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

特許第5583308号
(P5583308)

(45)発行日　平成26年9月3日(2014.9.3)　(24)登録日　平成26年7月25日(2014.7.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	

請求項の数 14　(全 263 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001-537340 (P2001-537340)
(86)(22)出願日	平成12年11月8日 (2000.11.8)
(65)公表番号	特表2003-513655 (P2003-513655A)
(43)公表日	平成15年4月15日 (2003.4.15)
(86)国際出願番号	PCT/US2000/030654
(87)国際公開番号	WO2001/034629
(87)国際公開日	平成13年5月17日 (2001.5.17)
審査請求日	平成19年11月7日 (2007.11.7)
審判番号	不服2011-7985 (P2011-7985/J1)
審判請求日	平成23年4月14日 (2011.4.14)
(31)優先権主張番号	60/164,835
(32)優先日	平成11年11月12日 (1999.11.12)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	60/221,142
(32)優先日	平成12年7月27日 (2000.7.27)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(73)特許権者　597018381
ヒューマン　ジノーム　サイエンシーズ,　インコーポレイテッド
Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ,　Ｉｎｃ.
アメリカ合衆国デラウェア州、ウィルミントン、センタービル、ロード、２７１１、スイート、４００
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】２１個のヒト分泌タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号７４のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子。

【請求項２】

前記ポリヌクレオチドが配列番号１１を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。

【請求項３】

前記ポリヌクレオチドが配列番号１１からなる、請求項１に記載の単離された核酸分子。

【請求項４】

前記ポリヌクレオチドが配列番号１１のヌクレオチド２１７～１１１９を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。

【請求項５】

前記ポリヌクレオチドが配列番号１１のヌクレオチド２１７～１１１９からなる、請求項１に記載の単離された核酸分子。

【請求項６】

配列番号１１のヌクレオチド２１７～１１１９の相補的なポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

【請求項７】

配列番号１１のヌクレオチド２１７～１１１９の相補的なポリヌクレオチドからなる、

単離された核酸分子。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか１項に記載の単離された核酸分子を含む、組換えベクター。
【請求項９】
請求項１～７のいずれか１項に記載の単離された核酸分子を含む組換え宿主細胞を、作製する方法。
【請求項１０】
配列番号７４のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。
【請求項１１】
配列番号７４のアミノ酸配列をからなる単離されたポリペプチド。
【請求項１２】
請求項１０または１１に記載の単離されたポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。
【請求項１３】
請求項１０または１１に記載の単離されたポリペプチドを発現する、組換え宿主細胞。
【請求項１４】
単離されたポリペプチドを作製する方法であって、
（ａ）該ポリペプチドが発現されるような条件下で、請求項１３に記載の組換え宿主細胞を培養する工程；および
（ｂ）該ポリペプチドを回収する工程、
を包含する、方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（発明の分野）
本発明は、新たに同定されたポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、これらのポリペプチドに結合する抗体、このようなポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体の使用、ならびにそれらの産生に関する。
【０００２】
（発明の背景）
膜によって取り囲まれる単一コンパートメントとして存在する細菌とは異なり、ヒト細胞および他の真核細胞は、膜によって多くの機能的に異なるコンパートメントに細分される。各膜で区切られたコンパートメント、すなわちオルガネラは、そのオルガネラの機能に不可欠な異なるタンパク質を含む。細胞は、特定の細胞オルガネラにタンパク質を標的化するために、タンパク質内部に位置するアミノ酸モチーフである「選別シグナル」を使用する。
【０００３】
シグナル配列、シグナルペプチド、またはリーダー配列と呼ばれる選別シグナルの１つの型は、小胞体（ＥＲ）と呼ばれるオルガネラに１つのクラスのタンパク質を指向させる。ＥＲは、膜で区切られたタンパク質をすべての他の型のタンパク質から分離する。一旦、ＥＲに局在すると、両方の群のタンパク質とも、ゴルジ装置と呼ばれる別のオルガネラにさらに指向され得る。ここで、ゴルジは、タンパク質を、分泌小胞を含む小胞、細胞膜、リソソーム、および他のオルガネラに分布させる。
【０００４】
シグナル配列によってＥＲに標的化されたタンパク質は、分泌タンパク質として細胞外間隙に放出され得る。例えば、分泌タンパク質を含む小胞は、細胞膜と融合し得、そして細胞外間隙にその内容物を放出し得る（エキソサイトーシスと呼ばれるプロセスである）。エキソサイトーシスは、構成的に、または誘発シグナルの受け取りの後に生じ得る。後者の場合には、タンパク質は、エキソサイトーシスが誘発されるまで、分泌小胞（または分泌顆粒）に貯蔵される。同様に、細胞膜上に存在するタンパク質はまた、タンパク質を膜に保持する「リンカー」のタンパク質分解切断によって、細胞外間隙に分泌され得る。

【０００５】
近年大きく進歩したにもかかわらず、ヒトの分泌タンパク質をコードする遺伝子は少数しか同定されていない。これらの分泌タンパク質としては、商業的価値のあるヒトインスリン、インターフェロン、第ＶＩＩＩ因子、ヒト成長ホルモン、組織プラスミノーゲンアクチベーター、およびエリスロポエチンが挙げられる。したがって、ヒトの生理学における分泌タンパク質の広範な役割を考慮すると、新規のヒトの分泌タンパク質およびそれらをコードする遺伝子を同定および特徴付けるための必要性がある。この知見は、分泌タンパク質またはそれらをコードする遺伝子を使用することによって、医学的疾患、障害および／または状態を検出、処置、および予防することを可能にする。
【０００６】
（発明の要旨）
本発明は、新規ポリヌクレオチドおよびそのコードされたポリペプチドに関する。さらに、本発明は、そのポリペプチドおよびポリヌクレオチドを産生するためのベクター、宿主細胞、抗体、ならびに組換え方法および合成方法に関する。このポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関連する疾患、障害および／または状態を検出するための診断方法、ならびにこのような疾患、障害および／または状態を処置するための治療方法もまた提供される。本発明は、さらに、このポリペプチドの結合パートナーを同定するためのズクリーニング方法に関する。
【０００７】
（詳細な説明）
（定義）
以下の定義は、本明細書全体を通して使用される特定の用語の理解を容易にするために提供される。
【０００８】
本発明において、「単離された（単離した）」とは、その本来の環境（例えば、それが天然に存在する場合は天然の環境）から取り出された物質をいい、したがって、その天然の状態から「人間の手によって」変更されている。例えば、単離されたポリヌクレオチドは、ベクターまたは物質の組成物の一部であり得るか、あるいは細胞中に含まれ得、そしてなお「単離され」得る。なぜなら、そのベクター、物質の組成物、または特定の細胞は、ポリヌクレオチドの本来の環境ではないからである。用語「単離された」は、ゲノムライブラリーまたはｃＤＮＡライブラリー、丸ごとの細胞全体またはｍＲＮＡ調製物、ゲノムＤＮＡ調製物（電気泳動により分離されたものおよびブロットへのトランスファーされたものを含む）、せん断された全細胞ゲノムＤＮＡ調製物あるいは、当該分野が本発明のポリヌクレオチド／配列の識別する特徴を示せない他の組成物をいわない。
【０００９】
本発明において、「分泌」タンパク質とは、ＥＲ、分泌小胞、または細胞外間隙にシグナル配列の結果として指向され得るタンパク質、ならびにシグナル配列を必ずしも含まないが細胞外間隙に放出されるタンパク質をいう。分泌タンパク質が、細胞外間隙に放出される場合、この分泌タンパク質は、「成熟」タンパク質を産生するために細胞外プロセシングを受け得る。細胞外間隙への放出は、エキソサイトーシスおよびタンパク質分解切断を含む多くの機構によって生じ得る。
【００１０】
特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも１５、少なくとも３０、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも１２５、少なくとも５００または少なくとも１０００個の連続するヌクレオチドであるが、長さが３００ｋｂ、２００ｋｂ、１００ｋｂ、５０ｋｂ、１５ｋｂ、１０ｋｂ、７．５ｋｂ、５ｋｂ、２．５ｋｂ、２．０ｋｂまたは１ｋｂ以下である。さらなる実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書において開示される場合、コード配列の一部を含むが、任意のイントロンの全てまたは一部を含まない。別の実施形態において、コード配列を含むポリヌクレオチドは、ゲノム隣接遺伝子（すなわち、ゲノムにおける目的の遺伝子に対して５’側または３

’側）のコード配列を含まない。他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、１０００、５００、２５０、１００、５０、２５、２０、１５、１０、５、４、３、２、または１より多いゲノム隣接遺伝子コード配列を含まない。

【００１１】

本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド」とは、配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）に含まれる核酸配列を有する分子、またはＡＴＣＣに寄託されたクローン内に含まれるｃＤＮＡをいう。例えば、このポリヌクレオチドは、５’および３’非翻訳配列、シグナル配列を含むかもしくは含まないコード領域、分泌タンパク質コード領域を含む全長ｃＤＮＡ配列のヌクレオチド配列、ならびにこの核酸配列のフラグメント、エピトープ、ドメイン、および改変体を含み得る。さらに、本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」とは、広く定義される場合、ポリヌクレオチドから生じた翻訳されたアミノ酸配列を有する分子をいう。

【００１２】

本発明では、配列番号Ｘとして同定された全長配列は、しばしば、複数のクローンに含まれる配列を重複させることによって生成された（コンティグ分析）。配列番号Ｘについての配列のすべてまたはほとんどを含む代表的クローンが、アメリカンタイプカルチャーコレクション（「ＡＴＣＣ」）に寄託された。表１に示すように、各クローンは、ｃＤＮＡクローンＩＤ（識別子）およびＡＴＣＣ受託番号によって同定される。ＡＴＣＣは、１０８０１　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ　２０１１０－２２０９，ＵＳＡに位置する。ＡＴＣＣ寄託は、特許手続目的のための微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に拠って行われた。

【００１３】

本発明の「ポリヌクレオチド」はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号Ｘに含まれる配列、その相補体、またはＡＴＣＣに寄託されたクローン内のｃＤＮＡにハイブリダイズし得るポリヌクレオチドを含む。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（７５０ｍＭ　ＮａＣｌ、７５ｍＭクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハルト溶液、１０％デキストランサルフェート、および２０μｇ／ｍｌ変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中での４２℃での一晩インキュベーション、続いて０．１×ＳＳＣ中で約６５℃にてフィルターを洗浄することをいう。

【００１４】

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

【００１５】

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

【００１６】

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

【００１７】

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

【００１８】

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

【００１９】
「配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）」とは、ポリヌクレオチド配列をいうが、「配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）」とは、ポリペプチド配列をいい、両方の配列とも、表１に特定された整数によって同定される。
【００２０】
「生物学的活性を有するポリペプチド」とは、特定の生物学的アッセイで測定した場合、用量依存性を伴なっても伴なわなくても、本発明のポリペプチド（成熟形態を含む）の活性と類似であるが、必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいう。用量依存性が存在する場合、このポリペプチドの用量依存性と同一である必要はないが、むしろ本発明のポリペプチドと比較した場合に、所定の活性における用量依存性に実質的に類似する（すなわち、候補ポリペプチドは、本発明のポリペプチドと比較して、より大きな活性を示すか、または約１／２５以上、そして好ましくは約１／１０以上の活性、そして最も好ましくは約１／３以上の活性を示す）。
【００２１】
多くのタンパク質（および翻訳されたＤＮＡ配列）は、アミノ酸組成が、利用可能な残基の小さいサブセットに対して非常に片寄る領域を含む。例えば、膜貫通ドメインおよびシグナルペプチド（これもまた膜貫通である）は、代表的に、ロイシン（Ｌ）、バリン（Ｖ）、アラニン（Ａ）、およびイソロイシン（Ｉ）が支配する長いストレッチを含む。ｃＤＮＡの末端のポリアデノシン領域（ポリＡ）は、正方向（ｆｏｒｗａｒｄ）翻訳においてポリリジン（ポリ－Ｋ）、および逆相補体（ｒｅｖｅｒｓｅ　ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ）が翻訳される場合、ポリフェニルアラニン（ポリ－Ｆ）として現れる。これらの領域は、しばしば「より低い複雑性」の領域といわれる。
【００２２】
このような領域は、ＢＬＡＳＴのようなデータベース類似性調査プログラムに、真の相同性を意味しない、高いスコアの配列一致を見出させ得る。ほとんどの重量（ｗｅｉｇｈｔ）マトリックス（ＢＬＡＳＴによって生じるアライメントをスコアするために使用される）が、一般的に、特定の低い複雑性の領域において見出される疎水性アミノ酸（Ｌ、ＶおよびＩ）の群のいずれかの間での一致に、正確な一致に対しての高いスコアとほとんど同様の高いスコアを与えるという事実によって、問題が悪化する。
【００２３】
これに対する補正のために、ＢＬＡＳＴＸ．２（バージョン２．０ａ５ＭＰ－ＷａｓｈＵ）は、特定の配列においてより低い複雑性を「マスクする（ｍａｓｋ）」２つのフィルター（「ｓｅｇ」および「ｘｎｕ」）を用いる。これらのフィルターは、このような領域についての配列を分析して、そしてより低い複雑性領域におけるアミノ酸が文字「Ｘ」により置換された新しい配列を作製する。次いで、これは、ＢＬＡＳＴＸプログラムへの入力配列（ときどき、本明細書中で「Ｑｕｅｒｙ（問い合わせ）」および／または「Ｑ」といわれる）として使用される。このレジメンは、高いスコアの一致が真の相同性を表すことを保証するのを補助する一方、ＢＬＡＳＴＸプログラムがアライメントを描くためにフィルターによってマスクされた問い合わせ配列を使用するという点で、ネガティブな結果が存在する。
【００２４】
従って、以下の適用において示されるアライメントにおける「Ｘ」のストレッチは、下線を引かれたＤＮＡ配列または翻訳されたタンパク質配列のいずれかが、未知または不特定であることを必ずしも示さない。そしてまたこのようなストレッチの存在は、この配列が、本発明のアライメントにおいて開示される配列に対して同一であるか、または同一でないことを示すことを意味されない。このようなストレッチは、上記で定義されるように、このＢＬＡＳＴＸプログラムが、低い複雑性の領域の検出に起因して、その領域におけるアミノ酸をマスクすることを単に示し得る。全ての場合において、本明細書、配列表（表１）、および／または寄託されたクローンに示される参照（ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ）配列（ときどき、本明細書中で、「対象（Ｓｕｂｊｅｃｔ）」、「Ｓｂｊｃｔ」、および／ま

たは「Ｓ」という）は、本発明の決定的な実施形態であり、そして本明細書中の他の箇所で特別に示さない限り、アライメントにおいて示される部分的配列に対して、本発明を限定するように解釈されるべきでない。

【００２５】

（本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド）

（遺伝子番号１によってコードされるタンパク質の特徴）

コンピューターアルゴリズムＢＬＡＳＴＸを使用して、この遺伝子の翻訳産物が、非限定的な例として、以下のデータベースの受託番号ｇｂ｜ＡＡＤ３３８９２．１｜ＡＦ１４２７８０＿１（列挙される受託番号を通じて入手可能な全ての情報が、本明細書中で参考として援用される）を通してアクセス可能な配列（これは、ここでは「（ＡＦ１４２７８０）ブチロフィリン様タンパク質［Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ］」として記載される）と配列相同性を共有することを決定した。観察される相同性を示す部分的なアライメントをすぐ下に示す。

【００２６】

【化１】

```
>gb|AAD33892.1|AF142780_1 (AF142780) butyrophilin-like protein [Mus musculus]
           >gb|AAD33892.1|AF142780_1 (AF142780) butyrophilin-like protein [Mus
           musculus] >sp|AAD33892|AAD33892 Butyrophilin-like protein.
           Length = 247

  Plus Strand HSPs:

 Score = 835 (293.9 bits), Expect = 1.5e-82, P = 1.5e-82
 Identities = 159/233 (68%), Positives = 183/233 (78%), Frame = +1

Q:   313 HQIAALPTVTVPKELYIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERAT 492
         H +AALPTVT PKE+Y ++ GS+V+LEC+PD      L  I ASLQKVENDTS   ERAT
S:    15 HPVAALPTVTAPKEVYTVDVGSSVSLECDFDRRECTELEGIRASLQKVENDTSLQSERAT 74

Q:   493 LLEEQLPLGKASPHIPQVQVRDEGQYQCIIIYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVP 672
         LLEEQLPLGKA PHIP VQVRD GQY+C++I G AWDYKYLT+KVKASY +I+T IL+VP
S:    75 LLEEQLPLGKALPHIPSVQVRDSGQYRCLVICGAAWDYKYLTVKVKASYMRIDTRILEVP 134

Q:   673 ETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSVPANTSHSRTPEGLYQVTSVLRLKPPPGRNFSCVF 852
          T EV+LTCQA GYPLAEVSW NVSVPANTSH RTPEGLYQVTSVLRLKP P RNFSC+F
S:   135 GTGEVQLTCQARGYPLAEVSWQNVSVPANTSHIRTPEGLYQVTSVLRLKPQPSRNFSCMF 194

Q:   853 WNTHVRELTLASIDLQSQMEPRTHPTWLLHIPIPSCXXXXXXXXTVIALRKQL 1011
         WN H++ELT A ID  S+MEP+   TW LH+PIP+C         VI  RK++
S:   195 WNAHMKELTSAIIDPLSRMEPKVPRTWPLHVPIPACTIALIPLAIVIIQRKRI 247
```

上記で「Ｓ」として示されるｇｂ｜ＡＡＤ３３８９２．１｜ＡＦ１４２７８０＿１のセグメントは、配列番号として配列表中に示される。構造的な類似性に基づいて、これらの相同なポリペプチドは、少なくともいくつかの生物学的活性を共有することが予期される。このような活性は、当該分野で公知であり、そしてそのいくつかが本明細書中の他で記載される。このような活性を決定するためのアッセイもまた、当該分野で公知であり、そのいくつかが、本明細書中の他で記載されている。本発明の好ましいポリペプチドは、上記で示されるアライメント（コンピューターによって、配列に導入されたギャップは、もちろん除去される）において、「Ｑ」配列に対応する配列番号として配列表に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【００２７】

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｓｏａｒｅｓ＿ｐｒｅｇｎａｎｔ＿ｕｔｅｒｕｓ＿ＮｂＨＰＵ、そしてより少ない程度で以下において：Ｐｒｉｍａｒｙ　Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　Ｃｅｌｌｓ，ｌｉｂ　１；Ｔｈｙｍｕｓ；Ｈｕｍａｎ　Ａｄｕｌｔ　Ｓｐｌｅｅｎ；Ａｏｒｔａ　ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ　ｃｅｌｌｓ　＋　ＴＮＦ－ａ；Ｈｕｍａｎ　Ｔ－ｃｅｌｌ　ｌｙｍｐｈｏｍａ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｐｒｉｍａｒｙ　Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌｓ，ｆｒａｃ　２、およびＳｏａｒｅｓ＿ｔｅｓｔｉｓ＿ＮＨＴ。

【００２８】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害を含

むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００２９】

組織分布、およびブチロフィリンに対する相同性に基づき、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体が、種々の障害の診断および／または処置に有用であり得る。子宮における発現の上昇は、生殖障害の診断および／または処置を研究するための有用性を示唆する。ブチロフィリンに対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体が、多発性硬化症に対する感受性について乳製品、ワクチンおよびアッセイにおいて有用であり得ることを示唆する。この組織分布はまた、造血組織／免疫組織における富化を示す。さらに、この遺伝子産物は、Ｔ細胞同時刺激分子のＢ７ファミリーの新規なメンバーである、Ｂ７－Ｈ１に対して相同性を共有する。したがって、この遺伝子産物は、免疫障害の処置および／または診断において有用であり得る。

【００３０】

（遺伝子番号２によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子に対応する翻訳産物は、骨形態形成タンパク質の阻害において役割を果たすと考えられる、マウス（ｍｕｒｉｎｅ）グレムリン（Ｇｒｅｍｌｉｎ）タンパク質と配列番号相同性を共有する（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ　ＡＡＣ４０１１１を参照のこと）。

【００３１】

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｏｓｔｅｏｂｌａｓｔｓ、そしてより少ない程度で以下において：Ｓｏａｒｅｓ＿ｓｅｎｅｓｃｅｎｔ＿ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ＿ＮｂＨＳＦ；Ｊｉａ ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ ｓｔｒｏｍａ；Ｈｕｍａｎ Ｏｓｔｅｏｂｌａｓｔｓ ＩＩ；Ｈｕｍａｎ Ｔｈｙｍｕｓ Ｓｔｒｏｍａｌ Ｃｅｌｌｓ；Ｓｏａｒｅｓ ｍｅｌａｎｏｃｙｔｅ ２ＮｂＨＭ；ＨＳＡ １７２ Ｃｅｌｌｓ；Ｈｕｍａｎ Ｏｓｔｅｏｃｌａｓｔｏｍａ；Ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌ ＴＦ２７４；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ（＃９３７２１２）；Ｈｕｍａｎ ｅｎｄｏｍｅｔｒｉａｌ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ－ｔｒｅａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｐｒｏｇｅｓｔｅｒｏｎｅ；Ｈｕｍａｎ ｅｎｄｏｍｅｔｒｉａｌ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ－ｔｒｅａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｅｓｔｒａｄｉｏｌ；Ｈｕｍａｎ ａｄｕｌｔ（Ｋ．Ｏｋｕｂｏ）；Ｈｕｍａｎ ｅｎｄｏｍｅｔｒｉａｌ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｇａｓ４；Ｈｕｍａｎ Ｇａｌｌ Ｂｌａｄｄｅｒ；Ｃｏｌｏｎ Ｔｕｍｏｒ；Ｈｕｍａｎ ８ Ｗｅｅｋ Ｗｈｏｌｅ Ｅｍｂｒｙｏ；Ｃｏｌｏｎ Ｔｕｍｏｒ ＩＩ；Ｈｕｍａｎ Ｂｏｎｅ Ｍａｒｒｏｗ Ｓｔｒｏｍａｌ Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ；ＨＵＭＡＮ ＳＣＨＷＡＮＯＭＡ；Ｃｒｏｈｎ’ｓ Ｄｉｓｅａｓｅ；Ｐｈａｒｙｎｘ Ｃａｒｃｉｎｏｍａ；Ｈｕｍａｎ Ｎｏｒｍａｌ Ｃａｒｔｉｌａｇｅ Ｆｒａｃｔｉｏｎ ＩＶ；Ｈｕｍａｎ Ｐｒｅ－Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ Ａｄｉｐｏｃｙｔｅｓ；ＨＳＣ１７２ ｃｅｌｌｓ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｃｏ１２；ｈｕｍａｎ ｃｏｒｐｕｓ ｃｏｌｏｓｕｍ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｃｏ９；Ｓｙｎｏｖｉａｌ ｈｙｐｏｘｉａ－ＲＳＦ ｓｕｂｔｒａｃｔｅｄ；Ｈｕｍａｎ Ｓｔｏｍａｃｈ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｈｕｍａｎ Ｃｏｌｏｎ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ａｌｖ１；Ｇｅｓｓｌｅｒ Ｗｉｌｍｓ ｔｕｍｏｒ；Ｍｏｎｏｃｙｔｅ ａｃｔｉｖａｔｅｄ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；１２ Ｗｅｅｋ Ｏｌｄ Ｅａｒｌｙ Ｓｔａｇｅ Ｈｕｍａｎ，ＩＩ；Ｈｕｍａｎ Ｐａｎｃｒｅａｓ Ｔｕｍｏｒ，Ｒｅｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｓｙｎｏｖｉａｌ Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ（ｃｏｎｔｒｏｌ）；Ｂｏｎｅ Ｍａ

rrow Stromal Cell, untreated；NCI_CGAP_Co3；CHME Cell Line, untreated；Colon Carcinoma；NCI_CGAP_Co8；Human Placenta；Pancreas normal PCA4 No；Monocyte activated；Pancreas Tumor PCA4 Tu；Neutrophils IL－1 and LPS induced；H. Frontal cortex, epileptic, re－excision、およびNCI_CGAP_Lu5。

【００３２】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：筋骨格系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に筋骨格系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、筋骨格組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００３３】

マウスグレムリンタンパク質に対しての、この遺伝子に対応する翻訳産物の相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体が、増殖因子のＴＧＦ－βファミリーのメンバーの阻害に有用であり得ることを示す。骨芽細胞および巨骨細胞腫組織におけるこの遺伝子産物の発現の上昇は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物、および抗体が、骨芽細胞の生存、増殖および／または成長において役割を果たしうることを示唆する。従って、この遺伝子産物は、骨粗しょう症のような状態において骨量への影響に有用であり得る。

【００３４】

この分泌タンパク質は、生物学的活性を決定するため、抗体を惹起するため、組織マーカーとして、同種のリガンドまたはレセプターを単離するために、それらの相互作用を調節する薬剤を同定するために、そして栄養補給剤として、使用され得る。このタンパク質はまた、非常に広範な生物学的活性を有し得る。代表的な用途は、以下の「走化性」および「結合活性」の節、実施例１１、１２、１３、１４、１５、１６、１８、１９および２０、ならびに本明細書中の他の箇所において記載される。簡潔には、このタンパク質は、以下の活性を有し得る：サイトカイン、細胞の増殖／分化調節活性、または他のサイトカインの誘導；免疫刺激／免疫抑制活性（例えば、ヒトの免疫不全ウイルス感染、癌、自己免疫疾患、およびアレルギーを処置するため）；造血の調節（例えば、貧血を処置するため、または化学療法に対する補助薬として）；骨、軟骨、腱、靭帯、および／または神経の刺激または増殖（例えば、創傷を処置するため、卵胞刺激ホルモンの刺激のため（受胎能の制御のため）；走化性およびケモキネシス活性（例えば、感染、腫瘍を処置するため）；止血または血栓崩壊活性（例えば、血友病、心筋梗塞などを処置するため）；抗炎症活性（例えば、敗血症性ショック、クローン病を処置するため）；抗菌薬として；乾癬または他の過剰増殖性疾患を処置するため；代謝および挙動の調節のため。遺伝子治療手順における対応する核酸の使用も意図される。

【００３５】

免疫細胞（例えば、好中球、骨髄）における組織分布は、このクローンのタンパク質産物が、種々の免疫系障害の診断および処置に有用であることを示す。代表的な用途は、以下の「免疫活性」および「感染疾患」の節において、実施例１１、１３、１４、１６、１８、１９、２０および２７において、ならびに本明細書中の他の箇所に記載される。簡略には、この遺伝子産物の発現は、血液幹細胞を含む、造血細胞系列の増殖；生存；分化；

および／または活性化の調節における役割を示す。サイトカイン産生、抗原提示、または他のプロセスの調節における関与は、（例えば、免疫応答をブーストすることによる）ガンの処置における有用性を示唆する。リンパ系起源の細胞における発現は、この天然の遺伝子産物が、免疫機能に関与することを示す。従って、それはまた、関節炎、喘息、ＡＩＤＳのような免疫不全疾患、白血病、慢性関節リウマチ、慢性肉芽腫症、炎症性腸疾患、敗血症、挫創、好中球減少症、好中球増加症、乾癬、過敏症（例えば、Ｔ細胞媒介細胞障害）；移植器官および組織に対する免疫反応（例えば、宿主対移植片および移植片対宿主疾患）または自己免疫障害（例えば、自己免疫不妊症、水晶体組織傷害、脱髄、全身エリテマトーデス、薬物誘導溶血性貧血、慢性関節リュウマチ、シェーグレン病、および強皮症）を含む、免疫学的障害のための薬剤としても有用である。

【００３６】

さらに、このタンパク質は、他の血液細胞の分化または挙動に影響する分泌因子、または傷害の部位に造血細胞を補充する分泌因子を示し得る。従って、この遺伝子産物は、様々な血液系列の幹細胞および方向付けられた前駆細胞の拡大において、ならびに様々な細胞型の分化および／または増殖において有用であると考えられる。組織分布（例えば、骨芽細胞）は、このクローンのタンパク質産物が、骨障害の診断および／または処置に有用であることを示唆する。結腸、膵臓および咽頭起源の腫瘍における組織分布は、このクローンのタンパク質産物が、これらの腫瘍の診断および阻害のために、ならびに発現が示された他の腫瘍に対して有用であることを示唆する。さらに、このタンパク質はまた、栄養補給剤としてのその使用に加えて、生物学的活性を決定するため、抗体を惹起するため、組織マーカーとして、同種のリガンドまたはレセプターを単離するために、それらの相互作用を調節する薬剤を同定するために、使用され得る。タンパク質およびこのタンパク質に対して指向される抗体は、上記に列挙された組織の腫瘍マーカーおよび／または免疫療法の標的としての有用性を示し得る。

【００３７】

（遺伝子番号３によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子に対応する翻訳産物は、マウスＭＰＳ－１タンパク質およびラットＭＰＧ－１タンパク質（それぞれ、Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号ＡＡＡ７３９５７およびＡＡＤ３８４１７を参照のこと）と配列相同性を共有する。ＭＰＳ－１タンパク質は、パーフォリン（ｐｅｒｆｏｒｉｎ）タンパク質の溶解性ファミリーに対して進化的保存を有するマクロファージ特異的タンパク質である。相同性に基づいて、この遺伝子に対応する翻訳産物は、溶解能において機能し得、細胞死を起こすと考えられる。

【００３８】

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｈｕｍａｎ Ｂｏｎｅ Ｍａｒｒｏｗ，ｔｒｅａｔｅｄ、そしてより少ない程度で以下において：Ｈｕｍａｎ ｒｅｊｅｃｔｅｄ ｋｉｄｎｅｙ；Ｈｕｍａｎ Ｔ－ｃｅｌｌ ｌｙｍｐｈｏｍａ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｈｕｍａｎ Ａｄｕｌｔ Ｓｍａｌｌ Ｉｎｔｅｓｔｉｎｅ；Ｈｕｍａｎ Ｏｓｔｅｏｂｌａｓｔｓ ＩＩ；Ｕｌｃｅｒａｔｉｖｅ Ｃｏｌｉｔｉｓ；Ｈｕｍａｎ Ｐｌａｃｅｎｔａ；ｈｕｍａｎ ｔｏｎｓｉｌｓ；Ｈｏｄｇｋｉｎ’ｓ Ｌｙｍｐｈｏｍａ ＩＩ、およびＰｒｉｍａｒｙ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ，ｌｉｂ １。

【００３９】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしく

は細胞型（例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００４０】

この遺伝子は、マウスおよびラットのマクロファージ特異的遺伝子１のヒトオルソログである。このマウス遺伝子は、ディファレンシャルｃＤＮＡ分析によって同定され、そして、成熟マクロファージにおいては高レベルそして特定の骨髄単球性細胞株においては中皮のレベルで、マクロファージ系列および分化段階特異的発現を示した。

【００４１】

ヒト骨髄における組織分布および他の造血細胞型は、この遺伝子およびそのタンパク質産物が、ヒト免疫系障害、骨芽細胞腫、関節炎および他の癌の診断および処置に有用であることを示す。この遺伝子に対応する翻訳産物は、細胞死に関与する溶解性タンパク質として機能し得る。

【００４２】

あるいは、この遺伝子に対応する翻訳産物は、免疫機能および免疫監視機構に参加し得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００４３】

（遺伝子番号４によりコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｓｏａｒｅｓ ｆｅｔａｌ ｌｉｖｅｒ ｓｐｌｅｅｎ １ＮＦＬＳ、そしてより少ない程度で以下において：ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿ＧＣＢ１；Ｈｕｍａｎ Ｐｉｔｕｉｔａｒｙ, ｓｕｂｔ ＩＸ；Ｓｏａｒｅｓ＿ＮＦＬ＿Ｔ＿ＧＢＣ＿Ｓ１；Ｓｏａｒｅｓ＿ＮｈＨＭＰｕ＿Ｓ１；Ｈｕｍａｎ Ｐｉｔｕｉｔａｒｙ, ｓｕｂｔｒａｃｔｅｄ；Ｓｏａｒｅｓ ａｄｕｌｔ ｂｒａｉｎ Ｎ２ｂ４ＨＢ５５Ｙ；Ｒｅｊｅｃｔｅｄ Ｋｉｄｎｅｙ, ｌｉｂ ４；Ｈ．Ｆｒｏｎｔａｌ ｃｏｒｔｅｘ, ｅｐｉｌｅｐｔｉｃ, ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｓｏａｒｅｓ ｍｅｌａｎｏｃｙｔｅ ２ＮｂＨＭ；Ｈｕｍａｎ Ｃｅｒｅｂｅｌｌｕｍ；Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｔ－Ｃｅｌｌｓ, １２ ｈｒｓ, ｓｕｂｔｒａｃｔｅｄ；Ｈｕｍａｎ Ｃｏｌｏｎ, ｓｕｂｔｒａｃｔｉｏｎ；Ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ Ｉｓｌｅｔ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｕｔ４；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ＮＴ２ ｎｅｕｒｏｎａｌ ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ ９３７２３０；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｋｉｄ６；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｐａｎｃｒｅａｓ（＃９３７２０８）；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ＨｅＬａ ｃｅｌｌ ｓ３ ９３７２１６；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌ ９３７２２３；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｃｏ３；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｃｏｌｏｎ（＃９３７２０４）；Ｅａｒｌｙ Ｓｔａｇｅ Ｈｕｍａｎ Ｂｒａｉｎ；Ｈｕｍａｎ Ｆｅｔａｌ Ｋｉｄｎｅｙ, Ｒｅｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｈｕｍａｎ Ｆｅｔａｌ Ｈｅａｒｔ；ｈｕｍａｎ ｔｏｎｓｉｌｓ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿ＧＣ６；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｋｉｄ５；ＨＵＭＡＮ Ｂ ＣＥＬＬ ＬＹＭＰＨＯＭＡ；Ｓｏａｒｅｓ ｏｖａｒｙ ｔｕｍｏｒ ＮｂＨＯＴ；Ｈｏｄｇｋｉｎ’ｓ Ｌｙｍｐｈｏｍａ ＩＩ；Ｓｏａｒｅｓ＿ｔｅｓｔｉｓ＿ＮＨＴ；Ｈ．Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅｓ, ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ ｃｏｔ ５０Ａ３；ＰＲＭＩＸ；Ｎａｍａｌｗａ Ｃｅｌｌｓ；ＨＬ－６０, ＲＡ ４ｈ, Ｓｕｂｔｒａｃｔｅｄ：ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐｒ８；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐｒ９；Ｈｕｍａｎ Ｐｉｔｕｉｔａｒｙ, ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｈｕｍａｎ Ｆｅｔａｌ Ｂｒａｉｎ；ｓｔｏｍａｃｈ ｃａｎｃｅｒ（ｈｕｍａｎ）；Ｈｕｍａｎ Ｃｏｌｏｎ；Ｈｕｍａｎ ｒｅｔｉｎａ ｃＤＮＡ Ｔｓｐ５０９Ｉ－ｃｌｅａｖｅｄ ｓｕｂｌｉｂｒａｒｙ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｌｉｐ２；Ｈｕｍａｎ Ｆｅｔａｌ Ｓｐｌｅｅｎ；Ｓｍｏｏｔｈ ｍｕｓｃｌｅ, ｃｏｎｔｒｏｌ, ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｈ．Ｅｐｉｄｉｄｉｙｍｕｓ, ｃａｐｕｔ ＆ ｃｏｒｐｕｓ；Ｈ．ｃｅｒｅｂｅｌｌｕｍ, Ｅｎｚｙｍｅ ｓｕｂｔｒａｃｔｅｄ；Ｈｕｍａｎ Ｌｕｎｇ；Ｈ．Ｅｐｉｄｉｄｉｙｍｕｓ, ｃａｕｄａ；Ｈｕｍａｎ Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ

, re−excision;Healing groin wound − zero hr post−incision(control);Human Epididymus;STROMAL −OSTEOCLASTOMA;Synovial IL−1/TNF stimulated;Hepatocellular Tumor;pBMC stimulated w/ poly I/C;Smooth muscle, IL 1b induced;Stratagene schizo brain S11;Synovial hypoxia−RSF subtracted;NCI_CGAP_Co14;B−cells(unstimulated);LNCAP prostate cell line;Jurkat T−Cell, S phase;H. Lymph node breast Cancer;Human Adult Small Intestine;Breast, Normal:(4005522B2);Stratagene lung carcinoma 937218;Human Prostate;B−Cells;Human Brain, Striatum;Monocyte activated, re−excision;Human Fetal Kidney;Human Uterine Cancer;NCI_CGAP_Gas4;Human Pancreas Tumor, Reexcision;Ovary, Cancer(9809C332):Poorly differentiated adenocarcinoma;Ovary, Cancer:(4004576 A8);Human Chondrosarcoma;Bone Marrow Stromal Cell, untreated;Human Thymus Stromal Cells;Soares breast 2NbHBst;Human Adrenal Gland Tumor;Human Gall Bladder;Smooth muscle, serum induced, re−exc;Smooth muscle, serum treated;breast lymph node CDNA library;Human Placenta;H Macrophage(GM−CSF treated), re−excision;Normal colon;NCI_CGAP_GC4;Human Synovial Sarcoma;Pancreas normal PCA4 No;12 Week Early Stage Human II, Reexcision;NCI_CGAP_Brn23;Monocyte activated;Soares_placenta_8to9weeks_2NbHP8to9W;Human Testes;Bone Marrow Cell Line(RS4, 11);NCI_CGAP_Lu5;Keratinocyte;Colon Normal III;Soares_fetal_heart_NbHH19W、およびPrimary Dendritic Cells, lib 1。

【００４４】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００４５】

観察された組織分布は、この遺伝子産物が、種々の障害の診断および／または処置に有用であり得ることを示唆する。胎児肝臓および脾臓における発現は、造血における、そして血液細胞系列の生存、分化、および／または活性化における潜在的な役割を示唆する。

従って、この遺伝子産物は、免疫系機能不全、感染に対する感受性、自己免疫、白血病／リンパ腫、炎症および免疫調節に関与し得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００４６】

（遺伝子番号５によってコードされるタンパク質の特徴）

コンピューターアルゴリズムＢＬＡＳＴＸを使用して、この遺伝子の翻訳産物が、非限定的な例として、以下のデータベースの受託番号ｇｂ｜ＡＡＣ１７２１７．１｜（列挙される受託番号を通じて入手可能な全ての情報が、本明細書中で参考として援用される）を通してアクセス可能な配列（これは、ここでは「｜（ＡＦ０１６０３２）ｇｕａｎｏｓｉｎｅ－ｄｉｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ ｌｉｋｅ ｐｒｏｔｅｉｎ［Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ］」として記載される）と配列相同性を共有することを決定した。観察される相同性を示す部分的なアライメントをすぐ下に示す。

【００４７】

【化２】

```
>gb|AAC17217.1| (AF016032) guanosine-diphosphatase like protein [Homo sapiens]
           >sp|O15092|O15092 GUANOSINE-DIPHOSPHATASE LIKE PROTEIN (KIAA0392).
           >dbj|BAA21575.1| (AB002390) KIAA0392 [Homo sapiens] (SUB 60-609)
           Length = 609

 Plus Strand HSPs:

 Score = 829 (291.8 bits), Expect = 6.1e-82, P = 6.1e-82
 Identities = 168/283 (59%), Positives = 199/283 (70%), Frame = +3

Q:   219 MARISPSYLCPASWYPTV-PTVSPF-----LRQRVAXXXXXXXXXXXXXXXXXDFRHWSA 380
         M RI  S L PASW+P++ P    P      LRQ +                    R+
S:     1 MGRIGISCLFPASWHFSISPVGCPRILNTNLRQIMVISVLAAAAVSLLYFSVVIIRNKYG 60

Q:   381 SLPRDRQYERYLARVGELEATDTEDPNLNYGLXVDCGSSGSRIFXYFWPRHNGNPHDLLD 560
          L RD++++RYLARV ++EATDT +PN+NYG+ VDCGSSGSR+F Y WPRHNGNPHDLLD
S:    61 RLTRDKKFQRYLARVTDIEATDTNNPNVNYGIVVDCGSSGSRVFVYCWPRHNGNPHDLLD 120

Q:   561 IKQMRDRNSQPVVKKIKPGISAMADTPEHASDYLRPLLSFAAAHVPVKKHKETPLYILCT 740
          I+QMRD+N +PVV KIKPGIS  A +PE  SDY+ PLL+FAA HVP  KHKETPLYILCT
S:   121 IRQMRDKNRKPVVMKIKPGISEPATSPEKVSDYISPLLNFAAEHVPRAKHKETPLYILCT 180

Q:   741 AGMRLLPERKQLAILADLVKDLPLEPDPLFSQSQAEVISGKQEGVYAWIGINPVLXRFDH 920
          AGMR+LPE +Q AIL DL+ D+P+ FDPLPS S AEVISGKQEGVYAWIGINPVL RF+H
S:   181 AGMRILPESQQKAILEDLLTDIPVHFDPLPSDSHAEVISGKQEGVYAWIGINPVLGRFEH 240

Q:   921 EDESDAEATQEL---------AAGRRRTVGILDMGGAXXQIAYE 1025
           ++ D EA  E+          A  R+RT GILDMGG   QIAYE
S:   241 IEDDD-EAVVEVNIPGSESSEAIVRKRTAGILDMGGVSTQIAYE 283
```

上記で「Ｓ」として示されるｇｂ｜ＡＡＣ１７２１７．１｜のセグメントは、配列番号：として配列表中に示される。構造的な類似性に基づいて、これらの相同なポリペプチドは、少なくともいくつかの生物学的活性を共有することが予期される。このような活性は、当該分野で公知であり、そしてそのいくつかが本明細書中の他で記載される。このような活性を決定するためのアッセイもまた、当該分野で公知であり、そのいくつかが、本明細書中の他で記載されている。本発明の好ましいポリペプチドは、上記で示されるアライメント（コンピューターによって、配列に導入されたギャップは、もちろん除去される）において、「Ｑ」配列に対応する配列番号：として配列表に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【００４８】

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｓｏａｒｅｓ ｉｎｆａｎｔ ｂｒａｉｎ １ＮＩＢ、そしてより少ない程度で以下において：Ｍｅｓｓａｎｇｉａｌ ｃｅｌｌ，ｆｒａｃ １；Ｈｕｍａｎ Ｕｍｂｉｌｉｃａｌ Ｖｅｉｎ Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ，ｆｒａｃ Ｂ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ａｄｉｐｏｃｙｔｅｓ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｆｅｔａｌ Ｈｅａｒｔ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｓｍｏｏｔｈ ｍｕｓｃｌｅ，ＩＬ１ｂ ｉｎｄｕｃｅｄ；Ｈｕｍａｎ Ｏｓｔｅｏｓａｒｃｏｍａ；ｈｕｍａｎ ｏｖａｒｉａｎ ｃａｎｃｅｒ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿ＣＬＬ１；ＰＣ３ Ｐｒｏｓｔａｔｅ ｃｅｌｌ ｌｉｎｅ；Ｓｏａｒｅｓ ｍｅ

ｌａｎｏｃｙｔｅ ２ＮｂＨＭ、およびＰｒｉｍａｒｙ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ，ｌｉｂ １。

【００４９】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００５０】

アピラーゼ、ジホスファターゼおよびＣＤ３９（細胞間相互作用および凝集に関与すると考えられる）に対する相同性に基づいて、このタンパク質は、細胞間相互作用に類似の役割を有し得る。胎児脳における発現に基づいて、この遺伝子およびその産物は、認識、学習および他のより高度な神経機能（例えば、記憶）に必要である、正しい神経相互作用（ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ）の形成に関与し得る。従ってこの遺伝子は、このような障害ならびに他の神経変性性障害（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ＡＬＳおよび多発性硬化症）の診断および処置に有用であり得る。さらに、このタンパク質は、神経再生が有利である、脊髄損傷を含む神経損傷の治療に有用であり得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００５１】

（遺伝子番号６によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子に対応する翻訳産物は、ヒトＨＥＲ２レセプタータンパク質と配列相同性を共有する（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号ＡＡＡ７５４９３を参照のこと）。この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐｒ２８、そしてより少ない程度で以下において：ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐｒ２３；Ｈｏｄｇｋｉｎ’ｓ Ｌｙｍｐｈｏｍａ Ｉ；Ｈｅａｌｉｎｇ ｇｒｏｉｎ ｗｏｕｎｄ － ｚｅｒｏ ｈｒ ｐｏｓｔ－ｉｎｃｉｓｉｏｎ（ｃｏｎｔｒｏｌ）；Ｈｅａｌｉｎｇ ｇｒｏｉｎ ｗｏｕｎｄ，６．５ ｈｏｕｒｓ ｐｏｓｔ ｉｎｃｉｓｉｏｎ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｕｔ２；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐｒ２；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｋｉｄ６；Ｓｏａｒｅｓ ａｄｕｌｔ ｂｒａｉｎ Ｎ２ｂ５ＨＢ５５Ｙ；Ｈｏｄｇｋｉｎ’ｓ Ｌｙｍｐｈｏｍａ ＩＩ；Ｓｏａｒｅｓ＿ｆｅｔａｌ＿ｈｅａｒｔ＿ＮｂＨＨ１９Ｗ、およびＳｏａｒｅｓ ｉｎｆａｎｔ ｂｒａｉｎ １ＮＩＢ。

【００５２】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害、ならびに癌を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系および癌組織の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００５３】

ヒトＨｅｒ２レセプターに対する相同性、そして主ヒト前立腺腫瘍およびホジキンＩリンパ腫組織におけるこの組織分布は、この遺伝子およびそのタンパク質産物が、ヒト前立腺がん、ホジキンリンパ腫、および他の免疫系障害の診断および処置に有用であることを示す。

【００５４】

（遺伝子番号７によりコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子に対応する翻訳産物は、ヒトＳｔｅｅｒｉｎ－１タンパク質（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号ＡＪ２５１９７３を参照のこと）、およびエクステンシン様タンパク質（ｅｘｔｅｎｓｉｎ－ｌｉｋｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ）と配列相同性を共有する。

【００５５】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含むか、あるいは以下のアミノ酸配列から構成される：ＭＳＤＮＡＰＡＳＬＥＳＧＳＳＳＴＰＴＮＣＳＴＳＳＡＩＰＱＰＧＡＡＴＫＰＷＲＳＫＳＬＳＶＫＨＳＡＴＶＳＭＬＳＶＫＰＰＧＰＥＡＰＲＰＴＰＥＡＭＫＰＡＰＮＮＱＫＳＭＬＥＫＬＫＬＦＮＳＫＧＧＳＫＡＧＥＧＰＧＳＲＤＴＳＣＥＲＬＥＴＬＰＳＦＥＥＳＥＥＬＥＡＡＳＲＭＬＴＴＶＧＰＡＳＳＳＰＫＩＡＬＫＧＩＡＱＲＴＦＳＲＡＬＴＮＫＫＳＳＬＫＧＮＥＫＥＫＥＫＱＱＲＥＫＤＫＥＫＳＫＤＬＡＫＲＡＳＶＴＥＲＬＤＬＫＥＥＰＫＥＤＰＳＧＡＡＶＰＥＭＰＫＫＳＳＫＩＡＳＦＩＰＫＧＧＫＬＮＳＡＫＫＥＰＭＡＰＳＨＳＧＩＰＫＰＧＭＫＳＭＰＧＫＳＰＳＡＰＡＰＳＫＥＧＥＲＳＲＳＧＫＬＳＳＧＬＰＱＱＫＰＱＬＤＧＲＨＳＳＳＳＳＳＬＡＳＳＥＧＫＧＰＧＧＴＴＬＮＨＳＩＳＳＱＴＶＳＧＳＶＧＴＴＱＴＴＧＳＮＴＶＳＶＱＬＰＱＰＱＱＱＹＮＨＰＮＴＡＴＶＡＰＦＬＹＲＳＱＴＤＴＥＧＮＸＴＸＥＳＳＳＴＧＶＳＶＥＰＸＨＦＰＲＬＤＳＬＬＷＫＮＳＬＧＫＩＬＲＬＧＧＣＧＱＳＮＰＨＡＴＭＴＱＱＧＲＲＧＲＥＦ（配列番号１４６）。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書に記載のフラグメント、これらのポリペプチドに少なくとも、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるポリペプチド、およびこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドなど）がまた、本発明により包含される。本発明のポリペプチドに結合する抗体がまた、本発明により包含される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明により包含される。

【００５６】

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｓｏａｒｅｓ＿ｐｒｅｇｎａｎｔ＿ｕｔｅｒｕｓ＿ＮｂＨＰＵ、そしてより少ない程度で以下において：７ＴＭ－ＰＮＭＩＸ；Ｈｕｍａｎ　Ｏｓｔｅｏｂｌａｓｔｓ　ＩＩ；Ｈｕｍａｎ　Ｆｅｔａｌ　Ｋｉｄｎｅｙ，ＲｅｅｘｃｉｓｉｏｎおよびＳｏａｒｅｓ　ｍｅｌａｎｏｃｙｔｅ　２ＮｂＨＭ。

【００５７】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：生殖疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に生殖系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、生殖組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００５８】

ヒトＳｔｅｅｒｉｎ－１タンパク質に対する相同性、およびエクステンシン様タンパク

質に対する相同性、ならびにＺｎフィンガー転写因子に対する相同性は、この遺伝子が、遺伝子発現、調節、および発生において役割を果たすことを示唆する。ヒト妊娠子宮における組織分布および骨芽細胞における組織分布は、この遺伝子およびそのタンパク質産物が、雌性生殖障害および異常な胚発達の診断および処置に有用であることを示す。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００５９】

（遺伝子番号８によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子は、主にｐｏｏｌｅｄ　Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌｓ、およびＨｕｍａｎ　Ｔｈｙｍｕｓ　Ｓｔｒｏｍａｌ　Ｃｅｌｌｓにおいて発現される。

【００６０】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００６１】

ヒト樹状細胞および胸腺間質細胞における組織分布は、この遺伝子およびそのタンパク質産物が、ヒト免疫障害の診断および処置に有用であることを示す。この遺伝子産物は、サイトカイン産生、抗原提示、または他のプロセスの調節において関与し得、このことは、癌の処置（例えば、免疫応答をブーストすることによる）における有用性を示唆し得る。この遺伝子は、リンパ起源の細胞において発現するので、この遺伝子またはタンパク質、ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙する組織の腫瘍マーカーおよび／または免疫治療標的として有用性を示し得る。従って、これはまた、関節炎、喘息、免疫不全疾患（例えば、ＡＩＤＳ）、白血病、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、挫瘡、および乾癬を含む免疫学的障害のための薬剤として用いられ得る。さらに、この遺伝子産物は、種々の血液系列の幹細胞および方向付けられた前駆体の拡大において、ならびに種々の細胞型の増殖において商業的有用性を有し得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００６２】

（遺伝子番号９によってコードされるタンパク質の特徴）

開示されたｃＤＮＡをコードする遺伝子は、第１２染色体に存在すると考えられる。従って、本発明に関するポリヌクレオチドは第１２染色体についての連鎖分析におけるマーカーとして有用である。

【００６３】

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｓｏａｒｅｓ＿ｆｅｔａｌ＿ｈｅａｒｔ＿ＮｂＨＨ１９Ｗ、そしてより少ない程度で以下において：Ｈｕｍａｎ　Ｌｉｖｅｒ，ｎｏｒｍａｌ；Ｅａｒｌｙ　Ｓｔａｇｅ　Ｈｕｍａｎ　Ｂｒａｉｎ；Ｈ．ｈｙｐｏｔｈａｌａｍｕｓ，ｆｒａｃ　Ａ；Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｔ－ｃｅｌｌｓ；Ｈｕｍａｎ　Ｔｏｎｓｉｌｓ，Ｌｉｂ　２；ｈｕｍａｎ　ｃｏｒｐｕｓ　ｃｏｌｏｓｕｍ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　ｌｕｎｇ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ　９３７２１８；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　ｆｅｔａｌ　ｓｐｌｅｅｎ（＃９３７２０５）；Ｈｕｍａｎ　ｕｍｂ

ilical vein endothelial cells, IL-4 induced；Macrophage（GM-CSF treated）；Stratagene liver（#937224）；Bone marrow；Endothelial-induced；Human Amygdala；Stratagene lung（#937210）；Spleen, Chronic lymphocytic leukemia；Human Bone Marrow, treated；Soares_NhHMPu_S1；Primary Dendritic Cells, lib 1、およびSoares infant brain 1NIB。

【００６４】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：発生および免疫系の障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系および発生系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、発生組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００６５】

ヒト胎児組織における組織分布は、この遺伝子およびそのタンパク質産物が、発生の障害および成人免疫障害および癌の診断および処置に有用であることを示す。この遺伝子産物は、サイトカイン産生、抗原提示、または他のプロセスの調節において関与し得、このことは、癌の処置（例えば、免疫応答をブーストすることによる）における有用性を示唆し得る。この遺伝子は、リンパ起源の細胞において発現するので、この遺伝子またはタンパク質、ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙する組織の腫瘍マーカーおよび／または免疫治療標的として有用性を示し得る。従って、これはまた、関節炎、喘息、免疫不全疾患（例えば、ＡＩＤＳ）、白血病、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、挫瘡、および乾癬を含む免疫学的障害のための薬剤として用いられ得る。さらに、この遺伝子産物は、種々の血液系列の幹細胞および方向付けられた前駆体の拡大において、ならびに種々の細胞型の増殖において商業的有用性を有し得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００６６】

（遺伝子番号１０によってコードされるタンパク質の特徴）

開示されたｃＤＮＡをコードする遺伝子は、第１９染色体に存在すると考えられる。従って、本発明に関するポリヌクレオチドは第１９染色体についての連鎖分析におけるマーカーとして有用である。

【００６７】

この遺伝子は、主にヘルパーＴ細胞（Ｔ－ｃｅｌｌ　ｈｅｌｐｅｒ）および精巣において、そしてより少ない程度でｅｘｔｅｎｔ　ｕｂｉｑｕｉｔｏｕｓｌｙにおいて、発現される。

【００６８】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：精巣および免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に精巣および免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障

害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、とのような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、精巣組織、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００６９】

観察された組織分布は、この遺伝子産物が、種々の障害の診断および／または処置において有用であり得ることを示唆する。ヘルパーＴ細胞における組織分布に基づいて、この遺伝子産物は、免疫系機能不全、白血病／リンパ腫、感染に対する感受性、および循環障害の診断および／または処置に有用であり得る。同様に、精巣における発現の上昇は、雄性受精における潜在的な役割、および雄性避妊薬としてのこの遺伝子産物の潜在的な適用を示唆する。分泌されたタンパク質はまた、生物学的活性を決定するために、抗体を惹起するために、組織マーカーとして、同属のリガンドまたはレセプターを単離するために、それらの相互作用を調節する薬剤を同定するために、そして栄養補給剤として、使用され得る。この産物はまた、非常に広範な生物学的活性を有する。これらの代表的なものは、サイトカイン、細胞の増殖／分化調節活性、または他のサイトカインの誘導；免疫刺激／免疫抑制活性（例えば、ヒトの免疫不全ウイルス感染、癌、自己免疫疾患、およびアレルギーを処置するため）；造血の調節（例えば、貧血を処置するため、または化学療法に対する補助薬として）；骨、軟骨、腱、靭帯、および／または神経の刺激または増殖（例えば、創傷を処置するため、卵胞刺激ホルモンの刺激のため（受胎能の制御のため）；走化性およびケモキネシス活性（例えば、感染、腫瘍を処置するため）；止血または血栓崩壊活性（例えば、血友病、心筋梗塞などを処置するため）；抗炎症活性（例えば、敗血症性ショック、クローン病を処置するため）；抗菌薬として；乾癬または他の過剰増殖性疾患を処置するため；代謝および挙動の調節のためである。遺伝子治療手順における対応する核酸の使用も意図される。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００７０】

（遺伝子番号１１によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：ｐｒｏｓｔａｔｅ，Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌｓ，ｐｏｏｌｅｄ；Ｓｏａｒｅｓ＿ｆｅｔａｌ＿ｌｕｎｇ＿ＮｂＨＬ１９Ｗ、そしてより少ない程度で以下において：Ｈｕｍａｎ　Ｐｉｎｅａｌ　Ｇｌａｎｄ；Ｌ４２８、およびＡｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｔ－Ｃｅｌｌ（１２ｈｓ）／Ｔｈｉｏｕｒｉｄｉｎｅ　ｌａｂｅｌｌｅｄＥｃｏ。

【００７１】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害、ならびに癌を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系および癌性組織の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００７２】

ヒト前立腺および造血細胞系列における組織分布は、この遺伝子およびそのタンパク質産物が、ヒト前立腺癌および免疫系障害の診断および処置に有用であることを示す。この遺伝子産物は、サイトカイン産生、抗原提示、または他のプロセスの調節に関与し得、（

例えば、免疫応答をブーストすることによる）ガンの処置における有用性をまた示唆し得る。この遺伝子は、リンパ系起源の細胞において発現するので、この遺伝子またはタンパク質、ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。従って、それはまた、関節炎、喘息、ＡＩＤＳのような免疫不全疾患、白血病、慢性関節リウマチ、慢性肉芽腫症、炎症性腸疾患、敗血症、挫創、好中球減少症、好中球増加症、乾癬、過敏症（例えば、Ｔ細胞媒介細胞障害）；移植器官および組織ヒ対する免疫反応（例えば、宿主対移植片および移植片対宿主疾患）または自己免疫障害（例えば、自己免疫不妊症、水晶体組織傷害、脱髄、全身エリテマトーデス、薬物誘導溶血性貧血、慢性関節リュウマチ、シェーグレン病、および強皮症）を含む、免疫学的障害のための薬剤としても有用であり得る。さらに、この遺伝子産物は、様々な血液系列の幹細胞および方向付けられた前駆細胞の拡大において、ならびに様々な細胞型の分化および／または増殖において商業的有用性を有し得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００７３】

（遺伝子番号１２によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｈｕｍａｎ Ｗｈｏｌｅ Ｂｒａｉｎ ＃２ － Ｏｌｉｇｏ ｄＴ ＞ １．５Ｋｂ；Ｋｅｒａｔｉｎｏｃｙｔｅ、そしてより少ない程度で以下において：Ｂｏｎｅ Ｍａｒｒｏｗ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ（ＲＳ４，１１）；Ｔ ｃｅｌｌ ｈｅｌｐｅｒ ＩＩ；Ｔｅｓｔｉｓ １；Ｈｕｍａｎ ８ Ｗｅｅｋ Ｗｈｏｌｅ Ｅｍｂｒｙｏ，ｓｕｂｔｒａｃｔｅｄ；Ｈｕｍａｎ ｒｅｔｉｎａ ｃＤＮＡ Ｔｓｐ５０９Ｉ－ｃｌｅａｖｅｄ ｓｕｂｌｉｂｒａｒｙ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｓｃｈｉｚｏ ｂｒａｉｎ Ｓ１１；Ｈｕｍａｎ Ｕｍｂｉｌｉｃａｌ Ｖｅｉｎ，Ｅｎｄｏ．ｒｅｍａｋｅ；Ｈｕｍａｎ Ｓｔｏｍａｃｈ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｈ．Ｌｙｍｐｈ ｎｏｄｅ ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ；Ｈｕｍａｎ Ｉｎｆａｎｔ Ｂｒａｉｎ；Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ｌｉｎｅ，ａｎｇｉｏｇｅｎｉｃ；Ｈｕｍａｎ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｔ－Ｃｅｌｌｓ；Ｔ－Ｃｅｌｌ ＰＨＡ ２４ ｈｒｓ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｈＮＴ ｎｅｕｒｏｎ（＃９３７２３３）；Ｈｕｍａｎ Ｔｅｓｔｅｓ Ｔｕｍｏｒ；Ｐｒｉｍａｒｙ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ，ｆｒａｃ ２；Ｈｕｍａｎ Ａｄｕｌｔ Ｐｕｌｍｏｎａｒｙ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｈｕｍａｎ ８ Ｗｅｅｋ Ｗｈｏｌｅ Ｅｍｂｒｙｏ；Ｓｏａｒｅｓ＿ｆｅｔａｌ＿ｌｕｎｇ＿ＮｂＨＬ１９Ｗ、およびＰｒｉｍａｒｙ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ，ｌｉｂ １。

【００７４】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：神経系および免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に神経系および免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、神経組織、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００７５】

この遺伝子の組織分布は、このクローンが、神経発生、神経変性、造血および免疫の障害および新生物の診断および／または処置に有用であり得ることを示唆する。この遺伝子産物は、サイトカイン産生、抗原提示、または他のプロセスの調節において関与し得、こ

のことは、癌の処置（例えば、免疫応答をブーストすることによる）における有用性を示唆し得る。この遺伝子は、リンパ起源の細胞において発現するので、この遺伝子またはタンパク質、ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙する組織の腫瘍マーカーおよび／または免疫治療標的として有用性を示し得る。従って、これはまた、関節炎、喘息、免疫不全疾患（例えば、ＡＩＤＳ）、白血病、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、挫瘡、および乾癬を含む免疫学的障害のための薬剤として用いられ得る。さらに、この遺伝子産物は、種々の血液系列の幹細胞および方向付けられた前駆体の拡大において、ならびに種々の細胞型の増殖において商業的有用性を有し得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００７６】

（遺伝子番号１３によりコードされるタンパク質の特徴）

Ｕ９３７骨髄細胞株に対して試験した場合、この遺伝子を含む細胞から得られた上清は、ＧＡＳアッセイを活性化した。従って、この遺伝子は、Ｊａｋ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路を介して、骨髄細胞を活性化するようである。γ活性化配列（ＧＡＳ）は、Ｊａｋ－ＳＴＡＴ経路に関与する多くの遺伝子の上流に見出されるプロモーターエレメントである。このＪａｋ－ＳＴＡＴ経路は、細胞の分化および増殖に関与する大きなシグナル伝達経路である。従って、Ｊａｋ－ＳＴＡＴ経路の活性化（ＧＡＳエレメントの結合により反映される）を用いて、細胞の増殖および分化に関与するタンパク質を示し得る。

【００７７】

この遺伝子は、神経／感覚組織において、および初代樹状細胞において、ある程度富化して偏在的に発現される。

【００７８】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：神経系および免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に神経系および免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、神経組織、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００７９】

観察された組織分布は、種々の疾患の研究、診断および／または処置についての有用性を示唆する。神経／感覚組織における富化発現は、この遺伝子が、アルツハイマー病、パーキンソン病、学習障害のような神経変性性障害および行動障害の処置、検出および／または診断に有用であり得ることを示す。あるいは、樹状細胞における発現および観察された生物学的活性は、免疫系疾患および／または障害、ならびに感染性疾患の研究、診断、および／または処置についての有用性を示唆する。この遺伝子産物は、サイトカイン産生、抗原提示、または他のプロセスの調節において関与し得、このことは、癌の処置（例えば、免疫応答をブーストすることによる）における有用性を示唆する。この遺伝子は、リンパ起源の細胞において発現するので、この遺伝子またはタンパク質、ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙された組織の腫瘍マーカーおよび／または免疫療法標的としての有用性を示し得る。従って、この遺伝子はまた、関節炎、喘息、免疫不全疾患（例えば、ＡＩＤＳ）、白血病、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、挫瘡、および乾癬を含む免疫学的障害のための薬剤として用いられ得る。さらに、この遺伝子産物は、種々の血液系列の幹細胞および方向付けられた前駆体の拡大において、ならびに種々の細胞型の分化および／または増殖において商業的有用性を有し得る。さらに、この遺伝子

に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００８０】

（遺伝子番号１４によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子は、主に免疫系／造血系の細胞において、とりわけ、単球および樹状細胞、ならびに胎児肝臓および脾臓（造血機能を有することが公知）において発現される。

【００８１】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に造血系および発生系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫系、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００８２】

造血機能を有することが公知である、胎児肝臓および脾臓におけるその発現、ならびに樹状細胞における発現に基づいて、この遺伝子およびそのコードするポリペプチドは、自己免疫障害（全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）および慢性関節リウマチを含む）において観察されるような免疫系の過剰な活性などの免疫機能に関連する障害の診断および処置に、または特定の免疫細胞血球減少のような乏しい免疫機能に関連する障害の処置において有用であり得る。この遺伝子産物はまた、器官移植およびアレルギーにおける免疫応答の調節に有用であり得る。この遺伝子は、免疫障害の処置に、または腫瘍に対する免疫ベースの治療の開始に有用であり得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００８３】

（遺伝子番号１５によってコードされるタンパク質の特徴）

コンピューターアルゴリズムＢＬＡＳＴＸを使用して、この遺伝子の翻訳産物が、非限定的な例として、以下のデータベースの受託番号ｇｂ｜ＡＡＢ５７６７９．１｜（列挙される受託番号を通じて入手可能な全ての情報が、本明細書中で参考として援用される）を通してアクセス可能な配列（これは、ここでは「｜ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ＵＮＣ５Ｈ２［Ｒａｔｔｕｓ　ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ］」として記載される）と配列相同性を共有することを決定した。観察される相同性を示す部分的なアライメントをすぐ下に示す。

【００８４】

【化３】

```
>gb|AAB57679.1| transmembrane receptor UNC5H2 [Rattus norvegicus]
            >sp|O08722|O08722 TRANSMEMBRANE RECEPTOR UNC5H2.
            Length = 945

 Plus Strand HSPs:

 Score = 638 (224.6 bits), Expect = 2.3e-61, P = 2.3e-61
 Identities = 122/130 (93%), Positives = 124/130 (95%), Frame = +3

Q:     3 EGEGQIFQLHTTLAETPAGSLDTLCSAPGXTVTTQLGPYAFKIPLSIRQKICNSLDAPNS 182
         EGEGQIFQLHTTLAETPAGSLD LCSAPG   TTQLGPYAFKIPLSIRQKICNSLDAPNS
S:   816 EGEGQIFQLHTTLAETPAGSLDALCSAPGNAATTQLGPYAFKIPLSIRQKICNSLDAPNS 875

Q:   183 RGNDWRMLAQKLSMDRYLNYFATKASPTGVILDLWEALQQDDGDLNSLASALEEMGKSEM 362
         RGNDWR+LAQKLSMDRYLNYFATKASPTGVILDLWEA QQDDGDLNSLASALEEMGKSEM
S:   876 RGNDWRLLAQKLSMDRYLNYFATKASPTGVILDLWEARQQDDGDLNSLASALEEMGKSEM 935

Q:   363 LVAVATDGDC 392
         LVA+ TDGDC
S:   936 LVAMTTDGDC 945
```

上記で「Ｓ」として示されるｇｂ｜ＡＡＢ５７６７９．１｜のセグメントは、配列番号：として配列表中に示される。構造的な類似性に基づいて、これらの相同なポリペプチドは、少なくともいくつかの生物学的活性を共有することが予期される。このような活性は、当該分野で公知であり、そしてそのいくつかが本明細書中の他で記載される。このような活性を決定するためのアッセイもまた、当該分野で公知であり、そのいくつかが、本明細書中の他で記載されている。本発明の好ましいポリペプチドは、上記で示されるアライメント（コンピューターによって、配列に導入されたギャップは、もちろん除去される）において、「Ｑ」配列に対応する配列番号：として配列表に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【００８５】

この遺伝子の翻訳産物は、発生中の神経系において重要であると考えられるネトリン（ｎｅｔｒｉｎ）レセプターと配列相同性を共有する。このネトリンは、拡散性誘引物質として、ならびに異なるクラスの細胞および軸索についての忌避薬として機能し得る、系統学的に保存された指導合図（ガイダンスキュー：ｇｕｉｄａｎｃｅ　ｃｕｅ）のファミリーである。脊椎動物、昆虫および線虫において、免疫グロブリンスーパーファミリーのＤＣＣサブファミリーのメンバーは、ネトリン供給源に向かう遊走に関与するレセプターとみなされている。ラットネトリンレセプターに対するヒト遺伝子産物の配列類似性に基づき、このクローンの翻訳産物は、ネトリンレセプタータンパク質と少なくともいくつかの生物学的活性を共有することが期待される。このような活性は、当該分野で公知であり、そのいくつかが、本明細書のいずれかに記載されている。

【００８６】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチドは、以下のアミノ酸配列：ＥＧＥＧＱＩＦＱＬＨＴＴＬＡＥＴＰＡＧＳＬＤＴＬＣＳＡＰＧＸＴＶＴＴＱＬＧＰＹＡＦＫＩＰＬＳＩＲＱＫＩＣＮＳＬＤＡＰＮＳＲＧＮＤＷＲＭＬＡＱＫＬＳＭＤＲＹＬＮＹＦＡＴＫＡＳＰＴＧＶＩＬＤＬＷＥＡＬＱＱＤＤＧＤＬＮＳＬＡＳＡＬＥＥＭＧＫＳＥＭＬＶＡＶＡＴＤＧＤＣ（配列番号１５２）、
を含むか、あるいはこのようなアミノ酸配列番号から構成される。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書に記載のフラグメント、これらのポリペプチドに少なくとも、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるポリペプチド、およびこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドなど）が、本発明により包含される。本発明のポリペプチドに結合する抗体がまた、本発明により包含される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明により包含される。

【００８７】

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ　ｉｎｆａｎｔ　ｂｒａｉｎ　ｃＤＮＡ、そしてより少ない程度で以下にお

いて：Smooth muscle, serum treated；NCI_CGAP_Kid5；Soares_multiple_sclerosis_2NbHMSP；Soares ovary tumor NbHOT；Soares_pregnant_uterus_NbHPU；H. Epididiymus, cauda；Smooth Muscle- HASTE normalized；Human Synovium；Gessler Wilms tumor；Human Chondrosarcoma；Human Thymus Stromal Cells；NCI_CGAP_Pan1；Fetal Heart；NCI_CGAP_GC4；Osteoblasts；Human Cerebellum；Soares_NFL_T_GBC_S1；Soares_NhHMPu_S1；Soares infant brain 1NIB；Human Astrocyte；Sinus piniformis Tumour；Human OB MG63 treated（10 nM E2）fraction I；Barstead spleen HPLRB2；Normal Human Trabecular Bone Cells；Adipocytes, re-excision；Smooth Muscle Serum Treated, Norm；Smooth muscle-ILb induced；Human Normal Breast；NCI_CGAP_AA1；Palate normal；Human adult（K. Okubo）；H. Kidney Cortex, subtracted；Human Osteosarcoma；Prostate BPH；Spinal Cord, re-excision；Breast Cancer Cell line, angiogenic；12 Week Old Early Stage Human, II；Human Osteoblasts II；Human Pancreas Tumor；Stromal cell TF274；Human Pancreas Tumor, Reexcision；Ovary, Cancer（9809C332）：Poorly differentiated adenocarcinoma；Hemangiopericytoma；Soares breast 2NbHBst；Human Adrenal Gland Tumor；Smooth muscle, serum induced, re-exc；Pancreas Islet Cell Tumor；Colon Normal II；Adipocytes；NCI_CGAP_Co8；Human Fetal Kidney, Reexcision；NCI_CGAP_Kid3；Human Bone Marrow, treated；Hodgkin's Lymphoma II；Keratinocyte；Soares_fetal_lung_NbHL19W、およびColon Tumor II。

【００８８】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：神経系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示美的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に神経系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、神経組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００８９】

脳における組織分布および膜貫通レセプターUNC5H2［Rattus norvegicus］に対する配列番号相同性は、このクローンのタンパク質産物が、神経変性性疾患状態、行動障害、または炎症性状態の検出、処置および／または予防に有用であることを示す。代表的な用途は、本明細書中の、以下の「再生」および「過剰増殖性障害」の

セクションにおいて、実施例１１、１５および１８において、ならびに他のいずれかにおいて、記載される。要するに、この用途としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ツレット症候群、髄膜炎、脳炎、脱髄疾患、末梢神経障害、新形成、外傷、先天性異常、脊髄傷害、虚血および梗塞形成、動脈瘤、出血、精神分裂病、躁病、痴呆、偏執症、強迫性障害、鬱病、恐慌性障害、学習障害、ＡＬＳ、精神病、自閉、および行動変化（栄養補給、睡眠パターン、平衡、および知覚の障害を含む）の検出、処置、および／または予防が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、脳の領域におけるこの遺伝子産物の発現の上昇は、これが正常な神経機能において役割を果たすことを示す。潜在的に、この遺伝子産物は、シナプス形成、神経伝達、学習、認識、恒常性、あるいはニューロンの分化または生存に関与する。さらに、このタンパク質はまた、栄養補給剤としてのその用途に加えて、生物学的活性を決定するために、抗体を惹起するために、組織マーカーとして、同属のリガンドまたはレセプターを単離するために、それらの相互作用を調節する薬剤を同定するために使用され得る。タンパク質ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００９０】

（遺伝子番号１６によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌｓ，ｐｏｏｌｅｄ；ｈｕｍａｎ　ｔｏｎｓｉｌｓ。

【００９１】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００９２】

扁桃および樹状細胞におけるその発現に基づいて、この遺伝子およびそのコードするポリペプチドは、自己免疫障害（全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）および慢性関節リウマチを含む）において観察されるような免疫系の過剰な活性などの免疫機能に関連する障害の診断および処置に、または特定の免疫細胞血球減少のような乏しい免疫機能に関連する障害の処置において有用であり得る。この遺伝子産物はまた、器官移植およびアレルギーにおける免疫応答の調節に有用であり得る。

【００９３】

（遺伝子番号１７によってコードされるタンパク質の特徴）

本発明の好ましいポリペプチドは、配列表に配列番号１４８として示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこのようなポリペプチドからなる。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書に記載のフラグメント、これらのポリペプチドに少なくとも、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるポリペプチド、およびこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、など）がまた、本発明により包含される。本発明のポリペプチドに結合する抗体がまた、本発明により包含される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明により包含される。

【００９４】

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：ＫＭＨ２；Ｈｕｍａｎ Ａｄｒｅｎａｌ Ｇｌａｎｄ Ｔｕｍｏｒ；Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ，ｐｏｏｌｅｄ；Ｂｏｎｅ Ｍａｒｒｏｗ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ（ＲＳ４，１１）。

【００９５】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００９６】

骨髄および樹状細胞における発現に基づいて、この遺伝子およびそのコードする遺伝子産物は、自己免疫症候群（例えば、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、糖尿病、および免疫不全症候群）を含む免疫系の疾患の診断および処置に有用であり得る。この遺伝子はまた、器官移植またはアレルギーのような状態において免疫応答を調節するのに有用であり得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【００９７】

（遺伝子番号１８によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子は、以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて例示されるように、主に、２つの異なる型の組織、例えば、免疫機能／造血機能の細胞、および精巣において発現される：Ｈｕｍａｎ Ｅｏｓｉｎｏｐｈｉｌｓ；Ｈｕｍａｎ Ｔｅｓｔｅｓ，Ｒｅｅｘｃｉｓｉｏｎ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐｒ３；Ｅａｒｌｙ Ｓｔａｇｅ Ｈｕｍａｎ Ｂｒａｉｎ；Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ－ｉｎｄｕｃｅｄ；Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｔ－ｃｅｌｌ（１２ｎ）／Ｔｈｉｏｕｒｉｄｉｎｅ－ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｔ ｃｅｌｌ ｈｅｌｐｅｒ ＩＩ；Ｓｏａｒｅｓ＿ｆｅｔａｌ＿ｈｅａｒｔ＿ＮｂＨＨ１９Ｗ；Ｐｒｉｍａｒｙ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ，ｌｉｂ １；ＨＳＣ１７２ ｃｅｌｌｓ；Ｈ．Ｅｐｉｄｉｄｉｙｍｕｓ，ｃａｐｕｔ ＆ ｃｏｒｐｕｓ；Ｓｍｏｏｔｈ Ｍｕｓｃｌｅ－ ＨＡＳＴＥ ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ；Ａｍｎｉｏｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ － Ｐｒｉｍａｒｙ Ｃｕｌｔｕｒｅ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐｒ２２；Ｓｏａｒｅｓ＿ｐｉｎｅａｌ＿ｇｌａｎｄ＿Ｎ３ＨＰＧ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐｒ２８；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿ＣＬＬ１；Ｒｅｓｔｉｎｇ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｌｉｂｒａｒｙ，ＩＩ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｃｏｌｏｎ（＃９３７２０４）；Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ，ｐｏｏｌｅｄ；Ｓｏａｒｅｓ＿ｐｒｅｇｎａｎｔ＿ｕｔｅｒｕｓ＿ＮｂＨＰＵ；Ｓｏａｒｅｓ＿ＮｈＨＭＰｕ＿Ｓ１；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｃｏ１；Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ ７ ＨｅＬａ ｃＤＮＡ Ｌｉｂｒａｒｙ；Ａｔｒｉｕｍ ｃＤＮＡ ｌｉｂｒａｒｙ Ｈｕｍａｎ ｈｅａｒｔ；Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ ７ Ｆｅｔａｌ Ｂｒａｉｎ ｃＤＮＡ Ｌｉｂｒａｒｙ；Ｈｕｍａｎ ＯＢ ＭＧ６３ ｃｏｎｔｒｏｌ ｆｒａｃｔｉｏｎ Ｉ；Ｃｅｍ ｃｅｌｌｓ ｃｙｃｌｏｈｅｘａｍｉｄｅ ｔｒｅａｔｅｄ；Ｓｔｏｍａｃｈ ｃａｎｃｅｒ（ｈｕｍａｎ），ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｈｕｍａｎ ｅｎｄｏｍｅｔｒｉａｌ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ－ｔｒｅａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｅｓｔｒａｄｉｏｌ；Ｓｍｏｏｔｈ ｍｕｓｃｌｅ，ＩＬ１ｂ ｉｎｄｕｃｅｄ；Ｓｙｎｏｖｉａｌ ｈｙｐｏｘｉａ－ＲＳＦ ｓｕｂｔｒａｃｔｅｄ；Ｈｕｍａｎ Ｗｈｏｌｅ Ｂｒａｉｎ ＃２ － Ｏｌｉｇｏ ｄＴ ＞ １．５Ｋｂ；ＨＬ－６０，ＰＭＡ ４Ｈ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；ＬＮＣＡＰ ｐｒｏｓ

tate cell line；Synovial hypoxia；Jurkat T－cell G1 phase；Brain Frontal Cortex, re－excision；Stratagene neuroepithelium（＃937231）；Human Umbilical Vein, Reexcision；Gessler Wilms tumor；HUMAN JURKAT MEMBRANE BOUND POLYSOMES；Human Fetal Dura Mater；Human Activated T－Cells；Human Hypothalmus, Schizophrenia；NCI_CGAP_Br2；Human Rhabdomyosarcoma；Human adult testis, large inserts；Pancreas Islet Cell Tumor；Colon Carcinoma；breast lymph node CDNA library；Adipocytes；CD34 depleted Buffy Coat（Cord Blood）, re－excision；Human Microvascular Endothelial Cells, fract. A；Monocyte activated；HUMAN B CELL LYMPHOMA；Spleen, Chronic lymphocytic leukemia；Human Bone Marrow, treated；Human Testes；Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS_S1、およびSoares fetal liver spleen 1NFLS。

【００９８】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：免疫系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【００９９】

免疫機能に関連する種々の供給源（例えば、好酸球、リンパ節、Ｔ細胞および樹状細胞）におけるその発現に基づいて、この遺伝子およびそのコードするポリペプチドは、自己免疫症候群（全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）および慢性関節リウマチを含む）において観察されるような、免疫機能に関連する障害（例えば、免疫系の過剰な活性が病原となる障害）の診断および処置に、または特定の免疫細胞減少症のような乏しい免疫機能に関連する障害の処置において、有用であり得る。この遺伝子はまた、器官移植またはアレルギーのような状態において免疫応答を調節するのに有用であり得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【０１００】

（遺伝子番号１９によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Human Fetal Brain；pBMC stimulated w／poly I／C。

【０１０１】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：神経系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に

、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に神経系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、神経組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【０１０２】

発生中の脳における発現に起因して、この遺伝子およびそのコードするポリペプチドは、脳卒中、アルツハイマー病、多発性硬化症、ＡＬＳ、ならびに認識および学習機能の損失に関連する他の障害の診断および処置に有用であり得る。このタンパク質はまた、神経細胞の再生および再成長が必要である、脊髄および他の神経損傷の処置に有用であり得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【０１０３】

（遺伝子番号２０によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：Ｓｏａｒｅｓ＿ｐｒｅｇｎａｎｔ＿ｕｔｅｒｕｓ＿ＮｂＨＰＵ、そしてより少ない程度で以下において：Ｈｕｍａｎ ｅｎｄｏｍｅｔｒｉａｌ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ－ｔｒｅａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｐｒｏｇｅｓｔｅｒｏｎｅ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐｒ２８；Ｈｕｍａｎ ｅｎｄｏｍｅｔｒｉａｌ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ；Ｋｅｒａｔｉｎｏｃｙｔｅ；Ｈｕｍａｎ Ｗｈｏｌｅ Ｂｒａｉｎ ＃２ － Ｏｌｉｇｏ ｄＴ ＞ １．５Ｋｂ；Ｓｏａｒｅｓ＿ＮｈＨＭＰｕ＿Ｓ１；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿ＧＣＢ１；Ｈｕｍａｎ ｅｎｄｏｍｅｔｒｉａｌ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ－ｔｒｅａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｅｓｔｒａｄｉｏｌ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｃｏ１０；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｕｔ２；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｇａｓ４；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｐａｎ１；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿ＧＣ４；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿ＧＣ６；Ｓｏａｒｅｓ ｏｖａｒｙ ｔｕｍｏｒ ＮｂＨＯＴ；Ｂｏｎｅ Ｍａｒｒｏｗ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ（ＲＳ４，１１）；Ｈｏｄｇｋｉｎ’ｓ Ｌｙｍｐｈｏｍａ ＩＩ；Ｈｕｍａｎ ８ Ｗｅｅｋ Ｗｈｏｌｅ Ｅｍｂｒｙｏ；Ｓｏａｒｅｓ＿ｆｅｔａｌ＿ｌｕｎｇ＿ＮｂＨＬ１９Ｗ；Ｔ ｃｅｌｌ ｈｅｌｐｅｒ ＩＩ；Ｓｏａｒｅｓ＿ＮＦＬ＿Ｔ＿ＧＢＣ＿Ｓ１；Ｈｅａｌｉｎｇ Ａｂｄｏｍｅｎ Ｗｏｕｎｄ，１５ ｄａｙｓ ｐｏｓｔ ｉｎｃｉｓｉｏｎ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｏｖ３５；Ｔｅｓｔｉｓ １；Ｈｕｍａｎ ８ Ｗｅｅｋ Ｗｈｏｌｅ Ｅｍｂｒｙｏ，ｓｕｂｔｒａｃｔｅｄ；Ｈｕｍａｎ ｒｅｔｉｎａ ｃＤＮＡ Ｔｓｐ５０９Ｉ－ｃｌｅａｖｅｄ ｓｕｂｌｉｂｒａｒｙ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｏｖ２３；Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｔ－ｃｅｌｌｓ；Ｈ．Ｅｐｉｄｉｄｉｙｍｕｓ，ｃａｕｄａ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｓｃｈｉｚｏ ｂｒａｉｎ Ｓ１１；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｃｏ９；Ｈｕｍａｎ Ｕｍｂｉｌｉｃａｌ Ｖｅｉｎ，Ｅｎｄｏ．ｒｅｍａｋｅ；Ｏｖａｒｙ，Ｃａｎｃｅｒ：（１５７９９Ａ１Ｆ）Ｐｏｏｒｌｙ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ ｃａｒｃｉｎｏｍａ；Ｈｕｍａｎ Ｓｔｏｍａｃｈ，ｒｅ－ｅｘｃｉｓｉｏｎ；Ｗｉｌｍ’ｓ ｔｕｍｏｒ；Ｈｕｍａｎ Ｍａｎｉｃ Ｄｅｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｉｓｓｕｅ；Ｈ．Ｌｙｍｐｈ ｎｏｄｅ ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ；Ｈｕｍａｎ Ｉｎｆａｎｔ Ｂｒａｉｎ；Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ｌｉｎｅ，ａｎｇｉｏｇｅｎｉｃ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｕｔ１；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿Ｋｉｄ６；Ｈｕｍａｎ Ｆｅｔａｌ Ｄｕｒａ Ｍａｔｅｒ；Ｈｕｍａｎ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｔ－Ｃｅｌｌｓ；Ｔ－Ｃｅｌｌ ＰＨＡ ２４ ｈｒｓ；ＮＣＩ＿ＣＧＡＰ＿ＣＬＬ１；Ｈｕｍａｎ Ｔｈｙｍｕｓ Ｓｔｒｏｍａｌ Ｃｅｌｌｓ；ＣＨＭＥ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ，ｔｒｅａｔｅｄ ５ ｈｒｓ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ ｈＮＴ ｎｅｕｒｏｎ（＃９３７２３３）；Ｈｕｍａｎ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｌｙｍｐｈｏｍａ；Ｃｏｌｏｎ Ｃａｒｃｉｎｏ

ma；Human Placenta；NCI_CGAP_Kid11；Human Testes Tumor；Primary Dendritic cells, frac 2；Pancreas normal PCA4 No；Human Adult Pulmonary, re-excision；Human Bone Marrow, treated；Soares_parathyroid_tumor_NbHPA；Soares melanocyte 2NbHM；Colon Tumor II；Soares_fetal_heart_NbHH19W、およびPrimary Dendritic Cells, lib 1。

【０１０４】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：生殖、免疫、および造血系の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に生殖系、免疫系および造血系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、生殖組織、免疫組織、造血組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【０１０５】

観察された組織分布は、この遺伝子産物が、生殖系、新形成、および他の増殖障害の疾患の診断および／または処置に有用であり得ることを示唆する。同様に、造血細胞における発現は、種々の血球細胞系列の増殖、生存、分化および／または活性化における役割、ならびに免疫機能不全、自己免疫、白血病／リンパ腫、感染に対する感受性、および循環障害におけるこの遺伝子産物の関与を示し得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【０１０６】

（遺伝子番号２１によってコードされるタンパク質の特徴）

本発明の好ましいポリペプチドは、配列表に配列番号：配列番号：および／または配列番号１５６として示されるアミノ酸配列：１５７）を有するポリペプチドを含むか、あるいはこのようなポリペプチドからなる。さらに、これらのポリペプチドのフラグメントおよび改変体（例えば、本明細書に記載のフラグメント、これらのポリペプチドに少なくとも、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるポリペプチド、およびこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、など）がまた、本発明により包含される。本発明のポリペプチドに結合する抗体がまた、本発明により包含される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明により包含される。

【０１０７】

この遺伝子に対応する翻訳産物は、ヒトデルマタン（ｄｅｒｍａｔａｎ）／コンドロイチン硫酸２－スルホトランスフェラーゼ（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号ＡＢ０２０３１６を参照のこと）と配列相同性を共有する。

【０１０８】

この遺伝子は、主に以下の組織／ｃＤＮＡライブラリーにおいて発現される：ＳＴＲＯＭＡＬ －ＯＳＴＥＯＣＬＡＳＴＯＭＡ；Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ, ｐｏｏｌｅｄ；Ｓｍｏｏｔｈ ｍｕｓｃｌｅ, ｃｏｎｔｒｏｌ；ＮｉｎｅＷｅｅｋ Ｏｌｄ Ｅａｒｌｙ Ｓｔａｇｅ Ｈｕｍａｎ。

【０１０９】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：筋骨格系組織の疾患および／または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に筋骨格系の多くの障害に関して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、その障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、筋骨格組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、または別の組織もしくはサンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【０１１０】

この分泌タンパク質は、生物学的活性を決定するため、抗体を惹起するため、組織マーカーとして、同種のリガンドまたはレセプターを単離するために、それらの相互作用を調節する薬剤を同定するために、そして栄養補給剤として、使用され得る。このタンパク質はまた、非常に広範な生物学的活性を有し得る。代表的な用途は、以下の「走化性」および「結合活性」の節、実施例１１、１２、１３、１４、１５、１６、１８、１９および２０、ならびに本明細書中の他の箇所において記載される。簡潔には、このタンパク質は、以下の活性を有し得る：サイトカイン、細胞の増殖／分化調節活性、または他のサイトカインの誘導；免疫刺激／免疫抑制活性（例えば、ヒトの免疫不全ウイルス感染、癌、自己免疫疾患、およびアレルギーを処置するため）；造血の調節（例えば、貧血を処置するため、または化学療法に対する補助薬として）；骨、軟骨、腱、靭帯、および／または神経の刺激または増殖（例えば、創傷を処置するため、卵胞刺激ホルモンの刺激のため（受胎能の制御のため）；走化性およびケモキネシス活性（例えば、感染、腫瘍を処置するため）；止血または血栓崩壊活性（例えば、血友病、心筋梗塞などを処置するため）；抗炎症活性（例えば、敗血症性ショック、クローン病を処置するため）；抗菌薬として；乾癬または他の過剰増殖性疾患を処置するため；代謝および挙動の調節のため。遺伝子治療手順における対応する核酸の使用も意図される。巨骨細胞腫におけるこの遺伝子産物の発現のレベルの上昇は、この産物が巨骨細胞腫の生存、増殖および／または成長において役割を果たし得ることを示唆する。従って、この産物は、骨粗しょう症のような状態において骨量に影響するのに有用であり得る。さらに、このタンパク質はまた、栄養補給剤としての使用に加えて、生物学的活性を決定するため、抗体を惹起するため、組織マーカーとして、同種のリガンドまたはレセプターを単離するために、それらの相互作用を調節する薬剤を同定するために、使用され得る。タンパク質ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に挙げられた組織に対する腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【０１１１】

【表１】

表１－①

表1

遺伝子番号	cDNAクローンID	ATCC寄託番号および日付	ベクター	オリゴヌクレオチド配列番号X	総オリゴヌクレオチド配列	クローン配列の5'オリゴヌクレオチド	クローン配列の3'オリゴヌクレオチド	開始コドンの5'オリゴヌクレオチド	シグナルペプチドの最初のアミノ酸のオリゴヌクレオチド	アミノ酸配列番号Y	シグナルペプチドの最初のアミノ酸	シグナルペプチドの最後のアミノ酸	分泌されたタンパク質の最初のアミノ酸	ORFの最後のアミノ酸
1	HDPPA04	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	11	2406	1	2406	271	271	74	1	19	20	283
1	HDPPA04	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	32	1675	1	1613		1003	95	1	18	19	23
1	HDPPA04	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	33	786	1	786	261	261	96	1	19	20	93
2	HOHBY44	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	12	3369	1	3369	170	170	75	1	24	25	184
2	HOHBY44	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	34	1063	533	1063		2	97	1	1	2	77
2	HOHBY44	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	35	1178	1	1178		1125	98	1	1	2	84
3	HOHBL42	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	13	3258	1	1690	61	61	76	1	17	18	716
3	HOHBL42	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	36	790	1	790	82	82	99	1	15	16	61
3	HOHBL42	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	37	1203	1	1203		809	100	1			11

(続きあり)

(続き)

表1－②

遺伝子番号	cDNA クローンID	ATCC寄託番号およびZ日付	ベクター	ヌクレオチド配列番号X	総ヌクレオチド配列	クローン配列の5'ヌクレオチド	クローン配列の3'ヌクレオチド	開始コドンの5'ヌクレオチド	シグナルペプチドの最初のアミノ酸の5'ヌクレオチド	アミノ酸配列番号Y	シグナルペプチドの最初のアミノ酸	シグナルペプチドの最後のアミノ酸	分泌されたタンパク質の最初のアミノ酸	ORFの最後のアミノ酸
3	HOHBL42	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	38	804	1	804		590	101	1	1	2	66
4	HRABV43	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	14	3077	1	3077	99	99	77	1	22	23	617
4	HRABV43	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	39	1602	1	1602	88	88	102	1	22	23	505
4	HRABV43	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	40	1789	209	1775	63	63	103	1	22	23	191
5	HDPRH52	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	15	1082	64	1082	219	219	78	1	21	22	288
5	HDPRH52	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	41	2102	1	2102		1711	104	1	19	20	33
6	HDTEK44	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	16	2070	20	2070		691	79	1	14	15	83
6	HDTEK44	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	42	1005	1	1005	175	175	105	1	17	18	67
6	HDTEK44	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	43	2988	1	2988	116	116	106	1	17	18	67
6	HDTEK44	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	44	2052	2	2052		673	107	1	14	15	83

(続きあり)

(続き)

表1-③

遺伝子番号	cDNA クローンID	ATCC寄託番号Zおよび日付	ベクター	ヌクレオチド配列番号X	総ヌクレオチド配列	クローン配列の5'ヌクレオチド	クローン配列の3'ヌクレオチド	開始コドンの5'ヌクレオチド	シグナルペプチドの最初のアミノ酸の5'ヌクレオチド	アミノ酸配列番号Y	シグナルペプチドの最初のアミノ酸	シグナルペプチドの最後のアミノ酸	分泌されたタンパク質の最初のアミノ酸	ORFの最後のアミノ酸
7	HOHBP82	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	17	2055	1	2055	369	369	80	1	27	28	39
7	HOHBP82	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	45	617	1	617	396	396	108	1	27	28	63
7	HOHBP82	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	46	558	1	558		63	109	1			9
7	HOHBP82	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	47	1454	411	1454		1040	110	1	12	13	94
8	HWBAD01	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	18	829	1	829	125	125	81	1	21	22	41
8	HWBAD01	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	48	835	1	835		541	111	1	13	14	77
8	HWBAD01	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	49	516	1	516		511	112	1	1	2	87
9	HWABE12	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	19	1056	1	1056	146	146	82	1	34	35	50
9	HWABE12	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	50	534	1	534		532	113	1	1	2	86
9	HWABE12	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	51	503	76	184		502	114	1	1	2	53

(続きあり)

(続き)

表1－④

遺伝子番号	cDNA クローンID	ATCC寄託番号および日付	ベクター	ヌクレオチド配列番号X	総ヌクレオチド配列	クローン配列の5'ヌクレオチド	クローン配列の3'ヌクレオチド	開始コドンの5'ヌクレオチド	シグナルペプチドの最初のアミノ酸の5'ヌクレオチド	アミノ酸配列番号Y	シグナルペプチドの最初のアミノ酸	シグナルペプチドの最後のアミノ酸	分泌されたタンパク質の最初のアミノ酸	ORFの最後のアミノ酸
10	HHEPJ23	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	20	3143	1	3143	175	175	83	1	21	22	62
10	HHEPJ23	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	52	607	1	607	175	175	115	1	21	22	62
11	HWBAR14	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	21	3878	1	3878	152	152	84	1	48	49	371
11	HWBAR14	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	53	432	1	432	287	287	116	1	33	34	48
11	HWBAR14	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	54	794	1	794		204	117	1			12
11	HWBAR14	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	55	1019	1	1019		528	118	1	1	2	129
12	HDPPN86	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	22	6297	1	6297	127	127	85	1	32	33	46
12	HDPPN86	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	56	2042	1	2042	117	117	119	1	26	27	46
13	HDPIW06	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	23	5257	1	5257	147	147	86	1	25	26	53
13	HDPIW06	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	57	584	1	584	174	174	120	1	25	26	53

(続きあり)

(続き)

表1-⑤

遺伝子番号	cDNA クローンID	ATCC寄託番号Zおよび日付	ベクター	ヌクレオチド配列番号X	総ヌクレオチド配列	クローン配列の5'ヌクレオチド	クローン配列の3'ヌクレオチド	開始コドンの5'ヌクレオチド	シグナルペプチドの最初のアミノ酸の5'ヌクレオチド	アミノ酸配列番号Y	シグナルペプチドの最初のアミノ酸	シグナルペプチドの最後のアミノ酸	分泌されたタンパク質の最初のアミノ酸	ORFの最後のアミノ酸
13	HDPIW06	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	58	684	1	684		226	121	1			4
13	HDPIW06	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	59	2070	1	2070		2014	122	1			19
13	HDPIW06	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	60	427	1	427		153	123	1	1	2	51
14	HWBCH13	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	24	464	1	464	82	82	87	1	29	30	73
14	HWBCH13	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	61	341	1	341		193	124	1			5
14	HWBCH13	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	62	804	1	804		535	125	1			10
14	HWBCH13	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	63	1081	1	1081		772	126	1	1	2	57
15	HOHCJ90	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	25	1116	231	1116	307	307	88	1	29	30	80
15	HOHCJ90	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 2.0	64	2211	1	1170		1275	127	1	1	2	164
16	HWBCM79	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	26	1563	1	1563	381	381	89	1	26	27	36

(続きあり)

(続き)

表1-⑥

遺伝子番号	cDNA クローンID	ATCC寄託番号Zおよび日付	ベクター	ヌクレオチド配列番号X	総ヌクレオチド配列	クローン配列の5'ヌクレオチド	クローン配列の3'ヌクレオチド	開始コドンの5'ヌクレオチド	シグナルペプチドの最初のアミノ酸の5'ヌクレオチド	アミノ酸配列番号Y	シグナルペプチドの最初のアミノ酸	シグナルペプチドの最後のアミノ酸	分泌されたタンパク質の最初のアミノ酸	ORFの最後のアミノ酸
17	HWBDM62	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	27	1528	1	1528	101	101	90	1	17	18	40
17	HWBDM62	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	65	1236	1	1236		387	128	1			2
17	HWBDM62	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	66	797	1	797		309	129	1	17	18	22
17	HWBDM62	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	67	534	1	534		179	130	1	1	2	53
18	HWBCV72	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	28	235	1	235	46	46	91	1	23	24	63
18	HWBCV72	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	68	1096	1	1096		169	131	1			7
18	HWBCV72	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	69	1288	153	1288		493	132	1			8
18	HWBCV72	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	70	3319	3125	3305		860	133	1	1	2	352
19	HMTAL77	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	29	569	1	569		218	92	1	14	15	86
19	HMTAL77	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	71	372	41	372		241	134	1			7

(続きあり)

表1-①

遺伝子番号	cDNAクローンID	ATCC寄託番号Zおよび日付	ベクター	ヌクレオチド配列番号X	総ヌクレオチド配列	クローン配列の5'ヌクレオチド	クローン配列の3'ヌクレオチド	開始コドンの5'ヌクレオチド	シグナルペプチドの最初のアミノ酸の5'ヌクレオチド	アミノ酸配列番号Y	シグナルペプチドの最初のアミノ酸	シグナルペプチドの最後のアミノ酸	分泌されたポリペプチドの最初のアミノ酸	ORFの最後のアミノ酸
20	HHEPG23	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	30	2767	1	2767	421	421	93	1			20
20	HHEPG23	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	72	337	23	337	124	124	135	1			20
20	HHEPG23	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	73	1415	1	1415		938	136	1			11
21	HWBAR88	PTA-867 10/26/99	pCMVSport 3.0	31	1051	1	1051	156	156	94	1	18	19	75

(続き)

表１は、上記の各「遺伝子番号」に対応する情報を要約する。「ヌクレオチド配列番号Ｘ（ＮＴ　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）」として同定されるヌクレオチド配列は、表１において同定される「ｃＤＮＡクローンＩＤ」から、およびいくつかの場合において、さらなる関連のＤＮＡクローンから得られる部分的に相同な（「重複する」）配列から構築された。重複する配列は、高い重複性の単一の連続した配列に構築され（通常、各ヌクレオチド部位で３～５個の重複する配列）、配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）として同定される最終的な配列を得た。

【０１１２】

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

【０１１３】

「総ヌクレオチド配列（Ｔｏｔａｌ　ＮＴ　Ｓｅｑ）」は、「遺伝子番号（ＧｅｎｅＮｏ）」によって同定されるコンティグにおけるヌクレオチドの総数をいう。寄託された

クローンは、これらの配列の全てまたは大半を含み得、これらは、配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）の「クローン配列の５’ヌクレオチド」および「クローン配列の３’ヌクレオチド」として示されるヌクレオチドの位置によって反映される。推定開始コドン（メチオニン）の配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）のヌクレオチドの位置は、「開始コドンの５’ヌクレオチド」として同定される。同様に、推定シグナル配列の配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）のヌクレオチドの位置は、「シグナルペプチドの最初のアミノ酸の５’ヌクレオチド」として同定される。

【０１１４】

翻訳されたアミノ酸配列は、メチオニンで始まり、「アミノ酸配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）」として同定されるが、他のリーディングフレームもまた、公知の分子生物学技術を使用して容易に翻訳され得る。これらの代替のオープンリーディングフレームによって生成されるポリペプチドは、本発明によって特に意図される。

【０１１５】

推定シグナルペプチドの配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）の最初および最後のアミノ酸の位置は、「シグナルペプチドの最初のアミノ酸」および「シグナルペプチドの最後のアミノ酸」として同定される。分泌部分の配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）の推定される最初のアミノ酸の位置は、「分泌部分の推定される最初のアミノ酸」として同定される。最後に、オープンリーディングフレームにおける最後のアミノ酸の配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）のアミノ酸の位置は、「ＯＲＦの最後のアミノ酸」として同定される。

【０１１６】

配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）（ここでＸは、配列表に開示される任意のポリヌクレオチド配列であり得る）および翻訳された配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）（ここでＹは、配列表に開示される任意のポリペプチド配列であり得る）は、十分に正確であり、そしてそうでなければ、当該分野において周知の種々の用途および以下でさらに記載される種々の用途に適切である。例えば、配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）は、配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）において含まれる核酸配列または寄託されたクローンに含まれるｃＤＮＡを検出する核酸ハイブリダイゼーションプローブを設計するために有用である。これらのプローブはまた、生物学的サンプル中の核酸分子にハイブリダイズし、それによって本発明の種々の法医学的方法、および診断方法を可能にする。同様に、配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）から同定されるポリペプチドは、例えば、表１において同定されるｃＤＮＡクローンによってコードされるタンパク質（ポリペプチドおよび分泌タンパク質を含む）に特異的に結合する抗体を作製するために使用され得る。

【０１１７】

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

【０１１８】

従って、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列における正確さを必要とするこれらの適用のために、本発明は、配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）として同定される作製されたヌクレオチド配列、および配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）として同定される推定の翻訳されたアミノ酸配列のみならず、表１において記載されるような、ＡＴＣＣに寄託された本発明のヒトｃＤＮＡを含むプラスミドＤＮＡのサンプルもまた提供する。各々の寄託されたクローンのヌクレオチド配列は、公知の方法に従って、寄託されたクローンを配列決定することによって容易に決定され得る。次いで、推定アミノ酸配列は、この

ような寄託物から証明され得る。さらに、特定のクローンによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列はまた、ペプチド配列決定によって、または寄託されたヒトｃＤＮＡを含む適切な宿主細胞中でタンパク質を発現させ、このタンパク質を収集し、そしてその配列を決定することによって、直接的に決定され得る。

【０１１９】

本発明はまた、配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）、配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）、または寄託されたクローンに対応する遺伝子に関する。対応する遺伝子は、本明細書中に開示される配列情報を使用して、公知の方法に従って単離され得る。このような方法は、開示された配列からプローブまたはプライマーを調製する工程、およびゲノム物質の適切な供給源から対応する遺伝子を同定または増幅する工程を包含する。

【０１２０】

本発明においてまた提供されるものは、対立遺伝子改変体、オーソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）、および／または種ホモログである。当該分野において公知の手順を使用し、本明細書中に開示される配列またはＡＴＣＣに寄託されたクローンからの情報を用いて、配列番号Ｘ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘ）、配列番号Ｙ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）または寄託されたクローンに対応する遺伝子の全長遺伝子、対立遺伝子改変体、スプライシング改変体、全長のコード部分、オーソログ、および／または種ホモログを獲得し得る。例えば、対立遺伝子改変体および／または種ホモログは、本明細書中に提供される配列から適切なプローブまたはプライマーを作製し、そして対立遺伝子改変体および／または所望のホモログについて適切な核酸供給源をスクリーニングすることによって単離および同定され得る。

【０１２１】

表２は、本発明の特定の実施形態に含まれる好ましいエピトープ、および本発明の特定の実施形態に従って放棄され得るポリペプチド配列を示す。第１列は、上記表１に記載される各「遺伝子番号」をいう。第２列は、表１に開示されるポリヌクレオチド配列に関する配列識別子「ヌクレオチド配列番号Ｘ」を示す。３列目は、表１に開示されるポリヌクレオチド配列に関する配列識別子「ＡＡ配列番号Ｙ」を示す。第４列目は、配列番号Ｘの１と最終ヌクレオチドマイナス１５との間の任意の整数である、固有の整数「ｎｔＡ」を示す。そして第５列は、固有の整数「ｎｔＢ」を示すが、この「ｎｔＢ」は、配列番号Ｘの１５と最終ヌクレオチドとの間の任意の整数である。ここでｎｔＡもｎｔＢも両方とも、配列番号Ｘに示されるヌクレオチド残基の位置に相当し、そしてｎｔＢは＋１４以上である。配列番号Ｘとして示される各ポリヌクレオチドについて、固有に規定された整数は、一般式ａ－ｂに置きかえられ得、そしてこれを用いて、好ましくは本発明から除外され得るポリヌクレオチドを記載し得る。第６列は、各々の好ましいＯＲＦによりコードされるポリペプチド（配列番号Ｙ）中に含まれる好ましいエピトープを含む残基を列挙する。可能性のある免疫原性領域の同定は、ＪａｍｅｓｏｎおよびＷｏｌｆ（（１９８８）ＣＡＢＩＯＳ，４；１８１～１８６）の方法に従って実施された；詳細には、このアルゴリズムのＧｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ）実施（プログラムＰＥＰＴＩＤＥＳＴＲＵＣＴＵＲＥ（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ　ｖ１０．０，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ），Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃ）に統合された）。この方法は、所定の残基がタンパク質の表面上で見出される確率の値を戻す。抗原性係数スコアが少なくとも６アミノ酸を超える領域が、表２に「好ましいエピトープ」として示される。本発明のポリペプチドは、表２に記載される残基を含む抗原性エピトープの１、２、３、４、５または５以上を有し得る。用いられる分析基準に依存して抗原性決定基を推測すること、抗原決定基の正確な位置がわずかに変化し得ることが理解される。

【０１２２】

表３は、表１に開示されるクローンに対応するポリヌクレオチドの発現プロフィールをまとめる。１列目は、表１に開示される各コンティグ配列に関するｃＤＮＡクローンについての、特定のクローン識別子「クローン番号（Ｃｌｏｎｅ　ＩＤ）」を提供する。２列

目の「ライブラリーコード」は、本発明のポリヌクレオチドを発現する組織および/または細胞株のライブラリーの発現プロフィールを示す。第２列の各ライブラリーのコードは、表５に提供されるライブラリーコードおよびライブラリーの詳細（Ｌｉｂｒａｒｙ ｄｅｓｃｒｉｐｔｉｏｎ）に対応する組織／細胞供給源の識別子コードを示す。これらのポリヌクレオチドの発現は、試験した他の組織および／または細胞ライブラリーにおいては観察されなかった。当業者は、慣用的に、この情報を用いて、本発明の対応するポリヌクレオチドの優勢な発現パターンを示す組織を同定するか、または優勢なおよび／または特異的な組織発現を示すポリヌクレオチドを同定し得る。

【０１２３】

表４の第１列は、ヌクレオチド配列識別子「配列番号Ｘ」を提供する。この「配列番号Ｘ」は、表１の５列目に開示されたヌクレオチド配列番号Ｘに適合する。表４の２列目は、配列番号Ｘに対応するポリヌクレオチドの染色体配置である「細胞学的バンドすなわち染色体（Ｃｙｔｏｌｏｇｉｃ Ｂａｎｄ ｏｒ Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ）」を提供する。染色体配置は、ＮＣＢＩ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）ＵｎｉＧｅｎｅ ｄａｔａｂａｓｅに含まれるＥＳＴおよびｃＤＮＡに対する正確な適合（マッチ）を見出すことにより決定された。推定染色体配置を考慮して、Ｏｎｌｉｎｅ Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ（Ｏｎｌｉｎｅ Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ, ＯＭＩＭ™. ＭｃＫｕｓｉｃｋ－Ｎａｔｈａｎｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ, Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ, ＭＤ）およびＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ, Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ, ＭＤ）２０００）由来のＭｏｒｂｉｄ Ｍａｐとの比較によって疾患関連遺伝子座を、決定した。Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂ ＵＲＬ：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｏｍｉｍ／）。Ｑｕｅｒｙの推定染色体配置が、Ｍｏｒｂｉｄ Ｍａｐエントリーの染色体配列番号位置と重複した場合、ｍｏｒｂｉｄ ｍａｐエントリーのＯＭＩＭ参照同定数（ＯＭＩＭ ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｎｕｍｂｅｒｓ）を「ＯＭＩＭ ＩＤ」と表示して、表４の３列目に示した。ＯＭＩＭ参照同定数に対する手がかり（ｋｅｙ）を表６に示した。

【０１２４】

表５は、表３に開示されたライブラリーコードに対する手がかりを提供する。１列目は、表３の２列目に開示されたライブラリーコードを提供する。２列目は、対応するライブラリーが誘導された組織または細胞の供給源の詳細を提供する。疾患組織に対応するライブラリーコードは、「疾患」の用語を使って第３列目に示される。

【０１２５】

表６は、表４の３列目に開示されたＯＭＩＭ参照同定数に対する手がかりを提供する。ＯＭＩＭ参照同定数（１列目）は、Ｏｎｌｉｎｅ Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ（Ｏｎｌｉｎｅ Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ, ＯＭＩＭ™. ＭｃＫｕｓｉｃｋ－Ｎａｔｈａｎｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ, Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ, ＭＤ）およびＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ, Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ, ＭＤ）２０００）Ｗｏｒｌｄ Ｗｉｄｅ Ｗｅｂ ＵＲＬ：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｏｍｉｍ／）から導かれた。２列目は、Ｍｏｒｂｉｄ Ｍａｐデータベースを用いて決定されたような、表４の２列目に開示された細胞質バンドと関連した疾患を提供する。

【０１２６】

【表２】

表２

表２－①

遺伝子番号	ヌクレオチド配列番号X	アミノ酸配列番号Y	nt A ヌクレオチド A	nt B ヌクレオチド B	好ましいエピトープ
1	11	74	1 - 2392	15 - 2406	Lys-61～Arg-72 Arg-95～Tyr-100 Ala-121～Ile-126 Asn-163～Gly-172 Lys-183～Asn-189 Ser-211～His-218 Leu-251～Val-269.
1	32	95	1 - 1661	15 - 1675	Ser-16～Lys-23.
1	33	96	1 - 772	15 - 786	Lys-61～Arg-72.
2	12	75	1 - 3355	15 - 3369	Glu-23～Gln-30 Asn-42～Gly-65 Thr-84～Lys-100 Glu-105～Ser-110 Arg-132～Phe-138 Pro-159～Arg-172.
2	34	97	1 - 1049	15 - 1063	
2	35	98	1 - 1164	15 - 1178	Cys-25～Asn-36.
3	13	76	1 - 3244	15 - 3258	
3	36	99	1 - 776	15 - 790	
3	37	100	1 - 1189	15 - 1203	
3	38	101	1 - 790	15 - 804	
4	14	77	1 - 3063	15 - 3077	Gln-200～Lys-208 Asn-273～Glu-283 Trp-319～Thr-325 Ala-340～Pro-359 Gln-365～Pro-370 Pro-395～Ser-400 Asn-541～Thr-546 Glu-563～Ala-571 Pro-574～Ala-583 Glu-590～Asp-599 Arg-604～Glu-612.
4	39	102	1 - 1588	15 - 1602	Gln-200～Lys-208 Asn-273～Glu-283 Trp-319～Thr-325 Ala-340～Pro-357.
4	40	103	1 - 1775	15 - 1789	
5	15	78	1 - 1068	15 - 1082	Leu-56～Tyr-62 Glu-73～Asn-81.
5	41	104	1 - 2088	15 - 2102	
6	16	79	1 - 2056	15 - 2070	Arg-45～Ser-54 Ser-78～Ser-83.
6	42	105	1 - 991	15 - 1005	Leu-36～Gly-41 Lys-51～Arg-56 Arg-58～Gly-66.

(続きあり)

(続き)

表2-②

6	43	106	1 - 2974	15 - 2988	Leu-36～Gly-41 Lys-51～Arg-56 Arg-58～Gly-66.
6	44	107	1 - 2038	15 - 2052	Arg-45～Ser-54 Ser-78～Ser-83.
7	17	80	1 - 2041	15 - 2055	Pro-20～Gln-28.
7	45	108	1 - 603	15 - 617	
7	46	109	1 - 544	15 - 558	
7	47	110	1 - 1440	15 - 1454	Ala-45～Arg-50.
8	18	81	1 - 815	15 - 829	
8	48	111	1 - 821	15 - 835	Pro-59～Arg-67.
8	49	112	1 - 502	15 - 516	
9	19	82	1 - 1042	15 - 1056	
9	50	113	1 - 520	15 - 534	
9	51	114	1 - 489	15 - 503	
10	20	83	1 - 3129	15 - 3143	
10	52	115	1 - 593	15 - 607	
11	21	84	1 - 418	15 - 432	
11	53	116	1 - 780	15 - 794	Leu-2～Leu-10.
11	54	117	1 - 1005	15 - 1019	Phe-13～Ser-19 Ser-96～Pro-104.
12	22	85	1 - 6283	15 - 6297	
12	55	118	1 - 2028	15 - 2042	
13	23	86	1 - 5243	15 - 5257	Gln-30～His-36.
13	56	119	1 - 570	15 - 584	Gln-30～His-36.
13	57	120	1 - 670	15 - 684	
13	58	121	1 - 2056	15 - 2070	
13	59	122	1 - 413	15 - 427	Leu-24～Arg-30 Lys-42～Ala-50.
14	24	87	1 - 450	15 - 464	
14	60	123	1 - 327	15 - 341	
14	61	124	1 - 790	15 - 804	
14	62	125	1 - 1067	15 - 1081	Pro-34～Gly-41.
15	25	88	1 - 1102	15 - 1116	Pro-10～Arg-16.
15	63	126	1 - 2197	15 - 2211	
16	26	89	1 - 1549	15 - 1563	
17	27	90	1 - 1514	15 - 1528	
17	64	127	1 - 1222	15 - 1236	
17	65	128	1 - 783	15 - 797	
17	66	129	1 - 520	15 - 534	Arg-21～Arg-34.
18	28	91	1 - 221	15 - 235	Glu-34～Lys-40.
18	67	130	1 - 1082	15 - 1096	
18	68	131	1 - 1274	15 - 1288	
18	69	132	1 - 3305	15 - 3319	Ser-108～Gly-131 Ala-138～Tyr-145 Lys-160～Gly-165 Ile-193～Cys-200 Pro-209～Arg-215 Thr-220～Leu-229 Ile-233～Ile-253 Leu-257～Lys-263

(続きあり)

(続き)

表2-③

					Pro-273～Pro-285 Gly-345～Phe-352.
19	29	92	1 - 555	15 - 569	
19	70	133	1 - 358	15 - 372	
20	30	93	1 - 2753	15 - 2767	
20	71	134	1 - 323	15 - 337	
20	72	135	1 - 1401	15 - 1415	
21	31	94	1 - 1037	15 - 1051	

【０１２７】
【表３】

表3

表3-①

クローンID	ライブラリーコード
HDPPA04	H0004 H0494 H0521 H0522 H0591 H0641 L1290 S0452 T0049
HOHBY44	H0013 H0014 H0031 H0171 H0327 H0489 H0544 H0545 H0551 H0597 H0622 H0628 H0661 H0665 H0667 H0668 L1290 S0002 S0003 S0026 S0053 S0126 S0192 S0212 S0222 S0250 S0276 S0336 S0350 S0360 S0376 S0380 S0420 S0426 T0039 T0040
HOHBL42	H0031 H0036 H0251 H0264 H0306 H0309 H0361 H0402 H0427 H0445 H0486 H0506 H0518 H0521 H0581 H0586 H0587 H0591 H0592 H0644 H0656 H0657 H0677 H0690 L1290 S0116 S0152 S0250 S0358 S0374 S0408
HRABV43	H0012 H0014 H0026 H0032 H0036 H0038 H0050 H0052 H0057 H0059 H0085 H0135 H0150 H0156 H0178 H0213 H0224 H0231 H0251 H0255 H0261 H0264 H0318 H0331 H0341 H0343 H0370 H0424 H0486 H0492 H0494 H0518 H0519 H0521 H0549 H0550 H0551 H0553 H0555 H0587 H0592 H0594 H0599 H0604 H0607 H0619 H0620 H0622 H0624 H0650 H0656 H0658 H0662 H0672 H0673 H0677 H0687 L1290 S0002 S0007 S0011 S0027 S0037 S0049 S0150 S0196 S0212 S0222 S0268 S0276 S0278 S0358 S0374 S0378 S0390 S0426 S3014 T0042
HDPRH52	H0252 H0328 H0433 H0521 H0645 L1290 S0037 S0152 S0208 S0342
HDTEK44	H0485 H0486 H0586 H0592 H0683 H0687 L1290
HOHBP82	S0250
HWBAD01	H0551 H0580
HWABE12	H0327 H0412 H0435 H0445 H0488 H0510 H0521 H0539 H0581 H0638 H0657 L1290 S0007 S0010 S0046 S0116 S0144 S0330 S0358 S0376 S0424 S6014 T0002
HHEPJ23	H0009 H0012 H0014 H0024 H0040 H0041 H0052 H0083 H0087 H0100 H0123 H0125 H0131 H0135 H0136 H0156 H0215 H0252 H0256 H0257 H0261 H0264 H0265 H0266 H0284 H0290 H0295 H0316 H0318 H0328 H0402 H0412 H0415 H0424 H0445 H0484 H0486 H0494 H0520 H0529 H0530 H0542 H0543 H0545 H0547 H0550 H0553 H0555 H0556 H0559 H0560 H0580 H0581 H0586 H0592 H0593 H0618 H0620 H0650 H0652 H0656 H0660 H0665 H0686 H0689 H0698 H0706 L1290 S0049 S0051 S0110 S0144 S0150 S0182 S0210 S0222 S0278 S0358 S0360 S0376 S0420
HWBAR14	H0012 H0265 H0560 H0561 H0580 H0593 H0665 H0687 H0693 H0694 L1290 S0053 S6028 T0006
HDPPN86	H0013 H0056 H0090 H0341 H0423 H0494 H0521 H0522 H0542 H0543 H0546 H0547 H0553 H0575 H0580 L1290 S0038 S0418 S6028 T0002 T0010
HDPIW06	H0008 H0013 H0032 H0039 H0051 H0052 H0165 H0169 H0274 H0373 H0427 H0431 H0445 H0509 H0520 H0521 H0547 H0553 H0575 H0587 H0590 H0624 H0631 H0638 H0647 H0649 H0652 H0658 H0688 H0696 L0022 L1290 S0007 S0015 S0026 S0028 S0031 S0036 S0038 S0040 S0212 S0222 S0242 S0276 S0328 S0354 S0364 S0412 S0438 S0448 S6024 S6028 T0060
HWBCH13	H0486 H0521 S0002
HOHCJ90	H0163 H0251 H0252 H0286 H0292 H0333 H0505 H0521 H0529 H0550 H0551 H0555 H0619 H0620 H0622 H0633 H0658 L0022 S0026 S0027 S0032 S0037 S0040 S0044 S0126 S0206 S0250 S0260 S0282 S0354 S0360 S3012 S3014
HWBCM79	H0264 H0580
HWBDM62	H0156 H0341 H0560 H0580 L0022

(続きあり)

(続き)

表3-②

HWBCV72	H0038 H0069 H0083 H0123 H0124 H0125 H0253 H0266 H0284 H0295 H0318 H0402 H0423 H0436 H0445 H0457 H0519 H0521 H0539 H0543 H0546 H0549 H0550 H0551 H0556 H0559 H0580 H0581 H0595 H0599 H0616 H0618 H0623 H0658 H0662 H0687 L0022 S0002 S0007 S0037 S0038 S0040 S0046 S0051 S0150 S0194 S0206 S0276 S0282 S0356 S0358 T0040 T0041
HMTAL77	H0030 H0036 H0050 H0090 H0123 H0124 H0150 H0171 H0333 H0341 H0343 H0351 H0352 H0370 H0412 H0427 H0435 H0436 H0486 H0487 H0518 H0520 H0521 H0522 H0539 H0543 H0547 H0556 H0581 H0591 H0594 H0597 H0599 H0618 H0620 H0628 H0633 H0637 H0641 H0644 H0658 H0659 H0670 L0022 S0007 S0027 S0045 S0051 S0116 S0134 S0150 S0212 S0222 S0330 S0360 S0366 S0418 S0420 S0428 S3014 T0010 T0042 T0109
HHEPG23	H0009 H0013 H0056 H0090 H0341 H0423 H0494 H0521 H0522 H0542 H0543 H0546 H0547 H0553 H0555 H0575 H0580 L0022 S0038 S0116 S0418 S6028 T0002 T0010
HWBAR88	H0144 H0272 H0412 H0580 H0650 S0011 S0428

【０１２８】

【表４】

表4

配列番号: X	細胞質バンドすなわち染色体:	OMIM参照:
14	11q13	102200 106100 131100 133780 147050 153700 161015 164009 168461 180721 180840 191181 193235 209901 232600 259700 259770 600045 600319 600528 601884

【０１２９】

【表５】

表５ 表5-①

ライブラリーコード	ライブラリーの説明(詳細)	疾患
H0004	Human Adult Spleen	
H0008	Whole 6 Week Old Embryo	
H0009	Human Fetal Brain	
H0012	Human Fetal Kidney	
H0013	Human 8 Week Whole Embryo	
H0014	Human Gall Bladder	
H0024	Human Fetal Lung III	
H0026	Namalwa Cells	
H0030	Human Placenta	
H0031	Human Placenta	
H0032	Human Prostate	
H0036	Human Adult Small Intestine	
H0038	Human Testes	
H0039	Human Pancreas Tumor	疾患
H0040	Human Testes Tumor	疾患
H0041	Human Fetal Bone	
H0050	Human Fetal Heart	
H0051	Human Hippocampus	
H0052	Human Cerebellum	
H0056	Human Umbilical Vein, Endo. remake	
H0057	Human Fetal Spleen	
H0059	Human Uterine Cancer	疾患
H0069	Human Activated T-Cells	
H0083	HUMAN JURKAT MEMBRANE BOUND POLYSOMES	
H0085	Human Colon	
H0087	Human Thymus	
H0090	Human T-Cell Lymphoma	疾患
H0100	Human Whole Six Week Old Embryo	
H0123	Human Fetal Dura Mater	
H0124	Human Rhabdomyosarcoma	疾患
H0125	Cem cells cyclohexamide treated	
H0131	LNCAP + 0.3nM R1881	
H0135	Human Synovial Sarcoma	
H0136	Supt Cells, cyclohexamide treated	
H0144	Nine Week Old Early Stage Human	
H0150	Human Epididymus	
H0156	Human Adrenal Gland Tumor	疾患
H0163	Human Synovium	
H0165	Human Prostate Cancer, Stage B2	疾患
H0169	Human Prostate Cancer, Stage C fraction	疾患
H0171	12 Week Old Early Stage Human, II	
H0178	Human Fetal Brain	
H0213	Human Pituitary, subtracted	
H0215	Raji cells, cyclohexamide treated, differentially expressed	
H0224	Activated T-Cells, 12 hrs, subtracted	
H0231	Human Colon, subtraction	
H0251	Human Chondrosarcoma	疾患
H0252	Human Osteosarcoma	疾患

(続きあり)

(続き)

表5-③

H0253	Human adult testis, large inserts	
H0255	breast lymph node CDNA library	
H0256	HL-60, unstimulated	
H0257	HL-60, PMA 4H	
H0261	H. cerebellum, Enzyme subtracted	
H0264	human tonsils	
H0265	Activated T-Cell (12hs)/Thiouridine labelledEco	
H0266	Human Microvascular Endothelial Cells, fract. A	
H0272	HUMAN TONSILS, FRACTION 2	
H0274	Human Adult Spleen, fractionII	
H0284	Human OB MG63 control fraction I	
H0286	Human OB MG63 treated (10 nM E2) fraction I	
H0290	Human OB HOS treated (1 nM E2) fraction I	
H0292	Human OB HOS treated (10 nM E2) fraction I	
H0295	Amniotic Cells - Primary Culture	
H0306	CD34 depleted Buffy Coat (Cord Blood)	
H0309	Human Chronic Synovitis	疾患
H0316	HUMAN STOMACH	
H0318	HUMAN B CELL LYMPHOMA	疾患
H0327	human corpus colosum	
H0328	human ovarian cancer	疾患
H0331	Hepatocellular Tumor	疾患
H0333	Hemangiopericytoma	疾患
H0341	Bone Marrow Cell Line (RS4,11)	
H0343	stomach cancer (human)	疾患
H0351	Glioblastoma	疾患
H0352	wilm's tumor	疾患
H0361	Human rejected kidney	疾患
H0370	H. Lymph node breast Cancer	疾患
H0373	Human Heart	
H0402	CD34 depleted Buffy Coat (Cord Blood), re-excision	
H0412	Human umbilical vein endothelial cells, IL-4 induced	
H0415	H. Ovarian Tumor, II, OV5232	疾患
H0423	T-Cell PHA 24 hrs	
H0424	Human Pituitary, subt IX	
H0427	Human Adipose	
H0431	H. Kidney Medulla, re-excision	
H0433	Human Umbilical Vein Endothelial cells, frac B, re-excision	
H0435	Ovarian Tumor 10-3-95	
H0436	Resting T-Cell Library,II	
H0445	Spleen, Chronic lymphocytic leukemia	疾患
H0457	Human Eosinophils	
H0484	Breast Cancer Cell line, angiogenic	
H0485	Hodgkin's Lymphoma I	疾患
H0486	Hodgkin's Lymphoma II	疾患
H0487	Human Tonsils, lib I	
H0488	Human Tonsils, Lib 2	
H0489	Crohn's Disease	疾患
H0492	HL-60, RA 4h, Subtracted	
H0494	Keratinocyte	
H0505	Human Astrocyte	
H0506	Ulcerative Colitis	

(続きあり)

(続き)

表5-③

H0509	Liver, Hepatoma	疾患
H0510	Human Liver, normal	
H0518	pBMC stimulated w/ poly I/C	
H0519	NTERA2, control	
H0520	NTERA2 + retinoic acid, 14 days	
H0521	Primary Dendritic Cells, lib 1	
H0522	Primary Dendritic cells,frac 2	
H0529	Myeloid Progenitor Cell Line	
H0530	Human Dermal Endothelial Cells,untreated	
H0539	Pancreas Islet Cell Tumor	疾患
H0542	T Cell helper I	
H0543	T cell helper II	
H0544	Human endometrial stromal cells	
H0545	Human endometrial stromal cells-treated with progesterone	
H0546	Human endometrial stromal cells-treated with estradiol	
H0547	NTERA2 teratocarcinoma cell line+retinoic acid (14 days)	
H0549	H. Epididiymus, caput & corpus	
H0550	H. Epididiymus, cauda	
H0551	Human Thymus Stromal Cells	
H0553	Human Placenta	
H0555	Rejected Kidney, lib 4	疾患
H0556	Activated T-cell(12h)/Thiouridine-re-excision	
H0559	HL-60, PMA 4H, re-excision	
H0560	KMH2	
H0561	L428	
H0575	Human Adult Pulmonary,re-excision	
H0580	Dendritic cells, pooled	
H0581	Human Bone Marrow, treated	
H0586	Healing groin wound, 6.5 hours post incision	疾患
H0587	Healing groin wound, 7.5 hours post incision	疾患
H0590	Human adult small intestine,re-excision	
H0591	Human T-cell lymphoma,re-excision	疾患
H0592	Healing groin wound - zero hr post-incision (control)	疾患
H0593	Olfactory epithelium,nasalcavity	
H0594	Human Lung Cancer,re-excision	疾患
H0595	Stomach cancer (human),re-excision	疾患
H0597	Human Colon, re-excision	
H0599	Human Adult Heart,re-excision	
H0604	Human Pituitary, re-excision	
H0607	H.Leukocytes, normalized cot 50A3	
H0616	Human Testes, Reexcision	
H0618	Human Adult Testes, Large Inserts, Reexcision	
H0619	Fetal Heart	
H0620	Human Fetal Kidney, Reexcision	
H0622	Human Pancreas Tumor, Reexcision	疾患
H0623	Human Umbilical Vein, Reexcision	
H0624	12 Week Early Stage Human II, Reexcision	
H0628	Human Pre-Differentiated Adipocytes	
H0631	Saos2, Dexamethosome Treated	
H0633	Lung Carcinoma A549 TNFalpha activated	疾患
H0637	Dendritic Cells From CD34 Cells	
H0638	CD40 activated monocyte dendridic cells	

(続きあり)

(続き)

表1-④

H0641	LPS activated derived dendritic cells	
H0644	Human Placenta (re-excision)	
H0645	Fetal Heart, re-excision	
H0647	Lung, Cancer (4005163 B7): Invasive, Poorly Diff. Adenocarcinoma, Metastatic	疾患
H0649	Lung, Normal: (4005313 B1)	
H0650	B-Cells	
H0652	Lung, Normal: (4005313 B1)	
H0656	B-cells (unstimulated)	
H0657	B-cells (stimulated)	
H0658	Ovary, Cancer (9809C332): Poorly differentiated adenocarcinoma	疾患
H0659	Ovary, Cancer (15395A1F): Grade II Papillary Carcinoma	疾患
H0660	Ovary, Cancer: (15799A1F) Poorly differentiated carcinoma	疾患
H0661	Breast, Cancer: (4004943 A5)	疾患
H0662	Breast, Normal: (4005522B2)	
H0665	Stromal cells 3.88	
H0667	Stromal cells(HBM3.18)	
H0668	stromal cell clone 2.5	
H0670	Ovary, Cancer(4004650 A3): Well-Differentiated Micropapillary Serous Carcinoma	
H0672	Ovary, Cancer: (4004576 A8)	
H0673	Human Prostate Cancer, Stage B2, re-excision	
H0677	TNFR degenerate oligo	
H0683	Ovarian cancer, Serous Papillary Adenocarcinoma	
H0686	Adenocarcinoma of Ovary, Human Cell Line	
H0687	Human normal ovary(#9610G215)	
H0688	Human Ovarian Cancer(#9807G017)	
H0689	Ovarian Cancer	
H0690	Ovarian Cancer, # 9702G001	
H0693	Normal Prostate #ODQ3958EN	
H0694	Prostate cancer (adenocarcinoma)	
H0696	Prostate Adenocarcinoma	
H0698	NK CellsYao20 IL2 treated for 48 hrs	
H0706	Human Adult Skeletal Muscle	
L0022	Stratagene schizo brain S11	
L1290	Human heart cDNA (YNakamura)	
S0002	Monocyte activated	
S0003	Human Osteoclastoma	疾患
S0007	Early Stage Human Brain	
S0010	Human Amygdala	
S0011	STROMAL -OSTEOCLASTOMA	疾患
S0015	Kidney medulla	
S0026	Stromal cell TF274	
S0027	Smooth muscle, serum treated	
S0028	Smooth muscle,control	
S0031	Spinal cord	
S0032	Smooth muscle-ILb induced	
S0036	Human Substantia Nigra	
S0037	Smooth muscle, IL1b induced	
S0038	Human Whole Brain #2 - Oligo dT > 1.5Kb	
S0040	Adipocytes	
S0044	Prostate BPH	疾患

(続きあり)

(続き)

表5-⑤

S0045	Endothelial cells-control	
S0046	Endothelial-induced	
S0049	Human Brain, Striatum	
S0051	Human Hypothalmus,Schizophrenia	疾患
S0053	Neutrophils IL-1 and LPS induced	
S0110	Brain Amygdala Depression	疾患
S0116	Bone marrow	
S0126	Osteoblasts	
S0134	Apoptotic T-cell	
S0144	Macrophage (GM-CSF treated)	
S0150	LNCAP prostate cell line	
S0152	PC3 Prostate cell line	
S0182	Human B Cell 8866	
S0192	Synovial Fibroblasts (control)	
S0194	Synovial hypoxia	
S0196	Synovial IL-1/TNF stimulated	
S0206	Smooth Muscle- HASTE normalized	
S0208	Messangial cell, frac 1	
S0210	Messangial cell, frac 2	
S0212	Bone Marrow Stromal Cell, untreated	
S0222	H. Frontal cortex,epileptic,re-excision	疾患
S0242	Synovial Fibroblasts (Il1/TNF), subt	
S0250	Human Osteoblasts II	疾患
S0260	Spinal Cord, re-excision	
S0268	PRMIX	
S0276	Synovial hypoxia-RSF subtracted	
S0278	H Macrophage (GM-CSF treated), re-excision	
S0282	Brain Frontal Cortex, re-excision	
S0328	Palate carcinoma	疾患
S0330	Palate normal	
S0336	Human Normal Cartilage Fraction IV	
S0342	Adipocytes,re-excision	
S0350	Pharynx Carcinoma	疾患
S0354	Colon Normal II	
S0356	Colon Carcinoma	疾患
S0358	Colon Normal III	
S0360	Colon Tumor II	疾患
S0364	Human Quadriceps	
S0366	Human Soleus	
S0374	Normal colon	
S0376	Colon Tumor	疾患
S0378	Pancreas normal PCA4 No	
S0380	Pancreas Tumor PCA4 Tu	疾患
S0390	Smooth muscle, control, re-excision	
S0408	Colon, normal	
S0412	Temporal cortex-Alzheizmer, subtracted	疾患
S0418	CHME Cell Line,treated 5 hrs	
S0420	CHME Cell Line,untreated	
S0424	TF-1 Cell Line GM-CSF Treated	
S0426	Monocyte activated, re-excision	
S0428	Neutrophils control, re-excision	
S0438	Liver Normal Met5No	

(続きあり)

(続き)

表5-⑥

S0448	Larynx Normal	
S0452	Thymus	
S3012	Smooth Muscle Serum Treated, Norm	
S3014	Smooth muscle, serum induced,re-exc	
S6014	H. hypothalamus, frac A	
S6024	Alzheimers, spongy change	疾患
S6028	Human Manic Depression Tissue	疾患
T0002	Activated T-cells	
T0006	Human Pineal Gland	
T0010	Human Infant Brain	
T0039	HSA 172 Cells	
T0040	HSC172 cells	
T0041	Jurkat T-cell G1 phase	
T0042	Jurkat T-Cell, S phase	
T0049	Aorta endothelial cells + TNF-a	
T0060	Human White Adipose	
T0109	Human (HCC) cell line liver (mouse) metastasis, remake	

【０１３０】
【表６】

表6

OMIM ID	OMIM 詳細(説明)
102200	Somatotrophinoma (2)
106100	Angioedema, hereditary (3)
131100	Carcinoid tumor of lung (3) Multiple endocrine neoplasia I (3) Prolactinoma, hyperparathyroidism, carcinoid syndrome (2)
133780	Vitreoretinopathy, exudative, familial (2)
147050	Atopy (2)
153700	Macular dystrophy, vitelliform type (3)
161015	Mitochondrial complex I deficiency, 252010 (1) (?)
164009	Leukemia, acute promyelocytic, NUMA/RARA type (3)
168461	Centrocytic lymphoma (2) Multiple myeloma, 254250 (2) Parathyroid adenomatosis 1 (2)
180721	Retinitis pigmentosa, digenic (3)
180840	Susceptibility to IDDM (1) (?)
191181	Cervical carcinoma (2)
193235	Vitreoretinopathy, neovascular inflammatory (2)
209901	Bardet-Biedl syndrome 1 (2)
232600	McArdle disease (3)
259700	Osteopetrosis, recessive (2)
259770	Osteoporosis-pseudoglioma syndrome (2)
600045	Xeroderma pigmentosum, group E, subtype 2 (1)
600319	Diabetes mellitus, insulin-dependent, 4 (2)
600528	CPT deficiency, hepatic, type I, 255120 (1)
601884	[High bone mass] (2)

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

【０１３１】

ポリペプチドは、分泌タンパク質の形態（成熟形態を含む）であり得るか、またはより大きいタンパク質（例えば、融合タンパク質）の部分であり得る（以下を参照のこと）。分泌配列もしくはリーダー配列、プロ配列、精製を補助する配列（例えば、複数のヒスチジン残基）、または組換え生成の間の安定性のためのさらなる配列を含むさらなるアミノ酸配列を含むことは、しばしば有利である。

【０１３２】

本発明のポリペプチドは、好ましくは、単離された形態で提供され、そして好ましくは実質的に精製される。ポリペプチド（分泌ポリペプチドを含む）の組換え的に生成されたバージョン（ｖｅｒｓｉｏｎ）は、本明細書中に記載される技術または当該分野で公知のそれ以外の技術（例えば、ＳｍｉｔｈおよびＪｏｈｎｓｏｎ、Ｇｅｎｅ　６７：３１－４０（１９８８）に記載される１工程の方法によるような）を使用して実質的に精製され得る。本発明のポリペプチドはまた、例えば、分泌タンパク質に対して惹起される本発明の抗体のように、本明細書中に記載される技術または当該分野において公知のそれ以外の技術を使用して、天然供給源、合成供給源または組換え供給源から精製され得る。

【０１３３】

本発明は、配列番号Ｘの核酸配列、および／またはＡＴＣＣ寄託物Ｚ中に含まれるｃＤＮＡを含むか、あるいはそれらからなるポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、配列番号Ｙのポリペプチド配列および／またはＡＴＣＣ寄託物Ｚ中に含まれるｃＤＮＡによりコードされるポリペプチドを含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドを提供する。配列番号Ｙのポリペプチド配列および／またはＡＴＣＣ寄託物Ｚ中に含まれるｃＤＮＡによりコードされるポリペプチド配列を含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に包含される。

【０１３４】

（シグナル配列）

本発明はまた、配列番号Ｙのポリペプチド配列、および／または寄託されたクローン中のｃＤＮＡによりコードされるポリペプチド配列を有するポリペプチドの成熟形態を包含する。成熟形態をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号Ｘのポリヌクレオチド配列、および／または寄託されたクローンのｃＤＮＡに含まれるポリヌクレオチド配列のような）もまた、本発明に包含される。シグナル仮説に従うと、哺乳動物細胞により分泌されるタンパク質は、一旦、粗面小胞体を横切る伸長中のタンパク質鎖の輸送が開始されると成熟タンパク質から切断される、シグナル配列または分泌リーダー配列を有する。ほとんどの哺乳動物細胞および昆虫細胞でさえも、同じ特異性を有する分泌タンパク質を切断する。しかし、いくつかの場合、分泌タンパク質の切断は、完全には、均一ではなく、このことは、このタンパク質の２以上の成熟種を生じる。さらに、分泌タンパク質の切断特異性は、最終的には、完全なタンパク質の一次構造によって決定される（すなわち、これは、このポリペプチドのアミノ酸配列に固有である）ことが長い間公知である。

【０１３５】

タンパク質が、シグナル配列、ならびにその配列についての切断点を有するか否かを予測するための方法が、利用可能である。例えば、ＭｃＧｅｏｃｈ，Ｖｉｒｕｓ　Ｒｅｓ．３：２７１－２８６（１９８５）の方法は、短いＮ末端荷電領域およびそれに続く完全な（切断されていない）タンパク質の非荷電領域からの情報を使用する。ｖｏｎ　Ｈｅｉｎｊｅ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１４：４６８３－４６９０（１９８６）の方法は、切断部位の周辺の残基（代表的に－１３～＋２残基）からの情報を使用し、ここで、＋１は、分泌タンパク質のアミノ末端を示す。これらの方法のそれぞれについての、公知の哺乳動物分泌タンパク質の切断点を予測することの正確さは、７５～８０％の範囲にある（ｖｏｎ　Ｈｅｉｎｊｅ、前出）。しかし、２つの方法は、所定のタンパク質について、同じ推定切断点を必ずしも生成するとは限らない。

【０１３６】

本発明の場合において、分泌ポリペプチドの推定アミノ酸配列は、ＳｉｇｎａｌＰと呼ばれるコンピュータープログラム（Ｈｅｎｒｉｋ　Ｎｉｅｌｓｅｎら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　１０：１－６（１９９７））によって分析され、このプログラムは、アミノ酸配列に基づいてタンパク質の細胞での位置を予測する。この局在化のコンピューター予測の一部として、ＭｃＧｅｏｃｈおよびｖｏｎ　Ｈｅｉｎｊｅの方法が援用される。このプログラムによって、本明細書中に記載される分泌タンパク質のアミノ酸配列の分析は、表１において示される結果を提供した。

【０１３７】

しかし、当業者に理解されるように、切断部位は、時折、生物に応じて変化し、そして絶対的な確実性を伴っては予測され得ない。従って、本発明は、配列番号Ｙにおいて示される配列を有する分泌ポリペプチドを提供し、これは推定切断点の５残基（すなわち、＋５または－５残基）内で始まるＮ末端を有する、同様に、いくつかの場合において、分泌タンパク質からのシグナル配列の切断は、完全に均一という訳ではなく、１つより多くの分泌される種を生じることもまた認識される。これらのポリペプチド、およびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明によって意図される。

【０１３８】

さらに、上述の分析によって同定されるシグナル配列は、天然に存在するシグナル配列を必ずしも予測しないかもしれない。例えば、天然に存在するシグナル配列は、推定シグナル配列からさらに上流にあり得る。しかし、推定シグナル配列は、分泌タンパク質をＥＲに指向し得る可能性がある。それにもかかわらず、本発明は、哺乳動物細胞（例えば、下記のようなＣＯＳ細胞）において、配列番号Ｘのポリヌクレオチド配列および／または寄託されたクローンのｃＤＮＡに含まれるポリヌクレオチド配列の発現により産生される成熟タンパク質を提供する。これらのポリペプチド、およびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明によって意図される。

【０１３９】

（ポリヌクレオチドおよびポリペプチド改変体）

本発明は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘに開示されたポリヌクレオチド配列、それに対する相補鎖、および／または寄託されたクローン中に含まれるｃＤＮＡ配列の改変体に関する。

【０１４０】

本発明はまた、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙに開示されるポリペプチド配列、および／または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド配列の改変体を包含する。

【０１４１】

「改変体」とは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、それらの本質的な特性を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。一般に、改変体は、全体的に密接に類似し、そして、多くの領域において、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに同一である。

【０１４２】

本発明はまた、例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｘのヌクレオチドをコードする配列またはその相補鎖、寄託されたｃＤＮＡクローンに含まれるヌクレオチドをコードする配列またはその相補鎖、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、寄託されたクローンに含まれるｃＤＮＡによりコードされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および／またはこれらの核酸分子のいずれかのポリヌクレオチドフラグメント（例えば、本明細書中に記載されるフラグメント）に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であるヌクレオチド配列を含むか、あるいはそれらからなる核酸分子に関する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件またはより低いストリンジェントな条件の下で、これらの核酸分子にハイブリダイズするポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドもまた、本発明により包含される。

【０１４３】

本発明はまた、例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙに示されるポリペプチド配列、寄託されたクローン中に含まれるｃＤＮＡによりコードされるポリペプチド配列、および／またはこれらのポリペプチドのいずれかのポリペプチドフラグメント（例えば、本明細書中に記載されるフラグメント）に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドに関する。

【０１４４】

本発明の参照ヌクレオチド配列に、例えば、少なくとも９５％「同一」であるヌクレオ

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

【０１４５】

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

【０１４６】

対象配列が、５’または３’欠失のために（内部欠失のためではなく）問い合わせ配列より短い場合、手動の補正が結果に対してなされなければならない。これは、同一性パーセントを計算する場合に、ＦＡＳＴＤＢプログラムが対象配列の５’および３’切断を考慮しないからである。５’末端または３’末端で切断される対象配列について、問い合わせ配列に対して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして一致／整列されない対象配列の５’および３’である問い合わせ配列の塩基の数を計算することによって補正される。ヌクレオチドが一致／整列されるか否かは、ＦＡＳＴＤＢ配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントは、同一性パーセントから差し引かれ、特定のパラメーターを用いて上記のＦＡＳＴＤＢプログラムによって算定され、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この補正されたスコアが、本発明の目的に使用されるものである。ＦＡＳＴＤＢ整列によって示されるように、問い合わせ配列と一致／整列されない、対象配列の５’および３’塩基の外側の塩基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的で算定される。

【０１４７】

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

Ｂによって算定される同一性パーセントは手動で補正されない。再び、問い合わせ配列と一致／整列しない対象配列の５’または３’の塩基のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

【０１４８】

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

【０１４９】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、表１に示されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：Ｙ）に対して、または寄託されたクローンに含まれるｃＤＮＡによってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一であるか否かは、従来的に、公知のコンピュータープログラムを使用して決定され得る。問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間での最良の全体的な一致（全体的配列整列としても参照される）を決定するための好ましい方法は、Ｂｒｕｔｌａｇら（Ｃｏｍｐ．Ａｐｐ．Ｂｉｏｓｃｉ．６：２３７－２４５（１９９０））のアルゴリズムに基づくＦＡＳＴＤＢコンピュータープログラムを使用して決定され得る。配列整列において、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともヌクレオチド配列であるかまたは両方ともアミノ酸配列であるかのいずれかである。上記の全体的配列整列の結果は、同一性パーセントで示される。ＦＡＳＴＤＢアミノ酸整列に用いられる好ましいパラメーターは：Ｍａｔｒｉｘ＝ＰＡＭ　０、ｋ－ｔｕｐｌｅ＝２、Ｍｉｓｍａｔｃｈ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝１、Ｊｏｉｎｉｎｇ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝２０、Ｒａｎｄｏｍｉｚａｔｉｏｎ　Ｇｒｏｕｐ　Ｌｅｎｇｔｈ＝０、Ｃｕｔｏｆｆ　Ｓｃｏｒｅ＝１、Ｗｉｎｄｏｗ　Ｓｉｚｅ　＝　配列の長さ、Ｇａｐ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝５、Ｇａｐ　Ｓｉｚｅ　Ｐｅｎａｌｔｙ　＝　０．０５、Ｗｉｎｄｏｗ　Ｓｉｚｅ＝５００または対象アミノ酸配列の長さ（どちらかより短い方）である。

【０１５０】

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

【０１５１】

例えば、９０アミノ酸残基の対象配列は、同一性パーセントを決定するために１００残

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

【０１５２】

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

【０１５３】

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

【０１５４】

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

【０１５５】

さらに、豊富な証拠は、改変体が、天然に存在するタンパク質の生物学的活性に類似する活性をしばしば保持することを実証する。例えば、Ｇａｙｌｅおよび共同研究者ら（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ ２６８：２２１０５－２２１１１（１９９３））は、ヒトサイトカインＩＬ－１ａの広範囲にわたる変異分析を行った。彼らは、ランダムな変異誘発を使用して、分子の全長にわたって改変体当たり平均２．５アミノ酸の変化になる、３，５００個を超える個々のＩＬ－１ａ変異体を作製した。複数の変異が、全ての潜在的なアミノ酸の位置で試験された。この研究者らは、「分子の大部分は、［結合活性または生物学的活性］のいずれに対してもほとんど影響を伴わないで変化され得る」ことを見出した。（要約を参照のこと）。実際、試験された３，５００個を超えるヌクレオチド配列のうち、

わずか２３個の独特なアミノ酸配列が、野生型と活性が有意に異なるタンパク質を生成した。

【０１５６】

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

【０１５７】

従って、本発明はさらに、実質的な生物学的活性を示すポリペプチド改変体を含む。このような改変体としては、活性に対する影響をほとんど有さないように、当該分野において公知の一般的な法則に従って選択される、欠失、挿入、逆位、反復、および置換が挙げられる。例えば、表現型的にサイレントなアミノ酸置換を作製する方法に関する指針は、Ｂｏｗｉｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４７：１３０６－１３１０（１９９０）において提供され、ここで、著者らは変化に対するアミノ酸配列の寛容性を研究するための２つの主要なストラテジーがあることを指摘する。

【０１５８】

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

【０１５９】

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

【０１６０】

著者らが言及するように、これらの２つのストラテジーは、タンパク質がアミノ酸置換に驚くほど寛容であることを明らかにした。著者らはさらに、どのアミノ酸変化が、タンパク質中の特定のアミノ酸位置で許容されるようであるかを示す。例えば、（タンパク質の三次構造内に）ほとんど埋もれているアミノ酸残基は、非極性側鎖を必要とするが、表面側鎖の特徴は、一般にほとんど保存されない。さらに、寛容される保存的なアミノ酸置換は、脂肪族または疎水性アミノ酸のＡｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、およびＩｌｅの置換；ヒドロキシル残基のＳｅｒおよびＴｈｒの置換；酸性残基のＡｓｐおよびＧｌｕの置換；アミド残基のＡｓｎおよびＧｌｎの置換、塩基性残基のＬｙｓ、Ａｒｇ、およびＨｉｓの置換；芳香族残基のＰｈｅ、Ｔｙｒ、およびＴｒｐの置換、ならびに小さなサイズのアミノ酸のＡｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｍｅｔ、およびＧｌｙの置換を含む。

【０１６１】

保存的なアミノ酸置換に加えて、本発明の改変体は、（ｉ）１つ以上の非保存的なアミノ酸残基との置換、ここでは置換されるアミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされるアミノ酸残基であってもよく、もしくはそうでなくてもよい、または（ｉｉ）置換基を有する１つ以上のアミノ酸残基での置換、または（ｉｉｉ）別の化合物（例えば、ポリペプチドの安定性および／もしくは可溶性を増加するための化合物（例えば、ポリエチレン

グリコール））との成熟ポリペプチドの融合、または（ｉｖ）さらなるアミノ酸（例えば、ＩｇＧ　Ｆｃ融合領域ペプチド、またはリーダーもしくは分泌配列、または精製を容易にする配列のような）とのポリペプチドの融合、または（ｖ）ポリペプチドと別の化合物（例えば、アルブミン（限定しないが、組換えアルブミン（例えば、１９９９年３月２日に発行された米国特許第５，８７６，９６９号、ＥＰ特許０　４１３　６２２号、および１９９８年６月１６日に発行された米国特許第５，７６６，８８３号（これらは、その全体において本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）を含む））との融合物を含む。このような改変体ポリペプチドは、本明細書中の教示から、当業者の範囲内であると考えられる。

【０１６２】

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

【０１６３】

本発明のさらなる実施形態は、少なくとも１つのアミノ酸置換を含むが、５０アミノ酸置換を超えず、さらにより好ましくは、４０アミノ酸置換を超えず、なおより好ましくは、３０アミノ酸置換を超えず、そしてなおさらにより好ましくは、２０アミノ酸置換を超えないアミノ酸配列を有する本発明のアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。もちろん、好ましさの増大する順番に、ペプチドまたはポリペプチドは、少なくとも１つのアミノ酸置換を含むが、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、または１アミノ酸置換を超えない本発明のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有することが非常に好ましい。特定の実施形態において、本発明のアミノ酸配列またはそのフラグメント（例えば、本明細書に記載の成熟形態および／または他のフラグメント）における付加、置換、および／または欠失の数は、１～５、５～１０、５～２５、５～５０、１０～５０、または５０～１５０であり、保存的アミノ酸置換が好ましい。

【０１６４】

（ポリヌクレオチドおよびポリペプチドフラグメント）

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドのポリヌクレオチドフラグメントに関する。

【０１６５】

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

０ヌクレオチド）は好ましい。

【０１６６】

さらに、本発明のポリヌクレオチドフラグメントの代表例としては、例えば、以下のおおよそのヌクレオチド数の配列を含むか、あるいは以下からなるフラグメントが挙げられる：１～５０、５１～１００、１０１～１５０、１５１～２００、２０１～２５０、２５１～３００、３０１～３５０、３５１～４００、４０１～４５０、４５１～５００、５０１～５５０、５５１～６００、６５１～７００、７０１～７５０、７５１～８００、８００～８５０、８５１～９００、９０１～９５０、９５１～１０００、１００１～１０５０、１０５１～１１００、１１０１～１１５０、１１５１～１２００、１２０１～１２５０、１２５１～１３００、１３０１～１３５０、１３５１～１４００、１４０１～１４５０、１４５１～１５００、１５０１～１５５０、１５５１～１６００、１６０１～１６５０、１６５１～１７００、１７０１～１７５０、１７５１～１８００、１８０１～１８５０、１８５１～１９００、１９０１～１９５０、１９５１～２０００、もしくは２００１から配列番号Ｘの末端、またはそれらの相補鎖、あるいは寄託されたクローンに含まれるｃＤＮＡ。この文脈において、「約（おおよそ）」は、特に記載された範囲、およびいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（５、４、３、２、または１）のヌクレオチドだけ大きいかまたは小さな範囲を含む。好ましくは、これらのフラグメントは、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする。より好ましくは、これらのポリヌクレオチドは、本明細書中で議論されるようにプローブまたはプライマーとして使用され得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシー条件下でこれらの核酸分子にハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明に含まれ、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドも同様に含まれる。

【０１６７】

本発明において、「ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号Ｙに含まれるか、または寄託されたクローンに含まれるｃＤＮＡによってコードされるアミノ酸配列の一部である、アミノ酸配列をいう。タンパク質（ポリペプチド）フラグメントは、「自立構造（ｆｒｅｅ－ｓｔａｎｄｉｎｇ）」であり得るか、あるいはより大きなポリペプチド内（そのフラグメントが、部分または領域を（最も好ましくは単一の連続した領域として）形成する）に含まれ得る。本発明のポリペプチドフラグメントの代表的な例としては、例えば、以下のおおよそのアミノ酸数を含むか、あるいは以下のおおよそのアミノ酸数からなるフラグメントが挙げられる：１～２０、２１～４０、４１～６０、６１～８０、８１～１００、１０２～１２０、１２１～１４０、１４１～１６０、または１６１からコード領域の末端まで。さらに、ポリペプチドフラグメントは、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、または１５０アミノ酸の長さであり得る。この文脈において、「約（おおよそ）」とは、特に記載された範囲または値、およびいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（５、４、３、２、または１）のアミノ酸だけ大きいかまたは小さな範囲または値を含む。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

【０１６８】

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

【０１６９】

構造的または機能的ドメインによって特徴付けられるポリペプチドおよびポリヌクレオ

チドのフラグメント（例えば、α－ヘリックスおよびα－ヘリックス形成領域、β－シートおよびβ－シート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、α両親媒性領域、β両親媒性領域、可撓性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高い抗原性指標領域を含むフラグメント）もまた、好ましい。保存性ドメインの中に含まれる配列番号Ｙのポリペプチドフラグメントは、本発明によって特に意図される。さらに、これらのドメインをコードするポリヌクレオチドもまた、意図される。

【０１７０】

他の好ましいポリペプチドフラグメントは、生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、類似の活性を示すが本発明のポリペプチドの活性とは必ずしも同一ではないフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性または減少した所望でない活性を含み得る。これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

【０１７１】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドフラグメントは、機能的活性を示すポリペプチドをコードする。「機能的活性」を示すポリペプチドとは、本発明のタンパク質の全長（完全）ポリペプチドと関連した１つ以上の公知の機能的活性を示し得るポリペプチドを意味する。このような機能的活性としては、生物学的活性、抗原性［本発明のポリペプチドに対する抗体に結合する（または結合することについて、本発明のポリペプチドと競合する）能力］、免疫原性（本発明のポリペプチドに結合する抗体を生成する能力）、本発明のポリペプチドと多量体を形成する能力、および本発明のポリペプチドについてのレセプターまたはリガンドに結合する能力が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７２】

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

【０１７３】

例えば、本発明のポリペプチドの抗体への結合について本発明の全長ポリペプチドに結合するかまたはそれと競合する能力についてアッセイする、１つの実施形態では、当該分野で公知の種々の免疫アッセイが、用いられ得る。このようなアッセイとしては、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射分析アッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュ免疫アッセイ（例えば、コロイド金、酵素または放射性同位体標識を用いる）、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ（例えば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ）、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインＡアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどのような技術を用いる競合および非競合アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。１つの実施形態では、抗体結合が、一次抗体上の標識を検出することによって検出される。別の実施形態では、この一次抗体は、この一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態では、この二次抗体が標識される。多くの手段が、免疫アッセイにおける結合の検出について当該分野で公知であり、そして本発明の範囲内である。

【０１７４】

別の実施形態では、同定された本発明のポリペプチドについてのリガンド、または本発明のポリペプチドフラグメント、改変体、もしくは誘導体が多量体化する能力が評価される場合、結合が、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、ならびにアフィニティーブロッティングのような当該分野で周知の手段によって、アッセイされ得る。一般には、Ｐｈｉｚｉｃｋｙ，Ｅ．ら、１９９５、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．５９：９４－１２３を参照のこと。別の実施形態では、その基質への本発明のポリペプチドの結合の生理学的相関（シグナル伝達）がアッセイされ得る。

【０１７５】

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

【０１７６】

（エピトープおよび抗体）

本発明は、配列番号Ｙのアミノ酸配列を有するポリペプチドのエピトープ、またはＡＴＣＣ寄託番号Ｚに含まれるポリヌクレオチド配列によって、もしくは配列番号Ｘの配列の相補物にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列のエピトープ、または上記で規定されたようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下もしくはより低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下でＡＴＣＣ寄託番号Ｚに含まれるポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列のエピトープを含むか、あるいはそれらからなるポリペプチドを含む。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列（例えば、配列番号Ｘで開示された配列）のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列、本発明のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列の相補鎖のポリヌクレオチド配列、および上記で定義されたストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下で相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む。

【０１７７】

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

【０１７８】

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

【０１７９】

本発明においては、抗原性エピトープは、好ましくは、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７アミノ酸配列を含み、より好ましくは、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０アミノ酸配列を含み、そして最も好ましくは約１５アミノ酸と約３０アミノ酸との間の配列を含む。免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含有する好ましいポリペプチドは、少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５または１００アミノ酸残基の長さである。さらなる非排他的に好ましい抗原性エピトープは、本明細書中で開示される抗原性エピトープおよびその一部を含む。抗原性エピトープは、有用である（例えば、エピトープに特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体を含む）を惹起するた

め）。好ましい抗原性エピトープは、本明細書中で開示される抗原性エピトープ、および２、３、４、５以上のこれらの抗原性エピトープの任意の組合わせを含む。抗原性エピトープは、イムノアッセイにおいて、標的分子として使用され得る。（例えば、Ｗｉｌｓｏｎら、Ｃｅｌｌ　３７：７６７－７７８（１９８４）；Ｓｕｔｃｌｉｆｆｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２１９：６６０－６６６（１９８３）を参照のこと）。

【０１８０】

同様に、免疫原性のエピトープを使用して、例えば、当該分野で周知の方法に従って抗体を誘導し得る。（例えば、Ｓｕｔｃｌｉｆｆｅら（前出）；Ｗｉｌｓｏｎら（前出）；Ｃｈｏｗら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２：９１０－９１４；およびＢｉｔｔｌｅら、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．６６：２３４７－２３５４（１９８５）を参照のこと）。好ましい免疫原性エピトープは、本明細書で開示された免疫原性エピトープ、ならびにこれらの免疫原性エピトープの２つ、３つ、４つ、５つ以上の任意の組み合わせを含む。１つ以上の免疫原性エピトープを含むポリペプチドは、キャリアタンパク質（例えば、アルブミン）とともに動物系（例えば、ウサギまたはマウス）に対する抗体応答を惹起するために提示され得るか、または、そのポリペプチドが十分に長い場合では（少なくとも約２５アミノ酸）、このポリペプチドはキャリアなしで提示され得る。しかし、８～１０程度のわずかなアミノ酸を含む免疫原性エピトープが、変性されたポリペプチドの直鎖エピトープに（少なくとも）結合し得る抗体を惹起するのに十分であることが示された（例えば、ウエスタンブロッティングにおいて）。

【０１８１】

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

【０１８２】

当業者に理解されるように、そして上記で考察されるように、免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含む本発明のポリペプチドは、他のポリペプチド配列に融合され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン（ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＭ）の定常ドメインまたはそれらの部分（ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、またはそれらの任意の組み合わせおよびそれらの部分）、あるいはアルブミン（組換えアルブミン（例えば、１９９９年３月２日発行の米国特許第５，８７６，９６９号、欧州特許第０　４１３　６２２号、および１９９８年６月１６日発行の米国特許第５，７６６，８８３号（これらは、本明細書によってその全体において参考として援用される）を参照のこと）を含むが、

限定はされない）と融合され得、キメラポリペプチドを生じる。このような融合タンパク質は、精製を容易にし得、そしてインビボでの半減期を増大させ得る。これは、ヒトＣＤ４－ポリペプチドの最初の２つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている。例えば、ＥＰ　３９４，８２７；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ，３３１：８４～８６（１９８８）を参照のこと。上皮の障壁を横切る抗原の免疫系への増強された送達は、ＩｇＧまたはＦｃフラグメントのようなＦｃＲｎ結合パートナーへ結合された抗原（例えば、インシュリン）について実証された（例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９６／２２０２４および同ＷＯ９９／０４８１３を参照のこと）。ＩｇＧ部分のジスルフィド結合に起因するジスルフィド結合二量体構造を有するＩｇＧ融合タンパク質はまた、単量体ポリペプチドまたはそれらのフラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和においてより効果的であることが見出された。例えば、Ｆｏｕｎｔｏｕｌａｋｉｓら，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２７０：３９５８－３９６４（１９９５）を参照のこと。上記のエピトープをコードする核酸はまた、エピトープタグ（例えば、赤血球凝集素（「ＨＡ」）タグまたはフラッグ（ｆｌａｇ）タグ）として目的の遺伝子と組換えられ、発現されたポリペプチドの検出および精製を補助し得る。例えば、Ｊａｎｋｎｅｃｈｔらによって記載される系は、ヒト細胞株中で発現される非変性融合タンパク質の容易な精製を可能にする（Ｊａｎｋｎｅｃｈｔ　ら、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：８９７２－８９７）。この系において、目的の遺伝子はワクシニア組換えプラスミドへサブクローン化され、その結果、この遺伝子のオープンリーディングフレームが、６つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグへ翻訳時に融合される。このタグは、融合タンパク質についての基質結合ドメインとしての機能を果たす。組換えワクシニアウイルスを用いて感染された細胞からの抽出物は、Ｎｉ２＋ニトリロ酢酸－アガロースカラム上へロードされ、そしてヒスチジンタグ化タンパク質は、イミダゾール含有緩衝液を用いて選択的に溶出され得る。

【０１８３】

本発明のさらなる融合タンパク質は、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および／またはコドンシャッフリング（総称して「ＤＮＡシャッフリング」といわれる）の技術を通じて生成され得る。ＤＮＡシャッフリングを利用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、この方法を使用することにより、改変された活性を有するポリペプチド、ならびにこれらのポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを生成し得る。一般には、米国特許第５，６０５，７９３号；同第５，８１１，２３８号；同第５，８３０，７２１号；同第５，８３４，２５２号；および同第５，８３７，４５８号、ならびにＰａｔｔｅｎら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：７２４－３３（１９９７）；Ｈａｒａｙａｍａ，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６（２）：７６－８２（１９９８）；Ｈａｎｓｓｏｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８７：２６５－７６（１９９９）；ならびにＬｏｒｅｎｚｏおよびＢｌａｓｃｏ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２４（２）：３０８－１３（１９９８）（これらの特許および刊行物の各々が本明細書によってその全体において参考として援用される）を参照のこと。１つの実施形態において、配列番号Ｘに対応するポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの改変は、ＤＮＡシャッフリングにより達成され得る。ＤＮＡシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的組換えにより、ポリヌクレオチド配列において変化を生じるように２つ以上のＤＮＡセグメントをアセンブルすることを含む。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドまたはそのコードされるポリペプチドは、組換え前に、誤りがちの（ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ）ＰＣＲ、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法による、ランダム変異誘発に供されることによって改変され得る。別の実施形態において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの１つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどは、１つ以上の異種分子の、１つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどと組換えられ得る。

【０１８４】
（抗体）
さらに、本発明のポリペプチドは、（特異的な抗体抗原結合をアッセイするための当該分野で周知のイムノアッセイによって決定されるような）本発明の、ポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、または配列番号Ｙの改変体、および／またはエピトープに免疫特異的に結合する抗体およびＴ細胞抗原レセプター（ＴＣＲ）に関する。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体、単鎖抗体、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生されるフラグメント、抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Ｉｄ抗体を含む）、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを含むが、限定されない。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫グロリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、免疫特異的に抗原に結合する抗原結合部位を含む分子をいう。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意の型（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＹ）、任意のクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）または任意のサブクラスであり得る。好ましい実施形態では、本発明の免疫グロブリン分子は、ＩｇＧ１である。他の好ましい実施形態では、本発明の免疫グロブリンはＩｇＧ４である。
【０１８５】
最も好ましくは、この抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体フラグメントであり、これには、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）２、Ｆｄ、単鎖Ｆｖｓ（ｓｃＦｖ）、単鎖抗体、ジスルフィド結合Ｆｖｓ（ｓｄＦｖ）ならびにＶＬまたはＶＨドメインのいずれかを含むフラグメントが挙げられるがこれらに限定されない。単鎖抗体を含む抗原結合抗体フラグメントは、可変領域を単独で、または以下の全体もしくは部分と組み合わせて含み得る：ヒンジ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメイン。また、可変領域とヒンジ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインとの任意の組み合わせもまた含む抗原結合フラグメントがまた本発明に含まれる。本発明の抗体は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源由来であり得る。好ましくは、この抗体は、ヒト、ネズミ（ｍｕｒｉｎｅ）（例えば、マウスおよびラット）、ロバ、シップウサギ（ｓｈｉｐ　ｒａｂｂｉｔ）、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。本明細書中で使用される場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、そしてヒト免疫グロブリンライブラリーまたは１つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックであり、そして内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体（下に記載のように、および例えば、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉらによる米国特許第５，９３９，５９８号において記載のような）を含む。
【０１８６】
本発明の抗体は、一重特異的、二重特異的、三重特異的またはより多くの多重特異性の抗体であり得る。多重特異的な抗体は、本発明のポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であり得るか、または本発明のポリペプチドおよび異種のエピトープ（例えば、異種ポリペプチドもしくは固体支持体物質）、の両方に特異的であり得る。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ　９３／１７７１５；同ＷＯ　９２／０８８０２；同ＷＯ　９１／００３６０；同ＷＯ　９２／０５７９３；Ｔｕｔｔら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０－６９（１９９１）；米国特許第４，４７４，８９３号、同第４，７１４，６８１号、同第４，９２５，６４８号、同第５，５７３，９２０号、同第５，６０１，８１９号；Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、Ｊ．Ｉｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３（１９９２）を参照のこと。
【０１８７】
本発明の抗体は、これらが認識または特異的に結合する、本発明のポリペプチドのエピトープまたは部分に関して記載または特定化され得る。このエピトープまたはポリペプチドの部分は、例えば、Ｎ末端およびＣ末端位置によって、連続するアミノ酸残基におけるサイズによって本明細書中に記載されるように、または表および図に列挙されるように、

特定化され得る。本発明の任意のエピトープまたはポリペプチドに特異的に結合する抗体はまた、排除され得る。従って、本発明は、本発明のポリペプチドを特異的に結合し、そして本発明のポリペプチドの排除を可能にする抗体を含む。

【０１８８】

本発明の抗体はまた、その交差反応性について記載または特定化され得る。本発明のポリペプチドの任意の他のアナログ、オーソログまたはホモログを結合しない抗体が、含まれる。本発明のポリペプチドに対して少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６５％、少なくとも６０％、少なくとも５５％および少なくとも５０％の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書中に記載される方法を用いて計算されるように）を有するポリペプチドを結合する抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトタンパク質の、マウスホモログ、ラットホモログおよび／またはウサギホモログならびに対応するそれらのエピトープと交差反応する。本発明のポリペプチドに対して９５％未満、９０％未満、８５％未満、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、６０％未満、５５％未満および５０％未満の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書中に記載される方法を用いて計算されるように）を有するポリペプチドを結合しない抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、上記の交差反応性は、本明細書中に開示された、任意の単一特異的な抗原性または免疫原性ポリペプチド、あるいは２、３、４、５以上の特異的抗原性および／または免疫原生ポリペプチドの組み合わせに関する。さらに、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（本明細書中で記載されるような）で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを結合する抗体が、本発明に含まれる。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドに対するそれらの結合親和性について記載または特定化され得る。好ましい結合親和性としては、５×１０$^{-2}$Ｍ未満、１０$^{-2}$Ｍ未満、５×１０$^{-3}$Ｍ未満、１０$^{-3}$Ｍ未満、５×１０$^{-4}$Ｍ未満、１０$^{-4}$Ｍ未満、５×１０$^{-5}$Ｍ未満、１０$^{-5}$Ｍ未満、５×１０$^{-6}$Ｍ未満、１０$^{-6}$Ｍ未満、５×１０$^{-7}$Ｍ未満、１０$^{-7}$Ｍ未満、５×１０$^{-8}$Ｍ未満、１０$^{-8}$Ｍ未満、５×１０$^{-9}$Ｍ未満、１０$^{-9}$Ｍ未満、５×１０$^{-10}$Ｍ未満、１０$^{-10}$Ｍ未満、５×１０$^{-11}$Ｍ未満、１０$^{-11}$Ｍ未満、５×１０$^{-12}$Ｍ未満、１０$^{-12}$Ｍ未満、５×１０$^{-13}$Ｍ未満、１０$^{-13}$Ｍ未満、５×１０$^{-14}$Ｍ未満、１０$^{-14}$Ｍ未満、５×１０$^{-15}$Ｍ未満または１０$^{-15}$Ｍ未満の解離定数すなわちＫｄを有する親和性が挙げられる。

【０１８９】

本発明はまた、競合性結合を決定するための当該分野で公知の任意の方法（例えば、本明細書中で記載されるイムノアッセイ）によって決定されるような、本発明のエピトープに対する抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。好ましい実施形態において、この抗体は、少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６０％、または少なくとも５０％、エピトープへの結合を競合的に阻害する。

【０１９０】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る。例えば、本発明は、本発明のポリペプチドとのレセプター／リガンド相互作用を部分的または完全にのいずれかで破壊する抗体を含む。好ましくは、本発明の抗体は、本明細書中で開示された抗原性エピトープ、またはその部分を結合する。本発明は、レセプター特異的抗体およびリガンド特異的抗体の両方の特徴を有する。本発明はまた、リガンド結合を妨害しないがレセプター活性化を妨害するレセプター特異的抗体の特徴を有する。レセプター活性化（すなわち、シグナル伝達）は、本明細書中に記載の技術、そうでなければ、当該分野で公知の技術により決定され得る。例えば、レセプター活性化は、レセプターのリン酸化（例えば、チロシンまたはセリン／トレオニン）、または免疫沈降それに続いてウェスタンブロット分析（例えば、上記のような）によってその基質を検出することにより、決定され得る。特定の実施形態において、この抗体の非存在下で、リガンド活性またはレセプター活性を、その活性の少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なく

とも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６０％、または少なくとも５０％阻害する抗体が提供される。

【０１９１】

本発明はまた、リガンド結合およびレセプター活性化の両方を妨げるレセプター特異的抗体、ならびにレセプターリガンド複合体を認識し、そして好ましくは、結合していないレセプターまたは結合していないリガンドを特異的に認識しないレセプター特異的抗体の特徴を有する。同様に、本発明は、リガンドと結合し、そしてレセプターへのリガンドの結合を妨げる中和抗体、およびリガントと結合し、それによりレセプター活性化を妨げるが、リガンドがレセプターを結合することを妨げない抗体を含む。さらに、本発明は、レセプターを活性化する抗体を含む。これらの抗体は、レセプターアゴニストとして作用し得、すなわち、例えば、レセプターの二量化を誘発することによってリガンド媒介レセプター活性化の生物学的活性化の全てまたはサブセットのいずれかを増強するかまたは活性化し得る。この抗体は、本明細書中に開示される本発明のペプチドの特異的生物学的活性を含む生物学的活性についてのアゴニスト、アンタゴニストまたは逆アゴニストとして特定化され得る。上記抗体アゴニストは、当該分野で公知の方法を用いて作製され得る。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９６／４０２８１；米国特許第５，８１１，０９７号；Ｄｅｎｇら、Ｂｌｏｏｄ　９２（６）：１９８１－１９８８（１９９８）；Ｃｈｅｎら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８（１６）：３６６８－３６７８（１９９８）；Ｈａｒｒｏｐら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６１（４）：１７８６－１７９４（１９９８）；Ｚｈｕら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ：５８（１５）：３２０９－３２１４（１９９８）；Ｙｏｏｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６０（７）：３１７０－３１７９（１９９８）；Ｐｒａｔら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｓｃｉ．１１１（Ｐｔ２）：２３７－２４７（１９９８）；Ｐｉｔａｒｄら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　２０５（２）：１７７－１９０（１９９７）；Ｌｉａｕｔａｒｄら、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　９（４）：２３３－２４１（１９９７）；Ｃａｒｌｓｏｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２（１７）：１１２９５－１１３０１（１９９７）；Ｔａｒｙｍａｎら、Ｎｅｕｒｏｎ　１４（４）：７５５－７６２（１９９５）；Ｍｕｌｌｅｒら、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　６（９）：１１５３－１１６７（１９９８）；Ｂａｒｔｕｎｅｋら、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　８（１）：１４－２０（１９９６）（上記の文献は、全て、その全体が参考として本明細書中に援用される）を参照のこと。

【０１９２】

本発明の抗体は、例えば、これらに限定されないが、本発明のポリペプチドを精製し、検出し、そして標的化するために使用され得る。これらは、インビトロおよびインビボの両方での診断方法および治療方法を含む。例えば、この抗体は、生物学的サンプルにおける本発明のポリペプチドのレベルを定性的におよび定量的に測定するためのイムノアッセイにおける使用を有する。例えば、Ｈａｒｌｏｗら，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，第２版，１９８８）（本明細書中でその全体が参照として援用される）を参照のこと。

【０１９３】

以下にさらに詳細に議論されるように、本発明の抗体は、単独または他の化合物との組み合わせのいずれかで使用され得る。この抗体はさらに、Ｎ末端でもしくはＣ末端で異種ポリペプチドに組換え的に融合され得るか、あるいはポリペプチドまたは他の組成物へ化学的に結合（共有結合および非共有結合を含む）され得る。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子および異種ポリペプチド、薬剤、放射性核種、または毒素のようなエフェクター分子へ組換え的に融合または結合され得る。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０８４９５；ＷＯ９１／１４４３８；ＷＯ８９／１２６２４；米国特許第５，３１４，９９５号；および欧州特許第３９６，３８７号を参照のこと。

【０１９４】

本発明の抗体は、改変された（すなわち、共有結合性付着（ｃｏｖａｌｅｎｔ　ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ）が、抗体が抗イディオタイプ応答を産生するのを妨げないような、抗体

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

【０１９５】

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

【０１９６】

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

【０１９７】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生およびスクリーニングする方法は、当該分野で慣用的かつ周知であり、そして実施例に詳細に議論される（例えば、実施例１６）。非限定的な実施例において、マウスは、本発明のポリペプチドまたはそのようなペプチドを発現する細胞を用いて免疫され得る。一旦免疫応答が検出される（例えば、抗原に特異的な抗体がマウスの血清中に検出される）と、マウスの脾臓を収集しそして脾細胞を単離する。次に、その脾細胞を周知の技術によって任意の適切な骨髄腫細胞（例えば、ＡＴＣＣから入手可能な細胞株ＳＰ２０由来の細胞）に融合させる。ハイブリドーマを限界希釈によって選択およびクローン化する。次に、ハイブリドーマクローンを、本発明のポリペプチドに結合し得る抗体を分泌する細胞について、当該分野で公知の方法によってアッセイする。一般的に高いレベルの抗体を含む腹水（ａｓｃｉｔｅｓ　ｆｌｕｉｄ）が、陽性ハイブリドーマクローンを用いてマウスを免疫することによって、産生され得る。

【０１９８】

従って、本発明は、モノクローナル抗体および本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する工程を包含する方法によって産生される抗体を、生成する方法を提供し、ここで、好ましくは、このハイブリドーマは、骨髄腫細胞と本発明の抗原で免疫したマウ

スから単離された脾細胞とを融合させ、次いで本発明のポリペプチドと結合し得る抗体を分泌するハイブリドーマクローンについて、融合物から生じるハイブリドーマをスクリーニングすることによって生成される。

【０１９９】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術によって生成され得る。例えば、本発明のＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２フラグメントは、（Ｆａｂフラグメントを生成するために）パパインまたは（Ｆ（ａｂ’）２フラグメントを産生するために）ペプシンのような酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって産生され得る。Ｆ（ａｂ’）２フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のＣＨ１ドメインを含む。

【０２００】

例えば、本発明の抗体はまた、当該分野で公知の種々のファージディスプレイ方法を用いて産生され得る。ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特定の実施形態において、そのようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトもしくはマウス）から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用され得る。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて選択または同定され得る（例えば、標識した抗体あるいは固体表面またはビーズに結合または捕捉された抗原を使用する）。これらの方法において用いられるファージは、代表的には、ファージ遺伝子ＩＩＩタンパク質またはファージ遺伝子ＶＩＩＩタンパク質のいずれかに組換え的に融合されたＦａｂ、Ｆｖまたはジスルフィド安定化されたＦｖの抗体ドメインを有するファージから発現されたｆｄおよびＭ１３結合ドメインを含む糸状ファージ（ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ　ｐｈａｇｅ）である。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられる：Ｂｒｉｎｋｍａｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１８２：４１－５０（１９９５）；Ａｍｅｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１８４：１７７－１８６（１９９５）；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：９５２－９５８（１９９４）；Ｐｅｒｓｉｃら、Ｇｅｎｅ　１８７　９－１８（１９９７）；Ｂｕｒｔｏｎら、Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　５７：１９１－２８０（１９９４）；ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＧＢ９１／０１１３４；ＰＣＴ公開ＷＯ　９０／０２８０９；ＷＯ　９１／１０７３７；ＷＯ　９２／０１０４７；ＷＯ　９２／１８６１９；ＷＯ　９３／１１２３６；ＷＯ　９５／１５９８２；ＷＯ　９５／２０４０１；ならびに米国特許第５，６９８，４２６号；同第５，２２３，４０９号；同第５，４０３，４８４号；同第５，５８０，７１７号；同第５，４２７，９０８号；同第５，７５０，７５３号；同第５，８２１，０４７号；同第５，５７１，６９８号；同第５，４２７，９０８号；同第５，５１６，６３７号；同第５，７８０，２２５号；同第５，６５８，７２７号；同第５，７３３，７４３号および同第５，９６９，１０８号（これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される）。

【０２０１】

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

【０２０２】
単鎖のＦｖｓおよび抗体を産生するために用いられ得る技術の例としては、米国特許第４，９４６，７７８号および同第５，２５８，４９８号；Ｈｕｓｔｏｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ２０３：４６－８８（１９９１）；Ｓｈｕら、ＰＮＡＳ ９０：７９９５－７９９９（１９９３）；およびＳｋｅｒｒａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０３８－１０４０（１９８８）に記載される技術が挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボにおける使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の使用が好ましくあり得る。キメラ抗体とは、抗体の異なる部分が、異なる動物種に由来する分子（例えば、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体）である。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野において公知である。例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４：２１４（１９８６）；Ｇｉｌｌｉｅｓら、（１９８９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １２５：１９１－２０２；米国特許第５，８０７，７１５号；同第４，８１６，５６７号；および同第４，８１６３９７号を参照のこと（これらはそれらの全体が、参考として本明細書中に援用される）。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望された抗原に結合する非ヒト種抗体由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させるため（好ましくは改善させるために）ＣＤＲドナー抗体由来の対応残基と置換される。これらフレームワークの置換は、当該分野で周知の方法によって同定され、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのＣＤＲおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較による。（例えば、Ｑｕｅｅｎら、米国特許第５，５８５，０８９号；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３（１９８８）を参照のこと（これらはそれらの全体が参考として本明細書中に援用される）。）抗体は、以下を含む当該分野で公知の種々の技術を用いてヒト化され得る：例えば、ＣＤＲ－移植（欧州特許第２３９，４００号；ＰＣＴ公開ＷＯ ９１／０９９６７；米国特許第５，２２５，５３９号；同第５，５３０，１０１号および同第５，５８５，０８９号）、ベニヤリング（ｖｅｎｅｅｒｉｎｇ）またはリサーフェイシング（ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ）（欧州特許第５９２，１０６号；同第５１９，５９６号；Ｐａｄｌａｎ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２８（４／５）：４８９－４９８（１９９１）； Ｓｔｕｄｎｉｃｋａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ７（６）：８０５－８１４（１９９４）；Ｒｏｇｕｓｋａら、ＰＮＡＳ ９１：９６９－９７３（１９９４））、およびチェーンシャッフリング（ｃｈａｉｎ ｓｈｕｆｆｌｉｎｇ）（米国特許第５，５６５，３３２号）。

【０２０３】
完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置に対して特に所望される。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記のファージディスプレイ法を含む当該分野で公知の種々の方法により作製され得る。米国特許第４，４４４，８８７号、同第４，７１６，１１１号；およびＰＣＴ公開ＷＯ ９８／４６６４５、ＷＯ ９８／５０４３３、ＷＯ ９８／２４８９３、ＷＯ ９８／１６６５４、ＷＯ ９６／３４０９６、ＷＯ ９６／３３７３５、およびＷＯ ９１／１０７４１；（これらの各々はその全体が参考として本明細書中に援用される）もまた参照のこと。

【０２０４】
ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンの発現は出来ないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いて産生され得る。例えば、ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子およびヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子の複合体は、無作為にまたは相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入され得る。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域（ｄｉｖｅｒｓｉｔｙ ｒｅｇｉｏｎ）は、ヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子に加えて、マウスの胚性幹細胞に導入され得る。マウス重鎖免疫グロブリ

ン遺伝子およびマウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン座の導入と別々にまたは同時に非機能的にされ得る。特に、ＪＨ領域のホモ接合性の欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。改変された胚性幹細胞を増殖させ、そしてキメラマウスを産生するために胚盤胞中に微量注入する。次いで、キメラマウスを、ヒト抗体を発現するホモ接合性の子孫を産生するために繁殖させる。トランスジェニックマウスを、選択された抗原（例えば、本発明のポリペプチドの全体または部分）を用いて通常の様式で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いた免疫したトランスジェニックマウスから得られ得る。トランスジェニックマウスに保持されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、Ｂ細胞分化の間に再構成し、そしてその後、クラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。従って、そのような技術の使用によって、治療的に有用なＩｇＧ抗体、ＩｇＡ抗体、ＩｇＭ抗体およびＩｇＥ抗体の産生が可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、ＬｏｎｂｅｒｇおよびＨｕｓｚａｒ、Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３（１９９５）を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術のならびにそのような抗体を産生するためのプロトコールの詳細な議論については、例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９８／２４８９３；ＷＯ９２／０１０４７；ＷＯ９６／３４０９６；ＷＯ９６／３３７３５；欧州特許第０　５９８　８７７；米国特許第５，４１３，９２３号；同第５，６２５，１２６号；同第５，６３３，４２５号；同第５，５６９，８２５号；同第５，６６１，０１６号；同第５，５４５，８０６号；同第５，８１４，３１８号；同第５，８８５，７９３号；同第５，９１６，７７１号；および同第５，９３９，５９８号を参照のこと（これらはその全体が本明細書中に参考として援用される）。さらに、Ａｂｇｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．（Ｆｒｅｅｍｏｎｔ，ＣＡ）およびＧｅｎｐｈａｒｍ（Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）のような企業は、上記の技術に類似した技術を用いて選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに従事し得る。

【０２０５】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト化抗体を、「ガイドされた（ｇｕｉｄｅｄ）選択」といわれる技術を用いて産生し得る。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）は、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を導くために使用される。（Ｊｅｓｐｅｒｓら、Ｂｉｏ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１２：８９９－９０３（１９８８））。

【０２０６】

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

【０２０７】

（抗体をコードするポリヌクレオチド）

本発明はさらに、本発明の抗体およびそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ストリンジェントな、またはより低いストリジェンシーなハイブリダイゼーション条件下で（例えば、上記に定義されるよう

な）抗体（好ましくは、本発明のポリペプチドと特異的に結合する、好ましくは、配列番号Ｙのアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する抗体）をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【０２０８】

ポリヌクレオチドが、当該分野で公知の任意の方法によって得られ得、そしてそのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定される。例えば、抗体のヌクレオチド配列が知られている場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから構築され得（例えば、Ｋｕｔｍｅｉｅｒら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１７：２４２（１９９４）に記載されるような）、これは、簡単にいうと、以下の工程を包含する：この抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、次いでＰＣＲによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅。

【０２０９】

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

【０２１０】

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えＤＮＡ技術、部位特異的変異誘発、ＰＣＲなど（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９９０，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，第２版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹおよびＡｕｓｕｂｅｌら編、１９９８，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹに記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。））を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および／または挿入を作製するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成し得る。

【０２１１】

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

への結合を改善する。さらに、このような方法は、１つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する１つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

【０２１２】

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

【０２１３】

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

【０２１４】

（抗体を産生する方法）

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

【０２１５】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ（例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体）の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分（好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えＤＮＡ技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法には、例えば、インビトロの組換えＤＮＡ技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域（例えば、ＰＣＴ公開 ＷＯ８６／０５８０７；ＰＣＴ公開 ＷＯ８９／０１０３６；および米国特許第５，１２２，４６４号を参照のこと）をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

【０２１６】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、そしてこのトランスフェクトされた細胞は、次いで、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あ

るいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

【０２１７】

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

【０２１８】

細菌系において、多くの発現ベクターが、抗体分子の発現を意図する使用に依存して有利に選択され得る。例えば、多量のこのようなタンパク質が産生されるべき場合、抗体分子の薬学的組成物の生成のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指向するベクターが所望され得る。このようなベクターには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体をコードする配列がｌａｃＺをコードする領域と共にベクターにインフレーム（ｉｎ ｆｒａｍｅ）で個別に連結され得、その結果、融合タンパク質が産生されるＥ．ｃｏｌｉ発現ベクターｐＵＲ２７８（Ｒｕｔｈｅｒら、ＥＭＢＯ Ｊ．２：１７９１（１９８３））；ｐＩＮベクター（Ｉｎｏｕｙｅ＆Ｉｎｏｕｙｅ、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３：３１０１－３１０９（１９８５）；Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ＆Ｓｃｈｕｓｔｅｒ、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２４：５５０３－５５０９（１９８９））など。ｐＧＥＸベクターもまた、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質として、外来性ポリペプチドを発現させるために使用され得る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、そして溶解した細胞から、マトリックスグルタチオン－アガロースビーズへの吸着および結合、それに続く遊離グルタチオン存在化での溶出によって容易に精製され得る。このｐＧＥＸベクターは、トロンビンまたはＸａ因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、その結果、このクローニングされた標的遺伝子産物は、ＧＳＴ部分から放出され得る。

【０２１９】

昆虫系においては、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多角体病ウィルス（ＡｃＮＰＶ）は、異種遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。このウィ

ルスは、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞において増殖する。抗体をコードする配列は、このウィルスの非必須の領域（例えばポリヘドリン遺伝子）に個々にクローニングされ得、そしてＡｃＮＰＶプロモーター（例えばポリヘドリンプロモーター）の制御下に配置され得る。

【０２２０】

哺乳動物宿主細胞においては、多数のウィルスに基づく発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合においては、目的の抗体をコードする配列は、アデノウイルスの転写／翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび３つの部分に分かれるリーダー配列、に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボでの組換えによって、アデノウィルスゲノムに挿入され得る。ウィルスのゲノムの非必須領域（例えば、Ｅ１またはＥ３領域）における挿入は、生存可能で、感染した宿主において抗体分子を発現する能力のある組換えウィルスを生じる（例えば、Ｌｏｇａｎ＆Ｓｈｅｎｋ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８１：３５５－３５９（１９８４）を参照のこと）。特異的開始シグナルはまた、挿入された抗体をコードする配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルは、ＡＴＧ開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、この開始コドンは、挿入部分全体の翻訳を確実にするために、所望されるコード配列のリーディングフレーム（ｒｅａｄｉｎｇ　ｆｒａｍｅ）と相が同じでなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、種々の起源、天然および合成の両方であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター、などの含有によって高められ得る（Ｂｉｔｔｎｅｒら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１－５４４（１９８７）を参照のこと）。

【０２２１】

さらに、宿主細胞系統は、選択され得、これは挿入配列の発現を調節し、または、所望される特異的な様式で遺伝子産物を改変し、そしてプロセシングする。タンパク質産物のこのような改変（例えばグリコシル化）およびプロセシング（例えば切断）は、タンパク質の機能のために重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の、翻訳後プロセシングおよび改変のための、特徴的で特異的な機構を有する。適切な細胞株または宿主系は、発現された異種タンパク質の正確な改変およびプロセシングを確実にするように選択され得る。この目的のために、遺伝子産物の、第一の転写、グリコシル化、およびリン酸化の正確なプロセシングのための細胞機構を有する、真核生物宿主細胞が、使用され得る。このような哺乳動物宿主細胞は、ＣＨＯ、ＶＥＲＹ、ＢＨＫ、Ｈｅｌａ、ＣＯＳ、ＭＤＣＫ、２９３、３Ｔ３、ＷＩ３８、そして特に、例えば、ＢＴ４８３、Ｈｓ５７８Ｔ、ＨＴＢ２、ＢＴ２０およびＴ４７Ｄのような乳癌細胞株、ならびに、例えば、ＣＲＬ７０３０およびＨｓ５７８Ｂｓｔのような正常な乳腺細胞株を含むが、これらに限定されない。

【０２２２】

組換えタンパク質の長期間の高収率産生、安定発現が好ましい。例えば、安定に抗体分子を発現する細胞株が操作され得る。ウィルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞は、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、など）、および選択マーカーによって制御されるＤＮＡで形質転換され得る。異種ＤＮＡの導入に続いて、操作された細胞は、１～２日間富化培地で増殖させられ得、次いで、選択培地に切り替えられる。組換えプラスミドにおける選択マーカーは、選択に対する耐性を与え、そして細胞が、プラスミドをその染色体内に安定に組み込み、そして増殖して、細胞増殖巣を形成し、これを今度はクローニングし得、増殖して細胞株になり得ることを可能にする。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を操作するために、有利に使用され得る。このような操作された細胞株は、直接的または間接的に抗体分子と相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において、特に有用であり得る。

【０２２３】

多数の選択系が使用され得、この選択系は、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒら、Ｃｅｌｌ　１１：２２３（１９７７））、ヒポキサンチン－グアニン　ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ＆Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　４８：２０２（１９９２））、およびアデニン　ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙら、Ｃｅｌｌ　２２：８１７（１９８０））の遺伝子を含むが限定されず、これらの遺伝子は、ｔｋ－、ｈｇｐｒｔ－またはａｐｒｔ－細胞においてそれぞれ使用され得る。また、代謝拮抗物質耐性は、以下の遺伝子の選択の根拠として使用され得る：ｄｈｆｒ、これはメトトレキサートに対する耐性を与える（Ｗｉｇｌｅｒら、Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：３５７（１９８０）；Ｏ’Ｈａｒｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：１５２７（１９８１））；ｇｐｔ、これはミコフェノール酸にに対する耐性を与える（Ｍｕｌｌｉｇａｎ＆Ｂｅｒｇ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：２０７２（１９８１））；ｎｅｏ、これはアミノグリコシドＧ－４１８に対する耐性を与える（Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　１２：４８８－５０５；Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗｕ、Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ　３：８７－９５（１９９１）；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６（１９９３）；Ｍｕｌｌｉｇａｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０：９２６－９３２（１９９３）；およびＭｏｒｇａｎ　ａｎｄ　Ａｎｄｅｒｓｏｎ、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７（１９９３）；１９９３年5月、ＴＩＢ　ＴＥＣＨ　１１（５）：１５５－２１５）；ならびにｈｙｇｒｏ、これはハイグロマイシンにに対する耐性を与える（Ｓａｎｔｅｒｒｅら、Ｇｅｎｅ　３０：１４７（１９８４））。組換えＤＮＡ技術の分野で周知の方法は、所望の組換えクローンを選択するために、慣用的に適用され得、そしてこのような方法は、以下に記載されている：例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９３）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ、Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ、Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ（１９９０）；ならびに１２章および１３章、Ｄｒａｃｏｐｏｌｉら（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹ（１９９４）；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１（１９８１）（これらはその全体が本明細書中に参考として援用される）。

【０２２４】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大され得る（総説として、ＢｅｂｂｉｎｇｔｏｎおよびＨｅｎｔｓｃｈｅｌ、Ｔｈｅ　ｕｓｅ　ｏｆ　ｖｅｃｔｏｒｓ　ｂａｓｅｄ　ｏｎ　ｇｅｎｅ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　ｃｌｏｎｅｄ　ｇｅｎｅｓ　ｉｎ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎ　ＤＮＡ　ｃｌｏｎｉｎｇ、Ｖｏｌ．３．（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、１９８７）を参照のこと）。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが、増幅可能であると、宿主細胞の培養物に存在するインヒビターのレベルにおける増加は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加する。増幅領域は抗体遺伝子と結合しているので、抗体の産生もまた増加する（Ｃｒｏｕｓｅら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２５７（１９８３））。

【０２２５】

宿主細胞は、本発明の二つの発現ベクター（重鎖由来のポリペプチドをコードする第一のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第二のベクター）で、同時トランスフェクトされ得る。この二つのベクターは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの等しい発現を可能にする、同一の選択マーカーを含み得る。あるいは、単一のベクターが使用され得、これは重鎖および軽鎖両方のポリペプチドをコードし、そして発現することができる。このような状況において、過剰の毒性の遊離重鎖を避けるために、重鎖の前に軽鎖が配置されるべきである（Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ、Ｎａｔｕｒｅ　３２２：５２（１９８６）；

Ｋｏｈｌｅｒ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：２１９７（１９８０））。重鎖および軽鎖のためのコード配列はｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡを含み得る。

【０２２６】

一旦本発明の抗体分子が、動物によって産生されるか、化学的に合成されるか、または組換えにより発現されると、当該分野で公知の、免疫グロブリン分子の精製のための任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー（特に、プロテインＡの後に特異的抗原に対するアフィニティーによる）、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製のための任意の他の標準的な技術によって、精製され得る。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、本明細書中に記載されるかまたはそうでなければ当該分野において公知の、異種ポリペプチド配列に融合され得、精製を容易にする。

【０２２７】

本発明は、本発明のポリペプチド（もしくはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、もしくは１００個のアミノ酸）に、組換えにより融合されるかまたは化学的に結合されて（共有結合および非共有結合の両方を含む）、融合タンパク質を生成する抗体、を含む。この融合は、直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。この抗体は、本発明のポリペプチド（またはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、もしくは１００個のアミノ酸）以外の抗原に特異的であり得る。例えば、インビトロまたはインビボのいずれにおいても、本発明のポリペプチドを特定の細胞表面のレセプターに特異的な抗体に融合または結合させることによって、特定の細胞のタイプに対して、本発明のポリペプチドを標的にするために、抗体が使用され得る。本発明のポリペプチドに融合または結合される抗体はまた、インビトロ免疫アッセイおよび当該分野で公知の方法を使用する精製方法において使用され得る。例えば、Ｈａｒｂｏｒら、上記、およびＰＣＴ公開ＷＯ９３／２１２３２；ＥＰ４３９，０９５；Ｎａｒａｍｕｒａら、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．３９：９１－９９（１９９４）；米国特許第５，４７４，９８１号；Ｇｉｌｌｉｅｓら、ＰＮＡＳ　８９：１４２８－１４３２（１９９２）；Ｆｅｌｌら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４６：２４４６－２４５２（１９９１）を参照のこと。これらは、その全体が参考として援用される。

【０２２８】

本発明はさらに、抗体の可変領域以外のドメインに融合または結合された、本発明のポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体のＦｃ領域、またはその部分に融合または結合され得る。本発明のポリペプチドに融合されたこの抗体の部分は、定常領域、ヒンジ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメイン、またはそのドメイン全体もしくは部分の任意の組合せを含み得る。これらのポリペプチドはまた、上記の抗体の部分に融合または結合され得、多量体を形成する。例えば、本発明のポリペプチドに融合されたＦｃ部分は、このＦｃ部分の間のジスルフィド結合を通して二量体を形成し得る。より高度の多量体形態は、ポリペプチドをＩｇＡおよびＩｇＭの部分に融合させることによって作製され得る。本発明のポリペプチドを抗体部分に融合または結合させるための方法は、当該分野において公知である。例えば、米国特許第５，３３６，６０３号；同第５，６２２，９２９号；同第５，３５９，０４６号；同第５，３４９，０５３号；同第５，４４７，８５１号；同第５，１１２，９４６号；ＥＰ　３０７，４３４；ＥＰ　３６７，１６６；ＰＣＴ公開ＷＯ９６／０４３８８；ＷＯ９１／０６５７０；Ａｓｈｋｅｎａｚｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：１０５３５－１０５３９（１９９１）；Ｚｈｅｎｇら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５４：５５９０－５６００（１９９５）；およびＶｉｌら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：１１３３７－１１３４１（１９９２）（前記の参考文献はその全体が参考として援用される）を参照のこと。

【０２２９】

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

【０２３０】

さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけヘキサ－ヒスチジンペプチド（例えば、ｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，９２５９　Ｅｔｏｎ　Ａｖｅｎｕｅ，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ，９１３１１）において提供されるタグ）であり、これらの多くのマーカーアミノ酸配列が市販されている。例えば、Ｇｅｎｔｚら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：８２１－８２４（１９８９）に記載されるように、ヘキサ－ヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「ＨＡ」タグ（Ｗｉｌｓｏｎら、Ｃｅｌｌ３７：７６７（１９８４））、および「ｆｌａｇ」タグを含むが、これに限定されない。

【０２３１】

本発明は、診断剤または治療剤に結合される、抗体またはそのフラグメントをさらに含む。抗体は、例えば、臨床上の試験手順（例えば、所定の処置レジメン（ｒｅｇｉｍｅｎ）の効力を決定するため）の一部として、腫瘍の発生または進行をモニターするために、診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質と連結させることによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子放射断層撮影を使用する陽電子放射金属、および非放射性常磁性金属イオン、が挙げられる。この検出可能な物質は、抗体（またはそのフラグメント）に対して、直接的または間接的のいずれかで、当該分野で公知の技術を使用する媒介物（例えば、当該分野で公知のリンカーなど）を介して、連結または結合され得る。例えば、本発明に従う診断薬としての使用のための抗体に結合され得る金属イオンに関しては、米国特許第４，７４１，９００号を参照のこと。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ロー

ダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；ならびに、適切な放射性物質の例としては、１２５Ｉ、１３１Ｉ、１１１Ｉｎまたは９９Ｔｃが挙げられる。

【０２３２】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、治療用部分（例えば細胞毒（例えば細胞増殖抑制性もしくは細胞殺傷性の薬剤））、治療剤または放射性金属イオン（例えば、α－エミッター（例えば２１３Ｂｉ）など）に結合され得る。細胞毒または細胞毒性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を含む。例としては、パクリタキセル（ｐａｃｌｉｔａｘｏｌ）、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド（ｔｅｎｏｐｏｓｉｄｅ）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン（ｃｏｌｃｈｉｃｉｎ）、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン（ｄｉｈｙｄｒｏｘｙ　ａｎｔｈｒａｃｉｎ　ｄｉｏｎｅ）、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそのアナログまたはホモログ、が挙げられる。治療剤は、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン（５－ｆｌｕｏｒｏｕｒａｃｉｌ　ｄｅｃａｒｂａｚｉｎｅ）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ（ｔｈｉｏｅｐａ）クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド（ｃｙｃｌｏｔｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、ならびにｃｉｓ－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アンスラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアンスラマイシン（ａｎｔｈｒａｍｙｃｉｎ）（ＡＭＣ））、ならびに抗有糸分裂剤（例えばビンクリスチンおよびビンブラスチン）、を含むが、それらに限定されない。

【０２３３】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を改変するために使用され得、治療剤または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、毒素（例えばアブリン、リシンＡ、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、α－インターフェロン、β－インターフェロン、神経発育因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス薬（例えば、ＴＮＦ－α、ＴＮＦ－β、ＡＩＭ　Ｉ（国際公開第ＷＯ９７／３３８９９号を参照のこと）、ＡＩＭ　ＩＩ（国際公開第ＷＯ９７／３４９１１号を参照のこと）、Ｆａｓリガンド（Ｔａｋａｈａｓｈｉら、Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：１５６７－１５７４（１９９４））、ＶＥＧＩ（国際公開第ＷＯ９９／２３１０５号を参照のこと））、血栓症薬もしくは抗脈管形成薬（例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン）；または生物学的応答改変剤（例えばリンホカイン、インターロイキン－１（「ＩＬ－１」）、インターロイキン－２（「ＩＬ－２」）、インターロイキン－６（「ＩＬ－６」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、顆粒球コロニー刺激因子（「Ｇ－ＣＳＦ」）、または他の増殖因子など）、が挙げられ得る。

【０２３４】

抗体はまた、固体支持体に付着させられ得、この固体支持体は、標的抗原の免疫アッセイまたは精製に特に有用である。このような固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレン、が挙げられるがそれらに限定されない。

【０２３５】

このような治療部分を抗体に結合する技術は周知であり、例えば、Ａｒｎｏｎら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｏｆ Ｄｒｕｇｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｒｅｉｓｆｅｌｄら（編）、２４３－５６頁（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９８５）；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍら、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（第２版）、Ｒｏｂｉｎｓｏｎら（編）、６２３－５３頁（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．１９８７）；Ｔｈｏｒｐｅ、「Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ」Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｐｉｎｃｈｅｒａら（編）、４７５－５０６頁（１９８５）；「Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，Ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ Ｏｆ Ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ Ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ｂａｌｄｗｉｎら（編）、３０３－１６頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５）、およびＴｈｏｒｐｅら、「Ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ Ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｔｏｘｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．６２：１１９－５８（１９８２）を参照のこと。

【０２３６】

あるいは、抗体は２次抗体に結合され、米国特許第４，６７６，９８０号（これは、その全体が本明細書に参考として援用される）におけるＳｅｇａｌによる記載のような抗体の異種結合体（ｈｅｔｅｒｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）を形成し得る。

【０２３７】

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

【０２３８】

（免疫表現型分類（ｉｍｍｕｎｏｐｈｅｎｏｔｙｐｉｎｇ））

本発明の抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の遺伝子の翻訳生成物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、特定の細胞型の分化および／または成熟の種々の段階で示差的に発現される細胞マーカーとして有用であり得る。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対して指向されるモノクロナール抗体は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技術が、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクロナール抗体を用いて利用され得、そしてその技術には、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリクス（すなわち、プレート）に付着した抗体を用いる「パンニング」、ならびにフローサイトメトリー（例えば、米国特許第５，９８５，６６０号；およびＭｏｒｒｉｓｏｎら、Ｃｅｌｌ，９６：７３７－４９（１９９９）を参照のこと）が挙げられる。

【０２３９】

これらの技術は、血液学的悪性腫瘍（すなわち、急性白血病患者における微小残存病変（ｍｉｎｉｍａｌ ｒｅｓｉｄｕａｌ ｄｉｓｅａｓｅ）（ＭＲＤ））および移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を予防するための移植術における「非自己」細胞と共に見出され得るような、細胞の特定集団のスクリーニングを可能にする。あるいは、これらの技術は、ヒト臍帯血において見出され得るような増殖および／または分化を受け得る、造血幹細胞および前駆細胞のスクリーニングを可能にする。

【０２４０】

（抗体結合アッセイ）

本発明の抗体は、免疫特異的結合について、当該分野で公知の任意の方法によってアッ

セイされ得る。使用され得る免疫アッセイは、競合的および非競合的アッセイ系を含むがこれに限定されない。このアッセイ系は以下のような技術を使用する、少し例を挙げると、ウェスタンブロット、放射性免疫アッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射分析アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインＡ免疫アッセイ。このようなアッセイは、当該分野で、慣習的および周知である（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、１９９４、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、第１巻、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを参照のこと。これはその全体が本明細書中で参考として援用される）。典型的な免疫アッセイは、以下に簡単に記載される（しかし限定として意図されない）。

【０２４１】

免疫沈降プロトコルは、一般に、ＲＩＰＡ緩衝液（１％ＮＰ－４０またはＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、１％デオキシコール酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ７．２）、１％Ｔｒａｓｙｌｏｌ）のような、タンパク質ホスファターゼおよび／またはプロテアーゼインヒビター（例えば、ＥＤＴＡ、ＰＭＳＦ、アプロチニン、バナジウム酸ナトリウム）を補充した溶解緩衝液中で、細胞の集団を溶解する工程、目的の抗体を細胞溶解物に添加する工程、４℃である時間（例えば１～４時間）インキュベートする工程、プロテインＡおよび／またはプロテインＧのセファロースビーズを細胞溶解物に添加する工程、約１時間以上、４℃でインキュベートする工程、ビーズを溶解緩衝液で洗浄する工程およびビーズをＳＤＳ／サンプル緩衝液中に再懸濁する工程、を包含する。目的の抗体が特定の抗原を免疫沈降する能力は、例えば、ウェスタンブロット分析によって評価され得る。当業者は、抗原に対する抗体の結合を増加し、そしてバックグラウンドを減少する（例えば、セファロースビーズとともに細胞溶解物を予め洗浄する）ように改変され得るパラメータに関して、よく知っている。免役沈降プロトコルに関するさらなる考察については、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、１９９４、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌ．１、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１０．１６．１）を参照のこと。

【０２４２】

ウェスタンブロット分析は一般的に、タンパク質サンプルを調製する工程、タンパク質サンプルのポリアクリルアミドゲルでの電気泳動（例えば抗原の分子量によって８％～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥ）、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲルからメンブレン（例えばニトロセルロース、ＰＶＤＦまたはナイロン）へ移す工程、ブロッキング溶液（例えば、３％のＢＳＡまたは無脂肪ミルクを含むＰＢＳ）中でメンブレンをブロッキングする工程、メンブレンを洗浄緩衝液（例えば、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ２０）中で洗浄する工程、ブロッキング緩衝液で希釈された１次抗体（目的の抗体）を用いてメンブレンをブロッキングする工程、洗浄緩衝液中でメンブレンを洗浄する工程、ブロッキング緩衝液で希釈された、酵素基質（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ）または放射性分子（例えば３２Ｐまたは１２５Ｉ）に結合した２次抗体（これは１次抗体（例えば抗ヒト抗体）を認識する）でメンブレンをブロッキングする工程、洗浄緩衝液中でメンブレンを洗浄する工程、および抗原の存在を検出する工程、を包含する。当業者は、検出されるシグナルを増加し、そしてバックグランドノイズを減少するように改変され得るパラメータをよく知っている。ウェスタンブロットプロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、１９９４、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｖｏｌ．１、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１０．８．１）を参照のこと。

【０２４３】

ＥＬＩＳＡは、抗原を調製する工程、９６ウェルマイクロタイタープレートのウェルをその抗原でコーティングする工程、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまた

はアルカリホスフォターゼ）のような検出可能な化合物に結合した目的の抗体をそのウェルに添加し、そして一定時間インキュベートする工程、および抗原の存在を検出する工程を含む。ＥＬＩＳＡにおいて、目的の抗体は、検出可能な化合物に結合している必要はない；その代わり、検出可能な化合物に結合した第二の抗体（目的の抗体を認識する）がウェルに添加され得る。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体がウェルにコーティングされ得る。この場合、検出可能な化合物に結合した第二の抗体が、コーティングされたウェルへの目的の抗原の添加に続いて、添加され得る。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように改変され得るパラメータ、および当該分野において公知のＥＬＩＳＡの他のバリエーションに関して、認め得る。ＥＬＩＳＡに関するさらなる考察については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら編，１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，第１巻、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ & Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１１．２．１を参照のこと。

【０２４４】

抗体の抗原に対する結合親和性および抗体－抗原相互作用のオフレート（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）が、競合結合アッセイにより決定され得る。競合結合アッセイの一つの例は、ラジオイムノアッセイであり、ラジオイムノアッセイは、標識した抗原（例えば、３Ｈまたは１２５Ｉ）と、漸増量の非標識抗原の存在下での目的の抗体とのインキュベーション、および標識した抗原に結合した抗体の検出を含む。目的の抗体の、特定の抗原に対する親和性、および結合オフレートは、スキャッチャードプロット分析によるデータから決定され得る。第二の抗体との競合はまた、ラジオイムノアッセイを用いて決定され得る。この場合、抗原は、漸増量の非標識第二抗体の存在下で、標識した化合物（例えば、３Ｈまたは１２５Ｉ）に結合した目的の抗体とともにインキュベートされる。

【０２４５】

（治療用途）

本発明はさらに、抗体を基礎とした治療に関し、この治療は、本発明の抗体を、１つ以上の開示された疾患、障害、または状態を処置するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトの患者に投与する工程を含む。本発明の治療化合物としては、本発明の抗体（本明細書中に記載するような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む）ならびに本発明の抗体をコードする核酸（本明細書中に記載するような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体ならびに抗イディオタイプ抗体を含む）が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連した疾患、障害または状態（本明細書中に記載する任意の１つ以上の疾患、障害、または状態を含むがこれらに限定されない）を処置、阻害または予防するために使用され得る。本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連した疾患、障害または状態の処置および／または予防は、それらの疾患、障害または状態に関連した症状を緩和する工程を含むがこれに限定されない。本発明の抗体は、当該分野で公知であるか、または本明細書中に記載されるように、薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

【０２４６】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の１つの要約は、身体内で局所的にまたは全身的に、あるいは（例えば、補体（ＣＤＣ）により、またはエフェクター細胞（ＡＤＣＣ）により媒介されるような）抗体の直接的細胞傷害性により、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを結合させることを含む。これらのアプローチのいくつかは、より詳細に以下に記載される。本明細書中で提供される教示を与えられれば、当業者は、過度の実験なしに、診断上の目的、モニタリングの目的あるいは治療上の目的のために、本発明の抗体を使用する方法がわかる。

【０２４７】

本発明の抗体は、例えば、抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増加させるために役立つ、他のモノクローナル抗体またはキメラ抗体、あるいはリンホカインまたは造血増殖因子（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－３およびＩＬ－７など）と組み合わせて

有利に利用され得る。

【０２４８】

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

【０２４９】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に関するイムノアッセイ、およびそれらに関連した障害の治療の両方のために、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する、高親和性および／または強力な、インビボでの阻害抗体および／または中和抗体、それらのフラグメント、またはその領域を使用することが好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に対して親和性を有する。好ましい結合親和性としては、５×１０$^{-2}$Ｍ、１０$^{-2}$Ｍ、５×１０$^{-3}$Ｍ、１０$^{-3}$Ｍ、５×１０$^{-4}$Ｍ、１０$^{-4}$Ｍ、５×１０$^{-5}$Ｍ、１０$^{-5}$Ｍ、５×１０$^{-6}$Ｍ、１０$^{-6}$Ｍ、５×１０$^{-7}$Ｍ、１０$^{-7}$Ｍ、５×１０$^{-8}$Ｍ、１０$^{-8}$Ｍ、５×１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ、５×１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ、５×１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ、５×１０$^{-12}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ、５×１０$^{-13}$Ｍ、１０$^{-13}$Ｍ、５×１０$^{-14}$Ｍ、１０$^{-14}$Ｍ、５×１０$^{-15}$Ｍ、および１０$^{-15}$Ｍより小さい解離定数すなわちＫｄを有する結合親和性が挙げられる。

【０２５０】

（遺伝子治療）

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

【０２５１】

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

【０２５２】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌら，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　１２：４８８－５０５（１９９３）；ＷｕおよびＷｕ，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ　３：８７－９５（１９９１）；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６（１９９３）；Ｍｕｌｌｉｇａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０：９２６－９３２（１９９３）；ならびにＭｏｒｇａｎおよびＡｎｄｅｒｓｏｎ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７（１９９３）；Ｍａｙ，ＴＩＢＴＥＣＨ　１１（５）：１５５－２１５（１９９３）を参照のこと。使用され得る、組換えＤＮＡ技術分野において一般的に公知である方法は、Ａｕｓｕｂｅｌら（編），Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９３）；およびＫｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９０）に記載される。

【０２５３】

好ましい局面において、化合物は抗体をコードする核酸配列を含有し、上記核酸配列は、適切な宿主において、抗体、またはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質、あるいはその重鎖もしくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸配列は、抗体コード領域に作動可能に連結したプロモーターを有し、上記プロモーターは

誘導性であるかまたは構成性であり、そして必要に応じて組織特異的である。別の特定の実施形態においては、抗体をコードする配列および任意の他の所望の配列がゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接した核酸分子が使用され、それにより抗体をコードする核酸の染色体内の発現を提供する（ＫｏｌｌｅｒおよびＳｍｉｔｈｉｅｓ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８９３２－８９３５（１９８９）；Ｚｉｊｌｓｔｒａら，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：４３５－４３８（１９８９））。特定の実施形態において、発現した抗体分子は単鎖抗体であるか；あるいはこの核酸配列は、この抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする配列またはそのフラグメントを含む。

【０２５４】

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

【０２５５】

特定の実施形態において、核酸配列はインビボで直接的に投与され、そこで核酸配列は発現されて、コードされた産物を産生する。これは、当該分野で公知の多数の方法などのいずれかにより（例えば、それらを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれを細胞内になるように投与することにより（例えば、欠損性または弱毒化したレトロウイルスまたは他のウイルスベクター（米国特許第４，９８０，２８６号を参照のこと）を用いた感染により）、あるいは、裸のＤＮＡの直接注射により、あるいは、微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ、Ｄｕｐｏｎｔ）の使用により、あるいは脂質もしくは細胞表面のレセプターでコーティングするか、または薬剤をトランスフェクトすることにより、リポソーム、微粒子、もしくはマイクロカプセル中へのカプセル化により、あるいは、それらを核に進入することが公知であるペプチドと結合させて投与することにより、レセプター媒介のエンドサイトーシスを受けるリガンドとそれを結合させて投与することにより（例えば、ＷｕおよびＷｕ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２（１９８７）を参照のこと）（レセプターを特異的に発現する細胞型を標的にするために用いられ得る）達成され得る。別の実施形態において、核酸－リガンド複合体が形成され得、ここで、このリガンドはエンドソームを破壊するフソジェニック（ｆｕｓｏｇｅｎｉｃ）ウイルス性ペプチドを含み、核酸がリソソーム分解を回避するようにする。さらに別の実施形態において、核酸は、特異的なレセプターを標的とすることにより、細胞特異的な取り込みおよび発現についてインビボで標的とされ得る（例えば、ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０６１８０号；同第ＷＯ９２／２２６３５号；同第ＷＯ９２／２０３１６号；同第ＷＯ９３／１４１８８号、同第ＷＯ９３／２０２２１号を参照のこと）。あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして相同組換えにより、発現のために宿主細胞ＤＮＡ中に組み込まれ得る（ＫｏｌｌｅｒおよびＳｍｉｔｈｉｅｓ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８９３２－８９３５（１９８９）；Ｚｉｊｌｓｔｒａら，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：４３５－４３８（１９８９））。

【０２５６】

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

，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９３：６４４－６５１（１９９４）；Ｋｉｅｍら，Ｂｌｏｏｄ　８３：１４６７－１４７３（１９９４）；ＳａｌｍｏｎｓおよびＧｕｎｚｂｅｒｇ，Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　４：１２９－１４１（１９９３）；ならびにＧｒｏｓｓｍａｎおよびＷｉｌｓｏｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．ｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　ａｎｄ　Ｄｅｖｅｌ．３：１１０－１１４（１９９３）。

【０２５７】

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

【０２５８】

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

【０２５９】

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

【０２６０】

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

【０２６１】

得られた組換え細胞は、当該分野において公知の様々な方法により、患者へ送達され得る。組換え血球（例えば、造血幹細胞または造血前駆細胞）は、好ましくは、静脈内に投

与される。使用が考えられる細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、そして当業者により決定され得る。

【０２６２】

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

【０２６３】

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

【０２６４】

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

【０２６５】

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

【０２６６】

（治療活性または予防活性の実証）

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の治療有用性または予防有用性を実証するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および／または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術（ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない）を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるかどうかを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養において増殖され、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

【０２６７】

（治療的／予防的な投与および組成物）

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

【０２６８】

化合物が核酸または免疫グロブリンを含む場合に使用され得る処方物および投与方法は

、上記に記載され；さらなる適切な処方物および投与経路は、本明細書中で以下に記載されたものの中から選択され得る。

【０２６９】

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

【０２７０】

特定の実施形態において、本発明の薬学的化合物または組成物を、処置の必要な領域に局所的に投与することが望まれ得る；これは、制限する目的ではないが、例えば、手術中の局部注入、局所適用（例えば、手術後の創傷包帯との組み合わせて）により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラント（このインプラントは、シアラスティック（ｓｉａｌａｓｔｉｃ）膜のような膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、またはゼラチン様材料である）により達成され得る。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する場合、タンパク質が吸収されない材料を使用するために注意が払われなければならない。

【０２７１】

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

【０２７２】

さらに別の実施形態において、化合物または組成物は制御された放出システム中で送達され得る。１つの実施形態において、ポンプが用いられ得る（Ｌａｎｇｅｒ，（前出）；Ｓｅｆｔｏｎ，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１（１９８７）；Ｂｕｃｈｗａｌｄら，Ｓｕｒｇｅｒｙ ８８：５０７（１９８０）；Ｓａｕｄｅｋら，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４（１９８９）を参照のこと）。別の実施形態において、高分子材料が用いられ得る（Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，ＬａｎｇｅｒおよびＷｉｓｅ（編），ＣＲＣ Ｐｒｅｓ．，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ（１９７４）；Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ，Ｄｒｕｇ Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ，ＳｍｏｌｅｎおよびＢａｌｌ（編），Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４）；ＲａｎｇｅｒおよびＰｅｐｐａｓ，Ｊ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｓｃｉ．Ｒｅｖ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．２３：６１（１９８３）を参照のこと；Ｌｅｖｙら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１９０（１９８５）；Ｄｕｒｉｎｇら，Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．２５：３５１（１９８９）；Ｈｏｗａｒｄら，Ｊ．Ｎ

ｅｕｒｏｓｕｒｇ．７１：１０５（１９８９）もまた参照のこと）。さらに別の実施形態において、制御された放出システムは、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、全身用量の一部のみを必要とする（例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ，Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，（前出），第２巻，１１５～１３８頁（１９８４）を参照のこと）。

【０２７３】

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

【０２７４】

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

【０２７５】

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

【０２７６】

好ましい実施形態において、組成物は、慣用手順に従って、ヒトへの静脈内投与のために採用された薬学的組成物として、処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤および注射の部位での痛みを緩和するリグノカインのような局部麻酔を含み得る。一般的には、成分

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

【０２７７】

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

【０２７８】

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

【０２７９】

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

【０２８０】

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

【０２８１】

（診断および画像化）

目的のポリペプチドに特異的に結合する標識化抗体、ならびにその誘導体およびそのアナログは、診断目的のために使用されて、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連する疾患、障害および／または状態を検出、診断またはモニターし得る。本発明は、目的のポリペプチドの異常な発現の検出を提供し、これは、（ａ）目的のポリペプチドに特異的な１つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（ｂ）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、異常な発現を示す。

【０２８２】

本発明は、障害を診断するための診断アッセイを提供し、このアッセイは、（ａ）目的のポリペプチドに特異的な１つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的の

ポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（ｂ）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、特定の障害を示す。癌に関して、個体由来の生検組織における比較的高い量の転写物の存在は、疾患の発生についての素因を示し得るか、または実際の臨床症状の出現前に疾患を検出するための手段を提供し得る。この型のより決定的な診断は、保健専門家に予防手段を使用させること、またはより早期の積極的な処置を可能にし得、これにより、癌の発生またはさらなる進行を予防する。

【０２８３】

本発明の抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を使用して生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイに使用し得る（例えば、Ｊａｌｋａｎｅｎら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７－３０９６（１９８７）を参照のこと）。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）および放射免疫アッセイ（ＲＩＡ））が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野において公知であり、そして酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）；放射性同位体（例えば、ヨウ素（１２５Ｉ、１２１Ｉ）、炭素（１４Ｃ）、硫黄（３５Ｓ）、トリチウム（３Ｈ）、インジウム（１１２Ｉｎ）、およびテクネチウム（９９Ｔｃ））；発光標識（例えば、ルミノール）；ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、ならびにビオチンが挙げられる。

【０２８４】

本発明の１つの局面は、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおける、目的のポリペプチドの異常な発現と関連する疾患または障害の検出および診断である。１つの実施形態において、診断は、ａ）目的のポリペプチドに特異的に結合する有効量の標識化分子を被験体に（例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に）投与する工程；ｂ）このポリペプチドが発現する被験体内の部位でこの標識化分子が優先的に濃縮することを可能にするために（および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるために）投与後、時間間隔を待つ工程；ｃ）バックグラウンドレベルを決定する工程；およびｄ）この被験体中の標識化分子を検出する工程、を包含し、その結果、このバックグラウンドレベルを越える標識化分子の検出は、この被験体が目的のポリペプチドの異常な発現と関連する特定の疾患または障害を有することを示す。バックグラウンドレベルは、特定の系について以前に決定された標準的な値と、検出された標識化分子の量を比較する工程を包含する種々の方法により決定され得る。

【０２８５】

被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、約５～２０ミリキュリーの９９ｍＴｃの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌら、「Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ」（Ｔｕｍｏｒ Ｉｍａｇｉｎｇ：Ｔｈｅ Ｒａｄｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒの第１３章、Ｓ．Ｗ．ＢｕｒｃｈｉｅｌおよびＢ．Ａ．Ｒｈｏｄｅｓ編、Ｍａｓｓｏｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｉｎｃ．（１９８２）に記載される。

【０２８６】

用いられる標識の型および投与の様式を含む、いくつかの可変要素に依存して、標識された分子が被験体の部位に優先的に濃縮し、そして結合されていない標識された分子がバックグラウンドレベルまで一掃されることを可能にする、投与後の時間間隔は、６～４８時間または６～２４時間または６～１２時間である。別の実施形態においては、投与後の

時間間隔は、５～２０日間または５～１０日間である。
【０２８７】
１つの実施形態においては、疾患または障害のモニタリングは、その疾患または障害を診断するための方法を繰り返すこと（例えば、最初の診断後１ヶ月、最初の診断後６ヶ月、最初の診断後１年など）により行われる。
【０２８８】
標識された分子の存在は、インビボ走査について当該分野において公知の方法を用いて、患者から検出され得る。これらの方法は、用いられる標識の型に依存する。当業者は、特定の標識を検出するための適切な方法を決定し得る。本発明の診断方法において用いられ得る方法およびデバイスとしては、限定はされないが、コンピューター断層撮影（ＣＴ）、陽子（ｐｏｓｉｔｉｏｎ）射出断層撮影法（ＰＥＴ）のような全身走査、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、および超音波検査法が挙げられる。
【０２８９】
特定の実施形態においては、この分子は放射性同位体で標識され、そして放射線応答性の外科用機器を用いて患者から検出される（Ｔｈｕｒｓｔｏｎら、米国特許第５，４４１，０５０号）。別の実施形態においては、この分子は蛍光化合物で標識され、そして蛍光応答性の走査機器を用いて患者から検出される。別の実施形態においては、この分子は陽電子射出金属で標識され、そして陽子射出断層撮影法を用いて患者（ｐａｔｅｎｔ）から検出される。さらに別の実施形態においては、この分子は常磁性標識で標識され、そして磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）を用いて患者から検出される。
【０２９０】
（キット）
本発明は、上記の方法において使用され得るキットを提供する。１つの実施形態において、キットは、１つ以上の容器において、本発明の抗体、好ましくは精製した抗体を備える。特定の実施形態において、本発明のキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチドを備える。このエピトープは、キット中に含まれる抗体と特異的に免疫反応する。好ましくは、本発明のキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体をさらに備える。別の特定の実施形態において、本発明のキットは、目的のポリペプチドへの抗体の結合を検出するための手段を備える（例えば、この抗体は、検出可能な基質（例えば、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物もしくは発光化合物）に結合体化され得るか、または一次抗体を認識する二次抗体が、検出可能な基質と結合体化され得る）。
【０２９１】
本発明の別の特定の実施形態において、キットは、増殖性および／または癌性のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対して特異的な抗体を含む血清のスクリーニングに使用するための診断キットである。このようなキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体を備え得る。このようなキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチド抗原を備え得る。このエピトープは、少なくとも１つの抗ポリペプチド抗原抗体と特異的に免疫反応する。さらに、このようなキットは、抗原に対する上記の抗体の結合を検出するための手段を備える（例えば、抗体は、蛍光化合物（例えば、フローサイトメトリーにより検出され得るフルオレセインまはたローダミン）と結合体化され得る）。特定の実施形態において、キットは、組換え的に産生されたポリペプチド抗原または化学的に合成されたポリペプチド抗原を備え得る。キットのポリペプチド抗原はまた、固体支持体に付着され得る。
【０２９２】
より特定の実施形態において、上記のキットの検出手段は、上記のポリペプチド抗原が付着する固体支持体を備える。このようなキットはまた、非付着レポーター標識化抗ヒト抗体を備え得る。この実施形態において、ポリペプチド抗原への抗体の結合は、上記のレポーター標識化抗体の結合によって検出され得る。
【０２９３】
さらなる実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清のスク

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

【０２９４】

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

【０２９５】

上記アッセイにおいて、固体表面試薬は、固体支持体物質（例えば、ポリマービーズ、ディップスティック、９６ウェルプレートまたは濾過材料）へタンパク質物質を付着することについての公知の技術によって調製される。これらの付着法は、一般に、支持体へのタンパク質の非特異的吸着またはタンパク質の共有結合性の付着（代表的に、固体支持体上の化学的反応基に対して遊離のアミン基（例えば、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基、もしくはアルデヒド基）による）を包含する。あるいは、ストレプトアビジンコートプレートが、ビオチン化抗原と組み合わせて使用され得る。

【０２９６】

従って、本発明は、この診断方法を実施するためのアッセイ系またはキットを提供する。このキットは、一般に、表面に結合した組換え抗原を有する支持体、および表面に結合した抗抗原抗体を検出するためのレポーター標識化抗ヒト抗体を含む。

【０２９７】

（融合タンパク質）

本発明の任意のポリペプチドは、融合タンパク質を産生するために使用され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、第２のタンパク質と融合される場合、抗原性タグとして使用され得る。本発明のポリペプチドに対して惹起される抗体は、ポリペプチドに結合することによって、第２のタンパク質を間接的に検出するために使用され得る。さらに、分泌されるタンパク質は、細胞位置を輸送シグナルに基づいて標的化するので、本発明のポリペプチドは、他のタンパク質に一旦融合されると標的化分子として使用され得る。

【０２９８】

本発明のポリペプチドと融合され得るドメインの例は、異種シグナル配列のみならず、他の異種機能性領域をも含む。融合は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。

【０２９９】

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

【０３００】

さらに、本発明のポリペプチド（フラグメント、そして特にエピトープを含む）は、免

疫グロブリン（ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＭ）の定常ドメインまたはそれらの部分（ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、およびそれらの任意の組み合わせ（ドメイン全体およびそれらの部分の両方を含む））の一部と組み合わせられ、キメラポリペプチドを生じ得る。これらの融合タンパク質は精製を容易にし、そしてインビボにおける増大した半減期を示す。１つの報告された例は、ヒトＣＤ４ポリペプチドの最初の２つのドメイン、および哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載している（ＥＰ Ａ ３９４，８２７； Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ ３３１： ８４－８６（１９８８））。ジスルフィド連結二量体構造（ＩｇＧに起因する）を有する融合タンパク質もまた、モノマー分泌タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子に結合しそして中和するのにさらに効率的であり得る（Ｆｏｕｎｔｏｕｌａｋｉｓら、Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７０：３９５８－３９６４（１９９５））。これらの融合タンパク質をコードする核酸を含むか、あるいはこのような核酸から構成されるポリヌクレオチドもまた本発明によって包含される。

【０３０１】

同様に、ＥＰ－Ａ－Ｏ ４６４ ５３３（カナダ国対応特許第２０４５８６９号）は、別のヒトタンパク質またはその部分とともに免疫グロブリン分子の定常領域の種々の部分を含む融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質のＦｃ部分は、治療および診断において有益であり、従って、例えば、改良された薬物動態学的な特性を生じ得る（ＥＰ－Ａ ０２３２ ２６２）。あるいは、融合タンパク質が発現され、検出され、そして精製された後に、Ｆｃ部分を欠失させることが望ましい。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、Ｆｃ部分は、治療および診断を妨害し得る。例えば、薬物の発見において、ｈＩＬ－５のようなヒトタンパク質は、ｈＩＬ－５のアンタゴニストを同定するための高処理能力スクリーニングアッセイの目的のためにＦｃ部分と融合されてきた（Ｄ．Ｂｅｎｎｅｔｔら、Ｊ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ ８：５２－５８（１９９５）；Ｋ．Ｊｏｈａｎｓｏｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：９４５９－９４７１（１９９５）を参照のこと）。

【０３０２】

さらに、本発明のポリペプチドはマーカー配列（例えば、融合されたポリペプチドの精製を容易にするペプチド）に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけヘキサ－ヒスチジンペプチド（例えば、ｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，９２５９ Ｅｔｏｎ Ａｖｅｎｕｅ，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ，９１３１１）において提供されるタグ）であり、これらの多くのマーカーアミノ酸配列が市販されている。例えば、Ｇｅｎｔｚら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８２１－８２４（１９８９）に記載されるように、ヘキサ－ヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグである「ＨＡ」タグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する（Ｗｉｌｓｏｎら、Ｃｅｌｌ ３７：７６７（１９８４））。

【０３０３】

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

【０３０４】

（ベクター、宿主細胞、およびタンパク質産生）

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

【０３０５】

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

は荷電脂質との複合体において導入される。ベクターがウイルスである場合、ウィルスベクターは、適切なパッケージング細胞株を使用してインビトロでパッケージングされ、次いで宿主細胞に形質導入され得る。

【０３０６】

ポリヌクレオチド挿入物は、適切なプロモーター（いくつか挙げれば、例えば、ファージλＰＬプロモーター、Ｅ．ｃｏｌｉ　ｌａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｐｈｏＡプロモーターおよびｔａｃプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーターおよびＳＶ４０後期プロモーター、ならびにレトロウイルスＬＴＲのプロモーター）に作動可能に連結されるべきである。他の適切なプロモーターは当業者に公知である。発現構築物はさらに、転写開始、転写終結のための部位、および転写領域において、翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。構築物によって発現される転写物のコード部分は、好ましくは、始めに翻訳開始コドン、および翻訳されるためのポリペプチドの末端に適切に位置される終結コドン（ＵＡＡ、ＵＧＡまたはＵＡＧ）を含む。

【０３０７】

示されるように、発現ベクターは、好ましくは少なくとも１つの選択マーカーを含む。このようなマーカーは、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、Ｇ４１８、またはネオマイシン耐性遺伝子、ならびにＥ．ｃｏｌｉおよび他の細菌において培養するためのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む。適切な宿主の代表的な例は、細菌細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ、ＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓおよびＳａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ細胞）；酵母細胞のような真菌細胞（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅまたはＰｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ（ＡＴＣＣ受託番号２０１１７８））；Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌｉａ　Ｓ２およびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ　Ｓｆ９細胞のような昆虫細胞；ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、２９３細胞、およびＢｏｗｅｓメラノーマ細胞のような動物細胞；ならびに植物細胞を含むが、これらに限定されない。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および条件は、当該分野で公知である。

【０３０８】

細菌における使用のために好ましいベクターの中には、ｐＱＥ７０、ｐＱＥ６０およびｐＱＥ－９（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．から入手可能）；ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔベクター、Ｐｈａｇｅｓｃｒｉｐｔベクター、ｐＮＨ８Ａ、ｐＮＨ１６ａ、ｐＮＨ１８Ａ、ｐＮＨ４６Ａ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．から入手可能）；およびｐｔｒｃ９９ａ、ｐＫＫ２２３－３、ｐＫＫ２３３－３、ｐＤＲ５４０、ｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．から入手可能）を含む。好ましい真核生物ベクターの中には、ｐＷＬＮＥＯ、ｐＳＶ２ＣＡＴ、ｐＯＧ４４、ｐＸＴ１およびｐＳＧ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅから入手可能）；ならびにｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧおよびｐＳＶＬ（Ｐｈａｒｍａｃｉａから入手可能）がある。酵母菌系における使用のための好ましい発現ベクターは、ｐＹＥＳ２、ｐＹＤ１、ｐＴＥＦ１／Ｚｅｏ、ｐＹＥＳ２／ＧＳ、ｐＰＩＣＺ、ｐＧＡＰＺ、ｐＧＡＰＺａｌｐｈ、ｐＰＩＣ９、ｐＰＩＣ３．５、ｐＨＩＬ－Ｄ２、ｐＨＩＬ－Ｓ１、ｐＰＩＣ３．５Ｋ、ｐＰＩＣ９Ｋ、およびｐＡＯ８１５（すべてＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｂａｄ，ＣＡから入手可能）を含むが、これらに限定されない。他の適切なベクターは当業者に容易に明らかである。

【０３０９】

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

【０３１０】

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

【０３１１】

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

【０３１２】

１つの実施形態においては、酵母Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓは、真核生物系において本発明のポリペプチドを発現するために用いられる。Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓは、メタノールをその唯一の炭素源として代謝し得るメチロトローフィック（ｍｅｔｈｙｌｏｔｒｏｐｈｉｃ）酵母である。メタノール代謝経路における主なステップは、O_2を用いてメタノールを酸化し、ホルムアルデヒドにすることである。この反応は、酵素アルコールオキシダーゼにより触媒される。メタノールをその唯一の炭素源として代謝するために、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓは、O_2に対するアルコールオキシダーゼの相対的に低い親和性にいくぶん起因して、高いレベルのアルコールオキシダーゼを産生しなければならない。従って、主要な炭素源としてのメタノールによる増殖培地において、２つのアルコールオキシダーゼ遺伝子（ＡＯＸ１）のうちの１つのプロモーター領域は、非常に活性である。メタノールの存在下において、ＡＯＸ１遺伝子から産生されるアルコールオキシダーゼは、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ中の総可溶性タンパク質のおよそ３０％までを構成する。Ｅｌｌｉｓ，Ｓ．Ｂ．ら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：１１１１－２１（１９８５）；Ｋｏｕｔｚ，Ｐ．Ｊ．ら、Ｙｅａｓｔ　５：１６７－７７（１９８９）；Ｔｓｃｈｏｐｐ，Ｊ．Ｆ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１５：３８５９－７６（１９８７）を参照のこと。従って、全体または一部のＡＯＸ１調節塩基配列の転写調節下で、異種コード配列（例えば、本発明のポリヌクレオチド）は、メタノールの存在下で増殖したＰｉｃｈｉａ酵母において例外的に高いレベルで発現される。

【０３１３】

１つの例においては、プラスミドベクターｐＰＩＣ９Ｋは、本明細書中に記述されるように、本質的に以下に記載されるようなＰｉｃｈｅａ酵母系において本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡを発現するために用いられる：「Ｐｉｃｈｉａ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ」、Ｄ．Ｒ．ＨｉｇｇｉｎｓおよびＪ．Ｃｒｅｇｇ編、Ｔｈｅ　Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ，１９９８。この発現ベクターは、多重クローニング部位の上流に位置するＰｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓアルカリホスファターゼ（ＰＨＯ）分泌シグナルペプチド（すなわち、リーダーペプチド）に連結した強いＡＯＸ１プロモーターの効力により、本発明のＰＳＦ－２タンパク質の発現および分泌を可能にする。

【０３１４】

多くの他の酵母ベクターは、当業者が容易に理解するように、提案される発現構築物が、転写、翻訳、分泌（所望される場合）などのために適切に配置されたシグナル（必要ならばインフレームＡＵＧを含む）を提供する限り、ｐＰＩＣ９Ｋ（例えば、ｐＹＥＳ２、ｐＹＤ１、ｐＴＥＦＩ／Ｚｅｏ、ｐＹＥＳ２／ＧＳ、ｐＰＩＣＺ、ｐＧＡＰＺ、ＰＧＡＰＺα、ｐＰＩＣ９、ｐＰＩＣ３．５、ｐＨＩＬ－Ｄ２、ＰＨＩＬ－Ｓ１、ｐＰＩＣ３．５Ｋ、およびＰＡＯ８１５）の代わりに用いられ得る。

【０３１５】

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

【０３１６】

本明細書において議論されるベクター構築物を含む宿主細胞を含むことに加えて、本発明はまた、脊椎動物起源（特に、哺乳動物起源）の一次（ｐｒｉｍａｒｙ）宿主細胞、二次（ｓｅｃｏｎｄａｒｙ）宿主細胞、および不死化宿主細胞を含む。これらの宿主細胞は、内因性の遺伝物質（例えば、コード配列）を欠失または置換するように操作されており、そして／または本発明のポリヌクレオチドと作動可能に連結された遺伝物質（例えば、異種ポリヌクレオチド配列）を含むように操作され、そして内因性のポリヌクレオチドを活性化、変更、および／または増幅する。例えば、当該分野で公知の技術は、相同組換えを介して、異種制御領域（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）および内因性ポリヌクレオチド配列を作動可能に連結するために使用され得、その結果、新しい転写ユニットを形成する（例えば、１９９７年６月２４日に発行された米国特許第５，６４１，６７０号；１９９８年３月３１日に発行された米国特許第５，７３３，７６１号；１９９６年９月２６日に公開された国際公開第ＷＯ　９６／２９４１１号；１９９４年８月４日に公開された国際公開第ＷＯ　９４／１２６５０；Ｋｏｌｌｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：８９３２－８９３５（１９８９）；およびＺｉｊｌｓｔｒａら，Ｎａｔｕｒｅ　３４２：４３５－４３８（１９８９）を参照のこと。これらの開示の各々は、それら全体において参考として援用される）。

【０３１７】

さらに、本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の技術を用いて化学合成され得る（例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，１９８３，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｎ．Ｙ．およびＨｕｎｋａｐｉｌｌｅｒら，Ｎａｔｕｒｅ，３１０：１０５－１１１（１９８４）を参照のこと）。例えば、本発明のポリペプチド配列のフラグメントに対応するポリペプチドは、ペプチド合成機の使用により合成され得る。さらに、所望の場合、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸アナログが、置換または付加としてこのポリペプチド配列に導入され得る。非古典的アミノ酸としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：通常のアミノ酸のＤ異性体、２，４－ジアミノ酪酸、ａ－アミノイソ酪酸、４－アミノ酪酸、Ａｂｕ、２－アミノ酪酸、ｇ－Ａｂｕ、ｅ－Ａｈｘ、６－アミノヘキサン酸、Ａｉｂ，２－アミノイソ酪酸、３－アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ｂ－アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸（例えば、ｂ－メチルアミノ酸）、Ｃａ－メチルアミノ酸、Ｎａ－メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸アナログ。さらにアミノ酸はＤ（右旋性）またはＬ（左旋性）であり得る。

【０３１８】

本発明は、翻訳の間または翻訳後に、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子または他の細胞性リガンドへの結合などによって示差的に改変されるポリペプチドを含む。任意の多数の化学的改変は、以下を含むがこれらに限定されない公知の技術によって

実施され得る：臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、Ｖ８プロテアーゼ、ＮａＢＨ$_4$による特異的化学的切断；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシンの存在下での代謝合成；など。

【０３１９】

本発明によって含まれるさらなる翻訳後修飾としては、例えば、以下などが挙げられる：Ｎ結合型もしくはＯ結合型の炭水化物鎖（Ｎ末端またはＣ末端のプロセシング）、アミノ酸バックボーンへの化学部分の結合、Ｎ結合型もしくはＯ結合型の炭水化物鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのＮ末端メチオニン残基の付加もしくは欠失。このポリペプチドはまた、検出可能な標識（例えば、酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識）を用いて改変して、このタンパク質の検出および単離が可能にされ得る。

【０３２０】

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

【０３２１】

このポリマーは、任意の分子量のポリマーであり得、そして分枝状でまたは非分枝状であり得る。ポリエチレングリコールに関しては、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の容易さのために、約１ｋＤａと約１００ｋＤａとの間（用語「約（およそ）」は、ポリエチレングリコールの調製物において、いくつかの分子は示した分子量よりも重く、いくつかは示した分子量よりも軽いことを示す）である。所望の治療プロフィール（例えば、所望される持続放出の持続時間、存在する場合には生物学的活性に対する効果、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または抗原性がないこと、および治療タンパク質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知の効果）に依存して、他のサイズが用いられ得る。例えば、ポリエチレングリコールは、約２００、５００、１０００、１５００、２０００、２５００、３０００、３５００、４０００、４５００、５０００、５５００、６０００、６５００、７０００、７５００、８０００、８５００、９０００、９５００、１０，０００、１０，５００、１１，０００、１１，５００、１２，０００、１２，５００、１３，０００、１３，５００、１４，０００、１４，５００、１５，０００、１５，５００、１６，０００、１６，５００、１７，０００、１７，５００、１８，０００、１８，５００、１９，０００、１９，５００、２０，０００、２５，０００、３０，０００、３５，０００、４０，０００、５０，０００、５５，０００、６０，０００、６５，０００、７０，０００、７５，０００、８０，０００、８５，０００、９０，０００、９５，０００、または１００，０００ｋＤａの平均分子量を有し得る。

【０３２２】

上記のように、ポリエチレングリコールは、分枝構造を有していてもよい。分枝ポリエチレングリコールは、例えば、以下に記載される：米国特許第５，６４３，５７５号；Ｍｏｒｐｕｒｇｏら、Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．５６：５９－７２（１９９６）；Ｖｏｒｏｂｊｅｖら、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ １８：２７４５－２７５０（１９９９）；およびＣａｌｉｃｅｔｉら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．１０：６３８－６４６（１９９９）（これらの各々の開示は、本明細書中において参考として援用される）。

【０３２３】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学的部分）は、このタンパク質の機能的ドメインまたは抗原性ドメインに対する効果を考慮してこのタンパク質に結合されるべきで

ある。当業者に利用可能な多数の結合方法が存在する（例えば、本明細書中に参考として援用される、ＥＰ　０　４０１　３８４（Ｇ－ＣＳＦにＰＥＧを結合する）、Ｍａｌｉｋら，Ｅｘｐ．Ｈｅｍａｔｏｌ．２０：１０２８－１０３５（１９９２）（塩化トレシル（ｔｒｅｓｙｌ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ）を用いたＧＭ－ＣＳＦのペグ化を報告する）もまた参照のこと）。例えば、ポリエチレングリコールは、反応性基（例えば、遊離のアミノ基またはカルボキシル基）を介してアミノ酸残基により共有結合され得る。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合し得る基である。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基としては、リジン残基およびＮ末端アミノ酸残基が挙げられ得る；遊離のカルボキシル基を有するアミノ酸残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびＣ末端アミノ酸残基が挙げられ得る。スルフヒドリル残基もまた、ポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として用いられ得る。治療目的のために好ましいのは、アミノ基での結合、例えば、Ｎ末端またはリジン基での結合である。

【０３２４】

上記で示唆されるように、ポリエチレングリコールは、多くのアミノ酸残基のいずれかへの結合を介してタンパク質に結合され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、リジン残基、ヒスチジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、またはシステイン残基への共有結合を介してタンパク質に連結され得る。１つ以上の反応化学系を用いて、タンパク質の特定のアミノ酸残基（例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステイン）またはタンパク質の１つより多くの型のアミノ酸残基（例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システインおよびそれらの組み合わせ）にポリエチレングリコールを結合し得る。

【０３２５】

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

【０３２６】

上記のように、本発明のタンパク質のペグ化は、かなり多数の手段によって、達成され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、直接的または介在性リンカーによってのいずれかによってタンパク質に接続され得る。タンパク質にポリエチレングリコールを接続させるためのリンカーレス（ｌｉｎｋｅｒｌｅｓｓ）システムは、Ｄｅｌｇａｄｏら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａ．Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｒ　Ｓｙｓ．９：２４９－３０４（１９９２）；Ｆｒａｎｃｉｓら、Ｉｎｔｅｒｎ．Ｊ．ｏｆ　Ｈｅｍａｔｏｌ．６８：１－１８（１９９８）；米国特許第４，００２，５３１号；米国特許第５，３４９，０５２号；ＷＯ９５／０６０５８；およびＷＯ９８／３２４６６に記載される。これらの各々の開示は、本明細書中に参考として援用される。

【０３２７】

介在するリンカーを伴わずに、タンパク質のアミノ酸残基に直接的にポリエチレングリコールを結合させる１つの系は、トレシル化（ｔｒｅｓｙｌａｔｅｄ）ＭＰＥＧ（これは、塩化トレシル（ｔｒｅｓｙｌｃｈｌｏｒｉｄｅ）（$ClSO_2CH_2CF_3$）を使用して、モノメトキシ（ｍｏｎｍｅｔｈｏｘｙ）ポリエチレングリコール（ＭＰＥＧ）を改変することによって生成される）を使用する。トレシル化ＭＰＥＧとのタンパク質の反応に際して、ポリエチレングリコールは、タンパク質のアミン基に直接結合される。従って、本

発明は、本発明のタンパク質と２，２，２－トリフルオロエタン（ｔｒｉｆｌｕｏｒｅｏｔｈａｎｅ）スルホニル基を有するポリエチレングリコール分子とを反応させることによって生成されるタンパク質－ポリエチレングリコール結合体を含む。

【０３２８】

ポリエチレングリコールはまた、多くの異なる介在リンカーを使用して、タンパク質に結合され得る。例えば、米国特許第５，６１２，４６０号（この開示全体が、本明細書中で参考として援用される）は、タンパク質にポリエチレングリコールを結合させるためのウレタンリンカーを開示する。ポリエチレングリコールが、リンカーによってタンパク質に結合されるタンパク質－ポリエチレングリコール結合体はまた、ＭＰＥＧ－スクシンイミジルスクシネート（ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌｓｕｃｃｉｎａｔｅ）、１，１'－カルボニルジイミダゾールで活性化されたＭＰＥＧ、ＭＰＥＧ－２，４，５－トリクロロフェニルカルボネート（ｔｒｉｃｈｌｏｒｏｐｅｎｙｌｃａｒｂｏｎａｔｅ）、ＭＰＥＧ－ｐ－ニトロフェノールカルボネート、および種々のＭＰＥＧ－スクシネート誘導体のような化合物とのタンパク質の反応によって生成され得る。さらなる多くのポリエチレングリコール誘導体、およびタンパク質にポリエチレングリコールを結合させるための反応化学が、ＷＯ９８／３２４６６（この開示全体が、本明細書中で参考として援用される）に記載される。本明細書中に示される反応化学を使用して生成されるペグ化タンパク質産物は、本発明の範囲内に含まれる。

【０３２９】

本発明の各タンパク質に結合されたポリエチレングリコール部分の数（すなわち、置換の程度）もまた、変動し得る。例えば、本発明のペグ化タンパク質は、平均して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１５、１７、２０個またはそれより多いポリエチレングリコール分子を連結し得る。同様に、平均の置換の程度は、タンパク質１分子あたり１～３、２～４、３～５、４～６、５～７、６～８、７～９、８～１０、９～１１、１０～１２、１１～１３、１２～１４、１３～１５、１４～１６、１５～１７、１６～１８、１７～１９、または１８～２０個のポリエチレングリコール部分のような範囲内である。置換の程度を決定する方法は、例えば、Ｄｅｌｇａｄｏら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａ．Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓ．９：２４９－３０４（１９９２）において考察される。

【０３３０】

本発明のポリペプチドは、モノマーまたはマルチマー（すなわち、ダイマー、トリマー、テトラマーおよびより高度のマルチマー）であり得る。従って、本発明は、モノマーおよびマルチマーの本発明のポリペプチド、それらの調製ならびにそれらを含む組成物（好ましくは、治療剤（Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ））に関する。特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、モノマー、ダイマー、トリマーまたはテトラマーである。さらなる実施形態では、本発明のマルチマーは、少なくともダイマー、少なくともトリマー、または少なくともテトラマーである。

【０３３１】

本発明によって含まれるマルチマーは、ホモマーまたはヘテロマーであり得る。本明細書中で用いられる場合、用語ホモマーは、配列番号Ｙのアミノ酸配列に対応するポリペプチドまたは寄託されたｃＤＮＡクローンによって含まれるｃＤＮＡによってコードされるポリペプチド（本明細書中に記載されるポリペプチドの、フラグメント、改変体、スプライス改変体、および融合タンパク質を含む）のみを含むマルチマーをいう。これらのホモマーは、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み得る。特定の実施形態では、本発明のホモマーは、同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドのみを含むマルチマーである。別の特定の実施形態では、本発明のホモマーは、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むマルチマーである。特定の実施形態では、本発明のマルチマーは、ホモダイマー（例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む）あるいはホモトリマー（例えば、同一および／または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む）である。さらなる実施形態では、本発明のホモマー性マルチマーは、少な

くともホモダイマー、少なくともホモトリマーまたは少なくともホモテトラマーである。
【０３３２】
本明細書中で用いられる場合、用語ヘテロマーとは、本発明のポリペプチドに加えて１以上の異種ポリペプチド（すなわち、異なるタンパク質のポリペプチド）を含むマルチマーをいう。特定の実施形態では、本発明のマルチマーは、ヘテロダイマー、ヘテロトリマーまたはヘテロテトラマーである。さらなる実施形態では、本発明のヘテロマー性マルチマーは、少なくともヘテロダイマー、少なくともヘテロトリマーまたは少なくともヘテロテトラマーである。
【０３３３】
本発明のマルチマーは、疎水性、親水性、イオン性および／もしくは共有結合的な結合の結果であり得、そして／または例えば、リポソーム形成によって間接連結され得る。従って、１つの実施形態では、本発明のマルチマー（例えば、ホモダイマーまたはホモトリマーなど）は、本発明のポリペプチドが溶液中で互いに接触する場合に形成される。別の実施形態では、本発明のヘテロマルチマー（例えば、ヘテロトリマーまたはヘテロテトラマー）は、本発明のポリペプチドが、溶液中で本発明のポリペプチドに対する抗体（本発明の融合タンパク質における異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）と接触した場合に形成される。他の実施形態では、本発明のマルチマーは、本発明のポリペプチドとの、および／または本発明のポリペプチド間での共有結合によって形成される。このような共有結合は、ポリペプチド配列（例えば、配列表に記載されるか、または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドによってコードされるポリペプチドに含まれる）に含まれる１以上のアミノ酸残基を含み得る。１例では、この共有結合は、ネイティブ（すなわち、天然に存在する）ポリペプチドにおいて相互作用するポリペプチド配列内に位置するシステイン残基間での架橋である。別の例では、この共有結合は、化学的操作または組換え操作の結果である。あるいは、このような共有結合は、本発明の融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列において含まれる１以上のアミノ酸残基を含み得る。
【０３３４】
１例では、共有結合は、本発明の融合タンパク質に含まれる異種配列間にある（例えば、米国特許第５，４７８，９２５号を参照のこと）。特定の例では、この共有結合は、（本明細書中に記載されるような）本発明のＦｃ融合タンパク質に含まれる異種配列間にある。別の特定の例では、本発明の融合タンパク質の共有結合は、共有結合したマルチマーを形成し得る別のタンパク質（例えば、オステオプロテゲリン（ｏｓｅｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ）など）由来の異種ポリペプチド配列間にある（例えば、国際公開番号ＷＯ９８／４９３０５号（この内容はその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。別の実施形態では、２以上の本発明のポリペプチドは、ペプチドリンカーを通して連結される。例としては、米国特許第５，０７３，６２７号（本明細書中に参考として援用される）に記載されるペプチドリンカーが挙げられる。ペプチドリンカーによって隔てられた複数の本発明のポリペプチドを含むタンパク質は、従来の組換えＤＮＡ技術を用いて産生され得る。
【０３３５】
本発明のマルチマーポリペプチドを調製するための別の方法は、ロイシンジッパーポリペプチド配列またはイソロイシンジッパーポリペプチド配列に融合された本発明のポリペプチドの使用を含む。ロイシンジッパードメインおよびイソロイシンジッパードメインは、そのドメインが見出されるタンパク質のマルチマー形成を促進するポリペプチドである。ロイシンジッパーは元々、いくつかのＤＮＡ結合タンパク質において同定され（Ｌａｎｄｓｃｈｕｌｚら，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４０：１７５９、（１９８８））、そしてそれ以来種々の異なるタンパク質において見出されている。とりわけ公知のロイシンジッパーは、ダイマー形成またはトリマー形成をする、天然に存在するペプチドおよびその誘導体である。本発明の可溶性マルチマータンパク質を生成するために適切なロイシンジッパードメインの例は、本明細書中に参考として援用されるＰＣＴ出願ＷＯ　９４／１０３０８に記載されるロイシンジッパードメインである。溶液中でダイマー形成またはトリマー形成

をするペプチド配列に融合された本発明のポリペプチドを含む組換え融合タンパク質は、適切な宿主細胞中で発現され、そして得られる可溶性マルチマー融合タンパク質は、当該分野で公知の技術を用いて培養上清から回収される。

【０３３６】

本発明のトリマーポリペプチドは、増強された生物学的活性の利点を提供し得る。好ましいロイシンジッパー部分およびイソロイシン部分は、トリマーを優先的に形成する部分である。１例は、本明細書中に参考として援用されるＨｏｐｐｅら（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　３４４：１９１，（１９９４））および米国特許出願第０８／４４６，９２２号に記載されるような肺サーファクタントプロテインＤ（ＳＰＤ）に由来するロイシンジッパーである。天然に存在するトリマータンパク質由来の他のペプチドは、本発明のトリマーポリペプチドの調製において用いられ得る。

【０３３７】

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

【０３３８】

本発明のマルチマーは、当該分野で公知の化学技術を使用して生成され得る。例えば、本発明のマルチマーに含まれることが所望されるポリペプチドは、当該分野で公知のリンカー分子およびリンカー分子長最適化技術を使用して、化学的に架橋され得る（例えば、米国特許第５，４７８，９２５号（これはその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。さらに、本発明のマルチマーは、当該分野で公知の技術を使用して生成されて、マルチマー中に含まれることが所望されるポリペプチドの配列内に位置するシステイン残基間に、１つ以上の分子間架橋を形成し得る（例えば、米国特許第５，４７８，９２５号（これは、本明細書中にその全体が参考として援用される）を参照のこと）。さらに、本発明のポリペプチドは、このポリペプチドのＣ末端またはＮ末端へのシステインまたはビオチンの付加により慣用的に改変され得、そして当該分野で公知の技術が、１つ以上のこれらの改変されたポリペプチドを含むマルチマーを生成するために適用され得る（例えば、米国特許第５，４７８，９２５号（これはその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。さらに、当該分野で公知の技術は、本発明のマルチマーに含まれることを所望されるポリペプチド成分を含むリポソームを生成するために適用され得る（例えば、米国特許第５，４７８，９２５号（これはその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。

【０３３９】

あるいは、本発明のマルチマーは、当該分野で公知の遺伝子操作技術を用いて生成され得る。１つの実施形態では、本発明のマルチマーに含まれるポリペプチドは、本明細書中に記載されるかさもなくば当該分野で公知の融合タンパク質技術を用いて組換え生成される（例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第５，４７８，９２５号を参照のこと）。特定の実施形態では、本発明のホモダイマーをコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、リンカーポリペプチドをコードする配列に連結し、次いでさらに元々のＣ末端からＮ末端の方向とは逆方向でポリペプチドの翻訳産物をコードする合成ポリヌクレオチド（リーダー配列を欠く）に連結することによって生成される（例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第５，４７８，９２５号を参照のこと）。別の実施形態では、本明細書中に記載されるかさもなくば当該分野で公知の組換え技術を適用して、膜貫通ドメイン（または疎水性もしくはシグナルペプチド）を含み、そして膜再構成技術によってリポソームに組み込まれ得る、本発明の組換えポリペプチドを生成する（例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第５，４７８，９２５号を参照のこと）。

【０３４０】

（ポリヌクレオチドの使用）
本明細書中で同定された各々のポリヌクレオチドは、試薬として多数の方法において使用され得る。以下の説明は例示的であるとみなされるべきであり、そして公知の技術を利用する。
【０３４１】
本発明のポリヌクレオチドは、染色体同定のために有用である。実際の配列データ（反復多型性）に基づく染色体マーキング試薬は現在ほとんど利用可能ではないため、新しい染色体マーカーを同定する必要性が存在するままである。本発明の各々のポリヌクレオチドは、染色体マーカーとして使用され得る。
【０３４２】
簡単に言うと、配列は、配列番号Ｘで示される配列からＰＣＲプライマー（好ましくは１５～２５ｂｐ）を調製することによって染色体にマッピングされ得る。プライマーが、ゲノムＤＮＡ中の１つより多くの予測されたエキソンにまたがらないように、プライマーは、コンピューター分析を使用して選択され得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのＰＣＲスクリーニングのために使用される。配列番号Ｘに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが、増幅されたフラグメントを産生する。
【０３４３】
同様に、体細胞ハイブリッドは、特定の染色体に対してポリヌクレオチドをＰＣＲマッピングする迅速な方法を提供する。単一のサーマルサイクラーを使用して１日あたり３つ以上のクローンが割り当てられ得る。さらに、ポリヌクレオチドの下位位置決定（ｓｕｂｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ）は、特定の染色体フラグメントのパネルを用いて達成され得る。使用され得る他の遺伝子マッピング戦略は、インサイチュハイブリダイゼーション、標識フローソート（ｌａｂｅｌｅｄ　ｆｌｏｗ　ｓｏｒｔｅｄ）染色体でのプレスクリーニング、染色体特異的ｃＤＮＡライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる前選択、およびコンピューターマッピング技術（例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、Ｓｈｕｌｅｒ、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１６：４５６～４５９（１９９８）を参照のこと）を含む。
【０３４４】
ポリヌクレオチドの正確な染色体位置はまた、中期染色体スプレッド（ｓｐｒｅａｄ）の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）を使用して獲得され得る。この技術は５００または６００塩基ほどの短さのポリヌクレオチドを使用する；しかし２，０００～４，０００ｂｐのポリヌクレオチドが好ましい。この技術の総説に関しては、Ｖｅｒｍａら、「Ｈｕｍａｎ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ：ａ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｂａｓｉｃ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」，　Ｐｅｒｇａｍｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８８）を参照のこと。
【０３４５】
染色体マッピングについては、ポリヌクレオチドは、個々に（単一染色体またはその染色体上の単一部位をマークするために）またはパネルで（複数部位および／または複数染色体をマークするために）使用され得る。
【０３４６】
本発明のポリヌクレオチドは、放射線（ｒａｄｉａｔｉｏｎ）ハイブリッドマッピング、ＨＡＰＰＹマッピング、およびロングレンジ制限マッピング（ｌｏｎｇ　ｒａｎｇｅ　ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ　ｍａｐｐｉｎｇ）において同様に有用である。これらの技術および当該分野で公知の他の技術の概説については、例えば、Ｄｅａｒ「Ｇｅｎｏｍｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ」ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ　ａｔ　Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ（１９９７）；Ａｙｄｉｎ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．７７：６９１～６９４（１９９９）；Ｈａｃｉａら、Ｍｏｌ．Ｐｓｙｃｈｉａｔｒｙ　３：４８３～４９２（１９９８）；Ｈｅｒｒｉｃｋら、Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ　Ｒｅｓ．７：４０９～４２３（１９９９）；Ｈａｍｉｌｔｏｎら、Ｍ

ｅｔｈｏｄｓ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．６２：２６５～２８０（２０００）；および/またはＯｔｔ，Ｊ．Ｈｅｒｅｄ．９０：６８～７０（１９９９）（これらのそれぞれは、その全体が参考として本明細書において援用される）を参照のこと。

【０３４７】

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

【０３４８】

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

【０３４９】

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

【０３５０】

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

【０３５１】

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

【０３５２】

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

【０３５３】

「本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する（こと）」とは、本発明のポリペプチドのレベルまたはこのポリペプチドをコードするｍＲＮＡのレベルを、第１の生物学

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

【０３５４】

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

【０３５５】

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

【０３５６】

本発明は、化学的に合成された（すなわち、ペプチド核酸（ＰＮＡ）として再現された）または当該分野で公知の他の方法に従って合成された、本発明のポリヌクレオチドを包含する。ＰＮＡの使用は、ポリヌクレオチドが固体支持体、すなわち、遺伝子チップに取り込まれる場合、好ましい形態として役立つ。本発明の目的のために、ペプチド核酸（ＰＮＡ）は、ポリアミド型のＤＮＡアナログであり、そしてアデニン、グアニン、チミンおよびシトシンについての単量体単位が市販されている（Ｐｅｒｃｅｐｔｉｃｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）。ＤＮＡの特定の成分（例えば、リン、酸化リンまたはデオキシリボース誘導体）は、ＰＮＡ中に存在しない。Ｐ．Ｅ．Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ｍ．Ｅｇｈｏｌｍ，Ｒ．Ｈ．ＢｅｒｇおよびＯ．Ｂｕｃｈａｒｄｔ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５４，１４９７（１９９１）；ならびにＭ．Ｅｇｈｏｌｍ，Ｏ．Ｂｕｃｈａｒｄｔ，Ｌ．Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ，Ｃ．Ｂｅｈｒｅｎｓ，Ｓ．Ｍ．Ｆｒｅｉｅｒ，Ｄ．Ａ．Ｄｒｉｖｅｒ，Ｒ．Ｈ．Ｂｅｒｇ、Ｓ．Ｋ．Ｋｉｍ，Ｂ．ＮｏｒｄｅｎおよびＰ．Ｅ．Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ｎａｔｕｒｅ　３６５，６６６（１９９３）によって開示されるように、ＰＮＡは、相補的なＤＮＡ鎖に対して特異的かつ緊密に結合し、そしてヌクレアーゼによって分解されない。実際、ＰＮＡは、ＤＮＡ自体が結合するよりも強力にＤＮＡに結合する。これはおそらく、２つの鎖の間に静電斥力が存在せず、そしてまたポリアミド骨格がより可撓性が高いことによる。これによって、ＰＮＡ／ＤＮＡ二重鎖は、ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖よりも広範囲のストリンジェンシー条件下で結合し、多重鎖ハイブリダイゼーションを行うのをより容易にする。強力な結合に起因して、ＤＮＡを用いてよりも小さいプローブが用いられ得る。さらに、

おそらく、単一の塩基ミスマッチが、ＰＮＡ／ＤＮＡハイブリダイゼーションを用いて決定され得る。なぜなら、ＰＮＡ／ＤＮＡの１５マーにおける単一のミスマッチは、ＤＮＡ／ＤＮＡの１５マー二重鎖については４℃～１６℃であるのに対して、融点（Ｔ．ｓｕｂ．ｍ）を８～２０℃低下させるからである。また、ＰＮＡ中に電荷基が存在しないことは、ハイブリダイゼーションが、低いイオン強度で行われ得、そして分析の間の塩によって可能な妨害を減少させることを意味する。

【０３５７】

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

【０３５８】

病理学的細胞増殖性の疾患、障害および／または状態はしばしば、癌原遺伝子の不適切な活性化に関連する（Ｇｅｌｍａｎｎ，Ｅ．Ｐ．ら，「Ｔｈｅ Ｅｔｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ａｃｕｔｅ Ｌｅｕｋｅｍｉａ：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｖｉｒａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ」，Ｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ Ｄｉｓｅａｓｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｂｌｏｏｄ，第１巻，Ｗｉｅｒｎｉｋ、Ｐ．Ｈ．ら編，１６１－１８２（１９８５））。新形成は現在、ウイルス配列の染色体への挿入、より活性に転写される領域への遺伝子の染色体転座、または何らかの他の機構による、正常な細胞遺伝子産物の定性的変化から、または遺伝子発現の定量的改変から生じると考えられている（Ｇｅｌｍａｎｎら、前出）。特定の遺伝子の変異または変更された発現が、他の組織および他の細胞型の中でも、いくつかの白血病の病因と関与するようである（Ｇｅｌｍａｎｎら、前出）。実際、いくつかの動物新形成に関与する癌遺伝子のヒト対応物は、ヒトの白血病および癌腫のいくつかの症例において増幅または転座されている（Ｇｅｌｍａｎｎら、前出）。例えば、ｃ－ｍｙｃ発現は、非リンパ球性白血病細胞株ＨＬ－６０において高度に増幅される。ＨＬ－６０細胞が増幅を止めるように化学的に誘導される場合、ｃ－ｍｙｃのレベルは、ダウンレギュレートされることが見出される（国際公開番号ＷＯ９１／１５５８０号）。しかし、ｃ－ｍｙｃまたはｃ－ｍｙｂの５’末端に相補的であるＤＮＡ構築物へのＨＬ－６０細胞の暴露が、ｃ－ｍｙｃタンパク質またはｃ－ｍｙｂタンパク質の発現をダウンレギュレートする対応するｍＲＮＡの翻訳をブロックし、処理した細胞の細胞増殖および分化の停止を引き起こすことが示されている（国際公開番号ＷＯ９１／１５５８０号；Ｗｉｃｋｓｔｒｏｍら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８５：１０２８（１９８８）；Ａｎｆｏｓｓｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８６：３３７９（１９８９））。しかし、当業者は、増殖表現型を示すことが公知である種々の起源の多数の細胞および細胞型を考慮すれば、本発明の有用性が造血性の細胞および組織の増殖性の疾患、障害および／または状態の処置に限定されないことを認識する。

【０３５９】

前記に加えて、ポリヌクレオチドは、三重らせん形成またはアンチセンスＤＮＡもしくはＲＮＡを通して遺伝子発現を制御するために使用され得る。アンチセンス技術は、例えば、Ｏｋａｎｏ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６：５６０（１９９１），「Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ」，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８）において考察される。三重らせん形成は例えば、Ｌｅｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６：３０７３（１９７９）；Ｃｏｏｎｅｙら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：４５６（１９８８）；およびＤｅｒｖａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：１３６０（１９９１）において考察される。両方の方法は、相補的ＤＮＡまたは相補的ＲＮＡへのポリヌクレオチドの結合に依存する。これらの技術に関して、好まし

いポリヌクレオチドは通常、２０～４０塩基長のオリゴヌクレオチドであり、そして転写に関与する遺伝子領域（三重らせん－Ｌｅｅら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．６：３０７３（１９７９）；Ｃｏｏｎｅｙら．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：４５６（１９８８）；およびＤｅｒｖａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：１３６０（１９９１）を参照のこと）またはｍＲＮＡ自体（アンチセンス－Ｏｋａｎｏ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６：５６０（１９９１）；Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙ－ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８））のいずれかに相補的である。三重らせん形成は、最適にはＤＮＡからのＲＮＡ転写の遮断を生じるが、アンチセンスＲＮＡハイブリダイゼーションは、ポリペプチドへのｍＲＮＡ分子の翻訳を阻止する。両方の技術は、モデル系において効果的であり、そして本明細書に開示される情報は、疾患を処置または予防するための試みにおいて、アンチセンスまたは三重らせんポリヌクレオチドを設計するために使用され得る。

【０３６０】

本発明のポリヌクレオチドはまた、遺伝子治療において有用である。遺伝子治療の１つの目標は、遺伝欠損を修正する試みにおいて、欠損遺伝子を有する生物へ正常遺伝子を挿入することである。本発明に開示されるポリヌクレオチドは、高度に正確な様式でこのような遺伝欠損を標的とする手段を提供する。別の目標は、宿主ゲノム中には存在しなかった新しい遺伝子を挿入し、それによって宿主細胞中に新しい形質を生成することである。

【０３６１】

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

【０３６２】

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

【０３６３】

法医学生物学もまた、本明細書に開示されるようなＤＮＡに基づく同定技術を使用して利益を得る。組織（例えば、髪または皮膚）、または体液（例えば、血液、唾液、精液、滑液、羊水、乳汁、リンパ、肺痰（ｐｕｌｍｏｎａｒｙ ｓｐｕｔｕｍ）またはサーファクタント、尿、糞便物質など）のような非常に小さな生物学的サンプルから得られたＤＮＡ配列は、ＰＣＲを使用して増幅され得る。ある先行技術において、ＤＱａクラスＩＩ ＨＬＡ遺伝子のような多型性遺伝子座から増幅された遺伝子配列は、個体を同定するための法医学生物学において使用される。（Ｅｒｌｉｃｈ，Ｈ．，ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．（１９９２））。一旦、これらの特異的多型性遺伝子座が増幅されると、これらは１つ以上の制限酵素で消化される。これは、ＤＱａクラスＩＩ ＨＬＡ遺伝子に対応するＤＮＡでプローブされたサザンブロットについてのバンドの同定セットを生じる。同様に、本発明のポリヌクレオチドは、法医学的目的のための多型性マーカーとして使用され得る。

【０３６４】
また、特定の組織の供給源を同定し得る試薬についての必要性が存在する。例えば、未知の起源の組織が提供される場合、法医学においてこのような必要性が生じる。適切な試薬は、例えば、本発明の配列から調製される、特定の組織に特異的なＤＮＡプローブまたはプライマーを含み得る。このような試薬のパネルは、種および／または器官型によって組織を同定し得る。同様の様式で、これらの試薬は、夾雑物について組織培養物をスクリーニングするために使用され得る。
【０３６５】
少なくとも、本発明のポリヌクレオチドは、サザンゲルでの分子量マーカーとして、特定の細胞型における特定のｍＲＮＡの存在に関する診断プローブとして、新規なポリヌクレオチドを発見するプロセスでの公知の配列を「差し引き」するためのプローブとして、「遺伝子チップ」または他の支持体に付着させるためのオリゴマーを選択および作製するため、ＤＮＡ免疫技術を用いて抗ＤＮＡ抗体を惹起させるため、および免疫応答を誘発する抗原として、使用され得る。
【０３６６】
（ポリペプチドの使用）
本明細書中に同定される各ポリペプチドは、多くの方法に使用され得る。以下の説明は、例示としてみなされるべきであり、そして公知の技術を利用する。
【０３６７】
本発明のポリペプチドは、抗体に基づいた技術を使用して生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイするために使用され得る。例えば、組織におけるタンパク質発現は、古典的な免疫組織化学法を用いて研究され得る（Ｊａｌｋａｎｅｎ，Ｍ．ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎ，Ｍ．ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７－３０９６（１９８７））。タンパク質遺伝子発現を検出するのに有用である、抗体に基づいた他の方法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）およびラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）のような免疫アッセイが含まれる。適切な抗体アッセイの標識は、当該技術分野で公知であり、そして例えば、グルコースオキシダーゼのような酵素標識、ならびにヨウ素（１２５Ｉ、１２１Ｉ）、炭素（１４Ｃ）、硫黄（３５Ｓ）、トリチウム（３Ｈ）、インジウム（１１２Ｉｎ）、およびテクネチウム（９９ｍＴｃ）のような放射性同位体、ならびにフルオレセインおよびローダミンのような蛍光標識、ならびにビオチンが挙げられる。
【０３６８】
生物学的サンプル中の分泌タンパク質レベルをアッセイすることに加えて、タンパク質はまた、画像化によりインビボで検出され得る。タンパク質をインビボで画像化するための抗体の標識またはマーカーとしては、Ｘ線ラジオグラフィー、ＮＭＲまたはＥＳＲにより検出可能なものが挙げられる。Ｘ線ラジオグラフィーについては、適切な標識は、検出可能な放射線を発するが、被験体に対して明白には有害ではないバリウムまたはセシウムのような放射性同位体を含む。ＮＭＲおよびＥＳＲに適切なマーカーには、例えば重水素のような検出可能な特徴的なスピンを有するものが含まれ、これは、関連したハイブリドーマのための栄養素を標識することにより抗体に取り込まれ得る。
【０３６９】
放射性同位体（例えば、１３１Ｉ、１１２Ｉｎ、９９ｍＴｃ）、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴により検出可能な材料のような適切な検出可能な画像化部分で標識された、タンパク質特異的抗体または抗体フラグメントは、哺乳動物に（例えば、非経口的、皮下、または腹腔内に）導入される。被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、９９ｍＴｃの約５～２０ミリキュリーの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、Ｓ．Ｗ．Ｂｕｒｃｈｉｅｌら、「Ｉｍｍｕｎｏｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅ

tics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments.」（Tumor Imaging：The Radiochemical Detection of Cancerの第１３章、S. W. BurchielおよびB. A. Rhodes編、Masson Publishing Inc.（１９８２））に記載される。

【０３７０】

従って、本発明は、障害の診断方法を提供し、この方法は、（ａ）個体の細胞または体液中の本発明のポリペプチドの発現をアッセイする工程；（ｂ）この遺伝子発現レベルを標準の遺伝子発現レベルと比較する工程を包含し、これによって、標準的な発現レベルと比較して、アッセイされたポリペプチドの遺伝子発現レベルの増加または減少が、障害の指標になる。癌に関しては、個体由来の生検組織中での比較的多量の転写物の存在は、この疾患の発症の素因を示し得るか、または実際の臨床症状の出現前にこの疾患を検出するための手段を提供し得る。この型のより決定的な診断は、保健専門家が、より早期に予防的測定または積極的処置を用い、それによって癌の発症またはさらなる進行を予防することを可能にし得る。

【０３７１】

さらに、本発明のポリペプチドを用いて疾患を処置、予防および／または診断し得る。例えば、患者には、ポリペプチド（例えば、インスリン）の非存在またはレベルの減少を置換すること、異なるポリペプチド（例えば、ヘモグロビンＢに対するヘモグロビンＳ、ＳＯＤ、カタラーゼ、ＤＮＡ修復タンパク質）の非存在またはレベルの減少を補充すること、ポリペプチド（例えば、癌遺伝子または腫瘍サプレッサー）の活性を阻害すること、ポリペプチドの活性を（例えば、レセプターに結合することによって）活性化すること、遊離リガンド（例えば、炎症を低減させる際に用いられる可溶性ＴＮＦレセプター）について、膜結合レセプターと競合させることによって膜結合レセプターの活性を減少させること、または所望の応答（例えば、血管の増殖阻害、増殖細胞または組織に対する免疫応答の増強）をもたらすことに取り組む際に、本発明のポリペプチドが投与され得る。

【０３７２】

同様に、本発明のポリペプチドに対する抗体もまた使用されて疾患を処置、予防および／または診断し得る。例えば、本発明のポリペプチドに対する抗体の投与によって、そのポリペプチドに結合して、そしてそのポリペプチドの過剰産生を低減し得る。同様に、抗体の投与によって、例えば、膜に結合したポリペプチド（レセプター）へ結合することにより、そのポリペプチドを活性化し得る。

【０３７３】

少なくとも本発明のポリペプチドは、当業者に周知の方法を用いるＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルまたは分子ふるいゲル濾過カラムの分子量マーカーとして使用され得る。ポリペプチドを用いてもまた、抗体を惹起し得、次いで、この抗体を使用して、宿主細胞の形質転換を評価する方法として、組換え細胞からのタンパク質発現を測定する。さらに、本発明のポリペプチドを使用して、以下の生物学的活性を試験し得る。

【０３７４】

（遺伝子治療方法）

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置または予防するための遺伝子治療方法に関する。この遺伝子治療法は、本発明のポリペプチドの発現を達成するために、核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ、およびアンチセンスＤＮＡまたはＲＮＡ）配列を動物へ導入することに関する。この方法は、プロモーター、および標的組織によるこのポリペプチドの発現のために必要な任意の他の遺伝的エレメントに作動可能に連結された、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを必要とする。このような遺伝子治療および送達の技術は、当該分野で公知であり、例えば、本明細書中に参考として援用されるＷＯ９０／１１０９２を参照のこと。

【０３７５】

従って、例えば、患者由来の細胞は、エキソビボで本発明のポリヌクレオチドに作動可

能に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチド（ＤＮＡまたはＲＮＡ）を用いて操作され得、この操作された細胞は次いで、このポリペプチドで処置されるべき患者に提供される。このような方法は、当該分野で周知である。例えば、Ｂｅｌｌｄｅｇｒｕｎら，Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．，８５：２０７－２１６（１９９３）；Ｆｅｒｒａｎｔｉｎｉら，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５３：１０７－１１１２（１９９３）；Ｆｅｒｒａｎｔｉｎｉら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １５３：４６０４－４６１５（１９９４）；Ｋａｉｄｏ，Ｔ．ら，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ６０：２２１－２２９（１９９５）；Ｏｇｕｒａら，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５０：５１０２－５１０６（１９９０）；Ｓａｎｔｏｄｏｎａｔｏら，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ７：１－１０（１９９６）；Ｓａｎｔｏｄｏｎａｔｏら，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：１２４６－１２５５（１９９７）；およびＺｈａｎｇら，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：３１－３８（１９９６）を参照のこと。これらの文献は、本明細書中に参考として援用される。１つの実施形態では、操作される細胞は、動脈細胞である。この動脈細胞は、動脈、動脈周囲の組織への直接注射によって、またはカテーテル注射によって患者に再度導入され得る。

【０３７６】

以下でより詳細に考察するように、このポリヌクレオチド構築物は、注射可能な物質を動物の細胞へ送達する任意の方法（例えば、組織（心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓など）の間隙空間への注射）によって送達され得る。このポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリアにて送達され得る。

【０３７７】

１つの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、裸のポリヌクレオチドとして送達される。用語「裸の」ポリヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡは、細胞への侵入を補助、促進または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、または沈殿剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、本発明のポリヌクレオチドはまた、リポソーム処方物中で送達され得、そしてリポフェクチン処方物などは、当業者に周知の方法によって調製され得る。このような方法は、例えば、本明細書中に参考として援用される、米国特許第５，５９３，９７２号、同第５，５８９，４６６号および同第５，５８０，８５９号に記載される。

【０３７８】

遺伝子治療方法において使用される本発明のポリヌクレオチドベクター構築物は好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列を含まない、構築物である。適切なベクターとしては、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅから入手可能なｐＷＬＮＥＯ、ｐＳＶ２ＣＡＴ、ｐＯＧ４４、ｐＸＴ１およびｐＳＧ；Ｐｈａｒｍａｃｉａから入手可能なｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧおよびｐＳＶＬ；ならびにＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから入手可能なｐＥＦ１／Ｖ５、ｐｃＤＮＡ３．１、およびｐＲｃ／ＣＭＶ２が挙げられる。他の適切なベクターは、当業者に容易に明白である。

【０３７９】

当業者に公知の任意の強力なプロモーターは、本発明のポリヌクレオチド配列の発現を駆動するために用いられ得る。適切なプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター）；または異種プロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター）；ＲＳウイルス（ＲＳＶ）プロモーター；誘導性プロモーター（例えば、ＭＭＴプロモーター、メタロチオネインプロモーター）；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ＡｐｏＡＩプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター）；レトロウイルスＬＴＲ；ｂ－アクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。このプロモーターはまた、本発明のポリヌクレオチドについてネイティブなプロモーターであり得る。

【０３８０】

他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する１つの主要な利点

は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製ＤＮＡ配列が細胞に導入されて、６ヶ月までの期間の間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【０３８１】

本発明のポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する）の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、器官組織の細網線維間の、細胞間の液体ムコ多糖類基質、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは結合組織鞘性筋肉細胞（ｃｏｎｎｅｃｔｉｖｅ　ｔｉｓｓｕｅ　ｅｎｓｈｅａｔｈｉｎｇ　ｍｕｓｃｌｅ　ｃｅｌｌ）内または骨の裂孔中の同じ基質を包含する。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下で議論される理由のために好ましい。本発明のポリヌクレオチド構築物は、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達され得る。本発明のポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞）において達成され得る。インビボでの筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現する能力において、特に適格である。

【０３８２】

裸の核酸配列注射のために、ＤＮＡまたはＲＮＡの有効投薬量は、約０．０５ｍｇ／ｋｇ体重から約５０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約０．００５ｍｇ／ｋｇから約２０ｍｇ／ｋｇであり、そしてより好ましくは約０．０５ｍｇ／ｋｇから約５ｍｇ／ｋｇである。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注射の組織部位に応じて変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。

【０３８３】

好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注射経路による。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に、肺または気管支の組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸のＤＮＡ構築物が、血管形成術の間にこの手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達され得る。

【０３８４】

裸のポリヌクレオチドは、送達部位での直接の針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、およびいわゆる「遺伝子銃」を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の任意の方法によって送達される。これらの送達方法は、当該分野で公知である。

【０３８５】

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

【０３８６】

特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド構築物は、リポソーム調製物中で複合体化している。本発明にて使用するためのリポソーム調製物は、カチオン性（正に荷電した）、アニオン性（負に荷電した）および中性の調製物を包含する。しかしながら、カチオン性リポソームとポリアニオン性核酸との間で強固な荷電複合体を形成し得るので、カチオン性リポソームが特に好ましい。カチオン性リポソームは、機能的形態において、プラスミドＤＮＡ（本明細書中で参考として援用される、Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８４：７４１３～７４１６（１９８７））；ｍＲＮＡ（本明細書中で参考として援用される、Ｍａｌｏｎｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８６：６０７７～６０８１（１９８９））；および精製された

転写因子（本明細書中で参考として援用される、Ｄｅｂｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６５：１０１８９～１０１９２（１９９０））の細胞内送達を媒介することが示されている。

【０３８７】

カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、Ｎ［１－２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリエチルアンモニウム（ＤＯＴＭＡ）リポソームは特に有用であり、そして登録商標ＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎのもとにＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，Ｎ．Ｙ．（本明細書中で参考として援用される、Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８４：７４１３～７４１６（１９８７）をもまた参照のこと、）より入手可能である。他の市販のリポソームとしては、トランスフェクテース（ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｃｅ）（ＤＤＡＢ／ＤＯＰＥ）およびＤＯＴＡＰ／ＤＯＰＥ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ）が挙げられる。

【０３８８】

当該分野で周知の技術を使用して、他のカチオン性リポソームを、容易に入手可能な物質より調製し得る。ＤＯＴＡＰ（１，２－ビス（オレオイルオキシ）－３－（トリメチルアンモニオ）プロパン）リポソームの合成の記述に関して、例えばＰＣＴ公開第ＷＯ　９０／１１０９２号（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。ＤＯＴＭＡリポソームの調製は文献にて説明されており、例えば、本明細書中で参考として援用される、Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８４：７４１３～７４１７を参照のこと。類似した方法を使用して、他のカチオン性脂質物質よりリポソームを調製し得る。

【０３８９】

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

【０３９０】

例えば、商業的に、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）を種々の組み合わせにおいて使用し、コレステロールを添加してもしなくても、従来のリポソームを生成し得る。従って、例えば、超音波処理バイアル中への窒素ガス流下で、ＤＯＰＧおよびＤＯＰＣの各５０ｍｇを乾燥することにより、ＤＯＰＧ／ＤＯＰＣ小胞を調製し得る。このサンプルを一晩真空ポンプ下に置き、そして次の日、脱イオン水で水和する。次いで、浴が、１５ＥＣで循環している間、最大設定にて、逆位カップ（浴タイプ）プローブを装備したＨｅａｔ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　モデル３５０超音波処理器を使用して、このサンプルを栓をしたバイアル中にて２時間超音波処理する。あるいは、負に荷電した小胞を、超音波処理なしで調製して多重膜小胞を生成し得るか、または核孔膜（ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ　ｍｅｍｂｒａｎｅ）を通して押し出すことにより別々の大きさの単膜小胞を生成し得る。他の方法は、当業者に公知でありそして利用可能である。

【０３９１】

このリポソームとしては、多重膜リポソーム（ＭＬＶ）、小さな単膜リポソーム（ＳＵＶ）または大きな単膜リポソーム（ＬＵＶ）が挙げられ得、ＳＵＶが好ましい。当該分野で周知の方法を使用して、種々のリポソーム－核酸複合体が調製される。例えば、本明細書中で参考として援用される、Ｓｔｒａｕｂｉｎｇｅｒら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｏｆ　Ｉｍ

ｍｕｎｏｌｏｇｙ、１０１：５１２～５２７（１９８３）を参照のこと。例えば、核酸を含有するＭＬＶは、ガラスチューブの壁面にリン脂質の薄膜を堆積させ、そしてその後、カプセル化されるべき物質の溶液で水和することによって調製され得る。ＳＵＶはＭＬＶの長期超音波処理により調製され、単膜リポソームの均質集団を生成する。封入されるべき物質を、予め形成されたＭＬＶの懸濁液に添加し、次いで、超音波処理する。カチオン性脂質を含むリポソームを使用する場合、乾燥した脂質膜を、滅菌水または１０ｍＭ Ｔｒｉｓ／ＮａＣｌのような等張性緩衝溶液のような適切な溶液中に再懸濁し、超音波処理し、次いで、予め形成されたリポソームをＤＮＡと直接混合する。正に荷電したリポソームのカチオン性ＤＮＡへの結合に起因して、リポソームおよびＤＮＡは非常に安定な複合体を形成する。ＳＵＶは、小核酸フラグメントを用いての用途を見出す。ＬＵＶは、当該分野で周知の多くの方法により調製される。一般に使用される方法としては、Ca^{2+}－ＥＤＴＡキレート化（Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓら、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ、３９４：４８３（１９７５）；Ｗｉｌｓｏｎら、Ｃｅｌｌ、１７：７７（１９７９））；エーテル注入（Ｄｅａｍｅｒら、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ、４４３：６２９（１９７６）；Ｏｓｔｒｏら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｍ．、７６：８３６（１９７７）；Ｆｒａｌｅｙら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７６：３３４８（１９７９））；界面活性剤透析（Ｅｎｏｃｈら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７６：１４５（１９７９））；および逆相エバポレーション（ＲＥＶ）（Ｆｒａｌｅｙら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２５５：１０４３１（１９８０）；Ｓｚｏｋａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７５：１４５（１９７８）；Ｓｃｈａｅｆｅｒ－Ｒｉｄｄｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２１５：１６６（１９８２））が挙げられ、これらの文献は本明細書中で参考として援用される。

【０３９２】

一般に、ＤＮＡのリポソームに対する割合は約１０：１から約１：１０までである。好ましくは、その割合（ｒａｔｉｏｎ）は約５：１から約１：５までである。より好ましくは、その割合は約３：１から約１：３までである。さらにより好ましくは、その割合は約１：１である。

【０３９３】

米国特許第５，６７６，９５４号（本明細書中で参考として援用される）はカチオン性リポソームキャリアと複合体化された遺伝物質のマウスへの注入について報告する。米国特許第４，８９７，３５５号、同第４，９４６，７８７号、同第５，０４９，３８６号、同第５，４５９，１２７号、同第５，５８９，４６６号、同第５，６９３，６２２号、同第５，５８０，８５９号、同第５，７０３，０５５号および国際公開第ＷＯ９４／９４６９号（これらは本明細書中で参考として援用される）は、ＤＮＡを細胞および哺乳動物にトランスフェクトする際に使用するためのカチオン性脂質を提供する。米国特許第５，５８９，４６６号、同第５，６９３，６２２号、同第５，５８０，８５９号、同第５，７０３，０５５号および国際公開第ＷＯ９４／９４６９号（これらは本明細書中で参考として援用される）は、ＤＮＡ－カチオン性脂質複合体を哺乳動物に送達する方法を提供する。

【０３９４】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチドをコードする配列を含むＲＮＡを含むレトロウイルス粒子を使用して、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。レトロウイルスプラスミドベクターを誘導し得るレトロウイルスとしては、モロニーマウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３９５】

このレトロウイルスプラスミドベクターを使用して、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞株の例としては、その全体が本明細書中で参考として援用される、Ｍｉｌｌｅｒ、Ｈｕｍａ

ｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅａｐｙ、１：５～１４（１９９０）にて記載されるようなＰＥ５０１、ＰＡ３１７、Ｒ－２、Ｒ－ＡＭ、ＰＡ１２、Ｔ１９－１４Ｘ、ＶＴ－１９－１７－Ｈ２、ＲＣＲＥ、ＲＣＲＩＰ、ＧＰ＋Ｅ－８６、ＧＰ＋ｅｎｖＡｍ１２およびＤＡＮ細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。このベクターは、当該分野で公知の任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入し得る。そのような手段としては、エレクトロポレーション、リポソームの使用、および$CaPO_4$沈殿が挙げられるが、それらに限定されない。１つの代替法において、このレトロウイルスプラスミドベクターをリポソームにカプセル化するか、または脂質に結合して、次いで宿主に投与し得る。

【０３９６】

このプロデューサー細胞株は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子を使用して、インビトロまたはインビボのどちらかにおいて、真核生物細胞を形質導入し得る。この形質導入された真核生物細胞は、本発明のポリペプチドを発現する。

【０３９７】

特定の他の実施形態において、アデノウイルスベクター中に含まれる本発明のポリヌクレオチドを用いて、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。アデノウイルスは、それが本発明のポリペプチドをコードし、そして発現し、それと同時に通常の溶解性ウイルス生活環にて複製するその能力に関して不活性化されるように操作され得る。アデノウイルス発現は、そのウイルスＤＮＡの宿主細胞染色体への組み込み無しに達成され、その結果、挿入性変異誘発についての心配が軽減される。さらに、アデノウイルスは、何年もの間、腸の生ワクチンとして優れた安全側面を伴って使用されている（Ｓｃｈｗａｒｔｚｅｔら、Ａｍ．Ｒｅｖ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｄｉｓ．、１０９：２３３－２３８（１９７４））。最終的に、アデノウイルス媒介性遺伝子移入が、コトンラットの肺へのα－１－アンチトリプシンおよびＣＦＴＲの移入を含む多くの例において実証されている（Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５２：４３１～４３４（１９９１）；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、Ｃｅｌｌ、６８：１４３～１５５（１９９２））。さらに、ヒト癌における原因物質としてアデノウイルスを確立しようとする広範な研究は、一様に否定的であった（Ｇｒｅｎら Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７６：６６０６（１９７９））。

【０３９８】

本発明において有用である適切なアデノウイルスベクターが、例えば、ＫｏｚａｒｓｋｙおよびＷｉｌｓｏｎ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖｅｌ．、３：４９９～５０３（１９９３）；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、Ｃｅｌｌ、６８：１４３～１５５（１９９２）；Ｅｎｇｅｌｈａｒｄｔら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔ．Ｔｈｅｒ．、４：７５９～７６９（１９９３）；Ｙａｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ、７：３６２～３６９（１９９４）；Ｗｉｌｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３６５：６９１～６９２（１９９３）；および米国特許第５，６５２，２２４号に記載されており、これらは本明細書中で参考として援用される。例えば、アデノウイルスベクターＡｄ２が有用であり、そしてヒト２９３細胞にて増殖され得る。これらの細胞は、アデノウイルスのＥ１領域を含み、そして構成的にＥｌａおよびＥｌｂを発現し、このことは、このベクターから欠失している遺伝子の産物を提供することによって欠損アデノウイルスを補完する。Ａｄ２に加えて、他の多様なアデノウイルス（例えば、Ａｄ３、Ａｄ５、およびＡｄ７）もまた、本発明において有用である。

【０３９９】

好ましくは、本発明において使用されるアデノウイルスは、複製欠損性である。複製欠損アデノウイルスは、感染性粒子を形成するために、ヘルパーウイルスおよび／またはパッケージング細胞株の助けを必要とする。得られたウイルスは、細胞に感染する能力があり、そしてプロモーターに作動可能に連結された目的のポリヌクレオチドを発現し得るが、ほとんどの細胞にて複製し得ない。複製欠損アデノウイルスは、次の遺伝子：Ｅ１ａ、

Ｅ１ｂ、Ｅ３、Ｅ４、Ｅ２ａまたはＬ１からＬ５までのすべてまたは一部のうちの１つ以上にて欠失され得る。

【０４００】

特定の他の実施形態において、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を使用して、エキソビボまたはインビボでこの細胞を操作する。ＡＡＶは、感染性粒子を生成するためにヘルパーウイルスを必要とする、天然に存在する欠損ウイルスである（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５８：９７（１９９２））。ＡＡＶはまた、非分裂細胞の中にそのＤＮＡを組み込み得る数少ないウイルスの中の１つである。３００塩基対程度の小さいＡＡＶを含むベクターがパッケージされ得、そして組み込み得るが、外来性ＤＮＡのためのスペースは約４．５ｋｂに限られる。そのようなＡＡＶの生成および使用の方法は当該分野で公知である。例えば、米国特許第５，１３９，９４１号、同第５，１７３，４１４号、同第５，３５４，６７８号、同第５，４３６，１４６号、同第５，４７４，９３５号、同第５，４７８，７４５号および同第５，５８９，３７７号を参照のこと。

【０４０１】

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

【０４０２】

遺伝子治療の別の方法は、相同組換え（例えば、米国特許第５，６４１，６７０号、１９９７年６月２４日発行；国際公開第ＷＯ９６／２９４１１号、１９９６年９月２６日公開；国際公開第ＷＯ９４／１２６５０号、１９９４年８月４日公開；Ｋｏｌｌｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８６：８９３２～８９３５（１９８９）；およびＺｉｊｌｓｔｒａら、Ｎａｔｕｒｅ、３４２：４３５～４３８（１９８９）を参照のこと）を介して、異種制御領域および内在性ポリヌクレオチド配列（例えば、目的のポリペプチド配列をコードしている配列）を作動可能に連結する工程を含む。この方法は、標的細胞中に存在しているが、通常はその細胞中で発現しないかまたは所望するよりも低いレベルで発現する、遺伝子の活性化を含む。

【０４０３】

当該分野で既知の標準的技術を使用して、ポリヌクレオチド構築物を作製する。この構築物は、プロモーターを、そのプロモーターに隣接した標的化配列とともに含む。適切なプロモーターが、本明細書中に記載されている。標的化配列は、内在性配列に対して十分に相補的であり、プロモーター－標的化配列と内在性配列との相同組換えを可能にする。標的化配列は、所望される内在性ポリヌクレオチド配列の５’末端の十分近くに存在し、それゆえ、相同組換えに際して、プロモーターは、内在性配列に作動可能に連結される。

【０４０４】

このプロモーターおよび標的化配列は、ＰＣＲを使用して増幅され得る。好ましくは、この増幅されたプロモーターは、５’末端および３’末端に別の制限酵素部位を含む。好

ましくは、第１の標的化配列の３’末端は、増幅されたプロモーターの５’末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第２の標的化配列の５’末端は、増幅されたプロモーターの３’末端と同じ制限部位を含む。増幅されたプロモーターおよび標的化配列を消化し、そしてともに連結する。

【０４０５】

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

【０４０６】

プロモーター－標的化配列構築物は、細胞により取り込まれる。この構築物と内在性配列との間に相同組換えが起こり、その結果、内在性配列は、このプロモーターの制御下に配置される。次いで、このプロモーターは、内在性配列の発現を駆動する。

【０４０７】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、他の新脈管形成タンパク質をコードする他のポリヌクレオチドと一緒に投与され得る。新脈管形成タンパク質としては、酸性および塩基性の線維芽細胞増殖因子、ＶＥＧＦ－１、ＶＥＧＦ－２（ＶＥＧＦ－Ｃ）、ＶＥＧＦ－３（ＶＥＧＦ－Ｂ）、上皮増殖因子αおよびβ、血小板由来の内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、腫瘍壊死因子α、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子、および一酸化窒素シンターゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４０８】

好ましくは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、そのタンパク質の分泌を促進する分泌シグナル配列を含む。代表的に、このシグナル配列は、ポリヌクレオチドのコード領域の５’末端に向かってかまたは５’末端で発現される、そのポリヌクレオチドのコード領域に位置する。このシグナル配列は、目的のポリヌクレオチドに対して同種または異種であり得、そしてトランスフェクトされる細胞に対して同種または異種であり得る。さらに、当該分野で公知の方法を使用して、このシグナル配列は化学合成され得る。

【０４０９】

その投与形態によって、治療効果を提供するのに十分な量にて１つ以上の分子が発現される限り、上記のポリヌクレオチド権築物のうちのいずれかの任意の投与形態が使用され得る。これは、直接針注射、全身注射、カテーテル注入、バイオリスティック（ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ）注射器、粒子加速器（すなわち、「遺伝子銃」）、ゲルフォームスポンジデポー（ｄｅｐｏｔ）、他の市販デポー（ｄｅｐｏｔ）物質、浸透圧ポンプ（例えば、Ａｌｚａミニポンプ）、経口用または坐剤用の固形（錠剤または丸剤）薬学的処方物、および手術中のデカンティングまたは局所適用を含む。例えば、ラット肝臓およびラット脾臓へのリン酸カルシウム沈澱した裸のプラスミドの直接注射、または門脈へのタンパク質被覆プラスミド直接注射は、ラット肝臓における外来遺伝子の遺伝子発現をもたらした（Ｋａｎｅｄａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４３：３７５（１９８９））。

【０４１０】

局所投与の好ましい方法は、直接注射によるものである。好ましくは、送達ビヒクルと複合体を形成した本発明の組換え分子は、動脈領域内部に直接注射により投与されるか、または動脈領域内部に局所投与される。動脈領域内部での組成物の局所投与とは、その組成物を動脈内に数センチメートル、好ましくは数ミリメートルで注射することを言う。

【０４１１】

局所投与の別の方法は、外科的創傷内またはその周辺に本発明のポリヌクレオチド構築物を接触させることである。例えば、患者は手術を経験し得、そしてこのポリヌクレオチ

ド構築物を創傷内部の組織表面上に被覆され得るか、またはその構築物を創傷内部の組織領域に注射され得る。

【０４１２】

全身投与に有用な治療組成物は、本発明の標的化された送達ビヒクルと複合体を形成した本発明の組換え分子を含む。全身投与で使用するために適切な送達ビヒクルは、特定部位に対してそのビヒクルを標的化するリガンドを含むリポソームを含む。

【０４１３】

全身投与の好ましい方法としては、静脈内注射、エアロゾル、経口および経皮（局所的）送達が挙げられる。当該分野で標準的な方法を使用して、静脈内注射が実行され得る。当該分野で標準的な方法を使用して、エアロゾル送達もまた実行され得る（例えば、本明細書中で参考として援用される、Ｓｔｒｉｂｌｉｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１８９：１１２７７～１１２８１（１９９２）を参照のこと）。動物の腸内の消化酵素による分解に耐える能力をもつキャリアに対して本発明のポリヌクレオチド構築物が複合体を形成することにより、経口送達は実行され得る。そのようなキャリアの例としては、当該分野で公知であるもののような、プラスチックカプセルまたは錠剤が挙げられる。皮膚内へ通過可能な親油性試薬（例えば、ＤＭＳＯ）と本発明のポリヌクレオチド構築物を混合することによって、局所的送達は実行され得る。

【０４１４】

送達される物質の有効量を決定することは、例えば、その物質の化学構造および生物学的活性、動物の年齢および体重、処置を必要とする正確な状態およびその重症度、ならびに投与経路を含む、多数の因子に依存し得る。処置の頻度は、１用量あたりの投与されるポリヌクレオチド構築物の量ならびに被験体の健康および病歴のような多くの因子に依存する。正確な量、投薬回数および投薬のタイミングは、主治医または主治獣医により決定される。本発明の治療的組成物は、任意の動物に、好ましくは哺乳動物および鳥類に投与され得る。好ましい哺乳動物としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマおよびブタが挙げられ、特にヒトである。

【０４１５】

（生物学的活性）

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

【０４１６】

（免疫活性）

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、例えば、免疫細胞の増殖、分化、もしくは動員（走化性）を活性化または阻害することにより、免疫系の疾患、障害および／または状態を、処置、予防、および／または診断するのに有用であり得る。免疫細胞は、造血と呼ばれるプロセスを介して発達し、多能性幹細胞から骨髄性細胞（血小板、赤血球、好中球およびマクロファージ）およびリンパ系細胞（Ｂリンパ球およびＴリンパ球）を生成する。これら免疫疾患、障害および／または状態の病因は、遺伝的、身体的（ｓｏｍａｔｉｃ）（例えば、癌またはいくつかの自己免疫性障害）、後天的（例えば、化学療法もしくは毒素による）または感染的であり得る。さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の免疫系の疾患または障害のマーカーまたは検出物質（ｄｅｔｅｃｔｏｒ）として使用され得る。

【０４１７】

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

は診断において有用であり得る。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の（または多くの）型の造血細胞の減少に関連した疾患、障害および／または状態を処置または予防する試みにおいて、多能性幹細胞を含む造血細胞の分化および増殖を増加させるために用いられ得る。免疫不全症候群の例としては、血液タンパク質の疾患、障害および／または状態（例えば、無ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症）、毛細血管拡張性運動失調、分類不能型免疫不全、ディ・ジョージ症候群、ＨＩＶ感染、ＨＴＬＶ－ＢＬＶ感染、白血球接着不全症候群、リンパ球減少、食細胞殺細菌機能不全、重症複合型免疫不全（ＳＣＩＤ）、ヴィスコット－オールドリッチ障害、貧血、血小板減少、またはヘモグロビン尿症が挙げられるが、それらに限定されない。

【０４１８】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストをまた使用して、止血性活性（出血を止めること）または血栓崩壊活性（血餅形成）を調節し得る。例えば、止血活性または血栓崩壊活性を増大させることにより、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、血液凝固の疾患、障害および／または状態（例えば、無線維素原血症、因子欠損症）、血液血小板の疾患、障害および／または状態（例えば、血小板減少症）、あるいは外傷、手術または他の原因から生じる創傷を処置または予防し得る。あるいは、止血活性または血栓崩壊活性を減少させ得る本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、凝血を阻害または溶解し得る。心臓発作（梗塞）、発作（ｓｔｒｏｋｅ）または瘢痕の処置または予防において、これらの分子は重要であり得る。

【０４１９】

自己免疫障害の処置、予防および／または診断において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、有用であり得る。多くの自己免疫障害は、免疫細胞によって外来性物質として不適切に自己認識することから生じる。この不適切な認識は、宿主組織の破壊をもたらす免疫応答を引き起こす。従って、免疫応答、特にＴ細胞の増殖、分化または走化性を阻害し得る本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの投与は、自己免疫障害の防止において効果的な治療であり得る。

【０４２０】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置、予防および／または診断され得る自己免疫疾患および障害の例としては、以下の１つ以上が挙げられるがこれらに限定されない：自己免疫溶血性貧血、自己免疫新生児血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性血球減少症、溶血性貧血、抗リン脂質症候群、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、心筋炎、再発性多発性軟骨炎、リウマチ性心疾患、糸球体腎炎（例えば、ＩｇＡネフロパシー）、多発性硬化症、神経炎、ブドウ膜炎眼炎、多発性内分泌腺症、紫斑（例えば、ヘノッホ－シェーンライン（Ｈｅｎｌｏｃｈ－Ｓｃｏｅｎｌｅｉｎ）紫斑病）、ライター病、Ｓｔｉｆｆ－Ｍａｎ症候群、自己免疫肺炎症、自閉症、ギヤン－バレー症候群、インシュリン依存性糖尿病（ｍｅｌｌｉｔｉｓ）、および自己免疫炎症性眼、自己免疫甲状腺炎、甲状腺機能低下症（すなわち、橋本甲状腺炎）、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、天疱瘡、レセプター自己免疫（例えば、（ａ）グレーヴズ病、（ｂ）重症筋無力症、および（ｃ）インシュリン耐性など）、自己免疫溶血性貧血、自己免疫血小板減少性紫斑病、慢性関節リウマチ、抗コラーゲン抗体を伴う強皮症（ｓｃｈｌｅｒｏｄｅｒｍａ）、混合結合組織病、多発性筋炎／皮膚筋炎、悪性貧血、特発性アディソン病、不妊症、糸球体腎炎（原発性糸球体腎炎およびＩｇＡネフロパシーなど）、水疱性類天疱瘡、シェーグレン症候群、糖尿病およびアドレナリン作用性薬剤耐性（喘息または嚢胞性線維症を伴うアドレナリン作用性薬剤耐性を含む）、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、他の内分泌腺不全、白斑、脈管炎、心筋梗塞後（ｐｏｓｔ－ＭＩ）、心臓切開症候群、じんま疹、アトピー性

皮膚炎、喘息、炎症性ミオパシーならびに他の炎症性障害、肉芽腫性障害、変性障害および萎縮性障害。

【０４２１】

本発明の組成物によって処置、予防および／または診断され得る、さらなる、自己免疫障害（起こり得る）としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：慢性関節リウマチ（例えば、関節における免疫複合体によってしばしば特徴付けられる）、抗コラーゲン抗体を伴う強皮症（ｓｃｈｌｅｒｏｄｅｒｍａ）（例えば、核小体抗体および他の核抗体によってしばしば特徴付けられる）、混合結合組織病（例えば、可溶性核抗原（例えば、リボ核タンパク質）に対する抗体によってしばしば特徴付けられる）、多発性筋炎（例えば、非ヒストンＡＮＡによってしばしば特徴付けられる）、悪性貧血（例えば、抗壁細胞、ミクロソーム、および内因子抗体によってしばしば特徴付けられる）、特発性アジソン病（例えば、体液および細胞媒介性副腎細胞傷害性によってしばしば特徴付けられる）、不妊症（例えば、抗精子抗体によってしばしば特徴付けられる）、糸球体腎炎（例えば、糸球体基底膜抗体または免疫複合体によってしばしば特徴付けられる）、水疱性類天疱瘡（例えば、基底膜中のＩｇＧおよび補体によってしばしば特徴付けられる）、シェーグレン症候群（例えば、多重組織抗体、および／または特定の非ヒストンＡＮＡ（ＳＳ－Ｂ）によってしばしば特徴付けられる）、糖尿病（例えば、細胞媒介性および体液性島細胞抗体によってしばしば特徴付けられる）、ならびにアドレナリン作動性薬剤抵抗性（喘息または嚢胞性線維症を伴うアドレナリン作動性薬剤抵抗性を含む）（例えば、βアドレナリンレセプター抗体によってしばしば特徴付けられる）。

【０４２２】

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

【０４２３】

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

【０４２４】

特定の好ましい実施形態においては、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストが、Ｂ細胞および／またはＴ細胞の免疫不全個体の中で免疫反応性をブーストするための薬剤として用いられ得る。

【０４２５】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、および／またはそのアゴニストを投与することにより回復されるかまたは処置され得るＢ細胞免疫不全としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：重篤な複合型免疫欠損（ＳＣＩＤ）－Ｘ連鎖、ＳＣＩＤ－常染色体、アデノシンデアミナーゼ欠損（ＡＤＡ欠損）、Ｘ連鎖無ガンマグロブリン血症（ＸＬＡ）、Ｂｒｕｔｏｎ’ｓ病、先天性無ガンマグロブリン血症、Ｘ連鎖乳児無ガンマグロブリン血症、後天性無ガンマグロブリン血症、成人発症無ガンマグロブリン血症、後

期発症無ガンマグロブリン血症、異常ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症、一過性乳児低ガンマグロブリン血症、非特異的低ガンマグロブリン血症、無ガンマグロブリン血症、分類不能型免疫不全（ＣＶＩ）（後天性）、ヴィスコット－オールドリッチ症候群（ＷＡＳ）、過剰ＩｇＭを伴うＸ連鎖免疫欠損、過剰ＩｇＭを伴う非Ｘ連鎖免疫欠損、選択的ＩｇＡ欠損、ＩｇＧサブクラス欠損（ＩｇＡ欠損を伴うかまたは伴わない）、正常なＩｇまたは上昇したＩｇを伴う抗体欠損、胸腺腫を伴う免疫欠損、Ｉｇ重鎖欠失、κ鎖欠損、Ｂ細胞リンパ球増殖性障害（ＢＬＰＤ）、選択的ＩｇＭ免疫欠損、退縮無ガンマグロブリン血症（Ｓｗｉｓｓ型）、網様発育不全、新生児好中球減少症、重篤な先天性白血球減少症、免疫欠損を伴う胸腺リンパ形成不全症－発育不全症または形成異常症、毛細血管拡張性運動失調、短肢（ｓｈｏｒｔ　ｌｉｍｂｅｄ）小人症、Ｘ連鎖リンパ球増殖症候群（ＸＬＰ）、Ｉｇを伴うネゼロフ症候群複合免疫欠損、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠損（ＰＮＰ）、ＭＨＣクラスＩＩ欠失（不全リンパ球症候群）および重症複合型免疫不全。

【０４２６】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、および／またはそのアゴニストを投与することによって、緩和または処置され得るＴ細胞不全としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：例えば、ディジョージ奇形、胸腺発育不全、第３および第４咽頭嚢症候群、２２ｑ１１．２欠損、慢性粘膜皮膚カンジダ症、ナチュラルキラー細胞欠損（ＮＫ）、特発性ＣＤ４＋　Ｔリンパ球減少、顕著なＴ細胞欠損を伴う免疫欠損（不特定）、および細胞媒介免疫の不特定の免疫欠損が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、ディジョージ奇形またはディジョージ奇形に関連する状態は、例えば、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、またはそのアンタゴニストもしくはアゴニストを投与することによって、緩和されるか処置される。

【０４２７】

本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、および／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することによって寛解または処置され得る他の免疫不全症としては、重症複合型免疫不全（ＳＣＩＤ：例えば、Ｘ連鎖ＳＣＩＤ、常染色体ＳＣＩＤ、およびアデノシンデアミナーゼ不全症）、毛細血管拡張性運動失調、ヴィスコット－オールドリッチ症候群、短肢性（ｓｈｏｒｔ－ｌｉｍｂｅｒ）小人症、Ｘ連鎖リンパ球増多症症候群（ＸＬＰ）、ネゼロフ症候群（例えば、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ不全症）、ＭＨＣクラスＩＩ不全症が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、毛細血管拡張性運動失調または毛細血管拡張性運動失調に関連する状態が、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、および／またはそれらのアゴニストを投与することによって寛解または処置され得る。

【０４２８】

特定の好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、慢性関節リウマチが処置、予防、および／または診断される。別の特定の実施形態において、全身性エリテマトーデスが、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置、予防および／または診断される。別の特定の好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、特発性血小板減少性紫斑病が処置、予防および／または診断される。別の特定の好ましい実施形態において、ＩｇＡネフロパシーは、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、処置、予防および／または診断される。好ましい実施形態において、自己免疫疾患および自己免疫障害ならびに／または上記の疾患および障害と関連する状態は、本発明タンパク質に対する抗体を用いて、処置、予防、および／または診断される。

【０４２９】

同様に、アレルギー反応および状態（例えば、喘息（特にアレルギー性喘息）または他の呼吸障害）はまた、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／または

それらのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、処置、予防および／または診断され得る。さらに、これらの分子は、アナフィラキシー、抗原性分子に対する過敏性、または血液型不適合を処置、予防および／または診断するために用いられ得る。

【０４３０】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストをまた用いて、炎症状態を処置、診断、および／または予防し得る。このような炎症性状態としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：例えば、呼吸器障害（例えば、喘息およびアレルギーなど）；胃腸障害（例えば、炎症性腸疾患など）；癌（例えば、胃癌、卵巣癌、肺癌、膀胱癌、肝臓癌、および乳癌など）；ＣＮＳ障害（例えば、多発性硬化症、血液脳関門透過性、虚血性脳損傷、および／または脳梗塞、外傷性脳損傷、神経変性性障害（例えば、パーキンソン病およびアルツハイマー病など）、ＡＩＤＳ関連痴呆、およびプリオン病）；心血管障害（例えば、アテローム性動脈硬化症、心筋炎、心血管疾患、および心肺バイパス合併症など）；ならびに炎症によって特徴付けられる多くのさらなる疾患、状態、および障害（例えば、慢性肝炎（ＢおよびＣ）、慢性関節リウマチ、痛風、外傷、敗血性ショック、膵炎、サルコイドーシス、皮膚炎、腎虚血再還流障害、グレーヴス病、全身性エリテマトーデス、真性糖尿病（例えば、Ｉ型糖尿病）、および同種異系移植拒絶など）。

【０４３１】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストは、移植拒絶、対宿主性移植片病、自己免疫および炎症性疾患（例えば、免疫複合体誘導血管炎、糸球体腎炎、溶血性貧血、重症筋無力症、ＩＩ型コラーゲン誘導動脈炎、実験アレルギー性および超急性異種移植変拒絶、慢性関節リウマチ、および全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）を処置、診断、および／または予防するのに有用である。器官拒絶は、免疫反応による、移植された組織の宿主免疫細胞破壊によって生じる。同様に、免疫反応はまた、ＧＶＨＤに関するが、この場合、外来の移植された免疫細胞が、宿主組織を破壊する。本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチドおよび／またはそのアゴニストもしくはアンタゴニスト（免疫応答、特にＴ細胞の活性化、増殖、分化、または走化性を阻害する）は、器官拒絶またはＧＶＨＤを予防するのに有効な治療であり得る。

【０４３２】

同様に、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストをまた使用し、炎症を調節および／または診断し得る。例えば、本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチド、および／または本発明のアゴニストもしくはアンタゴニストは、炎症応答に関与する細胞の活性化、増殖および／または分化を阻害し得る。これらの分子を使用して、感染に関連する炎症（例えば、敗血症性ショック、敗血症、または全身炎症応答症候群（ＳＩＲＳ））、虚血再灌流傷害に関連する炎症、内毒素致死に関連する炎症、関節炎に関連する炎症、補体媒介性超急性拒絶に関連する炎症、腎炎に関連する炎症、サイトカインまたはケモカインが誘導する肺傷害に関連する炎症、炎症性腸疾患に関連する炎症、クローン病に関連する炎症またはサイトカイン（例えば、ＴＮＦまたはＩＬ－１）の過剰生成から生じる炎症を含むがこれらに限定されない、慢性および急性の両方の状態の炎症状態を処置、診断、および予後を判断し得る。

【０４３３】

本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、感染性因子を処置、検出、および／または予防するために用いられ得る。例えば、免疫応答を増大することによって、特にＢ細胞および／またはＴ細胞の増殖、活性化および／または分化を増大することによって、感染性疾患は、処置、検出、および／または予防され得る。免疫応答は、既存の免疫応答を増大するか、または新しい免疫応答を惹起するかのいずれかによって、増大され得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、免疫応答の必然的な惹起なしに、感染性因子（感染性因子の適用列挙の節などで述べる）を直

接阻害し得る。

【０４３４】

本発明のさらなる好ましい実施形態としては、以下の適用におけるポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストの使用が挙げられるがこれらに限定されない：

免疫系をブーストし、１つ以上の抗体（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、およびＩｇＥ）の量の増大を生じ、高い親和性の抗体産生（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭおよびＩｇＥ）を誘導し、および／または免疫応答を増大するための動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ、ニワトリ、ラクダ、ヤギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒト、最も好ましくはヒト）への投与。

【０４３５】

機能的な内因性抗体分子を産生できないか、さもなければ易感染性の内因性免疫系を有するが、別の動物由来の再構成されたか、または部分的に再構成された免疫系の手段によってヒト免疫グロブリン分子を産生し得る、動物（上記に列挙した動物を含むがこれに限定されず、またトランスジェニック動物も含む）への投与（例えば、ＰＣＴ公開番号、ＷＯ９８／２４８９３、ＷＯ９６／３４０９６、ＷＯ９６／３３７３５、およびＷＯ９１／１０７４１を参照のこと）。

【０４３６】

特定の抗原に対する免疫応答性を増強するワクチンアジュバント。

【０４３７】

腫瘍特異的免疫応答を増強するためのアジュバント。

【０４３８】

抗ウイルス免疫応答を増強するアジュバント。アジュバントとして本発明の組成物を用いて増強され得る抗ウイルス免疫応答としては、ウイルスおよび本明細書において記載されるかさもなければ当該分野で公知のウイルス関連疾患および症状が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下：ＡＩＤＳ、髄膜炎、デング、ＥＢＶ、および肝炎（例えば、Ｂ型肝炎）からなる群より選択される、ウイルス、疾患または症状に対する免疫応答を増強するためのアジュバントとして用いられる。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下：ＨＩＶ／ＡＩＤＳ、ＲＳウイルス、デング、ロタウイルス、日本脳炎、インフルエンザＡおよびＢ、パラインフルエンザ、麻疹、サイトメガロウイルス、狂犬病、Ｊｕｎｉｎウイルス、チクングニヤウイルス、リフトバレー熱、単純疱疹、および黄熱病からなる群より選択されるウイルス、疾患または症状に対する免疫応答を増強するアジュバントとして用いられる。

【０４３９】

抗細菌免疫応答または抗真菌免疫応答を増大するためのアジュバント。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗細菌免疫応答または抗真菌免疫応答としては、細菌または真菌、および本明細書中に記載されるか、またはさもなくば当該分野で公知の疾患または症状に関連する細菌または真菌が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状（これは、破傷風、ジフテリア、ボツリスム、およびＢ型髄膜炎からなる群から選択される）に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。特定の好ましい実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状（これは、Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｐａｒａｔｙｐｈｉ、Ｍｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、Ｇｒｏｕｐ Ｂ ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｐｐ.、Ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｇｅｎｉｃ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ、Ｅｎｔｅｒｏｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ Ｅ.ｃｏｌｉ、Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ、およびＰｌａｓｍｏｄｉｕｍ（マラリア）からなる群から選択される）に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使

用される。

【０４４０】

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

【０４４１】

病原に対するＢ細胞応答性の刺激物質として。

【０４４２】

Ｔ細胞のアクチベーターとして。

【０４４３】

免疫抑制性治療を受ける前の、個体の免疫状態を増大させる薬剤として。

【０４４４】

より高い親和性抗体を誘導するための薬剤として。

【０４４５】

血清免疫グロブリン濃度を増加するための薬剤として。

【０４４６】

免疫無防備状態の個体の回復を促進するための薬剤として。

【０４４７】

高齢の集団の間の免疫応答性をブーストするための薬剤として。

【０４４８】

骨髄移植および／または他の移植（例えば、同種異系または外因性の器官移植）の前、間、または後の免疫系エンハンサーとして。移植に関して、本発明の組成物は、移植の前、同時、および／または後に投与され得る。特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植の後、Ｔ細胞集団の回復の開始前に投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植の後、Ｔ細胞集団の回復の開始後であるが、Ｂ細胞集団の完全な回復の前に最初に投与される。

【０４４９】

Ｂ細胞機能の後天的欠損を有する個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤として。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することによって寛解または処置され得る、Ｂ細胞機能の後天的欠損を生じる状態としては、ＨＩＶ感染、ＡＩＤＳ、骨髄移植、およびＢ細胞慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４５０】

一時的な免疫不全を有する個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤として。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することによって寛解または処置され得る、一時的な免疫不全を生じる状態としては、ウイルス感染（例えば、インフルエンザ）からの回復、栄養失調に関連する状態、感染性単核細胞症からの回復、またはストレスに関連する状態、麻疹からの回復、輸血からの回復、手術からの回復が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４５１】

単球、樹状細胞および／またはＢ細胞による抗原提示のレギュレーターとして。１つの実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボで抗原提示を増強するかまたは抗原提示をアンタゴナイズする。さらに、関連する実施形態において、この抗原提示の増強またはアンタゴナイズは、抗腫瘍処置としてかまたは免疫系を調節するために有用であり得る。

【０４５２】
個体の免疫系を、ＴＨ１細胞性応答とは反対に、体液性応答（すなわち、ＴＨ２）の発生に指向するための薬剤として。
【０４５３】
腫瘍増殖を誘導し、従って、腫瘍を抗腫瘍性薬剤に対してより感受性にするための手段として。例えば、多発性骨髄腫は、緩慢な細胞分裂（ｄｉｖｉｄｉｎｇ）の疾患であり、従って、実質的に全ての抗腫瘍性レジメンに対して不応性である。これらの細胞は、より迅速に増殖させた場合、これらの感受性プロフィールは、おそらく変化するであろう。
【０４５４】
ＡＩＤＳ、慢性リンパ球障害および／または分類不能性免疫不全症（Ｃｏｍｍｏｎ　Ｖａｒｉａｂｌｅ　Ｉｍｍｕｎｏｄｉｆｉｃｉｅｎｃｙ）のような病理におけるＢ細胞の産生の刺激因子として。
【０４５５】
手術、外傷または遺伝的欠陥後のリンパ組織の生成および／または再生のための治療として。
【０４５６】
ＳＣＩＤ患者の間で観察されるような免疫不全を生じる遺伝性の障害のための遺伝子ベースの治療として。
【０４５７】
本発明のポリペプチドに対する免疫媒介応答を阻害または増強するための抗体を生成するための抗原として。
【０４５８】
Ｔ細胞を活性化する手段として。
【０４５９】
単球に影響を及ぼす寄生生物疾患（リーシュマニア属（Ｌｅｓｈｍａｎｉａ））に対して防御するために単球／マクロファージを活性化する手段として。
【０４６０】
移植前の骨髄サンプルの前処理として。このような処理は、Ｂ細胞提示を増加し、従って回復を加速する。
【０４６１】
本発明のポリペプチドによって誘発される分泌サイトカインを調節する手段として。
【０４６２】
さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、および／またはそのアゴニストは、ＩｇＥ媒介アレルギー応答を処置または予防するために使用され得る。このようなアレルギー反応としては、ぜん息、鼻炎および湿疹が挙げられるが、これらに限定されない。
【０４６３】
上記の適用の全ては、獣医学的医療に適用され得る。
【０４６４】
本発明のアンタゴニストとしては、例えば、結合および／または阻害性の抗体、アンチセンス核酸、リボザイムが挙げられる。これらは、上記のリガンドの活性の多くを無効にし、そして以下のような臨床的または実用的な適用を見い出すことが予測される。
【０４６５】
外来因子または自己に対する種々の局面の免疫応答をブロックする手段として。例としては、狼瘡および関節炎のような自己免疫障害、ならびに皮膚アレルギー、炎症、腸疾患、損傷および病原体に対する免疫応答が挙げられる。
【０４６６】
自己免疫疾患（例えば、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデスおよびＭＳ）に関連するＢ細胞増殖およびＩｇ分泌を妨げるための治療として。
【０４６７】

内皮細胞におけるＢ細胞および／またはＴ細胞の遊走のインヒビターとして。この活性は、組織構造または同属の応答を破壊し、そして例えば、免疫応答の破壊および敗血症のブロックにおいて有用である。

【０４６８】

対宿主性移植片病または移植片拒絶のインヒビターとして。

【０４６９】

ＡＬＬ、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、プラスマ細胞腫、多発性骨髄腫、バーキットリンパ腫およびＥＢＶ変換性（ＥＢＶ－ｔｒａｎｓｆｏｒｍｅｄ）疾患のようなＢ細胞および／またはＴ細胞の悪性疾患のための治療。

【０４７０】

未定量有意性の単一クローン性高ガンマグロブリン血症（ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌｇａｍｍｏｐａｔｈｙ　ｏｆ　ｕｎｄｅｔｅｒｍｉｎｅｄ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｃｅ）（ＭＧＵＳ）、ヴァルデンストレーム疾患、関連する特発性単一クローン性高ガンマグロブリン血症、およびプラスマ細胞腫のような疾患における、慢性の高ガンマグロブリン血症事象のための治療。

【０４７１】

ラージＢ細胞リンパ腫の細胞増殖を減少するための治療。

【０４７２】

慢性骨髄性白血病に関連するＢ細胞およびＩｇの関与を減少する手段。

【０４７３】

免疫抑制剤。

【０４７４】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボでのＩｇＥ濃度を調節するために使用され得る。

【０４７５】

別の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストの投与は、ぜん息、鼻炎および湿疹を含むがこれらに限定されない、ＩｇＥ媒介アレルギー反応を処置または予防するために使用され得る。

【０４７６】

アゴニストおよびアンタゴニストは、例えば、上記のような、薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物において使用され得る。

【０４７７】

アゴニストまたはアンタゴニストは、例えば、特定の自己免疫疾患および慢性炎症疾患および感染性疾患における、マクロファージおよびその前駆体、ならびに好中球、好塩基球、Ｂリンパ球およびいくつかのＴ細胞サブセット（例えば、活性化Ｔ細胞およびＣＤ８細胞傷害性Ｔ細胞ならびにナチュラルキラー細胞）の、ポリペプチド走化性および活性化を阻害するために使用され得る。自己免疫疾患の例は、本明細書中に記載され、その自己免疫疾患の例としては、多発性硬化症およびインスリン依存性糖尿病が挙げられる。アンタゴニストまたはアゴニストはまた、例えば、単核食細胞の補充および活性化を妨げることによって、珪肺症、サルコイドーシス、特発性肺線維症を含む、感染性疾患を処置するために使用され得る。これらはまた、例えば、好酸球の産生および遊走を妨げることによって、特発性好酸球増多症候群を処置するために使用され得る。アンタゴニストまたはアゴニストはまた、例えば、動脈壁における単球浸潤を妨げることによって、アテローム性動脈硬化症を処置するために使用され得る。

【０４７８】

本発明のポリペプチドに対する抗体は、ＡＲＤＳを処置するために使用され得る。

【０４７９】

本発明のアゴニストおよび／またはアンタゴニストはまた、創傷および組織の修復の刺激、新脈管形成の刺激、血管またはリンパの疾患または障害の修復の刺激における用途を

有する。さらに、本発明のアゴニストおよびアンタゴニストは、粘膜表面の再生を刺激するために使用され得る。

【０４８０】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはそれらのアゴニストは、原発性または後天性の免疫不全、欠損性の血清免疫グロブリン産生、再発性の感染および／または免疫系機能不全によって特徴付けられる障害を処置または予防するために使用される。さらに、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはそれらのアゴニストは、関節、骨、皮膚および／または耳下腺の感染、血液由来の感染（例えば、敗血症、髄膜炎、敗血症性関節炎および／または骨髄炎）、自己免疫疾患（例えば、本明細書中に開示されるような自己免疫疾患）、炎症性障害、および悪性疾患、ならびに／あるいはこれらの感染、疾患および／または悪性疾患に関連する任意の疾患または障害または状態（ＣＶＩＤ、他の原発性免疫不全、ＨＩＶ疾患、ＣＬＬ、再発性気管支炎、静脈洞炎、中耳炎、結膜炎、肺炎、肝炎、髄膜炎、帯状ヘルペス（例えば、重篤な帯状ヘルペス）および／またはニューモシスティスを含むが、これらに限定されない）を処置または予防するために使用され得る。

【０４８１】

別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、分類不能性免疫不全症（Ｃｏｍｍｏｎ　Ｖａｒｉａｂｌｅ　Ｉｍｍｕｎｏｄｉｆｉｃｉｅｎｃｙ）（「ＣＶＩＤ」；「後天性無ガンマグロブリン血症」および「後天性低ガンマグロブリン血症」としても公知である）またはこの疾患のサブセットを有する個体を、処置および／または診断するために使用される。

【０４８２】

特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、（１）癌または新生物、および（２）自己免疫細胞または組織関連癌または新生物を処置、診断、および／または予防するために用いられ得る。好ましい実施形態において、本明細書中に記載されるように、毒素または放射性同位体に結合体化された本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、急性骨髄性白血病を処置、診断、および／または予防するために用いられ得る。さらに好ましい実施形態において、本明細書中に記載されるように、毒素または放射活性同位体に結合体化された本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、および／またはホジキン病を処置、診断、診断、および／または予防するために用いられ得る。

【０４８３】

別の特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、選択的ＩｇＡ欠損、ミエロペルオキシダーゼ欠損、Ｃ２欠損、毛細管拡張性運動失調、ＤｉＧｅｏｒｇｅ奇形、分類不能型免疫不全（ＣＶＩ）、Ｘ連鎖無ガンマグロブリン血、重症複合免疫不全（ＳＣＩＤ）、慢性肉芽腫症（ＣＧＤ）、およびＷｉｓｋｏｔｔ－Ａｌｄｒｉｃｈ症候群を処置、診断、予測、および／または予防し得る。

【０４８４】

処置または検出され得る自己免疫障害の例としては、アディソン病、溶血性貧血、抗リン脂質症候群、慢性関節リウマチ、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーヴズ病、多発性硬化症、重症筋無力症、神経炎、眼炎痛、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、多発性内分泌腺症、紫斑病、ライター病、スティッフマン症候群、自己免疫性甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、自己免疫性の肺の炎症、ギヤン－バレー症候群、インスリン依存性糖尿病、および自己免疫炎症性眼疾患が挙げられるが、それらに限定されない。

【０４８５】

好ましい実施形態において、自己免疫疾患および障害ならびに／または上記の疾患およ

び障害に関連する状態は、本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、処置、予測、予防、および／または診断される。

【０４８６】

Ｂ細胞免疫不全個体（例えば、部分的または完全な脾臓摘出術をうけた個体など）の間で免疫応答性をブーストするための因子として用いられる。

【０４８７】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストは、アポトーシスに影響し得、従って、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストは、細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関連する多くの疾患を処置するのに有用である。例えば、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関連する疾患としては、以下が挙げられる：癌（例えば、濾胞性リンパ腫、ｐ５３変異を伴う癌、およびホルモン依存性腫瘍（大腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、肺癌、腸癌、精巣癌、胃癌、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳癌、前立腺癌、カポジ肉腫および卵巣癌が挙げられるが、これらに限定されない））；自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病（Ｂｅｈｃｅｔ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ）およびウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス）、炎症、対宿主性移植片病、急性移植片拒絶、ならびに慢性移植片拒絶。好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアンタゴニストは、特に上記に列挙される、癌の増殖、進行、および／または転移（ｍｅｔａｓｉｓ）を阻害するために使用される。

【０４８８】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る細胞生存に関連したさらなる疾患または状態としては、以下のような悪性腫瘍および関連する障害の増殖および／または転移が挙げられるがこれらに限定されない：白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、および赤白血病を含む））、および慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病）を含む）、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクロ大グロブリン血症、Ｈ鎖病、および固形腫瘍（肉腫および癌腫（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、大腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫（ｍｅｎａｎｇｉｏｍａ）、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫。

【０４８９】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、増加したアポトーシスに関連する疾患としては、以下が挙げられる：ＡＩＤＳ；神経変性障害（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または以前に関連した疾患）；自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病（Ｂｅｈｃｅｔ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ）、脊髄形成異常症

候群（例えば、再生不良性貧血）、対宿主性移植片病、虚血性傷害（心筋梗塞、発作および再灌流傷害によって生じるようなもの）、肝臓傷害（例えば、肝炎関連肝臓傷害、虚血／再灌流傷害、胆汁うっ滞（ｃｈｏｌｅｓｔｏｓｉｓ）（胆管傷害）および肝臓癌）；毒物誘導性肝臓疾患（アルコールによって引き起こされるようなもの）、敗血症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。

【０４９０】

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

【０４９１】

同様に、他の過剰増殖性障害もまた、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る。このような過剰増殖性障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：高ガンマグロブリン血症、リンパ球増殖性障害、パラプロテイン血症、紫斑、サルコイドーシス、セザリー症候群、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ゴシェ病、組織球増殖症、および任意の他の過剰増殖性疾患、加えて上記に列挙した器官系に見出される新生物。

【０４９２】

（過剰増殖障害）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、新生物を含む過剰増殖性疾患、障害を処置、予防および／または診断し得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、直接的または間接的な相互作用を介してこの障害の増殖を阻害し得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、過剰増殖障害を阻害し得る他の細胞を増殖させ得る。

【０４９３】

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

【０４９４】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置、予防および／または診断され得る過剰増殖性の疾患、障害および／または状態の例としては、結腸、腹部、骨、胸、消化系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭および首、神経（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸郭、ならびに尿生殖器に位置する新生物が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４９５】

同様に、他の過剰増殖性の疾患、障害および／または状態もまた、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置、予防および／または診断され得る。そのような過剰増殖性の疾患、障害および／または状態の例としては、高ガンマグロブリン血症、リンパ増殖性の疾患、障害および／または状態、パラプロテイン血症、紫斑病、類肉腫症、セザリー症候群、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ゴシェ病、組織球増殖症、ならびに任意の他の過剰増殖疾患、さらに上記に収載されている器官系に位置している新生物が挙げられるが、それらに限定されな

い。

【０４９６】

１つの好ましい実施形態は、本発明のポリヌクレオチドを利用して、本発明、および／またはタンパク質融合物もしくはそのフラグメントを用いる遺伝子治療により、異常な細胞分裂を阻害する。

【０４９７】

従って、本発明は、異常に増殖している細胞に、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより細胞増殖性の疾患、障害および／または状態を処置または予防するための方法を提供する。ここで、上記のポリヌクレオチドは、上記の発現を抑制する。

【０４９８】

本発明の別の実施形態は、個体における細胞増殖性の疾患、障害および／または状態を処置または予防する方法を提供し、この方法は、異常に増殖している細胞に本発明の１つ以上の活性な遺伝子コピーを投与する工程を包含する。好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、上記のポリヌクレオチドをコードするＤＮＡ配列を発現する際に有効な組換え発現ベクターを含むＤＮＡ構築物である。本発明の別の好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチドをコードするＤＮＡ構築物を細胞に挿入して、レトロウイルス（または、より好ましくは、アデノウイルスベクター）を利用して処置する（参考として本明細書中に援用される、Ｇ　Ｊ．Ｎａｂｅｌら、ＰＮＡＳ　１９９９　９６：３２４－３２６を参照のこと）。最も好ましい実施形態において、このウイルスベクターは欠損性であり、そして非増殖細胞を形質転換せず、増殖細胞のみを形質転換する。さらに、好ましい実施形態において、増殖している細胞に、単独で、または他のポリヌクレオチドとともに、もしくは他のポリヌクレオチドと融合して挿入される本発明のポリヌクレオチドは、次いで、外部刺激（すなわち、磁性、特定の低分子、化学物質、または薬物投与など）により調節され得る。この刺激は、上記のポリヌクレオチドの上流にあるプロモーターに作用して、コードされたタンパク質産物の発現を誘導する。このようにして、本発明の有益な治療効果は、上記の外部刺激に基づいて、明らかに調節され得る（すなわち、本発明のポリヌクレオチドの発現を増加、減少、または阻害するために）。

【０４９９】

本発明のポリヌクレオチドは、発癌性遺伝子または抗原の発現を抑制する際に有用であり得る。「発癌性遺伝子の発現を抑制する」とは、遺伝子の転写の抑制、遺伝子転写物（前メッセンジャー（ｐｒｅ－ｍａｓｓａｇｅ）ＲＮＡ）の分解、スプライシングの阻害、メッセンジャーＲＮＡの破壊、タンパク質の翻訳後修飾の妨げ、タンパク質の破壊、またはタンパク質の正常機能の阻害を意図する。

【０５００】

異常に増殖する細胞に対する局所的な投与に関しては、本発明のポリヌクレオチドは、当業者に公知の任意の方法により投与され得、この方法としては、トランスフェクション、エレクトロポレーション、細胞のマイクロインジェクション、例えば、リポソームのようなビヒクルにおいて、リポフェクチン、または裸のポリヌクレオチド、または本明細書中全体を通して記載される任意の他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリヌクレオチドは、公知の遺伝子送達系（例えば、当業者に公知のレトロウイルスベクター（Ｇｉｌｂｏａ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　４４：８４５（１９８２）；Ｈｏｃｋｅ，Ｎａｔｕｒｅ　３２０：２７５（１９８６）；Ｗｉｌｓｏｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８５：３０１４）；ワクシニアウイルス系（Ｃｈａｋｒａｂａｒｔｙら，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．５：３４０３（１９８５））または他の効率的なＤＮＡ送達系（Ｙａｔｅｓら，Ｎａｔｕｒｅ　３１３：８１２（１９８５））に限定されない）により送達され得る。これらの参考文献は、例示にすぎず、そして本明細書中に参考として援用される。異常に増殖している細胞に特異的に送達するか、またはそれをトランスフェクトし、そして非分裂細胞を残す（ｓｐａｒｅ）ために、当業者に公知のレトロウイルスまたはアデノウイルス（例えば、当該分野または本明細書中で記載される）送達系を利用することが好ましい。宿主ＤＮＡ複製は組み込むためにレトロウイルスＤ

ＮＡが必要であるので、このレトロウイルスは、その生活環についての必要とされるレトロウイルス遺伝子の欠如に起因して自己複製できない。本発明のポリヌクレオチドのために、このようなレトロウイルス送達系を利用して、上記の遺伝子および構築物を、異常に増殖している細胞に標的化し、そして非分裂性の正常細胞を残す。

【０５０１】

本発明のポリヌクレオチドは、疾患部位に直接注射針を導くために使用される画像化デバイスの使用によって、内部器官、体腔などにおける細胞増殖性障害／疾患部位に直接送達され得る。本発明のポリヌクレオチドはまた、手術介入時に疾患部位に投与され得る。

【０５０２】

「細胞増殖性疾患」とは、任意のヒトもしくは動物の疾患または障害が、器官、腔、または身体部分のいずれか１つもしくはいずれかの組み合わせを冒していることを意味する。この疾患は、良性または悪性に拘わらず、細胞、細胞群、もしくは組織の単一または複数の局所的な異常な増殖により特徴づけられる。

【０５０３】

本発明のポリヌクレオチドの任意の量は、この量が、処置細胞の増殖に対して生物学的に阻害性の効果を有する限り、投与され得る。さらに、本発明の１つより多くのポリヌクレオチドを、同時に同じ部位に投与することが可能である。「生物学的に阻害性の」とは、部分的または全体的な成長阻害ならびに細胞の増殖または成長の速度における減少を意味する。生物学的に阻害性の用量は、標的の悪性または組織培養において異常に増殖している細胞の成長、動物および細胞培養物における腫瘍成長に対する本発明のポリヌクレオチドの効果を評価すること、あるいは当業者に公知の任意の他の方法により決定され得る。

【０５０４】

本発明はさらに、抗体に基づく治療に関し、この方法は、記載される疾患、障害および／または状態の１つ以上を処置、予防および／または診断するために、哺乳動物（好ましくはヒト）の患者に抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体を投与する工程を包含する。抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体（ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体）を生成するための方法は、本明細書中の他の箇所に詳細に記載される。このような抗体は、当該分野で公知のように、または本明細書中に記載されるように薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

【０５０５】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の概要は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを、身体において局所的もしくは全身的に、または抗体の直接的な細胞傷害性（例えば、補体による媒介（ＣＤＣ）もしくはエフェクター細胞による媒介（ＡＤＣＣ））により結合させる工程を包含する。これらのアプローチのいくつかは、以下により詳細に記載される。本明細書中に提供される教示があれば、当業者は、本発明の抗体を、過度の実験なくして、診断、モニタリングまたは治療の目的のために使用する方法を知る。

【０５０６】

詳細には、本発明の抗体、フラグメントおよび誘導体は、本明細書中に記載されるように、細胞増殖および／または分化の疾患、障害および／または状態を有するか、または発症している被験体を処置、予防および／または診断するために有用である。このような処置は、単一用量または複数用量の抗体、あるいはそのフラグメント、誘導体、または結合体を投与する工程を包含する。

【０５０７】

本発明の抗体は、他のモノクローナル抗体もしくはキメラ抗体と組み合わせて、またはリンホカインもしくは造血増殖因子（例えば、これは、抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性が増加するように作用する）と組み合わせて、有利に利用され得る。

【０５０８】

本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、そのフラグメントもしくは領域に対して、高親和性および／または強力なインビボ阻害抗体および／または中和抗体を使用す

ることは、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド（そのフラグメントを含む）に関する疾患、障害および／または状態に関するイムノアッセイおよびその治療の両方のために好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド（そのフラグメントを含む）に対する親和性を有する。好ましい結合親和性は、５×１０$^{-6}$Ｍ、１０$^{-6}$Ｍ、５×１０$^{-7}$Ｍ、１０$^{-7}$Ｍ、５×１０$^{-8}$Ｍ、１０$^{-8}$Ｍ、５×１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ、５×１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-10}$Ｍ、５×１０$^{-11}$Ｍ、１０$^{-11}$Ｍ、５×１０$^{-12}$Ｍ、１０$^{-12}$Ｍ、５×１０$^{-13}$Ｍ、１０$^{-13}$Ｍ、５×１０$^{-14}$Ｍ、１０$^{-14}$Ｍ、５×１０$^{-15}$Ｍ、および１０$^{-15}$Ｍ未満の解離定数すなわちＫｄを有する親和性を含む。

【０５０９】

さらに、本発明のポリペプチドは、本明細書中の他の箇所に記載されるように、単独で、融合タンパク質として、または直接的にもしくは間接的に他のポリペプチドとの組み合わせでかのいずれかで、増殖性細胞もしくは組織の脈管形成を阻害する際に有用である。最も好ましい実施形態において、上記の抗脈管形成効果は、例えば、造血性の腫瘍特異的細胞（例えば、腫瘍関連マクロファージ）の阻害を通じて、間接的に達成され得る（本明細書中に参考として援用される、Ｊｏｓｅｐｈ ＩＢら、Ｊ Ｎａｔｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ，９０（２１）：１６４８－５３（１９９８）を参照のこと）。本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する抗体はまた、脈管形成の直接的または間接的な阻害を生じ得る（本明細書中に参考として援用される、Ｗｉｔｔｅ Ｌ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ Ｒｅｖ．１７（２）：１５５－６１（１９９８）を参照のこと）。

【０５１０】

本発明のポリペプチド（タンパク質融合物を含む）、またはそのフラグメントは、アポトーシスの誘導を通じて増殖性細胞または組織を阻害する際に有用であり得る。上記のポリペプチドは、直接的または間接的のいずれかで、増殖性の細胞および組織のアポトーシスを誘導するように、例えば、死ドメインレセプター（例えば、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）レセプター１、ＣＤ９５（Ｆａｓ／ＡＰＯ－１）、ＴＮＦレセプター関連アポトーシス媒介タンパク質（ＴＲＡＭＰ）ならびにＴＮＦ関連アポトーシス誘導リガンド（ＴＲＡＩＬ）レセプター１および２（本明細書中に参考として援用されるＳｃｈｕｌｚｅ－Ｏｓｔｈｏｆｆ Ｋ，ら、Ｅｕｒ Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ ２５４（３）：４３９－５９（１９９８）を参照のこと））の活性化において作用し得る。さらに、本発明の別の好ましい実施形態において、上記のポリペプチドは、他の機構を通じて（例えば、アポトーシスを活性化する他のタンパク質の活性化において）あるいは上記タンパク質の発現を単独でまたは低分子薬物もしくはアジュバント（例えば、アポプトニン、ガレクチン、チオレドキシン、抗炎症性タンパク質）と組み合わせてかのいずれかで刺激することを通じて、アポトーシスを誘導し得る（例えば、本明細書中に参考として援用される、Ｍｕｔａｔ Ｒｅｓ ４００（１－２）：４４７－５５（１９９８），Ｍｅｄ Ｈｙｐｏｔｈｅｓｅｓ．５０（５）：４２３－３３（１９９８），Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ Ｉｎｔｅｒａｃｔ．Ａｐｒ ２４；１１１－１１２；２３－３４（１９９８））、Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．７６（６）：４０２－１２（１９９８），Ｉｎｔ Ｊ Ｔｉｓｓｕｅ Ｒｅａｃｔ；２０（１）：３－１５（１９９８）を参照のこと）。

【０５１１】

本発明のポリペプチド（それに対するタンパク質融合物を含む）、またはそのフラグメントは、増殖性細胞または組織の転移を阻害する際に有用である。阻害は、本明細書中他の箇所に記載されるように、ポリペプチドまたは上記ポリペプチドに対する抗体を投与する工程の直接的結果として、または間接的に（例えば、転移を阻害することが公知のタンパク質（例えば、α４インテグリン）の発現を活性化する）生じ得る（例えば、本明細書中に参考として援用される、Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９８；２３１：１２５－４１を参照のこと）。本発明のこのような治療的影響は、単独で、または低分子薬物もしくはアジュバントと組み合わせてかのいずれかで達成され得

る。

【０５１２】

別の実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチド（例えば、ポリペプチドまたは異種ポリペプチドに関連するポリペプチド抗体、異種核酸、毒素、またはプロドラッグを含む組成物）を含む組成物を、本発明のポリペプチドを発現する、標的とされた細胞に送達する方法を提供する。本発明のポリペプチドまたはポリペプチド抗体は、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグと、疎水性、親水性、イオン性および／または共有結合的な相互作用を通じて結合され得る。

【０５１３】

本発明のポリペプチド、それに対するタンパク質融合物、またはそのフラグメントは、増殖性抗原および免疫原に対して、直接的（例えば、本発明のポリペプチドが「ワクチン接種」された場合、上記の抗原および免疫原に対して応答するように免疫応答を生じる）または間接的（例えば、免疫応答を増強することが公知のタンパク質（例えば、ケモカイン）の発現を活性化することにおいて）のいずれかで、増殖している細胞または組織の免疫原性および／または抗原性を増強する際に有用である。

【０５１４】

（心臓血管障害）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、四肢虚血のような末梢動脈疾患を含む、心臓血管の疾患、障害および／または状態を処置、予防および／または診断し得る。

【０５１５】

心臓血管の疾患、障害および／または状態としては、動動脈瘻（ａｒｔｅｒｉｏ－ａｒｔｅｒｉａｌ　ｆｉｓｔｕｌａ）、動静脈瘻、大脳動静脈先天異常、先天性心欠陥（ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌ　ｈｅａｒｔ　ｄｅｆｅｃｔｓ）、肺動脈弁閉鎖症、およびシミター症候群のような心臓血管異常が挙げられる。先天性心欠陥としては、大動脈縮窄、三房心、冠状脈管奇形（ｃｏｒｏｎａｒｙ　ｖｅｓｓｅｌ　ａｎｏｍａｌｉｅｓ）、交差心、右胸心、開存性動脈管（ｐａｔｅｎｔ　ｄｕｃｔｕｓ　ａｒｔｅｒｉｏｓｕｓ）、エブスタイン奇形、アイゼンメンガー複合体、左心室発育不全症候群、左胸心、ファロー四徴症、大血管転位症、両大血管右室起始症、三尖弁閉鎖症、動脈管遺残、および心中隔欠損症（ｈｅａｒｔ　ｓｅｐｔａｌ　ｄｅｆｅｃｔｓ）（例えば、大動脈肺動脈中隔欠損症（ａｏｒｔｏｐｕｌｍｏｎａｒｙ　ｓｅｐｔａｌ　ｄｅｆｅｃｔ）、心内膜床欠損症、リュタンバッシェ症候群、ファロー三徴症、心室心中隔欠損症（ｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ　ｈｅａｒｔ　ｓｅｐｔａｌ　ｄｅｆｅｃｔｓ））が挙げられる。

【０５１６】

心臓血管の疾患、障害および／または状態としてはまた、不整脈、カルチノイド心臓病、高心拍出量（ｈｉｇｈ　ｃａｒｄｉａｃ　ｏｕｔｐｕｔ）、低心拍出量（ｌｏｗ　ｃａｒｄｉａｃ　ｏｕｔｐｕｔ）、心タンポナーデ、心内膜炎（細菌性を含む）、心臓動脈瘤、心停止、うっ血性心不全、うっ血性心筋症、発作性呼吸困難、心臓水腫、心肥大、うっ血性心筋症、左心室肥大、右心室肥大、梗塞後心破裂（ｐｏｓｔ－ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ　ｈｅａｒｔ　ｒｕｐｔｕｒｅ）、心室中隔破裂、心臓弁疾患、心筋疾患、心筋虚血、心内膜液浸出、心外膜炎（梗塞性および結核性を含む）、気心膜症、心膜切開後症候群、右心疾患、リウマチ性心疾患、心室機能不全、充血、心臓血管妊娠合併症（ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ　ｐｒｅｇｎａｎｃｙ　ｃｏｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）、シミター症候群、心血管梅毒、および心血管結核（ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）のような心臓病が挙げられる。

【０５１７】

不整脈としては、洞性不整脈、心房性細動、心房粗動、徐脈、期外収縮、アダムズ－ストークス症候群、脚ブロック、洞房ブロック、長ＱＴ症候群（ｌｏｎｇ　ＱＴ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、副収縮、ローン－ギャノング－レヴァイン症候群、マヘーム型早期興奮症候群（Ｍａｈａｉｍ－ｔｙｐｅ　ｐｒｅ－ｅｘｃｉｔａｔｉｏｎ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、ウ

ルフ－パーキンソン－ホワイト症候群、洞不全症候群、頻拍、および心室性細動が挙げられる。頻拍としては、発作性頻拍、上室性頻拍、心室固有調律促進、房室結節性再入頻拍（ａｔｒｉｏｖｅｎｔｒｉｃｕｌａｒ　ｎｏｄａｌ　ｒｅｅｎｔｒｙ　ｔａｃｈｙｃａｒｄｉａ）、異所心房性頻拍、異所接合部頻拍、洞房結節性再入頻拍（ｓｉｎｏａｔｒｉａｌ　ｎｏｄａｌ　ｒｅｅｎｔｒｙ　ｔａｃｈｙｃａｒｄｉａ）、洞性頻拍、トルサード・ド・ポワント、および心室性頻拍が挙げられる。

【０５１８】

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

【０５１９】

心筋疾患としては、アルコール性心筋症、うっ血性心筋症、肥大型心筋症、弁下部性大動脈狭搾症、弁下部性肺動脈狭搾症、拘束型心筋症、シャーガス心筋症、心内膜線維弾性症、心内膜心筋線維症、キーンズ症候群、心筋再灌流障害、および心筋炎が挙げられる。

【０５２０】

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

【０５２１】

心臓血管疾患としてはまた、動脈瘤、血管形成異常、血管腫症、細菌性血管腫症状、ヒッペル－リンダラ疾患（Ｈｉｐｐｅｌ－Ｌｉｎｄａｕ　Ｄｉｓｅａｓｅ）、クリペル－トルノネー－ウェーバー症候群、スタージ－ウェーバー症候群、血管運動神経性水腫、大動脈疾患、高安動脈炎、大動脈炎、ルリーシュ症候群、動脈閉塞疾患、動脈炎、動脈内膜炎（ｅｎａｒｔｅｒｉｔｉｓ）、結節性多発性動脈炎、脳血管の疾患、障害および／もしくは状態、糖尿病性血管障害、糖尿病性網膜症、塞栓症、血栓症、先端紅痛症、痔、肝静脈閉塞障害、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管障害、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管疾患、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、レーノー病、ＣＲＥＳＴ症候群、網膜静脈閉塞、シミター症候群、上大静脈症候群、毛細血管拡張症、毛細血管拡張性運動失調（ａｔａｃｉａ　ｔｅｌａｎｇｉｅｃｔａｓｉａ）、遺伝性出血性毛細管拡張症、精索静脈瘤、拡張蛇行静脈、静脈瘤性潰瘍、脈管炎、および静脈機能不全のような血管疾患が挙げられる。

【０５２２】

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

【０５２３】

動脈閉塞疾患としては、動脈硬化症、間欠性跛行、頸動脈狭窄症、線維筋性形成異常、腸間膜性血管閉塞、モヤモヤ病、腎動脈閉塞、網膜動脈閉塞、および閉塞性血栓性血管炎が挙げられる。

【０５２４】

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

【０５２５】

塞栓症としては、空気塞栓症、羊水塞栓症、コレステロール塞栓症、爪先チアノーゼ症候群、脂肪塞栓症、肺動脈塞栓症、および血栓塞栓症が挙げられる。血栓症としては、冠

状動脈血栓症、肝静脈血栓症、網膜静脈閉塞、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、および血栓性静脈炎が挙げられる。

【０５２６】

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

【０５２７】

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

【０５２８】

ポリペプチドは、当該分野で公知である任意の方法を使用して投与され得、これらの方法としては、送達部位における直接的針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、微粒子銃（ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ）注射、粒子加速器、ゲルフォームスポンジデポー、他の市販デポー物質、浸透圧ポンプ、経口または坐剤の固形薬学的処方物、手術中のデカンティングまたは局所適用、エアロゾル送達が挙げられるが、これらに限定されない。そのような方法は当該分野で公知である。本発明のポリペプチドは、下記でより詳細に記載される、治療剤（Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ）の一部として投与され得る。本発明のポリヌクレオチドを送達する方法は本明細書中でより詳細に記載される。

【０５２９】

（抗新脈管形成活性）

新脈管形成の内因性の、刺激因子とインヒビターとの間の天然に存在する平衡は、阻害影響を支配する平衡である。Ｒａｓｔｉｎｅｊａｄら、Ｃｅｌｌ ５６：３４５～３５５（１９８９）。新生血管形成が通常の生理学的条件下において生じるまれな場合（例えば、創傷治癒、器官再生、胚発生、および雌性生殖プロセス）において、新脈管形成は、厳密に調節され、そして空間的および時間的に定められる。病理学的な新脈管形成の条件（例えば、固形腫瘍増殖を特徴付ける）下において、これらの調節の制御はできない。調節されていない新脈管形成は病的になり、そして多くの新生物性疾患および非新生物性疾患の進行を維持する。多くの重篤な疾患は、固形腫瘍の増殖および転移、関節炎、いくつかの型の眼の障害および乾癬を含む、異常な新生血管形成により支配される。例えば、Ｍｏｓｅｓら、Ｂｉｏｔｅｃｈ．９：６３０～６３４（１９９１）；Ｆｏｌｋｍａｎら、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．、３３３：１７５７～１７６３（１９９５）；Ａｕｅｒｂａｃｈら、Ｊ．Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．２９：４０１～４１１（１９８５）；Ｆｏｌｋｍａｎ、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、ＫｌｅｉｎおよびＷｅｉｎｈｏｕｓｅ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１７５～２０３頁（１９８５）；Ｐａｔｚ、Ａｍ．Ｊ．Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ．９４：７１５～７４３（１９８２）；およびＦｏｌｋｍａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２１：７１９～７２５（１９８３）による概説を参照のこと。多くの病的状態において、新脈管形成のプロセスは、その疾患状態に寄与する。例えば、固形腫瘍の増殖が新脈管形成に依存することを示唆する有意なデータが蓄積されている。ＦｏｌｋｍａｎおよびＫｌａｇｓｂｒｕｎ、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３５：４４２～４４７（１９８７）。

【０５３０】

本発明は、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、本発明のアゴニストおよび／またはアンタゴニストの投与による新生血管形成に関連する疾患、障害および／あるいは状態の処置を提供する。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置し得る悪性状態および転移性状態には、本明細書に記載の悪性腫瘍、固形腫瘍、および癌、ならびに当該分野で公知の他のもの（このような

障害の総説については、Ｆｉｓｈｍａｎら、Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、第２版、Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏ．，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ（１９８５）を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。従って、本発明は、治療有効量の、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを、必要な個体に投与する工程を包含する、新脈管形成関連疾患および／または障害の処置、予防および／あるいは診断の方法を提供する。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、癌または腫瘍を治療的に予防するために、種々のさらなる方法で利用され得る。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストで処置、予防および／あるいは診断され得る癌としては、前立腺癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、膵臓癌、喉頭癌、食道癌、精巣癌、肝臓癌、耳下腺癌、胆管癌、結腸癌、直腸癌、頸部癌、子宮癌、子宮内膜癌、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌を含む固形腫瘍；原発性腫瘍および転移；黒色腫；グリア芽細胞腫；カポージ肉腫；平滑筋肉腫；非小細胞肺癌；結腸直腸癌；進行性（ａｄｖａｎｃｅｄ）悪性疾患；および血液から生じる腫瘍（例えば、白血病）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、皮膚癌、頭頸部腫瘍、乳房腫瘍およびカポージ肉腫のような癌を処置するために、局所送達され得る。

【０５３１】

なお他の局面において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、例えば膀胱内投与によって膀胱癌の表面形態を処置、予防および／あるいは診断するために利用され得る。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、注射もしくはカテーテルを介して、腫瘍に直接的に、または腫瘍部位付近に送達され得る。当然のことながら、当業者が理解するように、適切な投与様式は、処置されるべき癌によって変化する。他の送達様式は本明細書中において議論される。

【０５３２】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、癌に加えて、他の疾患、障害および／あるいは状態（新脈管形成を含む）を処置、予防および／あるいは診断する際に有用であり得る。これらの障害、疾患および／あるいは状態としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：良性腫瘍（例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫）；動脈硬化斑；眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、ブドウ膜炎（ｕｖｉｅｔｉｓ）および眼の翼状片（Ｐｔｅｒｙｇｉａ）（異常な血管増殖））；慢性関節リウマチ；乾癬；遅延型創傷治癒；子宮内膜症；脈管形成；顆粒化；過形成性瘢痕（ケロイド）；偽関節骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋の新脈管形成；冠状側副枝（ｃｏｒｏｎａｒｙ ｃｏｌｌａｔｅｒａｌｓ）；大脳側副枝；動静脈奇形；虚血性四肢新脈管形成；オースラー－ウェーバー（Ｏｓｌｅｒ－Ｗｅｂｂｅｒ）症候群；プラーク新生血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；血管線維腫；線維筋性形成異常；創傷顆粒化；クローン病；およびアテローム性動脈硬化症。

【０５３３】

例えば、本発明の１つの局面において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを過形成性瘢痕またはケロイドに投与する工程を包含する、過形成性瘢痕およびケロイドを処置、予防および／あるいは診断するための方法が提供される。

【０５３４】

本発明の１つの実施形態において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストは、過形成性瘢痕またはケロイドに、これらの病変の進行を妨げるために直接注射される。この治療は、過形成性瘢痕およびケロイド（例えば、やけど）の発生を生じることが知られている状態の予防処置において特に価値があり、そして好ましくは、増殖期が進行する時間（最初の傷害の約１４日後）を経た後であるが、過形成

性瘢痕またはケロイドの発生の前に開始される。上述のように、本発明はまた、眼の新生血管形成疾患（例えば、角膜新生血管形成、血管新生緑内障、増殖性糖尿病網膜症、水晶体後線維増殖および黄斑変性を含む）を処置、予防および／または診断するための方法を提供する。

【０５３５】

さらに、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド（アゴニストおよび／またはアンタゴニストを含む）を用いて処置され得る新生血管形成に関連する眼の疾患、障害および／あるいは状態としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血管新生緑内障、糖尿病網膜症、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟児網膜症、黄斑変性、角膜移植新生血管形成、ならびに他の眼の炎症性疾患、眼の腫瘍、および脈絡膜または虹彩の新生血管形成に関連する疾患。例えば、Ｗａｌｔｍａｎら、Ａｍ．Ｊ．Ｏｐｈｔｈａｌ．８５：７０４～７１０（１９７８）およびＧａｒｔｎｅｒら、Ｓｕｒｖ．Ｏｐｈｔｈａｌ．２２：２９１～３１２（１９７８）による総説を参照のこと。

【０５３６】

従って、本発明の１つの局面において、治療有効量の化合物（上記）を患者に対して、血管の形成が阻害されるように角膜に投与する工程を包含する、角膜新生血管形成（角膜移植新生血管形成を含む）のような眼の新生血管形成疾患を処置するための方法が提供される。簡潔には、角膜は、通常には血管を欠く組織である。しかし、特定の病的状態において、毛細血管は、縁の角膜周囲脈管叢から角膜に伸長し得る。角膜が血管化される場合、角膜はまた混濁され、患者の視力の衰えを生じる。角膜が完全に不透明になる（ｏｐａｃｉｔａｔｅ）場合に、完全に視力喪失になり得る。広範な種々の疾患、障害および／あるいは状態は、例えば、以下を含む角膜新生血管形成を生じ得る：角膜感染（例えば、トラコーマ、単純ヘルペス角膜炎、リーシュマニア症およびオンコセルカ症）、免疫学的プロセス（例えば、移植片拒絶およびスティーヴンズ－ジョンソン症候群）、アルカリやけど、外傷、炎症（任意の原因による）、毒性および栄養欠乏状態、ならびにコンタクトレンズを装着することの合併症として。

【０５３７】

本発明の特に好ましい実施形態において、生理食塩水（眼科用調製物において一般に使用される任意の保存剤および抗菌剤と組合せて）中で局所投与のために調製され得、そして点眼剤形態で投与され得る。溶液または懸濁液は、純粋な形態で調製され、そして１日に数回投与され得る。あるいは、上記のように調製される抗脈管形成組成物はまた、角膜に直接投与され得る。好ましい実施形態において、抗脈管形成組成物は、角膜に結合する粘膜接着性ポリマーとともに調製される。さらなる実施形態において、抗脈管形成因子または抗脈管形成組成物は、従来のステロイド治療に対する補助剤として利用され得る。局所治療はまた、脈管形成応答（例えば、化学的やけど）を誘導する高い可能性を有することが公知の角膜病変において予防的に有用であり得る。これらの場合において、処置（おそらくステロイドと組み合わされる）は、その後の合併症を予防するのを補助するために直ちに開始され得る。

【０５３８】

他の実施形態において、上記の化合物は、角膜支質に直接、顕微鏡下での誘導のもとで眼科医によって注入され得る。好ましい注射部位は、個々の病巣の形態で変化し得るが、投与の目標は、脈管構造の前進している面に組成物を置くこと（すなわち、血管と正常な角膜との間に分散される）である。ほとんどの場合において、これは、前進している血管から角膜を「防御」するための縁周囲（ｐｅｒｉｌｉｍｂｉｃ）角膜注射を含む。この方法はまた、角膜新生血管形成を予防的に防ぐために、角膜傷害の直後に利用され得る。この状況において、この物質は、角膜病巣とその所望されない潜在的な血液供給の縁との間に分散して縁周囲角膜に注射され得る。このような方法はまた、類似の様式で、移植された角膜の毛細血管侵入を予防するために利用され得る。徐放形態において、注入は、１年に２～３回のみ必要とされ得る。ステロイドもまた、注入溶液に添加され、その注射自体から生じる炎症を低減し得る。

【０５３９】
本発明の別の局面において、患者に、血管の形成を阻害するように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、血管新生緑内障を処置するための方法が提供される。１つの実施形態において、化合物は、血管新生緑内障の早期形態を処置するために、眼に局所投与され得る。他の実施形態において、化合物は、前眼房角（ａｎｔｅｒｉｏｒ　ｃｈａｍｂｅｒ　ａｎｇｌｅ）の領域への注入によって移植され得る。他の実施形態において、化合物はまた、化合物が眼房水に連続的に放出されるように、任意の位置に配置され得る。本発明の別の局面において、患者に、血管の形成が阻害されるように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、増殖性糖尿病性網膜症を処置するための方法が提供される。

【０５４０】
本発明の特に好ましい実施形態において、増殖性糖尿病性網膜症は、網膜におけるポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストの局所濃度を増加させるために、眼房水または硝子体への注入によって処置され得る。好ましくは、この処置は、光凝固を必要とする重篤な疾患の獲得の前に開始されるべきである。

【０５４１】
本発明の別の局面において、患者に、血管の形成が阻害されるように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび／またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、水晶体後線維増殖症を処置するための方法が、提供される。化合物は、硝子体内注射を介して、および／または眼内移植を介して局所投与され得る。

【０５４２】
さらに、このポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストで処置、予防および／あるいは疾患され得る障害としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：血管腫、関節炎、乾癬、血管線維腫、アテローム性動脈硬化症斑、遅延型創傷治癒、顆粒化、血友病性関節、過形成性瘢痕、偽関節骨折、オースラーウェーバー（Ｏｓｌｅｒ－Ｗｅｂｅｒ）症候群、化膿性肉芽腫、強皮症、トラコーマ、および血管接着。

【０５４３】
さらに、このポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストで処置され得る障害および／または状態としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：固形腫瘍、血液由来の（ｂｌｏｏｄ　ｂｏｒｎ）腫瘍（例えば、白血病）、腫瘍転移、カポージ肉腫、良性腫瘍（例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫）、慢性関節リウマチ、乾癬、眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、およびブドウ膜炎（ｕｖｉｅｔｉｓ））、遅延型創傷治癒、子宮内膜症、脈管形成、顆粒化、過形成性瘢痕（ケロイド）、偽関節骨折、強皮症、トラコーマ、血管接着、心筋の新脈管形成、冠状側副枝（ｃｏｒｏｎａｒｙ　ｃｏｌｌａｔｅｒａｌｓ）、大脳側副枝、動静脈奇形、虚血性四肢新脈管形成、オースラーウェーバー症候群、プラーク新生血管形成、毛細血管拡張症、血友病性関節、血管線維腫、線維筋性形成異常、創傷顆粒化、クローン病、アテローム性動脈硬化症、産児制限薬剤（月経を制御する、胎芽着床のために必要な血管新生を予防することによる）、病原性の結果（例えば、引っかき病（Ｒｏｃｈｅｌｅ　ｍｉｎａｌｉａ　ｑｕｉｎｔｏｓａ）、潰瘍（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ）、バルトネラ症および細菌性血管腫症状）のような新脈管形成を有する疾患。

【０５４４】
出産制限方法の１つの局面において、胎芽着床をブロックするに十分な化合物の量は、性交および受精が起こる前またはその後に投与され、このようにして出産制限の有効な方法、おそらく「事後用（ｍｏｒｎｉｎｇ　ａｆｔｅｒ）」方法を提供する。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアゴニストはまた、月経を制御すること

において使用され得るか、または子宮内膜症の処置における腹膜洗浄液として、もしくは腹膜移植のためのいずれかで投与され得る。

【０５４５】

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

【０５４６】

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

【０５４７】

本発明のさらなる局面において、腫瘍切除部位を処置するための方法が提供される。この方法は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニスト、および／またはアゴニストを、切除後に腫瘍の切除縁に投与して、その部位での、癌の局所的再発および新血管形成を阻害するようにする工程を包含する。本発明の１つの実施形態において、この抗脈管形成化合物は、腫瘍切除部位に直接投与される（例えば、この抗脈管形成化合物を用いて、腫瘍の切除縁に綿棒で塗るか、ブラシで塗るか、または他の方法でコーティングすることによって塗布される）。あるいは、この抗脈管形成化合物は、投与の前に、公知の手術用ペーストに組み込まれ得る。本発明の特に好ましい実施形態において、この抗脈管形成化合物は、悪性疾患の肝切除の後、および神経外科的手術の後に塗布される。

【０５４８】

本発明の１つの局面において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストは、広範な種類の腫瘍（例えば、胸部腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍、および肝腫瘍を含む）の切除縁に投与され得る。例えば、本発明１つの実施形態において、抗脈管形成化合物が、神経学的腫瘍の部位に、切除の後に投与され得、その結果、その部位での新規な血管の形成が阻害される。

【０５４９】

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

【０５５０】

軽い方の「ｄ群」遷移金属としては、例えば、バナジウム、モリブデン、タングステン、チタン、ニオブ、およびタンタル種が、挙げられる。このような遷移金属種は、遷移金属錯体を形成し得る。上記の遷移金属種の適切な錯体は、オキソ遷移金属錯体を含む。

【０５５１】

バナジウム錯体の代表的例は、オキソバナジウム錯体（例えば、バナジン酸塩錯体およびバナジル錯体）を含む。適切なバナジン酸塩錯体は、メタバナジン酸塩錯体およびオルトバナジウム酸塩錯体（例えば、メタバナジン酸アンモニウム、メタバナジン酸ナトリウ

ム、およびオルトバナジン酸ナトリウム）を含む。適切なバナジル錯体は、例えば、バナジルアセチルアセトネートおよび硫酸バナジル（硫酸バナジル水和物（例えば、硫酸バナジル一水和物および硫酸バナジル三水和物）を含む）を含む。

【０５５２】

タングステン錯体およびモリブデン錯体の代表的例もまた、オキソ錯体を含む。適切なオキソタングステン錯体は、タングステン酸塩錯体および酸化タングステン錯体を含む。適切なタングステン酸塩錯体は、タングステン酸アンモニウム、タングステン酸カルシウム、タングステン酸ナトリウム二水和物、およびタングステン酸を含む。適切な酸化タングステンは、酸化タングステン（ＩＶ）および酸化タングステン（ＶＩ）を含む。適切なオキソモリブデン錯体は、モリブデン酸塩錯体、酸化モリブデン錯体、およびモリブデニル錯体を含む。適切なモリブデン酸塩錯体は、モリブデン酸アンモニウムおよびその水和物、モリブデン酸ナトリウムおよびその水和物、ならびにモリブデン酸カリウムおよびその水和物を含む。適切な酸化モリブデンは、酸化モリブデン（ＶＩ）、酸化モリブデン（ＶＩ）、およびモリブデン酸を含む。適切なモリブデニル錯体は、例えば、モリブデニルアセチルアセトネートを含む。他の適切なタングステン錯体およびモリブデン錯体は、例えば、グリセロール、酒石酸および糖から誘導された、ヒドロキソ誘導体を含む。

【０５５３】

広範な種類の他の抗脈管形成因子もまた、本発明の状況において利用され得る。代表的例は、以下を含む：血小板第４因子；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（クイーンクラブ（ｑｕｅｅｎ　ｃｒａｂ）の殻から調製される）（Ｍｕｒａｔａら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５１：２２～２６、１９９１）；硫酸化多糖ペプチドグリカン複合体（ＳＰ－ＰＧ）（この化合物の機能は、ステロイド（例えば、エストロゲンおよびクエン酸タモキシフェン）の存在によって、増強され得る）；スタウロスポリン；基質代謝の調節因子（例えば、プロリンアナログ、シスヒドロキシプロリン、ｄ，Ｌ－３，４－デヒドロプロリン、チアプロリン、α，α－ジピリジル、アミノプロピオニトリルフマレートを含む）；４－プロピル－５－（４－ピリジニル）－２（３Ｈ）－オキサゾロン；メトトレキサート；ミトザントロン；ヘパリン；インターフェロン；２マクログロブリン－血清；ＣｈＩＭＰ－３（Ｐａｖｌｏｆｆら、Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．２６７：１７３２１～１７３２６、１９９２）；キモスタチン（Ｔｏｍｋｉｎｓｏｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ．２８６：４７５～４８０、１９９２）；シクロデキストリンテトラデカサルフェート；エポネマイシン；カンプトテシン；フマギリン（Ｉｎｇｂｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　３４８：５５５～５５７、１９９０）；チオリンゴ酸金ナトリウム（「ＧＳＴ」；ＭａｔｓｕｂａｒａおよびＺｉｆｆ、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．７９：１４４０～１４４６、１９８７）；アンチコラゲナーゼ－血清；α２－抗プラスミン（Ｈｏｌｍｅｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２（４）：１６５９～１６６４、１９８７）；ビサントレン（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）；ロベンザリット二ナトリウム（Ｎ－（２）－カルボキシフェニル－４－クロロアントロニル酸（ｃｈｌｏｒｏａｎｔｈｒｏｎｉｌｉｃ　ａｃｉｄ）二ナトリウム、または「ＣＣＡ」；Ｔａｋｅｕｃｈｉら、Ａｇｅｎｔｓ　Ａｃｔｉｏｎｓ　３６：３１２～３１６、１９９２）；サリドマイド；Ａｎｇｏｓｔａｔｉｃステロイド；ＡＧＭ－１４７０；カルボキシアミノイミダゾール（ｃａｒｂｏｘｙｎａｍｉｎｏｌｉｍｉｄａｚｏｌｅ）；およびメタロプロテイナーゼインヒビター（例えば、ＢＢ９４）。

【０５５４】

（細胞レベルでの疾患）

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、および／またはアンタゴニストまたはアゴニストによって、処置、予防および／または診断され得る、細胞生存の増大またはアポトーシスの阻害に関連する疾患には、以下が挙げられる：癌（例えば、濾胞性リンパ腫、ｐ５３変異を伴う癌腫、およびホルモン依存性腫瘍。これらは以下を含むが、これらに限定されない：結腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、肺癌、腸の癌、精巣癌、胃癌、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞

腫、破骨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳癌、前立腺癌、カポージ肉腫および卵巣癌）；自己免疫疾患、障害および／または状態（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ）、ならびにウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス）、炎症、対宿主性移植片病、急性移植片拒絶、ならびに慢性移植片拒絶。好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドおよび／またはアゴニストまたはアンタゴニストは、特に上記に列挙されたものにおいて、癌の増殖、進行、および／または転移（ｍｅｔａｓｉｓ）を阻害するために使用される。

【０５５５】

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

【０５５６】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、および／またはアゴニストまたはアンタゴニストによって処置、予防および／あるいは診断され得る、アポトーシスの増大に関連する疾患には、以下が挙げられる：ＡＩＤＳ；神経変性疾患、障害および／または状態（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または先の関連した疾患）；自己免疫疾患、障害および／または状態（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ）、脊髄形成異常症候群（例えば、再生不良性貧血）、対宿主性移植片病、虚血性損傷（心筋梗塞、発作および再灌流損傷によって生じるようなもの）、肝臓損傷（例えば、肝炎関連肝臓損傷、虚血／再灌流損傷、胆汁うっ滞（ｃｈｏｌｅｓｔｏｓｉｓ）（胆管損傷）および肝臓癌）；毒物誘導性肝臓疾患（アルコールによって生じるようなもの）、敗血症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。

【０５５７】

（創傷治癒および上皮細胞増殖）

本発明のなおさらなる局面に従って、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、および／またはアゴニストまたはアンタゴニストを、治療目的のため、例えば、創傷治癒の目的のために上皮細胞増殖および基底ケラチノサイトを刺激するため、ならびに毛包産生および皮膚創傷の治癒を刺激するために、利用するためのプロセスが提供される。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、およびアゴニストまたはアンタゴニストは、以下を含む創傷治癒を刺激することにおいて臨床的に有用であり得る：外科的創傷、切除の創傷、深い創傷（真皮および表皮の損傷を含む）、眼の組織の創傷、歯の組織の創傷、

口腔の創傷、糖尿病性潰瘍、皮膚の潰瘍、肘の潰瘍、動脈性の潰瘍、静脈うっ滞潰瘍、熱への曝露または化学物質から生ずる熱傷、および他の異常な創傷治癒状態（例えば、尿毒症、栄養失調、ビタミン欠乏、および／またはステロイド、放射能療法および抗腫瘍性薬物および代謝拮抗物質を用いる全身性処置に関連する合併症。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、皮膚の損失の後の皮膚の回復を促進するために使用され得る。

【０５５８】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドおよび／またはアゴニストまたはアンタゴニストは、創傷床（ｗｏｕｎｄ　ｂｅｄ）への皮膚移植片の付着を増大するため、および創傷床からの再上皮形成を刺激するために使用され得る。以下は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストが創傷床への付着を増大するために使用され得る、移植片の型である：自家移植片、人工皮膚、同種移植片（ａｌｌｏｇｒａｆｔ）、自己植皮片、自己表皮移植片（ａｕｔｏｅｐｄｅｒｍｉｃ　ｇｒａｆｔ）、無血管性（ａｖａｃｕｌａｒ）移植片、ブレアーブラウン移植片、骨移植片、胚胎組織移植片、真皮移植片、遅延移植片、皮膚移植片、表皮移植片、筋膜移植片、全層皮膚移植片、異種移植片（ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ　ｇｒａｆｔ）、異種移植片（ｘｅｎｏｇｒａｆｔ）、同種移植片（ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ　ｇｒａｆｔ）、増殖性移植片、層板状の移植片、網状移植片、粘膜移植片、オリエーティールシュ移植片、大網移植片（ｏｍｅｎｐａｌ　ｇｒａｆｔ）、パッチの移植片、茎状移植片、全層移植片（ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎｇ　ｇｒａｆｔ）、分層植皮片（ｓｐｌｉｔ　ｓｋｌｎ　ｇｒａｆｔ）、分層植皮片（ｔｈｉｃｋ　ｓｐｌｉｔ　ｇｒａｆｔ）。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドおよび／またはアゴニストまたはアンタゴニストは、皮膚の強度を助長するため、および高齢の皮膚の外見を改善するために使用され得る。

【０５５９】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、肝細胞増殖、および肺、乳房、膵臓、胃、小腸（ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｓｔｉｎｇ）、および大腸における上皮細胞増殖における変化を生じると考えられる。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、上皮細胞（例えば、皮脂細胞（ｓｅｂｏｃｙｔｅ）、毛包、肝実質細胞、肺胞上皮細胞ＩＩ型（ｔｙｐｅ　ＩＩ　ｐｎｅｕｍｏｃｙｔｅ）、ムチン産生杯細胞、および他の上皮細胞、ならびに皮膚、肺、肝臓、および胃腸管内に含まれるそれらの先祖）の増殖を促進し得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストは、内皮細胞、ケラチノサイト、および基底ケラチノサイトの増殖を促進し得る。

【０５６０】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、照射、化学療法処置またはウイルス感染から生じる腸の毒性の副作用を低減するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、小腸粘膜上で細胞保護的な効果を有し得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、化学療法およびウイルス感染から生じる粘膜炎（ｍｕｃｏｓｉｔｉｓ）（口粘膜）の治癒を刺激し得る。

【０５６１】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、熱傷を含む、完全なおよび部分的な厚さの皮膚欠損における皮膚の十分な再生（すなわち、毛包、汗腺、および皮脂腺の再増殖）、乾癬のような他の皮膚欠損の処置においてさらに使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストおよび／またはアンタゴニストは、表皮水疱症、これらの損傷の再上皮形成を促進することによる頻繁な開放性かつ疼痛性の水疱を生じる内在的な真皮への表皮の接着における欠損を処置するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくは

ポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、胃潰瘍および十二指腸潰瘍を処置し、そして粘膜の内層の瘢痕形成ならびにより迅速な腺の粘膜および十二指腸の粘膜の内層の再生による治癒を助けるために使用され得る。炎症性腸疾患（例えば、クーロン病および潰瘍性大腸結腸炎）は、それぞれ、小腸または大腸の粘膜表面の崩壊を生じる疾患である。従って、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、粘膜表面の再表面化（ｒｅｓｕｌｆａｃｉｎｇ）を促進して、より迅速な治癒を助けるため、および炎症性腸疾患の進行を予防するために、使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、アゴニストおよび／またはアンタゴニストを用いる処置は、胃腸管全体の粘膜の産生に対して有意な効果を有することが予測され、そして腸粘膜を、摂取されたかまたは外科手術後の有害な物質から保護するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、本発明のポリヌクレオチドの発現下に関連する疾患を処置するために使用され得る。

【０５６２】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、種々の病的状態に起因する肺への損傷を予防および治癒するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストのような成長因子は、急性または慢性の肺損傷を予防または処置するために、増殖および分化を刺激し得、そして肺胞および気管支（ｂｒｏｃｈｉｏｌａｒ）上皮の修復を促進し得る。例えば、気管支上皮および肺胞（ａｖｅｏｌｉ）の壊死を生じる、気腫（これは、肺胞の進行性の損失を生じる）および吸入損傷（すなわち、煙の吸入および熱傷から生じる）は、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストまたはアンタゴニストを使用して効果的に処置され得る。また、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、肺胞上皮細胞ＩＩ型の増殖および分化を刺激するために使用され得、これは、未熟な乳児における硝子膜疾患（例えば、乳児呼吸窮迫症候群および気管支肺異形成症）のような疾患を処置または予防することを助け得る。

【０５６３】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、肝実質細胞の増殖および分化を刺激し得、そして従って、肝臓疾患および病状（例えば、肝硬変により生じる劇症肝不全、肝炎ウイルスおよび毒性物質（すなわち、アセトアミノフェン、四塩化炭素（ｃａｒｂｏｎ　ｔｅｔｒａｈｏｌｏｒｉｄｅ）、および他の当該分野で公知の肝臓毒素）により生じる肝臓損傷）を緩和または処置するために使用され得る。

【０５６４】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、真性糖尿病の発症を処置または予防するために使用され得る。新たにＩ型糖尿病およびＩＩ型糖尿病と診断された患者において、いくつかの島細胞機能が残っている場合、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、その疾患の持続性の発現を緩和、遅延または予防するように、その島機能を維持するために使用され得る。また、本発明のポリヌクレオチドもしくポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、島細胞機能を改善または促進するための島細胞移植における補助として使用され得る。

【０５６５】

（神経学的疾患）

本発明の組成物（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニスト）を用いて処置、予防および／または診断され得る神経系の疾患、障害および／または状態には、軸索の切断、ニューロンの減少もしくは変性、または脱髄のいずれかを引き起こす、神経系損傷および疾患、障害および／または状態が挙げられるが、これらに限定されない。本発明に従って、患者（ヒト患者および非ヒト哺乳動物患

者を含む）において処置、予防および／または診断され得る神経系病変には、以下の中枢神経系（脊髄、脳を含む）または末梢神経系のいずれかの病変が挙げられるが、これらに限定されない：（１）虚血病変（ここで、神経系の一部における酸素不足により、ニューロンの損傷または死が生じ、これには大脳梗塞もしくは虚血、または脊髄梗塞もしくは虚血が挙げられる）；（２）外傷病変（身体的損傷により生じるかまたは手術に関連する病変、例えば、神経系の一部分を切断する病変、または圧縮損傷を含む）；（３）悪性病変（ここで、神経系の一部分は、神経系関連悪性疾患もしくは非神経系組織由来の悪性疾患のいずれかである悪性組織により破壊または損傷される）；（４）感染性病変（ここで、神経系の一部分は、例えば、膿瘍による感染の結果として、破壊または損傷されるか、あるいはヒト免疫不全ウイルス、帯状ヘルペスもしくは単純ヘルペスウイルスによる感染と関連するか、ライム病、結核、梅毒に関連する）；（５）変性病変（ここで、神経系の一部分は、変性プロセスの結果として破壊または損傷され、これには、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンティングトン病または筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）に関連する変性が挙げられるが、これらに限定されない）；（６）栄養性の疾患、障害および／または状態に関連する病変（ここで、神経系の一部分は、栄養障害または代謝障害によって破壊または損傷され、これには、ビタミンＢ１２欠乏症、葉酸欠乏症、ヴェルニッケ病、タバコ－アルコール弱視、マルキアファーヴァ－ビニャーミ病（脳梁の一次変性）およびアルコール小脳変性が挙げられるが、これらに限定されない）；（７）全身性疾患に関連する神経性病変（糖尿病（糖尿病性ニューロパシー、ベル麻痺）、全身性エリテマトーデス、癌または類肉腫症が挙げられるが、これらに限定されない）；（８）毒性物質（アルコール、鉛または特定の神経毒を含む）により生じる病変；ならびに（９）脱髄性病変（ここで、神経系の一部分は、脱髄性執権によって破壊または損傷され、これには、多発性硬化症、ヒト免疫不全ウイルス関連脊髄障害、横断脊髄障害または種々の病因、進行性多病巣性白質脳障害、および橋中央ミエリン溶解が挙げられるが、これらに限定されない）。

【０５６６】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳底酸素症の損傷効果から神経細胞を保護するために用いられる。この実施形態によると、本発明の組成物は、大脳底酸素症に関連する神経細胞損傷を処置、予防および／または診断するために用いられる。この実施形態の１つの局面において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳虚血と関連する神経細胞損傷を処置、予防および／または診断するために用いられる。この実施形態の別の局面において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳梗塞に関連する神経細胞損傷を処置、予防および／または診断するために用いられる。この実施形態の別の局面において本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、発作に関連する神経細胞損傷を処置、予防および／または診断もしくは予防するために用いられる。この実施形態のさらなる局面において、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、心臓発作に関連する神経細胞損傷を処置、予防および／または診断するために用いられる。

【０５６７】

神経系障害を処置または予防するのに有用な本発明の組成物は、ニューロンの生存または分化の促進における生物学的活性について試験することによって、選択され得る。例えば、制限する目的ではないが、以下の効果のいずれかを誘発する本発明の組成物は、本発明によると有用であり得る：（１）培地におけるニューロンの増加した生存時間；（２）培地またはインビボにおけるニューロンの増加した出芽；（３）培地またはインビボにおけるニューロン関連分子（例えば、運動ニューロンに関して、コリンアセチルトランスフェラーゼまたはアセチルコリンステラーゼ）の増加した産生；あるいは（４）インビボにおけるニューロン機能障害の軽減した症状。このような効果は、当該分野で公知の任意の方法によって測定され得る。好ましくは、非制限的な実施形態において、ニューロンの増加した生存時間は、本明細書中に記載される方法、またはそうでなければ当該分野で公知

の方法（例えば、Ａｒａｋａｗａら（Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．１０：３５０７～３５１５（１９９０））に記載される方法）を使用して慣用的に測定され得；ニューロンの増加した出芽は、当該分野で公知の方法（例えば、Ｐｅｓｔｒｏｎｋら（Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｌ．７０：６５～８２（１９８０））またはＢｒｏｗｎら（Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．４：１７～４２（１９８１））に記載される方法）によって検出され得；ニューロン関連分子の増加した産生は、当該分野で公知の技術を使用し、測定されるべき分子に基づいて、バイオアッセイ、酵素アッセイ、抗体結合、ノザンブロットアッセイなどによって、測定され得；そして運動ニューロンの機能障害は、運動ニューロン障害の物理的発現（例えば、弱さ、運動ニューロンの伝導速度、または機能障害）を評価することによって、測定され得る。

【０５６８】

特定の実施形態において、本発明に従って処置、予防および／または診断され得る運動ニューロンの疾患、障害および／または状態には、運動ニューロンおよび神経系の他の成分に影響を与え得る疾患、障害および／または状態（例えば、梗塞、感染、毒素への暴露、外傷、外科的損傷、変性疾患、または悪性疾患）、ならびにニューロンに選択的に影響する疾患、障害および／または状態（例えば、筋萎縮性側索硬化症）が挙げられるが、これらに限定されず、そしてこれには、進行性脊髄性筋萎縮症、進行性球延髄麻痺、原発性側索硬化症、小児筋萎縮および若年性筋萎縮、小児期の進行性球麻痺（ファチオ－ロンデ病）、ポリオおよびポリオ後症状、ならびに遺伝性運動感覚性神経障害（シャルコー－マリー－トゥース病）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５６９】

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

【０５７０】

さらに、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、および/またはアゴニストまたはアンタゴニストは、以下を含むが挙げられるがこれらに限定されない脳血管障害に関連する、疾患、傷害、障害または、損傷から、神経細胞を防御するのに有用であり得る：脳血管障害（例えば、頸動脈血栓症、頸動脈狭窄またはモヤモヤ病）、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、脳低酸素症、大脳動脈硬化症、大脳動静脈奇形、大脳動脈疾患、脳塞栓症および血栓（例えば、頸動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群）、硬膜上血腫（例えば、硬膜外血腫または硬膜下血腫およびクモ膜下出血）、脳亀裂骨折、脳虚血（例えば、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群、または椎骨脳底不全（ｖｅｒｔｅｂｒｏｂａｓｉｌａｒ　ｉｎｓｕｆｆｉｃｉｅｎｃｙ））、血管性痴呆（たとえば、多発脳梗塞性痴呆）、脳室周囲白質軟化症、ならびに血管性頭痛（例えば、群発性頭痛）。

【０５７１】

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

クレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の神経系疾患または傷害のマーカーまたは検出因子として用いられ得る。

【０５７２】

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

【０５７３】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストは、を用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：脳血管障害（例えば、頸動脈血栓症、頸動脈狭窄およびモヤモヤ病を含む頸動脈疾患）、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、大脳動脈硬化症、大脳動静脈奇形、大脳動脈疾患、頸動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群のような脳塞栓症および血栓症、硬膜上血腫、硬膜下血腫およびクモ膜下出血のような脳出血、脳亀裂骨折、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群および椎骨脳底不全（ｖｅｒｔｅｂｒｏｂａｓｉｌａｒ　ｉｎｓｕｆｆｉｃｉｅｎｃｙ）のような脳虚血、多発脳梗塞性痴呆のような血管性痴呆、脳室周囲白質軟化症、群発性頭痛のような血管性頭痛。

【０５７４】

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

【０５７５】

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

【０５７６】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：クモ膜炎のような髄膜炎、リンパ球性脈絡髄膜炎を含むウイルス性髄膜炎のような無菌性

髄膜炎、ヘモフィルス髄膜炎を含む細菌性髄膜炎、リステリア髄膜炎、ウォーターハウス－フリーデリックセン症候群のような髄膜炎菌性脳脊髄膜炎、肺炎球菌髄膜炎および髄膜結核症、クリプトコックス髄膜炎のような真菌性髄膜炎、硬膜下滲出、ブドウ膜髄膜脳炎症候群のような髄膜脳炎、横行脊髄炎（ｔｒａｎｓｖｅｒｓｅ　ｍｙｅｌｉｔｉｓ）のような脊髄炎、脊髄ろうのような神経梅毒、延髄ポリオおよびポリオ後症候群を含むポリオ、プリオン病（例えば、クロイツフェルト－ヤーコプ病、ウシの海綿状脳症、ゲルストコン－シュトロイスラー症候群、クールー、スクラピー）、ならびに大脳トキソプラスマ症。

【０５７７】

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

【０５７８】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経学的疾患としては、以下が挙げられる：シャルコー－マリー疾患を含む遺伝性の運動および感覚ニューロン障害、視覚萎縮症、レフスム病、遺伝性痙性対麻痺、ヴェルドニッヒ－ホフマン病、先天性痛覚脱失症および家族性自律神経障害のような遺伝性感覚および自律性ニューロパシー、神経学的症状発現（例えば、ゲルストマン症候群を含む失認）、逆向性健忘症のような健忘症、失行症、神経因性膀胱、脱力発作、難聴、部分聴覚欠失、大声（ｌｕｄｎｅｓｓ）レクルートメントおよび耳鳴を含む聴覚障害のような情報伝達障害、失書症、名称失語症、ブロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む失語症のような言語障害、急性失読症のような失読症、言語発達障害、名称失語症、ブロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む失語症のような発語障害、蓄積障害、構語障害、反響言語、無言症およびどもりを含む発語障害のような情報伝達障害、失声症および嗄声のような発声障害、除脳硬直状態、せん妄、線維束性攣縮、幻覚、髄膜症、母親由来１５　ｑ‐１３微少欠損、運動失調、アテトーシス、舞踏病、失調症、運動低下症、筋肉緊張低下、ミオクローヌス、チック、斜頸および振せんのような運動障害、スティッフマン症候群のような筋肉硬直のような筋肉緊張亢進、筋肉痙性、耳帯状疱疹を含む顔面神経麻痺のような神経麻痺、胃不全麻痺、片麻痺、複視のような眼筋麻痺、デュエーン症候群、ホルナー症候群、キーンズ症候群のような慢性進行性外眼筋麻

痺症、球麻痺、熱帯性痙攣不全対麻痺、ブラウン－セカール症候群、四肢麻痺、呼吸麻痺および声帯麻痺のような対麻痺、不全麻痺、幻肢、無味覚症および味覚不全のような味覚障害、弱視、失明、色覚異常、複視、半盲、視野暗点および準正常視覚（ｓｕｂｎｏｒｍａｌ　ｖｉｓｉｏｎ）のような視覚障害、クライネーレヴィン症候群、不眠症および夢遊症を含む過眠症のような睡眠障害、開口障害のような痙縮、昏睡、持続性植物状態および失神およびめまいのような意識消失、先天性筋無緊張症のような神経筋疾患、筋萎縮性側索硬化症、ランバート－イートン筋無力症症候群、運動神経疾患、棘筋萎縮、シャルコー－マリー疾患およびヴェルドニッヒ－ホフマン病のような筋萎縮、後ポリオ症候群、筋ジストロフィー、重症筋無力症、萎縮性筋緊張症、先天性筋緊張症、ネマリンミオパシー、家族性期性四肢麻痺、多発性パラミロクローヌス（Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ　Ｐａｒａｍｙｏｃｌｏｎｕｓ）、熱帯性痙攣不全対麻痺およびスティッフマン症候群、先端肢端疼痛症のような末梢神経系疾患、腎アミロイドーシス、アーディー症候群、Ｂａｒｒｅ－Ｌｉｅｏｕ症候群、家族性自律神経障害、ホルナー症候群、反射性交感神経性ジストロフィーおよびシャイ－ドレーガー症候群のような自律神経系疾患、神経線維腫症２を含む聴神経腫のような内耳神経疾患のような脳神経疾患、顔面神経痛のような顔面神経疾患、メルカーソン－ローゼンタール症候群、弱視を含む眼球運動性障害、眼振、眼球運動麻痺、デュエーン症候群のような眼筋麻痺、ホルナー症候群、キーンズ症候群を含む慢性進行性外眼筋麻痺症、内斜視および外斜視のような斜視、動眼神経麻痺、遺伝性眼萎縮症を含む眼萎縮症のような眼神経疾患、視神経円板結晶腔、視神経脊髄炎のような視神経炎、乳頭水腫、三叉神経痛、声帯麻痺、視神経脊髄炎および脊柱前弯症のような脱髄疾患、糖尿病性足のような糖尿病性ニューロパシー。

【０５７９】

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

【０５８０】

（感染性疾患）

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

【０５８１】

ウイルスは、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置、予防および／または診断され得る疾患または症状を引き起こし得る感染因子の一例である。ウイルスの例としては、以下のＤＮＡおよびＲＮＡのウイルスおよびウイルス科が挙げられるがこれらに限定されない：アルボウイルス、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アルテリウイルス、ビルナウイルス科、ブンヤウイルス科、カルシウイルス科、サルコウイルス科（Ｃｉｒｃｏｖｉｒｉｄａｅ）、コロナウイルス科、デング熱、ＥＢＶ、ＨＩＶ、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科（

肝炎）、ヘルペスウイルス科（例えば、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス、ヘルペス帯状疱疹）、モノネガウイルス（Ｍｏｎｏｎｅｇａｖｉｒｕｓ）（例えば、パラミクソウイルス科、麻疹ウイルス、ラブドウイルス科）、オルソミクソウイルス科（例えば、インフルエンザＡ、インフルエンザＢ、およびパラインフルエンザ）、パピローマウイルス、パポバウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科（例えば、痘瘡またはワクシニア）、レオウイルス科（例えば、ロタウイルス）、レトロウイルス科（ＨＴＬＶ－Ｉ、ＨＴＬＶ－ＩＩ、レンチウイルス）、およびトガウイルス科（例えば、ルビウイルス属）。これらの科内に入るウイルスは、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：関節炎、細気管支炎（ｂｒｏｎｃｈｉｏｌｉｔｉｓ）、呼吸性シンシチウムウイルス、脳炎、眼性感染症（例えば、結膜炎、角膜炎）、慢性疲労症候群、肝炎（Ａ型、Ｂ型、Ｃ型、Ｅ型、慢性活動性、デルタ）、日本脳炎Ｂ型、アルゼンチン出血熱、チングニア、リフトバレー熱、黄熱病、髄膜炎、日和見感染症（例えば、ＡＩＤＳ）、肺炎、バーキットリンパ腫、水痘、出血熱、麻疹、流行性耳下腺炎、パラインフルエンザ、狂犬病、感冒、ポリオ、白血病、風疹、性感染症、皮膚病（例えば、カポージ、いぼ）、およびウイルス血症。本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患が処置、予防および／または診断され得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、以下の処置、予防および／または診断に使用される：髄膜炎、デング熱、ＥＢＶ、および／または肝炎（例えば、Ｂ型肝炎）。さらなる具体的な実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、１以上の他の市販の肝炎ワクチンに非応答性の患者を処置するために使用される。さらに具体的な実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、ＡＩＤＳを処置、予防および／または診断するために使用される。

【０５８２】

同様に、疾患または症状を引き起こし得、かつ本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置、予防および／または診断され得る細菌性因子あるいは真菌性因子は、以下のグラム陰性およびグラム陽性細菌および細菌科ならびに真菌を含むがこれらに限定されない：Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔａｌｅｓ（例えば、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｎｏｒｃａｒｄｉａ）、Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｏｓｉｓ、Ｂａｃｉｌｌａｃｅａｅ（例えば、Ａｎｔｈｒａｘ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄａｃｅａｅ、Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｏｓｉｓ、Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ、Ｂｏｒｒｅｌｉａ（例えば、Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、Ｂｒｕｃｅｌｌｏｓｉｓ、Ｃａｎｄｉｄｉａｓｉｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｏｍｙｃｏｓｉｓ、Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｏｓｉｓ、Ｄｅｒｍａｔｏｃｙｃｏｓｅｓ、Ｅ．ｃｏｌｉ（例えば、Ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｇｅｎｉｃ Ｅ．ｃｏｌｉおよびＥｎｔｅｒｏｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ（例えば、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ、およびＳａｌｍｏｎｅｌｌａ ｐａｒａｔｙｐｈｉ）、Ｓｅｒｒａｔｉａ、Ｙｅｒｓｉｎｉａ）、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌｏｓｉｓ、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒｏｓｉｓ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａｔａｌｅｓ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ、Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａｃｅａｅ（例えば、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ｇｏｎｏｒｒｈｅａ、Ｍｅｎｉｇｏｃｏｃｃａｌ）、Ｍｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａｃｅａの感染症（例えば、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｈｅａｍｏｐｈｉｌｕｓ（例えば、ＨｅａｍｏｐｈｉｌｕｓインフルエンザＢ型）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａｃｅａｅ、Ｃｈｌａｍｙｄｉａｃｅａｅ、Ｓｙｐｈｉｌｉｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｐｐ．、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃａｌ、Ｍｅｎｉｎｇｉｏｃｏｃｃａｌ、Ｐｎｅ

ｕｍｏｃｏｃｃａｌならびにＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ（例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅおよびＢ群Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）。これらの細菌または真菌の科は、以下を含むがこれらに限定されない疾患または症状を引き起こし得る：菌血症、心内膜炎、眼感染症（結膜炎、結核、ブドウ膜炎）、歯肉炎、日和見感染症（例えば、ＡＩＤＳに関連した感染症）、爪周囲炎、プロテーゼ関連感染症、ライター病、気道感染症（例えば、百日咳または蓄膿症）、敗血症、ライム病、ネコ引っ掻き病、赤痢、パラチフス熱、食中毒、腸チフス、肺炎、淋病、髄膜炎（例えば、髄膜炎Ａ型およびＢ型）、クラミジア、梅毒、ジフテリア、ライ病、パラ結核、結核、狼瘡、ボツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿痂疹、リウマチ熱、猩紅熱、性感染病、皮膚病（例えば、蜂巣炎、皮膚真菌症（ｄｅｒｍａｔｏｃｙｃｏｓｅｓ））、毒血症、尿路感染症、創傷感染症。本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状もしくは疾患を処置、予防および／または診断し得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、以下を処置、予防および／または診断するために使用される：破傷風、ジフテリア、ボツリヅム、および／またはＢ型髄膜炎。

【０５８３】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および／またはアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置、予防および／または診断され得る、寄生生物性因子が引き起こす疾患または症状としては以下のファミリーまたはクラスが挙げられるがこれらに限定されない：アメーバ症、バベシア症、コクシジウム症、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症（Ｄｉｅｎｔａｍｏｅｂｉａｓｉｓ）、交疫、外部寄生生物性、ジアルジア鞭毛虫症、蠕虫症、リーシュマニア症、タイレリア症、トキソプラスマ症、トリパノソーマ症、およびトリコモナス（Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ）症、ならびに胞子虫症（Ｓｐｏｒｏｚｏａｎ）（例えば、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｖｉｒａｘ、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｉｕｍ、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｍａｌａｒｉａｅおよびＰｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｏｖａｌｅ）。これらの寄生生物は、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：疥癬、ツツガムシ病、眼性感染症、腸疾患（例えば、赤痢、ジアルジア鞭毛虫症）、肝臓疾患、肺疾患、日和見感染症（例えば、ＡＩＤＳ関連）、マラリア、妊娠合併症、およびトキソプラスマ症。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患を処置、予防および／または診断し得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、マラリアを処置、予防および／または診断するために使用される。

【０５８４】

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

【０５８５】

（再生）

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

【０５８６】

本発明を用いて再生し得る組織としては、以下が挙げられる：器官（例えば、膵臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮）、筋肉（平滑筋、骨格筋、または心筋）、血管系（血管およびリンパ管を含む）、神経、造血、および骨格（骨、軟骨、腱、および靭帯）の組織。好ましくは、再生は、瘢痕なく、または瘢痕が低減されて生じる。再生はまた、新脈管形成を含み得る。

【０５８７】

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

【０５８８】

同様に、神経および脳組織はまた、神経細胞を増殖および分化させるために本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用することによって再生され得る。本方法を用いて処置、予防および／または診断され得る疾患としては、中枢神経系疾患および末梢神経系疾患、神経障害、または機械的および外傷性の疾患、障害および／または状態（例えば、脊髄障害、頭部外傷、脳血管疾患、および発作（ｓｔｏｋｅ））が挙げられる。詳細には、末梢神経傷害と関連する疾患、末梢神経障害（例えば、化学療法または他の医学的療法から生じる）、局在神経障害、および中枢神経系疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、およびシャイ－ドレーガー症候群）はすべて、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置、予防および／または診断され得る。

【０５８９】

（走化性）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、走化性活性を有し得る。走化性分子は、細胞（例えば、単球、線維芽細胞、好中球、Ｔ細胞、肥満細胞、好酸球、上皮細胞および／または内皮細胞）を、身体中の特定の部位（例えば、炎症、感染、または過剰増殖の部位）に誘引または動員する。次いで、動員された細胞は、特定の外傷または異常性を撃退および／または治癒し得る。

【０５９０】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の細胞の走化性活性を増大し得る。次いで、これらの走化性分子を使用して、身体中の特定の位置に標的化した細胞の数を増加させることによって、炎症、感染、過剰増殖性の疾患、障害および／もしくは状態、または任意の免疫系障害を処置、予防および／または診断し得る。例えば、走化性分子を使用して、傷害を受けた位置に免疫細胞を誘引することによって、組織に対する創傷および他の外傷を処置、予防および／または診断し得る。本発明の走化性分子はまた、線維芽細胞を誘引し得、これは創傷を処置、予防および／または診断するために使用され得る。

【０５９１】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストが走化性活性を阻害し得ることもまた意図される。これらの分子はまた、疾患、障害および／または状態を処置、予防および／または診断するために使用され得る。従って、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、走化性のインヒビターとして使用され得る。

【０５９２】

（結合活性）

本発明のポリペプチドは、このポリペプチドに結合する分子、またはこのポリペプチドが結合する分子についてスクリーニングするために使用され得る。このポリペプチドとこの分子との結合は、結合したポリペプチドまたは分子の活性を活性化（アゴニスト）、増大、阻害（アンタゴニスト）、または減少させ得る。そのような分子の例としては、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質（例えば、レセプター）、または低分子が挙げられる。

【０５９３】

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

【０５９４】

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

【０５９５】

アッセイは、このポリペプチドへの候補化合物の結合を単純に試験し得、ここで結合は、標識によって、または標識された競合物との競合に関するアッセイにおいて検出される。さらに、アッセイは、候補化合物がこのポリペプチドへの結合によって生成されるシグナルを生じるか否かを試験し得る。

【０５９６】

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

【０５９７】

好ましくは、ＥＬＩＳＡアッセイは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて、サンプル（例えば、生物学的サンプル）におけるポリペプチドのレベルまたは活性を測定し得る。抗体は、ポリペプチドへの直接的もしくは間接的のいずれかの結合、または基質についてのポリペプチドとの競合によって、ポリペプチドのレベルまたは活性を測定し得る。

【０５９８】

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

チドは、種々の手段（部位特異的プロテインキナーゼに対する認識部位のヨウ素化または封入を含む）によって標識化され得る。

【０５９９】

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

【０６００】

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

【０６０１】

さらに、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および／またはコドンシャッフリングの技術（集合的に「ＤＮＡシャッフリング」という）を利用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、それによって本発明のポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを効果的に生成する。一般に、米国特許第５，６０５，７９３号、同第５，８１１，２３８号、同第５，８３０，７２１号、同第５，８３４，２５２号、および同第５，８３７，４５８号、ならびにＰａｔｔｅｎ，Ｐ．Ａ．ら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：７２４～３３（１９９７）；Ｈａｒａｙａｍａ，Ｓ．Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６（２）：７６～８２（１９９８）；Ｈａｎｓｓｏｎ，Ｌ．Ｏ．ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２８７：２６５～７６（１９９９）；ならびにＬｏｒｅｎｚｏ，Ｍ．Ｍ．およびＢｌａｓｃｏ，Ｒ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２４（２）：３０８～１３（１９９８）（これらの特許および刊行物の各々は、本明細書において参考として援用される）を参照のこと。１つの実施態様において、本発明のポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの変更は、ＤＮＡシャッフリングによって達成され得る。ＤＮＡシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的な組換えによる、２つ以上のＤＮＡセグメントの、本発明の分子の所望のポリヌクレオチド配列への構築を含む。別の実施態様において、本発明のポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドは、組換えの前に、誤りがちな（ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ）ＰＣＲ、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム変異誘発に供することによって、変更され得る。別の実施態様において、本発明のポリペプチドの１つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどは、１つ以上の異種分子の１つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどと組換えられ得る。好ましい実施態様において、この異種分子は、ファミリーのメンバーである。さらに好ましい実施態様において、この異種分子は、例えば、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、インスリン様増殖因子（ＩＧＦ－Ｉ）、トランスホーミング増殖因子（ＴＧＦ）－α、表皮増殖因子（ＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、ＴＧＦ－β、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－５、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－７、アクチビンＡおよびアクチビンＢ、デカペンタプレジック（ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ）（ｄｐｐ）、６０Ａ、ＯＰ－２、ドーサリン（ｄｏｒｓａｌｉｎ）、増殖分化因子（ＧＤＦ）、結節（ｎｏｄａｌ）、ＭＩＳ、インヒビン－α、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β５、および神経膠由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）のような増殖因子である。

【０６０２】

他の好ましいフラグメントは、本発明のポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、このポリペプチドの活性に類似の活性を示すが、必ずしも同一ではないフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改

善された所望の活性、または減少した所望されない活性を含み得る。

【０６０３】

さちに、本発明は、本発明のポリペプチドの作用を調節する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。このようなアッセイの例は、哺乳動物線維芽細胞、本発明のポリペプチド、スクリーニングされるべき化合物および^{3}[Ｈ]チミジンを、線維芽細胞が通常増殖する細胞培養条件下で合わせる工程を包含する。コントロールアッセイは、スクリーニングされるべき化合物の非存在下で実施され得、そしてこの化合物の存在下での線維芽細胞の増殖の量と比較して、各々の場合における^{3}[Ｈ]チミジンの取り込みの決定によって、この化合物が増殖を刺激するか否かを決定し得る。線維芽細胞の増殖の量は、^{3}[Ｈ]チミジンの取り込みを測定する液体シンチレーションクロマトグラフィーによって測定される。アゴニスト化合物およびアンタゴニスト化合物の両方が、この手順により同定され得る。

【０６０４】

別の方法において、本発明のポリペプチドに対するレセプターを発現する哺乳動物細胞または膜調製物は、この化合物の存在下において標識化した本発明のポリペプチドとともにインキュベートされる。次いで、この化合物がこの相互作用を増強またはブロックする能力が、測定され得る。あるいは、スクリーニングされるべき化合物の相互作用に従う既知のセカンドメッセンジャー系の応答およびレセプターが測定され、そしてこの化合物がこのレセプターに結合し、そしてセカンドメッセンジャー応答を誘発する能力を測定して、この化合物が潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する。このようなセカンドメッセンジャー系には、ｃＡＭＰグアニル酸シクラーゼ、イオンチャネルまたはホスホイノシチド加水分解が挙げられるが、これらに限定されない。

【０６０５】

これらの上記のアッセイの全ては、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。これらのアッセイを用いて発見される分子は、ポリペプチド／分子を活性化または阻害することによって、疾患を処置、予防および／または診断するか、あるいは患者に特定の結果（例えば、血管増殖）をもたらすために使用され得る。さらに、アッセイは、適切に操作された細胞または組織からの本発明のポリペプチドの産生を阻害または増強し得る因子を発見し得る。従って、本発明は、以下の工程を含む本発明のポリペプチドに結合する化合物を同定する方法を包含する：（ａ）候補結合化合物をポリペプチドとともにインキュベートする工程；および（ｂ）結合が生じたか否かを決定する工程。さらに、本発明は、以下の工程を含むアゴニスト／アンタゴニストを同定する方法を包含する：（ａ）候補化合物をポリペプチドとともにインキュベートする工程、（ｂ）生物学的活性をアッセイする工程、および（ｂ）ポリペプチドの生物学的活性が改変されているか否かを決定する工程。

【０６０６】

また、タンパク質のポリペプチド配列に含まれるβプリーツシート領域を使用することによって、実験的に本発明のポリペプチドを結合する分子を同定し得る。従って、本発明の特定の実施形態は、開示されたポリペプチド配列中の各々のβプリーツシート領域のアミノ酸配列を含むか、あるいは開示されたポリペプチド配列中の各々のβプリーツシート領域のアミノ酸配列からなる、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のさらなる実施形態は、本発明のポリペプチド配列中に含まれる任意の組合せもしくは全てを含むか、または本発明のポリペプチド配列中に含まれる任意の組合せまたは全てからなる、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のさらなる好ましい実施形態は、本発明のポリペプチド配列の１つにおけるβプリーツシート領域の各々のアミノ酸配列を含むか、あるいは本発明のポリペプチド配列の１つにおけるβプリーツシート領域の各々のアミノ酸配列からなる、ポリペプチドに関する。本発明のさらなる実施形態は、本発明のポリペプチド配列の１つにおけるβプリーツシート領域の任意の組合せもしくは全てを含むか、または本発明のポリペプチド配列の１つにおけるβプリーツシート領域の任意の組合せもしくは全てからなる、ポリペプチドに関する。

【０６０７】
（標的化された送達）
別の実施形態において、本発明は、組成物を、本発明のポリペプチドについてのレセプターを発現する標的化細胞、または本発明のポリペプチドの細胞結合形態を発現する細胞に送達する方法を提供する。
【０６０８】
本明細書中で議論される場合、本発明のポリペプチドまたは抗体は、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素またはプロドラッグと、疎水性、親水性、イオン性および／または共有結合性の相互作用を介して会合し得る。１つの実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸と会合した本発明のポリペプチド（抗体を含む）を投与することによる、本発明の組成物の細胞への特異的な送達のための方法を提供する。１つの例において、本発明は、治療タンパク質を標的化細胞中へ送達するための方法を提供する。別の例において、本発明は、一本鎖核酸（例えば、アンチセンスまたはリボザイム）あるいは二本鎖核酸（例えば、細胞のゲノムに組み込まれ得るか、またはエピソームにて複製し得、そして転写され得る、ＤＮＡ）を、標的化細胞に送達するための方法を提供する。
【０６０９】
別の実施形態において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラッグと会合した本発明のポリペプチド（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の抗体）を投与することによる細胞の特異的破壊（例えば、腫瘍細胞の破壊）のための方法を提供する。
【０６１０】
「毒素」とは、内因性の細胞傷害性エフェクター系、放射性同位体、ホロ毒素（ｈｏｌｏｔｏｘｉｎ）、改変型毒素、毒素の触媒サブユニット、または規定の条件下で細胞死を引き起こす細胞中もしくは細胞表面には通常存在しない任意の分子もしくは酵素を、結合および活性化する化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る毒素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：当該分野で公知の放射性同位体、固有のまたは誘導された内因性の細胞傷害性エフェクター系を結合する化合物（例えば、抗体（またはその一部を含む補体固定）、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、ＲＮＡｓｅ、α毒素、リシン、アブリン、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ内毒素Ａ、ジフテリア毒素、サポリン、モモルジン（ｍｏｍｏｒｄｉｎ）、ゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、α－サルシン（ｓａｒｃｉｎ）およびコレラ毒素。「細胞傷害性プロドラッグ」とは、通常細胞内に存在する酵素によって、細胞傷害性化合物へと変換される非毒性の化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る細胞傷害性プロドラッグとしては、安息香酸マスタードアルキル化剤のグルタミル誘導体、エトポシドまたはマイトマイシンＣのリン酸誘導体、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、およびドキソルビシンのフェノキシアセトアミド誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。
【０６１１】
（薬物スクリーニング）
本発明のポリペプチドの活性を改変する分子についてスクリーニングするための、本発明のポリペプチド、またはこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用が、さらに意図される。このような方法は、本発明のポリペプチドを、アンタゴニスト活性またはアゴニスト活性を有することが疑われる選択された化合物と接触させる工程、および結合に続いてこれらのポリペプチドの活性をアッセイする工程を包含する。
【０６１２】
本発明は、種々の薬物スクリーニング技術のいずれかにおいて、本発明のポリペプチド、またはそれらの結合フラグメントを使用することによって治療用化合物をスクリーニングするために特に有用である。このような試験に用いられるポリペプチドまたはフラグメントは、固体支持体に固定化され得、細胞表面上に発現され得、溶液中で遊離であり得、または細胞内に局在化され得る。薬物スクリーニングの１つの方法は、ポリペプチドまたはフラグメントを発現する組換え核酸を用いて安定に形質転換される真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を利用する。薬物は、競合結合アッセイにおいて、このような形質

転換細胞に対してスクリーニングされる。例えば、試験されている薬剤と本発明のポリペプチドとの間の複合体の形成（ｆｏｒｍｕｌａｔｏｎ）を測定し得る。

【０６１３】

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

【０６１４】

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

【０６１５】

本発明はまた、競合薬物スクリーニングアッセイの使用を意図し、ここで、本発明のポリペプチドを結合し得る中和抗体は、ポリペプチドまたはそのフラグメントに対する結合について試験化合物と特異的に競合する。この様式において、抗体を使用して、本発明のポリペプチドと１つ以上の抗原性エピトープを共有する任意のペプチドの存在を検出する。

【０６１６】

（本発明のポリペプチドに結合するペプチドおよび他の分子）

本発明はまた、本発明のポリペプチドに結合するポリペプチドおよび非ポリペプチドを同定するためのスクリーニング方法、ならびにそれによって同定された本発明のポリペプチドに結合する分子を含む。これらの結合分子は、例えば、本発明のポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストとして有用である。そのようなアゴニストおよびアンタゴニストは、本発明に従って、以下に詳細に記載される治療実施形態において使用され得る。

【０６１７】

この方法は、以下の工程を包含する：

ａ．本発明のポリペプチドを多数の分子と接触させる工程；および

ｂ．本発明のポリペプチドに結合する分子を同定する工程。

【０６１８】

本発明のポリペプチドを多数の分子と接触させる工程は、多数の方法によってもたらされ得る。例えば、当業者は、本発明のポリペプチドを固体支持体上に固定化させ、そして多数の分子の溶液を固定した本発明のポリペプチドと接触させることを考え得る。このような手順は、固定した本発明のポリペプチドから構成される親和性マトリックスを用いるアフィニティークロマトグラフィープロセスに類似している。次いで、本発明のポリペプチドに対して選択的な親和性を有する分子が、親和性選択によって精製され得る。固体支持体の性質、本発明のポリペプチドのこの固体支持体への付着に関するプロセス、溶媒、および親和性単離または親和性選択の条件は、大部分が慣用的であり、そして当業者に周知である。

【０６１９】
あるいは、多数のポリペプチドはまた、ポリペプチドのサブセットまたは個々のポリペプチドを含む実質的に別々の分画へ分離され得る。例えば、多数のポリペプチドは、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィーなどポリペプチドの分離に関して当業者に公知の方法によって、分離され得る。個々のポリペプチドはまた、宿主細胞の外部表面上またはほぼ外部表面に発現されるような様式で、形質転換された宿主細胞（例えば、組換えファージ）によって産生され得る。次いで、個々の単離物は、本発明のポリペプチドによって「プローブ化」され得、必要に応じて発現に必要とされるであろうインデューサーの存在下で、本発明のポリペプチドと個々のクローンとの間で任意の選択的親和性相互作用が起こったか否かが決定される。本発明のポリペプチドを個々のポリペプチドを含む各分画と接触させる前に、これらのポリペプチドはまず、さらなる簡便性のために固体支持体に移され得る。そのような固体支持体は、単に、例えばニトロセルロースまたはナイロンでできたフィルター膜の断片であり得る。この様式において、陽性クローンは、形質転換宿主細胞の発現ライブラリーの集団（これらは、本発明のポリペプチドに対して選択的親和性を有するポリペプチドをコードするＤＮＡ構築物を持つ）から同定され得る。さらに、本発明のポリペプチドに対して選択的親和性を有するポリペプチドのアミノ酸配列が、従来の手段によって直接決定され得るか、またはこのポリペプチドをコードするＤＮＡのコード配列が、頻繁により簡便に決定され得る。次いで、一次配列が、対応するＤＮＡ配列から推定され得る。アミノ酸配列がポリペプチド自身から決定されるものである場合、微小配列決定技術を使用し得る。この配列決定技術は、質量分析法を含み得る。

【０６２０】
特定の状況において、選択的親和性相互作用の存在を決定または検出しようと試みる前に、未結合の本発明のポリペプチドあるいは未結合ポリペプチドのいずれかを、本発明のポリペプチドおよび多数のポリペプチドの混合物から洗浄除去することが望ましくあり得る。このような洗浄工程は、本発明のポリペプチドまたは多数のポリペプチドが固体支持体に結合している場合に、特に望ましくあり得る。

【０６２１】
本方法に従って提供される多数の分子は、多様性ライブラリー（例えば、本発明のポリペプチドへ特異的に結合する分子をスクリーニングし得る無作為またはコンビナトリアルの、ペプチドライブラリーまたは非ペプチドライブラリー）として提供され得る。使用され得る多くのライブラリー（例えば、化学合成ライブラリー、組換えライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）、およびインビトロ翻訳ベースのライブラリー）が、当該分野で公知である。化学合成ライブラリーの例は、以下に記載される：Ｆｏｄｏｒら、１９９１、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：７６７－７７３；Ｈｏｕｇｈｔｅｎら、１９９１、Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８４－８６；Ｌａｍら、１９９１、Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４；Ｍｅｄｙｎｓｋｉ、１９９４、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １２：７０９－７１０；Ｇａｌｌｏｐら、１９９４、Ｊ．Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３７（９）：１２３３－１２５１；Ｏｈｌｍｅｙｅｒら、１９９３、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：１０９２２－１０９２６；Ｅｒｂら、１９９４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１１４２２－１１４２６；Ｈｏｕｇｈｔｅｎら、１９９２，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４１２；Ｊａｙａｗｉｃｋｒｅｍｅら、１９９４、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：１６１４－１６１８；Ｓａｌｍｏｎら、１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：１１７０８－１１７１２；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９３／２０２４２；ならびにＢｒｅｎｎｅｒおよびＬｅｒｎｅｒ、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：５３８１－５３８３。

【０６２２】
ファージディスプレイライブラリーの例は、以下に記載される：ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０；Ｄｅｖｌｉｎら、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４９：４０４－４０６；Ｃｈｒｉｓｔｉａｎ，Ｒ．Ｂ．ら、１９

９２、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７１１－７１８）；Ｌｅｎｓｔｒａ、１９９２、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．１５２：１４９－１５７；Ｋａｙら、１９９３、Ｇｅｎｅ １２８：５９－６５；ならびにＰＣＴ公開番号ＷＯ９４／１８３１８（１９９４年８月１８日）。

【０６２３】

インビトロ翻訳ベースのライブラリーとしては、以下：ＰＣＴ公開番号ＷＯ９１／０５０５８（１９９１年４月１８日）；およびＭａｔｔｈｅａｋｉｓら、１９９４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：９０２２－９０２６に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【０６２４】

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

【０６２５】

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

【０６２６】

非ペプチドライブラリーは、２つの型に大きく分類され得る：修飾されたモノマーおよびオリゴマー。修飾モノマーライブラリーは、比較的単純な骨格構造を使用し、この上に種々の官能基が付加される。しばしば、骨格は、既知の有用な薬理学的活性を有する分子である。例えば、骨格は、ベンゾジアゼピン構造であり得る。

【０６２７】

非ペプチドオリゴマーライブラリーは、モノマーの順序に依存して新規な形状を作製する様式で共にアセンブルされる、多数のモノマーを使用する。使用されるモノマー単位の間には、カルバメート、ピロリノン（ｐｙｒｒｏｌｉｎｏｎｅ）およびモルホリノがある。ペプトイド（側鎖がα炭素よりもαアミノ基に結合するペプチド様オリゴマー）は、非ペプチドオリゴマーライブラリーの別のバージョンの基礎を形成する。最初の非ペプチドオリゴマーライブラリーは、単一型のモノマーを使用し、従って、反復骨格を含む。近年のライブラリーは、１つより多くのモノマーを使用し、自由度が添加されたライブラリーを与える。

【０６２８】

ライブラリーをスクリーニングすることは、多様な一般的に公知の方法のいずれかによって達成され得る。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを開示する以下の参考文献：ＰａｒｍｌｅｙおよびＳｍｉｔｈ、１９８９、Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２５１：２１５－２１８；ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０；Ｆｏｗｌｋｅｓら、１９９２；ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４２２－４２７；Ｏｌｄｅｎｂｕｒｇら、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：５３９３－５３９７；Ｙｕら、１９９４、Ｃｅｌｌ ７６：９３３－９４５；Ｓｔａｕｄｔら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：５７７－５８０；Ｂｏｃｋら、１９９２、Ｎａｔｕｒｅ ３５５：５６４－５６６；Ｔｕｅｒｋら、１

９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：６９８８－６９９２；Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎら、１９９２、Ｎａｔｕｒｅ ３５５：８５０－８５２；米国特許第５，０９６，８１５号、米国特許第５，２２３，４０９号、および米国特許第５，１９８，３４６号（全てＬａｄｎｅｒらに対して）；ＲｅｂａｒおよびＰａｂｏ、１９９３、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６３：６７１－６７３；ならびにＰＣＴ公開番号ＷＯ９４／１８３１８を参照のこと。

【０６２９】

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

【０６３０】

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

【０６３１】

分子に結合している本発明のポリペプチドがポリペプチドである場合、このポリペプチドは、任意のペプチドライブラリー（ランダムペプチドライブラリー、コンビナトリアルペプチドライブラリー、またはバイアスペプチドライブラリーを含む）から簡便に選択され得る。用語「バイアス（ｂｉａｓｅｄ）」は、この場合のペプチドにおいて、ライブラリーを作製する方法が、生じる分子収集の多様性を支配する１つ以上のパラメーターを制限するように操作されることを意味するために本明細書中に使用される。

【０６３２】

従って、本当にランダムなペプチドライブラリーは、ペプチドの所定の位置に特定のアミノ酸を見出す可能性が全て２０のアミノ酸に関して同じである、ペプチドの収集物を作製する。しかし、例えば、リジンが５番目のアミノ酸毎に生じることを特定するかまたはデカペプチドライブラリーの４位、８位および９位がアルギニンのみを含むように固定して特定することによって、バイアスがライブラリーに導入され得る。明らかに、バイアスの多くの型は、意図され得、そして本発明は、任意の特定のバイアスに制限されない。さらに、本発明は、特定の型のペプチドライブラリー（例えば、ファージディスプレイペプチドライブラリーおよびＤＮＡ挿入物と共にλファージベクターを含むＤＮＡ構築物を使用するライブラリー）を意図する。

【０６３３】

上記のように、本発明のポリペプチドに結合する分子（ポリペプチドである）の場合、このポリペプチドは、約６から約６０より少ないアミノ酸残基を有し、好ましくは約６～約１０アミノ酸残基、そしてより好ましくは約６～約２２アミノ酸であり得る。別の実施形態において、本発明のポリペプチドに結合するポリペプチドは、１５～１００の範囲のアミノ酸、または２０～５０の範囲のアミノ酸を有する。

【０６３４】

分子に結合している選択された本発明のポリペプチドは、化学合成または組換え発現によって得られ得る。

【０６３５】

（アンチセンスおよびリボザイム（アンタゴニスト））

特定の実施形態において、本発明に従うアンタゴニストは、配列番号Ｘに含まれる配列

またはその相補鎖に対応する核酸および／または寄託されるクローンに含まれるヌクレオチド配列に対応する核酸である。１つの実施形態において、アンチセンス配列は、生物体により内部で生成され、別の実施形態において、アンチセンス配列は別々に投与される（例えば、Ｏ’Ｃｏｎｎｏｒ，Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６：５６０（１９９１）を参照のこと）。Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８）。アンチセンス技術を使用して、アンチセンスＤＮＡもしくはＲＮＡを通してか、または３重らせんの形成を通して遺伝子発現を制御し得る。アンチセンス技術は、例えば、Ｏｋａｎｏ，Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５６：５６０（１９９１）；Ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ（１９８８）に考察される。３重らせん形成は、例えば、Ｌｅｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６：３０７３（１９７９）；Ｃｏｏｎｅｙら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４１：４５６（１９８８）；およびＤｅｒｖａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５１：１３００（１９９１）において考察される。これらの方法は、相補的なＤＮＡまたはＲＮＡへのポリヌクレオチドの結合に基づく。

【０６３６】

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

【０６３７】

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

【０６３８】

１つの実施形態において、本発明のアンチセンス核酸は、外来の配列からの転写により細胞内で産生される。例えば、ベクターまたはその一部が転写され、本発明のアンチセンス核酸（ＲＮＡ）を産生する。このようなベクターは、本発明のアンチセンス核酸をコードする配列を含む。このようなベクターは、それが転写されて所望のアンチセンスＲＮＡを産生し得る限り、エピソームを保持し得るか、または染色体に組込まれ得る。このようなベクターは、当該分野において標準的な組換えＤＮＡ技術方法により構築され得る。ベクターは、脊椎動物細胞において複製および発現のために使用される、当該分野で公知のプラスミド、ウイルスなどであり得る。本発明のポリペプチドをコードする配列またはそのフラグメントの発現は、脊椎動物、好ましくはヒト細胞において作用する、当該分野で公知の任意のプロモーターにより得る。そのようなプロモーターは、誘導性または構成性であり得る。このようなプロモーターは、ＳＶ４０初期プロモーター領域（ＢｅｒｎｏｉｓｔおよびＣｈａｍｂｏｎ、Ｎａｔｕｒｅ、２９：３０４－３１０（１９８１））、ラウス肉腫ウイルスの３’長末端反復に含まれるプロモーター（Ｙａｍａｍｏｔｏら、Ｃｅｌ

ｌ、２２：７８７－７９７（１９８０））、ヘルペスチミジンプロモーター（Ｗａｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７８：１４４１－１４４５（１９８１））、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Ｂｒｉｎｓｔｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ、２９６：３９－４２（１９８２））などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０６３９】

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

【０６４０】

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

【０６４１】

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

ブリダイゼーション誘引切断剤など）に結合体化され得る。

【０６４２】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの改変された塩基部分を含み得、この塩基部分は、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される：５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルキューオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルキューオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン（ｗｙｂｕｔｏｘｏｓｉｎｅ）、プソイドウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、および２，６－ジアミノプリン。

【０６４３】

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

【０６４４】

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

【０６４５】

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

【０６４６】

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

【０６４７】

一方、本発明のコード領域配列に相補的なアンチセンスヌクレオチドが、使用され得、

転写された非翻訳領域に相補的なアンチセンスヌクレオチドが最も好ましい。

【０６４８】

本発明による潜在的なアンタゴニストはまた、触媒ＲＮＡ、すなわちリボザイムを含む（例えば、ＰＣＴ国際公開ＷＯ９０／１１３６４、１９９０年１０月４日公開；Ｓａｒｖｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４７：１２２２－１２２５（１９９０）を参照のこと）。一方、部位特異的認識配列でｍＲＮＡを切断するリボザイムを使用して、本発明のポリヌクレオチドに対応するｍＲＮＡを破壊し得るが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的ｍＲＮＡと相補的な塩基対を形成する隣接領域により決定される位置で、ｍＲＮＡを切断する。たった１つの必要条件は、標的ｍＲＮＡが以下の２つの塩基配列を有することである：５’－ＵＧ－３’。ハンマーヘッド型リボザイムの構築および生成は当該分野で周知であり、そしてＨａｓｅｌｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ、Ｎａｔｕｒｅ、３３４：５８５－５９１（１９８８）により十分に記載される。配列表に開示された各ヌクレオチド配列内に多くの潜在的なハンマーヘッド型リボザイム切断部位が存在する。好ましくは、このリボザイムは、切断認識部位が本発明のポリヌクレオチドに対応するｍＲＮＡの５’末端付近に位置するように；すなわち、効率を増大し、そして非機能的ｍＲＮＡ転写物の細胞内蓄積を最小化するように、操作される。

【０６４９】

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

【０６５０】

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

【０６５１】

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

【０６５２】

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

【０６５３】

アンタゴニスト／アゴニストをまた利用して、本明細書中に記載される疾患を処置、予防および／または診断し得る。

【０６５４】

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

【０６５５】
（他の活性）
本発明のポリペプチドは、血管内皮細胞増殖を刺激する能力の結果として、種々の疾患状態（例えば、血栓症、動脈硬化、および他の心臓血管の状態）に起因する虚血組織の血管再生を刺激するための処置において利用され得る。これらのポリペプチドをまた利用して、上記で議論されるように新脈管形成および肢の再形成を刺激し得る。
【０６５６】
このポリペプチドを、傷害、火傷、手術後組織修復、および潰瘍に起因する創傷の処置にもまた利用し得る。なぜなら、それらは異なる起源の種々の細胞（例えば、線維芽細胞および骨格筋細胞）に対してマイトジェン性であり、それゆえダメージを受けた組織または疾患組織の修復または置換を促進するからである。
【０６５７】
本発明のポリペプチドはまた、ニューロンの成長を刺激し、そして特定のニューロンの障害または神経変性状態（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、およびＡＩＤＳ関連合併症）において生じるニューロンの損傷を処置、予防および／または診断するために用いられ得る。本発明のポリペプチドは、軟骨細胞増殖を刺激する能力を有し得、それゆえ、骨および歯周の再形成を増強し、そして組織移植片または骨の移植片における補助のために利用され得る。
【０６５８】
本発明のポリペプチドをまた利用して、ケラチノサイト増殖を刺激することにより、日焼けに起因する皮膚の老化を予防し得る。
【０６５９】
本発明のポリペプチドをまた、抜け毛を予防するために利用し得る。なぜなら、ＦＧＦファミリーのメンバーは、髪形成細胞を活性化し、そしてメラノサイト増殖を促進するからである。同じ系列にそって、本発明のポリペプチドを利用して、他のサイトカインと組み合わせて使用した場合、造血細胞および骨髄細胞の増殖および分化を刺激し得る。
【０６６０】
本発明のポリペプチドをまた利用して、移植前の器官を維持し得るか、または始原組織の細胞培養を支持するために使用し得る。
【０６６１】
本発明のポリペプチドはまた、初期胚における分化のための中胚葉起源の組織を誘導するために利用され得る。
【０６６２】
本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、先に議論されるように造血系統に加えて、胚性幹細胞の分化もしくは増殖を増加または減少し得る。
【０６６３】
本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、哺乳動物の特徴（例えば、身長、体重、毛の色、眼の色、皮膚、脂肪組織の割合、色素沈着、大きさ、および形（例えば、美容外科））を調節するために使用され得る。同様に、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、異化作用、同化作用、プロセシング、利用、およびエネルギーの貯蔵に影響を及ぼす哺乳動物の代謝を調節するために使用され得る。
【０６６４】
本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、バイオリズム、カリカディック（ｃａｒｉｃａｄｉｃ）リズム、うつ病（抑うつ性の疾患、障害および／または状態を含む）、暴力の傾向、痛みへの耐性、生殖能力（好ましくは、アクチビンまたはインヒビン様活性によって）、ホルモンレベルもしくは内分泌レベル、食欲、性欲、記憶、ストレス、または他の認知の質に影響を及ぼすことによって、哺乳動物の精神状態または身体状態を変更するために使用され得る。

【０６６５】
本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、例えば、貯蔵能力、脂肪含有量、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子、または他の栄養成分を増加または減少させるような食品添加物または保存剤として使用され得る。
【０６６６】
（他の好ましい実施形態）
本願発明の他の好ましい実施形態は、配列番号Ｘのヌクレオチド配列中の少なくとも約５０の連続したヌクレオチドの配列に、少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を含み、ここで、Ｘは表１に規定されるような任意の整数である。
【０６６７】
上記連続したヌクレオチドの配列が、表１中の配列番号Ｘについて規定されるような、クローン配列のほぼ５’ヌクレオチドの位置のヌクレオチドで始まり、そしてクローン配列のほぼ３’ヌクレオチドの位置のヌクレオチドで終わる位置の範囲で、配列番号Ｘのヌクレオチド配列に含まれる、核酸分子もまた好ましい。
【０６６８】
上記連続したヌクレオチドの配列が、表１中の配列番号Ｘについて規定されるような、開始コドンのほぼ５’ヌクレオチドの位置のヌクレオチドで始まり、そしてクローン配列のほぼ３’ヌクレオチドの位置のヌクレオチドで終わる位置の範囲で、配列番号Ｘのヌクレオチド配列に含まれる、核酸分子もまた好ましい。
【０６６９】
上記連続したヌクレオチドの配列が、表１中の配列番号Ｘについて規定されるような、ほぼシグナルペプチドの第１のアミノ酸の５’ヌクレオチドの位置のヌクレオチドで始まり、そしてほぼクローン配列の３’ヌクレオチドの位置のヌクレオチドで終わる位置の範囲で、配列番号Ｘのヌクレオチド配列に含まれる、核酸分子も同様に好ましい。
【０６７０】
配列番号Ｘのヌクレオチド配列中の少なくとも約１５０の連続したヌクレオチドの配列に、少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた好ましい。
【０６７１】
配列番号Ｘのヌクレオチド配列中の少なくとも約５００の連続したヌクレオチドの配列に、少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子はさらに好ましい。
【０６７２】
さらに好ましい実施形態は、表１中の配列番号Ｘたついて規定されるような、ほぼシグナルペプチドの第１のアミノ酸の５’ヌクレオチドの位置のヌクレオチドで始まり、そしてほぼクローン配列の３’ヌクレオチドの位置のヌクレオチドで終わる配列番号Ｘのヌクレオチド配列に少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子である。
【０６７３】
さらに好ましい実施形態は、配列番号Ｘの完全なヌクレオチド配列に、少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。
【０６７４】
ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で核酸分子にハイブリダイズする単離された核酸分子もまた好ましく、ここで上記のハイブリダイズする核酸分子は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、Ａ残基のみまたはＴ残基のみからなるヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズしない。
【０６７５】
表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定されるヒトｃＤＮＡクローンを含むＤＮＡ分子を含む物質の組成物もまた好ましく、このＤＮＡ分子は、アメリカンタイプカル

チャーコレクションに寄託された物質中に含まれ、そして上記のｃＤＮＡクローンＩＤについて表１中に示されるＡＴＣＣ受託番号を与えられている。

【０６７６】

表１中のｃＤＮＡクローンＩＤによって同定されるヒトｃＤＮＡクローンのヌクレオチド配列中の少なくとも５０の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子もまた好ましく、このＤＮＡ分子は表１において示されるＡＴＣＣ受託番号を付与された寄託物中に含まれる。

【０６７７】

上記の少なくとも５０の連続したヌクレオチドの配列が、上記ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされる完全なオープンリーディングフレームの配列のヌクレオチド配列中に含まれる、単離された核酸分子もまた好ましい。

【０６７８】

上記ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるヌクレオチド配列中の少なくとも１５０の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた好ましい。

【０６７９】

さらに好ましい実施形態は、上記ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるヌクレオチド配列中の少なくとも５００の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。

【０６８０】

さらに好ましい実施形態は、上記ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされる完全なヌクレオチド配列に少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。

【０６８１】

さらに好ましい実施形態は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも５０の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を、生物学的サンプルにおいて検出するための方法である：配列番号Ｘのヌクレオチド配列であって、ここでＸは表１において規定されるような任意の整数である；および表１中のｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、そして表１において上記ｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物中に含まれるヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるヌクレオチド配列；上記の方法は、上記の群から選択される配列と、上記のサンプル中の少なくとも１つの核酸分子のヌクレオチド配列とを比較する工程、および上記サンプル中の上記核酸分子の配列が、上記の選択された配列に対して少なくとも９５％同一であるか否かを決定する工程を包含する。

【０６８２】

上記の配列を比較する工程が、上記サンプル中の核酸分子と、上記の群から選択される上記の配列を含む核酸分子との間の核酸ハイブリダイゼーションの程度を決定する工程を包含する、上記方法もまた好ましい。同様に、上記の配列を比較する工程が、上記サンプル中の核酸分子から決定されるヌクレオチド配列と、上記の群から選択される上記配列とを比較する工程によって実施される、上記方法もまた好ましい。核酸分子は、ＤＮＡ分子またはＲＮＡ分子を含み得る。

【０６８３】

さらに好ましい実施形態は、生物学的サンプルの種、組織、または細胞型を同定するための方法であって、この方法は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも５０の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む上記サンプル中の核酸分子を（もしあれば）検出する工程を包含する：配列番号Ｘのヌクレオチド配列であって、ここでＸは表１において規定されるような任意の整数である；および表１中のｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、そして表１において上記ｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物中に含まれるヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるヌクレオチド配列。

【０６８４】
生物学的サンプルの種、組織、または細胞型を同定するための方法は、少なくとも２つのヌクレオチド配列のパネル中のヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出する工程を包含し得、ここで上記パネル中の少なくとも１つの配列は、上記の群から選択される配列中の少なくとも５０の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも９５％同一である。
【０６８５】
表１において同定される分泌タンパク質をコードする遺伝子の異常な構造または発現と関連する病理学的状態を、被験体において診断するための方法もまた好ましく、この方法は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも５０の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、核酸分子を、（もしあれば）上記被験体から得られる生物学的サンプルにおいて検出する工程を包含する：配列番号Ｘのヌクレオチド配列、ここでＸは表１において規定されるような任意の整数である；および表１中のｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、かつ表１中の上記のｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれるヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるヌクレオチド配列。
【０６８６】
病理学的状態を診断するための方法は、少なくとも２つのヌクレオチド配列のパネル中のヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出する工程を包含し得、ここで、上記パネル中の少なくとも１つの配列は、上記群から選択される配列中の少なくとも５０の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも９５％同一である。
【０６８７】
上記の核酸分子のヌクレオチド配列が、少なくとも２つのヌクレオチド配列のパネルを含む、単離された核酸分子を含む物質の組成物もまた好ましく、ここで上記のパネル中の少なくとも１つの配列は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも５０の連続したヌクレオチドの配列に少なくとも９５％同一である：配列番号Ｘのヌクレオチド配列、ここでＸは表１において規定されるような任意の整数である；および表１中のｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、かつ表１中の上記のｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれるヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるヌクレオチド配列。核酸分子は、ＤＮＡ分子またはＲＮＡ分子を含み得る。
【０６８８】
配列番号Ｙのアミノ酸配列中の少なくとも約１０の連続したアミノ酸の配列に、少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた好ましく、ここでＹは、表１において規定されるような任意の整数である。
【０６８９】
上記連続したアミノ酸の配列が、表１中の配列番号Ｙについて示されるような、分泌部分のほぼ第１のアミノ酸の位置の残基で始まり、そしてオープンリーディングフレームのほぼ最後のアミノ酸の残基で終わる位置の範囲で、配列番号Ｙのアミノ酸配列中に含まれる、ポリペプチドもまた好ましい。
【０６９０】
配列番号Ｙのアミノ酸配列中の少なくとも約３０の連続したアミノ酸の配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた好ましい。
【０６９１】
配列番号Ｙのアミノ酸配列中の少なくとも約１００の連続したアミノ酸の配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。
【０６９２】
配列番号Ｙの完全なアミノ酸配列に少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。
【０６９３】
表１中のｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、かつ表１中の上記のｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれるヒトｃＤＮＡクローンに

よってコードされる分泌タンパク質の完全なアミノ酸配列において、少なくとも約１０の連続したアミノ酸の配列に少なくとも９０％同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【０６９４】

上記の連続したアミノ酸の配列が、表１中のｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、かつ表１中の上記のｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれるヒトｃＤＮＡクローンによってコードされる分泌タンパク質の分泌部分のアミノ酸配列に含まれる、ポリペプチドもまた好ましい。

【０６９５】

表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、かつ表１中の上記のｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれる、ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるタンパク質の分泌部分のアミノ酸配列中の少なくとも約３０の連続的なアミノ酸の配列に少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【０６９６】

表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、かつ表１中の上記のｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれる、ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるタンパク質の分泌部分のアミノ酸配列中の少なくとも約１００の連続的なアミノ酸の配列に少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【０６９７】

表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、かつ表１中の上記のｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれるヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるタンパク質の分泌部分のアミノ酸配列に少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【０６９８】

以下からなる群から選択される配列中の、少なくとも１０個の連続的なアミノ酸の配列に少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して特異的に結合する単離された抗体は、さらに好ましい：配列番号Ｙのアミノ酸配列（ここで、Ｙは表１で規定される任意の整数である）；および表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、かつ表１のこのｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれる、ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるタンパク質の完全アミノ酸配列。

【０６９９】

以下からなる群から選択された配列中の、少なくとも１０個の連続的なアミノ酸の配列に少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを、生物学的サンプルにおいて検出する方法はさらに好ましい：配列番号Ｙのアミノ酸配列（ここで、Ｙは表１で規定される任意の整数である）；および表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定され、かつ表１のこのｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれる、ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるタンパク質の完全アミノ酸配列；この方法は、このサンプル中における少なくとも１つのポリペプチド分子のアミノ酸配列をこの群から選択された配列と比較する工程およびこのサンプル中におけるこのポリペプチド分子の配列が、少なくとも１０個の連続的なアミノ酸のこの配列と少なくとも９０％同一であるかどうかを決定する工程を包含する。

【０７００】

このサンプル中における少なくとも１つのポリペプチド分子のアミノ酸配列を、この群から選択された配列と比較するこの工程は、このサンプル中のポリペプチドの、以下からなる群から選択された配列中の少なくとも１０個の連続的なアミノ酸の配列に対して、少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する抗体に対する特異的な結合の程度を決定する工程を包含する、上記の方法もまた、好ましい：配列

番号Ｙのアミノ酸配列（ここで、Ｙは表１に規定される任意の整数である）；および表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定されかつ表１のこのｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれるヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるタンパク質の完全アミノ酸配列。

【０７０１】

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

【０７０２】

生物学的サンプルの種、組織または細胞型を同定する方法もまた好ましく、ここでこの方法は、このサンプル中のポリペプチド分子（このポリペプチドは、もし存在するならば、以下からなる群から選択される配列における少なくとも１０の連続的なアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む）を検出する工程を包含する：配列番号Ｙのアミノ酸配列（ここで、Ｙは表１に規定される任意の整数である）；および表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定されかつ表１のこのｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれる、ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされる、分泌タンパク質の完全アミノ酸配列。

【０７０３】

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

【０７０４】

被験体において、表１において同定された分泌タンパク質をコードする遺伝子の異常な構造または発現に関連する病的状態を診断する方法もまた、好ましい。ここで、この方法は、この被験体から得られた生物学的サンプルにおいて、少なくとも２つのアミノ酸配列のパネルにおけるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子を検出する工程を包含し、ここでこのパネル中の少なくとも１つの配列は、以下からなる群から選択される配列における少なくとも１０の連続的なアミノ酸の配列と少なくとも９０％同一である：配列番号Ｙのアミノ酸配列（ここで、Ｙは表１に規定される任意の整数である）；および表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定されかつ表１のこのｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれる、ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされる分泌タンパク質の完全アミノ酸配列。

【０７０５】

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

【０７０６】

以下からなる群から選択された配列中の、少なくとも１０の連続的なアミノ酸の配列に少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた、好ましい：配列番号Ｙのアミノ酸配列（ここで、Ｙは表１に規定される任意の整数である）；および表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定されかつ表１のこのｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれる、ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされる分泌タンパク質の完全アミノ酸配列。

【０７０７】

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

【０７０８】

ポリペプチドが以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離された核酸分

子もまた、好ましい：配列番号Ｙのアミノ酸配列（ここで、Ｙは表１に規定される任意の整数である）；および表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定されかつ表１のこのｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれる、ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされる分泌タンパク質の完全アミノ酸配列。

【０７０９】

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

【０７１０】

このポリペプチドが発現されるような条件下でこの組換え宿主細胞を培養する工程、およびこのポリペプチドを回収する工程を包含する、単離されたポリペプチドを作製する方法もまた好ましい。この組換え宿主細胞は真核生物細胞であり、そしてこのポリペプチドは、以下からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む、ヒト分泌タンパク質の分泌部分である、単離されたポリペプチドを作製するこの方法もまた好ましい：配列番号Ｙの分泌部分の第１のアミノ酸の位置の残基で始まる、配列番号Ｙのアミノ酸配列（ここで、Ｙは表１に記載される整数であり、そして配列番号Ｙの分泌部分の第１のアミノ酸のこの位置は表１に規定される）；および表１におけるｃＤＮＡクローンＩＤによって同定されかつ表１のこのｃＤＮＡクローンについて示されるＡＴＣＣ受託番号を有する寄託物に含まれる、ヒトｃＤＮＡクローンによってコードされるタンパク質の分泌部分のアミノ酸配列。この方法によって生成された単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【０７１１】

増加したレベルの分泌タンパク質活性を必要とする個体を処置する方法もまた、好ましい。ここで、この方法は、このような個体に、この個体においてこのタンパク質の活性のレベルを増加させるのに有効な本願発明の単離されたポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体の一定量を含む薬学的組成物を投与する工程を包含する。

【０７１２】

上記で引用される適用は、広範な種々の宿主において使用されている。そのような宿主としては、ヒト、ネズミ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ミニブタ（ｍｉｃｒｏ　ｐｉｇ）、ニワトリ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、宿主は、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ニワトリ、ラット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌまたはネコである。好ましい実施形態において、宿主は、哺乳動物である。最も好ましい実施形態において、宿主は、ヒトである。

【０７１３】

本発明の特定の実施形態では、表７の４番目の列に列挙される各「コンティグＩＤ」について、好ましくは、表７の５番目の列で参照されるヌクレオチド配列、および一般式ａ－ｂにより記載されるヌクレオチド配列（ここでａおよびｂは、表７の列３で参照される対応する配列番号Ｘについて独自に決定される）を含むか、またはからなる、１つ以上のポリヌクレオチドが除外される。さらに特定の実施形態は、表７の５番目の列において参照される特定のポリヌクレオチド配列の１、２、３、４、またはそれ以上を除外するポリヌクレオチド配列に指向される。この表は、一般式により除外され得る配列の全てを含むことを決して意味せず、それは、単に例示的な例である。これらの登録を通じて利用可能な全ての文献は、本明細書中でその全体が参考として援用される。

【０７１４】

【表７】

表7

表7-①

遺伝子番号.	cDNA クローン ID	ヌクレオチド配列番号 X	コンティグ ID	公開登録番号
1	HDPPA04	11	904765	AI990290, AI798762, AA044757, AW105205, AW197379, AA039608, AA247117, AA303575, AA036918, AA247128, AI214428, AW449368, AA044631, AI762460,および AF142780.
1	HDPPA04	32	905419	AI990290, AI798762, AA044757, AW105205, AW197379, AA039608, AA303575, AA036918, AA247117, AI214428, AW449368, AA247128, AA044631, AI762460, AI432644, AI431337, AI623302, AI432662, AI431248, AI431328, AI432649, AI431254, AI431243, AI432665, AI431347, AI432653, AI431230, AI432654, AI431354, AI432655, AI431310, AI431312, AI431330, AW081103, AI432651, AI432647, AI432677, AI432661, AI432675, AI492519, AI431241, AI432658, AI431357, AI432676, AI431351, AI432673, AI431345, AI431353, AW128900, AI432672, AI432674, AI431346, AI431255, AI431340, AW128846, AI432664, AI432650, AI791349, AI431307, AI431316, AW128897, AI492520, AI431751, AI492509, AI432643, AI432657, AI492510, AI432666, AW129223, AI431247, AI431308, AW128884, Y17793,および AF064854.
1	HDPPA04	33	905418	AA247128 ,および AA247117.
2	HOHBY44	12	873264	AI037867, AW368603, AW151676, AW383192, AI753734, AI754387, AW044602, AW383224, AI041650, AW383194, AI750595, AW383164, AI884505, W52686, AW069006, AI750594, AA600082, AW078795, AI753050, AI802788, AW190902, AI750578, AI041803, AI621183, AI750577, AW383125, AA599801, AW087935, N31127, W51909, AI087351, AA071381, W47324, W48619, AA670070, W48852, N35377, AI752124, AI090390, W42791, W47325, N28395, N28453, AI085102, AI678451, AA545734, W42884, AA373348, AI302125, AI910477, H80042, AA071138, AA669811, AW361415, AW069430, AA788723, AW069485, AI940729, AI754608, AA376403, AA373673, H99469, AA373544, AI888605, AA373014, AI940705, AA373975, N27040, C01826, AA373298, AA112124, AA084001, AI940795, AA372833, AW005943, AW239511, AI521673, AW138508, AI932934, AA373557, AA344024, W25447, AI537571, C01953, AI476777, AF110137, Y10019, AB032372,

(続きあり)

(続き)

まわ-②

				AF045800, AF108189,およびAF045801.
2	HOHBY44	34	873263	AW069165, AI968107, AW069264, AI754660, AA912445, AI754594, N21113, AA703927, AA543066, AW130486, AI814434, AI924946, AW069841, AW173667, AI753523, AI753558, AA789056, AI753482, AW068940, AI022286, AI753593, AI753469, AA669866, AI753255, AW008360, AI949111, AW069588, AI754028, AI679005, AI677772, AI754354, AI589279, AI888455, AI752878, AI753002, AA836970, N20040, W19275, AI968546, AA788723, AW016646, AI440410, AI752123, AI801326, AI610424, AI753621, AI446171, AI753087, AI453455, AA599863, AI802571, AI537325, AA669978, AI811571, AI753506, AI309543, AA670062, AI623845, AI075634, AA729459, H80043, AI921732, AA329219, AA577421, AA668620, C01795, AI919521, AA600003, AA653400, AI445339, AI802573, AW130343, AA373014, C01953, AA600104, AI090390, AI302125, AI087351, AW069006, AI754608, AA071381, WS1909, W47325, W42791, AW069430, AI085102, AW005943, AA670070, AW069485, AA600082, AI753734, AI041803, AW138508, AI932934, AI754387, AI750577, AI750594,およびAF110137.
2	HOHBY44	35	785886	AW082079, N35762, N42296, AI081481, AW009605, AI949111, W19275, AW130343, AA600104, AI445339, AA653400, AA600003, AA577421, AI919521, AI075634, AA729459, AI623845, AI309543, AI811571, AI537325, AI802571, AA599863, AI453455, AI446171, AI610424, AI753087, AI440410, AI753621, AI801326, N20040, AI679005, AI589279, AI677772, AI752878, AI754354, AI754028, AW069588, AW008360, AI753255, AA669866, AI753506, AI753593, AW068940, AI753482, AI753558, AI753523, AW173667, AW069841, AI924946, AI814434, AW130486, AA543066, AA703927, AI754594, AI754660, AW069264, N21113, AI968107, AW069165, AA912445, AA668620, AA836970, AA669978, AI968546, AI888455, AI753469, AA789056, AW016646, AI022286, C01795,およびAF110137.
3	HOHBL42	13	1020664	H95505 ,およびL20314.
3	HOHBL42	36	863123	H95505.
3	HOHBL42	38	834714	L20314.
4	HRABV43	14	1024909	AA740749, AA844682, AA977690, AA864844, AI801095, AI206056, AA488673, AA815296, AI742443, AI932302, AA180508, AI833279, AI859081, AA157888, AA179837, AW192608, AA532678, AA479341, AA946767, AA804256, AA401011, AI982686, AI096855, AA187599, N69435, AI342048,

(続きあり)

(続き)

表1-③

				AI745007, AI831165, AA088238, W22883, R92180, AA769339, AI377067, AI143620, AW075726, AA620478, H81204, AA479449, H97641, AA973113, AA400972, AI082108, AA808322, T79180, AA326358, AA856779, AA157576, AW204418, AA907790, AA493191, H81203, AA455438, AA486056, AW206126, AA969911, AI364159, AI475423, H43700, R00938, AA720606, T77234, AW135686, R92284, AI672889, AI656432, R70152, H41249, T85995, AA984380, R86741, AA088288, R02180, T98954, R71371, AI915388, AI383063, R85065, T77448, T79264, T80896, T32391; T10419, R05703, AI270644, AA506839, AI290031, AI459837, AA894596, AA974600, T99869, T90967, R05702, AA312338, AA582695, R87108, R08118, T98910, AA335307, AA187391, N84682, T80825, R08119, R00566, R00671, N46204, AA362528, AI696531, AI652607, AA342282, AW237396, AA593124, W03260, T77927, H90040, T97899, AA341243, AA748184, W60591, AI695823, AA502058, AI040466, AA768593, AI147277, AI674501, AA211074, AA453417, AA723863, AI673001, AW008534, AI590725, C00030, AI919118, AA476751, AA782496, AI360894, AI308970, AI356725, AI800701, AI281134, AI027052, AW162438, AI421854, AI521004, AA834980, AI885897, H93566, AA975309, AI339377, AW149528, AA227152, AI580862, AW162508, AW149834, N27209, AA199737, AA873471, AW000752, AI862036, AI061193, AI348286, AW073221, AI049653, T32729, N69257, AW117999, AI371126, AI190452, AA046621, AI816144, AA069829, H54017, AA223575, AA593953, AW134905, W48701, AA533599, AA815362, AI355030, AI807069, AI346194, AI272101, AW183008, AA587783, AA703690, AA134981, AW103418, AI589847, AA401916, AA652228, T70319, AA054221, AW195167, AI676031, AA001439, R67338, R67057, AA577283, T57926, AI434272, W51922, W51921, R83286, AI688408, AA205942, AA557254, AI189237, R80210, および U39400.
4	HRABV43	39	883826	AA740749, T77234, T85995, T79264, N84682, AA157576, および AA768593.
4	HRABV43	40	902457	AA844682, AA977690, AA864844, AA488673, AA815296, AI206056, AI801095, AI932302, AI742443, AA180508, AI833279, AI859081, AA157888, AA179837, AW192608, AA532678, AA479341, AA946767, AI982686, AA401011, AI831165, AI096855, AA187599, N69435, AI342048, AI745007, W22883, AA088238, R92180,

(続きあり)

(続き)

表1-⑨

				AA804256, AI377067, AI143620, AA769339, H81204, AA620478, AA479449, H97641, AA973113, AA400972, AW075726, AA808322, AI082108, T79180, AA326358, AA856779, AA493191, H81203, AA907790, AA455438, AW204418, AA486056, AA969911, AI364159, AI475423, H43700, AW206126, R00938, AA720606, R92284, AI672889, AA157576, R70152, AI656432, H41249, AA984380, R86741, AW135686, AA088288, R02180, T98954, R71371, AI915388, R85065, T77448, T80896, T32391, R05703, T10419, AI383063, AA506839, AI290031, AI459837, AA894596, AI270644, T99869, AA974600, R05702, T90967, AA582695, AA312338, R87108, R08118, T98910, AA335307, AA187391, R08119, T80825, R00566, R00671, N46204, AA362528, AI696531, AI652607, AA342282, AW237396, AA593124, W03260, T77927, H90040, T97899, AA748184, AA341243, W60591, AI695823, AA502058, AI040466, AI147277, AI674501, AA211074, AA453417, AA723863, AI673001, AW008534, AI590725, C00030, AA476751, AA782496, AI360894, AI308970, AI356725, AI800701, AI281134, AI027052, AW162438, AI421854, AI521004, AI919118, AA834980, H93566, AI885897, AA975309, AI339377, AW149528, AI580862, AA227152, AW162508, AW149834, N27209, AA199737, AA873471, AW000752, AI862036, AI061193, AI348286, AW073221, AI049653, T32729, N69257, AW117999, AI371126, AI190452, AA046621, AI816144, AA069829, H54017, AA223575, AA593953, AW134905, W48701, AA533599, AA815362, AI355030, AI272101, AI346194, AW183008, AA587783, AA703690, AA134981, AI589847, AW103418, AA401916, AI807069, AA652228, T70319, AA054221, AW195167, AI676031, AA001439, R67338, W51922, W51921, R67057, AA577283, T57926, AI434272, R83286, AI688408, AA205942, AA557254, AI189237, R80210,および U39400.
5	HDPRH52	15	906430	AW297778, AA704347, AI693619,および AL133353.
5	HDPRH52	41	905416	AA316209, N35618, AA121285, AI394711, R19007, R44077, AI687282,および AL133353.
6	HDTEK44	16	1025421	AW263031, AI825947, AI674408, AI949058, AI686114, AW236450, AI131456, AI921750, AI499386, AI744116, H17702, AA968971, AI202380, AI612728, AW151821, AA612626, AI568798, AI678940, AI868979,および AW084407.

(続きあり)

(続き)

表7-⑤

6	HDTEK44	42	890972	AW392275, H20592, AA658220, AI583172, AA888002, H20504, AW392670, AL119457, AL119497, AW363220, AW384394, U46351, AL119443, U46347, U46346, Z99396, AW372827, AL119319, U46349, AL119444, U46350, AL119324, AL119484, AL119363, AL119391, AL119335, AL042965, AL119355, U46341, AL119483, AL119341, AL119439, AL119396, AL119511, AL119522, AL119418, AL119464, AB026436, AR054110, A81671, AR069079, AR060234,およびAR066494.
6	HDTEK44	43	904770	AW263031, AI825947, AI949058, AI686114, AI674408, AW236450, AI131456, AI921750, AI499386, AI744116, H17702, AW392275, AA968971, AI202380, H20592, AI612728, AW151821, AA612626, AA658220, AI583172, AA888002, AI568798, AI678940, AI868979, H20504,およびAW084407.
6	HDTEK44	44	902431	AW263031, AI825947, AI949058, AI686114, AI674408, AW236450, AI131456, AI499386, AI921750, AI744116, H17702, AA968971, AI202380, AI612728, AW151821, AA612626, AI568798, AI678940, AI868979,およびAW084407.
7	HOHBP82	17	906794	AI739417, N44813,およびA91748.
7	HOHBP82	45	906796	A91748.
7	HOHBP82	46	906795	AI269759, W44508, M79074, AI218914, AA969620, W44507, AA905017,およびA91748.
7	HOHBP82	47	902318	AA150056, W44507, AA152178, AA037745, AA039255, AA247807, AA247955, AI218914, AI269759, W44508, AA969620,およびA91748.
8	HWBAD01	49	610491	R17760, AC004231, Z77249, AC005632, AC004000, AC005189, AC005755, AL022067, AC005041, AC007298, AC004832, Z93241, U95742, AC007216, AC002306, AC006057, AC007371, AC005752, Z95152,およびAL031295.
9	HWABE12	19	815536	AA524063, AI751102, AA978352, AI800962, AI125904, AI148136, AW021017, AI817327, AI090472, AA864640, AA910568, AA129538, AI347257, AA994194, AA055492, AA055493, AI186179, T59947, AI127212, AW367523, T71365, AW276864, W78183, W58529, AI183851, T50338, AW367579, H17402, AA171811, T51546, AA194069, AA352426, AW376869, AW377057, AW377030, AW117263, AW377059, AA399164, AI541412, AW339825, AA411205, AA194185, AA452074, AA311049, T71528, AI420299, AW367570, AI770095, AI126814, およびAI751103.
9	HWABE12	50	815537	AI420299, AI126814, AI185173, AI125904, AI800962, AI148136, W58417, AA994194,

(続きあり)

(続き)

表1-⑥

				AA978352, T50338, AA055493, T51546, AI817327, AI090472, AA910568, AI186179, AI127212, T71365, W58529, AI347257, AI183851, AA524063, AA194069, AA864640, AI751102, AA352426, H17402, T59947, AA830076, AA451878, W72641, AA744611, AA855081, AW117263, AI081422, AA399164, AA224273, AW339825, AA411205, AA171696, AI123489, AW021017, AA744609, AA279075, AI160983, AA744606, W78183, AA677361, AA055492, AW276864, AA136501, AA745601, AI142596, AW193618, AI055938, AW367523, AA129538, W77930, AW367579, AW241440, AW241497, AA452074, AI699697, AI698785, AA860754, F04664, F03954, AA487085, AA364006, AA009855, AA364988, AA296614, T39853, AA366269, T39843, AC002040, AC002468, AC005873, Z93241, AC005828, AC000120, Z98884, AC004106, AC005350,およびAC005479.
9	HWABE12	51	694670	W72641, AI126814, AI185173, W58417, AI420299, AA744611, AI081422, AA830076, AA855081, AA171696, AA451878, W77930, AA224273, AI123489, AA744609, AA677361, AI160983, AA744606, AA279075, AA136501, AA745601, AI142596, AI055938, AW193618, AW241440, AW241497, AI698785, AI699697, AA860754, N95156, AI653333, AI933953, AI201780, D19771, W70320, AA887563, AI368873, AA127570, AI982547, AA364006, AA856842, AC002352, AC002040, AC020663, AC005350, AF053356, AC004678, AC005231, AC005412, AC011311, U47924, AC004686, AC004893, AF030453, AC000120, AL096701, AC005088, AC004966, AC005399, AC005512, AC002468, AL031729, AL117344, AL008726, AP000313, Z98884, AL022336, AC007731, D87022, AC005500, AP000553, AP000226, AC005873, AP000087, AP000050, AF001550, AP000117, AC005057, AC002385, AC004106, AC004851, AC005952, AF196971, AP000194, AC005944, AP000555, AL035465, AP000691,および AC003684.
10	HHEPJ23	20	1043435	T50625, R09009, R20490, R45313, R45313, H18236, H20422, H41102, H46766, R87981, R88024, R88944, H50900, N30260, N41983, N74323, N91758, W05230, W05562, W23596, W24176, W31111, W67681, W67680, AA034395, AA034396, AA044434, AA044605, AA161369, AA593612, AA595237, AA602781, AA632450, AA576151, AA566019, AA744132, AA808389, AA864841, AA877754, AA948357, AA706278, AA844058,

(続きあり)

(続き)

表7-⑦

				AA844324, AA994658, AI027455, AI051083, AI041576, AI083966, AI268158, AI345057, AI347726, AI363264, AI199583, AI199634, AI564878, AI419579, AI571744, AI424352, AI126459, AI191262, AI199798, AI208380, AI312683, AI332581, AI760697, AI798543, AI817558, AI830412, AI871292, AI970628, AW003596, AW006710, AW083202, AW191061,およびAW470476.
10	HHEPJ23	52	879858	AI126459, AI815708, R47401, AW392670, AI138849, AL119443, AA463298, AW384394, AW363220, U46349, AL119341, AW372827, U46351, AL119497, AL119319, AL119457, AL119324, U46341, Z99396, AL119444, AL119396, AL119355, AL119484, AL119363, AL119391, AL119483, U46350, U46347, U46346, AL134902, AL119418, AL119335, AL119439, AL119522, AL134525, AL119496, AL119401, AL134518, AL119399, AL037205, U46345, AL134538, AL134536, AL042450, AL042614, AL042970, AL042965, AL042975, AL042544, AL043019, AL042984, AL042542, AL042995, AL043029, AL042551, AL043003, AL119464, AL119488, AB026436, AR054110, A81671, AR066494, AR060234,およびAR069079.
11	HWBAR14	53	845408	AF109303,およびAI911903.
11	HWBAR14	54	873239	AA364356.
11	HWBAR14	55	762339	AA631143, AI703348, AA579486, AI969820, AA640153, AA225106, AI587483, AA631024, AI468280, AI911903, AI696721, N95796, AA492342, AI472447, W24907, AA652651, AA552457, AA579735, AA570251, AA652452, AA579320, AI984307, AA579319, AI432644, AI623302, AI431307, AI431316, AI431238, AI432666, AI431328, AI432657, AI431318, AI431347, AI432661, AI432653, AI431231, AI431230, AI431257, AI432654, AI432655, AI431310, AI431312, AW081103, AI432650, AI432677, AI431350, AI431323, AI431354, AI791349, AL045494, AI431353, AI431235, AI431247, AI431321, AI431315, AI431246, AI492519, AI432643, AI432675, AI431337, AI432651, AI432647, AW129223, AI432674, AI431330, AI431308, AI431243, AL042729, AI431248, AI431314, AL042931, AI492510, AI432649, AI432672, AI432665, AI432659, Y17793,およびAF019249.
12	HDPPN86	22	1037893	AI821271, AI313180, W22478, AI002815, AA680243, AL037632, AI076616, AW406162, AI732120, AA484962, AI110760, AI313166, AA381195, AI364780, AA722372, AL044000, AL041706, AL040921, AI817516, AI565581, AI284640, AI963600, AI608771, AL048626, AW440545, AI204304, AW317075, AA836811, AW088224,

(続きあり)

(続き)

表1-⑧

				AA634072, AI350211, AW193265, AI133164, AL046409, AA491814, N94311, AI431303, AI963720, AW276817, AI613280, AA601355, AW080939, AA599480, AI924251, AA469451, F36273, AI289067, AL119691, AI061334, AL045053, AI471481, AI305766, AL138265, AI679294, AA205915, AI754955, AW265385, AW419262, AL046205, AW276827, AI345654, AW327868, AI334443, AW269488, AW276435, AI270117, AI085719, AI890348, AI281881, AW193432, AL138455, AI341664, AI110688, AI149478, AW245747, AI754658, AI375710, AA587604, AI688846, AW406755, AW438643, AA581903, AI619997, AW407578, AA682912, AW029038, AI053623, AI801600, AI610159, AW023672, AI307608, AA610491, AA491284, AW303196, AW274349, AI679871, AA613345, AW021583, AW103758, AI792287, AA652764, AI537506, AW301350, AI053672, AA526787, AL041690, AL037683, AI355206, AI281697, AI358571, AW407632, AW088202, AL042853, AW004911, AI110770, AW265170, AI379719, AA502104, AW102811, AI192631, AI761471, AW088846, AI799642, AI679782, AA743907, AI754253, AA649642, AW073470, AI805363, AI696962, AL118991, AI469172, AA713815, AW339568, AI344844, AI887483, AL044940, AI064864, AW162049, AA284179, AI590958, AI929531, AI469968, AA714453, AI262909, AI298710, AI801482, AI754336, AL048925, AA490183, AI339850, AI434695, AI471543, AI921476, AI254316, AA720702, AI962050, AI340453, AI017024, AA806796, AW148792, AW265009, AA938105, AW338086, AA631507, AW265393, C75026, AI590689, AA513141, AI635818, AI358229, AI357551, AI434706, AA394271, W79504, AI246796, AI951863, AW022379, AW410400, AI049634, AW408717, AA654771, AI457397, AI918421, AI567674, AI561060, AI561255, AI919265, AI866856, AI053790, AI888752, AI669453, AA669840, AI499938, AL137737, AC005280, AC004263, AC005484, AF088219, AC004134, AC005288, AC005911, U47924, AC004859, AL035587, AL022724, AP000359, AC005324, AC005257, AC003009, AC005011, AL049759, AE000658, AC005670, AC007204, AC006251, AL139054, AC004821, AC003006, AC004678, AL117351, AC000118, U85195, Z93023, AC006211, AF196779, AL049776, AL133448, AC004675, AC005771, AC005234, AC000075, AC005488, AC004997, AC004876,

(続きあり)

(続き)

表7-⑨

				AC005844, AL023575, AP000553, AC004596, AL031597, AB023049, AL121658, AC006064, AC005664, AF001549, AL121603, AC007052, AC007011, U95742, AL035422, AC004686, AF196971, AL132642, AC004638, AC007227, AC005585, AC003007, AC002314, AC005632, AP000302, AL078477, AL022328, AC003070, AC007298, AC003085, AC005696, AC005839, AD000092, AC005682, AP000513, Z98200, AC005668, AL096791, AC002470, AC005755, Z99129, AL035683, AC006128, AC008039, AC004019, AC008079, AC005330, AL031255, U78027, AC003111, AC004975, AC005377, AC005520, AC005081, AP000474, AL034420, AC006487, AP000555, AC007666, AC006468, AC006480, AC005399, AC006132, AC006312, AL035450, AC006130, AL133500, U91326, AL021939, AL035458, AL109985, Z82901, AC002549, Z85986, AC004841, AC005231, AC005900, AC008101, AL020995, AP000114, AP000046, AF010238, AP000351, AL132992, AC005200, AC007207, AP000512, AC005071, AC005608, AP000298, Z95114, AL031073, AC005821, AL035659, AC006449, AC005778, D87009, AC006137, AC003957, AL136295, AJ003147, AC005562, AC007308, AL132987, AC004894, AL078593, AC006277, AR036572, U91328, AC002402, AL121653, AJ010598, AL024507, AJ010770, AC004257, AC009516, AC005971, AL035400, AC005808, AF095725, AC009247, AC007216, AF123462, AF039907, AC005701, AC005846, AL034582, AF002223, AC005695, AL023284, AL117344, Z99716, AC005747, AC000026, AL022400, AL031295, AC004858, U63721, AC002316, AC006285, AC005242, AP000049, AL121591, AL049643, AC005785, AC005261, AC000066, AC003982, AC007842, AL023879, AC004253, AC002477, AL133238, Z83820, AC006014, AC002542, AL035425, AP000090, AP000044, AC005412, AC005177, AL049829, AL049779, AC007919, AC002059, AC005740, AC002350, AP000311, AL022721, Z83826, AF111169, AL021578, AC006511, AC007536, AP000556, AC006538, AP000558, Z98051, AC004887, AC005041, AC004752, AC004797, AC007043, AC004690, AL033392, AC002395, AC005089, AC007785, AC007151, AC005531, AL009181, AC005913, AC004862, AC005996, AL021878, AC005304, AL008726, AC005754, AC007688, AL050332, L48038, AC004682, AL117352,

(続きあり)

(続き)

表7－⑩

				AC006530, AC002468, AC005005, AC005250, AC005666,および AC004985.
12	HDPPN86	56	895711	AI313180, W22478, AI002815, AA484962, AA381195, AA634072, AA350454, AA352295, AA360806, AI033197, AI821271, AA663922, AA769467,および AL137737.
13	HDPIW06	23	1018873	T71144, T81645, AA812058, AA604645, AA302937, N38979, AI915081, AL043351, AA610588, AI524453, AI280535, AA557945, AI984168, AA309156, AW272815, AA579276, AA703818, AA761606, AA761714, AW020150, AI453155, AA659324, R93341, AL044489, AA479751, AA368616, AI097051, AA347232, AA904275, AI797998, AI754064, AI521525, AI697239, H94269, AW272606, AI697242, AA877992, AI926102, AA847504, AA608729, AA664163, AA523293, T05604, AA367672, AI267320, N54538, AI573009, AF134726, AL034417, AP000503, AC007386, AF129756, AJ133269, AF196779, AB029025, Z95116, AL022316, AL022098, AC005369, AP000010, AC005081, AL023807, Z83820, AP000152, AC002990, AP000555, AL049749, AC005224, Z95114, AP000356, AC002106, AC004963, AC005049, AP000353, AC005015, AC005696, AC006064, AC004383, AC004079, AC004983, AL008729, AC002544, M63796, AC016830, AC004491, AC007066, AC007151, AL023656, AC008018, AL022721, AC005088, AC006449, AJ003147, AF030453, AC004962, U91318, AC004593, Z99716, AL050318, AP000049, AC004816, AC007263, AC004584, AP000311, AC006482, AC004216, AC007226, AL031577, AC007685, AC016027, AC003108, AC002558, AC003682, AL023575, AL008718, AL021393, AL035667, AC004084, AF109907, AC005014, AB023048, AL049776, AC002301, AC007666, AC002549, AC002300, AF111168, AC004685, AL009181, AL022320, AC005280, Z84480, AL121658, AL034429, AF053356, AP000045, AL035413, AC005821, AL049553, AL035683, AC004510, AC007684, AL031666, AL133163, AP000696, AC003006, AC007371, AC000052, AC006071, AC007216, AC005562, AC007784, Z95326, AL049745, AC004678, AC007021, Z93242, AP000269, U91321, AC004056, AP000697, AC008101, AF111169, AL049835, AC002476, Z83732, AC007308, AC004408, AC003035, AC006285, AC006450, AC005243, AL009051, AC007546, AP000085, AC004129, AL033504, U91322, AP000103, AC004228, AL031120, Y14768, AC004671, AC004686,

(続きあり)

(続き)

表7-⑪

				AC005519, AC007227, AL035072, Z82184, AL080243, AL109827, AL035091, Z93017, AC004821, AC005412, AL031311, AC006479, AL021154, AC003101, AL035071, AC005060, AC004975, AC005482, AP000067, AL030997, AC002553, U95742, AP000505, AC015853, Z95115, AC005996, AC006536, U80017, AL078463, AP000113, AC005332, AL031846, AC002425, AC007637, AC002394, AL117694, AF165926, AL133396, AL122023, AC005702, AB001523, AC005914, AC004099, AC004131, Z97054, AC007686, AL139054, AC007051, AL133246, AF047825, AC005358, AC005529, AL034371, U52112, AP000511, AL008723, Z83826, AL022396, AC007919, AC004019, AL022238, AC005722, AC004217, AC004832, AC000026, AL031230, AC004882, AC003684, AC005899, AC012384, AL049843, Z97876, AC004858, AC007436, AL133382, AC007917, AF196969, AC007172, D88268, AC006537, AC007707, AC002326, AC005102, AC002039, Z99943, AL049697, Z98036, AC005288, Z98941, AC007324, AC004854, AC006961, AP000068, U80460, AL109865, AC003982, AL050348, AC003071, AC002492, AC006211, AL008582, AF088219, AP000300, AL031602, AL031393, AC009263, AC008055,および AL008710.
13	HDPIW06	58	902388	AB029025.
13	HDPIW06	60	531470	T71144, AW182499, AA678404, AC005081, AL078638, AF030453, AC005088, AL022721, AC005488, AC005486, AC005482, AC005015, AC005339, AF053356, AL096791, Z98036, AC002120, AC006101, AC003078, AC007663, AC006549, AC007488, AC004985, U73634, AL035413, AC002132, AC002288, L78833, AL034429, AC003065, AF134726, AL031577, AC006312, AL122023, AC005033, AF121781, AL022320, AC002996, AL135745, AC006208, AC005183, AC004228, AC004130, AC004253, AL022336, AC000025, AF001548, AC005822, AC005527, AL031677, AC007993, AL009181, AC002477, AL021391, AC006544, AC008119, AL034554, AF129756, AC005531, AC005899, AC004453, AC004841, AC005529, AC004983, AC000026, AC002551, AC004129, AC002452, AC005011, AC003109, AB004907, AC007386, AL049776, AC003969, AL009183,および AC006487.
14	HWBCH13	63	815535	AI056866, W90205, W90079, Z80900, AC003964, AC006197, AL121877,

(続きあり)

(続き)

表1-(12)

				AC003009,および AC007312.
15	HOHCJ90	25	890046	AW372170, AA604346, AW068358, AA738473, AA913567, AA665740, AI799350, AI382075, AI142471, AW071731, AI818200, N92765, AW054966, AI869237, AI690475, AW135129, AA846091, AA678907, AA233833, AA934769, AA233799, T18597, Z33559, AI557262, Z32887, D59751, AI535660, AI557864, AI525316, AI541205, AI525500, AI525556, AI541356, C14210, D59436, AI540903, AI526078, AI541365, AI535639, AI536138, AI557084, D50992, R29657, AI557533, AI557809, AI541034, AI557852, AI557731, AI557317, AI541075, AI557602, D59458, AA585325, AI557264, AI557155, D57491, AI525302, AI525856, AI541346, AI557082, AI557808, AI546829, R45895, AI541321, AI540974, C15406, AA585098, AI525852, C15069, AA585101, C14228, Z32822, AI536150, D53161, AI526169, AI557810, AI547196, D61185, AI557238, AI546971, R28892, AI526112, D51433, D54850, AI541517, Z28355, AI525168, AI526016, AI526158, AI541353, AI557718, R28967, AA585430, AA585439, AI536070, D60765, D60844, AI557740, D54897, AI557041, AI546831, AI541013, R28735, R29445, AI557408, AI525656, AI526140, AA585155, AI541450, AI541492, AI526187, AI541336, AI557039, AI547250, AJ239433, AI525568, AA585378, AI541535, R28965, AI526205, AI541422, AA585329, C16294, C16315, AI526024, AI547189, AI526146, AI541383, AI557312, Z33585, AA170832, AI526191, Z36724, AI557758, AI557727, AI547137, AI546999, AI525114, H65400, AA585356, AI546875, AI557279, AI526109, AI540928, AI557763, AI557258, D55233, AI525339, AI547039, AI541027, AI557734, D30843, AI541307, AI541374, AI541515, AI557807, D61254, D53447, C16292, C15120, C15762, D52835, AI541510, R28895, AI547140, AA585389, AI525757, AI547202, AI525076, AI541362, D53472, AI547158, C16300, AI557787, AI525653, AI546945, AI525431, AI546891, AI525878, AI526117, AI541402, AI546996, AI541423, D78224, AI525320, AI547138, AI557241, AI557543, AI557785, AI541516, AI524890, AI526176, AI525661, AA585434, AI526026, AA585453, AI546855, AJ239466, AI524891, AI540967, AI524904, U87306, Z30183, A62298, AR050070, A82595, A82593, AF006072, U94592, Y09813, AR031358, AR017826, AR031365, AR062871, A25909, AR038855, X82834, A62300, AF213384, X82786, U45328, AF135243, A85395,

(続きあり)

(続き)

表7-⑬

				A70872, A70869, A85476, AB005666, AR037157, L36913, AI131952, U87250,および AR025466.
15	HOHCJ90	64	862934	AI760912, AI817827, AI144009, AA127855, AI819433, AI815208, AI683865, AA127885, AW197055, AW300678, AI344433, AI765641, AI318050, AI471973, Z44946, AA295252, F07655, AI370426, R72446, N57522, AA897641, AI985778, R38024, AA873508, AA426097, AA852480, H61346, AA953288, C02345, Z40698, F05244, T78309, D60961, AI250054, H62373, AA330282, AA911800, AI249948, AI674798, AI141688, AI962233, AI222384, N55399, F01499, F03905, N47672, AW050435,および AL049370.
16	HWBCM79	26	839427	AL042756, AL133668, AW303196, AW301350, AI345550, AL046746, AL045709, AI445914, AW271904, AW274349, AI364180, AI590458, AA457249, AL079734, AI590499, AI272052, AA714690, F23327, AA176917, AA664521, AW019964, F17700, AL134330, AI061313, AA837715, AI521049, AL042853, AA608520, AI635819, AA115725, AA665330, AI973173, AI285615, AI783911, AI084012, F26719, F31654, AI872227, AL120976, AA191418, AI753365, AA535937, AL048616, F29541, AW074060, AW075132, AL119838, AA077776, AL119405, AA744001, AA630517, AA879053, AW419389, AW193493, AA516207, AI561116, AI049986, AW090028, N85991, N83375, AA834821, AA745356, AW271917, AL050318, AF029308, U66061, U89335, AC009516, AC000353, AC007242, AC005696, AC002430, AC007993, AC007384, AC002070, AL022312, AC007358, AL034429, AC004032, AC003025, AC007011, AC008372, AC005231, AC005972, AC005358, AC007707, Z99716, AF139813, AL034420, AL109613, U91318, AC005105, AL031733, AC007486, AL031737, Z98949, AC007385, AL022721, AL049829, AC005678, AF061032, AC005920, AC003104, AC005081, AC004966, AC006449, AC002492, AL035398, AP000557, AC002425, AL020995, AC010202, ACX06530, Z86090, AL050309, AC005015, AC004383, AC002115, AL031985, AL031228, AL035703, AC007225, AF196779, AF117829, AL049709, AC004984, AL031662, AC004828, AL034424, AC004687, AL109984, Z82194, AL031685, AC004913, AL023803, AL021154, AC002394, AC004003, AC004477, AC003957, AC007880, AC006111,

(続きあり)

(続き)

表7-⑭

				AC005356, AC004552, AC006063, AC006013, AC004812, AC000111, AC005412, Z92545, AC004228, AC019014, AC002544, AL122020, AC002477, Z98941, U78027, AC005261, AC004230, AC006017, AC011625, AC002554, M89651, U91321, AC005355, AL021977, AF134726, AL022316, AC006112, AC005552, AC007686, AL133485, AC005781, AL122023, AC003663, AL035422, AL031782, AC007363, AL035072, AP000014, AL031729, AL096763, AL035251, AL049569, AC007151, AC006285, AC005829, AC005189, AL136295, AC007161, AC007263, Z83844, AC006241, AL080317, AC005224, AL132857, AL031734, AF111168, AC005146, AF001549, AC003015, AL022400, AL132712, AC006071, AF095901, AP000558, AP000345, Z99755, AC007298, AC002352, AC005703, AC002302, AC006509, AC004859, AF129756, AL049759, Z97876, AF111169, AL035458, AP000128, AP000206, AC006948, AC005191, AL035455, U91326, AC002553, AP000043, AP000518, AC005722, AF107885, AC006120, AL121825, AC002476, U95743, AF001550, AL031279, AC005753, AF047825, AC003982, AC004887, Z83840, AC005242, AC004955, U95739, AL109623, Z99916, AC003992, AC003692, AC002316, AC005014, AC006965, AC006116, AF181897, AC004526, AP000247, AC000039, AL033530, AL035681, AC004883, AL050312, AP000248, AL008635, AC007193, Z70289, AL031054, AC004814, AC006571, Z93020, AL034548, AL022327, AC016025, AP000208, AP000130, AC007649, AC002303, AL035683, AP000245, AC007096, AL031674, AC018769, AC007688, AC006023, Z98750, AC016831, AC005069, AC002289, AC005284, AC002558, AC005567, AL021328, AC004865, AC003969, U91319, Y14768, AC006059, AF053356, AL035086, AC009946, AC005070, AL049692, AC007073, AC005670, AC005921, AC002331,および AC004821.
17	HWBDM62	27	906779	AI284640, AW303196, AW301350, AL046409, AA680243, AI963720, AL138265, AW274349, AI270117, AI281881, AW265385, AA587604, AW419262, AI732120, AL044940, AI133164, AA526787, AI431303, AI754658, AI754955, AI761097, AW193265, AW276827, AL037683, AI350211, AI679782, AL138455, AI341548, AA490183, AI801591, AI298710, AW439558, AL042753, AI345654, AW088846, AL134972, AI110770, AL079645, AI473943, AI434695, AI471481, AI610159, AW021583.

(続きあり)

(続き)

表7-(15)

				AW072587, AA126051, AA126035, AL120687, AI919265, AA587256, AW270270, AW162049, AI929531, AI564185, AW438643, AL119391, AI733755, AA977743, F36273, AI619997, AA584195, AL040921, AI567674, AA470969, R17793, AW304584, AW088202, AW073470, AI289067, AI368745, AL040130, AI345681, AI345675, AA713815, AL038785, AI718446, AA621858, AW338086, AL119691, AI962050, AI061334, AI732764, AW406755, AI312309, AI471487, AI379719, AI110760, AA469451, AA488746, AI339850, AI688846, AI148277, AA682912, AW167372, AW088616, AI192631, AI457397, AI537955, AI814735, AW407578, AI559705, AL048925, AA649642, AL044858, AW193432, AW302013, AI653886, AA074130, AI623898, AW103758, AI798473, AW340844, AA491814, AI859742, AA719292, AI365988, AI375710, AI340453, AW162489, AA584581, AW166815, AI358229, AA719805, AW406447, AI281697, AA523843, AA502155, AW157005, AA482711, AW327868, AI358343, AI568678, AI745325, AI254615, AA584201, AL135405, AI871722, AW148792, AA581903, AI291268, AI267818, AI291124, AI144055, AW274346, AI286356, AA179944, AA446657, AA178953, AA192740, W79504, AI570261, AW410400, AI064864, AI368256, AI499938, AI303008, AA483771, AI674873, N29941, AI355224, AI951889, AA758934, AA652764, AI287485, AL041412, AI499503, AI110688, AA657835, AI143242, AI587583, AW023672, AA579063, AA177061, C06303, AI028510, AI635274, AW339568, AI587565, AA521323, F29989, AA629992, AP000330, AP000125, AP000057, AP000172, Z98742, AC007043, AC009069, AC003692, AP000365, AP000501, U66059, AF001550, Z98749, AC005839, AL022163, AC007226, AC005632, AC004263, AF015156, AC005815, U18398, AL050341, AC005019, AL132992, U18399, U18391, AC006057, AC006292, AC002477, AC016025, AC016830, U18395, AL022721, L44140, AF015149, AL050320, X55926, AC005755, U18394, AC005245, X54181, I51997, AL031280, AL121603, AL049757, AL049869, AF029308, AL049829, AC002492, AC005393, X54180, AC007541, AC005694, AF196969, U63630, AF015151, AC002045, AC005018, AL031650, AC006128, U95742, AC004992, AC004987, AC005562, D83989, Z73965, AC004593, AD000092, AC009516, AC006285, AF077058, AC007382, AC005250, S43650, AC004982, Z49816,

(続きあり)

(続き)

表1-⑯

				AC005939, AC002377, AP000244, AC007227, AL008710, AP000204, AP000126, AB003151, AC004033, AC004948, AC004765, AL031003, AC004797, AC007319, Z98046, Z81314, AL080242, AP000156, AC006960, AL031311, AC008372, AL078644, AC006501, AL049544, X54176, AC005387, AC002430, AC006251, AC006130, AC004993, AL031767, Z84487, AC006208, AC007384, AL034351, AC004650, AC006205, AC004814, AC005360, AL021808, AC004024, AF015147, AC004019, AL133355, U18387, AC003957, AL008735, AC005529, AL008718, AC008064, AP000014, AL049748, AC005324, AL096712, AC006277, AP000431, Y18000, AC003048, X60459, AC002565, AC007666, AC006045, AL023575, AP000044, AP000112, AL034384, AC004963, AC005251, AC005777, AC005912, Z97200, AC006017, AC008079, AC005666, U12584, AC004381, AC002310, Z86061, AC000052, Z75744, AL031283, AL022328, AC006050, AC005331, AC006048, AC000353, Z93930, AC005190, AC010077, AL035455, AL133485, AC004940, X54178, AL035451, AC005740, AC007216, AC007875, AL031319, D84394, AL132799, AL035681, AC003982, AC005154, U07563, AP000297, AL021453, AL133494, AL133399, AC004638, AF015148, AL035072, AL031709, AP000504, AC004890, AC008009, AL031281, AC005209, AC008101, AC005284, AL096776, AC004825, AL034343, X55927, X55925, AC003003, AC000114, X55923, AL035683, Y10196, AL031848, AL024498, AL008728, AF129756, AL031257, AC007676, U91323, AL022322, AP000338, AC005998, AC002984, AC007228, AC008173, AP000495, AL022400, X88791, AL031053, U67231, AC005156, AC006153, AC004686, AL034417, AL031054, D87675, X55924, AC006071, AC005914, AC006480, AL035422, AL133246, AC005859, AL033392, AP000216, U57006, AL049760, AC005089, AC005091, Z93241, AC006511, U57009, AC006213, AC004887,およびAC005808.
17	HWBDM62	65	902316	AP000330, AP000125, AP000057,およびAP000172.
17	HWBDM62	66	895690	AI761097, AP000172, AP000057, AP000125, およびAP000330.
17	HWBDM62	67	734124	AI431347, AW081103, AW128900, AC002544, X99832, AC002425,およびY17793.
18	HWBCV72	28	882920	AC006518.
18	HWBCV72	68	905783	AW266498, AL037695,およびAC006518.

(続きあり)

(続き)

表1-(17)

18	HWBCV72	69	905767	Z33596, AI284640, AA610491, AI344844, AI200051, AA720702, AI471481, AA630030, AA771811, T07451, AA525824, AA670468, AA554319, AA494099, N62433, AA908422, AA813902, AI049940, N26685, AI801591, AA346454, AA348017, AW272925, H15679, R43351, AI669453, AC006518, D83989, X75335, AC005839, AF042090, AF077058, X55922, AC006539, AC003047, AC005887, AL031904, AL009181, AC006211, AF064863, AC006057, AC005531, AC007630, AC005736, AC006261, U67827, AP000567, AC005519, AC007227, AC004463, U95742, AC005516, AC005520, AC002379, AL023879, Z32774, AC007216, AC005785, AC005373, AC005082, AC006277, AL049776, AF196779, AP000088, AC003962, AC005081, AC005037, AL021546, AL135371, AC004966, AL031848, AC002091, AC006241, AC007043, AC002059, AC004534, AL034371, AL022326, M89651, AC004485, AC006312, AL109984, AC004019, AC012380, AC006600, AC006538, AP000114, AC008035, AL132712, AC005180, AC009330, AC002369, AL021939, AC004812, AP000303, AC005523, Z98304, AL031281, AL049869, AF165926, AC004990, U07000, AC002509, AP001137, AC005411, AC004884, AF045555, AC000052, AC006051, AC008079, AC005011, AC004184, AC004858, AL135744, AP000046, およびAC003104.
18	HWBCV72	70	869177	AA206019, AA650210, AI018503, AI380539, AI223829, AI934781, AA311371, AA430231, AI978828, AI916761, AA654703, AW139620, W55873, AA659588, AI752482, AI093053, AW207120, AA659723, AW204025, H92450, AA654949, R05745, AW075995, AA644273, AI418805, AA627128, H92449, D61582, AA375163, AA994023, AI201537, AW293550, AA077918, AA102222, AA045668, AA010326, AA376452, AL135481, AA077049, AI739469, AI051657, AI870944, W56301, AI383697, AI383695, AA598926, AA317114, AA586345, AW058408, AA077082, AA102223, AI091799, AA045669, T51787, AW361959, AA214166, W27535, AW370222, AA209520, およびD16938.
19	HMTAL77	29	855227	AW248271, AA351119,およびAL137682.
19	HMTAL77	71	855226	AA351119, T75083, AA338164, AW248271, AA356283, AA829052, AA873659, AF114124,およびAL137682.
20	HHEPG23	30	1034541	AA732566, AI432371, AI394417, AI313180, AI367073, AI821271, W22478, AI521279,

(続きあり)

(続き)

表7-(18)

				AI025957, AA612859, AW062389, AA485239, AI002815, AW183741, AW081769, AA769467, AI868573, AI076616, AL037632, AA680243, AA722372, AI732120, AW406162, AL040921, AA484962, AI110760, AI313166, AI364780, AL041706, AL044000, AI817516, AI924251, AI284640, AI963600, AW407632, AA634072, AI565581, AI608771, AL048626, AA836811, AW440545, AW088224, AW245747, AI204304, AW317075, AI350211, AI305766, AI133164, AW193265, AL138265, AL046409, N94311, AW276817, AA491814, AL045053, AI431303, AI963720, AI334443, AA601355, AI613280, AI679294, AI110688, AW080939, AA599480, AL042853, AL044940, F36273, AA350454, AL119691, AA469451, AI289067, AA610491, AW303196, AA604333, AI061334, AA205915, AI754955, AA353281, AI471481, AL042420, AW301350, AW265385, AW419262, AW276827, AI679871, AI345654, AW327868, AW406755, AW269488, AW276435, AI270117, AI064864, AI085719, AI890348, AL046205, AI281881, AW193432, AL138455, AI341664, AA587604, AL044858, AI754658, AI375710, AI688846, AW029038, AW438643, AI149478, AA581903, AI619997, AW407578, AA682912, AW023672, AI801600, AI792287, AA526787, AI307608, AW265170, AA652764, AW102811, AI471603, AA491284, AI888752, AW274349, AA743907, AA613345, AW021583, AA502104, AA665330, AI610159, AA468022, AL037683, AA482711, AW088202, AI110770, AI499503, AI537506, AW103758, AI053672, AL041690, AA846935, AI355206, AI799642, AI679782, AI281697, AI358571, AW004911, AA284179, N24538, AI379719, AA649642, AI192631, AA713815, AI761471, AI887483, AW088846, AW248847, AI249997, AA470969, AW162049, AI754253, AI929531, AW073470, AI805363, AI305547, AI696962, AI469172, AI754336, AW339568, AI344844, AI339850, AI471543, AI962050, AI590958, AI469968, AA714453, AL079645, AI262909, AW304584, AW062724, AI801482, AL048925, AA490183, AA938105, AW265393, AI434695, AI921476, AI254316, AA720702, AI340453, AI017024, AL137737, AC005280, AC004263, AC005911, AC005484, AC005288, AL035587, AF088219, AC004134, U47924, AC004859, AP000359, AL022724, AC005257, AE000658, AL117351, AL139054, AC005324, AC005844, AC005670, AC003009, AC000118, AL049776, AC006211, AL023575,

(続きあり)

(続き)

表7-(19)

				AC005585, Z93023, U85195, AC004821, AC005234, AL121603, AC007227, AC005682, AC007204, AL035422, AC005488, AC004997, AC006251, AC005696, AP000553, AC004675, AF196779, AC003007, AL031597, AC002314, AC000075, AL121658, AC005632, AC005839, AC006965, AF001549, AL133448, Z99129, AP000513, AC004638, AC003085, AC004854, AC004876, AL022721, AB023049, AL034420, AC008101, AL049759, AC004686, AL021939, U78027, AC008079, AC002470, AP000302, Z98200, AC005231, AC007216, AL132642, AL132992, U95742, AL035450, AL022328, AL078477, AD000092, AC006312, AC005011, AC007011, AL080243, AC004841, AC009247, AC004678, AC006128, AC005664, AC007052, AC005081, AC003006, AP000512, AF196971, AC007207, AJ010598, Z82901, AC004257, AC008039, AC003957, AP000351, AC006449, AJ003147, AC006064, AC006137, AC006480, AC006130, AC004894, AC005377, AC005755, AC004019, AL023284, Z85986, AL035458, AP000049, AC004975, AL024507, AC005005, AC005200, AC005520, AF010238, AC002402, AC005900, AL133500, AC003982, AL096791, AC009516, D87009, AP000555, AP000114, AP000046, AC002549, AL035683, U91326, AP000311, AC004858, AL035400, AC003070, Z98051, AL136295, AC006277, AL034582, AC005771, AL031255, AC002477, AL117344, AC005913, AL031650, AC007043, AC005747, AP000556, AL050332, AP000090, AC007785, AC006468, AC005089, AC000066, AL031073, AF123462, AC004690, Z97195, AC004253, AL050318, AC006001, AC007308, AJ010770, AC005177, AL035425, AC006111, AL049779, AC005041, AL109985, AC005399, AC007676, AC007298, AC005608, AC007666, AC005193, AC004985, AL008726, AL132987, AC004596, AC002301, AL121653, AL035659, AF111169, AC002120, AC006132, AC005778, AP000298, AC005330, AC007919, AC004862, AL008725, AP000158, Z95114, Z83826, AL023494, AC006017, AC005531, AC005071, AP000349, AC006285, AL021878, AF095725, AC007387, AC004797, AC005859, AC005291, U66059, AP000558, AC006511, AC006960, AL049845, AC008018, AC005668, L48038, AC006487, AC005695, AC007064, AC002468,

(続きあり)

(続き)

表7-(20)

				AC005242, AL021578, AL022400, AL117352, AL050341, AC006538, AL022323, AF109907, AC002347, AC003111, AP000044, Z83820, AL109758, AC005218, AC004990, AC000026, AC007536, AC005019, AC005785, AL023879, AL020995, AL121591, AF039907, Z94056, AL009181, AC005996, AL031320, AL035398, Z99716,および AL133238.
20	HHEPG23	72	884590	AI821271.
20	HHEPG23	73	902169	AA732566, AI432371, AI394417, AI367073, AI521279, AI025957, AA612859, AW062389, AA485239, AW183741, AW081769, AA769467, AI868573, AA353281, N24538, AI313180, AW206261, AA484962, AA381195, AA829326, T29199, AA362689, AA362688, AA362690, AA360806, AI033197, AI002815, AL044652, AL137737, A49045, AF019049, I66487, A94048, A94061, AR035224, AR067734, I07209, I09252, I09251, I07249, AR068508, I09270, I09268, I09269, AR068510, AR068509, A63954, A49701, A29109, A32111, I66495, AR068550, A23373, AR068551, I66494, E01324, I08638, A94046, A94054, I09267, I58322, I58323, I66498, I66497, I66496, I66486, A27169, A27170, A39929, A83151, AR038307, AR038321, I91969, AR067731, AR067732, I12325, M68882, AR051537, AR051524, AR051528, AR051547, Y17793,および A42964.
21	HWBAR88	31	836469	AA334103, AI654920, AW418882, AI949038, AI093540, AA703125, AI076049, AI356640, AI359681, AI160128, AI422536,および AB020316.

概して、本発明を記載してきたが、例示の目的のために提供され、そして限定を意図しない、以下の実施例を参照することによって、本発明はより容易に理解される。

【０７１５】

（実施例）

（実施例１：選択されたｃＤＮＡクローンの寄託されたサンプルからの単離）

引用されるＡＴＣＣ寄託物中の各ｃＤＮＡクローンは、プラスミドベクター中に含まれる。表１は、各クローンが単離されたｃＤＮＡライブラリーを構築するために用いられたベクターを同定する。多くの場合において、ライブラリーを構築するために使用されたベクターは、プラスミドが切り出されたファージベクターである。すぐ下の表は、ｃＤＮＡライブラリーを構築する際に使用される各ファージベクターについて関連するプラスミドを相関づける。例えば、特定のクローンがベクター「Ｌａｍｂｄａ　Ｚａｐ」中に単離されていると表１に同定される場合、対応する寄託クローンは、「ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ」である。

【０７１６】

【表８】

ライブラリーを構築するために使用されたベクター	対応する寄託プラスミド
Lambda Zap	pBluescript (pBS)
Uni-Zap XR	pBluescript (pBS)
Zap Express	pBK
lafmid BA	plafmid BA
pSport1	pSport1
pCMVSport 2.0	pCMVSport 2.0
pCMVSport 3.0	pCMVSport 3.0
pCR®2.1	pCR®2.1

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

【０７１７】

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

（１９８８）およびＭｅａｄ，Ｄ．ら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：（１９９１）を参照のこと）。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、表１における特定のクローンについて同定されたファージベクター配列、ならびに上記に示された対応するプラスミドベクター配列を含まない。

【０７１８】

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

【０７１９】

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

【０７２０】

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

【０７２１】

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

グおよび配列決定することによって、選択された配列であることを確認する。

【０７２２】

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

【０７２３】

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

【０７２４】

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

【０７２５】

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

【０７２６】

（実施例２：ポリヌクレオチドに対応するゲノムクローンの単離）

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

【０７２７】

（実施例３：ポリペプチドの組織分布）

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

【０７２８】

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

【０７２９】

（実施例４：ポリヌクレオチドの染色体マッピング）

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

【０７３０】

（実施例５：ポリペプチドの細菌性発現）

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

【０７３１】

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

【０７３２】

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

【０７３３】

細胞を、さらに３～４時間増殖させる。次いで、細胞を遠心分離（６０００×ｇで２０分間）によって収集する。細胞ペレットを、カオトロピック剤である６Ｍグアニジン塩酸塩中に、４℃で３～４時間攪拌することによって溶解させる。細胞細片を遠心分離によっ

て取り除き、そしてポリペプチドを含む上清を、ニッケルーニトリロ三酢酸（「Ｎｉ－ＮＴＡ」）アフィニティー樹脂カラム（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．前出より入手可能）にロードする。６×Ｈｉｓタグを有するタンパク質は、Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂に高い親和性で結合し、そして単純な１工程手順で精製され得る（詳細には、Ｔｈｅ　ＱＩＡｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎｉｓｔ（１９９５）ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，前出を参照のこと）。

【０７３４】

手短に言えば、上清を、６Ｍグアニジン－ＨＣｌ、ｐＨ８のカラムにロードし、そのカラムを、最初に１０容量の６Ｍグアニジン－ＨＣｌ、ｐＨ８で洗浄し、次いで１０容量の６Ｍグアニジン－ＨＣｌ、ｐＨ６で洗浄し、最後にポリペプチドを、６Ｍグアニジン－ＨＣｌ、ｐＨ５で溶出する。

【０７３５】

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

【０７３６】

上記の発現ベクターに加えて、本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたファージオペレーターおよびプロモーターエレメントを含み、ｐＨＥ４ａと呼ばれる発現ベクターを含む（ＡＴＣＣ受託番号２０９６４５、１９９８年２月２５日に寄託）。このベクターは以下を含む：１）選択マーカーとしてのネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、２）Ｅ．ｃｏｌｉ複製起点、３）Ｔ５ファージプロモーター配列、４）２つのｌａｃオペレーター配列、５）シャイン－ダルガーノ配列、および６）ラクトースオペロンリプレッサー遺伝子（ｌａｑＩｑ）。複製起点（ｏｒｉＣ）は、ｐＵＣ１９（ＬＴＩ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）に由来する。プロモーター配列およびオペレーター配列を合成的に作製する。

【０７３７】

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

【０７３８】

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

【０７３９】

（実施例６：封入体からのポリペプチドの精製）

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

【０７４０】

Ｅ．ｃｏｌｉ発酵の生産期の完了後、細胞培養物を４～１０℃に冷却し、そして１５，

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

【０７４１】

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

【０７４２】

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

【０７４３】

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

【０７４４】

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

【０７４５】

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

【０７４６】

得られたポリペプチドは、上記の再折畳みおよび精製工程の後で９５％より高い純度を示すはずである。５μｇの精製タンパク質がロードされる場合、いかなる主たる混在バンドも、クマシーブルー染色した１６％　ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルから観察されないはずである。精製タンパク質はまた、エンドトキシン／ＬＰＳ混在について試験され得、そして代表的には、ＬＰＳ含量はＬＡＬアッセイに従って、０．１ｎｇ／ｍｌ未満である。

【０７４７】
（実施例７：バキュロウイルス発現系におけるポリペプチドのクローニングおよび発現）
この実施例において、プラスミドシャトルベクターｐＡ２を使用して、ポリヌクレオチドをバキュロウイルスに挿入し、ポリペプチドを発現する。この発現ベクターは、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多核体ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）の強力なポリヘドリンプロモーター、続いてＢａｍＨＩ、ＸｂａＩ、およびＡｓｐ７１８のような簡便な制限部位を含む。シミアンウイルス４０（「ＳＶ４０」）のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために使用する。組換えウイルスの容易な選択のために、このプラスミドは、同方向の弱いＤｒｏｓｏｐｈｉｌａプロモーターの制御下で、Ｅ．ｃｏｌｉ由来のβ－ガラクトシダーゼ遺伝子、続いてポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む。挿入された遺伝子は、クローン化したポリヌクレオチドを発現する生存可能なウイルスを生成する、野生型ウイルスＤＮＡとの細胞媒介性の相同組換えのためのウイルス配列と両方の側で隣接する。
【０７４８】
他の多くのバキュロウイルスベクター（例えば、ｐＡｃ３７３、ｐＶＬ９４１、およびｐＡｃＩＭ１）は、当業者が容易に理解するように、構築物が転写、翻訳、分泌などのために適切に配置されたシグナル（必要とされる場合、シグナルペプチドおよびインフレームなＡＵＧを含む）を提供する限りにおいて、上記のベクターの代わりに使用され得る。このようなベクターは、例えば、Ｌｕｃｋｏｗら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１７０：３１－３９（１９８９）に記載される。
【０７４９】
具体的には、ＡＵＧ開始コドンを含み、そして表１に同定されたリーダー配列に天然に結合した寄託されたクローンに含まれるｃＤＮＡ配列を、実施例１に記載されるＰＣＲプロトコルを使用して増幅させる。天然に存在するシグナル配列を使用して分泌タンパク質を産生する場合、ｐＡ２ベクターは第２のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、Ｓｕｍｍｅｒｓら、「Ａ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　Ｖｅｃｔｏｒｓ　ａｎｄ　Ｉｎｓｅｃｔ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ」、Ｔｅｘａｓ　Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｓｔａｔｉｏｎ　Ｂｕｌｌｅｔｉｎ　ＮＯ．：１５５５（１９８７）に記載される標準的な方法を用いて、このベクターを、バキュロウイルスリーダー配列を含むように改変し得る（ｐＡ２ＧＰ）。
【０７５０】
増幅されたフラグメントを、市販のキット（「Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ」、ＢＩＯ　１０１　Ｉｎｃ．，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，Ｃａ．）を使用して、１％アガロースゲルから単離する。次いで、このフラグメントを適切な制限酵素で消化し、そして再び１％アガロースゲル上で精製する。
【０７５１】
このプラスミドを対応する制限酵素で消化し、そして必要に応じて、当該分野で公知の慣用の手順を用いて、仔ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸し得る。次いで、このＤＮＡを、市販のキット（「Ｇｅｎｅｃｌｅａｎ」ＢＩＯ　１０１　Ｉｎｃ．，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，Ｃａ．）を使用して、１％アガロースゲルから単離する。
【０７５２】
このフラグメントおよび脱リン酸したプラスミドを、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを用いて互いに連結する。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＢ１０１細胞またはＸＬ－１　Ｂｌｕｅ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）細胞のような他の適切なＥ．ｃｏｌｉ宿主を、連結混合液で形質転換し、そして培養プレート上に拡げる。このプラスミドを含む細菌を、個々のコロニー由来のＤＮＡを消化し、そしてゲル電気泳動によって消化産物を分析することにより同定する。クローニングしたフラグメントの配列を、ＤＮＡシーケンスによって確認する。

【０７５３】
このポリヌクレオチドを含む５μｇのプラスミドを、Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：７４１３－７４１７（１９８７）によって記載されたリポフェクション法を使用して、１．０μｇの市販の線状化バキュロウイルスＤＮＡ（「ＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ™ ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ ＤＮＡ」，Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）と同時トランスフェクトする。１μｇのＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ™ ウイルスＤＮＡおよび５μｇのプラスミドを、５０μｌの無血清グレース培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を含む、マイクロタイタープレートの滅菌したウェル中で混合する。その後、１０μｌのリポフェクチンおよび９０μｌグレース培地を加え、混合し、そして室温で１５分間インキュベートする。次いで、トランスフェクション混合液を、無血清のグレース培地１ｍｌを加えた３５ｍｍ組織培養プレートに播種したＳｆ９昆虫細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １７１１）に滴下する。次いで、このプレートを２７℃で５時間インキュベートする。次いで、トランスフェクション溶液をこのプレートから除去し、そして１０％ウシ胎仔血清を補充した１ｍｌのグレース昆虫培地を添加する。次いで、培養を２７℃で４日間継続する。

【０７５４】
４日後上清を収集し、そしてＳｕｍｍｅｒｓおよびＳｍｉｔｈ（前出）によって記載されるようにプラークアッセイを行う。「Ｂｌｕｅ Ｇａｌ」（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ）を含むアガロースゲルを使用して、ｇａｌが発現しているクローン（青色に染色したプラークを生ずる）の容易な同定および単離を可能にする（この型の「プラークアッセイ」の詳細な説明はまた、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，９－１０頁によって頒布される、昆虫細胞培養およびバキュロウイルス学のための使用者ガイドの中に見出され得る）。適切なインキュベーションの後、青色に染色したプラークを、マイクロピペッターのチップ（例えば、エッペンドルフ）で拾う。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、２００μｌのグレース培地を含む微小遠心分離チューブ中で再懸濁させ、そして組換えバキュロウイルスを含む懸濁液を使用して、３５ｍｍディッシュに播種したＳｆ９細胞を感染させる。４日後、これらの培養ディッシュの上清を採集し、次いで４℃に貯蔵する。

【０７５５】
ポリペプチドの発現を確認するために、１０％熱非働化ＦＢＳを補充したグレース培地中で、Ｓｆ９細胞を増殖させる。この細胞を、約２の感染効率（「ＭＯＩ」）で、このポリヌクレオチドを含む組換えバキュロウイルスで感染させる。放射性標識したタンパク質を所望する場合には、６時間後に培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを含まないＳＦ９００ ＩＩ培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤから入手可能）に置き換える。４２時間後、５μＣｉの^{35}Ｓ－メチオニンおよび５μＣｉの^{35}Ｓ－システイン（Ａｍｅｒｓｈａｍから入手可能）を添加する。細胞をさらに１６時間インキュベートし、次いで遠心分離によって採集する。上清中のタンパク質ならびに細胞内タンパク質を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、次いでオートラジオグラフィーによって（放射性標識した場合）分析する。

【０７５６】
精製タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列の微量配列決定法を使用して、産生されたタンパク質のアミノ末端配列を決定し得る。

【０７５７】
（実施例８：哺乳動物細胞におけるポリペプチドの発現）
本発明のポリペプチドを、哺乳動物細胞において発現させ得る。代表的な哺乳動物発現ベクターは、ｍＲＮＡの転写の開始を媒介するプロモーターエレメント、タンパク質コード配列、および転写の終結および転写物のポリアデニル化に必要なシグナルを含む。さらなるエレメントは、エンハンサー、コザック（Ｋｏｚａｋ）配列、ならびに、ＲＮＡスプライシングのためのドナー部位およびアクセプター部位に隣接する介在配列を含む。非常

に効率的な転写は、ＳＶ４０由来の初期および後期プロモーター、レトロウイルス（例えばＲＳＶ、ＨＴＬＶＩ、ＨＩＶＩ）由来の長末端反復（ＬＴＲ）、およびサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）の初期プロモーターを用いて達成される。しかし、細胞内エレメント（例えば、ヒトアクチンプロモーター）もまた、使用され得る。

【０７５８】

本発明を実施する際の使用に適切な発現ベクターは、例えば、ｐＳＶＬおよびｐＭＳＧ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）、ｐＲＳＶｃａｔ（ＡＴＣＣ３７１５２）、ｐＳＶ２ｄｈｆｒ（ＡＴＣＣ　３７１４６）、ｐＢＣ１２ＭＩ（ＡＴＣＣ　６７１０９）、ｐＣＭＶＳｐｏｒｔ２．０、ならびにｐＣＭＶＳｐｏｒｔ３．０のようなベクターを含む。使用され得る哺乳動物宿主細胞としては、ヒトのＨｅｌａ細胞、２９３細胞、Ｈ９細胞およびＪｕｒｋａｔ細胞、マウスのＮＩＨ３Ｔ３細胞およびＣ１２７細胞、Ｃｏｓ　１細胞、Ｃｏｓ　７細胞およびＣＶ１細胞、ウズラのＱＣ１－３細胞、マウスのＬ細胞、およびチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞が挙げられる。

【０７５９】

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

【０７６０】

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

【０７６１】

プラスミドｐＳＶ２－ｄｈｆｒ（ＡＴＣＣ受託番号３７１４６）の誘導体である、発現ベクターｐＣ４（ＡＴＣＣ受託番号２０９６４６）およびｐＣ６（ＡＴＣＣ受託番号２０９６４７）は、ラウス肉腫ウイルス（Ｃｕｌｌｅｎら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、４３８－４４７（１９８５年3月））の強力なプロモーター（ＬＴＲ）、およびＣＭＶ－エンハンサー（Ｂｏｓｈａｒｔら、Ｃｅｌｌ　４１：５２１－５３０　（１９８５））のフラグメントを含む。例えば、ＢａｍＨＩ、ＸｂａＩ、およびＡｓｐ７１８の制限酵素切断部位を有するマルチプルクローニングサイトは、目的の遺伝子のクローニングを容易にする。このベクターはまた、３’イントロン、ラットプレプロインスリン遺伝子のポリアデニル化シグナルおよび終結シグナル、ならびに、ＳＶ４０初期プロモーターの制御下にあるマウスＤＨＦＲ遺伝子を含む。

【０７６２】

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

【０７６３】

本発明のポリヌクレオチドは、実施例１に概説するプロトコルに従って増幅される。分

泌タンパク質の産生のために天然に存在するシグナル配列が用いられる場合、このベクターは、第２のシグナルペプチドを含む必要はない。あるいは、天然に存在するシグナル配列が用いられない場合、このベクターは、異種シグナル配列を含むように改変され得る（例えば、ＷＯ９６／３４８９１を参照のこと）。

【０７６４】

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

【０７６５】

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

【０７６６】

活性なＤＨＦＲ遺伝子を欠損するチャイニーズハムスター卵巣細胞を、トランスフェクションに使用する。５μｇの発現プラスミドｐＣ６　ａ　ｐＣ４を、リポフェクチン（Ｆｅｌｇｎｅｒら、前出）を用いて、０．５μｇのプラスミドｐＳＶｎｅｏとともに同時トランスフェクトする。プラスミドｐＳＶ２－ｎｅｏは、優性選択マーカーである、Ｇ４１８を含む抗生物質の群に対する耐性を付与する酵素をコードするＴｎ５由来のｎｅｏ遺伝子を含む。細胞を、１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を補充したαマイナスＭＥＭに播種する。２日後、細胞をトリプシン処理し、そして１０、２５、または５０ｎｇ／ｍｌのメトトレキサートおよび１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を補充したαマイナスＭＥＭ中のハイブリドーマクローニングプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ，Ｇｅｒｍａｎｙ）中に播種する。約１０～１４日後、単一のクローンをトリプシン処理し、次いでメトトレキサートの異なる濃度（５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、４００ｎＭ、８００ｎＭ）を使用して、６ウェルのペトリ皿または１０ｍｌのフラスコに播種する。次いで、メトトレキサートの最高濃度で増殖するクローンを、さらに高い濃度（１μＭ、２μＭ、５μＭ、１０ｍＭ、２０ｍＭ）のメトトレキサートを含む新たな６ウェルプレートに移す。同じ手順を、１００～２００μＭの濃度で増殖するクローンが得られるまで繰り返す。所望の遺伝子産物の発現を、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットによって、または逆相ＨＰＬＣ分析によって分析する。

【０７６７】

（実施例９：タンパク質融合物）

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

【０７６８】

簡単には、ＩｇＧ分子のヒトＦｃ部分は、以下に記載の配列の５’末端および３’末端

にわたるプライマーを使用してＰＣＲ増幅され得る。これらのプライマーはまた、発現ベクター（好ましくは、哺乳動物発現ベクター）へのクローニングを容易にする都合の良い制限酵素部位を有するべきである。

【０７６９】

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

【０７７０】

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

ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域：

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

（実施例１０：ポリペプチドからの抗体の産生）

本発明の抗体は、種々の方法によって調製され得る。（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，第２章を参照のこと）。このような方法の１つの例として、本発明のポリペプチドを発現する細胞は、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために動物に投与される。好ましい方法において、分泌されたタンパク質の調製物が調製され、そして精製されて、天然の夾雑物を実質的に含まないようにされる。次いで、より大きな比活性のポリクローナル抗血清を生成するために、このような調製物は、動物に導入される。

【０７７１】

最も好ましい方法において、本発明の抗体は、モノクローナル抗体（またはそのタンパク質結合フラグメント）である。このようなモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を使用して調製される（Ｋｏｈｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５（１９７５）；Ｋｏｈｌｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５１１（１９７６）；Ｋｏｈｌｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：２９２（１９７６）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｈｙｂｒｉｄｏ

ｍａｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．、５６３－６８１頁（１９８１））。一般に、このような手順は、動物（好ましくはマウス）を、ポリペプチドで、またはより好ましくは分泌ポリペプチド発現細胞で免疫する工程を包含する。このような細胞は、任意の適切な組織培養培地において培養され得る；しかし、好ましくは１０％ウシ胎仔血清（約５６℃で非働化した）を補充し、そして約１０ｇ／ｌの非必須アミノ酸、約１，０００Ｕ／ｍｌのペニシリン、および約１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを補充したＥａｒｌｅ改変イーグル培地において培養される。

【０７７２】

このようなマウスの脾細胞は抽出され、そして適切な骨髄腫細胞株と融合される。任意の適切な骨髄腫細胞株は、本発明に従って用いられ得る；しかし、ＡＴＣＣから入手可能な親骨髄腫細胞株（ＳＰ２Ｏ）を用いることが好ましい。融合後、得られるハイブリドーマ細胞を、ＨＡＴ培地において選択的に維持し、次いでＷａｎｄｓら（Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ　８０：２２５－２３２（１９８１））により記載されるように限界希釈によってクローニングする。次いで、このような選択を通して得られるハイブリドーマ細胞を、このポリペプチドに結合し得る抗体を分泌するクローンを同定するためにアッセイする。

【０７７３】

あるいは、このポリペプチドに結合し得るさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を使用して２段階工程の手順において生成し得る。このような方法は、抗体それ自体が抗原であり、それゆえ第二の抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用する。この方法に従って、タンパク質特異的抗体を使用して、動物（好ましくは、マウス）を免疫する。次いで、このような動物の脾細胞を使用して、ハイブリドーマ細胞を産生する。そして、このハイブリドーマ細胞は、抗体のタンパク質特異的抗体に結合する能力がこのポリペプチドによってブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。このような抗体は、タンパク質特異的抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、そして動物を免疫してさらなるタンパク質特異的抗体の形成を誘導するために使用される。

【０７７４】

本発明の抗体のＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２ならびに他のフラグメントは、本明細書において記載される方法に従って用いられ得ることが明白である。このようなフラグメントは代表的に、（Ｆａｂフラグメントを生成するために）パパインまたは（Ｆ（ａｂ’）２フラグメントを産生するために）ペプシンのような酵素を使用して、タンパク質分解性切断により生成される。あるいは、分泌されたタンパク質－結合フラグメントは、組換えＤＮＡ技術の適用または合成化学により生成され得る。

【０７７５】

ヒトにおける抗体のインビボ使用のために、「ヒト化」キメラモノクローナル抗体を使用することが好適であり得る。このような抗体は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝的構築物を使用することによって産生され得る。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野で公知である。（総説については、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４（１９８６）；Ｃａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら、ＥＰ　１７１４９６；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、ＥＰ　１７３４９４；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、ＷＯ　８６０１５３３；Ｒｏｂｉｎｓｏｎら、ＷＯ　８７０２６７１；Ｂｏｕｌｌａｎｎｅら、Ｎａｔｕｒｅ　３１２：６４３（１９８４）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　３１４：２６８（１９８５）を参照のこと）。

【０７７６】

（実施例１１：ハイスループットスクリーニングアッセイのための分泌タンパク質の産生）

以下のプロトコルは、試験されるべきポリペプチドを含有する上清を産生する。この上清は、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。

【０７７７】
第一に、ポリ－Ｄ－リジン（６４４　５８７　Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｎｈｅｉｍ）ストック溶液（ＰＢＳ中に１ｍｇ／ｍｌ）を、ＰＢＳ（カルシウムもマグネシウムも含まない１７－５１６Ｆ　Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ）中で１：２０に希釈して、作業溶液５０μｇ／ｍｌにする。２００μｌのこの溶液を、各ウェル（２４ウェルプレート）に添加し、そして室温で２０分間インキュベートする。溶液を各ウェルにわたって分配させることを確実にする（注：１２チャンネルピペッターは、１つおきのチャンネルにチップをつけて使用され得る）。ポリ－Ｄ－リジン溶液を吸引除去し、そして１ｍｌ　ＰＢＳ（リン酸緩衝化生理食塩水）でリンスする。ＰＢＳは、細胞をプレートする直前までウェル中に残すべきであり、そしてプレートは２週間前までに予めポリリジンでコーティングし得る。

【０７７８】
２９３Ｔ細胞（Ｐ＋２０を過ぎて細胞を保有しない）を、２×１０^{5}細胞／ウェルで、０．５ｍｌのＤＭＥＭ（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ改変Ｅａｇｌｅ培地）（４．５Ｇ／Ｌのグルコースおよびｌ－グルタミン（１２－６０４Ｆ　Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ）を含む）／１０％熱非働化ＦＢＳ（１４－５０３Ｆ　Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ）／１×Ｐｅｎｓｔｒｅｐ（１７－６０２Ｅ　Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ）中にプレートする。細胞を一晩増殖させる。

【０７７９】
翌日、滅菌溶液容器（ｂａｓｉｎ）中で、３００μｌリポフェクトアミン（１８３２４－０１２　Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ）および５ｍｌ　Ｏｐｔｉｍｅｍ　Ｉ（３１９８５０７０　Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ）／９６ウェルプレートを、一緒に混合する。小容量のマルチチャンネルピペッターを用いて、実施例８または９に記載する方法によって産生されたポリヌクレオチド挿入物を含有する約２μｇの発現ベクターを、適切に標識された９６ウェルの丸底プレート中にアリコートする。マルチチャンネルピペッターを用いて、５０μｌのリポフェクトアミン／Ｏｐｔｉｍｅｍ　Ｉ混合物を各ウェルに添加する。ピペットで緩やかに吸い上げたり下げたりして混合する。室温で１５～４５分間インキュベートする。約２０分後、マルチチャンネルピペッターを使用して１５０μｌのＯｐｔｉｍｅｍ　Ｉを各ウェルに添加する。コントロールとして、挿入物を欠失するベクターＤＮＡの１つのプレートは、トランスフェクションの各セットでトランスフェクトされるべきである。

【０７８０】
好ましくは、トランスフェクションは、以下の作業をタッグチームを組んで（ｔａｇ－ｔｅａｍｉｎｇ）行うべきである。タッグチームを組むことによって、時間に関する労力は半減され、そして細胞にはＰＢＳ上であまり多くの時間を過ごさせない。まず、Ａさんは、培地を細胞の４つの２４ウェルプレートから吸引除去し、次いでＢさんが０．５～１ｍｌのＰＢＳで各ウェルをリンスする。次いで、Ａさんは、ＰＢＳリンスを吸引除去し、そしてＢさんは、チャンネル１つおきにチップのついた１２チャンネルピペッターを使用して、２００μｌのＤＮＡ／リポフェクトアミン／Ｏｐｔｉｍｅｍ　Ｉ複合体を、まず奇数のウェルに、次いで偶数のウェルにと、２４ウェルプレート上の各列に添加する。３７℃で６時間インキュベートする。

【０７８１】
細胞をインキュベートする間に、１×ペンストレップ（ｐｅｎｓｔｒｅｐ）を有するＤＭＥＭ中の１％ＢＳＡか、またはＣＨＯ－５培地（１１６．６ｍｇ／ＬのＣａＣｌ$_{2}$（無水物）；０．００１３０ｍｇ／Ｌ　ＣｕＳＯ$_{4}$－５Ｈ$_{2}$Ｏ；０．０５０ｍｇ／ＬのＦｅ（ＮＯ$_{3}$）$_{3}$－９Ｈ$_{2}$Ｏ；０．４１７ｍｇ／ＬのＦｅＳＯ$_{4}$－７Ｈ$_{2}$Ｏ；３１１．８０ｍｇ／ＬのＫＣｌ；２８．６４ｍｇ／ＬのＭｇＣｌ$_{2}$；４８．８４ｍｇ／ＬのＭｇＳＯ$_{4}$；６９９５．５０ｍｇ／ＬのＮａＣｌ；２４００．０ｍｇ／ＬのＮａＨＣＯ$_{3}$；６２．５０ｍｇ／ＬのＮａＨ$_{2}$ＰＯ$_{4}$－Ｈ$_{2}$Ｏ；７１．０２ｍｇ／ＬのＮａ$_{2}$ＨＰＯ$_{4}$；０．４３２０ｍｇ／ＬのＺｎＳＯ$_{4}$－７Ｈ$_{2}$Ｏ；０．００２ｍｇ／Ｌのアラキドン酸；１．０２２ｍｇ／Ｌのコレステロール；０．０７０ｍｇ／ＬのＤＬ－α－酢酸トコフェロール；０．０５２０ｍｇ／Ｌの

リノール酸；０．０１０ｍｇ／Ｌのリノレン酸；０．０１０ｍｇ／Ｌのミリスチン酸；０．０１０ｍｇ／Ｌのオレイン酸；０．０１０ｍｇ／Ｌのパルミトオレイン酸（ｐａｌｍｉｔｒｉｃ　ａｃｉｄ）；０．０１０ｍｇ／Ｌのパルミチン酸；１００ｍｇ／ＬのＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－６８；０．０１０ｍｇ／Ｌのステアリン酸；２．２０ｍｇ／ＬのＴｗｅｅｎ８０；４５５１ｍｇ／ＬのＤ－グルコース；１３０．８５ｍｇ／ｍｌのＬ－アラニン；１４７．５０ｍｇ／ｍｌのＬ－アルギニン－ＨＣｌ；７．５０ｍｇ／ｍｌのＬ－アスパラギン－H_2O；６．６５ｍｇ／ｍｌのＬ－アスパラギン酸；２９．５６ｍｇ／ｍｌのＬ－システィン２ＨＣｌ－H_2O；３１．２９ｍｇ／ｍｌのＬ－システィン－２ＨＣｌ；７．３５ｍｇ／ｍｌのＬ－グルタミン酸；３６５．０ｍｇ／ｍｌのＬ－グルタミン；１８．７５ｍｇ／ｍｌのグリシン；５２．４８ｍｇ／ｍｌのＬ－ヒスチジン－ＨＣｌ－H_2O；１０６．９７ｍｇ／ｍｌのＬ－イソロイシン；１１１．４５ｍｇ／ｍｌのＬ－ロイシン；１６３．７５ｍｇ／ｍｌのＬ－リジンＨＣｌ；３２．３４ｍｇ／ｍｌのＬ－メチオニン；６８．４８ｍｇ／ｍｌのＬ－フェニルアラニン；４０．０ｍｇ／ｍｌのＬ－プロリン；２６．２５ｍｇ／ｍｌのＬ－セリン；１０１．０５ｍｇ／ｍｌのＬ－スレオニン；１９．２２ｍｇ／ｍｌのＬ－トリプトファン；９１．７９ｍｇ／ｍｌのＬ－チロシン（Ｔｒｙｒｏｓｉｎｅ）－２Ｎａ－２H_2O；９９．６５ｍｇ／ｍｌのＬ－バリン；０．００３５ｍｇ／Ｌのビオチン；３．２４ｍｇ／ＬのＤ－Ｃａパントテン酸；１１．７８ｍｇ／Ｌの塩化コリン；４．６５ｍｇ／Ｌの葉酸；１５．６０ｍｇ／Ｌのｉ－イノシトール；３．０２ｍｇ／Ｌのナイアシンアミド；３．００ｍｇ／ＬのピリドキサールＨＣｌ；０．０３１ｍｇ／Ｌのピリドキシン塩酸塩；０．３１９ｍｇ／Ｌのリボフラビン；３．１７ｍｇ／Ｌのチアミン塩酸塩；０．３６５ｍｇ／Ｌのチミジン；および０．６８０ｍｇ／ＬのビタミンＢ$_{12}$；２５ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝剤；２．３９ｍｇ／ＬのＮａヒポキサンチン；０．１０５ｍｇ／Ｌのリポ酸；０．０８１ｍｇ／Ｌのプトレシンナトリウム－２ＨＣｌ；５５．０ｍｇ／Ｌのピルビン酸ナトリウム；０．０００６７ｍｇ／Ｌの亜セレン酸ナトリウム；２０μＭのエタノールアミン；０．１２２ｍｇ／Ｌのクエン酸第二鉄；４１．７０ｍｇ／Ｌのリノール酸と複合体化したメチル－Ｂ－シクロデキストリン；３３．３３ｍｇ／Ｌのオレイン酸と複合体化したメチル－Ｂ－シクロデキストリン；ならびに１０ｍｇ／Ｌのレチナールと複合体化したメチル－Ｂ－シクロデキストリン）のいずれかの適切な培地を調製する。（１０％ＢＳＡストック溶液のために、１Ｌ　ＤＭＥＭ中にＢＳＡ（８１－０６８－３　Ｂａｙｅｒ）１００ｇを溶解した）。培地を濾過し、そして５０μｌを内毒素アッセイのために１５ｍｌポリスチレンコニカル中に収集する。

【０７８２】

トランスフェクション反応を、好ましくはタッグチームを組んでインキュベーション時間の終わりに終結させる。Ａさんは、トランスフェクション培地を吸引除去し、その間Ｂさんは、１．５ｍｌの適切な培地を各ウェルに添加する。使用された培地に依存して４５時間または７２時間、３７℃でインキュベートする：１％ＢＳＡは４５時間、またはＣＨＯ－５は７２時間。

【０７８３】

４日目に、３００μｌのマルチチャンネルピペッターを使用して、６００μｌを1ｍｌの深底ウェルプレート１枚にアリコートし、そして残りの上清を２ｍｌの深底ウェルにアリコートする。次いで、各ウェルからの上清を実施例１３～２０に記載するアッセイにおいて使用し得る。

【０７８４】

活性が、上清を使用して以下に記載する任意のアッセイにおいて得られる場合、この活性は、ポリペプチドから直接に（例えば、分泌タンパク質として）か、または他のタンパク質の発現を誘導するポリペプチドによって（このタンパク質は、次いで上清中に分泌される）のいずれかに由来することが特に理解される。従って、本発明はさらに、特定のアッセイにおける活性によって特徴づけられる上清中のタンパク質を同定する方法を提供する。

【０７８５】

（実施例１２：ＧＡＳレポーター構築物の構築）
細胞の分化および増殖に関与する１つのシグナル伝達経路は、Ｊａｋｓ－ＳＴＡＴ経路と呼ばれる。Ｊａｋｓ－ＳＴＡＴ経路において活性化されたタンパク質は、多くの遺伝子のプロモーターに位置する、γ活性化部位「ＧＡＳ」エレメントまたはインターフェロン感受性応答エレメント（「ＩＳＲＥ」）に結合する。これらのエレメントに対するタンパク質の結合は、関連する遺伝子の発現を変化させる。
【０７８６】
ＧＡＳエレメントおよびＩＳＲＥエレメントは、転写のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター、すなわち「ＳＴＡＴ」と呼ばれるクラスの転写因子によって認識される。ＳＴＡＴファミリーには６つのメンバーが存在する。Ｓｔａｔ１およびＳｔａｔ３は、Ｓｔａｔ２と同様に（ＩＦＮαに対する応答が広範であるように）、多くの細胞型において存在する。Ｓｔａｔ４は、より限定されており、そして多くの細胞型には存在しないが、ＩＬ－１２での処理後のＴヘルパークラスＩ細胞に見出されている。Ｓｔａｔ５は、元々は乳房成長因子と呼ばれたが、骨髄細胞を含む他の細胞においてより高い濃度で見出されている。それは、多くのサイトカインによって組織培養細胞において活性化され得る。
【０７８７】
ＳＴＡＴは活性化されて、Ｊａｎｕｓ　Ｋｉｎａｓｅ（「Ｊａｋｓ」）ファミリーとして知られる１セットのキナーゼによるチロシンリン酸化に際して細胞質から核へ移動する。Ｊａｋｓは、可溶性のチロシンキナーゼの独特のファミリーの代表であり、そしてＴｙｋ２、Ｊａｋ１、Ｊａｋ２、およびＪａｋ３を含む。これらのキナーゼは、有意な配列類似性を示し、そして一般には休止細胞において触媒的に不活性である。
【０７８８】
Ｊａｋｓは、以下の表によって要約されるように広範なレセプターによって活性化される。（ＳｃｈｉｄｌｅｒおよびＤａｒｎｅｌｌ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６４：６２１－５１（１９９５）による総説から改変）。Ｊａｋｓを活性化し得るサイトカインレセプターファミリーは、２つの群に分けられる：（ａ）クラス１は、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、Ｅｐｏ、ＰＲＬ、ＧＨ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＬＩＦ、ＣＮＴＦ、およびトロンボポエチンに対するレセプターを含み；そして（ｂ）クラス２は、ＩＦＮ－ａ、ＩＦＮ－ｇ、およびＩＬ－１０を含む。クラス１レセプターは、保存されたシステインモチーフ（４つの保存されたシステインおよび１つのトリプトファンのセット）、およびＷＳＸＷＳモチーフ（Ｔｒｐ－Ｓｅｒ－Ｘｘｘ－Ｔｒｐ－Ｓｅｒ（配列番号２）をコードする膜近接領域）を共有する。
【０７８９】
従って、リガンドのレセプターへの結合の際に、Ｊａｋｓは活性化され、これは次いでＳＴＡＴを活性化し、これは、次いで移動し、そしてＧＡＳエレメントに結合する。この全プロセスは、Ｊａｋｓ－ＳＴＡＴシグナル伝達経路に包含される。
【０７９０】
それゆえ、ＧＡＳまたはＩＳＲＥエレメントの結合によって反映されるＪａｋｓ－ＳＴＡＴ経路の活性化は、細胞の増殖および分化に関与するタンパク質を示すために使用され得る。例えば、増殖因子およびサイトカインは、Ｊａｋｓ－ＳＴＡＴ経路を活性化することが知られている。（以下の表を参照のこと）。従って、レポーター分子に連結したＧＡＳエレメントを使用することにより、Ｊａｋｓ－ＳＴＡＴ経路のアクチベーターが同定され得る。
【０７９１】

【表９】

リガンド	JAKs tyk2	Jak1	Jak2	Jak3	STATS	GAS(エレメント)またはISRE
IFNファミリー						
IFN-a/B	+	+	-	-	1,2,3	ISRE
IFN-g		+	+	-	1	GAS (IRF1>Lys6>IFP)
Il-10	+	?	?	-	1,3	
gp130ファミリー						
IL-6(多面性)	+	+	+	?	1,3	GAS (IRF1>Lys6>IFP)
Il-11(多面性)	?	+	?	?	1,3	
OnM(多面性)	?	+	+	?	1,3	
LIF(多面性)	?	+	+	?	1,3	
CNTF(多面性)	-/+	+	+	?	1,3	
G-CSF(多面性)	?	+	?	?	1,3	
IL-12(多面性)	+	-	+	+	1,3	
g-Cファミリー						
IL-2(リンパ球)	-	+	-	+	1,3,5	GAS
IL-4(リンパ/骨髄性の)	-	+	-	+	6	GAS (IRF1 = IFP >>Ly6)(IgH)
IL-7(リンパ球)	-	+	-	+	5	GAS
IL-9(リンパ球)	-	+	-	+	5	GAS
IL-13(リンパ球)	-	+	?	?	6	GAS
IL-15	?	+	?	+	5	GAS
gp140ファミリー						
IL-3(骨髄性の)	-	-	+	-	5	GAS (IRF1>IFP>>Ly6)
IL-5(骨髄性の)	-	-	+	-	5	GAS
GM-CSF(骨髄性の)	-	-	+	-	5	GAS
成長ホルモンファミリー						
GH	?	-	+	-	5	
PRL	?	+/-	+	-	1,3,5	
EPO	?	-	+	-	5	GAS(B-CAS>IRF1=IFP>>Ly6)
レセプターチロシンキナーゼ						
EGF	?	+	+	-	1,3	GAS (IRF1)
PDGF	?	+	+	-	1,3	
CSF-1	?	+	+	-	1,3	GAS(IRF1ではない)

実施例１３～１４に記載される生物学的アッセイにおいて使用されるプロモーターエレメントを含む合成ＧＡＳを構築するために、ＰＣＲに基づいたストラテジーを用いてＧＡＳ－ＳＶ４０プロモーター配列を生成する。５’プライマーは、ＩＲＦ１プロモーターにおいて見出され、そして一定の範囲のサイトカインでの誘導の際にＳＴＡＴに結合することが以前に実証されたＧＡＳ結合部位の４つの直列のコピーを含むが（Ｒｏｔｈｍａｎら、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１：４５７－４６８（１９９４））、他のＧＡＳエレメントまたはＩＳＲＥエレメントを代わりに使用し得る。５’プライマーはまた、ＳＶ４０初期プロモーター配列に対して相補的な１８ｂｐの配列も含み、そしてＸｈｏＩ部位に隣接する。５’プライマーの配列は以下である：
５’：ＧＣＧＣＣＴＣＧＡＧＡＴＴＴＣＣＣＣＧＡＡＡＴＣＴＡＧＡＴＴＴＣＣＣＣＧＡＡＡＴＧＡＴＴＴＣＣＣＣＧＡＡＡＴＧＡＴＴＴＣＣＣＣＧＡＡＡＴＡＴＣＴＧＣＣＡＴＣＴＣＡＡＴＴＡＧ：３’（配列番号３）。

【０７９２】

下流プライマーはＳＶ４０プロモーターに対して相補的であり、そしてＨｉｎｄ　ＩＩＩ部位に隣接する：５’：ＧＣＧＧＣＡＡＧＣＴＴＴＴＴＧＣＡＡＡＧＣＣＴＡＧＧＣ：３’（配列番号４）。

【０７９３】

ＰＣＲ増幅を、Ｃｌｏｎｔｅｃｈから入手したＢ－ｇａｌ：プロモータープラスミド中に存在するＳＶ４０プロモーターのテンプレートを用いて実施する。得られたＰＣＲフラグメントをＸｈｏＩ／Ｈｉｎｄ　ＩＩＩを用いて消化し、そしてＢＬＳＫ２－（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）にサブクローニングする。正方向および逆方向のプライマーを用いる配列決定により、挿入物が以下の配列を含むことを確認する：

５’：ＣＴＣＧＡＧＡＴＴＴＣＣＣＣＧＡＡＡＴＣＴＡＧＡＴＴＴＣＣＣＣＧＡＡＡＴＧＡＴＴＴＣＣＣＣＧＡＡＡＴＧＡＴＴＴＣＣＣＣＧＡＡＡＴＡＴＣＴＧＣＣＡＴＣＴＣＡＡＴＴＡＧＴＣＡＧＣＡＡＣＣＡＴＡＧＴＣＣＣＧＣＣＣＣＴＡＡＣＴＣＣＧＣＣＣＡＴＣＣＣＧＣＣＣＣＴＡＡＣＴＣＣＧＣＣＣＡＧＴＴＣＣＧＣＣＣＡＴＴＣＴＣＣＧＣＣＣＣＡＴＧＧＣＴＧＡＣＴＡＡＴＴＴＴＴＴＴＴＡＴＴＴＡＴＧＣＡＧＡＧＧＣＣＧＡＧＧＣＣＧＣＣＴＣＧＧＣＣＴＣＴＧＡＧＣＴＡＴＴＣＣＡＧＡＡＧＴＡＧＴＧＡＧＧＡＧＧＣＴＴＴＴＴＴＴＧＧＡＧＧＣＣＴＡＧＧＣＴＴＴＴＧＣＡＡＡＡＡＧＣＴＴ：３’（配列番号５）（ここで５’末端のＣＴＣＧＡＧと３’末端のＡＡＧＣＴＴには、下線を付している）。

【０７９４】

このＧＡＳプロモーターエレメントがＳＶ４０プロモーターに結合されると、次に、ＧＡＳ：ＳＥＡＰ２レポーター構築物を操作する。ここで、レポーター分子は、分泌アルカリホスファターゼ、すなわち「ＳＥＡＰ」である。しかし、明らかに、この実施例または他の実施例のいずれにおいても、任意のレポーター分子が、ＳＥＡＰの代わりとなり得る。ＳＥＡＰの代わりに使用され得る周知のレポーター分子としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、または抗体により検出可能な任意のタンパク質が挙げられる。

【０７９５】

上記の配列により確認された合成ＧＡＳ－ＳＶ４０プロモーターエレメントを、ＧＡＳ－ＳＥＡＰベクターを作製するために、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＸｈｏＩを用いて、増幅したＧＡＳ：ＳＶ４０プロモーターエレメントでＳＶ４０プロモーターを有効に置換し、Ｃｌｏｎｔｅｃｈから入手したｐＳＥＡＰ－プロモーターベクターにサブクローニングする。しかし、このベクターはネオマイシン耐性遺伝子を含まず、それゆえ、哺乳動物の発現系には好ましくない。

【０７９６】

従って、ＧＡＳ－ＳＥＡＰレポーターを発現する哺乳動物の安定な細胞株を作製するために、ＧＡＳ－ＳＥＡＰカセットを、ＳａｌＩおよびＮｏｔＩを用いてＧＡＳ－ＳＥＡＰベクターから取り出し、そしてＧＡＳ－ＳＥＡＰ／Ｎｅｏベクターを作製するために、マルチクローニング部位におけるこれらの制限部位を用いて、ネオマイシン耐性遺伝子を含む骨格ベクター（例えば、ｐＧＦＰ－１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ））に挿入する。一旦、このベクターを哺乳動物細胞にトランスフェクトすれば、次いでこのベクターは、実施例１３～１４に記載されるようにＧＡＳ結合についてのレポーター分子として使用され得る。

【０７９７】

他の構築物を、上記の説明を使用し、そしてＧＡＳを異なるプロモーター配列で置換して、作製し得る。例えば、ＮＦＫ－ＢおよびＥＧＲプロモーター配列を含むレポーター分子の構築を、実施例１５および１６に記載する。しかし、多くの他のプロモーターを、これらの実施例に記載のプロトコルを使用して置換し得る。例えば、ＳＲＥ、ＩＬ－２、ＮＦＡＴ、またはオステオカルシンのプロモーターを単独で、または組み合わせて（例えば、ＧＡＳ／ＮＦ－ＫＢ／ＥＧＲ、ＧＡＳ／ＮＦ－ＫＢ、Ｉｌ－２／ＮＦＡＴ、またはＮＦ－ＫＢ／ＧＡＳ）置換し得る。同様に、他の細胞株（例えば、ＨＥＬＡ（上皮細胞）、Ｈ

ＵＶＥＣ（内皮細胞）、Ｒｅｈ（Ｂ細胞）、Ｓａｏｓ－２（骨芽細胞）、ＨＵＶＡＣ（大動脈細胞）、または心筋細胞）を、レポーター構築物の活性を試験するために使用し得る。

【０７９８】

（実施例１３：Ｔ細胞の活性についてのハイスループットスクリーニングアッセイ）

以下のプロトコルを使用して、因子を同定すること、および本発明のポリペプチドを含有する上清がＴ細胞を増殖および／または分化するか否かを決定することによって、Ｔ細胞活性を評価する。Ｔ細胞の活性を実施例１２で作製したＧＡＳ／ＳＥＡＰ／Ｎｅｏ構築物を用いて評価する。従って、ＳＥＡＰ活性を増加させる因子は、Ｊａｋｓ－ＳＴＡＴＳシグナル伝達経路を活性化する能力を示す。このアッセイに使用したＴ細胞は、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞（ＡＴＣＣ受託番号ＴＩＢ－１５２）であるが、Ｍｏｌｔ－３細胞（ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ－１５５２）およびＭｏｌｔ－４細胞（ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ－１５８２）細胞もまた使用し得る。

【０７９９】

Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞は、リンパ芽球性ＣＤ４＋　Ｔｈ１ヘルパー細胞である。安定な細胞株を作製するために、およそ２００万のＪｕｒｋａｔ細胞をＤＭＲＩＥ－Ｃ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、ＧＡＳ－ＳＥＡＰ／ｎｅｏベクターでトランスフェクトする（以下に記載のトランスフェクション手順）。トランスフェクトした細胞を、およそ２０，０００細胞／ウェルの密度で播種し、そして１ｍｇ／ｍｌのジェネティシン（ｇｅｎｔｉｃｉｎ）に対して耐性であるトランスフェクト体を選択する。耐性コロニーを増殖させ、次いで、漸増する濃度のインターフェロンγに対するそれらの応答について試験する。選択したクローンの用量応答を示す。

【０８００】

詳細には、以下のプロトコルにより、２００μｌの細胞を含む７５のウェルについて十分な細胞を得る。従って、複数の９６ウェルプレートについて十分な細胞を産生するために、これをスケールアップするか、または複数で実施するかのいずれかを行う。Ｊｕｒｋａｔ細胞をＲＰＭＩ＋１０％血清および１％のＰｅｎ－Ｓｔｒｅｐ中で維持する。Ｔ２５フラスコ中で２．５ｍｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）と１０μｇのプラスミドＤＮＡとを組み合わせる。５０μｌのＤＭＲＩＥ－Ｃを含む２．５ｍｌのＯＰＴＩ－ＭＥＭを添加し、そして、室温で１５～４５分間インキュベートする。

【０８０１】

インキュベート時間の間、細胞濃度をカウントし、必要な細胞数（トランスフェクションあたり10^7個）をスピンダウンし、そして最終濃度が10^7細胞／ｍｌとなるようにＯＰＴＩ－ＭＥＭ中で再懸濁する。次いで、ＯＰＴＩ－ＭＥＭ中の1×10^7個の細胞の１ｍｌをＴ２５フラスコに加え、そして３７℃で６時間インキュベートする。インキュベーションの後、１０ｍｌのＲＰＭＩ＋１５％の血清を添加する。

【０８０２】

Ｊｕｒｋａｔ：ＧＡＳ－ＳＥＡＰ安定レポーター株をＲＰＭＩ＋１０％血清、１ｍｇ／ｍｌジェネティシン、および１％のＰｅｎ－Ｓｔｒｅｐ中で維持する。これらの細胞は、本発明のポリペプチドを含む上清で処理されるか、および／または実施例１１に記載のプロトコールにより産生されるよう本発明のポリペプチドを誘導される。

【０８０３】

上清での処理日に細胞を洗浄すべきであり、そして１ｍｌあたり５００，０００個の細胞の密度となるように新鮮なＲＰＭＩ＋１０％血清中に再懸濁するべきである。必要な細胞の正確な数は、スクリーニングされる上清の数に依存する。１枚の９６ウェルプレートについて、およそ１０００万個の細胞（１０枚のプレートについて１億個の細胞）を必要とする。

【０８０４】

１２チャンネルのピペットを用いて９６ウェルのディッシュに細胞を分与するために、三角のリザーバーボートに細胞を移す。２００μｌの細胞を、１２チャンネルのピペット

を用いて、それぞれのウェルに移す（従って、ウェル当たり１００，０００個の細胞を添加する）。

【０８０５】

全てのプレートに播種した後、５０μｌの上清を、１２チャンネルピペットを用いて、上清を含む９６ウェルプレートから各ウェルに直接的に移す。さらに、外来性のインターフェロンγの用量（０．１、１．０、１０ｎｇ）を、ウェルＨ９、ウェルＨ１０、およびウェルＨ１１に添加し、アッセイについてのさらなる陽性コントロールとして使用する。

【０８０６】

上清で処理したＪｕｒｋａｔ細胞を含む９６ウェルディッシュをインキュベーターに４８時間置く（注記：この時間は４８～７２時間の間で変更可能である）。次いで、各ウェルから３５μｌのサンプルを１２チャンネルのピペットを用いて、不透明な９６ウェルプレートに移す。不透明なプレートを（セロファン（登録商標）のカバーを用いて）覆うべきであり、そして実施例１７に記載のＳＥＡＰアッセイを実施するまで、－２０℃で保存するべきである。残存する処理した細胞を含むプレートを４℃に置き、そして、所望するならば、特定のウェル上でのアッセイを繰り返すための物質の供給源として供する。

【０８０７】

陽性コントロールとして、１００ユニット／ｍｌのインターフェロンγを使用し得、これは、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化することが公知である。代表的には、３０倍を超える誘導が、陽性コントロールのウェルにおいて観察される。

【０８０８】

上述のプロトコルは、一過性および安定性の両方のトランスフェクト細胞の作製に用いられ得、このことは当業者に明らかである。

【０８０９】

（実施例１４：骨髄性活性を同定するハイスループットスクリーニングアッセイ）

以下のプロトコルを使用して、本発明のポリペプチドが骨髄性細胞を増殖および／または分化させるか否かを決定するととにより骨髄性の活性を評価する。骨髄性細胞の活性を実施例１２において産生されたＧＡＳ／ＳＥＡＰ／Ｎｅｏ構築物を用いて評価する。従って、ＳＥＡＰ活性を増加させる因子は、Ｊａｋｓ－ＳＴＡＴＳシグナル伝達経路を活性化する能力を示す。このアッセイに使用した骨髄性細胞としては、Ｕ９３７（前単球（ｐｒｅ－ｍｏｎｏｃｙｔｅ）細胞株である）が、ＴＦ－１、ＨＬ６０、またはＫＧ１が使用され得る。

【０８１０】

Ｕ９３７細胞を、実施例１２において産生されたＧＡＳ／ＳＥＡＰ／Ｎｅｏ構築物で、一過的にトランスフエクトするために、ＤＥＡＥ－Ｄｅｘｔｒａｎ法（Ｋｈａｒｂａｎｄａら、１９９４，Ｃｅｌｌ　Ｇｒｏｗｔｈ　＆　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ，５：２５９－２６５）を用いる。最初に、２×１０e^{7}個のＵ９３７細胞を回収し、そしてＰＢＳで洗浄する。Ｕ９３７細胞を、通常、１００単位／ｍｌのペニシリンおよび１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシンを補充した１０％熱非働化ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を含むＲＰＭＩ　１６４０培地中で増殖させる。

【０８１１】

次に、０．５ｍｇ／ｍｌ　ＤＥＡＥ－Ｄｅｘｔｒａｎ、８μｇのＧＡＳ－ＳＥＡＰ２プラスミドＤＮＡ、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＫＣｌ、３７５μＭ　Na_2HPO_4・$7H_2O$、１ｍＭ　$MgCl_2$、および６７５μＭ　$CaCl_2$を含む２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ　７．４）緩衝液１ｍｌ中に細胞を懸濁する。３７℃で４５分間インキュベートする。

【０８１２】

１０％　ＦＢＳを含むＲＰＭＩ　１６４０培地で細胞を洗浄し、次いで、１０ｍｌの完全培地に再懸濁し、そして３７℃で３６時間インキュベートする。

【０８１３】

ＧＡＳ－ＳＥＡＰ／Ｕ９３７安定細胞を、４００μｇ／ｍｌのＧ４１８中で細胞を増殖

させることにより得る。Ｇ４１８を含まない培地を使用して、慣用的に増殖させるが、１～２ヶ月毎に細胞を二継代の間、４００μｇ／ｍｌ　Ｇ４１８中で再増殖させるべきである。

【０８１４】

これらの細胞を1×10^{8}個の細胞（これは１０枚の９６ウェルプレートアッセイのために十分である）を回収することにより試験し、そしてＰＢＳで洗浄する。上記の２００ｍｌの増殖培地中に、5×10^{5}細胞／ｍｌの最終密度で細胞を懸濁する。９６ウェルプレートにおいてウェルあたり２００μｌの細胞（すなわち、1×10^{5}細胞／ウェル）をプレートする。

【０８１５】

実施例１１に記載されるプロトコルにより調製された上清の５０μｌを添加する。３７℃で４８～７２時間インキュベートする。陽性コントロールとして、１００単位／ｍｌのインターフェロンγを使用し得、これはＵ９３７細胞を活性化することが公知である。代表的には、３０倍を超える誘導が、陽性コントロールウェルにおいて観察される。実施例１７に記載のプロトコルに従って上清をＳＥＡＰアッセイする。

【０８１６】

（実施例１５：ニューロン活性を同定するハイスループットスクリーニングアッセイ）

細胞が分化および増殖を経る場合、一群の遺伝子が多くの異なるシグナル伝達経路を介して活性化される。これらの遺伝子の１つであるＥＧＲ１（初期増殖応答遺伝子１）は、活性化時に種々の組織および細胞型において誘導される。ＥＧＲ１のプロモーターはこのような誘導を担う。レポーター分子に結合したＥＧＲ１プロモーターを使用して、細胞の活性化を評価し得る。

【０８１７】

詳細には、以下のプロトコルをＰＣ１２細胞株におけるニューロン活性を評価するために使用する。ＰＣ１２細胞（ラット褐色細胞腫（ｐｈｅｎｏｃｈｒｏｍｏｃｙｔｏｍａ）細胞）は、多くのマイトジェン（例えば、ＴＰＡ（テトラデカノイルホルボールアセテート）、ＮＧＦ（神経成長因子）、およびＥＧＦ（上皮成長因子））での活性化により、増殖および／または分化することが公知である。この処理の間にＥＧＲ１遺伝子発現を活性化する。従って、ＳＥＡＰレポーターに結合したＥＧＲプロモーターを含む構築物でＰＣ１２細胞を安定にトランスフェクトすることにより、ＰＣ１２細胞の活性化を評価し得る。

【０８１８】

ＥＧＲ／ＳＥＡＰレポーター構築物を以下のプロトコルにより組み立て得る。ＥＧＲ－１プロモーター配列（－６３３～＋１）（Ｓａｋａｍｏｔｏ　Ｋら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　６：８６７－８７１（１９９１））を以下のプライマーを用いて、ヒトゲノムＤＮＡからＰＣＲ増幅し得る：

５’ＧＣＧＣＴＣＧＡＧＧＧＡＴＧＡＣＡＧＣＧＡＴＡＧＡＡＣＣＣＣＧＧ－３’（配列番号６）

５’ＧＣＧＡＡＧＣＴＴＣＧＣＧＡＣＴＣＣＣＣＧＧＡＴＣＣＧＣＣＴＣ－３’（配列番号７）。

【０８１９】

次いで、実施例１２において作製したＧＡＳ：ＳＥＡＰ／Ｎｅｏベクターを使用して、ＥＧＲ１増幅産物をこのベクターに挿入し得る。制限酵素ＸｈｏＩ／ＨｉｎｄＩＩＩを使用してＧＡＳ：ＳＥＡＰ／Ｎｅｏベクターを直鎖状化し、ＧＡＳ／ＳＶ４０スタッファー（ｓｔｕｆｆｅｒ）を取り除く。これらと同じ酵素を用いて、ＥＧＲ１増幅産物を制限処理する。ベクターとＥＧＲ１プロモーターとを連結する。

【０８２０】

細胞培養のための９６ウェルプレートを調製するために、コーティング溶液（コラーゲンＩ型（Ｕｐｓｔａｔｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．カタログ番号０８－１１５）を３０％エタノール（滅菌濾過）で１：３０希釈）を１つの１０ｃｍプレートあたり２ｍｌ、ま

たは９６ウェルプレートのウェルあたり５０ｍｌ添加し、そして２時間風乾させる。
【０８２１】
ＰＣ１２細胞を、予めコートした１０ｃｍ組織培養ディッシュ上で、ペニシリン（１００単位／ｍｌ）およびストレプトマイシン（１００μｇ／ｍｌ）を補充した、１０％ウマ血清（ＪＲＨ　ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥＳ、カタログ番号１２４４９－７８Ｐ）、５％熱非働化ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を含むＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｂｉｏ　Ｗｈｉｔｔａｋｅｒ）中で慣用的に増殖させる。１つから４つへの分割を３～４日毎に行う。細胞を掻き取ることによりプレートからはがし、そして１５回より多く上下にピペッティングして再懸濁する。
【０８２２】
ＥＧＲ／ＳＥＡＰ／Ｎｅｏ構築物を、実施例１１に記載のＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅプロトコルを使用して、ＰＣ１２にトランスフェクトする。ＥＧＲ－ＳＥＡＰ／ＰＣ１２安定細胞を、３００μｇ／ｍｌのＧ４１８中で細胞を増殖させることにより得る。Ｇ４１８を含まない培地を慣用的な増殖のために使用するが、１～２ヶ月毎に、細胞を２継代の間、３００μｇ／ｍｌのＧ４１８中で再増殖させるべきである。
【０８２３】
ニューロン活性をアッセイするために、およそ７０～８０％コンフルエントな細胞を有する１０ｃｍプレートを、古い培地を除去することによりスクリーニングする。ＰＢＳ（リン酸緩衝溶液）を用いて１回洗浄する。次いで、細胞を低血清培地（抗生物質とともに１％ウマ血清および０．５％　ＦＢＳを含むＲＰＭＩ－１６４０）中で一晩、細胞を飢餓（ｓｔａｒｖｅ）させる。
【０８２４】
翌朝、培地を除去し、そしてＰＢＳで細胞を洗浄する。プレートから細胞を掻き取り、細胞を２ｍｌの低血清培地中で懸濁する。細胞数をカウントし、そして低血清の培地をさらに添加し、5×10^{5}細胞／ｍｌの最終細胞密度に到達させる。
【０８２５】
２００μｌの細胞懸濁液を９６ウェルプレートの各ウェルに添加する（1×10^{5}細胞／ウェルに等しい）。実施例１１により産生された５０μｌの上清を、３７℃で４８～７２時間添加する。陽性コントロールとして、ＥＧＲを介してＰＣ１２細胞を活性化することが公知の成長因子（例えば、５０ｎｇ／μｌの神経成長因子（ＮＧＦ））を使用し得る。代表的には、５０倍を超えるＳＥＡＰ誘導が陽性コントロールウェルにおいて見られる。実施例１７に従って、上清をＳＥＡＰアッセイする。
【０８２６】
（実施例１６：Ｔ細胞の活性についてのハイスループットスクリーニングアッセイ）
ＮＦ－κＢ（核因子κＢ）は、広範な種々の薬剤（炎症性サイトカインであるＩＬ－１およびＴＮＦ、ＣＤ３０およびＣＤ４０、リンホトキシン－αおよびリンホトキシン－βを含む）により、ＬＰＳまたはトロンビンへの曝露により、ならびに特定のウイルス遺伝子産物の発現により活性化される転写因子である。転写因子として、ＮＦ－κＢは免疫細胞の活性化に関与する遺伝子の発現、アポトーシスの制御（ＮＦ－κＢは、アポトーシスから細胞を保護するために現われる）、Ｂ細胞およびＴ細胞の発生、抗ウイルス応答および抗菌応答、ならびに複数のストレス応答を調節する。
【０８２７】
刺激されない条件において、ＮＦ－κＢは、Ｉ－κＢ（インヒビターκＢ）を有する細胞質に保持される。しかし、刺激の際に、Ｉ－κＢはリン酸化され、そして分解され、ＮＦ－κＢの核シャトル（ｓｈｕｔｔｌｅ）を引き起こし、これにより標的遺伝子の転写を活性化する。ＮＦ－κＢにより活性化される標的遺伝子としては、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＣＡＭ－１およびＭＨＣクラス１が挙げられる。
【０８２８】
その中心的な役割および一定の範囲の刺激に応答する能力に起因して、ＮＦ－κＢプロモーターエレメントを利用するレポーター構築物を、実施例１１において産生された上清

をスクリーニングするために使用する。ＮＦ－κＢのアクチベーターまたはインヒビターは、疾患の処置に有用である。例えば、ＮＦ－κＢのインヒビターを、急性または慢性的なＮＦ－κＢの活性化に関連する疾患（例えば、慢性関節リウマチ）を処置するために使用し得る。

【０８２９】

ＮＦ－κＢプロモーターエレメントを含むベクターを構築するために、ＰＣＲに基づいたストラテジーを用いる。上流のプライマーは、ＮＦ－κＢ結合部位（ＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＣ）（配列番号８）の４つの直列のコピー、ＳＶ４０初期プロモーター配列の５’末端に対して相補的な１８ｂｐの配列を含み、そしてＸｈｏＩ部位に隣接する：

５’：ＧＣＧＧＣＣＴＣＧＡＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＣＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＡＴＣＣＴＧＣＣＡＴＣＴＣＡＡＴＴＡＧ：３’（配列番号９）。

【０８３０】

下流プライマーは、ＳＶ４０プロモーターの３’末端に対して相補的であり、そしてＨｉｎｄＩＩＩ部位に隣接する：

５’：ＧＣＧＧＣＡＡＧＣＴＴＴＴＴＧＣＡＡＡＧＣＣＴＡＧＧＣ：３’（配列番号４）。

【０８３１】

ＰＣＲ増幅を、Ｃｌｏｎｔｅｃｈから入手したｐＢ－ｇａｌ：プロモータープラスミドに存在するＳＶ４０プロモーターのテンプレートを使用して実施する。得られたＰＣＲフラグメントをＸｈｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、そしてＢＬＳＫ２－（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）にサブクローニングする。Ｔ７およびＴ３プライマーを用いるシークエンスにより、挿入物が以下の配列を含むことを確認する：

５’：ＣＴＣＧＡＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＣＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＡＴＣＴＧＣＣＡＴＣＴＣＡＡＴＴＡＧＴＣＡＧＣＡＡＣＣＡＴＡＧＴＣＣＣＧＣＣＣＣＴＡＡＣＴＣＣＧＣＣＣＡＴＣＣＣＧＣＣＣＣＴＡＡＣＴＣＣＧＣＣＣＡＧＴＴＣＣＧＣＣＣＣＡＴＴＣＴＣＣＧＣＣＣＣＡＴＧＧＣＴＧＡＣＴＡＡＴＴＴＴＴＴＴＡＴＴＴＡＴＧＣＡＧＡＧＧＣＣＧＡＧＧＣＣＧＣＣＴＣＧＧＧＣＣＴＣＴＧＡＧＣＴＡＴＴＣＣＡＧＡＡＧＴＡＧＴＧＡＧＧＡＧＧＣＴＴＴＴＴＴＧＧＡＧＧＣＣＴＡＧＧＣＴＴＴＴＧＣＡＡＡＡＡＧＣＴＴ：３’（配列番号１０）。

【０８３２】

次に、ＸｈｏＩおよびＨｉｎｄＩＩＩを使用して、ｐＳＥＡＰ２－プロモータープラスミド（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）に存在するＳＶ４０最小プロモーターエレメントをこのＮＦ－κＢ／ＳＶ４０フラグメントで置換する。しかし、このベクターはネオマイシン耐性遺伝子を含まず、そしてそれゆえ、哺乳動物の発現系には好ましくない。

【０８３３】

安定な哺乳動物細胞株を作製するために、ＮＦ－κＢ／ＳＶ４０／ＳＥＡＰカセットを制限酵素ＳａｌＩおよびＮｏｔＩを使用して上記のＮＦ－κＢ／ＳＥＡＰベクターから取り出し、そしてネオマイシン耐性を含むベクターに挿入する。詳細には、ＳａｌＩおよびＮｏｔＩでｐＧＦＰ－１を制限処理した後に、ＮＦ－κＢ／ＳＶ４０／ＳＥＡＰカセットをｐＧＦＰ－１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）に挿入し、ＧＦＰ遺伝子を置換した。

【０８３４】

一旦、ＮＦ－κＢ／ＳＶ４０／ＳＥＡＰ／Ｎｅｏベクターを作製した後は、実施例１３に記載のプロトコルに従って、安定なＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を作製し、そして維持する。同様に、これらの安定なＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を含む上清をアッセイするための方法はまた、実施例１３に記載される。陽性コントロールとして、外因性のＴＮＦα（０．１、１、１０ｎｇ）をウェルＨ９、Ｈ１０、およびＨ１１（代表的には、５～１０倍の活性化が観察されるウェル）に添加する。

【０８３５】

（実施例１７：ＳＥＡＰ活性についてのアッセイ）

実施例１３～１６に記載されるアッセイのためのレポーター分子として、ＳＥＡＰ活性を、以下の一般的な手順に従ってＴｒｏｐｉｘ　Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｌｉｇｈｔ　Ｋｉｔ（カタログ番号ＢＰ－４００）を用いてアッセイする。Ｔｒｏｐｉｘ　Ｐｈｏｓｐｈｏ－ｌｉｇｈｔ　Ｋｉｔは、以下で使用される希釈緩衝液、アッセイ緩衝液、および反応緩衝液を提供する。

【０８３６】

ディスペンサーに２．５×希釈緩衝液を満たし、そして１５μｌの２．５×希釈緩衝液を３５μｌの上清を含むオプティプレート（Ｏｐｔｉｐｌａｔｅ）に分与する。プラスチックシーラーでプレートをシールし、そして６５℃で３０分間インキュベートする。一様でない加温を避けるためにオプティプレートを離しておく。

【０８３７】

サンプルを室温まで１５分間冷却する。ディスペンサーを空にし、そしてアッセイ緩衝液を満たす。５０μｌのアッセイ緩衝液を添加し、そして室温で５分間インキュベートする。ディスペンサーを空にし、そして反応緩衝液を満たす（以下の表を参照のこと）。５０μｌの反応緩衝液を添加し、そして室温で２０分間インキュベートする。化学発光シグナルの強度は時間依存的であり、そしてルミノメーターで５つのプレートを読み取るために約１０分間を費やすので、１回毎に５つのプレートを処理し、１０分後に２つ目のセットを開始するべきである。

【０８３８】

ルミノメーターにおける相対的な光の単位（ｌｉｇｈｔ　ｕｎｉｔ）を読み取る。ブランクとしてＨ１２をセットし、そして結果を印字する。化学発光の増加は、レポーター活性を示す。

【０８３９】

【表１０】

反応緩衝液の処方：

プレート番号	反応緩衝液の希釈物(ml)	CSPD (ml)
10	60	3
11	65	3.25
12	70	3.5
13	75	3.75
14	80	4
15	85	4.25
16	90	4.5
17	95	4.75
18	100	5
19	105	5.25
20	110	5.5
21	115	5.75
22	120	6
23	125	6.25
24	130	6.5
25	135	6.75
26	140	7
27	145	7.25
28	150	7.5
29	155	7.75
30	160	8
31	165	8.25
32	170	8.5
33	175	8.75
34	180	9
35	185	9.25
36	190	9.5
37	195	9.75
38	200	10
39	205	10.25
40	210	10.5
41	215	10.75
42	220	11
43	225	11.25
44	230	11.5
45	235	11.75
46	240	12
47	245	12.25
48	250	12.5
49	255	12.75
50	260	13

（実施例１８：低分子の濃度および膜透過性における変化を同定するハイスループットスクリーニングアッセイ）

レセプターへのリガンドの結合は、カルシウム、カリウム、ナトリウムのような低分子およびｐＨの細胞内レベルを変化させ、ならびに膜電位を変化させることは公知である。これらの変化を特定細胞のレセプターに結合する上清の同定を行うアッセイで測定し得る。以下のプロトコルは、カルシウムについてのアッセイを記載するが、このプロトコルは、カリウム、ナトリウム、ｐＨ、膜電位、または蛍光プローブにより検出可能な任意の他の低分子における変化を検出するように容易に改変され得る。

【０８４０】

以下のアッセイは、蛍光測定画像化プレートリーダー（「ＦＬＩＰＲ」）を使用して低分子を結合する蛍光分子（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）における変化を測定する。明らかに、低分子を検出する任意の蛍光分子を、本明細書で用いるカルシウム蛍光分子、ｆｌｕｏ－４（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．；カタログ番号Ｆ－１４２０２）の代わりに使用し得る。

【０８４１】
接着細胞については、細胞を１０，０００～２０，０００細胞／ウェルで、底が透明なＣｏ－ｓｔａｒ黒色９６ウェルプレートに播種する。プレートをCO_2インキュベーター内で２０時間インキュベートする。接着細胞をＢｉｏｔｅｋ洗浄器内で２００μｌのＨＢＳＳ（Ｈａｎｋ’ｓ　Ｂａｌａｎｃｅｄ　Ｓａｌｔ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ）で2回洗浄し、最後の洗浄後、緩衝液１００μｌを残す。
【０８４２】
１ｍｇ／ｍｌ　ｆｌｕｏ－４のストック溶液を１０％プルロン酸（ｐｌｕｒｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）ＤＭＳＯで作製する。細胞にｆｌｕｏ－４を負荷するため、１２μｇ／ｍｌ　ｆｌｕｏ－４（５０μｌ）を各ウェルに添加する。このプレートをCO_2インキュベーター中、３７℃で６０分間インキュベートする。プレートをＢｉｏｔｅｋ洗浄器で、ＨＢＳＳにより４回洗浄し、緩衝液１００μｌを残す。
【０８４３】
非接着細胞については、細胞を培養培地からスピンダウンする。細胞を、５０ｍｌのコニカルチューブ内でＨＢＳＳを用いて２～５×10^6細胞／ｍｌに再懸濁する。細胞懸濁液１ｍｌに対して、１０％プルロン酸ＤＭＳＯ溶液を含んだｆｌｕｏ－４（１ｍｇ／ｍｌ）を４μｌを加える。次に、チューブを３７℃の水浴中に３０～６０分間置く。細胞をＨＢＳＳで2回洗浄し、１×10^6細胞／ｍｌに再懸濁し、そしてマイクロプレートに１００μｌ／ウェルずつ分配する。プレートを１０００ｒｐｍで５分間遠心分離する。次に、プレートをＤｅｎｌｅｙ　ＣｅｌｌＷａｓｈ中で２００μｌで１回洗浄した後、吸引工程により最終容量を１００μｌにする。
【０８４４】
非細胞ベースのアッセイについては、各ウェルは、ｆｌｕｏ－４のような蛍光分子を含有する。上清をウェルに添加し、そして蛍光変化を検出する。
【０８４５】
細胞内カルシウムの蛍光を測定するため、ＦＬＩＰＲを以下のパラメーターについて設定する：（１）システムゲインは、３００～８００ｍＷであり；（２）曝露時間は、０．４秒間であり；（３）カメラＦ／ストップは、Ｆ／２であり；（４）励起は４８８ｎｍであり；（５）蛍光は５３０ｎｍであり；そして（６）サンプル添加は５０μｌである。５３０ｎｍにおける蛍光の増加は、細胞内Ca^{++}濃度の増加を生じる、細胞外シグナリング事象を示す。
【０８４６】
（実施例１９：チロシンキナーゼ活性を同定するハイスループットスクリーニングアッセイ）
プロテインチロシンキナーゼ（ＰＴＫ）は、多様な群の膜貫通キナーゼおよび細胞質キナーゼを意味する。レセプタープロテインチロシンキナーゼ（ＲＰＴＫ）群内に、ＰＤＧＦ、ＦＧＦ、ＥＧＦ、ＮＧＦ、ＨＧＦおよびインスリンレセプターサブファミリーを含む、一定の範囲のマイトジェン（ｍｉｔｏｇｅｎｉｃ）および代謝性成長因子のレセプターがある。さらに、対応するリガンドが未知である大きなＲＰＴＫファミリーがある。ＲＰＴＫのリガンドは、主として分泌される低分子量タンパク質を含むが、膜結合型および細胞外マトリックスタンパク質も含む。
【０８４７】
リガンドによるＲＰＴＫの活性化は、リガンド媒介レセプター二量体化を含み、これはレセプターサブユニットのトランスリン酸化および細胞質チロシンキナーゼの活性化を生じる。細胞質チロシンキナーゼとしては、ｓｒｃファミリー（例えば、ｓｒｃ、ｙｅｓ、ｌｃｋ、ｌｙｎ、ｆｙｎ）のレセプター関連チロシンキナーゼ、ならびにＪａｋファミリーのような非レセプター結合型および細胞基質プロテインチロシンキナーゼが挙げられる。これらのメンバーは、サイトカインスーパーファミリー（例えば、インターロイキン、インターフェロン、ＧＭ－ＣＳＦおよびレプチン）のレセプターによって誘発されるシグナル伝達を媒介する。

【０８４８】
チロシンキナーゼ活性を刺激し得る公知の因子は広範であるため、チロシンキナーゼシグナル伝達経路を活性化し得るこれらの新規なヒト分泌タンパク質の同定は興味深い。従って、以下のプロトコルを設計して、チロシンキナーゼシグナル伝達経路を活性化し得る新規なヒト分泌タンパク質を同定する。
【０８４９】
標的細胞（例えば、初代ケラチノサイト）を約２５，０００細胞／ウェルの密度で、Ｎａｌｇｅ Ｎｕｎｃ（Ｎａｐｅｒｖｉｌｌｅ，ＩＬ）から購入した９６ウェルＬｏｐｒｏｄｙｎｅ Ｓｉｌｅｎｔ Ｓｃｒｅｅｎ Ｐｌａｔｅに播種する。プレートを１００％エタノールで３０分間、２回リンスして滅菌し、水でリンスした後、一晩乾燥させる。幾つかのプレートを、１００ｍｌの細胞培養グレードＩ型コラーゲン（５０ｍｇ／ｍｌ）、ゼラチン（２％）またはポリリジン（５０ｍｇ／ｍｌ）（これらは全て、Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から購入し得る）で、またはＢｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ（Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）から購入した１０％Ｍａｔｒｉｇｅｌ、あるいは仔ウシ血清で２時間コートし、ＰＢＳでリンスした後、４℃で保存する。増殖培地を含む５，０００細胞／ウェルを播種し、製造業者のＡｌａｍａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ，ＣＡ）が記載するように、ａｌａｍａｒＢｌｕｅを使用して４８時間後に細胞数を間接定量することにより、これらのプレート上の細胞増殖をアッセイする。Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ（Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）のＦａｌｃｏｎプレートカバー＃３０７１を使用し、Ｌｏｐｒｏｄｙｎｅ Ｓｉｌｅｎｔ Ｓｃｒｅｅｎ Ｐｌａｔｅを覆う。Ｆａｌｃｏｎ Ｍｉｃｒｏｔｅｓｔ ＩＩＩ細胞培養プレートもまた、いくつかの増殖実験において使用し得る。
【０８５０】
抽出物を調製するため、Ａ４３１細胞をＬｏｐｒｏｄｙｎｅプレートのナイロン膜上に播種し（２０，０００／２００ｍｌ／ウェル）、そして完全培地中で一晩培養する。細胞を無血清基本培地中で２４時間インキュベートして静止させる。ＥＧＦ（６０ｎｇ／ｍｌ）または実施例１１で生成した上清５０μｌで５～２０分間処理した後、培地を除去し、１００ｍｌの抽出緩衝液（２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．５、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、０．１％ＳＤＳ、２ｍＭ Na_3VO_4、２ｍＭ $Na_4P_2O_7$およびＢｏｅｈｅｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）から入手したプロテアーゼインヒビターの混合物（＃１８３６１７０））を各ウェルに添加し、そしてプレートを回転振盪器上、４℃で５分間振盪する。次に、プレートを真空トランスファーマニホールド（ｖａｃｕｕｍ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｍａｎｉｆｏｌｄ）に設置し、そしてハウスバキュームを使用して抽出物を各ウェルの底の０．４５ｍｍ膜で濾過する。抽出物をバキュームマニホールドの底の９６ウェル捕獲／アッセイプレートに集め、そして直ちに氷上に置く。遠心分離により明澄化した抽出物を得るため、界面活性剤で５分間可溶化した後、各ウェルの含有物を取り出し、４℃、１６，０００×ｇで１５分間遠心分離する。
【０８５１】
濾過抽出物をチロシンキナーゼ活性のレベルについて試験する。チロシンキナーゼ活性を検出する多数の方法が公知であるが、本明細書においては方法の一つを記載する。
【０８５２】
一般的に、特定の基質（ビオチン化ペプチド）上のチロシン残基をリン酸化する能力を決定することにより、上清のチロシンキナーゼ活性を評価する。この目的に使用し得るビオチン化ペプチドとしては、ＰＳＫ１（細胞分裂キナーゼｃｄｃ２－ｐ３４のアミノ酸６～２０に相当）およびＰＳＫ２（ガストリンのアミノ酸１～１７に相当）が挙げられる。両ペプチドは、一連のチロシンキナーゼの基質であり、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍから入手可能である。
【０８５３】
以下の成分を順に添加することにより、チロシンキナーゼ反応を設定する。まず、５μ

Mビオチン化ペプチド１０μｌを添加した後、順に、ＡＴＰ／Mg^{2+}（５mM　ＡＴＰ／５０mM　$MgCl_2$）１０μｌ、５×アッセイ緩衝液（４０mM塩酸イミダゾール、ｐＨ７．３、４０mM　β－グリセロリン酸塩、１mM　ＥＧＴＡ、１００mM　$MgCl_2$、５mM　$MnCl_2$、０．５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ）１０μｌ、バナジン酸ナトリウム（１mM）５μｌ、最後に水５μｌを加える。成分を穏やかに混合し、反応混合物を３０℃で２分間プレインキュベートする。コントロール酵素または濾過上清１０μｌを加えて反応を開始させる。

【０８５４】

次に、１２０mM　ＥＤＴＡ　１０μｌを添加することによりチロシンキナーゼアッセイ反応を停止し、反応物を氷上に置く。

【０８５５】

反応混合物の５０μｌのアリコートをマイクロタイタープレート（ＭＴＰ）モジュールに移し、３７℃で２０分間インキュベートすることにより、チロシンキナーゼ活性を測定する。これにより、ストレプトアビジン（ｓｔｒｅｐｔａｖａｄｉｎ）コーティング９６ウェルプレートをビオチン化ペプチドと会合させる。ＭＴＰモジュールを３００μｌ／ウェルのＰＢＳで４回洗浄する。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化した抗ホスホチロシン（ｐｈｏｓｐｏｔｙｒｏｓｉｎｅ）抗体（抗Ｐ－Ｔｙｒ－ＰＯＤ（０．５ｕ／ｍｌ）７５μｌを、各ウェルに添加した後、３７℃で１時間インキュベートする。ウェルを上記のように洗浄する。

【０８５６】

次に、ペルオキシダーゼ基質溶液（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）１００μｌを加え、室温で少なくとも5分間（最長３０分間）インキュベートする。ＥＬＩＳＡリーダーを使用して、４０５ｎｍにおけるサンプルの吸光度を測定する。結合したペルオキシダーゼ活性のレベルをＥＬＩＳＡリーダーを使用して定量し、これは、チロシンキナーゼ活性のレベルを反映する。

【０８５７】

（実施例２０：リン酸化活性を同定するハイスループットスクリーニングアッセイ）

実施例１９に記載のプロテインチロシンキナーゼ活性アッセイの可能性のある代替物および／または補完物（ｃｏｍｐｌｉｍｅｎｔ）として、主要な細胞内シグナル伝達中間体の活性化（リン酸化）を検出するアッセイもまた使用し得る。例えば、下記のように、１つの特定のアッセイは、Ｅｒｋ－１およびＥｒｋ－２キナーゼのチロシンリン酸化を検出し得る。しかし、Ｒａｆ、ＪＮＫ、ｐ３８　ＭＡＰ、Ｍａｐキナーゼキナーゼ（ＭＥＫ）、ＭＥＫキナーゼ、Ｓｒｃ、筋肉特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）、ＩＲＡＫ、ＴｅｃおよびＪａｎｕｓのような他の分子、ならびに他の任意のホスホセリン、ホスホチロシンまたはホスホスレオニン分子のリン酸化を、以下のアッセイにおいてこれらの分子でＥｒｋ－１またはＥｒｋ－２を置き換えることにより検出し得る。

【０８５８】

詳細には、９６ウェルＥＬＩＳＡプレートのウェルをプロテインＧ（１μｇ／ｍｌ）０．１ｍｌにより室温（ＲＴ）で２時間コーティングしてアッセイプレートを作製する。次に、プレートをＰＢＳでリンスし、３％ＢＳＡ／ＰＢＳによりＲＴで１時間ブロックする。次に、プロテインＧプレートをＥｒｋ－１およびＥｒｋ－２に対する２つの市販のモノクローナル抗体（１００ｎｇ／ウェル）（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）で処理（ＲＴで１時間）する。（他の分子を検出するために、上記の任意の分子を検出するモノクローナル抗体を交換することにより、この工程を容易に改変し得る）。ＰＢＳで３～５回リンスした後、使用時まで、プレートを４℃で保管する。

【０８５９】

Ａ４３１細胞を２０，０００／ウェルで９６ウェルＬｏｐｒｏｄｙｎｅフィルタープレートに播種し、増殖培地中で一晩培養する。次に、細胞を基本培地（ＤＭＥＭ）中で４８時間飢餓させた後、ＥＧＦ（６ｎｇ／ウェル）または実施例１１で得た上清５０μｌで５～２０分間処理する。次に、細胞を可溶化し、抽出物を濾過して直接アッセイプレート中

に入れる。

【０８６０】

抽出物とともにＲＴで１時間インキュベートした後、ウェルを再度リンスする。陽性コントロールとして、市販のＭＡＰキナーゼ調製物（１０ｎｇ／ウェル）をＡ４３１抽出物の代わりに使用する。次に、プレートを、Ｅｒｋ－１およびＥｒｋ－２キナーゼのリン酸化エピトープを特異的に認識する市販のポリクローナル（ウサギ）抗体（１μｇ／ｍｌ）で処理する（ＲＴで１時間）。この抗体を標準的な手順によりビオチン化する。次に、結合ポリクローナル抗体をユーロピウムストレプトアビジンおよびユーロピウム蛍光増強剤とともにＷａｌｌａｃ　ＤＥＬＦＩＡ装置内で連続的にインキュベートする（時間分解性蛍光）ことによって定量する。バックグラウンドを超える蛍光シグナルの増加は、リン酸化を示す。

【０８６１】

（実施例２１：ポリヌクレオチドに対応する遺伝子における変化の決定方法）

目的の表現型（例えば、疾患）を提示する家族全員または個々の患者から単離されるＲＮＡを単離する。次に、ｃＤＮＡをこれらのＲＮＡサンプルから当該分野で公知のプロトコルを使用して生成する（Ｓａｍｂｒｏｏｋを参照のこと）。次に、このｃＤＮＡを、配列番号Ｘにおける目的の領域を取り囲むプライマーを用いる、ＰＣＲのテンプレートとして使用する。示唆されるＰＣＲ条件は、Ｓｉｄｒａｎｓｋｙ，Ｄ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ２５２：７０６（１９９１）に記載の緩衝溶液を使用し、９５℃で３０秒間；５２～５８℃で６０～１２０秒間；および７０℃で６０～１２０秒間の３５サイクルからなる。

【０８６２】

次に、ＰＣＲ産物を、ＳｅｑｕｉＴｈｅｒｍ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用い、その５’末端にＴ４ポリヌクレオチドキナーゼを用いて標識したプライマーを使用してシークエンスする。選択したエキソンのイントロン－エキソン境界もまた決定し、ゲノムＰＣＲ産物を分析してその結果を確認する。次に、疑わしい変異を有するＰＣＲ産物のクローン化およびシークエンスを行い、直接シークエンスの結果を確認する。

【０８６３】

ＰＣＲ産物を、Ｈｏｌｔｏｎら，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９：１１５６（１９９１）に記載のようにＴテールベクターにクローン化し、Ｔ７ポリメラーゼ（Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ）を用いてシークエンスする。罹患個体を、非罹患個体には存在しない変異により同定する。

【０８６４】

ゲノム再配列もまた、ポリヌクレオチドに対応する遺伝子における変化を決定する方法として観察される。実施例２に従って単離したゲノムクローンを、ジゴキシゲニンデオキシ－ウリジン５’－三リン酸（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｈｅｉｍ）を用いてニックトランスレーションし、そしてＪｏｈｎｓｏｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．　３５：　７３－９９（１９９１）に記載のようにＦＩＳＨを行う。対応するゲノムの遺伝子座への特異的ハイブリダイゼーションのために、大過剰のヒトｃｏｔ－１　ＤＮＡを用いて標識プローブとのハイブリダイゼーションを行う。

【０８６５】

染色体を、４，６－ジアミノ－２－フェニリドールおよびヨウ化プロピジウムで対比染色し、ＣバンドおよびＲバンドの組み合わせを生成する。正確なマッピングのための整列画像を、三重バンドフィルターセット（Ｃｈｒｏｍａ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｂｒａｔｔｌｅｂｏｒｏ，ＶＴ）と冷却電荷結合素子カメラ（Ｐｈｏｔｏｍｅｔｒｉｃｓ，Ｔｕｃｓｏｎ，ＡＺ）および可変励起波長フィルター（Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ｇｅｎｅｔ．Ａｎａｌ．Ｔｅｃｈ．Ａｐｐｌ．，８：７５（１９９１））とを組み合わせて用いて得る。ＩＳｅｅ　Ｇｒａｐｈｉｃａｌ　Ｐｒｏｇｒａｍ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｏｖｉｓｉｏｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｄｕｒｈａｍ，ＮＣ）を使用して、画像収集、分析および染色体画分（ｆｒａｇｍｅｎｔａｌ）長測定を行う。プローブがハイブリダイズしたゲノム領域

の染色体変化を、挿入、欠失および転座として同定する。これらの変化を関連疾患の診断マーカーとして使用する。

【０８６６】

（実施例２２：生物学的サンプル中のポリペプチドの異常レベルを検出する方法）

本発明のポリペプチドは生物学的サンプル中で検出され得、そしてこのポリペプチドレベルの上昇または低下が検出されるなら、このポリペプチドは、特定表現型のマーカーである。検出方法は数多くあり、そしてそれ故、当業者は以下のアッセイをそれらの特定の必要性に適合するように改変し得ることが理解される。

【０８６７】

例えば、抗体サンドイッチＥＬＩＳＡを使用し、サンプル中（好ましくは、生物学的サンプル中）のポリペプチドを検出する。マイクロタイタープレートのウェルを、最終濃度０．２～１０μｇ／ｍｌの特異的抗体でコーティングする。この抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであって、実施例１０に記載の方法により産生される。ウェルへのこのポリペプチドの非特異的結合が減少するように、このウェルをブロックする。

【０８６８】

次に、コーティングしたウェルを、このポリペプチドを含有するサンプルと共にＲＴで２時間を超えてインキュベートする。好ましくは、サンプルの系列希釈を使用して結果を確認すべきである。次に、このプレートを脱イオン水または蒸留水で３回洗浄し、非結合ポリペプチドを除去する。

【０８６９】

次に、特異的抗体－アルカリホスファターゼ結合体５０μｌを２５～４００ｎｇの濃度で加え、室温で２時間インキュベートする。このプレートを再び脱イオン水または蒸留水で３回洗浄し、未結合の結合体を除去する。

【０８７０】

４－メチルウンベリフェリルリン酸（ＭＵＰ）またはｐ－ニトロフェニルリン酸（ＮＰＰ）基質溶液７５μｌを各ウェルに添加し、そして室温で１時間インキュベートする。この反応をマイクロタイタープレートリーダーにより測定する。コントロールサンプルの系列希釈を使用して標準曲線を作成し、そしてＸ軸（対数目盛）にポリペプチド濃度を、そしてＹ軸（一様目盛）に蛍光または吸光度をプロットする。標準曲線を用いてサンプル中のポリペプチド濃度を補間する。

【０８７１】

（実施例２３：処方）

本発明はまた、被験体に有効量の治療剤を投与することにより疾患または障害（例えば、本明細書中に開示される疾患または障害の任意の１つ以上のような）を処置および／または予防する方法を提供する。治療剤により、薬学的に受容可能なキャリア型（例えば、滅菌キャリア）と組み合わせた、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（フラグメントおよび改変体を含む）、そのアゴニストまたはアンタゴニスト、および／またはそれらに対する抗体が意味される。

【０８７２】

治療剤を、個々の患者の臨床状態（特に、治療剤単独処置の副作用）、送達部位、投与方法、投与計画および当業者に公知の他の因子を考慮に入れ、医療実施基準（ｇｏｏｄ　ｍｅｄｉｃａｌ　ｐｒａｃｔｉｃｅ）を遵守する方式で処方および投薬する。従って、本明細書において目的とする「有効量」は、このような考慮を行って決定される。

【０８７３】

一般的提案として、用量当り、非経口的に投与される治療剤の合計薬学的有効量は、患者体重の、約１μｇ／ｋｇ／日～１０ｍｇ／ｋｇ／日の範囲にあるが、上記のようにこれは治療的裁量に委ねられる。さらに好ましくは、このホルモンについて、この用量は、少なくとも０．０１ｍｇ／ｋｇ／日、最も好ましくはヒトに対して約０．０１ｍｇ／ｋｇ／日と約１ｍｇ／ｋｇ／日との間である。連続投与する場合、代表的には、治療剤を約１μ

ｇ／ｋｇ／時間～約５０μｇ／ｋｇ／時間の投薬速度で１日に１～４回の注射かまたは連続皮下注入（例えばミニポンプを用いる）のいずれかにより投与する。静脈内用バッグ溶液もまた使用し得る。変化を観察するために必要な処置期間および応答が生じる処置後の間隔は、所望の効果に応じて変化するようである。

【０８７４】

治療剤を、経口的、直腸内、非経口的、槽内（ｉｎｔｒａｃｉｓｔｅｍａｌｌｙ）、膣内、腹腔内、局所的（散剤、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど）、口内あるいは経口または鼻腔スプレーとして投与し得る。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の製剤補助剤をいう。本明細書で用いる場合、用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【０８７５】

本発明の治療剤はまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性治療剤の適切な例は、経口的、直腸内、非経口的、槽内、膣内、腹腔内、局所的（散剤、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど）、口内あるいは経口または鼻腔スプレーとして投与する。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の製剤補助剤をいう。本明細書で用いる場合、用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【０８７６】

本発明の治療剤はまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性治療剤の適切な例は、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの成形品の形態の半透過性ポリマーマトリックスのような適切なポリマー材料、適切な疎水性材料（例えば、受容可能な油中の乳濁液として）またはイオン交換樹脂、および貧可溶性誘導体（例えば、貧可溶性塩のような）を包含する。

【０８７７】

徐放性マトリックスとしては、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号、ＥＰ５８，４８１）、Ｌ－グルタミン酸およびγ－エチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー（Ｓｉｄｍａｎら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２２：５４７－５５６（１９８３））、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）（Ｌａｎｇｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．１５：１６７－２７７（１９８１）、およびＬａｎｇｅｒ，Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．１２：９８－１０５（１９８２））、エチレンビニルアセテート（Ｌａｎｇｅｒら、同書）またはポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸（ＥＰ１３３，９８８）が挙げられる。

【０８７８】

徐放性治療剤はまた、リポソームに封入された本発明の治療剤を包含する（一般には、Ｌａｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０）；Ｔｒｅａｔら，Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ，Ｌｏｐｅｚ－ＢｅｒｅｓｔｅｉｎおよびＦｉｄｌｅｒ（編），Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，３１７－３２７頁および３５３－３６５頁（１９８９）を参照のこと）。治療剤を含有するリポソームは、それ自体が公知である方法により調製される：ＤＥ３，２１８，１２１；Ｅｐｓｔｅｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）８２：３６８８－３６９２（１９８５）；Ｈｗａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）７７：４０３０－４０３４（１９８０）；ＥＰ５２，３２２；ＥＰ３６，６７６；ＥＰ８８，０４６；ＥＰ１４３，９４９；ＥＰ１４２，６４１；日本国特許出願第８３－１１８００８号；米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号；ならびにＥＰ第１０２，３２４号。通常、リポソームは、小さな（約２００～８００Å）ユニラメラ型であり、そこでは、脂質含有量は、約３０モル％コレステロールよりも多く、選択された割合が、最適な治療剤のために調整される。

【０８７９】
なおさらなる実施形態において、本発明の治療剤は、ポンプによって送達される（Ｌａｎｇｅｒ，前出；Ｓｅｆｔｏｎ，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１（１９８７）；Ｂｕｃｈｗａｌｄら，Ｓｕｒｇｅｒｙ ８８：５０７（１９８０）；Ｓａｕｄｅｋら，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４（１９８９）を参照のこと）。
【０８８０】
他の制御放出系は、Ｌａｎｇｅｒ（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０））による総説において議論される。
【０８８１】
非経口投与のために、１つの実施形態において、一般に、治療剤は、それを所望の程度の純度で、薬学的に受容可能なキャリア、すなわち用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、かつ処方物の他の成分と適合するものと、単位投薬量の注射可能な形態（溶液、懸濁液または乳濁液）で混合することにより処方される。例えば、この処方物は、好ましくは、酸化剤、および治療剤に対して有害であることが知られている他の化合物を含まない。
【０８８２】
一般に、治療剤を液体キャリアまたは微細分割固体キャリアあるいはその両方と均一および緊密に接触させて処方物を調製する。次に、必要であれば、生成物を所望の処方物に成形する。好ましくは、キャリアは、非経口的キャリア、より好ましくはレシピエントの血液と等張である溶液である。このようなキャリアビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液およびデキストロース溶液が挙げられる。不揮発性油およびオレイン酸エチルのような非水性ビヒクルもまた、リポソームと同様に本明細書において有用である。
【０８８３】
キャリアは、等張性および化学安定性を高める物質のような微量の添加剤を適切に含有する。このような物質は、用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、このような物質としては、リン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸および他の有機酸またはその塩類のような緩衝剤；アスコルビン酸のような抗酸化剤；低分子量（約１０残基より少ない）ポリペプチド（例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド）；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンのようなアミノ酸；セルロースまたはその誘導体、ブドウ糖、マンノースまたはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物；ＥＤＴＡのようなキレート剤；マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような対イオン；および／またはポリソルベート、ポロキサマーもしくはＰＥＧのような非イオン性界面活性剤が挙げられる。
【０８８４】
治療剤は、代表的には約０．１ｍｇ／ｍｌ～１００ｍｇ／ｍｌ、好ましくは１～１０ｍｇ／ｍｌの濃度で、約３～８のｐＨで、このようなビヒクル中に処方される。前記の特定の賦形剤、キャリアまたは安定化剤を使用することにより、ポリペプチド塩が形成されることが理解される。
【０８８５】
治療的投与に用いられる任意の医薬品は無菌状態であり得る。滅菌濾過膜（例えば０．２ミクロンメンブレン）で濾過することにより無菌状態は容易に達成される。一般に、治療剤は、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下用注射針で穿刺可能なストッパー付の静脈内用溶液バッグまたはバイアルに配置される。
【０８８６】
治療剤は、通常、単位用量または複数用量容器、例えば、密封アンプルまたはバイアルに、水溶液または再構成するための凍結乾燥処方物として貯蔵される。凍結乾燥処方物の

例として、１０ｍｌのバイアルに、滅菌濾過した１％（ｗ／ｖ）治療剤水溶液５ｍｌを充填し、そして得られる混合物を凍結乾燥する。凍結乾燥した治療剤を注射用静菌水を用いて再構成して注入溶液を調製する。

【０８８７】

本発明はまた、本発明の治療剤の１つ以上の成分を満たした一つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。さらに、治療剤を他の治療用化合物と組み合わせて使用し得る。

【０８８８】

本発明の治療剤は、単独で、またはアジュバントと組み合わせて投与され得る。本発明の治療剤とともに投与され得るアジュバントとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：ミョウバン、ミョウバン＋デオキシコール酸（ＩｍｍｕｎｏＡｇ）、ＭＴＰ－ＰＥ（Ｂｉｏｃｉｎｅ　Ｃｏｒｐ．）、ＱＳ２１（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．）、ＢＣＧ、およびＭＰＬ。特定の実施形態において、本発明の治療剤は、ミョウバンと組み合わせて投与される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、ＱＳ－２１と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得るさらなるアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：モノホスホリル脂質免疫調節剤、ＡｄｊｕＶａｘ　１００ａ、ＱＳ－２１、ＱＳ－１８、ＣＲＬ１００５、アルミニウム塩、ＭＦ－５９、およびＶｉｒｏｓｏｍａｌアジュバント技術。本発明の治療剤とともに投与され得るワクチンとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ＭＭＲ（麻疹、流行性耳下腺炎，風疹）、ポリオ（ｐｏｌｉｏ）、水痘、破傷風／ジフテリア、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、Ｂ型インフルエンザ、百日咳（ｗｈｏｏｐｉｎｇ　ｃｏｕｇｈ）、肺炎、インフルエンザ、ライム病、ロタウイルス、コレラ、黄熱病、日本脳炎、ポリオ（ｐｏｌｉｏｍｙｅｌｉｔｉｓ）、狂犬病、腸チフス、および百日咳（ｐｅｒｔｕｓｉｓ）に対する防御に指向するワクチン。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わされた薬剤が治療混合物としてともに投与される説明を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じての場合）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第１に、続いて第２に与えられる化合物または薬剤のうちの１つを別々に投与することをさらに含む。

【０８８９】

本発明の治療剤は、単独で、または他の治療的薬剤と組み合わせて投与され得る。本発明の治療剤とともに投与され得る治療的薬剤としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：ＴＮＦファミリーの他のメンバー、化学療法剤、抗生物質、ステロイド性および非ステロイド性の抗炎症剤、従来の免疫療法剤、サイトカインならびに／または増殖因子。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わされた薬剤が、治療混合物としてともに投与される説明を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じての場合）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第１に、続いて第２に与えられる化合物または薬剤のうちの１つを別々に投与することをさらに含む。

【０８９０】

１つの実施形態において、本発明の治療剤は、ＴＮＦファミリーのメンバーと組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得るＴＮＦ、ＴＮＦ関連、またはＴＮＦ様の分子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：可溶性形態のＴＮＦ－α、リンホトキシン－α、（ＬＴ－α、ＴＮＦ－βとしても公知）、ＬＴ－β（複合ヘテロトリマーＬＴ－α２－βにおいて見出された）、ＯＰＧＬ、ＦａｓＬ、ＣＤ２７Ｌ、ＣＤ３０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、４－１ＢＢＬ、ＤｃＲ３、ＯＸ４０Ｌ、ＴＮＦ－γ（国際公開番号ＷＯ９６／１４３２８）、ＡＩＭ－Ｉ（国際公開番号ＷＯ９７／３３８９９）、エン

ドカイン（ｅｎｄｏｋｉｎｅ）－α（国際公開番号ＷＯ９８／０７８８０）、ＴＲ６（国際公開番号ＷＯ９８／３０６９４）、ＯＰＧ、およびニュートロカイン（ｎｅｕｔｒｏｋｉｎｅ）－α（国際公開番号ＷＯ９８／１８９２１）、ＯＸ４０、および神経増殖因子（ＮＧＦ）、ならびに可溶性形態のＦａｓ、ＣＤ３０、ＣＤ２７、ＣＤ４０および４－ＩＢＢ、ＴＲ２（国際公開番号ＷＯ９６／３４０９５）、ＤＲ３（国際公開番号ＷＯ９７／３３９０４）、ＤＲ４（国際公開番号ＷＯ９８／３２８５６）、ＴＲ５（国際公開番号ＷＯ９８／３０６９３）、ＴＲ６（国際公開番号ＷＯ９８／３０６９４）、ＴＲ７（国際公開番号ＷＯ９８／４１６２９）、ＴＲＡＮＫ、ＴＲ９（国際公開番号ＷＯ９８／５６８９２）、ＴＲ１０（国際公開番号ＷＯ９８／５４２０２）、３１２Ｃ２（国際公開番号ＷＯ９８／０６８４２）、およびＴＲ１２、ならびに可溶性形態のＣＤ１５４、ＣＤ７０、およびＣＤ１５３。

【０８９１】

特定の実施形態において、本発明の治療剤は、抗レトロウイルス薬剤、ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、および／またはプロテアーゼインヒビターと組み合わせて投与される。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得るヌクレオシド逆転写酵素インヒビターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ＲＥＴＲＯＶＩＲ™（ジドブジン／ＡＺＴ）、ＶＩＤＥＸ™（ジダノシン／ｄｄＩ）、ＨＩＶＩＤ™（ザルシタビン／ｄｄＣ）、ＺＥＲＩＴ™（スタブジン／ｄ４Ｔ）、ＥＰＩＶＩＲ™（ラミブジン／３ＴＣ）、およびＣＯＭＢＩＶＩＲ™（ジドブジン／ラミブジン）。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ＶＩＲＡＭＵＮＥ™（ネビラピン）、ＲＥＳＣＲＩＰＴＯＲ™（デラビルジン）、およびＳＵＳＴＩＶＡ™（エファビレンズ）。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得るプロテアーゼインヒビターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ＣＲＩＸＩＶＡＮ™（インディナビル（ｉｎｄｉｎａｖｉｒ））、ＮＯＲＶＩＲ™（リトナビル（ｒｉｔｏｎａｖｉｒ））、ＩＮＶＩＲＡＳＥ™（サキナビル（ｓａｑｕｉｎａｖｉｒ））、およびＶＩＲＡＣＥＰＴ™（ネルフィナビル（ｎｅｌｆｉｎａｖｉｒ））。特定の実施形態において、抗レトロウイルス薬剤、ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、および／またはプロテアーゼインヒビターは、ＡＩＤＳを処置するため、および／またはＨＩＶ感染を予防もしくは処置するために、本発明の治療剤との任意の組み合わせで使用され得る。

【０８９２】

他の実施形態において、本発明の治療剤は、抗日和見感染症薬剤と組み合わせて投与され得る。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る抗日和見感染症薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ＴＲＩＭＥＴＨＯＰＲＩＭ－ＳＵＬＦＡＭＥＴＨＯＸＡＺＯＬＥ™、ＤＡＰＳＯＮＥ™、ＰＥＮＴＡＭＩＤＩＮＥ™、ＡＴＯＶＡＱＵＯＮＥ™、ＩＳＯＮＩＡＺＩＤ™、ＲＩＦＡＭＰＩＮ™、ＰＹＲＡＺＩＮＡＭＩＤＥ™、ＥＴＨＡＭＢＵＴＯＬ™、ＲＩＦＡＢＵＴＩＮ™、ＣＬＡＲＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ™、ＡＺＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ™、ＧＡＮＣＩＣＬＯＶＩＲ™、ＦＯＳＣＡＲＮＥＴ™、ＣＩＤＯＦＯＶＩＲ™、ＦＬＵＣＯＮＡＺＯＬＥ™、ＩＴＲＡＣＯＮＡＺＯＬＥ™、ＫＥＴＯＣＯＮＡＺＯＬＥ™、ＡＣＹＣＬＯＶＩＲ™、ＦＡＭＣＩＣＯＬＶＩＲ™、ＰＹＲＩＭＥＴＨＡＭＩＮＥ™、ＬＥＵＣＯＶＯＲＩＮ™、ＮＥＵＰＯＧＥＮ™（フィルグラスチム（ｆｉｌｇｒａｓｔｉｍ）／Ｇ－ＣＳＦ）、およびＬＥＵＫＩＮＥ™（サルグラモスチン（ｓａｒｇｒａｍｏｓｔｉｍ）／ＧＭ－ＣＳＦ）。特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ　ｃａｒｉｎｉｉ肺炎感染を予防的に処置または予防するために、ＴＲＩＭＥＴＨＯＰＲＩＭ－ＳＵＬＦＡＭＥＴＨＯＸＡＺＯＬＥ™、ＤＡＰＳＯＮＥ™、ＰＥＮＴＡＭＩＤＩＮＥ™、および／またはＡＴＯＶＡＱＵＯＮＥ™との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｖｉｕｍ複合感染を予防的に処置または予防するために、ＩＳＯＮＩＡＺＩＤ™、ＲＩＦＡＭＰＩＮ™、ＰＹＲＡＺＩＮＡＭＩＤＥ™、および／

またはＥＴＨＡＭＢＵＴＯＬ™との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ感染を予防的に処置または予防するために、ＲＩＦＡＢＵＴＩＮ™、ＣＬＡＲＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ™、および／またはＡＺＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ™との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見サイトメガロウイルス感染を予防的に処置または予防するために、ＧＡＮＣＩＣＬＯＶＩＲ™、ＦＯＳＣＡＲＮＥＴ™、および／またはＣＩＤＯＦＯＶＩＲ™との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見真菌感染を予防的に処置または予防するために、ＦＬＵＣＯＮＡＺＯＬＥ™、ＩＴＲＡＣＯＮＡＺＯＬＥ™、および／またはＫＥＴＯＣＯＮＡＺＯＬＥ™との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見単純ヘルペスウイルスＩ型および／またはＩＩ型感染を予防的に処置または予防するために、ＡＣＹＣＬＯＶＩＲ™および／またはＦＡＭＣＩＣＯＬＶＩＲ™との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ　ｇｏｎｄｉｉ感染を予防的に処置または予防するために、ＰＹＲＩＭＥＴＨＡＭＩＮＥ™および／またはＬＥＵＣＯＶＯＲＩＮ™との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見細菌感染を予防的に処置または予防するために、ＬＥＵＣＯＶＯＲＩＮ™および／またはＮＥＵＰＯＧＥＮ™との任意の組み合わせで使用される。

【０８９３】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、抗ウイルス薬剤との組み合わせで投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る抗ウイルス薬剤としては、アシクロビル、リバビリン、アマンタジン、およびレマンチジン（ｒｅｍａｎｔｉｄｉｎｅ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８９４】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、抗生物質とともに投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る抗生物質としては、アモキシシリン、β－ラクタマーゼ、アミノグリコシド、β－ラクタム（糖ペプチド）、β－ラクタマーゼ、クリンダマイシン、クロラムフェニコール、セファロスポリン、シプロフロキサシン、シプロフロキサシン、エリスロマイシン、フルオロキノロン、マクロライド、メトロニダゾール、ペニシリン、キノロン、リファンピン、ストレプトマイシン、スルホンアミド、テトラサイクリン、トリメトプリム、トリメトプリム－スルファメトキサゾール（ｓｕｌｆａｍｔｈｏｘａｚｏｌｅ）、およびバンコマイシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０８９５】

本発明の治療剤とともに投与され得る従来の非特異的免疫抑制剤としては、ステロイド、シクロスポリン、シクロスポリンアナログ、シクロホスファミドメチルプレドニゾン、プレドニゾン、アザチオプリン、ＦＫ－５０６、１５－デオキシスペルグアリン（１５－ｄｅｏｘｙｓｐｅｒｇｕａｌｉｎ）、およびＴ細胞応答の機能を抑制することによって作用する他の免疫抑制剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０８９６】

特定の実施形態において、本発明の治療剤は、免疫抑制剤と組み合わせて投与され得る。本発明の治療剤と共に投与され得る免疫抑制剤調製物は、ＯＲＴＨＯＣＬＯＮＥ™（ＯＫＴ３）、ＳＡＮＤＩＭＭＵＮＥ™／ＮＥＯＲＡＬ™／ＳＡＮＧＤＹＡ™（シクロスポリン）、ＰＲＯＧＲＡＦ™（タクロリムス）、ＣＥＬＬＣＥＰＴ™（ミクロフェノレート）、アザチオプリン、グリコチコステロイド、およびＲＡＰＡＭＵＮＥ™（シロリムス）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、免疫抑制剤は、器官または骨髄移植の拒絶を予防するために使用され得る。

【０８９７】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、単独または１以上の静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る静脈内免疫グロブリン調製物としては、ＧＡＭＭＡＲ™、ＩＶＥＥＧＡＭ™、ＳＡＮＤＯＧＬ

ＯＢＵＬＩＮ™、ＧＡＭＭＡＧＡＲＤ　Ｓ／Ｄ™およびＧＡＭＩＭＵＮＥ™が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の治療剤は、移植治療（例えば、骨髄移植）において静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。

【０８９８】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、単独または抗炎症剤と組合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る抗炎症剤としては、グルココルチコイドおよび非ステロイド抗炎症剤、アミノアリールカルボン酸誘導体、アリール酢酸誘導体、アリール酪酸誘導体、アリールカルボン酸、アリールプロピオン酸誘導体、ピラゾール、ピラゾロン、サリチル酸誘導体、チアジンカルボキサミド、ｅ－アセトアミドカプロン酸、Ｓ－アデノシルメチオニン、３－アミノ－４－ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン（ａｍｉｘｅｔｒｉｎｅ）、ベンダザック、ベンジドアミン、ブコローム、ジフェンピラミド、ジタゾール、エモルファゾン、グアイアズレン、ナブメトン、ニメスリド、オルゴテイン、オキサセプロール、パラニリン、ペリゾキサル、ピフオキシム、プロキアゾン、プロキサゾール、およびテニダップが挙げられるが、これらに限定されない。

【０８９９】

別の実施形態において、本発明の組成物は、化学療法剤と組合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る化学療法剤としては、抗生物質誘導体（例えば、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、およびダクチノマイシン）；抗エストロゲン（例えば、タモキシフェン）；抗代謝物（例えば、フルオロウラシル、５－ＦＵ、メトトレキサート、フロックスウリジン（ｆｌｏｘｕｒｉｄｉｎｅ）、インターフェロンα－２ｂ、グルタミン酸、プリカマイシン、メルカプトプリン、および６－チオグアニン）；細胞傷害剤（例えば、カルムスチン、ＢＣＮＵ、ロムスチン、ＣＣＮＵ、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、エストラムスチン、ヒドロキシウレア、プロカルバジン、マイトマイシン、ブスルファン、シス－プラチン、およびビンクリスチンスルフェート）；ホルモン（例えば、メドロキシプロゲステロン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エチニルエストラジオール、エストラジオール、メゲストロールアセテート、メチルテストステロン、ジエチルスチルベストールジホスフェート、クロロトリアニセン、およびテストラクトン）；ナイトロージェンマスタード誘導体（例えば、メファレン、クロランブシル、メクロレタミン（ナイトロージェンマスタード）およびチオテパ）；ステロイドおよび組合わせ（例えば、ベタメタゾンリン酸ナトリウム）；ならびにその他（例えば、ジカルバジン、アスパラギナーゼ、ミトタン、ビンクリスチンスルフェート、ビンブラスチンスルフェート、およびエトポシド）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０９００】

特定の実施形態において、本発明の治療剤は、ＣＨＯＰ（シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレジニゾン）と組み合わせて投与されるか、ＣＨＯＰの成分の任意の組み合わせで投与される。別の実施形態において、本発明の治療剤は、Ｒｉｔｕｘｉｍａｂと組み合わせて投与される。さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、ＲｉｔｕｘｍａｂおよびＣＨＯＰと共に、またはＲｉｔｕｘｍａｂおよびＣＨＯＰの成分の任意の組み合わせと共に投与される。

【０９０１】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、サイトカインと組合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得るサイトカインとしては、ＩＬ２、ＩＬ３、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ７、ＩＬ１０、ＩＬ１２、ＩＬ１３、ＩＬ１５、抗ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＩＦＮ－γおよびＴＮＦ－αが挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態において、本発明の治療剤は、任意のインターロイキン（ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－１９、ＩＬ－２０およびＩＬ－２１を含むが、これらに限定されない）と共に投与され得る。

【０９０２】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、新脈管形成タンパク質と組合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る新脈管形成タンパク質としては、欧州特許ＥＰ－３９９８１６に開示されるようなグリオーム誘導増殖因子（Ｇｉｌｉｏｍａ Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ）（ＧＤＧＦ）；欧州特許ＥＰ－６８２１１０に開示されるような血小板誘導増殖因子－Ａ（ＰＤＧＦ－Ａ）；欧州特許ＥＰ－２８２３１７に開示されるような血小板誘導増殖因子－Ｂ（ＰＤＧＦ－Ｂ）；国際公開番号ＷＯ９２／０６１９４号に開示されるような胎盤増殖因子（ＰＩＧＦ）；Ｈａｕｓｅｒら、Ｇｏｒｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ、４：２５９－２６８（１９９３）に開示されるような胎盤増殖因子－２（ＰＩＧＦ－２）；国際公開番号ＷＯ９０／１３６４９号に開示されるような血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）；欧州特許ＥＰ－５０６４７７に開示されるような血管内皮増殖因子－Ａ（ＶＥＧＦ－Ａ）；国際公開番号ＷＯ９６／３９５１５号に開示されるような血管内皮増殖因子－２（ＶＥＧＦ－２）；血管内皮増殖因子－Ｂ（ＶＥＧＦ－３）；国際公開番号ＷＯ９６／２６７３６号に開示されるような血管内皮増殖因子Ｂ－１８６（ＶＥＧＦ－Ｂ１８６）；国際公開番号ＷＯ９８／０２５４３号に開示されるような血管内皮増殖因子－Ｄ（ＶＥＧＦ－Ｄ）；国際公開番号ＷＯ９８／０７８３２号に開示されるような血管内皮増殖因子－Ｄ（ＶＥＧＦ－Ｄ）；およびドイツ国特許ＤＥ１９６３９６０１に開示されるような血管内皮増殖因子－Ｅ（ＶＥＧＦ－Ｅ）が挙げられるが、これらに限定されない。上記の参考文献は、本明細書で参考として援用される。

【０９０３】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、造血増殖因子と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得る造血増殖因子としては、ＬＥＵＫＩＮＥ™（ＳＡＲＧＲＡＭＯＳＴＩＭ™）およびＮＥＵＰＯＧＥＮ™（ＦＩＬＧＲＡＳＴＩＭ™）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０９０４】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、線維芽細胞増殖因子と組合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る線維芽細胞増殖因子としては、ＦＧＦ－１、ＦＧＦ－２、ＦＧＦ－３、ＦＧＦ－４、ＦＧＦ－５、ＦＧＦ－６、ＦＧＦ－７、ＦＧＦ－８、ＦＧＦ－９、ＦＧＦ－１０、ＦＧＦ－１１、ＦＧＦ－１２、ＦＧＦ－１３、ＦＧＦ－１４、およびＦＧＦ－１５が挙げられるが、これらに限定されない。

【０９０５】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、他の治療レジメまたは予防レジメ（例えば、放射線治療）と組合わせて投与される。

【０９０６】

（実施例２４：ポリペプチドのレベル低下を処置する方法）

本発明は、体内における本発明のポリペプチドのレベルを増大させる必要のある個体を処置するための方法に関し、その方法は、治療有効量の本発明のアゴニスト（本発明のポリペプチドを含む）を含む組成物をそのような個体に投与する工程を包含する。さらに、個体における分泌タンパク質の標準または正常発現レベルの低下により引き起こされる状態は、本発明のポリペプチドを、好ましくは分泌形態で投与することにより処置し得ることが理解される。従って、本発明はまた、ポリペプチドのレベルの増加が必要な個体の処置方法を提供する。この方法は、このような個体に、このような個体でポリペプチドの活性レベルを増加させる量のポリペプチドを含む治療剤を投与する工程を包含する。

【０９０７】

例えば、ポリペプチドのレベルが低下した患者は、ポリペプチドを、１日用量０．１～１００μｇ／ｋｇで６日続けて服用する。好ましくは、ポリペプチドは分泌形態である。投与および処方物に基づく投薬計画の正確な詳細は、実施例２３に提供されている。

【０９０８】

（実施例２５：ポリペプチドのレベル上昇を処置する方法）

本発明はまた、体内における本発明のポリペプチドのレベルを減少させる必要のある個体を処置するための方法に関し、その方法は、治療有効量の本発明のアンタゴニスト（本

発明のポリペプチドおよび抗体を含む）を含む組成物をそのような個体に投与する工程を包含する。

【０９０９】

１つの例において、アンチセンス技術を使用して本発明のポリペプチドの産生を阻害する。この技術は、ガンのような様々な病因に起因するポリペプチド、好ましくは分泌形態のポリペプチドのレベルを低下させる方法の１つの例である。例えば、ポリペプチドのレベルが異常に上昇したと診断された患者に、アンチセンスポリヌクレオチドを、０．５、１．０、１．５、２．０および３．０ｍｇ／ｋｇ／日で静脈内に２１日間投与する。この処置に対して十分な耐性があれば、７日間の休薬期間後に、この処置を繰り返す。アンチセンスポリヌクレオチドの処方は、実施例２３に提供されている。

【０９１０】

（実施例２６：遺伝子治療を使用する処置方法－エキソビボ）

遺伝子治療の１つの方法は、ポリペプチドを発現し得る線維芽細胞を患者に移植する方法である。一般に、線維芽細胞は、皮膚生検により被験者から得られる。得られた組織を組織培養培地中に配置し、小片に分割する。小塊の組織を組織培養フラスコの湿潤表面に置き、ほぼ１０片を各フラスコに置く。このフラスコを倒置し、しっかりと閉めた後、室温で一晩放置する。室温で２４時間後、フラスコを反転させ、組織塊をフラスコの底に固定させたままにし、そして新鮮培地（例えば、１０％ＦＢＳ、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するＨａｍのＦ１２培地）を添加する。次に、フラスコを３７℃で約１週間インキュベートする。

【０９１１】

この時点で、新鮮な培地を添加し、次いで数日ごとに取り換える。さらに二週間培養した後に、単層の線維芽細胞が出現する。この単層をトリプシン処理し、さらに大きなフラスコにスケールアップする。

【０９１２】

モロニーマウス肉腫ウイルスの長末端反復が隣接するｐＭＶ－７（Ｋｉｒｓｃｈｍｅｉｅｒ，Ｐ．Ｔ．ら、ＤＮＡ，７：２１９－２５（１９８８））をＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化した後、仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。線状ベクターをアガロースゲル上で分画し、そしてガラスビーズを使用して精製する。

【０９１３】

本発明のポリペプチドをコードするｃＤＮＡを、必要な場合、プライマーを用いそして適切な制限部位および開始／終止コドンを有する、実施例１に記載のそれぞれ５’末端配列および３’末端配列に対応するＰＣＲプライマーを使用して増幅し得る。好ましくは、この５’プライマーはＥｃｏＲＩ部位を含み、そしてこの３’プライマーはＨｉｎｄＩＩＩ部位を含む。等量の、モロニーマウス肉腫ウイルスの線状骨格および増幅したＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩフラグメントを、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼの存在下で一緒に加える。得られた混合物を、この２つのフラグメントを連結するのに適した条件下で維持する。次に、連結混合物を使用し、細菌ＨＢ１０１を形質転換する。次に、それを、カナマイシンを含む寒天上にプレーティングし、ベクターが正確に挿入された目的の遺伝子を有することを確認する。

【０９１４】

アンホトロピックｐＡ３１７またはＧＰ＋ａｍ１２パッケージング細胞を、１０％仔ウシ血清（ＣＳ）、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、組織培養でコンフルエントな密度まで増殖させる。次に、その目的の遺伝子を含むＭＳＶベクターを培地に加え、そしてパッケージング細胞をこのベクターで形質導入する。このとき、このパッケージング細胞は、その遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する（ここで、このパッケージング細胞をプロデューサー細胞という）。

【０９１５】

形質導入されたプロデューサー細胞に新鮮な培地を添加し、次いでこの培地を１０ｃｍプレートのコンフルエントなプロデューサー細胞から採取する。感染性ウイルス粒子を含

む使用済み培地を、ミリポアーフィルターを通して濾過し、はがれたプロデューサー細胞を除去した後、この培地を使用して、線維芽細胞を感染させる。線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから培地を除去し、そしてプロデューサー細胞からの培地で速やかに置き換える。この培地を除去し、そして新鮮な培地と置き換える。ウイルスの力価が高ければ、実質的にすべての線維芽細胞が感染され、選択は必要ではない。力価が非常に低ければ、ｎｅｏまたはｈｉｓのような選択マーカーを有するレトロウイルスベクターを使用することが必要である。一旦、線維芽細胞が効率的に感染したなら、その線維芽細胞を分析し、タンパク質が産生されているか否かを決定する。

【０９１６】

次に、操作された線維芽細胞を、単独で、またはサイトデックス３マイクロキャリアビーズ上でコンフルエントに増殖させた後のいずれかで、宿主に移植する。

【０９１７】

（実施例２７：本発明のポリヌクレオチドに対応する内因性遺伝子を使用する遺伝子治療）

本発明に従う遺伝子治療の別の方法は、本発明の内因性ポリヌクレオチド配列を、例えば、米国特許番号５，６４１，６７０（１９９７年６月２４日発行）；国際公開番号ＷＯ　９６／２９４１１（１９９６年９月２６日公開）；国際公開番号ＷＯ　９４／１２６５０（１９９４年８月４日公開）；Ｋｏｌｌｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８６：８９３２～８９３５（１９８９）；およびＺｉｊｌｓｔｒａら、Ｎａｔｕｒｅ，３４２：４３５～４３８（１９８９）に記載されるように、相同組換えを介してプロモーターに作動可能に結合する工程を包含する。この方法は、その標的細胞中に存在するが、その細胞中では発現されないかまたは所望されるよりも低いレベルで発現される、遺伝子の活性化を包含する。

【０９１８】

プロモーターおよび標的化配列を含むポリヌクレオチド構築物を作製する。この標的配列は、プロモーターに隣接する、内因性ポリヌクレオチド配列の５’非コード配列に相同である。この標的化配列は、このポリヌクレオチド配列の５’末端に十分に近く、その結果、このプロモーターは、相同組換えの際にこの内因性配列に作動可能に連結される。このプロモーターおよび標的化配列を、ＰＣＲを使用して増幅し得る。好ましくは、この増幅したプロモーターは、５’末端および３’末端上に異なる制限酵素部位を含む。好ましくは、第１の標的化配列の３’末端は、増幅したプロモーターの５’末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第２の標的化配列の５’末端は、増幅したプロモーターの３’末端と同じ制限部位を含む。

【０９１９】

この増幅したプロモーターおよび増幅した標的化配列を、適切な制限酵素で消化し、続いてウシ腸ホスファターゼで処理する。消化したプロモーターおよび消化した標的化配列を、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼの存在下でともに加える。生じた混合物を、これら２つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。この構築物をアガロースゲル上でサイズ分画し、次いでフェノール抽出およびエタノール沈殿により精製する。

【０９２０】

この実施例において、このポリヌクレオチド構築物を、エレクトロポレーションを介して裸のポリヌクレオチドとして投与する。しかし、このポリヌクレオチド構築物はまた、トランスフェクション促進剤（例えば、リポソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、沈殿剤など）とともに投与され得る。送達のこのような方法は、当該分野で公知である。

【０９２１】

一旦、細胞をトランスフェクトすると、相同組換えが生じて、このプロモーターがこの内因性ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結される。これは、この細胞中におけるこのポリヌクレオチドに対応するポリヌクレオチドの発現を生じる。発現は、免疫学的染色または当該分野で公知の他の任意の方法により、検出され得る。

【０９２２】

線維芽細胞を、皮膚生検により被験者から得る。得られた組織を、ＤＭＥＭ＋１０％ウシ胎仔血清中に配置する。対数増殖期または定常期初期の線維芽細胞を、トリプシン処理し、そしてプラスチックの表面から栄養培地でリンスする。細胞懸濁液のアリコートを、計数のために取り出し、そして残りの細胞を遠心分離に供する。上清を吸引し、そしてペレットを５ｍｌのエレクトロポレーション緩衝液（２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．３、１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＫＣｌ、０．７ｍＭ　Na_2HPO_4、６ｍＭデキストロース）に再懸濁する。この細胞を再遠心分離し、上清を吸引し、そして細胞をアセチル化ウシ血清アルブミン１ｍｇ／ｍｌを含むエレクトロポレーション緩衝液に再懸濁する。この最終細胞懸濁物は、約３×１０^{6}細胞／ｍｌを含む。エレクトロポレーションを、再懸濁直後に実施すべきである。

【０９２３】

プラスミドＤＮＡを、標準的技術に従って調製する。例えば、本発明のポリヌクレオチドに対応する遺伝子座に標的化するためのプラスミドを構築するために、プラスミドｐＵＣ１８（ＭＢＩ　Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ、Ａｍｈｅｒｓｔ、ＮＹ）をＨｉｎｄＩＩＩで消化する。ＣＭＶプロモーターを、５’末端にＸｂａＩ部位および３’末端にＢａｍＨＩ部位を備えてＰＣＲにより増幅する。２つの非コード配列をＰＣＲを介して増幅する：一方の非コード配列（フラグメント１）を、５’末端にＨｉｎｄＩＩＩ部位および３’末端にＸｂａＩ部位を備えて増幅する；他方の非コード配列（フラグメント２）を、５’末端にＢａｍＨＩ部位および３’末端にＨｉｎｄＩＩＩ部位を備えて増幅する。このＣＭＶプロモーターおよびこれらのフラグメント（１および２）を、適切な酵素（ＣＭＶプロモーター－ＸｂａＩおよびＢａｍＨＩ；フラグメント１－ＸｂａＩ；フラグメント２－ＢａｍＨＩ）で消化し、そしてともに連結する。生じた連結生成物をＨｉｎｄＩＩＩで消化し、そしてＨｉｎｄＩＩＩで消化したｐＵＣ１８プラスミドと連結する。

【０９２４】

プラスミドＤＮＡを、０．４ｃｍの電極ギャップを備える滅菌キュベット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に添加する。最終ＤＮＡ濃度は、一般的に、少なくとも１２０μｇ／ｍｌである。次いで、この細胞懸濁液の０．５ｍｌ（約１．５×１０^{6}細胞を含む）をこのキュベットに添加し、そしてこの細胞懸濁液およびＤＮＡ溶液を、穏やかに混合する。エレクトロポレーションを、Ｇｅｎｅ－Ｐｕｌｓｅｒ装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて実施する。キャパシタンスおよび電圧を、それぞれ、９６０μＦおよび２５０～３００Ｖに設定する。電圧が増加すると、細胞の生存が減少するが、導入されたＤＮＡをそのゲノム中に安定に組込む生存細胞の割合が劇的に増加する。これらのパラメーターを与えると、パルス時間約１４～２０ｍＳｅｃが観察されるはずである。

【０９２５】

エレクトロポレーションした細胞を、室温で約５分間維持し、次いで、このキュベットの中身を、滅菌した移動ピペットを用いて穏やかに取り出す。この細胞を、１０ｃｍのディッシュ中の、予め温めた栄養培地（１５％ウシ血清を含むＤＭＥＭ）１０ｍｌに直接加え、そして３７℃でインキュベートする。翌日、この培地を吸引し、そして１０ｍｌの新鮮な培地で置換し、そしてさらに１６～２４時間インキュベートする。

【０９２６】

次いで、操作された線維芽細胞を、宿主中に、単独か、またはサイトデックス（ｃｙｔｏｄｅｘ）３マイクロキャリア（ｍｉｃｒｏｃａｒｒｉｅｒ）ビーズ上でコンフルエントになるまで増殖させた後かのいずれかで、注入する。ここで、この線維芽細胞は、タンパク質産物を生成する。次いで、この線維芽細胞を、上記のような患者に導入し得る。

【０９２７】

（実施例２８：遺伝子治療を使用する処置方法－インビボ）

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置するためにインビボ遺伝子治療方法を使用することである。この遺伝子治療法は、ポリペプチドの発現を増大または減少させるための、動物への裸の核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ、およびアンチセンスＤＮＡまたはＲＮＡ）配列の導入に関する。本発明のポリヌクレオチドは、プロモーター、または標的組織

によるそのポリペプチドの発現に必要な任意の他の遺伝子エレメントに、作動可能に連結され得る。このような遺伝子治療および送達の技術および方法は、当該分野で公知であり、例えば、ＷＯ９０／１１０９２、ＷＯ９８／１１７７９；米国特許第５６９３６２２号、同第５７０５１５１号、同第５５８０８５９号；Ｔａｂａｔａら、Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．３５（３）：４７０－４７９（１９９７）；Ｃｈａｏら、Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｓ．３５（６）：５１７－５２２（１９９７）；Ｗｏｌｆｆ、Ｎｅｕｒｏｍｕｓｃｕｌ．Ｄｉｓｏｒｄ．７（５）：３１４－３１８（１９９７）、Ｓｃｈｗａｒｔｚら、Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．３（５）：４０５－４１１（１９９６）；Ｔｓｕｒｕｍｉら、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ　９４（１２）：３２８１－３２９０（１９９６）（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

【０９２８】

ポリヌクレオチド構築物は、注入可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法（例えば、組織（心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸など）の間隙空間への注入）によって送達され得る。このポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリア中で送達され得る。

【０９２９】

用語「裸の」ポリヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡは、細胞への侵入を補助、促進、または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、または沈澱剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、本発明のポリヌクレオチドはまた、当業者に周知の方法によって調製され得るリポソーム処方物（例えば、Ｆｅｌｇｎｅｒ　Ｐ．Ｌ．ら（１９９５）Ａｎｎ．ＮＹ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７７２：１２６－１３９およびＡｂｄａｌｌａｈ　Ｂ．ら（１９９５）Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ　８５（１）：１－７で教示されたもの）中で送達され得る。

【０９３０】

この遺伝子治療方法において使用されるポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列も含まない構築物である。当業者に公知の任意の強力なプロモーターが、ＤＮＡの発現を駆動するために用いられ得る。他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する１つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製ＤＮＡ配列が細胞に導入されて、６ヶ月までの間の期間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【０９３１】

このポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する）の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、細胞間液、ムコ多糖基質（器官組織の細網線維、血管または腔（ｃｈａｍｂｅｒ）の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維に間にある）、あるいは結合組織鞘性筋肉細胞内または骨の裂孔中の同じ基質を包含する。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下に考察する理由のために好ましい。それらは、これらの細胞を含む組織への注入によって、好都合に送達され得る。それらは、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞）において達成され得る。インビボで、筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現するそれらの能力において、特に適格である。

【０９３２】

裸のポリヌクレオチド注入のために、ＤＮＡまたはＲＮＡの有効投薬量は、約０．０５ｇ／ｋｇ体重から約５０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約０．００５ｍｇ／ｋｇから約２０ｍｇ／ｋｇであり、そしてより好ましくは、約０．０５ｍｇ／ｋｇから約５ｍｇ／ｋｇである。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は

、注入の組織部位に従って変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注入経路によってである。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に肺または気管支組織、咽喉、または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸のポリヌクレオチド構築物が、血管形成術の間に、この手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達され得る。

【０９３３】

インビボでの筋肉における注入ポリヌクレオチドの用量応答効果を、以下のようにして決定する。本発明のポリペプチドをコードするｍＲＮＡの生成のための適切な鋳型ＤＮＡを、標準的な組換えＤＮＡ方法論に従って調製する。鋳型ＤＮＡ（これは環状または線状のいずれかであり得る）を裸のＤＮＡとして使用するか、またはリポソームと複合体化するかのいずれかである。次いで、マウスの四頭筋に、種々の量の鋳型ＤＮＡを注入する。

【０９３４】

５～６週齢の雌性および雄性のＢａｌｂ／Ｃマウスに、０．３ｍｌの２．５％Ａｖｅｒｔｉｎを腹腔内注射することにより麻酔する。１．５ｃｍの切開を大腿前部で行い、そして四頭筋を直接可視化する。鋳型ＤＮＡを、０．１ｍｌのキャリアに入れて、１ｃｃ注射器で２７ゲージ針を通して１分間にわたって、筋肉の遠位挿入部位から約０．５ｃｍのところで膝に、約０．２ｃｍの深さで注入する。縫合を、将来の位置決定のために注入部位の上で行い、そしてその皮膚をステンレス鋼クリップで閉じる。

【０９３５】

適切なインキュベーション時間（例えば、７日）後、筋肉抽出物を、四頭全体を切り出すことによって調製する。個々の四頭筋の５枚毎の１５μｍ切片を、タンパク質発現について組織化学的に染色する。タンパク質発現についてのタイムコースを、異なるマウスからの四頭を異なる時間で採取すること以外は、同様な様式で行い得る。注入後の筋肉中のＤＮＡの持続性を、注入したマウスおよびコントロールマウスからの全細胞性ＤＮＡおよびＨＩＲＴ上清を調製した後、サザンブロット分析によって決定し得る。マウスにおける上記実験の結果を、裸のＤＮＡを用いて、ヒトおよび他の動物において適切な投薬量および他の処置パラメーターを外挿するために使用し得る。

【０９３６】

（実施例２９：トランスジェニック動物）

本発明のポリペプチドはまた、トランスジェニック動物において発現され得る。マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシおよびヒト以外の霊長類（例えば、ヒヒ、サルおよびチンパンジー）を含むがこれらに限定されない任意の種の動物は、トランスジェニック動物を作製するために用いられ得る。特定の実施形態において、本明細書に記載されるかまたはさもなければ当該分野で公知の技術が、遺伝子治療プロトコルの一部として、ヒトにおける本発明のポリペプチドの発現のために用いられる。

【０９３７】

当該分野で公知の任意の技術を、導入遺伝子（すなわち、本発明のポリヌクレオチド）の動物への導入に用いて、トランスジェニック動物の創始系統（ｆｏｕｎｄｅｒ　ｌｉｎｅ）を生成し得る。このような技術は、前核マイクロインジェクション（Ｐａｔｅｒｓｏｎら、Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４０：６９１－６９８（１９９４）；Ｃａｒｖｅｒら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）１１：１２６３－１２７０（１９９３）；Ｗｒｉｇｈｔら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）９：８３０－８３４（１９９１）；およびＨｏｐｐｅら、米国特許第４，８７３，１９１号（１９８９））；生殖細胞系へのレトロウイルス媒介遺伝子移入（Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｐｕｔｔｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２：６１４８－６１５２（１９８５））、胚盤胞または胚；胚性幹細胞における遺伝子標的化（Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、Ｃｅｌｌ　５６：３１３－３２１（１９８９））；細胞または胚のエレクトロポレーション

（Ｌｏ、１９８３、Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：１８０３－１８１４（１９８３））；遺伝子銃を用いた本発明のポリヌクレオチドの導入（例えば、Ｕｌｍｅｒら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５９：１７４５（１９９３）を参照のこと）；胚性多能性（ｐｌｅｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）幹細胞への核酸構築物の導入および胚盤胞へのこの幹細胞の移入；ならびに精子媒介遺伝子移入（Ｌａｖｉｔｒａｎｏら、Ｃｅｌｌ　５７：７１７－７２３（１９８９））；などを含むがこれらに限定されない。このような技術の総説については、本明細書中にその全体が参考として援用される、Ｇｏｒｄｏｎ、「Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ　Ａｎｉｍａｌｓ」、Ｉｎｔｌ．Ｒｅｖ．Ｃｙｔｏｌ．１１５：１７１－２２９（１９８９）を参照のこと。

【０９３８】

当該分野で公知の任意の技術を用いて、本発明のポリヌクレオチドを含むトランスジェニッククローンを生成し得る（例えば、培養された、静止状態に誘導された胚細胞、胎児細胞または成体の細胞由来の除核した卵母細胞の核への核移入（Ｃａｍｐｅｌｌら、Ｎａｔｕｒｅ　３８０：６４－６６（１９９６）；Ｗｉｌｍｕｔら、Ｎａｔｕｒｅ　３８５：８１０－８１３（１９９７））。

【０９３９】

本発明は、その全ての細胞に導入遺伝子を有するトランスジェニック動物、ならびにいくつかの細胞（しかしその全ての細胞ではない）に導入遺伝子を有する動物（すなわち、モザイク動物またはキメラ）を提供する。導入遺伝子は、１つの導入遺伝子としてまたはコンカテマー（例えば、頭－頭タンデム型または頭－尾タンデム型）のような複数のコピーとして組み込まれ得る。この導入遺伝子はまた、例えば、Ｌａｓｋｏらの教示（Ｌａｓｋｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：６２３２－６２３６（１９９２））に従って特定の細胞型に選択的に導入され得、そして活性化され得る。このような細胞型特異的活性化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そしてそれらは当業者に明らかである。ポリヌクレオチド導入遺伝子が、内在性遺伝子の染色体部位に組み込まれることが所望される場合、遺伝子の標的化が好ましい。手短に言えば、このような技術が利用される場合、内在性遺伝子に対して相同ないくつかのヌクレオチド配列を含むベクターが、染色体配列との相同な組換えを介して内在性遺伝子のヌクレオチド配列に組み込まれ、そのヌクレオチド配列の機能を破壊することを目的として設計される。導入遺伝子はまた、特定の細胞型に選択的に導入され得、従って、例えば、Ｃｒｅら（Ｃｒｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６５：１０３－１０６（１９９４））の教示に従って、導入された細胞型においてのみ内在性遺伝子が不活化される。そのような細胞型特異的不活化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そしてそれらは当業者に明らかである。

【０９４０】

一旦トランスジェニック動物が作製されると、その組換え遺伝子の発現は、標準的な技術を利用してアッセイされ得る。最初のスクリーニングは、サザンブロット分析またはＰＣＲ技術によって達成されて、導入遺伝子の組み込みが起きたことを動物組織の分析により確認し得る。トランスジェニック動物の組織における導入遺伝子のｍＲＮＡ発現レベルはまた、動物から得た組織サンプルのノーザンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析および逆転写酵素ＰＣＲ（ｒｔ－ＰＣＲ）を含むがこれらに限定されない技術を用いて評価され得る。トランスジェニック遺伝子発現組織のサンプルはまた、導入遺伝子産物に特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的または免疫組織化学的に評価され得る。

【０９４１】

一旦、創始動物が生成されると、それらは、交配され、同系交配され、異系交配されるかまたは交雑されて、特定の動物のコロニーを生成し得る。そのような交配戦略の例は、以下を含むがそれらに限定されない：別の系統を樹立するための１つより多くの組み込み部位を有する創始動物の異系交配；各導入遺伝子の相加的発現効果によって、より高いレベルで導入遺伝子を発現する複合トランスジェニックを生成するための別々の系統の同系

交配；発現の増強およびＤＮＡ分析による動物のスクリーニングの必要性の排除の両方のための、所定の組み込み部位に対してホモ接合性の動物を生成するヘテロ接合性トランスジェニック動物の交雑；複合ヘテロ接合性またはホモ接合性系統を生成するための別々のホモ接合系統の交雑；ならびに目的の実験モデルに適切な異なるバックグラウンド上に導入遺伝子を配置するための交配。

【０９４２】

本発明のトランスジェニック動物は、本発明のポリペプチドの生物学的機能の詳述、異常な発現に関連する状態および／または障害の研究、ならびにこのような状態および／または障害の改善に有効な化合物についてのスクリーニングに有用な動物モデル系を含むがこれらに限定されない用途を有する。

【０９４３】

（実施例３０：ノックアウト動物）

内因性遺伝子発現もまた、標的化された相同組換えを使用して遺伝子および／またはそのプロモーターを不活性化あるいは「ノックアウトする」ことによって減少し得る（例えば、Ｓｍｉｔｈｉｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ　３１７：２３０－２３４（１９８５）；ＴｈｏｍａｓおよびＣａｐｅｃｃｈｉ、Ｃｅｌｌ　５１：５０３－５１２（１９８７）；Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、Ｃｅｌｌ　５：３１３－３２１（１９８９）を参照のこと；これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される）。例えば、内因性ポリヌクレオチド配列（この遺伝子のコード領域または調節領域のいずれか）と相同性のＤＮＡに隣接される、本発明の改変体、非機能的なポリヌクレオチド（または完全に関連のないＤＮＡ配列）を、選択マーカーおよび／またはネガティブ選択マーカーを用いてまたは用いずに使用し、インビボで本発明のポリペプチドを発現する細胞をトランスフェクトし得る。別の実施形態において、当該分野で公知の技術を、目的の遺伝子を含むが、発現しない細胞中でノックアウトを作製するために使用する。標的化された相同組換えを介した、このＤＮＡ構築物の挿入は、標的化された遺伝子の不活性化を生じる。このようなアプローチは、胚性幹細胞に対する改変が不活性な標的化された遺伝子を有する動物の子孫を作製するために使用され得る研究および農業分野に特に適する（例えば、ＴｈｏｍａｓおよびＣａｐｅｃｃｈｉ　１９８７およびＴｈｏｍｐｓｏｎ　１９８９、前出を参照のこと）。しかし、このアプローチは、当業者に明白な適切なウイルスベクターを使用して、組換えＤＮＡ構築物がインビボで要求された部位に直接投与されるか、または標的化される場合、ヒトにおける使用に慣用的に適合され得る。

【０９４４】

本発明のさらなる実施形態において、本発明のポリペプチドを発現するために遺伝子操作される細胞、あるいは本発明のポリペプチドを発現しないように遺伝子操作された細胞（例えば、ノックアウト）を、インビボで患者に投与する。このような細胞は、患者（すなわち、ヒトを含む動物）またはＭＨＣ適合性ドナーから入手され得、そして線維芽細胞、骨髄細胞、血球（例えば、リンパ球）、脂肪細胞、筋細胞、内皮細胞などを含み得るが、それらに限定されない。この細胞を、例えば、形質導入（ウイルスベクターおよび好ましくは細胞ゲノム中に導入遺伝子を組み込むベクターを使用する）、またはトランスフェクション手順（プラスミド、コスミド、ＹＡＣ、裸のＤＮＡ、エレクトロポレーション、リポソームなどの使用を含むが、これらに限定されない）によって、細胞中に本発明のポリペプチドのコード配列を導入するために、あるいはこのコード配列および／または本発明のポリペプチドに結合している内因性の調節配列を破壊するために、組換えＤＮＡ技術を使用してインビトロで遺伝子操作する。本発明のポリペプチドのコード配列を強力な構成的プロモーターもしくは誘導性プロモーターまたはプロモーター／エンハンサーの制御下に配置し、本発明のポリペプチドの発現および好ましくは分泌を達成し得る。本発明のポリペプチドを発現および好ましくは分泌する操作した細胞を、例えば、循環中において、または腹腔内で患者中へ全身的に導入し得る。

【０９４５】

あるいは、この細胞をマトリックスに組み込み得、そして身体に移植し得る（例えば、

遺伝子操作した線維芽細胞を皮膚移植片の一部として移植し得る）；遺伝子操作した内皮細胞をリンパ移植片または脈管移植片の一部として移植し得る（例えば、Ａｎｄｅｒｓｏｎら、米国特許第５，３９９，３４９号ならびにＭｕｌｌｉｇａｎおよびＷｉｌｓｏｎ、米国特許第５，４６０，９５９号を参照のこと。これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される）。

【０９４６】

投与される細胞が非自己または非ＭＨＣ適合性細胞である場合、それらを、この導入細胞に対する宿主免疫応答の発生を妨害する周知の技術を使用して投与し得る。例えば、この細胞をカプセル性の形態で導入し得、この形態は、構成成分と即時の細胞外環境との交換を可能にしつつ、導入細胞が宿主免疫系によって認識されることを可能にしない。

【０９４７】

本発明のトランスジェニックおよび「ノックアウト」動物は、本発明のポリペプチドの生物学的機能の詳述、異常な発現に関連する疾患、障害および／または状態の研究、ならびにこのような疾患、障害および／または状態を寛解させるに有効な化合物のスクリーニングにおいて有用な動物モデル系を含むが、それらに限定されない用途を有する。

【０９４８】

（実施例３１：抗体の産生）

（ａ．ハイブリドーマ技術）

本発明の抗体は、種々の方法によって調製され得る。（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，第２章を参照のこと）。このような方法の１つの例として、本発明のポリペプチドを発現する細胞は、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために動物に投与される。好ましい方法において、本発明のポリペプチドの調製物が調製され、そして精製されて、天然の夾雑物を実質的に含まないようにされる。次いで、より大きな比活性のポリクローナル抗血清を生成するために、このような調製物は、動物に導入される。

【０９４９】

本発明のポリペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を使用して調製される（Ｋｏｈｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５（１９７５）；Ｋｏｈｌｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５１１（１９７６）；Ｋｏｈｌｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：２９２（１９７６）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ，ＥＩｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．、５６３－６８１頁（１９８１））。一般に、動物（好ましくはマウス）は、本発明のポリペプチドで、またはより好ましくは分泌ポリペプチド発現細胞で免疫される。このようなポリペプチド発現細胞は、任意の適切な組織培養培地において、好ましくは１０％ウシ胎仔血清（約５６℃で非働化した）を補充し、そして約１０ｇ／ｌの非必須アミノ酸、約１，０００Ｕ／ｍｌのペニシリン、および約１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを補充したＥａｒｌｅ改変イーグル培地において培養される。

【０９５０】

このようなマウスの脾細胞は抽出され、そして適切な骨髄腫細胞株と融合される。任意の適切な骨髄腫細胞株は、本発明に従って用いられ得る；しかし、ＡＴＣＣから入手可能な親骨髄腫細胞株（ＳＰ２Ｏ）を用いることが好ましい。融合後、得られるハイブリドーマ細胞を、ＨＡＴ培地において選択的に維持し、次いでＷａｎｄｓら（Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ　８０：２２５－２３２（１９８１））により記載されるように限界希釈によってクローニングする。次いで、このような選択によって得られるハイブリドーマ細胞は、本発明のポリペプチドを結合し得る抗体を分泌するクローンを同定するためにアッセイされる。

【０９５１】

あるいは、本発明のポリペプチドに結合し得るさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を使用して２段階工程の手順において生成し得る。このような方法は、抗体それ自体が抗原であり、それゆえ第二の抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用

する。この方法に従って、タンパク質特異的抗体を使用して、動物（好ましくは、マウス）を免疫する。次いで、このような動物の脾細胞を使用して、ハイブリドーマ細胞を産生する。そして、このハイブリドーマ細胞は、本発明のタンパク質に特異的な抗体のポリペプチドに結合する能力が本発明のポリペプチドによってブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。このような抗体は、本発明のタンパク質に特異的な抗体のポリペプチドに対する抗イディオタイプ抗体を含み、そして動物を免疫してさらなる本発明のタンパク質に特異的な抗体のポリペプチドの形成を誘導するために使用される。

【０９５２】

ヒトにおける抗体のインビボ使用のために、抗体は、「ヒト化」される。このような抗体は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝的構築物を使用することによって産生され得る。キメラ抗体およびヒト化抗体を産生するための方法は当該分野で公知であり、そして本明細書中に議論される（総説については、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４（１９８６）；Ｃａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら、ＥＰ　１７１４９６；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、ＥＰ　１７３４９４；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、ＷＯ　８６０１５３３；Ｒｏｂｉｎｓｏｎら、ＷＯ　８７０２６７１；Ｂｏｕｌｉａｎｎｅら、Ｎａｔｕｒｅ　３１２：６４３（１９８４）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　３１４：２６８（１９８５）を参照のこと）。

【０９５３】

（ｂ）ｓｃＦｖｓのライブラリーからのポリペプチドに対して指向される抗体フラグメントの単離）

ヒトＰＢＬから単離した天然に存在するＶ遺伝子を、ドナーが曝され得たかまたは曝され得なかった本発明のポリペプチドに対する反応性を含む抗体フラグメントのライブラリーに構築する（例えば、米国特許第５，８８５，７９３号（その全体が参考として本明細書に援用される）を参照のこと）。

【０９５４】

ライブラリーのレスキュー。　ＰＣＴ公開ＷＯ　９２／０１０４７に記載のように、ヒトＰＢＬのＲＮＡからｓｃＦｖｓのライブラリーを構築する。抗体フラグメントを提示するファージをレスキューするため、ファージミドを保有する約10^9個のＥ．ｃｏｌｉを用いて、５０ｍｌの２×ＴＹ（１％グルコースおよび１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する）（２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＧＬＵ）を接種し、そして振盪しながら０．８のＯ．Ｄ．まで増殖させる。この培養物の５ｍｌを用いて５０ｍｌの２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＧＬＵに接種し、２×１０８ＴＵのΔ遺伝子３ヘルパー（Ｍ１３Δ遺伝子ＩＩＩ、ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０１０４７を参照のこと）を添加し、そして培養物を振盪なしで３７℃で４５分間インキュベートし、次いで振盪しながら３７℃で４５分間インキュベートする。この培養物を１０分間４０００ｒ．ｐ．ｍ．で遠心分離し、そしてペレットを２リットルの２×ＴＹ（１００μｇ／ｍｌアンピシリンおよび５０μｇ／ｍｌカナマイシンを含有する）中に再懸濁し、そして一晩増殖させる。ファージをＰＣＴ公開ＷＯ９２／０１０４７に記載のように調製する。

【０９５５】

Ｍ１３Δ遺伝子ＩＩＩを以下のように調製する：Ｍ１３Δ遺伝子ＩＩＩヘルパーファージは、遺伝子ＩＩＩタンパク質をコードしない。それゆえ、抗体フラグメントを提示するファージ（ファージミド）は、抗原に対するより大きい結合アビディティーを有する。ファージ形態形成の間、野生型遺伝子ＩＩＩタンパク質を供給するｐＵＣ１９誘導体を保有する細胞においてヘルパーファージを増殖させることにより、感染性Ｍ１３Δ遺伝子ＩＩＩ粒子を作製する。培養物を振盪なしで３７℃で１時間インキュベートし、次いで振盪しながら３７℃でさらに１時間インキュベートする。細胞を遠心沈殿（ＩＥＣ－Ｃｅｎｔｒａ　８，４００ｒ．ｐ．ｍ．で１０分間）し、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンおよび２５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有する２×ＴＹブロス（２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＫＡＮ）３

００ｍｌ中で再懸濁し、そして３７℃で振盪しながら一晩増殖させた。ファージ粒子を、２回のＰＥＧ沈殿（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９９０）により培養培地から精製および濃縮し、２ｍｌ　ＰＢＳに再懸濁し、そして０．４５μｍのフィルター（Ｍｉｎｉｓａｒｔ　ＮＭＬ；Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）を通過させ、約10^{13}形質導入単位／ｍｌ（アンピシリン耐性クローン）の最終濃度を得る。

【０９５６】

ライブラリーのパニング。Ｉｍｍｕｎｏｔｕｂｅｓ（Ｎｕｎｃ）を、本発明のポリペプチドの１００μｇ／ｍｌまたは１０μｇ／ｍｌのいずれかの４ｍｌを用いてＰＢＳ中で一晩被膜する。チューブを２％Ｍａｒｖｅｌ－ＰＢＳを用いて３７℃で２時間ブロックし、次いでＰＢＳ中で３回洗浄する。約10^{13}ＴＵのファージをチューブに適用し、そして、回転盤上で上下にタンブリングしながら室温で３０分間インキュベートし、次いでさらに１．５時間静置しておく。チューブをＰＢＳ０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０で１０回、そしてＰＢＳで１０回洗浄する。１ｍｌの１００ｍＭトリエチルアミンを添加し、そして回転盤上で１５分間上下に回転させることによりファージを溶出し、その後この溶液を０．５ｍｌの１．０Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．４で直ちに中和する。次いで、溶出したファージを細菌とともに３７℃で３０分間インキュベートすることにより、ファージを用いて、１０ｍｌの対数増殖中期のＥ．ｃｏｌｉ　ＴＧ１に感染させる。次いで、Ｅ．ｃｏｌｉを１％グルコースおよび１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有するＴＹＥプレート上にプレートする。次いで、得られる細菌ライブラリーを、上記のようにΔ遺伝子３ヘルパーファージでレスキューし、次の回の選択のためのファージを調製する。次いで、このプロセスを、アフィニティー精製の全４回について反復し、３回目および４回目にはチューブ洗浄をＰＢＳ、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０で２０倍、そしてＰＢＳで２０倍に増加する。

【０９５７】

結合剤の特徴付け。第３回目および４回目の選択から溶出したファージを用いて、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＢ　２１５１を感染させ、そして可溶性ｓｃＦｖをアッセイのために単一コロニーから生成する（Ｍａｒｋｓら、１９９１）。５０ｍＭ炭酸水素塩、ｐＨ９．６中の本発明のポリペプチドの１０ｐｇ／ｍｌのいずれかで被膜したマイクロタイタープレートを用いてＥＬＩＳＡを実行する。ＥＬＩＳＡ中の陽性クローンをＰＣＲフィンガープリンティング（例えば、ＰＣＴ公報ＷＯ９２／０１０４７を参照のこと）、次に配列決定することによりさらに特徴付ける。これらのＥＬＩＳＡ陽性クローンはまた、当該分野において公知の技術（例えば、エピトープマッピング、結合親和性、レセプターシグナル形質導入、抗体／抗原結合をブロックするかまたは競合的に阻害する能力、および競合的アゴニスト活性または競合的アンタゴニスト活性など）によりさらに特徴付けられ得る。

【０９５８】

（実施例３２：Ｂ細胞増殖および分化の刺激または阻害を検出するアッセイ）

機能的体液性免疫応答の生成は、Ｂ系列の細胞とそれらの微小環境との間に、可溶性のシグナル伝達および同族のシグナル伝達の両方を必要とする。シグナルは、陽性の刺激（Ｂ系列の細胞がプログラムされた発生を持続するようにさせる）、または陰性の刺激（細胞が電流発生経路を阻止するように指示する）を伝え得る。現在までに、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４およびＩＬ－１５を含む、多数の刺激シグナルおよび阻害シグナルがＢ細胞応答性に影響することが見出されている。興味深いことに、これらのシグナルはそれ自体は弱いエフェクターであるが、種々の同時刺激タンパク質と組み合わせて、Ｂ細胞集団中の活性化、増殖、分化、ホーミング、耐性、および死を誘導し得る。

【０９５９】

Ｂ細胞同時刺激タンパク質の最も研究されたクラスの１つがＴＮＦスーパーファミリーである。このファミリー内で、ＣＤ４０、ＣＤ２７およびＣＤ３０は、そのそれぞれのリガンドである、ＣＤ１５４、ＣＤ７０およびＣＤ１５３と共に種々の免疫応答を調節することが見出されている。これらのＢ細胞集団およびそれらの前駆細胞の増殖および分化の検出および／または観察を可能にするアッセイは、種々のタンパク質がこれらのＢ細胞集

団上に、増殖および分化の点で有し得る効果を決定する際に価値のあるツールである。以下に列挙するのは、Ｂ細胞集団およびそれらの前駆体の分化、増殖、または阻害の検出を可能にするように設計された２つのアッセイである。

【０９６０】

（インビトロアッセイ）－本発明の精製されたポリペプチド、またはそれらの短縮化形態を、Ｂ細胞集団およびそれらの前駆体において活性化、増殖、分化もしくは阻害および／または死を誘導する能力について評価する。精製したヒト扁桃腺Ｂ細胞への本発明のポリペプチドの活性（定性的に０．１～１０，０００ｎｇ／ｍＬの用量範囲にわたって測定した）を、標準的なＢリンパ球同時刺激アッセイにおいて評価する。このアッセイでは、精製した扁桃腺Ｂ細胞を、プライミング因子として、ホルマリン固定Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃｏｗａｎ　Ｉ（ＳＡＣ）、または固定した抗ヒトＩｇＭ抗体のいずれかの存在下で培養する。ＩＬ－２およびＩＬ－１５のような第２のシグナルは、トリチウム化チミジン取り込みにより測定した場合、ＳＡＣおよびＩｇＭ架橋と協同してＢ細胞増殖を誘発する。新規な協同因子を、このアッセイを用いて容易に同定し得る。このアッセイは、ＣＤ３陽性細胞の磁気ビーズ（ＭＡＣＳ）枯渇によりヒト扁桃腺Ｂ細胞を単離する工程を包含する。得られる細胞集団は、ＣＤ４５Ｒ（Ｂ２２０）の発現により評価する場合、９５％のＢ細胞より大きい。

【０９６１】

種々の希釈のそれぞれのサンプルを９６ウェルプレートの個々のウェルに配置し、ここへ、培養培地（１０％ＦＢＳ、５×１０$^{-5}$Ｍ　２ＭＥ、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１０μｇ／ｍｌストレプトマイシン、および１０$^{-5}$希釈のＳＡＣを含有するＲＰＭＩ　１６４０）中で懸濁した、総量１５０μｌ中の、１０^{5}Ｂ細胞を添加する。増殖または阻害を、因子の添加後７２時間から開始して、３Ｈ－チミジン（６．７Ｃｉ／ｍＭ）で２０ｈパルス（１μＣｉ／ウェル）により定量する。陽性コントロールおよび陰性コントロールは、それぞれＩＬ２および培地である。

【０９６２】

（インビボアッセイ）－ＢＡＬＥ／ｃマウスに、緩衝液のみ、または本発明の２ｍｇ／ｋｇのポリペプチド、またはそれらの短縮形態を、１日２回注射（腹腔内）する。マウスにこの処置を４日間連続して与え、この時点でそれらを屠殺し、そして分析のために種々の組織および血清を収集した。正常な脾臓および本発明のポリペプチドで処理した脾臓由来のＨ＆Ｅ切片の比較により、脾臓細胞でのこのポリペプチドの活性の結果、例えば、動脈周囲リンパ性鞘の拡散および／または赤色脾髄領域の有核の細胞充実性の有意な増加（これは、Ｂ細胞集団の分化および増殖の活性化を示し得る）が確認される。Ｂ細胞マーカーである、抗ＣＤ４５Ｒ（Ｂ２２０）を用いる免疫組織化学的研究を用いて、脾臓細胞への任意の生理的な変化（例えば、脾臓組織崩壊）が、樹立されたＴ細胞領域に浸潤する漠然と規定されたＢ細胞区画内のＢ細胞提示の増加に起因するか否かを決定する。

【０９６３】

ポリペプチドで処置したマウス由来の脾臓のフローサイトメトリー分析を用いて、このポリペプチドが、ＴｈＢ＋であるＣＤ４５Ｒ（Ｂ２２０）ｄｕｌｌ　Ｂ細胞の比を、コントロールマウスで観察される比よりも特異的に増加するか否かを示す。

【０９６４】

同様に、増加した成熟Ｂ細胞のインビボでの提示の推定される結果は、血清Ｉｇ力価の相対的な増加である。従って、血清ＩｇＭおよびＩｇＡレベルを緩衝液処置マウスとポリペプチド処置マウスとの間で比較する。

【０９６５】

本実施例において記載する試験は、本発明のポリペプチドの活性を試験した。しかし、当業者は、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドのアゴニスト、および／またはアンタゴニストを試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【０９６６】

（実施例３３：Ｔ細胞増殖アッセイ）
（休止ＰＢＬに対する増殖アッセイ）
ＣＤ３誘導性の増殖アッセイをＰＢＭＣで実行し、そして^{3}Ｈ－チミジンの取り込みにより測定する。このアッセイを以下のように実行する。９６ウェルプレートを、ＣＤ３に対するｍＡｂ（ＨＩＴ３ａ，Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）の１００μｌ／ウェル、またはアイソタイプ適合のコントロールｍＡｂ（Ｂ３３．１）（０．０５Ｍ　炭酸水素塩緩衝液、ｐＨ９．５中、１μｇ／ｍｌ）で４℃で１晩、コートし、次いでＰＢＳで３回洗浄する。ＰＢＭＣをヒト末梢血から、Ｆ／Ｈ勾配遠心分離により単離し、そして種々の濃度のＴＮＦδおよび／またはＴＮＦ　εタンパク質の存在下で、１０％ＦＣＳおよびＰ／Ｓを含有するＲＰＭＩ中、ｍＡｂでコートしたプレートの４通りのウェル（５×１０^{4}／ウェル）に添加する（総量２００μｌ）。関連するタンパク質緩衝液および培地単独がコントロールである。３７℃での培養の４８時間後、プレートを１０００ｒｐｍで２分間回転させ、そして１００μｌの上清を除去し、そして、増殖への効果が観察される場合、ＩＬ－２（または他のサイトカイン）の測定のために－２０℃で貯蔵した。ウェルに０．５μＣｉの^{3}Ｈ－チミジンを含有する１００μｌの培地を補充し、そして３７℃で１８～２４時間培養する。ウェルを収集し、そして^{3}Ｈ－チミジンの取り込みを増殖の指標として用いた。抗ＣＤ３単独が増殖の陽性コントロールである。ＩＬ－２（１００Ｕ／ｍｌ）をまた、増殖を増強するコントロールとして用いる。Ｔ細胞の増殖を誘導しないコントロール抗体を、ＴＮＦδおよび／またはＴＮＦεタンパク質の効果についての陰性コントロールとして用いる。

【０９６７】
あるいは、休止しているＰＢＬ（末梢血リンパ球）上での増殖アッセイを、^{3}Ｈ－チミジンの取り込みにより測定する。このアッセイを以下のように実行する。ＰＢＭＣをヒト末梢血から、Ｆｉｃｏｌｌ（ＬＳＭ，ＩＣＮ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ａｕｒｏｒａ，Ｏｈｉｏ）勾配遠心分離により単離し、そして１０％（Ｆｅｔａｌ　Ｃａｌｆ　Ｓｅｒｕｍ，Ｂｉｏｆｌｕｉｄｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）／ＲＰＭＩ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｅｒｇ，ＭＤ）中で一晩、培養する。この一晩のインキュベーション期間によって、接着性細胞をプラスチックに接着させる。これは、アッセイにおいてより低いバックグラウンドとなる。なぜなら、抗原提示細胞として作用し得るか、または増殖因子を産生し得る細胞の存在が少ないからである。翌日非接着性細胞を回収して、洗浄し、増殖アッセイ中で用いる。このアッセイを、最終容量２００μｌ中に２×１０^{4}細胞／ウェルを用いて９６ウェルプレート中で実施する。目的のタンパク質を発現する上清（例えば、ＣＨＯまたは２９３Ｔ上清）を、３０％の最終稀釈で試験し、従って、６０μｌを、細胞を含有する１４０μｌの１０％　ＦＣＳ／ＲＰＭＩに添加する。コントロール上清を同じ最終稀釈で用い、そして以下のタンパク質を発現する：ベクター（陰性コントロール）、ＩＬ－２（*）、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－１０およびＴＲ２。コントロール上清に加えて、組換えヒトＩＬ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）をまた最終濃度１００ｎｇ／ｍｌで用いる。培養の２４時間後、各ウェルを１μＣｉの^{3}Ｈチミジン（Ｎｅｎ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）でパルスする。次いで、細胞をパルス２０時間後に回収し、そして^{3}Ｈチミジンの取り込みを増殖の指標として用いる。結果を３連のサンプルの平均±標準誤差として表す。
（*）各トランスフェクションにおいて産生されたコントロールサイトカインＩＬ－２、ＩＦＮγ、ＴＮＦαおよびＩＬ－１０の量は、３００ｐｇ～５ｎｇ／ｍｌの間で変化する。

【０９６８】
（同時刺激アッセイ）
休止しているＰＢＬ（末梢血リンパ球）での同時刺激アッセイを、ＣＤ３およびＣＤ２８に対して固定された抗体の存在下で実施する。ＣＤ３の不変領域に特異的な抗体の使用は、抗原によりＴ細胞レセプターの刺激を通じて生じるＴ細胞活性の誘導を模倣する。同時刺激シグナル（第２シグナル）の非存在下でのＴＣＲ（第１シグナル）の架橋は、増殖

の非常に低い誘導を生じ、そして最終的には「アネルギー」の状態（この状態は、増殖がないことおよびサイトカイン産生をできないことによって特徴付けられる）を生じる。同時刺激分子の作用を模倣する、ＣＤ２８に対する抗体のような同時刺激シグナルの追加。活性化ＡＰＣ上で発現されたＢ７－１は、細胞生存およびＩＬ－２の産生を含むＴ細胞応答の増強を生じる。従って、この型のアッセイにより、目的のタンパク質を発現する上清の添加によって生じる、Ｔ細胞増殖に対する正の影響および負の影響の両方を検出できる。

【０９６９】

このアッセイを以下のように実行する。最終容量１００μｌで１００ｎｇ／ｍｌ抗ＣＤ３および５μｇ／ｍｌ抗ＣＤ２８（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いて、９６ウェルプレートをコートし、そして４℃で一晩インキュベートする。使用前にプレートをＰＢＳで２回洗浄する。ＰＢＭＣをヒト末梢血から、Ｆｉｃｏｌｌ（ＬＳＭ，ＩＣＮ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ａｕｒｏｒａ，Ｏｈｉｏ）勾配遠心分離により単離し、そして１０％ＦＣＳ（Ｆｅｔａｌ Ｃａｌｆ Ｓｅｒｕｍ，Ｂｉｏｆｌｕｉｄｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）／ＲＰＭＩ（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｅｒｇ，ＭＤ）中で一晩、培養する。この一晩のインキュベーション期間によって、接着性細胞をプラスチックに接着させる。これは、アッセイにおいてより低いバックグラウンドとなる。なぜなら、抗原提示細胞として作用し得るか、または増殖因子を産生し得る細胞の存在が少ないからである。翌日非接着性細胞を回収して、洗浄し、増殖アッセイ中で用いる。このアッセイを、最終容量２００μｌ中に2×10^4細胞／ウェルを用いて９６ウェルプレート中で実施する。目的のタンパク質を発現する上清（例えば、ＣＨＯまたは２９３Ｔ上清）を、３０％の最終稀釈で試験し、従って、６０μｌを、細胞を含有する１４０μｌの１０％ ＦＣＳ／ＲＰＭＩに添加する。コントロール上清を同じ最終稀釈で用い、そして以下のタンパク質を発現する：ベクターのみ（陰性コントロール）、ＩＬ－２、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－１０およびＴＲ２。コントロール上清に加えて、組換えヒトＩＬ－２（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）をまた最終濃度１０ｎｇ／ｍｌで用いる。培養の２４時間後、各ウェルを１μＣｉの^{3}Ｈチミジン（Ｎｅｎ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）でパルスする。次いで、細胞をパルス２０時間後に回収し、そして^{3}Ｈチミジンの取り込みを増殖の指標として用いる。結果を３連のサンプルの平均±標準誤差として表す。

【０９７０】

（同時刺激アッセイ：ＩＦＮγおよびＩＬ－２ ＥＬＩＳＡ）

このアッセイを以下のように実行する。最終容量５００μｌで３００ｎｇ／ｍｌもしくは６００ｎｇ／ｍｌのどちらかの抗ＣＤ３および５μｇ／ｍｌ抗ＣＤ２８（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いて、２４ウェルプレートをコートし、そして４℃で一晩インキュベートする。使用前にプレートをＰＢＳで２回洗浄する。ＰＢＭＣをヒト末梢血から、Ｆｉｃｏｌｌ（ＬＳＭ，ＩＣＮ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ａｕｒｏｒａ，Ｏｈｉｏ）勾配遠心分離により単離し、そして１０％ＦＣＳ（Ｆｅｔａｌ Ｃａｌｆ Ｓｅｒｕｍ，Ｂｉｏｆｌｕｉｄｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）／ＲＰＭＩ（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｅｒｇ，ＭＤ）中で一晩、培養する。この一晩のインキュベーション期間によって、接着性細胞をプラスチックに接着させる。これは、アッセイにおいてより低いバックグラウンドとなる。なぜなら、抗原提示細胞として作用し得るか、または増殖因子を産生し得る細胞の存在が少ないからである。翌日非接着性細胞を回収して、洗浄し、同時刺激アッセイ中で用いる。このアッセイを、最終容量９００μｌ中に1×10^5細胞／ウェルを用いて前もってコートした２４ウェルプレート中で実施する。目的のタンパク質を発現する上清（２９３Ｔ上清）を、３０％の最終稀釈で試験し、従って、３００μｌを、細胞を含有する６００μｌの１０％ ＦＣＳ／ＲＰＭＩに添加する。コントロール上清を同じ最終稀釈で用い、そして以下のタンパク質を発現する：ベクターのみ（陰性コントロール）、ＩＬ－２、ＩＦＮγ、ＩＬ－１２およびＩＬ－１８。コントロール上清に加えて、組替えヒトＩＬ－２（全てのサイトカインは、Ｒ＆Ｄ

Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮから購入した）をまた最終濃度１０ｎｇ／ｍｌで、ＩＬ－１２を最終濃度１ｎｇ／ｍｌおよびＩＬ－１８を最終濃度５０ｎｇ／ｍｌで用いる。コントロールおよび未知のサンプルを、二連で試験する。上清サンプル（２５０μｌ）をアッセイ開始後２日目および５日目で回収する。ＩＦＮγおよびＩＬ－２の分泌に対しての試験のためのＥＬＩＳＡをＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）から購入したキットを使用して行う。結果を２連のサンプルの平均±標準誤差として表す。

【０９７１】

（プレ活性化した休止しているＴ細胞の増殖アッセイ）

レクチンフィトヘムアグルチニン（ＰＨＡ）を用いて事前に活性化した細胞上で、プレ活性化した休止しているＴ細胞での増殖アッセイを実施する。レクチンは、ＴＣＲを含むＴ細胞表面糖タンパク質上の残基に結合し得るポリマー性植物タンパク質であり、そしてポリクローナルアクチベータとして作用する。ＰＢＬをＰＨＡで処理し、次いで低用量のＩＬ－２類似エフェクターＴ細胞の存在下で培養する。これらの細胞は一般に、ＩＬ－２のような増殖因子によって誘導されたさらなる活性化に対してより感受性である。これは、高親和性ＩＬ－２レセプターの発現に起因する。このレセプターは、この集団をＩＬ－２の量に応答させる（ナイーブなＴ細胞上で有する効果の１００分の１である）。従ってこの型の細胞の使用は、休止している（ナイーブな）Ｔ細胞での増殖を誘導するのに十分でない、非常に低用量の未知の増殖因子の効果を検出し得る。

【０９７２】

このアッセイを以下のように実行する。ＰＢＭＣをヒト末梢血から、Ｆ／Ｈ勾配遠心分離により単離し、そして２μｇ／ｍｌ　ＰＨＡ（Ｓｉｇｍａ，Ｓａｉｎｔ　Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）の存在下で、１０％ＦＣＳ／ＲＰＭＩ中で３日間、培養する。次いでこの細胞をＰＢＳ中で洗浄し、そして５ｎｇ／ｍｌのヒト組換えＩＬ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）の存在下で、１０％ＦＣＳ／ＲＰＭＩ中で、３日間培養する。この細胞を洗浄して、飢餓培地（１％ＦＣＳ／ＲＰＭＩ）中で１６時間休息させ、その後増殖アッセイを開始した。細胞のアリコートをＦＡＣＳによって分析して、Ｔ細胞（ＣＤ３陽性細胞）存在のパーセンテージを決定する；これは通常ドナーに依存して９３～９７％の間にわたる。このアッセイを、最終容量２００μｌ中に2×10^4細胞／ウェルを用いて９６ウェルプレート中で実施する。目的のタンパク質を発現する上清（例えば、ＣＨＯまたは２９３Ｔ上清）を、３０％の最終稀釈で試験し、従って、６０μｌを、細胞を含有する１４０μｌの１０％　ＦＣＳ／ＲＰＭＩに添加する。コントロール上清を同じ最終稀釈で用い、そして以下のタンパク質を発現する：ベクター（陰性コントロール）、ＩＬ－２、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－１０およびＴＲ２。コントロール上清に加えて、組換えヒトＩＬ－２をまた最終濃度１０ｎｇ／ｍｌで用いる。培養の２４時間後、各ウェルを１μＣｉの^{3}Ｈチミジン（Ｎｅｎ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）でパルスする。次いで、細胞をパルス２０時間後に回収し、そして^{3}Ｈチミジンの取り込みを増殖の指標として用いる。結果を３連のサンプルの平均±標準誤差として表す。

【０９７３】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチドの活性を試験した。しかし、当業者は、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドのアゴニスト、および／またはアンタゴニストを試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【０９７４】

（実施例３４：ＭＨＣクラスＩＩ、同時刺激分子および接着分子の発現、ならびに単球および単球由来ヒト樹状細胞の細胞分化への本発明のポリペプチドの効果）

樹状細胞を末梢血において見出される増殖前駆体の増殖により生成する：接着性ＰＢＭＣまたは清浄化単球画分を、ＧＭ－ＣＳＦ（５０ｎｇ／ｍｌ）およびＩＬ－４（２０ｎｇ／ｍｌ）とともに７～１０日間培養する。これらの樹状細胞は、非成熟細胞の特徴的表現型（ＣＤ１、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ４０およびＭＨＣクラスＩＩ抗原の発現）を有す

る。ＴＮＦ－αのような活性化因子での処理は、表面表現形に迅速な変化（ＭＨＣクラスＩおよびＩＩ、同時刺激分子および接着分子の発現の増加、ＦＣγＲＩＩの下方制御、ＣＤ８３の上方制御）を生じる。これらの変化は抗原提示能力の増加、および樹状細胞の機能的成熟と関連する。

【０９７５】

表面抗原のＦＡＣＳ分析を以下の様に実施する。細胞を、本発明のポリペプチドまたはＬＰＳ（陽性コントロール）の漸増する濃度で１～３日処理し、１％ＢＳＡおよび０．０２ｍＭアジ化ナトリウムを含有するＰＢＳで洗浄し、次いで１：２０希釈の適切なＦＩＴＣ標識モノクローナル抗体またはＰＥ標識モノクローナル抗体とともに、４℃で３０分間インキュベートする。さらなる洗浄後、標識した細胞をＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）でのフローサイトメトリーにより分析する。

【０９７６】

（サイトカインの生成への効果）樹状細胞により生成されるサイトカイン、特にＩＬ－１２は、Ｔ細胞依存性免疫応答の開始において重要である。ＩＬ－１２は、Ｔｈ１ヘルパーＴ細胞免疫応答の発生に強力に影響し、そして細胞傷害性Ｔ細胞機能およびＮＫ細胞機能を誘導する。ＥＬＩＳＡを用いて以下のようにＩＬ－１２放出を測定する。樹状細胞（10^6／ｍｌ）を、本発明のポリペプチドの漸増する濃度で２４時間処理する。ＬＰＳ（１００ｎｇ／ｍｌ）を、陽性コントロールとして細胞培養に添加する。次いで、細胞培養からの上清を収集し、そして市販のＥＬＩＳＡキット（例えば、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ））を用いてＩＬ－１２含量について分析する。キットに提供される標準的プロトコールを用いる。

【０９７７】

ＭＨＣクラスＩＩ、同時刺激分子および接着分子の発現への効果。細胞表面抗原の３つの主なファミリー：接着分子、抗原提示に関与する分子、およびＦｃレセプター、が、単球上で同定され得る。ＭＨＣクラスＩＩ抗原および他の同時刺激分子（例えば、Ｂ７およびＩＣＡＭ－１）の発現の調節は、単球の抗原提示能力、およびＴ細胞活性化を誘導する能力に変化を生じ得る。Ｆｃレセプターの発現増加は、単球細胞傷害性活性、サイトカイン放出および食菌作用の改善と相関し得る。

【０９７８】

ＦＡＣＳ分析は、以下のように表面抗原を試験するために用いられる。単球を、本発明のポリペプチドまたはＬＰＳ（陽性コントロール）の漸増する濃度で１～５日処理し、１％ＢＳＡおよび０．０２ｍＭアジ化ナトリウムを含有するＰＢＳで洗浄し、次いで１：２０希釈の適切なＦＩＴＣ標識モノクローナル抗体またはＰＥ標識モノクローナル抗体とともに、４℃で３０分間インキュベートする。さらなる洗浄後、標識した細胞をＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）でのフローサイトメトリーにより分析する。

【０９７９】

（単球活性化および／または生存の増加）単球を活性化する（あるいは、不活化する）および／または単球の生存を増加する（あるいは、単球生存を低下させる）分子についてのアッセイは、当該分野で公知であり、そして本発明の分子が単球のインヒビターまたはアクチベーターとして機能するか否かを決定するために慣用的に適用され得る。本発明のポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、以下に記載の３つのアッセイを用いてスクリーニングされ得る。これらのアッセイのそれぞれについて、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ勾配（Ｓｉｇｍａ）を通じた遠心分離により、単一のドナーｌｅｕｋｏｐａｃｋ（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｒｅｄ　Ｃｒｏｓｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ）から精製する。単球を向流遠心性エルトリエーション（ｃｏｕｎｔｅｒｆｌｏｗ　ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ｅｌｕｔｒｉａｔｉｏｎ）によりＰＢＭＣから単離する。

【０９８０】

（単球生存アッセイ）ヒト末梢血単球は、血清または他の刺激の非存在下で培養した場合、次第に生存度を失う。それらの死は、内部調節されたプロセス（アポトーシス）から生じる。活性化因子、例えばＴＮＦαの培養への添加は、劇的に、細胞生存を改善し、そ

してＤＮＡの断片化を妨げる。プロピジウムヨード（ＰＩ）染色を用いて、以下のようにアポトーシスを測定する。単球を、１００ｎｇ／ｍｌのＴＮＦ－α（陰性コントロール）の存在下、および試験される種々の濃度の化合物の存在下で、ポリプロピレンチューブ中の無血清培地（陽性コントロール）中で、４８時間培養する。細胞を、最終濃度５μｇ／ｍｌでＰＩを含有するＰＢＳ中で2×10^{6}／ｍｌの濃度に懸濁し、次いでＦＡＣＳｃａｎ分析の前に５分間室温でインキュベートする。ＰＩ取り込みは、この試験パラダイムにおけるＤＮＡの断片化と相関することを示している。

【０９８１】

（サイトカイン放出への影響）単球／マクロファージの重要な機能は、刺激後のサイトカインの放出を通じた免疫系の他の細胞集団へのそれらの調節活性である。サイトカイン放出を測定するためのＥＬＩＳＡは、以下のように実施する。ヒト単球を、5×10^{5}細胞／ｍｌの密度で、本発明のポリペプチドの漸増する濃度とともに、および同じ条件下でこのポリペプチドの非存在下で、インキュベートする。ＩＬ－１２の生成については、この細胞を、本発明のポリペプチドの存在下でＩＦＮ（１００Ｕ／ｍｌ）で１晩プライムする。次いで、ＬＰＳ（１０ｎｇ／ｍｌ）を添加する。馴化培地を２４時間後に収集し、そして使用するまで凍結保存する。次いで、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１０、ＭＣＰ－１およびＩＬ－８の測定を市販のＥＬＩＳＡキット（例えば、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）を用い、そしてキットに提供される標準的プロトコールを適用して実施する。

【０９８２】

（酸化的バースト（Ｏｘｉｄａｔｉｖｅ　ｂｕｒｓｔ））精製した単球を９６ウェルプレートに$2\sim1\times10^{5}$細胞／ウェルでプレートする。本発明のポリペプチドの漸増濃度をウェルの総量０．２ｍｌの培養培地（ＲＰＭＩ　１６４０＋１０％ＦＣＳ、グルタミンおよび抗生物質）に添加する。３日間のインキュベーション後、このプレートを遠心分離し、そして培地をウェルから除く。マクロファージの単層に、１ウェルあたり０．２ｍｌのフェノールレッド溶液（１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　リン酸カリウム緩衝液ｐＨ７．０、５．５ｍＭデキストロース、０．５６ｍＭフェノールレッドおよび１９Ｕ／ｍｌのＨＲＰＯ）を、刺激物質（２００ｎＭ　ＰＭＡ）とともに添加する。このプレートを３７℃で２時間インキュベートし、そして１ウェルあたり２０μｌの１Ｎ　ＮａＯＨを添加して反応を停止する。吸収を６１０ｎｍで読む。マクロファージにより生成されるH_2O_2の量を算出するため、既知のモル濃度のH_2O_2溶液の標準曲線をそれぞれの実験について実施する。

【０９８３】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチドの活性を試験した。しかし、当業者は、本発明のポリペプチドの活性、ポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニストの活性、および／またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【０９８４】

（実施例３５：本発明のポリペプチドの生物学的効果）

（星状細胞および神経アッセイ）

上記のように、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉで発現され、そして精製された本発明の組換えポリペプチドを、皮質ニューロン細胞の生存、神経突起成長または表現形分化を促進する活性について、およびグリア線維性酸性タンパク質免疫陽性細胞、星状細胞の増殖の誘導について試験し得る。バイオアッセイのための皮質細胞の選択は、皮質構造中のＦＧＦ－１およびＦＧＦ－２の広く行き渡っている発現、ならびにＦＧＦ－２処理から生じる皮質ニューロン生存の以前に報告された増強に基づく。チミジン取り込みアッセイを用いて、例えば、これらの細胞への本発明のポリペプチドの活性を解明し得る。

【０９８５】

さらに、インビトロにおける皮質ニューロンまたは海馬ニューロンへのＦＧＦ－２（塩基性ＦＧＦ）の生物学的効果を記載する以前のレポートは、ニューロン生存および神経突

起成長の両方における増大を実証している（Ｗａｌｉｃｋｅら、「Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｐｒｏｍｏｔｅｓ ｓｕｒｖｉｖａｌ ｏｆ ｄｉｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ ｎｅｕｒｏｎｓ ａｎｄ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｎｅｕｒｉｔｅ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ」Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：３０１２～３０１６（１９８６）、アッセイは、本明細書でその全体が参考として援用される）。しかし、ＰＣ－１２細胞で実行される実験からの報告は、これらの２つの応答が必ずしも同義でないこと、そしてどのＦＧＦを試験しいるかだけでなく、どのレセプターが標的細胞で発現されているかにも依存し得ることを示唆する。神経突起成長を誘導する本発明のポリペプチドの能力を、一次の皮質ニューロン培養パラダイムを用いて、例えば、チミジン取り込みアッセイを用いてＦＧＦ－２で得られた応答と比較し得る。

【０９８６】

（線維芽細胞および内皮細胞アッセイ）

ヒト肺線維芽細胞をＣｌｏｎｅｔｉｃｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から入手し、そしてＣｌｏｎｅｔｉｃｓからの増殖培地で維持する。真皮性微小血管内皮細胞をＣｅｌｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から得る。増殖アッセイについては、ヒト肺線維芽細胞および真皮性微小血管内皮細胞を、９６ウェルプレートの増殖培地中で１日間、５，０００細胞／ウェルで培養し得る。次いでこの細胞を０．１％ＢＳＡ基礎培地中で１日間インキュベートする。新鮮な０．１％ＢＳＡ培地で培地を置換した後、細胞を試験タンパク質と３日間インキュベートする。Ａｌａｍａｒ Ｂｌｕｅ（Ａｌｍａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ，ＣＡ）を１０％の最終濃度になるように各ウェルに添加する。この細胞を４時間インキュベートする。細胞生存度をＣｙｔｏＦｌｕｏｒ蛍光リーダーでの読取りにより測定する。PGE_2アッセイについては、ヒト肺線維芽細胞を、９６ウェルプレート中で１日間、５，０００細胞／ウェルで培養する。０．１％ＢＳＡ基礎培地に培地を変換した後、細胞をＩＬ－１αとともに、またはそれをともなわずに、ＦＧＦ－２または本発明のポリペプチドと２４時間インキュベートする。上清を収集し、そしてＥＩＡキット（Ｃａｙｍａｎ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩ）によりPGE_2についてアッセイする。ＩＬ－６アッセイについては、ヒト肺線維芽細胞を、９６ウェルプレート中で１日間、５，０００細胞／ウェルで培養する。０．１％ＢＳＡ基礎培地に培地を変換した後、細胞を本発明のポリペプチドＩＬ－１αとともに、またはそれをともなわずに、ＦＧＦ－２と２４時間インキュベートする。上清を収集し、そしてＥＬＩＳＡキット（Ｅｎｄｏｇｅｎ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）によりＩＬ－６についてアッセイする。

【０９８７】

ヒト肺線維芽細胞をＦＧＦ－２または本発明のポリペプチドとともに基礎培地中で３日間培養し、その後、線維芽細胞の増殖への効果を評価するためＡｌａｍａｒ Ｂｌｕｅを添加する。ＦＧＦ－２は、本発明のポリペプチドでの刺激に匹敵して用いられ得る１０～２５００ｎｇ／ｍｌの刺激を示すはずである。

【０９８８】

（パーキンソンモデル）

パーキンソン病における運動機能の喪失は、黒質線条体のドーパミン作動性投射ニューロンの変性から生じる線条体ドーパミンの欠乏に起因する。広範に特徴付けされたパーキンソン病の動物モデルは、１－メチル－４フェニル１，２，３，６－テトラヒドロピリジン（ＭＰＴＰ）の全身投与を含む。ＣＮＳにおいて、ＭＰＴＰは、星状細胞に取り込まれ、そしてモノアミンオキシダーゼＢにより１－メチル－４－フェニルピリジン（MPP^+）に異化され、そして放出される。引き続き、MPP^+は、ドーパミンの高親和性再取り込みトランスポーターによりドーパミン作動性ニューロンに能動的に蓄積する。次いで、MPP^+は、電気化学勾配によりミトコンドリア中で濃縮され、そしてニコチン酸アミドニリン酸：ユビキノン酸化還元酵素（複合体Ｉ）を選択的に阻害し、これにより電子伝達を妨害し、そして最終的に活性酸素を生成する。

【０９８９】
ＦＧＦ－２（塩基性ＦＧＦ）が黒質のドーパミン作動性ニューロンへの栄養活性を有することが組織培養パラダイムにおいて実証されている（Ｆｅｒｒａｒｉら、Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．１９８９）。近年、Ｕｎｓｉｃｋｅｒ博士のグループは、線条体のゲル型インプラントでのＦＧＦ－２投与がＭＰＴＰ曝露と関連する毒性から黒質のドーパミン作動性ニューロンのほぼ完全な防御を生じることを実証している（ＯｔｔｏおよびＵｎｓｉｃｋｅｒ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，１９９０）。
【０９９０】
ＦＧＦ－２を用いたデータに基づいて、本発明のポリペプチドは、インビトロにおけるドーパミン作動性ニューロン生存を増強する際において、本発明のポリペプチドがＦＧＦ－２の作用と類似の作用を有するか否かを決定するために評価され得、そして、本発明のポリペプチドはまた、線条体におけるドーパミン作動性ニューロンを、ＭＰＴＰ処理と関連する損傷からの防御についてインビボで試験され得る。本発明のポリペプチドの潜在的効果を、まずドーパミン作動性ニューロン細胞培養パラダイムにおいてインビトロで試験する。妊娠１４日のＷｉｓｔａｒラット胚由来の中脳底板を解剖することにより、培養物を調製する。組織をトリプシンで分離し、そしてポリオルチニン－ラミニンでコートしたカバーガラスに２００，０００細胞／ｃｍ^{2}の密度で播いた。この細胞をダルベッコ改変イーグル培地およびホルモン補充物（ＮＩ）を含有するＦ１２培地中で維持する。インビトロで８日後、培養物をパラホルムアミドで固定し、そしてチロシンヒドロキシラーゼ（ドーパミン作動性ニューロンについての特異的マーカー）での免疫組織化学染色のために処理する。分離した細胞培養物を胚性ラットから調製する。培養培地を３日ごとに変化させ、そしてこの因子をまたその時点ごとに添加する。
【０９９１】
ドーパミン作動性ニューロンを妊娠１４日（この発生時間は、ドーパミン作動性前駆細胞が増殖する段階を過ぎる）で動物から単離するので、チロシンヒドロキシラーゼ免疫陽性ニューロンの数の増加は、インビトロで生存しているドーパミン作動性ニューロンの数の増加を示す。従って、もし本発明のポリペプチドがドーパミン作動性ニューロンの生存を延長するように作用するならば、このポリペプチドがパーキンソン病に関与し得ることを示唆する。
【０９９２】
本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチドの活性を試験した。しかし、当業者は、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、本発明のアゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。
【０９９３】
（実施例３６：血管内皮細胞の増殖への本発明のポリペプチドの効果）
１日目に、ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）を、４％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、１６ユニット／ｍｌ　ヘパリン、および５０ユニット／ｍｌ　内皮細胞増殖補充物（ＥＣＧＳ、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，Ｉｎｃ．）を含有するＭ１９９培地中で、３５ｍｍシャーレあたり２～５×１０^{4}細胞の密度で播種する。２日目、この培地を、１０％ＦＢＳ、８ユニット／ｍｌヘパリンを含有するＭ１９９で置換する。配列番号Ｙのアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび陽性コントロール（例えば、ＶＥＧＦおよび塩基性ＦＧＦ（ｂＦＧＦ））を種々の濃度で添加する。４日目および６日目に、培地を交換する。８日目、Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｃｏｕｎｔｅｒを用いて細胞数を決定する。
【０９９４】
ＨＵＶＥＣ細胞数の増加は、本発明のポリペプチドが血管内皮細胞を増殖し得ることを示す。
【０９９５】
本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチドの活性を試験した。しかし、当業者は、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、本発明のアゴニ

スト、および／またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【０９９６】

（実施例３７：血管内皮細胞の増殖への本発明のポリペプチドの刺激効果）

増殖因子の分裂促進活性の評価のために、電子共役試薬ＰＭＳ（フェナジンメトサルフェート）を用いる、比色分析ＭＴＳ（３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－５－（３－カルボキシメトキシフェニル）－２－（４－スルフォフェニル）２Ｈ－テトラゾリウム）アッセイを実行した（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ　９６　ＡＱ，Ｐｒｏｍｅｇａ）。細胞を０．１ｍＬの血清補充培地中で９６ウェルプレートに播種し（５，０００細胞／ウェル）、そして一晩付着させる。０．５％ＦＢＳ中、１２時間の血清飢餓後、Ｈｅｐａｒｉｎ（８Ｕ／ｍｌ）を伴うかまたは伴わない、条件（ｂＦＧＦ、$ＶＥＧＦ_{165}$または０．５％ＦＢＳ中の本発明のポリペプチド）をウェルに４８時間添加する。２０ｍｇのＭＴＳ／ＰＭＳ混合物（１：０．０５）を１ウェルあたりに添加し、そして３７℃で１時間インキュベートさせ、その後ＥＬＩＳＡプレートリーダーで４９０ｎｍの吸光度を測定する。コントロールウェル（培地あり、細胞なし）のバックグラウンドの吸光度を差し引きし、そしてそれぞれの条件について７つのウェルを並行して実施する。Ｌｅａｋら、Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　Ｃｅｌｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３０Ａ：５１２～５１８（１９９４）を参照のこと。

【０９９７】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチドの活性を試験した。しかし、当業者は、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、本発明のアゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【０９９８】

（実施例３８：ＰＤＧＦ誘導性血管平滑筋細胞増殖刺激効果の阻害）

ＨＡｏＳＭＣ増殖を、例えば、ＢｒｄＵｒｄ組み込みにより測定し得る。手短には、４チャンバスライド上で増殖するコンフルエント未満の静止期細胞を、ＣＲＰまたはＦＩＴＣ標識化ＡＴ２－３ＬＰでトランスフェクトする。次いで、この細胞に１０％ウシ血清および６ｍｇ／ｍｌのＢｒｄＵｒｄをパルスする。２４時間後、ＢｒｄＵｒｄ染色キット（Ｚｙｍｅｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を用いることにより免疫細胞化学を実施する。簡略には、この細胞を、変性溶液への曝露後、ビオチン化マウス抗－ＢｒｄＵｒｄ抗体と４℃で２時間インキュベートし、次いでストレプトアビジン－ペルオキシダーゼおよびジアミノベンジジンとともにインキュベートする。ヘマトキシリンでの対比染色後、この細胞を顕微鏡試験のために標本にし、そしてＢｒｄ　Ｕｒｄ－陽性細胞を計数する。ＢｒｄＵｒｄ係数は、総細胞数に対するＢｒｄＵｒｄ－陽性細胞の割合として計算される。さらに、個々の細胞について、明野照明および暗野ＵＶ蛍光照明の同時使用により、ＢｒｄＵｒｄ染色（核）およびＦＩＴＣ取り込み（細胞質）の同時検出を実行する。（Ｈａｙａｓｈｉｄａら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．６：２７１（３６）：２１９８５～２１９９２（１９９６）を参照のこと）。

【０９９９】

本実施例において記載した研究は、本発明のポリペプチドの活性を試験した。しかし、当業者は、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、本発明のアゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【１０００】

（実施例３９：内皮遊走の刺激）

本実施例は、本発明のポリペプチドがリンパ性の内皮細胞遊走を刺激し得る可能性を探索するために用いられ得る。

【１００１】

内皮細胞遊走アッセイは、４８ウェルの微小走化性チャンバを用いて実行される（Ｎｅ

ｕｒｏｐｒｏｂｅ Ｉｎｃ．，Ｃａｂｉｎ Ｊｏｈｎ，ＭＤ；Ｆａｌｋ，Ｗら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ １９８０；３３：２３９～２４７）。ポリビニルピロリドンを含まないポリカーボネートフィルター（これは８μｍの孔径を備える）（Ｎｕｃｌｅｏｐｏｒｅ Ｃｏｒｐ．Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）を室温で少なくとも６時間０．１％ゼラチンでコートし、そして滅菌空気のもとで乾燥する。０．２５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を補充したＭ１９９中で試験物質を適切な濃度に希釈し、そして２５μｌの最終希釈を改変Ｂｏｙｄｅｎ装置の底部チャンバに置く。コンフルエント未満の、早期継代（２～６）のＨＵＶＥＣまたはＢＭＥＣ培養物を洗浄し、そして細胞の脱離に必要な最小の時間トリプシン処理する。底部チャンバと上部チャンバとの間のフィルターを配置した後、１％ＦＢＳを含有する５０μｌ Ｍ１９９中に懸濁した２．５×10^5細胞を上部コンパートメントに播種する。次いでこの装置を、５％ＣＯ２を用いて湿潤にしたチャンバ中で３７℃で５時間インキュベートして細胞を遊走させた。インキュベーション期間後、このフィルターを取り出し、そして非遊走細胞を有するフィルターの上部側をゴム性のポリスマン（ｐｏｌｉｃｅｍａｎ）でかきとる。このフィルターをメタノールで固定し、そしてＧｉｅｍｓａ溶液で染色する（Ｄｉｆｆ－Ｑｕｉｃｋ，Ｂａｘｔｅｒ，ＭｃＧｒａｗ Ｐａｒｋ，ＩＬ）。遊走は、それぞれのウェルにおいて、３つの無作為の高出力視野（４０×）の細胞を計数することにより定量する。そしてすべての群を４連で実行する。

【１００２】

本実施例において記載した研究は、本発明のポリペプチドの活性を試験した。しかし、当業者は、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、本発明のアゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【１００３】

（実施例４０：内皮細胞による一酸化窒素生成の刺激）

血管内皮による一酸化窒素の放出は、血管内皮弛緩の介在物質であると考えられてる。従って、本発明のポリペプチドの活性は、このポリペプチドに応答する内皮細胞による一酸化窒素産生を測定することによってアッセイされ得る。

【１００４】

一酸化窒素を、２４時間の飢餓、次いで、様々なレベルの陽性コントロール（例えば、ＶＥＧＦ－１）および本発明のポリペプチドへの４時間の曝露の後のコンフルエントな微小血管内皮細胞の９６ウェルプレート中で測定する。培地中の一酸化窒素を、Ｇｒｉｅｓｓ試薬の使用により定量して、硝酸還元酵素による一酸化硝酸由来の硝酸塩の還元後の亜硝酸の総量を測定する。一酸化窒素放出の際の本発明のポリペプチドの効果を、ＨＵＶＥＣにおいて試験する。

【１００５】

簡単には、培養したＨＵＶＥＣ単層からのＮＯ放出は、ＮＯメーター（Ｉｓｏ－ＮＯ，Ｗｏｒｌｄ Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｉｎｃ．）（１０４９）に接続したＮＯ特異的なポーラログラフ電極を用いて測定する。ＮＯエレメントの較正を、以下の式に従って行う：

$$2KNO_2+2KI+2H_2SO_4 \rightarrow 2NO+I_2+2H_2O+2K_2SO_4$$

検量線を、ＫＩおよびH_2SO_4を含む較正溶液中に段階的な濃度のKNO_2（０、５、１０、２５、５０、１００、２５０、および５００ｎｍｏｌ／Ｌ）を添加することによって得る。ＮＯに対するＩｓｏ－ＮＯ電極の特異性を、オーセンティックなＮＯ気体からのＮＯを測定することにより、事前に決定する（１０５０）。この培養培地を取り除き、そしてＨＵＶＥＣを、Ｄｕｌｂｅｃｃｏリン酸緩衝化生理食塩水で２回洗浄する。次いで、細胞を、６ウェルプレート中で５ｍｌのろ過したＫｒｅｂｓ－Ｈｅｎｓｅｌｅｉｔ溶液に浸し、そしてこの細胞プレートを、３７℃に温度を維持するために、スライドウォーマー（Ｌａｂ Ｌｉｎｅ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｉｎｃ．）で保持する。ＮＯセンサープローブをウェルに垂直に挿入して、異なる条件の追加の前に、電極の先端を溶液の表面の

２ｍｍ下で保持する。Ｓ－ニトロソアセチルペニシラミン（ＳＮＡＰ）を、陽性コントロールとして用いる。放出したＮＯの量を、１×１０^{6}内皮細胞あたりのピコモル濃度として表す。全ての報告した値は、各群（細胞培養ウェルの数）における４～６の測定値の平均である。Ｌｅａｋら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２１７：９６－１０５（１９９５）を参照のこと。

【１００６】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【１００７】

（実施例４１：新脈管形成における索形成に対する本発明のポリペプチドの効果）

新脈管形成における別の工程は、内皮細胞の分化により特徴付けられる索（ｃｏｒｄ）形成である。このバイオアッセイは、インビトロで培養した場合の微小血管内皮細胞の毛細管様構造（中空構造）を形成する能力を測定する。

【１００８】

ＣＡＤＭＥＣ（微小血管内皮細胞）を、増殖細胞（２継代）としてＣｅｌｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｉｎｃ．から購入し、Ｃｅｌｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ’ＣＡＤＭＥＣ Ｇｒｏｗｔｈ Ｍｅｄｉｕｍ中で培養し、そして５継代で使用する。インビトロ新脈管形成アッセイのために、４８ウェル細胞培養プレートのウェルをＣｅｌｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ’Ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ Ｆａｃｔｏｒ Ｍｅｄｉｕｍ（２００ｍｌ／ウェル）を用いて、３７℃にて３０分間コートする。ＣＡＤＭＥＣを、７，５００細胞／ウェルでコートしたウェルに播種し、Ｇｒｏｗｔｈ Ｍｅｄｉｕｍ中で一晩培養する。次いで、このＧｒｏｗｔｈ Ｍｅｄｉｕｍを、コントロール緩衝液または本発明のポリペプチド（０．１～１００ｎｇ／ｍｌ）を含む３００ｍｇのＣｅｌｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ’Ｃｈｏｒｄ Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍと交換し、そしてこの細胞をさらに４８時間培養する。毛細管様索の数および長さを、Ｂｏｅｃｋｅｌｅｒ ＶＩＡ－１７０ビデオ画像分析装置の使用を通じて定量する。全てのアッセイを三連で行った。

【１００９】

市販の（Ｒ＆Ｄ）ＶＥＧＦ（５０ｎｇ／ｍｌ）を、陽性コントロールとして用いる。ｂ－エストラジオール（１ｎｇ／ｍｌ）を、陰性コントロールとして用いる。適切な緩衝液（タンパク質なし）もまた、コントロールとして利用する。

【１０１０】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチドの活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【１０１１】

（実施例４２：ニワトリ漿尿膜に対する脈管形成効果）

ニワトリ漿尿膜（ＣＡＭ）は、新脈管形成を試験するために十分に確立した系である。ＣＡＭにおける血管形成は、容易に可視化および定量可能である。本発明のポリペプチドのＣＡＭにおける新脈管形成を刺激する能力を試験し得る。

【１０１２】

ニワトリ白色レグホン（Ｇａｌｌｕｓ ｇａｌｌｕｓ）の受精卵および日本ウズラ（ｑｕａｌ）（Ｃｏｔｕｒｎｉｘ ｃｏｔｕｒｎｉｘ）を、３７．８℃および湿度８０％でインキュベートする。１６日齢のニワトリの分化したＣＡＭおよび１３日齢のウズラの胚を以下の方法で研究する。

【１０１３】

発生の４日目に、ニワトリ卵の卵殻に窓を作る。この胚を正常な発生について調べ、そしてこの卵をセロテープ（登録商標）で封着する。これらを、さらに１３日目までインキュベートする。Ｔｈｅｒｍａｎｏｘカバーガラス（Ｎｕｎｃ，Ｎａｐｅｒｖｉｌｌｅ，ＩＬ）を、直径約５ｍｍのディスクに切る。滅菌かつ無塩成長因子を滅菌水に溶解し、そし

て約３．３ｍｇ／５ｍｌをディスクにピペットで移す。風乾後、逆さにしたディスクをＣＡＭに適用する。３日後、標本を３％グルタルアルデヒドおよび２％ホルムアルデヒド中に固定し、そして０．１２Ｍカコジル酸ナトリウム緩衝液ですすぐ。これらを実体顕微鏡［Ｗｉｌｄ　Ｍ８］を用いて写真撮影し、上記のように半薄層切片化および超薄層切片化のために包埋する。コントロールを、キャリアディスクのみを用いて行う。

【１０１４】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【１０１５】

（実施例４３：マウスにおけるＭａｔｒｉｇｅｌ移植片を用いる新脈管形成アッセイ）

本発明のポリペプチドのインビボ新脈管形成アッセイは、既存の毛細管網様構造の、マウス細胞外マトリックス物質（Ｍａｔｒｉｇｅｌ）の移植したカプセル中に新しい脈管を形成する能力を測定する。このタンパク質を、４℃で液体Ｍａｔｒｉｇｅｌと混合し、次いでこの混合物を、マウスに皮下（ここで、この混合物は凝固する）注射する。７日後、Ｍａｔｒｉｇｅｌの固体「プラグ」を取り除き、そして新しい血管の存在について試験する。Ｍａｔｒｉｇｅｌを、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｌａｂｗａｒｅ／Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓから購入する。

【１０１６】

４℃で解凍した時、Ｍａｔｒｉｇｅｌ物質は液体である。このＭａｔｒｉｇｅｌを、４℃にて１５０ｎｇ／ｍｌで本発明のポリペプチドと混合し、冷３ｍｌシリンジ中に引き抜く。約８週齢の雌性Ｃ５７Ｂ１／６マウスに、腹部の中腹側面の２つの部位にＭａｔｒｉｇｅｌおよび実験タンパク質の混合物を注射する（０．５ｍｌ／部位）。７日後、このマウスを頚椎脱臼により屠殺し、Ｍａｔｒｉｇｅｌプラグを取り除きそして洗浄する（すなわち、全ての付着する膜および線維組織を取り除く）。同じ全プラグを中性緩衝化１０％ホルムアミド中に固定し、パラフィン中に包埋し、そしてＭａｓｓｏｎ’ｓ　Ｔｒｉｃｈｒｏｍｅで染色後、組織学的試験のために切片を作製するために使用する。各プラグの３つの異なる領域由来の断面をプロセスする。選択した切片をｖＷＦの存在について染色する。このアッセイについての陽性コントロールは、ウシ塩基性ＦＧＦ（１５０ｎｇ／ｍｌ）である。Ｍａｔｒｉｇｅｌ単独を用いて、新脈管形成の基礎レベルを決定する。

【１０１７】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【１０１８】

（実施例４４：ウサギ下肢モデルにおける虚血の救出）

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの虚血に対するインビボでの効果を研究するため、ウサギ後肢虚血モデルを、以前に記載される（Ｔａｋｅｓｈ．ｉｔａら、Ａｍ　Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ　１４７：１６４９－１６６０（１９９５））ように１つの大腿動脈の外科的除去により作製する。大腿動脈の切除は、血栓の逆行性伝播および外腸骨動脈の閉塞を生じる。結果として、虚血肢への血流は、内腸骨動脈から生じる側副血管に依存する（Ｔａｋｅｓｈｉｔａら、Ａｍ　Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ　１４７：１６４９－１６６０（１９９５））。１０日の間隔で、ウサギの手術後の回復および内因性の側副血管の発達を可能にする。手術（０日）後１０日目に、ベースライン血管造影を行った後、虚血肢の内腸骨動脈を、本発明のポリヌクレオチドを含む５００ｍｇの裸の発現プラスミドを用いて、（Ｒｉｅｓｓｅｎら、Ｈｕｍ　Ｇｅｈｅ　Ｔｈｅｒ．４：７４９－７５８（１９９３）；Ｌｅｃｌｅｒｃら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９０：９３６－９４４（１９９２））に記載されるように、ヒドロゲル被覆バルーンカテーテルを用いる動脈遺伝子移入技術により、トランスフェクトする。本発明のポリペプチドを処置に用いる場合、５００ｍｇの本発明のポリペプチドまたはコントロールの単回ボーラスを、注入カテーテルを通じて１

分間にわたり、虚血肢の内腸骨動脈中に送達する。３０日目に、種々のパラメーターを、これらのウサギで測定する：（ａ）ＢＰ比－虚血肢の収縮期血圧　対　正常肢の収縮期血圧の比；（ｂ）血流および逆流－停止ＦＬ：非拡張性状態の間の血流、および最大ＦＬ：完全な拡張性状態の間の血流（これはまた、血管量の間接的測定）、そして逆流は、最大ＦＬ：停止ＦＬの比に反映される；（ｃ）血管造影値（ａｎｇｉｏｇｒａｐｈｉｃ　Ｓｃｏｒｅ）－これを側副血管の血管造影により測定する。スコアを、オーバーレイグリッド（ｏｖｅｒｌａｙｉｎｇ　ｇｒｉｄ）内の円の百分率（ウサギ大腿の総数ｍで割った横断不透明化動脈を用いる）により決定する；（ｄ）毛細管（ｃａｐｉｌｌａｒｙ）密度－側副毛細血管の数は、後肢から得た光学顕微鏡用切片において決定した。

【１０１９】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のアゴニストおよび／またはアンタゴニストを試験し得る。

【１０２０】

（実施例４５：本発明のポリペプチドの血管拡張に対する効果）

血管内皮の拡張は、血圧の低下に重要であるので、自然発症高血圧ラット（ＳＨＲ）における、本発明のポリヌクレオチドの血圧に影響する能力を、試験する。漸増用量（０、１０、３０、１００、３００、および９００ｍｇ／ｋｇ）の本発明のポリペプチドを、１３～１４週齢の自然発症高血圧ラット（ＳＨＲ）に投与する。データを、平均＋／－ＳＥＭで表す。統計学的分析を、両側ｔ検定を用いて行い、そして統計的な有意性を、ｐ＜０．０５　対　緩衝液単独への応答としそ定義する。

【１０２１】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【１０２２】

（実施例４６：ラット虚血皮膚弁モデル）

評価パラメーターとして、皮膚の血流、皮膚温度、および第ＶＩＩＩ因子の免疫組織化学または内皮アルカリホスファターゼ反応が挙げられる。皮膚虚血の間の本発明のポリペプチドの発現を、インサイチュハイブリダーゼーションを用いて研究する。

【１０２３】

このモデルにおける研究を、以下の３つの部分に分ける：

ａ）虚血皮膚

ｂ）虚血皮膚創傷

ｃ）通常の創傷。

【１０２４】

実験プロトコルは以下を含む：

ａ）３×４ｃｍの単一茎全層無作為皮膚弁（ｓｉｎｇｌｅ　ｐｅｄｉｃｌｅ　ｆｕｌｌ－ｔｈｉｃｋｎｅｓｓ　ｒａｎｄｏｍ　ｓｋｉｎ　ｆｌａｐ）（動物の下背部にわたる筋皮弁）を生じさせる。

【１０２５】

ｂ）虚血皮膚（皮膚弁）に切除創傷をつくる（直径４～６ｍｍ）

ｃ）次の種々の投薬範囲の本発明のポリペプチドによる、切除創傷（創傷後の０、１、２、３、４日目）の局所的な処置：１ｍｇ～１００ｍｇ

ｄ）組織学的研究、免疫組織化学的研究、およびインサイチュ研究のために、創傷後の３、５、７、１０、１４、および２１日目に創傷組織を収集する。

【１０２６】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【１０２７】
（実施例４７：末梢動脈疾患モデル）
本発明のポリペプチドを用いる脈管形成治療は、末梢動脈疾患の場合の虚血の周囲の血流の回復を得る新規の治療的ストラテジーである。実験プロトコルは以下を含む：
ａ）一方の片側の大腿動脈を、後肢の虚血筋肉を作製するために結紮し、他方の片側の後肢は、コントロールの役割をする。
【１０２８】
ｂ）本発明のポリペプチドを、２０ｍｇ～５００ｍｇの投薬範囲で、一週間あたり静脈内および／または筋肉内に３回（おそらくそれより多く）で２～３週間、送達する。
【１０２９】
ｃ）この虚血筋肉組織を、大腿動脈の結紮後、本発明のポリペプチドの発現の分析ならびに組織学のために、１、２、および３週間目に収集する。生検もまた、他方の片側の対側後肢の正常な筋肉において行う。
【１０３０】
本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。
【１０３１】
（実施例４８：虚血性心筋疾患モデル）
本発明のポリペプチドを、側副血管の発達を刺激し得、かつ冠状動脈閉塞後の新しい血管を再構成し得る強力なマイトジェンとして評価する。ポリペプチドの発現の変化を、インサイチュで調査する。実験プロトコルは、以下を含む：
ａ）心臓を、ラットの左側開胸術を介して露出する。直ちに、左冠状動脈を、細い縫合糸（６－０）を用いて咬合し、そして胸郭を閉じる。
【１０３２】
ｂ）本発明のポリペプチドを、２０ｍｇ～５００ｍｇの投薬範囲で、一週間あたり静脈内および／または筋肉内に３回（おそらくそれより多く）で２～４週間、送達する。
【１０３３】
ｃ）手術の３０日後、この心臓を、形態測定のために取り出しそして横断切片化し、そしてインサイチュで分析する。
【１０３４】
本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。
【１０３５】
（実施例４９：ラット角膜創傷治癒モデル）
この動物モデルは、本発明のポリペプチドの、新生血管形成に対する効果を示す。実験プロトコルは、以下を含む：
ａ）角膜の中心から間質層へと１～１．５ｍｍの長い切開を作る
ｂ）目の外端に面する切開の唇縁の下にスパーテルを挿入する
ｃ）ポケットを作る（その基底は、目の縁から（ｆｏｒｍ）１～１．５ｍｍである）
ｄ）５０ｎｇ～５μｇ（ｕｇ）の本発明のポリペプチドを含む小丸剤を、ポケット内に配置する
ｅ）本発明のポリペプチドでの処置をまた、２０ｍｇ～５００ｍｇの投薬範囲内で（毎日の処置を５日間）角膜創傷に局所的に適用し得る。
【１０３６】
本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。
【１０３７】

（実施例５０：糖尿病マウスおよび糖質コルチコイド障害性創傷治癒モデル）
（Ａ．糖尿病ｄｂ＋／ｄｂ＋マウスモデル）
本発明のポリペプチドが治癒プロセスを促進することを実証するために、創傷治癒の遺伝的糖尿病マウスモデルを、使用する。ｄｂ＋／ｄｂ＋マウスにおける全層（ｆｕｌｌ　ｔｈｉｃｋｎｅｓｓ）創傷治癒モデルは、障害性の創傷治癒の十分に特徴付けられた、臨床的に関連性のある、そして再現可能なモデルである。糖尿病性創傷の治癒は、収縮よりむしろ肉芽組織の形成および再上皮形成に依存する（Ｇａｒｔｎｅｒ，Ｍ．Ｈ．ら、Ｊ．Ｓｕｒｇ．Ｒｅｓ．５２：３８９（１９９２）；Ｇｒｅｅｎｈａｌｇｈ，Ｄ．Ｇ．ら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１３６：１２３５（１９９０））。

【１０３８】

この糖尿病動物は、ＩＩ型真性糖尿病において観察される特徴的な特性の多くを有する。ホモ接合（ｄｂ＋／ｄｂ＋）マウスは、それらの正常なヘテロ接合（ｄｂ＋／＋ｍ）同腹仔と比較して肥満である。変異体糖尿病（ｄｂ＋／ｄｂ＋）マウスは、第４染色体（ｄｂ＋）上の単一の常染色体性の劣性変異を有する（Ｃｏｌｅｍａｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：２８３－２９３（１９８２））。動物は、多食症、多渇症、および多尿症を示す。変異体糖尿病マウス（ｄｂ＋／ｄｂ＋）は、上昇した血中グルコース、増加したまたは正常なインスリンレベル、および抑制された細胞媒介性免疫を有する（Ｍａｎｄｅｌら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２０：１３７５（１９７８）；Ｄｅｂｒａｙ－Ｓａｃｈｓ，Ｍ．ら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５１（１）：１－７（１９８３）；Ｌｅｉｔｅｒら、Ａｍ．Ｊ．ｏｆ　Ｐａｔｈｏｌ．１１４：４６－５５（１９８５））。末梢神経障害、心筋合併症、および微小血管損傷、基底膜肥厚および糸球体濾過異常は、これらの動物において記載されている（Ｎｏｒｉｄｏ，Ｆ．ら、Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｌ．８３（２）：２２１－２３２（１９８４）；Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎら、Ｄｉａｂｅｔｅｓ　２９（１）：６０－６７（１９８０）；Ｇｉａｃｏｍｅｌｌｉら、Ｌａｂ　Ｉｎｖｅｓｔ．４０（４）：４６０－４７３（１９７９）；Ｃｏｌｅｍａｎ，Ｄ．Ｌ．Ｄｉａｂｅｔｅｓ　３１（補遺）：１－６（１９８２））。これらのホモ接合糖尿病マウスは、高血糖症を発症し、そしてこれは、ヒトＩＩ型糖尿病に類似してインスリンに対して耐性である（Ｍａｎｄｅｌら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２０：１３７５－１３７７（１９７８））。

【１０３９】

これらの動物において観察した特徴は、このモデルにおける治癒が、ヒト糖尿病において観察される治癒に類似し得ることを示す（Ｇｒｅｅｎｈａｌｇｈら、Ａｍ．Ｊ．ｏｆ　Ｐａｔｈｏｌ．１３６：１２３５－１２４６（１９９０））。

【１０４０】

遺伝的糖尿病の雌性Ｃ５７ＢＬ／ＫｓＪ（ｄｂ＋／ｄｂ＋）マウス、およびそれらの非糖尿病（ｄｂ＋／＋ｍ）ヘテロ接合性同腹仔を、この研究に用いた（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）。これらの動物を６週齢で購入する。研究の開始時は８週齢である。動物を個別に飼育し、そして自由に食物と水を与える。全ての操作を、無菌操作を用いて行う。この実験を、Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．のＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ　ａｎｄ　ｔｈｅ　Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　ｏｆ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌｓの規則およびガイドラインに従って行う。

【１０４１】

創傷プロトコルを、以前に報告された方法（Ｔｓｕｂｏｉ，Ｒ．およびＲｉｆｋｉｎ，Ｄ．Ｂ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７２：２４５－２５１（１９９０））に従って行う。簡単には、創傷させる日に、動物を、脱イオン水に溶解したＡｖｅｒｔｉｎ（０．０１ｍｇ／ｍＬ）、２，２，２－トリブロモエタノールおよび２－メチル－２－ブタノールの腹腔内注射で麻酔する。この動物の背面領域を剃毛し、そして皮膚を７０％エタノール溶液およびヨウ素で洗浄する。手術範囲を、創傷させる前に滅菌ガーゼで乾燥させる。次いで

、８ｍｍの全層の創傷を、Ｋｅｙｅｓ組織パンチを用いて作製する。創傷させた直後に、周囲の皮膚を、創傷の拡大を取り除くために穏やかに伸ばす。実験の間、この創傷を開放しておく。処置の適用は、創傷させた日から５日間連続で、局所的に受ける。処置の前に、創傷を、滅菌生理食塩水およびガーゼスポンジを用いて穏やかに洗浄する。

【１０４２】

創傷を視覚的に検査し、そして手術の日およびその後２日間隔で、固定した距離で写真撮影する。創傷閉鎖を、１～５日目および８日目の日々の測定により決定する。創傷を目盛り付き（ｃａｌｉｂｒａｔｅｄ）Ｊａｍｅｓｏｎ測径器（ｃａｌｉｐｅｒ）を用いて水平および垂直に測定する。肉芽組織がもはや目に見えず、そして創傷を連続した上皮が覆う場合に、創傷を治癒したとみなす。

【１０４３】

本発明のポリペプチドを、ビヒクル中で８日間、異なる投薬範囲（１日あたり創傷あたり４ｍｇ～５００ｍｇ）を用いて投与する。ビヒクルコントロール群に、５０ｍＬのビヒクル溶液を与えた。

【１０４４】

動物を、８日目にペントバルビタールナトリウム（３００ｍｇ／ｋｇ）の腹腔内注射で安楽死させる。次いで、創傷および周囲の皮膚を、組織学および免疫組織化学のために収集する。組織標本を、さらなる処理のために、生検スポンジの間の組織カセット内で１０％中性緩衝化ホルマリン中に置く。

【１０４５】

各々１０匹の動物（５匹の糖尿病および５匹の非糖尿病コントロール）の３つの群：１）ビヒクルプラシーボコントロール、２）非処置群、および３）処置群を、評価する。

【１０４６】

創傷閉鎖を、水平軸および垂直軸で面積を測定すること、および創傷の面積の合計を得ることにより分析する。次いで、収縮を、最初の創傷の面積（０日）と処置後（８日）の面積との間の差異を確立することにより評価する。１日目のこの創傷面積は、６４ｍｍ^2（皮膚パンチに対応するサイズ）である。計算を以下の式を用いて行う：

［８日目の開放面積］－［１日目の開放面積］／［１日目の開放面積］

標本を１０％緩衝化ホルマリン中に固定し、そしてパラフィン包埋塊を、創傷表面に対して垂直に切り出し（５ｍｍ）、そしてＲｅｉｃｈｅｒｔ－Ｊｕｎｇミクロトームを用いて切断する。慣用的なヘマトキシリン－エオシン（Ｈ＆Ｅ）染色を、二等分した創傷の横断切片で行う。創傷の組織学的試験を用いて、修復した皮膚の治癒プロセスおよび形態的な外見を、本発明のポリペプチドを用いる処置によって改変したかどうかを評価する。この評価は、細胞蓄積、炎症細胞、毛細管、線維芽細胞、再上皮形成、および表皮成熟の存在の検証を含む（Ｇｒｅｅｎｈａｌｇｈ，Ｄ．Ｇ．ら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１３６：１２３５（１９９０））。目盛り付きレンズマイクロメーターを盲検観察者（ｂｌｉｎｄｅｄ　ｏｂｓｅｒｖｅｒ）が用いる。

【１０４７】

組織切片をまた、ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅ検出システムを使用してポリクローナルウサギ抗ヒトケラチン抗体で免疫組織化学的に染色する。ヒト皮膚を陽性組織コントロールとして用いる一方、非免疫ＩｇＧを陰性コントロールとして用いる。ケラチノサイト増殖を、目盛り付きレンズマイクロメーターを用いて創傷の再上皮形成の程度を評価することによって決定する。

【１０４８】

皮膚標本における増殖細胞核抗原／サイクリン（ＰＣＮＡ）を、ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅ検出システムを用いて抗ＰＣＮＡ抗体（１：５０）を使用することにより実証する。ヒト結腸癌は、陽性組織コントロールとして役割を果たし得、そしてヒト脳組織を、陰性組織コントロールとして用い得る。各標本は、１次抗体の脱落および非免疫マウスＩｇＧとの置換を有する切片を含む。これらの切片の順位は、０～８のスケール（わずかな増殖を反映するより低い側のスケール～激しい増殖を反映するより高い側）の増殖の程度に基づく。

【１０４９】
実験データを、片側ｔ検定を用いて分析する。＜０．０５のｐ値を有意とみなす。
【１０５０】
（Ｂ．ステロイド障害性ラットモデル）
ステロイドによる創傷治癒の阻害は、種々のインビトロおよびインビボ系において十分に実証されている（Ｗａｈｌ，Ｇｌｕｃｏｃｏｒｔｉｃｏｉｄｓ ａｎｄ Ｗｏｕｎｄ ｈｅａｌｉｎｇ：Ａｎｔｉ－Ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ａｃｔｉｏｎ：Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｓｐｅｃｔｓ．２８０－３０２（１９８９）；Ｗａｈｌら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１５：４７６－４８１（１９７５）；Ｗｅｒｂら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１４７：１６８４－１６９４（１９７８））。糖質コルチコイドは、新脈管形成を阻害すること、血管透過性（Ｅｂｅｒｔら、Ａｎ．Ｉｎｔｅｒｎ．Ｍｅｄ．３７：７０１－７０５（１９５２））、線維芽細胞増殖、およびコラーゲン合成（Ｂｅｃｋら、Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ．５：２９５－３０４（１９９１）；Ｈａｙｎｅｓら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．６１：７０３－７９７（１９７８））を低下させること、ならびに循環する単球の一過性の減少を生じること（Ｈａｙｎｅｓら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．６１：７０３－７９７（１９７８）；Ｗａｈｌ，「Ｇｌｕｃｏｃｏｒｔｉｃｏｉｄｓ ａｎｄ ｗｏｕｎｄ ｈｅａｌｉｎｇ」：Ａｎｔｉｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ａｃｔｉｏｎ：Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｓｐｅｃｔｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２８０－３０２頁（１９８９））によって創傷治癒を遅延させる。障害性創傷治癒に対するステロイドの全身性投与は、ラットにおいて十分に確立された現象である（Ｂｅｃｋら、Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ．５：２９５－３０４（１９９１）；Ｈａｙｎｅｓら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．６１：７０３－７９７（１９７８）；Ｗａｈｌ，「Ｇｌｕｃｏｃｏｒｔｉｃｏｉｄｓ ａｎｄ ｗｏｕｎｄ ｈｅａｌｉｎｇ」：Ａｎｔｉｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ Ｓｔｅｒｏｉｄ Ａｃｔｉｏｎ：Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｓｐｅｃｔｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２８０－３０２頁（１９８９）；Ｐｉｅｒｃｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：２２２９－２２３３（１９８９））。
【１０５１】
本発明のポリペプチドが治癒プロセスを促進し得ることを実証するために、治癒が、メチルプレドニゾロンの全身性投与により損なわれる、ラットの全層切除皮膚創傷に対するポリペプチドの複数の局所適用の効果を評価する。
【１０５２】
若年成体の雄性Ｓｐｒａｇｕｅ Ｄａｗｌｅｙラット（体重２５０～３００ｇ）（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）をこの実験に用いる。この動物を、８週齢で購入する。そして研究の開始時は９週齢である。ラットの治癒応答は、創傷の時点で、メチルプレドニゾロンの全身性投与（１７ｍｇ／ｋｇ／ラット、筋肉内）により損なわれる。動物を個別に飼育し、そして自由に食物と水を与える。全ての操作を、無菌技術を用いて行う。この研究を、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＩｎｃのＩｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ａｎｄ ｔｈｅ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓの規則およびガイドラインに従って行う。
【１０５３】
創傷プロトコルは、上記Ａ節に従う。創傷させる日に、動物をケタミン（５０ｍｇ／ｋｇ）およびキシラジン（５ｍｇ／ｋｇ）の筋肉内注射で麻酔する。この動物の背面領域を剃毛し、そして皮膚を７０％エタノールおよびヨウ素溶液で洗浄する。手術範囲を、創傷させる前に滅菌ガーゼで乾燥させる。８ｍｍの全層創傷をＫｅｙｅｓ組織パンチを用いて作製する。実験の間、この創傷の左を開放する。試験物質の適用を、創傷させ、次いでメチルメチルプレドニゾロン投与した日から開始して、７日間連続で、１日１回、局所的に

与える。処置の前に、創傷を滅菌生理食塩水およびガーゼスポンジを用いて穏やかに洗浄する。

【１０５４】

創傷を視覚的に検査し、そして創傷させた日および処置の終りに、固定した距離で写真撮影する。創傷閉鎖を、１～５日目の毎日および８日目の測定により決定する。創傷を目盛り付き（Ｃａｌｉｂｒａｔｅｄ）Ｊａｍｅｓｏｎノギスを用いて水平および垂直に測定する。創傷を、肉芽組織がもはや目に見えずかつ創傷を連続した上皮が覆う場合に、治癒したとみなす。

【１０５５】

本発明のポリペプチドを、ビヒクル中で８日間、異なる用量の範囲（１日あたり創傷あたり４ｍｇ～５００ｍｇ）を用いて投与する。ビヒクルコントロール群は、５０ｍＬのビヒクル溶液を受けた。

【１０５６】

動物を、８日目にペントバルビタールナトリウム（３００ｍｇ／ｋｇ）の腹腔内注射で安楽死させる。次いで、創傷および周囲の皮膚を、組織学のために収集する。組織標本を、さらなるプロセシングのために、生検スポンジの間の組織カセット内で１０％中性緩衝化ホルマリン中に置く。

【１０５７】

各々１０匹の動物（メチルプレドニゾロンを用いる５匹および糖質コルチコイドを用いない５匹）の４つの群を評価する：１）非処置群、２）ビヒクルプラシーボコントロール、３）処置群。

【１０５８】

創傷閉鎖を、垂直軸および水平軸で面積を測定すること、および創傷の面積の合計を得ることにより分析する。次いで、閉鎖を、最初の創傷の面積（０日）と処置後（８日）の面積との間の差異を確立することにより評価する。１日目のこの創傷面積は、６４mm^2（皮膚パンチに対応するサイズ）である。計算を以下の式を用いて行う：

［８日目の開放面積］－［１日目の開放面積］／［１日目の開放面積］

標本を１０％緩衝化ホルマリン中に固定し、そしてパラフィン包埋塊を、創傷表面に対して垂直に切り出し（５ｍｍ）、そしてＯｌｙｍｐｕｓミクロトームを用いて切断する。慣用的なヘマトキシリン－エオシン（Ｈ＆Ｅ）染色を、二等分した創傷の横断切片で行う。創傷の組織学的試験は、修復した皮膚の治癒プロセスおよび形態的な外見を、本発明のポリペプチドを用いる処置によって改善したかどうかを評価することを可能にする。目盛り付きレンズマイクロメーターを盲検観察者（ｂｌｉｎｄｅｄ　ｏｂｓｅｒｖｅｒ）が用いて、創傷の隙間の距離を決定する。

【１０５９】

実験データを、片側ｔ検定を用いて分析する。＜０．０５のｐ値を有意とみなす。

【１０６０】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【１０６１】

（実施例５１：リンパ水腫（ｌｙｍｐｈａｄｅｍａ）動物モデル）

この実験アプローチの目的は、ラット後肢におけるリンパ管形成およびリンパの循環系の再確立における本発明のポリペプチドの治療的効果を試験するための、適切かつ一貫したリンパ水腫モデルを作製することである。有効性は、罹患した肢の腫脹体積、リンパの脈管の量の定量、総血漿タンパク質の量、および組織病理学により測定される。急性リンパ水腫は、７～１０日間観察される。恐らくより重要なことは、水腫の慢性進行は、３～４週間まで続く。

【１０６２】

手術を始める前に、血液サンプルを、タンパク質濃度分析のために採血する。雄性ラッ

ト（体重約３５０ｇ）に、ペントバルビタールを投薬する。次いで、右肢を膝から股関節部まで剃毛する。この剃毛した範囲を７０％ＥｔＯＨに浸したガーゼで拭く。血液を、血清総タンパク質試験のために採血する。周径測定および体積測定を行った後に、２つの測定レベル（踵の０．５ｃｍ上、足背の中間点）に印をつけた後、足へ色素を注射する。右足背および左足背の両方の内皮に、０．０５ｍｌの１％Ｅｖａｎ’ｓ　Ｂｌｕｅを注射する。次いで、足への色素の注射の後、周径測定および体積測定を行う。

【１０６３】

目印として膝関節を用いて、中肢単径部切開を、大腿血管の位置を確認できるように環状に行う。鉗子および止血剤を用いて、皮膚弁を切開し、そして分離する。大腿血管の位置確認後、血管の横に沿ってかつ血管の下に走るリンパ管を位置確認する。次いで、この範囲の主要なリンパ管を、電気凝固縫合結紮する。

【１０６４】

顕微鏡を用いて、肢の背の筋肉（半腱様筋（ｓｅｍｉｔｅｎｄｉｎｏｓｉｓ）および内転筋の付近）を平滑に切開する。次いで、膝窩リンパ節の位置を確認する。次いで、２つの近位リンパ管および２つの遠位リンパ管、ならびに膝窩節の遠位血液供給部を縫合糸により結紮する。次いで、膝窩リンパ節および任意の付随する脂肪組織を、結合組織を切断することによって取り除く。

【１０６５】

この手順で生じるいかなる軽度の出血をも管理するように注意すること。リンパ管を咬合した後、皮膚弁を、液体皮膚（Ｖｅｔｂｏｎｄ）（ＡＪ　Ｂｕｃｋ）を使用することによって密封する。別々の皮膚縁を、その下の筋肉組織に、脚の周囲に約０．５ｃｍのギャップを残しながら密封する。皮膚はまた、必要なときにその下の筋肉に縫合することによって係留してもよい。

【１０６６】

感染を回避するために、動物を、メッシュを用いて個別に収容する（床敷きなし）。回復した動物を、最適な水腫ピークを通して毎日チェックする。このピークは、代表的には５～７日まで生じる。次いで、プラトーの水腫ピークを観察する。リンパ水腫の強度を評価するために、各肢上の２つの指定した場所の周径および体積を、操作の前および７日間毎日測定する。リンパ水腫に対する血漿タンパク質の効果を決定し、そしてタンパク質分析が有用な試験周界であるか否かもまた調査する。コントロール肢および水腫肢の両方の重量を、２箇所で評価する。分析を盲目様式（ｂｌｉｎｄ　ｍａｎｎｅｒ）で行う。

【１０６７】

周径測定：肢の動きを防止するための短期気体麻酔のもとで、布巻尺を使用して、肢の周径を測定する。測定を、距骨および背面の足にて、２人の異なる人物によって行い、次いで、これらの２つの読み取りを平均する。読み取りを、コントロールおよび水腫肢の両方から得る。

【１０６８】

体積測定：手術の日に、動物をペントバルビタールで麻酔し、そして手術の前に試験する。毎日の体積測定のために、動物を短期ハロタン麻酔（迅速な固定化およびすばやい回復）のもとにおき、両方の脚を剃毛し、そして耐水性マーカーを用いて脚に等しく印をつける。脚を、最初に水に漬け、次いで各々印をしたレベルまで装置に漬け、次いでＢｕｘｃｏ水腫ソフトウェア（Ｃｈｅｎ／Ｖｉｃｔｏｒ）によって測定する。データを１人の人物によって記録し、一方他者は、脚をしるしを付けた領域まで漬ける。

【１０６９】

血液－血漿タンパク質測定：手術の前に血液を取り出し、遠心分離し、そして血清を分離し、次いで、全タンパク質およびＣａ２＋比較について結論付ける。

【１０７０】

肢重量比較：血液を取り出した後、この動物を、組織収集のために調製する。この肢を、キリチン（ｑｕｉｌｌｉｔｉｎｅ）を用いて切断し、次いで、実験用脚とコントロール脚の両方を、結紮して切断し、そして秤量する。２回目の秤量を、脛踵（ｔｉｂｉｏ－ｃ

ａｃａｎｅａｌ）関節を外し、そして足を秤量して行う。

【１０７１】

組織学的調製：膝（膝窩）領域の後ろに位置する横筋を切り出し、そして金属型に配置し、ｆｒｅｅｚｅＧｅｌで満たし、冷メチルブタンに漬け、標識したサンプルバッグに切断するまで－８０ＥＣにて配置する。切断の際に、筋肉を、蛍光顕微鏡のもとで、リンパ管について観察する。

【１０７２】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【１０７３】

（実施例５２：ＴＮＦα誘導性接着分子発現の本発明のポリペプチドによる抑制）

炎症および新脈管形成の領域に対するリンパ球の漸増は、リンパ球上の細胞表面接着分子（ＣＡＭ）と血管内皮との間の特異的なレセプター－リガンド相互作用に関する。この接着プロセスは、通常の設定および病理学的設定の両方において、細胞間接着分子－１（ＩＣＡＭ－１）、血管細胞接着分子－１（ＶＣＡＭ－１）、および内皮細胞（ＥＣ）における内皮白血球接着分子－１（Ｅ－セレクチン）発現を含む、多段階カスケードに続く。これらの分子および他の分子の血管内皮における発現は、白血球が局所血管系に接着し得、そして炎症応答の発生の間に局所組織に溢出し得る効率を決定する。サイトカインおよび増殖因子の局所濃度は、これらのＣＡＭの発現の調節に関与する。

【１０７４】

腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）（強力なプロ炎症性サイトカイン）は、内皮細胞における３つ全てのＣＡＭの刺激因子であり、そして広範な種々の炎症応答に関与し得、しばしば病理学的結果をもたらす。

【１０７５】

ＴＮＦ－α誘導性ＣＡＭ発現の抑制を媒介する本発明のポリペプチドの潜在能力を試験し得る。改変型ＥＬＩＳＡアッセイ（これは、固相吸着剤としてＥＣを使用する）を使用して、ＦＧＦファミリーのタンパク質のメンバーを用いて同時刺激した場合に、ＴＮＦ－α処理タンパク質ＥＣにおけるＣＡＭ発現の量を測定する。

【１０７６】

この実験を行うために、ヒト膀静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）培養物を、プールした索採取物から得、そして１０％ＦＣＳおよび１％ペニシリン／ストレプトマイシンを補充した増殖培地（ＥＧＭ－２；Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）中で、５％CO_2を含む３７℃の加湿インキュベーターにおいて維持する。ＨＵＶＥＣを、ＥＧＭ培地中1×10^4細胞／ウェルの濃度で、９６ウェルプレート中に、３７℃で１８～２４時間またはコンフルエントになるまで播種する。続いて、単層を、１００Ｕ／ｍｌペニシリンおよび１００ｍｇ／ｍｌストレプトマイシンを補充したＲＰＭＩ－１６４０の無血清溶液で３回洗浄し、そして所定のサイトカインおよび／または増殖因子を用いて、２４時間３７℃にて処理した。インキュベーション後、次いで、この細胞を、ＣＡＭ発現について評価する。

【１０７７】

ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）を、標準的な９６ウェルプレートにおいてコンフルエントになるまで増殖させる。増殖培地を、細胞から取り除き、そして９０μｌの１９９培地（１０％ＦＢＳ）に置き換える。試験のためのサンプルおよびポジティブまたはネガティブコントロールを、このプレートに三連で添加する（１０μｌ容量）。プレートを、３７℃にて、５時間（セレクチンおよびインテグリン発現）または２４時間（インテグリン発現のみ）のいずれかでインキュベートする。プレートを吸引して、培地を除去し、そして１００μｌの０．１％パラホルムアルデヒド－ＰＢＳ（Ｃａ＋＋およびＭｇ＋＋を有する）を各ウェルに添加する。プレートを、４℃にて３０分間保持する。

【１０７８】

次いで、固定液をウェルから除去し、そしてウェルをＰＢＳ（＋Ｃａ、Ｍｇ）＋０．５％ＢＳＡを用いて１回洗浄し、そして排水する。このウェルを乾燥させないこと。１０μｌの希釈した一次抗体を、試験ウェルおよびコントロールウェルに添加する。抗ＩＣＡＭ－１－Ｂｉｏｔｉｎ、抗ＶＣＡＭ－１－Ｂｉｏｔｉｎおよび抗Ｅ－セレクチン－Ｂｉｏｔｉｎを、１０μｇ／ｍｌの濃度（０．１ｍｇ／ｍｌストック抗体の１：１０希釈）で使用する。細胞を、加湿した環境において、３７℃にて３０分間インキュベートする。ウェルを、ＰＢＳ（＋Ｃａ、Ｍｇ）＋０．５％ＢＳＡを用いて３回洗浄する。

【１０７９】

次いで、２０μｌの希釈したＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎ－Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈｏｔａｓｅ（１：５，０００希釈）を各ウェルに添加し、そして３７℃　にて３０分間インキュベートする。ウェルを、ＰＢＳ（＋Ｃａ、Ｍｇ）＋０．５％ＢＳＡを用いて３回洗浄する。１錠のｐ－ニトロフェノールホスフェート（ｐＮＰＰ）を、５ｍｌのグリシン緩衝液（ｐＨ１０．４）に溶解させる。グリシン緩衝液中のｐＮＰＰ基質１００μｌを、各試験ウェルに添加する。三連の標準ウェルを、グリシン緩衝液中のＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎ－Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈｏｔａｓｅの操作希釈（ｗｏｒｋｉｎｇ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ）（１：５，０００（10^{0}）＞$10^{-0.5}$＞10^{-1}＞$10^{-1.5}$）から調製する。５μｌの各希釈物を、三連のウェルに添加し、そして各ウェル中の得られたＡＰ含量は、５．５０ｎｇ、１．７４ｎｇ、０．５５ｎｇ、０．１８ｎｇである。次いで、１００μｌのｐＮＰＰ試薬を、標準ウェルの各々に添加しなければならない。このプレートを、３７℃にて４時間インキューベートしなければならない。３Ｍ　ＮａＯＨの５０μｌの容量を全てのウェルに添加する。この結果を、プレートリーダーにおいて４０５ｎｍにて定量する。バックグラウンド減算オプションを、グリシン緩衝液のみで満たしたブランクウェルにおいて使用する。このテンプレートを、各々の標準ウェルにおけるＡＰ結合体の濃度を示すように設定する［５．５０ｎｇ；１．７４ｎｇ；０．５５ｎｇ；０．１８ｎｇ］。結果を、各サンプル中の結合したＡＰ結合体の量として示す。

【１０８０】

本実施例において記載される研究は、本発明のポリペプチド活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、本発明のポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、アゴニスト、および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【１０８１】

（実施例５３：骨髄ＣＤ４３＋細胞増殖の刺激についてのアッセイ）

このアッセイは、ヒトＣＤ３４＋が、造血増殖因子の存在下で増殖する能力に基づき、そしてこのアッセイは、哺乳動物細胞において発現された単離ポリペプチドが、ＣＤ３４＋細胞の増殖を刺激する能力を評価する。

【１０８２】

最も熟成した前駆体は、単一シグナルのみに応答することが以前に示されている。より未熟な前駆体は、応答するために少なくとも２つのシグナルを必要とする。従って、ポリペプチドの広範な先祖細胞の造血活性に対する効果を試験するために、このアッセイは、他の造血増殖因子の存在下または非存在下において、所定のポリペプチドを含む。単離された細胞を、試験サンプルと組み合わせて、幹細胞因子（ＳＣＦ）の存在下で、５日間培養する。ＳＣＦのみは、骨髄（ＢＭ）細胞の増殖に対して、非常に制限された効果を有し、「生存」因子としてのみ、このような条件下で作用する。しかし、これらの細胞（例えば、ＩＬ－３）に対する刺激効果を示す任意の因子と組み合わせると、ＳＣＦは、相乗効果を生じる。従って、試験されたポリペプチドが、造血祖先に対する刺激効果を有する場合、このような活性は、容易に検出され得る。正常なＢＭ細胞は、低レベルの細胞周期（ｃｙｃｌｉｎｇ　ｃｅｌｌ）を有するので、所望のポリペプチド、あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストのいかなる阻害効果も検出されないようである。従って、先祖に対する阻害効果のためのアッセイが、好ましくは、ＳＣＦ＋ＩＬ＋３でのインビトロ刺激に最初に供され、次いで、このような誘起増殖の阻害のために評価される化合物と接触させられる細胞において試験される。

【１０８３】
簡潔には、ＣＤ３４＋細胞は、当該分野で公知の方法を使用して単離される。これらの細胞は、解凍され、そして、培地（１％　Ｌ－グルタミンを有するＱＢＳＦ　６０　血清のない培地（５００ｍｌ）（Ｑｕａｌｉｔｙ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ　Ｃａｔ＃　１６０－２０４－１０１））に再懸濁される。２００×ｇでのいくらか穏やかな遠心分離の後、細胞は、１時間静置される。細胞数を２．５×10^5細胞／ｍｌに調節する。この時間の間、１００μｌの滅菌水を９６ウェルプレートの周辺ウェルに添加する。このアッセイにおいて、所定のポリペプチドで試験され得るサイトカインは、５０ｎｇ／ｍｌのｒｈＳＣＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，ＭｉｎｎｅａｐｏｌｉＳ，ＭＮ，Ｃａｔ＃　２５５－ＳＣ）のみであり、そして３０ｎｇ／ｍｌのｒｈＳＣＦとｒｈＩＬ－３（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，Ｃａｔ＃　２０３－ＭＬ）との組み合わせである。１時間後、１０μｌの調製されたサイトカイン、５０μｌの上清（１：２希釈での上清＝５０μｌ）および２０μｌの希釈された細胞を、培地に添加し、この培地は、１００μｌの最終全体積にするためにすでにウェル中に存在する。次いで、このプレートを３７℃／５％　CO_2インキュベータに５日間置く。

【１０８４】
アッセイを行う（ｈａｒｖｅｓｔ）１８時間前に、０．５μＣｉ／ウェルの［３Ｈ］チミジンを、各ウェルに１０μｌの体積で添加し、増殖率を決定する。この実験は、Ｔｏｍｔｅｃ　Ｈａｒｖｅｓｔｅｒ　９６を使用して、細胞を、各９６ウェルプレートからフィルターマットに収集することによって終結される。収集後、フィルターマットを乾燥し、トリムし、そして１つのＯｍｎｉＦｉｌｔｅｒプレートおよび１つのＯｍｎｉＦｉｌｔｅｒトレイからなるＯｍｎｉＦｉｌｔｅｒアセンブリに置く。６０μｌのＭｉｃｒｏｓｃｉｎｔを各ウェルに添加し、そしてプレートをＴｏｐＳｅａｌ-Ａプレスオンフィルムで密閉する。バーコード１５ステッカーを計数のために、第１のプレートに固定する。次いで、密閉されたプレートを充填し、そして放射能のレベルを、Ｐａｃｋａｒｄ　Ｔｏｐ　Ｃｏｕｎｔを介して決定し、プリントされたデータを分析のために収集する。放射能レベルは、細胞増殖の量を反映する。

【１０８５】
本実施例に記載される研究は、骨髄ＣＤ３４＋細胞増殖を刺激する、所定のポリペプチドの活性を試験する。当業者は、ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、抗体、アゴニスト、および／またはアンタゴニスト、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体の活性を試験するために、例示された実施例を容易に改変し得る。非限定的な実施例として、このアッセイで試験される可能性のあるアンタゴニストは、サイトカインの存在下で細胞増殖を阻害すること、および／またはサイトカインおよび所定のポリペプチドの存在下で細胞増殖の阻害を増加させることが期待される。対照的に、このアッセイで試験される可能性のあるアゴニストは、細胞増殖を増強し、そして／またはサイトカインおよび所定のポリペプチドの存在下で、細胞増殖の阻害を減少させることが期待される。

【１０８６】
骨髄ＣＤ３４＋細胞の増殖を刺激する遺伝子の能力は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよびポリペプチドが、診断および免疫系および造血に影響する障害の処置に有用であることを示す。代表的な用途は、上記の「免疫活性」および「感染疾患」の節、ならびに本明細書中の他の箇所に記載される。

【１０８７】
（実施例５４：細胞外マトリックス増強細胞応答（ＥＭＥＣＲ）についてのアッセイ）
細胞外マトリックス増強細胞応答（ＥＭＥＣＲ）アッセイの目的は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）誘導シグナルに関連して、造血幹細胞に作用する遺伝子産物（例えば、単離されたポリペプチド）を同定することである。

【１０８８】
周囲のミクロ環境から受けるシグナルに関連して、細胞は、調節因子に応答する。例え

ば、線維芽細胞、ならびに内皮幹細胞および上皮幹細胞は、ＥＣＭからのシグナルの非存在下で、複製することができない。造血幹細胞は、骨髄中で自己再生を起こし得るが、インビトロ懸濁液培養ではそうではない。インビトロで自己再生を起こす幹細胞の能力は、間質（ｓｔｒｏｍａｌ）細胞およびＥＣＭタンパク質フィブロネクチン（ｆｎ）とのそれらの相互作用に依存する。細胞のｆｎへの吸着は、$\alpha_5.\beta_1$および$\alpha_4.\beta_1$インテグリンレセプターによって媒介され、これらのレセプターは、ヒトおよびマウス造血幹細胞によって発現される。ＥＣＭ環境で組み込み、そして幹細胞の自己再生の刺激の原因である因子は未だ同定されていない。このような因子の発見は、遺伝子治療および脊髄移植適用における重要な目的である。

【１０８９】

簡潔には、ポリスチレンの組織培養処理されていない９６ウェルプレートは、０．２μｇ／ｃｍ^{2}のコーティング濃度でｆｎフラグメントでコートされる。マウス骨髄細胞を、０．２ｍｌの血清のない培地（１，０００細胞／ウェル）にプレートする。ＩＬ－３（５ｎｇ／ｍｌ）＋ＳＣＦ（５０ｎｇ／ｍｌ）の存在下で培養された細胞は、幹細胞の自己再生が期待されず、明確な分化が期待される条件で、ポジティブコントロールとして作用する。遺伝子産物は、ＳＣＦ（５．０ｎｇ／ｍｌ）の存在下、または非存在下で適切なネガティブコントロールとともに試験され、ここで、試験因子の上清は、全アッセイ体積の１０％を示す。次いで、プレートされた細胞を、低酸素環境（５％CO_2、７％O_2および８８％N_2）の組織培養インキュベータで７日間インキュベートすることによって増殖させる。次いで、ウェル内の増殖細胞の数を、細胞ＤＮＡへのチミジン組込みを測定することによって定量する。アッセイにおけるポジティブヒットの確認は、細胞の表現型の特徴付けを必要とし、この特徴付けは、培養系をスケールアップし、そして細胞表面抗原およびＦＡＣＳｃａｎに対する適切な抗体試薬を使用することによって達成される。

【１０９０】

当業者は、ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、抗体、アゴニスト、および／またはアンタゴニストならびにそのフラグメントおよび改変体の活性を試験するための例示的な研究を容易に改変し得る。

【１０９１】

特定の遺伝子産物は、造血祖先の刺激薬であることが見出される場合、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、診断、ならびに免疫系および造血に影響する障害の処置に有用であり得る。代表的な用途は、上記の「免疫活性」および「感染疾患」の節、ならびに本明細書の他の箇所に記載される。遺伝子産物はまた、種々の血液連鎖の幹細胞および先駆細胞（ｃｏｍｍｉｔｅｄ　ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ）の拡張において、そして種々の細胞の型の分化および／または増殖において有用であり得る。

【１０９２】

さらに、目的の遺伝子のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド、ならびに／またはそのアゴニストおよび／またはアンタゴニストはまた、造血細胞の増殖および分化を阻害するために使用され、そしてそれによって、化学療法の間に、化学療法薬剤から骨髄幹細胞を保護するために使用され得る。この抗増殖効果は、より高い用量の化学療法薬剤の投与、従って、より有効な化学治療処置を可能にし得る。

【１０９３】

さらに、目的の遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよびポリペプチドもまた、造血関連障害（例えば、貧血、汎血球減少症、白血球減少症、血小板減少症、または白血病）の処置および診断に有用であり得る。なぜなら、間質細胞は、造血系列の細胞の生成において重要であるからである。これらの用途としては、骨髄細胞エキソビボ培養、骨髄移植、骨髄再形成、新形成の放射線療法または化学療法が、挙げられる。

【１０９４】

（実施例５５：ヒト皮膚線維芽細胞および大動脈平滑筋細胞の増殖）

目的のポリペプチドを、正常なヒト皮膚線維芽細胞（ＮＨＤＦ）およびヒト大動脈平滑筋細胞（ＡｏＳＭＣ）の培養物に添加し、そして２つの同時アッセイを各サンプルを用い

て実施する。第１のアッセイは、正常なヒト線維芽細胞（ＮＨＤＦ）または大動脈平滑筋細胞（ＡｏＳＭＣ）の増殖に対する、目的のポリペプチドの効果を試験する。線維芽細胞または平滑筋細胞の異常な増殖は、いくつかの病理学的プロセス（繊維症および再狭窄を含む）の一部である。第２のアッセイは、ＮＨＤＦおよびＳＭＣの両方によるＩＬ６産生を試験する。ＩＬ６産生は、機能的活性化の指標である、活性化細胞は、多数のサイトカインおよび他の因子の産生の増加を有し、これは、炎症誘発性（ｐｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ）または免疫調節性の結果を生じ得る。アッセイは、同時刺激活性または阻害活性をチェックするために、同時ＴＮＦａ刺激とともに行い、そして同時ＴＮＦａ刺激なしで行う。

【１０９５】

簡単に述べると、１日目に、９６ウェルの黒いプレートに、１００μｌ培養培地中に１０００細胞／ウェル（ＮＨＤＦ）または２０００細胞／ウェル（ＡｏＳＭＣ）を配置する。ＮＨＤＦ培養培地は、以下：Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ　ＦＢ基礎培地、ｌｍｇ／ｍｌ　ｈＦＧＦ、５ｍｇ／ｍｌインスリン、５０ｍｇ／ｍｌゲンタマイシン、２％　ＦＢＳを含み、一方ＡｏＳＭＣ培養培地は、Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ　ＳＭ基礎培地、０．５μｇ／ｍｌ　ｈＥＧＦ、５ｍｇ／ｍｌインスリン、１μｇ／ｍｌ　ｈＦＧＦ、５０ｍｇ／ｍｌゲンタマイシン、５０μｇ／ｍｌ　Ａｍｐｈｏｔｅｒｉｃｉｎ　Ｂ、５％　ＦＢＳを含む。３７℃で少なくとも４～５時間のインキュベーション後、培養培地を吸引し、増殖停止培地で置換する。ＮＨＦＤ用の増殖停止培地は、線維芽細胞基礎培地、５０ｍｇ／ｍｌゲンタマイシン、２％　ＦＢＳを含み、一方ＡｐＳＭＣ用の増殖停止培地は、ＳＭ基礎培地、５０ｍｇ／ｍｌゲンタマイシン、５０μｇ／ｍｌ　ＡｍｐｈｏｔｅｒｉｃｉｎＢ、０．４％　ＦＢＳを含む。３７℃で２日目までインキュベートする。

【１０９６】

２日目、目的のポリペプチドの系列希釈物およびテンプレートを、それらが常に、培地コントロールおよび既知のタンパク質コントロールを含むように、設計する。刺激実験および阻害実験の両方について、タンパク質を増殖停止培地で希釈する、阻害実験について、ＴＮＦａを、最終濃度２ｎｇ／ｍｌ（ＮＨＤＦ）または５ｎｇ／ｍｌ（ＡｏＳＭＣ）まで添加する。コントロールまたは本発明のポリペプチドを含む１／３容量の培地を添加し、そして５日目まで、３７℃／５％　CO_2にてインキュベートする。

【１０９７】

各ウェルから６０μｌを別の標識９６ウェルプレートに移し、プレートシーラーで覆い、そして６日目まで４℃で（ＩＬ６　ＥＬＩＳＡのために）保存する。細胞培養プレート中の残りの１００μｌに、その培養物容量の１０％に等しい量（１０μｌ）のＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅを無菌的に添加する。プレートを３～４時間の間インキュベーターに戻す。次いで、５３０ｎｍでの励起および５９０ｎｍでの放射を伴う蛍光を、ＣｙｔｏＦｌｕｏｒを使用して測定する。これにより、増殖刺激／阻害のデータを得る。

【１０９８】

５日目、ＩＬ－６　ＥＬＩＳＡを、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）に希釈した５０～１００μｌ／ウェルの抗ヒトＩＬ－６モノクローナル抗体で９６ウェルプレートをコーティングすることによって実施し、室温でＯＮをインキュベートする。

【１０９９】

６日目、プレートの中身を流しに空け、そしてペーパータオル上で吸い取る。４％　ＢＳＡを含むＰＢＳを含むアッセイ緩衝液を調製する。プレートを、ＰＢＳ中の２００μｌ／ウェルのＰｉｅｒｃｅ　Ｓｕｐｅｒ　Ｂｌｏｃｋブロッキング緩衝液で１～２時間ブロックし、次いで、洗浄緩衝液（ＰＢＳ，０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０）でプレートを洗浄する。プレートをペーパータオル上で吸い取る。次いで、０．５０ｍｇ／ｍｌに希釈した抗ヒトＩＬ－６モノクローナルビオチン標識抗体５０μｌ／ウェルを添加する。ＩＬ－６ストックの培地中の希釈物を作製する（３０ｎｇ／ｍｌ、１０ｎｇ／ｍｌ、３ｎｇ／ｍｌ、１ｎｇ／ｍｌ、０．３ｎｇ／ｍｌ、０ｎｇ／ｍｌ）。二連のサンプルをプレートの最上列に添加する。プレートを覆い、そして振盪機上で室温で２時間インキュベートする。

【１１００】
プレートを洗浄緩衝液で洗浄し、ペーパータオル上で吸い取る。ＥＵ標識ストレプトアビジンをアッセイ緩衝液中に１：１０００希釈し、そして１００μｌ／ウェルを添加する。プレートを覆い、そして室温で１時間インキュベートする。プレートを洗浄緩衝液で洗浄する。ペーパータオル上で吸い取る。
【１１０１】
１００μｌ／ウェルの増強溶液を添加し、そして５分間振盪する。Ｗａｌｌａｃ　ＤＥＬＦＩＡ蛍光測定器でプレートを読み取る。各アッセイでの三連のサンプルからの読み取りを、表にして平均をとる。
【１１０２】
このアッセイにおける陽性の結果は、ＡｏＳＭＣ細胞増殖を示唆し、そして目的の遺伝子産物が皮膚線維芽細胞増殖および／または平滑筋細胞増殖に関与し得ることを示唆する。陽性の結果はまた、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、目的の遺伝子／遺伝子産物のポリヌクレオチド／ポリペプチドのアゴニストおよび／またはアンタゴニストの多くの潜在的な使用を示唆する。例えば、本明細書の全体にわたって記載されるように、炎症および免疫応答、創傷の治癒、ならびに新脈管形成。特に、この遺伝子産物のポリペプチドおよびこの遺伝子のポリヌクレオチドは、創傷の治癒および皮膚の再生、ならびに脈管形成（血管およびリンパ管の両方）の促進に使用され得る。脈管の成長は、例えば、心臓血管疾患の処置において使用され得る。さらに、この遺伝子産物のポリペプチドおよびこの遺伝子のポリヌクレオチドのアンタゴニストは、抗脈管（例えば、抗新脈管形成）として作用することによって、新脈管形成を含む、疾患、障害、および／または状態を処置する際に有用であり得る。これらの疾患、障害、および／または状態、例えば以下：悪性腫瘍、固形腫瘍、良性腫瘍（例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫）；関節硬化性斑（ａｒｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｉｃ　ｐｌａｑｕｅ）；眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜障害、未熟児の網膜障害、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、皮膚潮紅、網膜芽細胞腫、ぶどう膜炎、および眼の翼状片（異常な血管の成長））；慢性関節リウマチ；乾癬；遅延性の創傷の治癒；子宮内膜症；脈管形成；顆粒形成：過形成性瘢痕（ケロイド）；非結合性骨折（ｎｏｎｕｎｉｏｎ　ｆｒａｃｔｕｒｅ）；強皮症；トラコーマ；脈管接着；心筋新脈管形成；冠状側副枝；大脳側副枝；動静脈奇形；虚血性の肢の新脈管形成；Ｏｓｌｅｒ－Ｗｅｂｂｅｒ症候群；斑の新生血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；血管線維腫；線維性筋性形成異常症；創傷肉芽化；クローン病；およびアテローム性硬化症などは、当該分野において公知でありそして／または本明細書中で記載される。さらに、この遺伝子産物のポリペプチドおよびこの遺伝子のポリヌクレオチドのアンタゴニストは、当該分野において公知でありそして／または本明細書中で記載される、抗過剰増殖性疾患および／または抗炎癖性疾患を処置する際に有用であり得る。
【１１０３】
当業者は、ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、抗体、アゴニスト、および／またはアンタゴニスト、ならびにそのフラグメントおよび改変体の活性を試験するために例示された研究を容易に改変し得る。
【１１０４】
（実施例５６：内皮細胞上での細胞接着分子（ＣＡＭ）の発現）
リンパ球の、炎症および新脈管形成の領域に対する漸増は、リンパ球上の細胞表面接着分子（ＣＡＭ）と脈管内皮との間の特異的なレセプターリガンド相互作用を含む。接着プロセスは、通常の環境および病的な環境の両方において、多段階のカスケードに続き、このカスケードは、内皮細胞（ＥＣ）上での細胞内接着分子１（ＩＣＡＭ－１）、脈管細胞接着分子１（ＶＣＡＭ－１）、および内皮性白血球接着分子１（Ｅ－セレクチン）の発現を含む。脈管内皮上でのこれらの分子などの発現は、白血球が局所的な脈環構造と接着し、そして炎症性応答の進行の間に局所的な組織へと溢出し得る効率を決定する。サイトカインおよび増殖因子の局所的濃度は、これらのＣＡＭの発現の調節に関与する。

【１１０５】
簡単には、内皮細胞（例えば、ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ））は、標準９６ウェルプレート中でコンフルエンスまで増殖する。増殖培地を、細胞から除去し、そして１００μｌの１９９　Ｍｅｄｉｕｍ（１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ））で置き換える。試験のためのサンプルおよび陽性または陰性のコントロールを、３部構成（１０μｌの容量ずつ）のプレートに添加する。次いで、プレートを、３７℃で、５時間（セレクチンおよびインテグリンの発現）かまたは２４時間（インテグリンの発現のみ）のいずれかの間インキュベートする。プレートを、培地を除去するために吸引し、そして１００μｌの０．１％パラホルムアルデヒド－ＰＢＳ（Ｃａ＋＋およびＭｇ＋＋含有）を各ウェルに添加する。プレートを４℃で３０分間保持する。固定剤をウェルから除去し、そしてウェルをＰＢＳ（＋Ｃａ、Ｍｇ）＋０．５％ＢＳＡで１回洗浄し、そして水気を切る。１０μｌの希釈した第１抗体を、試験ウェルおよびコントロールウェルに添加する。抗ＩＣＡＭ－１－ビオチン、抗ＶＣＡＭ－１－ビオチン、および抗Ｅ－セレクチン－ビオチンを、１０μｇ／ｍｌの濃度（０．１ｍｇ／ｍｌの貯蔵抗体の１：１０希釈）で使用する。細胞を３７℃で３０分間、加湿された環境においてインキュベートする。ウェルを、ＰＢＳ（＋Ｃａ、Ｍｇ）＋０．５％ＢＳＡで３回洗浄する。２０μｌの希釈されたＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎ－Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈｏｔａｓｅ（１：５，０００希釈、本明細書中で実用的な希釈液といわれる）を各ウェルに添加し、そして３７℃で３０分間インキュベートする。ウェルを、ＰＢＳ（＋Ｃａ、Ｍｇ）＋０．５％ＢＳＡで３回洗浄する。５ｍｌのグリシン緩衝液（ｐＨ１０．４）につき１錠のｐ－ニトロフェノールホスフェート（ｐＮＰＰ）を溶解する。グリシン緩衝液中の１００μｌのｐＮＰＰ基質を各試験ウェルに添加する。３部構成の標準ウェルを、グリシン緩衝液中のＥｘｔｒＡｖｉｄｉｎ－Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈｏｔａｓｅ；１：５，０００（10^{0}）＞$10^{-0.5}$＞10^{-1}＞$10^{-1.5}$の実用的な希釈液から調製する。各希釈液の５μｌを３部構成のウェルに添加すると、各ウェル中の得られるＡＰ含有量は、５．５ｎｇ、１．７４ｎｇ、０．５５ｎｇ、０．１８ｎｇ、である。次いで、１００μｌのｐＮＮＰ試薬を標準ウェルの各々に添加する。このプレートを、３７℃で４時間インキュベートする。５０μｌの容量の３Ｍ　ＮａＯＨを、全てのウェルに添加する。このプレートを、グリシン緩衝液のみを充填したブランクウェルでのバックグラウンド除去オプションを使用して、４０５ｎｍのプレートリーダーで読む。さらに、テンプレートを、各標準ウェル［５．５０ｎｇ；１．７４ｎｇ；０．５５ｎｇ；０．１８ｎｇ］中のＡＰ共重合体の濃度を示すようにセットアップする。結果を、各サンプル中の結合したＡＰ共重合体の量として示す。

【１１０６】
（実施例５７：Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ内皮細胞増殖アッセイ）
このアッセイを使用して、ウシリンパ内皮細胞（ＬＥＣ）、ウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）、またはヒト微小血管子宮筋細胞（ＵＴＭＥＣ）のｂＦＧＦ誘導増殖のタンパク質媒介性阻害を定量的に決定し得る。このアッセイは、代謝活性の検出に基づいて、蛍光定量的な増殖インジケーターを組み込む。標準Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ増殖アッセイを、内皮細胞刺激の供給源として添加した１０ｎｇ／ｍｌのｂＦＧＦを含むＥＧＭ－２ＭＶ中で調整する。このアッセイは、増殖培地および細胞濃度がわずかに変化した様々な内皮細胞と共に使用され得る。試験されるべきタンパク質バッチの希釈物を、適切に希釈する。ｂＦＧＦなしの血清を含有しない培地（ＢＩＢＣＯ　ＳＦＭ）を、非刺激コントロールとして使用し、そしてＡｎｇｉｏｓｔａｔｉｎまたはＴＳＰ－１は、既知の阻害コントロールとして含まれる。

【１１０７】
簡単には、ＬＥＣ、ＢＡＥＣまたはＵＴＭＥＣを、９６ウェルプレートに、５０００～２０００細胞／ウェルの密度で、増殖培地に播種し、そして３７℃で一晩放置する。この細胞の一晩のインキュベーションの後、増殖培地を除去し、そしてＧＩＢＣＯ　ＥＣ－ＳＦＭで置き換える。この細胞を、追加のｂＦＧＦを含む３つのウェル中で、目的のタンパク質またはコントロールタンパク質サンプルの適切な希釈物（ＳＦＭ中で調製）で、１０

ｎｇ／ｍｌの濃度まで処理する。一旦、細胞をサンプルで処理すると、プレート（単数または複数）を、３７℃のインキュベーターに３日間戻す。３日後、１０ｍｌのストックＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ　Ｃａｔ＃　ＤＡＬ１１００）を、各ウェルに添加し、そしてプレート（単数または複数）を、３７℃のインキュベーターに４時間戻す。次いで、このプレート（単数または複数）を、ＣｙｔｏＦｌｕｏｒ蛍光リーダーを使用して、５３０ｎｍ励起および５９０ｎｍ発光で読みとる。直接出力を、相対蛍光単位で記録する。

【１１０８】

Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅは、細胞増殖から生じる増殖培地の化学的還元に応答して、蛍光を発しかつ色を変化する、酸化－還元指示薬である。培地中で細胞が増殖するにつれて、生得代謝活性によりすぐ周辺の環境の化学的還元が生じる。増殖に関する還元により、この指示薬は、酸化（非蛍光性の青色）形態から還元（蛍光性赤色）形態に変化し得る。すなわち、刺激された増殖は、より強いシグナルを生成し、そして阻害された増殖は、より弱いシグナルを生成し、そして全シグナルは細胞の総数ならびにそれらの代謝活性に比例する。活性のバックグラウンドレベルは、飢餓性培地のみを用いて観察される。これを陽性コントロールサンプル（増殖培地中のｂＦＧＦ）およびタンパク質希釈物から観察される出力と比較する。

【１１０９】

（実施例５８：混合リンパ球反応の阻害の検出）

このアッセイを使用して、遺伝子産物（例えば、単離されたポリペプチド）による混合リンパ球反応（ＭＬＲ）の阻害を検出および評価し得る。ＭＬＲの阻害は、細胞増殖および生存度、相互作用する細胞における同時刺激分子の変調、リンパ球と副細胞との間の接着の変調、または副細胞によるサイトカイン産生の変調に対する直接効果に起因し得る。複数の細胞は、これらのポリペプチドによって標的化され得る。なぜなら、このアッセイで使用される末梢血液単核画分は、Ｔ、Ｂおよびナチュラルキラーリンパ球、ならびに単球および樹状細胞を含むためである。

【１１１０】

ＭＬＲを阻害することが見出された目的のポリペプチドは、リンパ球および単球の活性化または増殖に関する疾患における用途を見出し得る。これには、喘息、関節炎、糖尿病、炎症性の皮膚状態、乾癬、湿疹、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、糸球体腎炎、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、肝硬変、対宿主性移植片病、対移植片性宿主病、肝炎、白血病およびリンパ腫のような疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【１１１１】

簡単には、ヒトドナー由来のＰＢＭＣを、Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ（ＬＳＭ（登録商標）、密度　１．００７０ｇ／ｍｌ、Ｏｒｇａｎｏｎ　Ｔｅｋｎｉｋａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｗｅｓｔ　Ｃｈｅｓｔｅｒ、ＰＡ）を使用する密度勾配遠心分離によって精製する。２つのドナー由来のＰＢＭＣを、１０％　ＦＣＳおよび2mM　グルタミンを補ったＲＰＭＩ－１６４０（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）中、2×10^{6}細胞／ｍｌに調整する。第３のドナー由来のＰＢＭＣを、2×10^{5}細胞／ｍｌに調整する。各ドナー由来の５０μｌのＰＢＭＣを、９６ウェル丸底マイクロタイタープレートのウェルに添加する。試験材料の希釈物（５０μｌ）を、三連でマイクロタイターウェルに添加する。（目的のタンパク質の）試験サンプル１：４の最終希釈になるまで添加し；ｒｈｕＩＬ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ、カタログ番号　２０２－ＩＬ）を、１μｇ／ｍｌの最終濃度になるまで添加し；抗－ＣＤ４　ｍＡｂ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、クローン　３４９３０．１１、カタログ番号　ＭＡＢ３７９）を１０μｇ／ｍｌの最終濃度になるまで添加する。細胞を、５％　CO_2中、３７℃で７～８時間培養し、そして１μＣの［^{3}H］チミジンを、培養の最後の１６時間でウェルに添加する。細胞を収集し、そしてチミジンの取込みを、Ｐａｃｋａｒｄ　ＴｏｐＣｏｕｎｔを使用して決定する。デ

ータを、３つの測定値の平均および標準偏差として表す。

【１１１２】

目的のタンパク質のサンプルを、別個の実験でスクリーンし、そして陰性コントロール処理、抗－ＤＣ４　ｍＡＢ（これはリンパ球の増殖を阻害する）、および陽性コントロール処理、ＩＬ－２（組換え物質または上清として）（これは、リンパ球の増殖を促進する）と比較する。

【１１１３】

当業者は、例示の研究を容易に改変して、ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、抗体、アゴニスト、および／またはアンタゴニスト、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体の活性を試験し得る。

【１１１４】

本発明を、前述の説明および実施例に詳細に記載された以外の方法で実施し得ることは、明らかである。本発明の多数の改変およびバリエーションが、上記の教示を考慮して可能であり、従って、それは、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

【１１１５】

発明の背景、詳細な説明および実施例において引用された各文書の全開示（特許、特許出願、学術文献、要約、実験マニュアル、書籍または他の開示を含む）は、本明細書中に参考として援用される。さらに、本明細書にとともに提出された配列表のハードコピーおよび対応するコンピューター読み出し形態は、両方とも本明細書中にその全体が参考として援用される。さらに、米国仮出願第６０／１６４，８３５号および同第６０／２２１，１４２号の内容は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。

【１１１６】

【表１１】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

４２ 頁、 Ｎ／Ａ 行

Ｂ．寄託物の表示 その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ☐

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

アメリカ合衆国 バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日	受託番号
1999年10月26日	PTA-867

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く ☐

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

欧州：欧州特許が求められる指定国に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日まで、請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能になる。（EPC規則28(4)） （以下の頁に続く）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☒この用紙は国際出願とともに受理された	☐この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官

PCT/RO/134様式（1992年７月）

ＰＴＡ－８６７

（カナダ）

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官（Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎｅｒ ｏｆ Ｐａｔｅｎｔｓ）が、長官により指名された独立の専門家に対してのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【１１１７】

（ノルウェー）

出願人はここにおいて、出願が（ノルウェー特許庁により）公開に付されるかあるいは

公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第２２条および第３３条（３）に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト（ｌｉｓｔ　ｏｆ　ｒｅｃｏｇｎｉｚｅｄ　ｅｘｐｅｒｔｓ）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【１１１８】

（オーストラリア）

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄（ｌａｐｓｉｎｇ）、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者（ｓｋｉｌｌｅｄ　ａｄｄｒｅｓｓｅｅ）に対してのみ行われる旨を、告知するものである（オーストラリア国特許法第３．２５（３）号規定）。

【１１１９】

（フィンランド）

出願人はここにおいて、出願が（特許および統制委員会（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｂｏａｒｄ　ｏｆ　Ｐａｔｅｎｔｓ　ａｎｄ　Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎｓ）により）公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

【１１２０】

（英国）

出願人はここにおいて、微生物のサンプルは専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

【１１２１】

（デンマーク）

出願人はここにおいて、出願が（デンマーク特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第２２条および第３３条（３）に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト（ｌｉｓｔ　ｏｆ　ｒｅｃｏｇｎｉｚｅｄ　ｅｘｐｅｒｔｓ）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【１１２２】

（スウェーデン）

出願人はここにおいて、出願が（スウェーデン特許庁により）公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から１６ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする（好ましくはＰＣＴ　Ａｐｐｌｉｃａｎｔ’ｓ　ＧｕｉｄｅのＶｏｌｕｍｅ　Ｉのａｎｎｅｘ　Ｚに記載された書式ＰＣＴ／ＲＯ／１３４による）。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト（ｌｉｓｔ　ｏｆ　ｒｅｃｏｇｎｉｚｅｄ　ｅｘｐｅｒｔｓ）に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【１１２３】

（オランダ）

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄（ｌａｐｓｅｄ）される日までは、特許法３１Ｆ（１）の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第２２Ｃ条または第２５条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【配列表】

0005583308000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	101
C12P	*21/02*	*(2006.01)*	C12P	21/02	C

微生物の受託番号 ATCC PTA-867

(72)発明者 ルーベン, スティーブン エム.
アメリカ合衆国 メリーランド 20832, オルネイ, ヘリテイジ ヒルズ ドライブ 18528
(72)発明者 コマットソウリス, ジョージ エイ.
アメリカ合衆国 メリーランド 20901, シルバー スプリング, ギャーウッド ストリート 9518
(72)発明者 ウェイ, ピン
アメリカ合衆国 メリーランド 20833, ブルックビル, オールド バルティモア ロード 19100
(72)発明者 フィセラ, マイケル
アメリカ合衆国 メリーランド 20817, ベセスダ, レッドウィング ロード 6308
(72)発明者 ベーカー, ケビン ピー.
アメリカ合衆国 メリーランド 20878, ダーネスタウン, インディアン ラン ドライブ 14006

合議体
審判長 鈴木 恵理子
審判官 ▲高▼ 美葉子
審判官 冨永 みどり

(56)参考文献 国際公開第1999/05162(WO, A1)
Biochim Biophys Acta. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Gene Structure and Expression (1996)、Vol. 1306, No. 1, p. 1-4
GenBank Accession no. AF142780. 2, Mus musculus butyrophilin-like protein(Btdc)mRNA, complete cds[online], 30-SEP-1999[retrieved on 24 Dec. 2013], URL:http://www. ncbi. nlm. nih. gov/nuccore/6001953?
Nature Medicine(1999Dec), Vol. 5, No. 12, p. 1365-1369

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)