(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-508607
(P2005-508607A)
(43)公表日　平成17年4月7日(2005.4.7)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 38/00	A61K	48/00		4B065
A61K 48/00	A61P	9/00		4C084
A61P 9/00	A61P	17/02		4H045
A61P 17/02	C07K	14/47		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 76 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-574369 (P2002-574369)
(86)(22)出願日　平成14年3月20日 (2002.3.20)
(85)翻訳文提出日　平成15年9月19日 (2003.9.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/008946
(87)国際公開番号　WO2002/074980
(87)国際公開日　平成14年9月26日 (2002.9.26)
(31)優先権主張番号　60/277,425
(32)優先日　平成13年3月20日 (2001.3.20)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/277,431
(32)優先日　平成13年3月20日 (2001.3.20)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/277,440
(32)優先日　平成13年3月20日 (2001.3.20)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500204740
ダナ－ファーバー　キャンサー　インスチチュート　インコーポレーテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１１５，ボストン，ビニー・ストリート　４４
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】低酸素誘導性因子αのムテインおよびその使用方法

(57)【要約】
本発明は、低酸素誘導性因子αムテインと、これらの低酸素誘導性因子αムテインをコードするＤＮＡ配列と、発現制御配列に作動可能に連結したそれらのＤＮＡ配列を含み、かつ低酸素誘導性因子αムテインの発現を誘導可能な組換えＤＮＡ分子と、それらの組換えＤＮＡ分子で形質転換された宿主と、ＨＩＦムテインを含む薬学的組成物を提供する。本発明はまた、それらの組成物を、低酸素関連組織損傷および虚血関連組織損傷を処置するために使用する方法を、提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
低酸素誘導性因子（ＨＩＦ）ムテインポリペプチドであって、野生型ＨＩＦαポリペプチドにおけるヒドロキシル化可能な１つ以上のアミノ酸残基が変異しており、該ＨＩＦムテインは、ＶＨＬへの減少した結合と、酸素存在下での分解に対する増加した耐性とを提示し、そして両方が機能的な野生型ＨＩＦαポリペプチドトランス活性化ドメインを含む、ＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項２】
請求項１に記載のＨＩＦムテインポリペプチドであって、前記ヒドロキシル化可能なアミノ酸残基がプロリンである、ＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項３】
請求項２に記載のＨＩＦムテインポリペプチドであって、前記プロリンが、野生型ＨＩＦαに従って番号付けされた野生型ＨＩＦαの５６４位にある、ＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項４】
低酸素誘導性因子（ＨＩＦ）ムテインポリペプチドであって、野生型ＨＩＦαに従って番号付けされた野生型ＨＩＦαの５６４位にあるアミノ酸がプロリンではなく、該ＨＩＦムテインは、ＶＨＬへの減少した結合と、酸素存在下での分解に対する増加した耐性とを提示する、ＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項５】
野生型低酸素誘導性因子（ＨＩＦ）αと少なくとも８５％類似するアミノ酸配列を含む低酸素誘導性因子（ＨＩＦ）ムテインポリペプチドであって、野生型ＨＩＦαに従って番号付けされた野生型ＨＩＦαの５６４位にあるアミノ酸がプロリンではなく、該ＨＩＦムテインは、ＶＨＬへの減少した結合と、酸素存在下での分解に対する増加した耐性とを提示する、ＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項６】
低酸素誘導性因子（ＨＩＦ）ムテインポリペプチドであって、野生型ＨＩＦαに従って番号付けされた野生型ＨＩＦαの５６２位にあるアミノ酸がロイシンではなく、該ＨＩＦムテインは、ＶＨＬへの減少した結合と、酸素存在下での分解に対する増加した耐性とを提示する、ＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項７】
野生型低酸素誘導性因子（ＨＩＦ）αと少なくとも８５％類似するアミノ酸配列を含む低酸素誘導性因子（ＨＩＦ）ムテインポリペプチドであって、野生型ＨＩＦαに従って番号付けされた野生型ＨＩＦαの５６２位にあるアミノ酸がロイシンではなく、該ＨＩＦムテインは、ＶＨＬへの減少した結合と、酸素存在下での分解に対する増加した耐性とを提示する、ＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項８】
４０２位のアミノ酸がプロリンではないようなさらなる置換を有する、請求項４、５、６、または７に記載のＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項９】
５６４位のアミノ酸がアラニンである、請求項４または５に記載のＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項１０】
５６２位のアミノ酸がアラニンである、請求項６または７に記載のＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項１１】
配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列を含む、ＨＩＦムテインポリペプチド。
【請求項１２】
請求項１～１０または１１に記載のポリペプチドをコードする、核酸。
【請求項１３】

配列番号１または配列番号３のヌクレオチド配列を含む、核酸。
【請求項１４】
プロモーターに作動可能に連結された請求項１２または１３に記載の核酸を含む、発現ベクター。
【請求項１５】
請求項１４に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。
【請求項１６】
請求項１～１１のいずれか１項に記載のＨＩＦαムテインと、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、薬学的組成物。
【請求項１７】
請求項１２または１３に記載の核酸と、薬学的に受容可能なキャリアとを含む、薬学的組成物。
【請求項１８】
請求項１～１１のいずれか１項に記載のＨＩＦαムテインと特異的に結合する、抗体。
【請求項１９】
細胞中の少なくとも１つの遺伝子の発現を増加するための方法であって、該遺伝子の発現は、ＨＩＦポリペプチドにより活性化され、該方法は、該細胞を、請求項１４に記載の発現ベクターと接触させる工程を包含する、方法。
【請求項２０】
請求項１６に記載の方法であって、前記細胞が、インビボ、インビトロ、またはエキソビボで提供される、方法。
【請求項２１】
低酸素症関連組織損傷または虚血関連組織損傷を有するかまたはそのような損傷を有する危険がある被験体において、そのような損傷を減少、予防、または処置する方法であって、該方法は、該被験体に、治療上有効な量の
（ａ）請求項１２または１３に記載の核酸配列、あるいは
（ｂ）請求項１～１０または１１に記載のポリペプチド
を投与し、それにより該組織損傷を減少する工程、
を包含する、方法。
【請求項２２】
被験体における新脈管形成または血管新生を増加する方法であって、該方法は、該被験体に、治療上有効な量の
（ａ）請求項１２または１３に記載の核酸配列、あるいは
（ｂ）請求項１～１０または１１に記載のポリペプチド
を投与し、それにより新脈管形成または血管新生を増加する工程、
を包含する、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、米国政府の支援を伴ってなされた。この米国政府は、本発明において特定の権利を有する。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は、低酸素誘導性因子ムテインをコードするポリペプチドおよび核酸に関する。
【背景技術】
【０００３】
（発明の背景）
哺乳動物は、必須の代謝プロセス（O_2がＡＴＰ形成の間に電子授与体として作用する、酸化的リン酸化を含む）のために分子酸素（O_2）を必要とする。低酸素（O_2の需要が供給を上回る状体）により惹起される全身ホメオスタシス応答、局所的ホメオスタシス

応答および細胞内ホメオスタシス応答は、貧血であるかまたは高地にいる個体による赤血球形成（Ｊｅｌｋｍａｎｎ，Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．７２：４４９－４８９，１９９２）、虚血性心筋層における新生血管形成（Ｗｈｉｔｅら、Ｃｉｒｃ．Ｒｅｓ．７１：１４９０－１５００，１９９２）および減少したO_2圧にて培養された細胞における解糖（Ｗｏｌｆｅら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１３５：４０５－４１２，１９８３）を包含する。これらの適合性応答は、O_2輸送を増加するか、またはO_2を必要としない代替的代謝経路を活性化するかのいずれかである。これらの応答に関与する低酸素誘導性遺伝子産物としては、エリスロポエチン（ＥＰＯ）（Ｓｅｍｅｎｚａ，Ｈｅｍａｔｏｌ．Ｏｎｃｏｌ．Ｃｌｉｎｉｃｓ Ｎ．Ａｍｅｒ．８：８６３－８８４，１９９４に概説される）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）（Ｓｋｗｅｉｋｉら、Ｎａｔｕｒｅ ３５９：８４３－８４５，１９９２；Ｂａｎａｉら、Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．２８：１１７６－１１７９，１９９４；ＧｏｌｄｂｅｒｇおよびＳｃｈｎｅｉｄｅｒ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：４３５５－４３５９，１９９４）および解糖酵素（Ｆｉｒｔｈら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：６４９６－６５００，１９９４；Ｓｅｍｅｎｚａら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２３７５７－２３７６３，１９９４）が、挙げられる。

【０００４】

低酸素に対する遺伝的応答を媒介する分子機構が、ＥＰＯ遺伝子について広範に調査されている。ＥＰＯ遺伝子は、赤血球生成を調節し従って血液のO_2保有能力を調節する、増殖因子をコードする（Ｊｅｌｋｍａｎｎ，１９９２（上記）；Ｓｅｍｅｎｚａ，１９９４（上記））。低酸素に応答する転写活性化のために必要なシス作用性ＤＮＡ配列が、ＥＰＯの３’隣接領域において同定され、そしてそのエンハンサーである低酸素誘導性因子１（ＨＩＦ－１）に結合するトランス作用性因子が、ＥＰＯ転写の生理学的調節因子に関する基準を満たした。詳細には、ＥＰＯ発現の誘導物質（１％O_2、塩化コバルト［$CoCl_2$］、およびデスフェリオキサミン［ＤＦＸ］）はまた、同様の速度論でＨＩＦ－１ＤＮＡ結合活性を誘導した。さらに、ＥＰＯ発現のインヒビター（アクチノマイシンＤ、シクロヘキシミド、および２－アミノプリン）、は、ＨＩＦ－１活性の誘導をブロックした。さらに、ＨＩＦ－１結合を消滅させるＥＰＯの３’隣接領域での変異はまた、エンハンサー機能も消滅した（Ｓｅｍｅｎｚａ、１９９４（上記））。これらの結果は、ＨＩＦ－１ ＤＮＡ結合活性の誘導における進行中の転写、翻訳、およびタンパク質リン酸化と、低酸素細胞におけるＥＰＯ転写とを必要とする、シグナル伝達経路を支持する（Ｓｅｍｅｎｚａ、１９９４（上記））。

【０００５】

ＥＰＯ発現は、細胞型特異的であるが、１％O_2か、$CoCl_2$か、またはＤＦＸかによるＨＩＦ－１活性の誘導が、多くの哺乳動物細胞株において検出された（ＷａｎｇおよびＳｅｍｅｎｚａ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：４３０４－４３０８，１９９３）。このＥＰＯエンハンサーは、非ＥＰＯ産生細胞中にトランスフェクトされたレポーター遺伝子の低酸素誘導性転写を指示した（ＷａｎｇおよびＳｅｍｅｎｚａ、１９９３（上記）；Ｍａｘｗｅｌｌら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：２４２３－２４２７，１９９３）。いくつかの解糖酵素をコードするＲＮＡが、ＥＰＯ産生Ｈｅｐ３Ｂ細胞またはＥＰＯ非産生ＨｅＬａ細胞において１％O_2か、$CoCl_2$か、またはＤＦＸかによって誘導された一方で、シクロヘキシミドが、それらの誘導を阻止し、そしてＨＩＦ－１結合部位を含む解糖遺伝子配列が、トランスフェクションアッセイにおける低酸素誘導性転写を媒介した（Ｆｉｒｔｈら、１９９４（上記）；Ｓｅｍｅｎｚａら、１９９４（上記））。これらの実験は、低酸素に対するホメオスタシス応答を活性化する際のＨＩＦ－１の役割を支持する。

【０００６】

低酸素誘導性因子１（ＨＩＦ－１）は、生理学的に適切なレベルの低酸素に応答して特異に発現される哺乳動物転写因子である（Ｗａｎｇ，Ｇ．Ｌ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２：５５１０－５５１４，１９９５；Ｗａｎｇ，Ｇ．Ｌ．

およびＳｅｍｅｎｚａ，Ｇ．Ｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：１２３０－１２３７，１９９５；米国特許第５，８８２，９１４号）。ＨＩＦ－１は、低酸素により誘導される遺伝子のシス作用性低酸素応答性エレメントに結合する、塩基性ヘリックスループ－ヘリックスタンパク質である（Ｗａｎｇ，Ｇ．Ｌ．およびＳｅｍｅｎｚａ，Ｇ．Ｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｈｅｍａｔｏｌ．３：１５６－１６２，１９９２；Ｊｉａｎｇ，Ｂ．Ｈ．ら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：１９２５３－１９２６０，１９９７）。低酸素に供された細胞においてＨＩＦ－１により活性化される遺伝子としては、ＥＰＯ、血管内皮成長ホルモン（ＶＥＧＦ）、ヘムオキシゲナーゼ－１、誘導性一酸化窒素シンターゼ、および解糖酵素アルドラーゼＡ、エノラーゼ１、乳酸デヒドロゲナーゼＡ，ホスホフルクトキナーゼＩ、およびホスホグリセレートキナーゼＩが挙げられる（Ｓｅｍｅｎｚａ，Ｇ．Ｌ．ら、Ｋｉｄ．Ｉｎｔ．５１：５５３－５５５，１９９７）。ＨＩＦ－１ ＤＮＡ結合活性およびＨＩＦ－１タンパク質濃度は、細胞が漸減するO_2濃度に供されると、指数関数的に増加する（Ｊｉａｎｇ，Ｂ．Ｈ．ら、Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．２７１：Ｃ１１７２－Ｃ１１８０，１９９６）。

【０００７】

ＨＩＦ－１はまた、低酸素細胞におけるＶＥＧＦ遺伝子の転写を活性化する（Ｆｏｒｓｙｔｈｅら、１９９６；Ｉｙｅｒら、１９９８）。サイトメガロウイルスプロモーター由来のＨＩＦαと、ＶＥＧＦ遺伝子由来の低酸素応答エレメントを含むレポータープラスミドとの発現を可能にする条件下で、ｐＣＥＰ４／ＨＩＦ－１αプラスミドで培養細胞がトランスフェクトされた場合、レポーター遺伝子の発現は、非低酸素条件下で細胞において増加され、そしてインタクトなＨＩＦ－１結合部位の存在に依存する、低酸素条件下での劇的なさらなる誘発が存在する（Ｆｏｒｓｙｔｈｅら、１９９６）。ＨＩＦ－１α発現を欠くノックアウトマウス由来の胚性幹細胞において、低酸素に応答したＶＥＧＦ ｍＲＮＡの発現が存在しない（Ｉｙｅｒら、１９９８）。

【０００８】

ＨＩＦ－１は、２つのサブユニット（ＨＩＦ－１αおよびＨＩＦ－１β）のヘテロダイマーである。このＨＩＦ－１αサブユニットは、ＨＩＦ－１に特異的であり、一方ＨＩＦ－１β（アリール炭化水素レセプター核トランスロケーター（ＡＲＮＴ）としても公知）は、他のタンパク質とダイマー化し得る。ＨＩＦ－１αサブユニットは、低酸素条件下で安定化され、そして新脈管形成およびグルコース代謝に関与する遺伝子を調節することにおいて重要である。

【０００９】

ＨＩＦ－１αの構造分析によって、ダイマー化には、ＨＬＨおよびＰＡＳと呼ばれる２つのドメインが必要であることが、明らかとなった。ＤＮＡ結合は、塩基性ドメインにより媒介される（Ｓｅｍｅｎｚａ，Ｇ．Ｌ．ら、Ｋｉｄ．Ｉｎｔ．５１：５５３－５５５，１９９７）。２つのトランス活性化ドメインが、ＨＩＦ－１α中に含まれ、アミノ酸５３１と８２６との間に位置する。最小のトランス活性化ドメインは、アミノ酸残基５３１～５７５および７８６～８２６に存在する（Ｊｉａｎｇ，Ｂ．Ｈ．ら、１９９７（上記）；Ｓｅｍｅｎｚａ，Ｇ．Ｌ．ら、１９９７（上記））。アミノ酸１～３９０は、ＨＩＦ１β（ＡＲＮＴ）との最適なヘテロダイマー化およびＤＮＡ結合のために必要である。さらに、ＨＩＦ－１αのカルボキシ末端（アミノ酸３９１－８２６）の欠失は、ＨＩＦ－１が転写を活性化する能力を減少させた。しかし、ＨＩＦ－１α（１～３９０）は、低酸素細胞および非低酸素細胞の両方において高レベルで発現され、対照的に、全長ＨＩＦ－１α（１～８２６）は、非低酸素細胞と比較して低酸素細胞においてかなり高レベルで発現された（Ｊｉａｎｇ，Ｂ．Ｈ．ら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：１７７７１－１７７７８，１９９６）。従って、低酸素は、ＨＩＦ－１α活性に対する以下の２つの独立した効果を有する：（１）低酸素は、ＨＩＦ－１αタンパク質を安定化すること（すなわち、ＨＩＦ－１αタンパク質の分解を減少すること）によって、ＨＩＦ－１αタンパク質の定常状態レベルを増加する；および（２）低酸素は、そのタンパク質の特異的転写活性（すなわち、そのタンパク質の濃度とは独立している）を増加する。

【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【００１０】
（発明の要旨）
本発明は、低酸素誘導性因子（ＨＩＦ）ムテインポリペプチドを提供する。１つの局面において、ＨＩＦムテインポリペプチドは、野生型ＨＩＦαポリペプチドにおけるヒドロキシル化可能な１つ以上のアミノ酸残基が変異しているポリペプチドを包含する。これらの変異は、ＶＨＬへの減少した結合と、酸素存在下での分解に対する増加した耐性とを提示し、そして両方が機能的な野生型ＨＩＦαポリペプチドトランス活性化ドメインを含む。
【００１１】
さらなる局面において、本発明は、野生型ＨＩＦαポリペプチド、および野生型ＨＩＦαと８５％類似するポリペプチドが１つ以上のアミノ酸変異を有する、低酸素誘導性因子（ＨＩＦ）ムテインポリペプチドを提供する。これらのムテインは、フォン・ヒッペル－リンダウ（ＶＨＬ）ポリペプチドへの減少した結合と、酸素存在下での分解に対する増加した耐性を有する、ＨＩＦムテインを生じる。これらの変異としては、例えば、野生型ＨＩＦαに従って番号付けされたアミノ酸５６４位での変異が挙げられ、そのアミノ酸はプロリンではない。あるいは、５６２位にあるそのアミノ酸は、ロイシンではない。別の局面において、ＨＩＦムテインポリペプチドにおける４０２位のアミノ酸は、プロリンではない。好ましくは、５６４位、５６２位、または４０２位にあるアミノ酸は、アラニンである。
【００１２】
１つの局面において、そのＨＩＦムテインは、配列番号２または配列番号４の配列を含む。
【００１３】
本発明はまた、ＨＩＦムテインをコードする核酸（例えば、配列番号１）と、発現制御配列に作動可能に連結したそれらの配列を含み、かつ適切な宿主においてそのＨＩＦムテインの発現を誘導可能な組換えＤＮＡ分子と、それらの組換えＤＮＡ分子で形質転換された宿主と、ＨＩＦムテイン抗体と、そのＨＩＦムテインを含む薬学的組成物とを、提供する。これらの組成物は、低酸素関連組織損傷および虚血関連組織損傷を処置または予防する際、ならびに新脈管形成または血管新生を調節する際に、有用である。
【００１４】
さらなる局面において、本発明は、細胞中の少なくとも１つの遺伝子の発現を増加するための方法を提供し、その遺伝子の発現は、ＨＩＦポリペプチドにより活性化され、この方法は、その細胞を、ＨＩＦムテイン核酸（例えば、ＨＩＦ核酸を含む発現ベクター）と接触させる工程による。この細胞は、インビボでも、インビトロでも、またはエキソビボでも接触され得る。
【００１５】
他のように定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似するかまたは等価である方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料が、以下に記載される。本明細書中で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それらの全体が参考として援用される。矛盾する場合、本明細書（定義を含む）が支配する。さらに、その材料、方法、および実施例は、例示的であるに過ぎず、限定的であることは意図されない。
【００１６】
本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。
【００１７】

（発明の詳細な説明）
本発明は、安定な低酸素症誘導性因子α（ＨＩＦα）タンパク質、またはムテインおよび核酸を提供する。本発明の核酸配列およびポリペプチド配列は、本明細書中で、ｓＨＩＦタンパク質もしくはポリペプチド、またはＨＩＦムテインと称される。
【００１８】
本明細書中で使用する場合、「野生型ＨＩＦ－α」は、ネイティブかまたは組換えかに関わらず、ネイティブＨＩＦ－αの通常存在するアミノ酸配列（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号：ＢＡＢ７０６０８、ＢＡＢ６９６８９、ＢＡＡ３４２３４またはＡＡＰ２４４１３に示されるような）を有する、野生型のＨＩＦ－α（すなわち、ＨＩＦ－１α、ＨＩＦ－２αまたはＨＩＦ－３α）を意味する。
【００１９】
野生型の全長ＨＩＦ－αは、低酸素細胞と比較して、非低酸素細胞において低レベルで発現する（Ｗａｎｇ，Ｇ．Ｌ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２：５５１０－５５１４、１９９５；Ｗａｎｇ，Ｇ．Ｌ．およびＳｅｍｅｎｚａ，Ｇ．Ｌ．、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：１２３０－１２３７、１９９５；Ｊｉａｎｇ，Ｂ．Ｈ．ら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：１９２５３－１９２６０、１９９７（本明細書中で参考として援用される）。野生型ＨＩＦ－αは、ＨＩＦ－βとヘテロ二量体を形成してＤＮＡ結合タンパク質（哺乳動物の転写因子である低酸素症誘導性因子（ＨＩＦ）を形成することができるとして特徴付けられている。ＨＩＦは、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、グルコーストランスポーターおよび解糖酵素をコードする遺伝子を含む複数の遺伝子の転写を活性化する。
【００２０】
用語「ムテイン」は、本明細書中で使用する場合、低酸素条件下または非低酸素条件下で安定なＨＩＦαポリペプチドの種々の形態をいう。「安定な」とは、このＨＩＦムテインが、比較した場合、分解（ｄｅｇｒｅｄａｔｉｏｎ）に対してより耐性であること（すなわち、野生型ＨＩＦ－αに対する非低酸素条件下で、野生型ＨＩＦ－αと比較して増加した半減期）を意味する。低酸素は、組織における酸素要求が、その組織の酸素供給を超える状態である。用語「低酸素」および「非低酸素」は、特定の組織において代表的に観察される酸素濃度に関して、相対的であると理解される。さらに、ＨＩＦムテインは、フォン・ヒッペル－リンダウ（ＶＨＬ）タンパク質への結合の減少を示す。
【００２１】
（ｓＨＩＦポリペプチド）
ＨＩＦムテインポリペプチドは、野生型ＨＩＦαポリペプチド中のヒドロキシル化可能なアミノ酸残基の１以上が変異しているポリペプチドを含む。あるいは、ＨＩＦムテインは、野生型ＨＩＦ中の１以上のアミノ酸残基が変異して、このポリペプチドのヒドロキシル化を阻害しているポリペプチドを含む。これらの変異は、ＶＨＬに対する結合の減少、酸素の存在下での分解に対する耐性の増加を示し、そして両方の機能的な野生型ＨＩＦαポリペプチドトランス活性化ドメインを有するＨＩＦムテインを生じる。「ヒドロキシル化可能」は、アミノ酸残基がヒドロキシル化され得ることを意味する。ヒドロキシル化可能なアミノ酸残基の例は、プロリンである。
【００２２】
「機能的な野生型ＨＩＦαポリペプチドトランス活性化ドメイン」は、ＨＩＦムテインが、野生型ＨＩＦαのトランス活性化機能を保持していることを意味する。例えば、ＨＩＦムテインは、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、グルコーストランスポーターおよび解糖酵素の転写を活性化し得る。野生型ＨＩＦαは、このポリペプチドのＣ末端半分中の２つの高度に保存されたトランス活性化ドメインを介して、低酸素症誘導性遺伝子の転写を活性化する。これら２つのドメインは、ＮＡＤ（Ｎ末端活性化ドメイン）（これは、アミノ酸４８１～６０３を含む）およびＣＡＤ（Ｃ末端活性化ドメイン）（これは、アミノ酸残基７７６～８２６を含む）と称される。ＮＡＤ（これは、酸素正常状態ではほとんど検出不能であった）は、低酸素では安定化および蓄積されるが

、一方、ＣＡＤは、構成的に発現された。

【００２３】

ＨＩＦムテインは、野生型ＨＩＦ－αに従って番号付けした場合、５６４位のアミノ酸がプロリンでないポリペプチドを含む。あるいは、ＨＩＦムテインは、５６２位のアミノ酸がロイシンでないポリペプチドを含む。好ましくは、ＨＩＦムテインは、５６４位のアミノ酸がプロリンでなく、かつ５６２位のアミノ酸がロイシンでないポリペプチドを含む。好ましくは、５６４位および／または５６２位のアミノ酸は、アラニンである。さらに、ＨＩＦムテインは、４０２位のアミノ酸がプロリンでないポリペプチドを含む。

【００２４】

本発明のｓＨＩＦポリペプチドは、例えば、配列番号２または配列番号４において提供される配列のタンパク質を含む。本発明はまた、その任意の残基が、配列番号２または配列番号４に示される対応する残基から変化され得るが、なおｓＨＩＦ様活性および生理学的機能を保持するタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする、変異体タンパク質または改変体タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、２０％以上までの残基が、変異体タンパク質または改変体タンパク質においてそのように変化され得る。好ましくは、ＨＩＦムテインは、野生型ＨＩＦαに対して少なくとも約８０％相同であり、より好ましくは少なくとも約８５％、約９０％、約９５％、約９８％そして最も好ましくは野生型ＨＩＦαに対して少なくとも約９９％の相同である。一般に、ｓＨＩＦ様機能を保存するｓＨＩＦ様改変体には、配列中の特定の位置で残基が他のアミノ酸によって置換され、そして親タンパク質の２つの残基間でさらなる残基の挿入の可能性および親配列からの１以上の残基の欠失の可能性をさらに含む、任意の改変体が含まれる。任意のアミノ酸の置換、挿入または欠失が、本発明により包含される。好ましい状況において、置換は、上に定義されたような保存的置換である。ｓＨＩＦ様の活性としては、例えば、低酸素条件下または非低酸素条件下での安定性、ＶＨＬへの結合の減少、低酸素症または虚血に関連する組織損傷の減少、あるいは脈管形成の調節が挙げられる。

【００２５】

ｓＨＩＦの一次アミノ酸配列の軽微な改変は、非低酸素条件下で安定であり、かつ本明細書中に記載されるｓＨＩＦαポリペプチドと比較して実質的に等価な活性を有するタンパク質を生じ得る。これらの軽微な改変は、異なる種から単離されたＨＩＦ－αポリペプチド（例えば、ヒト、マウスおよびラットのＨＩＦαポリペプチド）の配列中に見出される軽微な差異を含む。このようなタンパク質としては、用語、本発明のｓＨＩＦαの「アミノ酸配列を実質的に有する」によって規定されるタンパク質が挙げられる。このような改変は、部位特異的変異誘発によるように意図的であり得るか、または異なる種において見出されるように自然発生的であり得る。これらの改変によって生成される全てのポリペプチドは、ｓＨＩＦαの生物学的活性がなお存在し、そしてこのポリペプチドが、野生型ＨＩＦαと比較して非低酸素条件下で安定である限り、本明細書中に含まれる。さらに、１以上のアミノ酸の欠失はまた、その生物学的活性を有意に変更することなく、得られた分子の構造の改変を生じ得る。例えば、ｓＨＩＦαの生物学的活性に必要でないアミノ末端またはカルボキシ末端のアミノ酸を除去し得る。

【００２６】

本発明の１つの局面は、単離されたｓＨＩＦタンパク質およびその生物学的に活性な部分、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに関する。抗ｓＨＩＦ抗体を惹起するための免疫原としての使用に適切なポリペプチドフラグメントもまた提供される。

【００２７】

ｓＨＩＦポリペプチドは、現在のクローニング技術を使用して容易に調製されるか、または部位特異的変異誘発による固体状態方法により合成され得る。ｓＨＩＦポリペプチドは、このポリペプチドのドミナントネガティブ形態を含み得る。１つの実施形態において、ネイティブｓＨＩＦタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用する適切な精製スキームによって、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、ｓ

ＨＩＦタンパク質は、組換えＤＮＡ技術によって合成される。組換え発現の代わりに、ｓＨＩＦタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して化学的に合成され得る。

【００２８】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、ｓＨＩＦタンパク質が由来する細胞または組織供給源由来の細胞性物質も他の混入タンパク質も実質的に含まないか、あるいは化学的に合成された場合、化学物質前駆体も他の化学物質も実質的に含まない。語「細胞性物質を実質的に含まない」は、タンパク質が、それが単離または組み換え的に生成される細胞の細胞性成分から分離されている、ｓＨＩＦタンパク質の調製物を含む。１つの実施形態において、語「細胞性物質を実質的に含まない」は、非ｓＨＩＦタンパク質（本明細書中で「混入タンパク質」とも称される）の約３０（乾燥重量）％未満、より好ましくは非ｓＨＩＦタンパク質の約２０％未満、なおより好ましくは非ｓＨＩＦタンパク質の約１０％未満、そして最も好ましくは非ｓＨＩＦタンパク質の約５％未満を有する、ｓＨＩＦタンパク質の調製物を含む。ｓＨＩＦタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え的に生成される場合、これは、好ましくは、培養培地を実質的に含まない（すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の容積の、約２０％未満、より好ましくは約１０％未満、そして最も好ましくは約５％未満を示す）。

【００２９】

語「化学物質前駆体も他の化学物質も実質的に含まない」は、ｓＨＩＦタンパク質が、このタンパク質の合成に関与する化学物質前駆体または他の化学物質から分離されている、ｓＨＩＦタンパク質の調製物を含む。１つの実施形態において、語「化学物質前駆体も他の化学物質も実質的に含まない」は、化学物質前駆体または非ｓＨＩＦ化学物質の約３０（乾燥重量）％未満、より好ましくは化学物質前駆体または非ｓＨＩＦ化学物質の約２０％未満、なおより好ましくは化学物質前駆体または非ｓＨＩＦ化学物質の約１０％未満、そして最も好ましくは化学物質前駆体または非ｓＨＩＦ化学物質の約５％未満を有するｓＨＩＦタンパク質の調製物を含む。

【００３０】

ｓＨＩＦタンパク質の生物学的に活性な部位は、全長ｓＨＩＦタンパク質よりも短くかつｓＨＩＦタンパク質の少なくとも１つの活性を提示する、ｓＨＩＦタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号２または配列番号４に示されるアミノ酸配列）に有意に相同であるか、またはそのアミノ酸由来であるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、ｓＨＩＦタンパク質の少なくとも１つの活性を有するドメイン、またはモチーフを含むｓＨＩＦタンパク質は、例えば、１０、２５、５０、１００またはそれ以上のアミノ酸長であるポリペプチドであり得る。

【００３１】

本発明のｓＨＩＦタンパク質の生物学的に活性な部分は、ｓＨＩＦタンパク質の間で保存されている上記のドメインのうちの少なくとも１つ（例えば、酸素依存性分分解ドメイン（ＯＤＤ））を含み得る。さらに、このタンパク質の他の領域が欠失した他の生物学的に活性な部分は、組換え技術で調製され得、そして、ネイティブｓＨＩＦタンパク質の１つ以上の機能活性について評価され得る。

【００３２】

（ｓＨＩＦキメラタンパク質およびｓＨＩＦ融合タンパク質）

本発明はまた、ｓＨＩＦのキメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、ｓＨＩＦ「キメラタンパク質」またはｓＨＩＦ「融合タンパク質」は、非ｓＨＩＦポリペプチドに作動可能に連結したｓＨＩＦポリペプチドを含む。「ｓＨＩＦポリペプチド」とは、ｓＨＩＦに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、一方、「非ｓＨＩＦポリペプチド」は、ｓＨＩＦタンパク質とは実質的に相同ではないタンパク質に対応するアミノ酸配列を有しているポリペプチドをいう（例えば、ｓＨＩＦタンパク質とは異なるタンパク質であり、かつ同一生物種または異なる生物種由来であるタンパク質）。ｓＨＩＦ融合タンパク質において、ｓＨＩＦポリペプチドは、ｓＨＩ

Ｆタンパク質の全体または一部分に対応し得る。１つの実施形態において、ｓＨＩＦ融合タンパク質は、ＨＩＦタンパク質の少なくとも１つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態において、ｓＨＩＦ融合タンパク質は、ｓＨＩＦタンパク質の少なくとも２つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に結合する（した）」とは、ｓＨＩＦポリペプチドおよび非ｓＨＩＦポリペプチドが互いにフレームを一致させて融合されることを示すことが意図される。非ｓＨＩＦポリペプチドは、ｓＨＩＦポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に融合され得る。

【００３３】

例えば、１つの実施形態において、ｓＨＩＦ融合タンパク質は、第２のタンパク質の細胞外ドメインに作動可能に連結したｓＨＩＦポリペプチドを含む。このような融合タンパク質は、ｓＨＩＦ活性を調節する化合物についてのスクリーニングアッセイ（例えば、以下に詳述されるようなアッセイ）においてさらに使用され得る。

【００３４】

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

【００３５】

本発明の、ｓＨＩＦキメラタンパク質およびｓＨＩＦ融合タンパク質は、標準的な組換えＤＮＡ技術によって産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするＤＮＡフラグメントは、例えば、連結のために平滑末端および接着末端を使用することによって、適切な末端を提供するための制限酵素によって、適切に接着末端を生めることによって、望まない結合を回避する為にアルカリホスファターゼを処理することによって、および酵素連結することによって、従来の技術に従い、フレームを一致させて一緒に連結される。別の実施形態において、この融合遺伝子は、自動ＤＮＡ合成機を含む従来技術によって、合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅は、アンカープライマーを使用して実施され得、このアンカープライマーは、その後アニーリングされ得、そして、再度増幅されてキメラ遺伝子配列を生じ得る２つの連続した遺伝子フラグメントの間の相補的オーバーハングを生じるプライマーである（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，１９９２を参照のこと）。さらに、すでに融合部分（例えば、ＧＳＴポリペプチド）をコードする多くの発現ベクターが、市販される。ｓＨＩＦコード核酸は、このような発現ベクターにクローニングされ得、その結果、この融合部分が、ｓＨＩＦタンパク質とフレームを一致して連結される。

【００３６】

（ｓＨＩＦ核酸）

本発明の核酸は、ｓＨＩＦポリペプチドまたはｓＨＩＦタンパク質をコードする核酸を包含する。本明細書中で使用される場合、ポリペプチドおよびタンパク質という用語は、交換可能である。これらのポリヌクレオチドとしては、ｓＨＩＦαをコードする、ＤＮＡ配列、ｃＤＮＡ配列、およびＲＮＡ配列が挙げられる。ｓＨＩＦの全てまたは一部分をコードする全てのポリヌクレオチドがまた、これらのポリヌクレオチドが低酸素条件および非低酸素条件の下で安定であるＨＩＦα活性を有するポリペプチドをコードする限り、本明細書中において包含されることがまた、理解される。このようなポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、および意図的に操作したポリペプチドを含み得る。例えば、ｓＨＩＦポリヌクレオチドは、部位特異的突然変異に供され得る。ｓＨＩＦ関するポリヌクレオチド配列はまた、アンチセンス配列を含む。本発明のポリヌクレオチドは、遺伝コードの結果としての縮重体である配列を含む。２０の天然に存在するアミノ酸が存在し、その殆どが１より多くのコドンによって特定される。従って、全ての縮重ヌクレオチド配列は、機能的にしないＨＩＦαポリペプチドのアミノ酸配列が機能的に変化しないヌクレオチドによってコードされる限り、本発明に含まれる。

【００３７】

いくつかの実施形態において、ｓＨＩＦ核酸は、成熟ｓＨＩＦポリペプチドをコードする。本明細書中で使用される場合、本明細書中に記載されるポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、天然に存在するポリペプチド形態または前駆体形態の産物またはプロタンパク質をいう。天然に存在するポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質としては、全長遺伝子産物（対応する遺伝子によってコードされる）が挙げられるが、これに限定されない。あるいは、この成熟形態は、本明細書中で記載されるオープンリーディングフレームによってコードされるポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質として定義され得る。産物「成熟」形態は、非限定的な例ではあるが、遺伝子産物が生じる細胞内で生じ得る、１つ以上の天然の生じるプロセッシング工程の結果として、生じる。ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態を導くこのようなプロセッシング工程の例としては、オープンリーディングフレームの開始コドンによってコードされるＮ末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチドもしくはリーダーペプチドのタンパク質分解性切断が挙げられる。従って、１～Ｎ番目の残基（ここで、１は、Ｎ末端メチオニン）を有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態は、Ｎ末端メチオニンの除去後、残った２～Ｎ番目の残基を有する。あるいは、１～Ｎ番目の残基（ここで、１番目の残基～Ｍ番目の残基のＮ末端シグナル配列が切断される）を有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態は、残ったＭ＋１～Ｎ番目の残基を有する。さらに、本明細書中で使用される場合、ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解性切断事象以外の、翻訳後改変の工程から生じ得る。このようなさらなるプロセスとしては、非限定的なものではあるが、グリコシル化、ミリストイル化、またはリン酸化が挙げられる。一般に、成熟ポリペプチドまたは成熟タンパク質は、これらのプロセスの１つのみか、またはこれらのプロセスのいずれかの組合せの操作から生じ得る。

【００３８】

ｓＨＩＦに共通して、核酸は、配列が、配列番号１もしくは配列番号３、またはそれらのフラグメント中に提供される核酸である。さらに、本発明は、配列番号３もしくは配列番号１またはそれらのフラグメントの変異体または核酸改変体を含み、これらの塩基のいずれかは、配列番号１または配列番号３中に示される対応する塩基から変化され得るが、なお、少なくとも１つのｓＨＩＦ様活性および生理学的機能（すなわち、低酸素状態および非低酸素状態で安定、ＶＨＬへの減少した結合性、親脈管形成を調節する低酸素症または虚血関連組織損傷の減少）を維持するタンパク質をコードする。本発明はさらに、配列番号１または配列番号３の核酸配列の相補鎖を含み、これは、それらのフラグメント、誘導体、アナログおよびホモログを含む。本発明はさらに、核酸もしくは核酸フラグメント、またはそれらの相補鎖を含み、これらの構造は、化学改変を含む。

【００３９】

本発明の１つの局面は、ｓＨＩＦタンパク質またはその生物学的活性タンパク質をコードする、単離された核酸分子に関する。ｓＨＩＦコード核酸（例えば、ｓＨＩＦ　ｍＲＮＡ）を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての用途に十分な核酸フラグメント、およびｓＨＩＦ核酸分子の増幅または変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）プライマーとしての用途のためのフラグメントもまた、含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）、ヌクレオチドアナログを使用して生成したＤＮＡまたはＲＮＡ、ならびにそれらの誘導体、フラグメントおよびホモログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。

【００４０】

「プローブ」は、様々な長さ、好ましくは少なくとも約１０ヌクレオチド（ｎｔ）、１００ｎｔ、または例えば、約６０００ｎｔもの長さの核酸配列をいい、用途に依存する。プローブは、同一の核酸配列、同様の核酸配列または相補的核酸配列の検出において使用される。天然の供給源または組換え供給源から通常取得されるより長い長さのプローブは、オリゴマーよりも、ハイブリダイズに非常に特異的でありかつより遅い。プローブは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、そして、ＰＣＲ、メンブレンに基づくハイブリ

ダイゼーション技術またはＥＬＩＳＡ様技術において特異性を有するように設計される。

【００４１】

「単離された」核酸分子は、核酸の天然供給源中に存在する他の核酸分子から分離された別の核酸分子である。単離された核酸分子の例としては、ベクター中に含まれるＤＮＡ分子、異種宿主細胞中に維持される組換えＤＮＡ分子、部分的にまたは実質的に精製された核酸分子および合成ＤＮＡ分子または合成ＲＮＡ分子が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、「単離された」核酸は、核酸が由来する生物のゲノムＤＮＡ中の核酸に天然に隣接する配列（すなわち、核酸の５’末端および３’末端に位置する配列）を含まない。例えば、様々な実施形態において、単離されたｓＨＩＦ核酸分子は、この核酸が由来する細胞のゲノムＤＮＡ中の核酸分子に天然に隣接する、約５０ｋｂ、２５ｋｂ、５ｋｂ、４ｋｂ、３ｋｂ、２ｋｂ、１ｋｂ、０．５ｋｂまたは０．１ｋｂ以下ヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子（例えば、ｃＤＮＡ分子）は、実質的には、組換え技術によって生成される場合には他の細胞物質もしくは培養培地を、または、化学的に合成される場合には化学前駆物質もしくは他の化学物質を含み得ない。

【００４２】

本発明の核酸分子（例えば、配列番号１もしくは配列番号３のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはこのヌクレオチド配列のいずれかの相補鎖）は、標準的生物学技術および本明細書中で提供される配列情報を使用して、単離され得る。配列番号１または配列番号３の核酸配列の全てまたは一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用して、ｓＨＩＦ核酸配列は、標準的ハイブリダイゼーション技術およびクローニング技術を使用して単離され得る（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら編、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ ２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９；およびＡｕｓｕｂｅｌら編、ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ，１９９３中に記載されるとおり）。

【００４３】

本発明の核酸分子は、鋳型としてｃＤＮＡ、ｍＲＮＡあるいはゲノムＤＮＡ、および標準的ＰＣＲ増幅技術に従う適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクターにクローニングされ、そして、ＤＮＡ配列分析によって特徴付けられる。さらに、ｓＨＩＦヌクレオチドに対応するオリゴヌクレオチドは、標準的合成技術（例えば、自動化ＤＮＡ合成器を使用する）によって、調製され得る。

【００４４】

本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲ反応で使用される十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列またはｃＤＮＡ配列に基づいても、それらから設計されてもよく、そして、この配列を使用して、特定の細胞または組織中の同一のＤＮＡもしくはＲＮＡ、類似のＤＮＡもしくはＲＮＡまたは相補的なＤＮＡもしくはＲＮＡの存在を増幅するか、確認するか、または明らかにする。オリゴヌクレオチドは、約１０ｎｔ、約５０ｎｔまたは約１００ｎｔ長、好ましくは約１５ｎｔ～約３０ｎｔ長を有する核酸配列の一部を含む。１つの実施形態において、１００ｎｔ長以下の核酸分子を含むオリゴヌクレオチドはさらに、配列番号１もしくは配列番号３の少なくとも６つの連続したヌクレオチド、またはそれらの相補鎖を含む。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得、そして、プローブとして使用され得る。

【００４５】

別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号１または配列番号３中に示される核酸配列の相補鎖である核酸分子を含む。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号１もしくは配列番号３中に示されるヌクレオチド配列、またはこのヌクレオチド配列の一部の相補的である核酸分子を含む。配列番号１または配

列番号３中に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号１または配列番号３中に示されるヌクレオチド配列に、ほとんどまたは全くミスマッチがなく水素結合し得る、配列番号１または配列番号３中に示されるヌクレオチド配列に対して十分に相補的であり、これによって、安定な二本鎖を形成する核酸分子である。

【００４６】

本明細書中で使用される場合、用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位管のＷａｔｓｏｎ－ＣｒｉｃｋまたはＨｏｏｇｓｔｅｅｎ塩基対をいい、そして、用語「結合」は、２つのポリペプチドもしくは化合物、または関連するポリペプチドもしくは化合物、あるいはそれらの組合せ間の物理的または化学的な相互作用をいう。結合は、イオン結合、非イオン結合、Ｖｏｎ　ｄｅｒ　Ｗａａｌｓ結合、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用は、直接的かまたは間接的かのいずれかである。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物の効果を介し得るか、またはこの効果に起因し得る。直接結合は、別のポリペプチドまたは化合物の効果を介しても、またはこの効果に起因しても生じない相互作用をいい、その代わりに、他の実質的な化学的相互作用がない。

【００４７】

さらに、本発明の核酸分子は、ｓＨＩＦ核酸配列の一部（例えば、プローブまたはプライマーとして使用され得るフラグメント）のみ、またはｓＨＩＦの生物学的活性部分をコードするフラグメントを含み得る。本明細書中で提供されるフラグメントは、少なくとも６つの（連続した）核酸または少なくとも４つの（連続した）アミノ酸の配列（この長さは、それぞれ、核酸の場合の特異的ハイブリダイゼーションを可能とするか、またはアミノ酸の場合のエピトープの特異的認識を可能にするのに十分である）として定義され、そして、おおくても、全長配列に満たないいくつかの部分である。フラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続した一部から導かれ得る。誘導体は、直接的にか、または、改変もしくは部分的置換によってかのいずれかで、天然の化合物から形成される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、天然の化合物と類似ではあるが同一でない構造（特定の成分または操作に関して異なる）を有する核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成的または異なる進化起源由来であり得、そして、野生株と比較して、類似または反対の代謝活性を有し得る。

【００４８】

誘導体およびアナログは、この誘導体またはアナログが、以下に記載されるような改変された核酸またはアミノ酸を含む場合、全長であっても、全長以外でもよい。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログとしては、本発明の核酸またはタンパク質に対して実質的に相同な領域を含む分子が挙げられるが、これに限定されない。種々の実施形態では、これは、同一のサイズの核酸配列またはアミノ酸配列にわたる場合か、またはアライメントが当該分野で公知のコンピューターホモロジー検索によってなされた、整列された配列と比較した場合に、少なくとも約７０％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９８％またはなお９９％の同一性（好ましくは８０％～９９％の同一性）を有するか、このコード核酸配列は、ストリンジェント、中ストリンジェントまたは低ストリンジェントな条件下で、前述のタンパク質をコードする配列の相補鎖にハイブリダイズし得る。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら編、ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ＮＹ，１９９３および以下を参照のこと。例示的なプログラムは、デフォルト設定を使用するＧａｐプログラムである（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ　８　ｆｏｒ　ＵＮＩＸ（登録商標），Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｐａｒｋ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）であり、これは、ＳｍｉｔｈおよびＷａｔｅｒｍａｎのアルゴリズムを使用する（Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．，１９８１，２：４８２－４８９（その全体が本明細書中に参考として援用される））。

【００４９】

「相同核酸配列」もしくは「相同アミノ酸配列」またはそれらの改変体は、上記によう

にヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの相同性によって特徴付けられた配列をいう。本発明において、相同ヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（哺乳動物、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられるがこれに限定されない）のｓＨＩＦポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同ヌクレオチド配列はまた、本明細書中に記載のヌクレオチド配列の天然に生じる対立遺伝子の改変および変異を含むが、これらに限定されない。相同核酸配列は、保存的アミノ酸置換ならびにｓＨＩＦ活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。ｓＨＩＦタンパク質の生物学的活性は、上記される。

【００５０】

（ｓＨＩＦ変異体）

本発明はさらに、遺伝コードの縮退に起因して、配列番号１または配列番号３中に示されるヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を含む。従って、これらの核酸は、配列番号１または配列番号３中に示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質（例えば、配列番号２または配列番号４のポリペプチド）と同じｓＨＩＦタンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号２または配列番号４中に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【００５１】

さらに、他の種由来のｓＨＩＦタンパク質をコードし、従って、配列番号１または配列番号３のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。

【００５２】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のｓＨＩＦタンパク質をコードする核酸）または他の関連した配列（例えば、パラログ（ｐａｒａｌｏｇ））は、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングについて当該分野で周知の方法を使用して、プローブとして特定のヒト配列の全てまたは一部を用いた低、中、または高ストリンジェンシーなハイブリダイゼーションにより取得され得る。

【００５３】

本明細書中で使用される場合、句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は、配列依存的であり、そして、異なる環境では異なる。より長い配列は、より短い配列よりも、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびｐＨで、特定の配列に対して、熱融解点（Ｔｍ）よりも約５℃低く選択される。Ｔｍは、平衡状態で、標的配列に相補的なプローブの５０％が、標的配列にハイブリダイズする温度（規定されたイオン強度、ｐＨおよび核酸濃度下で）である。標的配列は、一般に、過剰に存在するので、Ｔｍでは、プローブの５０％が平衡状態で占有される。代表的に、ストリンジェントな条件は、ｐＨ７．０～８．３で、塩濃度が約１．０Ｍ未満のナトリウムイオン、代表的には、０．０１Ｍ～１．０Ｍのナトリウムイオン（または他の塩）であり、そして、温度が、短いプローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチド（例えば、１０ｎｔ～５０ｎｔ）に対しては少なくとも約３０℃で、そして、より長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドに対しては少なくとも６０℃である条件である。ストリンジェントな条件はまた、不安定化剤（例えば、ホルムアミド）の添加によって達成され得る。

【００５４】

ストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９），６．３．１－６．３．６中に見出され得る。好ましくは、この条件は、代表的には、互いに対して少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８５％、約９０％、約９５％、約９８％または約９９％の相同な配列が、互いにハイブリダイズ

したままであるような条件である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、６５℃で、６×ＳＳＣ、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．０２％のＰＶＰ、０．０２％のＦｉｃｏｌｌ、０．０２％のＢＳＡおよび５００ｍｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡを含む高塩緩衝液中でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションの後に、５０℃で、０．２×ＳＳＣ、０．０１の％ＢＳＡ中での１回以上の洗浄が続く。ストリンジェントな条件下で、配列番号１または配列番号３の配列にハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に相当する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子は、自然状態で生じる（例えば、天然タンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有するＲＮＡ分子またはＤＮＡ分子をいう。

【００５５】

第２の実施形態において、中ストリンジェンシーの条件下で、配列番号１もしくは配列番号３のヌクレオチド配列、または、そのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズ可能な核酸配列が、提供される。中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、５５℃で、６×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．５％のＳＤＳおよび１００ｍｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡ中でのハイブリダイゼーション、続く、３７℃で、１×ＳＳＣ、０．１の％ＳＤＳ中での１回以上の洗浄である。使用され得る中ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編），１９９３，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ，およびＫｒｉｅｇｌｅｒ，１９９０，ＧＥＮＥ ＴＲＡＮＳＦＥＲ ＡＮＤ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ．を参照のこと。

【００５６】

第３の実施形態において、低ストリンジェンシーの条件下で、配列番号１もしくは配列番号３のヌクレオチド配列、または、そのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズ可能な核酸配列が、提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、４０℃で、３５％のホルムアミド、５×ＳＳＣ、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．０２％のＰＶＰ、０．０２％のＦｉｃｏｌｌ、０．２％のＢＳＡ、１００ｍｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡ、１０％（ｗｔ／ｖｏｌ）の硫酸デキストラン中でのハイブリダイゼーション、続く、５０℃で、２×ＳＳＣ、２５ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、５ｍＭのＥＤＴＡおよび０．１の％のＳＤＳ中での１回以上の洗浄である。使用され得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である（例えば、種間ハイブリダイゼーションのために使用されるように）。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編），１９９３，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ，およびＫｒｉｅｇｌｅｒ，１９９０，ＧＥＮＥ ＴＲＡＮＳＦＥＲ ＡＮＤ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ；Ｓｈｉｌｏ ａｎｄ Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，１９８１，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ７８：６７８９－６７９２を参照のこと。

【００５７】

（保存的変異）

集団中に存在し得るｓＨＩＦ配列の変異体に加えて、当業者はさらに、変化が、配列番号１または配列番号３のヌクレオチド配列に、変異によって導入され得、これによって、ｓＨＩＦタンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされたｓＨＩＦタンパク質のアミノ酸配列中に変化を導くということを理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基でアミノ酸置換を導くヌクレオチド置換は、配列番号１または配列番号３の配列中で作製され得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性の変更なしでｓＨＩＦの野生型配列から変更され得る残基である一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされ

る。例えば、本発明のｓＨＩＦタンパク質間で保存されるアミノ酸残基は、改変を特に受けやすそうでないことが予想される。

【００５８】

本発明の別の局面は、活性に可欠であるアミノ酸残基中の変化を含むｓＨＩＦタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなｓＨＩＦタンパク質は、配列番号２または配列番号４とはアミノ酸配列が異なるが、なお生物学的活性は維持する。１つの実施形態において、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列に対して、少なくとも約７５％相同であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、核酸によってコードされるタンパク質は、配列番号２または配列番号４に対して少なくとも約８０％、より好ましくは、少なくとも約９０％、約９５％、約９８％、そして、最も好ましくは、配列番号２または配列番号４に対して少なくとも約９９％相同である。

【００５９】

配列番号２または配列番号４のタンパク質に対して相同であるｓＨＩＦタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号１のヌクレオチド配列に、１つ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失を導入することによって作製され得、その結果、１つ以上のアミノ酸置換、付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入される。

【００６０】

変異は、標準的技術（例えば、部位特異的突然変異およびＰＣＲ媒介突然変異）によって、配列番号１または配列番号３のヌクレオチド配列に導入される。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、１つ以上の予想される非必須アミノ酸残基にて作製され得る。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置きかえられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で規定されている。これらのファミリーとしては、以下を有するアミノ酸が挙げられる：塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。従って、ｓＨＩＦ中の予想される非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置きかえられる。あるいは、別の実施形態において、変異は、ｓＨＩＦコード配列の全てまたは一部に沿って、（例えば、飽和突然変異によって）無作為に導入され得、そして、得られた変異体は、活性を保持する変異体を同定するために、ｓＨＩＦ生物学的活性についてスクリーニングされ得る。配列番号１または配列番号３の突然変異の後に、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そして、このタンパク質の活性が、決定され得る。

【００６１】

（ｓＨＩＦ組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、ｓＨＩＦタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログをコードする核酸を含むベクター（好ましくは、発現ベクター）に関する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」とは、これが連結される別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。１つの型のベクターは、「プラスミド」であり、プラスミドとは、さらなるＤＮＡセグメントが連結され得る環状二本鎖ＤＮＡループをいう。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、このウイルスベクター中に、さらなるＤＮＡセグメントがウイルスゲノムへと連結され得る。特定のベクターは、このベクターが導入される宿主細胞にて自律的に複製し得る（例えば、細菌の複製起点を含む細菌ベクターおよびエピソームの哺乳動物ベクター）。他のベクター(例えば、エピソームでない哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、作動可能に連結される遺伝

子の発現を方向付け得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態にある。本明細書中で、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、等価な機能を提供するウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）のような発現ベクターのこのような他の形態を含むことが意図される。

【００６２】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態にて、本発明の核酸を含む。このことは、組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択された１以上の調節配列（発現される核酸に作動可能に連結される）を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結される（た）」とは、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式にて（例えば、インビトロ転写／翻訳系にて、またはベクターが宿主細胞に導入された場合の宿主細胞にて）調節配列に連結されていることを意味することが意図される。

【００６３】

用語「調節配列」とは、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。このような調節配列は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）に記載される。調節配列としては、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を方向付ける配列および特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を方向付ける配列（例えば、組織特異的調節配列）が挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどのような因子に依存し得ることが、当業者により認識される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入されて、それにより、タンパク質またはペプチド（本明細書中に記載の核酸によりコードされる融合タンパク質または融合ペプチド（例えば、ｓＨＩＦタンパク質、ｓＨＩＦタンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を含む）を生成し得る。

【００６４】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞におけるｓＨＩＦタンパク質の発現のために設計され得る。例えば、ｓＨＩＦタンパク質は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉのような細菌細胞、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを使用して)、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）においてさらに議論される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、Ｔ７プロモーター調節配列およびＴ７ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写および翻訳され得る。

【００６５】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を方向付ける構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを用いてＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉにおいて最もしばしば行われる。融合ベクターは、そのベクターにコードされるタンパク質に（通常は、組換えタンパク質のアミノ末端に）多くのアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、３つの目的を果たす：（ｉ）組換えタンパク質の発現を増大させること；（ｉｉ）組換えタンパク質の溶解性を増大させること；および（ｉｉｉ）アフィニティー精製にてリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質の精製に役立つこと。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解性切断部位は、融合タンパク質の精製の後に融合部分から組換えタンパク質を分離することを可能にするために、融合部分と組換えタンパク質との接合部

に導入される。このような酵素、およびそれらの同族認識配列としては、第Ｘａ因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。代表的な融合発現ベクターとしては、標的組換えタンパク質に、それぞれ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはプロテインＡを融合する、ｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ；ＳｍｉｔｈおよびＪｏｈｎｓｏｎ，１９８８．Ｇｅｎｅ ６７：３１－４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，Ｍａｓｓ．）およびｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）が挙げられる。

【００６６】

適切な誘導性非融合Ｅ．ｃｏｌｉ発現ベクターの例としては、ｐＴｒｃ（Ａｍｒａｎｎら，（１９８８）Ｇｅｎｅ ６９：３０１－３１５）およびｐＥＴ １１ｄ（Ｓｔｕｄｉｅｒら，ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）６０－８９）が挙げられる。

【００６７】

Ｅ．ｃｏｌｉにおいて組換えタンパク質発現を最大にするための１つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌において、そのタンパク質を発現させることである。例えば、Ｇｏｔｔｅｓｍａｎ，ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）１１９－１２８を参照のこと。別のストラテジーは、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を改変することである。その結果、各アミノ酸についての個々のコドンは、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて優先的に利用されるコドンである（例えば、Ｗａｄａら，１９９２．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：２１１１－２１１８を参照のこと）。本発明の核酸配列のこのような改変は、標準的なＤＮＡ鎖合成技術により行われ得る。

【００６８】

別の実施形態において、ｓＨＩＦ発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｉｖｉｓａｅにおける発現のためのベクターの例としては、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Ｂａｌｄａｒｉら，１９８７．ＥＭＢＯ Ｊ．６：２２９－２３４）、ｐＭＦａ（ＫｕｒｊａｎおよびＨｅｒｓｋｏｗｉｔｚ，１９８２．Ｃｅｌｌ ３０：９３３－９４３）、ｐＪＲＹ８８（Ｓｃｈｕｌｔｚら，１９８７．Ｇｅｎｅ ５４：１１３－１２３）、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）、およびｐｉｃＺ（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。

【００６９】

あるいは、ｓＨＩＦは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して昆虫細胞にて発現され得る。培養昆虫細胞（例えば、ＳＦ９細胞）におけるタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、ｐＡｃシリーズ（Ｓｍｉｔｈら，１９８３．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ ３：２１５６－２１６５）およびｐＶＬシリーズ（ＬｕｃｋｌｏｗおよびＳｕｍｍｅｒｓ，１９８９．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７０：３１－３９）が挙げられる。

【００７０】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞にて発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ，１９８７．Ｎａｔｕｒｅ ３２９：８４０）およびｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎら，１９８７．ＥＭＢＯ Ｊ．６：１８７－１９５）が挙げられる。哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントにより提供される。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス４０に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方の他の適切な発現系については、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら，ＭＯ

ＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ．第２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９の第１６章および第１７章を参照のこと。

【００７１】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型にて優先的に核酸の発現を方向付け得る（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して、核酸を発現する）。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Ｐｉｎｋｅｒｔら，１９８７．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ特異的プロモーター（ＣａｌａｍｅおよびＥａｔｏｎ，１９８８．Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、特に、Ｔ細胞レセプターのプロモーター（ＷｉｎｏｔｏおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８９．ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９－７３３）および免疫グロブリン（Ｂａｎｅｒｊｉら，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０；ＱｕｅｅｎおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８）、ニューロン特異的プロモーター（例えば、神経線維プロモーター；ＢｙｒｎｅおよびＲｕｄｄｌｅ，１９８９．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄら，１９８５．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、ミルクホエイプロモーター；米国特許第４，８７３，３１６号および欧州特許出願公開第２６４，１６６号）が挙げられる。発生調節プロモーターもまた含まれる（例えば、マウスｈｏｘプロモーター（ＫｅｓｓｅｌおよびＧｒｕｓｓ，１９９０．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）およびα－フェトプロテインプロモーター（ＣａｍｐｅｓおよびＴｉｌｇｈｍａｎ，１９８９．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６））。

【００７２】

本発明は、アンチセンス方向で発現ベクターにクローン化された本発明のＤＮＡ分子を含む組換え発現ベクターをさらに提供する。すなわち、このＤＮＡ分子は、ｓＨＩＦ ｍＲＮＡに対してアンチセンスであるＲＮＡ分子の（ＤＮＡ分子の転写による）発現を可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。アンチセンス方向でクローン化された核酸に作動可能に連結された調節配列は、種々の細胞型、例えば、ウイルスプロモーターおよび／もしくはエンハンサーにおいてアンチセンスＲＮＡ分子の連続的発現を指向するように選択され得るか、または調節配列は、アンチセンスＲＮＡの、構成的、組織特異的もしくは細胞型特異的発現を指向するように選択され得る。このアンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形態であり得、ここでアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型により決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の考察については、例えば、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂら、「Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ＲＮＡ ａｓ ａ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓ」Ｒｅｖｉｅｗｓ－Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｖｏｌ．１（１）１９８６を参照のこと。

【００７３】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入されている宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中において交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫または潜在的な子孫をもいうことが理解される。変異または環境の影響のいずれかに起因して、後続の世代において特定の改変が発生し得るので、このような子孫は、実際には、親細胞と同一ではないかもしれないが、これらは、なお、本明細書で使用されるこの用語の範囲内に含まれる。

【００７４】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、ｓＨＩＦタ

ンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉのような細菌細胞、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞またはＣＯＳ細胞）において発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【００７５】

ベクターＤＮＡは、従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞中に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、外来核酸（例えば、ＤＮＡ）を、宿主細胞に導入するための、種々の当該分野で認識された技術をいうことを意図され、これらの技術としては、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈降、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ．第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９）、および他の研究マニュアルに見出され得る。

【００７６】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションに関して、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの少しの画分のみが外来ＤＮＡをそのゲノムに組み込み得ることが公知である。これらの成分（ｉｎｔｅｇｒａｎｔ）を同定および選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子は、一般的に、目的の遺伝子と共に宿主細胞中に導入される。種々の選択マーカーとしては、Ｇ４１８、ハイグロマイシンおよびメトトレキサートのような薬物に対する耐性を付与する選択マーカーが挙げられる。選択マーカーをコードする核酸は、ｓＨＩＦをコードするベクターと同じベクターで宿主細胞中に導入され得るか、または別々のベクターで導入され得る。この導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択（例えば、選択マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存するが、その他の細胞は死滅する）により同定され得る。

【００７７】

本発明の宿主細胞（例えば、培養において原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞）を使用して、ｓＨＩＦタンパク質を産生（すなわち、発現）し得る。従って、本発明は、本発明の宿主細胞を使用してｓＨＩＦタンパク質を産生する方法をさらに提供する。一実施形態において、この方法は、ｓＨＩＦタンパク質が産生されるように、適切な培地中で本発明の宿主細胞（この宿主細胞中には、ｓＨＩＦタンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入されている）を培養する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、この培地または宿主細胞からｓＨＩＦタンパク質を単離する工程をさらに包含する。

【００７８】

（トランスジェニックｓＨＩＦ動物）

本発明の宿主細胞を使用して、非ヒトトランスジェニック動物もまた産生し得る。例えば、一実施形態において、本発明の宿主細胞は、ｓＨＩＦタンパク質コード配列が導入されている、受精卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞を使用して、外因性ｓＨＩＦ配列がそのゲノムに導入されている非ヒトトランスジェニック動物、または内因性ｓＨＩＦ配列が変更されている相同組換え動物を作製し得る。このような動物は、ｓＨＩＦタンパク質の機能および／または活性を研究するため、ならびにｓＨＩＦタンパク質活性の調節因子を同定および／または評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、その動物の細胞の１つ以上が導入遺伝子を含む、非ヒト動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは齧歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノム中に組み込まれた外因性ＤＮＡ、および成熟動物

のゲノムに留まり、それによりそのトランスジェニック動物の１つ以上の細胞型または組織においてコードされる遺伝子産物の発現を指向する外因性ＤＮＡである。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」は、その動物の発生の前に、内因性遺伝子と、その動物の細胞（例えば、その動物の胎児性細胞）中に導入された外因性ＤＮＡ分子との間の相同組換えにより、内因性ｓＨＩＦ遺伝子が変更されている、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスである。

【００７９】

本発明のトランスジェニック動物は、ｓＨＩＦコード核酸を、受精卵母細胞の雄性前核に（例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルスリウイルス感染により）導入し、そしてその卵母細胞を、偽性妊娠雌性養育動物（ｆｏｓｔｅｒ　ａｎｉｍａｌ）において発生させることにより作製され得る。配列番号１または配列番号３を含む配列は、非ヒト動物のゲノム中に導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトｓＨＩＦ遺伝子の非ヒトホモログ（例えば、マウスｓＨＩＦ遺伝子）は、ヒトｓＨＩＦ　ｃＤＮＡへのハイブリダイゼーションに基づいて単離され得（さらに上記される）、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルはまた、導入遺伝子の発現効率を増大させるためにその導入遺伝子に含まれ得る。組織特異的調節配列は、ｓＨＩＦ導入遺伝子に作動可能に連結されて、ｓＨＩＦタンパク質の発現を特定の細胞に指向し得る。胚操作およびマイクロインジェクションを介するトランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を作製するための方法は、当該分野で慣用的になっており、そして例えば、米国特許第４，７３６，８６６号；同第４，８７０，００９号；および同第４，８７３，１９１号；ならびにＨｏｇａｎ，１９８６，ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＮＧ　ＴＨＥ　ＭＯＵＳＥ　ＥＭＢＲＹＯ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．に記載される。同様の方法は、他のトランスジェニック動物の産生に使用される。トランスジェニック創始（ｆｏｕｎｄｅｒ）動物は、そのゲノムにおけるｓＨＩＦ導入遺伝子の存在および／またはその動物の組織もしくは細胞におけるｓＨＩＦ　ｍＲＮＡの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック創始動物を使用して、この導入遺伝子を保有するさらなる動物を育種し得る。さらに、ｓＨＩＦタンパク質をコードする導入遺伝子を保有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を保有する他のトランスジェニック動物と交配され得る。

【００８０】

相同組換え動物を作製するために、欠失、付加または置換が導入されてそれによりｓＨＩＦ遺伝子を変更（例えば、機能的に破壊）されているｓＨＩＦ遺伝子の少なくとも一部を含有するベクターが調製される。ｓＨＩＦ遺伝子は、ヒト遺伝子（例えば、配列番号１のＤＮＡまたは配列番号３のＤＮＡ）であり得るが、より好ましくは、ヒトｓＨＩＦ遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号１または配列番号３のヒトｓＨＩＦ遺伝子のマウスホモログを使用して、マウスゲノムにおける内因性ｓＨＩＦ遺伝子を変更するのに適切な相同組換えベクターを構築し得る。一実施形態において、このベクターは、相同組換えの際に、内因性ｓＨＩＦ遺伝子が、機能的に破壊されるように設計される（すなわち、もはや機能的タンパク質を全くコードしない；「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる）。

【００８１】

あるいは、このベクターは、相同組換えの際に、内因性ｓＨＩＦ遺伝子が、変異されるかまたは他の方法で変更されるが、なお機能的タンパク質をコードする（例えば、上流調節領域が変更されて、それにより内因性ｓＨＩＦタンパク質の発現を変更し得る）ように設計され得る。相同組換えベクターにおいて、ｓＨＩＦ遺伝子の変更された部分は、その５’末端および３’末端において、ｓＨＩＦ遺伝子のさらなる核酸と隣接して、相同組換えが、このベクターにより保有される外因性ｓＨＩＦ遺伝子と、胚性幹細胞における内因性ｓＨＩＦ遺伝子との間で起こることを可能にする。さらなる隣接ｓＨＩＦ核酸は、内因性遺伝子との首尾良い相同組換えに十分な長さである。代表的には、数キロベースの隣接

ＤＮＡ（５’末端および３’末端の両方において）が、このベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの記載についてはＴｈｏｍａｓら、１９８７．Ｃｅｌｌ ５１：５０３を参照のこと。次いで、このベクターは、胚性幹細胞株中に（例えば、エレクトロポレーションにより）導入され、そして導入されたｓＨＩＦ遺伝子が、内因性ｓＨＩＦ遺伝子と相同組換えされている細胞が、選択される。例えば、Ｌｉら、１９９２．Ｃｅｌｌ ６９：９１５を参照のこと。

【００８２】

次いで、この選択された細胞を、動物（例えば、マウス）の胚盤胞に注入し、凝集キメラを形成する。例えば、Ｂｒａｄｌｅｙ，１９８７：ＴＥＲＡＴＯＣＡＲＣＩＮＯＭＡＳ ＡＮＤ ＥＭＢＲＹＯＮＩＣ ＳＴＥＭ ＣＥＬＬＳ：Ａ ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ ＡＰＰＲＯＡＣＨ，Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ編。ＩＲＬ，Ｏｘｆｏｒｄ １１３～１５２頁を参照のこと。次いで、キメラ胚を、適切な偽性妊娠雌性養育動物に移植し得、そしてこの胚を出産させる。その生殖細胞に相同組換えされたＤＮＡを有する子孫を使用して、導入遺伝子の生殖細胞系伝達により、動物の全ての細胞が相同組換えされたＤＮＡを含有する動物を育種し得る。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法は、Ｂｒａｄｌｅｙ，１９９１．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２：８２３－８２９；ＰＣＴ国際公開ＷＯ９０／１１３５４；ＷＯ９１／０１１４０；ＷＯ９２／０９６８；およびＷＯ９３／０４１６９にさらに記載される。

【００８３】

別の実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含むトランスジェニック非ヒト動物が産生され得る。このような系の一例は、バクテリオファージＰ１のｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系である。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系の説明については、例えば、Ｌａｋｓｏら、１９９２．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：６２３２－６２３６を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのＦＬＰリコンビナーゼ系である。Ｏ’Ｇｏｒｍａｎら、１９９１．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：１３５１－１３５５を参照のこと。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合、Ｃｒｅリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含有する動物が必要とされる。このような動物は、例えば、２つのトランスジェニック動物（一方は、選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を含有し、そして他方がリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含有する）を交配させることによる、「二重」トランスジェニック動物の構築により提供され得る。

【００８４】

本明細書中に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンはまた、Ｗｉｌｍｕｔら、１９９７．Ｎａｔｕｒｅ ３８５：８１０－８１３に記載される方法に従って産生され得る。手短には、トランスジェニック動物由来の細胞（例えば、体細胞）を単離し得、そして成長周期を出てG_0期に入るように誘導し得る。次いで、休止細胞は、例えば、電気パルスの使用により、休止細胞が単離された種と同じ種の動物由来の摘出された卵母細胞に融合され得る。次いで、この再構築された卵母細胞を培養し、その結果、桑実胚または未分化胚芽細胞へと発達し、次いで偽性妊娠雌性養育動物に移される。この雌性養育動物の子孫は、細胞（例えば、体細胞）が単離された動物のクローンである。

【００８５】

（ｓＨＩＦ抗体）

ｓＨＩＦタンパク質またはｓＨＩＦタンパク質のフラグメントに対する抗体もまた本発明に含まれる。本明細書で使用される場合、用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン（Ｉｇ）分子の免疫学的に活性な部分（すなわち、抗原を特異的に結合する（抗原と免疫反応する）抗原結合部分を含む分子）をいう。このような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、F_{ab}フラグメント、$F_{ab'}$フラグメントおよび$F_{(ab')_2}$フラグメント、ならびにF_{ab}発現ライブラリが挙げられるがこれらに限定されない。一般に、ヒトから得られた抗体分子は、Ｉ

ｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＥおよびＩｇＤのいずれかのクラスに関連し、これらのクラスは、この分子に存在する重鎖の性質によって互いに異なる。特定のクラスは、IgG_1、IgG_2などのようなサブクラスも有する。さらに、ヒトにおいて、軽鎖は、κ鎖またはλ鎖であり得る。本明細書中での抗体の言及は、全てのこのようなクラス、サブクラスおよびヒト抗体種の型への言及を含む。

【００８６】

本発明の単離されたｓＨＩＦ関連タンパク質は、抗原またはその部分もしくはフラグメントとして作用することを意図され得、そしてさらに、ポリクローナル抗体調製およびモノクローナル抗体調製のための標準的技術を使用して、免疫特異的に抗原に結合する抗体を作製するための免疫原として使用され得る。全長タンパク質が使用され得るか、または本発明は、免疫原としての使用のための抗原の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。抗原性ペプチドフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号２または配列番号４に示されるアミノ酸配列）のうち少なくとも６つのアミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体が、全長タンパク質またはそのエピトープを含む任意のフラグメントとの特異的免疫複合体を形成するようなそのエピトープを包含する。好ましくは、この抗原性ペプチドは、少なくとも１０のアミノ酸残基、または少なくとも１５のアミノ酸残基、または少なくとも２０のアミノ酸残基、または少なくとも３０のアミノ酸残基を含む。抗原性ペプチドに含まれる好ましいエピトープは、そのタンパク質の表面上に位置するタンパク質の領域（一般的に、これらは親水性領域である）である。

【００８７】

本発明の特定の実施形態において、抗原性ペプチドにより含まれる少なくとも１つのエピトープは、そのタンパク質の表面上に位置するｓＨＩＦ関連タンパク質の領域（例えば、親水性領域）である。ヒトｓＨＩＦ関連タンパク質配列の疎水性分析は、ｓＨＩＦ関連タンパク質のどの領域が特に親水性であるか、従って、どの領域が、抗体産生を標的化するために有用な表面残基をコードしているようであるかを示す。抗体産生を標的化するための手段として、親水性および疎水性の領域を示すハイドロパシー（ｈｙｄｒｏｐａｔｈｙ）プロットが、当該分野で周知の任意の方法により作製され得る。これらの方法としては、例えば、フーリエ変換を用いるかまたは用いない、Ｋｙｔｅ　Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ法またはＨｏｐｐ　Ｗｏｏｄｓ法が挙げられる。例えば、ＨｏｐｐおよびＷｏｏｄｓ，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：３８２４－３８２８；ＫｙｔｅおよびＤｏｏｌｉｔｔｌｅ　１９８２，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５－１４２（これらの各々は、本明細書中にその全体が参考として援用される）を参照のこと。抗原性タンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログ内の１つ以上のドメインに特異的な抗体もまた、本明細書中に提供される。

【００８８】

本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログは、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の産生において免疫原として利用され得る。

【００８９】

当該分野で公知の種々の手順は、本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の産生のために使用され得る（例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｈａｒｌｏｗ　ＥおよびＬａｎｅ　Ｄ，１９８８，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。これらの抗体のいくつかは、以下に考察される。

【００９０】

（ポリクローナル抗体）

ポリクローナル抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、

マウスまたは他の哺乳動物）を、ネイティブタンパク質、その合成改変体、または前述の誘導体を用いて１回以上注射することにより免疫し得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然に存在する免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質の代わりになる化学的合成されたポリペプチド、または組換えにより発現される免疫原性タンパク質を含み得る。さらに、このタンパク質は、免疫される哺乳動物において免疫原性であることが公知の第２のタンパク質に結合体化され得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、およびダイズトリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。この調製物はさらに、アジュバントを含み得る。免疫学的応答を増大させるために使用される種々のアジュバントとしては、フロイントアジュバント（完全および不完全）、鉱物ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイル乳濁液、ジニトロフェノールなど）、ヒトにおいて有用なアジュバント（例えば、Ｂａｃｉｌｌｅ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－ＧｕｅｒｉｎおよびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍ）、または同様の免疫刺激因子が挙げられるがこれらに限定されない。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、ＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（モノホスホリルリピドＡ、合成トレハロースジコリノマイコレート（ｄｉｃｏｒｙｎｏｍｙｃｏｌａｔｅ））が挙げられる。

【００９１】

免疫原性タンパク質に特異的なポリクローナル抗体分子は、哺乳動物から単離され得（例えば、血液から）、そして周知の技術（例えば、プロテインＡまたはプロテインＧを使用するアフィニティクロマトグラフィー（これは、免疫血清のＩｇＧ画分を主に提供する））によりさらに精製され得る。続いて、またあるいは、探索される免疫グロブリンの標的である特異的抗原、またはそのエピトープは、免疫アフィニティクロマトグラフィーにより免疫特異的抗体を精製するためにカラム上に固定され得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、Ｄ．Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ（Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｔｉｓｔ，Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｔｉｓｔ，Ｉｎｃ．，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ　ＰＡ発行、第１４巻、第８号（２０００年４月１７日）２５～２８頁）により考察される。

【００９２】

（モノクローナル抗体）

用語「モノクローナル抗体（ＭＡｂ）」または「モノクローナル抗体組成物」は、本明細書中で使用する場合、固有の軽鎖遺伝子産物および固有の重鎖遺伝子産物からなる抗体分子の１つのみの分子種を含む抗体分子の集団をいう。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）は、この集団の全ての分子において同一である。従って、ＭＡｂは、それに対する固有の結合親和性により特徴付けられる抗原の特定のエピトープと免疫反応し得る抗原決定部位を含む。

【００９３】

モノクローナル抗体は、例えば、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ、Ｎａｔｕｒｅ、２５６：４９５（１９７５）に記載されるような、ハイブリドーマ法を用いて作製され得る。ハイブリドーマ法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物は、代表的に、免疫化因子によって免疫されて、その免疫化因子に特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生し得るリンパ球が誘導される。あるいは、このリンパ球は、インビトロで免疫され得る。

【００９４】

免疫化因子は、代表的に、タンパク質抗原、そのフラグメント、またはその融合タンパク質を含む。一般的に、ヒト起源の細胞が所望される場合にいずれかの末梢血リンパ球が使用されるか、または非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合に脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用される。次いで、リンパ球は、適切な融合因子（例えば、ポリエチレングリコール）を用いて不死化細胞株と融合されて、ハイブリドーマ細胞が形成される（Ｇｏｄｉｎｇ、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ、（１９８６）ｐｐ．５９－１０３）

。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシ、およびヒト起源の骨髄腫細胞である。通常、ラットまたはマウス骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、非融合、不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠く場合、ハイブリドーマの培養培地は、代表的に、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む（「ＨＡＴ培地」）。これらの物質は、ＨＧＰＲＴ欠損細胞の増殖を阻害する。

【００９５】

好ましい不死化細胞株は、効果的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定的な高レベルの発現を支持し、そしてＨＡＴ培地のような培地に感受性である不死化細胞である。より好ましい不死化細胞株は、マウス骨髄腫株である。マウス骨髄腫株は、例えば、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣａｌｉｆｏｒｎｉａおよびＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、Ｍａｎａｓｓａｓ、Ｖｉｒｇｉｎｉａから獲得され得る。ヒト骨髄腫およびマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１３３：３００１（１９８４）；Ｂｒｏｄｅｕｒら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、（１９８７）ｐｐ．５１－６３）。

【００９６】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、次いで、その抗原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）または酵素連結イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ））により決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、ＭｕｎｓｏｎおよびＰｏｌｌａｒｄ、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ、１０７：２２０（１９８０）のＳｃａｔｃｈａｒｄ分析により決定され得る。好ましくは、標的抗原に対する高い程度の特異性および高い結合親和性を有する抗体が単離される。

【００９７】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、そのクローンは、限界希釈手順によりサブクローニングされ得、そして標準的な方法により増殖され得る。この目的のために適切な培養培地として、例えば、Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ’ｓ ＭｅｄｉｕｍおよびＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物における腹水としてインビボで増殖され得る。

【００９８】

このサブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、培養培地または腹水液から、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、プロテインＡ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィー）により単離または精製され得る。

【００９９】

モノクローナル抗体はまた、組換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号に記載される方法）により作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）容易に単離および配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなＤＮＡの好ましい供給源として機能する。一旦単離されると、そのＤＮＡは、発現ベクター中に配置され得、次いで、この発現ベクターは、宿主細胞（例えば、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムス

ター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはそうでなければ免疫グロブリンを産生しない骨髄腫細胞）にトランスフェクトされて、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成が獲得される。このＤＮＡはまた、例えば、ヒト重鎖および軽鎖定常領域のコード配列を相同なマウス配列と置換することによるか（米国特許第４，８１６，５６７号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ、Ｎａｔｕｒｅ　３６８、８１２－１３（１９９４））、または免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全体または一部を共有結合することにより改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常領域と置換されるか、または本発明の抗体の抗原結合部位の可変ドメインと置換されて、キメラ二価抗体が作製され得る。

【０１００】

（ヒト化抗体）

本発明のタンパク質抗原に対する抗体はさらに、ヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。これらの抗体は、ヒトへの投与に適しており、投与された免疫グロブリンに対するヒトによる免疫応答を引き起こさない。抗体のヒト化形態は、原理的にヒト免疫グロブリンの配列で構成され、そして非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそのフラグメント（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、または抗体の他の抗原結合配列）である。ヒト化は、Ｗｉｎｔｅｒらの方法に従って（Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ、３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３３２：３２３－３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３９：１５３－１５３６（１９８８））、げっ歯類ＣＤＲまたはヒト抗体の対応する配列に対するＣＤＲ配列と置換することによって実施され得る（例えば、米国特許第５，２２５，５３９号を参照のこと）。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基で置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても移入されたＣＤＲ配列またはフレームワーク配列においても見出されない残基を含み得る。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも１つ（代表的には２つ）の可変領域の実質的に全てを含む。この可変領域において、非ヒト免疫グロブリンのＣＤＲ領域に対応するＣＤＲ領域の全てまたは実質的に全て、およびフレームワーク領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のＣＤＲ領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）（代表的には、ヒト免疫グロブリンのＦｃ）の少なくとも一部を含む（Ｊｏｎｅｓら、１９８６；Ｒｅｃｈｍａｎｎら、１９８８；およびＰｒｅｓｔａ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．、２．５９３－５９６（１９９２））。

【０１０１】

（ヒト抗体）

完全ヒト抗体は、軽鎖および重鎖の両方の本質的に全配列（ＣＤＲを含む）がヒト遺伝子から生じる抗体分子に関する。このような抗体は、本明細書中で「ヒト抗体」または「完全ヒト抗体」と称される。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ技術；ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂｏｒら、１９８３　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｔｏｄａｙ　４：７２を参照のこと）、およびＥＢＶハイブリドーマ技術により調製されて、ヒトモノクローナル抗体が産生され得る（Ｃｏｌｅら、１９８５：ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ　ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ　ＡＮＤ　ＣＡＮＣＥＲ　ＴＨＥＲＡＰＹ、Ａｌａｎ　Ｒ．Ｌｉｓｓ、Ｉｎｃ．、ｐｐ．７７－９６）。ヒトモノクローナル抗体は、本発明を実施する上で使用され得、そしてヒトハイブリドーマを用いることによってか（Ｃｏｔｅら、１９８３．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　８０：２０２６－２０３０）、またはエプスタインバーウイルスを用いてヒトＢ細胞をインビトロで形質転換することによって（Ｃｏｌｅら、１９８５：ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ　ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ　ＡＮＤ　ＣＡＮＣＥＲ　ＴＨＥＲＡＰＹ、Ａｌａｎ　Ｒ．Ｌｉｓｓ、Ｉｎｃ．、ｐｐ．７７－９６）、生成され得る。

【０１０２】

さらに、ヒト抗体はまた、さらなる技術（ファージディスプレイライブラリー（Ｈｏｏ

ｇｅｎｂｏｏｍおよびＷｉｎｔｅｒ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２７：３８１（１９９１）；Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２２：５８１（１９９１））を用いて生成され得る。同様に、ヒト抗体は、トランスジェニック動物（例えば、内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的にかまたは完全に不活性化されたマウス）にヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することにより作製され得る。チャレンジにおいて、ヒト抗体産生が観察され、これは、全ての観点（遺伝子の再配置、集合、および抗体レパートリーを含む）において、ヒトにおいて見られるものと非常に類似する。このアプローチは、例えば、米国特許第５，５４５，８０７号；同第５，５４５，８０６号；同第５，５６９，８２５号；同第５，６２５，１２６号；同第５，６３３，４２５号；同第５，６６１，０１６号、ならびにＭａｒｋｓら（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０、７７９－７８３（１９９２））；Ｌｏｎｂｅｒｇら（Ｎａｔｕｒｅ ３６８ ８５６－８５９（１９９４））；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ（Ｎａｔｕｒｅ ３６８、８１２－１３（１９９４））；Ｆｉｓｈｗｉｌｄら（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４、８４５－５１（１９９６））；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４、８２６（１９９６））；ならびにＬｏｎｂｅｒｇおよびＨｕｓｚａｒ（Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３ ６５－９３（１９９５））に記載される。

【０１０３】

ヒト抗体はさらに、抗原によるチャレンジに応答して、その動物の内因性抗体ではなく完全ヒト抗体を産生するよう改変されたトランスジェニック非ヒト動物を用いて生成され得る（ＰＣＴ公開ＷＯ９４／０２６０２を参照のこと）。非ヒト宿主において重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子は不能にされ、そしてヒト重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な遺伝子座が、宿主ゲノムに挿入される。ヒト遺伝子は、例えば、必須のヒトＤＮＡセグメントを含む酵母人工染色体を用いて組み込まれる。次いで、所望の改変を全て提供する動物が、その改変の完全な要素よりも小さい要素を含む中間トランスジェニック動物を交雑育種（ｃｒｏｓｓｂｒｅｅｄ）することにより子孫として獲得される。このような非ヒト動物の好ましい実施形態はマウスであり、そしてＰＣＴ公開ＷＯ９６／３３７３５およびＷＯ９６／３４０９６に開示されるように、Ｘｅｎｏｍｏｕｓｅ^{TM}と称される。この動物は、完全ヒト免疫グロブリンを分泌するＢ細胞を産生する。抗体は、目的の免疫原による免疫後に動物から直接的に獲得され得る（例えば、ポリクローナル抗体の調製物として）か、あるいはその動物に由来する不死化Ｂ細胞（例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ）から獲得され得る。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子が収集され、そして抗体を直接的に獲得するために発現され得るか、または例えば、単鎖Ｆｖ分子のような抗体のアナログを獲得するためにさらに改変され得る。

【０１０４】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主（マウスとして例示される）を作製する方法の例は、米国特許第５，９３９，５９８号に開示される。これは、胚性幹細胞において少なくとも１つの内因性重鎖遺伝子座からＪセグメント遺伝子を欠失させて、再配置された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の形成を防止する工程（この欠失は、選択マーカーをコードする遺伝子を含む標的化ベクターによりもたらされる）；および胚性幹細胞からその体細胞および生殖細胞が選択マーカーをコードする遺伝子を含むトランスジェニックマウスを作製する工程を包含する方法によって獲得され得る。

【０１０５】

目的の抗体（例えば、ヒト抗体）を作製する方法は、米国特許第５，９１６，７７１号に開示されている。この方法は、重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを培養物中の１つの哺乳動物宿主細胞に導入する工程、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを別の哺乳動物宿主細胞に導入する工程、および２つの細胞を融合してハイブリッド細胞を形成する工程を包含する。このハイブリッド細胞は、この重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。

【０１０６】

この手順のさらなる改善において、免疫原上の臨床的に関連するエピトープを同定するための方法、および高親和性でこの関連するエピトープに免疫特異的に結合する抗体を選択するための関連する方法が、ＰＣＴ公開ＷＯ９９／５３０４９に開示されている。

【０１０７】

（F_{ab}フラグメントおよび単鎖抗体）

本発明に従って、本発明の抗原性タンパク質に特異的な単鎖抗体の生成のための技術が適応され得る（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号を参照のこと）。さらに、F_{ab}発現ライブラリーの構築のための方法が適応されて（例えば、Ｈｕｓｅら、１９８９ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－１２８１）、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログに対する所望の特異性を有するモノクローナルF_{ab}フラグメントの迅速かつ効率的な同定が可能になり得る。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントは、当該分野で公知の技術により生成され得、これらとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：（ｉ）抗体分子のペプシン消化により生成される$F_{(ab')_2}$フラグメント；（ｉｉ）$F_{(ab')_2}$フラグメントのジスルフィド結合の還元により生成されるF_{ab}フラグメント；（ｉｉｉ）パパインおよび還元剤を用いた抗体分子の処理により生成されるF_{ab}フラグメント、および（ｉｖ）F_vフラグメント。

【０１０８】

（二重特異的抗体）

二重特異的抗体は、少なくとも２つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル（好ましくは、ヒトまたはヒト化）抗体である。本発明の場合、結合特異性のうちの１つは、本発明の抗原性タンパク質に対するものである。第２の結合標的は、任意の他の抗原であり、そして有利には、細胞表面タンパク質またはレセプターもしくはレセプターサブユニットである。

【０１０９】

二重特異的抗体を作製する方法は、当該分野で公知である。伝統的に、二重特異的抗体の組換え生成は、２つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖の対の同時発現に基づく（２つの重鎖は異なる特異性を有する）（ＭｉｌｓｔｅｉｎおよびＣｕｅｌｌｏ、Ｎａｔｕｒｅ ３０５：５３７－５３９（１９８３））。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の無作為の組み合わせに起因して、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、１０個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生成し、これらのうちの１つのみが、正確な二重特異的構造を有する。この正確な分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により達成される。同様の手順が、ＷＯ９３／０８８２９（１９９３年5月１３日公開）およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒら、１９９１ ＥＭＢＯ Ｊ．、１０：３６５５－３６５９に開示されている。

【０１１０】

所望の結合特異性（抗体－抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合され得る。この融合物は、好ましくは、ヒンジ領域、ＣＨ２領域、およびＣＨ３領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインを有する。この融合物の少なくとも１つに存在する軽鎖結合に必須の部位を含む、第１重鎖定常領域（ＣＨ１）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、および所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするＤＮＡは、別々の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物に同時トランスフェクトされる。二重特異的抗体を作製するさらなる詳細については、例えば、Ｓｕｒｅｓｈら、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１２１：２１０（１９８６）を参照のこと。

【０１１１】

ＷＯ９６／２７０１１に開示される別のアプローチに従って、抗体分子の対の間の境界は、組換え細胞培養物から収集されるヘテロダイマーの割合を最大にするために操作され得る。好ましい境界は、抗体定常ドメインのＣＨ３領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第１の抗体分子の境界から１つ以上の小さなアミノ酸側鎖が、より大きな側

鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）と置換される。大きな側鎖と同一または類似の大きさの代償的な「空洞」は、大きなアミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）で置換することにより第２の抗体分子の境界に作製される。このことにより、他の望まない最終産物（例えば、ホモダイマー）に対するヘテロダイマーの収率を増大する機構が提供される。

【０１１２】

二重特異的抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$二重特異的抗体）として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を作製する技術は、文献に記載されている。例えば、二重特異的抗体は、化学結合を用いて調製され得る。Ｂｒｅｎｎａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：８１（１９８５）は、インタクトな抗体がタンパク質分解切断されてＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを生成する手順を記載する。これらのフラグメントは、近接するジチオールを安定化し、そして細胞間ジスルフィド形成を防止するために、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。次いで、生成するＦａｂ’フラグメントは、チオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換される。次いで、Ｆａｂ’－ＴＮＢ誘導体の１つは、メルカプトエチルアミンを用いた還元によりＦａｂ’－チオールに再変換され、そして等モルの他のＦａｂ’－ＴＮＢ誘導体と混合されて二重特異的抗体が形成される。生成される二重特異的抗体は、酵素の選択的な固定化のための因子として使用され得る。

【０１１３】

さらに、Ｆａｂ’フラグメントは、Ｅ．ｃｏｌｉから直接的に収集され得、そして化学的に連結されて二重特異的抗体が形成される。Ｓｈａｌａｂｙら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７５：２１７－２２５（１９９２）は、完全ヒト化二重特異的抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子の生成について記載している。各々のＦａｂ’フラグメントは、Ｅ．ｃｏｌｉから別々に分泌され、そしてインビトロで直接化学連結に供されて、二重特異的抗体が形成された。これによって形成される二重特異的抗体は、ＥｒｂＢ２レセプターおよび正常なヒトＴ細胞を過剰発現する細胞に結合し得、そしてヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘導し得た。

【０１１４】

組換え細胞培養物から直接、二重特異的抗体フラグメントを作製および単離するための種々の技術もまた記載されている。例えば、二重特異的抗体は、ロイシンジッパーを使用して生成されている。Ｋｏｓｔｅｌｎｙら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）。ＦｏｓタンパクおよびＪｕｎタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって２つの異なる抗体のＦａｂ’部分に連結した。抗体ホモ二量体を、ヒンジ領域にて還元して、単量体を形成し、次いで、再び酸化して抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法はまた、抗体ホモ二量体の生成のために利用され得る。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：６４４４－６４４８（１９９３）により記載される「ダイアボディー」技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための別の機構を提供している。このフラグメントは、リンカーにより軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。このリンカーは、非常に短いので、同じ鎖上にある２つのドメインの間を対合することはできない。従って、１つのフラグメントのV_HおよびV_Lドメインを、別のフラグメントの相補的なV_LドメインおよびV_Hドメインと対合させ、それにより、２つの抗原結合部位を形成する。単鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体の使用により二重特異的抗体フラグメントを作製するための別のストラテジーもまた、報告されている。Ｇｒｕｂｅｒら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：５３６８（１９９４）を参照のこと。

【０１１５】

２つを超える結合価を有する抗体が企図される。例えば、三重特異的が調製され得る。Ｔｕｔｔら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１）。

【０１１６】

例示的な二重特異的抗体は、２つの異なるエピトープに結合し得る。そのうちの少なく

とも１つは、本発明のタンパク質抗原に由来する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞防御機構を集中させるために、Ｔ細胞レセプター分子のような、白血球上の誘発分子（例えば、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ２８、またはＢ７）、またはＩｇＧについてのＦｃレセプター（ＦｃγＲ）（例えば、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６））に結合するアームと組合わされ得る。二重特異的抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に傷害性薬剤を細胞に方向付けるために使用され得る。これらの抗体は、抗原結合アームおよび細胞傷害性薬剤もしくは放射性核種キレート剤（例えば、ＥＯＴＵＢＥ、ＤＰＴＡ、ＤＯＴＡ、またはＴＥＴＡ）に結合するアームを有する。別の、目的の二重特異的抗体は、本明細書中に記載のタンパク質抗原を結合し、さらに組織因子（ｓＨＩＦ）を結合する。

【０１１７】

（ヘテロ結合抗体）

ヘテロ結合抗体（ｈｅｔｅｒｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）はまた、本発明の範囲内である。ヘテロ結合抗体は、２つの共有結合した抗体から構成される。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を、所望でない細胞に標的化させることが提唱され（米国特許第４，６７６，９８０号）、ＨＩＶ感染の処置について提唱されている（ＷＯ９１／００３６０；ＷＯ９２／２００３７３；ＥＰ０３０８９）。これらの抗体が、合成タンパク質化学において公知の方法（架橋剤を含む方法が挙げられる）を使用してインビトロで調製され得ることが企図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することにより構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル－４－メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば、米国特許第４，６７６，９８０号に開示される試薬が挙げられる。

【０１１８】

（エフェクター機能操作）

エフェクター機能に関して、例えば、癌を処置する際に、抗体の有効性を増強するために、本発明の抗体を改変することは望ましいことであり得る。例えば、システイン残基を、Ｆｃ領域に導入し得、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にし得る。このように生成されたホモ二量体の抗体は、改善されたインターナリゼーション能力および／または増大した補体媒介性細胞殺傷、ならびに抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有し得る。Ｃａｒｏｎら，Ｊ．Ｅｘｐ　Ｍｅｄ．，１７６：１１９１－１１９５（１９９２）およびＳｈｏｐｅｓ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８：２９１８－２９２２（１９９２）を参照のこと。抗腫瘍活性が増強されたホモ二量体の抗体はまた、Ｗｏｌｆｆら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５３：２５６０－２５６５（１９９３）に記載されるヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、抗体は、２つのＦｃ領域を有するように操作され得、それにより、増強された補体溶解およびＡＤＣＣ能力を有し得る。Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎら，Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓｉｇｎ，３：２１９－２３０（１９８９）を参照のこと。

【０１１９】

（免疫結合体）

本発明はまた、細胞傷害性薬剤（例えば、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはそのフラグメント））、または放射活性同位体に結合体化された抗体（すなわち、放射性結合体）を含む免疫結合体に関する。

【０１２０】

このような免疫結合体の生成において有用な化学療法剤は、上記に記載されている。使用され得る酵素的に活性な毒素およびそのフラグメントとしては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、体外毒素Ａ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシシン（ｍｏｄｅｃｃｉｎ）Ａ鎖、α－サルシン（ｓａｒｃｉｎ）、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ　ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチン（ｄｉａｎｔｈｉｎ）タンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒ

ａｎｔｉａインヒビター、カルシン（ｃｕｒｃｉｎ）、クロチン（ｃｒｏｔｉｎ）、ｓａｐａｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓインヒビター、ゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）、ミトギリン（ｍｉｔｏｇｅｌｌｉｎ）、レストリクトシン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｏｃｉｎ）、フェノマイシン（ｐｈｅｎｏｍｙｃｉｎ）、エノマイシン（ｅｎｏｍｙｃｉｎ）、およびトリコセシン（ｔｒｉｃｏｔｈｅｃｅｎｅ）が挙げられる。種々の放射性核種が、放射性結合抗体の作製に利用可能である。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ、および^{186}Ｒｅが挙げられる。

【０１２１】

抗体と細胞傷害性薬剤の結合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤（例えば、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート（ｄｉｍｅｔｈｙｌ ａｄｉｐｉｍｉｄａｔｅ）ＨＣＬ、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド（ｇｌｕｔａｒｅｌｄｅｈｙｄｅ））、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリレン２，６－ジイソシアネート）、およびビス－活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン）を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Ｖｉｔｅｔｔａら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３８：１０９８（１９８７）に記載されるように調製され得る。^{14}炭素標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、抗体への放射性核種の結合体化についての例示的キレート剤である。ＷＯ９４／１１０２６を参照のこと。

【０１２２】

別の実施形態において、この抗体は、腫瘍予備標的化における利用のための「レセプター」(例えば、ストレプトアビジン）に結合体化され得る。ここで、抗体－レセプター結合体は、患者に投与され、続いて、キレート剤を使用して、循環から結合していない結合体が排除され、次いで、「リガンド」（例えば、アビジン）が投与され、これは、次に細胞傷害性薬剤に結合される。

【０１２３】

（低酸素症誘導性遺伝子の発現を改変する方法）

本発明により、少なくとも１つの低酸素症誘導性遺伝子（すなわち、低酸素症誘導性因子により活性化される遺伝子）の発現を増大させる方法もまた提供される。この方法は、細胞と、本発明のｓＨＩＦをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターとを、そのベクター中に含まれる核酸配列の発現を可能にする条件下で接触させ、それにより、細胞中の低酸素症誘導性遺伝子の増加した発現を提供する工程を包含する。このような遺伝子としては、例えば、ＶＥＧＦをコードする遺伝子、グルコース輸送体をコードする遺伝子、解糖酵素をコードする遺伝子、ＩＧＦ－２をコードする遺伝子、ＩＧＦ結合タンパク質をコードする遺伝子などが挙げられる。

【０１２４】

細胞は、低酸素症誘導性遺伝子を発現し得る任意の細胞であり得る。

【０１２５】

発現ベクターに曝される（すなわち、発現ベクターと接触される）細胞集団は、任意の数の細胞（すなわち、１以上の細胞）であり得、インビトロ、インビボ、またはエキソビボにて提供され得る。

【０１２６】

（低酸素症または虚血に関連する組織損傷を処置し、新脈管形成または血管新生を調節する方法）

本発明はまた、ＨＩＦ－１媒介性障害の発症を処置（すなわち、低減、予防または遅延）する種々の方法、新脈管形成または血管新生を調節する種々の方法を提供する。ＨＩＦ－１媒介性障害の例としては、低酸素症または虚血に関連する組織損傷が挙げられる。被

験体は、好ましくは、哺乳動物である。この哺乳動物は、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得る、種々の局面において、被験体としては、冠動脈、大脳動脈、または末梢動脈の疾患を有する患者、および１以上の治癒していない創傷を有する患者が挙げられる。

【０１２７】

本発明の方法に従うと、実質的に精製されたｓＨＩＦ－１αムテインまたは適切なベクター中のｓＨＩＦ－１αをコードするポリヌクレオチド配列が、低酸素症／虚血に関連する組織損傷の処置もしくは予防、または新脈管形成もしくは血管新生を調節するために被験体に導入される。

【０１２８】

本発明の方法および組成物により処置される、関連する臨床状態としては、大脳循環、冠状動脈循環、または末梢循環の疾患に起因する虚血が挙げられる。１つの治療目的は、ｓＨＩＦ（これは、内因性ＨＩＦ－１βと二量体を形成し、特定のＤＮＡ配列に結合し、新脈管形成に関連する低酸素症誘導性遺伝子（例えば、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）をコードする遺伝子（既知のＨＩＦ－１標的遺伝子）（Ｊ．Ａ．Ｆｏｒｓｙｔｈｅら，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １６：４６０４，１９９６；Ｎ．Ｖ．Ｉｙｅｒら，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ １２：１４９，１９９８）が挙げられるが、これらに限定されない）の転写を活性化する）の過剰発現により、虚血組織において新脈管形成を促進することである。ＨＩＦ－１αを使用する論理的根拠は、ＨＩＦ－１αが、新脈管形成に関与する複数の遺伝子の発現を制御する転写因子であるので、単一の脈管形成因子（例えば、ＶＥＧＦ）を使用した処置と比較して、優れた臨床結果を与えるということである。しかし、その組織部位にＤＮＡを送達する方法は、送達される特定の遺伝子の正体によっては決して影響を受けない。さらに、冠状動脈疾患を有する多くの患者は、安静時の減少した心筋血流も、低酸素症も有さない。彼らが、心筋虚血から生じるアンギナ症状を経験するのは、運動時および増大した心筋血流が必要なときのみである。あるいは、狭窄した冠状血管は、痙攣または凝血塊のいずれかにより完全に閉塞状態になり、心筋梗塞（心臓発作）を生じ得る。従って、安定な形態のＨＩＦ－１αを使用する処置の目的は、たとえそのとき低酸素症がなかったとしても、心臓発作を予防するために、これらの患者において新脈管形成を誘導することである。従って、本発明のｓＨＩＦ組成物は、予防的処置レジメンおよび治療的処置レジメンを提供する。

【０１２９】

本発明は、低酸素症に関連する障害を処置するために、ｓＨＩＦ－１αをコードするポリヌクレオチドの導入を提供する。この障害は、ＨＩＦ－１αポリペプチドの発現により改善または緩和される。このような治療は、ｓＨＩＦ－１αポリヌクレオチドを、低酸素状態に曝された細胞に導入することによりその治療効果を達成する。このようにして、ＨＩＦ－１αは、低酸素を呈した組織および周辺の低酸素を呈していない組織の両方にて発現され、その結果、ＨＩＦ－１αは、ＨＩＦ－１β（これは、低酸素を呈した細胞および低酸素を呈していない細胞において過剰に存在する）と二量体化し得、下流の標的遺伝子の転写を活性化し得る。ＨＩＦ－１によって活性化され得る遺伝子の例は、血管内皮細胞増殖因子、グルコース輸送体、解糖酵素、およびインスリン様増殖因子２である。これらの遺伝子は、低酸素症に対する重要な適応応答（新脈管形成および解糖、ならびに細胞死の防止を含む）を媒介する。

【０１３０】

治療的に使用される場合、本明細書中に記載のｓＨＩＦポリペプチドおよびｓＨＩＦ核酸は、本明細書中で「治療剤」といわれる。治療剤の投与方法としては、皮内経路、筋肉内経路、腹腔内経路、静脈内経路、皮下経路、経鼻経路、硬膜上経路および経口経路が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の治療剤は、任意の従来の経路により（例えば、注入またはボーラス注射により、上皮または粘膜皮膚の内層（ｌｉｎｉｎｇ）（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）を通じた吸収により）投与され得、他の生物学的に活性な薬剤とともに投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さら

に、任意の適切な経路（脳室内注射および髄腔内注射が挙げられる）により、この治療剤を中枢神経系に投与することは有利であり得る。脳室内注射は、レザバ（例えば、Ｏｍｍａｙａレザバ）に取り付けられた脳室内カテーテルにより容易にされ得る。肺投与もまた、吸入器またはネブライザ、およびエアロゾル化剤を用いた処方物の使用により、用いられ得る。処置が必要な領域に治療剤を局所的に投与することもまた所望され得る；これは、例えば、限定ではないが、手術中の局所的注入により、局部的適用により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラントにより達成され得る。種々の送達系が公知であり、本発明の治療剤を投与するために使用され得る。これらの系としては、例えば、以下が挙げられる：（ｉ）リポソーム、微粒子、マイクロカプセル中のカプセル化；（ｉｉ）この治療剤を発現し得る組換え細胞；（ｉｉｉ）レセプター媒介性エンドサイトーシス（例えば、ＷｕおよびＷｕ，１９８７．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２６２：４４２９－４４３２を参照のこと）；（ｉｖ）レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての治療剤核酸の構築物、など。本発明の１つの実施形態において、この治療剤は、小胞にて、特にリポソームにて送達され得る。リポソームにおいては、本発明のタンパク質は、他の薬学的に受容可能なキャリアに加えて、両親媒性薬剤（例えば、水溶液中でミセル、不溶性単層、液晶、またはラメラ層として凝集した形態で存在する脂質）と合わされる。リポソーム処方物に適切な脂質としては、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などが挙げられるが、これらに限定されない。このようなリポソーム処方物の調製は、例えば、米国特許第４，８３７，０２８号；および米国特許第４，７３７，３２３号（その全てが本明細書中に参考として援用される）において開示されるように、当該分野の技術レベル内である。なお別の実施形態において、この治療剤は、制御放出系（例えば、送達ポンプ（例えば、Ｓａｕｄｅｋら，１９８９．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３２１：５７４）および半透性ポリマー材料（例えば、Ｈｏｗａｒｄら，１９８９．Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ ７１：１０５を参照のこと）が挙げられる）にて送達され得る。さらに、この制御放出系は、治療標的（例えば、脳）の近くに置かれ得、従って、全身投与量のごくわずかしか要しない。例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ，Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ １９８４．（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ）を参照のこと。

【０１３１】

本発明の特定の実施形態において、治療剤が、タンパク質をコードする核酸である場合、この治療剤の核酸は、適切な核酸発現ベクターの一部としてその核酸を構築し、この核酸を、細胞内にあるように投与すること（例えば、レトロウイルスベクターの使用により、直接注入により、微粒子銃の使用により、脂質もしくは細胞表面レセプターまたはトランスフェクト剤でのコーティングにより）、または核に入ることが公知のホメオボックス様ペプチドに連結してその核酸を投与すること、などによって（例えば、Ｊｏｌｉｏｔら，１９９１．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８８：１８６４－１８６８を参照のこと）、インビボで投与されて、そのコードされたタンパク質の発現を促進し得る。あるいは、核酸の治療剤は、細胞内に導入され得、相同組換えによって発現のために宿主細胞ＤＮＡに組み込まれ得るか、またはエピソームのままであり得る。

【０１３２】

本明細書中で使用される場合、用語「治療有効量」とは、意義のある患者利益（すなわち、関連する医学的状態の処置、治癒、予防、もしくは緩和、またはこのような状態の処置、治癒、予防もしくは緩和の速度の増大）を示すに十分な薬学的組成物または方法の各活性成分の総量を意味する。単独で投与される個々の活性成分に適用される場合、この用語は、その成分単独に対して言及する。組み合わせに対して適用される場合、この用語は、組み合わせて投与されようと、連続して投与されようと、同時に投与されようと、その治療効果をもたらす活性成分を合わせた量に対して言及する。

【０１３３】

特定の障害または状態の処置に有効な、本発明の治療剤の量は、その障害または状態の

性質に依存し、平均的な当業者により、標準的な臨床技術を使用して決定され得る。さらに、インビトロアッセイは、必要に応じて、最適な投薬範囲の同定を補助するために使用され得る。処方物にて使用される正確な用量はまた、投与経路、ならびにその疾患または障害の全体的な重篤度に依存し、実施者の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。最終的には、主治医が、各個々の患者を処置する、本発明のタンパク質の量を決定する。最初に、主治医は、低用量の本発明のタンパク質を投与し、患者の応答を観察する。より大きな用量の本発明のタンパク質が、患者の最適な治療効果が得られるまで投与され得、その時点で、投薬量はそれ以上増大させない。しかし、本発明の治療剤の静脈内投与に適切な投薬量範囲は、一般に、活性化合物が約２０～５００マイクログラム（μｇ）／キログラム（Ｋｇ）体重である。経鼻投与に適切な投薬量範囲は、一般に、約０．０１ｐｇ／ｋｇ体重～１ｍｇ／ｋｇ体重である。有効用量は、インビトロ試験系または動物モデル試験系から得られた用量応答曲線から推定され得る。坐剤は、一般に、０．５重量％～１０重量％の範囲の活性成分を含む；経口処方物は、好ましくは、１０％～９５％の活性成分を含む。

【０１３４】

本発明の治療剤（Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ）を使用する静脈内治療の持続期間は、各個々の患者の処置されるべき疾患の重篤度および状態、および潜在的な特異体質感受性に依存して、変化し得る。最終的には、担当医が、本発明の薬学的組成物を使用する静脈内治療の適切な持続期間を決定する。

【０１３５】

細胞はまた、本発明の治療剤または治療タンパク質の存在下で、エキソビボで培養され得、そのような細胞に対する所望の効果またはそのような細胞中の活性を増幅または生成し得る。次いで、処置される細胞は、治療目的で、インビボに導入され得る。

【０１３６】

（遺伝子療法）

本発明の１つの局面において、ＨＩＦポリペプチドをコードする核酸、またはそれらの機能的誘導体は、遺伝子療法によって投与される。遺伝子療法とは、特定の核酸を被験体に投与することによって行われる治療をいう。本発明のこの局面において、核酸は、そのコードされるペプチドを生成し、次いで、このペプチドは、上で言及した疾患または障害（例えば、虚血または低酸素症）の機能を調節することによって治療効果を発揮するように作用する。当該分野内で利用可能な遺伝子療法に関連する任意の方法論が、本発明の実施において使用され得る。例えば、Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌら、１９９３．Ｃｌｉｎ Ｐｈａｒｍ １２：４８８～５０５を参照のこと。

【０１３７】

好ましい実施形態において、治療は、適切な宿主内で、上で言及したｓＨＩＦポリペプチド、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログのいずれか１つ以上を発現する発現ベクターの一部である核酸を含む。特定の実施形態において、このような核酸は、ｓＨＩＦポリペプチドのコード領域に作動可能に連結されたプロモーターを有する。このプロモーターは、誘導性または構成性であり得、かつ必要に応じて、組織特異的であり得る。このプロモーターは、例えば、ウイルス起源または哺乳動物起源であり得る。別の特定の実施形態において、核酸分子が使用され、ここで、コード配列（および他の任意の所望な配列）が、ゲノム内の所望な部位にて相同組換えを促進する領域に隣接しており、従って、核酸の染色体内発現が提供される。例えば、ＫｏｌｌｅｒおよびＳｍｉｔｈｉｅｓ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８６：８９３２～８９３５を参照のこと。なお別の実施形態において、送達される核酸は、エピソームを残し、内因性遺伝子およびさもなければサイレント遺伝子を誘導する。

【０１３８】

治療核酸の患者への送達は、直接的か（すなわち、患者は、核酸または核酸含有ベクターに直接曝露される）、間接的か（すなわち、細胞は最初に、インビトロで核酸と接触され、次いで患者に移植される）のどちらであってもよい。これら２つのアプローチは、そ

れぞれ、インビボ遺伝子療法またはエキソビボ遺伝子療法として知られている。本発明の特定の実施形態において、核酸は、インビボに直接投与され、ここでコード産物を産生するように発現される。これは、以下の工程を包含するがこれらに限定されない、当該分野で公知の多数の方法のいずれかによって、達成され得る：上記核酸を、適切な核酸発現ベクターの一部として構築する工程、および細胞内にあるような様式で、この核酸を投与する工程（例えば、欠損したかまたは弱毒化した、レトロウイルスまたは他のウイルスベクターを用いる注射によって；米国特許第４，９８０，２８６号を参照のこと）；裸のＤＮＡを直接注射する工程；微粒子照射（例えば、Ｇｅｎｅ　Ｇｕｎ（登録商標）；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ，ＤｕＰｏｎｔ）を使用する工程；この核酸を脂質でコーティングする工程；付随した細胞表面レセプター／トランスフェクト剤を使用する工程；リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセル中にカプセル化する工程；核に侵入することが知られているペプチドに、結合した核酸を投与する工程；あるいは、レセプター媒介性エンドサイトーシスの素因となるリガンドに、結合した核酸を投与する工程（例えば、ＷｕおよびＷｕ、１９８７．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２６２：４４２９～４４３２を参照のこと）（これを使用して、目的のレセプターを特異的に発現する細胞型を「標的化」し得る）など。

【０１３９】

本発明の実施における遺伝子療法に対するさらならアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクチン、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション、ウイルス感染などの方法によって、インビボ組織培地中の細胞内に遺伝子を移入する工程を包含する。一般的に、移入の方法論としては、細胞への選択マーカーの同時移入が挙げられる。次いで、細胞は、移入遺伝子を取り込みかつこの遺伝子を発現している細胞の単離を容易にするように、淘汰圧（例えば、抗生物質耐性）下に置かれる。次いで、これらの細胞は、患者に送達される。特定の実施形態において、得られる組換え細胞のインビボ投与前に、核酸は、当該分野で公知の任意の方法によって細胞に導入される。これらの方法としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：トランスフェクション、エレクトロポーション、マイクロインジェクション、目的の核酸配列を含有するウイルスまたはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体媒介性遺伝子移入、微小核体媒介性遺伝子移入、スフェロプラスト融合、ならびにレシピエント細胞の、必要な発達機能および生理学的機能がその移入によって崩壊されないことを確実にする、類似の方法論。例えば、ＬｏｅｆｆｌｅｒおよびＢｅｈｒ、１９９３．Ｍｅｔｈ　Ｅｎｚｙｍｏｌ　２１７：５９９～６１８を参照のこと。選択された技術は、核酸の細胞への安定な移入を提供すべきであり、その結果、核酸は、細胞により発現可能である。好ましくは、この移入された核酸は、遺伝性でありかつ細胞子孫により発現可能である。代替の実施形態において、この移入された核酸は、エピソームを残し、かつそうでなければサイレントな内因性核酸の発現を誘導する。

【０１４０】

本発明の好ましい実施形態において、得られる組換え細胞は、当該分野で公知の種々の方法によって、患者に送達され得る。これらの方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：上皮細胞の注射（例えば、皮下）、患者への皮膚移植片のような組換え皮膚細胞の適用、および組換え血球（例えば、造血幹細胞または前駆細胞）または肝細胞の静脈内注射。使用に向けて想定された細胞の総量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者によって決定され得る。

【０１４１】

遺伝子療法のために核酸が導入され得る細胞は、任意の所望で、利用可能な細胞型を含み、この細胞は、異種、異種遺伝子型、同系、または自己由来であり得る。細胞型としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：分化型細胞（例えば、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞、血球）、あるいは種々の幹細胞または前駆細胞、特に、胚性心筋細胞、肝臓幹細胞（国際特許公開ＷＯ９４／０８５９８）、神経幹細胞（ＳｔｅｍｐｌｅおよびＡｎｄｅｒｓｏｎ，１９９２，Ｃｅｌｌ　７１：９７３～９８５）、例えば、骨髄から得られるような造血幹細胞または前駆細胞、臍帯血、末

梢血、胎児肝臓など。好ましい実施形態において、遺伝子療法のために利用される細胞は、患者に対して自己由来である。

【０１４２】

（薬学的組成物）

本発明の化合物（例えば、ｓＨＩＦポリペプチド、ｓＨＩＦポリペプチドをコードする核酸、およびｓＨＩＦ抗体（本明細書中で、「活性化合物」とも呼ばれる））、ならびにそれらの誘導体、フラグメント、アナログおよびホモログは、投与に適切な薬学的組成物に取り込まれ得る。このような組成物は、代表的には、核酸分子、またはタンパク質、および薬学的に受容可能なキャリアを含有する。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的投与に適した、任意および全ての、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張性遅延剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。適切なキャリアは、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（この分野における標準的な参考書）の最新版に記載されている（これは、本明細書中で参考として援用される）。このようなキャリアまたは希釈液の好ましい例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、および５％ヒト血清アルブミン。リポソームおよび非水性ビヒクル（例えば、固定油）もまた、使用され得る。薬学的に活性な物質のための、このような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性化合物と不適合性であること以外、組成物におけるそれらの使用が企図される。補充された活性化合物もまた、それらの組成物中に取り込まれえる。

【０１４３】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合するように処方される。投与経路の例としては、非経口投与（例えば、静脈内）、皮内投与、皮下投与、経口投与（例えば、吸入）、経皮投与（局所的）、経粘膜投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用、または皮下適用に使用するための溶液または懸濁液としては、以下の成分が挙げられ得る：滅菌希釈液（例えば、注射用水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸または二硫酸ナトリウム）；キレート化剤（例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸）；緩衝剤（例えば、アセテート、シトレートまたはホスフェート）、および緊張度の調整用の薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。ｐＨは、酸または塩基（例えば、塩酸または塩化ナトリウム）で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨て可能なシリンジ、またはガラスもしくはプラスチックから作製された複数用量のバイアルに封入され得る。

【０１４４】

注射可能な使用に適切な薬学的組成物としては、滅菌水溶液（水に溶解性の場合）または分散剤および滅菌注射可能な溶液または分散剤の即席調製用の滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与について、適切なキャリアとしては、生理学的生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ^{TM}（ＢＡＳＦ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．）またはリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）が挙げられる。全ての場合において、この組成物は、滅菌性でなければならず、かつ容易なシリンジ性能が存在する程度の流体でなければならない。この組成物は、製造および保存の条件下で安定でなければならず、かつ細菌および真菌のような微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。キャリアはまた、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含有する、溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）を使用することによって、分散の場合に必要とされる粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって、維持され得る。微生物の活動の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなど）によって達成され得る。多くの場合において、組成物中に、等張剤（

例えば、糖）、ポリアルコール（例えば、マニトール（ｍａｎｉｔｏｌ））、ソルビトール、塩化ナトリウムを含有することが好ましい。注射可能な組成物の延長された吸収は、この組成物中に、吸収を遅滞する薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を含有させることによってなされ得る。

【０１４５】

滅菌注射可能な溶液は、適切な溶媒に必要な量の活性化合物（例えば、ｓＨＩＦポリペプチドまたは核酸をコードするｓＨＩＦ）を、上に列挙される成分の１つ以上の組み合わせとともに取り込み、必要な場合、滅菌濾過することによって、調製され得る。一般的には、分散物（ｄｉｓｐｅｒｓｉｏｎ）は、この活性化合物を、滅菌ビヒクル（塩基性分散媒体および上に列挙される成分からの必要な他の成分を含有する）中に取り込むことによって調製される。滅菌注射可能な溶液の調製用の滅菌粉末の場合、調製方法は、活性成分および前出の滅菌濾過溶液からの任意のさらなる所望成分の粉末を生じる、減圧乾燥および凍結乾燥である。

【０１４６】

経口組成物としては、一般に、不活性希釈液または食用キャリアが挙げられる。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るかまたは錠剤内に圧縮され得る。経口治療投与の目的で、活性化合物は、賦形剤と併用され得、錠剤、トローチ、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬として使用するために液体キャリアを使用して、調製され得、ここで、この流体キャリア中の化合物は、経口に適用され、うがいされ（ｓｗｉｓｈｅｄ）そして喀痰されるかまたは飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および／またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含有され得る。錠剤、ピル、カプセル剤、トローチなどは、以下の成分のいずれか、または類似の性質の化合物を含有し得る：結合剤（例えば、微結晶性セルロース、トラガントゴムまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、スターチまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギニン酸、Ｐｒｉｍｏｇｅｌ、またはコーンスターチ）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはＳｔｅｒｏｔｅｓ）；活動促進剤（ｇｌｉｄａｎｔ）（例えば、コロイド二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは、香料剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ香料）。

【０１４７】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のようなガス）を含む圧縮容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器からエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【０１４８】

全身投与はまた、経粘膜手段または経皮手段であり得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透するのを遮断するのに適切な浸透剤が、この処方物において使用される。このような浸透剤は、一般に、当該分野で公知であり、これらとしては、例えば、経粘膜投与用の、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用を介して達成され得る。経皮投与について、活性化合物は、軟膏（ｏｉｎｔｍｅｎｔ）、軟膏（ｓａｌｖｅ）、ゲル、または当該分野で一般に知られているクリームに処方される。

【０１４９】

この化合物はまた、坐剤の形態（例えば、従来型の坐剤ベース（例えば、ココアバターおよび他のグリセリド）を有する）かまたは直腸送達用の停留浣腸剤（ｒｅｔｅｎｔｉｏｎ　ｅｎｅｍａｓ）の形態で調製され得る。

【０１５０】

１つの実施形態において、この活性化合物は、身体からの急速な排出に対してこの化合物を保護するキャリア（例えば、制御された放出処方物（インプラント送達系およびマイクロカプセル送達系が挙げられる））を用いて調製される。生分解性の、生体適合性ポリマー（例えば、エチレン、酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が、使用され得る。このような処方物の調製方法は

、当業者に明らかである。これらの材料はまた、Ａｌｚａ　ＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎおよびＮｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃから市販されている。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対してモノクローナル抗体での感染細胞に標的化されるリポソームが挙げられる）もまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号（これは、完全に、本明細書中で参考として援用される）に記載されるような、当業者に公知の方法に従って精製され得る。

【０１５１】

投与および投薬の均一性を容易にするために、投薬単位形態の経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有利である。本明細書中で使用されるような投薬単位形態は、処置されるべき被験体のための単一投薬量として適した物理的に個別の単位を言う；各単位は、必要とされる薬学的キャリアに関連する所望の治療効果をもたらすように計算された予測された量の活性化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、活性化合物の独自の特徴および達成されるべき特定の治療効果によって、かつそれらに直接依存して決定される。

【０１５２】

その薬学的組成物は、投与のための説明書とともに、容器、パック、またはディスペンサーを備え得る。

【０１５３】

本発明は、以下の実施例においてさらに記載されるが、これらは、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【０１５４】

（実施例１：ｐＶＨＬ－ＨＩＦ相互作用（ｉｎｔｅｒａｔｉｏｎ）に対する塩化コバルト処理およびデスフェリオキサミン処理の効果）

ｐＶＨＬ欠損腎臓癌細胞を、塩化コバルトおよびデスフェリオキサミンの増加量で処理した。未処理の細胞は、ファーウェスタンブロットアッセイ（ｆａｒ　ｗｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔ　ａｓｓａｙ）において、組換えｐＶＨＬ／エロンガンＢ／エロンガンＣ（ＶＢＣ）に直接結合する高レベルのＨＩＦ２αを含んだ（図１Ａ）。対照的に、ＶＢＣは、塩化コバルトまたはデスフェリオキサミンで処理した細胞から単離されたＨＩＦ２αを認識しなかった。

【０１５５】

低酸素は、塩化コバルトおよびデスフェリオキサミンとは対照的に、ＨＩＦポリユビキチン結合を阻害するが、ｐＶＨＬおよびＨＩＦの物理的結合は阻害しない。低酸素によるＨＩＦの生理的調節が、塩化コバルトおよびデスフェリオキサミンの薬学的な効果とは機構的に異なることを示唆する。しかし、酸素への細胞抽出物の曝露は、ｐＶＨＬ／ＨＩＦ複合体の後溶解（ｐｏｓｔｌｙｓｉｓ）の再編成を可能にし得る。このことに取り組むために、Ｅ１ユビキチン活性化酵素（１９）に温度感受性変異を有するマウス細胞（ｔｓ２０）を、低酸素条件下または酸素正常条件下のいずれかにおいて非許容温度で増殖させた結果、ＨＩＦは、酸素（２０）の存在下または非存在下で蓄積した。次いで、その細胞を迅速に溶解し、そしてＶＢＣでファーウェスタンブロット（ｆａｒｗｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔ）した。ＶＢＣは、酸素の存在下で蓄積されたＨＩＦを認識しただけであった（図１Ｂ）。これらの２つの設定でのＨＩＦ１αの類似の誘導を、抗－ＨＩＦ１αイムノブロット分析によって確認した。集合的に、これらの実験は、ｐＶＨＬとＨＩＦの相互作用が、酸素および鉄依存性であるＨＩＦの翻訳後修飾によって支配されることを示す。

【０１５６】

（実施例２：ｐＶＨＬは、ＨＩＦの特異的な改変形態を認識する）

ＨＩＦ１αの領域に結合するｐＶＨＬは、酸素依存性分解ドメイン（ＯＤＤ）（７）と呼ばれた。ｐＶＨＬは、ウサギ網状赤血球溶解物中で産生されたＨＩＦには結合するが、コムギ胚芽抽出物またはＥ．ｃｏｌｉ（１６）中で産生されたＨＩＦには結合しないことが観察された。さらに、コムギ胚芽またはＥ．ｃｏｌｉから誘導されたＨＩＦは、ヒト、

ウサギまたはＸｅｎｏｐｕｓ細胞抽出物との３７℃でのプレインキュベーション後にｐＶＨＬ結合活性を必要とした（１６）。例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ中で産生されたグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ－ＯＤＤ融合タンパク質は、ウサギ網状赤血球溶解物とのプレインキュベーションを除いては、ＶＢＣによって認識されなかった（図１Ｃ）。ＶＢＣは、熱不活性化網状赤血球溶解物とともにインキュベートされたＧＳＴ－ＯＤＤ融合タンパク質を認識しなかった（図１Ｄ）。これらの結果は、ｐＶＨＬがＨＩＦの改変された形態を認識すること、およびこの改変が、種々の脊椎動物細胞抽出物中に存在する因子によって行なわれることを示す。

【０１５７】

（実施例３：ｐＶＨＬによって認識される改変ＨＩＦの分析）

この改変の性質を決定するために、本発明者らは、ｐＶＨＬに結合するＨＩＦの領域を決定した。ＨＩＦ残基５５５～５７５を含むＧａｌ４－ＨＩＦ融合タンパク質は、固定されたＧＳＴ－ＶＨＬ、エロンガンＢ、エロンガンＣ複合体に特異的に結合した（図２Ａおよび２Ｅを参照のこと）（１３、１７）。同様に、ＨＩＦ残基５５６～５７５に対応するビオチン化ペプチドは、網状赤血球溶解物とのプレインキュベーション後にｐＶＨＬに結合した（図２Ｂ）（１８）。他の者によって示されるように、ＨＩＦのこの領域は、高度に保存された８マー（ＭＬＡＰＹＩＰＭ）（配列番号８）（図２Ｅ）を含み、これは、８個の連続するアラニンに変異される場合、ＨＩＦ安定化を導く（１９）。この領域のアラニンスキャンは、Ｌｅｕ５６２およびＰｒｏ５６４が、ｐＶＨＬに対する特異的な結合に必須であることを示した（図２Ｂ）。対照的に、このペプチド中の１つの可能性のあるホスホアクセプター（Ｔｙｒ５６５）の変異は、ｐＶＨＬ結合に影響を及ぼさず、このことは、Ｔｙｒ５６５Ｐｈｅ変異がＨＩＦ安定性に影響を与えなかったという以前の研究と一致する（２０）。さらに、ホスファターゼ処理は、これらのアッセイにおいて、ＧＳＴ－ＯＤＤに対するｐＶＨＬの結合に影響を与えなかった（１６）。

【０１５８】

重要なことに、全長ＨＩＦ１αまたはＧａｌ４－ＯＤＤ融合タンパク質の環境中のＬｅｕ５６２またはＰｒｏ５６４のいずれかの変異は、ｐＶＨＬ結合活性を抑止した（図２Ｃおよび２Ｄ）。網状赤血球溶解物中で合成されたＧａｌ４－ＯＤＤは、小麦麦芽由来のＧａｌ４－ＯＤＤ調製物では非存在である電気泳動的に異なるバンドをを含んだことが注目される（図２Ｄ）。対応するタンパク質はＶＢＣに結合し、そしてＬｅｕ５６２Ａｌａ翻訳産物およびＰｒｏ５６４Ａｌａ翻訳産物間では検出され得ず、このことは、このタンパク質がＬｅｕ５６２またはＰｒｏ５６４の翻訳後修飾を含み得ることを示唆する。２Ｄタンパク質ゲル電気泳動によって、この推定改変が、タンパク質電荷における変更を含まないことが示唆された（１６）。

【０１５９】

ｐＶＨＬ結合アッセイと一致して、Ｌｅｕ５６２ＡｌａまたはＰｒｏ５６４Ａｌａの変異を有するＧａｌ４－ＨＩＦ融合タンパク質は、インビトロにおいてｐＶＨＬ依存性ポリユビキチン化の減少を示した（図３Ａ）（１３）。定性的に類似の結果が、対応する全長ＨＩＦ１α種を用いて得られた（１６）。同様に、全長ＨＩＦ１αのＰｒｏ５６４ＡｌａおよびＨＩＦ１α　Ｌｅｕ５６２Ａｌａは、Ｘｅｎｏｐｕｓ抽出物を用いて実行された分解アッセイにおいて、野生型ＨＩＦ１αよりもより安定であった（２１）（図３Ｂ）。

【０１６０】

（実施例４：ＨＩＦ改変がプロリンヒドロキシル化であることの決定）

ＨＩＦ改変がプロリンヒドロキシル化であるか否かを決定するために、ビオチン化ＨＩＦ（５５６～５７５）ペプチドを、網状赤血球溶解物と共にインキュベートし、遊離のビオチンと共にペプチドを溶出し、そしてこれらを質量分析器によって分析した（２３）。これらの実験において、まぎらわしいメチオニンの酸化を妨害するために、Ｍｅｔ５６１およびＭｅｔ５６８をアラニンと置換した。これらの置換は、ｐＶＨＬ結合に影響を与えなかった（１６）。ウサギ網状赤血球溶解物を用いて予備処理されたＨＩＦペプチドサンプルは、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ分析において、１６の分子量の増加に対応する第２のピーク

を含んだ（図４Ａ）。このピークは、網状赤血球溶解物とインキュベーションする前のペプチド調製物においても、網状赤血球処理したＬｅｕ５６２Ａｌａペプチドおよびプロ５６４Ａｌａペプチドにおいても検出され得なかった（図４Ａ）（１６）。エレクトロスプレーイオントラップタンデム質量分析計（ＭＳ／ＭＳ）によって、Ｐｒｏ５６４における＋１６の付加が確認され、Ｌｅｕ５６２のそのような改変は排除された（２４）。さらに、網状赤血球処理したＨＩＦ（５５６～５７５）ペプチドのイオントラップＭＳ／ＭＳは、５６４位にヒドロキシプロリンを含む合成ＨＩＦ（５５６～５７５）ペプチドを用いて得られたものと同一の生成物イオンスペクトルを生成した（１６）。Ｇａｌ４－ＨＩＦ（５５５～５７５）は、網状赤血球溶解物または小麦麦芽抽出物を用いて^{3}Ｈ－プロリンの存在下で翻訳され、これを電気泳動ゲルを用いて単離し、そしてこれを酸加水分解および薄層クロマトグラフィーに供した（１７、２５）。ウサギ網状赤血球溶解物中で生成されるが小麦麦芽で生成されないＧａｌ４－ＨＩＦは、ヒドロキシプロリンを含んだ（図４Ｂ）。

【０１６１】

予想されるように、５６４位にヒドロキシプロリンを含むＨＩＦ（５５６～５７５）ペプチドは、網状赤血球溶解物を用いた予備処理ありまたは予備処理なしにおいてｐＶＨＬに結合した（図５Ａ）。Ｌｅｕ５６２Ａｌａペプチドの質量分析法分析は、Ｌｅｕ５６２がＨＩＦ改変に必要とされることを示した（図４Ａ）が、Ｌｅｕ５６２がｐＶＨＬに対する結合に必要とは限らないという可能性を残す。実際、ｐＶＨＬは、Ｌｅｕ５６２Ａｌａ置換および５６４残基のヒドロキシプロリンを有するＨＩＦ（５５６～５７５）ペプチドに結合した（図５Ｂ）。このことは、Ｌｅｕ５６２がＰｒｏ５６４のヒドロキシル化を促進することを示唆する。

【０１６２】

（実施例５：細胞由来のｐＶＨＬ複合体と相互作用するヒドロキシル化ＨＩＦの分析）

Ｔｓ２０細胞を、ＨＡタグ化ｐＶＨＬを生成するように操作した（２６）。制限された温度（ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｖｅ　ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ）でＨＡ－ｐＶＨＬに結合するＨＩＦは、ヒドロキシル化ＨＩＦ（５５６～５７５）ペプチドによって溶出され得るが、未改変ペプチドでは溶出され得ないことが見出された（２７）（図５Ｃ）。さらに、ＨＩＦは、ＨＩＦ（５５６～５７５）Ｐｒｏ５６４Ａｌａペプチドによっても、ポリヒドロキシプロリンペプチドによっても溶出されない（図５Ｃ）。固定されたペプチド、およびＨＡ－ｐＶＨＬを産生するか（ＷＴ８）または産生しない（ＲＣ３）代謝的に標識された適合する腎臓癌腫細胞を用いて、アフィニティークロマトグラフィーを実行した（１８、２７、２８）。ヒドロキシル化されたＨＩＦ（５５６～５７５）ペプチドは、ｐＶＨＬ、ならびにｐＶＨＬ関連タンパク質（エロンガンＢ、エロンガンＣ、およびＣｕｌ２）の予想された電気泳動移動度を有するタンパク質に特異的に結合した（図５Ｄ）。これらの結果は、ｐＶＨＬが、ＨＩＦ１α中に存在するプロリンヒドロキシル化エピトープを認識することを示す。この考えと一致して、Ｐｒｏ５６４Ａｌａ変異を含むＨＩＦ１α変異体は、ＣＯＳ７細胞中で増強された安定性を示し、そして低酸素擬似デスフェリオキサミンに対して無反応であった（図３Ｃ）。

【０１６３】

（実施例６：ＨＩＦ１α　Ｐｒｏ５６４Ａｌａ変異体の生成）

ＨＩＦ１α　Ｐｒｏ５６４Ａｌａ変異体ｃＤＮＡを、２工程ＰＣＲによって生成した。野生型ＨＩＦ１α　ｃＤＮＡを、以下のプライマーを用いてＰＣＲ増幅した

【０１６４】

【化１】

プライマーA (GCGCGGATCCGCCACCATGGAG)(配列番号9)

プライマーB (CATTGGGATATAAGCAGCTAACATCTC)(配列番号10)

プライマーC (GAGATGTTAGCTGCTTATATCCCAATG)(配列番号11)

プライマーD (GCGCCAATTGTCAGTTAACTTG)(配列番号12)

。次いで、ＰＣＲ産物を混合し、そしてプライマーＡおよびプライマーＤを用いて増幅した。得られるＰＣＲ産物をＢａｍ ＨＩおよびＭｕｎ Ｉを用いて消化し、そしてＢａｍ ＨＩおよびＥｃｏ ＲＩを用いて消化したｐｃＤＮＡ３．０－ＨＡに連結した。得られるｃＤＮＡをＤＮＡ配列決定によって確認した。

【０１６５】

（実施例７：ＨＩＦ２α Ｐｒｏ５３１Ａｌａ変異体の生成）

ＨＩＦ２α Ｐｒｏ５３１Ａｌａ変異体ｃＤＮＡを、２工程ＰＣＲによって生成した。野生型ＨＩＦ２α ｃＤＮＡを、以下のプライマーを用いてＰＣＲ増幅した

【０１６６】

【化２】

プライマーA (GCGCGGATCCGCCACCATGACA)(配列番号13)

プライマーB (CATGGGGATATAAGCTGCCAGTGTCTC)(配列番号14)

プライマーC (GAGACACTGGCAGCTTATATCCCCATG)(配列番号15)

プライマーD (GCGCCAATTGTCAGGTGGCCTGGTC)(配列番号16)

。次いで、ＰＣＲ産物を混合し、そしてプライマーＡおよびプライマーＤを用いて増幅した。得られるＰＣＲ産物をＢａｍ ＨＩおよびＭｕｎ Ｉを用いて消化し、そしてＢａｍ ＨＩおよびＥｃｏ ＲＩを用いて消化したｐｃＤＮＡ３．０－ＨＡベクターに連結した。得られるｃＤＮＡをＤＮＡ配列決定によって確認した。

【０１６７】

（実施例８：ＨＩＦムテインポリペプチドの配列）

ＨＩＦムテインポリペプチドの配列を、配列番号５に示す。変異を太字で示す。野生型ＨＩＦα中の５６２位のロイシンを、配列番号５においてアラニンで置換した。

【０１６８】

【化３】

```
        1 megaggandk kkisserrke ksrdaarsrr skesevfyel ahqlplphnv
sshldkasvm
       61 rltisylrvr klldagdldi eddmkaqmnc fylkaldgfv mvltddgdmi
yisdnvnkym
      121 gltqfeltgh svfdfthpcd heemremlth rnglvkkgke qntqrsfflr
mkctltsrgr
      181 tmniksatwk vlhctghihv ydtnsnqpqc gykkppmtcl vlicepiphp
snieipldsk
      241 tflsrhsldm kfsycderit elmgyepeel lgrsiyeyyh aldsdhltkt
hhdmftkgqv
      301 ttgqyrmlak rggyvwvetq atviyntkns qpqcivcvny vvsgiiqhdl
ifslqqtecv
      361 lkpvessdmk mtqlftkves edtsslfdkl kkepdaltll apaagdtiis
ldfgsndtet
      421 ddqqleevpl yndvmlpspn eklqninlam splptaetpk plrssadpal
nqevalklep
      481 npeslelsft mpqiqdqtps psdgstrqss pepnspseyc fyvdsdmvne
fklelveklf
      541 aedteaknpf stqdtdldle maapyipmdd dfqlrsfdql splesssasp
esaspqstvt
      601 vfqqtqiqep tanattttat tdelktvtkd rmedikilia spspthihke
ttsatsspyr
      661 dtqsrtaspn ragkgvieqt ekshprspnv lsvalsqrtt vpeeelnpki
lalqnaqrkr
      721 kmehdgslfq avgigtllqq pddhaattsl swkrvkgcks seqngmeqkt
iilipsdlac
      781 rllgqsmdes glpqltsydc evnapiqgsr nllqgeellr aldqvn
```

（配列番号5）

（実施例９：ＨＩＦムテインポリペプチドの配列）

ＨＩＦムテインポリペプチドの配列を、配列番号６に示す。変異を太字で示す。野生型ＨＩＦα中の５６２位のロイシンおよび５６４位のプロリンを、配列番号６においてアラニンで置換した。

【０１６９】

【化４】

```
      1 megaggandk kkisserrke ksrdaarsrr skesevfyel ahqlplphnv
sshldkasvm
     61 rltisylrvr klldagdldi eddmkaqmnc fylkaldgfv mvltddgdmi
yisdnvnkym
    121 gltqfeltgh svfdfthpcd heemremlth rnglvkkgke qntqrsfflr
mkctltsrgr
    181 tmniksatwk vlhctghihv ydtnsnqpqc gykkppmtcl vlicepiphp
snieipldsk
    241 tflsrhsldm kfsycderit elmgyepeel lgrsiyeyyh aldsdhltkt
hhdmftkgqv
    301 ttgqyrmlak rggyvwvetq atviyntkns qpqcivcvny vvsgiiqhdl
ifslqqtecv
    361 lkpvessdmk mtqlftkves edtsslfdkl kkepdaltll apaagdtiis
ldfgsndtet
    421 ddqqleevpl yndvmlpspn eklqninlam splptaetpk plrssadpal
nqevalklep
    481 npeslelsft mpqiqdqtps psdgstrqss pepnspseyc fyvdsdmvne
fklelveklf
    541 aedteaknpf stqdtdldle maaayipmdd dfqlrsfdql splesssasp
esaspqstvt
    601 vfqqtqiqep tanattttat tdelktvtkd rmedikilia spspthihke
ttsatsspyr
    661 dtqsrtaspn ragkgvieqt ekshprspnv lsvalsqrtt vpeeelnpki
lalqnaqrkr
    721 kmehdgslfq avgigtllqq pddhaattsl swkrvkgcks seqngmeqkt
iilipsdlac
    781 rllgqsmdes glpqltsydc evnapiqgsr nllqgeellr aldqvn
```

（実施例１０：ＨＩＦムテインポリペプチドの配列）

ＨＩＦムテインポリペプチドの配列を、配列番号７に示す。変異を太字で示す。野生型ＨＩＦα中の４０２位のプロリン、５６２位のロイシン、および５６４位のプロリンを、配列番号７においてアラニンで置換した。

【０１７０】

【化５】

```
   1 megaggandk kkisserrke ksrdaarsrr skesevfyel ahqlplphnv
sshldkasvm
  61 rltisylrvr klldagdldi eddmkaqmnc fylkaldgfv mvltddgdmi
yisdnvnkym
 121 gltqfeltgh svfdfthpcd heemremlth rnglvkkgke qntqrsfflr
mkctltsrgr
 181 tmniksatwk vlhctghihv ydtnsnqpqc gykkppmtcl vlicepiphp
snieipldsk
 241 tflsrhsldm kfsycderit elmgyepeel lgrsiyeyyh aldsdhltkt
hhdmftkgqv
 301 ttgqyrmlak rggyvwvetq atviyntkns qpqcivcvny vvsgiiqhdl
ifslqqtecv
 361 lkpvessdmk mtqlftkves edtsslfdkl kkepdaltll aaaagdtiis
ldfgsndtet
 421 ddqqleevpl yndvmlpspn eklqninlam splptaetpk plrssadpal
nqevalklep
 481 npeslelsft mpqiqdqtps psdgstrqss pepnspseyc fyvdsdmvne
fklelveklf
 541 aedteaknpf stqdtdldle maaayipmdd dfqlrsfdql splesssasp
esaspqstvt
 601 vfqqtqiqep tanattttat tdelktvtkd rmedikilia spspthihke
ttsatsspyr
 661 dtqsrtaspn ragkgvieqt ekshprspnv lsvalsqrtt vpeeelnpki
lalqnaqrkr
 721 kmehdgslfq avgigtllqq pddhaattsl swkrvkgcks seqngmeqkt
iilipsdlac
 781 rllgqsmdes glpqltsydc evnapiqgsr nllqgeellr aldqvn
```

（配列番号7）

（参考文献および留意事項）

【０１７１】

【化６】

1. G. Semenza, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 551 (1999).

2. R. Wenger, *J Exp. Biol.* **203**, 1253 (2000).

3. G. Semenza, *Cell* **98** , 281 (1999).

4. H. Zhu, F. Bunn, *Resp. Phys.* **115**, 239 (1999).

5. M. Ivan, W. G. Kaelin, *Curr. Opin. Gen. and Dev.* **11**, 27 (2001).

6. C. E. Stebbins, W. G. Kaelin, N. P. Pavletich, *Science* **284**, 455 (1999).

7. M. Ohh, *et al.*, *Nature Cell Biol.* **2**, 423 (2000).

8. T. Kamura, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **97**, 10430 (2000).

9. M. Cockman, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **275**, 25733 (2000).

10. K. Tanimoto, Y. Makino, T. Pereira, L. Poellinger, *EMBO J.* **19**, 4298 (2000).

11. R. Deshaies, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol* **.15**, 435 (1999).

12. P. Maxwell, *et al.*, *Nature* **399**, 271 (1999).

１３．ファーウエスタンブロットアッセイ、ＧＳＴ－プルダウンアッセイ、およびインビトロユビキチン化アッセイを、（７）に記載されるように実行した。

１４．Ｄ．Ｃｈｏｗｄａｒｙ，Ｊ．Ｄｅｒｍｏｄｙ，Ｋ．Ｊｈａ，Ｈ．Ｏｚｅｒ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１４，１９９７（１９９４）。

１５．酸素正常状態細胞（ｎｏｒｍｏｘｉｃ ｃｅｌｌ）を、制限された温度（３９℃）または許容温度（ｐｅｒｍｉｓｓｉｖｅ ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ）（３３℃）で１２時間増殖させた。低酸素細胞を、許容温度において６時間、１％ O_2 の存在下で増殖させ、次いで、制限された温度において１２時間増殖させた。この細胞を、ＥＢＣ（５０ｍＭ ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、１２０ｍＭ ＮａＣｌ、０．５％ ＮＰ－４０）中で５分間４℃でインキュベーションすることによって溶解した。１４，０００ｇで３分間の遠心分離後、清澄した溶解物を、ＳＤＳ中で煮沸した。

１６．Ｍ．Ｉｖａｎ，Ｍ．Ｏｈｈ，Ｊ．Ａｓａｒａ，Ｗ．Ｓ．Ｌａｎｅ，およびＷ．Ｇ．Ｋａｅｌｉｎ（未公開データ）。

１７．^{35}Ｓ標識タンパク質の連結インビトロ転写／翻訳（ｃｏｕｐｌｅｄ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ／ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ）を、製造業者の指示書（ＴＮＴ，Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）に従って実行した。^{3}Ｈ－Ｐ－標識Ｇａｌ４－ＨＩＦ（５５５～５７５）のインビトロ翻訳を、同様に、４５０μｌのＬ－［２，３，４，５－^{3}Ｈ］－プロリン（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｎｕｃｌｅａｒ）を含む２ｍｌ反応物中で実行した。

１８．ペプチド結合研究のために、１μｇのビオチン化ペプチドを３０μｌの単量体アビジンアガロース（Ｐｉｅｒｃｅ）に結合させた。示される場合、このペプチドを、５０μｌのウサギ網状赤血球溶解物を用いて９０分間３０℃でプレインキュベートした。次いで

、アガロースを、ＮＥＴＮ（２０ｍＭ　ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５％　Ｎ－Ｐ４０）を用いて３回洗浄し、そして５００μｌのＥＢＣまたは５００μｌの^{35}Ｓ放射性標識細胞抽出物（サブコンフルエントな１００ｍｍディッシュからの細胞に等価）中に４μｌの^{35}Ｓ－ＨＡ－ｐＶＨＬを含む結合反応物に使用した。４℃で１時間インキュベーションした後、このアガロースをＮＥＴＮを用いて４回洗浄した。結合したタンパク質を、ＳＤＳ含有サンプル緩衝液中での煮沸によって溶出し、そしてオートラジオグラフィーによって検出した。

１９．Ｖ．Ｓｒｉｎｉｖａｓ，Ｌ．Ｚｈａｎｇ，Ｘ．Ｚｈｕ，Ｊ．Ｃａｒｏ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２６０，５５７（１９９９）。

２０．Ｃ．Ｐｕｇｈ，Ｊ．Ｏ’Ｒｏｕｒｋｅ，Ｍ．Ｎａｇａｏ，Ｊ．Ｇｌｅａｄｌｅ，Ｐ．Ｒａｔｃｌｉｆｆｅ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２，１１２０５（１９９７）。

２１．Ｘｅｎｏｐｕｓ卵抽出物を調製し（Ａ．Ｓａｌｉｃ，Ｅ．Ｌｅｅ，Ｌ．Ｍａｙｅｒ，Ｍ．Ｋｉｒｓｃｈｎｅｒ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．５，５２３（２０００））、そして凍結保存した。分解反応は、８μｌの卵抽出物、０．１μｌの１００ｍｇ／ｍｌ　シクロヘキサミド、０．２５μｌのエネルギー再生混合物、０．２５μｌのウシユビキチン、および０．４μｌの^{35}Ｓ放射性標識ＨＩＦを含み、そして室温で実行した。示される時点において、１μｌのアリコートを取り出し、そしてサンプル緩衝液に置いた。サンプルを、５～１５％の勾配のゲル上で分離し、そしてオートラジオグラフィーによって分析した。

２２．Ｋ．Ｉ．Ｋｉｖｉｒｉｋｋｏ，Ｊ．Ｍｙｌｌｙｈａｒｊｕ，Ｍａｔｒｉｘ　Ｂｉｏｌ．１６，３５７（１９９８）。

２３．ＨＰＬＣ精製ペプチド（１μｇ）を、３０μｌの単量体アビジンアガロースに結合させ、そして１００μｌのウサギ網状赤血球溶解物を用いて室温で１時間、転倒混和させながらインキュベートした。簡単に遠心分離した後、網状赤血球溶解物を取り出し、新しい網状赤血球溶解物を添加し、そしてこのサイクルを６回繰り返した。次いで、アガロースを、ＮＥＴＮを用いて４回洗浄し、そしてＰＢＳを用いて１回洗浄した。改変したペプチドを、５０μｌの２０ｍＭ　酢酸アンモニウム（ｐＨ７．０）、２ｍＭ　ビオチン中で溶出した。プロリン５６４ヒドロキシル化を、特注のナノエレクトロスプレー源を装備したＦｉｎｎｉｇａｎ　ＬＣＱ　ＤＥＣＡ　四重極イオントラップ質量分析計に直接接続したマイクロキャピラリーＨＰＬＣを用いてＭＳ／ＭＳによって確認した。ＨＩＦ（５５６～５７５）ペプチドに対してｍ／ｚ　１２６７において二重にプロトン化されたイオンの標的化されたイオンＭＳ／ＭＳ（ＴＩＭＭ）を、２．５ダルトンの単離幅および３０％の相対衝突エネルギーで実行した。

２４．ｗｗｗ．ｓｃｉｅｎｃｅオンラインアドレス

２５．インビトロ翻訳における２ｍｌの^{3}Ｈ－Ｐ－標識Ｇａｌ４－ＨＩＦ（５５５～５７５）を、５０μｇの抗ＨＡ抗体（１２ＣＡ５，Ｒｏｃｈｅ）を用いて免疫沈降し、１２％のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルで分離し、そしてポリビニリデンフルオリド（ＰＶＤＦ）膜に転写した。Ｇａｌ４－ＨＩＦ（５５５～５７５）を、オートラジオグラフィーによって可視化し、そしてこの膜の対応する領域を切り出し、そして１００μｌの１０ＮＨＣｌ中、１０５℃で３時間インキュベーションすることによって加水分解した。サンプルを蒸発させて乾燥させ、１０μｇの未標識プロリンおよび４－ＯＨプロリン（Ｓｉｇｍａ）を含む２０μｌのH_2O中に再懸濁し、そして２Ｄ薄層クロマトグラフィー（第１次元にはフェノール－蒸留水を使用し、そして第２次元にはＮ－ブタノール－酢酸－H_2Oを使用）によって分離した（Ｊ．Ｌｕｄｌｏｗ，Ｒ．Ｃｏｎｓｉｇｌｉ，Ｊ　Ｖｉｒｏｌ　１９８９　６３，２８８１－４（１９８９）］。ニンヒドリンを用いた標準物の可視化の後、放射性標識プロリンをオートラジオグラフィーによって検出した。

２６．ｔｓ２０細胞を、ｐＩＲＥＳ－ＨＡ－ＶＨＬ、ｐＩＲＥＳ－ＨＡ－ＶＨＬ（Ｙ９８Ｈ）、またはｐＩＲＥＳ－Ｎｅｏ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）でトランスフェクトし、そして１ｍｇ／ｍｌ　Ｇ４１８の存在下で選択した。個々のＧ４１８耐性コロニーをクローニングシリンダーを用いて単離し、そして増殖させた。ＨＡ－ＶＨＬまたはＨＡ－ＶＨＬ（Ｙ９８Ｈ）を産生する細胞を、抗ＨＡ免疫ブロット分析によって同定した。

２７．ｔｓ２０細胞を、制限温度または許容温度で１４時間増殖させ、メチオニンに対して９０分間飢餓させ、次いで、^{35}Ｓ－ｍｅｔ（５００μＣｉ／ｍｌ）を補充したメチオニン不含培地中で９０分間増殖させた。細胞を、冷ＰＢＳを用いて１回洗浄し、ＥＢＣ中で溶解し、そして抗ＨＡ（１２ＣＡ５；Ｒｏｃｈｅ）または抗ＨＩＦ１α（ＮＢ１００－１０５；Ｎｏｖｕｓ）を用いて免疫沈降した。ＮＥＴＮで５回洗浄した後、結合したタンパク質をサンプル緩衝液中で煮沸することによって溶出するか、または示されたペプチドを７μｇ含む６５μｌのＰＢＳ中でインキュベーションすることによって溶出した。７８６－Ｏのサブクローンを、１時間飢餓させ、^{35}Ｓ－ｍｅｔ（５００μＣｉ／ｍｌ）を補充したメチオニン不含培地中で３時間増殖させ、氷冷ＰＢＳを用いて１回洗浄し、そしてＥＢＣ中で溶解した。

【０１７２】

【化７】

28. O. Iliopoulos, A. Kibel, S. Gray, W. G. Kaelin, *Nature Med.* **1**, 822 (1995).

29. P. Jaakkola, et al., *Science*（印刷中）

30. Y. Takahashi, S. Takahashi, Y. Shiga, T. Yoshimi, T. Miura, *J. Biol. Chem.* **275**, 14139 (2000).

31. C. Levene, C. Bates, *Biochim. Biophys. Acta* **444**, 446 (1976).

32. M. Bickel, *et al.*, *Hepatology* **28**, 404 (1998).

33. T. Franklin, W. Morris, P. Edwards, M. Large, R. Stephenson, *Biochem J* **353**, 333 (2001).

34. L. Friedman, *et al.*, *Proc. Natl .Acad. Sci . U S A* **97**, 4736 (2000).

（他の実施形態）

本発明は、本発明の詳細な説明と共に記載されるが、上記の説明は、例示することが意図され、本発明の範囲を制限することを意図せず、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定される。他の局面、利点、および改変が、上記の特許請求の範囲の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【０１７３】

【図１Ａ】図１Ａは、ｐＶＨＬがＨＩＦの改変形態に結合することを示すブロットの写真である。ｐＶＨＬ欠損腎癌腫細胞を、漸増量のデスフェリオキサミン（２μｍ、１０μｍ、１００μｍ、１０００μｍ）または塩化コバルト（２μｍ、１０μｍ、１００μｍ、１０００μｍ）を用いて処理し、そしてコントロール（レーン１）または抗ＨＩＦ２α抗体で免疫沈降した。結合したタンパク質を、抗ＨＩＦ２αイムノブロット（ＩＢ）、または精製ｐＶＨＬ／エロンガンＢ／エロンガンＣ（ＶＢＣ）複合体を用いるファーウェスタン（ｆａｒｗｅｓｔｅｒｎ）（ＦＷ）分析によって検出した。

【図１Ｂ】図１Ｂは、ｐＶＨＬがＨＩＦの改変形態に結合することを示すブロットの写真である。低酸素条件または酸素正常状態条件下で制限温度にて増殖したｔｓ２０細胞の、ＶＢＣファーウェスタンおよび抗ＨＩＦ１αイムノブロット分析。

【図１Ｃ】図１Ｃは、ｐＶＨＬがＨＩＦの改変形態に結合することを示すブロットの写真である。酸素依存性分解ドメイン（ＯＤＤ）を含むＧＳＴ－ＨＩＦ１α（５３０～６５２）を、Ｅ．Ｃｏｌｉにおいて生成し、グルタチオンセファロースで回収し、そしてウサギ網状赤血球溶解物と共に３０℃で９０分間インキュベートした。ストリンジェントな洗浄の後、ＧＳＴ－ＯＤＤタンパク質をＶＢＣファーウェスタンおよび抗ＧＳＴイムノブロット分析に供した。

【図１Ｄ】図１Ｄは、ｐＶＨＬがＨＩＦの改変形態に結合することを示すブロットの写真である。酸素依存性分解ドメイン（ＯＤＤ）を含むＧＳＴ－ＨＩＦ１α（５３０～６５２）を、Ｅ．Ｃｏｌｉにおいて生成し、グルタチオンセファロースで回収し、そしてウサギ網状赤血球溶解物と共に３０℃で９０分間インキュベートした。ストリンジェントな洗浄の後、ＧＳＴ－ＯＤＤタンパク質をＶＢＣファーウェスタンおよび抗ＧＳＴイムノブロット分析に供した。レーン３において、網状赤血球溶解物を、最初に２０分間加熱インキュベートした。ストリンジェントな洗浄の後、ＧＳＴ－ＯＤＤタンパク質をＶＢＣファーウェスタンおよび抗ＧＳＴイムノブロット分析に供した。

【図２Ａ】図２Ａは、示された^{35}Ｓ標識Ｇａｌ４－ＨＩＦ１α融合タンパク質の、固定化されたＧＳＴ－ｐＶＨＬ、エロンガンＢ、エロンガンＣ複合体への結合を示すブロットの写真である。

【図２Ｂ】図２Ｂは、^{35}Ｓ標識ｐＶＨＬの、残基５６１～５６８の示された置換を有するビオチン化ＨＩＦ１α（５５６～５７５）ペプチドへの結合を示すブロットの写真である。「＋」は、ｐＶＨＬの添加の前の未プログラム網状赤血球溶解物とペプチドとのプレインキュベートを示す。

【図２Ｃ】図２Ｃは、^{35}Ｓ標識野生型（ＷＴ）、Ｐｒｏ５６４ＡｌａおよびＬｅｕ５６２Ａｌａの全長ＨＡ－ＨＩＦ１αを示すブロットの写真である。

【図２Ｄ】図２Ｄは、^{35}Ｓ標識Ｇａｌ４－ＨＡ－ＨＩＦ１α（５３０～６５２）を示すブロットの写真である。タンパク質を抗ＨＡ抗体で免疫沈降したか、または固定化ＧＳＴ－ＶＢＣ複合体を用いて捕捉した。ＷＧ＝コムギ麦芽抽出物；Ｒｅｔｉｃ＝ウサギ網状赤血球溶解物。

【図２Ｅ】図２Ｅは、ＨＩＦオルソログおよびパラログ（ｐａｒａｌｏｇ）間のＬｅｕ５６２およびＰｒｏ５６４の保存を示す図である。

【図３Ａ】図３Ａは、野生型ｐＶＨＬ生成ベクターまたは空のベクターで安定にトランスフェクトされたｐＶＨＬ欠損腎癌腫細胞から調製したＳ１００抽出物の存在下での、^{35}Ｓ標識した野生型、Ｌｅｕ５６２ＡｌａおよびＰｒｏ５６４ＡｌａのＧａｌ４－ＨＡ－ＨＩＦ１α（５３０～６５２）のインビボでのユビキチン化を示すブロットの写真である。

【図３Ｂ】図３Ｂは、Ｘｅｎｏｐｕｓ卵抽出物における、^{35}Ｓ標識野生型、Ｌｅｕ５６２ＡｌａおよびＰｒｏ５６４Ａｌａのインビボでの分解を示すブロットの写真である。

【図３Ｃ】図３Ｃは、野生型ＨＡ－ＨＩＦ１αまたはＰｒｏ５６４ＡｌａのＨＡ－ＨＩＦ１αをコードするプラスミドの１．５μｇ（レーン１、２、５、６）または３．５μｇ（レーン３、４、７、８）で一過的にトランスフェクトされ、次いでデスフェリオキサミンを含むかまたは含まない培地に移されたＣＯＳ７細胞の、抗ＨＡイムノブロット分析を示すブロットの写真である。

【図４Ａ】図４Ａは、ウサギ網状赤血球溶解物とのインキュベーション後の、野生型、Ｐｒｏ５６４ＡｌａおよびＬｅｕ５６２Ａｌａのビオチン化ＨＩＦ（５５６～５７５）ペプチドのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ分析の図である。

【図４Ｂ】図４Ｂは、ウサギ網状赤血球溶解物またはコムギ麦芽抽出物と共に^{3}Ｈ－プロリンの存在下でインビボ翻訳され、加水分解され、そしてＴＬＣによって分析されたＧａｌ４－ＨＡ－ＨＩＦ（５５５～５７５）を示す写真である。点線の円は、ニンヒドリン染色されたプロリンおよびヒドロキシプロリンマーカーを示す。

【図５Ａ】図５Ａは、残基５６１～５６８の示された置換を有するビオチン化ＨＩＦ１α（５５６～５７５）ペプチドへの、^{35}Ｓ標識ｐＶＨＬの結合を示すブロットの写真である。

【図５Ｂ】図５Ｂは、残基５６１～５６８の示された置換を有するビオチン化ＨＩＦ１α（５５６～５７５）ペプチドへの、^{35}Ｓ標識ｐＶＨＬの結合を示すブロットの写真である。

【図５Ｃ】図５Ｃは、ＨＡ－ｐＶＨＬを生成するために安定にトランスフェクトされたｔｓ２０細胞が、制限温度（レーン１）および許容温度（レーン２～６）で代謝的に標識され、そして抗ＨＩＦ１α（レーン１および２）または抗ＨＡ抗体（レーン３～７）で免疫

沈降されたことを示すブロットの写真である。結合したタンパク質をサンプル緩衝液中での煮沸（レーン１および２）または示されたペプチドでの処理によって溶出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分解し、そしてオートラジオグラフィーによって検出した。

【図５Ｄ】図５Ｄは、野生型ｐＶＨＬ生成ベクター（ＷＴ８）または空のベクター（ＲＣ３）で安定にトランスフェクトされたｐＶＨＬ欠損腎癌腫細胞が、^{35}Ｓメチオニンで代謝的に標識され、溶解され、そして残基５６４の示された置換を有する固定化されたビオチン化ＨＩＦ１α（５５６～５７５）ペプチドと共にインキュベートされたことを示すブロットの写真である。特異的結合タンパク質をオートラジオグラフィーによって検出した。

【図６】図６は、ＷＴ８（ＶＨＬポジティブ）腎癌腫ＷＴ８細胞における、ＨＩＦ２αの野生型およびＰ５３１Ａ変異体の安定性を実証するブロットの写真である。血球凝集素（ＨＡ）タグ化ＨＩＦ２αの野生型およびＰ５３１Ａ変異体で安定に感染されたＷＴ８を、シクロヘキシミドと共にインキュベートした。その後、示された時点において、細胞抽出物を調製し、そして抗ＨＡイムノブロットアッセイによって分析した。各レーンは、１００μｇのタンパク質抽出物を含んだ。

【図７】図７は、ＨＩＦ２αの野生型および変異体によるＧｌｕｔ－１誘導を実証するブロットの写真である。ＷＴ８（ＶＨＬポジティブ）腎癌腫細胞を、空のレトロウイルスまたは血球凝集素（ＨＡ）タグ化ＨＩＦ２αの野生型、ＨＩＦ２αの塩基性ヘリックス－ループ－ヘリックス（ｂＨＬＨ）変異体、ＨＩＦ２αのＰ５３１Ａ変異体もしくはＨＩＦ２αの塩基性ヘリックス－ループ－ヘリックス／Ｐ５３１Ａ二重変異体をコードするレトロウイルスを用いて安定に感染した。これらの細胞を酸素正常状態（２１％）条件下および低酸素（１％）条件下で１２時間培養し、そしてＧＬＵＴに対する抗体を用いてイムノブロットした。５０μｇの全細胞抽出物を各レーンにロードし、そして比較可能なロードを、抗アクチンウエスタンブロット分析によって確認した。

【図８】図８は、本発明に従うＨＩＦムテインの核酸配列（配列番号１）およびコードされたポリペプチド配列（配列番号２）を示す図である。

【図９】図９は、本発明に従うＨＩＦムテインの核酸配列（配列番号３）およびコードされたポリペプチド配列（配列番号４）を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Dana Farber Cancer Institute
Kaelin Jr., William G
Ivan, Mircea

<120> Muteins of Hypoxia Inducible Factor Alpha and Methods of Use Thereof

<130> 20363-008-061

<140> Not yet assigned
<141> 2002-03-20

<150> 60/277,425
<151> 2001-03-20

<150> 60/277,431
<151> 2001-03-20

<150> 60/277,440
<151> 2001-03-20

<150> 60/332,493
<151> 2001-11-09

<150> 60/345,200
<151> 2001-11-09

<150> 60/345,131
<151> 2001-12-20

<150> 60/342,598
<151> 2001-12-20

<150> 60/345,132
<151> 2001-12-20

<150> 60/332,334
<151> 2001-11-09

<150> NOT YET ASSIGNED
<151> 2002-03-19

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 2481
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Encodes HIF Mutein

<400> 1
atggagggcg ccggcggcgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaagaa 60
aagtctcgag atgcagccag atctcggcga agtaaagaat ctgaagtttt ttatgagctt 120
gctcatcagt tgccacttcc acataatgtg agttcgcatc ttgataaggc ctctgtgatg 180
aggcttacca tcagctattt gcgtgtgagg aaacttctgg atgctggtga tttggatatt 240
gaagatgaca tgaaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttgga tggttttgtt 300

```
atggttctca cagatgatgg tgacatgatt tacatttctg ataatgtgaa caaatacatg 360
ggattaactc agtttgaact aactggacac agtgtgtttg attttactca tccatgtgac 420
catgaggaaa tgagagaaat gcttacacac agaaatggcc ttgtgaaaaa gggtaaagaa 480
caaaacacac agcgaagctt ttttctcaga atgaagtgta ccctaactag ccgaggaaga 540
actatgaaca taaagtctgc aacatggaag gtattgcact gcacaggcca cattcacgta 600
tatgatacca acagtaacca acctcagtgt gggtataaga aaccacctat gacctgcttg 660
gtgctgattt gtgaacccat tcctcaccca tcaaatattg aaattccttt agatagcaag 720
actttcctca gtcgacacag cctggatatg aaattttctt attgtgatga aagaattacc 780
gaattgatgg gatatgagcc agaagaactt ttaggccgct caatttatga atattatcat 840
gctttggact ctgatcatct gaccaaaact catcatgata tgtttactaa aggacaagtc 900
accacaggac agtacaggat gcttgccaaa agaggtggat atgtctgggt tgaaactcaa 960
gcaactgtca tatataacac caagaattct caaccacagt gcattgtatg tgtgaattac 1020
gttgtgagtg gtattattca gcacgacttg attttctccc ttcaacaaac agaatgtgtc 1080
cttaaaccgg ttgaatcttc agatatgaaa atgactcagc tattcaccaa agttgaatca 1140
gaagatacaa gtagcctctt tgacaaactt aagaaggaac ctgatgcttt aactttgctg 1200
gccccagccg ctggagacac aatcatatct ttagattttg gcagcaacga cacagaaact 1260
gatgaccagc aacttgagga agtaccatta tataatgatg taatgctccc ctcacccaac 1320
gaaaaattac agaatataaa tttggcaatg tctccattac ccaccgctga aacgccaaag 1380
ccacttcgaa gtagtgctga ccctgcactc aatcaagaag ttgcattaaa attagaacca 1440
aatccagagt cactggaact ttcttttacc atgccccaga ttcaggatca gacacctagt 1500
ccttccgatg gaagcactag acaaagttca cctgagccta atagtcccag tgaatattgt 1560
ttttatgtgg atagtgatat ggtcaatgaa ttcaagttgg aattggtaga aaaacttttt 1620
gctgaagaca cagaagcaaa gaacccattt tctactcagg acacagattt agacttggag 1680
atgttagctg cttatatccc aatggatgat gacttccagt tacgttcctt cgatcagttg 1740
tcaccattag aaagcagttc cgcaagccct gaaagcgcaa gtcctcaaag cacagttaca 1800
gtattccagc agactcaaat acaagaacct actgctaatg ccaccactac cactgccacc 1860
actgatgaat taaaaacagt gacaaaagac cgtatggaag acattaaaat attgattgca 1920
tctccatctc ctacccacat acataaagaa actactagtg ccacatcatc accatataga 1980
gatactcaaa gtcggacagc ctcaccaaac agagcaggaa aaggagtcat agaacagaca 2040
gaaaaatctc atccaagaag ccctaacgtg ttatctgtcg ctttgagtca aagaactaca 2100
gttcctgagg aagaactaaa tccaaagata ctagctttgc agaatgctca gagaaagcga 2160
aaaatggaac atgatggttc acttttcaa gcagtaggaa ttggaacatt attacagcag 2220
ccagacgatc atgcagctac tacatcactt tcttggaaac gtgtaaaagg atgcaaatct 2280
agtgaacaga atggaatgga gcaaaagaca attattttaa taccctctga tttagcatgt 2340
agactgctgg ggcaatcaat ggatgaaagt ggattaccac agctgaccag ttatgattgt 2400
gaagttaatg ctcctataca aggcagcaga aacctactgc agggtgaaga attactcaga 2460
gctttggatc aagttaactg a                                          2481
```

<210> 2
<211> 826
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: HIF Mutein

<400> 2

```
Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
  1               5                  10                  15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
             20                  25                  30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
         35                  40                  45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
     50                  55                  60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65                  70                  75                  80
```

```
Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
                 85                  90                  95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
            100                 105                 110

Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
        115                 120                 125

Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
    130                 135                 140

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
145                 150                 155                 160

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
                165                 170                 175

Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
            180                 185                 190

His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
        195                 200                 205

Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
    210                 215                 220

Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
225                 230                 235                 240

Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
                245                 250                 255

Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
            260                 265                 270

Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
        275                 280                 285

Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
    290                 295                 300

Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
305                 310                 315                 320

Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
                325                 330                 335

Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
            340                 345                 350

Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
        355                 360                 365

Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
    370                 375                 380

Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
385                 390                 395                 400

Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
                405                 410                 415
```

```
Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
            420                 425                 430

Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
        435                 440                 445

Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
    450                 455                 460

Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
465                 470                 475                 480

Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
                485                 490                 495

Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
            500                 505                 510

Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
        515                 520                 525

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
    530                 535                 540

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
545                 550                 555                 560

Met Leu Ala Ala Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
                565                 570                 575

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
            580                 585                 590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
        595                 600                 605

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
    610                 615                 620

Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
625                 630                 635                 640

Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
                645                 650                 655

Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
            660                 665                 670

Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
        675                 680                 685

Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
    690                 695                 700

Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
705                 710                 715                 720

Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
                725                 730                 735

Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
            740                 745                 750
```

```
Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
        755                 760                 765

Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly
    770                 775                 780

Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys
785                 790                 795                 800

Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu
                805                 810                 815

Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn
            820                 825
```

<210> 3
<211> 2613
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Encodes HIF Mutein

<400> 3

```
atgacagctg acaaggagaa gaaaaggagt agctcggaga ggaggaagga gaagtcccgg 60
gatgctgcgc ggtgccggcg gagcaaggag acggaggtgt tctatgagct ggcccatgag 120
ctgcctctgc cccacagtgt gagctcccat ctggacaagg cctccatcat gcgactggca 180
atcagcttcc tgcgaacaca caagctcctc tcctcagttt gctctgaaaa cgagtccgaa 240
gccgaagctg accagcagat ggacaacttg tacctgaaag ccttggaggg tttcattgcc 300
gtggtgaccc aagatggcga catgatcttt ctgtcagaaa acatcagcaa gttcatggga 360
cttacacagg tggagctaac aggacatagt atctttgact tcactcatcc ctgcgaccat 420
gaggagattc gtgagaacct gagtctcaaa aatggctctg gttttgggaa aaaaagcaaa 480
gacatgtcca cagagcggga cttcttcatg aggatgaagt gcacggtcac caacagaggc 540
cgtactgtca acctcaagtc agccacctgg aaggtcttgc actgcacggg ccaggtgaaa 600
gtctacaaca actgccctcc tcacaatagt ctgtgtggct acaaggagcc cctgctgtcc 660
tgcctcatca tcatgtgtga accaatccag cacccatccc acatggacat ccccctggat 720
agcaagacct tcctgagccg ccacagcatg gacatgaagt tcacctactg tgatgacaga 780
atcacagaac tgattggtta ccaccctgag gagctgcttg gccgctcagc ctatgaattc 840
taccatgcgc tagactccga gaacatgacc aagagtcacc agaacttgtg caccaagggt 900
caggtagtaa gtggccagta ccggatgctc gcaaagcatg ggggctacgt gtggctggag 960
acccagggga cggtcatcta caaccctcgc aacctgcagc cccagtgcat catgtgtgtc 1020
aactacgtcc tgagtgagat tgagaagaat gacgtggtgt tctccatgga ccagactgaa 1080
tccctgttca agccccacct gatggccatg aacagcatct ttgatagcag tggcaagggg 1140
gctgtgtctg agaagagtaa cttcctattc accaagctaa aggaggagcc cgaggagctg 1200
gcccagctgg ctcccaccct aggagacgcc atcatctctc tggatttcgg gaatcagaac 1260
ttcgaggagt cctcagccta tggcaaggcc atcctgcccc cgagccagcc atgggccacg 1320
gagttgagga gccacagcac ccagagcgag gctgggagcc tgcctgcctt caccgtgccc 1380
caggcagctg ccccgggcag caccaccccc agtgccacca gcagcagcag cagctgctcc 1440
acgcccaata gccctgaaga ctattacaca tctttggata acgacctgaa gattgaagtg 1500
attgagaagc tcttcgccat ggacacagag gccaaggacc aatgcagtac ccagacggat 1560
ttcaatgagc tggacttgga gacactggca gcttatatcc ccatggacgg ggaaggcttc 1620
cagctaagcc ccatctgccc cgaggagcgg ctcttggcgg agaacccaca gtccaccccc 1680
cagcactgct tcagtgccat gacaaacatc ttccagccac tggcccctgt agccccgcac 1740
agtcccttcc tcctggacaa gtttcagcag cagctggaga gcaagaagac agagcccgag 1800
cgccggccca tgtcctccat cttctttgat gccggaagca aagcatccct gccaccgtgc 1860
tgtggccagg ccagcacccc tctctcttcc atgggggggca gatccaacac ccagtggccc 1920
ccagatccac cattacattt tgggcccaca aagtgggccg tcggggatca gcgcacagag 1980
ttcttgggag cagcgccgtt ggggccccct gtctctccac cccatgtctc caccttcaaa 2040
acaaggtctg caaagggttt tggggctcga ggcccaaacg tgctgagtcc ggccatggta 2100
gccctctcca acaagctgaa gctgaagcga cagctggagt atgaaaagca agccttccag 2160
gacccgagcg gggggaccc acctggtggc agcacctcac atttgatgtg gaaacggatg 2220
```

```
aagaacctca ggggtgggag ctgcctttg atgccggaca agccactgag cgcaaatgta 2280
cccaatgata agctcaccca aaactccatg aggggcctgg gccatcccct gagacatctg 2340
ccgctgccac agcctccatc tgccatcagt cccggggaga acagcaagag caggttcccc 2400
ccacagtgct acgccaccca gtaccaggac tacagcctgt cgtcagccca caaggtgtca 2460
ggcatggcaa gccggctgct cgggccctca tttgagtcct acctgctgcc cgaactgacc 2520
agatatgacc gtgaggtgaa agtgcccgtg ctgggaagct ccacgctcct gcaaggaggg 2580
gacctcctca gagccctgga ccaggccacc tga                              2613
```

<210> 4
<211> 870
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: HIF Mutein

<400> 4

```
Met Thr Ala Asp Lys Glu Lys Lys Arg Ser Ser Ser Glu Arg Arg Lys
  1               5                  10                  15

Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Cys Arg Arg Ser Lys Glu Thr Glu
             20                  25                  30

Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Glu Leu Pro Leu Pro His Ser Val Ser
         35                  40                  45

Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Ile Met Arg Leu Ala Ile Ser Phe Leu
     50                  55                  60

Arg Thr His Lys Leu Leu Ser Ser Val Cys Ser Glu Asn Glu Ser Glu
 65                  70                  75                  80

Ala Glu Ala Asp Gln Gln Met Asp Asn Leu Tyr Leu Lys Ala Leu Glu
                 85                  90                  95

Gly Phe Ile Ala Val Val Thr Gln Asp Gly Asp Met Ile Phe Leu Ser
            100                 105                 110

Glu Asn Ile Ser Lys Phe Met Gly Leu Thr Gln Val Glu Leu Thr Gly
        115                 120                 125

His Ser Ile Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Ile Arg
    130                 135                 140

Glu Asn Leu Ser Leu Lys Asn Gly Ser Gly Phe Gly Lys Lys Ser Lys
145                 150                 155                 160

Asp Met Ser Thr Glu Arg Asp Phe Phe Met Arg Met Lys Cys Thr Val
                165                 170                 175

Thr Asn Arg Gly Arg Thr Val Asn Leu Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val
            180                 185                 190

Leu His Cys Thr Gly Gln Val Lys Val Tyr Asn Asn Cys Pro Pro His
        195                 200                 205

Asn Ser Leu Cys Gly Tyr Lys Glu Pro Leu Leu Ser Cys Leu Ile Ile
    210                 215                 220

Met Cys Glu Pro Ile Gln His Pro Ser His Met Asp Ile Pro Leu Asp
225                 230                 235                 240
```

```
Ser Lys Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Met Asp Met Lys Phe Thr Tyr
                245                 250                 255

Cys Asp Asp Arg Ile Thr Glu Leu Ile Gly Tyr His Pro Glu Glu Leu
            260                 265                 270

Leu Gly Arg Ser Ala Tyr Glu Phe Tyr His Ala Leu Asp Ser Glu Asn
        275                 280                 285

Met Thr Lys Ser His Gln Asn Leu Cys Thr Lys Gly Gln Val Val Ser
    290                 295                 300

Gly Gln Tyr Arg Met Leu Ala Lys His Gly Gly Tyr Val Trp Leu Glu
305                 310                 315                 320

Thr Gln Gly Thr Val Ile Tyr Asn Pro Arg Asn Leu Gln Pro Gln Cys
                325                 330                 335

Ile Met Cys Val Asn Tyr Val Leu Ser Glu Ile Glu Lys Asn Asp Val
            340                 345                 350

Val Phe Ser Met Asp Gln Thr Glu Ser Leu Phe Lys Pro His Leu Met
        355                 360                 365

Ala Met Asn Ser Ile Phe Asp Ser Ser Gly Lys Gly Ala Val Ser Glu
    370                 375                 380

Lys Ser Asn Phe Leu Phe Thr Lys Leu Lys Glu Glu Pro Glu Glu Leu
385                 390                 395                 400

Ala Gln Leu Ala Pro Thr Pro Gly Asp Ala Ile Ile Ser Leu Asp Phe
                405                 410                 415

Gly Asn Gln Asn Phe Glu Glu Ser Ser Ala Tyr Gly Lys Ala Ile Leu
            420                 425                 430

Pro Pro Ser Gln Pro Trp Ala Thr Glu Leu Arg Ser His Ser Thr Gln
        435                 440                 445

Ser Glu Ala Gly Ser Leu Pro Ala Phe Thr Val Pro Gln Ala Ala Ala
    450                 455                 460

Pro Gly Ser Thr Thr Pro Ser Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ser Cys Ser
465                 470                 475                 480

Thr Pro Asn Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Thr Ser Leu Asp Asn Asp Leu
                485                 490                 495

Lys Ile Glu Val Ile Glu Lys Leu Phe Ala Met Asp Thr Glu Ala Lys
            500                 505                 510

Asp Gln Cys Ser Thr Gln Thr Asp Phe Asn Glu Leu Asp Leu Glu Thr
        515                 520                 525

Leu Ala Ala Tyr Ile Pro Met Asp Gly Glu Gly Phe Gln Leu Ser Pro
    530                 535                 540

Ile Cys Pro Glu Glu Arg Leu Leu Ala Glu Asn Pro Gln Ser Thr Pro
545                 550                 555                 560

Gln His Cys Phe Ser Ala Met Thr Asn Ile Phe Gln Pro Leu Ala Pro
                565                 570                 575
```

```
Val Ala Pro His Ser Pro Phe Leu Leu Asp Lys Phe Gln Gln Gln Leu
            580                 585                 590

Glu Ser Lys Lys Thr Glu Pro Glu Arg Arg Pro Met Ser Ser Ile Phe
        595                 600                 605

Phe Asp Ala Gly Ser Lys Ala Ser Leu Pro Pro Cys Cys Gly Gln Ala
    610                 615                 620

Ser Thr Pro Leu Ser Ser Met Gly Gly Arg Ser Asn Thr Gln Trp Pro
625                 630                 635                 640

Pro Asp Pro Pro Leu His Phe Gly Pro Thr Lys Trp Ala Val Gly Asp
                645                 650                 655

Gln Arg Thr Glu Phe Leu Gly Ala Ala Pro Leu Gly Pro Pro Val Ser
            660                 665                 670

Pro Pro His Val Ser Thr Phe Lys Thr Arg Ser Ala Lys Gly Phe Gly
        675                 680                 685

Ala Arg Gly Pro Asn Val Leu Ser Pro Ala Met Val Ala Leu Ser Asn
    690                 695                 700

Lys Leu Lys Leu Lys Arg Gln Leu Glu Tyr Glu Lys Gln Ala Phe Gln
705                 710                 715                 720

Asp Pro Ser Gly Gly Asp Pro Pro Gly Gly Ser Thr Ser His Leu Met
                725                 730                 735

Trp Lys Arg Met Lys Asn Leu Arg Gly Gly Ser Cys Pro Leu Met Pro
            740                 745                 750

Asp Lys Pro Leu Ser Ala Asn Val Pro Asn Asp Lys Leu Thr Gln Asn
        755                 760                 765

Ser Met Arg Gly Leu Gly His Pro Leu Arg His Leu Pro Leu Pro Gln
    770                 775                 780

Pro Pro Ser Ala Ile Ser Pro Gly Glu Asn Ser Lys Ser Arg Phe Pro
785                 790                 795                 800

Pro Gln Cys Tyr Ala Thr Gln Tyr Gln Asp Tyr Ser Leu Ser Ser Ala
                805                 810                 815

His Lys Val Ser Gly Met Ala Ser Arg Leu Leu Gly Pro Ser Phe Glu
            820                 825                 830

Ser Tyr Leu Leu Pro Glu Leu Thr Arg Tyr Asp Arg Glu Val Lys Val
        835                 840                 845

Pro Val Leu Gly Ser Ser Thr Leu Leu Gln Gly Gly Asp Leu Leu Arg
    850                 855                 860

Ala Leu Asp Gln Ala Thr
865                 870
```

<210> 5
<211> 826
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: HIF Mutein

<400> 5

```
Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
  1               5                  10                  15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
             20                  25                  30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
         35                  40                  45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
     50                  55                  60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65                  70                  75                  80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
                 85                  90                  95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
            100                 105                 110

Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
        115                 120                 125

Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
    130                 135                 140

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
145                 150                 155                 160

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
                165                 170                 175

Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
            180                 185                 190

His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
        195                 200                 205

Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
    210                 215                 220

Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
225                 230                 235                 240

Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
                245                 250                 255

Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
            260                 265                 270

Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
        275                 280                 285

Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
    290                 295                 300

Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
305                 310                 315                 320
```

```
Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
                325                 330                 335

Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
            340                 345                 350

Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
        355                 360                 365

Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
    370                 375                 380

Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
385                 390                 395                 400

Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
                405                 410                 415

Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
            420                 425                 430

Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
        435                 440                 445

Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
    450                 455                 460

Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
465                 470                 475                 480

Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
                485                 490                 495

Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
            500                 505                 510

Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
        515                 520                 525

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
    530                 535                 540

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
545                 550                 555                 560

Met Ala Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
                565                 570                 575

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
            580                 585                 590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
        595                 600                 605

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
    610                 615                 620

Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
625                 630                 635                 640

Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
                645                 650                 655
```

```
Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
            660                 665                 670

Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
        675                 680                 685

Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
    690                 695                 700

Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
705                 710                 715                 720

Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
                725                 730                 735

Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
            740                 745                 750

Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
        755                 760                 765

Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly
    770                 775                 780

Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys
785                 790                 795                 800

Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu
                805                 810                 815

Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn
            820                 825
```

<210> 6
<211> 826
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: HIF Mutein

```
<400> 6
Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
  1               5                  10                  15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
             20                  25                  30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
         35                  40                  45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
     50                  55                  60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65                  70                  75                  80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
                 85                  90                  95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
```

```
                100                 105                 110

Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
        115                 120                 125

Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
    130                 135                 140

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
145                 150                 155                 160

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
                165                 170                 175

Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
            180                 185                 190

His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
        195                 200                 205

Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
    210                 215                 220

Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
225                 230                 235                 240

Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
                245                 250                 255

Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
            260                 265                 270

Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
        275                 280                 285

Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
    290                 295                 300

Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
305                 310                 315                 320

Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
                325                 330                 335

Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
            340                 345                 350

Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
        355                 360                 365

Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
    370                 375                 380

Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
385                 390                 395                 400

Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
                405                 410                 415

Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
            420                 425                 430

Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
```

```
        435                 440                 445

Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
    450                 455                 460

Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
465                 470                 475                 480

Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
                485                 490                 495

Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
            500                 505                 510

Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
        515                 520                 525

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
    530                 535                 540

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
545                 550                 555                 560

Met Ala Ala Ala Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
                565                 570                 575

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
            580                 585                 590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
        595                 600                 605

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
    610                 615                 620

Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
625                 630                 635                 640

Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
                645                 650                 655

Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
            660                 665                 670

Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
        675                 680                 685

Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
    690                 695                 700

Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
705                 710                 715                 720

Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
                725                 730                 735

Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
            740                 745                 750

Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
        755                 760                 765

Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly
```

```
    770                 775                 780

Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys
785                 790                 795                 800

Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu
                805                 810                 815

Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn
            820                 825


<210> 7
<211> 826
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: HIF Mutein

<400> 7
Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
  1               5                  10                  15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
             20                  25                  30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
         35                  40                  45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
     50                  55                  60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65                  70                  75                  80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
                85                  90                  95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
            100                 105                 110

Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
        115                 120                 125

Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
    130                 135                 140

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
145                 150                 155                 160

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
                165                 170                 175

Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
            180                 185                 190

His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
        195                 200                 205

Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
    210                 215                 220
```

```
Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
225                 230                 235                 240

Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
                245                 250                 255

Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
            260                 265                 270

Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
        275                 280                 285

Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
    290                 295                 300

Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
305                 310                 315                 320

Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
                325                 330                 335

Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
            340                 345                 350

Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
        355                 360                 365

Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
    370                 375                 380

Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
385                 390                 395                 400

Ala Ala Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
                405                 410                 415

Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
            420                 425                 430

Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
        435                 440                 445

Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
    450                 455                 460

Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
465                 470                 475                 480

Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
                485                 490                 495

Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
            500                 505                 510

Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
        515                 520                 525

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
    530                 535                 540

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
545                 550                 555                 560
```

```
Met Ala Ala Ala Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
                565                 570                 575

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
            580                 585                 590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
        595                 600                 605

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
    610                 615                 620

Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
625                 630                 635                 640

Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
                645                 650                 655

Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
            660                 665                 670

Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
        675                 680                 685

Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
    690                 695                 700

Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
705                 710                 715                 720

Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
                725                 730                 735

Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
            740                 745                 750

Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
        755                 760                 765

Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly
    770                 775                 780

Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys
785                 790                 795                 800

Glu Val Asn Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu
                805                 810                 815

Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn
            820                 825
```

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Conserved HIF
8-mer

<400> 8
Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met

1 5

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer A
for Pro564Ala Mutant

<400> 9
gcgcggatcc gccaccatgg ag 22

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer B
for Pro564Ala Mutant

<400> 10
cattgggata taagcagcta acatctc 27

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer C
for Pro564Ala Mutant

<400> 11
gagatgttag ctgcttatat cccaatg 27

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer D
for Pro564Ala Mutant

<400> 12
gcgccaattg tcagttaact tg 22

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer A
for Pro531Ala mutant

<400> 13
gcgcggatcc gccaccatga ca 22

<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer B for Pro531Ala Mutant

<400> 14
catggggata taagctgcca gtgtctc 27

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer C for Pro531Ala Mutant

<400> 15
gagacactgg cagcttatat ccccatg 27

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR PrimerD for Pro531Ala Mutant

<400> 16
gcgccaattg tcaggtggcc tggtc 25

【図１Ａ】

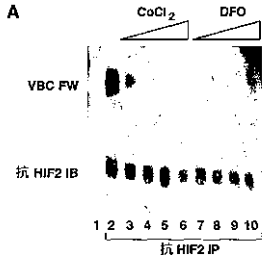


Figure 1A

【図１Ｂ】

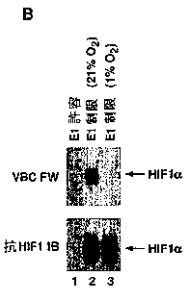


Figure 1B

【図１Ｃ】

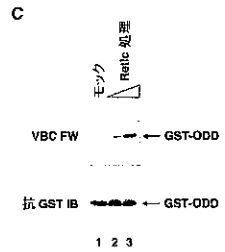


Figure 1C

【図１Ｄ】



Figure 1D

【図２Ａ】

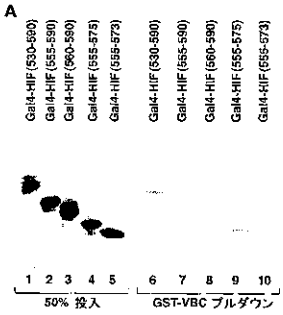


Figure 2A

【図２Ｂ】

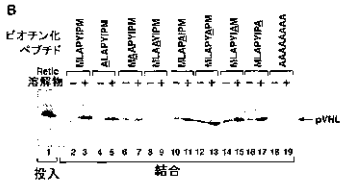


Figure 2B

【図２Ｃ】

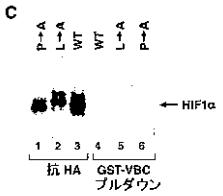


Figure 2C

【図２Ｄ】

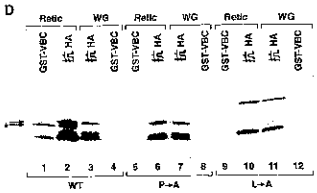


Figure 2D

【図２Ｅ】

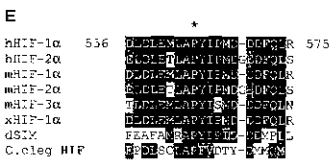


Figure 2E

【図３Ａ】

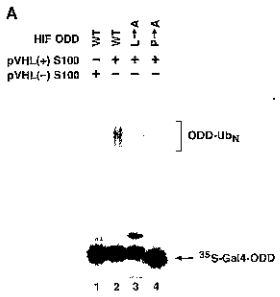


Figure 3A

【図３Ｂ】

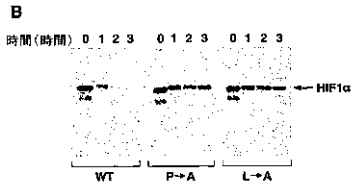


Figure 3B

【図３Ｃ】

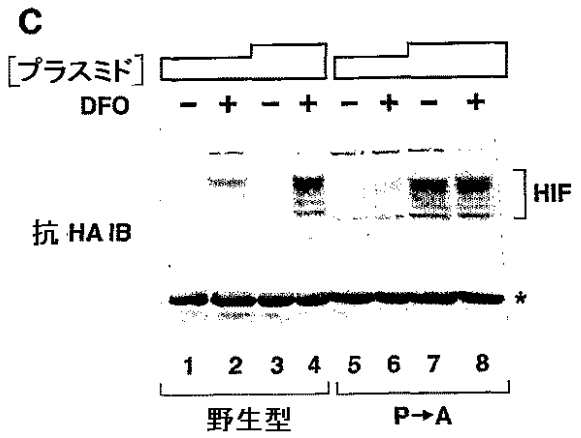


Figure 3C

【図４Ａ】

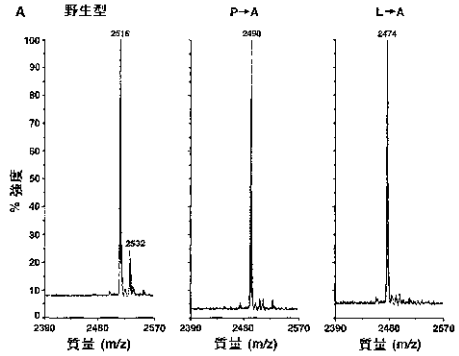


Figure 4A

【図４Ｂ】

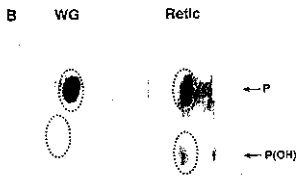


Figure 4B

【図５Ａ】

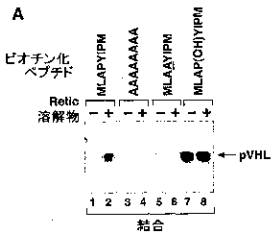


Figure 5A

【図５Ｂ】

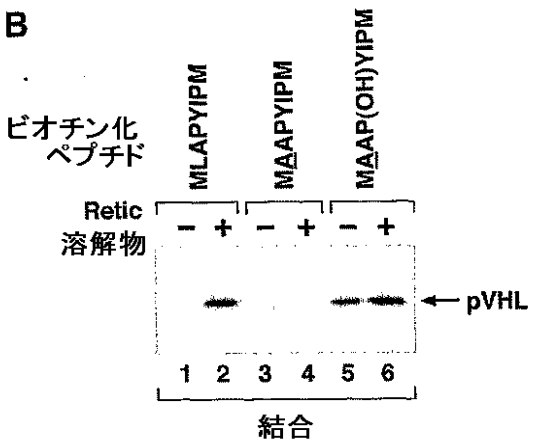


Figure 5B

【図５Ｃ】

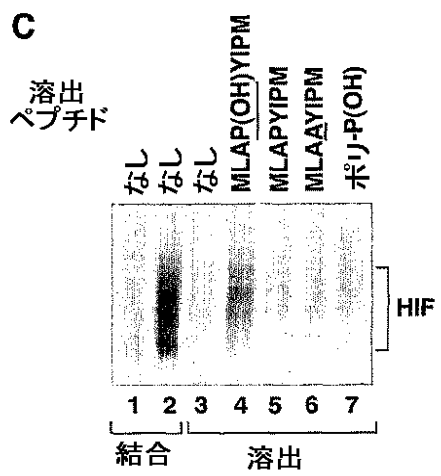


Figure 5C

【図５Ｄ】

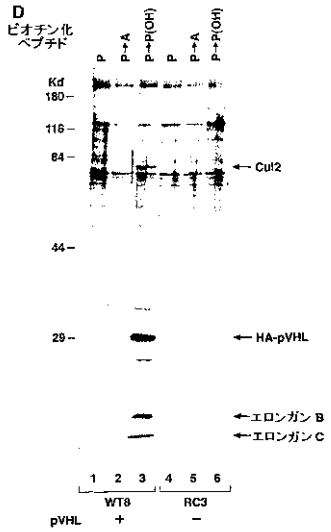
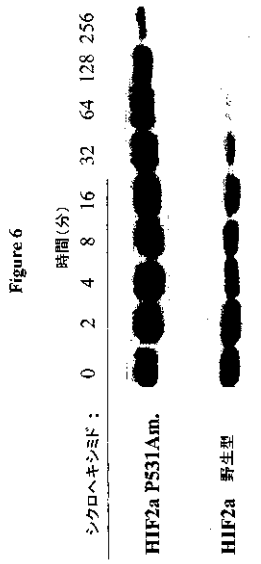


Figure 5D

【図６】



【図７】



【図８】

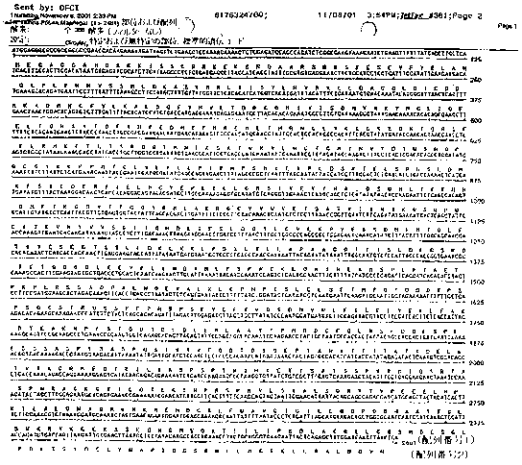


Fig. 8

【図９】

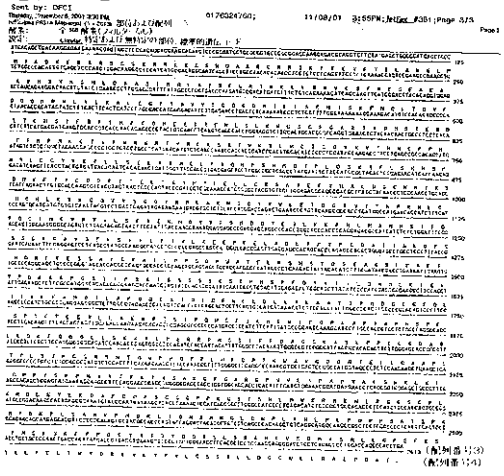


Fig. 9

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/08946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C07K 16/00; C12N 15/12, 15/74, 15/85
US CL : 435/325, 69.1, 252.3, 320.1; 536/23.1, 23.5; 530/350, 388.21
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/325, 69.1, 252.3, 320.1; 536/23.1, 23.5; 530/350, 388.21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/10578 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 02 March 2000 (02.03.2000), pages 12-16.	1-11 and 13
Y, P	US 6,124,131 A (SEMENZA) 26 September 2000 (26.09.2000) columns 2, 3, 5 and 6.	1-11 and 13
A	SEMENZA et al. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. Kidney International. February 1997, Vol. 31, pages 553-555. See whole document.	1-11 and 13
A, P	TANIMOTO et al. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1alpha by the von-Hippel-Lindo tumor suppressor protein. The EMBO Journal. August 2000, Vol. 19, No. 16, pages 4298-4309. See pages 4299-4306.	1-11 and 13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 July 2002 (19.07.2002)	23 SEP 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Chih-Min Kam Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/08946

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/08946

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This International Search Authority has found 6 inventions claimed in the International Application covered by the claims indicated below:
I. Claims 1-11, drawn to a hypoxia inducible factor (HIF) mutein polypeptide.
II. Claims 13, drawn to a nucleic acid encoding the mutein peptide.

This International Searching Authority considers that the International application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:
The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group I invention is the specific polypeptide claimed therein while the special technical feature of the Group II invention is the particular nucleic acid claimed therein. Since the special technical feature of the Group I invention is not present in the Group II claims and the special technical feature of the Group II invention are not present in the Groups I claims, unity of invention is lacking.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST search on USPAT, DERWENT, EPO, JPO, USPGPUB; STN search on MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, AGRICOLA. Search terms:hypoxia inducible factor, hif, mutein, mutation, von hippel lindau, vhl, transactivation domain. Nucleotide sequence search: SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3. Amino acid sequence: SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ 14/47	Ｃ０７Ｋ 16/18		
Ｃ０７Ｋ 16/18	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ａ６１Ｋ 37/02		

(31)優先権主張番号 60/332,493
(32)優先日 平成13年11月9日(2001.11.9)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/332,334
(32)優先日 平成13年11月9日(2001.11.9)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/345,200
(32)優先日 平成13年11月9日(2001.11.9)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/345,131
(32)優先日 平成13年12月20日(2001.12.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/342,598
(32)優先日 平成13年12月20日(2001.12.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/345,132
(32)優先日 平成13年12月20日(2001.12.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 10/101,816
(32)優先日 平成14年3月19日(2002.3.19)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 カエリン, ウイリアム ジー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１１６, ボストン, コモンウェルス アベニュー １７７
(72)発明者 イヴァン, ミルセア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９, ケンブリッジ, ノーフォーク ストリート １０７, ナンバー７

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 CA05 CA06 DA02 DA06 EA04 FA02 FA10
GA11 GA18 GA19 HA08 HA14
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA07 BA13 BA22 BA23 CA53 NA14
ZA36 ZA89
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA86 EA20 FA72 FA74