

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2005/121340

発行日 平成20年4月10日 (2008. 4. 10)

(43) 国際公開日 平成17年12月22日 (2005. 12. 22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 14/435 (2006.01)	C07K 14/435	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C084
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2006-514438 (P2006-514438)	(71) 出願人	500507630 株式会社ガルフアーマ
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/009211		香川県高松市林町2217番地44 香川 県新規産業創出支援センター ネクスト香 川203号
(22) 国際出願日	平成17年5月13日 (2005. 5. 13)	(74) 代理人	100097582 弁理士 水野 昭宣
(31) 優先権主張番号	特願2004-175086 (P2004-175086)	(72) 発明者	西 望 香川県木田郡三木町大字鹿伏605番地1 0
(32) 優先日	平成16年6月14日 (2004. 6. 14)	(72) 発明者	平島 光臣 香川県高松市伏石町884-3-302
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	山内 清明 香川県高松市屋島西町1927-5-70 1
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規ガレクチン8改変体タンパク質及びその用途

(57) 【要約】

大腸菌を宿主として生産されたリコンビナント体ガレクチン8は、血球凝集活性、好中球接着誘導活性、インテグリン_m結合活性、プロMMP-9結合活性、活性型MMP-9産生促進活性、スーパーオキシド産生促進活性、特定の細胞に対してアポトーシス誘導活性、腫瘍細胞に対して転移・浸潤などを抑制又は阻害する活性などを有するが、リコンビナント体ガレクチン8は二つのCRDをつなぐリンク領域がプロテアーゼに対して感受性が高いため、きわめて容易に酵素消化されてしまい、上記活性が失われるため、更なる研究のためにはより安定型の分子が必要である。ガレクチン8の二つのCRDをつなぐリンク領域の改変により、上記活性に悪影響を及ぼすことを避けつつ、安定性を高めた改変分子が得られた。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ガレクチン 8 又はそれと実質的に同等の活性を有するタンパク質のリンクペプチド又はその近傍領域が改変されていることを特徴とするタンパク質又はその塩。

【請求項 2】

改変がガレクチン 8 又はそれと実質的に同等の活性を有するタンパク質のリンクペプチド又はその近傍領域のアミノ酸配列において 1 個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、ガレクチン 8 と比較して少なくともリンクペプチドに対する分解感受性の改質されていることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質又はその塩。

【請求項 3】

ガレクチン 8 と実質的に同等の活性を有するタンパク質が、ガレクチン 8 のアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の相同性を有するものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のタンパク質又はその塩。

【請求項 4】

(1) ガレクチン 8 の N 末端側の糖鎖認識領域 (NCRD) 又はそれと実質的に同等の活性を有するポリペプチドと (2) ガレクチン 8 の C 末端側の糖鎖認識領域 (CCRD) 又はそれと実質的に同等の活性を有するポリペプチドとを、(3) ガレクチン 8 のリンクペプチドのアミノ酸配列において 1 個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる改変リンクペプチドを介して結合してあることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一記載のタンパク質又はその塩。

【請求項 5】

(1) 配列番号 3 で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド又はそれと実質的に同等の活性を有し且つ配列番号 3 で表わされるアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドあるいは配列番号 3 で表わされるアミノ酸配列のうち少なくとも 1 ~ 8 個のアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加せしめてあるアミノ酸配列を有するポリペプチドと (2) 配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド又はそれと実質的に同等の活性を有し且つ配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドあるいは配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列のうち少なくとも 1 ~ 21 個のアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加せしめてあるアミノ酸配列を有するポリペプチドとを、(3) 配列番号 9 又は 10 で表わされるアミノ酸配列において 1 個又はそれ以上のアミノ酸が欠失 (ただし、配列番号 10 において 29 ~ 70 位の配列の欠失を除く)、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる改変リンクペプチドを介して結合してあることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一記載のタンパク質又はその塩。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一記載のタンパク質をコードする塩基配列を有することを特徴とする核酸。

【請求項 7】

ポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項 6 記載の核酸。

【請求項 8】

DNA 又は RNA であることを特徴とする請求項 6 又は 7 記載の核酸。

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれか一記載の核酸を含有していることを特徴とする組換えベクター。

【請求項 10】

請求項 6 ~ 8 のいずれか一記載の核酸に加えて標識タンパク質及び/又はペプチドをコードする塩基配列を含有していることを特徴とする請求項 9 記載の組換えベクター。

【請求項 11】

請求項 6 ~ 8 のいずれか一記載の核酸又は請求項 9 又は 10 記載の組換えベクターを保

10

20

30

40

50

有することを特徴とする形質転換体。

【請求項 1 2】

形質転換体宿主細胞が原核細胞又は真核細胞であることを特徴とする請求項 1 1 記載の形質転換体。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一記載のタンパク質、請求項 6 ~ 8 のいずれか一記載の核酸、請求項 9 又は 1 0 記載の組換えベクター及び請求項 1 1 又は 1 2 記載の形質転換体からなる群から選択されたものを有効成分として含有することを特徴とする医薬。

【請求項 1 4】

免疫調節剤、抗炎症剤又はエンドトキシンショック抑制剤であることを特徴とする請求項 1 3 記載の医薬。 10

【請求項 1 5】

抗腫瘍薬又は抗腫瘍転移剤であることを特徴とする請求項 1 3 記載の医薬。

【請求項 1 6】

(1) 血球凝集活性、(2) アポトーシス誘導活性、(3) 細胞接着誘導活性、(4) インテグリン_m結合活性、(5) p r o M M P - 9 結合活性、p r o M M P - 9 活性化作用、あるいは活性型 M M P - 9 産生促進活性、(6) スーパーオキシド産生促進活性、(7) L P S の誘導する炎症の抑制活性、(8) L P S の誘導する T N F - α 、I L - 1 2、及び / 又は I F N - γ の生産を抑制する活性、及び(9) エンドトキシンショック抑制活性からなる群から選択された活性を利用して、病的な状態又は疾患を治療あるいは予防する剤であることを特徴とする請求項 1 3 記載の医薬。 20

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一記載のタンパク質、請求項 6 ~ 8 のいずれか一記載の核酸、請求項 9 又は 1 0 記載の組換えベクター及び請求項 1 1 又は 1 2 記載の形質転換体からなる群から選択されたものを有効成分として含有することを特徴とする分析又は検査試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、新規ガレクチン 8 改変体 (変異体) タンパク質及びその用途に関する。本発明は、特に、リンク領域が改変されたガレクチン 8 及びそれを利用する生化学、臨床検査、医療並びに医薬応用技術に関する。 30

【背景技術】

特定の糖鎖とそれに結合するタンパク質とが哺乳動物の生体において生理的現象及び進化・成長に伴う現象、そして様々な病気などにおいて多種多様な役割や機能を果たしていることを示している証拠が見つかってきている。生体には β -ガラクトシド構造を持った糖鎖を特異的に認識する動物レクチンが存在していることが見出されており、こうしたレクチン類のグループであるガレクチンとしては、これまでに少なくとも 1 4 種の遺伝子が哺乳動物で同定されている。ガレクチンファミリーは、その構造から三つのサブグループ、すなわち、プロト型 (p r o t o t y p e)、キメラ型 (c h i m e r a)、そしてタンデムリピート型 (t a n d e m r e p e a t) に分類されているが、その生体内での機能はほとんどわかっていない。特に、糖鎖認識ドメインを二個有するタンデムリピート型ガレクチンについては研究の歴史も浅く、その標的となる生体内の糖鎖 (受容体) が明らかにされていないため、その機能は未解明である。ところでガレクチンは細胞表面の複雑な糖鎖を認識するタンパク質を探索して見出されたなどの経緯から、細胞の接着、細胞間の情報伝達、細胞の活性化などに関与するといった機能を有すると予想されており注目を集めている。さらに、そうした機能の他、別の重要な様々な機能を有していると予想させるような研究成果も得られつつある。 40

タンデムリピート型ガレクチンの一つであるガレクチン 8 (g a l e c t i n - 8 : G a l - 8) は、インシュリン受容体基質に対する抗体を使用する Z A P の発現ライブラリーのスクリーニングの過程で偶然に発見され、クローン化して得られたもの (非特許文献 1) で、ラット肝臓の c D N A ライブラリーからクローン化されたが、ヒトガレクチン 50

- 8をコードするcDNAは、ヒト脳海馬のcDNAライブラリーからラット全長cDNAをプローブとして単離されている(非特許文献2: GenBank/EMBL accession no. X91790)。その後の研究により、Gal-8は、ガレクチン-4, -6, -9及び-12などの他のタンデムリピート型ガレクチン類よりは、より広い範囲の哺乳動物の組織(例えば、肝臓、心臓、筋肉、腎臓、脳など)に分布していることが見出されている。Gal-8は、強力な血球凝集活性を示し、ラクトシルアガロースに結合する。Gal-8のN-末端側CRD及びC-末端側CRDはおおよそ40%のアミノ酸の同一性を有している。その生物学的な機能に関しては、Gal-8はヒトカルシノーマ細胞がインテグリン被覆したプレートに接着するのを阻害し、該細胞のアポトーシス誘導することが示されている(非特許文献3)。Gal-8は結腸癌の移動に影響を及ぼすことも示されている(非特許文献4)。Gal-8 mRNAは、肺で高く発現しているとの報告や、その発現量は減るが、肝、腎、脾、後脚、心筋等の各組織でも発現しているとの報告もある。さらに、ヒト前立腺癌抗原であるPCTA-1とタンパク質レベルで高い相同性を示すとの報告もある。

炎症は、感染巣や組織損傷部位などへの白血球や血漿中の分子群の流入をもたらす反応である。炎症反応には三つの重要な要素がある。(1)炎症巣における血流の増加、(2)血管内皮細胞の収縮による毛細血管透過性の亢進(これによって通常とは異なった高分子が血管外に遊離し、また、免疫反応の可溶性分子群が炎症の局所に移動する)、(3)白血球の血管外への遊走と周囲組織への浸潤(炎症の初期には多形核白血球〔主として好中球〕が最も多く、後半になって単核球やリンパ球が炎症の局所に移動する)。好中球の炎症部位への浸潤は、いくつかの独立した過程を経て進行する。第一のステップにはセレクトイン(selectins)が関与し、好中球の血管内皮細胞への弱い接着と血管内皮細胞上での好中球のローリングが引き起こされる。第二のステップでは走化性因子(chemoattractant)とインテグリン(integrins)の作用により、好中球と血管内皮細胞の間の接着が強まり、好中球は内皮細胞上に停止する。これに引き続いて、好中球は内皮細胞の間隙を通過して組織内に浸潤する。この過程にも走化性因子とインテグリンが関与する。

好中球と血管内皮細胞の強い接着は、integrin L_2 (Lymphocyte Function-Associated Antigen-1; LFA-1)、integrin M_2 (macrophage receptor 1; Mac-1)、integrin X_2 (p150/95)などのインテグリン(主としてLFA-1とMac-1)と内皮細胞表面に存在する分子(リガンド/受容体)の相互作用により引き起こされる。LFA-1は、ICAM-1とICAM-2、Mac-1はICAM-1とそれぞれ結合することが知られている。インテグリンは通常、リガンドに対して親和性を持たない、あるいは低い親和性を示す不活性型で存在し、細胞内外からの刺激によって高い親和性を持つ活性型に変化する(立体構造の変化による可逆的な活性化)。インテグリンの細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体の中には、この活性化を引き起こすものが知られているが、*in vivo*での活性化のメカニズムは明らかではない。

好中球は本来生体防御に重要な役割を果たしている。好中球は貪食作用によって、侵入した微生物の破壊や炎症部位の修復を行うとともに、強力な殺菌作用を持つ酸、酵素、活性酸素などを放出する。しかし、これらの傷害性因子は抗体のような標的特異性を持たず周辺の正常組織まで傷害する可能性があるため、生体はこのような反応を局限する機構を備えている。この制御機構に乱れが生じると、好中球の産生する傷害性因子は組織傷害を引き起こすことになる。好中球が関与する疾患として、様々な慢性炎症性疾患(ベーチェット病、クローン病など)、虚血再灌流障害、好中球性皮膚症(スウィート症候群など)、全身性炎症反応症候群(SIRS)などが知られている。

こうした好中球が炎症部位へ浸潤する最初のステップが、血管内皮細胞との相互作用であることを考えると、この段階を阻害するなどの制御することによって好中球の過剰な作用を抑制するなどのことが期待されている。特に、心筋梗塞の治療時など好中球による傷

害の発生が予想できる場合には、予防的に使用することのできる薬剤などを開発することが期待されている。好中球が血管内皮細胞との相互作用をするステップ（+ 傷害性因子放出）における異常は、好中球の過剰作用の原因となる可能性もある。さらに、こうした好中球の過剰作用の原因を特定することができれば、診断、治療の精密化に寄与できる。好中球が獲得する内皮細胞に対する接着能を制御する機構を解明することは、炎症を始めとした様々な生理的現象を理解し、炎症などに伴う病的な状態をコントロールする上で重要である。好中球の接着能を制御することは、医薬品、診断薬、スクリーニング法、診断法などの開発に役立つので、その解明が求められる。

最近、本発明者等のグループは、ヒトガレクチン - 8 が、強力な好中球接着誘導能を有すること、Gal - 8 の C 末端 CRD がインテグリン α M に結合し、一方ガレクチン - 8 の N 末端 CRD が proMMP - 9 に結合し、さらに proMMP - 9 を活性化し、活性型 MMP - 9 産生を促進すること、またガレクチン - 8 の C 末端 CRD は例えば好中球などにおけるスーパーオキシド産生を促進する活性を有し、それはラクトースなどの糖アナログにより阻害することができることなどを見出し、例えばガレクチン - 8 と好中球との相互作用（ガレクチン - 8 とインテグリン α M との相互作用やガレクチン - 8 と proMMP - 9 との相互作用、proMMP - 9 の活性化を含む）に関連する応答・症状・疾患の研究・解析・測定、診断、予防、治療などの目的で様々な試薬、方法などに係わる技術の提供を行っている（特許文献 1）。

【特許文献 1】特開 2003 - 246749

【非特許文献 1】Hadari et al., J. Biol. Chem., 270: 3447 - 3453 (1995)

【非特許文献 2】Hadari et al., Trends in Glycoscience and Glycotechnology, Vol. 9, No. 45, pp. 103 - 112 (1997)

【非特許文献 3】Hadari et al., J. Cell Sci., 113: 2385 - 2397 (2000)

【非特許文献 4】N. Nagym et al., Gut, 50: 392 - 401 (2002)

【発明の開示】

こうしたガレクチン 8 の多面的な作用を利用することにより、癌治療、好中球の関与する疾患、生理作用や生物活性作用、糖鎖結合性などを介した糖鎖認識によって生ずる細胞の接着、細胞間の情報伝達、細胞の活性化など、さらには腫瘍細胞の転移・浸潤などへの関与を含めた様々な生体内機能や生物活性を明らかにして、各種の疾患を治療すること等が期待されている。しかしながら、リコンビナント体ガレクチン 8 は二つの CRD をつなぐリンク領域がプロテアーゼに対して感受性が高いため、きわめて容易に酵素消化されてしまい、上記活性が失われる。

本発明者等は、鋭意研究を進めた結果、ガレクチン 8 の有する糖鎖認識活性を保持しつつプロテアーゼに対してより安定な分子構造を探索し、ガレクチン 8 の二つの CRD をつなぐリンク領域を改変することにより、上記したような活性に悪影響を及ぼすことを避けつつ、安定性を高めた改変分子を得ることに成功して、本発明を完成した。

本発明は、以下を提供する。

(1) ガレクチン 8 又はそれと実質的に同等の活性を有するタンパク質のリンクペプチド又はその近傍領域が改変されていることを特徴とするタンパク質又はその塩。

(2) 改変がガレクチン 8 又はそれと実質的に同等の活性を有するタンパク質のリンクペプチド又はその近傍領域のアミノ酸配列において 1 個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、ガレクチン 8 と比較して少なくともリンクペプチドに対する分解感受性の改質されていることを特徴とする上記 (1) 記載のタンパク質又はその塩。

(3) ガレクチン 8 と実質的に同等の活性を有するタンパク質が、ガレクチン 8 のアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の相同性を有するものであることを特徴とする上記 (

10

20

30

40

50

1) 又は(2)記載のタンパク質又はその塩。

(4) (1)ガレクチン8のN末端側の糖鎖認識領域(NCRD)又はそれと実質的に同等の活性を有するポリペプチドと(2)ガレクチン8のC末端側の糖鎖認識領域(CCRD)又はそれと実質的に同等の活性を有するポリペプチドとを、(3)ガレクチン8のリンクペプチドのアミノ酸配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる改変リンクペプチドを介して結合してあることを特徴とする上記(1)~(3)のいずれか一記載のタンパク質又はその塩。

(5) (1)配列番号3で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド又はそれと実質的に同等の活性を有し且つ配列番号3で表わされるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドあるいは配列番号3で表わされるアミノ酸配列のうち少なくとも1~8個のアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加せしめてあるアミノ酸配列を有するポリペプチドと(2)配列番号4で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド又はそれと実質的に同等の活性を有し且つ配列番号4で表わされるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドあるいは配列番号4で表わされるアミノ酸配列のうち少なくとも1~21個のアミノ酸残基を欠失、置換若しくは付加せしめてあるアミノ酸配列を有するポリペプチドとを、(3)配列番号9又は10で表わされるアミノ酸配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失(ただし、配列番号10において29~70位の配列の欠失を除く)、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる改変リンクペプチドを介して結合してあることを特徴とする上記(1)~(4)のいずれか一記載のタンパク質又はその塩。

(6) 上記(1)~(5)のいずれか一記載のタンパク質をコードする塩基配列を有することを特徴とする核酸。

(7) ポリヌクレオチドであることを特徴とする上記(6)記載の核酸。

(8) DNA又はRNAであることを特徴とする上記(6)又は(7)記載の核酸。

(9) 上記(6)~(8)のいずれか一記載の核酸を含有していることを特徴とする組換えベクター。

(10) 上記(6)~(8)のいずれか一記載の核酸に加えて標識タンパク質及び/又はペプチドをコードする塩基配列を含有していることを特徴とする上記(9)記載の組換えベクター。

(11) 上記(6)~(8)のいずれか一記載の核酸又は上記(9)又は(10)記載の組換えベクターを保有することを特徴とする形質転換体。

(12) 形質転換体宿主細胞が原核細胞又は真核細胞であることを特徴とする上記(11)記載の形質転換体。

(13) 上記(1)~(5)のいずれか一記載のタンパク質、上記(6)~(8)のいずれか一記載の核酸、上記(9)又は(10)記載の組換えベクター及び上記(11)又は(12)記載記載の形質転換体からなる群から選択されたものを有効成分として含有することを特徴とする医薬。

(14) 免疫調節剤、抗炎症剤又はエンドトキシンショック抑制剤であることを特徴とする上記(13)記載の医薬。

(15) 抗腫瘍薬又は抗腫瘍転移剤であることを特徴とする上記(13)記載の医薬。

(16) (1)血球凝集活性、(2)アポトーシス誘導活性、(3)細胞接着誘導活性、(4)インテグリン_m結合活性、(5)proMMP-9結合活性、proMMP-9活性化作用、あるいは活性型MMP-9産生促進活性、(6)スーパーオキシド産生促進活性、(7)LPSの誘導する炎症の抑制活性、(8)LPSの誘導するTNF- α 、IL-12、及び/又はIFN- γ の生産を抑制、及び(9)エンドトキシンショック抑制活性からなる群から選択された活性を利用して、病的な状態又は疾患を治療あるいは予防する剤であることを特徴とする上記(13)記載の医薬。

(17) 上記(1)~(5)のいずれか一記載のタンパク質、上記(6)~(8)のいずれか一記載の核酸、上記(9)又は(10)記載の組換えベクター及び上記(11)

10

20

30

40

50

又は(12)記載の形質転換体からなる群から選択されたものを有効成分として含有することを特徴とする分析又は検査試薬あるいはキット。

(18) 上記(1)~(5)のいずれか一記載のタンパク質、上記(6)~(8)のいずれか一記載の核酸、上記(9)又は(10)記載の組換えベクター及び上記(11)又は(12)記載の形質転換体からなる群から選択されたものを有効成分として含有することを特徴とする好中球接着誘導剤。

(19) 好中球の、血管内皮細胞、間質細胞、上皮細胞及び人工的基質から成る群から選ばれたものとの接着を誘導するものであることを特徴とする上記〔18〕記載の剤。

(20) 上記(1)~(5)のいずれか一記載のタンパク質の存在下、試験試料を好中球と接触せしめ、好中球接着能を測定することを特徴とする好中球接着阻害剤のスクリーニング法。

(21) 上記(1)~(5)のいずれか一記載のタンパク質の存在下、試験試料をプロ MMP - 9 と接触せしめ、MMP - 9 を測定することを特徴とするプロ MMP - 9 活性化阻害剤のスクリーニング法。

(22) 上記(1)~(5)のいずれか一記載のタンパク質の存在下、試験試料を好中球と接触せしめ、好中球のスーパーオキシド産生能を測定することを特徴とする好中球スーパーオキシド産生阻害剤のスクリーニング法。

(23) 試験試料の存在下、上記(1)~(5)のいずれか一記載のタンパク質をインテグリン_mと接触せしめ、該タンパク質とインテグリン_mとの相互作用に起因する生物学的活性を測定することを特徴とするガレクチン - 8 阻害剤のスクリーニング法。

(24) 上記(1)~(5)のいずれか一記載のタンパク質に対する結合親和性を利用した物質の分離及び/又は検出法。

(25) 物質が、糖鎖含有化合物、インテグリン_m、プロ MMP - 9 及び好中球から成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記(24)記載の分離及び/又は検出法。

発明の効果

ガレクチン8に関して得られたガレクチン8改変体は、野生型に比較してプロテアーゼに対して安定化されているので、ガレクチン8が有している生体内での機能の解明に利用可能であり、腫瘍化細胞の制御、免疫調節、さらにはアレルギーや炎症のコントロール、またLPS誘起の炎症抑制、エンドトキシンショック抑制(致死性の抑制作用を含む)など様々な生体反応の制御・調節に果たしているガレクチン8の機能・活性を研究するのに使用できる。また、当該ガレクチン8改変体及びその関連物質は、臨床応用、分子生物学的応用、生化学応用、医学的応用における試薬並びに活性剤として有望である。

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び/又は改変(あるいは修飾)をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

【図面の簡単な説明】

図1は、ガレクチン8改変体(G8NC(nul1))発現ベクターの構築方法を示す。

図2は、ガレクチン8改変体(G8NC(nul1))のアミノ酸配列を示す。

図3は、ガレクチン8改変体(G8NC(nul1))発現物及び精製処理物の電気泳動写真を示す。

図4は、野生型ガレクチン8(G8(M))とガレクチン8改変体(G8NC(nul1))との間でプロテアーゼに対する耐性を比較した結果を示す。左側の図はエラスターゼ(elastase)に対する耐性を調べた結果を、右側の図はトリプシン(tryp

s i n) に対する耐性を調べた結果を示す。図は、電気泳動写真を示す。

図5は、野生型ガレクチン8 (G 9 (M)) とガレクチン8 改変体 (G 8 N C (n u l l)) との間で生物活性を比較した結果を示す。末梢血好中球接着誘導活性を調べた結果である。

図6は、エンドトキシン投与マウスにおけるガレクチン8 改変体 (「 G 8 」 と表記) の効果を調べた結果 (血清サンプル中の T N F - 量) である。

図7は、エンドトキシン投与マウスにおけるガレクチン8 改変体 (「 G 8 」 と表記) の効果を調べた結果 (血清サンプル中の I L - 1 2 (p 7 0) 量) である。

図8は、エンドトキシン投与マウスにおけるガレクチン8 改変体 (「 G 8 」 と表記) の効果を調べた結果 (血清サンプル中の I F N - 量) である。

10

【発明を実施するための最良の形態】

本明細書に記載の発明は、これまでに公表された研究および係属中の特許出願、例えば、特許願 2 0 0 2 - 4 6 4 7 8 (特開 2 0 0 3 - 2 4 6 7 4 9 号公報)、特許願 2 0 0 3 - 9 1 7 3 を参考にしており、その内容は本明細書の開示の中に含まれる。

「ガレクチン8 改変体」とは、ガレクチン8 の糖鎖認識部位が保有する特定の糖鎖に対して特異的に結合するといった活性又はそれと類似した活性 (本活性のうちには定性的な活性及び / 又は定量的な活性が含まれてよい) を提供する物質をいう。ガレクチン8 は、血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、インテグリン_m 結合活性、プロ MMP - 9 結合活性、活性型 MMP - 9 産生促進活性、スーパーオキシド産生促進活性、特定の細胞に対してアポトーシス誘導活性などを有するが、本ガレクチン8 改変体は野生型ガレクチン8 が有する当該活性のうちの一つあるいはそれと類縁の活性を有するものであってよく、ガレクチン8 が有する生物活性が改変又は修飾されているものであってよいし、ある場合には好ましい。本発明で特に好ましいガレクチン8 改変体とは、生物活性を有する試薬として、臨床検査の分野、分析の分野、あるいは医学又は医薬などの分野で、野生型ガレクチン8 より好ましい性質を少なくとも一つ示すものを指す。

20

ガレクチン8 改変体は、例えば、ガレクチン8 又はそれと実質的に同等の活性を有するタンパク質のリンクペプチド又はその近傍領域が改変されているタンパク質又はその塩、ガレクチン8 又はそれと実質的に同等の活性を有するタンパク質のリンクペプチド又はその近傍領域のアミノ酸配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、ガレクチン8 と比較して少なくともリンクペプチドに対する分解感受性が改質されているといった改変の施されたタンパク質又はその塩、ガレクチン8 と実質的に同等の活性を有するタンパク質であって且つガレクチン8 のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性、又は少なくとも75%以上の相同性、又は少なくとも80%以上の相同性、又は少なくとも85%以上の相同性、又は少なくとも90%以上の相同性、又は少なくとも95%以上の相同性を有するタンパク質又はその塩、(1) ガレクチン8 のN末端側の糖鎖認識領域 (N C R D) 又はそれと実質的に同等の活性を有するポリペプチドと(2) ガレクチン8 のC末端側の糖鎖認識領域 (C C R D) 又はそれと実質的に同等の活性を有するポリペプチドとを、(3) ガレクチン8 のリンクペプチドのアミノ酸配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる改変リンクペプチドを介して結合してあるタンパク質又はその塩などであってよい。

30

40

ガレクチン8 の塩基配列並びにアミノ酸配列は、例えば、データベースNCBI上、NP_963837 . g a l e c t i n 8 i s o f o r . . . [g i : 4 2 5 4 4 1 8 7] NM_201543 . H o m o s a p i e n s l e c t . . . [g i : 4 2 5 4 4 1 8 6] ; NP_963838 . g a l e c t i n 8 i s o f o r . . . [g i : 4 2 5 4 4 1 9 1] , NM_201544 . H o m o s a p i e n s l e c t . . . [g i : 4 2 5 4 4 1 9 0] ; NP_963839 . g a l e c t i n 8 i s o f o r . . . [g i : 4 2 5 4 4 1 9 3] , NM_201545 . H o m o s a p i e n s l e c t . . . [g i : 4 2 5 4 4 1 9 2] に示されている。ガレクチン8 では、コード領域の塩基配列上に変異があること場合が見出されており、8箇所に変異が生ずること

50

が報告され、このうちアミノ酸に変異が生じている箇所として4箇所あることが知られている(C. Maier et al., European Urology, 42, pp 301-307 (2002))。配列番号5を参照すると、DNA配列の56位(a t), 72位(c t), 106位(t c), 165位(t c), 166位(g a), 330位(a g), 552位(c g), 816位(c t)において変異が生ずる場合があることが、そしてアミノ酸配列では19位(Tyr Phe), 36位(Cys Arg), 56位(Val Met), 184位(Ser Arg)において変異となっていることが報告されている。ヒトガレクチン-8をコードする遺伝子は、上記のように公知であり、本発明の変異体を得るための鋳型として好適に利用可能であるが、別途ヒト類表皮癌細胞系細胞(A431)など当該遺伝子を発現しているものからクローニングしたものを使用できる。代表的には適切な塩基配列をプライマーとして利用することにより、所定のコード遺伝子部分を入手して使用することができる。本発明の変異体ポリヌクレオチド(あるいは核酸)は、その塩基配列に開始コドン、例えば、Metをコードするコドン(及び終止コドン、例えばTGA、TAAまたはTAG)が存在していてもあるいは欠いていて後から付加するものであってよく、また、該塩基配列がコードするタンパク質と少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち且つ糖鎖結合活性を有するかあるいは同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。該ポリヌクレオチド(あるいは核酸)は、一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、DNA:RNAハイブリッド、合成DNAなどの核酸であり、またヒトゲノムDNA、ヒトゲノミックDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、合成DNAのいずれであってよい。該ポリヌクレオチド(あるいは核酸)の塩基配列は、修飾(例えば、付加、除去、置換など)されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。さらには、以下説明するように、本発明の核酸は、本発明で記載するペプチド、特に本発明の変異体(改変体)ペプチドあるいはその一部をコードするもので、好ましいものとしてはDNAが挙げられる。ヒト、チンパンジー、サル、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウサギなどの哺乳動物由来のものも包含されてよい。また上記「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジエントな条件でCRDの塩基配列うちの連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、糖鎖結合性の点で実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。

好ましい態様では、ガレクチン8改変体は、例えば、(1)ガレクチン8のNCRDとして配列番号3に示されているアミノ酸配列又はその配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたもの、あるいは、配列番号3に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも70%以上の相同性、又は少なくとも75%以上の相同性、又は少なくとも80%以上の相同性、又は少なくとも85%以上の相同性、又は少なくとも90%以上の相同性、又は少なくとも95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ、ラクトース結合能を有するものであって、(2)ガレクチン8のCCR Dとして配列番号4に示されているアミノ酸配列又はその配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたもの、あるいは、配列番号3に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも70%以上の相同性、又は少なくとも75%以上の相同性、又は少なくとも80%以上の相同性、又は少なくとも85%以上の相同性、又は少なくとも90%以上の相同性、又は少なくとも95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ、ラクトース結合能を有するものであって、(3)上記(1)と(2)を結合しているリンク領域として配列番号9に示されているアミノ酸配列又はその配列において1個又はそれ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたもので、好ましくはエラスターゼなどのタンパク分解酵素に対してネイティブなガレクチン8より安定化されているものが挙げられる。当該リンク領域(3)としては、配列番号9に示されているアミノ酸配列中のアミノ酸残基が1個以上(例えば、1~2個、好ましくは3~4個、さらに好ましくは5~6個、さらに好ましくは7~8個、特に1~9個あるいは9個以上など)欠けている

10

20

30

40

50

欠失類縁体、該アミノ酸残基の1個以上（例えば、1～9個、好ましくは1～8個、さらに好ましくは1～6個、さらに好ましくは1～4個、特には1～2個あるいは9個以上など）が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上（例えば、1～28個、好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～10個、特には1～5個など）のアミノ酸残基（ただし、配列番号10に示されているアミノ酸配列のうち配列番号9に示されているアミノ酸配列を除いた部分で示されるものは除く）が付加されている付加類縁体も包含する。代表的な場合、当該リンク領域（3）としては、配列番号9に示されているアミノ酸配列をHM, RIP, 又は任意の2アミノ酸の配列で置換したものなどが挙げられる。アミノ酸の置換、欠失、あるいは挿入は、ポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を生ぜしめないものであることもできるし、ある場合には好ましい変化を与えるものであることができる。該アミノ酸配列中のアミノ酸の置換体としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられ、極性（中性）としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられ、陽電荷をもつアミノ酸（塩基性アミノ酸）としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられ、陰電荷をもつアミノ酸（酸性アミノ酸）としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

10

また、当該リンク領域（3）としては、配列番号9又は10に示されているアミノ酸配列を、配列番号10に示されているアミノ酸配列の29～70位の部分を除いて、HM, RIP, 又は任意の2アミノ酸の配列で置換したもの、配列番号9又は10に示されているアミノ酸配列のうち配列番号10に示されているアミノ酸配列の29～70位の部分を除いて、そのうちの6アミノ酸を残して、それ以外の残基を削除したものなどが挙げられる。また、当該リンク領域（3）としては、配列番号9又は10に示されているアミノ酸配列中のアミノ酸残基（ただし、例えば、配列番号10に示されているアミノ酸配列の29～70位の部分を除いてよい）が1個以上（例えば、1～5個、好ましくは3～10個、さらに好ましくは5～15個、さらに好ましくは7～20個、特には1～28個など）欠けている欠失類縁体、該アミノ酸残基の1個以上（例えば、1～9個、好ましくは1～8個、さらに好ましくは1～6個、さらに好ましくは1～4個、特には1～2個あるいは9個以上など）が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上（例えば、1～60個、好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特には1～5個など）のアミノ酸残基（ただし、配列番号10に示されているアミノ酸配列のうち29～70位の部分で示されるものは除く）が付加されている付加類縁体も包含する。

20

30

天然のヒトガレクチン8タンパク質の特徴であるドメイン構造あるいは糖結合能が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含される。また本発明のペプチドあるいはポリペプチドは天然のヒトガレクチン8タンパク質と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然のものと実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに、たとえば、N端側CRDやC端側CRDでは天然に生ずる変異体の一つであることもできる。本発明のヒト由来のタンパク質（又はペプチドあるいはポリペプチド）は、その各ドメインが、例えば、配列表のSEQ ID NO: 5～8から成る群から選ばれたアミノ酸配列に対し、特にはN端側CRDやC端側CRDのアミノ酸配列に対し、60%、場合によっては70%より高い相同性を有しているものが挙げられ、より好ましくはそれに対し、80%あるいは90%以上の相同アミノ酸配列を有するものが挙げられる。本発明のヒト由来のタンパク質の一部のものとは、該ヒト由来のタンパク質の一部のペプチド（すなわち、該タンパク質の部分ペプチド）であって、本発明の、ガレクチン8タンパク質と実質的に同等な活性を有するものであればいずれのものであってもよい。例えば、該本発明のタンパク質の部分ペプチドは、該ヒトガレクチン8の構成アミノ酸配列のうち少なくとも5個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは50個以上、より好

40

50

ましくは70個以上、もつと好ましくは100個以上、ある場合には200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられ、好ましくはそれらは連続したアミノ酸残基に対応するものであるか、あるいは、例えば、配列表のSEQ ID NO: 5~8のいずれかで示されるアミノ酸配列のうち対応する領域に対する相同性に関して、上記と同様の相同性を有するものが挙げられる。

本明細書において、「実質的に同等」とはタンパク質の活性、例えば、血球凝集活性、好中球接着誘導活性、インテグリン_m結合活性、プロMMP-9結合活性、活性型MMP-9産生促進活性、スーパーオキシド産生促進活性、所定の細胞傷害活性、アポトーシス誘起活性、抗炎症活性、LPS誘導の炎症を抑制する活性、抗アレルギー活性、免疫調節活性、LPS誘導のTNF- α 、IL-12、及び/又はIFN- γ の生産を抑制する活性、エンドトキシンショック抑制活性、糖鎖結合活性、生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。さらにまた、その用語の意味の中には、実質的に同質の活性を有する場合を包含してよく、該実質的に同質の活性としては、血球凝集活性、好中球接着誘導活性、インテグリン結合活性、細胞傷害活性、アポトーシス誘起活性、エンドトキシンショック抑制活性などを挙げることができる。該実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示し、例えば、生理的に、薬理的に、あるいは生物学的に同質であることを示す。例えば、血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、インテグリン結合活性などの結合活性、細胞傷害活性、アポトーシス誘起活性、エンドトキシンショック抑制活性などの活性が、同等（例えば、約0.001~約1000倍、好ましくは約0.01~約100倍、より好ましくは約0.1~約20倍、さらに好ましくは約0.5~約2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的な要素は異なってもよい。

「ガレクチン8改変体ポリペプチド」とは、野生型ガレクチン8の天然の配列の改変体、その誘導体、類似体（アナログ）、フラグメント、キメラ体、および変異体を含むものである。当該ポリペプチドは、宿主細胞において発現するように意図され且つ特定のガレクチン8改変体ポリペプチドをコードするように設計された組換えで産生されたポリヌクレオチド配列によってコードされているものを含む。

「ガレクチン8改変体治療剤」とは、ガレクチン8改変体をコードするポリヌクレオチド（ガレクチン8改変体ポリヌクレオチド）またはガレクチン8改変体ポリペプチド配列に由来する分子、このようなガレクチン8改変体ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの改変体、変異体、類似体、キメラ体、フラグメントなどのうちの少なくとも一つを含むものを指している。ポリヌクレオチドであるガレクチン8改変体治療剤とは、一般的には、ガレクチン8改変体ポリペプチドをコードする配列であって且つ宿主細胞で組換え技術で発現することができるものを含んでいる。さらに、ガレクチン8改変体治療剤は、ガレクチン8活性のアゴニストであってもよい。他のガレクチン8改変体治療剤としては、ガレクチン8改変体を供与するもの、ガレクチン8改変体の有する活性を有し且つガレクチン8活性の欠如あるいは不足に関連する疾患・病気・異常な症状を予防及び/又は治療する効果を生じるガレクチン8活性のモデュレーターを含んでいてよい。ガレクチン8活性のモデュレーターとしては、例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または低分子であってよい。

本明細書で使用の用語「診断剤」とは、本発明における診断において使用する1つまたはそれ以上のその診断行為に寄与するような任意の薬剤をいう。これらものの診断への使用は、ガレクチン8産生細胞の存在を決定するための方法あるいはガレクチン8結合性物質を提示する細胞の存在を決定するための方法を含むものであってよい。診断剤としては、例えば、ガレクチン8改変体（ムテイン）をコードするDNA、安定化ガレクチン8改変体（ムテイン）、および該安定化ガレクチン8改変体（ムテイン）を有する細胞または細胞ホモジュネートからなる群から選択されたものを含むものが挙げられる。

本明細書で使用の用語「治療剤」とは、本発明における治療において使用する1つまたはそれ以上のその治療行為を達成するかまたは達成するのに寄与する任意の薬剤であってよい。例えば、治療剤がガレクチン8改変体ポリペプチドを発現するように設計されたポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドである場合、その薬剤は、哺乳動物に投与されそして細胞で発現することができるポリヌクレオチドである。この場合、薬剤の活性形態は、発現されたポリペプチドである。

ガレクチン 8 改変体治療剤は、ガレクチン 8 改変体の生物活性を有する治療剤、または天然のガレクチン 8 改変体よりも長く特定の糖鎖に対して結合している活性を有するポリペプチド、エラスターゼ、トリプシンなどのタンパク分解酵素に対してネイティブなガレクチン 8 より安定化されているガレクチン 8 改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのようなガレクチン 8 改変体に由来する治療剤である。該治療剤は、単独で、あるいは他の薬剤（例えば、ガレクチン 8 改変体の投与と共に使用され且つ特定の腫瘍あるいは免疫疾患などに対するその他の公知の処置法に使用されるような薬物、あるいは哺乳動物でのガレクチン 8 改変体の発現を容易に行いような遺伝子送達ビヒクルなど）と組み合わせて、その治療目的を達成する。例えば、該治療剤は、他の目的のために開発されたガレクチン 8 改変体を含むものであってよく、さらには、ガレクチン 8 のアゴニスト、ガレクチン 8 活性を修飾又は調節する薬物を含むものであってよく、例えば、有機低分子化合物又は物質、ペプチド、ペプチド様化合物又は物質、ガレクチン 8 改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ガレクチン 8 改変体ポリペプチド、プロテアーゼに対してネイティブなガレクチン 8 より安定化されているガレクチン 8 改変体のキメラ体あるいは変異体などを発現し且つ形質転換された細胞であってよい。

本明細書で「配合治療剤」とは、一緒に投与した場合にそれらの別々の効果を生じるといった、いくつかの成分またはいくつかの薬剤を含有する治療組成物を指しており、それらは疾患などを処置するために一緒に投与された場合に相乗効果を生じるようなものを指してよい。好ましくは、配合治療剤中のいくつかの成分またはいくつかの薬剤のそれぞれにより得られる別々の作用効果は、より大きな治療効果、例えば、腫瘍の消失あるいは正常化、自己免疫疾患を含めた免疫疾患からの回復および長期生存が得られるようにそれを組み合わせることができるのである。配合治療剤を投与して得られる効果の例としては、短期での症状の回復と長期投与の後に得られる症状の回復との組み合わせとか、患者における特定の型の細胞のそれぞれに対する自己免疫応答などの好ましくない免疫応答を減少せしめるといったような効果の組み合わせが挙げられる。本発明の配合治療剤の例としては、ガレクチン 8 改変体をコードするポリヌクレオチドと IFN 類、IL - 2 などのサイトカイン類の少なくとも一つをコードするポリヌクレオチドを含んでいる遺伝子送達ビヒクルを投与するためのものなどが挙げられる。別の例としては、2つの遺伝子送達ベクターを使用することもでき、例えば、1つはガレクチン 8 改変体を発現するもので、他方はサイトカイン類の少なくとも一つを発現するためのものであってよい。さらに、標的細胞において種々の活性を誘導するためのガレクチン 8 改変体の投与を見越してアップレギュレートするために、IFN 類、IL - 2 など、あるいは IFN - などを発現する遺伝子送達ビヒクルを投与することもできる。種々の治療剤は、それを同時に供与することもできるし、例えば、治療を効率化するよう、必要に応じて個々の薬剤の 1 つまたはすべてを繰り返し投与するものであってよく、同一の薬学的に許容される担体中に入れて投与することもできる。

「遺伝子送達ビヒクル」とは、細胞におけるポリペプチドの発現のためのコード配列を細胞へ送達することを容易になし得るようにする成分をいう。該細胞は、インビボ遺伝子治療におけるように哺乳動物の体内に存在していてもよいし、エキソビボ遺伝子治療におけるようにトランスフェクション処理のために一旦哺乳動物から取り出され、ポリペプチドが発現するように哺乳動物に戻されたものであってよい。遺伝子送達ビヒクルは、細胞への遺伝子送達を達成することのできるような任意の成分またはビヒクルであってよく、例えば、リポソーム、粒子、ベクターなどであってよい。遺伝子送達ビヒクルとしては、組換えビヒクル（例えば、組換えウイルスベクター）、核酸ベクター（例えば、プラスミド）、ネイキッド核酸分子（例えば、遺伝子）、核酸分子上の負電荷を中和し且つ核酸分子を折り畳んだ分子として凝集せしめることのできるようなポリカチオン分子と複合体化されている核酸分子、リポソームと結合した核酸（米国特許第 5, 166, 320 号明細

10

20

30

40

50

書；第5,547,932号明細書；Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7851, 1987)などが挙げられる。該遺伝子送達ビヒクルは、プロデューサー細胞のような特定の真核生物細胞を包含してよく、これらは宿主細胞に1つ以上の所望の特性を生物学的に有している核酸分子を送達することができるといったものである。所望の特性とは、以下に論議するように、例えば、タンパク質、酵素、あるいは抗体などのような所望物質を発現する能力及び/又は生物学的活性を提供する能力を含んでいてよい。すなわち、遺伝子送達ビヒクルによって運ばれる核酸分子が、所望の物質を発現することを必要とせず、それ自体活性な薬剤であってもよい。このような生物学的活性の1つの例は、遺伝子治療においてみられるものである。遺伝子治療では、ある種の遺伝子を不活性化し、当該遺伝子に指示される産物が作り出されるのを遮断し、送達された核酸分子が特異的に発現するようにした遺伝子に組込むものである。遺伝子送達ビヒクルとは、1つまたは複数の目的の配列または遺伝子が発現するように指示することのできる集合体(アセンブリ)を指している。

10

遺伝子送達ビヒクルは、一般的には、プロモーターエレメントを含んでおり、そしてポリアダニル化を指示するシグナルを含んでいてよい。さらに、遺伝子送達ビヒクルは、1つまたは複数の目的の配列または遺伝子に、転写された場合に作動し得るように連結されており、翻訳開始配列として作用する配列を含んでいる。また、遺伝子送達ビヒクルは、Neo、SV²Neo、TK、ハイグロマイシン、プレオマイシン(フレオマイシン)、ピューロマイシン、ヒスチジノール、DHFRなどのような選択可能マーカー、1つ以上の制限酵素部位および翻訳終結配列を含んでいてよい。本発明で使用される場合、遺伝子送達ビヒクルとは、ウイルスベクター(Jolly, Cancer Gen. Therapy, 1:51-64, 1994)、核酸ベクター、ネイキッドDNA、リボソームDNA、コスミド、細菌、特定の真核生物細胞(プロデューサー細胞を含む；米国特許第6,333,195号明細書参照)のような組換えビヒクルを包含してよい。

20

「生物学的活性」とは、特異的な活性を保持している分子を指す場合に使用される。例えば、生物学的に活性なガレクチン8改変体ポリペプチドは、ガレクチン8の糖鎖認識部位が保有する特定の糖鎖に対して特異的に結合するといった活性又はそれと実質的に同等な性質の活性を有し且つエラスターゼ、トリプシンなどのタンパク分解酵素に対してネイティブなガレクチン8より定性的及び/又は定量的に安定化されている能力を保持し、例えば、ガレクチン8が保有する血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、インテグリン_m結合活性、プロMMP-9結合活性、活性型MMP-9産生促進活性、スーパーオキシド産生促進活性、LPSの誘導する炎症の抑制活性、LPSの誘導するTNF- α 、IL-12、及び/又はIFN- γ の生産を抑制する活性、エンドトキシンショック抑制活性、抗腫瘍活性あるいはアポトーシスを導くアポトーシス経路を活性化する活性などを示す。

30

本明細書で使用の用語「核酸分子」または「ポリヌクレオチド」とは、特定のアミノ酸配列またはその相補鎖をコードするRNAまたはDNA、さらにはDNA:RNAハイブリッドなどの分子をいう。本明細書で使用の「コード配列」とは、特定のアミノ酸配列またはその相補鎖をコードするRNAまたはDNA、さらにはDNA:RNAハイブリッドなどのいずれかをいう。ポリヌクレオチドは、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはリボザイムを含んでいてよく、また遺伝子の3'または5'非翻訳領域のような配列、遺伝子のイントロン、遺伝子のコード領域を構成していないといった遺伝子の他の領域を含んでいてよい。DNAやRNAは、一本鎖または二本鎖であってもよい。合成核酸や合成ポリヌクレオチドには、化学的に合成された核酸配列を有するものも含まれてよく、さらに変性に対する抵抗性を分子に与えるために化学的に部分改変しておくこともできる。ポリヌクレオチドは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、相補的DNAもしくはRNAを使用しての組換え発現などによって製造できるし、あるいは化学合成によって生成させることもできる。

40

本明細書中用語「発現制御配列」や「調節配列」とは、ポリペプチドをコードする遺伝子の発現に影響を与え、転写や翻訳のためのシグナルを含むといった発現に影響を及ぼす

50

ような1つまたはそれ以上の成分を含んでおり且つ当該分野で使用されている配列をいう。本発明のポリペプチドの発現に適している発現制御配列は、ポリペプチドが発現されるべき宿主系によってそれは異なる。

本発明の「ポリペプチド」としては、ガレクチン8 改変体ポリペプチドを含むものであれば如何なるものであってもよく、成熟タンパク質を含むガレクチン8 改変体タンパク質の任意の部分が挙げられ、さらにその短縮型、改変体、対立遺伝子体、アナログ、誘導体などが挙げられる。改変体としては、関連タンパク質と同じ遺伝子から発現されるスプライスされた改変体から誘導されたものであってよい。他に特に指示がない限り、このようなポリペプチドは、例えば、特定の糖鎖に対して特異的に結合するといった親和結合性あるいは特異的パートナーへの結合活性などの当該ガレクチン8 タンパク質が有する生物活性のうちの一つ又はそれ以上の生物活性を有するものである。本「ポリペプチド」なる用語は、特定の長さの遺伝子産物に限定するものではない。ヒトに由来するまたはヒト以外の供給源に由来することに拘らず、ガレクチン8 のN末端側糖鎖認識部位(NCRD)及びC末端側糖鎖認識部位(CCRD)に関して標的タンパク質または成熟タンパク質と同一である、あるいは少なくとも60%、好ましくは70%、より好ましくは80%、および最も好ましくは90%、さらには95%の相同性を有しているポリペプチドは、本ポリペプチドのこの定義内に含まれる。したがって、対立遺伝子に基づく改変体、並びにアミノ酸の置換、欠失、または挿入を含む遺伝子産物の改変体も含まれてよい。アミノ酸の置換は、アミノ酸の保存性の置換、あるいはグリコシル化部位、リン酸化部位、アセチル化部位などを改変するようなアミノ酸の置換、あるいは機能に必要なシステイン残基の位置を改変して折り畳みパターンを変えるとといったもの、さらに必須アミノ酸残基でないものを取り除くといったような置換であってよい。アミノ酸の保存性の置換とは、一般的には、電荷、疎水性/親水性、及び/又は置換されるアミノ酸の立体的なサイズ(大きさ)を保存するような置換であり、例えば、Gly/Ala、Val/Ile/Leu、Asp/Glu、Lys/Arg、Asn/Gln、Ser/Cys/Thr、およびPhe/Trp/Tyrなどといった群のメンバー間での置換が保存性の置換である。

10

20

アナログとは、標的タンパク質様の活性を有するものであり、ペプチド様のものであり、広く知られているペプチド模倣物質の一つあるいはそれ以上を有しているペプチドなどが挙げられる。本定義のうちには、例えば、1つまたはそれ以上のアミノ酸のアナログ(例えば、非天然型アミノ酸などを含む)を含んでいるポリペプチド、置換された連結部を有するポリペプチド、天然に存在するような変異および天然には存在しないような変異といったような当該技術分野で公知のその他の改変・修飾が含まれる。

30

本明細書で用語「ポリペプチド」は、ポリペプチド発現の後改変されているもの、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、ミリスチル化などされているものであってもよい。

本明細書で用語「ネイキッドDNA」とは、哺乳動物での発現のために哺乳動物へ投与されるポリヌクレオチドDNAを指している。ポリヌクレオチドとしては、例えば、コード配列であってよく、ポリヌクレオチドDNAは、一旦DNAが細胞内に入るとコード配列が容易に発現するように発現制御配列に直接的または間接的に結合しているものであってよい。間接的な結合とは、哺乳動物細胞でのDNAの発現を容易にする目的で調節領域とコード配列を結合するためとか、他の配列を組み込むのを容易にするなどのため、リンカーまたはスパーサーを介して2つのポリヌクレオチド領域を一緒に結合することを含んでいてよい。

40

本明細書で「ベクター」とは、1つ又は複数の目的の配列または遺伝子の発現を指示することができる集合体(アセンブリ)を指している。ベクターは、転写プロモーター/エンハンサー、1または複数の遺伝子座を規定しているエレメント、さらにはオルターナティブ・スプライシング、核RNA輸送、メッセンジャーの翻訳後に起こる修飾、あるいはタンパク質の転写後に起こる修飾などといった過程を指示又は制御している他の遺伝子が発現するのを制御しているその他のエレメントを任意に含んでいなければならない。さらに、ベクターは、転写される場合に、1つ又はそれ以上の目的の配列または遺伝子に作

50

動可能に連結され、且つ翻訳開始配列として作用するような配列を含まなければならない。必要に応じて、ベクターは、ポリアデニル化を指示するシグナル、Neo、TK、ハイグロマイシン、ブレオマイシン（フレオマイシン）、ヒスチジノール、DHFRなどのような選択マーカー、1つ又はそれ以上の制限部位および翻訳終結配列を含んでよい。さらに、ベクターがレトロウイルス中に配置される場合、ベクターは、パッケージングシグナル、長末端反復配列（LTR）、そして、もしそれが無いなら、使用されるレトロウイルスに適したプラス鎖やマイナス鎖のプライマー結合部位を含まなければならない。

「組織特異的プロモーター」とは、限定された数の組織タイプあるいは細胞タイプにおいて優先的に活性であるようなものであって、転写プロモーター/エンハンサーまたは遺伝子座を規定しているエレメント、あるいは上記したように遺伝子発現を制御するその他のエレメントを指している。このような組織特異的プロモーターの代表的例としては、例えば、PEPCKプロモーター、HER2/neuプロモーター、カゼインプロモーター、IgGプロモーター、絨毛性胚抗原プロモーター、エラストラーゼプロモーター、ボルホピリノーゲンデアミナーゼプロモーター、インスリンプロモーター、成長ホルモン因子プロモーター、チロシンヒドロキシラーゼプロモーター、アルブミンプロモーター、フェトプロテインプロモーター、アセチルコリンレセプタープロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、またはグロビンプロモーター、T細胞レセプタープロモーター、オステオカルシンプロモーターなどが挙げられる。

「事象特異的プロモーター」とは、転写プロモーター/エンハンサーまたは遺伝子座を規定しているエレメント、または上記したように遺伝子発現を制御するその他のエレメントであって且つこれらの転写活性が細胞性刺激に対する応答の際に変化するようなものを指している。このような事象特異的プロモーターの代表的例としては、チミジンキナーゼもしくはチミジレートシンターゼプロモーター、もしくはインターフェロンプロモーター、さらにホルモン（天然ホルモン、合成ホルモン、または他の非宿主生物からのホルモンのいずれか、例えば、昆虫ホルモンなど）の存在に応答するプロモーターなどが挙げられる。

用語「融合タンパク質」または「融合ポリペプチド」とは、1つより多くのタンパク質または1つより多くのタンパク質の部分を含む1つのポリペプチドの発現を生じるようなベクターを使用しての発現で産生されるものであり且つベクターまたは連続した結合中の1つより多くの異種コード配列を組換え発現せしめて得られるタンパク質またはポリペプチドを指している。最も好ましくは、融合タンパク質は、それを構築するのに使用された由来タンパク質又はポリペプチドが有していた生物学的活性のうち少なくとも1つを保持しているポリペプチド単位をもっており、好ましくは、別々のタンパク質の部分を組み合わせることによってシグナルポリペプチドを形成し、相乗的に改良された生物学的活性を生ぜしめているものが含まれる。生成される融合タンパク質としては、発現された場合に機能を有するポリペプチドを有するもの、発現された場合に機能を有さないペプチドを有するものが挙げられる。該発現された場合に機能を有さないペプチドとしては、好ましくは活性を有するポリペプチドを発現するために役立つものが挙げられる。本発明に有用な融合タンパク質の例としては、治療のためあるいは検知又は測定のため、さらには分析又は分離や精製のためといった利用の観点からのいくつかの利点を有している遺伝子操作された任意のガレクチン8改変体融合ポリペプチドが挙げられる。

用語「キメラ」または「キメラタンパク質」は、融合タンパク質または融合ポリペプチドと等価な意味を有すると考えてよい。「キメラ分子」は、融合ポリペプチド、または融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド融合分子であってよい。キメラは、連結されたDNAコード配列から構築され、そして細胞系で発現されるか、またはベクターでもって投与して動物においてインビボ発現することができる。例えば、ガレクチン8改変体を含むキメラまたは融合タンパク質は、インビボまたはエキソビボでの遺伝子治療プロトコルで投与することができる。

本明細書で「患者」とは、生きている生物で任意の治療又は予防処置可能なものをさしてよく、真核生物または原核生物を含むが、これらに限定されるものではない。例えば、

10

20

30

40

50

患者である真核生物としては、脊椎動物や無脊椎動物であってよい。したがって、例えば、患者は、魚、鳥、蠕虫、昆虫、哺乳動物、爬虫類、両生類、菌類、植物であってよく、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物としては、例えば、ヒトが挙げられる。

本発明のガレクチン 8 改変体治療剤及び / 又は診断剤の一般的製造および使用法を以下説明する。1つの態様では、本発明は、ガレクチン 8 が保有する生理活性又は生物活性の不足又は欠如に起因する疾患・病気・異常状態を処置する技術を提供する。該処置技術としては、例えば、ガレクチン 8 改変体治療剤を提供する工程及び / 又は当該疾患などを有する哺乳動物に有効量のガレクチン 8 改変体治療剤を投与する工程などが挙げられる。ガレクチン 8 改変体は、血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、インテグリン_m結合活性、プロ MMP - 9 結合活性、活性型 MMP - 9 産生促進活性、スーパーオキシド産生促進活性、悪性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性、悪性腫瘍細胞に対してのアポトーシス誘導活性、悪性腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性（抗ガン活性）、免疫調節活性、抗炎症作用、抗アレルギー作用、LPSの誘導する炎症の抑制活性、LPSの誘導する TNF - α 、IL - 12、及び / 又は IFN - γ の生産を抑制する活性、エンドトキシンショック抑制活性を發揮することから、抗腫瘍剤（抗ガン剤）、抗アレルギー剤、免疫調節剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤、ホルモン代替用剤、エンドトキシンショック抑制剤などとして期待できるものである。該処置技術は、好中球の異常状態を処置する方法を包含する。「自己免疫疾患」、「自己免疫疾患」、および「自己免疫」とはすべて、哺乳動物での自己免疫によって特徴づけられる障害（これは、自己成分に対する免疫系の応答である）をいう。自己免疫応答は、臨床的兆候を現す症状に進展し得るものである。厳密に言えば、移植拒絶は自己免疫反応ではないが、患者が症状的に細胞、組織、または器官を置換したりあるいは移植するといった外科手術を受ける場合、同種移植を受ける体というものは、外来移植に対して免疫学的に反応するものである。種の 1 つのメンバーから他の種への、細胞、組織、または器官の同種移植中に、受容体（レシピエント）では移植された細胞、組織、または器官を拒絶するのに十分な免疫応答が生じる場合には、「移植拒絶」が起こるのである。

本発明の方法および治療剤によって処置することができる「腫瘍」の例としては、悪性腫瘍が含まれていてよく、例えば、転移をする腫瘍は悪性腫瘍で、一般的にその悪性腫瘍は上皮性と非上皮性のものがあるとされ、ある場合には、ガン、肉腫、白血病などに区分して考えられることもあるが、単に「ガン」と呼んだ場合、一般人では悪性腫瘍を指すことが多い。本明細書で「ガン」とは、広い意味で解釈してよく、単に上皮性の悪性腫瘍と解釈すべきではない。本明細書において「ガン」とは、上皮性悪性腫瘍及び非上皮性悪性腫瘍（腫瘍形成性のものも非形成性のものも含む）を包含してよく、皮膚ガン（メラノーマを含めてよい）、乳ガン、卵巣ガン、子宮ガン、睾丸悪性腫瘍、前立腺ガン、膀胱ガン、腎ガン、甲状腺ガン、咽頭・喉頭ガン、舌ガン、上顎ガン、食道ガン、胃ガン、結腸・直腸ガン、肺・気管支ガン、肝ガン（肝細胞癌、肝内胆管ガンを含む）、肝外胆管・胆嚢ガン、膵臓ガン、白血病、悪性リンパ腫、形質細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、悪性血管腫、悪性血管内皮腫、脳腫瘍（メニンギオーマ、グリオーマ、アストロサイトーマなどを含む）等が挙げられるが、これらに限定されることなく、本発明のガレクチン 8 改変体を使用することで好ましい結果が得られるもの、さらには当該ガレクチン 8 改変体が関与して何らかの生理的又は生物学的な応答が得られるものは含まれてよいと理解されるべきである。

本発明の方法および治療剤によって処置することができる「自己免疫疾患」の例としては、多発性硬化症、橋本甲状腺炎、全身性エリテマトーデス（SLE）、グッドパスチャー症候群、天疱瘡、レセプター自己免疫、自己免疫溶血性貧血、自己免疫血小板減少性紫斑病、変形性関節症、慢性関節炎リウマチ、抗コラーゲン抗体による強皮症（scleroderma）、複合化結合組織病、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アジソン病、自発性不妊症、糸球体腎炎、水疱性類天疱瘡、アドレナリン作用性薬物耐性、慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫ベースの内分泌腺不全、白斑、脈管炎、心筋梗塞後遺症（post-myocardial infarction）、心臓穿孔症候群、蕁麻疹、

10

20

30

40

50

アトピー性皮膚炎、自己免疫ベースの喘息、自己免疫ベースの炎症性反応、肉芽腫症障害、強直性（*ankylosing*）脊椎炎、連鎖球菌感染後（*poststreptococcal*）系球体腎炎、自己免疫溶血性貧血、脳炎、リンパ腫に対する二次的自己免疫反応、変性障害、萎縮性障害などが挙げられる。レセプター自己免疫を表す自己免疫疾患としては、例えば、グレーブス病、重症筋無力症、インスリン耐性症などが挙げられる。アドレナリン性薬物耐性の自己免疫疾患としては、例えば、喘息および嚢胞性線維症などが挙げられる。

本発明における他の自己免疫疾患としては、例えば、動物モデルが存在するものが挙げられ、例えば、シェーグレン症候群（自己免疫涙腺炎（*dacryodentitis*）または免疫媒介唾液腺炎）、自己免疫心筋炎、原発性胆汁性肝硬変（*PBC*）、炎症性心臓病、水銀誘導性腎自己免疫、インスリン依存性糖尿病（*I型糖尿病*または*IDD*）、胸腺切除術後自己免疫、中枢神経系（*CNS*）脱髄障害、*CNS*狼瘡、睡眠発作、免疫媒介*PNS*障害、変形性関節症、慢性関節炎リウマチ、ブドウ膜炎、髄質嚢胞性線維症、自己免疫溶血性疾患、自己免疫脈管炎、卵巣自己免疫疾患、ト強皮症（*scleroderma*）などが挙げられる。中枢神経系（*CNS*）脱髄障害によって特徴づけられる自己免疫疾患としては、例えば、多発性硬化症（*MS*）などが挙げられる。末梢神経系（*PNS*）自己免疫疾患は、例えば、ギヤン-バレー症候群（*GBS*）であってよい。

ガレクチン8 改変体治療剤としては、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、低分子の有機化合物、ペプチド、またはペプチド様化合物又は物質などが挙げられる。また、ガレクチン8 改変体治療剤は、ガレクチン8 改変体ポリペプチド、ガレクチン8 改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、当該ガレクチン8 改変体ポリペプチドの一部を含む融合ポリペプチド、当該ガレクチン8 改変体ポリペプチドの一部を含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ガレクチン8 改変体ポリペプチドの生物学的に活性なペプチド誘導體、ガレクチン8 改変体ポリペプチドに由来する生物学的に活性なペプチド様化合物又は物質、またはガレクチン8 改変体活性を有しており且つガレクチン8 改変体の構造を模倣している低分子の有機化合物（例えば、アゴニストを含めてよい）などが含まれていてよい。ガレクチン8 改変体ポリペプチドは、ガレクチン8 改変体ポリペプチド改変体、ガレクチン8 改変体ポリペプチド誘導體、変異したガレクチン8 改変体ポリペプチド、または短縮型ガレクチン8 改変体ポリペプチドのような生物学的に活性なガレクチン8 改変体ポリペプチドであってよい。ガレクチン8 改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ガレクチン8 のN端側CRD全長並びにC端側CRD全長を持っている改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、ガレクチン8 改変体ポリペプチドの生物学的に活性な部分をコードする配列、ガレクチン8 改変体ポリペプチドに由来する生物学的に活性なペプチドをコードする配列、可溶性ガレクチン8 改変体ポリペプチドをコードする配列などであってよい。本発明の別の実施態様は、ガレクチン8 改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現し得る遺伝子送達ビヒクルを有する組成物である。

本発明では、「遺伝子組換え技術」を利用して所定の核酸（ポリヌクレオチド）や所定のペプチド（ポリペプチド）を構築したり取得すること、また単離・配列決定したり、組換え体を作製したりできる。本明細書中使用できる遺伝子組換え技術（組換えDNA技術を含む）としては、当該分野で知られたものが挙げられ、例えばJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., *DNA Cloning*, 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、東京化学同人(1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III(組換えDNA技術)」、東京化学同人(1

10

20

30

40

50

992); M. J. Gait (Ed), Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (1984); B. D. Hames and S. J. Higgins (Ed), Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press Ltd., Oxford, UK (1985); B. D. Hames and S. J. Higgins (Ed), Transcription and Translation: A Practical Approach (Practical Approach Series), IRL Press Ltd., Oxford, UK (1984); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (2nd Edition), John Wiley & Sons, New York (1988); J. H. Miller and M. P. Calos (Ed), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1987); R. J. Mayer and J. H. Walker (Ed), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology, Academic Press, (1987); R. K. Scopes et al. (Ed), Protein Purification: Principles and Practice (2nd Edition, 1987 & 3rd Edition, 1993), Springer-Verlag, N. Y.; D. M. Weir and C. C. Blackwell (Ed), Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, 2, 3 and 4, Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1986); L. A. Herzenberg et al. (Ed), Weir's Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, 2, 3 and 4, Blackwell Science Ltd. (1997); R. W. Ellis (Ed), Vaccines - new approaches to immunological problems, Butterworth-Heinemann, London (1992); R. Wu ed., Methods in Enzymology, Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., Methods in Enzymology, Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., Methods in Enzymology, Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., Methods in Enzymology, Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu et al. ed., Methods in Enzymology, Vol. 218, Academic Press, New York (1993); S. Weissman (ed.), Methods in Enzymology, Vol. 303, Academic Press, New York (1999); J. C. Glorioso et al. (ed.), Methods in Enzymology, Vol. 306, Academic Press, New York (1999)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる(それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる)〔以下、これら全てを「遺伝子組換え技術」という〕。

本明細書中、「相同性」とは、ポリペプチド配列(あるいはアミノ酸配列)又はポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド配列（あるいは塩基配列）における2本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同志又は各塩基同志の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量（数）を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものである。相同性は容易に算出することができる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の相同性を測定する方法は数多く知られており、「相同性」（「同一性」とも言われる）なる用語は、当業者には周知である（例えば、Lesk, A. M. (Ed.), *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), *Computer Analysis of Sequence Data: Part I*, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), *Sequence Analysis Primer*, M-Stockton Press, New York, (1991)等)。二つの配列の相同性を測定するのに用いる一般的な方法には、Martin, J. Bishop (Ed.), *Guide to Huge Computers*, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H. & Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988)等が開示されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。相同性を測定するための好ましい方法としては、試験する二つの配列間の最も大きな適合関係部分を得るように設計したものが挙げられる。このような方法は、コンピュータープログラムとして組み立てられているものが挙げられる。二つの配列間の和同性を測定するための好ましいコンピュータープログラム法としては、GC Gプログラムパッケージ (Devereux, J. et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403 (1990))等が挙げられるが、これらに限定されるものでなく、当該分野で公知の方法を使用することができる。

本明細書中、「ポリメラーゼ連鎖反応」あるいは「ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (polymerase chain reaction)」又は「PCR」とは、一般的に、米国特許第4,683,195号明細書などに記載されたような方法を指し、例えば、所望のヌクレオチド配列をインピットで酵素的に増幅するための方法を指している。一般に、PCR法は、鋳型核酸と優先的にハイブリダイズすることのできる2個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プライマー伸長合成を行うようなサイクルを繰り返し行うことを含むものである。典型的には、PCR法で用いられるプライマーは、鋳型内部の増幅されるべきヌクレオチド配列に対して相補的なプライマーを使用することができ、例えば、該増幅されるべきヌクレオチド配列とその両端において相補的であるか、あるいは該増幅されるべきヌクレオチド配列に隣接しているものを好ましく使用することができる。5'端側のプライマーとしては、少なくとも開始コドンを含むか、あるいは該開始コドンを含めて増幅できるように選択し、また3'端側のプライマーとしては、少なくともストップコドンを含むか、あるいは該ストップコドンを含めて増幅できるように選択することが好ましい。プライマーは、好ましくは5個以上の塩基、さらに好ましくは10個以上の塩基からなるオリゴヌクレオチド、より好ましくは18~25個の塩基からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。

PCR反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えばR. Saiki, et al., *Science*, 230:1350, 1985; R. Saiki, et al., *Science*, 239:48

10

20

30

40

50

7, 1988; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., DNA Cloning, 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis et al. ed., PCR Protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)などに記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。また、PCR法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

10

PCR反応は、代表的な場合には、例えば鋳型（例えば、mRNAを鋳型にして合成されたDNA; 1st strand DNA）と該遺伝子に基づいてデザインされたプライマーとを、10x反応緩衝液（Taq DNAポリメラーゼに添付されている）、dNTPs（デオキシヌクレオシド三リン酸dATP, dGTP, dCTP, dTTPの混合物）、Taq DNAポリメラーゼ及び脱イオン蒸留水と混合する。混合物を、例えば、GeneAmp 2400 PCR system, Perkin-Elmer/Cetus社などの自動サーマルサイクラーを用いて一般的なPCRサイクル条件下にそのサイクルを25~60回繰り返すが、増幅のためのサイクル数は適宜目的に応じて適当な回数とすることができる。PCRサイクル条件としては、例えば、変性90~95 5~100秒、アニーリング40~60 5~150秒、伸長65~75 30~300秒のサイクル、好ましくは変性94 15秒、アニーリング58 15秒、伸長72

20

45秒のサイクルが挙げられるが、アニーリングの反応温度及び時間は適宜実験によって適当な値を選択できるし、変性反応及び伸長反応の時間も、予想されるPCR産物の鎖長に応じて適当な値を選択できる。アニーリングの反応温度は、通常プライマーと鋳型DNAとのハイブリッドのTm値に応じて変えることが好ましい。伸長反応の時間は、通常1000bpの鎖長当たり1分程度がおおよその目安であるが、より短い時間を選択することも場合により可能である。

30

本明細書中、「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短い一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドで、好ましくはポリデオキシヌクレオチドが挙げられ、Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol. 28, p. 716-734 (1989)に記載されているような既知の方法、例えば、フォスフォトリエステル法、フォスフォジエステル法、フォスファイト法、フォスフォアミダイト法、フォスフォネート法などの方法により化学合成されることができる。通常合成は、修飾された固体支持体上で合成を便利に行うことができることが知られており、例えば、自動化された合成装置を用いて行うことができ、該装置は市販されている。該オリゴヌクレオチドは、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を含有してよく、例えば、イノシンなどの天然においては普通でない塩基あるいはトリチル化された塩基などを含有してよいし、場合によっては、マーカの付された塩基を含有してよい。

40

所定の核酸を同定したりするには、ハイブリダイゼーション技術を利用することができる。該ハイブリダイゼーションは、上記「遺伝子組換え技術」を開示する文献記載の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーションは、DNAなどの核酸を含有しているサンプルをナイロンフィルターなどの膜を含めた担体に転写せしめ、必要に応じ変成処理、固定化処理、洗浄処理などを施した後、その担体（例えば、膜など）に転写せしめられたものを、必要に応じ変成させた標識プローブDNA断片と、ハイブリダイゼーション用緩衝液中で反応させて行われる。

ハイブリダイゼーション処理は、普通約35~約80、より好適には約50~約65

50

で、約15分間～約36時間、より好適には約1～約24時間行われるが、適宜最適な条件を選択して行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーション処理は、約55で約18時間行われる。ハイブリダイゼーション用緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、Rapid hybridization buffer (Amersham社)などを用いることができる。転写した担体(例えば、膜など)の変成処理としては、アルカリ変性液を使用する方法が挙げられ、その処理後中和液や緩衝液で処理するのが好ましい。また担体(例えば、膜など)の固定化処理としては、普通約40～約100、より好適には約70～約90で、約15分間～約24時間、より好適には約1～約4時間ベーキングすることにより行われるが、適宜好ましい条件を選択して行うことができる。例えば、フィルターなどの担体を約80

10

で約2時間ベーキングすることにより固定化が行われる。転写した担体(例えば、膜など)の洗浄処理としては、当該分野で普通に使用される洗浄液、例えば1M NaCl、1mM EDTAおよび0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0などで洗うことにより行うことができる。ナイロンフィルターなどの膜を含めた担体としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができる。

上記アルカリ変性液、中和液、緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、アルカリ変性液としては、例えば、0.5M NaOHおよび1.5M NaClを含有する液などを挙げることができ、中和液としては、例えば、1.5M NaCl含有0.5M Tris-HCl緩衝液、pH8.0などを挙げることができ、緩衝液としては、例えば、2×SSPE(0.36M NaCl、20mM NaH₂PO₄および2mM EDTA)などを挙げることができる。またハイブリダイゼーション処理に先立ち、非特異的なハイブリダイゼーション反応を防ぐために、必要に応じて転写した担体(例えば、膜など)はプレハイブリダイゼーション処理することが好ましい。このプレハイブリダイゼーション処理は、例えば、プレハイブリダイゼーション溶液[50% formamide、5×Denhardt's溶液(0.2%ウシ血清アルブミン、0.2% polyvinyl pyrrolidone)、5×SSPE、0.1% SDS、100μg/ml熱変性サケ精子DNA]などに浸し、約35～約50、好ましくは約42で、約4～約24時間、好ましくは約6～約8時間反応させることにより行うことができるが、こうした条件は当業者であれば適宜実験を繰り返し、より好ましい条件を決めることができる。ハイブリダイゼーションに用いる標識プローブDNA断片の変性は、例えば、約70～約100、好ましくは約100で、約1～約60分間、好ましくは約5分間加熱するなどして行うことができる。なお、ハイブリダイゼーションは、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で行うことができるが、本明細書でストリンジентな条件とは、例えばナトリウム濃度に関し、約15～約50mM、好ましくは約19～約40mM、より好ましくは約19～約20mMで、温度については約35～約85、好ましくは約50～約70、より好ましくは約60～約65の条件を示す。

20

30

ハイブリダイゼーション完了後、フィルターなどの担体を十分に洗浄処理し、特異的なハイブリダイゼーション反応をした標識プローブDNA断片以外の標識プローブを取り除くなどしてから検出処理をすることができる。フィルターなどの担体の洗浄処理は、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いて行うことができ、例えば、0.1% SDS含有0.5×SSC(0.15M NaCl、15mMクエン酸)溶液などで洗うことにより実施できる。

40

ハイブリダイズした核酸は、代表的にはオートラジオグラフィにより検出することができるが、当該分野で用いられる方法の中から適宜選択して検出に用いることもできる。検出したシグナルに相当する核酸バンドを、適切な緩衝液、例えば、SM溶液(100mM NaClおよび10mM MgSO₄含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5)などに懸濁し、ついでこの懸濁液を適度に希釈して、所定の核酸を単離・精製、そしてさらなる増幅処理にかけることができる。本明細書で「高い相同性」といった場合

50

当該対象配列の長さにもよるが、例えば50%以上、さらには60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、そして特定の場合には95%以上で、特に好ましくは97%以上であってよい。該「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェントな条件で問題の配列を有するものにハイブリダイズするものであってよく、例えば当該塩基配列のうちの連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、当該ポリペプチドと実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。核酸は、化学合成によって得ることも可能である。その場合断片を化学合成し、それらを酵素により結合することによってもよい。

ハイブリダイゼーション処理により遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーなどを含めた核酸サンプルから目的核酸をスクリーニングする処理は、繰り返して行うことができる。クローニングされているヒト由来のcDNAライブラリー、例えば種々のヒト由来の組織あるいは培養細胞（特には、ヒトの腎臓、脳、松果体、下垂体後葉、神経細胞、網膜、網膜血管細胞、網膜神経細胞、胸腺、血管、内皮細胞、血管平滑筋細胞、血液細胞、マクロファージ、リンパ球、精巣、卵巣、子宮、腸、心臓、肝臓、膵臓、小腸、大腸、歯肉関連細胞、皮膚関連細胞、糸球体細胞、尿細管細胞、結合組織細胞などの組織・細胞、さらには各種腫瘍組織、ガン細胞等）cDNAライブラリーを使用できる。さらに鋳型などとして用いるcDNAライブラリーは、市販の種々の組織由来cDNAライブラリーを直接使用することもでき、例えばStratagene社、Invitrogen社、Clontech社などから市販されたcDNAライブラリーを用いることができる。典型的な例では、ヒト組織・細胞から調製した遺伝子ライブラリー、例えばヒトP1 artificial chromosome ゲノミックライブラリー（Human Genome Mapping Resource Center）、ヒト組織cDNAライブラリー（例えば、Clontech社などから入手可能）を用いることができる。種々のヒト組織あるいは培養細胞等から構築されたヒトゲノミックDNAライブラリーあるいはヒト由来cDNAライブラリーをプローブを使用してスクリーニングできる。プローブなどを放射性同位体などによって標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライムDNAラベリングキット（Boehringer Mannheim社）などを使用し、例えば、random-primingキット（Pharmacia LKB社、Uppsala）などを使用して、プローブ用DNAを[^{-32}P]dCTP（Amersham社）などで標識し、放射活性を持つプローブを得ることができる。

所定の核酸を保有する、ファージ粒子、組換えプラスミド、組換えベクターなどは、当該分野で普通に使用される方法でそれを精製分離することができ、例えば、グリセロールグラジエント超遠心分離法（Molecular Cloning, a laboratory manual, ed. T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. 78, 1989）、電気泳動法などにより精製することができる。ファージ粒子などからは、当該分野で普通に使用される方法でDNAを精製分離することができ、例えば、得られたファージなどをTM溶液（10mM MgSO_4 含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH7.8）などに懸濁し、DNase IおよびRNase Aなどで処理後、20mM EDTA、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K及び0.5% SDS混合液などを加え、約65 $^{\circ}\text{C}$ 、約1時間保温した後、これをフェノール抽出ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させ、次に得られたDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液（10mM EDTA含有10mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0）に溶解するなどして得られる。また、目的としているDNAは、サブクローニングなどにより大量に得ることも可能であり、例えばサブクローニングは、宿主として大腸菌を用いプラスミドベクターなどを用いて行うことができる。こうしたサブクローニングにより得られたDNAも、上記と同様にして遠心分離、フェノール抽出、エタノール沈殿などの方法により精製分離できる。

10

20

30

40

50

本明細書において、得られたPCR産物などの核酸(DNAを含む)は、通常1~2%アガロースゲル電気泳動にかけて、特異なバンドとしてゲルから切り出し、例えば、gene clean kit (Bio 101)などの市販の抽出キットを用いて抽出する。抽出されたDNAは適当な制限酵素で切断し、必要に応じ精製処理したり、さらには必要に応じ5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼなどによりリン酸化した後、pUC18などのpUC系ベクターといった適当なプラスミドベクターにライゲーションし、適当なコンピテント細胞を形質転換する。クローニングされたPCR産物はその塩基配列を解析される。PCR産物のクローニングには、例えば、p-Direct (Clontech社)、pCR-ScriptTM SK(+) (Stratagene社)、pGEM-T (Promega社)、pAmpTM (Gibco-BRL社)などの市販のプラスミドベクターを用いることが出来る。宿主細胞の形質転換をするには、例えばファージベクターを使用したり、カルシウム法、ルビジウム/カルシウム法、カルシウム/マンガン法、TFB高効率法、FSB凍結コンピテント細胞法、迅速コロニー法、エレクトロポレーションなど当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができる(D. Hanahan, J. Mol. Biol., 166: 557, 1983など)。目的とするDNAを単離するためには、逆転写PCR(polymerase chain reaction coupled reverse transcription; RT-PCR)、RACE(rapid amplification of cDNA ends)を適用することが出来る。RACEは、例えば、M. A. Innis et al. ed., PCR Protocols (M. A. Frohman, a guide to methods and applications), pp. 28-38, Academic Press, New York (1990)などに記載された方法に従って行うことができる。

10

20

DNAは、必要に応じてクローニングでき、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、P1ファージ、F因子、YACなどが利用できる。好ましくはファージ由来のベクターが挙げられ、例えばCharon 4A, Charon 21A, gt10, gt11, DASHII, FIXII, EMBL3, ZAPIITM (Stratagene社)などが利用できる。また、得られたDNAを、下記で詳しく説明するような適当なベクター、例えば、プラスミドpEX, pMAMneo, pKG5などのベクターに組み込み、下記で詳しく説明するような適当な宿主細胞、例えば、大腸菌、酵母、CHO細胞、COS細胞などで発現させることができる。また、該DNA断片は、そのままあるいは適当な制御配列を付加したDNA断片として、または適当なベクターに組み込み、そして動物に導入して、所定の遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作成することができる。動物としては、哺乳動物が挙げられ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ウシなどが挙げられる。好ましくは、マウスなどの動物の受精卵に該DNA断片を導入して、トランスジェニック動物を作成することができる。所定の遺伝子産物の確認を、当該外来遺伝子をトランスフェクションした、293T細胞、COS-1細胞などのそれに適した動物細胞などを用いて行うことができる。

30

外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法(例えば、F. L. Graham et al., Virology, 52: 456, 1973など)、DEAE-デキストラン法(例えば、D. Warden et al., J. Gen. Virol., 3: 371, 1968など)、エレクトロポレーション法(例えば、E. Neumann et al., EMBO J, 1: 841, 1982など)、マイクロインジェクション法、リボソーム法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうして所定の遺伝子をトランスフェクションされた動物細胞の産生する遺伝子産物は、それを解析することもできる。

40

所定の遺伝子など(本発明で得られたDNAなど)を組み込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞(例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、293T細胞、CHO細胞、COS細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主)中で該

50

DNAが発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。もちろん、市販のキットや試薬に添付のものから選んで使用することもできる。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適に修飾されたコドンが含まれていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための発現制御配列、調節配列など、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに有用な配列（ハイブリドタンパク質や融合タンパク質をコードするものも含む）等を含んでいることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファンプロモーター（trp）、ラクトースプロモーター（lac）、トリプトファン・ラクトースプロモーター（tac）、リポプロテインプロモーター（lpp）、ファージP_Lプロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40レートプロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTRプロモーター、CMVプロモーター、SRプロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10プロモーター等を使用し得る。さらにCYC1、HIS3、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO、TP1、AOX1等の制御系を使用することもできる。

所望ポリペプチドをコードするDNAのトランスクリプションを促進するためエンハンサーをベクターに挿入することができ、そうしたエンハンサーとしてはプロモーターに働いてトランスクリプションを促進する作用を持つ、通常約10～100bpのcis作用を持つエレメントのものが挙げられる。多くのエンハンサーが、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、インシュリンなどの哺乳動物遺伝子から知られている。代表的には、真核細胞感染性ウイルスから得られるエンハンサーが好適に使用でき、例えばレプリケーションオリジンのレート領域にあるSV40エンハンサー（100～270bp）、サイトメガロウイルスの初期プロモーターのエンハンサー、ポリオーマのレプリケーションオリジンのレート領域にあるエンハンサー、アデノウイルスのエンハンサーなどの例が挙げられる。また、必要に応じて、宿主にあったシグナル配列を付加することもでき、それらは当業者によく知られているものを使用できる。

大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf(-)、pBluescript KSTM（Stratagene社）などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、例えばpAS、pKK223（Pharmacia社）、pMC1403、pMC931、pKC30、pRSET-B（Invitrogen社）なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドとしては、例えばSV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、具体的にはpcD、pcD-SR、CDM8、pCEV4、pME18S、pBC12BI、pSG5（Stratagene社）などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、YIp型ベクター、YEp型ベクター、YRp型ベクター、YCP型ベクターなどが挙げられ、例えばpGPD-2などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌K12株に由来するものが挙げられ、例えばNM533、XL1-Blue、C600、DH1、DH5、DH11S、DH12S、DH5、DH10B、HB101、MC1061、JM109、STBL2、B834株由来としては、BL21(DE3)pLysSなどが挙げられる。細菌における発現系として、例えば、Chang et al., Nature (1978) 275: 615; Goeddel et al., Nature (1979) 281: 544; Goeddel et al., Nucleic Acid Res., (1980) 8: 4057; EP 36, 776, 米国特許第4, 551, 433号明細書; deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 21-25; Siebenlist et al., Cell (1980) 20: 269などの記載を参照できる。宿

10

20

30

40

50

主細胞が酵母の場合、例えば *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces* 株, *Candida*, *Trichoderma reesia*, その他の酵母株などが挙げられる。酵母における発現系として、例えば、Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:1929; Ito et al., J. Bacteriol. (1983) 153:163; Kurtz et al., Mol. Cell. Biol. (1986) 6:142; Kunze et al., J. Basic Microbiol. (1985) 25:141; Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. (1986) 132:3459; Roggenkamp et al., Mol. Gen. Genet (1986) 202:302; Das et al., J. Bacteriol. (1984) 158:1165; De Louvencourt et al., J. Bacteriol. (1983) 154:737; Van den Berg et al., Bio/Technology (1990) 8:135; Kunze et al., J. Basic Microbiol. (1985) 25:141; Cregg et al., Mol. Cell. Biol. (1985) 5:3376; 米国特許第4, 837, 148号明細書, 同第4, 929, 555号明細書; Beach and Nurse, Nature (1981) 300:706; Davidow et al., Curr. Genet. (1985) 10:380; Gaillardin et al., Curr. Genet. (1985) 10:49; Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) 112:284-289; Tilburn et al., Gene (1983) 26:205-221; Yalton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81:1470-1474; Kelly and Hynes, EMBO J., (1985) 4:475-479; EP 244, 234; WO 91/00357などに記載されているものを参照できる。

10

20

宿主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS-7細胞、COS-1細胞、CV-1細胞、ヒト腎細胞由来293細胞、ヒト表皮細胞由来A431細胞、ヒト結腸由来205細胞、マウス線維芽細胞由来のCOP細胞、MOP細胞、WOP細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来のCHO細胞、CHO DHFR⁻細胞、ヒトHeLa細胞、マウス細胞由来C127細胞、マウス細胞由来NIH 3T3細胞、マウスL細胞、9BHK、HL60、U937、HaK、Jurkat細胞、その他の形質転換されて得られたセルライン、通常の二倍体細胞、インビトロの一次培養組織から誘導された細胞株などが挙げられる。哺乳動物発現は、例えば、Dijkema et al., EMBO J. (1985) 4:761; Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79:6777; Boshart et al., Cell (1985) 41:521; 米国特許第4, 399, 216号明細書; Ham and Wallace, Methods in Enzymology (1979) 58:44; Barnes and Sato, Anal. Biochem. (1980) 102:255; 米国特許第4, 767, 704号明細書; 同第4, 657, 866号明細書; 同第4, 927, 762号明細書; 同第4, 560, 655号明細書; WO 90/103430; WO 87/00195; 米国特許第RE 30, 985号明細書などに記載されているものを参照できる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus)、それに由来するものあるいはその他の適切なものをベクターとし、*Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruit fly), カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えばBM-N細胞などを用いることが挙げられる (例えば、Luckow et al., Bio/Technology, 6, 47-55 (1

30

40

50

988); Setlow, J. K. et al. (eds.), Genetic Engineering, Vol. 8, pp. 277-279, Plenum Publishing, 1986; Maeda et al., Nature, 315, pp. 592-594 (1985)。昆虫における異種遺伝子の発現については、例えば、米国特許第4,745,051号明細書; Friesen et al. (1986), "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", The Molecular Biology of Baculoviruses (W. Doerfler (Ed)); EP 127,839; EP 155,476; Vlak et al., J. Gen. Virol., (1988) 69:765-776; Miller et al., Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42:177; Carbonell et al., Gene (1988) 73:409; Maeda et al., Nature, (1985) 315:592-594; Lebacqz-Verheyden et al., Mol. Cell. Biol. (1988) 8:3129; Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:8404; Miyajima et al., Gene (1987) 58:273; Martin et al., DNA (1988) 7:99などに記載されているものを参照できる。さらに、多数のパキユロウイルス株および改変体並びに宿主由来の対応する許容昆虫宿主細胞については、例えば、Luckow et al., Bio/Technology (1988) 6:47-55; Miller et al., Generic Engineering (Setlow, J. K. et al. (Ed)) Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986) pp. 277-279; Maeda et al., Nature (1985) 315:592-594などに記載されているものを参照できる。

*Agrobacterium tumefaciens*などを利用して、植物細胞を宿主細胞として使用することも可能であり、それに適するベクターと共に、それらは当該分野で広く知られている。本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA断片をクローン化するのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA修飾・分解酵素、DNAポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNAリガーゼなどを用いることが出来る。制限酵素としては、例えば、R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.*, 13:165, 1985; S. Linn et al. ed. *Nucleases*, p. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, 1982; R. J. Roberts, D. Macelis, *Nucleic Acids Res.*, 19:Suppl. 2077, 1991などに記載のものが挙げられる。

本発明に従い、ポリペプチド(又はタンパク質)をコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、必要に応じて適当な選択マーカを用い、繰り返しクローニングを行うことにより、高い発現能を安定して有する細胞株を得ることができる。例えば、宿主細胞として動物細胞を用いた形質転換体において、*dhfr* 遺伝子を選択マーカとして利用した場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、本発明のポリペプチドをコードするDNAを増幅させ、より高い発現を得られる細胞株を得ることができる。本発明の形質転換体は、本発明のポリペプチドをコードする核酸が発現可能な条件下で培養し、目的物を生成、蓄積せしめることができる。該形質転換体は、当該分野で汎用されている培地中で培養することができる。例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母などを宿主としている形質転換体は、液体培地を好適に使用することができる。培地中には、該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、麦芽エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナ

トリウム、塩化マグネシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、カザミノ酸、生長促進因子などを添加してもよい。また、必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 - インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。培地の pH は約 5 ~ 約 8 が望ましい。

培養は、例えば大腸菌では通常約 15 ~ 約 45 で約 3 ~ 約 75 時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約 5 ~ 約 20 % の胎児牛血清を含む MEM 培地、PRMI 1640 培地、DMEM 培地などが用いられる。pH は約 6 ~ 約 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30 ~ 約 40 で約 15 ~ 約 72 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。所定の遺伝子産物を発現している形質転換体はそのまま利用可能であるが、その細胞ホモジネートとしても利用できるが、所定の遺伝子産物を単離して用いることもできる。上記培養細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により粗抽出液を得る方法などを適宜用いることができる。緩衝液の中には尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X - 100 (商品名)、ツウィーン - 20 (商品名) などの界面活性剤を加えてあってもよい。培養液中に目的生成物が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる目的生成物は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせてその精製を行なうことができ、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、リガンドなどを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。該リガンドとしては、特異的認識をするモノクローナル抗体を含めた抗体又はそのフラグメント、レクチン、糖、結合ペアーの一方などが挙げられる。例えば、イムノ・アフィニティ・クロマトグラフィー、ゼラチン - アガロース・アフィニティ・クロマトグラフィー、ヘパリン - アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

さらに得られた本発明のポリペプチド (又はタンパク質) は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、ブロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などにすることができる。本発明のポリペプチドは、C 末端が通常カルボキシル基 (-COOH) またはカルボキシレート (-COO⁻) であるが、C 末端がアミド (-CONH₂) またはエステル (-COOR) であってもよい。ここでエステルにおける R としては、例えば、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピルもしくは n - ブチルなどの C₁₋₆ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C₃₋₈ シクロアルキル基、例えば、フェニル、*n* - ナフチルなどの C₆₋₁₂ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル - C₁₋₂ アルキル基もしくは *n* - ナフチルメチルなどの *n* - ナフチル - C₁₋₂ アルキル基などの C₇₋₁₄ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質が C 末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート) を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記した C 末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチド (又はタンパク質) には、上記したポリペプチドにおいて、N 末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基 (例えば、ホルミル基、アセチルなどの C₁₋₅ アルキル - カルボニル基などの C₁₋₆ アシル基など) で保護されているもの、

N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

さらに、本発明に係わる遺伝子の塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、所定のポリペプチドのアミノ酸配列中に適宜、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したとき変異を導入した相当するポリペプチドを製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、例えば日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、p105（広瀬進）、東京化学同人（1986）；日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III（組換えDNA技術）」、p233（広瀬進）、東京化学同人（1992）；R. Wu, L. Grossman, ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 154, p. 350 & p. 367, Academic Press, New York (1987)；R. Wu, L. Grossman, ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983)；J. A. Wells et al., *Gene*, 34:315, 1985；T. Grundstroem et al., *Nucleic Acids Res.*, 13:3305, 1985；J. Taylor et al., *Nucleic Acids Res.*, 13:8765, 1985；R. Wu ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987)；A. R. Oliphant et al., *Gene*, 44:177, 1986などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法（部位特異的変異導入法）（Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487, 1987；Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331, 1986）、カセット変異導入法（cassette mutagenesis: Wells et al., *Gene*, 34:315, 1985）、制限部位選択変異導入法（restriction selection mutagenesis: Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A*, 317:415, 1986）、アラニン・スキャンニング法（Cunningham & Wells, *Science*, 244:1081-1085, 1989）、PCR変異導入法、Kunkel法、dNTP[S]法（Eckstein）、亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。

また、遺伝子組換え法で製造する時に融合ポリペプチド（融合タンパク質）として発現させ、生体内あるいは生体外で、所望のポリペプチドと実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合ポリペプチドはその融合部を利用してアフィニティークロマトグラフィーなどで精製することも可能である。こうした融合ポリペプチドとしては、ヒスチジンタグに融合せしめられたもの、あるいは、-ガラクトシダーゼ（-gal）、マルトース結合タンパク（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシン（TRX）又はCre Recombinaseのアミノ酸配列に融合せしめられたものなどが挙げられる。同様に、ポリペプチドは、ヘテロジニアスなエピトープのタグを付加され、該エピトープに特異的に結合する抗体を用いてのイムノアフィニティ・クロマトグラフィーによる精製をなし得るようにすることもできる。より適した実施態様においては、ポリヒスチジン（poly-His）又はポリヒスチジン-グリシン（poly-His-Gly）タグ、また該エピトープタグとしては、例えばAU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (registered trademark, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe,

T7, Lex A, V5, VP16, GAL4, VSV-Gなどが挙げられる (Field et al., *Molecular and Cellular Biology*, 8: pp. 2159 - 2165 (1988); Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5: pp. 3610 - 3616 (1985); Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6): pp. 547 - 553 (1990); Hopp et al., *BioTechnology*, 6: pp. 1204 - 1210 (1988); Martin et al., *Science*, 255: pp. 192 - 194 (1992); Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266: pp. 15163 - 15166 (1991); Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: pp. 6393 - 6397 (1990)など)。酵母を利用した two-hybrid 法も利用できる。

さらに融合ポリペプチドとしては、検出可能なタンパク質となるようなマーカーを付されたものであることもできる。より好適な実施態様においては、該検出可能なマーカーは、ビオチン/ストレプトアビジン系の Biotin Avi Tag、蛍光を発する物質などであってよい。該蛍光を発する物質としては、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) などの発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP)、それを改変した変異体 (GFP バリエーション)、例えば、EGFP (Enhanced-humanized GFP), rsGFP (red-shift GFP), 黄色蛍光タンパク質 (yellow fluorescent protein: YFP), 緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP), 藍色蛍光タンパク質 (cyan fluorescent protein: CFP), 青色蛍光タンパク質 (blue fluorescent protein: BFP), ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) 由来の GFP などが挙げられる (宮脇敦史編、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座3 - GFPとバイオイメージング、羊土社(2000年))。また、上記融合タグを特異的に認識する抗体 (モノクローナル抗体及びそのフラグメントを含む) を使用して検出を行うこともできる。こうした融合ポリペプチドの発現及び精製は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

得られたタンパク質 (ペプチドあるいはポリペプチドを包含してよい) は、それを酵素免疫測定法など知られた手法で、適当な担体あるいは固相に結合せしめて固相化することができる。固相化タンパク質、固相化ペプチドは、便利に結合アッセイや物質のスクリーニングに使用できる。

ポリペプチドやタンパク質の構造の修飾・改変などは、例えば日本生化学会編、「新生物化学実験講座1、タンパク質VII、タンパク質工学」、東京化学同人(1993)を参考にし、そこに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法、さらにはそれらと実質的に同様な方法で行うことができる。また下記するようにその生物学的活性のうちには、免疫的に活性、例えば抗原性を有するということも含まれてよい。該修飾・改変のうちには、脱アミノ化、ヒドロキシル化、カルボキシル化、リン酸化、硫酸化、メチル化などのアルキル化、アセチル化などのアシル化、エステル化、アミド化、開環、閉環、グリコシル化、含有糖鎖の種類を違うものに変えること、含有糖鎖の数を増減すること、脂質結合、D-体アミノ酸残基への置換などであってもよい。それらの方法は、当該分野で知られている (例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, pp. 79 - 86 W. H. Freeman & Co., San Francisco, USA (1983) 等)。

本発明のガレクチン8改変体を利用して、当該ガレクチン8の所定の生物学的活性などの機能 (例えば、血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、インテグリン_M結合活性、プロMMP-9結合活性、活性型MMP-9産生促進活性、スーパー

オキシド産生促進活性、細胞傷害活性、アポトーシス誘導活性、LPSの誘導する炎症の抑制活性、LPSの誘導するTNF- α 、IL-12、及び/又はIFN- γ の生産を抑制する活性、エンドトキシンショック抑制活性、悪性細胞の転移を抑制する活性などを促進する化合物(アゴニスト)や阻害する化合物(アンタゴニスト)又はそれらの塩をスクリーニングすることができる。このことは該スクリーニング試薬の提供も意味する。かくして、本発明で解明の当該ガレクチン8タンパク質などのポリペプチド、その一部のペプチド又はそれらの塩の示す活性を用いた、様々な物質に関し、本発明の当該ガレクチン8タンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などの示す生物学的活性などの所定の機能を促進する化合物(アゴニスト)や阻害する化合物(アンタゴニスト)又はそれらの塩のスクリーニング方法も提供される。

10

該スクリーニングでは、例えば(i)ガレクチン8改変体タンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩(該タンパク質を発現する形質転換体を含んでいてもよい、以下同様)などに適当な試験試料を接触させた場合と、(ii)本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などに問題の試験試料の存在しない場合との比較を行う。具体的には、上記スクリーニングでは、当該生物学的活性(例えば、各ガレクチン8タンパク質と生体成分との間の相互作用に関連した活性など)を測定して、比較する。

該スクリーニング系には、測定に便利となるよう適当な検知用基質を存在せしめてもよい。該基質としては、測定に有効に利用できるものであれば何れのものであってよい。例えば、公知の基質として知られているものの中から選んで用いることができるが、好ましくは合成された化合物などを使用できる。基質は、そのまま使用できるが、好ましくはフルオレッセインなどの蛍光、酵素や放射性物質で標識したものを使用できる。

20

試験試料としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、植物抽出物、動物などの組織抽出物、細胞抽出物などが挙げられる。試験試料に使用される試験化合物の例には、好ましくは抗ガレクチン抗体、酵素阻害剤、サイトカイン、各種インヒビター活性を有する化合物、特に合成化合物などを含んでよい。これら化合物は、新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該スクリーニングは、通常の結合活性あるいは酵素活性の測定法に準じて実施することができる。例えば当該分野で公知の方法などを参考にして行うことができる。また、各種標識、緩衝液系その他適当な試薬等を使用したり、そこで説明した操作等に準じて行うことができる。使用ペプチドなどは、活性化剤で処理したり、その前駆体あるいは潜在型のものを活性型のものに予め変換しておくこともできる。測定は通常Tris-HCl緩衝液、リン酸塩緩衝液などの反応に悪影響を与えないような緩衝液等の中で、例えば、pH約4~約10(好ましくは、pH約6~約8)において行うことができる。これら個々のスクリーニングにあたっては、それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の当該ガレクチン8タンパク質あるいはそれと実質的に同等な活性を有するポリペプチドあるいはペプチドに関連した測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、*Methods in Enzymology*, Academic Press社(USA)発行〕など参照)。

30

本明細書において、ガレクチン8改変体の活性は、以下のことを意味してよい。

40

ガレクチン8改変体は、サイトカイン活性、細胞増殖活性(誘導又は阻害活性)あるいは細胞分化活性(誘導又は阻害活性)、特定の細胞集団における他のサイトカインの産生誘導活性について試験されることができる。多くの因子依存性細胞増殖アッセイが知られており、例えば、32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB-M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTL2, TF-1, Mofe, CMKなどの細胞株のためのアッセイが知られている。T細胞または胸腺細胞増殖活性に関するアッセイとしては、それに限定されるものではないが、例えばJohn E. Coligan, Ada M. Kruijsbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober(Ed.), *Current Protocols in Immu*

50

nology (以下、単に J. E. Coligan et al. (Ed.), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc. という) (Chapter 3: In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function (3.1-3.19); Chapter 7: Immunologic studies in Humans), John Wiley & Sons, Inc; Takai et al., J. Immunol., 137:3494-3500 (1986); Bertagnolli et al., J. Immunol., 145:1706-1712 (1990); Bertagnolli et al., Cellular Immunology, 133:327-341 (1991); Bertagnolli et al., J. Immunol., 149:3778-3783 (1992); Bowman et al., J. Immunol., 152:1756-1761 (1994) に記載されるものが挙げられる。脾臓細胞、リンパ節細胞及び胸腺細胞のサイトカイン生産及び/又は増殖活性に関するアッセイとしては、それに限定されるものではないが、例えば J. E. Coligan et al. (Ed.), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc. (Chapter 3 In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function - Proliferative Assays for T Cell Function and Chapter 6 Cytokines and Their Cellular Receptors - Measurement of mouse and human Interferon) に記載されるものが挙げられる。造血性細胞およびリンパ球産生性細胞の増殖および分化活性に関するアッセイとしては、それに限定されるものではないが、例えば J. E. Coligan et al. (Ed.), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc. (Chapter 6 Cytokines and Their Cellular Receptors - Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4; - Measurement of mouse and human interleukin 6; - Measurement of human Interleukin 11; - Measurement of mouse and human Interleukin 9); deVries et al., J. Exp. Med., 173:1205-1211 (1991); Moreau et al., Nature, 336:690-692 (1988); Greenberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:2931-2938 (1983); Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:1857-1861 (1986) に記載されるものが挙げられる。抗原に対する T 細胞クローンの応答性についてのアッセイ (特に、その増殖およびサイトカイン産生を測定して、APC - T 細胞相互作用および直接的な T 細胞に作用するタンパク質を同定することを含む) としては、それに限定されるものではないが、例えば J. E. Coligan et al. (Ed.), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc. (Chapter 3 In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function; Chapter 6 Cytokines and Their Cellular Receptors; Chapter 7 Immunologic studies in Humans); Weinberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:6091-6095 (1980); Weinberger et al., Eur. J. Immunol., 11:405-411 (1981); Takai et al., J. Immunol., 137:3494-3500 (1986); Takai et al., J. Immunol., 140:508-512 (1988) に記載され

10

20

30

40

50

るものが挙げられる。

ガレクチン8 改変体は、免疫刺激または抑制活性について試験されることができる。種々の免疫不全症および免疫障害（重症複合免疫不全症（SCID）を包含する）の処置における活性、例えば、T および/またはB リンパ球の増殖の調節（アップレギュレーションまたはダウンレギュレーション）における活性、さらにはNK 細胞及びその他の細胞群が細胞溶解活性を発揮する場合に活性であるか否かを試験できる。当該免疫不全症は遺伝的なものであってもよく、またはウイルス（例えば、HIV）ならびに細菌または真菌感染により引き起こされたものであってもよく、さらには自己免疫障害から生じてもよい。より具体的には、ウイルス、細菌、真菌又はその他の感染症により引き起こされる感染性疾患（HIV、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ミコバクテリア、マラリアなどによる感染およびカンジダ症のような種々の真菌感染症を包含してよい）がそれに含まれてよい。また、免疫系を刺激することが求められるような場合、例えばガンの治療などの場合も包含されてよい。該自己免疫障害としては、例えば、結合組織疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、自己免疫性肺炎、ギヤン - バレー症候群、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性糖尿病、重症筋無力症、対宿主性移植片病、自己免疫性炎症性眼疾患などが挙げられる。また、喘息（特にアレルギー性喘息）及びその他の呼吸器系の疾患といったアレルギー反応およびアレルギー性症状の処置における活性の試験を含んでいてよい。免疫を抑制することが望まれるようなその他の症状（例えば、器官移植を包含する）に対する活性の試験を含んでいてよい。

10

ガレクチン8 改変体が、免疫応答を可能にするか否かを多数の方法で試験できる。例えば、ダウンレギュレーションは、すでに進行中の免疫応答を阻害またはブロックする形態のものであってもよく、または免疫応答の誘導を防止することを含んでもよい。T 細胞応答を抑制することにより、またはT 細胞において特異的寛容性を誘導することにより、またはその両方により、活性化T 細胞の機能を阻害してもよい。一般的に、T 細胞応答を免疫的に抑制するには、T 細胞をその抑制因子に連続的に接触せしめることが必要であるような、能動的なそして非抗原特異的なプロセスである。寛容（T 細胞における非応答性またはアネルギーの誘導を含む）というものは、一般的には抗原特異的であり、寛容化因子に接触することが止められた後も持続するという点で、免疫抑制と区別される。該寛容性であるか否かは、実際の操作では、寛容化因子の非存在下で特異的抗原に再度曝露した場合、T 細胞応答が有るか無いかをみることにより確かめることが可能である。1 つ以上の抗原機能（それに限定されるものではないが、例えばB リンパ球（例えばB 7 のような）抗原機能が包含される）のダウンレギュレーションまたは阻害、例えば、活性化T 細胞による高レベルのリンホカイン合成の阻害は、組織、皮膚および器官の移植の状況ならびに対宿主性移植片病（GVHD）において有用である。例えば、T 細胞機能を阻害すると、組織移植における組織破壊を減少せしめるはずである。代表的には、組織を移植した場合、移植片の拒絶は、T 細胞により当該組織片を外来物として認識することを介して開始され、移植片を破壊するような免疫反応がそれに続く。B 7 リンパ球抗原と免疫細胞上のその天然のリガンド（単数または複数）との相互作用を阻害またはブロックする分子（B 7 - 2 活性を有する可溶性でモノマー形態のペプチドの単独、または別のB リンパ球抗原（例えば、B 7 - 1、B 7 - 3）活性を有するモノマー形態のペプチドあるいはブロック抗体のようなものとの組合せ）を移植前に投与すると、対応する副次的刺激シグナルを伝達することなく、免疫細胞上の天然のリガンド（単数または複数）への分子の結合を導くことができる。こうしてB リンパ球抗原機能をブロックすると、T 細胞のような免疫細胞によるサイトカイン合成を阻止し、従って、免疫抑制剤として作用する。さらに、副次的刺激を欠如することにより、T 細胞を不活化し、それによって対象物における寛容性を誘発するのに十分であるようになるのである。B リンパ球抗原ブロッキング剤による長期の寛容誘導により、該ブロッキング剤を繰り返し投与することの必要性はこれを避けることができよう。ターゲットが十分に免疫抑制または寛容とされるためには、B リンパ球抗原組合せ機能をブロックすることも必要であるかもしれない。

20

30

40

ガレクチン8 改変体が、血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、

50

インテグリン_m結合活性、プロMMP-9結合活性、活性型MMP-9産生促進活性、スーパーオキシド産生促進活性、LPS誘導による炎症の抑制活性、LPS誘導のTNF- α 、IL-12、及びノ又はIFN- γ の生産の抑制、エンドトキシンショック抑制活性をどの程度有するかとか、該活性を可能にするか否かを多数の方法で試験できる。また、アポトーシス誘導活性測定法などは、田沼靖一監修、「細胞工学別冊：実験プロトコールシリーズ、アポトーシス実験プロトコール」株式会社秀潤社、1995年1月20日（第1版第2刷）などを参考にできるし、市販の測定キットなどを使用できる。

器官移植片拒絶またはGVHDを防止する場合の特定のブロッキング剤の効力は、ヒトにおける効力を予測するに有用な動物モデルを使用して行うことができる。適切な使用可能な系としては、例えばラットの同種心臓移植片、マウスの異種膵島細胞移植片などが挙げられる。Lenschow et al., Science, 257:789-792 (1992)及びTurka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:11102-11105 (1992)に記載されるように、両方ともインビボにおいてCTLA4 Ig融合タンパク質の免疫抑制作用を検討するために使用されている。さらに、GVHDのマウスモデル(Paul (Ed.), Fundamental Immunology, Raven Press, New York, pp. 846-847 (1989))を使用して、疾患の進行に対するインビボにおけるBリンパ球抗原機能ブロッキング効果を測定することもできる。また、自己免疫疾患の治療的処置に抗原機能をブロックすることが有用である場合もある。多くの自己免疫障害は、自己組織に対する反応の結果であり、疾患に關与するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進するT細胞の不適切な活性化の結果に起因している。自己応答性T細胞の活性化を防止することによって疾患の症状を少なくしたり、無くすることができる。Bリンパ球抗原受容体：リガンド相互作用を破壊することを介してT細胞の副次的刺激をブロックするような薬剤を投与することにより、T細胞活性化を阻害し、疾患の過程に關与するような自己抗体またはT細胞由来のサイトカインの産生を防止することができる。さらに、ブロッキング剤により、疾患からの長期の軽減を誘導することを可能にするような自己反応性T細胞の抗原特異的な寛容性を誘導することが可能となる。ヒトの自己免疫疾患に対応した、十分に特徴付がなされている多くの動物モデルを使用して自己免疫障害の防止または改善に対するブロッキング剤の効力試験を行うことができよう。例えばマウス実験的自己免疫性脳炎、MRL/lpr/lprマウスまたはNZBハイブリッドマウスにおける全身性エリテマトーデス、マウス自己免疫性コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBラットにおける糖尿病、マウス実験的重症筋無力症などを挙げることができる(Paul (Ed.), Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 840-856 (1989))。また、抗原機能(好ましくは、Bリンパ球抗原機能)のアプレギュレーションも、免疫応答をアプレギュレートする手段として治療上有用であろう。免疫応答のアプレギュレーションは、既存の免疫応答を増強する形態または最初の免疫応答を誘起する形態であってよい。例えば、Bリンパ球抗原機能を刺激することを介しての免疫応答の増強は、ウイルス感染の場合に有用であり得る。さらに、刺激性形態のBリンパ球抗原を全身投与することにより、インフルエンザ、通常のかぜ、および脳炎のような全身性ウイルス性疾患を改善し得る。抗原機能(好ましくは、Bリンパ球抗原機能)のアプレギュレーションまたは増強は、腫瘍免疫性の誘導においても有用であろう。例えば、ガレクチン8改変体の少なくとも1つをコードする核酸を用いてトランスフェクトした腫瘍細胞(例えば、肉腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、ガン腫)をターゲットに投与して、ターゲット中の腫瘍特異的寛容の克服を達成するか否かを調べることができる。

ガレクチン8改変体は、造血調節活性について試験することができ、さらには骨髓系またはリンパ系細胞欠損症の処置に有用であるか否か調べることができる。種々の造血細胞株の増殖および分化活性を調べるのに適したアッセイ法は当該分野で広く知られており、それを使用することができる。胚幹細胞の分化に關するアッセイ(特に、胚分化造血に対する作用)としては、それに限定されるものではないが、例えばJohansson e

10

20

30

40

50

t al., Cellular Biology, 15: 141 - 151 (1995); Keller et al., Molecular and Cellular Biology, 13: 473 - 486 (1993); McClanahan et al., Blood 81: 2903 - 2915 (1993)に記載されるものが挙げられる。幹細胞の生存および分化(特に、リンパ-造血調節に対する作用)については、それに限定されるものではないが、例えばMethylcellulose colony forming assays, Freshney, M.G. Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshneyら編 Vol 265 - 268頁, Wiley-Liss, Inc., New York, NY. 1994; Hirayamaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5907 - 5911, 1992; Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential, McNiece, I.K. および Bridgell, R.A. Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshneyら編 Vol 23 - 39頁, Wiley-Liss, Inc., New York, NY. 1994; Nebenら, Experimental Hematology 22: 353 - 359, 1994; Cobblestone area forming cell assay, Ploemacher, R.E. Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshneyら編 Vol 1 - 21頁, Wiley-Liss, Inc., New York, NY. 1994; Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells, Spooner, E., Dexter, M. および Allen, T. Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshneyら編 Vol 163 - 179頁, Wiley-Liss, Inc., New York, NY. 1994; Long term culture initiating cell assay, Sutherland, H.J. Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshneyら編 Vol 139 - 162頁, Wiley-Liss, Inc., New York, NY. 1994に記載されるものが挙げられる。

ガレクチン8 改変体は、骨、軟骨、腱、靭帯および/または神経組織の成長または再生、ならびに創傷治癒および組織の修復および置換に使用する医薬組成物として、さらに熱傷、裂傷および潰瘍の処置用剤としての活性についてもそれを調べることができる。骨が正常には形成されないような状態の下での軟骨および/または骨の成長を誘導する活性は、ヒトおよび他の動物における骨折および軟骨の損傷または欠損の治癒に有用である。ガレクチン8 改変体の歯周病の処置および他の歯の修復プロセスに対する活性もそれを試験できる。骨形成細胞を誘引したり、骨形成細胞の増殖を刺激したり、あるいは骨形成細胞の前駆体の分化を誘導するような活性も調べることができる。ガレクチン8 改変体は、例えば、骨および/もしくは軟骨の修復の刺激を介するか、または炎症もしくは炎症過程により媒介される組織破壊の過程(コラゲナーゼ活性、破骨細胞活性など)をブロックすることによる、骨粗鬆症または骨関節炎の処置に活性を示す可能性がある。さらに、ヒトおよびその他の動物における腱または靭帯の裂傷、変形および他の腱または靭帯の欠損の治癒に対する活性も試験されてよい。ガレクチン8 改変体は、神経細胞または神経組織に対する変性、死滅もしくは外傷が関与する神経細胞の増殖ならびに神経および脳組織の再生に、すなわち、中枢および末梢神経系疾患およびニューロパシーならびに機械的および外傷性障害の処置に活性を有するか否か試験されてよく、より具体的には、末梢神経傷害、末梢ニューロパシーおよび局在化ニューロパシーのような末梢神経系疾患、ならびにアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン病、筋萎縮性側索硬化症およびシャイ-ドレーガー症候群のような中枢神経系疾患に対する活性が調べられる。

ガレクチン8 改変体は、インテグリン関連活性、哺乳動物細胞(例えば、単球、線維芽細胞、好中球、T細胞、肥満細胞、好酸球、上皮細胞および/または内皮細胞を包含する

)の走化性/遊走活性(接着能を含む)、止血または血栓溶解活性、受容体、受容体リガンドまたは受容体/リガンド相互作用のインヒビターもしくはアゴニストとしての活性、抗炎症活性(炎症応答に關与する細胞刺激活性を含む)、LPSの誘導する炎症の抑制活性、LPSの誘導するTNF- α 、IL-12、及び/又はIFN- γ の生産を抑制する活性、エンドトキシンショック抑制活性、抗腫瘍活性も含む腫瘍に關連した活性、下記のさらなる活性または効果の1つ以上についてそれを試験できる:細菌、ウイルス、真菌および他の寄生体(これらに限定されない)を包含する感染性因子の増殖、感染もしくは機能の阻害またはその殺傷;身長、体重、体毛の色、目の色、皮膚、肥瘦比(fat to lean ratio)もしくは他の組織の色素沈着、または器官もしくは身体部分のサイズもしくは形態(例えば、豊胸またはその逆、骨の形態もしくは形状の変化)(これらに限定しない)を包含する身体特性への影響(抑制または増強);バイオリズムまたは心周期もしくは律動への影響;雄性または雌性対象の繁殖能への影響;摂食した脂肪、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子または他の栄養因子もしくは成分(単数または複数)の代謝、異化、同化、プロセッシング、利用、貯蔵または排除への影響;食欲、性欲、ストレス、認識(認識障害を包含する)、鬱病(鬱病性障害を包含する)および暴力的行為(これらに限定しない)を包含する行動特性への影響;鎮痛効果または他の痛みを軽減する効果の提供;造血系以外の系統における胚幹細胞の分化および増殖の促進;ホルモンまたは内分泌活性;酵素の場合、酵素の欠損の修正および欠損關連疾患の処置;過剰増殖性障害(例えば、乾癬のような)の処置;免疫グロブリン様活性(例えば、抗原または補体に結合する能力のような);ならびにワクチン組成物において抗原として作用して、そのようなタンパク質またはそのようなタンパク質と交差反応性である別の物質もしくは物体に対する免疫応答を惹起する能力。

本発明のスクリーニング方法又はスクリーニングキットを用いて得られる化合物又はその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の機能を促進あるいは阻害する化合物である。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容される塩などが挙げられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、並びにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

本発明の活性成分〔例えば、(a)当該ガレクチン8改変体ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩、それに関連するペプチド等、(b)該当該ガレクチン8改変体あるいはその関連ポリペプチドをコードするDNAなどの核酸等、(c)該ガレクチン8タンパク質の問題の活性を制御する化合物(当該ガレクチン8タンパク質の血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、インテグリン α 結合活性、プロMMP-9結合活性、活性型MMP-9産生促進活性、スーパーオキシド産生促進活性、細胞傷害活性、アポトーシス誘導活性、LPSの誘導する炎症の抑制活性、LPSの誘導するTNF- α 、IL-12、及び/又はIFN- γ の生産を抑制する活性、エンドトキシンショック抑制活性、正常細胞には悪影響を与えないで所定の効能を果たす活性などを促進

10

20

30

40

50

したりあるいは抑制・阻害するなどの現象、あるいは組織あるいはタンパク質の変質・過剰生産あるいは分解現象といった生物学的活性を促進あるいは抑制及び/又は阻害する化合物)またはその塩、当該タンパク質産生を制御する化合物またはその塩、(d)本発明を使用して見出された活性物質などを医薬として用いる場合、通常単独或いは薬理的に許容される各種製剤補助剤と混合して、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。好ましくは、経口投与、局所投与、または非経口投与等の使用に適した製剤調製物の形態で投与され、目的に応じていずれの投与形態(吸入法、あるいは直腸投与も包含される)によってもよい。

また、本発明の活性成分は、各種医薬、例えば抗腫瘍剤(抗がん剤)、腫瘍移転阻害剤、血栓形成阻害剤、関節破壊治療剤、鎮痛剤、消炎剤、免疫調節剤及び/又は免疫抑制剤と配合して使用することもでき、それらは、有利な働きを持つものであれば制限なく使用でき、例えば当該分野で知られたものの中から選択することができる。

非経口的な投与形態としては、局所、経皮、静脈内、筋肉内、皮下、皮内もしくは腹腔内投与を包含し得るが、患部への直接投与も可能であり、またある場合には好適でもある。好ましくはヒトを含む哺乳動物に経口的に、あるいは非経口的(例、細胞内、組織内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、胸腔内、脊髄腔内、点滴法、注腸、経直腸、点耳、点眼や点鼻、歯、皮膚や粘膜への塗布など)に投与することができる。具体的な製剤調製物の形態としては、溶液製剤、分散製剤、半固形製剤、粉粒体制剤、成型製剤、浸出製剤などが挙げられ、例えば、錠剤、被覆錠剤、糖衣を施した剤、丸剤、トローチ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、マイクロカプセル剤、埋込剤、粉末剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、注射剤、液剤、エリキシル剤、エマルジョン剤、灌注剤、シロップ剤、水剤、乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤、スプレー剤、吸入剤、噴霧剤、軟膏製剤、硬膏製剤、貼付剤、パスタ剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、坐剤(例えば、直腸坐剤)、チンキ剤、皮膚用水剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、塗布剤、輸液剤、注射用液剤などのための粉末剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品等が挙げられる。

医薬用の組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。例えば、適宜必要に応じて、生理学的に認められる担体、医薬として許容される担体、アジュバント剤、賦形剤、補形剤、希釈剤、香味剤、香料、甘味剤、ベヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤、pH調節剤、緩衝剤、界面活性剤、基剤、溶剤、充填剤、増量剤、溶解補助剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、崩壊剤、噴射剤、保存剤、抗酸化剤、遮光剤、保湿剤、緩和剤、帯電防止剤、無痛化剤などを単独もしくは組合わせて用い、それとともに本発明のタンパク質等を混和することによって、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態にして製造することができる。

非経口的使用に適した製剤としては、活性成分と、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る媒体との無菌性溶液、または懸濁液剤など、例えば注射剤等が挙げられる。一般的には、水、食塩水、デキストロース水溶液、その他関連した糖の溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が好ましい注射剤用液体担体として挙げられる。注射剤を調製する際は、蒸留水、リンゲル液、生理食塩液のような担体、適当な分散化剤または湿化剤及び懸濁化剤などを使用して当該分野で知られた方法で、溶液、懸濁液、エマルジョンのごとき注射しうる形に調製する。

注射用の水性液としては、例えば生理食塩液、ブドウ糖やその他の補助薬(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)を含む等張液などが挙げられ、薬理的に許容される適当な溶解補助剤、たとえばアルコール(たとえばエタノールなど)、ポリアルコール(たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(たとえばポリソルベート80TM、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)又は浸透圧調節のための試薬、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン

10

20

30

40

50

、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、アスコルビン酸などの酸化防止剤、吸収促進剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

非経口投与には、界面活性剤及びその他の薬学的に許容される助剤を加えるか、あるいは加えずに、水、エタノール又は油のような無菌の薬学的に許容される液体中の溶液あるいは懸濁液の形態に製剤化される。製剤に使用される油性ベヒクルあるいは溶剤としては、天然あるいは合成あるいは半合成のモノあるいはジあるいはトリグリセリド類、天然、半合成あるいは合成の油脂類あるいは脂肪酸類が挙げられ、例えばピーナッツ油、トウモロコシ油、大豆油、ゴマ油などの植物油が挙げられる。例えば、この注射剤は、通常本発明化合物を0.1~10重量%程度含有するように調製されることができる。

10

局所的、例えば口腔、又は直腸の使用に適した製剤としては、例えば洗口剤、歯磨き剤、口腔噴霧剤、吸入剤、軟膏剤、歯科充填剤、歯科コーティング剤、歯科ペースト剤、坐剤等が挙げられる。洗口剤、その他歯科用剤としては、薬理的に許容される担体を用いて慣用の方法により調製される。口腔噴霧剤、吸入剤としては、本発明化合物自体又は薬理的に許容される不活性担体とともにエアゾール又はネブライザー用の溶液に溶解させるかあるいは、吸入用微粉末として歯などへ投与できる。軟膏剤は、通常使用される基剤、例えば、軟膏基剤(白色ワセリン、パラフィン、オリーブ油、マクロゴール400、マクロゴール軟膏など)等を添加し、慣用の方法により調製される。

歯、皮膚への局所塗布用の薬品は、適切に殺菌した水または非水賦形剤の溶液または懸濁液に調剤することができる。添加剤としては、例えば亜硫酸水素ナトリウムまたはエデト酸二ナトリウムのような緩衝剤;酢酸または硝酸フェニル水銀、塩化ベンザルコニウムまたはクロロヘキシジンのような殺菌および抗真菌剤を含む防腐剤およびヒプロメルローズのような濃厚剤が挙げられる。

20

坐剤は、当該分野において周知の担体、好ましくは非刺激性の適当な補形剤、例えばポリエチレングリコール類、ラノリン、カカオ脂、脂肪酸トリグリセライド等の、好ましくは常温では固体であるが腸管の温度では液体で直腸内で融解し薬物を放出するものなどを使用して、慣用の方法により調製されるが、通常本発明化合物を0.1~95重量%程度含有するように調製される。使用する賦形剤および濃度によって薬品は、賦形剤に懸濁させるかまたは溶解させることができる。局部麻酔剤、防腐剤および緩衝剤のような補助薬は、賦形剤に溶解可能である。経口的使用に適した製剤としては、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、トローチのような固形組成物や、液剤、シロップ剤、懸濁剤のような液状組成物等が挙げられる。製剤調製する際は、当該分野で知られた製剤補助剤などを用いる。錠剤及び丸剤はさらにエンテリックコーティングされて製造されることもできる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。

30

また、活性成分がタンパク質やポリペプチドである場合、ポリエチレングリコール(PEG)は、哺乳動物中で極めて毒性が低いことから、それを結合させることは特に有用である。また、PEGを結合せしめると、異種性化合物の免疫原性及び抗原性を効果的に減少せしめることができる場合がある。該化合物は、マイクロカプセル装置の中に入れて与えてもよい。PEGのようなポリマーは、アミノ末端のアミノ酸の - アミノ基、リジン側鎖の - アミノ基、アスパラギン酸又はグルタミン酸側鎖のカルボキシル基、カルボキシ末端のアミノ酸の - カルボキシル基、又はある種のアスパラギン、セリン又はトレオニン残基に付着したグリコシル鎖の活性化された誘導体に、簡便に付着させることができる。

40

タンパク質との直接的な反応に適した多くの活性化された形態のPEGが知られている。タンパク質のアミノ基と反応させるのに有用なPEG試薬としては、カルボン酸、カルボネート誘導体の活性エステル、特に、脱離基がN-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェノール、イミダゾール、又は1-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン-4-スルフォネートであるものが挙げられる。同様に、アミノヒドラジン又はヒドラジド基を含有するPEG試薬は、タンパク質中の過ヨウ素酸酸化によって生成したアルデヒドとの反応に

50

有用である。

本発明の診断および治療は、哺乳動物が示しているかもしれない特定の自己免疫などを含めた免疫に関連した疾患・病気、ガンなどの悪性腫瘍を含めた腫瘍、アレルギー疾患、炎症、LPS誘導の炎症、LPS誘導の、TNF- α 、IL-12、及び/又はIFN- γ の生産上昇、LPS誘導の、エンドトキシンショックなどに関して適切であるように、当該哺乳動物を診断することによってその実施が開始される。診断はまた、処置の進行をモニターするため、および、例えば、行われている治療における投与量または投与回数のようなパラメーターを変えるか否かを判断するために、治療手順として治療の間継続されることができる。ガレクチン8改変体治療薬の投与についての適切性を決定することを助けることができるような診断手法としては、哺乳動物におけるガレクチン8の発現レベルの分析、および自己免疫の部位から離れたリンパ球などの細胞と自己免疫の部位に近接するリンパ球などの細胞との間のこれらのレベルの比較、さらには炎症部位近傍の好中球などの細胞との間のこれらのレベルの比較などが挙げられる。処置されるべき哺乳動物の自己免疫疾患などの疾患・病気、ガンなどの悪性腫瘍を含めた腫瘍、アレルギー疾患、炎症などは、細胞内のガレクチン8抗原などを検出することによってモニターされることができる。このモニタリングは、哺乳動物由来のサンプルをガレクチン8特異的抗体と接触させ、そしてサンプルとの抗体の結合を検出することを含んでよい。

遺伝子治療用ビヒクルは、哺乳動物における発現のために哺乳動物に送達されるべき本発明の治療薬たるコード配列（例えば、ガレクチン8改変体コード配列）を含んでいる構築物（コンストラクト、construct）を送達するためのもの、あるいは、ガレクチン8改変体の全てもしくは部分であって且つ送達のためのものである核酸配列をも含んでいる該構築物を送達するためのものであって、局所的または全身的のいずれかの方法で投与されることのできるものである。これらの構築物は、インビボまたはエキソビボの形で、ウイルスベクターによるアプローチまたは非ウイルスベクター形式でのアプローチを利用することのできるものである。このようなコード配列を発現するには、内因性の哺乳動物プロモーターまたは異種プロモーターを使用して誘導することにより行うことができる。インビボでのコード配列の発現は、構築的になされるか、または調節されて行われるかのいずれかである。ガレクチン8改変体が哺乳動物において発現される場合、可溶性のガレクチン8改変体として発現されることができ、ある場合には前駆体型ガレクチン8改変体として発現されることができ、これらの両方においてまたはそのいずれかにおいて、それらは、例えば、全てのガレクチン8改変体、またはガレクチン8改変体の生物学的に活性な部分、バリエーション、誘導体、もしくは融合体などであってよい。

本発明は、所要のガレクチン8改変体の核酸配列を発現することのできる遺伝子送達ビヒクルを提供する。遺伝子送達ビヒクルとしては、好ましくは、ウイルスベクターが挙げられ、より好ましくは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ヘルペスウイルス、またはアルファウイルスなどのウイルスベクターなどが挙げられる。ウイルスベクターとしては、さらに、アストロウイルス、コロナウイルス、オルトミクソウイルス、パポウイルス、パラミクソウイルス、パルボウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、トガウイルスなどのウイルスベクターも挙げられる。当該遺伝子送達ビヒクルに関しては、一般には、D. Jolly, Cancer Gene Therapy, 1(1): 51-64 (1994); O. Kimura et al., Human Gene Therapy, 5: 845-852 (1994); S. Connelly et al., Human Gene Therapy, 6: 185-193 (1995); M. G. Kaplitt et al., Nature Genetics, 8: 148-153 (1994)などを参照することができる。

レトロウイルスベクターは、当該分野でよく知られており、例えば、B型、C型、およびD型レトロウイルス、xenotropicレトロウイルス（例えば、NZB-X1, NZB-X2, NZB9.1 (R. R. O'Neill, J. Virol., 53: 100-106 (1985) 参照) など）、polytropicレトロウイルス（例えば、MCF, MCF-MLV (M. Kelly, J. Virol., 45: 291-298 (

10

20

30

40

50

1983)参照)など)、スプマウイルス、レンチウイルスなど(R. L. Weiss et al. (Eds.), RNA Tumor Viruses, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1985参照)を含む任意のレトロウイルス遺伝子治療ベクターが本発明において使用可能である。

遺伝子治療レトロウイルスベクターの一部は、異なっているレトロウイルス由来のものであってよい。例えば、レトロベクターのLTRはネズミザルコーマウイルス由来のものであってよいし、tRNA結合部位はラウスザルコーマウイルス由来のものであってよいし、パッケージングシグナルはネズミ白血病ウイルス由来のものであってよいし、第二鎖合成オリジンはトリ白血症ウイルス由来のものであってよい。これらの組換えレトロウイルスベクターは、それらを適切なパッケージング細胞株に導入することによって形質導入可能なレトロウイルスベクター粒子を形成せしめるのに使用することができる(米国特許第5,591,624号明細書参照)。レトロウイルスベクターは、インテグラーゼという目的DNAを宿主細胞のDNA中に部位特異的に組み込む能力を有する組み込み酵素をレトロウイルス粒子内に持つようにすることで構築することができる。組換えウイルスベクターとしては、複製能欠損組換えウイルスであることが好ましい。

上記のレトロウイルスベクターとの使用に適しているパッケージング細胞株としては、当該分野でよく知られたものが挙げられ、また、容易に調製されることができる(米国特許第6,013,517号明細書, WO 92/05266参照)。当該パッケージング細胞株は、組換えベクター粒子を産生するためのプロデューサー細胞株(ベクター細胞株, vector cell line: VCL)を作製するのに使用することができる。好ましくは、パッケージング細胞株は、ヒト血清中で不活化することがないようにして、ヒトの親細胞(例えば、HT1080細胞)またはミンクの親細胞株から作製される。

レトロウイルス遺伝子治療ベクターの構築に好ましいレトロウイルスとしては、トリ白血症ウイルス、ウシ白血病ウイルス、ネズミ白血病ウイルス、ミンク細胞フォーカス形成ウイルス、ネズミザルコーマウイルス、網細内皮症ウイルス、ラウスザルコーマウイルスなどが挙げられる。ネズミ白血病ウイルスとして特に好ましいものとしては、例えば、4070Aおよび1504A(Hartley & Rowe, J. Virol., 19:19-25(1976))、Abelson(ATCC No. VR-999)、Friend(ATCC No. VR-245)、Graffi, Gross(ATCC No. VR-590)、Kirsten、ハーベイザルコーマウイルス並びにRauscher(ATCC No. VR-998)、及びモロニーマウス白血病ウイルス(ATCC No. VR-190)などが挙げられる。

このようなレトロウイルスは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC, Rockville, Maryland, USA)のような寄託機関または保存機関から入手可能であるか、あるいは、一般に利用可能な技術を使用して既知の供給源から単離することができる。

本発明で使用可能な公知のレトロウイルス遺伝子治療ベクターの例としては、GB 200651, EP 0415731, EP 0345242, WO 89/02468, WO 89/05349, WO 89/09271, WO 90/02806, WO 90/07936, WO 94/03662, WO 93/25698, WO 93/25234, WO 93/11230, WO 93/10218, WO 93/10218, WO 91/02805、米国特許第5,219,740号明細書、同第4,405,712号明細書、同第4,861,719号明細書、同第4,980,289号明細書、同第4,777,127号明細書、同第5,591,624号明細書、Vile, Cancer Res, 53:3860-3864(1993)、Vile, Cancer Res, 53:962-967(1993)、Ra, Cancer Res, 53:83-88(1993)、Takamiya, J Neurosci Res, 33:493-503(1992)、Baba, J Neurosurg, 79:729-735(1993)、Mann, Cell 33:153(1983)、Cane, Proc Nat

10

20

30

40

50

l Acad Sci USA, 81:6349 (1984), Miller, Human Gene Therapy, 1:5-14 (1990)などに記載されたものが挙げられる。

ヒトのアデノウイルス遺伝子治療ベクターもまた当該分野で公知であり、本発明で使用可能であり、例えば、Berkne, Biotechniques, 6:616 (1988); Rosenfeld, Science, 252:431 (1991); WO 93/07283; WO 93/06223; WO 93/07282などを参照することができる。

本発明で使用可能な既知のアデノウイルス遺伝子治療ベクターの例としては、上記の参考文献に記載されているものや、例えば、WO 94/12649; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984; WO 95/00655; WO 95/27071; WO 95/29993; WO 95/34671; WO 96/05320; WO 94/08026; WO 94/11506; WO 93/06223; WO 94/24299; WO 95/14102; WO 95/24297; WO 95/02697; WO 94/28152; WO 94/24299; WO 95/09241; WO 95/25807; WO 95/05835; WO 94/18922; WO 95/09654などに記載されているものが挙げられる。また、Curriel, Human Gene Therapy, 3:147-154 (1992)に記載されているように死んでいるアデノウイルスに連結されたDNAを投与することによってもよい。

また、本発明の遺伝子送達ビヒクルとしては、アデノウイルス随伴ウイルス(AAV)ベクターが挙げられる。このようなベクターのうち本発明での使用のための好ましい例としては、WO 93/09239に開示されているような、AAV-2に基づいたベクターが挙げられる。最も好ましいAAVベクターとしては、2つのAAVの逆末端反復配列を含むものである。このものは、天然のD配列がヌクレオチド置換によって改変されており、その結果、少なくとも5つの天然型のヌクレオチドおよび18個までの天然型ヌクレオチド(好ましくは、少なくとも10個の天然型ヌクレオチドおよび18個までの天然型ヌクレオチド、最も好ましくは、10個の天然型ヌクレオチド)が維持されているものであり、D配列の残りのヌクレオチドは欠失しているかまたは非天然型のヌクレオチドで置換されているものである。AAV逆末端反復領域の天然型のD配列は、各AAV逆末端反復配列中に20個の連続するヌクレオチドを有する配列(すなわち、各末端に1つの配列が存在するもの)であり、このものはHP形成には関与してはいない。非天然型の置換されたヌクレオチドは、同じ部位で天然型のD配列中に見出されるヌクレオチドとは異なっている任意のヌクレオチドであってよい。他の使用可能なAAVベクターの例としては、pWP-19、pWN-1などが挙げられる(Nahreini, Gene, 124:257-262 (1993))。このようなAAVベクターの別の例としては、psub201などが挙げられる(Samulski, J. Virol., 61:3096 (1987))。別のAAVベクターの例としては、Double-D ITRベクターなどが挙げられる。Double-D ITRを作製する方法は、米国特許第5,478,745号明細書に開示されている。またそれに加えて、AAVベクターは、例えば、米国特許第4,797,368号明細書、同第5,139,941号明細書、同第5,474,935号明細書、WO 94/288157号などに開示のものが挙げられる。本発明で利用可能なAAVベクターの別の例としては、SSV9AFABTKneoが挙げられ、このものは、AFPエンハンサーおよびアルブミンプロモーターを含んでおり、さらに肝臓で優先的に発現せしめることに向けられたものである。その構造並びに作製方法は、Su, Human Gene Therapy, 7:463-470 (1996)に開示されている。別のAAV遺伝子治療ベクターとしては、米国特許第5,354,678号明細書、同第5,173,414号明細書、同第5,139,941号明細書、同第5,252,479号明細書などに記載されているものが挙げられる。

本発明の遺伝子治療ベクターは、ヘルペスベクターであってもよい。主なヘルペスベク

ターの好ましい例としては、チミジンキナーゼポリペプチドをコードする配列を含んでいる単純ヘルペスウイルスベクター（例えば、米国特許第5,288,641号明細書およびEP 0176170に開示されるベクター）が挙げられる。さらなる単純ヘルペスウイルスベクターの例としては、WO 95/04139などに開示されるHFEM/ICP6-LacZ, Geller, Science, 241:1667-1669 (1988)、WO 90/09441、WO 92/07945などに記載されるpHSVlac, Fink, Human Gene Therapy, 3:11-19 (1992)に記載されるHSV Us3::pgC-lacZ、EP 0453242 Aに記載されるHSV7134, 2RH 105およびGAL4、寄託番号ATCC VR-977およびATCC VR-260としてATCCに寄託されているベクターなどが挙げられる

10

。本発明においては、アルファウイルス遺伝子治療ベクターを使用することもできる。好ましいアルファウイルスベクターとしては、シンドビスウイルスベクター、トガウイルス、Semliki Forestウイルス(ATCC VR-67; ATCC VR-1247)、Middlebergウイルス(ATCC VR-370)、Ross Riverウイルス(ATCC VR-373; ATCC VR-1246)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(ATCC VR923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532)、米国特許第5,091,309号、同第5,217,879号、およびWO 92/10578に記載されるベクターなどが挙げられる。また、使用可能なアルファウイルスベクターとしては、米国特許第5,091,309号明細書、同第5,217,879号明細書、同第5,843,723号明細書、同第6,376,236号明細書、WO 94/21792、WO 92/10578、WO 95/07994などに記載されるものも挙げられる。このようなアルファウイルスは、ATCC (Rockville, Maryland, USA)のような寄託機関または保存機関から入手可能であるか、あるいは、一般に利用可能な技術を使用して既知の供給源から単離することができる。好ましくは、細胞傷害性が低減せしめられているアルファウイルスベクターを使用することができる(米国特許第6,391,632号明細書参照)

20

。DNAベクター系(例えば、真核生物階層型発現系(eukaryotic layered expression system)など)は、本発明のガレクチン8改変体の核酸を発現するために有用である。真核生物階層型発現系の詳細については、WO 95/07994を参照することができる。好ましくは、本発明の真核生物階層型発現系としては、アルファウイルスベクターに由来するものが挙げられ、好ましくは、シンドビスウイルスベクターに由来するものが挙げられる。

30

本発明での使用に適した他のウイルスベクターとしては、ポリオウイルス(例えば、ATCC VR-58, Evans, Nature, 339:385 (1989), Sabin, J. Biol. Standardization, 1:115 (1973)などに記載されているウイルスなど);ライノウイルス(例えば、ATCC VR-1110およびArnold, J. Cell Biochem, L401-405 (1990)に記載されるウイルスなど);ポックスウイルス(例えば、カナリアポックスウイルスなど)またはワクシニアウイルス(例えば、ATCC VR-111, ATCC VR-2010など、Fisher-Hoch, Proc Natl Acad Sci USA, 86:317 (1989), Flexner, Ann NY Acad Sci, 569:86 (1989), Flexner, Vaccine, 8:17 (1990)、米国特許第4,603,112号明細書及び同第4,769,330号明細書、並びにWO 89/01973に記載されるウイルスなど);SV40ウイルス(例えば、ATCC VR-305およびMulligan, Nature, 277:108 (1979)およびMadzak, J. Gen. Vir, 73:1533 (1992)に記載されるウイルスなど);インフルエンザウイルス(例えば、ATCC VR-797など)、米国特許第5,166,057号明細書、Enami, Proc Natl Acad Sci US

40

50

A, 87:3802-3805 (1990), Enami & Palese, J Virol, 65:2711-2713 (1991), Luytjes, Cell, 59:110 (1989), McMichael, N E J Med, 309:13 (1983), Yap, Nature, 273:238 (1978)、及び Nature, 277:108 (1979)などに記載されているような逆遺伝学技術を用いて作製された組換えインフルエンザウイルス; EP 0386882、Ruchschacher, J. Vir., 66:2731 (1992)などに記載されているヒト免疫不全症ウイルス; 麻疹ウイルス (例えば、ATCC VR-67, VR-1247並びにEP 0440219に記載されているウイルスなど); アウラウイルス (例えば、ATCC VR-368など); ベバルウイルス (例えば、ATCC VR-600およびATCC VR-1240など); Cabassouウイルス (例えば、ATCC VR-922など); チクングニヤウイルス (例えば、ATCC VR-64, ATCC VR-1241など); Fort Morganウイルス (例えば、ATCC VR-924など); ゲタウイルス (例えば、ATCC VR-369, ATCC VR-1243など); Kyzylgachウイルス (例えば、ATCC VR-927など); マヤロウイルス (例えば、ATCC VR-66など); ムカンボウイルス (例えば、ATCC VR-580, ATCC VR-1244など); ヌヅムウイルス (例えば、ATCC VR-371など); ピクスナウイルス (例えば、ATCC VR-372, ATCC VR-1245など); Tonateウイルス (例えば、ATCC VR-925など); トリニティウイルス (例えば、ATCC VR-469など); ユナウイルス (例えば、ATCC VR-374など); ワトロアウイルス (例えば、ATCC VR-926など); Y-62-33ウイルス (例えば、ATCC VR-375など); O'Nyongウイルス、東部脳炎ウイルス (例えば、ATCC VR-65, ATCC VR-1242など); 西部脳炎ウイルス (例えば、ATCC VR-70, ATCC VR-125L, ATCC VR-622, ATCC VR-1252など); コロナウイルス (例えば、ATCC VR-740, Hamre, Proc Soc Exp Biol Med, 121:190 (1966)に記載されるウイルス)に由来するベクターなどが挙げられる。

本発明の組成物を細胞へ送達するのは、上述のウイルスベクターに限定されない。他の送達方法および媒体も使用することができるが、そうしたものとしては、例えば、核酸発現ベクター、死んでいるアデノウイルスのみに連結されたポリカチオン性コンプレックスDNA (例えば、Curiel, Hum Gene Ther, 3:147-154 (1992)参照)、リガンド連結DNA (例えば、Wu, J Biol Chem, 64:16985-16987 (1989)参照)、真核生物細胞送達ビヒクル細胞 (例えば、米国特許第6,013,517号明細書、同第6,015,686号明細書など参照)、光重合されたヒドロゲル物質沈殿物、米国特許第5,149,655号明細書に記載されているような携帯型遺伝子導入パーティクルガン、WO 92/11033に記載される電離放射線法、核電荷中和法、または細胞膜との融合法などが挙げられる。さらなる手法としては、Philip, Mol Cell Biol, 14:2411-2418 (1994), Woffendin, Proc Natl Acad Sci USA, 91:1581-585 (1994)に記載されているものなどが挙げられる。

粒子媒介遺伝子転移技術も使用することができ、配列は、高レベル発現のための慣用の制御配列を含む通常のベクターに挿入され、次いで合成遺伝子転移分子 (例えば、細胞標的リガンド (例えば、Wu et al., J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987)に記載されているようなアジアロムコイド、Hucked, Biochem Pharmacol, 40:253-263 (1990)に記載されているようなインシュリン、Plank, Bioconjugate Chem, 3:533-539 (1992)に記載されているようなガラクトース、ラクトース、またはトランスフェリンなど)に連結された、ポリリジン、プロタミン、およびアルブミンのようなポリマー性DNA結合カチオン)とインキュベートされる。

ネイキッドDNAも使用することができ、例えば、ネイキッドDNAの導入方法として

10

20

30

40

50

は、WO 90/11092および米国特許第5,580,859号明細書に記載されるものなどが挙げられる。取り込み効率は、生分解性ラテックスビーズを用いて改善することができる。DNAコートラテックスビーズは、該ビーズがエンドサイトーシスされた後に効率的に細胞に輸送される。この方法は、疎水性を増大させて、それによりエンドソーム破裂およびDNAの細胞質への放出を容易にするようなビーズ処理によりさらに改善されることことができる。

遺伝子送達ビヒクルとして作用することのできるようなリポソームは、米国特許第5,422,120号明細書、WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/144445およびEP 524,968に記載されている。非ウイルス的送達法において、米国特許出願第60/023,867号に記載されるように、ガレクチン8改変体ポリペプチドをコードする核酸配列は、高レベル発現のための通常の制御配列を含む慣用的なベクターに挿入されることができ、次いで合成遺伝子導入分子とインキュベートされることができる。該合成遺伝子導入分子としては、例えば、細胞標的リガンド(例えば、アシアロオロソムコイド、インシュリン、ガラクトース、ラクトース、トランスフェリンなど)に連結されたポリマー性DNA結合カチオンが挙げられる。ポリマー性DNA結合カチオンとしては、例えば、ポリリジン、プロタミン、アルブミンなどが挙げられる。他の送達系としては、種々の組織特異的または偏在的に活性なプロモーター制御下の遺伝子を含むDNAをカプセル化するためのリポソームを使用するものが挙げられる。使用に適した非ウイルス的送達法としては、機械的送達系(例えば、Woffendinet al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(24):11581-11585(1994)に記載されている手法)も挙げられる。

さらに、コード配列およびこのような発現の産物は、光重合されたヒドロゲル物質の沈殿により送達することができる。コード配列を送達するのに使用されることのできる遺伝子送達の他の方法としては、例えば、米国特許第5,149,655号明細書に記載される携帯型遺伝子導入パーティクルガンを使用するもの、WO 92/11033に記載されているような導入される遺伝子を活性化するために電離放射線の使用するものなどが挙げられる。リポソームおよびポリカチオン性遺伝子送達ビヒクルの例としては、米国特許第5,422,120号明細書および同第4,762,915明細書、WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445, EP 0524968, Stryer, Biochemistry, 236-240(1975), W.H. Freeman et al., Biochem Biophys Acta, 600:1(1980), Bayer, Biochem Biophys Acta, 550:464(1979), Rivnay, Meth Enzymol, 149:119(1987), Wang, Proc Natl Acad Sci USA, 84:7851(1987), Plant, Anal Biochem, 176:420(1989)などに記載されるものが挙げられる。

本発明は、ガンなどの悪性腫瘍を含む腫瘍、アレルギー性疾患、炎症、免疫異常、好中球や活性化リンパ球(特に活性化T細胞が挙げられ、また活性化B細胞を含んでいてもよい)に関連した自己免疫疾患などを含む疾患や病気に悩む哺乳動物を、ガレクチン8改変体またはガレクチン8改変体由来治療剤(例えば、治療活性成分としてガレクチン8改変体ポリペプチドもしくは哺乳動物における発現のためのガレクチン8改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドなどを含む組成物)の投与により処置する方法を開示するものである。本発明の方法および組成物により処置されることのできる自己免疫疾患としては、任意の自己免疫疾患または移植拒絶(例えば、本明細書中に列挙される自己免疫疾患を含むが、それらに限定されない)が挙げられる。

ガレクチン8改変体は、例えば、組換え技術で発現されたポリペプチド、またはガレクチン8改変体ポリペプチドの改変体、その誘導體、もしくはその融合タンパク質として投与されることができ、哺乳動物に局所的または全身的な形態のいずれかにより送達されることができるものである。ガレクチン8改変体、ガレクチン8改変体の誘導體もしくは改変体、またはガレクチン8改変体融合体をコードする核酸(DNA、RNAなど)は、遺

10

20

30

40

50

伝子治療プロトコルにおいて、哺乳動物における発現のための調節領域を含むネイキッドプラスミドDNAとして、または哺乳動物における発現のためのウイルスベクターで投与されることができる。発現のためのガレクチン8改変体ポリペプチドの送達は、送達を容易にし得るような薬学的に許容される担体を用いて達成することができる。自己免疫疾患を有する哺乳動物をガレクチン8改変体由来治療剤で処置して、自己免疫疾患の改善もしくは寛解、または自己免疫に起因する臨床徴候が無くなるようにできる。

本発明は、本発明に開示のものがどのように働くかという理論に限定されない。ガレクチン8改変体を発現するか、もしくはガレクチン8改変体を発現させることにより、またはガレクチン8改変体由来治療剤を投与することにより、問題の活性化リンパ球は、利用可能にされているガレクチン8改変体の影響を受けて、優先的に標的化されアポトーシスを受ける。ガレクチン8改変体ポリペプチドまたはガレクチン8改変体由来治療剤は、自己免疫を示している領域（例えば、治療がなされている特定の自己免疫疾患を特徴付けているような局在領域）に投与されることができる。これにより、投与されたガレクチン8改変体、さらにはその他の治療剤と、その領域の細胞で発現されている標的物を有している活性化T細胞などとの間の接触が最適化される。従って、該領域の細胞は、遺伝子送達ビヒクルの助けをかりて、該領域に投与されたガレクチン8改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現するにあたっての良好な候補であるのである。かくして、本発明を種々に変更したり、適用して、ガレクチン8改変体ポリペプチドを発現するように操作されて、活性化T細胞などによる攻撃下にある細胞において発現がなされるようにすることができる。移植拒絶の場合には、多くの細胞タイプの細胞表面上でユビキタスに発現されるタンパク質を結合することのできる分子の結合部と融合しているガレクチン8改変体ポリペプチドが挙げられる。該結合部分は、例えば、ヘパリンであってもよいし、そして結合する細胞表面上の分子は、グリコサミノグリカンであってもよい。また該結合部分は、任意の選択された細胞表面抗原に特異的な単鎖抗体の結合ドメインであることもできる。

本発明に関し、ガンなどの悪性腫瘍細胞を含む腫瘍細胞に対して細胞傷害作用を得たり、抗アレルギー作用を得たり、抗炎症作用を得たり、免疫異常を正常化せしめたり、血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、インテグリン_M結合活性、プロ MMP - 9 結合活性、活性型 MMP - 9 産生促進活性、スーパーオキシド産生促進活性、LPSの誘導する炎症の抑制活性、LPSの誘導する TNF - α 、IL - 12、及び/又は IFN - γ の生産を抑制する活性、エンドトキシンショック抑制活性などを発揮せしめたり、活性化リンパ球（特には活性化T細胞を含んでいてもよい）に対してアポトーシスを誘導せしめる場合も、上記自己免疫の場合と同様に理解されるべきである。

本明細書中で使用する「投与」または「投与する」とは、治療剤または治療剤の配合物を哺乳動物に送達するプロセスをいう。投与プロセスは、治療剤（単数または複数の治療剤）および所望の効果により変えることができる。投与は、例えば、非経口的送達または経口的送達など、治療剤に適した任意の手段により達成することができる。非経口的送達としては、例えば、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内送達、器官組織への注射、粘膜、肺、局所的、またはカテーテルによる送達などが挙げられる。経口的な手段は口を経由してなされるものであり、例えば、錠剤またはその他の胃腸経由の送達手段（飲用可能な液体を含む）を使用するなどして行われる。粘膜経由の送達としては、例えば、鼻腔内送達などが挙げられる。肺経由の送達としては、薬剤の吸入させることであってよい。投与は、一般的に、薬学的に許容される担体（例えば、緩衝液、ポリペプチド、ペプチド、ポリサッカライドコンジュゲート、リポソーム、リピッドなど）を用いた送達によりなされてよい。遺伝子治療プロトコルとは、哺乳動物において転写物またはポリペプチドとして発現された場合に治療目的を達成することができるといったポリヌクレオチドを治療剤として投与しているものと考えてよい場合を包含するものであり、ここでは非経口的送達手段および経口的送達手段のいずれをも適用されることができる。このような投与手段は、処置される疾患に適しているように選択される。例えば、疾患が器官ベースである場合、送達は局所的であることができ、例えば、疾患が全身的である場合、送達は全身的であってよい。

10

20

30

40

50

併用投与とは、ある患者に加えられている治療において1つあるいはそれ以上の治療剤を投与することをいう。治療剤は、同じ薬学的担体を用いて投与されることができ、または異なる担体を用いて投与されることもできる。それらは、同じまたは異なる投与手段により投与されることもできる。薬剤は、同じ型の薬剤であっても、または異なる型の薬剤であってもよく、例えば、異なる型としては、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または低分子のものが挙げられる。投与時間は、正確に同じ時間であってもよいし、1つの治療剤は、別の薬剤の前または後に投与されてもよい。従って、併用投与は、同時であってもよいし、連続的であってもよい。治療剤を所定の組合せとするための正確なプロトコルは、薬剤およびその他の考慮の中で処置される状態を考慮して決定される。

用語「インビボ投与」とは、哺乳動物における発現のため、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを患者（例えば、哺乳動物）に投与することをいう。特に、直接的なインビボ投与としては、細胞を哺乳動物から取り出すことなく、哺乳動物細胞をコード配列でトランスフェクトすることが挙げられる。従って、直接的インビボ投与としては、患者細胞で発現が生ずるように、自己免疫疾患に悩む領域に目的のポリペプチドをコードするDNAを直接注射することが挙げられる。

用語「エキスピボ投与」とは、細胞を患者（例えば、哺乳動物）から取り出した後、細胞（例えば、自己免疫攻撃下にある細胞集団に由来する細胞）をトランスフェクト処理することをいう。トランスフェクション後、細胞は哺乳動物に戻される。エキスピボ投与は、細胞を哺乳動物から取り出し、必要に応じて形質転換されるべき細胞（すなわち、自己免疫機構による攻撃下の細胞）を選択し、選択された細胞を複製不可能にし、選択された細胞を発現のための遺伝子（すなわち、ガレクチン8改変体）をコードするポリヌクレオチド（発現を容易にするための調節領域をも含んでいるもの）で形質転換し、ガレクチン8改変体発現のために形質転換された細胞を患者に戻すことにより達成される。治療的に有効な量としては、所望の治療結果を生じるような量のことをいう。例えば、所望の治療効果が自己免疫からの寛解である場合、治療的に有効な量とは、寛解を容易にするような量をさす。治療的に有用な量とは、例えば、数日または数週間の投与を含むような投薬プロトコルにおいて投与されるような量であってもよい。治療効果が、例えば、自己免疫疾患の徴候が出現している間に、哺乳動物の自己免疫応答の影響を低減せしめるものである場合、哺乳動物においてこれを達成するための薬剤の有効量とは、自己免疫の徴候の低減をもたらすような量をいう。

用語「薬学的に許容される担体」とは、治療剤（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、低分子、ペプチド性物質、ペプチドなど）を投与するための担体を指しており、それ自体が組成物を受け取る個体に有害な抗体の産生を誘導せず、そして問題とされるような毒性がなくてそれを投与することができるような任意の薬学的に許容される担体をいう。本発明の別の態様では、薬学的に許容される担体または希釈剤と組合せて上記のような組換えウイルスベクターを含んでいる薬学的組成物が提供される。このような薬学的組成物は、液体溶液の形態のものであってよく、投与前に溶液に懸濁されることのできるような固体形態（例えば、凍結乾燥された固体）のものとして調製されていてよい。さらに、組成物は、表面へ投与したり、注射したり、経口投与したり、直腸投与したりするのに適した担体または希釈剤を用いて調製されることができ、薬学的に許容される担体または希釈剤は、使用される投与量および濃度でそれを受け取る者に対して実質的に無毒であるものである。注射可能な溶液のための担体または希釈剤の代表的な例としては、水、等張生理食塩水溶液（好ましくは、生理学的pHに緩衝化されているもので、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水またはTris緩衝化生理食塩水などが挙げられる）、マンニトール、デキストロース、グリセロール、エタノール、ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミンなど）が挙げられる。特に好ましい組成物としては、10mg/mlマンニトール、1mg/ml HSA、20mM Tris (pH 7.2)、および150mM NaCl中にベクターまたは組換えウイルスを含むものが挙げられる。この場合、組換えベクターは約1mgの物質を示すものであってよく、高分子物質が1%未満で、総物質（水を含む）の1/100,000未満であってもよい。この組成物は、少なくと

10

20

30

40

50

も6ヶ月間約20で安定である。

本発明の薬学的組成物は、細胞分裂を刺激する因子を含んでいてよく、よってリコンビナントレトロウイルスベクターを取込んだり、組込むことを刺激する因子を含んでいてよい。組換えウイルスの保存法は、米国特許第5,792,643号明細書に記載されているものを参照できる。

本発明で提供される治療法を遂行するための治療剤の全ては、治療薬用の薬学的に許容される担体を含んでいる適切な薬学的組成物に入れることができる。治療薬のための薬学担体は、同じものであってもよく、またそれぞれの治療薬で異なってもよい。適した担体としては、大きくてゆっくりと代謝される巨大分子(例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、粒子中の不活性ウイルスなど)であってよい。このような担体は、当業者に周知である。

10

薬学的に許容される塩としては、例えば、無機酸塩(例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩など);有機酸塩(例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩など)が挙げられ、それらは該組成物に入れられて使用されることができる。薬学的に許容される賦形剤については、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J., USA, 1991)を参照できる。治療組成物中の薬学的に許容される担体としては、例えば、水、生理食塩水、グリセロール、エタノールなどの液体が挙げられる。助剤としては、例えば、湿潤剤、乳化剤などが挙げられ、pH緩衝化物質などをこのようなビヒクル中に入れてあることもできる。代表的には、治療組成物は、液体溶液または懸濁物のいずれかとして注射可能なように調製される;注射前に液体ビヒクルを使用して液体または懸濁物とされるのに適した固体形態のものもそれを調製することができる。薬学的に許容される担体の定義内にはリポソームも含まれる。

20

薬学的に許容される担体または希釈剤と組合せて、組換えレトロウイルスまたは上記のベクター構築物のうちの1つを有するウイルスを含んでいる薬学的組成物も提供できる。該組成物は、液体溶液または投与前に溶液に懸濁される固体形態のもの(例えば、凍結乾燥されたもの)のいずれかとして調製することができる。さらに、該組成物は、表面に投与したり、注射したり、経口投与したり、直腸投与したりするのに適した担体または希釈剤を用いて調製することもできる。

薬学的に許容される担体または希釈剤としては、使用される投与量および濃度でそれを受け取る者(レピシエント)に対して無毒であるものである。注射可能な溶液のための担体または希釈剤の代表的な例としては、水、等張生理食塩水溶液(好ましくは、生理学的pHで緩衝化されているものが挙げられ、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、Tris緩衝生理食塩水などである)、マンニトール、デキストロース、グリセロール、エタノール、ポリペプチドまたはタンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン)などが挙げられる。ベクターまたは組換えウイルスは、10mg/mlマンニトール、1mg/ml HSA、20mM Tris (pH 7.2)、および150mM NaClを含有しているといった薬学的組成物に入れて送達することができる。この場合、組換えベクターは約1gの物質であって、高分子物質の1%未満で、総物質質量(水を含む)の1/100,000未満であってよい。該組成物は、少なくとも6ヶ月間20で安定であろう。

30

40

薬学的に許容される担体または希釈剤は、液体溶液または投与前に溶液に懸濁することのできる固体形態のもの(例えば、凍結乾燥されたもの)のいずれかの形態の組成物とすることができるように遺伝子送達ビヒクルと組み合わせることができる。2つ以上の遺伝子送達ビヒクルは、代表的には、伝統的な直接の経路(例えば、頬/舌下、直腸、経口、経鼻、局所(例えば、経皮および眼など)、膣、肺、動脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、眼内、鼻腔内、または静脈内)を介して、あるいは間接的に投与されることができる。

本発明の治療薬は、任意に、例えば、哺乳動物における発現のためのポリヌクレオチドを含んでいてよく、該治療薬は、当該分野で公知の方法に従って腸溶性錠剤やカプセル剤などに製剤化されることができる。これらは、以下の特許:例えば、米国特許第4,853,230号明細書、EP 225,189、AU 9,224,296、AU 9,2

50

30, 801、およびWO 92144, 52などを参照することができる。このようなカプセルは、経口的に投与されて、腸を標的とすることができる。経口投与後1~4日で、例えば、ポリペプチドの発現がなされているか否か、あるいは、例えば、リボザイムもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドによる発現阻害が起こっているか否かを、当該タンパク質に対する抗体を使用することなどにより血漿および血液を測定して決定することができる。

遺伝子送達ビヒクルは、例えば、米国特許第4, 411, 648号明細書、同第5, 222, 936号明細書、同第5, 286, 254号明細書、WO 94/05369などに記載されるように、例えば、注射、パーティクルガン、局所的投与、非経口投与、吸入、またはイオン導入送達などにより哺乳動物に導入されることができる。

治療組成物または治療剤は、ガンなどの悪性腫瘍を含む腫瘍、アレルギー症、炎症、免疫異常、自己免疫疾患を改善することができるような他の治療剤、あるいはガレクチン8改変体治療剤の投与で得られる治療上の利益を増強することができるような他の治療剤と共に投与されてもよい。例えば、アレルギー反応を治療するための投与の場合、粘膜、鼻、気管支、肺などの組織に存在する細胞で発現するようにガレクチン8改変体ポリヌクレオチドのエアロゾルを投与してもよく、有利には、例えば、アレルギー反応が静まるまでの間、毎日数回、鼻用スプレーまたはエアロゾルスプレーによって反復投与することもできる。

遺伝子送達ビヒクルは、哺乳動物の単一部位または複数部位に直接的に投与することができ、例えば、直接注射により投与することができる。遺伝子送達ビヒクルは、エクスピボにより形質導入された標的細胞を使用して投与されることもできる。本発明はまた、遺伝子送達ビヒクルの投与に適切な薬学的組成物（例えば、種々の賦形剤を含む）を提供する。

ガレクチン8改変体ポリペプチド、その改変体、誘導體、アナログ、変異体、あるいはキメラの発現を指示するベクター構築物を、ガンなどの悪性腫瘍を含む腫瘍部位、アレルギーを示す部位、炎症部位、免疫異常を示す部位、自己免疫を示す部位（例えば、脾臓、腎臓、肝臓、関節、脳、脊髄液、皮膚、あるいは身体の他の領域もしくは器官）に直接的に投与することができる。ベクター構築物を直接的に投与するために、本発明の範囲内で種々の方法を使用することができる。例えば、ある領域のために働いている動脈が同定されたなら、ベクターを当該部位に直接的に送達するためにこのような動脈に注射することができる。同様に、例えば、ベクター構築物を含んでいる局所用薬剤組成物を適用することにより、ベクター構築物を皮膚表面に直接的に投与することができる。

直接投与において、ガレクチン8改変体治療剤およびその他の抗自己免疫薬剤を含んでいる配合治療剤と一緒に投与することができる。併用投与はそれを同時になすことができ、例えば、同じベクター中に薬剤をコードするポリヌクレオチドを置いたり、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、その他の薬物であるか否かを問わず、薬剤を同じ薬剤組成物中に入れたり、あるいはほぼ同じ時間に、ほぼ同じ位置に注射することができる別々の薬剤組成物の中に薬剤を入れてそれを投与することにより達成することができる。併用投与を同時に行わない場合（例えば、プロドラッグアクチベーターを投与した後にプロドラッグを投与するような場合）、第2番目の薬剤は、治療目的に適したように、直接注射により投与してよい。従って、例えば、プロドラッグを投与するような場合、プロドラッグはプロドラッグアクチベーターと同じ部位に投与されよう。よって、併用投与プロトコルとしては、治療目的を達成するための投与の組み合わせを含んでいてよい。さらに、併用投与は、必要な場合、後から投与することを含んでいてよい（例えば、ガレクチン8改変体インスピボで直接注射して投与する処理を反復するといったようなものが挙げられる）。

本発明においては、取り出された細胞は、同じ動物あるいは別の同種異系の動物もしくは哺乳動物に戻すことができるということは理解されるべきである。このような場合、一般的には、組織適合性がその動物で合致していることが好ましい（必ずしもそうとは限らないが、例えば、Yamamoto et al., AIDS Research and Human Retroviruses, 7: 911-922 (1991); Yam

10

20

30

40

50

amoto et al., Journal of Virology, 67:601-605 (1993) 参照)。

患者の種々の部位から細胞を取り出すことができる。さらに、本発明の他の実施態様では、例えば、皮膚由来の細胞（皮膚繊維芽細胞など）または血液由来の細胞（例えば、末梢血白血球など）にベクター構築物を入れることができる。所望であれば、細胞の特定の画分（例えば、T細胞部分集合または幹細胞など）を血液から特異的に取り出すことができる（例えば、WO 91/16116 参照）。次いで、任意の上記の技術を利用して取り出された細胞とベクター構築物とを接触せしめ、続いてその細胞を温血動物に（好ましくは、自己免疫を示す領域の付近へまたは付近内に）戻すことができる。

一旦、例えば、哺乳動物などの患者について診断がなされれば、ガレクチン8 改変体治療剤を与えたり、処置される特定の疾患・病気（例えば、腫瘍、アレルギー、炎症、自己免疫疾患など）に適した手法および用量でそれを哺乳動物に投与したり、治療剤の連続投与または投与の修正につきその必要性を決定するために哺乳動物はモニターされるなどといったことを含めた本発明の実施がなされる。本発明において実施とは、処置される疾患を同定し、標的遺伝子治療を適用することが可能な有望細胞型または身体領域を決定することからなっているもよい。ガレクチン8 改変体ポリヌクレオチド（哺乳動物における発現のための調節領域を有するプラスミド、または発現のためのウイルスベクターを含んでいてよい）を構築し、いくつかの哺乳動物細胞を取り出し、ガレクチン8 改変体をコードするポリヌクレオチドでもってトランスフェクト処理され、そしてガレクチン8 改変体発現のために哺乳動物に入れることがなされる。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば、疾患が明白な領域において発現するように、哺乳動物に投与することができる。

従って、例えば、悪性腫瘍細胞の場合、ガレクチン8 改変体を用いてインビボあるいはエキソビボで患部組織又は臓器などの当該腫瘍細胞をトランスフェクト処理することができる。また、例えば、慢性関節炎リウマチの場合、ガレクチン8 改変体を用いてエキソビボで関節液から得られた細胞をトランスフェクトすることができる。

例えば、多発性硬化症処置において、影響を受ける脳領域へガレクチン8 改変体を注射することができし、自己免疫反応型の活性化T細胞などの攻撃下にある細胞でのガレクチン8 改変体発現を容易にするようにすることもできる。また、一例として、多発性硬化症の場合、ガレクチン8 改変体DNAは哺乳動物脳に局所的に注射することができ、脊髄液に由来する細胞を取り出し、それをガレクチン8 改変体DNAでトランスフェクト処理し、脊髄領域に戻すことができる。さらに別の例としては、シェーグレン症候群を有する哺乳動物を処置するために、この疾患の標的器官として、注射によるガレクチン8 改変体ポリペプチド投与に適したものが選択されてよい。また、シェーグレン症候群を患う哺乳動物に関し、罹患器官（例えば、腎臓など）を同定し、ガレクチン8 改変体DNAを該器官に直接投与することもできるし、さらに器官に由来する細胞を取り出し、トランスフェクト処理され、次に哺乳動物のそれらの細胞でガレクチン8 改変体が発現するように身体に戻すことができる。

例えば、移植拒絶を予防する場合、移植を受ける動物は、外来の細胞、外来の組織、または外来の器官を攻撃するような活性化患者細胞を殺すため、ガレクチン8 改変体治療剤を局在的もしくは全身的に投与されることができし、患者身体内で器官を一旦保護するために、移植の直前に器官外表面上の細胞においてガレクチン8 改変体ポリペプチドが発現するようにすることもできる。移植を受けた者の免疫系が外来細胞、外来組織、または外来器官に順応するまでの間、ガレクチン8 改変体治療剤を連続して投与することが必要とされるであろう。

ガレクチン8 改変体治療剤は、天然のガレクチン8 に類似して作用することが期待される。従って、アポトーシス反応を引き起こすためにそれを使用することができる。従って、臨床医は、アポトーシスを達成するために、発現されるかさもなければ哺乳動物に投与される必要があるガレクチン8 改変体の量を化学量論的に知ることができよう。本発明の他の態様では、本明細書中で開示されるベクター構築物は、さらなる非ベクター由来遺伝子の発現を指示することもできる。例えば、ガレクチン8 改変体を投与すると共に適用さ

れるプロドラッグ系は、遺伝子治療のための安全な機構として作用するし、併用治療剤として作用することもできる。

プロドラッグアクチベーターをガレクチン8改変体と共にベクターにおいて発現させて、安全な機構を確保したものであってもよい。該活性化系が止められるべきと決定されると、プロドラッグが投与され、当該プロドラッグアクチベーターを活性化せしめる。こうした処置により、臨床医に遺伝子治療している間の制御手段を与えることになる。プロドラッグアクチベーター/プロドラッグ系は、哺乳動物（ここでは、例えば、自己免疫がガレクチン8改変体発現により悪化せしめられているような場合）においてトランスフェクト細胞を不活化するために有用である。プロドラッグアクチベーター/プロドラッグ系は、該系により提供されるプロドラッグ活性化を用いての細胞傷害作用をなすように、組合せ治療をしたり、治療剤に併用投与したりして使うことができる。

10

プロドラッグアクチベーターおよびプロドラッグと共に、ガレクチン8改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与することを含む治療は免疫調節性のものであってよい。免疫調節性とは、性質または効力が因子の非存在下で起こった免疫応答とは異なる免疫応答を引き起こす因子の使用を指すもので、該因子は免疫応答に關与する1つ以上の細胞により製造されものであるとしても、細胞に外因的に添加されものである。応答の性質または効力は、当業者に公知の種々のアッセイ（例えば、細胞増殖（例えば、³Hチミジンの取り込み）を測定するインビトロアッセイおよびインビトロ細胞傷害アッセイ（例えば、⁵¹Cr放出を測定する）を含む）により測定することができる（Warner et al., AIDS Res. and Human Retroviruses, 7: 645-655 (1991) 参照）。免疫調節因子としては、インビボおよびエキソビボの両方で活性であるものである。このような因子の代表的な例は、サイトカイン（例えば、インターロイキン2, 4, 6, 12および15）、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、GM-CSF、G-CSF、ならびに腫瘍壊死因子（TNF）などが挙げられる。他の免疫調節因子としては、例えば、CD3, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, MHCクラスI分子, MHCクラスII分子、₂-マクログロブリン、シャペロン、そのアナログなどが挙げられる。しかし、遺伝子送達ビヒクルが、サイトカインである免疫調節補因子を発現しない場合、このサイトカインは上記の組成物中に含まれていてよいし、上記の組成物とは別々に（同時にまたは後で）投与することができる。要するに、このような実施態様では、免疫調節補因子は、好ましくは、当該分野で知られている標準的なプロトコルおよび投与量に従って投与される。例えば、インターフェロンは、2~4ヶ月間、100~500万単位/日の投与量で投与されることができ、そしてIL-2は、2~12週間、1~3回/日、10,000~100,000単位/kg体重の投与量で投与することができる。インターフェロンは、例えば、ガレクチン8改変体投与でより効果的な治療を達成するために、活性化T細胞において問題遺伝子の発現をアップレギュレートするために2~12週間、2~3回/週、150,000~1,500,000単位の投与量で投与することができる。

20

30

併用治療剤においては、プロドラッグアクチベーターは、そのためのベクターから発現することもできるし、ガレクチン8改変体ポリペプチドと同じベクターから発現することもできる。いずれかのベクター系（単一ベクターまたは2つのベクター）を、インビボまたはエキソビボ手段により投与することができる。自己免疫治療において、例えば、プロドラッグアクチベーターの添加は、ガレクチン8改変体により達成される効果を支持する免疫調節効果をさらに促進し、そしてさらにプロドラッグ添加は、トランスフェクト細胞の殺傷を活性化することができる。

40

シャペロン分子は、ポリヌクレオチド治療薬の投与前、投与と同時に、または投与後に投与されることができ、そしてシャペロン分子は、例えば、熱ショックタンパク質（例えば、hsp70）であってよい。さらに、哺乳動物において発現されるポリヌクレオチドは、例えば、所望の標的細胞だけのポリヌクレオチド発現を確実にする目的のための、誘導プロモーター（例えば、組織特異的プロモーター）に連結することができる。さらに、ポリヌクレオチドを組織に効果的に送達する目的のために、ポリヌクレオチドは、その組

50

織の細胞ゲノムへの組込みに適したヌクレオチド配列に隣接していることができる。

本発明のこの態様のためにおよび多くの態様のために、ヒトを処置する有効性は、所定の自己免疫疾患の動物モデルにおいて最初に試験することができる。このような現存する動物モデルとしては、例えば、シェーグレン症候群（自己免疫涙腺炎または免疫媒介唾液腺炎）、自己免疫心筋炎、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、炎症性心疾患、水銀誘導性腎臓自己免疫、インスリン依存性糖尿病（I型糖尿病またはIDD）、胸腺摘出後自己免疫、中枢神経系（CNS）脱髄障害、CNS狼瘡、ナルコレプシー、重症筋無力症（MG）、グレーブズ病、免疫媒介PNS障害、変形性関節症、慢性関節リウマチ、ブドウ膜炎、髄質嚢胞性線維症、自己免疫溶血性疾患、自己免疫脈管炎、卵巣自己免疫疾患、およびヒト強皮症（scleroderma）などをふくむ自己免疫疾患の動物モデルが挙げられる。

10

複数の遺伝子送達ビヒクルを、動物または植物に投与することができる。好ましい実施態様において、動物は温血動物であり、さらに好ましくは、マウス、ニワトリ、ウシ、ブタ、ペット（例えば、ネコおよびイヌ）、ウマ、およびヒトからなる群より選択される。ポリペプチド治療薬（例えば、ガレクチン8改変体または他のサイトカイン）について、投与量は、約5～50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 哺乳動物体重、また約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約5 mg/kg 、また約100～500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 哺乳動物体重、および約200～約250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲であってよい。

ポリペプチド治療薬（例えば、天然または変異体のガレクチン8改変体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドなど）に関しては、組織を標的とした投与では、患者（例えば、哺乳動物）におけるポリヌクレオチド発現に応じて、コード配列または非コード配列の発現可能構築物を含むベクターを次のように投与できる：局所的投与の遺伝子治療プロトコルでは、約100 ng ～約200 mg DNA、あるいは約500 ng ～約50 mg DNA、または約1 μg ～約2 mg DNA、あるいは約5 μg DNA～約500 μg DNA、そして遺伝子治療プロトコルにおける局所投与の間では、約20 μg ～約100 μg の範囲、そして例えば、注射あたりまたは投与あたり約500 μg の用量で投与することができる。より多くの発現が所望される場合には、組織のより広い領域にわたって、より多くの量のDNAまたは同じ量のDNAが連続投与プロトコルに従い再投与されようし、例えば、腫瘍部位の異なる近接または密接した組織部分へいくつかが投与され、そうしたことは陽性の治療結果をもたらすために必要とされよう。

20

30

低分子治療薬の投与について、低分子の効力に応じて、投与量を変えることができる。非常に強力なインヒビターでは、その投与量は、哺乳動物キログラムあたりの量で示せば、例えば、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約500 mg/kg 、あるいは約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約5 mg/kg 、又は約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、あるいは例えば、約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲で十分である。ペプチドおよびペプチドの投与では、効力はまた投与量により変わり、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約500 mg/kg 哺乳動物体重、および約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約5 mg/kg 、および約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲であってよい。そして通常の用量は約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であってよい。

本発明の活性成分は、その投与量を広範囲にわたって選択して投与できるが、その投与量及び投与回数などは、処置患者の性別、年齢、体重、一般的健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行なっている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。

40

医薬品製造にあたっては、その添加剤等や調製法などは、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十四改正 日本薬局方解説書、平成13年6月27日発行、株式会社廣川書店；一番ヶ瀬 尚 他編 医薬品の開発12巻（製剤素剤〔I〕）、平成2年10月15日発行、株式会社廣川書店；同、医薬品の開発12巻（製剤素材〔II〕）平成2年10月28日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して適用することができる。

本発明の活性成分は、本明細書で説明している、(a)ガレクチン8改変体及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドなど、(b)ガレクチン8改変体及びそれ

50

と実質的に均等な生物活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、(c) ガレクチン8 改変体技術を利用して見出された因子など、(d) ガレクチン8 改変体及びそれと実質的に均等な生物活性を有するポリペプチド遺伝子送達ビヒクルなどが挙げられ、それらはヒトガレクチン8 が血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、インテグリン_m 結合活性、プロMMP-9 結合活性、活性型MMP-9 産生促進活性、スーパーオキシド産生促進活性、LPSの誘導する炎症の抑制活性、LPSの誘導するTNF- α 、IL-12、及び/又はIFN- γ の生産を抑制する活性、エンドトキシンショック抑制活性を示すという性状、腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導するが、正常細胞にはアポトーシスを誘導しないという性状、悪性細胞の転移性を抑制するという性状、アポトーシスを誘導する活性などのいずれかを利用する上で有用であり、抗腫瘍剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、自己免疫疾患用剤、抗炎症剤、エンドトキシン誘起炎症の抑制剤、エンドトキシンショック抑制剤、副腎皮質ステロイドホルモンと同様な活性を利用する薬剤として有望である。

10

【実施例】

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。

全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。なお、以下の実施例において、特に指摘が無い場合には、具体的な操作並びに処理条件などは、DNAクローニングではJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 及びD. M. Glover et al. ed., DNA Cloning, 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); PCR法を使用する場合には、H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., DNA Cloning, 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) 及びM. A. Innis et al. ed., PCR Protocols, Academic Press, New York (1990) に記載の方法に準じて行っているし、また市販の試薬あるいはキットを用いている場合はそれらに添付の指示書 (protocols) や添付の薬品等を使用している。

20

30

実施例 1

〔ガレクチン8 改変体の製造〕

(A) A432細胞からのtotal RNAの抽出

40

A432細胞(ヒト由来細胞, skin tumor, carcinoma, squamous cell)は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC CRL 1555)などにより入手可能である。セルラインは、10% FBSを添加したDME培地(DMEM; Sigma、セントルイス、米国)中で5% CO₂の条件下37で維持される。

A432細胞からのtotal RNAの抽出は、次のようにして行った。すなわち、90-mmプレートにおいて培養したA432細胞(10% FBSを含むDMEMを使用)を、PBSで2度洗浄した後、プレートあたり3mlのISOGEN(商品名: ニッポンジーン)を加え、マニュアル(ニッポンジーン)に従ってtotal RNAを抽出する。

50

ISOGEN (商品名: ニッポンジーン) は、フェノールとチオシアン酸グアニジンを含む均一な液体で、液層分離の際に便利のように着色された溶液であり、このISOGEN (商品名: ニッポンジーン) を使用してのRNAの抽出は基本的には次のようなステップで行われる。試料にISOGEN (商品名: ニッポンジーン) を加えて溶解またはホモジナイゼーションした後、クロロホルムを加えて遠心分離する。遠心分離するとホモジネートは水相、有機相及び中間相の3相に分離する。水相にはRNAのみが存在することになるので、この水相を採取してイソプロパノールを加えてRNAを沈殿させ、洗浄処理することによりtotal RNAを取得できる。

(B) total RNAからのpoly(A)⁺RNAの精製とcDNA合成

total RNAからのpoly(A)⁺RNAの精製とcDNA合成は、次のようにして行った。すなわち、A432細胞から抽出したtotal RNAを、1mg/mlの濃度になるようDEPC処理水に溶解する。PolyATtractTM mRNA Isolation System (商品名: Promega) を用い、マニュアルに従ってtotal RNAからpoly(A)⁺RNAを精製する。精製したpoly(A)⁺RNAを5µg/20µlの濃度になるようDEPC処理水に溶解する。

PolyATtractTM mRNA Isolation System (商品名: Promega) は、ピオチニル化されたオリゴ(dT)プローブと磁性粒子上に固相化されたアビジンとを利用するもので、total RNA試料をRNase-free水に添加し、次にピオチニル化オリゴ(dT)プローブ(Biotinylated-Oligo(dT) Probe)と2×SSCの存在下にプローブとのアニーリングを行う。次にアニーリングの反応液をStreptavidin MagnetosphereTM Paramagnetic Particles (SA-PMPs) と混合する。インキュベート後SA-PMPs含有チューブを磁石のスタンドに置いて、SA-PMPsペレットを回収すべく注意して上清を除く。回収したSA-PMPsペレットをRNase-free水に再溶解した後、磁石のスタンドに置きSA-PMPsを回収し、溶出されたmRNA含有水溶液を取得する。必要により、乾燥処理して溶媒を除去したり、アルコール沈殿処理して濃縮してよい。

First-Strand cDNA Synthesis Kit (商品名: Amersham Biosciences) を用い、マニュアルに従って5µgのpoly(A)⁺RNAからcDNAを合成する(プライマーにはNot I-d(T)₁₈を使用する)。上記で精製して得たpoly(A)⁺RNAをDEPC処理水に溶解して所定の濃度とし、65℃で10分間保持してテンプレートの変性をした後0℃で2分間保持し、poly(A)⁺RNA試料液(RNAテンプレート)とする。First-Strand cDNA Synthesis Kit (商品名: Amersham Biosciences) には、cDNA合成用プライマーとしてNot I-d(T)₁₈プライマー、First-Strand Reaction Mixes (Cloned, FPLC pure M-MuLV Reverse Transcriptase; RNA guard; RNase/DNase Free BSA; dATP, dCTP, dGTP & dTTP含有Tris-HCl (pH 8.0))、DTT液及びRNase-Free水がセットになっており、RNAテンプレート、Reaction Mix、プライマー、DTT液及びRNase-Free水を混合し、37℃で60分間反応させて、first-strand cDNA合成が完了するようになっている。

得られたCdnaはそのままPCRに使用できる。

(C) ガレクチン8改変体発現ベクターの構築

発現ベクターの作製には、

(1) A432細胞のpoly(A)⁺RNA画分から調製したcDNA

(2) pET-11aベクター(STRATAGENE)

(3) PCR用プライマー:

PEG8-1: CGTCCTCATATGATGTTGTCCTTAAACAACCTAC [配列番号11]
 PEG8NCRD2: CGACCGCATATGCGAGCTGAAGCTAAAACCAAT [配列番号12]
 PEG8CCRD1: CGTCCTCATATGAGGCTGCCATTCGCTGCAAGG [配列番号13]
 PEG8CCRD2: CGACCGGGATCCCTACCAGCTCCTTACTTCCAG [配列番号14]

を使用した。

図1に示す手順でpET-11aベクターのNdeI-BamHI siteにガレクチン8のN-末端側糖鎖結合ドメイン(N-terminal carbohydrate recognition domain, NCRD)とC-末端側糖鎖結合ドメイン(CCRD)を挿入し、リンカーペプチドを欠く改変型ガレクチン8(G8NC(null))の発現ベクターを作製した。

まず、ガレクチン8 cDNAからそれぞれ(1)ヒトガレクチン8のC-末端側CRDに対応するcDNAと(2)ヒトガレクチン8のN-末端側CRDに対応するcDNAを取得した。すなわち、cDNAからPCR用プライマー: PEG8CCRD1+PEG8CCRD2を用いてヒトガレクチン8のC-末端側CRDに対応するcDNA(G8CCRD)を増幅した。G8CCRDを制限酵素(NdeI+BamHI)で切断した後、同じ制限酵素で処理したpET-11aベクターに挿入してpET-G8CCRDを得た。PCRは、KOD DNA polymerase kit(TOYOBO Code No. KOD-101)を使用して行った。PCR Reaction mixture(dNTP mix, 25mM MgCl₂, 10x Buffer, KOD DNA polymerase(0.05u), プライマー及び鋳型cDNA)を以下のようなPCRのサイクルの条件で反応させた: 94 で2分処理した後、サイクル(98 で15秒、次に65 で2秒、そして74 で30秒処理)を25回行い、最後に4 で反応を停止した。PCR増幅された断片のベクターへの挿入は、Ligation high kit(TOYOBO Code No. LGK-101)を使用して行った。反応は、インサート:ベクターのモル比を約5:1で混合し、その総DNA溶液(体積)量の1/2(体積)量の試薬Ligation highを加えて混合して行った。16 で16時間(O/N)反応させることで挿入した。

一方、該ガレクチン8 cDNAからPCR用プライマー: PEG8-1+PEG8NCRD2を用いてヒトガレクチン8のN-末端側CRDに対応するcDNA(G8NCRD)を増幅した。G8NCRDを制限酵素(NdeI)で切断した後、得られた断片を同じ制限酵素(NdeI)で処理し、さらに脱リン酸化したpET-G8CCRDに挿入してpET-G8NC(null)を得た。PCR増幅並びにベクターへの組み込みは上記と同様にして行った。pET-G8NC(null)は、ヒトのM型ガレクチン8の第156番目のAsp(D)から第183番目のLeu(L)までの28個のアミノ酸配列をHis-Met(HM)配列に置き換えたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。すなわち、配列番号1で示される塩基配列を持つものであり、配列番号2で示されるアミノ酸配列(図2)を有するポリペプチドをコードしている。

(D) ガレクチン8改変体組換え蛋白質の発現及び精製

上記工程(C)で得られた発現用プラスミドベクターpET-G8NC(null)を大腸菌(BL21(DE3))に導入した。導入は、エレクトロポレーション法により行った。すなわち、competent BL21(DE3)とプラスミドベクター水溶液を混合し、1.8kVの電圧でのエレクトロポレーション法によりトランスフェクションを行った。

組換え蛋白質の発現は、大腸菌を2%(w/v)グルコース及び100μg/mlアンピシリン含有2xYT培地中で培養し、600nmでの吸光度が0.7に達した時点で0.1Mイソプロピル-D-チオガラクトピラノシドを添加(最終濃度、0.1mM)して、組換え蛋白質の発現を誘導して行った。20 で18時間培養した後、遠心により

菌体を集め、10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSFに懸濁した。懸濁液を10分間超音波処理した後、10% (w/v) Triton X-100を加え(最終濃度、1%) 4 で30分間攪拌した。15,000 × gで30分間遠心し、得られた上清液中の組換えタンパク質を、ラクトース-アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

結果、純度の高い標品が比較的高い収率で得られた。得られた組換え蛋白質の電気泳動の結果を図3に示す。SDS-PAGE条件は次の通りである: Gel, Acrylamide-BIS (12% gel), 電気泳動用バッファ, 25 mM Tris-192 mMグリシン-0.1% SDS, 泳動条件, 180 V, 45 min., 染色, CBB, 60 / 30 min. 電気泳動サンプルは、Strata CleanTM Resin (Stratagene)に吸着させ、1 × sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (W/V) 2-ME, Glycerol)で0.2 mg/mlに調整し、98 / 3 min.の熱処理後レーンあたり約2 μgのタンパク量で電気泳動をした。

精製されたG8NC (null)は、4 で少なくとも9週間安定に保存することができる。一方、野生型のガレクチン8 (M-type, G8 (M))は、同じ保存条件で1週間以内に大部分が分解される。この分解は、精製ガレクチン標品に含まれる大腸菌由来のプロテアーゼによるものと考えられる。

実施例 2

ヒト組織中に存在するプロテアーゼに対する感受性を、野生型のガレクチン8 (M-type, G9 (M): 短いリンカーペプチドを持つアイソフォーム)とG8NC (null)で比較した。PBSに溶解したガレクチンに1/100 (重量比)のelastaseあるいはtrypsinを加え37 で保温した。いずれの場合もG9 (M)は15分間で大部分が分解されたのに対して、G8NC (null)は2時間後においてもほとんど分解を受けていなかった(図4参照)。

実施例 3

ガレクチン8の生物活性に与える変異導入の効果を調べるために、末梢血好中球の接着に対する効果を検討した。また、好中球のスーパーオキシド産生に及ぼす効果についても検討した。

(1) In vitro細胞接着アッセイ

好中球は、健康なボランティアによる末梢血白血球を、不連続濃度勾配のPercoll (Amersham Pharmacia Biotech)に加えて分離した。コンタミの赤血球細胞を水で20秒間溶解させ、続いて等体積の2 × PBSおよび4倍の体積のRPMI-1640、10% FBSを加えた。遠心分離後、RPMI-1640、10% FBS中で細胞を再構成した。分離した細胞は、3つの24ウェル組織培養プレート(0.45 mlの培地/ウェル当たり2.5 × 10⁵個の細胞)に加えた。50 μlのアッセイサンプルを添加した後、細胞は37 にて60分間接着させた。インキュベーション期間の終わりに、激しくピペティングし、PBSで洗浄して、ゆるく結合した細胞を除去した。結合した細胞は、0.25%トリプシン/0.5 mM EDTAにより37 にて10分間処理して回収した後、2 M NaClおよび2 mM EDTAを含む50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)中で超音波処理した。超音波処理物のDNA含有量は、コウシ胸腺DNAを標準として用いて、LabarcaおよびPaigenの方法(Anal. Biochem., 102, 344-352 (1980))によって決定した。

(2) スーパーオキシド生成の判定

O₂⁻生成は、Yamaokaらの方法(J. Immunol., 154, 3479-3487 (1995))によって決定した。0.5 mM MgCl₂、0.8 mM CaCl₂および7.5 mMグルコースを含むPBS中で懸濁させた精製好中球(2.5 × 10⁶ / 2 ml)を、キュベット内に配置した。キュベットにはウマ心臓チトクロムc (7.5 μM)も含まれていた。反応はサイトカラシンB (5 μg/ml)の存在時または不在

時に実施した。対照実験では、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた。37 °Cにて5分間事前インキュベートした後、刺激を加え、 550 nm での吸収変化を測定した。 O_2^- 生成活性は、 $20.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ のモル吸光係数を用いて計算した。

(3) 結果

10%血清存在下で、培養ディッシュに対する好中球の接着を調べた結果、G8NC (null)はG8(M)と比較してより高い活性を示した(図5参照)。またG8NC (null)は、好中球のスーパーオキシド産生をG8(M)とほぼ同程度まで促進した(表1参照)。

【表1】

表1

Additives	Superoxide production (O_2^- nmoles/ 1×10^6 cells/min)	
	- cytochalasin B	+ cytochalasin B
None	0.00	0.00
fMLP, $0.2 \mu\text{M}$	2.14	8.43
G8(M), $0.3 \mu\text{M}$	-	2.60
G8(M), $1 \mu\text{M}$	1.83	5.40
G8NC(null), $0.3 \mu\text{M}$	-	2.72
G8NC(null), $1 \mu\text{M}$	2.04	5.88

10

実施例4

ガレクチン8 (Gal-8)のエンドトキシン及びそれに関連した生体反応現象に対する生物活性を調べる目的で、改変体ガレクチン8 (安定化ガレクチン8)を使用してその発揮する作用効果を検討した。

BALB/cマウス(6週齢)にリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) (ここでLPSはE. coli, 0111: B4由来、Sigma-Aldrich社製) $4 \mu\text{g}$ を腹腔内に投与した。Gal-8の効果を調べるため、recombinant human Gal-8 (ガレクチン8改変体: G8NC (null)、以下の図及び表では、G8又はGalectin-8と表記) $80 \mu\text{g}$ をLPS $4 \mu\text{g}$ と併せて腹腔内に投与した。

30

マウスの眼窩静脈より経時的に採血し、血清を調製、その後サイトカイン測定のためELISA (Pierce Endogen社製)に供した。LPSまたはLPSとGal-8 (G8NC (null))を投与1時間後の血清についてはTNF- α を、3時間後の血清についてはIL-12 (p70)を、6時間後の血清及び12時間後の血清についてはIFN- γ をそれぞれ測定した。

測定結果を、図6~8に示す。この結果、LPSとGal-8 (G8NC (null))を同時に投与した場合、LPS投与に比べ、TNF- α 、IL-12 (p70)、IFN- γ の生産を抑制した。このことからGal-8はLPSの誘導する炎症を抑制する可能性が示唆されたので、LPSによるエンドトキシンショックのモデルであるジェネラライズドシュワルツマン反応 (generalized Schwartzman reaction)を用いて、Gal-8によるエンドトキシンショック抑制効果を検討した。

40

本モデルは少量のLPS ($5 \mu\text{g}/\text{mouse}$)を腹腔内に投与したのち、24時間以内に再度LPS ($65 \mu\text{g}/\text{mouse}$)を投与することにより致死性のショックを起こす。この1回目のLPS投与時にGal-8 (G8NC (null))を $80 \mu\text{g}/\text{mouse}$ で同時に投与すると、LPSを投与したマウスがショック死するのに対し、Gal-8 (G8NC (null))の同時投与で6匹中5匹がショック死を免れ生存した。テスト結果を表2に示す。

50

【表 2】

表 2 Effect of Galectin-8 on Shwartzman reaction

Administration	Sensitization (1 st) i.p.	Challenge (2 nd) i.v.	Survival
1. PBS	PBS	LPS (65 μ g)	6/6
2. PBS	LPS (5 μ g)	LPS (65 μ g)	0/6
3. Galectin-8 (80 μ g)	LPS (5 μ g)	LPS (65 μ g)	5/6 (83.3%)

以上より recombinant human Gal-8 (G8NC (null)) は LPS の誘導する TNF- α 、IL-12 (p70)、IFN- γ の生産を抑制し、エンドトキシンショックを防ぐ効果があることがわかった。つまり、ガレクチン 8 (Gal-8) は LPS の誘導する TNF- α 、IL-12 (p70)、IFN- γ の生産を抑制し、エンドトキシンショックを防ぐ効果がある。

LPS はグラム陰性菌に特有のもので、動物に対して毒素活性をもち、内毒素 (エンドトキシン) と呼ばれる。通常、細胞壁に強固に結合しているが、細胞の溶解が起こったときなどに遊離し、生体に様々な反応を引き起こすことが知られている。内毒素はタンパク毒素である外毒素と異なり、熱、乾燥、消毒剤に対して強い抵抗性を持っている。活性の作用はリポド A 部分のものが殆どとされているが、しかしリポド A そのものは水に不溶なので、それだけでは活性を示さない。ところが、多糖部分の大きな親水性により可溶化して、水溶液中ではミセルを形成して運ばれて活性を示すとされている。LPS は補体を第 2 経路において活性化させ、マクロファージや他の細胞からサイトカインや他の免疫制御物質を放出する。これらの生理活性物質は宿主の生体防御機構に働くとともに、細菌を除去する方向に働くと考えられている。しかし、これらのサイトカインなどが過剰になると宿主に毒性をしめし、ショックなど死を招くことがある。LPS の生物活性としては、(1) 致死活性、(2) エンドトキシンショック、(3) 発熱、(4) アジュバント活性、(5) マクロファージの活性化、(6) 補体系別経路活性化、(7) 物質の膜透過に対する関与、(8) 抗腫瘍作用、(9) ウイルスのレセプター、(10) 循環器障害、補体の活性化、血管内血液凝固、(11) 白血球全般の減少と増多、低血糖、低血圧、主要臓器の機能不全および致死性のショック作用、(12) リンパ球や血管内皮細胞などで LPS の刺激により分泌されたサイトカインなどにより引き起こされるショック作用、(13) サイトカインやオーダアコイドの誘導、(14) 中枢神経細胞、筋肉細胞の障害、(15) 凝固因子、排出促進物質の活性化、血管の収縮と拡張、薬物代謝酵素の阻害、(16) シュワルツマン反応 (出血壊死を伴う非免疫学的炎症反応)、(17) 血小板凝集によるセロトニンの放出などを含む血管系の障害、(18) インターフェロンの誘発、(19) 遊走性阻害、物質の膜透過に対する関与などが知られている。LPS の致死活性とは、血

20

30

40

【産業上の利用可能性】

ガレクチン 8 改変体は、野生型のものよりも酵素に対して抵抗性があることから、ガレクチン 8 が示す多面的な作用・機能を有効利用するのに役立つ。野生型ガレクチン 8 は、血球凝集活性、好中球接着誘導活性などの細胞接着誘導活性、インテグリン α 結合活性、プロ MMP-9 結合活性、活性型 MMP-9 産生促進活性、スーパーオキシド産生促進

50

活性、特定の細胞に対してのアポトーシス誘導活性、腫瘍細胞に対する増殖抑制・阻害作用、ガンの転移抑制・退縮作用などの活性を誘導することが示唆されているが、本ガレクチン8改変体は、同様な活性を示すより有利な活性物質として期待できる。さらにガレクチン8改変体を使用することで、LPS誘起の炎症を抑制する活性、エンドトキシンショック抑制作用（致死性の抑制作用を含む）があることが観察され、ガレクチン8がこうした活性を有することが示唆される。このように炎症及び炎症性疾患に対する治療剤、エンドトキシンショック抑制剤、ガン治療薬や難治性の免疫疾患（自己免疫疾患を含む）、アレルギー疾患に対する治療薬の開発・ガレクチン8の機能解明・研究開発に利用できる。

本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

10

【配列表フリーテキスト】

SEQ ID NO: 1, Description of Artificial Sequence: Polynucleotide for galectin-8 mut
ein, G8NC (null)

SEQ ID NO: 2, Description of Artificial Sequence: Polynucleotide for galectin-9 mut
ein

SEQ ID NO: 5, galectin-8 short isoform (hGa
lectin-8 (M))

20

SEQ ID NO: 7, galectin-8 long isoform (hGal
ectin-8 (L))

SEQ ID NO: 11, Description of Artificial S
equence: Oligonucleotide to act as a prim
er for PCR

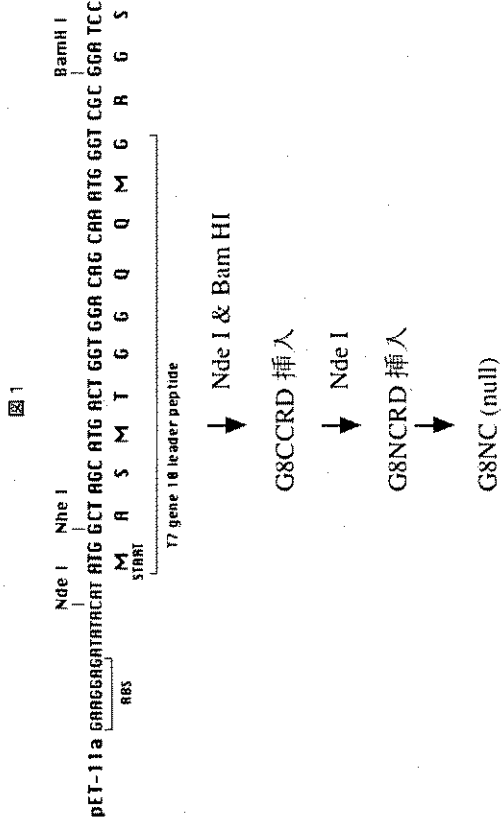
SEQ ID NO: 12, Description of Artificial S
equence: Oligonucleotide to act as a prim
er for PCR

SEQ ID NO: 13, Description of Artificial S
equence: Oligonucleotide to act as a prim
er for PCR

30

SEQ ID NO: 14, Description of Artificial S
equence: Oligonucleotide to act as a prim
er for PCR

【 図 1 】

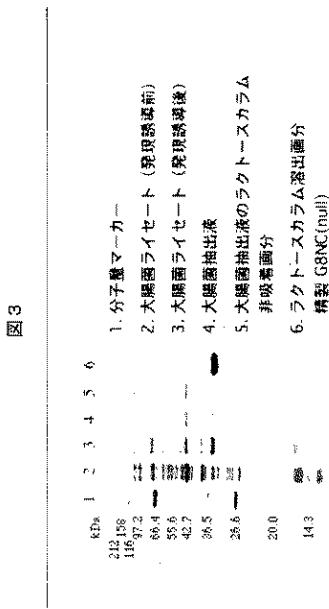


【 図 2 】

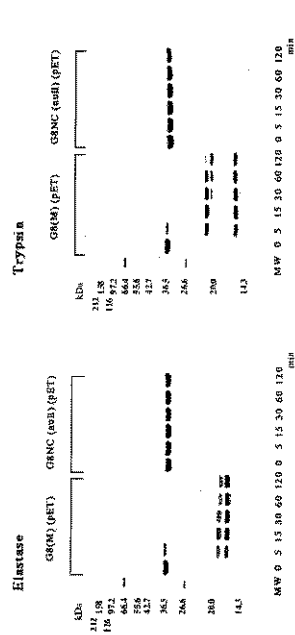
MMLSLANLQNIYNPVIFFVGTIPD
 QLDPGLIVIRGHVPSDADRQVDL
 QNGSSMKFRADVAHFNFRFRKAGC
 IVCNTLINEKWRREITTYDTPFKRE
 KSFEIIVMLKDKFQAVVNGKHLL
 YGHRIGPEKIDTLYGKVNHSIG
 FSSFSSHMRLFFAARLNTPMGEGRTVVVKGEVN
 ANAKSFNVDDLKAGSKDIALHLNPR
 LNIKAFVRSFLOQESWGEERNITS
 FPFSPGMVFEMIIYCDVREFKVVAVN
 GVHSLYKRRFKELSSIDTLEINGD
 IHLLEYRSW

図 2

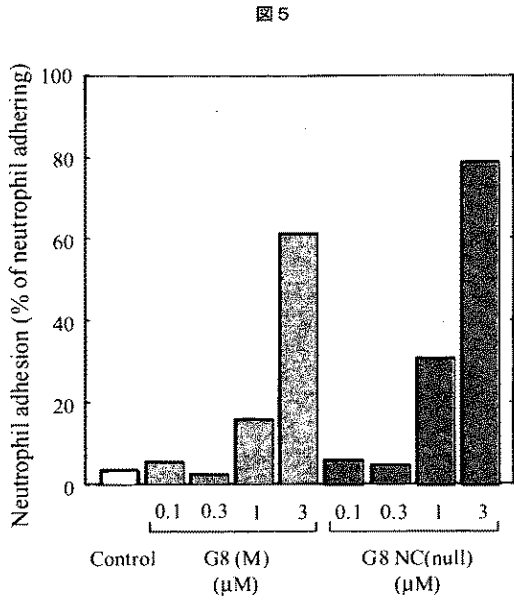
【 図 3 】



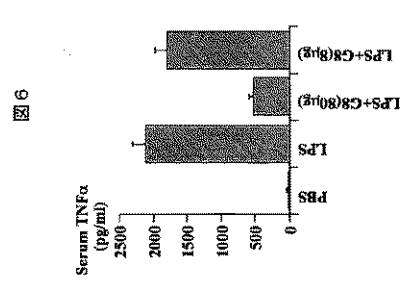
【 図 4 】



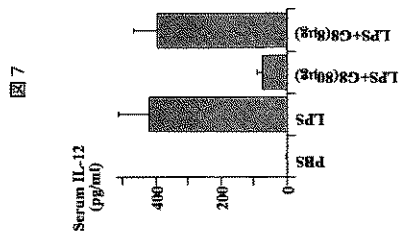
【 図 5 】



【 図 6 】

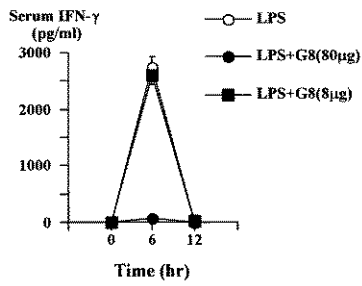


【 図 7 】



【 図 8 】

図 8



【配列表】

2005121340000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/009211
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12N15/12, A61K38/17, A61P7/04, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10 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) Int.Cl. ⁷ C12N15/00-90, A61K38/00-58, A61P1/00-43/00, C07K1/00-16/46, C12NS1/00-7/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ Y	Nishi N. et al., "Role of linker peptide in biological activity of Galectin-8: Presence of novel thrombin-recognition site in a linker peptide of an isoform of Galectin-8", Trends in Glycoscience and Glycotechnology, (May 2004), Vol.16, p.s55	1-4/ 5-17
Y	Nishi N. et al., "Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity", Glycobiology, (2002), Vol.12, No.3, pages 191 to 197	1-17
Y	JP 2001-501831 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 13 February, 2001 (13.02.01), & EP 1012266 A1	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 but 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 17 June, 2005 (17.06.05)		Date of mailing of the international search report 05 July, 2005 (05.07.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/009211

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Nishi N. et al., "Development of highly stable galectins: truncation of the linker peptide confers protease-resistance on tandem-repeat type galectins.", FEBS Lett., (2005), Vol.579, No.10, pages 2058 to 2064	1-17
Y	Wada J. et al., "Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin.", J.Biol.Chem., (1997), Vol.272, No.9, pages 6078 to 6086	1-17

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 5 / 0 0 9 2 1 1								
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))										
Int.Cl. ⁷ C12N15/12, A61K38/17, A61P7/04, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))										
Int.Cl. ⁷ C12N15/00-90, A61K38/00-58, A61P1/00-43/00, C07K1/00-16/46, C12N1/00-7/08										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの										
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2005年									
日本国実用新案登録公報	1996-2005年									
日本国登録実用新案公報	1994-2005年									
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)										
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)、JSTPlus (JOIS)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号								
X/ Y	Nishi N. et al. "Role of linker peptide in biological activity of Galectin-8: Presence of novel thrombin-recognition site in a linker peptide of an isoform of Galectin-8", Trends in Glycoscience and Glycotechnology, (May 2004), vol.16, p.s55	1-4/ 5-17								
Y	Nishi N. et al. "Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity", Glycobiology, (2002) vol.12, no.3, p.191-197	1-17								
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 17.06.2005	国際調査報告の発送日 05.07.2005									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 斎藤 真由美	4B 3539								
電話番号 03-3581-1101 内線 3448										

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/009211

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-501831 A (ヒューマン ジノーム サイエンス誌, イン コーポレイテッド) 2001.02.13 & EP1012266 A1	1-17
P, X	Nishi N. et al. "Development of highly stable galectins:- truncation of the linker peptide confers protease-resistance on tandem-repeat type galectins." FEBS Lett., (2005), vol.579, no.10, p.2058-2064	1-17
Y	Wada J. et al. "Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin." J. Biol. Chem., (1997), vol.272, no.9, p.6078-6086	1-17

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00		A
A 6 1 K	38/36	(2006.01)	A 6 1 K	37/46		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	39/00	(2006.01)	A 6 1 P	39/00		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
			G 0 1 N	33/53		S

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM), EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR, CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,L T,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN ,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 伊藤 愛子

香川県木田郡牟礼町大町 1 7 0 3 - 3 2

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04 GA11
 HA08
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA01 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 CA18 DA31 DA40
 NA14 ZA512 ZB072 ZB111 ZB211 ZB261 ZC371 ZC411
 4H045 AA10 AA30 BA09 CA40 EA20 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	新型半乳糖凝集素8变体蛋白及其用途		
公开(公告)号	JPWO2005121340A1	公开(公告)日	2008-04-10
申请号	JP2006514438	申请日	2005-05-13
申请(专利权)人(译)	胆有限公司制药		
[标]发明人	西望 平島光臣 山内清明 伊藤愛子		
发明人	西望 平島光臣 山内清明 伊藤愛子		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/435 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K38/36 A61K48/00 A61P7/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P39/00 A61P43/00 G01N33/53 A61K38/00 A61K38/17 A61P7/04 C07K14/47 C12N15/12		
CPC分类号	A61K38/00 A61P29/00 C07K14/4726		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/435 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K37/46 A61K48/00 A61P7/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P39/00 A61P43/00.105 A61P43/00.111 G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DA31 4C084/DA40 4C084/NA14 4C084/ZA512 4C084/ZB072 4C084/ZB111 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZC371 4C084/ZC411 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2004175086 2004-06-14 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

以大肠杆菌为宿主产生的重组半乳糖凝集素8，血凝活性，嗜中性粒细胞粘附诱导活性，整联蛋白 α 中号结合活性，MMP-9前结合活性，MMP-9产生活性促进活性，超氧化物。它具有促进生产的活性，对特定细胞的凋亡诱导活性以及抑制或抑制肿瘤细胞的转移和侵袭的活性。然而，重组半乳糖凝集素8具有将两个CRD连接至蛋白酶的连接区。灵敏度很高，以至于酶消化非常容易，并且失去了活性，因此需要更稳定的分子用于进一步研究。通过修饰连接半乳糖凝集素8的两个CRD的连接区，获得了具有改善的稳定性的修饰分子，同时避免了对上述活性的不利影响。