：５８５－５９１に記載されている））は、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡ転写物を触媒によって切断するために使用され得、それによってＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡの翻訳を阻害する。ＢＡＦＦ－Ｒをコードする核酸について特異性を有しているリボザイムは、本明細書中で開示されているＢＡＦＦ－Ｒ　ＤＮＡのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号３、配列番号４、配列番号６）に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、ＢＡＦＦ－ＲをコードするｍＲＮＡ中で切断されるヌクレオチド配列に対して相補的である、Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ　Ｌ－１９　ＩＶＳ　ＲＮＡの誘導体が、構築され得る。例えば、Ｃｅｃｈら、米国特許第４，９８７，０７１号；およびＣｅｃｈら、米国特許第５，１１６，７４２号を参照のこと。あるいは、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡは、ＲＮＡ分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有している触媒性ＲＮＡを選択するために使用され得る。例えば、Ｂａｒｔｅｌら（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６１：１４１１－１４１８を参照のこと。

【００８３】

あるいは、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の発現は、標的細胞中のＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の転写を妨げる３重螺旋構造を形成するように、ＢＡＦＦ－Ｒの調節領域（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒプロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的化することによって、阻害され得る。一般的には、Ｈｅｌｅｎｅ（１９９１）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓ．６：５６９－８４；Ｈｅｌｅｎｅら（１９９２）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６０：２７－３６；およびＭａｈｅｒ（１９９２）Ｂｉｏａｓｓａｙｓ　１４：８０７－１５を参照のこと。

【００８４】

種々の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒの核酸は、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または可溶性を改善するように改変され得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格が、ペプチド核酸を作製するために改変され得る（Ｈｙｒｕｐら（１９９６）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４：５－２３を参照のこと）。本明細書中で使用される場合には、用語「ペプチド核酸」または「ＰＮＡ」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置きかえられ、そして４個の天然のヌクレオ塩基のみが保持される核酸模倣物（例えば、ＤＮＡ模倣物）をいう。中性のＰＮＡ骨格は、低いイオン強度の条件下で、ＤＮＡおよびＲＮＡへの特異的なハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。ＰＮＡオリゴマーの合成は、Ｈｙｒｕｐら（１９９６）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４：５－２３；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅら（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１４６７０－６７５に記載されているような標準的な固相ペプチド合成プロトコールを使用して行われ得る。

【００８５】

ＢＡＦＦ－ＲのＰＮＡは、治療用途および診断用途において使用され得る。例えば、ＰＮＡは、例えば、転写または翻訳の停止を誘導するか、あるいは複製を阻害することによる遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子因子として使用され得る。ＢＡＦＦ－ＲのＰＮＡはまた、例えば、遺伝子中の単一の塩基対変異の分析においては、例えば、ＰＮＡ特異的ＰＣＲクランピングにおいて使用され得；他の酵素（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ（Ｈｙｒｕｐ Ｂ．（１９９６）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４：５－２３））と組合せて使用される場合には、人工的な制限酵素として使用され得；あるいは、ＤＮＡ配列決定およびハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーとして使用され得る（Ｈｙｒｕｐら（１９９６）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４：５－２３；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅ（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１４６７０－６７５）。

【００８６】

別の実施形態においては、ＢＡＦＦ－ＲのＰＮＡは、例えば、それらの安定性または細胞による取り込みを増進するために、ＰＮＡに親油性基または他のヘルパー基を付着させることによって、ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの形成によって、あるいは、リポソームまたは当該分野で公知の薬物送達のための技術の使用によって、改変され得る。例えば、ＰＮＡとＤＮＡとの有利な特性を組み合わせ得るＢＡＦＦ－ＲのＰＮＡ－ＤＮＡキメラが、作製され得る。このようなキメラは、ＤＮＡ認識酵素（例えば、ＲＮａｓｅ ＨおよびＤＮＡポリメラーゼ）がＤＮＡ部分と相互作用し、一方でＰＮＡ部分が高い結合親和性および特異性を提供することを可能にする。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラは、塩基スタッキング、ヌクレオ塩基間の結合数、および方向に関して選択された適切な長さのリンカーを使用して連結され得る（Ｈｙｒｕｐら（１９９６）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４：５－２３）。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの合成は、Ｈｙｒｕｐ（１９９６）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４：５－２３；およびＦｉｎｎら（１９９６）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２４：３３５７－６３に記載されているように行われ得る。例えば、ＤＮＡ鎖は、標準的なホスホルアミダイトカップリング化学を使用して固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ（例えば、５’－（４－メトキシトリチル）アミノ－５’－デオキシ－チミジンホスホルアミダイト）が、ＰＮＡとＤＮＡの５’末端との間で使用され得る（Ｍａｇら（１９８９）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１７：５９７３－８８）。次いで、ＰＮＡ単量体が、５’ＰＮＡセグメントと３’ＤＮＡセグメントとのキメラ分子を生成するために段階的にカップリングされる（Ｆｉｎｎら（１９９６）前出）。あるいは、５’ＤＮＡセグメントと３’ＰＮＡセグメントとのキメラ分子が、合成され得る。Ｐｅｔｅｒｓｅｎら（１９７５）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．５：１１１９１－１１１２４を参照のこと。

【００８７】

他の実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付属基（例えば、インビボでの宿主細胞レセプターの標的化のため）、または細胞膜を通過する輸送を促進する試薬（例えば、Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒら（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：６５５３－６５５６；Ｌｅｍａｉｔｒｅら（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：６４８－６５２；ＰＣＴ国際公開番号第ＷＯ８８／０９８１０号を参照のこと）、または血液－脳関門（例えば、ＰＣＴ国際公開番号第ＷＯ８９／１０１３４号を参照のこと）を含有し得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションを誘発する切断試薬（ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｔｒｉｇｇｅｒｅｄ ｃｌｅａｖａｇｅ ａｇｅｎｔ）（例えば、Ｋｒｏｌら（１９８８）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：９５８－９７６を参照のこと）またはインターカレート剤（例えば、Ｚｏｎ（１９８８）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．５：５３９

－５４９を参照のこと）を用いて改変され得る。最後に、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションを誘発する架橋剤（ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｔｒｉｇｇｅｒｅｄ ｃｒｏｓｓ－ｌｉｎｋｉｎｇ ａｇｅｎｔ）、輸送剤、ハイブリダイゼーションを誘発する切断試薬など）と連結され得る。

【００８８】

（ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド）

本発明の１つの局面は、単離されたＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログに関する。抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体を惹起するための免疫原としての使用に適切なポリペプチドフラグメントもまた提供される。１つの実施形態においては、天然のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用して適切な精製スキームによって細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、組換えＤＮＡ技術によって生成される。組換え発現の代替として、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して化学的に合成され得る。

【００８９】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質が由来する細胞または組織供給源から、細胞の材料または他の混入しているタンパク質を実質的に含まないか、あるいは、化学的に合成される場合には、化学的な前駆体または他の化合物を実質的に含まない。語句「細胞の材料を実質的に含まない」は、タンパク質が、そのタンパク質が単離されるかまたはそのタンパク質を組換え生成する細胞の細胞成分から分離されている、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の調製物を含む。１つの実施形態においては、語句「細胞の材料を実質的に含まない」は、約３０％未満（乾燥重量で）の非ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質（本明細書中では、「混入タンパク質」とも呼ばれる）を有している、より好ましくは、約２０％未満の非ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を有する、なおより好ましくは、約１０％未満の非ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を有する、そして最も好ましくは、約５％未満の非ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を有するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の調製物を含む。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合には、培養培地を実質的に含まない、すなわち、培養培地がタンパク質調製物の容量の約２０％未満、より好ましくは、約１０％未満、そして最も好ましくは、約５％未満を示すこともまた、好ましい。

【００９０】

語句「化学前駆体または他の化合物を実質的に含まない」は、タンパク質がタンパク質の合成に関係している化学前駆体または他の化合物から分離されている、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の調製物を含む。１つの実施形態においては、語句「化学的な前駆体または他の化合物を実質的に含まない」は、約３０％未満（乾燥重量で）の化学前駆体または非ＢＡＦＦ－Ｒ化合物を有する、より好ましくは、約２０％未満の化学前駆体または非ＢＡＦＦ－Ｒ化合物を有する、なおより好ましくは、約１０％未満の化学前駆体または非ＢＡＦＦ－Ｒ化合物を有する、そして最も好ましくは、約５％未満の化学前駆体または非ＢＡＦＦ－Ｒ化合物を有するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の調製物を含む。

【００９１】

ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の生物学的に活性な部分は、全長のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質よりも短いアミノ酸を含み、そしてＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の少なくとも１つの活性を示すＢＡＦＦ－Ｒタンパク質（例えば、配列番号５に示されるアミノ酸配列）のアミノ酸配列に対して十分に相同であるか、またはそのアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含有するペプチドを含む。典型的には、生物学的に

活性な部分は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の少なくとも１つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、１０、２５、５０、１００、またはそれより長いアミノ酸長のポリペプチドであり得る。

【００９２】

本発明のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の生物学的に活性な部分は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質間で保存されている、上記で同定されたドメインの少なくとも１つを含み得る。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の別の生物学的に活性な部分は、上記で同定されたドメインの少なくとも２つを含み得る。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の別の生物学的に活性な部分は、上記で同定されたドメインの少なくとも３個を含み得る。本発明のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のなお別の生物学的に活性な部分は、上記で同定されたドメインの少なくとも４個を含み得る。

【００９３】

さらに、タンパク質の他の領域が欠失した他の生物学的に活性な部分が、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブのＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の機能的活性の１つ以上について評価され得る。

【００９４】

１つの実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、図２Ｄ（配列番号５）に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、図２Ｄ（配列番号５）に対して実質的に相同であり、そして図２Ｄ（配列番号５）のタンパク質の機能的活性を保持しているが、以下に詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子のバリエーションまたは突然変異誘発に起因して、アミノ酸配列において異なる。従って、別の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、図２Ｄ（配列番号５）のアミノ酸に対して少なくとも約４５％相同であるアミノ酸配列を含み、そして図２Ｄ（配列番号５）のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の機能的な活性を保持するタンパク質である。

【００９５】

いくつかの実施形態においては、本発明は、ＢＡＦＦ結合活性を維持したまま発現されるタンパク質の凝集を緩和するように設計された、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドの特異的な変異体を含む。このような変異体には、例えば、ＪＳＴ６６１（配列番号１７）、ＪＳＴ６６２（配列番号１８）、ＪＳＴ６６３（配列番号１９）、ＪＳＴ６７３（配列番号２０）、ＪＳＴ６７４（配列番号２１）、ＪＳＴ６７５（配列番号２２）、ＪＳＴ６７２（配列番号２３）、ＪＳＴ６７６（配列番号２４）、ＪＳＴ６７１（配列番号２５）、ＪＳＴ６７７（配列番号２６）、およびＪＳＴ６７８（配列番号２７）のアミノ酸配列をコードするクローンが含まれる。他の実施形態には、ＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドをコードする変異体が含まれる。これは、ネイティブのヒトＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドの特徴と同様の凝集を有するが、これはまた、例えば、ＪＳＴ６５９（配列番号１５）、ＪＳＴ６６０（配列番号１６）、ＪＳＴ６６４（配列番号２８）、ＪＳＴ６６８（配列番号２９）、ＪＳＴ６６５（配列番号３０）、ＪＳＴ６６６（配列番号３１）、およびＪＳＴ６６７（配列番号３２）のアミノ酸配列を含有する配列を含むＢＡＦＦにも結合する。他の実施形態には、ＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドをコードする変異体が含まれる。ここで、ヒトＢＡＦＦ－ＲとマウスＢＡＦＦ－Ｒとの間で保存されたアミノ酸が、他の保存的アミノ酸に変化しており、そしてここで、ＢＡＦＦに対するＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドの結合活性は保持されている。他の実施形態においては、変異体は、他のアミノ酸に変化したヒトＢＡＦＦ－ＲとマウスＢＡＦＦ－Ｒとの間で保存されていないアミノ酸を有する、ＢＡＦＦ－ＲまたはＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドをコードする。好ましくは、非極性アミノ酸が、プロリン残基または非荷電極性アミノ酸に変化

している。
【００９６】
（２つ以上の配列間での相同性の決定）
２つのアミノ酸配列または２つの核酸の相同性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較の目的のために整列される（例えば、第２のアミノ酸または核酸配列との最適なアラインメントのために、第１のアミノ酸または核酸配列の配列中にギャップが導入され得る）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが、比較される。第１の配列中の位置が、第２の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有されている場合、分子はその位置で相同である（すなわち、本明細書中で使用する場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸「同一性」と等価である）。
【００９７】
核酸配列の相同性は、２つの配列間の同一性の程度として決定され得る。相同性は、当該分野で公知のコンピュータープログラム（例えば、ＧＣＧプログラムパッケージとして提供されているＧＡＰソフトウェア）を使用して決定され得る。ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ（１９７０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３を参照のこと。核酸配列の比較のための以下の設定（５．０のＧＡＰクリエーションペナルティーおよび０．３のＧＡＰエクステンションペナルティー）を用いてＧＣＧ　ＧＡＰソフトウェアを使用すると、上記のアナログ核酸配列のコード領域は、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、図３（配列番号６）に示されるＤＮＡ配列のＣＤＳ（コード）部分と、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％の好ましい程度の同一性を示す。
【００９８】
用語「配列同一性」は、２つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列が、特定の比較領域にわたって、残基毎の基準で同一である程度をいう。用語「配列同一性の割合」は、その比較領域にわたって最適に並べられた２つの配列を比較すること、同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合は、Ａ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、Ｕ、またはＩ）が両方の配列中に存在する位置の数を決定し、それによって一致する位置の数を得ること、比較領域中の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）によって一致した位置の数を除算すること、そして配列同一性の割合を得るために結果に１００を掛けることによって、計算される。用語「実質的な同一性」は、本明細書中で使用される場合には、ポリヌクレオチド配列の特徴を示す。ここでは、ポリヌクレオチドは、比較領域の全体について参照配列と比較した場合に、少なくとも８０％の配列同一性、好ましくは、少なくとも８５％の配列同一性、そしてしばしば、９０～９５％の配列同一性、より通常は、少なくとも９９％の配列同一性を有する配列を含む。
【００９９】
（キメラおよび融合タンパク質）
本発明はまた、ＢＡＦＦ－Ｒのキメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合には、ＢＡＦＦ－Ｒ「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドに対して作動可能に連結されたＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを含む。「ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド」は、ＢＡＦＦ－Ｒに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、一方、「非ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド」は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質と実質的に相同ではないタンパク質（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質とは異なり、そして同じまたは異なる生物体に由来するタンパク質）に対応しているアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。ＢＡＦＦ－Ｒ融合タンパク質中では、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の全体または一部に対応し得る。１つの実施形態においては

、ＢＡＦＦ－Ｒ融合タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の少なくとも１つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒ融合タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の少なくとも２つの生物学的に活性な部分を含む。なお別の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒ融合タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の少なくとも３個の生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質中では、用語「作動可能に連結された」は、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドおよび非ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドが、互いにインフレームで融合されていることを示すことが意図される。非ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドは、ＢＡＦＦ－ＲポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に融合され得る。非ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドは、例えば、抗体のＦｃ部分であり得る。これは、ＢＡＦＦ－ＲポリペプチドのＮ末端またはＣ末端のいずれかに作動可能に連結され得る。Ｆｃ標的タンパク質融合体は、Ｌｏら（１９９８）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｒｉｎｇ　１１：４９５－５００、ならびに米国特許第５，５４１，０８７号および同第５，７２６，０４４号に記載されている。その開示は、本明細書中で参考として援用される。

【０１００】

例えば、１つの実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒ融合タンパク質は、第２のタンパク質の細胞外ドメインに作動可能に連結されたＢＡＦＦ－Ｒドメインを含む。このような融合タンパク質はさらに、ＢＡＦＦ－Ｒ活性を調節する化合物のスクリーニングアッセイに利用され得る（このようなアッセイは、以下に詳細に記載される）。

【０１０１】

なお別の実施形態においては、融合タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒ配列がＧＳＴ（すなわち、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ）配列のＣ末端に融合されている、ＧＳＴ－ＢＡＦＦ－Ｒ融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、組換えＢＡＦＦ－Ｒの精製を容易にし得る。

【０１０２】

別の実施形態においては、融合タンパク質は、そのＮ末端に異種シグナル配列を含むＢＡＦＦ－Ｒタンパク質である。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒはそれ自身のシグナル配列を含まないので、異種シグナル配列が、ＢＡＦＦ－Ｒ融合タンパク質の十分な分泌のために、ＢＡＦＦ－Ｒコード配列の５’末端に融合されなければならない。ＢＡＦＦ－Ｒの発現および／または分泌は、異なる異種シグナル配列の使用を通じて増大され得る。

【０１０３】

なお別の実施形態においては、融合タンパク質は、１つ以上のドメインを含有しているＢＡＦＦ－Ｒ配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合された、ＢＡＦＦ－Ｒ－免疫グロブリン融合タンパク質である。本発明のＢＡＦＦ－Ｒ－免疫グロブリン融合タンパク質は薬学的組成物中に取り込まれ得、そして細胞表面上でのＢＡＦＦ－ＲリガンドとＢＡＦＦ－Ｒタンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボでのＢＡＦＦ－Ｒ媒介性のシグナル伝達を抑制するために、被験体に投与され得る。ＢＡＦＦ－Ｒ－免疫グロブリン融合タンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒの同族リガンドの生体利用可能性に影響を与えるように使用され得る。ＢＡＦＦ－Ｒリガンド／ＢＡＦＦ－Ｒの相互作用の阻害は、増殖性障害および分化の障害の両方の処置、ならびに細胞生存性の調節（例えば、促進または阻害）のために治療的に有用であり得る。さらに、本発明のＢＡＦＦ－Ｒ－免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中での抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体の産生、ＢＡＦＦ－Ｒリガンドの精製のために、およびＢＡＦＦ－ＲリガンドとＢＡＦＦ－Ｒとの相互作用を阻害する分子を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて、免疫原として使用され得る。

【０１０４】

本発明のＢＡＦＦ－Ｒキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えＤＮＡ

技術によって産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするＤＮＡフラグメントは、従来技術に従って（例えば、連結のための平滑末端または突出末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合には粘着末端のフィルイン、所望されない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素連結によって）、互いにインフレームで連結される。別の実施形態においては、融合遺伝子は、自動ＤＮＡ合成装置を含む従来技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅は、２つの連続する遺伝子フラグメント間の突出部に相補性を生じるアンカープライマーを使用して実施され得る。その後、キメラ遺伝子配列を作成するためのアニーリングおよび再増幅され得る（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら編、ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、１９９２を参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、ＧＳＴポリペプチド）をすでにコードする多くの発現ベクターが市販されている。ＢＡＦＦ－Ｒをコードする核酸はこのような発現ベクター中にクローン化され得、その結果、融合部分がＢＡＦＦ－Ｒタンパク質にインフレームで連結される。

【０１０５】

好ましい実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒ融合体が、図９の核酸（配列番号１１）およびアミノ酸（配列番号１２）配列によって提供される。

【０１０６】

（ＢＡＦＦ－Ｒアゴニストおよびアンタゴニスト）

本発明はまた、ＢＡＦＦ－Ｒアゴニスト（模倣物）またはＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニストのいずれかとして機能する、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の変異体にも関する。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の改変体は、突然変異誘発（例えば、別個の点変異またはＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の短縮型）によって作製され得る。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のアゴニストは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同じものを保持し得るか、またはそのサブセットを保持し得る。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のアンタゴニストは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の天然に存在する形態の１つ以上の活性を、例えば、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流のメンバーに競合して結合することによって阻害し得る。このように、特異的な生物学的作用は、限定された作用を有する改変体による処置によって誘発され得る。１つの実施形態においては、天然に存在する形態のタンパク質の生物学的活性のサブセットを有する改変体による被験体の処置は、天然に存在する形態のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質による処置と比較して、被験体における副作用が少ない。

【０１０７】

ＢＡＦＦ－Ｒアゴニスト（模倣物）またはＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニストのいずれかとして作用するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の変異体は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の変異体（例えば、短縮変異体）のコンビナトリアルライブラリーを、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって同定され得る。１つの実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒ変異体の多彩なライブラリーは、核酸レベルでの組合せ突然変異誘発によって作製され、そしてこれは、多彩な遺伝子ライブラリーによってコードされる。ＢＡＦＦ－Ｒ改変体の多彩なライブラリーは、例えば、遺伝子配列中に合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素によって連結することによって生成され得る。その結果、潜在的なＢＡＦＦ－Ｒ配列の縮重セットは、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にＢＡＦＦ－Ｒ配列のセットを含むより大きな融合タンパク質のセット（例えば、ファージディスプレイのために）として発現可能である。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なＢＡＦＦ－Ｒ改変体のライブラリーを生成するために使用され得る種々の方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動ＤＮＡ合成装置中で行われ得、次いで、合成遺伝子が適切な発現ベクター中に連

結される。遺伝子の縮重セットの使用は、可能性のあるＢＡＦＦ－Ｒ配列の所望されるセットをコードする配列の全てを１つの混合物中に提供することを可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当該分野で公知である（例えば、Ｎａｒａｎｇ（１９８３）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ３９：３；Ｉｔａｋｕｒａら（１９８４）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５３：３２３；Ｉｔａｋｕｒａら（１９７７）Ｓｃｉｅｎｃｅ １９８：１０５６－１０６３；Ｉｋｅら（１９８３）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１１：４７７－４８８を参照のこと）。

【０１０８】

（ポリペプチドライブラリー）

さらに、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする配列のフラグメントのライブラリーは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の改変体のスクリーニングおよびその後の選択のためのＢＡＦＦ－Ｒフラグメントの多彩な集団を作製するために、使用され得る。１つの実施形態においては、コード配列のフラグメントのライブラリーは、ニッキングが１分子あたり約１回だけ生じる条件下でヌクレアーゼを用いてＢＡＦＦ－Ｒをコードする配列の２本鎖のＰＣＲフラグメントを処理し、２本鎖のＤＮＡを変性し、異なるニック産物由来のセンス／アンチセンス対を含み得る２本鎖のＤＮＡを形成するようにＤＮＡを再生（ｒｅｎａｔｕｒｅ）させ、Ｓ１ヌクレアーゼ処理によって再形成された２本鎖から１本鎖部分を除去し、そして得られたフラグメントのライブラリーを発現ベクター中に連結することによって作製され得る。この方法によって、Ｎ末端、および種々の大きさのＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の内部フラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導し得る。

【０１０９】

点変異または短縮によって作製されるコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、および選択された特性を有する遺伝子産物のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術が、当該分野で公知である。このような技術は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の組合せ突然変異誘発によって作成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適合可能である。大きな遺伝子ライブラリーのスクリーニングのための最も広く使用される、高スループット分析が可能な技術には、典型的には、複製可能な発現ベクター中への遺伝子ライブラリーのクローニング、得られたベクターのライブラリーによる適切な細胞の形質転換、および所望される活性の検出が検出される産物の遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現させることが含まれる。自己調和変異誘発（Ｒｅｃｒｕｓｉｖｅ ｅｎｓｅｍｂｌｅ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）（ＲＥＭ）、ライブラリー中の機能的な変異体の頻度を増大させる新しい技術は、ＢＡＦＦ－Ｒ変異体を同定するためのスクリーニングアッセイと組合せて使用され得る（ＡｒｋｉｎおよびＹｏｕｒｖａｎ（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：７８１１－７８１５；Ｄｅｌｇｒａｖｅら（１９９３）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ６：３２７－３３１）。

【０１１０】

（抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体）

単離されたＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、またはその一部もしくはフラグメントは、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製のための標準的な技術を使用して、ＢＡＦＦ－Ｒに結合する抗体を作製するための免疫原として使用され得る。全長のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質が使用され得るか、あるいは、本発明は、免疫原として使用するために、ＢＡＦＦ－Ｒの抗原性ペプチドフラグメントを提供する。ＢＡＦＦ－Ｒの抗原性ペプチドは、図２Ｄ（配列番号５）に示されるアミノ酸配列の少なくとも８つのアミノ酸残基を含み、そしてＢＡＦＦ－Ｒのエピトープを含有する。その結果、このペプチドに対して惹起された抗体は、ＢＡＦＦ－

Ｒとの特異的な免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも１０個のアミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも１５個のアミノ酸残基、なおより好ましくは、少なくとも２０個のアミノ酸残基、そして最も好ましくは、少なくとも３０個のアミノ酸残基を含む。好ましくは、抗原性ペプチドに含まれるエピトープは、タンパク質表面に存在するＢＡＦＦ－Ｒの領域（例えば、親水性領域）である。

本明細書中で開示されるように、図２Ｄ（配列番号５）のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログは、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の作製において免疫原として利用され得る。用語「抗体」は、本明細書中で使用される場合には、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、抗原に特異的に結合する（それと免疫反応する）抗原結合部位を含む分子（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ））をいう。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント、ならびにＦａｂ発現ライブラリーが含まれるが、これらに限定されない。特異的な実施形態においては、ヒトＢＡＦＦ－Ｒタンパク質に対する抗体が開示される。当該分野で公知の種々の手順が、図２Ｄ（配列番号５）のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生に使用され得る。これらのタンパク質のいくつかは、以下で議論される。

【０１１１】

ポリクローナル抗体の産生のためには、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物）が、天然のタンパク質、またはその合成改変体、または上記の誘導体の注射によって免疫され得る。適切な免疫原性調製物には、例えば、組換え発現されたＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、または化学的に合成されたＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドが含まれ得る。調製物はさらに、アジュバントを含み得る。免疫学的応答を増大させるために使用される種々のアジュバントとして、以下が挙げられるがこれらに限定されない：フロイトの（完全なおよび不完全な）アジュバント、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性剤（例えば、リソレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノールなど）、ヒトアジュバント（例えば、カルメット－ゲラン杆菌（ＢＣＧ）およびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍ）、または同様の免疫賦活剤。所望される場合には、ＢＡＦＦ－Ｒに対して指向された抗体分子が哺乳動物から（例えば、血液から）単離され得、そしてさらに、ＩｇＧ画分を得るためのプロテインＡクロマトグラフィーのような、周知の技術によって精製され得る。

【０１１２】

用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、本明細書中で使用される場合には、ＢＡＦＦ－Ｒの特定のエピトープと免疫反応することが可能な抗原結合部位の１つの種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、モノクローナル抗体組成物は、典型的には、特定のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質に対する単一の結合親和性を示し、免疫反応する。特定のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログに対して指向されたモノクローナル抗体の調製のためには、連続的な細胞株の培養によって抗体分子の産生を提供する任意の技術が利用され得る。このような技術には、ハイブリドーマ技術（ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５－４９７を参照のこと）；トリオーマ技術；ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂｏｒら（１９８３）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ　４：７２を参照のこと）、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのＥＢＶハ

イブリドーマ技術（Ｃｏｌｅら、ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ　ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ　ＡＮＤ　ＣＡＮＣＥＲ　ＴＨＥＲＡＰＹ、Ａｌａｎ　Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８５、７７－９６頁を参照のこと）が含まれるが、これらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施において利用され得、そしてヒトハイブリドーマを使用することによって（Ｃｏｔｅら（１９８３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８０：２０２６－２０３０）またはエプスタインバーウイルスを用いてインビトロでヒトＢ細胞を形質転換することによって（Ｃｏｌｅら、ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ　ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ　ＡＮＤ　ＣＡＮＣＥＲ　ＴＨＥＲＡＰＹ、Ａｌａｎ　Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８５、７７－９６頁を参照のこと）産生され得る。

【０１１３】

本発明に従って、技術は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質に特異的な単鎖抗体の産生に適合させられ得る（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号を参照のこと）。さらに、方法は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログについて所望される特異性を有するモノクローナルＦａｂフラグメントの迅速でありそして効率的な同定を可能にするための、Ｆａｂ発現ライブラリーの構築（例えば、Ｈｕｓｅら（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４６：１２７５－１２８１を参照のこと）に適合させられ得る。ヒト以外の抗体は、当該分野で周知の技術によって「ヒト化」され得る。例えば、米国特許第５，２２５，５３９号を参照のこと。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントが、以下を含むがこれに限定されない当該分野で公知の技術によって産生され得る：（ｉ）抗体分子のペプシン消化によって産生されたＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって作成されたＦａｂフラグメント；（ｉｉｉ）パパインおよび還元剤での抗体分子の処理によって作成されたＦａｂフラグメント；ならびに（ｉｖ）Ｆｖフラグメント。

【０１１４】

さらに、標準的な組換えＤＮＡ技術を使用して作成され得る、ヒトおよびヒト以外の部分の両方を含有している組換え抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体（例えば、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体）は、本発明の範囲内である。このようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えＤＮＡ技術によって、例えば、以下に記載されている方法を使用して、産生され得る：ＰＣＴ国際出願番号第ＰＣＴ／ＵＳ８６／０２２６９号；欧州特許出願番号第１８４，１８７号；欧州特許出願番号第１７１，４９６号；欧州特許出願番号第１７３，４９４号；ＰＣＴ国際公開番号第ＷＯ８６／０１５３３号；米国特許第４，８１６，５６７号；欧州特許出願番号第１２５，０２３号；Ｂｅｔｔｅｒら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４０：１０４１－１０４３；Ｌｉｕら（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４：３４３９－３４４３；Ｌｉｕら（１９８７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９：３５２１－３５２６；Ｓｕｎら（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４：２１４－２１８；Ｎｉｓｈｉｍｕｒａら（１９８７）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４７：９９９－１００５；Ｗｏｏｄら、（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ　３１４：４４６－４４９；Ｓｈａｗら（１９８８）Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．８０：１５５３－１５５９；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２－１２０７；Ｏｉら（１９８６）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４；米国特許第５，２２５，５３９号；Ｊｏｎｅｓら（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５５２－５２５；Ｖｅｒｈｏｅｙａｎら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４；およびＢｅｉｄｌｅｒら（１９８８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４１：４０５３－４０６０。

【０１１５】

１つの実施形態において、所望される特異性を有している抗体のスクリーニングのための方法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）および当該分野で公知の他の免疫学的に媒介される技術が含まれるが、これらに限定されない。特異的な実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の特定のドメインに特異的な抗体の選択は、このようなドメインを保有しているＢＡＦＦ－Ｒファミリーのタンパク質のフラグメントに結合するハイブリドーマの作成によって容易になる。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質中の１つ以上のドメイン（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、その誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログの上記で同定された保存されている領域にまたがるドメイン）に特異的な抗体もまた、本明細書中で提供される。

【０１１６】

抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の局在化および／または定量（例えば、適切な生理学的サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のレベルの測定における使用のため。診断方法における使用のため、タンパク質の画像化における使用のためなど）に関係している当該分野で公知の方法において使用され得る。所定の実施形態においては、抗体由来の結合ドメインを含む、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、その誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログについての抗体は、薬理学的に活性な化合物（本明細書中以後、「治療薬」）として利用される。

【０１１７】

抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準的な技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降）によって、ＢＡＦＦ－Ｒを単離するために使用され得る。抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体は、細胞由来の天然のＢＡＦＦ－Ｒ、および宿主細胞中で発現された組換え産生されたＢＡＦＦ－Ｒの精製を容易にすることができる。さらに、抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の発現量およびパターンを評価するために、（例えば、細胞溶解物または細胞上清中の）ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を検出するために使用され得る。抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体は、例えば、所定の所持レジメの効率を決定するために、臨床試験手順の一部として組織中のタンパク質レベルをモニターするために診断的に使用され得る。検出は、検出可能な基質への抗体のカップリング（すなわち、物理的な連結）によって容易にされ得る。検出可能な基質の例には、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、および放射活性物質が含まれる。適切な酵素の例には、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含まれる；適切な補欠分子団複合体の例には、ストレプトアビジン／ビオチン、およびアビジン／ビオチンが含まれる；適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフィコエリスリンが含まれる；発光物質の例には、ルミノールが含まれる；生体発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる；そして、適切な放射活性物質の例には、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、または^{3}Ｈが含まれる。

【０１１８】

（ＢＡＦＦ－Ｒ組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする核酸を含有しているベクター（好ましくは、発現ベクター）に関する。本明細書中で使用される場合には、用語「ベクター」は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子をいう。ベクターの１つの型は「プラスミド」であり、これは、さらなるＤＮＡセグメントがその中に連結され得る環状の２本鎖のＤＮＡループをいう。ベクターの別の型はウイルスベクターであり、ここでは、さらなるＤＮＡセグメント

がウイルスゲノム中に連結され得る。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自律複製し得る（例えば、細菌の複製起点を有している細菌ベクター、およびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」と呼ばれる。一般には、組換えＤＮＡ技術において有用である発現ベクターは、たいてい、プラスミドの形態である。本明細書中では、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるので、互換的に使用され得る。しかし、本発明は、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）のような同等の機能を示す発現ベクターのこのような他の形態を含むように意図される。

【０１１９】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中の核酸の発現に適切な形態で、本発明の核酸を含む。これは、組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択される１つ以上の調節配列（これは、発現される核酸配列に作動可能に連結される）を含むことを意味する。組換え発現ベクター中で「作動可能に連結される」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現（例えば、インビトロの転写／翻訳システム中で、またはベクターが宿主細胞に導入される場合には宿主細胞中で）を可能にする様式で調節配列に連結されることを意味するように意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むように意図される。このような調節配列は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ「Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．，１９９０に記載されている。調節配列には、多くの型の宿主細胞中でヌクレオチド配列の構成的な発現を指向するもの、および特定の宿主細胞中でのみヌクレオチド配列の発現を指向するもの（例えば、組織特異的調節配列）が含まれる。発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現レベルなどの因子に依存し得ることが、当業者に明らかである。本発明の発現ベクターは、宿主細胞中に導入され得、それによって、本明細書中に記載されているような核酸によってコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質またはペプチドを含む）（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、ＢＡＦＦ－Ｒの変異体タンパク質、融合タンパク質など）を産生する。

【０１２０】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞中でのＢＡＦＦ－Ｒの発現のために設計され得る。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒは、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｉａ ｃｏｌｉのような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用する）、酵母細胞、または哺乳動物細胞中で発現され得る。適切な宿主細胞はさらに、Ｇｏｅｄｄｅｌ「Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．，１９９０において議論されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、Ｔ７プロモーター調節配列およびＴ７ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写されそして翻訳され得る。

【０１２１】

原核生物中でのタンパク質の発現は、最も頻繁には、Ｅ．ｃｏｌｉ中で、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する、構成性または誘導性プロモーターを含有しているベクターを用いて、行われる。融合ベクター

は、その中のコードされるタンパク質に対して（通常は、組換えタンパク質のアミノ末端に対して）多数のアミノ酸を付加させる。このような融合ベクターは、典型的には、３個の目的を提供する：（１）組換えタンパク質の発現を増大させること；（２）組換えタンパク質の可溶性を増大させること；および（３）親和性精製においてリガンドとして作用することによって、組換えタンパク質の精製を補助すること。融合発現ベクターにおいては、たいてい、融合部分から組換えタンパク質の分離、続く融合タンパク質の精製を可能にするために、タンパク質分解切断部位が、融合部分と組換えタンパク質の連結部に導入される。このような酵素、およびそれらの同性質の認識配列には、第Ｘａ因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼが含まれる。典型的な融合発現ベクターには、ｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ；ＳｍｉｔｈおよびＪｏｈｎｓｏｎ（１９８８）Ｇｅｎｅ ６７：３１－４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｂｅｖｅｒｌｙ，Ｍａｓｓ）、およびｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）が含まれる。これらはそれぞれ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはプロテインＡを標的組換えタンパク質に融合する。

【０１２２】

適切な誘導性の非融合Ｅ．ｃｏｌｉ発現ベクターの例には、ｐＴｒｃ（Ａｍｒａｎｎら（１９８８）Ｇｅｎｅ ６９：３０１－３１５）およびｐＥＴ １１ｄ（Ｓｔｕｄｉｅｒら、「Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．，１９９０、６０－８９頁）が含まれる。

【０１２３】

Ｅ．ｃｏｌｉ中での組換えタンパク質の発現を最大にするための１つの方法論は、組換えタンパク質をタンパク質溶解によって切断する能力を損傷している宿主細菌中でタンパク質を発現させることである。Ｇｏｔｔｅｓｍａｎ、「Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」、ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．，１９９０、１１９－１２８頁を参照のこと。別の方法論は、それぞれのアミノ酸についての個々のコドンが、Ｅ．ｃｏｌｉ中で優先的に利用されるものになるように、発現ベクター中に挿入される核酸の核酸配列を変更することである（Ｗａｄａら、（１９９２）、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２０：２１１１－２１１８）。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なＤＮＡ合成技術によって行うことができる。

【０１２４】

別の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒ発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中での発現のためのベクターの例には、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Ｂａｌｄａｒｉら、（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：２２９－２３４）、ｐＭＦａ（ＫｕｒｊａｎおよびＨｅｒｓｋｏｗｉｔｚ（１９８２）Ｃｅｌｌ ３０：９３３－９４３）、ｐＪＲＹ８８（Ｓｃｈｕｌｔｚら（１９８７）Ｇｅｎｅ ５４：１１３－１２３）、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）が含まれ、そしてＰ．ｐａｓｔｏｒｉｓについては、ｐＰＩＣファミリーのベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃｏｒｐ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）が含まれる。

【０１２５】

あるいは、ＢＡＦＦ－Ｒは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して昆虫細胞中で発現され得る。培養された昆虫細胞（例えば、ＳＦ９細胞）中でのタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、ｐＡｃシリーズ

（Ｓｍｉｔｈら（１９８３）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２１５６－２１６５）およびｐＶＬシリーズ（ＬｕｃｋｌｏｗおよびＳｕｍｍｅｒｓ（１９８９）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１７０：３１－３９）が含まれる。

【０１２６】

なお別の実施形態においては、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ　３２９：８４０－８４２）およびｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎら（１９８７）ＥＭＢＯ　Ｊ．６：１８７－１９５）が含まれる。哺乳動物細胞中で使用される場合には、発現ベクターの制御機能は、たいてい、ウイルス調節エレメントによって提供される。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス４０に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方に適切な他の発現システムについては、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら編、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ　ＭＡＮＵＡＬ、第２版、第１６章および第１７章，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．，１９８９を参照のこと。

【０１２７】

別の実施形態においては、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指向し得る（例えば、組織特異的調節エレメントが、核酸を発現させるために使用される）。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの限定的ではない例には、以下が含まれる：アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Ｐｉｎｋｅｒｔら（１９８７）Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ球系特異的プロモーター（ＣａｌａｍｅおよびＥａｔｏｎ（１９８８）Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、Ｔ細胞レセプターの特定のプロモーター（ＷｉｎｏｔｏおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ（１９８９）ＥＭＢＯ　Ｊ．８：７２９－７３３）、および免疫グロブリン（Ｂａｎｅｒｊｉら（１９８３）Ｃｅｌｌ　３３：７２９－７４０；ＷｕｅｅｎおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ（１９８３）Ｃｅｌｌ　３３：７４１－７４８）、ニューロン特異的プロモーター（例えば、神経繊維プロモーター；ＢｙｒｎｅおよびＲｕｄｄｌｅ（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄら（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３０：９１２－９１６）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター；米国特許第４，８７３，３１６号、および欧州特許出願公開番号第２６４，１６６号）。発達によって調節されるプロモーター（例えば、マウスｈｏｘプロモーター（ＫｅｓｓｅｌおよびＧｒｕｓｓ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９：３７４－３７９）およびα－フェトプロテインプロモーター（ＣａｍｐｅｓおよびＴｉｌｇｈｍａｎ（１９８９）Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．３：５３７－５４６））もまた、含まれる。

【０１２８】

本発明は、さらに、アンチセンス方向で発現ベクター中にクローン化された本発明のＤＮＡ分子を含有している、組換え発現ベクターを提供する。すなわち、ＤＮＡ分子は、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡに対してアンチセンスであるＲＮＡ分子の発現（ＤＮＡ分子の転写による）を可能にする様式で、調節配列に対して作動可能に連結される。種々の細胞型中でのアンチセンスＲＮＡ分子の持続的な発現を指向する、アンチセンス方向でクローン化された核酸に対して作動可能に連結された調節配列（例えば、ウイルスプロモーターおよび／またはエンハンサー）が選択され得るか、あるいは、アンチセンスＲＮＡの構成的、組織特異的、または細胞型特異的発現を指向する調節配列が、選択され得る。アンチセンス発現ベ

クターは、組換えプラスミド、ファージミド、またはアンチセンス核酸が高効率の調節領域の制御下で産生される弱毒化ウイルスの形態であり得る。その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂら（１９８６）「Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ＲＮＡ ａｓ ａ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓ」、Ｒｅｖｉｅｗ－－Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｒｉｃｓ，１（１）を参照のこと。

【０１２９】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入されている宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中では互換的に使用される。このような用語が、特定の被検細胞のみをいうのではなく、このような細胞の子孫または可能性のある子孫をもまたいうことが理解される。特定の改変は、変異または環境のいずれかの影響に起因して良好な発生を生じ得るので、このような子孫が、実際には、親細胞と同一ではない場合があるが、なお本明細書中で使用される場合には、この用語の範囲内に含まれる。

【０１３０】

宿主細胞は、原核生物細胞または真核生物細胞のいずれかであり得る。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉ、昆虫細胞、酵母、または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）またはＣＯＳ細胞）中で発現させられ得る。他の適切な宿主細胞が、当業者に公知である。

【０１３１】

ベクターＤＮＡは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を通じて、原核生物細胞または真核生物細胞中に導入され得る。本明細書中で使用される場合には、「形質転換」および「トランスフェクション」は、宿主細胞中に外来核酸（例えば、ＤＮＡ）を導入するための種々の当該分野で認識されている技術をいうように意図される。これには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするために適切な方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ、第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．，１９８９、および他の研究室用マニュアルに見ることができる。

【０１３２】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションのためには、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞の小さい画分のみが、それらのゲノム中に外来ＤＮＡを組み込む場合がある。これらの組み込み体を同定しそして選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性）をコードする遺伝子が、一般的には、目的の遺伝子とともに宿主細胞中に導入される。種々の選択マーカーには、薬物（例えば、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、およびメトトレキセート）に対する耐性を付与するマーカーが含まれる。選択マーカーをコードする核酸が、ＢＡＦＦ－Ｒをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞中に導入され得るか、または別のベクター上で導入され得る。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択マーカーを取り込んだ細胞は生存しているが、他の細胞は死滅する）。

【０１３３】

本発明の宿主細胞（例えば、培養物中の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞）は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を産生（すなわち、発現）するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用してＢＡＦＦ－Ｒタ

ンパク質を産生するための方法を提供する。１つの実施形態においては、この方法は、本発明の宿主細胞（ＢＡＦＦ－Ｒをコードする組換え発現ベクターがその中に導入されている）を適切な培地中で培養する工程を包含する。その結果、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質が産生される。別の実施形態においては、この方法は、培地または宿主細胞からＢＡＦＦ－Ｒを単離する工程をさらに包含する。

【０１３４】

（トランスジェニック動物）

本発明の宿主細胞は、ヒト以外のトランスジェニック動物を産生するためにもまた使用され得る。例えば、１つの実施形態においては、本発明の宿主細胞は、その中にＢＡＦＦ－Ｒをコードする配列が導入されている受精可能な卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような細胞は、外因性のＢＡＦＦ－Ｒ配列がそれらのゲノム中に導入されているヒト以外のトランスジェニック動物、または内因性のＢＡＦＦ－Ｒ配列が変更させられている相同組換え動物を作成するために、使用され得る。このような動物は、ＢＡＦＦ－Ｒの機能および／または活性を研究するため、ならびに、ＢＡＦＦ－Ｒ活性の調節因子を同定および／または評価するために、有用である。本明細書中で使用される場合には、「トランスジェニック動物」は、ヒト以外の動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラット、マウスのようなげっ歯類である。ここでは、１つ以上の動物細胞が導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、ヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが含まれる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物がそれから発生する細胞のゲノム中に組み込まれ、そして成熟した動物のゲノム中に留まり、それによってトランスジェニック動物の１つ以上の細胞型または組織中でのコードされる遺伝子産物の発現を指向する、外因性のＤＮＡである。本明細書中で使用される場合には、「相同組換え動物」は、ヒト以外の動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはマウスである。ここでは、内因性のＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子は、内因性遺伝子と、動物の発生の前に動物の細胞（例えば、動物の胚性細胞）中に導入された外因性のＤＮＡ分子との間での相同組換えによって変更されている。

【０１３５】

本発明のトランスジェニック動物は、ＢＡＦＦ－Ｒをコードする核酸を受精可能な卵母細胞の雄性前核に導入することによって（例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって）作成され得、そしてこれによって偽妊娠させた雌性育成動物中での卵母細胞を発育させる。図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のヒトＢＡＦＦ－Ｒ　ＤＮＡ配列が、ヒト以外の動物のゲノム中に導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子のヒト以外のホモログ（例えば、マウスのＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子（図４Ａ）（配列番号８））が、ヒトＢＡＦＦ－Ｒ　ｃＤＮＡに対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得（上記にさらに記載されている）、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた、導入遺伝子の発現効率を増大させるために導入遺伝子中に含まれ得る。組織特異的調節配列は、特定の細胞に対してＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の発現を指向させるために、ＢＡＦＦ－Ｒ導入遺伝子に対して作動可能に連結され得る。胚の操作およびマイクロインジェクションを通じてトランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を作成するための方法は、当該分野で通常となっており、そして例えば、米国特許第４，７３６，８６６号；同第４，８７０，００９号；および同第４，８７３，１９１号；ならびにＨｏｇａｎ、ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＮＧ　ＴＨＥ　ＭＯＵＳＥ　ＥＮＢＲＹＯ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８６に記載されている。同様の方法が、他のトランスジェニック動物の産生のために使用される。トランスジェニックが確立された

（ｆｏｕｎｄｅｒ）動物が、動物の組織または細胞中でのそのゲノム中のＢＡＦＦ－Ｒ導入遺伝子の存在および／またはＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニックが確立された動物は、導入遺伝子を保有しているさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、ＢＡＦＦ－Ｒをコードする導入遺伝子を保有しているトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を保有している他のトランスジェニック動物と交配させられ得る。

【０１３６】

相同組換え動物を作成するために、それによってＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子を変更する（例えば、機能を破壊する）ためにその中に欠失、付加、または置換が導入されているＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の少なくとも一部を含むベクターが、調製される。ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子は、ヒト遺伝子（例えば、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、図３（配列番号６）であり得るが、より好ましくは、ヒトＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子のヒト以外のホモログである。例えば、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｃ（配列番号４）、図３（配列番号６）のヒトＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子のマウスホモログ（図４ａ）が、マウスのゲノム中の内因性のＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子を変更するために適切な相同組換えベクターを構築するために、使用され得る。１つの実施形態においては、ベクターは、相同組換えの際に、内因性のＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子が機能的に破壊される（すなわち、もはや機能的なタンパク質はコードしない；「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる）ように、設計される。

【０１３７】

あるいは、ベクターは、相同組換えの際に、内因性のＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子が変異させられるか、または他の方法で変更されるが、なお機能的タンパク質をコードするように、設計され得る（例えば、上流の調節領域が、それによって内因性のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の発現を変更するように変更させられ得る）。相同組換えベクターにおいては、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の変更させられた部分は、ベクターによって保有される外因性のＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子と胚性幹細胞中の内因性のＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子との間で相同組換えが生じるように、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子のさらなる核酸によってその５’および３’末端に隣接している。さらなる隣接しているＢＡＦＦ－Ｒ核酸は、内因性の遺伝子との良好な相同組換えのために十分な長さである。典型的には、数キロ塩基の隣接しているＤＮＡ（５’および３’末端の両方）がベクター中に含まれる。相同組換えベクターの記載については、例えば、Ｔｈｏｍａｓら（１９８７）Ｃｅｌｌ　５１：５０３を参照のこと。ベクターは、胚性幹細胞株中に（例えば、エレクトロポレーションによって）導入され、そして導入されたＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子が内因性のＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子と相同組換えされた細胞が選択される（例えば、Ｌｉら（１９９２）Ｃｅｌｌ　６９：９１５を参照のこと）。

【０１３８】

次いで、選択された細胞は、キメラの凝集を形成するように動物（例えば、マウス）の芽細胞に注入される。例えば、Ｂｒａｄｌｅｙ、ＴＥＲＡＴＯＣＡＲＣＩＮＯＭＡＳ　ＡＮＤ　ＥＭＢＲＹＯＮＩＣ　ＳＴＥＭ　ＣＥＬＬＳ：Ａ　ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ　ＡＰＰＲＯＡＣＨ、Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ編、ＩＲＬ、Ｏｘｆｏｒｄ，１９８７、１３３－１５２頁を参照のこと。キメラ胚は、次いで、適切な偽妊娠させた雌性育成動物中に移植され、そして胚はそれに従わされる。相同組換えされたＤＮＡをそれらの生殖細胞中に保有している子孫は、動物の全ての細胞が導入遺伝子の生殖系伝達（ｇｅｒｍｌｉｎｅ　ｔｒａｎｓｍｉｓｓｉｏｎ）によって相同組換えされたＤＮＡを含む動物を繁殖させるために、使用され得る。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法は、さらに、Ｂｒａｄｌｅｙ（１９９１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２：８２３－８２９；ＰＣＴ国際公開番号第ＷＯ９０／１１３５４号；同第ＷＯ９１

／０１１４０号；第ＷＯ９２／０９６８号；および第ＷＯ９３／０４１６９号に記載されている。

【０１３９】

別の実施形態においては、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択されたシステムを含むトランスジェニックのヒト以外の動物が、産生され得る。このようなシステムの１つの例は、バクテリオファージＰ１のｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼシステムである。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼシステムの記載については、例えば、Ｌａｋｓｏら（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：６２３２－６２３６を参照のこと。リコンビナーゼシステムの別の例は、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのＦＬＰリコンビナーゼシステム（Ｏ’Ｇｏｒｍａｎら（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：１３５１－１３５５）である。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼシステムが導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合には、Ｃｒｅリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含有している動物が、必要である。このような動物は、「二重」トランスジェニック動物の構築を通じて、例えば、２つのトランスジェニック動物（一方は選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を含有し、そして他方はリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含有する）を交配させることによって提供され得る。

【０１４０】

本明細書中に記載されているヒト以外のトランスジェニック動物のクローンもまた、Ｗｉｌｍｕｔら（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ ３８５：８１０－８１３に記載されている方法に従って産生され得る。簡潔には、トランスジェニック動物に由来する細胞（例えば、体細胞）が単離され得、そして増殖周期を脱出し、そしてＧ$_0$期に入るように誘導される。次いで、静止状態の細胞は、例えば、電気的パルスの使用を通じて、休止期の細胞が単離された同じ種の動物に由来する核を取り除かれた（ｅｎｕｃｌｅａｔｅｒ）卵母細胞に対して融合され得る。次いで、再構築された卵母細胞は、それが桑実胚または芽細胞を生じるように培養され、次いで偽妊娠させた雌性の育成動物に移される。この雌性の育成動物の誕生した子孫は、細胞（例えば、体細胞）が単離された動物のクローンである。

【０１４１】

（薬学的組成物）

本発明のＢＡＦＦ－Ｒ核酸分子、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、および抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体（本明細書中では「活性化合物」とも呼ばれる）、およびそれらの誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログは、投与に適切な薬学的組成物中に取り込まれ得る。このような組成物は、典型的には、核酸分子、タンパク質、または抗体、および薬学的に需要可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合には、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与に適合する、溶媒、分散媒体、コーティング、抗生物質、抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などのいずれかまたは全てを含むように意図される。適切なキャリアは、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓの最新版、当該分野での標準的な参照テキストに記載されている。これらは本明細書中で参考として援用されている。このようなキャリアまたは希釈剤の好ましい例には、水、生理食塩水、リンガー（ｆｉｎｇｅｒ’ｓ）溶液、デキストロース溶液、および５％のヒト血清アルブミンが含まれるが、これらに限定されない。リポソーム、および不揮発性油のような非水性のビヒクルもまた、使用され得る。薬学的に活性な物質についてのこのような媒体および試薬の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または試薬が活性な化合物と非適合性である場合を除いて、組成物中でのそれらの使用が企図される。追加の活性な化合物もまた、組成物中に取り込まれ得る。

【０１４２】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合するように処方される。投与経路の例には、非経口的（例えば、静脈内、経皮、皮内）、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与が含まれる。非経口、皮内、または皮下での適用に使用される溶液または坐剤には、以下の成分を含むことができる：滅菌の稀釈液（例えば、注射のための水）、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成の溶媒；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコール、またはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、または亜硫酸水素ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ））；緩衝剤（例えば、酢酸、クエン酸、またはリン酸）；および弾力性の調節のための試薬（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。ｐＨは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）で調節され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨ての注射器、またはガラスもしくはプラスチック製の多用量のバイアル中に閉じられ得る。

【０１４３】

注射可能な用途に適切な薬学的組成物は、滅菌の水溶液（水溶性である場合）または分散剤、および滅菌の注射可能な溶液もしくは分散剤の即座の調製のための滅菌の散剤を含む。静脈内投与については、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ（ＢＡＳＦ　Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ）またはリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）が含まれる。全ての場合において、組成物は滅菌でなければならず、そして容易に注射器の中に存在する程度に流動性であるべきである。これは、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、そして細菌および真菌のような微生物の混入作用から保護されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体のポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含有している溶媒、または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散の場合には必要とされる粒子の大きさの維持によって、そして界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の保護は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなど）によって達成され得る。多くの場合には、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）、組成物中の塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能な組成物の遅延させられた吸収は、吸収を遅延させる試薬（例えば、一ステアリン酸アルミニウム、およびゼラチン）を組成物中に含むことによってもたらされ得る。

【０１４４】

滅菌の注射可能な溶液は、必要とされる場合には上記に列挙されている成分の１つまたはそれらの組合せとともに、適切な溶媒中に必要とされる量で活性な化合物（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質または抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体）を取り込むこと、続いて濾過滅菌することによって、調製され得る。一般的には、分散物は、塩基性の分散媒体および上記に列挙されているものから必要とされる他の成分を含有している滅菌のビヒクル中に、活性な化合物を取り込むことによって調製される。滅菌の注射可能な溶液の調製のための滅菌の粉末の場合においては、調製方法は、減圧乾燥および凍結乾燥である。これによって、事前に滅菌濾過されたその溶液から、有効成分の粉末、および任意のさらなる所望される成分を生じる。

【０１４５】

経口用組成物には、一般的には、不活性な希釈剤または食用のキャリアが含まれる。これらは、ゼラチンカプセル中に閉じられ得るか、または錠剤に圧縮され得る。経口による治療的投与の目的のためには、活性な化合物は賦形剤とともに

取り込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口用組成物はまた、歯磨き剤としての用途のために液体のキャリアを使用して調製され得る。ここでは、液体のキャリア中の化合物は、経口によって適用され、そして漱がれ、そして吐き出されれるかまたは飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤および／またはアジュバント材料が、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分、または同様の性質の化合物のいずれかを含有することができる：結合剤（例えば、微結晶セルロース、トラガカントガム、またはゼラチン）；賦形剤（例えば、澱粉またはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、Ｐｒｉｍｏｇｅｌ、またはトウモロコシ澱粉）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、またはＳｔｅｒｏｔｅｓ）；滑走剤（ｇｌｉｄａｎｔ）（例えば、コロイド状ニ酸化ケイ素）；甘味料（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは、香味料（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ香味料）。

【０１４６】

吸入による投与については、化合物は、適切な噴射剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含有している加圧された容器またはディスペンサー、あるいは噴霧吸入器から、噴霧剤の形態で送達される。

【０１４７】

全身的な投与はまた、経粘膜または経皮的な手段により得る。経粘膜または経皮的な投与については、浸透されるバリアに適切な浸透剤が処方物中で使用される。このような浸透剤は、一般的に当該分野で公知であり、そして例えば、経粘膜的な投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜的な投与は、鼻腔スプレーまたは坐剤の使用によって達成され得る。経皮的な投与については、活性な化合物は、当該分野で一般的に公知であるように、軟膏、膏薬、ゲル剤、またはクリーム剤に処方される。

【０１４８】

化合物はまた、直腸送達のためには、坐剤の形態（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤を用いて）または保持浣腸剤の形態に調製され得る。

【０１４９】

１つの実施形態においては、活性な化合物は、移植およびマイクロカプセル化送達システムを含む、体による迅速な排除に対して化合物を防御するキャリアを用いて調製される（例えば、徐放処方物）。生体分解性の生体適合性ポリマー（例えば、エチレンビニル酢酸、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当業者に明らかである。材料はまた、Ａｌｚａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｎｏｖａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．から商業的に入手することが可能である。リポソーム懸濁物（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染させられた細胞に対して標的化させられたリポソームを含む）もまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号に記載されているように、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【０１５０】

投与の容易さおよび投与量の均質性のために、投与量単位の形態で経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有利である。本明細書中で使用されるような投与量の単位形態は、処置される被験体についての単位投与量として適切な、物理的に個別の単位をいい；それぞれの単位は、必要とされる薬学的キャリアと組合せて、所望される効果を生じるように計算された活性な化合物の予め決定された量を含有している。本発明の投与量の単位形態についての詳細は、活性な化合物の固有の特徴、および達成される特定の治療効果によって指図されそ

してそれに直接依存する。
【０１５１】
本発明の核酸分子は、ベクター中に挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、米国特許第５，７０３，０５５号に記載されているように、多数の経路のうちのいずれかによって被験体に送達され得る。従って、送達にはまた、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第５，３２８，４７０号を参照のこと）、または定位注射（例えば、Ｃｈｅｎら、（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９１：３０５４－３０５７を参照のこと）が含まれる。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物には、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターが含まれ得るか、またはこれには、遺伝子送達ビヒクルがその中に包埋されているゆっくりと放出されるマトリックスが含まれ得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞（例えば、レトロウイルスベクター）から完全なまま産生され得る場合には、薬学的調製物は、遺伝子送達システムを生じる１つ以上の細胞を含み得る。
【０１５２】
薬学的組成物は、投与についての説明書とともに、容器、パッケージ、またはディスペンサー中に含まれ得る。
【０１５３】
（発明の用途および方法）
本明細書中で記載されている核酸分子、タンパク質、タンパク質ホモログ、および抗体は、以下の方法の１つ以上において使用され得る：（ａ）スクリーニングアッセイ；（ｂ）検出アッセイ（例えば、染色体マッピング、組織分類、法医生理学）；（ｃ）予知用医薬品（ｐｒｅｄｉｃｔｉｖｅ　ｍｅｄｉｃｉｎｅ）（例えば、診断アッセイ、予測アッセイ、臨床試験のモニタリング、および生薬遺伝学）；ならびに（ｄ）処置方法（例えば、治療的および予防的）。本明細書中に記載されているように、１つの実施形態においては、本発明のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質はＢＡＦＦに結合する能力を有する。
【０１５４】
本発明の単離された核酸分子は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を発現するために（例えば、遺伝子治療適用において宿主細胞中の組換え発現ベクターを通じて）、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡを検出する（例えば、生物学的サンプル中で）かまたはＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子中の遺伝子の損傷を検出するために、および以下にされに記載されるように、ＢＡＦＦおよび／またはＢＡＦＦ－Ｒ活性を調節するために、使用され得る。さらに、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、ＢＡＦＦ－Ｒ活性またはその発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングするために、ならびに、不十分なもしくは過剰なＢＡＦＦおよび／もしくはＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の産生によって、またはＢＡＦＦ－Ｒの野生型タンパク質と比較して減少した活性もしくは異常な活性を有するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の形態の産生によって特徴付けられる障害を処置するために、使用され得る。さらに、本発明の抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体が、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を検出しそして単離するために、ならびに、ＢＡＦＦおよび／またはＢＡＦＦ－Ｒ活性を調節するために、使用され得る。
【０１５５】
本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定された新規の試薬、および本明細書中に記載されているような処置のためのその用途に関する。
【０１５６】
（スクリーニングアッセイ）
本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質に結合するか、または例えば、ＢＡＦＦ－Ｒの発現もしくはＢＡＦＦ－Ｒの活性に対して刺激的作用または阻害性の作用を有する調節因子（すなわち、候補、または試験化合物、または試薬（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子、もしくは他の薬物））を同定するための方法

（本明細書中では「スクリーニングアッセイ」とも呼ばれる）を提供する。

【０１５７】

１つの実施形態においては、本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質もしくはポリペプチド、またはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはその活性を調節する、候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、以下を含む当該分野で公知の組合せライブラリー方法において、多数のアプローチのいずれかを使用して得ることできる：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相または液相ライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー方法；「１ビーズ１化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、他の４個のアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の低分子ライブラリーに適用することができる（Ｌａｍ（１９９７）、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．１２：１４５－１６７）。

【０１５８】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、例えば、以下において、当該分野で見出され得る：ＤｅＷｉｔｔら（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６９０９－６０１３；Ｅｒｂら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１１４２２－１１４２６；Ｚｕｃｋｅｒｍａｎｎら（１９９４）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：２６７８－２６８５；Ｃｈｏら（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１３０３；Ｃａｒｒｅｌｌら（１９９４）Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０５９；Ｃａｒｅｌｌら（１９９４）Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０６１；およびＧａｌｌｏｐら（１９９４）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：１２３３－１２５１。

【０１５９】

化合物のライブラリーは、溶液中で（例えば、Ｈｏｕｇｈｔｅｎ（１９９２）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４１２－４２１）、またはビーズ上で（Ｌａｍ（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４）、チップ上で（Ｆｏｄｏｒ（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ ３６４：５５５－５５６）、細菌上で（Ｌａｄｎｅｒ、米国特許第５，２２３，４０９号）、胞子上で（Ｌａｄｎｅｒ、米国特許第５，２２３，４０９号）、プラスミド上で（Ｃｕｌｌら（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１８６５－１８６９）、またはファージ上で（ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０；Ｄｅｖｌｉｎ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：４０４－４０６；Ｃｗｉｒｌａら（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：６３７８－６３８２；Ｆｅｌｉｃｉ（１９９１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：３０１－３１０；Ｌａｄｎｅｒ、米国特許第５，２２３，４０９号）、調製され得る。

【０１６０】

１つの実施形態においては、アッセイは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の膜に結合した形態またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞が、試験化合物と接触させられ、そしてＢＡＦＦ－Ｒタンパク質に結合する試験化合物の能力が決定される、細胞に基づくアッセイである。例えば、細胞は、哺乳動物起源であり得るかまたは酵母細胞であり得る。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質に結合する試験化合物の能力の決定は、例えば、試験化合物を放射性同位元素または酵素標識とカップリングさせることによって達成され得る。その結果、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分への試験化合物の結合は、複合体中の標識された化合物を検出することによって決定され得る。例えば、試験化合物は、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、または^{3}Ｈで、直接または間接的のいずれかで標

識され得、そして放射性同位元素は、放射線の放出を直接計数することによって、またはシンチレーションカウンティングによって検出される。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素標識され得、そして酵素標識は、適切な基質の生成物への転換の決定によって検出される。１つの実施形態においては、アッセイは、細胞表面上にＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の膜に結合した形態またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を、ＢＡＦＦ－Ｒに結合してアッセイ混合物を形成することが既知である化合物と接触させること、アッセイ混合物を試験化合物と接触させること、およびＢＡＦＦ－Ｒタンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定することを包含する。ここでは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質と相互作用する試験化合物の能力の決定は、既知の化合物と比較して、ＢＡＦＦ－Ｒまたはその生物学的に活性な部分に対して優先的に結合する試験化合物の能力を決定することを含む。

【０１６１】

別の実施形態においては、アッセイは、細胞に基づくアッセイである。これは、細胞表面上にＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の膜に結合した形態またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を試験化合物と接触させること、そしてＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する（例えば、刺激するかまたは阻害する）試験化合物の能力を決定することを包含する。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する試験化合物の能力の決定は、例えば、ＢＡＦＦ－Ｒの標的分子に結合するかまたはそれと相互作用するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の能力を決定することによって達成され得る。本明細書中で使用される場合には、「標的分子」は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質が自然な状態で結合するかまたは相互作用する分子であり、例えば、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質を発現する細胞の表面上の分子、第２の細胞の表面上の分子、細胞外環境にある分子、細胞膜の内表面に会合している分子、または細胞質分子である。ＢＡＦＦ－Ｒの標的分子は、ＢＡＦＦ－Ｒ以外の分子、本発明のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、またはポリペプチドであり得る。１つの実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒの標的分子は、細胞膜を通じる細胞内への細胞外シグナル（例えば、膜に結合したＢＡＦＦ－Ｒ分子への化合物の結合によって生成されるシグナル）の伝達を促進する、シグナル伝達経路の成分である。標的は、例えば、触媒活性を有する第２の細胞内タンパク質、または下流のシグナル伝達分子とＢＡＦＦ－Ｒとの会合を促進するタンパク質であり得る。

【０１６２】

ＢＡＦＦ－Ｒの標的分子に結合するかまたはそれと相互作用するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の能力の決定は、直接的な結合の決定のための上記の方法の１つによって達成され得る。１つの実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒの標的分子に結合するかまたはそれと相互作用するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の能力の決定は、標的分子の活性の決定によって達成され得る。例えば、標的分子の活性は、標的の細胞性セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内Ca^{2+}、ジアシルグリセロール、ＩＰ３など）の誘導の検出、適切な基質である標的の触媒／酵素活性の検出、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動可能に連結されたＢＡＦＦ－Ｒ応答性調節エレメントを含有している）の誘導の検出、あるいは、細胞応答（例えば、細胞の生存性、細胞の分化、または細胞増殖）の検出によって決定され得る。

【０１６３】

なお別の実施形態においては、本発明のアッセイは細胞を含まないアッセイである。これは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させること、そしてＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する試験化合物の能力を決定することを含む。ＢＡＦＦ－Ｒタ

ンパク質に対する試験化合物の結合は、上記のように直接または間接的のいずれかで決定され得る。１つの実施形態においては、アッセイは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、ＢＡＦＦ－Ｒに結合してアッセイ混合物を形成することが既知である化合物と接触させること、アッセイ混合物を試験化合物と接触させること、およびＢＡＦＦ－Ｒタンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定することを含む。ここでは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質と相互作用する試験化合物の能力は、既知の化合物と比較して、ＢＡＦＦ－Ｒまたはその生物学的に活性な部分に対して優先的に結合する試験化合物の能力を決定することを含む。

【０１６４】

別の実施形態においては、アッセイは、細胞を含まないアッセイである。これは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させること、そしてＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する（例えば、刺激するかまたは阻害する）試験化合物の能力を決定することを含む。ＢＡＦＦ－Ｒの活性を調節する試験化合物の能力の決定は、例えば、直接的な結合の決定のための上記の方法の１つによって、ＢＡＦＦ－Ｒの標的分子に結合するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の能力を決定することによって達成され得る。別の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒの活性を調節する試験化合物の能力の決定は、ＢＡＦＦ－Ｒの標的分子をさらに調節するＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の能力を決定することによって達成され得る。例えば、適切な基質に対する標的分子の触媒／酵素活性が、先に記載されているように決定され得る。

【０１６５】

なお別の実施形態においては、細胞を含まないアッセイは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、ＢＡＦＦ－Ｒに結合してアッセイ混合物を形成することが既知である化合物と接触させること、アッセイ混合物を試験化合物と接触させること、およびＢＡＦＦ－Ｒタンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定することを含む。ここでは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質と相互作用する試験化合物の能力の決定は、ＢＡＦＦ－Ｒの標的分子に対して優先的に結合するかまたはその活性を調節する、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の能力を決定することを含む。

【０１６６】

本発明の細胞を含まないアッセイは、ＢＡＦＦ－Ｒの可溶性形態または膜に結合した形態の両方の使用に敏感に反応する。ＢＡＦＦ－Ｒの膜に結合した形態を含有している細胞を含まないアッセイの場合においては、ＢＡＦＦ－Ｒの膜に結合した形態が溶液中で維持される可溶化剤を利用することが所望され得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤（例えば、ｎ－オクチルグルコシド、ｎ－ドデシルグルコシド、ｎ－ドデシルマルトシド、オクタノイル－Ｎ－メチルグルカミド、デカノイル－Ｎ－メチルグルカミド、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１１４、Ｔｈｅｓｉｔ（登録商標）、イソトリデシポリ（エチレングリコールエーテル）$_n$、３－（３－コラミドプロピル）ジメチルアンミニオール－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）、３－（３－コラミドプロピル）ジメチルアンミニオール－２－ヒドロキシ－１－プロパンスルホン酸（ＣＨＡＰＳＯ）、またはＮ－ドデシル－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アンモニオ－１－プロパンスルホン酸）が含まれる。

【０１６７】

本発明の上記のアッセイ方法の１つ以上の実施形態においては、タンパク質の１つまたは両方の複合体化されていない形態からの複合体の分離を容易にするために、ならびにアッセイを自動化に順応させるために、ＢＡＦＦ－Ｒまたはその標的分子のいずれかを固定することが、所望され得る。ＢＡＦＦ－Ｒに対する試験化合物の結合、またはＢＡＦＦ－Ｒと標的分子との、候補の化合物の存在下も

しくは非存在下での相互作用は、反応物の含有に適切な任意の容器中で達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験チューブ、および微量遠心分離用チューブが含まれる。１つの実施形態においては、タンパク質の１つまたは両方がマトリックスに結合させられるドメインが付加されている融合タンパク質が、提供され得る。例えば、ＧＳＴ－ＢＡＦＦ－Ｒ融合タンパク質、またはＧＳＴ－標的融合タンパク質が、グルタチオンセファロースビーズ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）またはグルタチオンで導出した（ｄｅｒｉｖａｔｉｚｅｄ）マイクロタイタープレート上に吸着させられ得、次いで、試験化合物、または試験化合物および吸着されていない標的タンパク質もしくはＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のいずれかと混合され得る。そして混合物が、複合体の形成の助けとなる条件下でインキュベートされる（例えば、塩およびｐＨについて生理学的条件で）。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートのウェルは、全ての結合していない成分を除去するために洗浄され、マトリックスは、ビーズの場合には固定化され、複合体は、例えば、上記に記載されているように、直接または間接的のいずれかで決定される。あるいは、複合体は、マトリックスから解離させられ、そしてＢＡＦＦ－Ｒの結合または活性のレベルが、標準的な技術を使用して決定される。

【０１６８】

マトリックス上のタンパク質を固定するための他の技術もまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒまたはその標的分子のいずれかが、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合を利用して固定され得る。ビオチン化ＢＡＦＦ－Ｒまたは標的分子は、当該分野で周知の技術（例えば、ビオチン化キット、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌ．）を使用してビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミド）から調製され得、そしてストレプトアビジンでコーティングした９６ウェルプレートのウェル（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）中に固定される。あるいは、ＢＡＦＦ－Ｒまたは標的分子と反応するが、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質のその標的分子への結合は妨害しない抗体が、プレートのウェルから導出され得、そして結合していない標的またはＢＡＦＦ－Ｒが抗体結合によってウェル中に捕捉される。このような複合体の検出のための方法は、ＧＳＴ－固定化複合体についての上記の記載に加えて、ＢＡＦＦ－Ｒまたは標的分子と反応する抗体を使用する複合体の免疫検出、ならびにＢＡＦＦ－Ｒまたは標的分子に伴う酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイを含む。

【０１６９】

別の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒの発現の調節因子は、細胞が候補の化合物と接触させられ、そして細胞中でのＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が検出される方法において同定される。候補の化合物の存在下での、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現レベルは、候補の化合物の非存在下での、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現レベルと比較される。次いで、候補の化合物はこの比較に基づいて、ＢＡＦＦ－Ｒの発現の調節因子として同定され得る。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が、候補の化合物の存在下でその非存在下よりも大きい（統計学的に有意に大きい）場合には、候補の化合物は、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現の刺激因子として同定される。あるいは、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現が、候補の化合物の存在下でその非存在下よりも少ない（統計学的に有意に少ない）場合には、候補の化合物は、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現の阻害因子として同定される。ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現レベルは、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質を検出するための、本明細書中に記載されている方法によって決定され得る。

【０１７０】

本発明のなお別の局面においては、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ（例えば、米国特許第５，２８３，３１７号；Ｚｅｒｖｏｓら（１９９３）Ｃｅｌｌ ７２：２２３－２３２；Ｍａｄｕｒａら（１９９３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１２０４６－１２０５４；Ｂａｒｔｅｌら（１９９３）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １４：９２０－９２４；Ｉｗａｂｕｃｈｉら（１９９３）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ８：１６９３－１６９６；およびＢｒｅｎｔ 第ＷＯ９４／１０３００号を参照のこと）において、ＢＡＦＦ－Ｒに結合するかまたはそれと相互作用する他のタンパク質（「ＢＡＦＦ－Ｒ結合タンパク質」または「ＢＡＦＦ－Ｒ－ｂｐ」）、およびＢＡＦＦ－Ｒ活性を調節する他のタンパク質を同定するために、「ベイトタンパク質」として使用され得る。このようなＢＡＦＦ－Ｒ結合タンパク質はまた、例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ経路の上流または下流のエレメントとして、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質によるシグナルの増幅に関係しているようである。

【０１７１】

ツーハイブリッドシステムは、異なるＤＮＡ結合および活性化ドメインから構成される、ほとんどの転写因子の調節因子の性質に基づく。簡潔には、このアッセイは、２つの異なるＤＮＡ構築物を利用する。１つの構築物中では、ＢＡＦＦ－Ｒをコードする遺伝子が、既知の転写因子（例えば、ＧＡＬ－４）のＤＮＡ結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物中では、同定されていないタンパク質（「獲物（ｐｒｅｙ）」または「サンプル」）をコードするＤＮＡ配列のライブラリーに由来するＤＮＡ配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合させられる。「ベイト」および「獲物」タンパク質がインビボで相互作用することが可能である場合には、転写因子のＤＮＡ結合ドメインと活性化ドメインである、ＢＡＦＦ－Ｒ依存性の複合体の形成が、非常に近接して生じる。この近接によって、転写因子に応答性である転写調節部位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子（例えば、ＬａｃＺ）の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そして機能的な転写因子を含有している細胞コロニーが単離され得、そしてＢＡＦＦ－Ｒと相互作用するタンパク質をコードするクローン化された遺伝子を得るために使用され得る。

【０１７２】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定された新規の試薬、および本明細書中に記載される処置のためのその用途に関する。

【０１７３】

（検出アッセイ）

本明細書中で同定されるｃＤＮＡ配列の一部またはフラグメント（および対応している完全な遺伝子配列）は、ポリヌクレオチド試薬として多数の方法において使用され得る。例えば、これらの配列は、以下のために使用され得る：（ｉ）それらのそれぞれの遺伝子を染色体上にマップし、それによって遺伝的疾患に関係している遺伝子領域の位置を決定するため；（ｉｉ）微小な生物学的サンプルから個体を同定するため（組織分類）；および（ｉｉｉ）生物学的サンプルの法医学的同定を補助するため。これらの適応は、以下の節で記載される。

【０１７４】

（染色体マッピング）

一旦、遺伝子の配列（または配列の一部）が単離されると、この配列は、染色体上の遺伝子の位置をマップするために使用され得る。このプロセスは、染色体マッピングと呼ばれる。従って、ＢＡＦＦ－Ｒの一部またはフラグメント、本明細書中に記載される配列は、それぞれ、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の位置を染色体上にマップするために使用され得る。染色体へのＢＡＦＦ－Ｒ配列のマッピングは、これらの配列を疾患に関係している遺伝子と相関させることにおいて重要な最初の工程である。

【０１７５】
簡潔には、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子は、ＢＡＦＦ－Ｒ配列からＰＣＲプライマー（好ましくは、１５～２５ｂｐの長さ）を調製することによって、染色体にマップされ得る。ＢＡＦＦ－Ｒ配列のコンピューター分析は、ゲノムＤＮＡ中の１つ以上のエキソンにはまたがらない（従って、増幅プロセスを複雑にはしない）プライマーを迅速に選択するために使用され得る。次いで、これらのプライマーは、所定の種の個々の染色体を含有している体細胞ハイブリッドのＰＣＲスクリーニングに使用され得る。ＢＡＦＦ－Ｒ配列に対応している種特異的遺伝子を含有しているこのようなハイブリッドのみが、増幅されたフラグメントを生じる。

【０１７６】
体細胞ハイブリッドのＰＣＲマッピングは、特定の染色体に対して特定の配列を割り当てるための迅速な手順である。１日あたり３個以上の配列が、１つのサーマルサイクラーを使用して割り当てられ得る。オリゴヌクレオチドプライマーを設計するためにＢＡＦＦ－Ｒ配列を使用すると、特異的な染色体に由来するフラグメントのパネルを用いて、仮の位置決め（ｓｕｂｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ）が達成され得る。

【０１７７】
染色体分裂中期の染色体スプレッドに対するＤＮＡ配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）はさらに、１工程で正確な染色体位置を提供するために使用され得る。染色体スプレッドは、その分離が有糸分裂期の紡錘糸を崩壊させる化学薬品様コルセミドによって、分裂中期でブロックされている細胞を使用して行われ得る。簡潔には、染色体はトリプシンで処理され得、次いでＧｉｅｍｓａで染色され得る。明るいバンドと暗いバンドのパターンが、それぞれの染色体について生じ、その結果、染色体は、個々に同定され得る。ＦＩＳＨ技術が、５００または６００塩基程度の短いＤＮＡ配列とともに使用され得る。しかし、１０００塩基より長いクローンが、単純な検出に十分なシグナル強度を有する固有の染色体位置への結合の高い可能性を有する。好ましくは、１０００塩基、そしてより好ましくは、２０００塩基が、合理的な時間で良好な結果を得るために十分である。この技術の概要については、Ｖｅｒｍａら、ＨＵＭＡＮ ＣＨＲＯＭＯＳＯＭＥＳ：Ａ ＭＡＮＵＡＬ ＯＦ ＢＡＳＩＣ ＴＥＣＨＮＩＱＵＥＳ、Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．，１９８８を参照のこと。

【０１７８】
染色体マッピングのための試薬は、単一の染色体を、またはその染色体上の単一の部位を記録するために個別に使用され得る。または試薬のパネルが、複数の部位および／または複数の染色体を記録するために使用され得る。遺伝子の非コード領域に対応している試薬が、実際には、マッピングの目的に好ましい。コード配列は、おそらく、遺伝子ファミリー内でより保存されており、従って、染色体マッピングの間の交差ハイブリダイゼーションの選択が増大する。

【０１７９】
一旦、配列が正確な染色体位置に対してマップされると、染色体上の配列の物理的な位置が、遺伝子マップのデータと相関させられ得る。このようなデータは、例えば、ＭｃＫｕｓｉｃｋ、ＭＥＮＤＥＬＩＡＮ ＩＮＨＥＲＩＴＡＮＣＥ ＩＮ ＭＡＮ（Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｗｅｌｃｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｌｉｂｒａｒｙからオンラインで入手可能である）に見られる。次いで、同じ染色体領域にマップされた遺伝子と疾患との関係が、例えば、Ｅｇｅｌａｎｄら（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ、３２５：７８３－７８７に記載されている連関分析（物理的に隣接している遺伝子の共同遺伝）を通じて同定され得る。

【０１８０】
さらに、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子に関係している疾患に罹患している個体と罹患し

ていない個体との間でのＤＮＡ配列の差異が、決定され得る。変異が罹患している個体の一部または全てにおいて観察されが、全ての罹患していない個体においては観察されない場合には、変異はおそらく、特定の疾患の原因因子である。罹患した個体と罹患していない個体との間での比較には、一般的には、染色体の構造変化（例えば、染色体スプレッドから見ることができるかまたはそのＤＮＡ配列に基づいてＰＣＲを使用して検出することができる、欠失または転移）を最初に観察することを含む。最終的には、いくつかの個体に由来する遺伝子の完全な配列決定が、変異の存在を確認するため、および多型による変異体を区別するために、行われ得る。

【０１８１】

（組織分類）

本発明のＢＡＦＦ－Ｒ配列はまた、微小な生物学的サンプルから個体を同定するためにも使用され得る。この技術においては、個体のゲノムＤＮＡが、１つ以上の制限酵素で消化され、そして同定のための固有のバンドを生じるようにサザンブロットでプローブされる。本発明の配列は、ＲＦＬＰ（米国特許第５，２７２，０５７号に記載されている、「制限断片長多型」）についてのさらなるＤＮＡマーカーとして有用である。

【０１８２】

さらに、本発明の配列は、個体のゲノムの選択された部分のＤＮＡ配列を実際に１塩基ずつ（ｂａｓｅ－ｂｙ－ｂａｓｅ）決定する、別の技術を提供するために使用され得る。このように、本明細書中に記載されているＢＡＦＦ－Ｒ配列は、配列の５’および３’末端から２つのＰＣＲプライマーを調製するために使用され得る。これらのプライマーは、次いで、個々のＤＮＡを増幅し、続いてそれを配列決定するために使用され得る。

【０１８３】

この様式で調製された個体に由来する対応するＤＮＡ配列のパネルは、各々の個体が、対立遺伝子の差異に起因して、このようなＤＮＡ配列の固有のセットを有するので、固有の個体の同定を提供することができる。本発明の配列は、個体由来および組織由来の配列のこのような同定を得るために使用され得る。本発明のＢＡＦＦ－Ｒ配列は、ヒトゲノムの一部を独自に示す。対立遺伝子のバリエーションは、これらの配列のコード領域においてある程度で生じ、そして非コード領域においてはより大きい程度で生じる。個々のヒトの間での対立遺伝子のバリエーションは、各５００塩基あたり約１つの頻度で生じると概算される。はるかに多い対立遺伝子のバリエーションは、制限断片長多型（ＲＦＬＰ）を含む一塩基多型（ＳＮＰ）に起因する。

【０１８４】

本明細書中に記載される配列のそれぞれは、ある程度で、同定目的のために比較され得る固体に由来するＤＮＡに対して標準として使用され得る。より多数の多型が非コード領域中に生じるので、より少ない配列が個体を区別するために必要である。図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｂ（配列番号４）、および図３（配列番号６）の非コード配列は、それぞれが１００塩基の増幅された非コード配列を生じる、約１０から１０００個のプライマーのパネルを用いて、ポジティブな個体の同定を十分に提供することができる。推定されるコード配列（例えば、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｂ（配列番号４）、および図３（配列番号６）中のコード配列）が使用される場合は、ポジティブな個体の同定のためのより適切な数のプライマーは、５００～２，０００である。

【０１８５】

（予測用（ｐｒｅｄｉｃｔｉｖｅ）医薬品）

本発明はまた、予測用医薬品の分野にも関する。ここでは、診断アッセイ、予

後アッセイ、生薬遺伝学、および臨床試験のモニタリングが、予後（予測）目的のために使用され、それによって個体を予防的に処置する。従って、本発明の１つの局面は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質および／または核酸の発現、ならびにＢＡＦＦ－Ｒ活性を、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞、組織）の状況下で決定し、それによって個体が疾患もしくは障害に罹患しているかどうか、または個体が異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現もしくは活性に関係している障害を発症する危険があるかどうかを決定するための診断アッセイに関する。本発明はまた、個体がＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、核酸の発現または活性に関係している障害を発症する危険があるかどうかを決定するための予後（または予測）アッセイを提供する。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の変異が生物学的サンプル中でアッセイされ得る。このようなアッセイは、それによってＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、核酸の発現または活性によって特徴付けられるかまたはそれに関係している障害の発症前に個体を予防的に処置するための、予後または予測目的のために、使用され得る。

【０１８６】

本発明の別の局面は、それによってその個体について適切な治療薬または予防薬（本明細書中では、「生薬遺伝学」と呼ばれる）を選択するための、個体におけるＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、核酸の発現、またはＢＡＦＦ－Ｒの活性を決定するための方法を提供する。生薬遺伝学は、個体の遺伝子型に基づいて（例えば、特定の試薬に応答する個体の能力を決定するために試験される個体の遺伝子型）、個体の治療的または予防的処置のための試薬（例えば、薬物）の選択を可能にする。

【０１８７】

本発明のなお別の局面は、臨床試験においけるＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に対する試薬（例えば、薬物、化合物）の影響のモニタリングに関する。

【０１８８】

これらおよび他の試薬が、以下の節でさらに詳細に記載される。

【０１８９】

（診断アッセイ）

生物学的サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒの存在または非存在の検出のための例示的な方法には、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、および生物学的サンプルを、ＢＡＦＦ－ＲタンパクまたはＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ）を検出することができる化合物または試薬と接触させ、その結果、ＢＡＦＦ－Ｒの存在が生物学的サンプル中で検出される工程を包含する。ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの検出のための試薬は、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡにハイブリダイズすることが可能である標識された核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、全長のＢＡＦＦ－Ｒ核酸（例えば、図１Ａ（配列番号１）、図１Ｂ（配列番号２）、図２Ａ（配列番号３）、図２Ｂ（配列番号４）、および図３（配列番号６）のいずれかの核酸、またはそれらの一部）であり、例えば、少なくとも１５、３０、５０、１００、２５０、または５００ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドであり、そしてＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡに対してストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズするために十分である。本発明の診断アッセイにおける使用に適切な他のプローブが、本明細書中に記載される。

【０１９０】

ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の検出のための試薬は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質に結合することができる抗体、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体はポリクローナルであり得るか、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。完全な抗体またはそのフラグメント（例えば、ＦａｂもしくはＦ（ａｂ’）$_2$）が使用され得る。用語「標識された」は、プローブまたは抗体に関して

、プローブまたは抗体に対する検出可能な物質のカップリング（すなわち、物理的な連結）によるプローブまたは抗体の直接的な標識、ならびに直接標識される別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的な標識を含むように意図される。直接的な標識の例には、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、およびビオチンでのＤＮＡプローブの末端標識（その結果、これは、蛍光標識されたストレプトアビジンで検出され得る）が含まれる。用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞、および生物学的液体、ならびに被験体中に存在する組織、細胞、および液体を含むように意図される。すなわち、本発明の検出方法は、インビトロならびにインビボで、生物学的サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡ、タンパク質、またはゲノムＤＮＡを検出するために使用され得る。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡの検出のためのインビトロ技術には、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の検出のためのインビトロ技術には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット、免疫沈降、および免疫蛍光が含まれる。ＢＡＦＦ－ＲゲノムＤＮＡの検出のためのインビトロ技術には、サザンハイブリダイゼーションが含まれる。さらに、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の検出のためのインビボ技術には、標識した抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体を被験体に導入することが含まれる。例えば、抗体は、被験体中でのその存在および位置が標準的な画像化技術によって検出され得る放射活性マーカーで標識され得る。

【０１９１】

１つの実施形態においては、生物学的サンプルは、試験被験体由来のタンパク質分子を含む。あるいは、生物学的サンプルは、試験被験体由来のｍＲＮＡ分子または試験被験体由来のゲノムＤＮＡ分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来の手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

【０１９２】

別の実施形態においては、この方法はさらに、コントロールの被験体由来のコントロールの生物学的サンプルを得る工程、コントロールサンプルを、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡを検出することができる化合物または試薬と接触させ、その結果、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの存在が生物学的サンプル中で検出される工程、ならびに試験サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの存在と、コントロールサンプル中のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの存在とを比較する工程を包含する。

【０１９３】

本発明はまた、生物学的サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒの存在を検出するためのキットを含む。例えば、キットは、生物学的サンプル中のＢＡＦＦ－ＲタンパクまたはｍＲＮＡを検出することができる、標識された化合物または試薬；サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ量を決定するための手段；および標準と、サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒ量とを比較するための手段を含有し得る。化合物または試薬は、適切な容器中にパッケージされ得る。キットはさらに、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質または核酸を検出するためにキットを使用するための説明書を含み得る。

【０１９４】

（予後アッセイ）

本明細書中に記載される診断方法はさらに、異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に関係している疾患または障害を有しているか、またはそれらを発症する危険のある被験体を同定するために利用され得る。例えば、本明細書中に記載されているアッセイ（例えば、上記の診断アッセイまたは以下のアッセイ）は、例えば、自己免疫性溶血性貧血および全身性エリテマトーデスのような自己免疫性状態においてＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、核酸の発現または活性に関係している障害を有しているかまたはそれを発症する危険のある被験体を同定するために、利用

され得る。あるいは、予後アッセイは、疾患または障害を有しているかまたはそれらを発症する危険のある被験体を同定するために利用され得る。従って、本発明は、異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に関係している疾患または障害を同定するための方法を提供する。ここでは、試験サンプルが被験体から得られ、そしてＢＡＦＦ－Ｒタンパク質または核酸（例えば、ｍＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ）が検出される。ここでは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質または核酸の存在は、異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に関係している疾患または障害を有しているかまたはそれらを発症する危険のある被験体についての診断である。本明細書中で使用される場合には、「試験サンプル」は、目的の被験体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的液体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織であり得る。

【０１９５】

さらに、本明細書中に記載されている予後アッセイは、被験体に、異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に関係している疾患または障害を処置するための試薬（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）を投与することができるかどうかを決定するために使用され得る。例えば、このような方法は、被験体が障害について試薬で効率よく処置され得るかどうかを決定するために使用され得る。従って、本発明は、被験体が異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に関係している障害について試薬で効率よく処理され得るかどうかを決定するための方法を提供する。ここでは、試験サンプルが得られ、そしてＢＡＦＦ－Ｒタンパク質または核酸が検出される（例えば、ここでは、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質または核酸の存在は、異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に関係している障害を処置するために試薬を投与され得る被験体についての診断である）。

【０１９６】

本発明の方法はまた、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子中の遺伝子の損傷を検出するために使用され得、それによって損傷を起こした遺伝子を有する被験体が、腫瘍形成性障害または自己免疫性障害の危険があるかまたはそれを罹患しているかどうかを決定する。種々の実施形態においては、この方法は、被験体由来の細胞サンプル中で、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質をコードする遺伝子の完全性に影響を与える変化の少なくとも１つ、またはＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の誤った発現によって特徴付けられる遺伝子の損傷の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、このような遺伝子の損傷は、以下の少なくとも１つの存在を確認することによって検出され得る：（１）ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子からの１つ以上のヌクレオチドの欠失；（２）ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子への１つ以上のヌクレオチドの付加；（３）ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の１つ以上のヌクレオチドの置換；（４）ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の染色体再配置；（５）ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子のメッセンジャーＲＮＡの転写レベルの変化；（６）ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の（例えば、ゲノムＤＮＡのメチル化パターンの）異常な改変；（７）ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ転写物の野生型ではないスプライシングパターンの存在；（８）ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の野生型ではないレベル；（９）ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の対立遺伝子の欠失、および（１０）ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の不適切な翻訳後改変。本明細書中に記載されているように、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の損傷を検出するために使用され得る、当該分野で公知の多数のアッセイ技術が存在する。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来の手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、核を有する細胞を含有している任意の生物学的サンプル（例えば、頬の粘膜細胞を含む）が、使用され得る。

【０１９７】

特定の実施形態においては、損傷の検出には、アンカーＰＣＲまたはＲＡＣＥＰＣＲのようなポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）（例えば、米国特許第４，６

８３，１９５号および同第４，６８３，２０２号を参照のこと）における、あるいは、鎖連結反応（ＬＣＲ）（例えば、Ｌａｎｄｅｇｒａｎら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：１０７７－１０８０；およびＮａｋａｚａｗａら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：３６０－３６４を参照のこと）における、プローブ／プライマーの使用を含む。これらの後者は、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子中の点変異の検出に特に有用である（Ａｂｒａｖａｙａら（１９９５）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２３：６７５－６８２を参照のこと）。この方法は、患者から細胞のサンプルを回収する工程、サンプルの細胞から核酸（例えば、ゲノム、ｍＲＮＡ、または両方）を単離する工程、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子（存在する場合には）のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じる条件下で、核酸サンプルをＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子に特異的にハイブリダイズする１つ以上のプライマーと接触させる工程、および増幅産物の存在または非存在を検出する工程、あるいは、増幅産物の大きさを検出しそしてコントロールサンプルと長さを比較する工程を包含し得る。ＰＣＲおよび／またはＬＣＲは、本明細書中に記載されている変異体の検出に使用される技術のいずれかと組合せて、予備的な増幅工程として使用されることが所望される場合がある。

【０１９８】

別の増幅方法には、以下が含まれる：自己維持配列の複製（Ｇｕａｔｅｌｌｉら（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：１８７４－１８７８）、転写増幅システム（Ｋｗｏｈら（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１１７３－１１７７）、Ｑ－βレプリカーゼ（Ｌｉｚａｒｄｉら（１９８８）ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６：１１９７）、または任意の他の核酸増幅方法、それに続く当業者に周知の技術を使用する増幅された分子の検出。これらの検出体系は、このような分子が非常に少ない数で存在する核酸分子の検出に特に有用である。

【０１９９】

代替の実施形態においては、サンプル細胞由来のＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子中の変異は、制限酵素切断パターンの変化によって同定することができる。例えば、サンプルおよびコントロールＤＮＡが単離され、増幅され（必要に応じて）、１つ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、そしてフラグメント長の大きさがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルとコントロールＤＮＡとの間でのフラグメント長の大きさの差異は、サンプルＤＮＡ中での突然変異を示す。さらに、配列特異的リボザイムの使用（例えば、米国特許第５，４９３，５３１号）は、リボザイム切断部位の発生または消滅によって特異的突然変異の存在を記録するために使用することができる。

【０２００】

他の実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒの遺伝子変異は、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含有している高密度アレイに対して、サンプルおよびコントロール核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）をハイブリダイズさせることによって同定され得る（Ｃｒｏｎｉｎら（１９９６）Ｈｕｍａｎ Ｍｕｔａｔｉｏｎ ７：２４４－２５５；Ｋｏｚａｌら（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．２：７５３－７５９）。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒの遺伝子変異は、Ｃｒｏｎｉｎら（１９９６）Ｈｕｍａｎ Ｍｕｔａｔｉｏｎ ７：２４４－２５５に記載されているような、光によって作成したＤＮＡプローブを含有している二次元アレイ中で同定することができる。簡潔には、プローブの第１のハイブリダイゼーションアレイは、連続して重複しているプローブの直線的な並びを作成することによって配列間での塩基変化を同定するために、サンプルおよびコントロール中のＤＮＡの長いストレッチを徹底的にスキャンするために使用され得る。この工程は、点変異の同定が可能である。この工程には、検出される全ての改変体または変異体に相補的である、より小さい特殊化されたプローブアレイを使用することに

よって、特異的な変異体の特徴付けを可能にする第２回目のハイブリダイゼーションアレイが続く。それぞれの変異体アレイは、類似のプローブのセット、野生型遺伝子に相補的なもの、および変異遺伝子に相補的な他のものから構成される。

【０２０１】

なお別の実施形態においては、当該分野で公知の任意の種々の配列決定反応が、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子を直接配列決定し、そして対応している野生型（コントロール）配列とサンプルＢＡＦＦ－Ｒの配列とを比較することによって変異体を検出するために、使用され得る。配列決定反応の例には、ＭａｘｉｍおよびＧｉｌｂｅｒｔ（１９７７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７４：５６０またはＳａｎｇｅｒ（１９７７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７４：５４６３によって開発された技術に基づく反応が含まれる。質量スペクトル分析による配列決定（例えば、ＰＣＴ国際公開番号第ＷＯ９４／１６１０１号；Ｃｏｈｅｎら（１９９６）Ａｄｖ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．３６：１２７－１６２；およびＧｒｉｆｆｉｎら（１９９３）Ａｐｐｌ．Ｂｉｃｈｅｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３８：１４７－１５９を参照のこと）を含む、任意の種々の自動配列決定手順が、診断アッセイ（Ｎａｅｖｅら（１９９５）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９：４４８）を行う場合に利用され得ることもまた、意図される。

【０２０２】

ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の変異の検出のための他の方法には、切断試薬からの保護が、ＲＮＡ／ＲＮＡまたはＲＮＡ／ＤＮＡヘテロ二重螺旋中の不適合の塩基を検出するために使用される方法が含まれる（Ｍｙｅｒｓら（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：１２４２）。一般的には、「不適合切断」の技術分野は、野生型ＢＡＦＦ－Ｒ配列を含有している（標識された）ＲＮＡまたはＤＮＡを、組織サンプルから得られた可能性のある変異体ＲＮＡまたはＤＮＡとともにハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重螺旋を提供することによって開始する。２本鎖二重螺旋は、コントロール鎖とサンプル鎖との間での塩基対不適合に起因して存在する、二重螺旋の１本鎖領域を切断する試薬で処理される。例えば、ＲＮＡ／ＤＮＡ二重螺旋は、ＲＮａｓｅで処理され得、そしてＤＮＡ／ＤＮＡハイブリッドはＳ１ヌクレアーゼで処理されて、不適合の領域を酵素的に消化することができる。他の実施形態においては、ＤＮＡ／ＤＮＡまたはＲＮＡ／ＤＮＡ二重螺旋のいずれかが、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで、および不適合の領域を消化するためにピペリジンで処理され得る。不適合の領域の消化後、得られた材料は、次いで、変異部位を決定するために、変性ポリアクリルアミドゲル上で大きさによって分離される。例えば、Ｃｏｔｔｏｎら（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：４３９７；Ｓａｌｅｅｂａら（１９９２）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：２８６－２９５を参照のこと。１つの実施形態においては、コントロールＤＮＡまたはＲＮＡを、検出のために標識することが可能である。

【０２０３】

なお別の実施形態においては、不適合切断反応は、細胞サンプルから得られたＢＡＦＦ－Ｒ ｃＤＮＡ中の点変異を検出およびマッピングするために定義されたシステム中で、２本鎖のＤＮＡ中の不適合の塩基対を認識する１つ以上のタンパク質（いわゆる、「ＤＮＡ不適合修復」酵素）を使用する。例えば、Ｅ．ｃｏｌｉのｍｕｔＹ酵素は、Ｇ／Ａ不適合のＡを切断し、そしてＨｅＬａ細胞由来のチミジンＤＮＡグリコシラーゼはＧ／Ｔ不適合のＴを切断する（Ｈｓｕら（１９９４）Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ １５：１６５７－１６６２）。例示的な実施形態に従うと、ＢＡＦＦ－Ｒ配列（例えば、野生型ＢＡＦＦ－Ｒ配列）に基づくプローブが、試験細胞由来のｃＤＮＡまたは他のＤＮＡ産物にハイブリダイ

ズさせられる。二重螺旋は、ＤＮＡ不適合修復酵素で処理され、そして切断産物（存在する場合）は、電気泳動プロトコールなどによって検出され得る。例えば、米国特許第５，４５９，０３９号を参照のこと。

【０２０４】

他の実施形態においては、電気泳動の移動度の変化は、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子中の変異の同定のために使用される。例えば、１本鎖の立体構造の多型（ＳＳＣＰ）は、変異体と野生型の核酸との間での電気泳動の移動度の差異を検出するために使用され得る（Ｏｒｉｔａら（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：２７６６、Ｃｏｔｔｏｎ（１９９３）Ｍｕｔａｔ．Ｒｅｓ．２８５：１２５－１４４；Ｈａｙａｓｈｉ（１９９２）Ｇｅｎｅｔ．Ａｎａｌ．Ｔｅｃｈ．Ａｐｐｌ．９：７３－７９もまた参照のこと）。サンプルおよびコントロールＢＡＦＦ－Ｒ核酸の１本鎖のＤＮＡフラグメントは変性させられ、そして再生させられる。１本鎖核酸の二次構造は配列に従って変化し、得られる電気泳動の移動度の変化は、単一の塩基の変化をもなお検出することが可能である。ＤＮＡフラグメントは標識され得るか、または標識されたプローブを用いて検出され得る。アッセイの感受性は、（ＤＮＡよりもむしろ）ＲＮＡ（その二次構造は配列の変化により敏感である）の使用によって増大させることができる。１つの実施形態においては、本発明の方法は、電気泳動の移動度の変化に基づいて２本鎖のヘテロ二重螺旋分子を分類するためのヘテロ二重螺旋分析を利用する（Ｋｅｅｎら（１９９１）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．７：５）。

【０２０５】

なお別の実施形態においては、変性剤の勾配を含有しているポリアクリルアミドゲル中での変異体または野生型フラグメントの移動が、変性勾配ゲル電気泳動（ＤＧＧＥ）を使用してアッセイされる（Ｍｙｅｒｓら（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１３：４９５）。ＤＧＧＥが分析方法として使用される場合は、ＤＮＡは、それが完全には変性させられないことを確実にするために、例えば、ＰＣＲによって、約４０ｂｐの高い融点のＧＣリッチＤＮＡのＧＣクランプを付加させることによって、改変される。さらなる実施形態においては、温度勾配が、コントロールおよびサンプルＤＮＡの移動度の差異を同定するために、変性勾配の代わりに使用される（ＲｏｓｅｎｂａｕｍおよびＲｅｉｓｓｎｅｒ（１９８７）Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｃｈｅｍ．２６５：１２７５３）。

【０２０６】

点変異の検出のための他の技術の例には、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマーエクステンションが含まれるがこれらに限定されない。例えば、既知の変異が中心に配置され、次いで完全な適合が見られる場合にのみハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的ＤＮＡにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドプライマーが調製され得る（Ｓａｉｋｉら（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２４：１６３；Ｓａｉｋｉら（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：６２３０）。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーション膜に付着させられ、そして標識された標的ＤＮＡとハイブリダイズする場合に、ＰＣＲ増幅された標的ＤＮＡまたは多数の種々の変異体にハイブリダイズする。

【０２０７】

あるいは、選択的ＰＣＲ増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術が、本発明と組合せて使用され得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心に（その結果、増幅はディファレンシャルハイブリダイゼーションに依存する）（Ｇｉｂｂｓら（１９８９）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ．Ｒｅｓ．１７：２４３７－２４４８）または一方のプライマーの３’末端の先端（ここでは、適切な条件下で、不適合が妨げられるかまたはポリメラーゼエク

ステンションが減少する）に、目的の変異を保有し得る（Ｐｒｏｓｓｎｅｒ（１９９３）Ｔｉｂｔｅｃｈ　１１：２３８）。さらに、切断に基づく検出を生じるように、変異の領域に新規の制限部位を導入することが所望される場合がある（Ｇａｓｐａｒｉｎｉら（１９９２）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｂｅｓ　６：１）。特定の実施形態においては、増幅はまた、増幅のためのＴａｑリガーゼを使用して行われ得ることが予測される（Ｂａｒａｎｙ（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：１８９）。このような場合には、連結は、５’配列の３’末端に完全な適合が存在する場合にのみ生じ、それによって増幅の存在または非存在の観察から特異的部位での既知の変異の存在を検出することを可能にする。

【０２０８】

本明細書中に記載されている方法は、例えば、本明細書中に記載されている少なくとも１つのプローブ核酸または抗体試薬を含有している、予めパッケージされた診断キットの利用によって行われ得る。これらは、例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子が関係している疾患または疾病の徴候または家族性病歴を示す患者を診断するための臨床的な設定において、便利に使用され得る。

【０２０９】

さらに、ＢＡＦＦ－Ｒが発現される任意の細胞型または組織は、本明細書中に記載されている予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、核を有している細胞を含有している任意の生物学的サンプル（例えば、頬の粘膜細胞を含む）が、使用され得る。

【０２１０】

（薬理ゲノム学）

本明細書中に記載されているスクリーニングアッセイによって同定されるような、ＢＡＦＦＦ－Ｒ活性（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の発現）に対して刺激性または阻害性の作用を有する試薬または調節因子は、障害（例えば、ガンに関連する障害または自己免疫生障害）を処置（予防的または治療的に）するために個体に対して投与され得る。このような処置と組合せて、個体の薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と個体の外来化合物もしくは薬物に対する応答との間の関係の研究）が考慮され得る。治療薬の代謝の差異は、薬理学的に活性な薬剤の用量と血中濃度との間の関係を変化させることによって、重篤な毒性または治療の失敗を導くことが可能である。このように、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づいて、予防的または治療的処置に有効な試薬（例えば、薬物）の選択を可能にする。このような薬理ゲノム学はさらに、適切な投与量および治療レジメを決定するために使用され得る。従って、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の活性、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸の発現、または個体中でのＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の変異の内容が、それによって個体の治療的または予防的処置に適切な試薬（単数または複数）を選択するために決定され得る。

【０２１１】

薬理ゲノム学は、罹患しているヒトにおける薬物の生体内分布の変化および異常な作用に起因して、薬物に対する応答の臨床的に有意な遺伝性のバリエーションを処理する。例えば、Ｅｉｃｈｅｌｂａｕｍ（１９９６）Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．２３：９８３－９８５およびＬｉｎｄｅｒ（１９９７）Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．４３：２５４－２６６を参照のこと。一般的には、薬理ゲノム学的状態の以下の２つの型が区別され得る；体に対する薬物の作用方法を変更する（薬物作用の変更）シグナル因子として伝達される遺伝的状態、または薬物の対する体の作用を変更する（薬物代謝の変更）シグナル因子として伝達される遺伝的状態。薬理ゲノム学的状態は、まれな異常としてまたは多型現象としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤ）欠損は、一般的な遺伝性の酵素欠損症である。ここでは

、主な臨床的な合併症は、酸化剤（抗マラリア薬、スルホンアミド、鎮痛剤、ニトロフラン）の経口摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

【０２１２】

例示的な実施形態として、薬物を代謝する酵素の活性は、薬物作用の強度および持続期間の両方の主用な決定因子である。薬物を代謝する酵素（例えば、Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ２（ＮＡＴ２）、ならびにチトクロームＰ４５０酵素ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９）の遺伝子の多型現象の発見は、一部の患者が期待される薬物効果を得られないか、または誇張された薬物応答および重篤な毒性を薬物の標準用量および安全用量の服用後に示す理由の説明を提供した。これらの多型現象は、集団中の２つの表現形（多量の代謝因子（ｍｅｔａｂｏｌｉｚｅｒ）（ＥＭ）および少量の代謝因子（ＰＭ））で発現される。ＰＭの出現率は、種々の集団間で異なる。例えば、ＣＹＰ２Ｄ６をコードする遺伝子は高度の多型現象があり、そしていくつかの変異がＰＭにおいて同定されている。これらは、全て、機能的なＣＹＰ２Ｄ６が存在しないことを導く。ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９の少量の代謝因子は、それらが標準的な用量で受容された場合に、極めて頻繁に、誇張された薬物応答および副作用を示す。転写因子が活性な治療部分である場合は、ＰＭは、そのＣＹＰ２Ｄ６を形成する代謝生成物であるモルヒネによって媒介されるコデリンの鎮痛作用について示されるように、治療応答を示さない。他の極端な作用は、いわゆる超迅速な代謝因子であり、これは標準的な用量には応答しない。最近、超迅速な代謝の分子機構が、ＣＹＰ２Ｄ６遺伝子の増幅に起因することが同定されている。

【０２１３】

このように、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の活性、ＢＡＦＦ－Ｒ核酸の発現、または個体中でのＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の変異の内容が、それによって個体の治療的または予防的処置に適切な試薬（単数または複数）を選択するために、決定され得る。さらに、薬理ゲノム学の研究は、個体の薬物応答性の表現形の同定のために、薬物を代謝する酵素をコードする多型性対立遺伝子の遺伝子分類への適用に使用され得る。この知見は、用量または薬物の選択に適用される場合には、有害な反応または治療の失敗を回避することが可能であり、従って、ＢＡＦＦ－Ｒ調節因子（例えば、本明細書中に記載されている例示的なスクリーニングアッセイの１つによって同定される調節因子）で被験体を処置した場合の治療または予防効率を増大させることができる。

【０２１４】

（臨床的有効性のモニタリング）

ＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に対する試薬（例えば、薬物または化合物）の影響（例えば、異常な細胞増殖および／または分化を調節する能力）のモニタリングは、基本的な薬物スクリーニングだけではなく、臨床試験においてもまた適用され得る。例えば、本明細書中に記載されているスクリーニングアッセイによって決定される試薬の、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の発現、タンパク質レベルを増大させること、またはＢＡＦＦ－Ｒ活性をアップレギュレートすることの有効性は、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の発現、タンパク質レベルの低下、またはＢＡＦＦ－Ｒ活性のダウンレギュレーションを示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の発現、タンパク質レベルを減少させるかまたはＢＡＦＦ－Ｒ活性をダウンレギュレートするためのスクリーニングアッセイによって決定された試薬の有効性は、ＢＡＦＦ－Ｒ遺伝子の発現、タンパク質レベルの増大、またはＢＡＦＦ－Ｒ活性のアップレギュレーションを示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験においては、ＢＡＦＦ－Ｒおよび好ましくは、例えば、障害に関係している他の遺伝子の発現または活性が、特定の細胞の免疫応答性の「読み出し」またはマーカーとして使用され得る。

【０２１５】

例えば、ＢＡＦＦ－Ｒを含む、ＢＡＦＦ－Ｒ活性を調節する試薬（例えば、化合物、薬物、または低分子）での処置によって細胞中で調節される遺伝子が、同定され得る（例えば、本明細書中に記載されているようなスクリーニングアッセイにおいて同定される）。このように、（例えば、臨床試験において）細胞増殖性障害に対する試薬の作用を研究するためには、細胞が単離され得、そしてＲＮＡが調製され得、そしてＢＡＦＦ－Ｒおよび障害に関係している他の遺伝子の発現レベルについて分析され得る。遺伝子の発現レベル（すなわち、遺伝子の発現パターン）は、本明細書中に記載されているように、ノーザンブロット分析もしくはＲＴ－ＰＣＲによって、あるいは、産生されるタンパク質の量を測定することによって、本明細書中に記載されている方法の１つによって、あるいは、ＢＡＦＦ－Ｒまたは他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この方法においては、遺伝子の発現パターンは、試薬に対する細胞の生理学的応答の指標であるマーカーとして作用し得る。従って、この応答状態は、試薬での個体の処置の前、処置の間の種々の時点で決定され得る。

【０２１６】

１つの実施形態においては、本発明は、以下の工程を包含している、試薬（例えば、本明細書中で記載されているスクリーニングアッセイによって同定された、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、低分子、または他の薬物候補）での被験体の処置の有効性をモニタリングするための方法を提供する：（ｉ）試薬の投与前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；（ｉｉ）投与前サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現レベルを検出する工程；（ｉｉｉ）被験体から１つ以上の投与後サンプルを得る工程；（ｉｖ）投与後サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現または活性のレベルを検出する工程；（ｖ）投与前サンプル中のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現または活性のレベルを、投与後サンプル（単数または複数）中のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡと比較する工程；ならびに（ｖｉ）それに従って、被験体への試薬の投与を変更する工程。例えば、試薬の投与の増大は、検出されたものよりも高いレベルにＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性を増大させるために（すなわち、試薬の有効性を増大させるために）、所望され得る。あるいは、試薬の投与の減少は、検出されたものよりも低いレベルにＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性を減少させるために（すなわち、試薬の有効性を減少させるために）所望され得る。

【０２１７】

（処置方法）

本発明は、異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に関係している障害の危険がある（またはその疑いのある）か、またはそのような障害を有している被験体を処置する、予防的および治療的方法を提供する。

【０２１８】

レベルまたは生物学的活性の増大（疾患または障害を罹患していない被験体と比較して）によって特徴付けられる疾患および障害は、活性をアンタゴナイズする（すなわち、減少させるかまたは阻害する）治療薬で処置され得る。活性をアンタゴナイズする治療薬は、治療的または予防的な様式で投与され得る。利用され得る治療薬には、以下が含まれるがこれらに限定されない：（ｉ）ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド、またはそれらのアナログ、誘導体、フラグメント、もしくはホモログ；（ｉｉ）ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドに対する抗体；（ｉｉｉ）ＢＡＦＦ－Ｒペプチドをコードする核酸；（ｉｖ）アンチセンス核酸および「機能不全」の核酸（すなわち、ＢＡＦＦ－Ｒペプチドに対するコード配列中への異種の挿入物に起因する）の投与が、相同組換えによるＢＡＦＦ－Ｒペプチドの内因性機能の「ノックアウト」のために利用される（例えば、Ｃａｐｅｃｃｈｉ（１９８９

）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４４：１２８８－１２９２を参照のこと）；あるいは（ｖ）ＢＡＦＦ－Ｒペプチドとその結合パートナーとの間での相互作用を変更する調節因子（すなわち、阻害因子、アゴニスト、およびアンタゴニスト（本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに特異的な抗体を含む））。

【０２１９】

レベルまたは生物学的活性の低下（疾患または障害を罹患していない被験体と比較して）によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増大させる（すなわち、それに対するアゴニストである）治療薬で処置され得る。活性をアップレギュレートする治療薬が、治療的または予防的な様式で投与され得る。利用され得る治療薬には、ＢＡＦＦ－Ｒペプチド、またはそれらのアナログ、誘導体、フラグメント、もしくはホモログ；あるいは、生体利用可能性を増大させるアゴニストが含まれるが、これらに限定されない。

【０２２０】

レベルの増大または減少は、ペプチドおよび／またはＲＮＡを定性することによって、（例えば、生検組織から）患者の組織サンプルを得ること、ならびにＲＮＡもしくはペプチドのレベル、または発現されたペプチド（またはＢＡＦＦ－ＲペプチドのｍＲＮＡ）の構造、および／もしくは活性についてインビトロでアッセイすることによって、容易に検出することができる。当該分野で周知の方法には、イムノアッセイ（例えば、ウェスタンウロット分析、免疫沈降、それに続くドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学などによる）、および／またはｍＲＮＡの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）が含まれるが、これらに限定されない。

【０２２１】

１つの局面においては、本発明は、被験体の、異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性に関係している疾患または状態を、ＢＡＦＦ－Ｒの発現を調節するかまたは少なくとも１つのＢＡＦＦ－Ｒ活性を調節する試薬を被験体に投与することによって、予防するための方法を提供する。異常なＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性によって引き起こされるかまたはそれに寄与する疾患の危険がある被験体は、例えば、本明細書中に記載されている診断的または予防的アッセイのいずれかまたはそれらの組合せによって同定され得る。予防薬の投与は、ＢＡＦＦ－Ｒの異常性の特徴である徴候の発現の前に行われ得る。その結果、疾患または障害は予防されるか、あるいはその進行が遅延させられる。ＢＡＦＦ－Ｒの異常性の型に依存して、例えば、ＢＡＦＦ－Ｒアゴニスト試薬またはＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニスト試薬が、被験体の処置に使用され得る。適切な試薬は、本明細書中に記載されているスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

【０２２２】

本発明の別の局面は、治療目的のためにＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法には、細胞に関係しているＢＡＦＦ－Ｒタンパク質活性の１つ以上の活性を調節する試薬を細胞と接触させる工程を包含する。ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の活性を調節する試薬は、核酸、またはタンパク質、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質の天然に存在している同性質のリガンド、ペプチド、ＢＡＦＦ－Ｒペプチド模倣物、または他の低分子であり得る。１つの実施形態においては、試薬は、１つ以上のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質活性を刺激する。このような刺激因子の例には、活性なＢＡＦＦ－Ｒタンパク質、および細胞中に導入されているＢＡＦＦ－Ｒをコードする核酸分子が含まれる。別の実施形態においては、試薬は、１つ以上のＢＡＦＦ－Ｒタンパク質活性を阻害する。このような阻害性の試薬の例には、アンチセンスＢＡＦＦ－Ｒ核酸分子および抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体が含まれる。これらの調節方法は、インビトロで（例えば、細胞を試薬とともに培養することによって）、あるいはインビボで（例えば、被験体に対して試

薬を投与することによって）行われ得る。このように、本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質または核酸分子の異常な発現または活性によって特徴付けられる疾患または障害に罹患している個体を処置する方法を提供する。１つの実施形態においては、この方法は、ＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートするかまたはダウンレギュレートする）試薬（例えば、本明細書中に記載されているスクリーニングアッセイによって同定される試薬）、またはそのような試薬の組合せを投与する工程を包含する。別の実施形態いおいては、この方法は、ＢＡＦＦ－Ｒの発現または活性の減少またはその異常を補うための治療として、ＢＡＦＦ－Ｒタンパク質または核酸分子を投与する工程を包含する。

【０２２３】

１つの実施形態においては、本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒを使用する方法を提供する。このような方法には、Ｂ細胞の増殖、樹状細胞によって誘導されるＢ細胞の増殖、およびＢＡＦＦ－Ｒの少なくともＢＡＦＦ結合部分を含有しているＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを使用する、動物中での成熟または免疫グロブリンの産生を阻害する方法が含まれる。他の実施形態には、Ｂ細胞の増殖、樹状細胞によって誘導されるＢ細胞の増殖、およびＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを使用して、動物中での成熟または免疫グロブリンの産生を刺激する方法（例えば、ＢＡＦＦ－Ｒの十分な発現を可能にするベクターでＢＡＦＦ－Ｒ欠損細胞をトランスフェクトすることによるか、またはＢＡＦＦ－Ｒに結合するかＢＡＦＦを模倣する抗体を投与することによる）が含まれる。

【０２２４】

別の実施形態においては、本発明は、自己免疫性疾患、高血圧、心臓血管障害、腎臓障害、Ｂ細胞リンパ増殖障害、免疫抑制性疾患、器官の移植、およびＨＩＶの処置においてＢＡＦＦ－Ｒを使用する方法を提供する。ＢＡＦＦ－Ｒとそのリガンドとの間でのシグナル伝達に関係している免疫応答を処置、抑制、または変更するために試薬を使用する方法、およびＢＡＦＦ－Ｒまたはそのエピトープに特異的な抗体の投与によって炎症を阻害する方法もまた、含まれる。

【０２２５】

本発明の方法は、好ましくは、治療有効量のＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド、異種アミノ酸配列に融合されたＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを含有しているキメラ分子、または抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体ホモログを投与することによって行われる。

【０２２６】

１つの実施形態においては、本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含有している薬学的組成物を提供する。

【０２２７】

別の実施形態においては、本発明は、異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合されたＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを含有しているキメラ分子を提供する。このようなキメラ分子の例には、免疫グロブリンのＦｃ領域またはエピトープタグ配列に融合されたＢＡＦＦ－Ｒが含まれる。

【０２２８】

別の実施形態においては、本発明は、ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。必要に応じて、抗体はモノクローナル抗体である。

【０２２９】

本発明の１つの実施形態は、ＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニストを含有している組成物の治療有効量を哺乳動物に投与することによって、所望されない細胞増殖に関係している状態について哺乳動物を処置する方法である。ここでは、ＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニストは、ＢＡＦＦ－Ｒとその同性質のレセプター（単数または複数）との間での相互作用をアンタゴナイズするポリペプチドを、薬学的に受容可能な賦形剤とともに含む。

【０２３０】
好ましい実施形態においては、細胞表面上のＢＡＦＦの同性質のレセプターは、ＢＡＦＦ－Ｒである。
【０２３１】
この方法は、ＢＡＦＦとその同性質のレセプター（単数または複数）との間での相互作用をアンタゴナイズするポリペプチドを有する、任意のＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニストとともに使用され得る。ＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニストの例には、可溶性ＢＡＦＦ－Ｒポリペプチド、可溶性キメラＢＡＦＦ－Ｒ分子（これには、ＢＡＦＦ－Ｒ－ＩｇＧ－Ｆｃおよび抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体ホモログが含まれるがこれらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない。
【０２３２】
本発明の方法は、所望されない細胞増殖に関係している任意の状態とともに使用され得る。詳細には、本発明の方法は、ＢＡＦＦおよび／またはＢＡＦＦ－Ｒを発現する腫瘍細胞を処置するために使用され得る。
【０２３３】
その細胞増殖がＢＡＦＦによって調節されるガンの例は、腫瘍組織ライブラリー中で発現されるＢＡＦＦおよび／またはＢＡＦＦ－Ｒメッセージのレベルをインビトロで測定することによってスクリーニングされ得る。ＢＡＦＦおよび／またはＢＡＦＦ－Ｒメッセージが高度に発現される腫瘍組織ライブラリーが候補である。あるいは、公的なおよび個人的なデータベース（すなわち、Ｉｎｃｙｔｅデータベース）を、例えば、全長のヒトＢＡＦＦ　ｃＤＮＡ配列を用いて候補を検索するために、スクリーニングし得る。
【０２３４】
所望されない細胞増殖に関係している状態の処置（詳細には、腫瘍の治療）に使用される本発明のＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニストは、有利には、細胞増殖の１０％、２０％、３０％、または４０％以上を阻害し、そして最も有利には、５０％以上を阻害する。ＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニストは、スクリーニングによって得られる。例えば、ＢＡＦＦ－Ｒアンタゴニストは、ヒトの結腸ガン腫ＨＴ２９またはヒト肺ガン腫Ａ５４９（これらは、それぞれ結腸および肺の腫瘍に由来する）に対する増殖阻害活性（すなわち、１０％、２０％、３０％、４０％、または５０％以上）に基づいて選択され得る。
【０２３５】
本発明の別の実施形態は、Ｂ細胞の増殖およびＢ細胞以外の細胞増殖、樹状細胞によって誘導されるＢ細胞の増殖、ならびに上記に記載されているようなＢＡＦＦ－Ｒポリペプチドを使用する、動物中での成熟または免疫グロブリンの産生を阻害する方法を提供する。
【０２３６】
Ｂ細胞およびＢ細胞以外の細胞の増殖、樹状細胞によって誘導されるＢ細胞の増殖、ならびに成熟または免疫グロブリンの産生を阻害する方法はまた、ＢＡＦＦ－Ｒに結合し、そしてＢＡＦＦのＢＡＦＦ－Ｒへの結合を阻害する、抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）の投与を含む場合がある。抗体の投与は、それによってＢ細胞およびＢ細胞以外の細胞の増殖、樹状細胞によって誘導されるＢ細胞の増殖、ならびに成熟または免疫グロブリンの産生を阻害する。使用に適切であり得る抗体の量は、本明細書中に提供されるインビボでのデータから推定され得る。例えば、体重または表面積に基づく推論法を含む、動物実験から投与量を推論するための種々の方法が、当該分野で公知である。
【０２３７】
本発明のいくつかの実施形態においては、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃポリペプチドまたは抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体は、約１から２０ｍｇ／ｋｇ／用量の量で投与される。複数の用量が、必要に応じて、１週間に２回、１週間に１回、２週間に１回、ま

たは１ヶ月に１回与えられ得る。医師は、全ての不適切な治療効果を減少させるように考慮した効率を決定することによって、適切な用量を決定することができる。

【０２３８】

別の実施形態においては、本発明は、自己免疫性疾患、高血圧、心臓血管障害、腎臓障害、Ｂ細胞リンパ増殖障害、免疫抑制性疾患、器官の移植、炎症、およびＨＩＶの処置において、ＢＡＦＦ－Ｒまたは抗ＢＡＦＦ－Ｒ抗体を使用する方法を提供する。ＢＡＦＦ－Ｒとそのリガンドとの間のシグナル伝達経路に関係している免疫応答を処置、抑制、または変更するための試薬の使用方法もまた、含まれる。

【０２３９】

（ＢＡＦＦ－ＲおよびＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃを含む、発現されたタンパク質の凝集を阻害する方法）

本発明はまた、発現されたタンパク質特に、ヒトＢＡＦＦ－ＲおよびＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ）の凝集を阻害するかまたは減少させる方法を提供する。発現されたタンパク質は、発現の間に凝集する傾向があり、これは高い収量での精製を失敗させる。本発明の方法においては、組換えシステム中で発現させられた場合に凝集する傾向にあるタンパク質のアミノ酸配列は、低い凝集活性を示すタンパク質ホモログのアミノ酸配列と比較される。２つのホモログは、それらの間に保存されたドメインおよび保存されていないアミノ酸を有し、そしてこれらはおそらくその中に散在している。一般的には、凝集タンパク質の少なくとも１つの保存されていないアミノ酸が、凝集を緩和するためにホモログ中のアミノ酸で置換され得る。いくつかの実施形態においては、非極性のアミノ酸が置換される。非極性のアミノ酸には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、およびシステインが含まれる、いくつかの実施形態においては、非極性のアミノ酸は、他の非極性のアミノ酸を置換する。凝集を阻害するかまたは減少させるために好ましい非極性のアミノ酸は、プロリンおよびアラニンである。他の実施形態においては、荷電していない極性のアミノ酸は、非極性のアミノ酸で置換される。荷電していない極性のアミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、およびチロシンが含まれる。

【０２４０】

本発明の方法においては、好ましくは、タンパク質の生物学的活性を保持する置換が行われる、一般的には、保存されていないアミノ酸は、生物学的活性に対して評価されるほどの影響を与えることなく、状況に順応させられる。

【０２４１】

本発明の方法の特異的な例においては、ヒトＢＡＦＦ－Ｒタンパク質は、配列番号５のＶ２０、Ｐ２１、Ａ２２、およびＬ２７位（配列番号１２のＶ４１、Ｐ４２、Ａ４３、およびＬ４８位）で、ならびにそれらの種々の組合せで導入されるアミノ酸置換を有する場合がある。これらは、タンパク質の凝集を大きく緩和させる。同様の方法論が、組換えシステム中で発現された場合に凝集する傾向がある他のタンパク質について使用され得る。操作の特定の理論のいずれにも束縛されることは望まないが、荷電していない極性のアミノ酸の非極性のアミノ酸での置換は、タンパク質に可溶性を与え、そしてタンパク質間の非極性領域の凝集を防止すると考えられている。

【０２４２】

本発明は、本明細書中に記載されている特異的な実施形態によっては、範囲は限定されない。実際、本明細書中に記載されているものに加えて、発明の種々の改変が、上記および添付の図面から当業者に明らかとなる。このような改変は、添付の特許請求の範囲に入ると思われる。

【０２４３】
（実施例）
（実施例１）
本実施例は、ＢＡＦＦの新規のレセプターであるＢＡＦＦ－Ｒの分子クローニングを記載する。
【０２４４】
（材料および方法）
オリゴｄＴでプライムしたｃＤＮＡライブラリーを、ヒトＢＡＦＦに結合するヒトＢ細胞株であるＢＪＡＢ細胞から作成し、そして発現ベクターＣＨ２６９中に直接クローン化した。ＣＨ２６９は、クローン化されたＤＮＡの発現を駆動するためのＣＭＶプロモーターを含み、そしてＥＢＶのｏｒｉＰをもまた含む、ｐＣＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の誘導体である。これは、ＥＢＮＡ－１で安定に形質転換された細胞（例えば、２９３ＥＢＮＡ）中でのこれらのプラスミドの多コピーの自律複製を可能にする。ＢＪＡＢ ｃＤＮＡライブラリーをＥ．ｃｏｌｉ ＤＨ１０Ｂ細胞中にトランスフェクトし、そして１ウェルあたり約２５００個の独立コロニーのプールとして９６ウェル形式で播種した。Ｑｉａｇｅｎ ＢｉｏＲｏｂｏｔ ９６００を使用してこれらのプールからＤＮＡを調製した。ＤＮＡのプールを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（Ｌｉｆｅ ＴＥｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、フィブロネクチンでコートした６ウェルディッシュ中に播種した２９３ＥＢＮＡ細胞中にトランスフェクトした。感染の４８時間後に、培地を除去し、そして細胞を、プレートアッセイ洗浄緩衝液（２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、０．５ｍｇ／ｍｌのウシ血清アルブミン、０．１％のNaN_3）で洗浄した。細胞の単層を、結合緩衝液（ＰＢＳ，２％のウシ胎児血清、０．１％のNaN_3）中の１００ｍｇ／ｍｌのビオチン化したヒト組換え可溶性ｍｙｃ－ＢＡＦＦ（ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦ）で重層し、そして室温で１時間インキュベートした。アッセイに使用したｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦ（アミノ酸１３６～２８５）を、Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ中で発現させ、そして陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製し、その後ゲル濾過した。
【０２４５】
ＢＡＦＦ溶液を除去し、そして細胞を洗浄し、ＰＢＳ中の１．８％のホルムアルデヒド－０．２％のグルタルアルデヒドでの５分間のインキュベーションによって固定した。細胞を再び洗浄し、次いで３０分間、結合緩衝液中のストックから１：３０００希釈で、アルカリホスファターゼと結合させたストレプトアビジン（ＳＡＶ－ＡＰ）（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）とともにインキュベートした。細胞を洗浄し、そしてファストレッド／ナフトールホスフェート（Ｐｉｅｒｃｅ）で染色した。ビオチン－ＢＡＦＦ／ＳＡＶ－ＡＰ複合体を結合している細胞を、低パワー顕微鏡下での目視検査後に赤色の沈殿の存在によって同定した。二次スクリーニングは、単一コロニーについてのＢＡＦＦ結合プールのＤＨ１０Ｂグリセロールストックをプレートアウトすること、１００のプールにおいて培養物に接種すること、および上記のようなＢＡＦＦ結合アッセイを繰り返すことを要した。二次スクリーニングのポジティブなプールを、個々のクローンに同様に分解させ、そして上記のように、２９３ＥＢＮＡへのトランスフェクションの際のＢＡＦＦの結合についてアッセイした。個々のＢＡＦＦ結合クローンのＤＮＡ配列を決定した。
【０２４６】
（結果）
ＢＡＦＦに結合するクローンの１つは、ｐＪＳＴ５７６であった。これは、ポリＡテールを含まない１２０１塩基対（ｂｐ）の挿入物の大きさを有する。ｐＪＳＴ５７６の挿入物の配列を、図１Ａ（配列番号１）に示す。このクローンのＢＬＡＳＴ分析は、染色体２２のＢＡＣクローンＨＳ２５０Ｄ１０（検索番号Ｚ９

９７１６）に対して、Ｇｅｎｂａｎｋデータベースにおいて相同性を示した。ｐＪＳＴ５７６の全体の配列を、このＢＡＣ中に見出した。相同性をまた、ヒトＥＳＴ、ＡＩ２５０２８９（ＩＭＡＧＥクローン２０００２７１）の３’末端に対しても見出した。ＥＳＴを、ヒトの濾胞性リンパ腫のライブラリーから作成した。ＥＳＴ　ＡＩ２５０２８９をＩｎｃｙｔｅから得、そして挿入物の配列を決定した（図１Ｂ）（配列番号２）。この配列は、１５ｂｐの５’配列をｐＪＳＴ５７６配列に対して付加しており（これはゲノム配列と連続している）、そして２３ｂｐはそうではない。ＥＳＴ配列の残りは、ｐＪＳＴ５７６と完全な相同性を有する。オープンリーディングフレームは、これらのクローンにおいては同一ではあり得ない。

【０２４７】

（実施例２）

本実施例において、本発明者らは、ＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡがイントロンを含み、次いでオープンリーディングフレームを確立することを決定する。

【０２４８】

（方法）

ＧＥＮＳＣＡＮ（Ｂｕｒｇｅ，Ｃ．およびＫａｒｌｉｎ，Ｓ．Ｊ．（１９９７）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６８：７８－９４）エキソン推定プログラムを、ＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡ配列について行った。このプログラムの結果は、ｃＤＮＡ中にイントロンが存在することを推定した。推定が正確であるかどうかを決定するために、ＰＣＲ分析を、ＪＳＴ５７６を発現する２つの細胞株由来の第１鎖ｃＤＮＡについて行った。ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、約１０７個のＢＪＡＢまたはＩＭ－９細胞から、製造業者によって提案されるプロトコールに従って精製した。ＲＮＡを定量し、そして５μｇを、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ予備増幅キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して第１鎖のｃＤＮＡ反応に使用した。オリゴｄＴおよびランダムヘキサマーの両方を、第１鎖生成物を作製するために使用した。第１鎖の合成を、推奨されるプロトコールに従って行った。次いで、３個（それぞれの反応のうちの１つ）においては、１０ｎｇのＪＳＴ５７６またはＤＮＡを含まないものを、推定したイントロンに隣接しているオリゴヌクレオチドを使用するＰＣＲのための鋳型として使用した。反応に使用したオリゴヌクレオチドは、５’オリゴは、ＢＡＦ－２２５［５’－ＧＧＣＣＧＡＧＴＧＣＴＴＣＧＡＣＣＴＧＣＴ－３’］（配列番号３３）またはＢＡＦ－２２６[５’－ＧＧＴＣＣＧＣＣＡＣＴＧＣＧＴＧＧＣＣＴＧ－３’]（配列番号３４）であり、そして３’オリゴは、ＢＡＦ－１９１[５’－ＣＡＣＣＡＡＧＡＣＧＧＣＣＧＧＣＣＣＴＧＡ－３’]（配列番号３５）である。それぞれの反応には、１×Ｐｆｕ緩衝液（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、２００ＭのｄＮＴＰ、１０％のＤＭＳＯ、１５０ｎｇの各オリゴ、および１．２５単位のＴｕｒｂｏ　Ｐｆｕポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を含んだ。反応を、３５サイクルの、９４℃で３０秒間、６０℃で１分間、および７２℃で１．５分間で行った。１０μｌの各反応物を１％のアガロースゲル上で泳動した。ＢＪＡＢおよびＩＭ－９　ＢＡＦ－２２５／１９１反応物に由来する残りの生成物を、Ｈｉｇｈ　Ｐｕｒｅ　ＰＣＲ生成物精製キット（Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）を使用して精製し、そして生成物の集団をＤＮＡ配列決定に供した。さらに、プライマーＢＡＦ－２２５およびＢＡＦ－１９１を使用したＰＣＲ産物を、休止Ｂ細胞のｃＤＮＡから生成し、サブクローン化し、そして個々のクローンを配列決定した。ここで、５μｌの休止Ｂ細胞のｃＤＮＡ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を、上記のＢＡＦ－２２５およびＢＡＦ－１９１プライマーを用いるＰＣＲ反応に使用した。次いで、ＰＣＲ生成物を、Ｈｉｇｈ　Ｐｕｒｅ　ＰＣＲ生成物精製キットを使用して精製し、そして濃縮した。ＰＣＲフラグメントをサブクローン化するために、フラグメントの末端をリン酸化し、そ

してＳｕｒｅ　Ｃｌｏｎｅ連結キット（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を推奨されるように使用して平滑末端にした。得られた生成物を、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のＥｃｏＲＶ部位にクローン化し、そしてＥ．ｃｏｌｉ中に形質転換した。個々のコロニーを増殖させ、プラスミドＤＮＡをミニプレップした。６個の異なる単離物を配列決定した。

【０２４９】

（結果）

ＧＥＮＳＣＡＮプログラムによって予想したＪＳＴ５７６の成熟ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図２Ａ（配列番号３）に示す。ＢＪＡＢおよびＩＭ－９反応による、予想したイントロンにまたがるＰＣＲ産物を図２Ｂに示し、そしてＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡクローン中のイントロンの存在を確認した。ＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡ由来のＰＣＲ産物の予想した大きさは、ＢＡＦ－２２５／ＢＡＦ－１９１については約７８８ｂｐであり、そしてＢＡＦ－２２６／ＢＡＦ－１９１については７６７ｂｐであった。ＪＳＴ５７６鋳型から得たＰＣＲ生成物は、ほぼこの大きさ（レーン１０および１１）であった。オリゴｄＴでプライムしたＢＪＡＢまたはＩＭ－９の第１鎖ｃＤＮＡのいずれかに対するＢＡＦ－２２５／ＢＡＦ－１９１を使用して得たＰＣＲ生成物（レーン２およびレーン６）は同じ大きさであり、そしてＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡ由来の生成物よりも有意に短かった。予想されたイントロンを有さないこのフラグメントの予想された大きさは、４８４ｂｐであった。ＰＣＲ生成物の大きさはこの大きさと一致した。同じ結果が、ＢＪＡＢまたはＩＭ－９　ＲＮＡをランダムヘキサマーでプライムした場合に得られた（レーン４およびレーン８）。ＢＡＦ－２２６／ＢＡＦ－１９１を使用した反応は、第１鎖ｃＤＮＡの鋳型に対してはうまくいかなかった。従って、ＧＥＮＳＣＡＮプログラムによって推定したイントロンがＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡ中に存在するようである。ＢＪＡＢおよびＩＭ－９　ＲＮＡ由来のスプライシングされた生成物の配列を、ＰＣＲ生成物の集団を配列決定することによって確認し、そして図２Ｃ（配列番号４）に示す配列中に反映させた。配列は、ヌクレオチド１４９のアラニンコドン（ＧＣＡ）（小文字で示す）が存在しないことを除いて、図２Ａ（配列番号３）に示す配列と同一であった。休止Ｂ細胞のｃＤＮＡについてのＲＴ－ＰＣＲ反応による６個の異なるクローンの配列決定の結果は、両方のスプライシングアクセプター部位が利用されることを示した。好ましいアクセプター部位は、１つのアラニン残基を生じる生成物であるようであった（６個のクローンのうちの５個）。しかし、ＧＥＮＳＣＡＮによって予想した配列（配列番号３）（これは、２個のアラニンを含む）を、６個のクローンのうちの１個において観察した。従って、ヒトＪＳＴ５７６のオープンリーディングフレームが確立され、そして単一のアミノ酸スプライシング変異体が決定されている。オープンリーディングフレームは、図２Ｄ（配列番号５）に示した１８４個のアミノ酸のタンパク質を推定した。太字のアラニン（Ａ）残基は、スプライシング変異体を示す。このタンパク質を、ＢＡＦＦ－Ｒと呼ぶ。ＢＡＦＦ－Ｒの推定のアミノ酸配列は、残基７２～１００による疎水性領域（Ｈｏｐｐ－Ｗｏｏｄｓアルゴリズム）、およびＴＭＰｒｅｄアルゴリズムによって分析した場合には、残基８４から１０２による膜貫通セグメントの可能性を含む。この領域には、停止導入シグナルとして作用する場合がある、アミノ酸の高度に荷電したストレッチが続く。ＢＡＦＦ－ＲはＮ末端のシグナル配列を欠失しており、そして他のＢＡＦＦ結合タンパク質であるＢＣＭＡ（Ｌａａｂｉら（１９９２）ＥＭＢＯ　Ｊ．１１：３８９７－３９０４）およびＴＡＣＩ（ｖｏｎ　ＢｕｌｏｗおよびＢｒａｍ、（１９９７）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７８：１３８－１４１）と同様のＩＩＩ型膜タンパク質である。Ｎ末端は、ＢＡＦＦ－Ｒの細胞外ドメインと推定され、そしてＴＮＦレセプターファミリーの全ての他のメンバーとは異なり、残基１９～３

５に４システインモチーフを含む。ＢＡＦＦ－ＲのＣ末端は、細胞内ドメインと推定される。

【０２５０】

（実施例３）

ここで、本発明者らは、インフレームの停止コドンを含有しているヒトＢＡＦＦ－Ｒについての提案されている開始メチオニンの上流のＤＮＡ配列を決定する。

【０２５１】

（方法）

プライマーＢＡＦ－２５４（５’－ＧＧＧＣＧＣＣＴＡＣＡＡＴＣＴＣＡＧＣＴＡ－３’）（配列番号３６）を、提案されているＡＴＧの上流の、ＢＡＣ　ＨＳ２５０ｄ１０（Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号Ｚ９９７１６）中に存在するゲノム配列について作製し、そしてオリゴＢＡＦ－２３６（５’－ＧＧＣＧＧＡＣＣＡＧＣＡＧＧＴＣＧＡＡＧＣＡＣＴＣ－３’）（配列番号３７）を用いるＰＣＲ反応に使用した。反応の鋳型は、製造業者（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって記載されているようにＰＣＲ予備増幅キットを使用して、ヒト脾臓ＲＮＡ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）から作製した第１鎖ｃＤＮＡであった。ＰＣＲ反応には、３μｇの第１鎖反応物、１×Ｐｆｕ緩衝液（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、１０％のＤＭＳＯ、０．２ｍＭのｄＮＴＰ、１５０ｎｇの各プライマー、および１．２５単位のＰｆｕ　Ｔｕｒｂｏポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を含んだ。ＰＣＲ生成物を、Ｈｉｇｈ　Ｐｕｒｅ　ＰＣＲ生成物精製キット使用して製造業者の説明書（Ｒｏｃｈｅ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）に従って精製した。ＰＣＲ生成物の末端を、Ｓｕｒｅ　Ｃｌｏｎｅ連結キット（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して平滑末端にしそしてリン酸化し、ｐＢＳＫ２（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のＥｃｏＲＶ部位にクローン化し、そしてＤＨ５細胞中に形質転換した。連結によって生じたコロニーを、Ｗｉｚａｒｄシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用してミニプレップし、次いでＡＢＩ機器を使用して配列決定した。

【０２５２】

（結果）

ＰＣＲ生成物の配列について、ｍＲＮＡがゲノム配列中に含まれるＡＴＧのすぐ上流の配列を含むことを確認した。この配列に、図３に示す配列中で下線を付ける。インフレームの上流の停止コドンの存在、および別のメチオニンが存在しないことは、ＪＳＴ５７６　ｃＤＮＡ中で見られるメチオニンが正確な開始メチオニンであることを示した。

【０２５３】

（実施例４）

本実施例は、マウスのＢＡＦＦ－Ｒ　ｃＤＮＡのクローニングを記載する。

【０２５４】

（方法）

約１００万個のファージプラークを、製造業者によって詳細に記載されているように、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）から購入したマウスＡ２０細胞株のｃＤＮＡライブラリーからスクリーニングした。ＪＳＴ５７６ヒトＢＡＦＦ－Ｒ　ｃＤＮＡをＥｃｏＮＩで消化し、１％の低融点ゲル上で泳動した。含有している４２５ｂｐのフラグメントをゲルから切り出し、そして秤量した。３倍容量の水を添加し、そしてゲルフラグメントを５分間沸騰させた。フラグメントを、５０μＣｉの^{32}Ｐ－ｄＣＴＰ（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を用いて、５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８）、５ｍＭの$MgCl_2$、１０μＭのβ－メルカプトエタノール、２００ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ６．５）、２０ＭのｄＮＴＰ（ｄＣＴＰを除く）、０．２７単位のｐｄ（Ｎ）６ヘキサヌクレオチド（Ａｍｅｒｓｈ

ａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）、および１単位のクレノウ酵素（ＵＳＢ）を含有している反応において、室温で一晩標識した。１ｍｌのプローブあたり約１００万個を、プラークスクリーニング緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ、１％のＳＤＳ、１ＭのＮａＣｌ、０．１％のピロリン酸ナトリウム、０．２％のＰＶＰ，０．２％のＦｉｃｏｌｌ、０．２％のＢＳＡ）中でフィルターとともに、６５℃で一晩インキュベートした。フィルターを、２×ＳＳＣおよび０．１％のＳＤＳ中で５０℃にて１．５時間（３×２リットル）で洗浄し、次いで２日間、ｘ線フィルムに露光させた。約３６個のポジティブなプラークを同定した。これらのうちの６個をプラーク精製した。プラスミドを、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅによって詳細に記載されているインビボでの切り出しプロトコールを使用して遊離させた。得られたコロニーを増殖させ、次いで、ＤＮＡをミニプレップした（Ｑｉａｇｅｎ）。ｃＤＮＡクローンを配列決定した。

【０２５５】

（結果）

マウスのＢＡＦＦ－Ｒのコンセンサスヌクレオチド配列を、図４Ａ（配列番号８）に示し、そしてアミノ酸配列を図４Ｂ（配列番号９）に示す。３個のクローンが、マウスＢＡＦＦ－Ｒの細胞内ドメイン中のアミノ酸１１９から１２９までの１０個のアミノ酸の欠失を含んだ。ヒトおよびマウスのＢＡＦＦ－Ｒ配列のアラインメントは、細胞外ドメインの４個のシステイン残基が保存されていること、開始メチオニンの位置が類似していること、およびタンパク質のＣ末端領域が高度に保存されており（図４）、最後の２４個の残基が同一であることを示す。配列は、全体で約５６％同一であった。

【０２５６】

（実施例５）

本実施例においては、ヒトの組換え可溶性ＢＡＦＦの、ｐＪＳＴ５７６およびＧＦＰレポータープラスミドで同時トランスフェクトされた細胞に結合する能力を記載する。

【０２５７】

（材料および方法）

レポータープラスミドは膜に固定されたＧＦＰ分子をコードし、そしてトランスフェクトされていない細胞からのトランスフェクトされた細胞の同定を可能にする。２９３ＥＢＮＡ細胞を、レポータープラスミドおよびｐＪＳＴ５７６を用いて、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して同時トランスフェクトした。トランスフェクションの１８～２０時間後、細胞を、ＰＢＳ中の５ｍＭのＥＤＴＡを用いてプレートから外し、そして計数した。細胞をＦＡＣＳ緩衝液（１０％のウシ胎児血清、０．１％のNaN_3を含有しているＰＢＳ）で２回洗浄し、そして２．５×10^5個の細胞を、ＦＡＣＳ緩衝液中に稀釈したビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦとともに氷上で１時間、８ｎｇ／ｍｌから５μｇ／ｍｌの範囲の濃度にわたってインキュベートした。細胞をＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、そして、ストックから１：１００稀釈で、フィコエリトリンと結合させたストレプトアビジン（ＳＡＶ－ＰＥ）（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）とともに３０分間インキュベートした。細胞を再びＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、そしてＦＡＣＳ緩衝液中の１％のパラホルムアルデヒド中に再懸濁した。細胞を、ＧＦＰおよびＰＥ蛍光についてＦＡＣＳによって分析し、そしてデータを四分象限（ｑｕａｄｒａｎｔ）ドットブロットにフォーマットした。２つの右側の四分象限中の点は、トランスフェクションレポーターＧＦＰを発現する細胞を示す。２つの上部の四分象限中の点は、結合したビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦを有している細胞を示す（この結合は、ＳＡＶ－ＰＥによって明らかである）。上部の右側の四分象限中の細胞は、ビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦに結合するトランスフェクトされた細胞である。

【０２５８】
（結果）
染色されなかった細胞およびＳＡＶ－ＰＥでのみ染色された細胞は、約５０％がＧＦＰポジティブであり、そしてレポータープラスミドで同時トランスフェクトされていることを示す（図５）。ＧＦＰレポーターおよびｐＪＳＴ５７６で同時トランスフェクトされた細胞が、１μｇ／ｍｌのビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦを用いて染色された場合には、ほぼ全ての細胞が下部の四分象限に移動した。これは、ＢＡＦＦの結合を示している。同様の結果が、ｈｕＴＡＣＩを発現するプラスミドがｐＪＳＴ５７６の代わりに同時トランスフェクトされた場合に見られた。ＴＡＣＩはＢＡＦＦに結合することが既知である。細胞は、５μｇ／ｍｌから８ｎｇ／ｍｌまでのビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦの５倍稀釈で染色され、そしてビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦの濃度の減少に伴って、移動の強度が減少した。
【０２５９】
（実施例６）
本実施例においては、ヒトの組換え可溶性ＢＡＦＦまたはマウスの組換え可溶性ＢＡＦＦの、ｐＪＳＴ５７６およびＧＦＰレポータープラスミドで同時トランスフェクトされた細胞に結合する能力を記載する。
【０２６０】
（材料および方法）
２９３ＥＢＮＡへの同時トランスフェクションは、実施例５に記載したとおりであった。トランスフェクションの１８～２０時間後、細胞を外し、計数し、そして以下の改変を用いて実施例５と同様にＦＡＣＳ分析のために染色した。細胞を、５μｇ／ｍｌのマウスまたはヒトの組換え可溶性ｆｌａｇ－ＢＡＦＦのいずれかとともに氷上で１時間インキュベートし、続いて、洗浄後に、５μｇ／ｍｌの抗ｆｌａｇモノクローナル抗体Ｍ２（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）とともに３０分間インキュベーションし、次いで、洗浄した細胞を、ストックからの１：１００稀釈で、ＰＥに結合させたロバ抗マウスＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）とともに、３０分間インキュベートすることによって、明らかにした。細胞を再び洗浄し、そしてパラホルムアルデヒドで固定し、そしてＧＦＰおよびＰＥポジティブ細胞についてＦＡＣＳによって分析した。
【０２６１】
（結果）
約５０％の細胞がＧＦＰポジティブであり、従って、レポータープラスミドで同時トランスフェクトされた（図６）。ＧＦＰレポーターとｐＪＳＴ５７６とで同時トランスフェクトされた細胞が５μｇ／ｍｌのヒトまたはマウスのいずれかの組換え可溶性ｆｌａｇ－ＢＡＦＦで染色された場合は、ほぼ全ての細胞が下部の右側の四分象限に移動した。これはマウスおよびヒトの両方のＢＡＦＦがｐＪＳＴ５７６でトランスフェクトされた細胞に結合することを示す。
【０２６２】
（実施例７）
本実施例においては、マウスの組換え可溶性ＡＰＲＩＬが、ｐＪＳＴ５７６およびＧＦＰレポータープラスミドで同時トランスフェクトされた細胞に結合することができないことを記載する。
【０２６３】
（材料および方法）
２９３ＥＢＮＡへの同時トランスフェクションは、実施例５に記載したとおりであった。トランスフェクションの１８～２０時間後、細胞を外し、計数し、そして以下の改変を用いて実施例５と同様にＦＡＣＳ分析のために染色した。細胞を、１μｇ／ｍｌのマウスの組換え可溶性ｍｙｃ－ＡＰＲＩＬとともに氷上で１

時間インキュベートし、その後の洗浄後、５μｇ／ｍｌの抗マウスＡＰＲＩＬモノクローナル抗体とともに３０分間インキュベーションし、続いて、洗浄した細胞を５μｇ／ｍｌのビオチン化抗ラットＩｇＧ２ｂ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）とともに３０分間インキュベーションし、そして最後に、洗浄した細胞をＳＡＶ－ＰＥとともに３０分間インキュベートすることによって明らかにした。細胞を再び洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定し、そしてＧＦＰおよびＰＥポジティブ細胞についてＦＡＣＳによって分析した。

【０２６４】

（結果）

約５０％の細胞がＧＦＰポジティブであり、従って、レポータープラスミドで同時トランスフェクトされた（図７）。ＧＦＰレポーターとｐＪＳＴ５７６とで同時トランスフェクトされた細胞が１μｇ／ｍｌのマウスｍｙｃ－ＡＰＲＬＩで染色される場合は、下部の右側の四分象限に移動した細胞はなかった。これは、ｐＪＳＴ５７６の代わりにヒトＴＡＣＩを発現するプラスミドで同時トランスフェクトされた細胞とは対照的であった。これらのトランスフェクトされた細胞は、ほぼ全てが、マウスのｍｙｃ－ＡＰＲＩＬ結合についてポジティブであった。ＢＡＦＦおよびＡＰＲＩＬの両方が、ＴＡＣＩおよびＢＣＭＡの両方に結合することは以前に示されている。従って、ＡＰＲＩＬが、ｐＪＳＴ５７６でトランスフェクトされた細胞上で発現された場合にはＢＡＦＦ－Ｒに結合しないという事実は、ＢＡＦＦに対するＢＡＦＦ－Ｒの特異性を示す。

【０２６５】

（実施例８）

本実施例は、組換えの可溶性ヒトｆｌａｇ－ＢＡＦＦによって同時免疫沈降される、ｐＪＳＴ５７６から発現されるＢＡＦＦ－Ｒの能力を記載する。

【０２６６】

（材料および方法）

２９３ＥＢＮＡ細胞を、ｐＪＳＴ５７６、ベクターのみのコントロール、またはＢＡＦＦ結合についてのポジティブコントロールとしてのｈｕＴＡＣＩを発現するプラスミドを用いて、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００によってトランスフェクトした。インキュベーションの２０時間後、トランスフェクション培地を吸引し、細胞をＰＢＳで洗浄し、そして培地を、^{35}Ｓ標識培地（１０％の透析したウシ胎児血清、４ｍＭのグルタミン、および１００μＣｉ／ｍｌの^{35}Ｓメチオニンおよびシステイン（Ｔｒａｎｓｌａｂｅｌ、ＩＣＮ Ｒａｄｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）を補充した、１部の完全なＤＭＥＭに対する９部のメチオニンおよびシステインを含まないＤＭＥＭ）と置き換えた。細胞を６時間この培地中でインキュベートし、その後、培地を除去した。細胞をＰＢＳで洗浄し、次いで２５０μｌの抽出緩衝液（１％のＢｒｉｊ ９８、１５０ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのＴｒｉｓ ｐＨ７．５）で可溶化させた。同時免疫沈降を、７５μｌの^{35}Ｓ標識した細胞抽出物を、５μｇの組換えの可溶性ヒトｆｌａｇ－ＢＡＦＦとともに、１ｍｌのＤＭＥＭ－１０％のウシ胎児血清－０．１％のNaN_3中で、一晩、４℃でインキュベーションすることによって行った。１０μｇの抗ｆｌａｇモノクローナル抗体Ｍ２、およびプロテインＡ－セファロースを添加し、そしてインキュベーションを２時間続けた。セファロースビーズを遠心分離によって回収し、ＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、そして還元剤としてβ－メルカプトエタノールを有するＳＤＳ充填緩衝液中に再懸濁した。サンプルを５分間沸騰させ、セファロースビーズをペレット化させるために短時間遠心分離し、そしてアリコートをＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で泳動した。ゲルを、Ｅｎｌｉｇｈｔｎｉｎｇ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｎｕｃｌｅａｒ）とともにインキュベートし、乾燥させ、そして－８０℃でフィルムに露光させた。

【０２６７】

（結果）
この同時免疫沈降物は、抗ｆｌａｇ抗体Ｍ２を通じてプロテインＡセファロースビーズにｆｌａｇ－ＢＡＦＦを結合する。これはまた、ｆｌａｇ－ＢＡＦＦに結合する細胞抽出物中の任意のタンパク質をもまた提示し、そしてこれらの放射標識されたタンパク質は、オートラジオグラフィーによって検出される。２９３ＥＢＮＡ細胞はＢＡＦＦには結合しないので、空のベクターコントロールは、この手順に固有のバックグラウンドを示す（図８）。ＴＡＣＩについてトランスフェクトされた細胞由来の抽出物がｆｌａｇ－ＢＡＦＦで同時免疫沈降された場合には、約３４ｋＤａの見かけの分子量を有するバンドが観察された。これは、ＢＡＦＦに結合することが既知のタンパク質である、全長のヒトＴＡＣＩについてのおおよその推定される分子量（３１．２ｋＤａ）である。ｐＪＳＴ５７６でトランスフェクトされた細胞由来の抽出物がｆｌａｇ－ＢＡＦＦで同時免疫沈降される場合には、約１２ｋＤａの見かけの分子量を有するバンドが観察される。ｐＪＳＴ５７６から発現されるＢＡＦＦ－Ｒについての推定される分子量は、１８．９ｋＤａである。推定される分子量と観察された分子量との間での不一致は、ＢＡＦＦ－Ｒの電荷または立体構造に起因する異常な電気泳動の移動度に起因し得る。別の可能性は、１２ｋＤａがＢＡＦＦ－Ｒのタンパク質溶解性フラグメントであることである。

【０２６８】

（実施例９）
本実施例は、可溶性形態のＢＡＦＦ－Ｒの作製を記載する。ｐＪＳＴ５７６に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーは、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインが存在しない場合にＢＡＦＦ－Ｒの細胞外ドメインをＰＣＲ増幅するために設計され得る。典型的には、これは、リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインとの間のほとんどのスタークまたはアミノ酸領域を含む。得られる可溶性レセプターの効力を最適化するために、含まれるスターク領域の量を変更することができる。この増幅されたフラグメントは、フラグメントの５’末端上の種々の異種リーダー配列へ、および３’末端での種々のＩｇ融合キメラ融合ベクターへのクローニングを可能にするために、適切な制限部位を用いて操作される。あるいは、ＢＡＦＦ－Ｒの細胞外ドメインの３’末端に停止シグナルを挿入し、そしてＩｇ融合キメラのアプローチの使用の代わりの使用に頼ることなく、レセプターの可溶性形態を作製するかまたは別のＣ末端融合パートナーを使用することが、可能である。また、シグナル配列、それに続くＢＡＦＦ－ＲのＮ末端の細胞外ドメインを含有している融合パートナーから構成されるＮ末端の融合タンパク質を作製することも可能であった。得られたベクターは、酵母、昆虫細胞、細菌、および哺乳動物細胞を含む、バイオテクノロジーにおいて使用されるほとんどのシステムにおいて発現され得、そして複数の例が全てのタイプの発現について存在する。種々のヒトＦｃドメインを、所望される場合には、ＦｃＲおよび相補性相互作用を最適化するかまたは排除するために付着させることができる。あるいは、これらのＦｃドメインの変異形態を、ＦｃＲ、または相補性相互作用、または特定の利点を有するＦｃドメインに対するＮ結合型の糖の結合を選択的に除去するために使用することができる。ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ融合分子の例を、図９に示す。この分子は、ＢＡＦＦ－Ｒ細胞外ドメイン（図２Ｄに示すアミノ酸残基２～７１）に対して、Ａａｔ２制限部位によって連結されたマウスＩｇ－ｋ遺伝子由来のＩ型リーダー配列を含む。次いで、これを、ヒトＩｇＧ１のＦｃドメインに対して、ＳａｌＩ制限部位によって連結する。

【０２６９】

（実施例１０）
本実施例において、本発明者らは、ヒト組織および細胞株中でのＢＡＦＦ－Ｒの発現プロフィールを、ノーザンブロット分析によって示す。

【０２７０】
（材料および方法）
種々のＢ細胞株およびＢ細胞以外の細胞株を、適切な条件下で増殖させた。ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、約10^7個の細胞から調製した。ＲＮＡを定量し、そして２０μｇの各サンプルを、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ、１９８９に記載されているように、１．２％のホルムアルデヒドゲル上で泳動した。ゲルをナイロンメンブレン（ＢＭＢ）上にブロットし、次いで紫外線（ＵＶ）で架橋した。いくつかのヒトのノーザンブロット（１２レーンの複数の組織、ヒトＩＩおよび免疫システムＩＩ）を、Ｃｌｏｎｔｅｃｈから購入した。フィルターを、ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）緩衝液中で６５℃で３０分間、予備ハイブリダイズさせた。次いで、ＪＳＴ５７６の３’末端由来のランダムプライムした^{32}Ｐで標識したＥｃｏＮＩフラグメントとともに、約３時間ハイブリダイズさせた。フィルターを、２×ＳＳＣ／０．０５％のＳＤＳ中で４５分間、室温で洗浄し、次いで、０．１×ＳＳＣ／０．１％のＳＤＳ中で５０℃で４５分間洗浄した。フィルターを、２枚の増感スクリーンを使用して４日間、Ｘ線フィルムに露光させた。さらに、いくつかのヒトのノーザンブロット（１２レーンの複数の組織、ヒトＩＩおよび免疫システムＩＩ）を、Ｃｌｏｎｔｅｃｈから購入し、ＪＳＴ５７６プローブにハイブリダイズさせ、そして上記のように処理した。

【０２７１】
（結果）
ＢＡＦＦ－ＲのｍＲＮＡは、この検出レベルで免疫システムの器官において優先的に発現されるようである。最も高いレベルは、脾臓およびリンパ節中であったが、ｍＲＮＡはまた、ＰＢＬ、胸腺、小腸、および結腸中にも見られた（図１０Ａ、Ｂ、およびＣ）。メッセージのおおよその大きさは４．５ｋｂであった；サンプル中に２つのｍＲＮＡの集団が存在するようであり、ここでは、遺伝子は高度には発現されない。２つのｍＲＮＡは、なおもまた、脾臓およびリンパ節中に存在し得る。このことは、ＢＡＦＦ－Ｒが別のポリＡ付加部位を有するか、またはＲＮＡが別のスプライシングを受けることを示し得る。多数の細胞株を、ＢＡＦＦ－Ｒ ｍＲＮＡの存在について試験した場合には、同じ４．５ｋｂのｍＲＮＡが検出される。Ｂ細胞株のみが、ＢＡＦＦ－Ｒ ｍＲＮＡを発現する（図１１）。Ｕ２６６、ＲＰＭＩ８２２６、およびＤａｕｄｉ細胞株中、または試験したＢ細胞以外の細胞株中では、ｍＲＮＡは検出されなかった。

【０２７２】
（実施例１１）
本実施例において、本発明者らは、ＪＳＴ５７６の発現が、ＢＡＦＦに結合する細胞株に制限されることを示す。

【０２７３】
（材料および方法）
細胞株をＡＴＣＣから購入し、そして示した条件下で増殖させた。種々のＢ細胞株およびＢ細胞以外の細胞株を適切な条件下で増殖させた。ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、約10^7個の細胞から調製した。ＲＮＡを定量し、そして２０μｇの各サンプルを、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ、１９８９に記載されているように、１．２％のホルムアルデヒドゲル上で泳動した。ゲルをナイロンメンブレン（ＢＭＢ）上にブロットし、次いでＵＶ架橋した。フィルターを、ＪＳＴ５７６標識フラグメントとハイブリダイズさせ、次いで実施例１０のように洗浄した。細胞を、ＢＡＦＦに結合するそれらの能力について、ＦＡＣＳ分析を使用してチェックした。約２．５～５×10^5個の細胞を回収し

、そして洗浄した。ＰＢＳ＋５％のＦＣＳおよび０．０５％のアジ化ナトリウム(ＦＡＣＳ緩衝液)中に稀釈したＦＬＡＧタグ化ＢＡＦＦを、３０分間の間、濃度範囲（８～０．１２５μｇ／ｍｌ）にわたって細胞とともに、氷上でインキュベートした。細胞をＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、そして３０分間氷上で、５μｇ／ｍｌの抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体Ｍ２（Ｓｉｇｍａ）とともにインキュベートした。再び、細胞をＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、次いで、ヤギ抗マウスＩｇＧ　ＰＥ結合抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）の１：５０００稀釈とともに、氷上で３０分間インキュベートした。細胞を上記のように洗浄し、次いで、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェアを使用して、ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローソーター（Ｂｅｃｋｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）上で分析した。

【０２７４】

（結果）

ＢＡＦＦ結合実験の結果を、表１に示す。ＢＡＦＦに結合した細胞株は、Ｒａｍｏｓ、Ｎａｍａｌｗａ、ＩＭ－９、ＮＣ－３７、Ｒａｊｉ、ＢＪＡＢ、およびＳＫＷ６．４であった。結合レベルを、＋の記号の数によって示す。ＢＡＦＦに結合しなかった細胞株は、Ｕ２６６、ＲＰＭＩ　８２２６、Ｄａｕｄｉ、Ｕ９３７、Ｊｕｒｋａｔ、ＨＴ２９、Ａ５４９、ＳＷ４８０、およびＭＥ２６０であった。ＢＡＦＦに結合する細胞株の能力は、図１１に示すＢＡＦＦ－Ｒ　ｍＲＮＡの存在と相関している。

【０２７５】

【表１】

表1

細胞株	型	BAFF結合
BJAB	Burkittリンパ腫	+++
IM-9	リンパ芽球 IgG	+++
NC-37	リンパ芽球 EBV+	++
Ramos	Burkitt リンパ腫 EBV-	++
Raji	Burkittリンパ腫	++
SKW6.4	リンパ芽球 IgM	++
Namalwa	Burkittリンパ腫	+
Daudi	Burkittリンパ腫 EBV+	-
U266	プラズマ細胞腫	-
RPMI 8226	プラズマ細胞腫	-
U937	単球	-
Jurkat	T細胞リンパ腫	-
HT29	結腸直腸腺癌	-
A549	肺癌腫	-
SW480	結腸直腸腺癌	-
ME260	黒色腫	-

（実施例１２）

本実施例は、一過的にトランスフェクトさせた２９３ＥＢＮＡ細胞中で発現されそしてその細胞により馴化培地中に分泌される、ｈｕＢＡＦＦ－Ｒ：ｈｕＩｇＧ１融合タンパク質が、組換えの可溶性ビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦを同時免疫沈降させる能力を記載する。

【０２７６】

（材料および方法）

２９３ＥＢＮＡ細胞を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｌｉｆｅ

Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって、ｈｕＢＡＦＦ－Ｒ（ａａ２－７１）：Ｆｃを発現するｐＪＳＴ６１８、ＢＡＦＦ結合についてのポジティブコントロールとしての、ｈｕＢＣＭＡ：ｈｕＩｇＧ１を発現するプラスミド、またはＢＡＦＦ結合についてのネガティブコントロールとしての、ｈｕＦＮ１４：ｈｕＩｇＧ１を発現するプラスミドのいずれかで、トランスフェクトした。２４時間のインキュベーション後、馴化培地を回収した。

【０２７７】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥを、還元剤を含有しているかまたは還元剤を含まない等量の２×ＳＤＳ泳動緩衝液を馴化培地と混合すること、そして５分間沸騰させることによって行った。次いで、サンプルを、４～２０％のＳＤＳポリアクリルアミドゲル上で泳動した。既知の量の精製したｈＢＣＭＡ：Ｆｃを、馴化培地中のｈＩｇＧ１融合タンパク質の量を概算するために、隣接するレーン中で泳動した。サンプルを、０．０１ＭのＣＡＰＳ　ｐＨ１１～１０％のＭｅＯＨ緩衝液中でのウェスタンブロットによって膜（Ｉｍｍｏｂｉｌｌｏｎ　Ｐ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）に移した。膜を、ＴＢＳＴ中の５％の脱脂粉乳（ＮＦＤＭ）でブロックし、１：３０００希釈のヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）で１時間プローブし、ＴＢＳＴ中で洗浄し、そしてフィルムに露光させた。同時免疫沈降を、２００μｌの馴化培地を、１ｍｌのＤＭＥＭ－１０％のウシ胎仔血清－０．１％のＮａＮ３中の２００ｎｇの可溶性のヒト組換えｆｌａｇ－ＢＡＦＦとともに、４℃で一晩インキュベートすることによって行った。プロテインＡ－セファロースを添加し、そしてインキュベーションを２時間継続した。セファロースビーズを遠心分離によって回収し、ＦＡＣＳ　ＴＢＳＴ緩衝液で洗浄し、そして還元剤としてβ－メルカプトエタノールを有するＳＤＳローディング緩衝液中に再懸濁した。サンプルを５分間沸騰させ、セファロースビーズをペレット化させるために軽く遠心分離し、そしてアリコートをＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で泳動した。５０ｎｇのＦＬＡＧ－ｈｕＢＡＦＦを、ポジティブコントロールとして泳動した。サンプルを、ＰＶＤＦ膜（Ｉｍｍｏｂｉｌｌｏｎ　Ｐ．Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）に、０．０１ＭのＣＡＰＳ　ｐＨ１１／１０％のＭｅＯＨ緩衝液中でのウェスタンブロットによって移した。膜を、５％のＮＦＤＭ－ＴＢＳＴでブロックし、１μｇ／ｍｌの抗ＦＬＡＧ　Ｍ２－ＨＲＰで１時間プローブし、ＴＢＳＴ中で洗浄し、そしてフィルムを露光させた。

【０２７８】

（結果）

同時免疫沈降は、プロテインＡセファロースとの融合パートナーの相互作用を通じて、種々のレセプター：Ｆｃ融合体を沈殿させた。これはまた、ｆｌａｇ－ＢＡＦＦのような、Ｒ：ＩｇＧ１融合体と相互作用するあらゆるタンパク質をもまた沈殿させた。ｈＢＣＭＡ：Ｆｃを発現する細胞による馴化培地は、予期されたように、ｆｌａｇ－ＢＡＦＦとの同時移動がウェスタンブロット上で観察されるバンド（図１２）としてｆｌａｇ－ＢＡＦＦを同時免疫沈降させることができた。ｈＦＮ１４：Ｆｃを発現する細胞による馴化培地は、ｆｌａｇ－ＢＡＦＦを同時免疫沈降させなかった。ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃを発現する細胞による馴化培地は、ｆｌａｇ－ＢＡＦＦを同時免疫沈降させることができた。ｆｌａｇ－ＢＡＦＦと同時に移動するバンドがウェスタンブロット上で観察され、そしてこれは、ｈｕＢＣＭＡ：ｈｕＩｇＧ１によって同時免疫沈降するものと同様の強度であった。

【０２７９】

（実施例１３）

本実施例は、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ融合タンパク質（本実施例の場合には、ｈｕＢＡＦＦ－Ｒ（ａａ２－７１）：ｈｕＩｇＧ１）が、ｈｕＢＡＦＦのＢＪＡＢ細胞への結合をブロックする能力を示す。

【０２８０】
（材料および方法）
実施例９で議論したｈｕＢＡＦＦ－Ｒ（２－７１）－ｈｕＩｇＧ１融合体を作製し、そしてこれをｐＪＳＴ６１８と呼ぶ。この構築物を２９３ＥＢＮＡ細胞中に一過的にトランスフェクトし、そしてその馴化培地を回収した。融合タンパク質を、プロテインＡセファロースからの酸溶出、それに続くゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。２００ｎｇ／ｍｌのビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦを、５０μｌのＦＡＣＳ緩衝液または精製したｈｕＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃの５倍の段階希釈液（５μｇ／ｍｌから２００ｎｇ／ｍｌの範囲）のいずれかで、氷上で３０分間予備インキュベーションした。次いで、ＢＪＡＢ細胞（２．５×10^5個の細胞）を、これらの溶液とともに氷上で１時間、インキュベートした。細胞をＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、そしてＳＡＶ－ＰＥで染色した。細胞を、ＦＡＣＳによってＰＥ蛍光について分析し、そしてデータを、重ね合わせたヒストグラムとしてフォーマットした。あるいは、２００ｎｇ／ｍｌのビオチン化－ＢＡＦＦを、ｈＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ、ｈＴＡＣＩ：Ｆｃ、またはｈＬＴＢＲ：Ｆｃのいずれかの２倍の段階希釈液とともに予備インキュベートした。細胞を、上記のようにビオチン化ＢＡＦＦの結合について染色した。
【０２８１】
（結果）
図１３Ａは、種々の濃度のｈｕＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃの存在下での、ＢＪＡＢに対するｈｕＢＡＦＦの結合についてプロットしたヒストグラムの重ね合わせを示す。黒線で標識した「Ａ」は、ＳＡＶ－ＰＥのバックグラウンドの結合を示し、そして赤線で印をつけた「Ｅ」は、ＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃとの予備インキュベーションを行わなかった、ビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦで染色された細胞を示す。ビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦの５μｇ／ｍｌのｈｕＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃとの予備インキュベーションは、バックグラウンドのレベルに近いヒストグラムの移動を生じた（曲線Ｂ）。１μｇ／ｍｌ（曲線Ｃ）または２００ｎｇ／ｍｌ（曲線Ｄ）のいずれかのｈｕＢＡＦＦ－Ｒ－ｈｕＩｇＧ１との予備インキュベーションは、ビオチン化ｍｙｃ－ｈｕＢＡＦＦの結合において約１／４倍の減少を生じた。
【０２８２】
図１３Ｂは、ＢＡＦＦ－Ｒ：ＦｃおよびＴＡＣＩ：Ｆｃの両方が、ＢＪＡＢ細胞へのＢＡＦＦの結合をブロックできることを示す。ＬＴＢＲ：Ｆｃとの予備インキュベーションは、ＢＡＦＦをブロックする作用を有さなかった。
【０２８３】
（実施例１４）
本実施例は、ＢＡＦＦによって誘導されるＢ細胞の増殖をブロックする、ＢＡＦＦ－Ｒ：ＩｇＧ１融合タンパク質の能力を記載する。
【０２８４】
（材料および方法）
インビトロでの増殖アッセイのために、マウスＢ細胞を、Ｃ５７Ｂ１６マウス（８週齢）の脾臓から、Ｂ細胞回収カラム（カラム（Ｃｅｌｌｅｃｔ^{TM} Ｍｏｕｓｅ Ｂ Ｃｅｌｌ Ｒｅｃｏｖｅｒｙ Ｃｏｌｕｍｎ：Ｃｅｄａｒｌａｎｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｌｉｍｉｔｅｄ，Ｏｎｔａｒｉｏ，Ｃａｎａｄａ．））を使用して単離した。精製したＢ細胞をＦＡＣＳによって分析し、そして９０％より多くがＢ２２０染色についてポジティブであることを見出した。Ｂ細胞を、２ｍｇ／ｍｌのヤギ抗ヒトｍ鎖抗体（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．）；コントロールのｈＩｇＧ（１０ｍｇ／ｍｌ）ｈｕＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ（１０ｍｇ／ｍｌ）の存在下または非存在下で、９６ウェルプレート（１０％のＦＢＳを補充した５０ｍｌのＲＰＭＩ中で10^5個の細胞／ウェル）中で７２時間

、インキュベートした。サンプルを、３連で、そして示した濃度のｍｙｃ－ｈＢＡＦＦのとともにプレートした。細胞を、［^{3}Ｈ］チミジン（１μＣｉ／ウェル）でさらに１８時間パルスし、そして回収した。［^{3}Ｈ］チミジンの取り込みを、液体シンチレーションカウンティングによってモニターした。実施例１３のように産生したヒトＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ融合タンパク質をこのアッセイで使用し、実施例９で議論したように、ｐＪＳＴ６１８でトランスフェクトした２９３ＥＢＮＡ細胞の上清から作製した。上清を回収し、プロテインＡカラム上に充填し、酸で溶出し、中和し、次いで凝集しないｈｕＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃタンパク質を得るためにゲル濾過クロマトグラフィーに供した。アッセイで使用したＢＡＦＦをＰｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ中で発現させ、そして陰イオン交換クロマトグラフィー、続くゲル濾過によって精製した。

【０２８５】

（結果）

図１４は、ＢＡＦＦが抗ｍ抗体（四角）およびｈＩｇＧ（三角）の存在下でＢ細胞の増殖を同時刺激することができることを示す。ＢＡＦＦのみ（ひし形）は、Ｂ細胞の増殖を誘導することはできなかった。１０ｍｇ／ｍｌのｈｕＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ（星型）とのインキュベーションは、ＢＡＦＦによって誘導されるＢ細胞の増殖の完全な阻害を生じた。

【０２８６】

（実施例１５）

（材料および方法）

（マウス）

６週齢の雌性ＢＡＬＢ／ｃマウスを、Ｔｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（ＢａｒＨａｒｂｏｒ，ＭＥ）から入手し、そしてＢｉｏｇｅｎ Ａｎｉｍａｌ Ｆａｃｉｌｉｔｙ中でバリア（ｂａｒｒｉｅｒ）条件下で維持した。

【０２８７】

（試薬および処置レジメン）

レセプター融合タンパク質は、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ領域を含む。マウス（５匹／１グループ）に、２００μｇの融合タンパク質（マウスＢＡＦＦ－Ｒ：ＦｃまたはヒトＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ）を、２回／週で４週間の間、ｉｐ（腹腔内）で与えた。コントロールマウスには、２００μｇのポリクローナルヒトＩｇＧ（Ｐａｎｇｌｏｂｕｌｉｎ^{TM}）（ＨＩｇＧ）を、２回／週で４週間にわたり与えた。最後の投薬の３日後、血液を眼窩空洞から回収し、次いでマウスを安楽死させ、そして脾臓、リンパ節、および骨髄を分析のために回収した。

【０２８８】

（フローサイトメトリー分析）

屠殺時に、脾臓の重量を記録した。単細胞懸濁物を、低張の溶液中で赤血球を溶解させた後に脾臓および血液から調製した。単細胞懸濁物もまた、鼠径部のリンパ節および骨髄から調製した。フローサイトメトリーを、Ｂ２２０、ＩｇＭ、ＩｇＤ、およびＣＤ２１に対して指向させたｍＡｂを使用して行った。脾臓のＢ細胞のサブ集団を、濾胞（Ｂ２２０＋、ＩｇＭ^{low}、ＣＤ２１^{low}）、辺縁帯（Ｂ２２０＋、ＩｇＭ^{hi}、ＣＤ２１^{hi}）、および新しく形成された（Ｂ２２０＋、ＩｇＭ^{hi}、ＣＤ２１－）と定義した。簡潔には、約１．５×１０^{6}個の細胞を、Ｆｃレセプターをブロックするために、１０μｇ／ｍｌのＦｃ Ｂｌｏｃｋ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）とともに氷上で１０分間インキュベートし、続いて、蛍光タグ化ｍＡｂを添加し、そして氷上で３０分間インキュベートした。細胞を、１回洗浄し、そして０．５％のパラホルムアルデヒド中に再懸濁した。細胞の蛍光データを、ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）上で獲得し、そしてＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（Ｂｅｃｋｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）を使用し

て分析した。

【０２８９】

（結果）

マウスまたはヒトＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃでの４週間の処置経過後に、コントロールのヒトＩｇＧで処置したマウスと比較した、マウスおよびヒトＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃで処置したマウス由来の脾臓の重量における著しい減少が存在した（図１５）。脾臓の細胞の明らかな減少が、多数の脾臓Ｂ細胞中での減少による結果であることが見出された。マウスおよびヒトＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃで処置したマウス中の全Ｂ２２０＋脾臓Ｂ細胞の平均の数は、それぞれ、１．８×１０^{6}細胞および２．６×１０^{6}細胞であり、これらは、コントロールのＨＩｇＧで処置した動物中のＢ細胞の数（これは、１９．８×１０^{6}細胞の平均を有した）と比較して明らかに減少していた（図１６）。脾臓Ｂ細胞の種々のサブ集団（濾胞、辺縁帯、および新しく形成された領域）の試験は、それぞれのサブセット中のＢ細胞の数が、ＢＡＦＦ－Ｒ：：Ｆｃで処置されたマウスにおいて減少した（表２）が、濾胞および辺縁帯のＢ細胞が、最も大きく減少したことを示した。

【０２９０】

【表２】

表２．BAFF-R::Fcでの処置は、脾臓B細胞のサブ集団の減少を生じる

	脾臓B細胞のサブ集団 (10^6 細胞 ±SD)		
	濾胞	辺縁帯	新しく形成された領域
ヒトIgG	14.5 ± 2.4	1.1 ± 0.3	1.5 ± 0.2
mBAFF-R:Fc	0.7 ± 0.1	0.06 ± 0.02	0.4 ± 0.1
hBAFF-R:Fc	1.4 ± 0.5	0.05 ± 0.02	0.5 ± 0.2

1,4,8,11,15,18,22および25日目に、200μgのHIgG、mBAFF-R:FcまたはhBAFF-R:Fcをマウスに与えた。28日目にマウスを安楽死させ、そして脾臓をB細胞のサブセットの分析のために回収した。

耳介部のリンパ節（ＬＮ）に含まれるＢ２２０＋のＢ細胞の割合の試験は、平均のＢ細胞の集団が、３０．８％±４．１のＢ細胞の平均を有したコントロールのＨＩｇ－Ｇで処置したマウスと比較した場合に、マウスおよびヒトＢＡＦＦ－Ｒ：：Ｆｃで処置したマウスにおいて顕著に減少した（それぞれ、１２．３％±１．４および１８．６％±１．３）ことを示した（図１７）。同様の結果を、末梢血Ｂ細胞を試験した場合に得た。ヒトＩｇＧで処置したマウス由来のリンパ球の４２．５％±２．９がＢ細胞であり、一方、リンパ球の２１．２％±６．１および８．３％±４．５のみが、それぞれ、マウスおよびヒトのＢＡＦＦ－Ｒ：：Ｆｃで処置されたマウス由来のＢ細胞であった（図１８）。

【０２９１】

新しく形成された（未成熟の）Ｂ細胞および成熟Ｂ細胞の集団は、ＢＡＦＦ－Ｒ：：Ｆｃで処置したマウスにおいては減少したが、骨髄中のＢ細胞前駆体は、影響されないままであった（データは示さない）。

【０２９２】

（考察）

これらの結果は、可溶性のＢＡＦＦ－Ｒレセプター融合タンパク質でのＢＡＦＦのインビボでの遮断が、Ｂ細胞の生存性および／または成熟の阻害を導くことを示唆する。

【０２９３】

これらの結果はまた、Ｂ細胞によって媒介される疾患における臨床的な適用で

の治療薬としてのＢＡＦＦ－Ｒ融合タンパク質の使用の可能性をも示唆する。疾患には、自己免疫性の性質の疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑症、抗リン脂質症候群、シャーガス病、グレーヴズ病、ヴェーゲナー肉芽腫症、結節性多発動脈炎、および急性進行性糸球体腎炎）が含まれる。この治療薬はまた、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、原発性アミロイド症または免疫細胞関連アミロイド症、および意義不明単クローン性高ガンマグロブリン血症（ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ｇａｍｍｏｐａｔｈｙ ｏｆ ｕｎｄｅｔｅｒｍｉｎｅｄ ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｃｅ）（ＭＧＵＳ）のような、プラスマ細胞の障害における適用を有する。腫瘍学の標的には、Ｂ細胞癌腫、白血病、およびリンパ腫が含まれる。

【０２９４】

（実施例１６）

本実施例においては、ＢＡＦＦ－Ｒの細胞外ドメインに対して惹起されたマウスモノクローナル抗体の最初のパネルの特徴付けを記載する。全ての抗体がＢＡＦＦ－Ｒの細胞外ドメインを認識し、そしてこれらの抗体のサブセットは、続くＢＡＦＦ－ＲへのＢＡＦＦの結合を妨げるというアンタゴニスト特性を有する。

【０２９５】

（材料および方法：）

ＲＢＦマウスを、ｈｕＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃで免疫し、そして追加免疫した。免疫マウス由来の脾臓細胞を、標準的な技術によるハイブリドーマの作製のために、株Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８．６５３の誘導体であるマウスの黒色腫株ＦＬ６５３と融合させた。

【０２９６】

ｈｕＢＡＦＦＲの細胞外ドメインに対する抗体を分泌するハイブリドーマクローンによる馴化培地を、ＦＡＣＳによってアッセイした。ＦＡＣＳ結合アッセイを、実施例５のように、全長のｈｕＢＡＦＦ－ＲまたはｍｕＢＡＦＦ－ＲおよびＧＦＰを発現するプラスミドで同時トランスフェクトした２９３ＥＢＮＡ細胞について行った。ハイブリドーマの馴化培地を、ＦＡＣＳ緩衝液中で１：１０で希釈し、そしてトランスフェクトした細胞とともに氷上で３０分間インキュベートした。細胞を、ＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、そして、結合を、１：１００希釈の抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）とともに氷上で３０分間インキュベーションすることによって明らかにした。細胞を、再びＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、そしてＦＡＣＳ緩衝液中の１％のパラホルムアルデヒド中に再懸濁した。細胞を、ＧＦＰおよびＰＥ蛍光についてＦＡＣＳによって分析し、そして実施例５に記載したように、データを、四分円ドットブロットにフォーマットした。ＢＡＦＦブロッキングアッセイを、１０μｇ／ｍｌのプロテインＡで精製した抗ＢＡＦＦ－Ｒ ｍＡｂまたはコントロール抗体（ＭＯＰ Ｃ２１）をＢＪＡＢ細胞とともに氷上で３０分間インキュベートすることによって行った。洗浄後、細胞を、２５０ｎｇ／ｍｌのビオチン化ｈｕＢＡＦＦとともに氷上で３０分間インキュベートした。再び、細胞を洗浄し、そしてＢＡＦＦの結合を、ＳＡＶ－ＰＥとともにインキュベーションすることによって明らかにした。細胞を、ＰＥ蛍光についてＦＡＣＳによって分析し、そしてデータを、重ね合わせヒストグラムとしてプロットした。

【０２９７】

（結果）

１０個のクローンに由来する上清が、ｈｕＢＡＦＦ－Ｒでトランスフェクトした細胞に結合することを観察した。１０個の抗ＢＡＦＦ－Ｒ上清のうちの４個のＦＡＣＳデータのドットプロットを、図１９Ａに示す。トランスフェクション効率は約５０％であり、ほぼ全てのトランスフェクトされた細胞が、上清での染色

後に右上側の四分円に移動した。これらの１０個の上清の全てが、ｍｕＢＡＦＦＲでトランスフェクトされた２９３ＥＢＮＡ細胞に結合しなかった（データは示さない）。ＢＡＦＦ－Ｒへの結合についてポジティブであったクローンによる馴化培地を、ＢＪＡＢ細胞の表面上で発現されるＢＡＦＦ－ＲとのＢＡＦＦの相互作用をブロックするそれらの能力について試験した。ＢＪＡＢ細胞はそれらの表面上にＢＡＦＦＲを発現し、そして検出可能な量のＢＣＭＡまたはＴＡＣＩは発現しなかった（Ｔｈｏｍｐｓｏｎら（２００１）Ｓｃｉｅｎｃｅ、８月１６日）。１０個のハイブリドーマのうちの２個（クローン２および９）がｍＡｂを産生し、このｍＡｂはＢＡＦＦとのＢＡＦＦ－Ｒの相互作用をブロックすることができた。（クローン２を、「抗－ＢＡＦＦ－Ｒクローン＃２．１」（ＩｇＧ１－κイソ型）として、２００１年９月６日にＡＴＣＣに寄託し、これは、ＡＴＣＣ Ｎｏ．＿＿を割り当てられた；クローン９を、「抗－ＢＡＦＦ－Ｒクローン＃９．１」（ＩｇＧ１－κイソ型）として、２００１年９月６日にＡＴＣＣに寄託し、これは、ＡＴＣＣ Ｎｏ．＿＿＿を割り当てられた）。図１９Ｂのヒストグラムの重ね合わせは、１０μｇ／ｍｌのｍＡｂクローン２（曲線（ｂ））または９（曲線（ｃ））のいずれかの予備インキュベーションが、左側よりも１０倍大きく、ＢＡＦＦコントロールを含まないシグナル（曲線（ａ））の近くにまで、ＢＡＦＦ結合曲線をシフトさせたことを示す。最も右側のヒストグラム（曲線（ｄ））は、コントロールのｍＡｂ ＭＯＰＣ２１、抗ＢＡＦＦ－Ｒ非ブロッキングｍＡｂ、またはタンパク質なしを、ＢＡＦＦの結合の前に細胞とインキュベートした場合の移動を示す。

【０２９８】

（実施例１７）

本実施例は、組換え発現された分子の可溶性の増大を生じる、ｈＢＡＦＦ－Ｒ２－７１）－Ｆｃ中のアミノ酸置換の構築、配列、およびタンパク質の特徴付けを記載する。

【０２９９】

（材料および方法：）

粘着末端を有する２本鎖のオリゴヌクレオチドカセットを、ｈＢＡＦＦ－Ｒ（２－７１）：ＩｇＧ１遺伝子中の同じ部位への連結によって、標的化した残基に置換を導入するために使用した。

【０３００】

発現プラスミドを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００を使用して実施例５のように２９３ＥＢＮＡ細胞中にトランスフェクトした。凝集を、実施例１２のように、トランスフェクションの２０時間後の馴化培地の非還元性ＳＤＳ－ＰＡＧＥの実行、それに続くウェスタン転写、およびＨＲＰ結合抗ヒトＩｇＧ（１：１００、Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）での検出およびＥＣＬ検出によって決定した。

【０３０１】

免疫沈降実験を、２００ｎｇのｆｌａｇ－ｈｕＢＡＦＦを有する１ｍｌのＤＭＥＭ／１０％ＦＢＳ／０．２％のＮａＡ３中の、１００μｌのトランスフェクション２０時間後の馴化培地を利用して行った。サンプルを、３０分間４℃で振盪させ、１つのチューブあたり３０μｌのプロテインＡ－セファロースを添加し、そしてさらに３０分間振盪を続けた。セファロースビーズをスピンダウンさせ、そして１ｍｌの冷ＰＢＳで３回洗浄した。ビーズを、２×ＳＤＳ還元緩衝液中に再懸濁し、そして４～２０％のアクリルアミドゲル上にローディングした。先に記載したようなウェスタン転写後、ｆｌａｇ－ＢＡＦＦを免疫沈降させる能力を、１μｇ／ｍｌのＨＲＰ結合抗ｆｌａｇ Ｍ２（Ｓｉｇｍａ）とともにフィルターをインキュベーションし、続いてＥＣＬ検出することによって明らかにした。

【０３０２】

（結果）
ヒトＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃは高度に凝集したが、マウスＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃは、ごくわずか（１０％未満）に凝集するのみであった。検出分析は、凝集の形成を減少させることなく、ＢＡＦＦ－ＲのＣ末端部分全体を、Ａ７１からＶ３６まで欠失させることができることを示した（システインリッチドメイン（ＣＲＤ）の最後のＣｙｓはＣ３５である）。このことは、ｈＢＡＦＦＲのＮ末端およびＣＲＤ領域が、凝集の形成に必要であることを示した。

【０３０３】
最初に、ヒトＢＡＦＦ－ＲのＮ末端配列の種々の量が、相同なマウス配列と置きかえられておりかつタンパク質凝集に対する影響について分析される、いくつかのマウス－ヒトＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃキメラを作製した。これらおよび続くｈＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃへの置換についてのアミノ酸配列を、図２０に示す。この図は、「野生型」ヒト（図９）およびマウスＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃの両方のＢＡＦＦ－Ｒ部分を示し、番号は、全長のヒト（図２ｄ）（配列番号５）またはマウスＢＡＦＦ－Ｒ（図４ｂ）（配列番号９）に由来するアミノ酸残基に対応している。図２０はまた、太字、赤、下線のタイプで示された置換された残基を有する、置換を有するｈＢＡＦＦＲ－Ｒ：Ｆｃクローンを示す。ヒトへのスウィッチングの前のマウスの残基の最初の２１個（Ｑ２１）未満を含有しているキメラは、野生型ｈＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃと同様に凝集するようである；しかし、少なくとも最初の３９個のマウスの残基を含むものは、ｍＢＡＦＦ－Ｒと同様に、明らかに減少した様式で凝集した。これらの２つのキメラＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃ構築物間のさらなる９個の残基の差異のうち、４個は、マウスとヒトとの間で異なった。このことは、Ｃ１９とＬ２７との間（ＣＲＤに対して内部である領域）でのヒト残基の少なくとも１つが、凝集に必要であることを示した。

【０３０４】
これらの４個の部位のみまたはこれらのサブセットにおいて、ヒト残基がマウスに対応しているもので置換されている構築物を、標準的な技術を使用して作製した。４個の残基（Ｖ２０Ｎ、Ｐ２１Ｑ、Ａ２２Ｔ、Ｌ２７Ｐ）のみが、ヒトＢＡＦＦＲ部分に置換された場合には、この改変されたＢＡＦＦ－Ｒ：Ｆｃは凝集しなかった。ｈＢＡＦＦ－Ｒ（Ｖ２０Ｎ、Ｐ２１Ｑ、Ａ２２Ｔ、Ｌ２７Ｐ）：Ｆｃはなお、免疫沈降によって分析した場合には、ＢＡＦＦと相互作用できた。Ｖ２０Ｎ　Ｌ２７Ｐ置換もまた、約９０％から約１０％に、ｈＢＡＦ－Ｒ：Ｆｃの凝集を減少させた。中程度のレベルの凝集が、Ｐ２１Ｑ　Ｌ２７Ｐ（４０％）、Ｌ２７Ｐ（６０％）、Ｖ２０Ｎ　Ｌ２７Ａ（６０％）、およびＶ２０Ｎ　Ｌ２７Ｓ（６０％）を用いて観察された。以下の置換の全ては、タンパク質の凝集を減少させなかった：Ｖ２０Ｎ　Ｐ２１Ｑ　Ａ２２Ｔ；Ｖ２０Ｎ　Ａ２２Ｔ；Ｖ２０Ｎ　Ｐ２１Ｑ；Ｖ２０Ｎ；およびＰ２１Ｑ。

【０３０５】
（実施例１８）
本実施例は、ｐ２１－Ａｒｃが、ＢＡＦＦ－Ｒに関係しているタンパク質であることを記載する。このような相互作用を決定するために使用した方法は、免疫沈降であった。

【０３０６】
（方法）
Ｎ末端にｍｙｃタグを融合されたＢＡＦＦ－Ｒ（ＢＡＦＦ－Ｒ－ｉ．ｃ．ｄ．）の細胞内ドメインをコードするｃＤＮＡを含有している構築物を作製し、そしてＣＨ２６９プラスミドのＮｈｅＩ（５’）およびＸｈｏＩ（３’）部位にサブクローン化した。２９３Ｅ細胞をこの構築物でトランスフェクトし、そして１５０ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１ｍＭのＮａ３ＶＯ４、５０ｍＭのＮａＦ、および１％のＢｒｉｊ　９７を含有している溶解

緩衝液で７２時間後に溶解させた。細胞溶解物を、１０，０００ｇで５分間の卓上型遠心分離器を用いて明澄化させ、そして抗ｍｙｃモノクローナル抗体９Ｅ１０で免疫沈降させた。免疫沈降物を、還元条件下での１０～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、そしてＰＶＤＦ膜上にトランスブロットした。ブロットしたタンパク質を、０．２％のＰｏｎｃｅａｕ　Ｓ溶液を用いて可視化し、そしてＢＡＦＦ－Ｒに特異的に結合しているタンパク質に対応している領域を切り出し、そしてＮ末端アミノ酸の配列分析に供した。ＰＡＴＴＥＲＮ　ＳＥＡＲＣＨアルゴリズムを使用する非重複タンパク質データベースの曖昧検索を、得られたＮ末端配列のデータについて行った。

【０３０７】

（結果）

ｍｙｃタグ化ＢＡＦＦＲ細胞質ドメインと特異的に結合したタンパク質の１つは、２１ｋＤａの見かけの分子量を有した。このタンパク質を、ｐ２１－Ａｒｃ（アクチン関連タンパク質複合体）として明確に同定した。ｐ２１－Ａｒｃは、アクチンの重合に関係していることが示されている、Ａｒｐ２／３複合体と呼ばれる７個のサブユニットのタンパク質の成分である（Ｗｅｌｃｈら（１９９７）Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１３８：３５７）。最近、アクチン結合タンパク質であるフィラミン（ｆｉｌａｍｉｎ）が、腫瘍壊死因子レセプター関連因子２（ＴＲＡＦ２）と結合することが報告された（Ｌｅｏｎａｒｄｉら（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：２７１）。従って、ＢＡＦＦＲ細胞質ドメインの同時免疫沈降物中でのｐ２１－Ａｒｃの同定は、ｐ２１－Ａｒｃが、ＢＡＦＦＲに直接結合するか、またはＴＲＡＦ２および／もしくは他のＴＲＡＦタンパク質とのその結合を通じてＢＡＦＦＲと間接的に結合し、次いでＢＡＦＦＲと結合するかのいずれかであることを示唆した。

【０３０８】

本発明の特定の実施形態の上記の詳細な説明から、特有のものが記載されていることが明らかである。特定の実施形態が本明細書中で詳細に開示されているが、これは説明の目的だけのための例に過ぎず、そして以下の添付の特許請求の範囲に関しての限定は意図されない。詳細には、種々の置換、変更、および改変が、特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲を逸脱することなく、本発明に対して行われ得ることが、発明者により意図される。

【化１】

SEQUENCE LISTING

<110> Biogen, Inc.
Thompson, Jeffrey S
Ambrose, Christine M

<120> Receptor Nucleic Acids and Polypeptides

<130> BIOG-0086

<150> 60/233,152
<151> 2000-09-18

<150> 60/234,140
<151> 2000-09-21

<150> 60/268,499
<151> 2001-02-13

<150> 60/312,185
<151> 2001-08-14

<160> 37

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 1201
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
gcaccatgag gcgagggccc cggagcctgc ggggcaggga cgcgccagcc cccacgccct 60

gcgtcccggc cgagtgcttc gacctgctgg tccgccactg cgtggcctgc gggctcctgc 120

gcacgccgcg gccgaaaccg ggtaaggggg acccacgggg cgcgcggcgc cggcagctgc 180

ggggagaacg gggccccgat cgccagggcg caggcagagc cccgaccccc gggggcgccg 240

agggctgaaa ggaccctgtg ggcagggcct ggaggggccc gcgatcaccg cgtggccctc 300

accgccgcct ctctccctcc ccttgtccac cgccccccgg ctgtccctcc cctccccggc 360

cagcctcgcc cccctccgcc cctccccgtc cccgctcctc cctcccctcg gccccctggc 420

ctccctccct gtccccctcc gaagcagccg gggccagcag ccctgcgccc aggacggcgc 480

tgcagccgca ggagtcggtg ggcgcggggg ccggcgaggc ggcgctgccc ctgcccgggc 540

tgctctttgg cgcccccgcg ctgctgggcc tggcactggt cctggcgctg gtcctggtgg 600

gtctggtgag ctggaggcgg cgacagcggc ggcttcgcgg cgcgtcctcc gcagaggccc 660

ccgacggaga caaggacgcc ccagagcccc tggacaaggt catcattctg tctccgggaa 720

tctctgatgc cacagctcct gcctggcctc ctcctgggga agacccagga accaccccac 780

ctggccacag tgtccctgtg ccagccacag agctgggctc cactgaactg gtgaccacca 840

agacggccgg ccctgagcaa caatagcagg gagccggcag gaggtggccc ctgccctccc 900

tctggacccc cagccagggg cttggaaatc aaattcagct cttcactcca gcatgcacat 960

【化２】

gccctctttc tgggaccagg ctaaccctgc agaagcacag acactacaga ccacagcatt 1020

cagcccccat ggagtttggt gtgcttgcct ttggcttcag acctcaccat ctttgacagc 1080

ccttgaaggt ggtagcccag ctcctgttcc tgtgccttca aaaggctggg gcactatgag 1140

taaaagaccg cttttaaaat ggggaaggca ccattaagcc aaaatgaatc tgaaaaaaga 1200

c 1201

<210> 2
<211> 992
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
gtcgacccac gcgtccgccc acgcgtccgg tgcggcggcg tcggcaccat gaggcgaggg 60

ccccggagcc tgcggggcag ggacgcgcca gcccccacgc cctgcgtccc ggccgagtgc 120

ttcgacctgc tggtccgcca ctgcgtggcc tgcgggctcc tgcgcacgcc gcggccgaaa 180

ccgggtaagg gggacccacg gggcgcgcgg cgccggcagc tgcggggaga acggggcccc 240

gatcgccagg gcgcaggcag agccccgacc cccgggggcg ccgagggctg aaaggaccct 300

gtgggcaggg cctggagggg cccgcgatca ccgcgtggcc ctcaccgccg cctctctccc 360

tccccttgtc caccgccccc cggctgtccc tcccctcccc ggccagcctc gcccccctcc 420

gcccctcccc gtccccgctc ctccctcccc tcggcccccc ggcctccctc cctgtcccct 480

cccgaagcag ccggggccag cagccctgcg cccaggacgg cgctgcagcc gcaggagtcg 540

gtgggcgcgg gggccggcga ggcggcgctg cccctgcccg ggctgctctt tggcgccccc 600

gcgctgctgg gcctggcact ggtcctggcg ctggtcctgg tgggtctggt gagctggagg 660

cggcgacagc ggcggcttcg cggcgcgtcc tccgcagagg cccccgacgg agacaaggac 720

gccccagagc ccctggacaa ggtcatcatt ctgtctccgg gaatctctga tgccacagct 780

cctgcctggc ctcctcctgg ggaagaccca ggaaccaccc cacctggcca cagtgtccct 840

gtgccagcca cagagctggg ctccactgaa ctggtgacca ccaagacggc cggccctgag 900

caacaatagc agggagccgg caggaggtgg cccctgccct ccctctggac ccccagccag 960

gggcttggaa atcaaattca gctcttcact cc 992

<210> 3
<211> 906
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
ggcgcgccgc accatgaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc 60

cacgccctgc gtcccggccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg 120

gctcctgcgc acgccgcggc cgaaaccggc agccggggcc agcagccctg cgcccaggac 180

【化３】

ggcgctgcag ccgcaggagt cggtgggcgc gggggccggc gaggcggcgc tgcccctgcc 240

cgggctgctc tttggcgccc ccgcgctgct gggcctggca ctggtcctgg cgctggtcct 300

ggtgggtctg gtgagctgga ggcggcgaca gcggcggctt cgcggcgcgt cctccgcaga 360

ggcccccgac ggagacaagg acgccccaga gcccctggac aaggtcatca ttctgtctcc 420

gggaatctct gatgccacag ctcctgcctg gcctcctcct ggggaagacc caggaaccac 480

cccacctggc cacagtgtcc ctgtgccagc cacagagctg ggctccactg aactggtgac 540

caccaagacg gccggccctg agcaacaata gcagggagcc ggcaggaggt ggcccctgcc 600

ctccctctgg acccccagcc aggggcttgg aaatcaaatt cagctcttca ctccagcatg 660

cacatgccct ctttctggga ccaggctaac cctgcagaag cacagacact acagaccaca 720

gcattcagcc cccatggagt ttggtgtgct tgcctttggc ttcagacctc accatctttg 780

acagcccttg aaggtggtag cccagctcct gttcctgtgc cttcaaaagg ctggggcact 840

atgagtaaaa gaccgctttt aaaatgggga aggcaccatt aagccaaaat gaatctgaaa 900

aaagac 906

<210> 4
<211> 903
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ggcgcgccgc accatgaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc 60

cacgccctgc gtcccggccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg 120

gctcctgcgc acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc 180

gctgcagccg caggagtcgg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcgctgc ccctgcccgg 240

gctgctcttt ggcgcccccg cgctgctggg cctggcactg gtcctggcgc tggtcctggt 300

gggtctggtg agctggaggc ggcgacagcg gcggcttcgc ggcgcgtcct ccgcagaggc 360

ccccgacgga gacaaggacg ccccagagcc cctggacaag gtcatcattc tgtctccggg 420

aatctctgat gccacagctc ctgcctggcc tcctcctggg gaagacccag gaaccacccc 480

acctggccac agtgtccctg tgccagccac agagctgggc tccactgaac tggtgaccac 540

caagacggcc ggccctgagc aacaatagca gggagccggc aggaggtggc ccctgccctc 600

cctctggacc cccagccagg ggcttggaaa tcaaattcag ctcttcactc cagcatgcac 660

atgccctctt tctgggacca ggctaaccct gcagaagcac agacactaca gaccacagca 720

ttcagccccc atggagtttg gtgtgcttgc ctttggcttc agacctcacc atctttgaca 780

gcccttgaag gtggtagccc agctcctgtt cctgtgcctt caaaaggctg gggcactatg 840

agtaaaagac cgcttttaaa atggggaagg caccattaag ccaaaatgaa tctgaaaaaa 900

gac 903

【化４】

<210> 5
<211> 185
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
20 25 30

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
35 40 45

Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val
50 55 60

Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe
65 70 75 80

Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu
85 90 95

Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala
100 105 110

Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu
115 120 125

Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro
130 135 140

Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr
165 170 175

Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
180 185

<210> 6
<211> 1187
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
gggcgcctac aatctcagct actcgggagg ctgaggcaga gaattgtttg aacccgggag 60

【化５】

gcagagcttg cagtgagccg agatagcgcc attgcactcc agcctgggcg acagagcgag 120

actccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaaaga aaggggggcc ccaggcgagc tcggtcccac 180

ccagcaggcg ggggcggggc agggcagagt gctccccccg cccccgcttt cctccccgag 240

ggccccggag cccagctcag cctcagtccc cgcagcttgt gcggcggcgt cggcaccatg 300

aggcgagggc cccggagcct gcggggcagg gacgcgccag cccccacgcc ctgcgtcccg 360

gccgagtgct tcgacctgct ggtccgccac tgcgtggcct gcgggctcct gcgcacgccg 420

cggccgaaac cggccggggc cagcagcccc gcgcccagga cggcgctgca gccgcaggag 480

tcggtgggcg cgggggccgg cgaggcggcg ctgcccctgc ccgggctgct ctttggcgcc 540

cccgcgctgc tgggcctggc actggtcctg gcgctggtcc tggtgggtct ggtgagctgg 600

aggcggcgac agcggcggct tcgcggcgcg tcctccgcag aggcccccga cggagacaag 660

gacgccccag agcccctgga caaggtcatc attctgtctc cgggaatctc tgatgccaca 720

gctcctgcct ggcctcctcc tggggaagac ccaggaacca ccccacctgg ccacagtgtc 780

cctgtgccag ccacagagct gggctccact gaactggtga ccaccaagac ggccggccct 840

gagcaacaat agcagggagc cggcaggagg tggccccctgc cctccctctg gacccccagc 900

caggggcttg gaaatcaaat tcagctcttc actccagcat gcacatgccc tctttctggg 960

accaggctaa ccctgcagaa gcacagacac tacagaccac agcattcagc ccccatggag 1020

tttggtgtgc ttgcctttgg cttcagacct caccatcttt gacagccctt gaaggtggta 1080

gcccagctcc tgttcctgtg ccttcaaaag gctggggcac tatgagtaaa agaccgcttt 1140

taaaatgggg aaggcaccat taagccaaaa tgaatctgaa aaaagac 1187

<210> 7
<211> 266
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Arg Glu Ala Glu Leu Ala Val Ser Arg Asp Ser Ala Ile Ala Leu
1 5 10 15

Gln Pro Gly Arg Gln Ser Glu Thr Pro Ser Gln Lys Lys Lys Lys Lys
20 25 30

Arg Lys Gly Gly Pro Arg Arg Ala Arg Ser His Pro Ala Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ala Gly Gln Ser Ala Pro Pro Ala Pro Arg Phe Leu Pro Glu Gly
50 55 60

Pro Gly Ala Gln Leu Ser Leu Ser Pro Arg Ser Leu Cys Gly Gly Val

【化６】

65 70 75 80

Gly Thr Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro
85 90 95

Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
100 105 110

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
115 120 125

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
130 135 140

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu
145 150 155 160

Phe Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val
165 170 175

Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly
180 185 190

Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro
195 200 205

Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala
210 215 220

Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly
225 230 235 240

His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val
245 250 255

Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
260 265

<210> 8
<211> 1943
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 8
gaattcggca cgagcccaga ctcggaactg tcccagctgc atgaggcggc gacatgggcg 60

ccaggagact ccgggtccga agccagagga gccgggacag ctcggtgccc acccagtgca 120

atcagaccga gtgcttcgac cctctggtga gaaactgcgt gtcctgtgag ctcttccaca 180

cgccggacac tggacataca agcagcctgg agcctgggac agctctgcag cctcaggagg 240

【化７】

gctccgcgct gagacccgac gtggcgctgc tcgtcggtgc ccccgcactc ctgggactga 300
tactggcgct gaccctggtg ggtctagtga gtctggtgag ctggaggtgg cgtcaacagc 360
tcaggacggc ctccccagac acttcagaag gagtccagca agagtccctg gaaaatgtct 420
ttgtaccctc ctcagaaacc cctcatgcct cagctcctac ctggcctccg ctcaaagaag 480
atgcagacag cgccctgcca cgccacagcg tcccggtgcc cgccacagaa ctgggctcca 540
ccgagctggt gaccaccaag acagctggcc cagagcaata gcagcagtgg aggctggaac 600
ccagggatct ctactgggct tgtggacttc acccaacagc ttgggaaaga acttggccct 660
tcagtgacgg agtcctttgc ctgggggggcg aacccggcag aaccagacac tacaggccac 720
atgagattgc ttttgtgtta gctcttgact tgagaacgtt ccatttctga gatggttttt 780
aagcctgtgt gccttcagat ggttggatag acttgagggt tgcatattta atctctgtag 840
tgagtcggag actggaaact taatctcgtt ctaaaaattt tggattactg ggctggaggt 900
atggctcagc agttcggttt gtgtgctgtt ctagccgagg actccagttg ttcagcttcc 960
cggaactcag atctggcagc ttaagaccac ctgtcactcc agcccctgga acatccttgc 1020
ctccaaaggc accagcactc atttgctcta gagcacacac acacacacac acacacacac 1080
acacacacac acacacacat atgcatgcat gcacacttaa aaatgtcaaa attagcggct 1140
ggagaaattc atggtcaaca gcgcttactg tgattccaga ggatgagagt ttgattccca 1200
gaatgcactg cgggtggctc attactgagc ataacttttg cttcagggga cctgatgcct 1260
ctggacttca tgggcatctg tattcacgtg cacatcctac acacacacac acacacacac 1320
acagacatac acacacacac actcttttac aaatgataaa atataagata ggcatggtgg 1380
tacacacctt taatcccaac attggggaag caaaggcagg caggtaactg agttggaggc 1440
catcctggtc tacatagcaa gttccaggct aaccagagct aaatggtgag accaagtctc 1500
aaaataatac tccccccccа aaaaaaaaaa acttttaaat tttgattttt ttcttttatt 1560
attatttttt atattaattt catggtgttt agaagtggta tacttagatg gtgactaaga 1620
ggaggtaaag ccatcaggac tgagccccta acatacaagg agaaagcaga gacaatgaac 1680
acgcccctct cctgctgtgt gccagctctg gaccaccagc cagagggcaa tcatcagatg 1740
tgggccctag aaccttcaga gccgaaagct aaatcaatct catttctttg taaagctatt 1800
tagccttagg tgttttgtta cggtgatata aaatggacta acacaggcac tatgagtaag 1860
aagcttttct ttgagctggg aaaggtactg ttaaaccaaa attaatctga ataaaaaaag 1920
gctaagggga agacacttaa aaa 1943

<210> 9
<211> 175
<212> PRT
<213> Mus musculus

【化８】

<400> 9

Met Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val
20 25 30

Arg Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His
35 40 45

Thr Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser
50 55 60

Ala Leu Arg Pro Asp Val Ala Leu Leu Val Gly Ala Pro Ala Leu Leu
65 70 75 80

Gly Leu Ile Leu Ala Leu Thr Leu Val Gly Leu Val Ser Leu Val Ser
85 90 95

Trp Arg Trp Arg Gln Gln Leu Arg Thr Ala Ser Pro Asp Thr Ser Glu
100 105 110

Gly Val Gln Gln Glu Ser Leu Glu Asn Val Phe Val Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Thr Pro His Ala Ser Ala Pro Thr Trp Pro Pro Leu Lys Glu Asp Ala
130 135 140

Asp Ser Ala Leu Pro Arg His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu
145 150 155 160

Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln
165 170 175

<210> 10
<211> 184
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
20 25 30

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
35 40 45

【化９】

```
Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
    50                  55                  60

Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly
65                  70                  75                  80

Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val
                85                  90                  95

Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
            100                 105                 110

Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
        115                 120                 125

Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
    130                 135                 140

Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
145                 150                 155                 160

Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr
                165                 170                 175

Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
            180
```

<210> 11
<211> 963
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(63)
<223> encodes signal peptide

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(66)
<223> introduces restriction site

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(276)
<223> encodes BAFF-R extracellular region

<220>
<221> misc_feature
<222> (277)..(279)

【化１０】

<223> introduces restriction site

<220>
<221> misc_feature
<222> (280)..(960)
<223> encodes human IgG1 Fc

<400> 11
atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacgtcaggc gagggccccg gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc cacgccctgc 120
gtcccggccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg gctcctgcgc 180
acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc gctgcagccg 240
caggagtcgg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcggtcg acaaaactca cacatgccca 300
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 360
aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 420
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 480
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 540
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 600
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 660
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 720
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 780
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ttggactccg acggctcctt cttcctctac 840
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 900
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa 960
tga 963

<210> 12
<211> 320
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(21)
<223> signal sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> encoded by region introducing restriction site

<220>
<221> PEPTIDE

【化１１】

<222> (23)..(92)
<223> BAFF-R extracellular domain

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(93)
<223> encoded by region introducing restriction site

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (94)..(320)
<223> Human IgG1 Fc

<400> 12

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Val Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg
20 25 30

Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu
35 40 45

Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro
50 55 60

Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro
65 70 75 80

Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Val Asp Lys Thr
85 90 95

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
100 105 110

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
115 120 125

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
130 135 140

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
145 150 155 160

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
165 170 175

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
180 185 190

【化１２】

```
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
        195                 200                 205

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
    210                 215                 220

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
225                 230                 235                 240

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
                245                 250                 255

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
            260                 265                 270

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
        275                 280                 285

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
    290                 295                 300

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
305                 310                 315                 320
```

<210> 13
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

```
Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1               5                   10                  15

Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
            20                  25                  30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
    50                  55                  60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65                  70
```

<210> 14
<211> 65
<212> PRT

【化１３】

<213> Mus musculus

<400> 14

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg
20 25 30

Asn Cys Val Ser Cys Glu Leu Phe His Thr Pro Asp Thr Gly His Thr
35 40 45

Ser Ser Leu Glu Pro Gly Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Gly Ser Ala
50 55 60

Leu
65

<210> 15
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> substitution

【化１４】

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> substitution

<400> 15

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Pro
1 5 10 15

Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 16
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> substitution

【化１５】

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (16)..(16)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (20)..(20)
<223> substitution

<400> 16

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 17
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> substitution

<220>

【化１６】

<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (16)..(16)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (20)..(20)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

【化１７】

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 17

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg
20 25 30

His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 18
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> substitution

【化１８】

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (15)..(15)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (16)..(16)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (20)..(20)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

【化１９】

<220>
<221> VARIANT
<222> (33)..(33)
<223> substitution

<400> 18

Gly Ala Arg Arg Leu Arg Val Arg Ser Gln Arg Ser Arg Asp Ser Ser
1 5 10 15

Val Pro Thr Gln Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg
20 25 30

Asn Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala
35 40 45

Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser
50 55 60

Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 19
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 19

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

【化２０】

```
Pro Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
            20                  25                  30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
    50                  55                  60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65                  70


<210>  20
<211>  70
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<220>
<221>  VARIANT
<222>  (22)..(22)
<223>  substitution


<220>
<221>  VARIANT
<222>  (24)..(24)
<223>  substitution


<220>
<221>  VARIANT
<222>  (29)..(29)
<223>  substitution


<400>  20

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1               5                   10                  15

Pro Cys Asn Pro Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
            20                  25                  30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
    50                  55                  60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65                  70


<210>  21
<211>  70
```

【化２１】

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 21

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Gln Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 22
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 22

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

【化２２】

```
Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
            20                  25                  30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
    50                  55                  60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65                  70


<210>  23
<211>  70
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<220>
<221>  VARIANT
<222>  (23)..(23)
<223>  substitution


<220>
<221>  VARIANT
<222>  (24)..(24)
<223>  substitution


<220>
<221>  VARIANT
<222>  (29)..(29)
<223>  substitution


<400>  23

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1               5                   10                  15

Pro Cys Val Gln Thr Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
            20                  25                  30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
    50                  55                  60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65                  70


<210>  24
```

【化２３】

<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 24

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 25
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 25

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala

【化２４】

50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 26
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 26

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Ser Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 27
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(29)
<223> substitution

<400> 27

【化２５】

```
Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1               5                   10                  15

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Ala Leu Val Arg His Cys Val
            20                  25                  30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
    50                  55                  60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65                  70
```

<210> 28
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> substitution

<400> 28

```
Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1               5                   10                  15

Pro Cys Asn Gln Thr Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
            20                  25                  30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
    50                  55                  60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65                  70
```

【化２６】

<210> 29
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (24)..(24)
<223> substitution

<400> 29

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

Pro Cys Asn Pro Thr Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 30
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

<400> 30

Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1 5 10 15

【化２７】

```
Pro Cys Asn Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
            20                  25                  30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
    50                  55                  60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65                  70
```

<210> 31
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> substitution

<400> 31

```
Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1               5                   10                  15

Pro Cys Val Gln Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
            20                  25                  30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
    50                  55                  60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65                  70
```

<210> 32
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (22)..(22)
<223> substitution

<400> 32

```
Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro Thr
1               5                   10                  15
```

【化２８】

Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val
20 25 30

Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala
50 55 60

Gly Ala Gly Glu Ala Ala
65 70

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 33
ggccgagtgc ttcgacctgc t 21

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 34
ggtccgccac tgcgtggcct g 21

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 35
caccaagacg gccggccctg a 21

<210> 36
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 36
gggcgcctac aatctcagct a 21

【化２９】

<210> 37
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer

<400> 37
ggcggaccag caggtcgaag cactc 25

【図１Ａ】

Figure 1A

JST576 cDNAクローンの配列

```
1     GCACCATGAG GCGAGGGCCC CGGAGCCTGC GGGGCAGGGA CGCGCCAGCC
51    CCCACGCCCT GCGTCCCGGC CGAGTGCTTC GACCTGCTGG TCCGCCACTG
101   CGTGGCCTGC GGGCTCCTGC GCACGCCGCG GCCGAAACCG GGTAAGGGGG
151   ACCCACGGGG CGCGCGGCGC CGGCAGCTGC GGGGAGAACG GGGCCCCGAT
201   CGCCAGGGCG CAGGCAGAGC CCCGACCCCC GGGGGCGCCG AGGGCTGAAA
251   GGACCCTGTG GGCAGGGCCT GGAGGGGCCC GCGATCACCG CGTGGCCCTC
301   ACCGCCGCCT CTCTCCCTCC CCTTGTCCAC CGCCCCCCGG CTGTCCCTCC
351   CCTCCCCGGC CAGCCTCGCC CCCCTCCGCC CCTCCCCGTC CCCGCTCCTC
401   CCTCCCCTCG GCCCCCTGGC CTCCCTCCCT GTCCCCTCCC GAAGCAGCCG
451   GGGCCAGCAG CCCTGCGCCC AGGACGGCGC TGCAGCCGCA GGAGTCGGTG
501   GGCGCGGGGG CCGGCGAGGC GGCGCTGCCC CTGCCCGGGC TGCTCTTTGG
551   CGCCCCCGCG CTGCTGGGCC TGGCACTGGT CCTGGCGCTG GTCCTGGTGG
601   GTCTGGTGAG CTGGAGGCGG CGACAGCGGC GGCTTCGCGG CGCGTCCTCC
651   GCAGAGGCCC CCGACGGAGA CAAGGACGCC CCAGAGCCCC TGGACAAGGT
701   CATCATTCTG TCTCCGGGAA TCTCTGATGC CACAGCTCCT GCCTGGCCTC
751   CTCCTGGGGA AGACCCAGGA ACCACCCCAC CTGGCCACAG TGTCCCTGTG
801   CCAGCCACAG AGCTGGGCTC CACTGAACTG GTGACCACCA AGACGGCCGG
851   CCCTGAGCAA CAATAGCAGG GAGCCGGCAG GAGGTGGCCC CTGCCCTCCC
901   TCTGGACCCC CAGCCAGGGG CTTGGAAATC AAATTCAGCT CTTCACTCCA
951   GCATGCACAT GCCCTCTTTC TGGGACCAGG CTAACCCTGC AGAAGCACAG
1001  ACACTACAGA CCACAGCATT CAGCCCCCAT GGAGTTTGGT GTGCTTGCCT
1051  TTGGCTTCAG ACCTCACCAT CTTTGACAGC CCTTGAAGGT GGTAGCCCAG
1101  CTCCTGTTCC TGTGCCTTCA AAAGGCTGGG GCACTATGAG TAAAAGACCG
1151  CTTTTAAAAT GGGGAAGGCA CCATTAAGCC AAAATGAATC TGAAAAAAGA
1201  C
```

【図１Ｂ】

Figure 1B

EST AI250289の配列

```
1     GTCGACCCAC GCGTCCGCCC ACGCGTCCGG TGCGGCGGCG TCGGCACCAT
51    GAGGCGAGGG CCCCGGAGCC TGCGGGGCAG GGACGCGCCA GCCCCCACGC
101   CCTGCGTCCC GGCCGAGTGC TTCGACCTGC TGGTCCGCCA CTGCGTGGCC
151   TGCGGGCTCC TGCGCACGCC GCGGCCGAAA CCGGGTAAGG GGGACCCACG
201   GGGCGCGCGG CGCCGGCAGC TGCGGGGAGA ACGGGGCCCC GATCGCCAGG
251   GCGCAGGCAG AGCCCCGACC CCCGGGGGCG CCGAGGGCTG AAAGGACCCT
301   GTGGGCAGGG CCTGGAGGGG CCCGCGATCA CCGCGTGGCC CTCACCGCCG
351   CCTCTCTCCC TCCCCTTGTC CACCGCCCCC CGGCTGTCCC TCCCCTCCCC
401   GGCCAGCCTC GCCCCCCTCC GCCCCTCCCC GTCCCCGCTC CTCCCTCCCC
451   TCGGCCCCCT GGCCTCCCTC CCTGTCCCCT CCCGAAGCAG CCGGGGCCAG
501   CAGCCCTGCG CCCAGGACGG CGCTGCAGCC GCAGGAGTCG GTGGGCGCGG
551   GGGCCGGCGA GGCGGCGCTG CCCCTGCCCG GGCTGCTCTT TGGCGCCCCC
601   GCGCTGCTGG GCCTGGCACT GGTCCTGGCG CTGGTCCTGG TGGGTCTGGT
651   GAGCTGGAGG CGGCGACAGC GGCGGCTTCG CGGCGCGTCC TCCGCAGAGG
701   CCCCCGACGG AGACAAGGAC GCCCCAGAGC CCCTGGACAA GGTCATCATT
751   CTGTCTCCGG GAATCTCTGA TGCCACAGCT CCTGCCTGGC CTCCTCCTGG
801   GGAAGACCCA GGAACCACCC CACCTGGCCA CAGTGTCCCT GTGCCAGCCA
851   CAGAGCTGGG CTCCACTGAA CTGGTGACCA CCAAGACGGC CGGCCCTGAG
901   CAACAATAGC AGGGAGCCGG CAGGAGGTGG CCCCTGCCCT CCCTCTGGAC
951   CCCCAGCCAG GGGCTTGGAA ATCAAATTCA GCTCTTCACT CC
```

【図２Ａ】

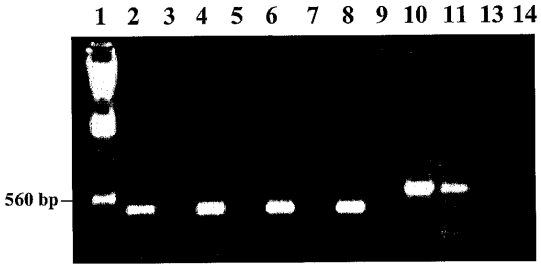
Figure 2A

GENSCANにより推測したJST576の配列

```
1     GGCGCGCCGC ACCATGAGGC GAGGGCCCCG GAGCCTGCGG GGCAGGGACG
51    CGCCAGCCCC CACGCCCTGC GTCCCGGCCG AGTGCTTCGA CCTGCTGGTC
101   CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GCTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151   AGCCGGGGCC AGCAGCCCTG CGCCCAGGAC GGCGCTGCAG CCGCAGGAGT
201   CGGTGGGCGC GGGGGCCGGC GAGGCGGCGC TGCCCCTGCC CGGGCTGCTC
251   TTTGGCGCCC CCGCGCTGCT GGGCCTGGCA CTGGTCCTGG CGCTGGTCCT
301   GGTGGGTCTG GTGAGCTGGA GGCGGCGACA GCGGCGGCTT CGCGGCGCGT
351   CCTCCGCAGA GGCCCCCGAC GGAGACAAGG ACGCCCCAGA GCCCCTGGAC
401   AAGGTCATCA TTCTGTCTCC GGGAATCTCT GATGCCACAG CTCCTGCCTG
451   GCCTCCTCCT GGGGAAGACC CAGGAACCAC CCCACCTGGC CACAGTGTCC
501   CTGTGCCAGC CACAGAGCTG GGCTCCACTG AACTGGTGAC CACCAAGACG
551   GCCGGCCCTG AGCAACAATA GCAGGGAGCC GGCAGGAGGT GGCCCCTGCC
601   CTCCCTCTGG ACCCCCAGCC AGGGGCTTGG AAATCAAATT CAGCTCTTCA
651   CTCCAGCATG CACATGCCCT CTTTCTGGGA CCAGGCTAAC CCTGCAGAAG
701   CACAGACACT ACAGACCACA GCATTCAGCC CCCATGGAGT TTGGTGTGCT
751   TGCCTTTGGC TTCAGACCTC ACCATCTTTG ACAGCCCTTG AAGGTGGTAG
801   CCCAGCTCCT GTTCCTGTGC CTTCAAAAGG CTGGGGCACT ATGAGTAAAA
851   GACCGCTTTT AAAATGGGGA AGGCACCATT AAGCCAAAAT GAATCTGAAA
901   AAAGAC
```

【図２Ｂ】

Figure 2B



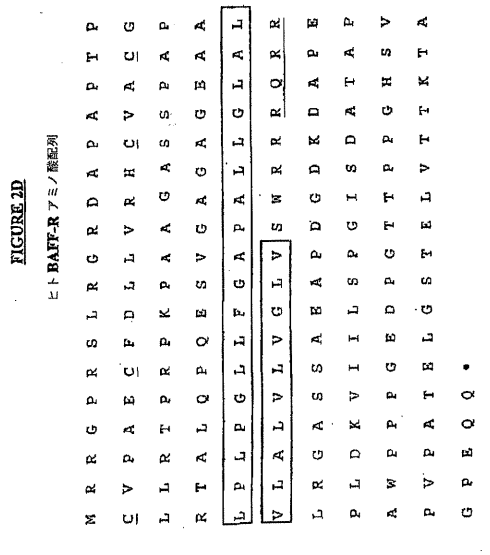
【図２Ｃ】

Figure 2C

Intronを除くJST576の配列

```
1     GGCGCGCCGC ACCATGAGGC GAGGGCCCCG GAGCCTGCGG GGCAGGGACG
51    CGCCAGCCCC CACGCCCTGC GTCCCGGCCG AGTGCTTCGA CCTGCTGGTC
101   CGCCACTGCG TGGCCTGCGG GCTCCTGCGC ACGCCGCGGC CGAAACCGGC
151   CGGGGCCAGC AGCCCTGCGC CCAGGACGGC GCTGCAGCCG CAGGAGTCGG
201   TGGGCGCGGG GGCCGGCGAG GCGGCGCTGC CCCTGCCCGG GCTGCTCTTT
251   GGCGCCCCCG CGCTGCTGGG CCTGGCACTG GTCCTGGCGC TGGTCCTGGT
301   GGGTCTGGTG AGCTGGAGGC GGCGACAGCG GCGGCTTCGC GGCGCGTCCT
351   CCGCAGAGGC CCCCGACGGA GACAAGGACG CCCCAGAGCC CCTGGACAAG
401   GTCATCATTC TGTCTCCGGG AATCTCTGAT GCCACAGCTC CTGCCTGGCC
451   TCCTCCTGGG GAAGACCCAG GAACCACCCC ACCTGGCCAC AGTGTCCCTG
501   TGCCAGCCAC AGAGCTGGGC TCCACTGAAC TGGTGACCAC CAAGACGGCC
551   GGCCCTGAGC AACAATAGCA GGGAGCCGGC AGGAGGTGGC CCCTGCCCTC
601   CCTCTGGACC CCCAGCCAGG GGCTTGGAAA TCAAATTCAG CTCTTCACTC
651   CAGCATGCAC ATGCCCTCTT TCTGGGACCA GGCTAACCCT GCAGAAGCAC
701   AGACACTACA GACCACAGCA TTCAGCCCCC ATGGAGTTTG GTGTGCTTGC
751   CTTTGGCTTC AGACCTCACC ATCTTTGACA GCCCTTGAAG GTGGTAGCCC
801   AGCTCCTGTT CCTGTGCCTT CAAAAGGCTG GGGCACTATG AGTAAAAGAC
851   CGCTTTTAAA ATGGGGAAGG CACCATTAAG CCAAAATGAA TCTGAAAAAA
901   GAC
```

【図２Ｄ】



【図３】

Figure 3

```
GGGCGCCTAC AATCTCAGCT ACTCGGGAGG CTGAGGCAGA GAATTGTTTG AACCCGGGAG
                                                    *   T   R   E

GCAGAGCTTG CAGTGAGCCG AGATAGCGCC ATTGCACTCC AGCCTGGGCG ACAGAGCGAG
  A   E   L     A   V   S   R     D   S   A     I   A   L     Q   P   G   R     Q   S   E

ACTCCGTCTC AAAAAAAAAA AAAGAAAAGA AAGGGGGGCC CCAGGCGAGC TCGGTCCCAC
  T   P   S     Q   K   K   K     K   K   R     K   G   G     P   R   R   A     R   S   H

CCAGCAGGCG GGGGCGGGGC AGGGCAGAGT GCTCCCCCCG CCCCCCGCTT CCTCCCCGAG
  P   A   G     G   G   G   A     G   Q   S     A   P   P     A   P   R   F     L   P   E

GGCCCCGGAG CCCAGCTCAG CCTCAGTCCC CGCAGCTTGT GCGGCGGCGT CGGCACCATG
  G   P   G     A   Q   L   S     L   S   P     R   S   L     C   G   G   V     G   T   M

AGGCGAGGGC CCCGGAGCCT GCGGGGCAGG GACGCGCCAG CCCCCACGCC CTGCGTCCCG
  R   R   G     P   R   S   L     R   G   R     D   A   P     A   P   T   P     C   V   P

GCCGAGTGCT TCGACCTGCT GGTCCGCCAC TGCGTGGCCT GCGGGCTCCT GCGCACGCCG
  A   E   C     F   D   L   L     V   R   H     C   V   A     C   G   L   L     R   T   P

CGGCCGAAAC CGGCCGGGGC CAGCAGCCCT GCGCCCAGGA CGGCGCTGCA GCCGCAGGAG
  R   P   K     P   A   G   A     S   S   P     A   P   R     T   A   L   Q     P   Q   E

TCGGTGGGCG CGGGGGCCGG CGAGGCGGCG CTGCCCCTGC CCGGGCTGCT CTTTGGCGCC
  S   V   G     A   G   A   G     E   A   A     L   P   L     P   G   L   L     F   G   A

CCCGCGCTGC TGGGCCTGGC ACTGGTCCTG GCGCTGGTCC TGGTGGGTCT GGTGAGCTGG
  P   A   L     L   G   L   A     L   V   L     A   L   V     L   V   G   L     V   S   W

AGGCGGCGAC AGCGGCGGCT TCGCGGCGCG TCCTCCGCAG AGGCCCCCGA CGGAGACAAG
  R   R   R     Q   R   R   L     R   G   A     S   S   A     E   A   P   D     G   D   K

GACGCCCCAG AGCCCCTGGA CAAGGTCATC ATTCTGTCTC CGGGAATCTC TGATGCCACA
  D   A   P     E   P   L   D     K   V   I     I   L   S     P   G   I   S     D   A   T

GCTCCTGCCT GGCCTCCTCC TGGGGAAGAC CCAGGAACCA CCCCACCTGG CCACAGTGTC
  A   P   A     W   P   P   P     G   E   D     P   G   T     T   P   P   G     H   S   V

CCTGTGCCAG CCACAGAGCT GGGCTCCACT GAACTGGTGA CCACCAAGAC GGCCGGCCCT
  P   V   P     A   T   E   L     G   S   T     E   L   V     T   T   K   T     A   G   P

GAGCAACAAT AGCAGGGAGC CGGCAGGAGG TGGCCCCTGC CCTCCCTCTG GACCCCCAGC
  E   Q   Q     *

CAGGGGCTTG GAAATCAAAT TCAGCTCTTC ACTCCAGCAT GCACATGCCC TCTTTCTGGG
ACCAGGCTAA CCCTGCAGAA GCACAGACAC TACAGACCAC AGCATTCAGC CCCCATGGAG
TTTGGTGTGC TTGCCTTTGG CTTCAGACCT CACCATCTTT GACAGCCCTT GAAGGTGGTA
GCCCAGCTCC TGTTCCTGTG CCTTCAAAAG GCTGGGGCAC TATGAGTAAA AGACCGCTTT
TAAAATGGGG AAGGCACCAT TAAGCCAAAA TGAATCTGAA AAAAGAC
```

【図４Ａ】

Figure 4A

マウスBAFF-Rの配列

```
1     GAATTCGGCA CGAGCCCAGA CTCGGAACTG TCCCAGCTGC ATGAGGCGGC
51    GACATGGGCG CCAGGAGACT CCGGGTCCGA AGCCAGAGGA GCCGGGACAG
101   CTCGGTGCCC ACCCAGTGCA ATCAGACCGA GTGCTTCGAC CCTCTGGTGA
151   GAAACTGCGT GTCCTGTGAG CTCTTCCACA CGCCGCACAC TGGACATACA
201   AGCAGCCTGG AGCCTGGGAC AGCTCTGCAG CCTCAGGAGG GCTCCGCGCT
251   GAGACCCGAC GTGGCGCTGC TCGTCGGTGC CCCCGCACTC CTGGGACTGA
301   TACTGGCGCT GACCCTGGTG GGTCTAGTGA GTCTGGTGAG CTGGAGGTGG
351   CGTCAACAGC TCAGGACGGC CTCCCCAGAC ACTTCAGAAG GAGTCCAGCA
401   AGAGTCCCTG GAAAATGTCT TTGTACCCTC CTCAGAAACC CCTCATGCCT
451   CAGCTCCTAC CTGGCCTCCG CTCAAAGAAG ATGCAGACAG CGCCCTGCCA
501   CGCCACAGCG TCCCGGTGCC CGCCACAGAA CTGGGCTCCA CCGAGCTGGT
551   GACCACCAAG ACAGCTGGCC CAGAGCAATA GCAGCAGTGG AGGCTGGAAC
601   CCAGGGATCT CTACTGGGCT TGTGGACTTC ACCCAACAGC TTGGGAAAGA
651   ACTTGGCCCT TCAGTGACGG AGTCCTTTGC CTGGGGGGCG AACCCGGCAG
701   AACCAGACAC TACAGGCCAC ATGAGATTGC TTTTGTGTTA GCTCTTGACT
751   TGAGAACGTT CCATTTCTGA GATGGTTTTT AAGCCTGTGT GCCTTCAGAT
801   GGTTGGATAG ACTTGAGGGT TGCATATTTA ATCTCTGTAG TGAGTCGGAG
851   ACTGGAAACT TAATCTCGTT CTAAAAATTT TGGATTACTG GGCTGGAGGT
901   ATGGCTCAGC AGTTCGGTTT GTGTGCTGTT CTAGCCGAAG ACTCCAGTTG
951   TTCAGCTTCC CGGAACTCAG ATCTGGCAGC TTAAGACCAC CTGTCACTCC
1001  AGCCCCTGGA ACATCCTTGC CTCCAAAGGC ACCAGCACTC ATTTGCTCTA
1051  GAGCACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAT
1101  ATGCATGCAT GCACACTTAA AAATGTCAAA ATTAGCGGCT GGAGAAATTC
1151  ATGGTCAACA GCGCTTACTG TGATTCCAGA GGATGAGAGT TTGATTCCCA
1201  GAATGCACTG CGGGTGGCTC ATTACTGAGC ATAACTTTTG CTTCAGGGGA
1251  CCTGATGCCT CTGGACTTCA TGGGCATCTG TATTCACGTG CACATCCTAC
1301  ACACACACAC ACACACACAC ACAGACATAC ACACACACAC ACTCTTTTAC
1351  AAATGATAAA ATATAAGATA GGCATGGTGG TACACACCTT TAATCCCAAC
1401  ATTGGGGAAG CAAAGGCAGG CAGGTAACTG AGTTGGAGGC CATCCTGGTC
1451  TACATAGCAA GTTCCAGGCT AACCAGAGCT AAATGGTGAG ACCAAGTCTC
1501  AAAATAATAC TCCCCCCCCA AAAAAAAAAA ACTTTTAAAT TTTCATTTTT
1551  TTCTTTTATT ATTATTTTTT ATATTAATTT CATGGTGTTT AGAAGTGGTA
1601  TACTTAGATG GTGACTAAGA GGAGGTAAAG CCATCAGGAC TGAGCCCCTA
1651  ACATACAAGG AGAAAGCAGA GACAATGAAC ACGCCCCTCT CCTGCTGTGT
1701  GCCAGCTCTG GACCACCAGC CAGAGGGCAA TCATCAGATG TGGGCCCTAG
1751  AACCTTCAGA GCCGAAAGCT AAATCAATCT CATTTCTTTG TAAAGCTATT
1801  TAGCCTTAGG TGTTTTGTTA CGGTGATATA AAATGGACTA ACACAGGCAC
1851  TATGAGTAAG AAGCTTTTCT TTGAGCTGGG AAAGGTACTG TTAAACCAAA
1901  ATTAATCTGA ATAAAAAAAG GCTAAGGGGA AGACACTTAA AAA
```

【図４Ｂ】

Figure 4B

マウスBAFF-R アミノ酸配列

MGARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCELFHTPDTGHTSSLEPGTALQPQEGSALRPD VALLVGAPALLG LILALTLVG LVSLVSW RWRQQLRTASPDTSEGVQQESLENVFVPSSETPHASAPTWPPLKEDADSALPRHSVPVPATELGSTELVTTKTAGPEQ

【図４Ｃ】

FIGURE 4C

```
                10        20        30        40        50
hBAFFR      M-RR-GPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTAL
                 ||  || |:||: :|| |  :|||| ||||:|:| |:::||   : :||  | ||||
mBAFFR      MGARRLRVRSQRSRDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCELFHTP--DTGHTSSLEPGTAL
                   10        20        30        40        50

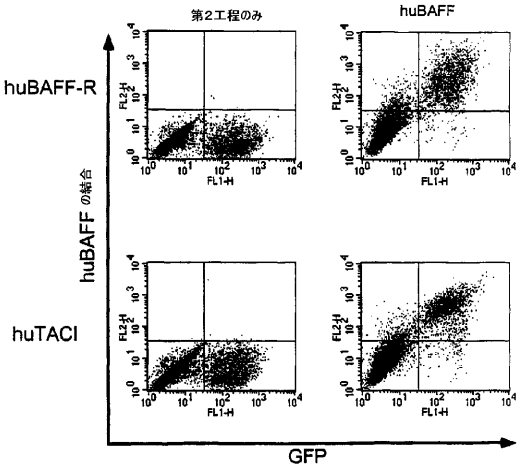
                60        70        80        90        100       110
hBAFFR      QPQESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALV-LVGLVSWRRRQPRRLRGASSARA
                ||||     | |  |  :|| |||||||||| |:|:|| ||:|||||| ||:  || ||
mBAFFR      QPQE------GSALRPDVALLVGAPALLGLILALTLVGLVSLVSWRWRQQ-LRTAS----
                60        70        80        90        100

                120       130       140       150       160       170
hBAFFR      PDGDKDAP-EPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHSVPVPATELGSTELVT
                || :: :.  | |::|:: |     |:||:|||  ||   :: | ||||||||||||||||
mBAFFR      PDTSEGVQQESLENVFVPSSETPHASAPTWPPLKEDADSALPRHSVPVPATELGSTELVT
                110       120       130       140       150       160

                180
hBAFFR      TKTAGPEQQ
                |||||||||
mBAFFR      TKTAGPEQ
                170
```

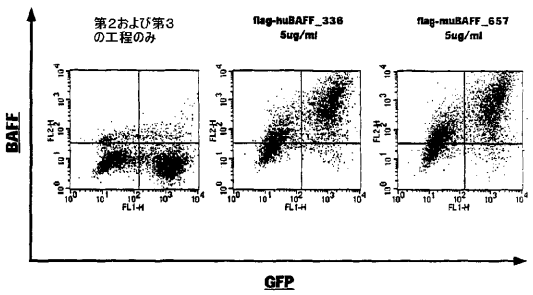
【図５】

Figure 5:



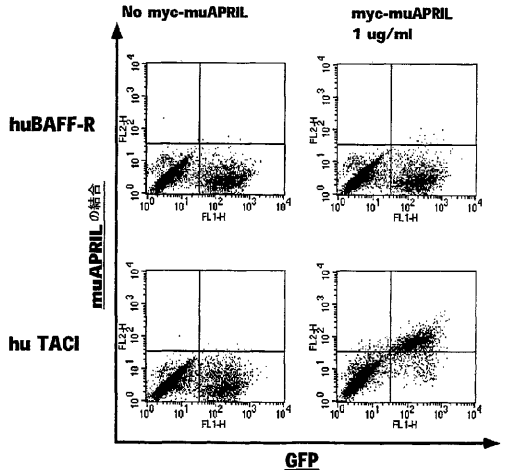
【図６】

Figure 6:



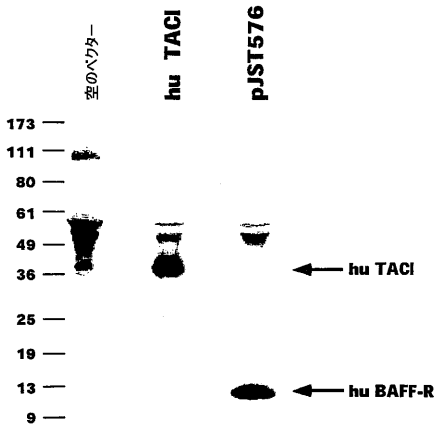
【図７】

Figure 7:



【図８】

Figure 8:



【図９】

FIGURE 9

```
1 ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT
   M  E  T  D  T  L  L  L  W  V  L  L  L  W  V  P  G  S  T  G

61 GACGTCAGGCGAGGGCCCCGGAGCCTGCGGGGCAGGGACGCGCCAGCCCCCACGCCCTGC
   D  V  R  R  G  P  R  S  L  R  G  R  D  A  P  A  P  T  P  C

121 GTCCCGGCCGAGTGCTTCGACCTGCTGGTCCGCCACTGCGTGGCCTGCGGGCTCCTGCGC
    V  P  A  E  C  F  D  L  L  V  R  H  C  V  A  C  G  L  L  R

181 ACGCCGCGGCCGAAACCGGCCGGGGCCAGCAGCCCTGCGCCCAGGACGGCGCTGCAGCCG
    T  P  R  P  K  P  A  G  A  S  S  P  A  P  R  T  A  L  Q  P

241 CAGGAGTCGGTGGGCGCGGGGGCCGGCGAGGCGGCGGTCGACAAAACTCACACATGCCCA
    Q  E  S  V  G  A  G  A  G  E  A  A  V  D  K  T  H  T  C  P

301 CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC
    P  C  P  A  P  E  L  L  G  G  P  S  V  F  L  F  P  P  K  P

361 AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
    K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S

421 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
    H  E  D  P  E  V  K  F  N  W  Y  V  D  G  V  E  V  H  N  A

481 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
    K  T  K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T

541 GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
    V  L  H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K  A

601 CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
    L  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q

661 GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
    V  Y  T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K  N  Q  V  S  L  T  C

721 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
    L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P

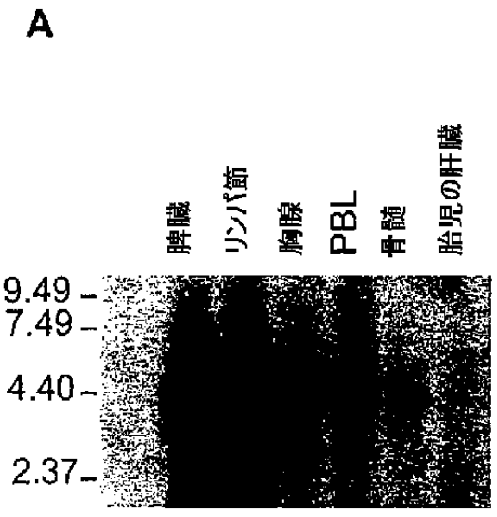
781 GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
    E  N  N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y

841 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
    S  K  L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V

901 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA
    M  H  E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K

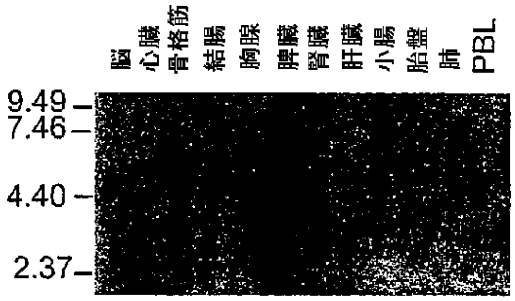
961 TGA
```

【図１０Ａ】



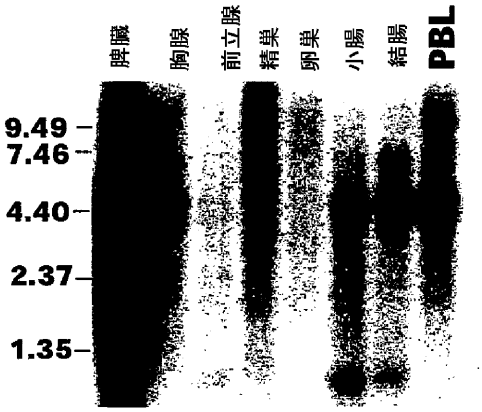
【図１０Ｂ】

B



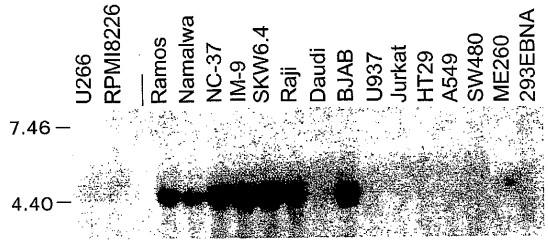
【図１０Ｃ】

Figure 10C



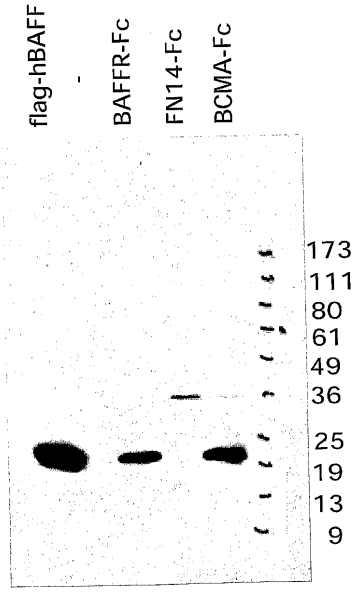
【図１１】

Figure 11:



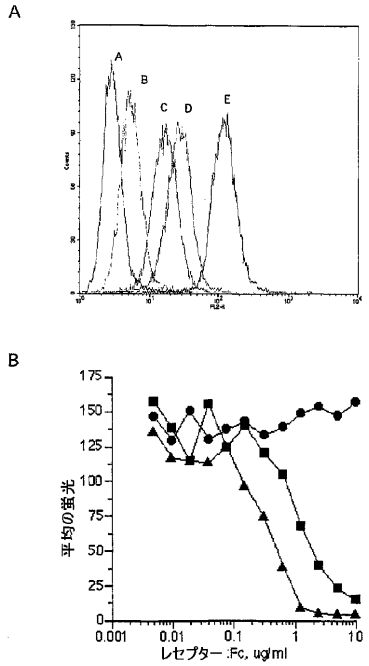
【図１２】

Figure 12:

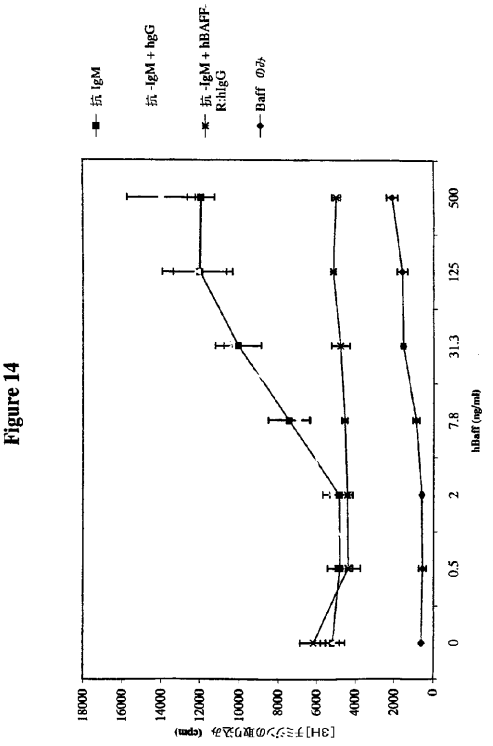


【図１３】

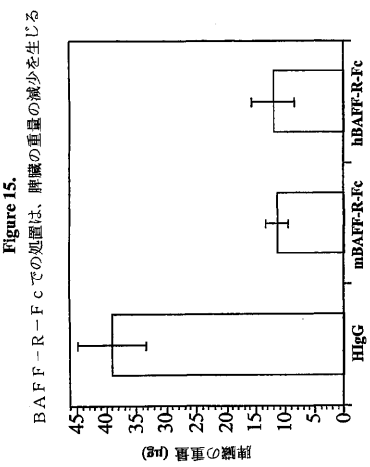
Figure 13:



【図１４】

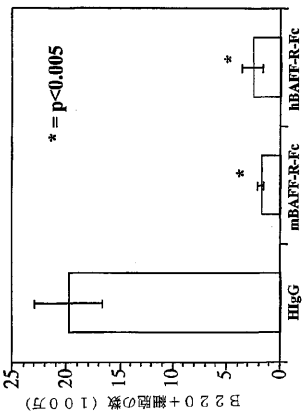


【図１５】



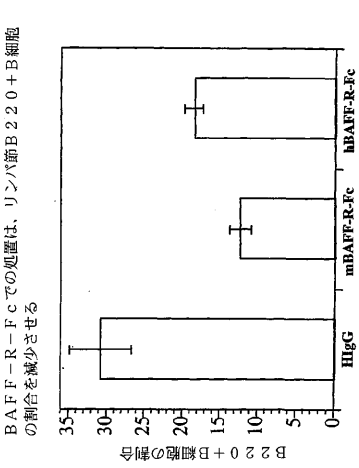
１，４，８，１１，１５，１８，２２および２５日目にマウスに２００ｍｇのＨＩｇＧ、ｍＢＡＦＦ－Ｒ－Ｆｃまたはｈ ＢＡＦＦ－Ｒ－Ｆｃを受容させた。マウスを２８日目に安楽死させ、脾臓を回収し、そして重量を記録した。

【図１６】



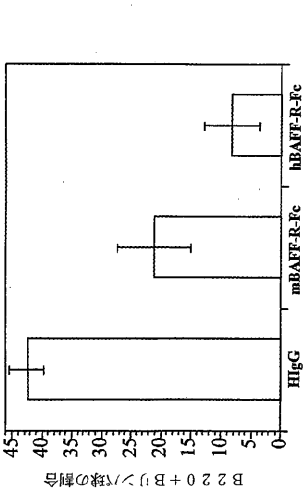
１，４，８，１１，１５，１８，２２および２５日目にマウスに２００ｍｇのＨＩｇＧ、ｍＢＡＦＦ－Ｒ－Ｆｃまたはｈ ＢＡＦＦ－Ｒ－Ｆｃを受容させた。マウスを２８日目に安楽死させ、脾臓を回収し、そして重量を記録した。

【図１７】



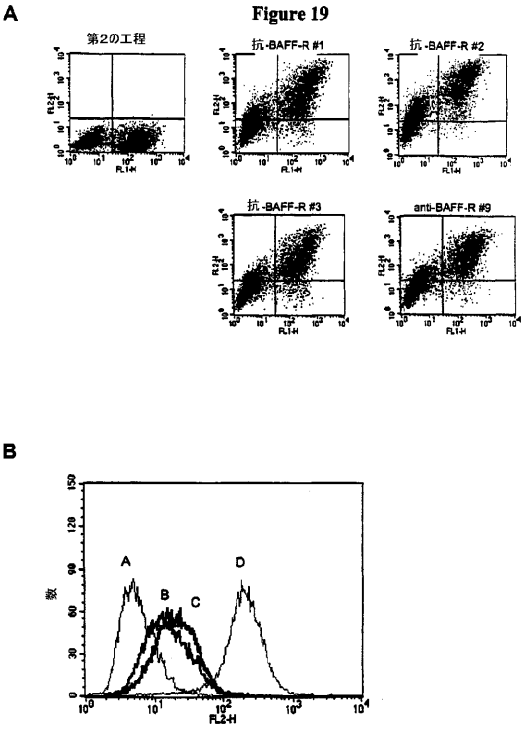
１，４，８，１１，１５，１８，２２および２５日目にマウスに２００ｍｇのＨＩｇＧ、ｍＢＡＦＦ－Ｒ－ＦｃまたはｈＢＡＦＦ－Ｒ－Ｆｃを受容させた。マウスを２８日目に安楽死させ、そしてＬＮを回収し、そしてＢ２２０＋細胞を分析した。

【図１８】



１，４，８，１１，１５，１８，２２および２５日目にマウスに２００ｍｇのＨＩｇＧ、ｍＢＡＦＦ－Ｒ－ＦｃまたはｈＢＡＦＦ－Ｒ－Ｆｃを受容させた。屠殺の前に２８日目に末梢血を回収し、そしてＢ２２０＋リンパ球の割合を決定した。

【図１９】



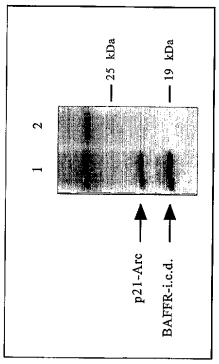
【図２０】

Figure 20

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80  選択%
hBAFFR    --RR-GPRSLRGRDAPAPTPCVPAEGFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      90
                  ||  ||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
mBAFFR    GARRLRVRSQRSDSSVFTQCNQTEGFDPLVRNCVSCELPHTP--DTGHTSSLEPGTALQPQE------GSAL      10
                 10        20        30        40        50        60
                                                                                  選択%
JST659    GARRLRVRSQRSDSPAFTPCVPAEGFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      90
JST660    GARRLRVRSQRSDSYFTQCVPAEGFDLLVRICVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      90
JST661    GARRLRVRSQRSDSSFFTQCNQTEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      10
JST662    GARRLRVRSQRSDSSVFTQCNQTEGFDPLVRNCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      10
JST663    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNQTEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      10
JST673    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNPTEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      10
JST674    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNQAEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      10
JST675    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNPAEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      10
JST672    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCVQTEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      35
JST676    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCVQAEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      35
JST671    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCVPAEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      60
JST677    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNPAEGFDGLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      60
JST678    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNPAEGFDALVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      60
JST664    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNQTEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      90
JST668    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNPTEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      90
JST665    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNQAEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      90
JST666    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCVQAEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      90
JST667    --RR-GPRSLRGRDAPAFTPCNPAEGFDPLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPPTALQPQESVGAGAGEAA      90
```

【図２１】

Figure 21



【配列表】
2014064585000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/00	101	4C084
C12P 21/02	*(2006.01)*	C12P	21/02	C	4C085
C12Q 1/68	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A	4H045
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61K 38/00	*(2006.01)*	A61K	37/02		
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61P 37/02	*(2006.01)*	A61P	35/00		
G01N 33/15	*(2006.01)*	A61P	37/02		
G01N 33/50	*(2006.01)*	G01N	33/15	Z	
C07K 19/00	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z	
		C07K	19/00		

(31)優先権主張番号 60/312,185
(32)優先日 平成13年8月14日(2001.8.14)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ジェフェリー エス. トンプソン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１８０, ストーンハム, ニューコウム ロード ６０

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03
4B024 AA01 AA11 BA61 BA63 CA04 CA20 DA02 EA04 FA10 GA13 HA14
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ43 QQ53 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34
4B064 AG20 CA10 CA19 CC15 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93X AB01 AC14 BA02 BA05 BB11 BB12 BB25 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 BA01 BA02 BA20 BA22 BA23 CA03 CA56 NA14 ZB072 ZB262
4C085 AA13 AA14 BB11 CC23
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA51 DA75 EA20 FA74 GA26

【外国語明細書】
2014064585000001.pdf