

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4515542号
(P4515542)

(45) 発行日 平成22年8月4日 (2010.8.4)

(24) 登録日 平成22年5月21日 (2010.5.21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/475 (2006.01)

C O 7 K 14/475

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 19 (全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-534781
 (86) (22) 出願日 平成10年2月10日 (1998.2.10)
 (65) 公表番号 特表2001-521376 (P2001-521376A)
 (43) 公表日 平成13年11月6日 (2001.11.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/001579
 (87) 国際公開番号 W01998/035036
 (87) 国際公開日 平成10年8月13日 (1998.8.13)
 審査請求日 平成16年10月15日 (2004.10.15)
 (31) 優先権主張番号 08/799,054
 (32) 優先日 平成9年2月10日 (1997.2.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
 ス サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒレグリン変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒレグリンの変異体であり、上記変異体は、天然で見出されないアミノ酸配列、および天然ヒトヒレグリン-β 1と比較して増大した親和性で ErbB レセプターと結合する能力を有し、上記変異体は上記ヒレグリン中のものとは異なるアミノ酸：

残基番号 181 において上記異なるアミノ酸が、A；残基番号 198 において上記異なるアミノ酸が、A；残基番号 205 において上記異なるアミノ酸が、A；あるいは残基番号 208 において上記異なるアミノ酸が、A；

を含み、上記残基番号は天然ヒトヒレグリン-β 1のN末端から数えた残基番号に相当することを特徴とする、ヒレグリン変異体。

【請求項 2】

上記ヒレグリンがヒトヒレグリン-β 1であることを特徴とする、請求項 1 記載のヒレグリン変異体。

【請求項 3】

ヒトヒレグリン-β 1の変異体であり、上記変異体は、天然で見出されないアミノ酸配列、および天然ヒトヒレグリン-β 1と比較して増大した親和性で ErbB レセプターと結合する能力を有し、上記変異体は：

A183G, E184W, K185D, E186R, K187E, T188G, M226I；

A183D, E184K, K185S, E186R, K187E, T188G, M226I；

10

20

F197Y, M198K, K200R, D201I, M226I;
P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
P205Y, S206R, R207Y, Y208R, L209M, M226I;
P205T, S206H, R207Y, Y208R, L209M;
P205T, S206K, R207Y, Y208R, L209G;
N223W, M226I;
N223H, M226I;
S177W, H178E, K181P, A183G, E184W, K185D, E186R, K187E, T188G, M226I;
P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T; 10
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, M226I;
F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
F197Y, M198R, D201T, M226I;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, M226I;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I; 20
F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, N223H, M226I; および
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, N223H, M226I;
から選択された一連のアミノ酸置換を含み、上記残基番号は天然ヒトヒレグリン-β 1のN末端から数えた残基番号に相当することを特徴とする、ヒレグリン変異体。

【請求項 4】

上記ヒレグリン変異体が：

A183G, E184W, K185D, E186R, K187E, T188G, M226I;
P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M; 30
N223H, M226I;
P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, M226I;
F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
F197Y, M198R, D201T, M226I;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, M226I;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I; 40
F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, N223H, M226I; および
A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, N223H, M226I;
から選択された一連のアミノ酸置換を含むことを特徴とする、請求項 3 記載のヒレグリン変異体。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか一項記載のヒレグリン変異体をコードする核酸分子。

【請求項 6】

請求項 5 記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 7】

請求項 6 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 8】

修飾されたヒレグリン変異体を生産するために、請求項 1 から 4 のいずれか一項記載のヒレグリン変異体を修飾することを含む、ヒレグリン変異体を生産する方法であり、該修飾されたヒレグリン変異体が E r b B レセプターと結合する能力を維持することを特徴とする方法。

【請求項 9】

ヒレグリンの変異体であり、上記変異体は、天然で見出されないアミノ酸配列、および天然ヒトヒレグリン-β 1 より E r b B-3 レセプターに対して、E r b B-4 レセプター

10

につい

てのより大きな特異性を有し、上記変異体は上記ヒレグリン中のものとは異なるアミノ酸：

残基番号 1 7 8 において上記異なるアミノ酸が、A；

残基番号 1 7 9 において上記異なるアミノ酸が、A；あるいは

残基番号 2 0 7 において上記異なるアミノ酸が、A；

を含み、上記残基番号は天然ヒトヒレグリン-β 1 の N 末端から数えた残基番号に相当することを特徴とする、ヒレグリン変異体。

【請求項 10】

上記ヒレグリンがヒトヒレグリン-β 1 であることを特徴とする、請求項 9 記載のヒレグリン変異体。

20

【請求項 11】

上記アミノ酸置換が、H178E および R207P から選択されることを特徴とする、請求項 10 記載のヒレグリン変異体。

【請求項 12】

ヒレグリン変異体であり、上記変異体は、天然で見出されないアミノ酸配列、および E r b B レセプターと結合する能力を有し、上記変異体は、アミノ酸置換 H178L を含み、且つアミノ酸残基 2 2 8-2 3 1 が欠失されて単一のメチオニン残基で置換されており、上記残基番号は天然ヒトヒレグリン-β 1 の N 末端から数えた残基番号に相当し、さらに、上記変異体は、天然ヒトヒレグリン-β 1 より E r b B-3 レセプターに対して、E r b B-4 レセプターについてのより大きな特異性を有することを特徴とする、ヒレグリン変異体。

30

【請求項 13】

上記ヒレグリンがヒトヒレグリン-β 1 であることを特徴とする、請求項 12 記載のヒレグリン変異体。

【請求項 14】

請求項 12 または 13 記載のヒレグリン変異体をコードする核酸分子。

【請求項 15】

請求項 14 記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 16】

請求項 15 記載のベクターを含む宿主細胞。

40

【請求項 17】

E r b B レセプターを発現する組織の修復および／または再生を促進するための、請求項 1 から 4 のいずれか一項記載のヒレグリン変異体、および製薬学的に許容可能なキャリアーを含む製薬学的組成物。

【請求項 18】

皮膚の外傷の治療のための、請求項 1 から 4 のいずれか一項記載のヒレグリン変異体、および製薬学的に許容可能なキャリアーを含む製薬学的組成物。

【請求項 19】

ヒト胃腸、呼吸器、生殖器、または尿路における再上皮形成を促進するための、請求項 1 から 4 のいずれか一項記載のヒレグリン変異体、および製薬学的に許容可能なキャリアー

50

を含む製薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

政府の実施権の主張

米国政府は、この発明に対して支払い済みの実施権を有し、国立衛生研究所によって与えられた許可番号GM 1 6 5 4 9 - 0 1の規定によるという適正な条件下で、特許権者が他者に実施権を供与しなければならないという制限された状況における権利を有する。

発明の背景

発明の分野

本発明は、ヒレグリン変異体、上記変異体をコードする核酸分子、並びに関連するベクター、宿主細胞、製薬学的組成物、および方法に関する。

特に、本発明は、E r b B - 3およびE r b B - 4レセプターに対して増大した親和性を有するヒトヒレグリン- β 1のアミノ酸置換変異体に関する。

関連分野の説明

細胞増殖および分化を調節するシグナルの伝達は、様々な細胞タンパク質のリン酸化によって一部調節されている。タンパク質チロシンキナーゼは、このプロセスを触媒する酵素である。レセプタータンパク質チロシンキナーゼは、細胞内タンパク質のリガンド刺激性チロシンリン酸化を介して、細胞増殖を導くものと考えられている。クラスIサブファミリーの増殖因子レセプタータンパク質チロシンキナーゼは、e r b B 1遺伝子によってコードされる170キロダルトン(kDa)の上皮増殖因子レセプター(EGFR)を含む。

e r b B 1は、ヒト悪性腫瘍において通常関連している。特に、この遺伝子の増大した発現は、乳、膀胱、肺及び胃の比較的進行性のガンにおいて観察されている。クラスIサブファミリーの第二のメンバーであるp 1 8 5^{neu}(E r b B - 2レセプターまたはp 1 8 5^{HER2}とも呼ばれる)は、化学的に処理されたラットの神経芽腫由来のトランスフォーミング遺伝子の産物として、もともと同定された。neu(e r b B 2またはHER2)遺伝子は、185kDaのレセプタータンパク質チロシンキナーゼをコードする。

ヒトe r b B 2遺伝子の増幅および／または過剰発現は、乳ガンおよび卵巣ガンにおける貧弱な予後と相関している。Slamonら, Science 235:177-82 (1987); Slamonら, Science 244:707-12 (1989)。e r b B 2の過剰発現は、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、大腸および膀胱の各ガンを含む他のガンと相関している。したがって、米国特許第4, 968, 603号において、Slamonらは、腫瘍細胞におけるe r b B 2遺伝子の増幅または発現を測定するための様々な診断アッセイを記載し、権利化を主張している。Slamonらは、腫瘍細胞におけるe r b B 2ガン遺伝子の複数のコピーの存在は、該疾患が一次腫瘍部位から特に広がる傾向にあり、それ故該疾患がさもなければ他の診断因子により示されるものより、より急速な治療の必要があることを示すことを発見した。Slamonらは、リンパ節状態の測定と共に、e r b B 2遺伝子増幅試験が、非常に改良された予後の有用性を提供すると結論付けた。

E r b B - 3レセプター(p 1 8 0^{HER3})をコードするe r b B 3(またはHER3)と呼ばれるさらなる関連遺伝子もまた記載されている。米国特許第5, 183, 884号; Krausら, PNAS USA 86:9193-97 (1989); 欧州特許出願第444, 961A1号; Krausら, PNAS USA 90:2900-04 (1993) 参照。Krausら (1989) は、著しく上昇したレベルのe r b B 3 mRNAが、特定のヒト乳腫瘍細胞系に存在し、e r b B 1およびe r b B 2と同様にe r b B 3が、ヒト悪性腫瘍において役割を果たしていることを発見した。また、Krausら (1993) は、キメラEGFR/E r b B - 3レセプターのE r b B - 3触媒ドメインのEGF依存性活性化が、トランスフェクトされたNIH-3T3細胞において増殖応答を引き起こすことを示した。さらにこれらの研究者は、あるヒト乳腫瘍細胞系が、安定状態E r b B - 3レセプターチロシンリン酸化の有意な上昇を示し、さらにヒト悪性腫瘍においてこのレセプターが関与していることを示した。ガンにおけるe r b B 3の役割は他の者によっても調査されており、この遺伝子が乳房(Lemoineら, Br. J. Cancer 66:1116-21 [1992])、胃腸(Pollerら, J. Pathol. 168:275-80 [1992]; Rajkumarら, J. Pathol. 170

10

20

30

40

50

:271-78 [1993] ;Sanidasら,Int.J.Cancer 54:935-40 [1993])、および膀胱 (Lemoine
ら,J.Pathol.168:269-73 [1992] ,およびFriessら,Clinical Cancer Research 1:1413-20
[1995]) の各ガンにおいて過剰発現されていることが見出されている。

増殖因子レセプタータンパク質チロシンキナーゼのクラス I サブファミリーは、e r b B
4 (H E R 4) 遺伝子の産物である E r b B-4 (H E R 4) レセプター含むようにさら
に拡張されている。欧州特許出願 5 9 9, 2 7 4 号; Plowmanら,PNAS USA 90:1746-50 (1
993) ;およびPlowmanら,Nature 366:473-75 (1993) 参照。Plowmanらは、増大した e r b
B 4 発現が、乳腺ガンを含む上皮起源の特定のガンと緊密に関連していることを見出した
。e r b B 4 発現を評価するヒト腫瘍性疾患 (特に乳ガン) の検出のための診断法が、欧
州特許出願第 5 9 9, 2 7 4 号に記載されている。

10

e r b B 2 ガン遺伝子のアクチベーターに対する探求は、ヒレグリンポリペプチドのファ
ミリーの発見を導いた。それ故今までのところ特徴付けされたヒトにおけるヒレグリンポ
リペプチドは、LeeおよびWood,Genomics 16:790-91 (1993) によって第 8 染色体の短腕に
マップされた単一の遺伝子の選択的スプライシングから由来する。

Holmesらは、ヒレグリン- α (H R G- α)、ヒレグリン- β 1 (H R G- β 1)、ヒレ
グリン- β 2 (H R G- β 2) およびヒレグリン- β 3 (H R G- β 3) と彼らが呼ぶ E
r b B-2 レセプターに対するポリペプチドアクチベーターのファミリーを単離しクロー
ン化した。Holmesら,Science 256:1205-10 (1992) ;国際特許出願 WO 9 2 / 2 0 7 9 8 ;
および米国特許第 5, 3 6 7, 0 6 0 号参照。これらの研究者は、M C F 7 乳ガン細胞に
おける E r b B-2 レセプターのチロシンリン酸化を活性化させる精製ヒレグリンポリペ
プチドの能力を示した。さらに、S K-B R-3 細胞 (それは高レベルの E r b B-2 レセ
プターを発現する) に対するヒレグリンポリペプチドのマイトジェン活性もまた調べられ
た。

20

ヒレグリンは、「プロ-ヒレグリン」として典型的に発現される大きなマルチドメイン
タンパク質である。プロ-ヒレグリンは、成熟可溶性形態 (通常約 4 4-4 5 k D a) へと
タンパク質溶解性プロセッシングを受けることが示されている。プロセッシングは、細胞内ま
たは細胞表面で生じることが示されている。可溶性形態におけるドメインは、イムノグロ
ブリンホモロジー (I g 様) ドメイン、グリコシル化部位の豊富なスパーサー領域、およ
び E r b B レセプター結合および活性化に必要である EGF に見出されるドメインと同様な
ドメインを、(N から C 末端に向かって順番に) 含む。Barbacciら,J.Biol.Chem.270:958
5-89 (1995) 参照。

30

ヒレグリン E G F 様ドメインは、E G F 残基 1-4 8 (Holmesら,上記参照) に対する実
質的な構造的相同性 (Jacobsenら,Biochemistry 35:3402-17 [1996]) およびそれに対す
る制限的な配列ホモロジーによって特徴付けされている。ヒレグリン E G F 様ドメインと
E G F の間の構造的相同性は、ヒレグリン- β 1 内に置換された E G F 配列のブロックが
、E r b B-3 と E r b B-2 を共発現する細胞に対する結合を損傷しないことを示すデ
ータによって確立されている。Barbacciら,上記参照。

ヒレグリンは最初の 2 1 3 アミノ酸残基において実質的に同一である一方で、それらはそ
の C 末端部分が異なる二つの E G F 様ドメインに基づいて、 α および β という二つの主要
な型に分類される。例えば、ヒレグリン- α E G F 様ドメインは、C 末端近傍の 9 個の置
換によって β 1 アイソフォームのものと異なる。 β アイソフォームは、 α アイソフォー
ムよりおよそ 8 から 1 0 倍高い親和性を有して E r b B レセプターに結合することが報告
されている。Wenら,Mol.Cell.Biol.14:1909-19 (1994) 。

40

ヒレグリン- α E G F ドメインの溶液構造は、NMR によって高分解能で最近測定されて
いる。Jacobsenら,上記参照;Nagataら,EMBO J.13,3517-3523 (1994) 。このドメインの顕
著な性質は、(1) 周期的なヘリックスを有する中心的な 3 つのストランドの β シート
を含む N 末端サブドメイン、および (2) 短い長さの β シートを含むより小さい C 末端サ
ブドメインを含む。E G F ドメインは、3 つのジスルフィド結合によって安定化され、それ
は N 末端サブドメイン中に 2 つ存在し、C 末端サブドメイン中に 1 つ存在する。システ
イン残基に相当する 6 個のペアは、全てのヒレグリンおよび E G F から由来する E G F 様ド

50

メインで保存されている。

ヒトHRGのラット同等物である44kDaのneuro分化因子(NDF)は、Pelesら,Cell,69:205-16(1992)およびWenら,Cell,69:559-72(1992)によって最初に記載された。

ヒトヒレグリンポリペプチドと同様に、NDFは、EGF様ドメインに続くIg様ドメインを有し、N末端シグナルペプチドを欠いている。後に、Wenらは、NDFのファミリーを拡張するために、「徹底的なクローニング」を実施した。Wenら,Mol.Cell.Biol.,14:1909-19(1994)。この仕事により、6の別個の線維芽細胞プロNDFが明らかにされた。Holmesらの呼称を採用して、NDFは、EGF様ドメインの配列に基づいてそれぞれαおよびβポリペプチドとして分類された。アイソフォーム1から4は、EGF様ドメインおよびトランスメンブランダドメインの間の可変領域を基礎として特徴付けされる。また、アイソフォームa、bおよびcは、可変長細胞質ドメインに基づいて定義される。これらの研究者は、様々なNDFアイソフォームが、選択的スプライシングによって生じ、組織特異的機能を実行していると結論付けている。欧州特許出願EP 505 148；国際特許出願WO 93/22424；および国際特許出願WO 94/28133(NDFを議論している)もまた参照。Fallsら,Cell 72:801-815(1993)は、「アセチルコリンレセプター誘導活性(ARIA)ポリペプチド」と呼ばれるヒレグリンファミリーのもう一つのメンバーを記載する。ニワトリ由来ARIAポリペプチドは、筋アセチルコリンレセプターの合成を刺激する。国際特許出願WO 94/08007参照。ARIAは、β型ヒレグリンであり、HRG-αおよびHRGβ1-β3のIg様ドメインとEGF様ドメインの間の全部のスペーサー領域を欠いている。

Marchionniら,Nature 362:312-318(1993)は、「グリア増殖因子(GGF)」と呼ばれるいくつかのウシ由来タンパク質を同定した。これらのGGFは、上記記載の他のヒレグリンタンパク質とIg様ドメインおよびEGF様ドメインを共有するが、アミノ末端クリングルドメインもまた有する。GGFは一般的に、Ig様ドメインとEGF様ドメインの間の完全なスペーサー領域を有しない。GGFの一つ、GGFIIのみが、N末端シグナルペプチドを有する。国際特許出願WO 92/18627；WO 94/00140；WO 94/04560；WO 94/26298；WO 95/32724(GGFおよびその使用を記載する)もまた参照。

Hoらは、「感覚および運動ニューロン由来因子(SMDF)」と呼ばれるヒレグリンファミリーのもう一つのメンバーを記載する。Hoら,J.Biol.Chem.270:14523-32(1995)。このタンパク質は、全ての他のヒレグリンポリペプチドの特徴であるEGF様ドメインを有するが、独特なN末端ドメインを有しない。さらに、SMDFは、他のヒレグリンポリペプチドで見出されるIg様ドメインおよびスペーサー領域の両者を欠いている。SMDFのもう一つの特徴は、N末端近傍の二つの領域の疎水性アミノ酸の存在である。

ヒレグリンポリペプチドは、ErbbB-2レセプターを活性化する能力に基づいて最初に同定された(Holmesら,上記参照を参照)一方で、neu(erbbB2)を発現する特定の卵巣細胞、およびneuトランスフェクト線維芽細胞は、NDFを結合も交差反応もせず、またそれらはNDFに応答してチロシンリン酸化も受けないことが発見されている。Pelesら,EMBO J.12:961-71(1993)。この発見は、もう一つの細胞構成要素が、十分なヒレグリン応答性を与えるために必要であることを示した。

Carrawayらは後に、NIH-3T3線維芽細胞に結合した¹²⁵I-erHRG-β1 177-244が、ウシerbbB3を用いて安定にトランスフェクトするが、元の細胞をトランスフェクトしないことを示した。これらの研究者はまた、昆虫細胞においてウシErbbB-3レセプターを発現し、HRG-β1 177-244が、これらの細胞から溶解されたErbbB-3レセプターの調製物に結合することを示した。彼らは、ErbbB-3が、ヒレグリンに対するレセプターであり、固有のチロシン残基のリン酸化を介在するのと同様に、両レセプターを発現する細胞におけるErbbB-2レセプターのリン酸化も介在すると結論付けた。Carrawayら,J.Biol.Chem.269:14303-06(1994)。Sliwowskiらは、erbbB3単独でトランスフェクトされた細胞が、ヒレグリンに対する低親和性を示す一方で、erbbB2およびerbbB3の両方でトランスフェクトされた細胞は、より高い親和

性を示すことを見出した。Sliwowskiら,J.Biol.Chem.269:14661-65 (1994)。

Plowmanおよびその共同研究者は、E r b B-4/E r b B-2レセプター活性化を同時に研究した。彼らは、E r b B-2レセプターを単独で、E r b B-4レセプターを単独で、または二つのレセプターを共に、ヒトTリンパ球において発現し、ヒレグリンがE r b B-4のチロシンリン酸化を刺激することができるが、両レセプターを発現する細胞においてのみE r b B-2リン酸化を刺激することができることを示した。Plowmanら,Nature 36:473-75 (1993)。

これらの観察は、Kokaiら,Cell 58:287-92 (1989),Sternら,EMBO J.7:995-1001 (1988),およびKingら,4:13-18 (1989)によって以前に記載された「レセプタークロストレーキング」概念に一致する。これらの研究者は、E G F Rに対するE G Fの結合が、E G F Rキナーゼドメインの活性化、およびE r b B-2レセプターの交差リン酸化を引き起こすことを見出した。これは、リガンド誘導性レセプターヘテロダイマー化、および該ヘテロダイマー内のレセプターの同時的なクロスリン酸化の結果であると考えられる。Wadaら,Cel l 61:1339-47 (1990)。

それ故、E r b Bレセプターは、リガンド誘導性レセプターダイマー化によって活性化されると考えられる。特異的に、ヒレグリンは、E r b B-3およびE r b B-4レセプターに別々に結合することができるが、E r b B-2レセプターには結合できない。しかしながら、E r b B-2は、シグナリングに必要であり、E r b B-3またはE r b B-4と組み合わせてE r b B-2を含むヘテロダイマーは、E r b B-3またはE r b B-4を含むホモダイマーよりも高い親和性を有してヒレグリンを結合する。Plowmanら,Nature 366:473-75 (1993);Sliwowskiら,J.Biol.Chem.269:14661-65 (1994)。

ヒレグリンの生物学的活性は、いくつかのグループによって調査されている。例えば、Holmesら(上記参照)は、ヒレグリンが乳房細胞系(S K-B R-3およびM C F-7のような)に対するマイトジェン効果を発揮することを見出した。Lewisらは、ヒレグリン-β 1が数多くのヒト乳房および卵巣腫瘍細胞系においてソフトアガーで増殖を刺激し、コロニー形成を増大することを報告した。Lewisら,Cancer Research 56:1457-65 (1996)。これらの研究者はまた、E r b B-2がヒレグリン応答性の重要なメディエーターであることを示した。

Pinkas-Kramarskiらは、N D F(ラットヒレグリン)が、胚および成人ラット脳におけるニューロンおよびグリア細胞、並びにラット脳細胞の一次培養物において発現されていることを見出し、N D Fが星状細胞に対する生存および成熟因子として機能することを示唆した。Pinkas-Kramarskiら,PNAS USA 91:9387-91 (1994)。Danilenkoらは、N D FおよびE r b B-2レセプターの相互作用が、傷の修復の間の上皮の移動および分化を導くことにおいて重要であることを報告した。Danilenkoら,Abstract 3101,FASEB 8(4-5):A535 (1994)。

MeyerおよびBirchmeirは、in situハイブリダイゼーションおよびR Nアーゼ保護実験を使用して、胚形成の間、および周産期の動物におけるマウスヒレグリンの発現を分析した。MeyerおよびBirchmeier,PNAS USA 91:1064-68 (1994)。これらの著者は、この分子の発現に基づいて、ヒレグリンが間葉因子及び神経因子としてイン・ビボで役割を演じることを結論付けている。彼らの発見はまた、ヒレグリンが上皮の形成において機能することを示した。

Fallsら(上記参照)は、ニワトリA R I Aが、運動ニューロンのシナプス後部の筋細胞において神経伝達物質レセプターの合成および濃度に主に影響する、筋管分化において役割を演じていることを見出した。CorfasおよびFischbachは、A R I Aがまた、ニワトリ筋肉におけるナトリウムチャネルの数を増大することを示した。CorfasおよびFischbach,J.Neuroscience 13:2118-25 (1993)。

ウシG G Fは、シュヴァン細胞に対してマイトジェン性であることが報告されている。例えば、Brockesら,J.Biol.Chem.255:8374-77 (1980);LemkeおよびBrockes,J.Neurosci.4:75-83 (1984);Brockesら,J.Neuroscience 4:75-83 (1984);Brockesら,Ann.Neurol.20:317-22 (1986);Brockes,Methods in Enzym.147:217-225 (1987);Marchionniら,上記参照

10

20

30

40

50

を参照。シュヴァン細胞は、ミエリン化ニューロンの軸索の周りを覆うミエリンを提供し、それ故末梢神経の形成、機能および再生において重要な役割を演じる。治療上の観点からこの役割の意味は、Leviら, J.Neuroscience 14:1309-19 (1994) によって注意が向けられている。Leviらは、損傷された脊髄の領域内に移植できるシュヴァン細胞を含む細胞性人工器官の構築に対する可能性を議論した。エクス・ビボでシュヴァン細胞を培養するための方法が記載されている。国際特許出願WO 94/00140; Liら, J.Neuroscience 16:2012-19 (1996) 参照。

G G F I I は、融合しかかった休止ヒト骨髄芽細胞に対してマイトジェン性であることが示されており、G G F I I の継続的な存在下で、クローン性ヒト骨髄芽細胞の分化は、分化の6日後に、より多い数の筋管を引き起こす。Sklarら, J.Cell Biochem., Abst.W462, 18 D, 540 (1994); 国際特許出願WO 94/26298 もまた参照。

新規なタンパク質の構造と機能の間の関係は、いかなる様々な利用可能なミューテーション分析法を用いても調べることができる。上記方法の例としては、アラニンスキャニングミュータジェネシスおよびファージミッドディスプレイが含まれる。アラニンスキャニングは、タンパク質またはタンパク質ドメインにおける活性残基（すなわちタンパク質機能に対して有意な効果を有する残基）を同定するために使用され得る。例えば、CunninghamおよびWellsは、レセプターを結合するのに重要であるヒト成長ホルモンにおける残基を同定するために、アラニンスキャニングを使用した。CunninghamおよびWells, Science 244:1081-85 (1989)。アラニンスキャニングにおいては、スキャンされるタンパク質またはドメインをコードする遺伝子を発現ベクター内に挿入し、連続的な残基がアラニンに変換されたタンパク質またはドメインをコードする一連のベクターを生産するためにミュータジェネシスを実施する。コードされたタンパク質またはドメインをこれらのベクターから発現し、それからアラニン置換変異体の活性を、改変された活性を有するものを同定するために試験する。活性の改変は、アラニン置換部位での残基が活性残基であることを示す。

ファージミッドディスプレイは、特定の結合活性のための数多くの変異体ポリペプチドのスクリーニングを許容するために開発された。SmithおよびParmleyは、外来ペプチドが、ファージ f d の遺伝子 I I I 内に短い遺伝子断片を挿入することによって、繊維状ファージの表面上に効率的に「ディスプレイ」され得ることを示した。Smith, Science 228:1315-17 (1985); ParmleyおよびSmith, Gene 73:305-18 (1985)。遺伝子 I I I コートタンパク質は、ファージ粒子の一つの末端で約5個のコピーで存在する。修飾されたファージは、遺伝子 I I I コートタンパク質に融合した外来ペプチドをディスプレイするために、「融合ファージ」と名付けられた。各融合ファージ粒子は、融合タンパク質のおよそ5個のコピーをディスプレイするので、この形態のファージディスプレイは「多価ディスプレイ」と名付けられた。

ScottらおよびCwirlaらは、融合ファージライブラリーが、「パンニング」として周知である連続的な親和性選択によってスクリーニングすることができることを示した。Scottら, Science 249:386-90 (1990); Cwirlaら, PNAS USA 87:6378-82 (1990)。しかしながら、高親和性融合ファージを選択する早期の努力は、おそらくファージ粒子の多価性のため失敗した。この問題は、融合タンパク質がファージミッドから低レベルで発現され、ヘルパーファージが野生型コートタンパク質の大過剰を提供するという「一価」ファージディスプレイ系の開発により解決された。Bassら, Proteins 8:309-14 (1990); Lowmanら, Biochem. 30:10832-38 (1991)。一価ファージディスプレイは、興味あるターゲットに高親和性を有して結合するものを単離する目的で、数多くの変異体ポリペプチドを生産しスクリーニングするために使用することができる。

発明の概要

本発明は、天然では見出されないアミノ酸配列を有し、および E r b B レセプターを結合する能力を有するヒレグリン変異体を提供する。一つの実施態様として、該変異体は、以下のものより成る群から選択された645アミノ酸天然ヒトヒレグリン-β1の残基に相当する選択された残基でアミノ酸置換を有する：

**S177, H178, L179, V180, K181, E184, E186,
K187, T188, V191, N192, G193, G194, E195,
M198, V199, K200, D201, N204, P205, S206,
R207, Y208, L209, K211, P213, N214, E215,
T217, G218, D219, Q222, N223, Y224, S228, および**

F229.

この実施態様の変異型として、アミノ酸置換が、選択された残基に相当する上皮増殖因子（E G F）残基と選択された残基を交換するものではない。

ヒレグリン変異体は、いかなる種から由来するヒレグリンファミリーのいかなる数の変異体でもあり得る。一つの実施態様として、ヒレグリン変異体は、例えばヒトヒレグリン-β 1のようなヒトヒレグリンの変異体である。本発明は、以下のものより成る群から選択されたアミノ酸置換を含むヒトヒレグリン-β 1変異体を提供する：

S177W; H178S, E, R, または A; V180Q, I, または E;

K181P または A; A183G; E184V, W, K, R, G, または N;

K185E, S, Q, または G; E186R; K187E または A; T188Q;

E195Q; F197Y; M198R または K; K200R; D201T または I;

P205T または Y; S206K, H, G, P, または R; R207Y;

Y208R または L; L209M または G; K211R; P213S, T, N,

または K; N214L, K, S, または E; F216M; N223H または W;

および M226I.

この実施態様の変異型として、ヒレグリン変異体は、この群から選択されたアミノ酸置換のセットを含む。アミノ酸置換のセットを有する本発明のいくつかのヒレグリン変異体は、E r b B-3 レセプター親和性の少なくとも 50 倍の増大を示し、E r b B-4 レセプター親和性の増大もまた伴う。

本発明はまた、ヒレグリン変異体が由来するヒレグリンよりも、E r b B-3 レセプターに対して E r b B-4 レセプターについてのより大きい特異性を有するヒレグリン変異体を含む。一つの実施態様として、このヒレグリン変異体は、H 1 7 8, L 1 7 9 および R 2 0 7 より成る群から選択された 6 4 5 アミノ酸天然ヒトヒレグリン-β 1 の残基に相当する選択された残基でアミノ酸置換を有する。

もう一つの実施態様として、E r b B-3 レセプターに対して E r b B-4 レセプターについてのより大きい特異性を有するヒレグリン変異体は、6 4 5 アミノ酸天然ヒトヒレグリン-β 1 の S 2 2 8 から K 2 3 1 残基に相当するアミノ酸残基の欠失を有し、欠失した残基に対して単一のメチオニンの置換を有する。

ここで開示された一つ以上のミューテーションを含むことに加えて、ヒレグリン変異体は、アミノ酸置換、少なくとも一つのアミノ酸の挿入、少なくとも一つのアミノ酸の欠失、または化学的修飾のような、一つ以上の他の修飾を有することができる。例えば、本発明は、断片であるヒレグリン変異体を提供する。この実施態様の変異型として、該断片は、約 1 7 5 残基から約 2 3 0 残基（すなわち E G F 様ドメイン）に広がるヒトヒレグリン-β 1 の部分に相当する残基を含む。この実施態様のさらなる変異型として、該断片は、約 1 7 5 残基から約 2 4 5 残基に広がるヒトヒレグリン-β 1 の部分に相当する残基を含む。

本発明の一つの態様は、上記修飾されたヒレグリン変異体を提供するための方法である。修飾（類）は、修飾された変異体が E r b B レセプターに対する能力を維持するように選択される。

ヒレグリン変異体に加えて、本発明は、関連する核酸分子、ベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明はまた、ヒレグリン変異体を発現することが可能な発現ベクターを含む宿主細胞を、ヒレグリン変異体の発現を許容する条件下で培養し、それからヒレグリン変異

10

20

30

40

50

体を培養物から回収するという、ヒレグリン変異体の生産法を提供する。

本発明の他の態様は、ヒレグリン変異体の様々な使用に関する。例えば、本発明は、ヒレグリン変異体を E r b B レセプターを発現する細胞と接触させるという、E r b B レセプターの活性化のための方法を提供する。ヒレグリン変異体は、例えばグリア細胞、シュヴァン細胞または筋細胞のような、細胞のエクソ・ビボでの生存、増殖または分化を促進するために、培養物中の細胞と接触させることができる。

代わりに、ヒレグリン変異体を、製薬学的に許容可能なキャリアーと組み合わせ、広範囲のガンの一つ、同様に神経系、筋系および上皮に影響する疾患および疾病を治療するために使用することができる。それ故、本発明は、製薬学的な組成物および治療法を提供する。

10

本発明はまた、サンプルがヒレグリンを結合する E r b B レセプターを含むかどうかを測定する方法を含む。特に、ヒレグリン変異体をサンプルと接触させ、ヒレグリン変異体とサンプルの構成要素の間の特異的な結合を、サンプル中に存在する E r b B レセプター（類）の存在及び／または量の指標として測定する。

【図面の簡単な説明】

図1は、数多くのヒレグリンポリペプチドの E G F 様ドメインにおけるアミノ酸配列、およびヒトヒレグリン-β1 E G F 様ドメイン（" b e t a 1 "）のアミノ酸配列の間の整列を示す。並べられた配列は以下の通りである：ヒトヒレグリン-α（a l p h a）、ヒトヒレグリン-β2およびβ3（b e t a 2およびb e t a 3）、neu分化因子a2およびb1からb4（n d f a 2およびn d f b 1-4）、グリア増殖因子I I（g g f）、感覚および運動ニューロン由来因子（s m d f）、ヒトヒレグリン-γ、およびアセチルコリンレセプター誘導性活性ポリペプチド（a r i a）。各配列について示された数字は、配列が示されている天然のポリペプチドのN末端から数えた、示された最初のアミノ酸の残基数である。" # " は、αおよびβ型 E G F 様ドメインの間の差異を示す。

20

図2は、ヒレグリン-β1 E G F 様ドメイン（ヒレグリン-β1 177-228残基）のアラニンスキャンの結果を示す。このドメイン内の個々のアミノ酸をアラニンにミューテートし、実施例2に記載されているように、g I I I 融合タンパク質としてファージ上に一価的にディスプレイした。ヒストグラムは、ファージ E L I S A によって測定された、E r b B-3およびE r b B-4レセプター-I g 融合物（E r b B-3-I gおよびE r b B-4-I g）に対する各アラニン変異体の結合親和性の変化を示す。X軸は、アラニンに変化された各アミノ酸とその位置を示す。Y軸は、ファージ上にディスプレイされている、野生型ヒレグリン-β1 E G F 様ドメインについての E C₅₀ に対する、各変異体についての E C₅₀ の比である。E C₅₀ は、固定化されたレセプター融合物に対して結合されたファージの全量の50%を移し替えるのに必要とされる可溶性レセプター融合物の濃度として計算された。E r b B-3結合結果は、黒い棒グラフで示され、E r b B-4結合結果は、白い棒グラフで示されている。

30

図3は、実施例3に記載されたファージディスプレイ研究でランダム化されたヒレグリン-β1 E G F 様ドメイン（ヒレグリンβ1 177-228残基）中の各位置での E r b B-3-I g に対する結合に対して選択されたアミノ酸を示す。バーの長さは、配列が測定されたファージディスプレイライブラリーA-EおよびG-I由来の変異体中の各位置での特定のアミノ酸の出現頻度を示す（すなわち、バーが長いほど高頻度を示す）。12のクローンを各ライブラリーから並べたが、ライブラリーHにおいては、12のクローンのうち一つのみが、望ましいランダム化ウィンドウにおいてミューテーションを有する変異体を表した（実施例3参照）。" W T " は、ヒレグリン-β1 E G F 様ドメインの野生型アミノ酸配列を示す。

40

図4は、実施例3に記載された組み合わせ変異体の E G F 様ドメイン中のアミノ酸置換を示す。野生型ヒレグリン-β1 E G F 様ドメイン（H R G 8）、ヒレグリンβ1 202-204残基の欠失を含むこのドメインの変異体（H R G 63）、および E G F 中の類似体ドメインの各アミノ酸配列が上部に示されている。示されたヒレグリン-β1アミノ酸配列の部分に対する残基のナンバーは、この配列の上部に示されている（天然のヒトヒレ

50

グリーン-β 1 のN末端から数字が打たれている)。示された E G F アミノ酸配列の部分に対する残基のナンバーは、この配列の下部に示されている (天然ヒト E G F のN末端から数字が打たれている)。" ." は、特定の位置で野生型残基と同一である残基を示す。" - " は、残基の不存在を示す。

発明の詳細な説明

本発明は、選択された残基で一つ以上のアミノ酸置換を有するヒレグリン変異体を提供する。本発明の範囲には、ヒトヒレグリンの変異体、及び特にヒトヒレグリン-β 1 の変異体が含まれる。本発明にかかるヒレグリン変異体は、選択された残基での単一のアミノ酸置換、または上記置換の組み合わせを有することができる。

ここで特定されるアミノ酸置換に加えて、本発明にかかるヒレグリン変異体は、例えばアミノ酸の欠失を含むさらなる修飾を有することができる。一つの実施態様として、ヒレグリン変異体は、E r b B レセプターの結合および活性化に十分である、「最小 E G F 様ドメイン」に相当するアミノ酸だけを残して、N および C 末端での欠失を有する。

本発明のヒレグリン変異体は、E r b B-3 または E r b B-4 のような E r b B レセプターを結合することが可能である。一つの実施態様として、変異体は、最も相同的な天然ヒレグリンの親和性と比較して、E r b B レセプターに対する増大した親和性を有する。E r b B レセプター結合に加えて、ヒレグリン変異体は、天然ヒレグリンの一つ以上の他の生物学的活性を所有することができる。

本発明はまた、ヒレグリン変異体に関する核酸分子、ベクター、および宿主細胞を提供する。本発明の核酸分子は、本発明のヒレグリン変異体またはその断片をコードする核酸分子をコードする、またはそれに相補的である。核酸分子は、二本鎖または一本鎖 DNA または RNA であり得る。本発明の核酸分子は、コードされたヒレグリン変異体の増殖および/または発現のための適切なベクター内に挿入することができる。上記ベクターは、例えば、ヒレグリン変異体の組換え生産を許容する適切な宿主内に導入される。

本発明のヒレグリン変異体は、様々な治療上及び非治療上の応用において有用である。特に、ヒレグリン変異体は、ガンおよび様々な疾患、並びに神経系、筋系および上皮の疾患を治療するために用いることができる。したがって、本発明は、ヒレグリン変異体を含む製薬学的組成物、および関連する治療法を包含する。

ヒレグリン変異体はまた、細胞培養法および診断法のような、様々な非治療上の応用において使用することができる。例えば、ヒレグリン変異体は、グリア細胞および筋細胞を含む、細胞のエクソ・ビボでの生存、増殖および分化を促進するために使用することができる。例示的な診断の応用として、ヒレグリン変異体は、e r b B (例えば e r b B 2) の過剰発現によって特徴付けされるガンの診断において使用される。したがって、本発明はまた、上記記載の方法を実施するために有用なキットを含む。

定義

ここで使用される、以下の語または表現は、他に示すところがない限り、以下に示される定義を有する。

「アミノ酸」および「残基」なる語は、ここで互換的に使用される。

「野生型アミノ酸」または「野生型残基」なる語は、天然のポリペプチドにおいて所定の位置で存在するアミノ酸を意味する。

アミノ酸は、標準的な三文字コードまたは一文字コードでここで表される。

二つ以上のポリペプチドにおける残基は、もし該残基がポリペプチド構造における類似の位置を占めるのであれば、「相当する」といわれる。本分野で周知のように、二つ以上のポリペプチドにおける類似の位置は、アミノ酸配列または構造的相同性に基づいて、ポリペプチド配列を並べることによって決定することができる。満足な整列を得るために、各配列中にギャップを導入することが必要であることは、当業者に理解されるであろう。例えば、ヒトヒレグリン-β 1 における残基に相当するヒト E G F 中の残基は、ヒレグリン-β 1 E G F 様ドメイン (ヒレグリン-β 1 177-228 残基) および図 4 中の類似する E G F ドメイン (E G F 1-48 残基) の間の整列において示される。

二つ以上のヒレグリンにおける残基は、もし該残基が最適な配列整列において並べられた

ならば、「相当する」といわれる。二つのポリペプチドの間の「最適な配列整列」は、最大の数の並べられた同一の残基が提供される整列として定義される。数多くのヒレグリンポリペプチドに対する最適な配列整列が、図1に示されている。

ヒレグリン-β1における残基位置は、アミノ酸に対する三文字または一文字コードによってここで名付けられており、引き続き、天然ヒトプロヒレグリン-β1（それは長さにおいて645アミノ酸である）のN末端から数えられた位置番号が付されている。例えば、ヒレグリン-β1の177位でのセリンは、“Ser177”または“S177”と表される。

以下では、他に示すところがあれば、ヒレグリン、ヒレグリン変異体、またはEGFのような関連するタンパク質における残基位置は、天然ヒトヒレグリン-β1のアミノ酸番号を参考としてここで特定化される。例えば、ヒレグリン-β1変異体は、1-176残基のN末端欠失を有することができる。この変異体における最初のアミノ酸は、ヒレグリン変異体の最初の残基とヒレグリン-β1のSer177が、二つのポリペプチドの間の最適な整列で並べられるので、「645アミノ酸ヒトヒレグリン-β1のSer177に相当する残基」としてここで同定される。

実施例3は、「最小EGF様ドメイン」と名付けられたヒレグリン-β1の177から228残基に相当する残基を含むヒレグリン-β1変異体を開示する。これらの変異体については、最小EGF様ドメイン（以下では「ヒレグリン-β1 EGF」または「HRG-β1 EGF」）における残基の位置、すなわち1-52残基の観点から、カッコにおいて、残基番号もまた表される。天然ヒトヒレグリン-β1にしたがって打たれた残基位置は、前者の位置の数字から176を差し引くことによって最小EGF様ドメインにおける残基位置に変換することができる。例えば、ヒレグリン-β1 Ser177については、177から176を差し引くことで1が与えられ、それ故ヒレグリン-β1 EGF Ser1は、ヒレグリン-β1 Ser177と同じ位置であると同定される。同じナंबरリング系が、実施例4で使用されている。

アミノ酸置換は、残基位置、引き続きヒレグリンポリペプチド内に置換されたアミノ酸に対するコードによって示される。それ故、ヒレグリン-β1のSer177でのアラニンの置換は、「ヒレグリン-β1 Ser177Ala」、「Ser177Ala」または「S177A」として表される。この例において、セリンは「置換されたアミノ酸」であり、アラニンは「置換アミノ酸」である。

二つのアミノ酸配列を記載するために用いられる、「相同」なる語は、アミノ酸配列が、ある程度のアミノ酸配列同一性を有することを示す。

ヒレグリン変異体

本発明は、ヒレグリン変異体を含む。「ヒレグリン変異体」なる語は、天然のヒレグリンのポリペプチド変異体を意味する。天然のヒレグリンは、天然で生じるヒレグリンポリペプチドのいかなるファミリーのものであれ、その全長のアミノ酸配列を有するポリペプチドとして定義される。このファミリーは、プロヒレグリン、同様にこれらのタンパク質の可溶性形態を包含する。本発明は、ヒトヒレグリン-β1の変異体を用いて例示される。実施例1-3参照。しかしながら、ヒレグリンファミリーは、最適な整列で並べられた場合、ヒレグリン-β1のEGF様ドメインと、少なくとも70%の配列同一性を有するEGF様ドメインを有する、いかなる天然で生じるポリペプチドをも包含する。それ故、天然のヒレグリンは、いかなる種、および数多くの天然で生じるアイソフォームまたは対立遺伝子形態の一つ由来でもあり得る。例示的なヒレグリンポリペプチドとして、neuro分化因子、グリア増殖因子、感覚および運動ニューロン由来因子、およびアセチルコリンレセプター誘導性活性ポリペプチドが含まれる。

一つの実施態様として、ヒレグリン変異体は、哺乳動物ヒレグリンの変異体である。この実施態様の変異型として、ヒレグリン変異体はヒトヒレグリンの変異体である。ヒトヒレグリンの例として、ヒレグリン-α（HRG-α）、ヒレグリン-β1（HRG-β1）、ヒレグリン-β2（HRG-β2）、ヒレグリン-β3（HRG-β3）、およびヒレグリン-γ（HRG-γ）が含まれる。

10

20

30

40

50

本発明にかかるヒレグリン変異体は、天然のヒレグリン中の野生型残基が、異なる残基によって置換されている、天然では見出されないアミノ酸配列を有する。このアミノ酸置換は、天然ヒトヒレグリン-β 1の残基に相当する一つ以上の選択された残基で生じる。選択された残基は、以下の群から選択される：

**S177, H178, L179, V180, K181, E184, E186,
K187, T188, V191, N192, G193, G194, E195,
M198, V199, K200, D201, N204, P205, S206,
R207, Y208, L209, K211, P213, N214, E215,
T217, G218, D219, Q222, N223, Y224, S228, および
F229.**

10

しかしながら、一つの実施態様として、アミノ酸置換は、選択された残基に相当する E G F 残基を用いた選択された残基の置換ではない。アラニンを用いたヒレグリン-β 1中のいかなる上記の残基の置換も、ファージ E L I S Aによって測定される E r b B-3または E r b B-4レセプターについての親和性に対する少なくとも2倍の効果を有する。実施例2参照。

一つの実施態様として、選択された残基は以下の群から選択される：

**S177, H178, L179, E186, K187, T188, V191,
N192, G193, G194, E195, R207, L209, K211,
P213, N214, T217, G218, Q222, Y224, および F229.**

20

アラニンを用いたヒレグリン-β 1中のいかなるこれらの残基の置換も、ファージ E L I S Aによって測定される E r b B-3または E r b B-4レセプターについての親和性に対する少なくとも5倍の効果を有する。実施例2参照。

この実施例の変異型として、選択された残基は以下の群から選択される：

**H178, L179, K187, N192, G193, G194, E195,
R207, K211, T217, G218, Q222, および Y224.**

アラニンを用いたヒレグリン-β 1中のいかなるこれらの残基の置換も、ファージ E L I S Aによって測定される E r b B-3または E r b B-4レセプターについての親和性に対する少なくとも10倍の効果を有する。実施例2参照。

30

一般的に、もし機能が置換のために選択された位置で保存されているのであれば、選択された残基を置換するために使用された残基は、野生型残基と性質において実質的に異ならない、すなわち、アミノ酸置換は保存的な置換である。アミノ酸は、表1に示されるように性質にしたがってグループ分けし得る。

表 1

同様な性質を有するアミノ酸の群

群	性質	アミノ酸
a	正の電荷	L y s、A r g、H i s
b	負の電荷	A s p、G l u
c	アミド	A s n、G l n
d	芳香族	P h e、T y r、T r p
e	疎水性	P r o、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、 M e t
f	非電荷親水性	S e r、T h r

40

それ故、機能を保存するために、野生型残基を置換するために使用される残基は、通常同

50

じ群または関連する群から選択される。さらに、セリンまたはアラニンは、ほとんどの他の残基を置換するために使用することができる。表2は各アミノ酸に対する保存的な置換を示し、それぞれに対する関連する群を同定し、アミノ酸がセリンまたはアラニンをういて置換できることを示す。表2はまた、好ましいアミノ酸置換をも示す。

表2

保存的なアミノ酸置換

AA*	選択される置換アミノ酸	好ましい置換	
Ala	e ¹ : Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met f: Ser, Thr	Ser	10
Arg	a: Lys, Arg, His Ser, Ala	Lys Ser, Ala	
Asn	a: Lys, Arg, His c: Asn, Gln Ser, Ala	Gln Ser, Ala Glu	
Asp	b: Asp, Glu c: Asn, Gln Ser, Ala	Ser, Ala Ala Ser	
Cys	e: Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met f: Ser, Thr	Asn Ser, Ala Asp	20
Gln	a: Lys, Arg, His c: Asn, Gln Ser, Ala	Ser, Ala Pro, Ala	
Glu	b: Asp, Glu c: Asn, Gln Ser, Ala	Arg Ser, Ala Ala, Val, Leu Ala, Val, Ile	
Gly	e: Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met f: Ser, Thr	Arg Ser, Ala Ala, Val, Ile	
His	a: Lys, Arg, His Ser, Ala	Arg Ser, Ala Ala, Val, Leu Ala, Val, Ile	
Ile	e: Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Met	Arg Ser, Ala Ala, Val, Leu, Ile	
Leu	e: Pro, Gly, Ala, Val, Ile, Met	Arg Ser, Ala Ala, Val, Leu, Ile	
Lys	a: Lys, Arg, His Ser, Ala	Tyr Ala, Val, Leu, Ile	30
Met	e: Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met	Phe Gly, Ala Thr	
Phe	a: Lys, Arg, His d: Phe, Tyr, Trp Ala, Val, Leu, Ile	Ala	
Pro	a: Lys, Arg, His d: Phe, Tyr, Trp Gly, Ala	Ser Ala Phe Ala Phe, Ala, Val, Leu, Ile	
Ser	a: Lys, Arg, His f: Ser, Thr Ala	Leu, Ile, Ser, Ala	40
Thr	a: Lys, Arg, His f: Ser, Thr Ala		
Trp	d: Phe, Tyr, Trp Ala		
Tyr	d: Phe, Tyr, Trp Ala, Val, Leu, Ile		
Val	e: Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met Ser, Ala		

・野生型アミノ酸

* 以下の場合の文字は、表1のアミノ酸の群を示す。

一つの実施態様として、ヒレグリン変異体はヒトヒレグリン-β1の変異体であり、以下の群から選択されるアミノ酸置換（類）を含む：

S177W; H178S, E, R, または A; V180Q, I, または E;
K181P または A; A183G, T, または D; E184V, W, K, R,
G, または N; K185E, S, Q, または G; E186R; K187E または
A; T188Q; E195Q; F197Y; M198R または K; K200R;
D201T または I; P205T または Y; S206K, H, G, P, または R;
R207Y; Y208R または L; L209M または G; K211R; P213S,
T, N, または K; N214L, K, S, または E; F216M; N223H
または W; および M226I.

10

本発明のもう一つの態様は、実施例 3 に記載された何れかのヒレグリン変異体のような、アミノ酸置換のセットを含むヒトヒレグリン- β 1 の変異体である。アミノ酸置換のセットは、以下に示された群から選択される（実施例 3 由来の変異体ナンバーが左側の欄に示されており、引き続き当該変異体のアミノ酸置換のセットが示されている）：

B5 : A183G, E184W, K185D, E186R, K187E, T188G, M226I;
 B10 : A183D, E184K, K185S, E186R, K187E, T188G, M226I;
 D1 : F197Y, M198K, K200R, D201I, M226I;
 E2 : P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
 E3 : P205Y, S206R, R207Y, Y208R, L209M, M226I;
 E6 : P205T, S206H, R207Y, Y208R, L209M;
 E8 : P205T, S206K, R207Y, Y208R, L209G;
 I1 : N223W, M226I;
 I2 : N223H, M226I;
 HRG37 : S177W, H178E, K181P, A183G, E184W, K185D, E186R, K187E, T188G, M226I;
 HRG48 : P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
 HRG53 : A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T;
 HRG54 : A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
 HRG55 : A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
 HRG56 : A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, M226I;
 HRG57 : F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
 HRG58 : F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
 HRG59 : F197Y, M198R, D201T, M226I;
 HRG60 : A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, M226I;
 HRG61 : A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
 HRG62 : A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
 HRG71 : F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, N223H, M226I; and
 HRG73 : A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, N223H, M226I.

これらのアミノ酸置換のセットのそれぞれは、ファージ E L I S A によって測定すると、E r b B - 3 レセプター親和性の少なくとも 5 倍の増大を生ずる。実施例 3 参照。

10

20

30

40

50

この実施態様における変異体では、アミノ酸置換のセットは、以下の群から選択される：

- B5:** A183G, E184W, K185D, E186R, K187E, T188G,
M226I;
- E2:** P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M;
- I2:** N223H, M226I;
- HRG48:** P205Y, S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
- HRG53:** A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y,
M198R, D201T;
- HRG56:** A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, M226I;
- HRG57:** F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y,
Y208L, L209M;
- HRG58:** F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y,
Y208L, L209M, M226I;
- HRG59:** F197Y, M198R, D201T, M226I;
- HRG60:** A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y,
M198R, D201T, M226I;
- HRG61:** A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, P205Y,
S206G, R207Y, Y208L, L209M, M226I;
- HRG62:** A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y,
M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L,
- HRG71:** F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y,
Y208L, L209M, N223H, M226I; and
- HRG73:** A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y,
M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L,
L209M, N223H, M226I.

10

20

30

これらのアミノ酸置換のセットのそれぞれは、ファージ E L I S A によって測定すると、E r b B-3 レセプター親和性の少なくとも 20 倍の増大を生ずる。実施例 3 参照。

この実施態様のもう一つの変異型として、アミノ酸置換のセットは、以下の群から選択される：

- HRG58:** F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y,
Y208L, L209M, M226I;
- HRG60:** A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y,
M198R, D201T, M226I;
- HRG71:** F197Y, M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y,
Y208L, L209M, N223H, M226I; and
- HRG73:** A183G, K185E, E186R, K187E, T188G, F197Y,
M198R, D201T, P205Y, S206G, R207Y, Y208L,
L209M, N223H, M226I.

40

これらのアミノ酸置換のセットのそれぞれは、ファージ E L I S A によって測定すると、E r b B-3 レセプター親和性の少なくとも 50 倍の増大を生ずる。実施例 3 参照。

50

本発明はまた、ヒレグリン変異体が由来するヒレグリンよりも、E r b B-3レセプターに対して、E r b B-4レセプターについてのより大きい特異性を有するヒレグリン変異体が含まれる。上記増大したE r b B-4レセプター特異性は、E r b B-3レセプターに対する結合よりも、E r b B-4レセプターに対する結合についてより小さい変異体：野生型E C₅₀比として測定され得る。一般的に、増大したE r b B-4レセプター特異性を有するヒレグリン変異体は、E r b B-4レセプターに対するほぼ野生型の親和性を有し、またはE r b B-3レセプターに対する有意に減少した親和性（すなわち少なくとも5-10倍）を好ましくは共に有する。

一つの実施態様として、増大したE r b B-4レセプター特異性を有するヒレグリン変異体は、H 1 7 8, L 1 7 9およびR 2 0 7より成る群から選択された6 4 5アミノ酸天然ヒトヒレグリン-β 1の残基に相当する選択された残基でアミノ酸置換を有する。例えば、本発明は、アミノ酸置換H 1 7 8 EまたはR 2 0 7 Pを含むヒトヒレグリン-β 1を提供する。

10

もう一つの実施態様として、増大したE r b B-4レセプター特異性を有するヒレグリン変異体は、6 4 5アミノ酸天然ヒトヒレグリン-β 1のS 2 2 8からK 2 3 1残基に相当するアミノ酸残基の欠失を有し、欠失された残基の代わりに単一のメチオニンの置換を有する。この実施態様の変異型として、ヒレグリン変異体はまた、アミノ酸置換H 1 7 8 Lを含む。

上記アミノ酸置換に加えて、ヒレグリン変異体は、任意に以下の修飾のいずれかを単一にまたは組み合わせて有する；

20

(1) 一つ以上のさらなるアミノ酸の置換；

(2) ヒレグリン変異体のアミノ酸配列のNまたはC末端に加えられた、または上記配列中に挿入された一つ以上のアミノ酸；

(3) ヒレグリン変異体から欠失された一つ以上のアミノ酸；および

(4) ヒレグリン変異体中のアミノ酸の一つ以上の共有結合修飾。

それ故、ヒレグリン変異体は、「実質的に全長」であり得、それはここにおいて、変異体が最も相同である天然のヒレグリンと少なくとも90%、ヒレグリン変異体が同じ長さであることを意味する。代わりに、ヒレグリン変異体は、最も相同な天然ヒレグリンの90%未満の長さである「断片」でもあり得る。断片であるヒレグリン変異体は、一般的に約30から約100アミノ酸、より一般的に約40から約60アミノ酸、さらにより一般的に約45から約65アミノ酸、そして最も一般的に約50アミノ酸の長さである。

30

例えば、ヒレグリン変異体は、「最小E G F様ドメイン」に相当するアミノ酸を含むことができる。最小E G F様ドメインは、E r b Bレセプターの結合および活性化に対して十分である天然のヒレグリンの部分である。一般的に、最小E G F様ドメインは、約70アミノ酸未満であり、通常約60アミノ酸未満の長さである。ヒトヒレグリン-β 1を参考として用いると、最小E G F様ドメインは1 7 7-2 2 8残基にわたっている。他に示すところがあれば、「H R G-β 1 E G F」は、最小E G F様ドメインを指す。

本発明にかかるヒレグリン変異体の適した共有結合修飾の例として、検出可能な標識との接合、「ペグ化」および細胞毒性試薬との接合が制限されることなく含まれる。ヒレグリン変異体は、サンプル中のE r b Bレセプターの存在を検出するために有用な接合物を生産するために、広範囲の様々な利用可能な標識の何れかに接合することができる。適切な標識には、放射性同位元素、蛍光標識、および酵素標識が含まれる。例示的な放射性同位元素標識として、³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³Hおよび¹³¹Iが含まれる。ヒレグリン変異体は、Current Protocols in Immunology Vols.1 & 2 (Coligenら, Wiley Publishers) に一般的に記載されているように、放射性同位元素に接合することができる。

40

ヒレグリン変異体に対する接合物として適した蛍光標識には、希土類キレート（ユーロピウムキレート）、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、リサミン、フィコエリトリン、およびテキサスレッド、並びにそれらの誘導体が含まれる。接合物は例えば、Current Protocols in Immunology上記参照に記載されているように調製される。

様々な酵素-基質系が利用可能であり、米国特許第4, 2 7 5, 1 4 9号はこれらのいく

50

つかのレビューを提供する。一般的に、上記系に有用な酵素は、基質の容易に検出可能な化学的改変を触媒する。例えば、酵素は、分光学的に測定され得る色素の変化を触媒し、あるいは蛍光計または化学発光計を用いてそれぞれ検出し得る蛍光または化学発光の変化を触媒することができる。例示的な酵素標識には、ルシフェラーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、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、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ等が含まれる。ヒレグリン変異体は、O'Sullivanら, Methods in Enzym. 73:47-166 (1981) および Current Protocols in Immunology (上記参照) に一般的に記載されているように、酵素標識に接合することができる。所定の酵素標識と共に使用される適切な基質は、当業者に周知である。

10

本発明のヒレグリン変異体のもう一つの例示的な修飾はペグ化であり、それはポリペプチドの ϵ -アミノ基(類)に、一つ以上のポリエチレングリコール(PEG)基を接合することを指す。ペグ化は、イン・ビボ半減期を増大し、および/または治療上のタンパク質の免疫原性および潜在的な毒性を減少するので、ヒレグリン変異体が製薬学的な使用を企図される場合、ペグ化は望ましい。Abuchowskiら, J. Biol. Chem. 252:3582-86 (1977) 参照。

細胞毒性試薬を用いたヒレグリン変異体の接合は、その表面で適切な ErbB レセプターを発現する細胞を特異的に結合するターゲット化細胞毒性試薬を提供する。「細胞毒性試薬」なる語は、細胞の機能を阻害または妨げ、および/または細胞の破壊を引き起こす物質をいう。この用語は、例えば放射性活性同位元素(例えば I、Y、Pr) および化学療法試薬を含む。

20

「化学療法試薬」とは、ガンの治療に有用ないかなる化学的化合物をもここで指す。「ガン」なる語は、非制御的な細胞増殖によって特徴付けされる哺乳動物における生理学的疾患を指す。ガンの例としては、ガン腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、および白血病が制限されることなく含まれる。上記ガンのより特異的な例としては、扁平上皮ガン、小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン、胃ガン、膵臓ガン、グリア芽細胞腫および神経線維腫のようなグリア細胞腫、子宮頸ガン、卵巣ガン、肝臓ガン、膀胱ガン、肝細胞ガン、乳ガン、大腸ガン、結腸直腸ガン、子宮内膜ガン、唾液腺ガン、腎臓ガン、腎性ガン、前立腺ガン、外陰ガン、甲状腺ガン、肝ガン腫、および様々な型の頭と頸のガンが含まれる。化学療法試薬の例としては、アドリアマイシン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル(5-FU)、シトシンアラビノシド(Ara-C)、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、シトキシン、タクソール、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ビンクリスチン、VP-16、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、ニコチンアミド、エスペラミシン、メルファランおよびいかなる関連するナイトロジェンマスタード、および内分泌系治療薬(ジエチルブチルベストロール[DES]、タモキシフェン、黄体形成ホルモン放出ホルモン拮抗薬、プロゲスチン、抗プロゲスチン等のような)が含まれる。

30

化学的化合物に対する接合に加えて、いかなる上記記載のヒレグリン変異体も、「キメラヒレグリン変異体」を生産するために異種ポリペプチドに対する融合によって修飾することができる。(キメラヒレグリン変異体はまた、「融合タンパク質」としてもここで示される。)典型的には、ヒレグリン変異体の生物学的活性を妨げるために、異種ポリペプチドをヒレグリン変異体のNまたはC末端で融合する。しかしながら、異種ポリペプチドはまた、生物学的活性に重要ではないヒレグリン変異体の領域に導入される。一般的に、キメラヒレグリン変異体は、組換え法によって生産される。キメラヒレグリン変異体の例としては、「シグナル配列」、「精製ハンドル」、および免疫グロブリン配列に融合されたヒレグリン変異体が含まれる。

40

「シグナル配列」とは、キメラタンパク質を発現する細胞から、それらを融合したポリペプチドの分泌を導くアミノ酸配列である。それ故、シグナル配列に対するヒレグリン

50

変異体の融合は、キメラヒレグリン変異体を宿主細胞培養培地内に分泌させ、そこからキメラヒレグリン変異体を比較的容易に回収することができるため、ヒレグリン変異体の組換え生産を容易にする。

適切なシグナル配列は、シグナル配列を有するいかなるタンパク質からも得ることができ、典型的にヒレグリン変異体のN末端に融合される（がいつもそうであるわけではない）。原核生物シグナル配列をコードするDNAは、例えば *lamB* または *ompF*、*MalE*、*PhoA* および他の遺伝子から得ることができる。本発明を実施するための簡便な原核生物シグナル配列は、大腸菌熱安定性エンテロトキシンII（STII）シグナル配列である。

「精製ハンドル」とは、「結合パートナー」と呼ばれるもう一つのポリペプチドを結合するポリペプチドの部分である。ヒレグリン変異体に対する精製ハンドルの融合は、該変異体に結合パートナーを結合する能力を与え、それは、結果として生じるキメラヒレグリン変異体の精製を容易にする。一般的に、精製ハンドルは、結合パートナーが、キメラヒレグリン変異体が精製される混合物中存在する他の構成要素と実質的に交差反応しないように選択される。ここで用いられる、「実質的に交差反応しない」なる語は、精製ハンドルに対する結合パートナーの親和性が、混合物中存在するいかなる他の構成要素に対するいかなる親和性の少なくとも約20倍、一般的に少なくとも約100倍、より一般的に少なくとも約1000倍であることを意味する。

一つの実施態様として、精製ハンドルは、抗体によって認識されるエピトープであり、それ故該キメラヒレグリン変異体は、「エピトープタグ化ヒレグリン変異体」と呼ばれる。適切なエピトープは一般的に、少なくとも5アミノ酸、一般的に約10から約50の間のアミノ酸、より一般的に約10から約30の間のアミノ酸を有する。

イムノグロブリン配列に融合したヒレグリン変異体を含むキメラ分子は、「ヒレグリン変異体イムノアドヘシン」と呼ばれる。一つの実施態様として、イムノグロブリン配列は、イムノグロブリン定常ドメインである。ヒレグリン変異体イムノアドヘシン中のイムノグロブリン配列は、*IgG*₁、*IgG*₂、*IgG*₃ または *IgG*₄ サブタイプ、*IgA*、*IgE*、*IgD* または *IgM* から得ることができる。一つの実施態様として、イムノグロブリン配列は、*IgG*₁ または *IgG*₃ から得られる。

キメラヒレグリン変異体の他の例としては、チオレドキシシン、「サルベージレセプター結合エピトープ」、または細胞毒性ポリペプチドに融合されたヒレグリン変異体を含む。チオレドキシシンとのヒレグリン変異体の融合は発現を増大させ、アガロースのような固体の支持体に共有結合することができるフェニルアルシンオキシドを使用した精製を容易にする精製ハンドルを提供する。（フェニルアルシンと官能化したアガロースは、Invitrogen Corp., San Diego, CA から ThibondTM 樹脂として商業的に入手可能である）。例示的なチオレドキシシン変異体融合タンパク質は、実施例2に記載されている。

「サルベージレセプター結合エピトープ」なる語は、*IgG* のイン・ビボでの血清半減期を増大する *IgG* 分子（例えば *IgG*₁、*IgG*₂、*IgG*₃ または *IgG*₄）のFc領域のエピトープを指す。本発明にかかるヒレグリン変異体に対する融合物として適切なサルベージレセプター結合エピトープには、いかなる周知のサルベージレセプター結合エピトープもが含まれる。

「細胞毒性ポリペプチド」なる語は、細胞機能を阻害するまたは細胞を殺傷するポリペプチドを指す。ヒレグリン変異体に対する融合物として適切な細胞毒性ポリペプチドには、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素学的に活性な毒素およびその断片、並びにSH2含有基質タンパク質に対するチロシンキナーゼの結合を阻害するペプチドのようなガン遺伝子産物／チロシンキナーゼインヒビターが含まれる（例えば国際特許出願WO 94/07913参照）。

一つの実施態様として、キメラヒレグリン変異体は、「プロドラッグ」を活性薬剤に変換する酵素に融合したヒレグリン変異体を含む。典型的には、「プロドラッグ」は、薬剤自体よりも細胞毒性の少ない、および細胞毒性薬剤に酵素学的に活性化または変換されることができる細胞毒性薬剤の前駆体または誘導体形態である。本発明のプロドラッグには、

リン酸含有プロドラッグ、チオリン酸含有プロドラッグ、硫酸含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、フェノキシアセトアミド含有プロドラッグ、フェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシン、5-フルオロウリジンプロドラッグ、およびそれらの誘導体が含まれる。本発明の使用のためのプロドラッグを生産するために誘導化することができる細胞毒性薬剤の例として、上記記載の化学療法試薬が制限されることなく含まれる。

本発明にかかるヒレグリン変異体は、E r b Bレセプターを結合することができる。「E r b Bレセプター」なる語は、哺乳動物クラスIチロシンキナーゼレセプターの何れかを指す。上記レセプターの例としては、E r b B-1レセプター（「E G Fレセプター」としても周知である）、E r b B-2レセプター（H E R 2レセプター」とも呼ばれる）、E r b B-3（または「H E R 3」）レセプター、およびE r b B-4（または「H E R 4」）レセプターが含まれる。「結合できる」なる語は、少なくとも1 mMの解離定数（ K_d ）をもつもう一つのポリペプチドを結合するポリペプチドを記載するために使用される。

E r b B-3およびE r b B-4レセプターを結合可能な例示的なヒレグリン変異体は、上記および実施例中に議論されている。さらなる修飾（たとえばさらなるアミノ酸の置換、付加、挿入、または欠失、あるいは共有結合修飾）を有するさらなるヒレグリン変異体の生産、およびキメラヒレグリン変異体の生産は、当業者の範囲内に存在する。

さらに、ここでの教示に照らして、当業者は、本発明のヒレグリン変異体の結合活性を保存する数多くのさらなる変異体をデザインすることが可能である。例えば、ヒレグリン変異体の非重要な残基における保存的置換（実施例2に同定される）は、E r b Bレセプター結合を有意に改変するとは期待されない。さらに、E r b Bレセプター結合に対するいかなる効果も、実施例1-3に記載されているもののような、簡単な結合アッセイで容易に測定され得る。それ故、本発明は、存在するいかなるさらなる修飾にも関わらず、上記議論されている特異的な位置でアミノ酸置換を有する全てのヒレグリン変異体を包含する。

E r b Bレセプター結合に加えて、本発明のヒレグリン変異体は、一つ以上の他の天然のヒレグリンの生物学的活性を所有することができる。例えば、ヒレグリン変異体はまた、E r b Bレセプターを活性化する能力を有する。「E r b Bレセプターを活性化する能力」なる用語は、E r b Bレセプターの細胞内キナーゼドメインがチロシン残基をリン酸化するように引き起こす能力を指す。一般的に、レセプター活性化は、二つ以上のE r b Bレセプターのレセプター複合体（例えばE r b B-2/E r b B-3またはE r b B-2/E r b B-4複合体）に対するヒレグリンの結合に関与する。レセプター結合は、一つ以上のレセプターのキナーゼドメインを活性化し、それは一つ以上のレセプターにおけるチロシン残基のリン酸化、および/またはさらなる基質ポリペプチド（類）におけるチロシン残基のリン酸化を活性化する。E r b Bレセプターリン酸化は、実施例3に記載されるチロシンリン酸化アッセイを使用して定量することができる。

さらに、本発明のヒレグリン変異体は、適切なE r b Bレセプターを有する細胞の生存、増殖および/または分化を増大することができる。「細胞の生存を増大する」なる用語は、ヒレグリン変異体にさらされていない細胞（「非処理細胞」）の生存の期間に対して、イン・ビトロまたはイン・ビボのそれぞれで、細胞の生存の期間を増大することを指す。「細胞の増殖を増大する」なる用語は、非処理細胞に対して、イン・ビトロまたはイン・ビボのそれぞれで、有糸分裂の速度または数を増大することを意味する。細胞培養物における細胞増殖の増大は、ヒレグリン変異体にさらす前後の細胞数のカウントによって、または集合の程度の顕微鏡による観察によって検出することができる。細胞増殖は、細胞による ^3H -チミジン取り込みを測定することによっても定量することができる。

「細胞の分化を増大する」なる用語は、細胞特異化の程度を増大することを指す。細胞特異化は、もともとの細胞のものとは異なる一つ以上の性質の獲得によって特徴付けされる。それ故、細胞特異化の程度は、細胞の表現型の変化（例えば細胞形態の変化を同定する

10

20

30

40

50

）に対してスクリーニングすることによって、典型的に測定される。

E r b Bレセプターを発現し、それ故ヒレグリンに対して応答的な例示的な細胞には、S K-B R-3細胞、グリア細胞、グリア芽細胞、シュヴァン細胞、肝細胞、上皮細胞、および筋細胞が含まれる。グリア細胞は、中枢神経系から由来し、稀突起膠細胞および星状細胞を含む。E r b Bレセプターを発現する筋細胞には、筋細胞前駆体（筋芽細胞）、同様により特異化した骨格筋、心筋、平滑筋細胞が含まれる。

本発明のヒレグリン変異体が所有することができる他の生物学的活性には、イオンチャンネル（例えばNa⁺チャンネル）形成の誘導；神経筋接合部でのアセチルコリンレセプター合成の誘導；ニューロン、および筋肉、神経または腺細胞の間のシナプス接合部の形成の促進；エストロゲンレセプターの下流調節；および細胞内在化（核の局在とおそらく関連する）が含まれる。

10

ヒレグリン変異体は、ペプチド合成及び組換え生産を含むいかなる適切な方法によっても生産される。一般的に、以下に詳細に記載される組換え法は、約50より長いヒレグリン変異体またはアミノ酸に対して使用される。

E r b B-3レセプターに対して、E r b B-4レセプターについての増大した特異性を有するヒレグリン変異体は、一つ以上のヒレグリン残基をミュータジェナイズし、増大したE r b B-4レセプター特異性を有する変異体を選択することによって調製することができる。一般的に、この文脈によってミュータジェネシスのために選択された残基は、E r b B-3レセプターに対する結合の効果と比較して、E r b B-4レセプターに対して結合する効果の差異によって特徴付けされる。上記残基は、例えば実施例2に提示されているアラニンスキャンニングから明らかである。

20

増大したE r b B-4レセプター特異性を有する変異体は、実施例4に記載されている、一価ファージディスプレイのような、いかなる適切なスクリーニング法を使用してもE r b B-4レセプターに対する結合についてスクリーニングすることによって選択される。該結果は、この場合E r b B-3レセプターに対する高親和性を有して結合する変異体の除去を引き起こす「カウンター選択」に変異体を受けさせることによって改良することができる。実施例4は、E r b B-3-I gに対するカウンター選択が、野生型H R G-β 1のものよりも、E r b B-3-I gに対してE r b B-4-I gについてのより大きい特性を示す変異体の有意な豊富化を提供する。

核酸分子

30

本発明はまた、ヒレグリン変異体に関する核酸分子を含む。「核酸分子」なる語は、ゲノムDNA、cDNA、増幅反応（ポリメラーゼ連鎖反応[" P C R "]）のようなことによって生産されるDNA、およびオリゴヌクレオチド合成によって生産されるDNAを含む一本鎖及び二本鎖DNA分子、同様にmRNAのようなRNA分子を包含する。ゲノムDNAは、非転写および翻訳領域を含む（5'および3'非コード領域、イントロン、およびヒレグリン変異体コード領域のような）。cDNAおよびmRNA分子は、転写される領域に相当する配列を含む。

本発明にかかる核酸分子は、天然では見出されないヌクレオチド配列を有し、本発明のヒレグリン変異体またはその断片をコードする核酸分子をコードするまたはそれに相補的である。相補的なヌクレオチド配列は、その構成要素を用いてワトソン-クリック結合を形成することが可能であり、その場合アデニンはチミンまたはウラシルとペアを形成し、グアニンはシトシンとペアを形成する。二本鎖DNA分子は、ヒレグリン変異体の一つをコードし、一方一本鎖DNAまたはRNA分子は、コード（センス）鎖または非コード（アンチセンス）鎖の何れかである。核酸分子がヒレグリン変異体の断片をコードする（またはコードする核酸分子に対して相補的である）場合、該断片は少なくとも一つのアミノ酸置換を含む。

40

遺伝学的コードの縮重のため、各ヒレグリン変異体に関連する数多くの考え得る核酸分子が存在する。より特異的には、いくつかの異なるコドンが同じアミノ酸をコードするため、多数の異なる核酸分子が同じヒレグリン変異体をコードする（またはコードする核酸分子に対して相補的である）。

50

一般的には、本発明のヒレグリン変異体は、ヒレグリン変異体アミノ酸配列内に望ましいミューテーションを導入するように、天然で生じるDNA配列をミューテートすることによって生産される。しかしながら、コードされるアミノ酸を改変することなく核酸分子中の一つ以上のコドンを変化することも有利である。本発明の範囲にある上記「サイレントミューテーション」の例として、例えば、望ましいベクターの構築を容易にするために制限エンドヌクレアーゼ部位を作出するまたは破壊するミューテーション、およびコードされるヒレグリン変異体の発現を増大するミューテーションが含まれる。後者の例としては、転写されたmRNA中の5'ステムおよびループ構造の形成を減少するように、または選択された宿主によって容易に転写されるコドンを提供するように（例えば大腸菌または酵母の発現に対して周知の好ましいコドン）デザインされたヌクレオチド置換が含まれる。

10

本発明の核酸分子は、ベクター（以下にさらに記載される）内に取り込むことができ、例えばハイブリダイゼーションプローブまたは増幅プライマーとして使用することができる。本発明にかかるハイブリダイゼーションプローブは、例えば、ミューテートされた核酸分子を含むクローンを同定するための細菌形質転換体をスクリーニングすることのような、望ましいミューテーションを含む核酸分子を検出するために有用である。

上記プローブは少なくとも約20ヌクレオチドであり、通常2キロベース未満である。該プローブは、使用されるハイブリダイゼーション条件の下で、検出されるミューテートされた配列とハイブリダイズし、他の配列とのハイブリダイゼーションから実質的にフリーであるために十分なヌクレオチドの数を含む。典型的には、本発明のプローブは、少なくとも50ヌクレオチド、通常約100ヌクレオチドの長さである。

20

本発明にかかる増幅プライマーは、所望のミューテーションを含む核酸分子を検出するために、またはシーケンシング、ベクター内への挿入のための分子のような十分な量を生産するために、PCRのような簡便な増幅プロトコールにおいて使用することができる。増幅プライマーは、増幅される核酸配列の5'末端とハイブリダイズする5'上流プライマー、および増幅される配列の3'末端の構成要素とハイブリダイズする3'下流プライマーを含む、数多くのプライマーペアとして典型的に使用される。

一般的に、本発明にかかるプライマーは、使用されるハイブリダイゼーション条件の下で、ミューテートされた配列とハイブリダイズし、および他の配列とのハイブリダイゼーションから実質的にフリーであるのに十分なヌクレオチドの数を含む。プライマーの特異性は、ミューテートされた配列とハイブリダイズする分子の数と共に増大する。さらに、特異性は、ミューテートされた配列とハイブリダイズするプライマー中の残基の割合と相関する。本発明のプライマーは、一般的に少なくとも約15ヌクレオチド、一般的には少なくとも約20ヌクレオチドを含む。該プライマーは約30ヌクレオチドを越える必要はなく、通常約25ヌクレオチドを越えない。この実施態様の一つの変異型として、該プライマーは、約20から約25ヌクレオチドを含む。一般的に、該プライマーは、約55℃から約75℃の範囲で T_m を有すべきである。特に、 T_m は、緊縮条件の下での増幅を容易にするために約60℃から約65℃の間である。

30

ベクターおよび宿主細胞

本発明の核酸分子は、宿主細胞における増殖および／または発現のためのベクター内に取り込ませることができる。上記ベクターは、適切な宿主細胞内でベクターの効率的な複製が可能である複製配列（すなわち複製のオリジン）、同様に抗生物質耐性遺伝子のような選択可能なマーカーをコードする配列を含む。適切な宿主のトランスフォーメーションにおいて、該ベクターは宿主のゲノムとは独立に複製し機能することができ、または宿主ゲノム内に挿入されることができる。ベクターのデザインは、その他の中では、ベクターについて企図される使用および宿主細胞に依存し、特定の使用および宿主細胞に対するヒレグリン変異体ベクターのデザインは、当業者の範囲内にある。

40

もしベクターがヒレグリン変異体の発現を企図された場合、該ベクターは、実施可能に結合したヒレグリン変異体コード配列の発現を効果的にするおよび／または増大することが可能な一つ以上の制御配列を含む。原核生物における発現のための適切な制御配列は、例

50

えばプロモーター配列、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核生物における発現のための制御配列は、プロモーター、エンハンサー、および転写終結配列（すなわちポリアデニル化シグナル）を含む。

「実施可能に結合」なる語は、二つの核酸配列がお互いに機能的に関係していることを意味する。例えば、プロモーター（エンハンサー）は、もし配列の転写を有効にする（または促進する）ならば、コード配列と実施可能に結合している。リボソーム結合部位は、もし翻訳を容易にするように位置していれば、コード配列と実施可能に結合している。実施可能に結合した核酸配列は大抵連続しているが、これは必須ではない。例えば、エンハンサーはコード配列の転写を増大するために、コード配列と連続している必要はない。

ヒレグリン変異体発現ベクターはまた、シグナル配列または増幅可能遺伝子をコードする核酸配列のような他の配列を含む。上述されているように、シグナル配列は、キメラタンパク質を発現する細胞からの、それに融合されたポリペプチドの分泌を引き起こす。発現ベクターにおいては、シグナル配列をコードする核酸は、ヒレグリン変異体コード配列のリーディングフレームを保存するように、ヒレグリン変異体コード配列に結合している。ヒレグリン変異体発現ベクターに増幅可能遺伝子（例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ [D H F R] 遺伝子）を含ませることは、ヒレグリン変異体をコードする核酸分子の複数のコピーを含む宿主細胞の選択を許容する。

本発明のベクターは、ありきたりの制限部位での結紮によって所望の要素と結合することで生産される。もし上記部位が存在しないのであれば、適切な部位を標準的なミュータジェネシス（例えば部位特異的またはカセットミュータジェネシス）または合成オリゴヌクレオチドアダプターによって導入することができ、あるいはリンカーを通常の方法にしたがって使用することができる。

本発明はまた、本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。広範囲の様々な宿主細胞が、ベクターの増幅および／または発現のために利用可能である。例としては、原核生物（大腸菌並びにバチルス、シュドモナスおよび他の細菌の株のような）酵母または他の真菌類、昆虫細胞、植物細胞、およびファージ、同様に高等真核細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞および他の哺乳動物細胞のような）が含まれる。本発明にかかる宿主細胞には、培養物中の細胞、トランスジェニックマウスのような生存動物中の細胞が含まれる。ヒレグリン変異体の組換え生産の使用のために適したベクターおよび宿主細胞についてのさらなる情報は、米国特許第 5, 3 6 4, 9 3 4 号を参照。

本発明のベクターは、いかなる通常の方法によっても宿主細胞内に導入され、該方法は使用されるベクター-宿主系に依存して変化するであろう。一般的に、ベクターは、トランスフォーメーション（「また「トランスフェクション」としても知られる）またはベクターを所有するウイルス（例えばファージ）を用いた感染によって宿主細胞内に導入される。もし宿主細胞が原核生物（または細胞壁を有する他の細胞）であるならば、簡便なトランスフォーメーション法には、Cohenら,PNAS USA 69:2110-14 (1972) に記載されたカルシウム処理法、およびChungら,Nuc.Acids.Res.16:3580 (1988) のポリエチレングリコール法が含まれる。もし原核生物が宿主として使用され、ベクターがファージミドベクターであるならば、実施例 1 に記載されているように、ベクターは感染によって宿主細胞内に導入することができる。酵母細胞は、例えばHinnen,PNAS U.S.A.75:1929-33 (1978) に教示されているように、ポリエチレングリコールを使用してトランスフォーム可能である。哺乳動物細胞は、Grahamら,Virology 52:546 (1978)、およびGormanら,DNA and Protein Eng.Tech.2:3-10 (1990) に記載されたリン酸カルシウム沈殿法を使用して簡便にトランスフォームされる。しかしながら、核への注入、エレクトロポレーション（実施例 1 参照）、およびプロトプラスト融合のような、宿主細胞内に DNA を導入するための他の周知の方法も、本発明での使用に適している。

一つの実施態様として、ヒレグリン変異体をコードする核酸分子を含む宿主細胞は、国際特許出願 WO 9 1 / 0 6 6 6 7 に記載されている相同的組換えによって生産される。略記すると、この方法は導入される配列を含む相同的組換えベクターを用いて、内因性ヒレグリン遺伝子を含む宿主細胞をトランスフォームすることを含む。相同的組換えベクター

はまた、内因性ヒレグリン遺伝子と並んだ内因性配列と相同である少なくとも約150ヌクレオチドの長さの少なくとも一つの配列を含む。適切な横に並んだ配列は、例えば開始時点として周知の天然のヒレグリン核酸配列を使用した、ゲノムウォーキングの方法によって、容易に同定される。相同的組換えベクターはさらに、DHF R遺伝子のような増幅可能遺伝子を含む。

トランスフォーメーションは、ベクターが組換えによって宿主細胞ゲノム内に挿入されるような条件下で実施される。それから、ベクターを挿入する細胞を、増幅可能遺伝子の増幅のために選択する条件下で培養する。それから結果として生じた細胞を、高レベルのヒレグリン変異体生産についてスクリーニングする。

ヒレグリン変異体の組換え生産

組換え的にヒレグリン変異体を生産するために、ヒレグリン変異体発現ベクターを含む宿主細胞を調製し、細胞増殖およびヒレグリン変異体の発現のために適した条件下で培養する。特に、培養培地は、使用される宿主のための適切な栄養素および増殖因子を含む。選択された宿主細胞の増殖のために必要とされる栄養素および増殖因子は、多くの場合周知であり、当業者は経験的に容易に決定することができる。哺乳動物宿主細胞についての適切な培養条件は、例えばMammalian Cell Culture (Mather編., Plenum Press 1984) 並びにBarnesおよびSato, Cell 22:649 (1980) に記載されている。

さらに、培養条件は、転写、翻訳、および細胞区画の間のタンパク質輸送を許容すべきである。これらの過程に影響する因子は周知であり、例えばDNA/RNAコピー数；RNAを安定化する因子；細胞培地中に存在する栄養素、補給物、および翻訳誘発物または抑制物；培養の温度、pHおよび浸透圧；並びに細胞密度を含む。特定のベクター-宿主細胞系における発現を促進するこれらの因子の調節は、当業者の範囲内にある。イン・ビトロの哺乳動物細胞培養物の生産性を最適化するための原理および実施法は、例えばMammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach (Butler編., IRL Press 1991) 中に見出すことができる。

本発明のヒレグリン変異体の生産に使用される細胞培養法は、タンパク質の大規模または小規模生産のための数多くの周知の方法の何れかである。これらには、流動床バイオリアクター、中空ファイバーバイオリアクター、ローラーボトル培養系、および拡散タンクバイオリアクター系の使用が、制限されることなく含まれる。ヒレグリン変異体は、例えば、バッチ、フェッドバッチ、または連続的な形態の方法で生産することができる。

上記記載のように生産される組換えタンパク質の回収のための方法は周知であり、使用される発現系に依存して変化する。例えば、もし典型的なように、ヒレグリン変異体が単一の配列に融合されているのであれば、ヒレグリン変異体は、培養培地またはペリプラズムから回収される。便利には、該変異体は、成熟タンパク質としてペリプラズム空間に分泌される。ヒレグリン変異体はまた、細胞内で発現され、細胞溶解物から回収することができる。

ヒレグリン変異体は、宿主細胞の区画または培養培地から該変異体を分離することが可能ないかなる方法によっても、培養培地または細胞溶解物から精製することができる。典型的にはヒレグリン変異体は、ヒレグリン変異体の企図された使用を妨げるであろう宿主細胞および/または培養培地構成物から分離される。第一の段階として、培養培地または細胞溶解物は、細胞破片を除去するために通常遠心分離または濾過される。それから典型的には、さらなる精製のための調製物を調節するために、該上清は、所望の容量に濃縮または希釈され、あるいは適切なバッファー内に二重濾過される。

ヒレグリン変異体は、二つの分子の間の性質のいかなる実質的な差異をも説明するために、最も相同な天然ヒレグリンと同じ方法で典型的にはさらに精製される。例えば、もしヒレグリン変異体が、エピトプタグ化ヒレグリン変異体であるならば、精製は該エピトプタグに対する抗体を含むイムノアフィニティークラムを使用して実施することができる。ヒレグリンを精製するための以下の例示的な方法が、本発明のヒレグリン変異体を精製するために使用または適用される：イムノアフィニティークラム上での分画、イオン交換カラム上での分画、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降、逆相HPLC、シリカ上で

10

20

30

40

50

のクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース上でのクロマトグラフィー、カチオン交換樹脂上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、およびゲル濾過（例えばHigh Load Superdex 75TMプレップグレードカラムを使用する）。

もしヒレグリン変異体が、初めに不溶性の凝集形態で発現されるのであれば（特に細菌宿主細胞において）、組換えタンパク質伸縮体を可溶化し変性するための本分野で利用可能な方法を使用して、ヒレグリン変異体を可溶化し変性することが必要である。例えば米国特許第4,511,502号参照。

この実施態様の一つの変異型として、ヒレグリン変異体を、（１）スピニングカップシークエネーターを使用して、N末端または内部のアミノ酸の少なくとも15残基、および好ましくは20残基を得るのに十分な程度に、（２）クマシーブルー染色を使用して非還元または還元条件下でのSDS-PAGEによって均質に精製する。ここで記載される「均質」なる語は、クマシーブルーを使用した染色によって測定すると、他のソース由来のタンパク質が約5%未満であることを意味する。

ヒレグリン変異体の均質性

概して、本発明にかかるヒレグリン変異体は、天然のヒレグリンと同様な応用で 사용할ことができる。もちろん、本発明の範囲内にあるいくつかのヒレグリン変異体は、他の応用よりも一つの応用によりよく適している。しかしながら、当業者は、どのヒレグリン変異体が所定の要用に適しているかを、該変異体の生物学的活性を測定する一つ以上のありきたりのアッセイを使用することによって、容易に突き止めることが可能である。

製薬学的組成物および治療法

ヒレグリンは、神経系、筋系および上皮に影響する広範囲の疾患および疾病を治療するために有用である。さらに、ヒレグリンは、ガンの治療において使用することができる。ここで用いられる「治療」なる語は、存在している疾患または疾病を治療することと同様に、予防手段をも包含する。

したがって、本発明は、様々な疾患または疾病の何れかを治療するのに有用であるヒレグリン変異体を含む製薬学的組成物を提供する。一つの実施態様として、製薬学的ヒレグリン変異体組成物は、哺乳動物を治療するために使用される。特に、該組成物は、ヒト、家畜（例えばウシおよびヒツジ）、動物園の動物、運動に使用される動物（例えばウマ）、およびペット（例えばイヌおよびネコ）を治療するのに有用である。この実施態様の一つの変異型として、該組成物はヒト患者を治療するために使用される。

本発明にかかるヒレグリン変異体は、イン・ビボでのニューロンの形成、維持、および／または再生を促進するために有用である。上記変異体に応答するニューロンは、中枢神経系（脳および脊髄）ニューロン、末梢神経系ニューロン（交感神経系、副交感神経系、感覚、および内臓の各ニューロンを含む）、および運動ニューロンを含む。ヒレグリン変異体治療に服しやすい疾患または疾病は、例えば、外傷、手術、発作、虚血、感染、代謝疾患、栄養欠損、悪性腫瘍、または毒性薬剤に対する神経系の損傷に苦しんでいるヒトで生じる。

ヒレグリン変異体は、ニューロンの生存、増殖、または分化を促進することによって上記患者に対して治療上の利益を提供することができる。例えば、ヒレグリン変異体は、外傷または手術によって損傷した運動ニューロンの生存または増殖を促進するために使用することができる。ヒレグリン変異体はまた、筋萎縮性側面硬化症（ルーゲーリグ病）、ベル麻痺、脊髄筋萎縮症または麻痺を含む様々な疾患を治療するためにも使用することができる。さらに、ヒレグリン変異体はまた、アルツハイマー病、パーキンソン病、てんかん、多発性硬化症、ハンティングトン舞蹈病、ダウン症、感音難聴、およびメニエール病のような、ヒト神経変性疾患を治療するためにも有用である。

さらに、本発明のヒレグリン変異体は、神経障害、特に末梢神経障害を治療するために使用することができる。ここで使用される、「末梢神経障害」なる語は、末梢神経系に影響する疾患を指し、運動、感覚、感覚運動、または自律神経失調症の一つまたは組み合わせとして最も頻繁に明らかにされる。例としては、胃腸管の減少した運動性または膀胱のアトニーのような、遠位感覚運動神経障害、および自律神経失調症が、制限されることなく

含まれる。ヒレグリン変異体治療に服しやすい末梢神経障害は遺伝的であり、全身性の疾患から由来し、または毒性物質によって誘発され得る。遺伝的な神経障害の例としては、シャルコー-マリー-トゥース病、レフサム病、無 β -リポタンパク血症、タンジアー病、クラッペ病、異染性白質萎縮症、ファブリー病、およびドゥジュリーヌ-ソッタ病が含まれる。全身性疾患と関連する神経障害の例としては、ポストポリオ症候群が含まれる；並びに毒性物質によって誘発される神経障害の例として、化学療法試薬を使用した治療によって引き起こされるものが含まれる。

ヒレグリン変異体はまた、神経機能を改良するために使用することができる。ヒレグリン変異体治療の有益的な効果は、細胞膜中のイオンチャンネルの形成の誘導、およびシナプス接合部の形成の増大に寄与する。

本発明にかかるヒレグリン変異体は、筋細胞、および筋細胞に影響する医学的病状を治療するために使用することができる。特に、上記ヒレグリン変異体は、筋肉の損傷の治療、筋細胞の萎縮症の減少、および筋細胞の生存、増殖および／または再生の増大に対して有用である。ヒレグリン変異体を使用する治療に対して服しやすい筋肉組織の病態生理学的な疾患の例としては、骨格筋疾患（例えばミオパシーまたはジストロフィー）、心筋疾患（心房不整脈、心筋症、虚血性損傷、先天性疾患、および心臓外傷）、および平滑筋疾患（動脈硬化、血管病変、または先天性血管疾患）が含まれる。ヒレグリン変異体はまた、高血圧を減少するために、および筋細胞における機能的アセチルコリンレセプターを増大するために（例えば重症筋無力症または筋頻拍を有する患者における）使用することができる。

本発明のヒレグリン変異体はまた、E r b Bレセプター、特にE r b B-2レセプターおよびE r b B-3またはE r b B-4レセプターのそれぞれを発現する組織の修復および／または再生を促進するために使用することができる。したがって、ヒレグリン変異体は、皮膚の外傷、胃腸疾患、バレット食道、嚢胞性または非嚢胞性末期腎疾患、または炎症性腸疾患の治療において有用である。ヒレグリン変異体はまた、ヒト胃腸、呼吸器、生殖器、または尿路における再上皮形成を促進するために使用することができる。

さらに、本発明にかかるヒレグリン変異体は、腫瘍細胞侵入および転移を阻害するために有用である。特に、減少した内因性ヒレグリンレベルによって特徴付けされる腫瘍（Parkら, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 34:521 [1993]）は、本発明のヒレグリン変異体を使用した治療に応答性である。さらに、E r b Bレセプターを過剰発現する腫瘍は、細胞毒性試薬を腫瘍組織に向けるために、細胞毒性試薬（上記記載）の接合したヒレグリン変異体を使用することによって治療することができる。ヒレグリン変異体-酵素接合体はまた、E r b Bレセプターを発現する細胞に対してプロドラッグ治療（上記記載）をターゲット化するために使用することができる。

本発明にかかる製薬学的組成物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版（Osol編、1980）に記載されているような、適宜に生理学的に許容可能なキャリアー、賦形剤、または安定剤と、所望の純度を有するヒレグリン変異体を混合することによって貯蔵のため調製される。該組成物は、凍結乾燥塊、または水溶液の形態で貯蔵することができる。製薬学的に許容可能なキャリアー、賦形剤、または安定剤は、使用される投与量で受容者に非毒性であり、バッファー（リン酸バッファー、クエン酸バッファー、および他の有機酸から調製されるバッファーのような）、抗酸化剤（例えばアスコルビン酸）、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、およびイムノグロブリンのような）、親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンのような）、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、およびリシンのような）、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（グルコース、マンノースおよびデキストリンを含む）、キレート剤（例えばエチレンジアミンテトラ酢酸[EDTA]）、糖アルコール（マンニトールおよびソルビトールのような）、塩形成カウンターイオン（例えばナトリウム）、および／または非イオン性界面活性剤（TweenTM、PluronicTM、およびPEGのような）を含む。一つの実施態様として、生理学的に許容可能なキャリアーは、水性pH緩衝溶液である。

10

20

30

40

50

イン・ビボでの投与のために企図されるヒレグリン変異体組成物は、典型的には無菌的である。もし該組成物が凍結乾燥形態で貯蔵されていると、該組成物は、凍結乾燥および再構成の前後で濾過することができる。

本発明の製薬学的ヒレグリン変異体組成物は、例えば皮下注射針によって穴を開けることが可能なストッパーを有する静脈溶液バッグまたはバイアルのような、滅菌アクセスポートを有する容器内に一般的に置かれる。

製薬学的なヒレグリン変異体組成物の投与法は、治療上のタンパク質の周知の投与法と異なる。投与の適切な経路には、例えば静脈内、腹膜内、大脳半球内、筋肉内、眼内、動脈内、または病変内の各経路が含まれる。製薬学的なヒレグリン変異体組成物は、点滴またはボラス注射によって継続的に投与することができる。

もし望ましければ、持続放出調製物もまた、ヒレグリン変異体を投与するために使用することができる。例示的な持続放出調製物は、ヒレグリン変異体が付着した固体の疎水性ポリマーの半透過性マトリックスを有する。適したポリマーの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド、L-グルタミン酸とγ-エチルーL-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-(−)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。上記物質は、フィルムまたはマイクロカプセルのような、成形人工物の形態で存在する。

一つの実施態様として、持続放出ヒレグリン変異体調製物は、リポソーム中に封入されたヒレグリン変異体を含む。リポソームは、様々なタイプの脂質、リン脂質、および／または界面活性剤より成る小粒子である。これらの構成成分は、生体膜の脂質整列と同様な、二重層形態で典型的に整列している。ヒレグリン変異体を含むリポソームは、例えば、Epsteinら,PNAS USA 82:3688-92 (1985)、およびHwangら,PNAS USA 77:4030-34 (1980)に記載されているもののような周知の方法によって調整される。一般的に、上記調製物中のリポソームは、脂質含有量が約30モルパーセントコレステロールより大きい小(約200-800オングストローム)単一層タイプのものであり、特異的なパーセントは最適な治療を提供するために調節される。有用なリポソームは、例えばホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を使用して、逆相蒸発法によって生産することができる。リポソームは、所望の直径を有するリポソームを生産するために所定のポアサイズのフィルターを通して成形される。

神経学的疾患または疾病の治療のために、ヒレグリン変異体は、サイラスティック膜のような膜上に吸着され、該膜は国際特許出願WO 91/04014に記載されているように、損傷した神経組織に近接して移植することができる。

治療学的に使用されるヒレグリン変異体組成物の投与量は、例えば治療目的、投与経路、および患者の疾患に依存する。したがって、臨床医は投与量を滴定し、最適な治療効果が必ず得られるように投与経路を修正する必要がある。典型的な一日の投与量は、約1μg/体重のkgから100mg/体重のkgまでの範囲であるが、典型的には約10μg/kg/日から10mg/kg/日である。一般的に、臨床医は、低投与量の製薬学的ヒレグリン変異体組成物を使用して始め、所望の治療効果が達成されるまで投与を増大する。

本発明のヒレグリン変異体の投与は、他の治療上の摂生を組み合わせることができる。神経学的疾患の治療については、ヒレグリン変異体は、所望の治療効果を達成するためにも一つの神経栄養因子を適宜組み合わせる、または該因子と同時に投与する。例えば、ヒレグリン変異体は、神経成長因子(NGF)、ニューロトロフィン(例えばNT-3、-4または-5)、骨由来神経因子(BDNF)、インスリン様増殖因子(例えばIGF-1またはIGF-2)、gas6、またはニューロンに対する共同刺激効果を達成するためのもう一つの神経栄養因子と共に使用することができる。神経栄養因子についての適切な投与量は、上記分子の本分野で周知のものとは異なる。

ガンの治療のため、放射線および／または化学療法試薬を、ヒレグリン変異体と同時的に投与することができる。上記化学療法試薬の適切な調製物及び投与スケジュールは、製造

10

20

30

40

50

者によって推奨される、または臨床医によって経験的に決定される。標準的な化学療法試薬の調製物および投与量については、Chemotherapy Service (Perry編, Williams & Wilkins 1992) を参照。化学療法試薬の投与は、ヒレグリン変異体の投与に先行または引き続き、あるいは化学療法試薬は、そこで同時に与えることができる。例えば E G F R、E r b B-2、E r b B-3、または E r b B-4 レセプター、あるいは血管内皮因子 (V E G F) を結合する抗体のような、腫瘍関連抗原に対する抗体を、一つ以上のサイトカインのようにヒレグリン変異体と共投与することができる。

非治療的方法

本発明にかかるヒレグリン変異体はまた、細胞培養法および診断法のような、様々な非治療的な応用において使用することができる。例えば、ヒレグリン変異体は、グリア、シュ

10

ヴァン、および筋細胞のような、細胞のエクソ・ビボでの生存、増殖、または分化を促進するために使用することができる。上記細胞の培養物は、例えばシュヴァン細胞特異的因子である神経成長因子レセプター (P 7 5^{NGFR}) のような、細胞特異的因子を生産するために有用である。細胞特異的因子は、診断の手段として直接的に使用することができ、または診断での使用のため抗体を生産する目的で使用することができる。

エクソ・ビボでの細胞培養物はまた、移植のための細胞性人工器官として使用することができる。例えば、シュヴァン細胞培養物は、切断された中枢軸索の再生を促進するために損傷した脊髄の領域内に移植することができ、または末梢神経損傷の修復を助けるために使用することができる。

20

したがって、本発明は、ヒレグリン応答性細胞が適切な細胞培養培地で提供される細胞培養法を提供する。適切な組織培養培地は、当業者に周知であり、最小必須培地 (M E M)、R P M I-1 6 4 0、およびダルベッコ修飾イーグル培地 (D M E M) が制限されることなく含まれる。これらの組織培養培地は、Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) および GIBCO (Grand Island, NY) から商業的に入手可能である。細胞を、ヒレグリン変異体の存在下で細胞の成育を許容する条件下で、細胞培養培地中で培養する。細胞培養のための適切な方法は、周知の方法と異なるところはなく、例えば液体培養、寒天中での培養、および塊中での培養が含まれる。

30

細胞は、有効量のヒレグリン変異体の存在下で培養される。ヒレグリン変異体の量は、細胞型および細胞培養条件に依存して変化するが、一般的に、約 1 0 n g / m l から約 1 m g / m l の範囲である。所定の細胞培養に対する適切な濃度は、当業者によって経験的に容易に測定されることができる。

エクソ・ビボでのシュヴァン細胞の培養法は、Li ら (上記参照) によって記載されており、および Sklar ら (上記参照) は、クローン化ヒト筋芽細胞のエクソ・ビボ培養を記載する。本発明のヒレグリン変異体は、これらの方法で使用される他のヒレグリンポリペプチドの代わりになる。

ヒレグリン変異体はまた、e r b B (例えば e r b B 2) 過剰発現によって特徴付けされるガンの診断で使用することができる。本発明にかかる診断法においては、サンプルは患者から得られ、該変異体とサンプル中に存在する E r b B レセプターの間の特異的な結合を許容する条件下でヒレグリン変異体と接触される。サンプルは組織サンプル、体液サンプル、または細胞である。固い腫瘍の場合には、組織サンプルは、外科的に取り出された腫瘍から由来し、簡便な方法で試験のため調製することができる。リンパ腫および白血病の場合には、リンパ球、白血球、またはリンパ組織を含むサンプルが得られる。尿、涙、血清、脳脊髄液、便、痰、細胞抽出物等のサンプルを含む他のサンプルは、特定の腫瘍を診断するために有用である。この方法に関して使用される、「特異的な結合」なる語は、ヒレグリン変異体が、適切な反応条件の下でサンプル中に存在する他の構成成分と実質的に交差反応しないのに十分な高い親和性を有して E r b B レセプターを結合することを意味する。

40

サンプルに特異的に結合するヒレグリン変異体の量は、E r b B レセプター含有量の指標として測定される。例えば、組織サンプルは一次腫瘍から得られ、ホルマリン固定、パラフィン埋没ブロックを調整するために使用することができる。Muss ら, 上記参照; Press ら

50

,Cancer Research 54:2771-77 (1994) 参照。それから組織切片を、周知の方法にしたがって調製する。

ヒレグリン変異体は、ヒレグリン変異体と切片中に存在する E r b B レセプターの間の特異的な結合を許容する条件下で組織切片と接触される。結合は一般的に、放射性同位元素、蛍光標識、または酵素-基質標識化系のような標識を使用して検出される。該標識は、上記記載のようにヒレグリン変異体に直接的に結合することができる。

代わりに、該標識をヒレグリン変異体に間接的に結合することができる。Current Protocols in Immunology (上記参照) に一般的に記載されているように、例えば、標識は抗ヒレグリン変異体抗体に接合することができ、またはビオチンまたはアビジンに接合し、アビジンまたはビオチン (それぞれ) に接合した抗ヒレグリン変異体抗体と共に使用することができる。ビオチンおよびアビジンの間の選択的な結合は、ヒレグリン変異体に対する標識と結び付く。

イン・ビトロの分析が通常企図される一方で、適切な検出可能標識に接合したヒレグリン変異体を使用したイン・ビボの分析 (例えばイメージングのための) もまた実施可能である。例えば米国特許第 4, 9 3 8, 9 4 8 号参照。

本発明の診断法は、リンパ節状態、一次腫瘍サイズ、組織学的状態、エストロゲンまたはプロゲステロン状態、腫瘍 DNA 含有量 (倍数性)、または細胞増殖 (S 期画分) の測定のような他の診断/予後評価と組み合わせて使用することができる。Mussら, New Eng. J. Med. 330:1260-66 (1994) 参照。

本発明にかかるヒレグリン変異体はまた、ヒレグリンのためのアッセイ (ラジオイムノアッセイ、酵素結合イムノアッセイ、およびラジオイムノアッセイのような)、親和性精製法 (例えば E r b B-3 または E r b B-4 レセプターのような E r b B レセプターのための)、および競合的レセプター結合アッセイにおける標準としても有用である。ヒレグリン変異体はまた、ヒレグリン変異体の検出および/または精製において有用な抗ヒレグリン変異体抗体を生産するための免疫原として使用することができる。

上記記載の応用に加えて、E r b B-3 レセプターに対して、E r b B-4 レセプターについての増大した特異性を有するヒレグリン変異体を、E r b B-3 レセプター以上に好ましく E r b B-4 レセプターを結合および刺激するために使用することができる。上記変異体は、サンプル中の E r b B-3 および E r b B-4 レセプターの存在の間を区別するために、または特定の生物学的機能が一方または両方のレセプターによって介在されるかを調べるためにデザインされた研究において有用である。例えば、比較的少数の E r b B-4 レセプターを有し、多数の E r b B-3 レセプターを有する細胞型において、レセプター特異的ヒレグリン変異体の不存在下では、異なるレセプターによって達成されるシグナル伝達経路を同定すること、および一方または両方のレセプターと特定の生物学的機能を結びつけることは困難である。好んで E r b B-4 レセプターに結合する変異体は、ヒレグリン機能における E r b B-3 および E r b B-4 レセプターの役割を解明する助けとして使用することができる。

診断キット及び製造品

本発明はまた、上記記載の方法を実施するために有用なキットを提供する。一つの実施態様として、本発明は、診断キット、すなわちサンプルを試験するのに使用される試薬を組み合わせたパッケージを提供する。キットの構成要素は、所定の割合で典型的に提供される。E r b B レセプターを検出するためのキットには、例えば適切な標識を使用して標識化されたヒレグリン変異体、または間接的な標識化のための標識化試薬 (類) を有するヒレグリン変異体が含まれる。もし標識が酵素であるならば、キットには該酵素標識に必要とされるいくつかの基質または補因子が典型的に含まれる。安定剤、バッファー等のような他の添加剤もまた、キット中に含まれる。キットの試薬は、適切な濃度のキットの試薬溶液を調製するための賦形剤と共に、通常凍結乾燥されている乾燥パウダーとして提供される。キットはまた、キットがデザインされているアッセイを実施するための説明書を、典型的に含む。

本発明はまた、上記記載の疾患の治療のために有用な製薬学的ヒレグリン変異体組成物を

含む製造品を提供する。製造品には、容器およびラベルが含まれる。適切な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、および試験チューブが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックのような様々な物質のいずれからでも作製され、滅菌アクセスポートを有する。容器上のまたはそれに関連するラベルは、該組成物が治療のため使用されるべき疾患を示す。

製造品は、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、またはブドウ糖溶液のような、生理学的に許容可能なバッファーを含む第二の溶液を含むキットの構成物であり得る。キットはまた、他のバッファー、希釈液、フィルター、針、シリンジ、及び使用のための説明書を有するパッケージ挿入物のような、商業的見地または使用者の見地から望ましい他の物質を含む。

10

以下の実施例は、説明のために提供され、制限するためではない。本明細書中の全ての引用文献の開示は、参考としてここに完全に取り込まれる。

実施例 1

ヒレグリン-β 1 最小 EGF 様ドメインの決定

ファージディスプレイの関係で高親和性レセプター結合を提供する HRG-β 1 EGF の最小部分を、M13 pIII の C 末端に融合した HRG-β 1 147-227, 147-244, 177-227 または 177-244 を生産するファージミドベクターを調製することによって決定した。これらの HRG-β 1 EGF 様ドメイン断片を、NsII/XbaI 含有突出部を有するプライマーを使用した PCR によって、ベクター pHL89 (Holmes ら, Science 256:1205-10 [1992] に記載されている) から増幅した。

20

これらの断片を、構築物 pHRG1-g3 (177-227)、pHRG2-g3 (177-244)、pHRG4-g3 (147-227) および pHRG5-g3 (147-244) を生産するために、同じ部位での制限切断-結紮によって、ファージミドディスプレイベクター pAm-g3 内に挿入した。pAm-g3 は pHGHAm-g3 の誘導体であり、ヒト成長ホルモン (hGH) のファージミドディスプレイのためにデザインされ、Lowman ら, Biochemistry 30:10832-38 (1991) に記載された。pHGHAm-g3 中に存在する hGH 遺伝子を除き、この遺伝子を、クローニングのために使用される制限部位での切断のためのスペースを提供する挿入断片を用いて置換することによって、pAm-g3 を生産した。

pHRG1-g3 は、該構築物を生産する際に導入された Ala227Val ミュートーションを含んだ。一本鎖ウラシル含有テンプレートを、この構築物から生産し、Ala227 を回復するために特定部位の突然変異誘発において使用し、pHRG6-g3 (177-227) を生産した。上記記載の構築物のそれぞれにおいて、HRG-β 1 EGF 様ドメイン断片を pIII の 247 残基に結合した。

30

HRG-β 1 EGF および pIII の間の接合部で、伸長した柔軟なリンカーを含ませることが、ErB-3 に結合する潜在的な pIII の干渉を軽減するかどうかを測定する目的として、この接合部でリンカーを有する二つの構築物を、pHRG1-g3 テンプレートから調製した。pHRG8-g3 は、3 個の連続した GGS (配列番号 34) 繰り返しを含むリンカーを通じて pIII 323 に付着した HRG-β 1 177-228 を発現し、pHRG11-g3 は、一つの GGS (配列番号 35) 結合を通じて pIII 247 に付着した HRG-β 1 177-230 を発現した。

40

上記記載の構築物から発現される HRG-β 1 EGF 様ドメインは、構築物の名前を表す "p" および "-g3" を取り除いてここで名付けられる。それ故、pHRG2-g3 構築物から発現された HRG-β 1 EGF 様ドメインは、"HRG2" と名付けられる。

該ドメインは、Bass ら, Proteins 8:309-14 (1990) に記載されているように、pIII 融合タンパク質としてファージ上に一価的にディスプレイされ、それからわずかな変化を有する Cunningham ら, EMBO J. 13:2508-15 (1994) に記載されたファージ ELISA 法を使用して、高親和性 ErB-2/3 レセプター-Ig 融合物 (ErB-2/3-Ig) に対するその結合について分析された。該ドメインをディスプレイするファージを生産するために、ミュータジェネシス反応混合物を、製造者のプロトコールにしたがって、XL-

50

1 B l u eTM細胞 (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) 内に電氣的トランスフォームした。それからトランスフォームされた細胞を、 10^{11} プラーク形成ユニット (p f u) の M 1 3 K 0 7 ヘルパーファージ (Promega Corp., Madison, WI) を使用して感染させた。Sambro okおよびManiatis, Molecular Cloning a Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press 429 (1989) の方法にしたがって、20% P E G (2000) / 2.5 M N a C l を使用して、18-24時間 (h) の増殖の後の細胞から培養液を沈殿させることによって、ファージストック (約 10^4 ファージミド / mL) を調製した。該ファージをリン酸緩衝生理食塩水 (P B S : 0.01 M リン酸ナトリウム、0.1 M N a C l、pH 7.5) 内に再懸濁した。

ヒト I g G 定常ドメインに融合した E r b B-2, E r b B-3 または E r b B-4 レセプターの細胞外ドメイン (E C D) を発現するベクターを使用して、E r b B レセプター-I g 融合物を調製した。最初に、イムノグロブリンのヒンジドメインをコードする領域で、ヒト I g G 重鎖を発現するベクター (p D R 2) 内に、唯一の M l u I 部位を導入した。また、これらのレセプターの E C D / トランスメンブラン接合部をコードする領域で、一連の E r b B 発現ベクター内に、M l u I 部位を導入した。全てのミュータジェネシスは、Kunkel ら, Methods Enzymol. 154:367-82 (1987) の方法にしたがって実施した。

所望の E r b B レセプター-I g 融合物を発現する構築物を作製するために、M l u I 部位を使用した。様々なレセプター融合物の融合接合部は以下の通りであった (N 末端から C 末端の順) : E r b B-2 については、E r b B 2 の G l u 6 4 6 が、V H の H i s 2 2 4 (H 2 2 4_{VH}) に融合された T h r - A r g - A s p - L y s - T h r (T R D K T ; 配列番号 36) に融合された ; E r b B-3 については、E r b B-3 の L e u 6 1 7 が、T R D K T - H 2 2 4_{VH} に融合された ; E r b B-4 については、E r b B-4 の G l y 6 4 0 が、T R D K T - H 2 2 4_{VH} に融合された。E r b B レセプター残基数は、P l o w m a n ら, PNAS USA 90:1746-50 (1993) のナンバーリング系にしたがって示されている。

保存された T R 配列は M l u I 部位から由来し、保存された D K T 配列はリンカーから由来した。最終発現構築物は p R K 型のプラスミド骨格を有し、一方で真核生物発現はサイトメガロウイルス (C M V) プロモーターによって実施された。

レセプター融合物をこれらの構築物から発現し、精製し、ジスルフィド結合ダイマーを形成させた。ホモダイマー性 E r b B-2, E r b B-3 および E r b B-4 レセプター-I g 融合物を、適切なレセプター融合物をコードする構築物を使用してトランスフェクトされた細胞によって生産した。ヘテロダイマー性レセプター融合物を、同じ細胞内に異なるレセプター融合物をコードする二つの発現ベクターを共トランスフェクトすることによって生産した。結果として分泌されたレセプター融合物は、二つの型のホモダイマーおよび予期されたヘテロダイマーの混合物であった。

レセプター融合物を発現するために、Gorman ら, DNA and Protein Eng. Tech. 2:3-10 (1990) に記載されたリン酸カルシウム沈降法を使用して、適切な発現ベクター (類) を用いて付着性 H E K - 2 9 3 細胞 (A T C C 番号 C R L 1 5 7 3) をトランスフェクトした。血清含有培地を、トランスフェクション後 15 時間で血清フリー培地と交換し、トランスフェクト細胞を 5-7 日間血清フリーで培養した。

生じた調節培地を回収し、プロテイン A カラム (1 mL Pharmacia HiTrapTM, Piscataway, NJ) を通過させた。精製レセプター融合物を、1 M T r i s - H C l (pH 9.0) を含むチューブ内に 0.1 M クエン酸 (pH 4.2) を使用して溶出した。それから溶出されたタンパク質を P B S に対して透析し、C e n t r i - p r e p - 3 0TM フィルター (Amicon, Beverly, MA) を使用して濃縮した。25% の最終濃度にグリセリンを加え、調製物を -20°C で貯蔵した。レセプター融合物濃度を、F c - E L I S A を介して測定した。

ファージ E L I S A のためのマイクロタイタープレート (Nunc MaxisorpTM 96 穴プレート, Inter Med, Denmark) を、以下のように調製した。100 μ L 50 mM N a C O ₃ (pH 9.6) 中の 0.5 μ g のウサギ抗ヒト I g G (F c ガンマ断片特異的) 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) を使用して、ウェルを一晩プレコートした。0.1%

10

20

30

40

50

ウシ血清アルブミン (BSA) を含む 200 μ L PBS を使用して 30 分 (min) 該ウェルをブロックし、洗浄バッファー (0.05% Tween 20TM を含む PBS) を使用してリンスした。それから結合バッファー (PBS、0.1% BSA、0.05% Tween 20TM) 中の 0.1 μ g ErbB-2/3-Ig を使用して 1 時間、該ウェルをコートし、再び洗浄した。

可溶性 ErbB-2/3-Ig の連続的な希釈物 (競合物) および 60% 飽和を与えるような所定のファージ濃縮物 (競合物なし) を、100 μ L 結合バッファー中でウェルに加えた。室温で 2 時間のインキュベーションに引き続き、プレートを徹底的に洗浄し、抗 M13 セイヨウワサビペルオキシダーゼ接合物 (Pharmacia, Piscataway, NJ) の 1:900 希釈物を使用して 20 分処理した。ファージ結合の量を、 α -フェニレンジアミンジヒドロクロリド基質溶液 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) を使用してセイヨウワサビペルオキシダーゼ活性をアッセイすることによって測定した。プレートのファージの半分に競合するのに必要な可溶性 ErbB-2/3-Ig の濃度として、EC₅₀ 値を計算した。

その結果が表 3 に示されている。

表 3

初めのヒレグリン-ファージ変異体

構築物	ヒレグリン- β 1 残基	リンカーおよび pIII 融合部分	ErbB-2/3-Ig EC ₅₀ (nM)
HRG2	177-244	pIII 247	6.0
HRG4	147-227	pIII 247	38.0
HRG5	147-244	pIII 247	4.7
HRG6	177-227	pIII 247	40.0
HRG7	177-228	pIII 247	42.0
HRG8	177-228 (1-52)	(GGGS) ₃ -pIII 323	11.0
HRG11	177-230	GGSGGG-pIII 247	19.0

二重の実験の平均

全てのファージストックは、固定化 ErbB-2/3-Ig に特異的に結合し、同じ EC₅₀ 値 (5-42 nM) で競合することができた。これらの値は、以前に測定された解離定数 (K_d) よりも約 100 倍高かった。Holmes ら, 上記参照。しかしながら、ファージ ELISA から得られた EC₅₀ 値は、特に親和性相互作用の場合、真の K_d 値よりもしばしば高い。これは、結合ファージに対する理にかなったシグナルを与えるのに必要とされる高いレセプターコート濃度、競合物溶液中の活性レセプターの低いパーセント、または pIII に対するタンパク質の結合からの妨害のためであろう。

いかなる場合でも、HRG- β 1 147-176 は、ErbB-3-Ig に対する HRG- β 1 EGF 様ドメインをディスプレイするファージの結合を増大しないようであり、一方で HRG- β 1 228-244 は、結合親和性にわずかに寄与した。それ故、HRG- β 1 の最小 EGF 様ドメインは、HRG- β 1 177-228 として定義された。HRG- β 1 EGF と pIII 断片の間に挿入されたリンカーを含む HRG- β 1 EGF-pIII 融合物をコードする構築物について、ファージ ELISA をまた実施した。ファージストックの結合滴定によって測定されたように、機能的融合物の増大した発現と共に、結合親和性における穏やかな増大が、リンカー含有融合物について観察された。残基 247 (pHRG8-g3) の代わりに、pIII 323 残基に対するリンカーを介した HRG- β 1 EGF の融合物は、わずかな親和性増大を引き起こした。それ故、この構築物は、ファージディスプレイライブラリーの構築のためのテンプレートベクターとして使用された。

実施例 2

アラニンスキャニングによるヒレグリン-β 1 EGFドメインにおける活性残基の同定
本実施例は、E r b B-3およびE r b B-4レセプターに対するHRG-β 1の結合における役割を演じるヒレグリン-β 1 (HRG-β 1) EGF様ドメイン (HRG-β 1 177-229) 中の活性残基の同定を記載する。活性残基は、このドメイン中の個々のアミノ酸をアラニンにミューテートすることによって同定された。ミューテートされたドメイン (以下では「変異体」) は、p I I I 融合タンパク質としてファージ上に一価的にディスプレイされ、E r b B-3およびE r b B-4に対する変異体親和性をファージELISAによって測定した。選択された変異体は、チオレドキシン融合タンパク質として発現され、それもE r b B-3およびE r b B-4親和性についてアッセイされた。

アラニンスキャニングミュータジェネシスおよびファージディスプレイ

pHRG2-g3から調製されたウラシル含有一本鎖DNAテンプレートを使用して、Kunkelら, Methods Enzymol. 154:367-82 (1987) に記載された特定部位の突然変異誘発によって、アラニン置換変異体を作製した。実施例1に記載されたpHRG2-g3は、p I I I 247に融合されたHRG-β 1 177-244を発現した。連続した残基がアラニンにミューテートされた一連の変異体を発現する一連の構築物を生産するために、一連のオリゴヌクレオチドを使用した。ファージストックを、PEG (8000) をファージの沈降に使用したことを除いて実施例1に記載されたようにこれらの構築物から調製した。E r b B-3-I gおよびE r b B-4-I gに対するアラニン置換変異体の親和性を、実施例1に記載されたようにファージELISAによって測定した。その結果が図2に示されており、それはファージ上にディスプレイされている野生型HRG-β 1 177-244に対するEC₅₀と比較した、各変異体についてのEC₅₀の割合を示す。このプロットにおいて、1の割合は、野生型HRG-β 1 177-224と比較した変異体結合についての親和性において差異が存在しないことを示し、例えば5の割合は、その変異体が、野生型HRG-β 1 177-224のものより5倍小さい親和性を有してレセプターを結合することを示す。

可溶性アラニン置換変異体の発現、精製、およびアッセイ

数多くのアラニン置換変異体を、チオレドキシン (T r x) 融合タンパク質として可溶性形態で発現した。適切な発現ベクターを調製するために、T r x発現ベクターを、pET23a (Novagen, Inc., Madison, WI) から最初に生産した。pET23aを、Nde I (238ベースで切断する) およびHind III (173ベースで切断する) を使用して切断し、T r xをコードする断片を挿入した。この断片は、pT r x F u s (2722-3180ベース; Invitrogen Corp., San Diego, CA) から得た。それから、T r x翻訳開始部位を含むNde I部位を、Nde Iを使用して切断し、Klenowを使用して再ブライゲーションすることによって破壊した。これはNde I部位を除去し、一方でT r x翻訳開始を維持した。

HRG-β 1アラニン置換変異体をコードするベクターは、pRK5. gDhrgB1ベクター (Gormanら, DNA Prot. Eng. Tech. 2:2-10 [1990] に記載されている) 中のKunkelミュータジェネシスによって初めに生産された。該変異体をコードする配列は、Nde IおよびBamHIを使用してこれらのベクターから切断できた。T r x発現ベクター内への上記断片のクローニングを容易にするため、Nde I部位のすぐ上流 (5407ベース) で、野生型HRG-β 1 146-224をコードするpRK5. gDhrgB1ベクター内にKpnI部位を導入するために、Kunkelミュータジェネシスを使用した。それから野生型HRG-β 1 146-224をコードするKpnI-BamHI断片を、pRK5. gDhrgB1から切断し、T r xをコードする配列の3'末端のKpnIおよびBamHIクローニング部位でT r x発現ベクターに挿入した。これは、KpnI部位のすぐ上流でNde I部位を導入した。結果として生じたベクターは、野生型HRG-β 1配列を、Nde IおよびBamHIを使用して切断することによって取り出すことができ、変異体をコードするNde I-BamHI断片と置換することができた。それ故、得られた一連のT r x-変異体発現ベクターは、T r xと変異体配列の間でエンテロキナーゼプロテアーゼ認識部位 (DDDDK; 配列番号37) を含むT r x-変異体融

合物を発現した。

T r x-変異体融合タンパク質の発現は、p E T 2 3 a由来の誘導可能T 7プロモーターによってなされた。クローニング、細胞増殖、および発現は、Novagen pET系マニュアルに記載されているように実施された。略記すると、クローニングはX L 1-B l u eTM細胞 (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) 中でなされ、可溶性タンパク質の発現はB L 2 1 D E 3宿主細胞 (Novagen, Inc., Madison, WI) 中でなされた。T r x-変異体発現ベクターを含むB L 2 1 D E 3細胞を、O D₅₅₀が0. 3-0. 6に到達するまでL B培地中で37℃で成育させた。それから0. 4 nMイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (I P T G) の添加によって、T r x-変異体の発現を誘導し、28℃で2-4時間継続して増殖を許容した。細胞を遠心分離によって回収し、細胞培養容量の1/20である容量の0. 02 M T r i s-HC l、0. 025 M E D T A (pH 7. 5) 中に再懸濁した。

10

細胞をドライアイス上で凍結し、37℃で解凍し、引き続き強力な超音波細胞破壊を実施して溶解した。凍結、解凍、超音波細胞破壊のサイクルを三度繰り返した。さらにタンパク質を、6 M G d H C l、0. 1 M T r i s-HC l (pH 8. 8) 中で可溶化し、0. 1 M N a₂ S O₄、0. 2 M N a₂ S₄ O₆の添加によって亜硝酸化し、室温で1. 5時間攪拌した。タンパク質を0. 05 M T r i s-HC l (pH 7. 5)、0. 01 M メチオニン中で透析した。透析後、不溶性物質を35 K×gで15分遠心分離することによって除去した。

上清を、0. 01 M T r i s-HC l (pH 7. 5) を使用して平衡化した15 m l カラムを使用してF a s t F l o w Q S e p h a r o s eTM (Pharmacia, Piscataway, NJ) クロマトグラフィーによって精製した。タンパク質を、5 m L/分の流速で0-2 M N a C l 勾配を使用して溶出した。T r x-変異体融合物は0. 5-0. 6 M N a C l の間で溶出され、1 m M システインの添加の後室温で一晩リホールディングされた。生じた調製物を、0. 05 M T r i s-HC l (pH 7. 5)、0. 01 M メチオニン内で透析した。T r x-変異体融合物は、アミノ酸分析およびS D S-P A G Eによって測定したところ、本質的に均一であることが見出された。

20

E r b Bレセプター-I g融合物に対するT r x-変異体融合物の親和性を、E r b B-3-I gおよびE r b B-4-I gに対して結合する¹²⁵I-H R G-β 1 177-244の阻害を測定することによって測定した。レセプター融合物を、ファージE L I S Aについて実施例1に記載されたように、抗ヒトI g Gを介してプレート (Nunc Maxisorp C^T Mブレイクアパートストリップウェル、Inter Med, Denmark) 上にコートした。一定量の125 I-H R G-β 1 177-244 (100-300 p M) および変化する濃度 (100 p M-4 μ M) の非標識T r x-変異体融合物を使用して、結合アッセイを実施した。室温で1-3時間のインキュベーションに引き続き、プレートを洗浄し、各ウェル中の結合¹²⁵I-H R G-β 1 177-244の量を、ガンマカウンター (Isodata, ICN Biomedic Systems, Huntsville, AL) 上でカウントした。E r b B-3結合アッセイについては、ブロッキングバッファーは1% B S Aを含むT B S T (0. 025 M T r i s-HC l [pH 7. 5]、0. 15 M N a C l、0. 02% T w e e n 2 0TM) であった；結合バッファーは2 m M グルタミン、100 U/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシン、10 m M H E P E Sバッファー (pH 7. 2)、0. 2% B S Aを含むR P M I 1 6 4 0TM細胞培養培地 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) であった；そして洗浄バッファーはT B S Tであった。E r b B-4結合アッセイについては、1% B S Aを含むP B Sをブロッキングバッファーおよび結合バッファーとして使用し、洗浄バッファーは0. 05% T w e e n 2 0TMを含むP B Sであった。

30

40

その結果が表4および5に示されている。

表 4

ファージ、およびE r b B - 3レセプターに結合する
可溶性アラニン置換変異体に対するE C₅₀値

<u>変異体</u>	<u>ファージE C₅₀ (nM)</u>	<u>可溶性E C₅₀ (nM)</u>	
HRG-β1*	13	9	
TH-WT*		47.6	10
S177	67	129	
H178	>1000	476	
L179	~1000	394	
F189	892	975	
N192	>1000	1642	
G193	>1000	26.9	
G194	500	1212	
E195	>1000	42	20
V199	27		
K200	20	45.4	
P205	22	39.5	
R207	>1000	245	
K211	>1000	248	
E215	51	156	
F216	500	2550	
T217	>1000	145	
G218	>1000	668	30
R220	>1000	結合なし	
Y224	865	339	
F229	6	177	

*変異体はアラニンにミューテートされたHRG-β1残基によって同定される。

*HRG-β1は、HRG-β1 177-244を組換え的に生産する。

*TH-WTは、野生型HRG-β1 146-244に対してそのC末端で融合されたチオレドキシンである。

表 5

ファージ、および E r b B - 4 レセプターに結合する
可溶性アラニン置換変異体に対する E C₅₀ 値

変異体 *	ファージ E C ₅₀ (nM)	可溶性 E C ₅₀ (nM)	
HRG-β1 [‡]	19	14.8	
TH-WT [•]		15.4	10
S177	83	54.6	
H178	32	138	
L179	56	51.7	
F189	106	565	
N192	188	696	
G193	23	76.3	
G194	65	275	
E195	24	13.2	
V199	47	246	20
K200	25	16.9	
P205	8	34.2	
R207	30	24.3	
K211	59	124	
E215	32	104	
F216	>1000	173	
T217	14.2	32.7	
G218	>1000	608	30
R220	>1000	結合なし	
Y224	51	24.5	
F229	>1000	89.9	

*変異体はアラニンにミューテートされた H R G - β 1 残基によって同定される。

[‡]H R G - β 1 は、H R G - β 1 1 7 7 - 2 4 4 を組換え的に生産する。

[•]T H - W T は、野生型 H R G - β 1 1 4 6 - 2 4 4 に対してその C 末端で融合されたチオレドキシンである。

実施例 3

一価ファージディスプレイを使用したヒレグリン-β 1 E G F ドメイン変異体の選択
本実施例は、最小 E G F 様ドメイン (H R G - β 1 1 7 7 - 2 2 8) に相当する残基を含む H R G - β 1 変異体の選択を記載する。これらの変異体のために、最小 E G F 様ドメイン中の残基の位置に関して (すなわち H R G - β 1 E G F 1 - 5 2)、カッコ内で残基数も表される。

H R G - β 1 E G F の変異体を調製し、Bassら, Proteins 8:309-14 (1990) の方法にしたがって、一価ファージディスプレイを使用して E r b B - 3 に対する結合について選択した。以下に詳細に議論されるように、H R G - β 1 E G F ファージミドベクターを調製し、その場合 H R G - β 1 E G F を M 1 3 コートタンパク質 p I I I の C 末端断片に融合し

10

20

30

40

50

た。ランダム化のために選択された部位でこのベクター内に終止コドンを導入するために、Kunke1ミュータジェネシスを実施した。この工程は、開始ベクターが野生型ポリペプチドを発現することを不可能にすることを確実にした。ライブラリー当たり4から6残基の断片を、6個のシステイン、Phe189 (HRG-β1EGF Phe13) および2個の最もC末端の残基 (図3参照) を除いて、直線状の方式でランダム化した。Phe189は、EGFおよびTGF-αにおける芳香族残基として保存されており、Tyr208 (HRG-β1EGF Tyr32) と重なった相互作用を形成するために、Phe189は改変しなかった。Jacobsenら, Biochemistry 35:3402-17 (1996)。それ故HRG-β1EGFは、A-E、G、HおよびIと名付けられた8個のライブラリーで変換された。

10

HRG-β1 202-209 (HRG-β1EGF 26-33) を変換されているライブラリーEは、3残基の欠失を含んだ。欠失領域は、HRG-β1EGFの第二および第三のβシートの間の乱れたターンに相当し、同等なアミノ酸はEGFおよびTGF-α内に存在しなかった。HRG8のHRG-β1 202-204 (HRG-β1EGF 26-28) が欠失されている (HRG63) HRG-β1EGFコントロール変異体は、野生型のものと同様な親和性でErB-3-Igに結合した (表13)。

さらなるライブラリー (F) は、HRG-β1 178, 180, 198および200 (HRG-β1EGF 2, 4, 22および24) を含む第一および第二のβシート由来の側鎖より成る表面パッチをランダム化するために作製された。

開始ベクター中の選択された部位を、HRG-β1EGFライブラリーを生産するためにKunke1ミュータジェネシスによってランダム化した。ミューテート化HRG-β1EGFをディスプレイするファージを、統計学的に各ファージ粒子がミューテート化HRG-β1EGFの1コピーより多くはディスプレイしないような条件下で、ライブラリーから生産した。Bassら, 上記参照を参照。それからこれらのファージを、ELISAプレート上に固定化したErB-3-Igに対する結合 (これらに対して選択された) について選択した。結合ファージを溶出し、宿主細胞を再感染するために使用し、それはもう一周の選択について新たなファージを生産するために使用した。それから、各ライブラリーから選択されたファージ由来の12のクローンをシークエンスした。

20

ファージライブラリーの構築

pHRG8-g3から調製されたウラシル含有一本鎖DNAテンプレートを使用して、Kunke1ミュータジェネシスによってファージライブラリーを構築した。実施例1に記載されたpHRG8-g3は、pIII323残基に対してリンカーを介して融合されたHRG-β1 177-228 (HRG-β1EGF 1-52) を発現した。各ライブラリーについて、TAAおよびTGA終止コドン、プールから野生型骨格を除去するカスタムテンプレートを生産するために、ランダム化のために選択された位置で挿入した。位置は、NNSコドン (この場合Nは4つのベースのいずれでもよく、SはGまたはCの何れかである) に対するミューテーションによって十分にランダム化された。一つのオリゴヌクレオチドをライブラリーFに対する場合を除いて各ライブラリーミュータジェネシス反応で使用し、Fについては二つのオリゴヌクレオチド (一方はHRG-β1 178および180 [HRG-β1EGF 2および4] をランダム化し、他方はHRGβ1 198および200 [HRG-β1EGF 22および24] をランダム化した) を同時に使用した。18ベースを含むミュータジェネシスオリゴヌクレオチドは、ランダム化残基の各側で突出している。

30

40

ミュータジェネシス反応混合物を、製造者のプロトコールにしたがって、XL-1Blue細胞 (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) 内に電氣的にトランスフォームした。それからトランスフェクトされた細胞を、 10^{11} pfu M13K07ヘルパーファージ (Promega Corp., Madison, WI) を使用して感染し、およびファージストック (約 10^{14} ファージミド/mL) を実施例1に記載されるように調製した。

1. 0×10^8 から 6. 4×10^8 の間の形質転換体を各ライブラリーから得、そのことは5以下のランダム化コドンを含むライブラリーが、考え得るアミノ酸配列の組み合わせ (

50

3. 3.6×10^7 の考え得る DNA 配列；3. 2×10^6 の考え得る アミノ酸配列）の優れた表示を有することを意味した。6 のランダム化コドン（1. 1×10^9 DNA 配列）を含むライブラリー B は、4. 8×10^8 の全形質転換体を有した。

E r b B-3-I g 結合のためのファージの選択

一価ファージを調製し、実施例 1 に記載されたように、ヒト F c 断片に対するポリクローナル抗体を使用した捕捉を介してマイクロタイタープレートに前もって結合された E r b B-3-I g 上で選択を実施した。100 μ L 結合バッファー（P B S、0.1% B S A、0.05% T w e e n 20TM）中のおよそ 10^{12} のファージを、E r b B-3-I g コート化ウェル、および E r b B-3-I g が加えられていない対照ウェルに適用した。室温で 2 時間のインキュベーションに引き続き、該プレートを激しく洗浄し（12 $\times$ ）50 m M H C l および 0.05% T w e e nTM の 100 μ L の溶液を加え、10 分攪拌することによって、ファージを溶出した。

溶出物を 10 μ L 1 M T r i s-H C l（pH 8.0）を使用して中和し、20 μ L を対数増殖期の X L-1 b l u e 細胞に対する滴定のために使用した。残りのものを、1 mL の対数増殖期 X L-1 b l u e 細胞を感染するために使用し（37 $^{\circ}$ C で 30 分）、それからそれを 2×10^{10} p f u M 13 K 07 ファージを使用して過剰感染し、50 μ g/mL のカルベニシリンを含む 25 mL 2 Y T 溶液（16 g/L トリプトファン、10 g/L 酵母抽出物、5 g/L N a C l）中で育成させた。ファージを上記記載のように回収し、サイクルを繰り返した。ライブラリーは、選択の 6 周で陰性（抗ヒト F c プレコートのみ）ウェルに対する陽性（E r b B-3-I g コート化）ウェルから溶出したファージの割合が、39 から 9200 の間であるように、急速に豊富化した。

6 周（ライブラリー A、B、D-F）または 7 周（ライブラリー C、G-I）の選択の後、各ライブラリーから 12 のクローンをランダムに拾い、ジデオキシ法によってシーケンスした。Sanger ら, PNAS USA 74:5463-67（1977）。DNA 配列から推定されたランダム化位置でのアミノ酸は、表 6-12 に示されている（“.” は野生型残基と同一の残基を示す）。各位置での一致した選択された残基は、図 3 に図式的に示されている。一般的に、数多くのミューテーションが存在し、ある場合には側鎖の性質の劇的な変化を伴った。特定の残基に分類されたいくつかの位置では、ライブラリーが大きな多様性を有し、選択がタンパク質レベルで存在する証拠を提供する、DNA の混合物が見出された。ライブラリーのいくつかにおいて、H R G- β 1 M e t 226 I l e（H R G- β 1 E G F M e t 50 I l e）の自発的ミューテーションが、このコドンの 1 ベースの変化のため存在した。このミューテーションは、E r b B-3-I g 結合に対する有意な親和性の増大を引き起こす。各ライブラリーに対するシーケンスの結果は、以下に要約されている。

ライブラリー A-H R G- β 1 177-181（H R G- β 1 E G F 1-5）

H R G- β 1 177-181（H R G- β 1 E G F 1-5）は、野生型 N 末端サブドメイン中の第一の β 鎖中に存在する。このライブラリーから選択された変異体中のアミノ酸変化は、表 6 に示されている。

表 6

ライブラリーA変異体

変異体番号	HRG- β 1での位置					
	177	178	179	180	181	
野生型	S	H	L	V	K	配列番号38
1	W	R	.	.	P	配列番号39
2	W	S	.	Q	P	配列番号40
3, 5, 10	W	E	.	.	P	配列番号41
4	W	S	.	.	.	配列番号42
6	W	S	.	I	P	配列番号43
7	W	R	.	.	A	配列番号44
8	W	A	.	.	P	配列番号45
9	W	S	.	Q	.	配列番号46
11	W	E	.	.	A	配列番号47
12	W	S	.	E	P	配列番号48

10

20

ランダム化において、Ser 177 (Ser 1) は極端にTrpを選択した。His 178 (His 2) は混合した親水性残基を選択したが、野生型残基はこの中に存在しなかった。Leu 179 (Leu 3) はシークエンスされた全ての変異体中で保存された。Val 180 (Val 4) は、12の変異体中の8で野生型を選択し、残りの変異体は、Val 180 Glu (Val 8 Glu) ミューテーションを除き、この位置で保存的な置換を有した。Lys 181 (Lys 5) では、Proが8の変異体で現れ、野生型残基が2の変異体で見出された。

ライブラリーA由来の4の変異体は、ライブラリーA中のランダム化された位置でのアミノ酸置換を含まなかった。代わりに、これらの変異体は、ライブラリーB中でランダム化された位置でアミノ酸置換を含み、それ故、これらの変異体は表7中で変異体B1-B4として挙げられた。同様に、ライブラリーB由来の4の変異体はライブラリーB中でランダム化されらが、ライブラリーA中でランダム化された位置での置換をむしろ含んだ。これらの変異体は、表6で変異体A5-A8として挙げられている。

30

ライブラリーB-HRG- β 1 183-188 (HRG- β 1 EGF 7-12)

HRG- β 1 183-188 (HRG- β 1 EGF 7-12) は、野生型タンパク質中でヘリックスの性質を有する。このライブラリーから選択された変異体中のアミノ酸変化は、表7に示されている。

表 7

ライブラリーB変異体

HRG- β 1での位置

変異体番号	183	184	185	186	187	188	
野生型	A	E	K	E	K	T	配列番号 4 9
1*	G	V	G	R	D	G	配列番号 5 0
2*	G	G	E	R	E	G	配列番号 5 1
3	G	.	E	R	E	G	配列番号 5 2
4*, 5*	G	W	D	R	E	G	配列番号 5 3
6*	G	V	Q	R	E	G	配列番号 5 4
7	G	.	E	R	A	G	配列番号 5 5
8	G	K	E	R	E	G	配列番号 5 6
9*	T	N	S	R	E	G	配列番号 5 7
10*	D	K	S	R	E	G	配列番号 5 8
11*	G	.	D	R	.	Q	配列番号 5 9
12	G	R	E	R	E	G	配列番号 6 0

*変異体はまたMet 226 Ileを含んだ。

この領域のランダム化は、野生から配列から最も劇的な変化を生じたが、この領域の一般的な親水性性質は、シーケンスされた変異体中で維持された。特にこの6残基の断片は、最初と最後の位置、Ala 183およびThr 188 (Ala 7およびThr 12)でGly残基を選択した。GluおよびAspを選択するLys 185 (Lys 9)で正及び負の電荷の記録の変化もまた存在し、他の中では、極端にArgを選択するGlu 186 (Glu 10)、GluおよびAspを選択するLys 187 (Lys 11)が存在する。Glu 184 (Glu 8)は、様々な異なる型の残基を選択し、この側鎖がErb B-3レセプター結合において重要な役割を果たしていないことを示した。

ライブラリーC-HRG- β 1 191-195 (HRG- β 1 EGF 15-19)

HRG- β 1 191-195 (HRG- β 1 EGF 15-19)は、ヘリックスと第二の β ストランドの間の β ターンを含む。このライブラリーから選択された変異体中のアミノ酸変化は、表8に示されている。

表 8

ライブラリーC変異体

HRG- β 1での位置

変異体番号	191	192	193	194	195	
野生型	V	N	G	G	E	配列番号 6 1
1, 2, 4, 5, 7-12	.	.	.	.	.	配列番号 6 2
3	.	.	.	.	V	配列番号 6 3
6	.	.	.	.	Q	配列番号 6 4

ランダム化および選択により、この領域中の野生型アミノ酸配列がほぼ完全に保存された変異体が生産された。ミューテーションは、2の変異体、両方Glu 195 (Glu 19)のみで見出された。この結果は、Erb B-3レセプター結合におけるこの領域の野生

型残基についての重要な役割と一致する。

ライブラリーD-HRG- β 1 197-201 (HRG- β 1 EGF21-25)
HRG- β 1 197-201 (HRG- β 1 EGF21-25) は、N末端サブドメイン中の第二の β ストランドに存在する。このライブラリーから選択された変異体中のアミノ酸変化が、表9に示されている。

表 9

ライブラリーD変異体

HRG- β 1での位置

変異体番号	197	198	199	200	201	
野生型	F	M	V	K	D	配列番号65
1*, 2*, 8*, 12*	Y	K	.	R	I	配列番号66
3	.	R	.	.	T	配列番号67
4, 5, 7, 9	Y	R	.	.	T	配列番号68
6	Y	.	I	.	Y	配列番号69
10	Y	.	.	.	T	配列番号70
11	M	R	.	R	T	配列番号71

*変異体はまたMet226Ileを含んだ。

この領域でのランダム化は、5の残基の2で増加または減少の変化のそれぞれを生産した。Phe197 (Phe21) は、12の変異体の10でTyrを選択し、この位置の芳香族性を維持した。Met198 (Met22) は、12の変異体の11で正に電荷した残基を選択した。Val199 (Val23) は、全ての変異体で保存され、Lys200 (Lys24) は、野生型またはArgのそれぞれを選択し、この位置での正の電荷を維持した。Asp201 (Asp25) は、ThrまたはIleの非電荷残基を選択し、この位置での β 枝性質を維持した。変異体D1, D2, D8, D12はまた、自発的親和性増大Met226Ile (Met50Ile) ミューテーションを誘導した。

ライブラリーE-HRG- β 1 205-209 (HRG- β 1 EGF29-33)
HRG- β 1 205-209 (HRG- β 1 EGF29-33) は、N末端サブドメイン中の第三の β ストランド中に存在する残基を含む。このライブラリーから選択された変異体中のアミノ酸変化が、表10に示されている。

表 10

ライブラリー E 変異体

HRG- β 1での位置

変異体番号	205	206	207	208	209	
野生型	P	S	R	Y	L	配列番号 72
1	T	P	Y	L	M	配列番号 73
2, 4	Y	G	Y	L	M	配列番号 74
3*	Y	R	Y	R	M	配列番号 75
5, 12	T	H	Y	R	G	配列番号 76
6	T	H	Y	R	M	配列番号 77
7*	Y	K	Y	R	M	配列番号 78
8, 9	T	K	Y	R	G	配列番号 79
10	Y	K	Y	R	.	配列番号 80
11*						

*変異体はまた Met 226 Ile を含んだ。

変異体 E 11 はライブラリー F 由来の組換え体であった（他の 12 のライブラリー F 変異体と同一）。

ランダム化において、Pro 205 (Pro 29) は Thr または Tyr を選択した。Ser 206 (Ser 30) は、主に塩基性側鎖を有する混合した残基を選択したが、Gly もまた二度現れる（同じ変異体由来の配列において）。側鎖の変換は Arg 207 (Arg 31) および Tyr 208 (Tyr 32) で出現し、Tyr に極端に変化する第一のもの、および主に Arg (7 の変異体) および Leu (4 の変異体) に変化する第二のものが存在した。Tyr 208 が構造中で Phe 189 (Phe 13) と重なり、EGF 配列で保存されているため、この発見は特に予期されなかった。Jacobsen ら, Biochemistry 35:3402-17 (1996) 参照。Leu 209 (Leu 33) では、比較的保存された Met 置換が、多くの変異体で見出されたが、Gly もまた見出された。

ライブラリー G-HRG- β 1 211-216 (HRG- β 1 EGF 35-40)
HRG- β 1 211-216 (HRG- β 1 EGF 35-40) は、HRG- β 1 EGF の C 末端サブドメインの最初の β スtrand を含む。このライブラリーから選択された変異体中のアミノ酸変化が、表 11 に示されている。

10

20

30

表 1 1

ライブラリーG変異体

H R G - β 1 での位置

変異体番号	211	212	213	214	215	216	
野生型	K	C	P	N	E	F	配列番号 8 1
1, 5, 6, 10, 12	R	.	S	L	.	.	配列番号 8 2
2	R	.	S	E	.	.	配列番号 8 3
3	.	.	.	K	.	M	配列番号 8 4
4	R	.	T	V	.	Y	配列番号 8 5
7, 8	R	.	T	V	.	Y	配列番号 8 6
9	.	.	N	S	.	.	配列番号 8 7
11	R	.	K	K	.	.	配列番号 8 8

ランダム化において、12の変異体のうち10がLys 211 Arg (Lys 35 Arg) ミューテーションを含み、それ故二つのシステイン残基の間に存在するこの位置での正の電荷を維持した。Pro 213 (Pro 37) は、混合した親水性残基を選択し、Asn 214 (Asn 38) は、Leu および Val が最も頻繁に現れる残基に混合物を選択した。Glu 215 (Glu 39) は全ての残基で保存されており、Phe 216 (Phe 40) は12の残基のうち8で維持され、残りの残基の3では保存的なTyr置換を有した。

ライブラリーH-HRG- β 1 217-220 (HRG- β 1 41-44)

HRG- β 1 217-220 (HRG- β 1 EGF 41-44) ライブラリーは、ライブラリーB (変異体B5) 由来の抗親和性変異体によって混ざりやすいことが明らかとなった。この変異体は12の変異体のうち11で見出された。唯一の影響を受けない変異体では、野生型アミノ酸配列がAsp 219 Glu (Asp 43 Glu) ミューテーションを除いて保存された。この結果は、この領域が最適な結合のため野生型または同様な配列を必要とすることを示唆した。

ライブラリーI-HRG- β 1 222-226 (HRG- β 1 EGF 46-50)

HRG- β 1 222-226 (HRG- β 1 EGF 46-50) は、HRG- β 1 213-216 (HRG- β 1 EGF 38-40) で β シートの上ストランドと並ぶ β シートの短いストランドを含む。このライブラリーから選択された変異体のアミノ酸変化が、表12に示されている。

表 1 2

ライブラリーI変異体

H R G - β 1 での位置

変異体番号	222	223	224	225	226	
野生型	Q	N	Y	V	M	配列番号 8 9
1, 4, 8	.	W	.	.	I	配列番号 9 0
2, 3, 5-7, 9-12	.	H	.	.	I	配列番号 9 1

HRG- β 1 222-226のランダム化において、二つの型の変異体がシーケンスされた12のうちで見出され、両者は、Gln 222 (Gln 46)、Tyr 224 (Tyr 48) およびVal 225 (Val 49) で保存された野生型残基を有し、両者はM

10

20

30

40

50

e t 2 2 6 I l e (M e t 5 0 I l e) ミューテーションを有する。A s n 2 2 3 (A s n 4 7) は、H i s (9 の変異体) または T r p (3 の変異体) を選択した。M e t 2 2 6 I l e の強力な親和性増大効果は、このライブラリーからシークエンスされた全ての変異体で存在し、およびいくつかの他のライブラリー由来の変異体での高頻度の出現によって証拠付けられる。

ライブラリー F-HRG- β 1 1 7 8, 1 8 0, 1 9 8 および 2 0 0 (HRG- β 1 EGF 2, 4, 2 2 および 2 4)

H i s 1 7 8 (H i s 2)、V a l 1 8 0 (V a l 4)、M e t 1 9 8 (M e t 2 2) および L y s 2 0 0 (L y s 2 4) を同時にランダム化した場合、一つの型の変異体のみが見出された。H i s 1 7 8, V a l 1 8 0, および L y s 2 0 0 は、野生型残基を選択し、M e t 1 9 8 は L y s を選択した。これらの変異体は、自発的な M e t 2 2 6 I l e (M e t 5 0 I l e) ミューテーションをさらに含み、それは他の配列よりも有意に選択される利点を該変異体に与えた。ライブラリー A からシークエンスされた 1 2 の変異体のうち全てが H i s 1 7 8 を含んでいなかったため、野生型 H i s は 1 7 8 位で見出されたことは際だっている。

10

ファージディスプレイおよびアラニンスキャニングの結果における HRG- β 1 EGF 残基の保存

アラニン置換が結合親和性に強力に影響する位置は、野生型残基を選択する傾向が存在した。例えば、N および C 末端サブドメインの間の接合部での位置のデータ参照 (すなわち HRG- β 1 1 9 1-1 9 5 [HRG- β 1 EGF 1 5-1 9] での β ターン、および HRG- β 1 2 1 7-2 2 0 [HRG- β 1 EGF 4 1-4 4] でのループ)。さらに、アラニン置換があまり有意な効果を有しない位置は、HRG- β 1 (HRG- β 1 EGF 7-1 2) でのヘリックス断片に見られるように、ファージディスプレイにおいて実質的なミューテーションを受けやすい傾向にあった。

20

レセプター親和性および特異性に対する選択されたミューテーションの影響の分析

各ライブラリー由来の個々の変異体を、ファージ生産、およびファージ上にディスプレイされたミューテートされた HRG- β 1 EGF (「変異体」) のさらなる特徴付けに対して選択した。さらなる特徴付けに対する変異体の選択は、有利な M e t 2 2 6 I l e (M e t 5 0 I l e) 置換を含まない配列に対する偏向を有して、選択される傾向に基づいた。さらに、上記記載の様々な組み合わせを含むミューテートされた HRG- β 1 EGF (「組み合わせ変異体」) をディスプレイするファージを生産するための使用されファージミドベクターを、いくつかの上記記載の変異体から調製されたテンプレートをを使用して、K u n k e l ミュータジェネシスによって調製した。組み合わせ変異体中のアミノ酸置換は、図 4 に示されている。E r b B-3-I g に対する変異体および組み合わせ変異体の親和性 (野生型 HRG- β 1 EGF の親和性に対して) を、実施例 1 に記載されているようにファージ E L I S A によって測定した。その結果が表 1 3 に示されている。いくつかの変異体および組み合わせ変異体もまた、特異性を評価するために相対的 E r b B-4-I g 親和性について試験した。

30

表 13

ファージELISAによって測定されるErbB-3-IgおよびErbB-4-Igに対するヒレグリン-β1EGF変異体および組み合わせ変異体の親和性

構築物	ファージErbB-3	ファージErbB-4
	EC ₅₀ (wt) / EC ₅₀ (mut) *	EC ₅₀ (wt) / EC ₅₀ (mut)
HRG8	1	1
HRG63	1.1 ± 0.8	
A1	0.55 ± 0.27	
A2	0.87 ± 0.5	
A3	0.96 ± 0.43	1.1 ± 0.4
A4	<0.3	
B3	4.7 ± 0.77	1.7 ± 0.5
B5	26 ± 20	
B10	9.3	
D1	11 ± 0.45	
D4	2.9 ± 1.1	5.0 ± 3.7
D10	2.1	
E2	28 ± 13	7.6
E3	16	
E6	6.6 ± 3.0	
E8	17 ± 2.3	
G1	1.2 ± 0.36	1.6
G4	0.86 ± 0.19	
H5	1.5	
I1	13 ± 11	
I2	20 ± 20	10
F1	4.4 ± 3.3	
HRG90	6.3 ± 3.1	
HRG37	13 ± 15	
HRG38	<0.3	
HRG40	<0.3	
HRG41	<0.3	
HRG48	49 ± 15	

10

20

30

40

構築物	ファージErbB-3	ファージErbB-4
	EC ₅₀ (wt) / EC ₅₀ (mut) *	EC ₅₀ (wt) / EC ₅₀ (mut)
HRG53	26 ± 16	
HRG54	12 ± 9.2	
HRG55	13 ± 11	
HRG56	31 ± 22	
HRG57	24 ± 16	
HRG58	58 ± 11	44
HRG59	26 ± 14	
HRG60	63 ± 11	
HRG61	29 ± 25	
HRG62	32 ± 14	
HRG71	79 ± 56	
HRG73	56 ± 6.6	16

*同じアッセイを実施する間で、測定された野生型HRG-β1EGF-ファージEC₅₀に基づく(ErbB-3-Igについて135±104nM、ErbB-4-Igについて163±112nM)。2-4回の二重の実施の平均における標準偏差、または一回の実施における二重に実施されたアッセイに対する平均のみが示されている。

ライブラリーA由来の変異体は、野生型HRG-β1EGFと大変似たEC₅₀値を有した。ライブラリーBおよびD由来の変異体は、Met226Ile(Met50Ile)を含まない選択された変異体に対する野生型親和性の3から5倍の範囲で、ErbB-3-IgおよびErbB-4-Igに対する有意に増大された親和性を有する。(変異体B3およびD4を参照)。親和性における実質的により大きい増大(野生型HRG-β1EGFの26倍まで)が、Met226Ile(Met50Ile)を含む変異体について測定された。(変異体B5, B10およびD1を参照)。

ライブラリーE由来の変異体は、さらにより大きい増大を示した。例えば、HRG-β1206および208(HRG-β1EGF30および32)でライブラリーコンセンサス配列(図3)とは異なる変異体E2は、28倍の親和性の増大を有した。Δ202-204(Δ26-28)対照変異体(HRG63)のErbB-3-Igに対する親和性は、野生型HRG-β1EGFのものと同様である(表13)ため、近接した3つの欠失よりもむしろ、HRG-β1205-209(HRG-β1EGF29-33)でのアミノ酸置換と、該効果は関連するように思える。

Met198Lys(Met22Lys)およびMet226Ile(Met50Ile)置換を有するライブラリーF由来の単一の変異体は、Met226Ile単独のものよりわずかにだけ増大を示し、Met198Lysミューテーションの寄与が小さい効果であることを示す。ライブラリーG由来の変異体は、どんなものでもErbB-3-Ig親和性増大をほとんど示さなかった。唯一のライブラリーH変異体由来の単一のAsp219Glu(Asp43Glu)ミューテーションは、親和性における穏やかな増大を提供した。2つのライブラリーI変異体は、ErbB-3-IgおよびErbB-4-Igに対する親和性における有意な増大を有した。該増大は、Met226Ile(Met50Ile)ミューテーション(変異体HRG90参照)由来のおよそ6倍の効果に寄与し、Asn223(Asn47)からTrpまたはHisミューテーションへの2から3倍のさらなる増大に寄与した。

変異体A3ミューテーションを含む組み合わせ変異体をディスプレイするファージは、わずかししか実施しなかった。A3+B3組み合わせは、変異体B3のものと同様なErbB-3-Igに対するEC₅₀を有したが、試験された他の組み合わせは、検出可能な親和性

を有して結合しなかった。これは、他のライブラリー由来のミューテーションと、Ser 177 Trp、His 178 GluまたはLys 181 Pro (Ser 1 Trp、His 2 GluまたはLys 5 Pro) ミューテーションとの不利な相互作用のためであろう。B3およびE2ミューテーションの組み合わせは、変異体E2のものに対してわずかに減少した親和性を生じた。

他のライブラリー由来の変異体からのミューテーションの組み合わせは、さらなる挙動を緊密に与え、50倍より大きいEC₅₀値の増大を引き起こした。最適な組み合わせ変異体に対するEC₅₀値は、使用されたレセプターコーティング濃度(およそ4 nM)でのアッセイのより低い制限に近かった。レセプターコートより低いレベルを使用することは、これらの組み合わせ変異体に対するナノモル以下のEC₅₀値を生じたが、野生型HRG-β1EGFファージの最小結合のため、野生型親和性の測定を許容しなかった。最適な組み合わせ変異体は、D4配列、B3またはE2配列の何れか、および単一Met 50 IleミューテーションまたはI2配列の何れかを含んだ。

一般的に、ErbB-3-Igに対する親和性の増大を示す変異体は、ErbB-4-Igに対する親和性の同様な増大をも示した。

可溶性HRG-β1EGF変異体の発現、精製、およびアッセイ

数多くの変異体が、可溶性形態で発現された(すなわちミューテートされたHRG-β1EGFは、M13 pIIIからフリーで発現された)。可溶性変異体のペリプラズムでの発現を容易にするために、TAGコドンにKunkelミュータジェネシスによって相当するファージミド内にHRG-β1 226 (HRG-β1EGF52)に導入し、生じた構築物を、34B8細胞(表現型: tonAΔ PhoAΔ E15 Δ (argF-lac) 169 deoC2 ompTΔ degP41 (ΔPstI-kanR))内にトランスフォームした。該構築物は、変異体A3、E2およびF1を発現するもの、並びに組み合わせ変異体HRG5~8 (D4+E2+M50I) およびHRG73 (B3+D4+E2+I2)、同様に野生型HRG-β1EGF (HRG8)を発現する構築物を含んだ。

約1 mg/Lの濃度の発現が、以下のように達成された。50 μg/mLのカルベニシリンを含むLB培地内でOD₅₅₀=1.0の密度に細胞培養物を育成させ、1/100希釈で修飾AP5培地に植菌するために使用した(修飾AP5培地は以下のものを含む: 1.5 g/L グルコース、11 g/L Hycase SF、0.6 g/L 酵母抽出物、0.19 g/L 無水MgSO₄、または0.394 g/L MgSO₄・7H₂O、1.07 g/L 塩化アンモニウム、3.73 g/L KCl、1.2 g/L NaCl、120 mL/L 1 M トリエタノールアミン [pH 7.4]。)

野生型HRG-β1EGFおよびその変異体は、単一の逆相HPLC工程においてペリプラズム破壊から均質に精製された。略記すると、細胞を30℃で24時間の増殖の後(OD₅₅₀=1.2) 4500 rpmでの遠心分離により回収し、ペレットを5時間エタノール/ドライアイス中で凍結した。5 mM MgCl₂、75 mM CaCl₂、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、および10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 中での再懸濁および解凍に引き続き、破壊された細胞を遠心分離で取り出し、破壊破片にした。破壊破片を濾過し、3 mL/分の流速で80分かけて0-40%アセトニトリル由来の勾配を用いて半予備C18逆相HPLCによってクロマトグラフィーにかけた。HRG-β1EGF(またはその変異体)を含むことがエレクトロスプレーマススペクトロメトリによって示された画分を凍結乾燥し、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 中で再懸濁した。アミノ酸分析およびSDS-PAGEで測定したところ、タンパク質は本質的に均質であることが見出された。

ErbB-Igに対する可溶性変異体の親和性を、実施例1で以前に記載されたようにErbB-2/3、-3および-4レセプター-Ig融合物に対する¹²⁵I-HRG結合の阻害を測定することによって測定した。ErbB-2/3-Ig調製物もまたErbB-2/2および3/3ホモダイマーを含むが(ErbB-2-および-3-Igの共発現の結果として)、¹²⁵I-HRGの置換は、2/3ヘテロダイマー対3/3ホモダイマーに

ついで野生型HRG- β 1EGFのおよそ100倍高い親和性のため、有意にErbB-2/3-Ig由来であるはずである。

その結果が表14に示されている。

表14

可溶性ヒレグリン- β 1EGF変異体に対する

結合および活性化パラメーター

構築物	ErbB-3-Ig EC ₅₀ (nM)	ErbB-4-Ig EC ₅₀ (nM)	ErbB-2/3-Ig EC ₅₀ (nM)	KIRA EC ₅₀ (nM)
HRG8 (WT)	2.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0.033 ± 0.003	0.212
A3	4.3 ± 0.2	2.1 ± 0.1	0.067 ± 0.007	0.182
E2	2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.02	0.035 ± 0.007	0.092
F1	0.60 ± 0.04	0.26 ± 0.011	0.061 ± 0.002	0.151
HRG58	0.80 ± 0.01	0.30 ± 0.005	0.075 ± 0.006	0.129
HRG73	2.7 ± 0.1	0.31 ± 0.003	0.20 ± 0.006	0.173

該変異体は、野生型HRG- β 1EGFが示すものよりErbB-3-Igに対する高い親和性を示す（4倍まで）が、親和性の増大はファージELISAによって測定されたものより劇的ではなかった。このフォーマットにおける分析もまた、E2ミューテーションが大きな増大した親和性を与えること、並びにさらなるD4およびMet50Ileミューテーション（構築物HRG58中で）がさらには寄与しないことを明らかにした。ファージELISAで観察されるように、該変異体は、ErbB-3-Igに対する親和性増大と同様であるErbB-4-Igに対する親和性の増大を示した。ErbB-2/3-Igに対する変異体親和性は、2/3ヘテロダイマーに対する野生型HRG- β 1EGFの親和性と同様であるが、最大に置換された構築物（HRG72）は野生型HRG- β 1EGFが結合するよりErbB-2/3-Igに対して6倍弱く結合した。

可溶性変異体もまた、MCF7乳ガン細胞上のErbB-2レセプターのチロシンリン酸化を刺激するその能力についてアッセイされた。これは、Sadickら, *Analyt. Biochem.* 235: 207-214に記載されているようにKIRA-ELISAフォーマットにおいて達成され、その場合検出されるErbB-2リン酸化は、主にErbB-2/3ヘテロダイマーの形成のためであると考えられる。

略記すると、 2×10^5 MCF-7細胞を、平底96穴培養プレートの各ウェルに加え、一晩培養した。翌朝、培養培地を0から10 nMの範囲の濃度で変異体またはHRG8（野生型）を含む培地と交換した。細胞を30分で37℃で刺激し、培養培地を捨てた。細胞を溶解しレセプターを可溶化するために、100 μ lの溶解バッファーを各ウェルに加えた。溶解バッファーは、150 mM NaCl、50 nM HEPES、0.5% Triton-X100、0.01% チメロゾール、30 kIU/ml アプロチニン（ICB Biochemicals, Aurora, OH）、1 mM 4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルホニルフロリドヒドロキシクロリド（AEB SF; ICN Biochemicals）、2 mM オルトバナジン酸ナトリウムより成った。それからプレートを室温で60分、プレートシェイカー（Bellco Instruments, Vineland, NJ）上で穏やかに攪拌した。

細胞を可溶化する一方、アフィニティー精製ポリクローナル抗ErbB-2ECD抗体（50 mMカルボン酸バッファー（pH 9.6）中で1.0 μ g/ml）を使用して4℃で一晩コートしたELISAマイクロタイタープレー（Nunc Maxi sorp™, Inter Med, Denmark）を注ぎ、穏やかな攪拌を用いて室温で60分ブロックバッファー（PBS、0.5% BSA [Intergen Co., Purchase, NY]、0.01% チメロゾール）を使用して

ブロックした。60分後、抗ErbB-2ECD抗体コート化プレートを、自動プレート洗浄器 (Scan Washer 300, Skatron Instruments, Inc., Sterling, VA) を使用して洗浄バッファー (PBS、0.05% Tween 20TM、0.01% チメロゾール) を用いて6回洗浄した。

各細胞培養マイクロタイター由来の可溶化ErbB-2を含む溶解物を、各抗ErbB-2ECD抗体コート化およびブロック化ELISAウェルに移し、穏やかな攪拌と共に室温で2時間インキュベートした。非結合レセプターを洗浄バッファーで洗浄することによって除去し、希釈バッファー (PBS、0.5% BSA、0.05% Tween 20TM、5mM EDTA、0.01% チメロゾール) 中に0.2 μg/mlに希釈した100 μlのビオチン化4G10を各ウェルに加えた。室温で2時間のインキュベーションの後、プレートを洗浄し、希釈バッファー中で1:50000に希釈した100 μlのセイヨウワサビペルオキシダーゼ接合ストレプトアビジン (Zymed Laboratories, S. San Francisco, CA) を各ウェルに加えた。プレートを穏やかな攪拌と共に室温で30分インキュベートした。有利アビジン接合物を洗浄し、100 μlの新鮮に調製された基質溶液 (テトラメチルベンジジン、TMB、二構成成分基質キット、KirkegardおよびPerry, Gaithersburg, MD) を各ウェルに加えた。反応を10分進行させ、その後色素形成を1.0M H₃PO₄を添加することによって停止させた。

その結果が表14に示されている。EC₅₀は、50%最大チロシンリン酸化を達成するのに必要な変異体 (またはHRG8) の濃度である。一般的に、試験された変異体によるリン酸化の刺激に対するEC₅₀は、野生型HRG-β1EGFのEC₅₀と実質的に異ならなかった。さらに、該値は、上記のレセプター融合物に結合するIC₅₀とよく相関した。

実施例4

一価ファージディスプレイを使用したErbB-4レセプター結合に対するヒレグリン-β1EGFドメイン変異体の選択

本実施例は、ErbB-4レセプターに対する結合のためのHRG-β1変異体、特に、野生型HRG-β1よりも、ErbB-3レセプターに対して、ErbB-4レセプターについての大きい特異性を有する変異体の選択を記載する。上記変異体は、例えば、ErbB-3-Igに対する結合よりも、ErbB-4-Igに対する結合についての低い変異体：野生型EC₅₀比を有する。研究された変異体は、最小EGF様ドメイン (HRG-β1 177-228) を含むHRG-β1 177-244に相当する残基を含む。本実施例において、「HRG-β1EGF」とは、177-244残基にわたるEGF様ドメインの領域を指す。残基数は、645アミノ酸天然ヒトHRG-β1中の位置の観点から、およびカッコン内でHRG-β1EGF中の位置の観点から (すなわちHRG-β1EGF 1-68)、表されている。

該変異体は、His178, Leu179およびArg207 (His2, Leu3およびArg31) でランダム化によって生産された。アラニンスキャニング (実施例2) がこれらの位置でのアラニンの置換が、ErbB-4レセプターと比較して、ErbB-3レセプターに対する親和性の有意に大きい損失を引き起こすため、これらの残基が選択され、これらの残基はErbB-4レセプター結合に対するよりもErbB-3レセプター結合に対して重要であることを示唆する。さらに、これらの残基は、潜在的に結合部位を形成するHRG-β1分子の表面上互いに近接して位置していると予測される。

ErbB-4-Ig結合に対するファージライブラリースクリーニング

HRG-β1EGFの変異体を調製し、Bassら, Proteins 8:309-14 (1990) の方法にしたがって一価ファージディスプレイを使用して、ErbB-4-Igに対する結合について選択した。略記すると、HRG-β1EGFファージミドベクターは、HRG-β1 177-244がM13コートタンパク質pIIIのC末端断片に融合された、pHRG2-p3 (実施例1に記載) であった。開始ベクターが野生型ポリペプチドを発現しないことを確かにするために、His178, Leu179およびArg207 (His2, Leu3およびArg31) でこのベクター内に終止コドンを導入する目的で、Kunkel ミュータジェネシスを実施した。

それからこれらの部位を、HRG- β 1EGFライブラリーを生産するためにKunkelミュータジェネシスによってランダム化した。ミューテート化HRG- β 1EGFを一価的にディスプレイするファージを、該ライブラリーから生産した。Bassら, 上記参照を参照。それからこれらのファージを、ELISAプレート上に固定化したErBB-4-Igホモダイマーに対して選択した。結合ファージを溶出し、新たなファージを生産するために使用される宿主細胞に再感染するために使用した。選択の第一周由来のファージの半分は、さらなる3周の選択のために固定化ErBB-4-Igに対して選択させた。第一周由来のファージのもう半分は、可溶性ErBB-3-Ig (10 nM) の存在下でさらなる3周のために固定化ErBB-4-Igに対して選択した。可溶性ErBB-3-Igの存在下での選択 (すなわちErBB-3-Igに対する「カウンター選択」) は、ErBB-3-Igに対するより高い親和性を有する変異体を取り出すことが期待され、選択の各周でErBB-4-Igに対するより高い親和性を有するものを豊富にすることを許容した。選択後、二つの生じたライブラリーのそれぞれから由来する12のクローンをシークエンスした。

10

初めのファージライブラリーの構築

初めのファージライブラリーを、ウラシル含有一本鎖DNAテンプレートを使用してKunkelミュータジェネシスによって構築した。TAAおよびTGA終止コドン、プールの野生型骨格を除去するカスタムテンプレートを生産するために、ランダム化に対して選択される位置で導入した。位置は、NNSコドン (この場合Nは4つの塩基の何れかであり、SはGまたはCの何れかである) へのミューテーションによって十分にランダム化された。二つのミュータジェネシスオリゴヌクレオチドを使用し、一つはHis178およびLeu179 (His2およびLeu3) をランダム化し、もう一つはArg207 (Arg31) をランダム化した。該オリゴヌクレオチドは、ランダム化残基のそれぞれの側で15ベースの突出部を含んだ。

20

最終ミュータジェネシス反応混合物を、製造者のプロトコールにしたがって、XL-1 Blue細胞 (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) 中に電気的トランスフォームした。それからトランスフォームされた細胞を、 10^{11} pfu M13K07ヘルパーファージ (Promega Corp., Madison, WI) を使用して感染し、ファージストック (約 10^{14} ファージミド/mL) を実施例1に記載のように調製した。

少なくとも 10^8 の形質転換体を得られ、該ライブラリーが考え得るアミノ酸配列組み合わせの適切な代表物を有することを示した。

30

ErBB-4-Ig結合に対するファージの選択

一価ファージを調製し、実施例1に記載されているように、ヒトFc断片に対するポリクローナル抗体を使用した捕捉を介して、マイクロタイタープレート上に前もって結合されたErBB-4-Ig上で選択を実施した。 $100\mu\text{L}$ 結合バッファー (PBS、0.1% BSA、0.05% Tween 20TM) 中のおよそ 10^{12} ファージを、ErBB-4-Igコート化ウェル、およびErBB-4-Igが添加されていない対照ウェルに適用した。選択の第一周の後、生じたファージの半分 (以下では「カウンター選択ライブラリー」) を、結合バッファー中の10mM ErBB-3-Igの存在下で選択した。室温で2時間のインキュベーションに引き続き、該プレートを強烈に洗浄し (12 $\times$)、 $100\mu\text{L}$ の50mM HClおよび0.05% TweenTM20の溶液を加え、10分攪拌することによって、ファージを溶出した。

40

溶出物を $10\mu\text{L}$ 1M Tris-HCl (pH 8.0) を使用して中和し、 $20\mu\text{L}$ を対数増殖期XL-1 blue細胞に対する滴定のため使用した。残りのものを1mLの対数増殖期XL-1 blue細胞を感染するために使用し (37 $^{\circ}\text{C}$ で30分)、それからそれを 2×10^{10} pfu M13K07ファージを使用して過剰感染し、 $50\mu\text{g/mL}$ のカルベニシリンを含む25mLの2YT溶液 (16g/Lトリプトファン、10g/L酵母抽出物、5g/L NaCl) 中で18-24時間増殖させた。ファージを上記記載のように回収し、サイクルを繰り返した。

選択の4周後、各ライブラリー由来の12のクローンをランダムに拾い、ジデオキシ法に

50

よってシーケンスした。Sangerら, PNAS USA 74:5463-67 (1977) 参照。DNA配列から推定されるランダム化の位置でのアミノ酸が、表15に示されている（“.”は野生型残基と同一である残基を示す）。

表15

ファージELISA中のErbB-3および
ErbB-4-Igに対するミューテーションおよび親和性
ErbB-4-Ig結合に対する選択の4周
(非カウンター選択)

野生型	H	L	R	#同族	ErbB-4 EC ₅₀ , Mut/WT*	ErbB-3 EC ₅₀ , Mut/WT
クローン	.	M	.	7	1.5	1.2
	W	.	.	2*	1.7	1.2
	E	.	.	2	1.7	9.5
	.	V	.	1	1.6	1.5

10

ErbB-3-Igカウンター選択と結合するErbB-4-Igに対する選択
の4周

クローン	.	.	P	7	1.3	6.1
	L	.	.	1*	1.7	6.4
	L	.	.	1	1.2	1.4
	D	V	.	1	2.0	2.2
	E	V	.	1	1.7	0.8
	T	M	.	1	1.6	1.4

20

*HRG-β1 228-231 (HRG-be-ta1EGF52-55)は、自発的に欠失され、単一のMet残基によって置換された。

*この配列を有する変異体の数（各ライブラリーからシーケンスされた12のうちの数）。

*ファージ上で一価的に発現された野生型HRG-β1 177-244に対するEC₅₀によって分割された変異体に対するEC₅₀。

30

一つの変異体が各ライブラリーにおいて際だっており、各ライブラリーからシーケンスされた12のクローンの7つで表された。ErbB-3-Igに対してカウンター選択されたライブラリー由来の際だった変異体は、His178およびLeu179 (His2およびLeu3)の位置で野生型残基を選択し、Arg207 (Arg31)でProを有した。カウンター選択なしで選択されたライブラリー由来の際だった変異体は、His178およびArg207 (His2およびArg31)の位置で野生型に選択し、Leu179 (Leu3)でMetを有した。ライブラリーのそれぞれ由来の変異体において、HRG-β1 228-231 (HRG-β1EGF52-55)の自発的な置換が存在した。

レセプター親和性および特異性に対するミューテーションの影響の分析

40

レセプター結合親和性を、実施例1に記載されているように、各ライブラリー由来の全ての独特な変異体についてファージELISAによって測定した。その結果が表15に示されている。ErbB-3-IgおよびErbB-4-Igに対する変異体の親和性を、特異性を評価するために測定した。

ErbBレセプター-Ig融合物に対するほとんどの変異体の親和性は、約1.2倍から約2.2倍の間で減少した。一つの変異体だけが、ErbB-3-Igに対してのみ、親和性におけるわずかな増大を示した。しかしながら、3つの変異体が、野生型HRG-β1の親和性より2倍未満小さいものである、ErbB-4-Igに対する親和性を有し、一方でErbB-3-Igに対するその親和性は、野生型HRG-β1の親和性より6から9倍小さかった。これらの変異体の全てが、Leu179 (Leu3)で野生型残基を

50

選択した。一つの変異体は、H i s 1 7 8 (H i s 2) でG l uを選択し、A r g 2 0 7 (A r g 3 1) で野生型を選択した。もう一つの変異体は、H i s 1 7 8 (H i s 2) で野生型を選択し、A r g 2 0 7 (A r g 3 1) でP r oを選択した。これが、カウンター選択ライブラリーにおける際だった変異体であった。

第三の変異体は、H i s 1 7 8 (H i s 2) でL e uを選択し、A r g 2 0 7 (A r g 3 1) でP r oを選択し、またH R G- β 1 2 2 8-2 3 1 (H R G- β 1 E G F 5 2-5 5) に対してM e t の自発的な選択を有したが、E r b B-3-I g に対するほぼ野生型の親和性を維持して、自発的な置換を欠いていた。それ故、E r b B-3-I g に対する親和性の減少は、この自発的置換に大きく寄与していた。H R G- β 1 2 2 8-2 3 1 (H R G- β 1 E G F 5 2-5 5) は、H R G- β 1 分子の表面でのランダム化領域に近接しているようなので、該データはH R G- β 1 の少なくとも二つの別々の領域が、主にH i s 1 7 8, L e u 1 7 9 およびA r g 2 0 7 (H i s 2, L e u 3 およびA r g 3 1) の各残基およびH R G- β 1 2 2 8-2 3 1 (H R G- β 1 E G F 5 2-5 5) でのE r b Bレセプター結合について重要であることを示唆する。

E r b B-4-I g 結合に対する増大した特異性を示す3つの変異体のうち2つは、カウンター選択ライブラリーから単離された12のクローンのうち8を説明した。他の変異体は、カウンター選択なしで選択されたライブラリーから単離された12のクローンのうち2つだけを説明した。それ故、E r b B-3-I g に対するカウンター選択は、野生型H R G- β 1 のものよりも、E r b B-3-I g に対して、E r b B-4-I g についてのより大きな特異性を示す変異体の有意な豊富化を生じた。

配列表

(1) 一般情報:

(i) 出願人:Ballinger,Marcus D.

Jones,Jennifer T.

Fairbrother,Wayne J.

Sliwowski,Mark X.

Wells,James A.

Genentech,Inc.

(ii) 発明の名称:ヒレグリン変異体

(iii) 配列数:92

(iv) 連絡先:

(A) 住所:Skjerven,Morrill,MacPherson,ら.

(B) 通り:25 Metro Drive,Suite 700

(C) 街:San Jose

(D) 州:California

(E) 国:USA

(F) 郵便番号:95110

(v) コンピュータ読み取り形態:

(A) メディアタイプ:フロッピーディスク

(B) コンピューター:IBM PC互換機

(C) オペレーティングシステム:PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア:PatentIn Release #1.0,Version #1.30

(vi) 現出願のデータ:

(A) 出願番号:係属中

(B) 出願日:1998年2月10日

(vi) 現出願のデータ:

(A) 出願番号:08/799,054

(B) 出願日:1997年2月10日

(C) 分類:

(viii) 弁理士/代理人情報:

- 10

1 5 10 15 20

20 25 30

35 40 45

50 55 60

65 70

- 40

50

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn

35 40 45

10

Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln

50 55 60

Lys Arg

20

65

(2) 配列番号 3 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:63アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

30

(vi) 起源:

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 3:

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

40

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg

50 55 60

50

(2) 配列番号 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:65アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Homo sapiens

10

(xi) 配列の記載:配列番号 4:

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1

5

10

15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20

25

30

20

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35

40

45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro

50

55

60

Glu

30

65

(2) 配列番号 5 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:66アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Rattus rattus

40

(xi) 配列の記載:配列番号 5:

Ser His Leu Ile Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Thr Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn

35 40 45

Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln

50 55 60

Lys Arg

65

(2) 配列番号 6 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:71アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Rattus rattus

(xi) 配列の記載:配列番号 6 :

10

20

30

Ser His Leu Ile Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Thr Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Ala

50 55 60

Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg

65 70

(2) 配列番号 7 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:63アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Rattus rattus

(xi) 配列の記載:配列番号 7:

Ser His Leu Ile Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Thr Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg

50 55 60

10

20

30

40

50

(2) 配列番号 8 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:64アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Rattus rattus

10

(xi) 配列の記載:配列番号 8:

Ser His Leu Ile Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Thr Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

20

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn

35 40 45

Val Pro Met Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu

50 55 60

(2) 配列番号 9 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:81アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Rattus rattus

(xi) 配列の記載:配列番号 9:

30

40

Ser His Leu Ile Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Thr Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn

35 40 45

Val Pro Met Phe Tyr Ser Met Thr Ser Arg Arg Lys Arg Gln Glu Thr

50 55 60

Glu Lys Pro Leu Glu Arg Lys Leu Phe His Ser Leu Val Lys Glu Ser

65 70 75 80

Lys

(2) 配列番号 10 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:65アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 10:

10

20

30

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro

50 55 60

Glu

65

(2) 配列番号 1 1 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:65アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 1 1 :

10

20

30

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro

50 55 60

Glu

65

(2) 配列番号 1 2 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:65アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 1 2 :

10

20

30

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro

50 55 60

Glu

65

(2) 配列番号 1 3 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:71アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:タンパク質

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Gallus domesticus

(xi) 配列の記載:配列番号 1 3 :

10

20

30

Ser His Leu Thr Lys Cys Asp Ile Lys Gln Lys Ala Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Tyr Met Val Lys Asp Leu Pro Asn Pro Pro Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Ala

50 55 60

Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg

65 70

(2) 配列番号 1 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 49 アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(C) 鎖の状態: 関係なし

(D) トポロジー: 関係なし

(ii) 分子のタイプ: ペプチド

(iii) 仮定: なし

(vi) 起源:

(A) 生物: 関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載: 配列番号 1 4:

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys

20 25 30

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala

35 40 45

Ser

(2) 配列番号 1 5 の情報:

10

20

30

40

50

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:48アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 1 5 :

10

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His

1 5 10 15

Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn

20 25 30

20

Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Arg

35 40 45

(2) 配列番号 1 6 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 1 6 :

30

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys

20 25 30

40

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Ile Ala

35 40 45

Ser

50

(2) 配列番号 17 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:52アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

10

(xi) 配列の記載:配列番号 17:

Trp Glu Leu Val Pro Cys Gly Trp Asp Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

20

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Ile Ala Ser

50

(2) 配列番号 18 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 18:

30

40

Trp Glu Leu Val Pro Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1

5

10

15

Gly Gly Glu Cys Tyr Lys Val Arg Ile Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

20

25

30

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Ile Ala

35

40

45

10

Ser

(2) 配列番号 19 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 19:

Trp Glu Leu Val Pro Cys Gly Trp Asp Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1

5

10

15

20

30

Gly Gly Glu Cys Tyr Lys Val Arg Ile Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

20

25

30

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Ile Ala

35

40

45

40

Ser

(2) 配列番号 20 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

50

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 2 0:

Trp Glu Leu Val Pro Cys Gly Trp Asp Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Tyr Lys Val Arg Ile Tyr Arg Tyr Arg Met Cys Lys

20 25 30

10

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Ile Ala

35 40 45

Ser

(2) 配列番号 2 1 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

20

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 2 1:

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

30

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

20 25 30

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Ile Ala

35 40 45

40

Ser

(2) 配列番号 2 2 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:52アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

50

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 2 2 :

Ser His Leu Val Lys Cys Gly Glu Glu Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Tyr Arg Val Lys Thr Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr 10

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Met Ala Ser

20

50

(2) 配列番号 2 3 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

30

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 2 3 :

Ser His Leu Val Lys Cys Gly Glu Glu Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

20 25 30

40

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala

35 40 45

Ser

(2) 配列番号 2 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

50

- Ser His Leu Val Lys Cys Gly Glu Glu Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

10

20 25 30

35 40 45

20

(xi) 配列の記載:配列番号 25:

30

Ser His Leu Val Lys Cys Gly Glu Glu Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

10

Val Ile Ala Ser

50

(2) 配列番号 26 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 26:

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

20

30

Gly Gly Glu Cys Tyr Arg Val Lys Thr Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

20 25 30

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala

35 40 45

40

Ser

(2) 配列番号 27 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

50

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし(組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 27:

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Tyr Arg Val Lys Thr Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

10

20 25 30

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Ile Ala

35 40 45

Ser

(2) 配列番号 28 の情報:

20

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:52アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし(組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 28:

30

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Tyr Arg Val Lys Thr Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

40

35 40 45

Val Ile Ala Ser

50

(2) 配列番号 29 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:52アミノ酸

50

- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 関係なし:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 29:

Ser His Leu Val Lys Cys Gly Glu Glu Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

10

Gly Gly Glu Cys Tyr Arg Val Lys Thr Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

20

Val Ile Ala Ser

50

(2) 配列番号 30 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 30:

30

Ser His Leu Val Lys Cys Gly Glu Glu Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

20 25 30

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Ile Ala

35 40 45

10

Ser

(2) 配列番号 3 1 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 3 1:

Ser His Leu Val Lys Cys Gly Glu Glu Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

20

30

Gly Gly Glu Cys Tyr Arg Val Lys Thr Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

20 25 30

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Ile Ala

35 40 45

40

Ser

(2) 配列番号 3 2 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

50

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 3 2:

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Tyr Arg Val Lys Thr Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

20 25 30

10

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln His Tyr Val Ile Ala

35 40 45

Ser

(2) 配列番号 3 3 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:49アミノ酸

20

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 3 3:

Ser His Leu Val Lys Cys Gly Glu Glu Arg Glu Gly Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

30

Gly Gly Glu Cys Tyr Arg Val Lys Thr Tyr Gly Tyr Leu Met Cys Lys

20 25 30

Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln His Tyr Val Ile Ala

35 40 45

40

Ser

(2) 配列番号 3 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:4アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

50

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 3 4 :

Gly Gly Gly Ser

1

(2) 配列番号 3 5 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:7アミノ酸

10

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 3 5 :

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

20

1

5

(2) 配列番号 3 6 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

30

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 3 6 :

Thr Arg Asp Lys Thr

1

5

(2) 配列番号 3 7 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

40

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 3 7 :

Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

(2) 配列番号 3 8 の情報:

50

- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:Homo sapiens
- (xi) 配列の記載:配列番号 38:

10

Ser His Leu Val Lys**1****5**

- (2) 配列番号 39 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 39:

20

Trp Arg Leu Val Pro**1****5**

- (2) 配列番号 40 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 40:

30

Trp Ser Leu Gln Pro**1****5**

- (2) 配列番号 41 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:

40

50

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 4 1:

Trp Glu Leu Val Pro

1

5

(2) 配列番号 4 2 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 4 2:

Trp Ser Leu Val Lys

1

5

(2) 配列番号 4 3 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 4 3:

Trp Ser Leu Ile Pro

1

5

(2) 配列番号 4 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 4 4:

Trp Arg Leu Val Ala

1

5

(2) 配列番号 4 5 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

10

20

30

40

50

- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 4 5 :

Trp Ala Leu Val Pro

1

5

10

- (2) 配列番号 4 6 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 4 6 :

20

Trp Ser Leu Gln Lys

1

5

- (2) 配列番号 4 7 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 4 7 :

30

Trp Glu Leu Val Ala

1

5

- (2) 配列番号 4 8 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 4 8 :

40

50

Trp Ser Leu Glu Pro**1****5**

(2) 配列番号 49 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

10

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 49:

Ala Glu Lys Glu Lys Thr**1****5**

(2) 配列番号 50 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

20

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 50:

Gly Val Gly Arg Asp Gly**1****5**

(2) 配列番号 51 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 51:

30

40

Gly Gly Glu Arg Glu Gly**1****5**

(2) 配列番号 52 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) TYPE:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

50

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 5 2 :

Gly Glu Glu Arg Glu Gly

1

5

(2) 配列番号 5 3 の情報:

10

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 5 3 :

20

Gly Trp Asp Arg Glu Gly

1

5

(2) 配列番号 5 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

30

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 5 4 :

Gly Val Gln Arg Glu Gly

1

5

(2) 配列番号 5 5 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

40

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 5 5 :

Gly Glu Glu Arg Ala Gly**1****5**

(2) 配列番号 5 6 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

10

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 5 6 :

Gly Lys Glu Arg Glu Gly**1****5**

(2) 配列番号 5 7 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

20

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 5 7 :

Thr Asn Ser Arg Glu Gly**1****5**

(2) 配列番号 5 8 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

40

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 5 8 :

Asp Lys Ser Arg Glu Gly**1****5**

(2) 配列番号 5 9 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

50

- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 59:

Gly Glu Asp Arg Lys Gln

1 5

- (2) 配列番号 60 の情報: 10
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:6アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 60: 20

Gly Arg Glu Arg Glu Gly

1 5

- (2) 配列番号 61 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド 30
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:Homo sapiens
- (xi) 配列の記載:配列番号 61:

Val Asn Gly Gly Glu

1 5

- (2) 配列番号 62 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸 40
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 62:

Val Asn Gly Gly Glu**1****5**

(2) 配列番号 6 3 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

10

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 6 3 :

Val Asn Gly Gly Val**1****5**

(2) 配列番号 6 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

20

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 6 4 :

Val Asn Gly Gly Gln**1****5**

(2) 配列番号 6 5 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

40

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 6 5 :

Phe Met Val Lys Asp**1****5**

(2) 配列番号 6 6 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

50

- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 6 6:

Tyr Lys Val Arg Ile

1

5

- (2) 配列番号 6 7 の情報: 10
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 6 7: 20

Phe Arg Val Lys Thr

1

5

- (2) 配列番号 6 8 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド 30
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 6 8:

Tyr Arg Val Lys Thr

1

5

- (2) 配列番号 6 9 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸 40
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 6 9:

Tyr Met Ile Lys Tyr**1****5**

(2) 配列番号 70 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

10

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 70:

Tyr Met Val Lys Thr**1****5**

(2) 配列番号 71 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

20

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 71:

Met Arg Val Arg Thr**1****5**

(2) 配列番号 72 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

40

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 72:

Pro Ser Arg Tyr Leu**1****5**

(2) 配列番号 73 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

50

- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 7 3 :

Thr Pro Tyr Leu Met

1 5

- (2) 配列番号 7 4 の情報: 10
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 7 4 : 20

Tyr Gly Tyr Leu Met

1 5

- (2) 配列番号 7 5 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド 30
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 7 5 :

Tyr Arg Tyr Arg Met

1 5

- (2) 配列番号 7 6 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:5アミノ酸 40
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 7 6 :

Thr His Tyr Arg Gly**1****5**

(2) 配列番号 77 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 77:

10

Thr His Tyr Arg Met**1****5**

(2) 配列番号 78 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 78:

20

Tyr Lys Tyr Arg Met**1****5**

(2) 配列番号 79 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 79:

30

Thr Lys Tyr Arg Gly**1****5**

(2) 配列番号 80 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

50

- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 8 0:

Tyr Lys Tyr Arg Leu

1

5

- (2) 配列番号 8 1 の情報: 10
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:6アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:Homo sapiens
- (xi) 配列の記載:配列番号 8 1: 20

Lys Cys Pro Asn Glu Phe

1

5

- (2) 配列番号 8 2 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:6アミノ酸
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド 30
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 8 2:

Arg Cys Ser Leu Glu Phe

1

5

- (2) 配列番号 8 3 の情報:
- (i) 配列の特徴:
- (A) 長さ:6アミノ酸 40
- (B) タイプ:アミノ酸
- (C) 鎖の状態:関係なし
- (D) トポロジー:関係なし
- (ii) 分子のタイプ:ペプチド
- (iii) 仮定:なし
- (vi) 起源:
- (A) 生物:関係なし (組換え体)
- (xi) 配列の記載:配列番号 8 3:

Arg Cys Ser Glu Glu Phe**1****5**

(2) 配列番号 8 4 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

10

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 8 4 :

Lys Cys Pro Lys Glu Met**1****5**

(2) 配列番号 8 5 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

20

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 8 5 :

Arg Cys Thr Val Glu Tyr

30

1**5**

(2) 配列番号 8 6 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

40

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 8 6 :

Arg Cys Thr Val Glu Tyr**1****5**

(2) 配列番号 8 7 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

50

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 8 7:

Lys Cys Asn Ser Glu Phe

1

5

(2) 配列番号 8 8 の情報:

10

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:6アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 8 8:

20

Arg Cys Lys Lys Glu Phe

1

5

(2) 配列番号 8 9 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

30

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 8 9:

Gln Asn Tyr Val Met

1

5

(2) 配列番号 9 0 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

40

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 9 0:

Gln Trp Tyr Val Ile

1

5

(2) 配列番号 9 1 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:5アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

10

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:関係なし (組換え体)

(xi) 配列の記載:配列番号 9 1 :

Gln His Tyr Val Ile

1

5

(2) 配列番号 9 2 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ:52アミノ酸

20

(B) タイプ:アミノ酸

(C) 鎖の状態:関係なし

(D) トポロジー:関係なし

(ii) 分子のタイプ:ペプチド

(iii) 仮定:なし

(vi) 起源:

(A) 生物:Homo sapiens

(xi) 配列の記載:配列番号 9 2 :

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1

5

10

15

30

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20

25

30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35

40

45

40

Val Met Ala Ser

50

【図 1】

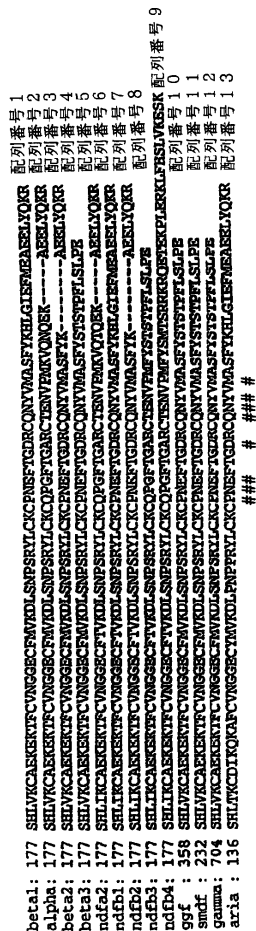


FIG. 1

【図 2】

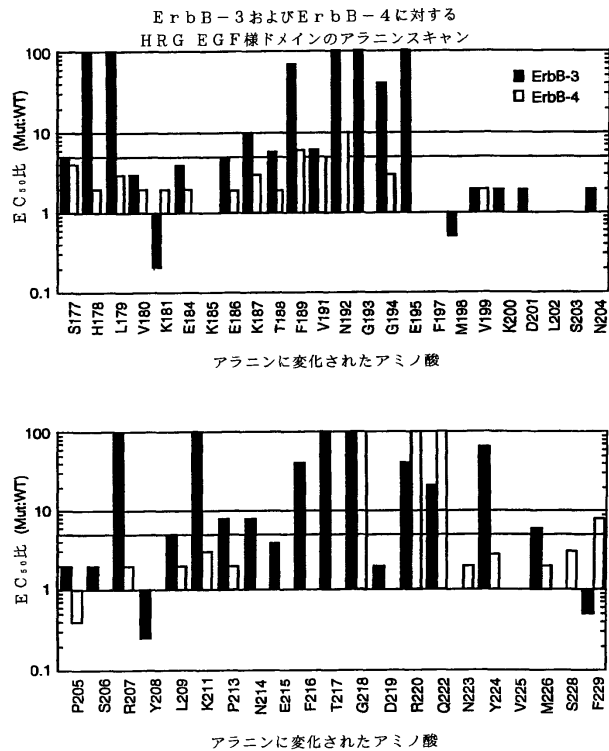


FIG. 2

【図 3】

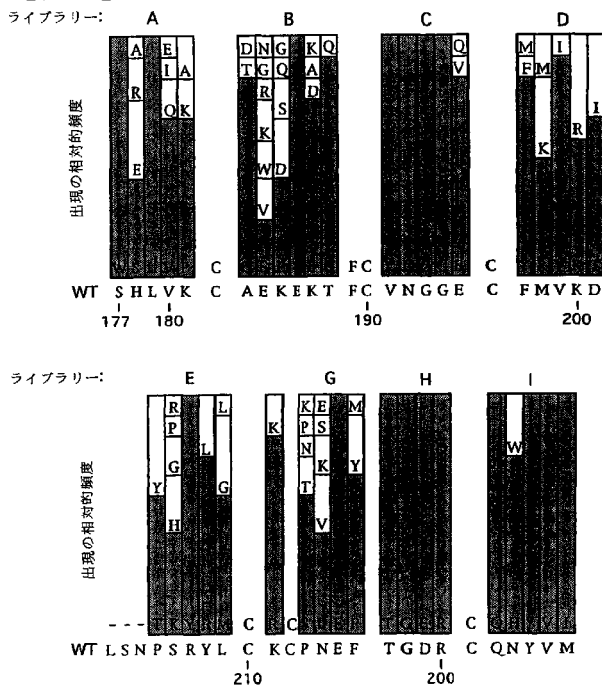


FIG. 3

【図 4】

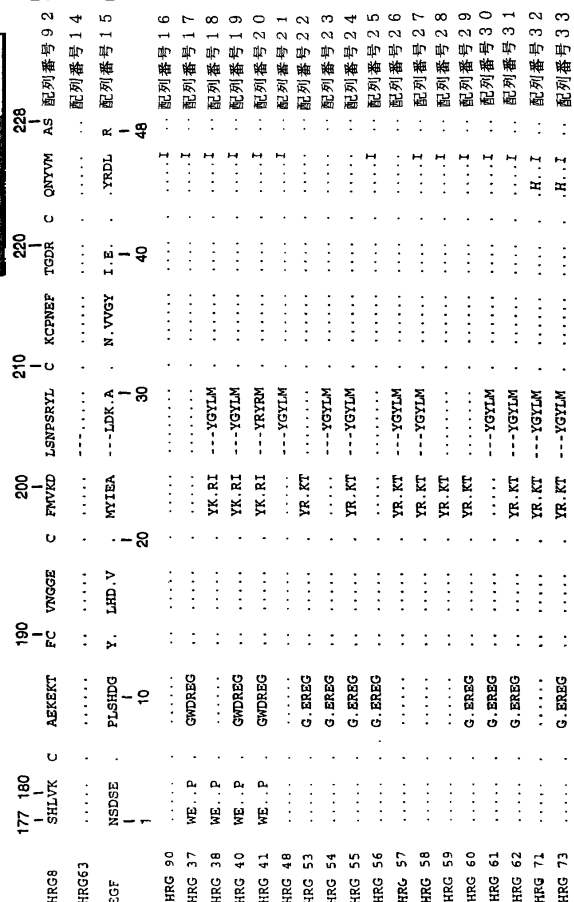


FIG. 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)

C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	43/00	1 1 1

- (72)発明者 バリンガー, マーカス ディ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 バーリンゲイム チューラ ヴィスタ アヴェニ
 ュ 9 1 8 アパートメント 3
- (72)発明者 ジョーンズ, ジェニファー ティ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 7 8 サン レイアーンドロ ウェイク アヴェニュー
 1 4 8 5 7
- (72)発明者 フェアブラザー, ウェイン ジェイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 バーリンゲイム トイオン ドライヴ 1 0 0 8
- (72)発明者 スリウコウスキ, マーク エックス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0 サン カルロス オーク クリーク レーン 4
 2
- (72)発明者 ウェルズ, ジェームズ エー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 バーリンゲイム コロンブス アヴェニュー 1 3
 4 2

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 特表平06-508031 (JP, A)
 Biochemistry (1991) vol.30, no.45, p.10832-10838
 J. Biol. Chem. (1995) vol.270, no.38, p.22337-22343
 Science (1990) vol.247, no.4949, p.1461-1465

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00 - 15/90
 C07K 14/475
 PubMed
 BIOSIS/WPI(DIALOG)