

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 510080**

(P2003 - 510080A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	N 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		48/00	4 B 0 6 3
39/395		A 6 1 P 9/10	4 B 0 6 4
48/00			101 4 B 0 6 5
A 6 1 P 9/10		19/02	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全166数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 526954(P2001 - 526954)

(86)(22)出願日 平成12年9月29日(2000.9.29)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月29日(2002.3.29)

(86)国際出願番号 PCT/US00/41035

(87)国際公開番号 W001/023572

(87)国際公開日 平成13年4月5日(2001.4.5)

(31)優先権主張番号 60/156,745

(32)優先日 平成11年9月30日(1999.9.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/158,942

(32)優先日 平成11年10月6日(1999.10.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 キュラジェン コーポレイション  
アメリカ合衆国 コネチカット州 06511  
ニュー ハイブン ロング ウォーフ ド  
ライブ 555

(72)発明者 ブラヤーガ, スーディルダス ケイ.  
アメリカ合衆国 コネチカット 06512,  
イースト ハイブン, ミル ストリート  
140, アパートメント 18 - 136

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリヌクレオチドおよびそれらによってコードされるポリペプチド

(57)【要約】

本発明は、PTMAXポリペプチドと称される、新規なポリペプチド、ならびにPTMAXポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびPTMAXに免疫特異的に結合する抗体、あるいはPTMAXポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体の誘導体、改変体、変異体、またはフラグメントを提供する。本発明はさらに、PTMAXポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体が、広範な病理学的状態の検出および処置において使用される方法、ならびに他の用途を提供する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、以下：

a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸配列の成熟形態；

b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで、該成熟形態における任意のアミノ酸は異なるアミノ酸に変化され、ただし、該成熟形態の配列における該アミノ酸残基の15%以下がこのように変化される、改変体；

c) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸配列；

d) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、選択された配列に特定される任意のアミノ酸は異なるアミノ酸に変化され、ただし、該配列における該アミノ酸残基の15%以下がこのように変化される、改変体；および

e) a) から d) までのいずれかのフラグメント、  
からなる群から選択されるアミノ酸を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項2】 前記ポリペプチドが、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられる天然に存在する対立遺伝子改変体である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 前記改変体が、単一のヌクレオチド多型性の翻訳物である、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項4】 前記ポリペプチドが、本明細書中に記載の改変体ポリペプチドであり、ここで、選択された配列に特定される任意のアミノ酸が、保存的置換を提供するように変化される、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】 単離された核酸分子であって、以下：

a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸の成熟形態；

b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸の成熟形態の改変体であって、ここで、選択された配

列の該成熟形態における任意のアミノ酸は異なるアミノ酸に変化され、ただし、該成熟形態の配列における該アミノ酸残基の15%以下がこのように変化される、改変体；

c) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸配列；

d) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、選択された配列に特定される任意のアミノ酸は、保存的置換を提供するように変化され、ただし、該配列中のアミノ酸残基の15%以下が、このように変化される、改変体；

e) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸配列を含むポリペプチドの少なくとも一部分または該ポリペプチドの任意の改変体をコードする核酸フラグメントであって、ここで、選択された配列の任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に変化され、ただし、該配列におけるアミノ酸残基の10%以下がこのように変化される、核酸フラグメント；および

f) 該核酸分子のいずれかの相補体、  
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項6】 前記核酸分子が、天然に存在する対立遺伝子核酸改変体のヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項7】 改変体ポリペプチドをコードする請求項5に記載の核酸分子であって、ここで、改変体ポリヌクレオチドが、天然に存在するポリペプチド改変体のポリペプチド配列を有する、核酸分子。

【請求項8】 前記核酸分子が、前記改変体ポリペプチドをコードする単一のヌクレオチド多型性を含む、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項9】 前記核酸分子が、以下：

a) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19によって与えられるヌクレオチド配列；

b) ヌクレオチド配列であって、ここで、配列番号1、3、5、7、9、11

、13、15、17、および19によって与えられる該ヌクレオチド配列における1つ以上のヌクレオチドが、選択された配列によって与えられるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変化され、ただし、該ヌクレオチドの15%以下がこのように変化される、ヌクレオチド配列；

c) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19によって与えられる配列の核酸フラグメント；および

d) 核酸フラグメントであって、ここで、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19によって与えられる該ヌクレオチド配列における1つ以上のヌクレオチドが、選択された配列によって与えられるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変化され、ただし、該ヌクレオチドの15%以下がこのように変化される、核酸フラグメント、  
からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項10】 前記核酸分子が、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19によって与えられるヌクレオチド配列、または該ヌクレオチド配列の相補体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項11】 前記核酸分子が、以下：

ヌクレオチド配列であって、ここで、選択されたヌクレオチド配列のコード配列に特定される任意のヌクレオチドが、該選択された配列によって与えられるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変化され、ただし、該選択されたコード配列におけるヌクレオチドの15%以下がこのように変化された、ヌクレオチド配列；

第一のポリヌクレオチドの相補体である単離された第二のポリヌクレオチド；または

これらのいずれかのフラグメント、  
を含む、請求項5に記載の核酸分子。

【請求項12】 請求項11に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項13】 前記核酸分子に作動可能に連結されたプロモーターをさら

に含む、請求項12に記載のベクター。

【請求項14】 請求項12に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項15】 請求項1に記載のポリペプチドに免疫特異的に結合する、抗体。

【請求項16】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項17】 前記抗体がヒト化抗体である、請求項15に記載の抗体。

【請求項18】 サンプルにおける請求項1に記載のポリペプチドの存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 該サンプルを提供する工程；

b) 該サンプルを、該ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体に導入する工程；および

c) 該ポリペプチドに結合した抗体の存在または量を決定する工程、を包含し、それによって、該サンプルにおけるポリペプチドの存在または量を決定する、方法。

【請求項19】 サンプルにおける請求項5に記載の核酸分子の存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 該サンプルを提供する工程；

b) 該サンプルを、該核酸分子に結合するプローブに導入する工程；および

c) 該核酸分子に結合した該プローブの存在または量を決定する工程、を包含し、それによって、該サンプルにおける該核酸分子の存在または量を決定する、方法。

【請求項20】 請求項1に記載のポリペプチドに結合する薬剤を同定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該ポリペプチドを該薬剤に導入する工程；および

(b) 該薬剤が該ポリペプチドにするか否かを決定する工程、を包含する方法。

【請求項21】 症状の処置における使用のための潜在的な治療剤を同定するための方法であって、ここで、該症状は、請求項1に記載のポリペプチドの異

常な発現または異常な生理学的相互作用に関連し、該方法は、以下：

a) 請求項1に記載のポリペプチドを発現し、該ポリペプチドに起因する特性または機能を有する細胞を提供する工程；

b) 該細胞を候補物質を含む組成物と接触させる工程；および

c) 該物質が、該ポリペプチドに起因する該特性または機能を変化するか否かを決定する工程、

を包含し、それによって、該物質の存在下で観察される変化が、該細胞が該物質を欠く組成物と接触された場合に観察されない場合、該物質が潜在的な治療剤として同定される、方法。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法は、該ポリペプチドの活性を調節するに十分な量で、請求項1に記載のポリペプチドを発現する細胞サンプルに該ポリペプチドに結合する化合物を導入する工程を包含する、方法。

【請求項23】 請求項1に記載のポリペプチドに関連した症状を処置または予防する方法であって、該方法は、このような処置または予防が所望される被験体に、該被験体における該症状を処置または予防するに十分な量で、請求項1に記載のポリペプチドを投与する工程を包含する、方法。

【請求項24】 前記被験体がヒトである、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 請求項1に記載のポリペプチドに関連した症状を処置または予防する方法であって、該方法は、このような処置または予防が所望される被験体に、該被験体における該症状を処置または予防するに十分な量で、PTMAX核酸を投与する工程を包含する、方法。

【請求項26】 前記被験体がヒトである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 請求項1に記載のポリペプチドに関連した症状を処置または予防する方法であって、該方法は、このような処置または予防が所望される被験体に、該被験体における該症状を処置または予防するに十分な量で、PTMAX抗体を投与する工程を包含する、方法。

【請求項28】 前記被験体がヒトである、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 請求項1に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能な

キャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項30】 請求項5に記載の核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項31】 請求項15に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項32】 1つ以上の容器に、請求項29に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項33】 1つ以上の容器に、請求項30に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項34】 1つ以上の容器に、請求項31に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項35】 ヒト疾患に関連した症候群を処置するための医薬の製造における治療剤の使用であって、該疾患は、請求項1に記載のポリペプチドに関連した症状から選択され、該治療剤は、請求項1に記載のポリペプチドである、使用。

【請求項36】 ヒト疾患に関連した症候群を処置するための医薬の製造における治療剤の使用であって、該疾患は、請求項1に記載のポリペプチドに関連する症状から選択され、該治療剤は、PTMAX核酸である、使用。

【請求項37】 ヒト疾患に関連した症候群を処置するための医薬の製造における治療剤の使用であって、該疾患は、請求項1に記載のポリペプチドに関連する症状から選択され、該治療剤は、PTMAX抗体である、使用。

【請求項38】 請求項1に記載のポリペプチドの活性の調節因子または請求項1に記載のポリペプチドに関連する症状に対する潜在性もしくは素因の調節因子をスクリーニングする方法であって、該方法は、以下：

a) 請求項1に記載のポリペプチドに関連する症状について危険性の増加した試験動物に対して、試験化合物を投与する工程であって、ここで、該試験動物は、請求項1に記載のポリペプチドを組換え発現する、工程；

b) 工程(a)の該化合物を投与した後に、該試験動物における該ポリペプチドの活性の発現を測定する工程；

c) 該試験動物における該タンパク質の活性を、該ポリペプチドが投与されていないコントロール動物における該ポリペプチドの活性と比較する工程であって、ここで、該コントロール動物に対する、該試験動物における該ポリペプチドの活性の変化は、該試験化合物が、請求項1に記載のポリペプチドに関連する症状の潜在性または該症状に対する素因の調節因子であることを示す、工程、を包含する、方法。

【請求項39】 前記試験動物が、野生型試験動物と比較して、増加したレベルで、試験タンパク質導入遺伝子を発現するかまたはプロモーターの制御下で該導入遺伝子を発現する組換え試験動物であり、ここで該プロモーターは、該導入遺伝子のネイティブな遺伝子プロモーターではない、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 第一の哺乳動物被験体において、請求項1に記載のポリペプチドの変化されたレベルに関連した疾患の存在または該疾患に対する素因を決定する方法であって、該方法は、以下：

a) 該第一の哺乳動物被験体由来のサンプルにおいて該ポリペプチドの発現のレベルを測定する工程；および

b) 工程(a)の該サンプルにおける該ポリペプチドの量を、第二の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程であって、該第二の哺乳動物被験体は、該疾患を有さないか、または該疾患に対する素因がないことが知られている、工程、を包含し、ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第一の被験体における該ポリペプチドの発現レベルの変化が、該疾患の存在または該疾患に対する素因を示す、方法。

【請求項41】 第一の哺乳動物被験体において、請求項5に記載の核酸分子の変化されたレベルに関連した疾患の存在または該疾患に対する素因を決定する方法であって、該方法は、以下：

a) 該第一の哺乳動物被験体由来のサンプルにおいて該核酸の量を測定する工程；および

b) 工程(a)の該サンプルにおける該核酸の量を、第二の哺乳動物被験体由

来のコントロールサンプル中に存在する該核酸の量と比較する工程であって、該第二の哺乳動物被験体は、該疾患を有さないか、または該疾患に対する素因がないことが知られている、工程、

を包含し、ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第一の被験体における該ポリペプチドのレベルの変化が、該疾患の存在または該疾患に対する素因を示す、方法。

【請求項42】 哺乳動物における病理学的状態を処置する方法であって、該方法は、該哺乳動物に、該病理学的状態を軽減するに十分な量のポリペプチドを投与する工程を包含し、ここで該ポリペプチドが、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20によって与えられるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその生物学的に活性なフラグメントである、方法。

【請求項43】 哺乳動物における病理学的状態を処置する方法であって、該方法は、該哺乳動物に、該病理学的状態を軽減するに十分な量の請求項15に記載の抗体を投与する工程を包含する、方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、一般的に、核酸およびポリペプチドに関し、より詳細には、本発明は、胸腺および他の組織において発現されるポリヌクレオチド、ならびにこのようなポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、そしてこのポリペプチドおよびポリヌクレオチドを産生するためのベクター、宿主細胞、抗体および組換え方法に関する。

**【0002】****(発明の背景)**

本発明は、一般的に、核酸およびそれらによってコードされるポリペプチド、ならびにこれらの核酸およびポリペプチドを使用する方法に関する。

**【0003】****(発明の要旨)**

本発明は、新規なポリヌクレオチド配列の発見に一部基づく。これらのヒト核酸およびこれらによってコードされるポリペプチドは、集合的に、本明細書において、「PTMAX」と呼ばれる。

**【0004】**

従って、一つの局面において、本発明は、新規なポリペプチド、あるいはそれらのフラグメント、ホモログ、アナログまたは誘導体をコードする単離された核酸分子を提供する。この核酸は、例えば、配列番号  $2n$  のアミノ酸配列（ここで、 $n$  は、 $1 \sim 10$  の整数である）を含むポリペプチドに少なくとも  $85\%$  同一なポリペプチド、あるいはそのフラグメント、ホモログ、アナログまたは誘導体であるポリペプチドをコードする核酸配列を含み得る。この核酸は、例えば、ゲノムDNA由来の1つ以上のフラグメント、またはcDNA分子、またはRNA分子を含み得る。特定の実施形態において、核酸分子は、配列番号  $2n - 1$  のいずれかの配列を含み得、ここで、 $n$  は、 $1 \sim 10$  の整数である。これらのポリペプチドおよび核酸は、本明細書中に開示されるように、プロサイモシン (prothymosin)、オンコスタチン、または神経発育因子に関連する。

## 【0005】

本明細書中に記載される核酸の一つ以上を含むベクター、および本明細書中に記載されるベクターまたは核酸を含む細胞もまた、本発明に含まれる。

## 【0006】

本発明はまた、上記核酸分子のいずれかを含むベクターを用いて形質転換された宿主細胞に関する。

## 【0007】

別の局面において、本発明は、PTMAX核酸および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を含む。

## 【0008】

さらなる局面において、本発明は、実質的に精製されたPTMAXポリペプチド（例えば、PTMAX核酸によってコードされるPTMAXポリペプチドのいずれか、ならびにそのフラグメント、ホモログ、アナログ、および誘導体）を含む。本発明はまた、PTMAXポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を含む。

## 【0009】

なおさらなる局面において、本発明は、PTMAXポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。抗体は、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、ならびにそれらのフラグメント、ホモログ、アナログ、および誘導体であり得る。本発明はまた、PTMAX抗体および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を含む。本発明はまた、上記核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチドのエピトープに結合する単離された抗体に関する。

## 【0010】

本発明はまた、上記薬学的組成物のいずれかを含むキットを含む。

## 【0011】

本発明はさらに、PTMAX核酸（例えば、PTMAX核酸を含むベクター）を含む細胞を提供し、そしてこの核酸によってコードされるPTMAXポリペプチドを発現するのに十分な条件下で細胞を培養することによってPTMAXポリ

ペプチドを産生するための方法を提供する。次いで、発現されたPTMAXポリペプチドは、細胞から回収される。好ましくは、細胞は、ほとんどまたは全く内因性のPTMAXポリペプチドを産生しない。細胞は、例えば、原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。

#### 【0012】

本発明はまた、サンプルをPTMAXポリペプチドまたはPTMAX核酸に特異的に結合する化合物と接触させ、そして存在する場合、複合体形成を検出することによって、このサンプル中のPTMAXポリペプチドまたはPTMAX核酸を同定する方法に関する。

#### 【0013】

本発明はさらに、PTMAXポリペプチドを化合物と接触させ、PTMAXポリペプチドの活性が改変されるか否かを決定することによって、PTMAXポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法を提供する。

#### 【0014】

本発明はまた、PTMAXポリペプチドを化合物と接触させ、その化合物が、PTMAXポリペプチドの活性を改変するか、PTMAXポリペプチドに結合するか、またはPTMAXポリペプチドをコードする核酸分子に結合するか否かを決定することによって同定されるPTMAXポリペプチド活性を調節する化合物に関する。

#### 【0015】

別の局面において、本発明は、被験体のPTMAX関連障害の存在またはこの障害の素因を測定する方法を提供する。この方法は、被験体からサンプルを提供する工程、およびこの被験体サンプル中のPTMAXポリペプチドの量を測定する工程を包含する。次いで、被験体サンプル中のPTMAXポリペプチドの量を、コントロールサンプル中のPTMAXポリペプチドの量と比較する。コントロールタンパク質サンプル中のPTMAXポリペプチドの量に対する被験体のタンパク質サンプル中のPTMAXポリペプチドの量における変化は、この被験体が、免疫系における機能不全、組織増殖関連状態、または神経学的障害に関連する病理を有することを示す。コントロールサンプルは、好ましくは、対等の個体（

すなわち、年齢、性別、または他の一般的状態の類似する個体であって、免疫系における機能不全、組織増殖関連状態、または神経学的障害を有することが疑われていない個体)から取られる。あるいは、コントロールサンプルは、被験体が免疫系における機能不全、組織増殖関連状態、または神経学的障害を有すると疑われていないときのその被験体から取られ得る。いくつかの実施形態において、PTMAXポリペプチドは、PTMAX抗体を使用して検出される。

#### 【0016】

さらなる局面において、本発明は、被験体のPTMAX関連障害の存在またはこの障害の素因を決定する方法を提供する。この方法は、核酸サンプル(例えば、RNAまたはDNAまたはその両方)を被験体から提供する工程、および被験体の核酸サンプル中のPTMAX核酸の量を測定する工程を包含する。次いで、被験体核酸中のPTMAX核酸サンプルの量を、コントロールサンプル中のPTMAX核酸の量と比較する。コントロールサンプル中のPTMAXの量に対するサンプル中のPTMAX核酸の量における変化は、この被験体が免疫系における機能不全、組織増殖関連状態、または神経学的障害を有することを示す。

#### 【0017】

なおさらなる局面において、本発明は、PTMAX関連障害を処置するか予防するかまたは遅延させる方法を提供する。本方法は、このような処置または予防または遅延が望ましい被験体に、PTMAX核酸、PTMAXポリペプチド、またはPTMAX抗体を、被験体の免疫系における障害、組織増殖関連障害、または神経学的障害を処置、予防、または遅延するのに十分な量で投与する工程を包含する。

#### 【0018】

他に規定しない限り、本明細書中で使用される全ての技術的用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または等価な方法または材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料は以下に記載される。本明細書中で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の文献は、その全体が参考として援用される。矛盾する場合

には、定義を含む本明細書が優先される (control)。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみであって限定することを意図しない。

【0019】

本発明の他の特徴および他の利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなる。

【0020】

(発明の詳細な説明)

本発明は、新規なヌクレオチドおよびそれによってコードされるポリペプチドを提供する。10個の新規な核酸配列およびそれらのコードされるポリペプチドが本発明に含まれる。それらの配列は、集合的に「PTMAX核酸」または「PTMAXポリヌクレオチド」と呼ばれ、そして対応するコードされるポリペプチドは、「PTMAXポリペプチド」または「PTMAXタンパク質」と呼ばれる。例えば、本発明に従うPTMAX核酸は、PTMAX核酸を含む核酸であり、そして本発明に従うPTMAXポリペプチドは、PTMAXのアミノ酸配列を含むポリペプチドである。他に示されない場合、「PTMAX」は、本明細書中に開示された新規な配列のいずれかをいうことを意味する。

【0021】

表1は、PTMAX核酸およびそれらがコードするポリペプチドの要約を提供する。

【0022】

表1のカラム1(「PTMAX番号」と表題が与えられる)は、本発明に従う核酸に割り当てられたPTMAX数を示す。

【0023】

表1のカラム2(「クローン識別番号」と表題が与えられる)は、示されたPTMAXの第2の識別番号を提供する。

【0024】

表1のカラム3(「クローンの起源の組織」と表題が与えられる)は、示されるPTMAX核酸が発現される組織を示す。

【0025】

表1のカラム4～9は、示されるPTMAX核酸およびポリペプチドについて示されるような構造的情報を記載する。

【0026】

表1のカラム10（「タンパク質類似性」と表題が与えられる）は、示されるPTMAXによってコードされるポリペプチドに関連する以前に記載されたタンパク質を列挙する。以前に記載されたタンパク質についてのGenbank識別番号が提供される。これらは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>から検索され得る。

【0027】

表1のカラム11（「単一のペプチド切断部位」と表題が与えられる）は、シグナルペプチドがSignalPによって決定されるように切断される推定のヌクレオチド位置を示す。

【0028】

表1のカラム12（「細胞局在」と表題が与えられる）は、示されるPTMAXポリペプチドの推定の細胞局在を示す。

【0029】

【表1】

表 1.

PTMAX 種別	アミノ酸 識別 番号	アミノ酸 起原の 組織	アミノ酸 残長	アミノ酸 残数 (nt)	分子量	アミノ酸 種類 対比	アミノ酸 切断部位 (nt)	細胞局在
1	AC009485_A	Genomic	327	1-327	11909.9	Pnr:REMTREMBL- ACC:G190372, human prothymosin alpha pseudogene;Pnr:SPTRE MBL-ACC:Q15249, human prothymosin alpha	None	Cytoplasm
2	AC010175_A.0.1	Genomic, placenta, spleen	555	1-342	12389.2	ACC:AAA36485, human prothymosin-alpha pseudogene;	None	Cytoplasm
3	AC010175_A.9.5	Genomic, placenta, spleen	675	55-397	12481.4	REMTREMBL- ACC:AAA36485, human prothymosin-alpha pseudogene	None	Nucleus

表1の続き

4	AC009533_A	Genomic	345	1-342	114	12390.2	Ptmr:REMTREMBL-ACC:G190372, human prothymosin alpha pseudogene;Ptmr:SPTREMBL-ACC:Q15249, human prothymosin alpha	None	Cytoplasm
5	AL121585_A	Genomic	501	134-460	109	12005.8	ACC:g625274, prothymosin alpha - human; ACC:g135833, prothymosin alpha - bovine	None	Cytoplasm
6	AC010175	Genomic	342	1-342	114	12389.2	Human prothymosin alpha	None	Cytoplasm
7	AC010784-1	Genomic	324	1-324	108	11680.7	Oncostatin A (Platelet Factor 4 precursor)	Betw. Residues 40 and 41: AEA-EE	plasma membrane
8	AL049825	Genomic	738	13-735	241	26958.5	Nerve Growth Factor		Extracellular or lysosome (lumen)
9	AL121585_da1	Genomic	345	10-339	110	12071.8	Prothymosin alpha	None	Cytoplasm
10	AL121585_da2	Genomic	350	10-348	113	12348.2	Prothymosin alpha	None	Cytoplasm

表2は、割り当てられたPTMAX番号、クローン識別番号および配列識別番号(配列番号(SEQ ID NO))に対する相互参照を提供する。

【0030】

【表2】

表 2.

PTMAX 番号	クローン 識別番号	配列 番号 核酸	配列番号 ポリペプチド
1	AC009485_A	1	2
2	AC010175_A.0.1	3	4
3	AC010175_A.9.5	5	6
4	AC009533_A	7	8
5	AL121585_A	9	10
6	AC010175	11	12
7	AC010784-1	13	14
8	AL049825	15	16
9	AL121585_da1	17	18
10	AL121585_da2	19	20

本発明に従う、PTMAX核酸およびそれらがコードするポリペプチドは、種々の用途および内容において有用である。本発明に従う種々のPTMAX核酸およびポリペプチドは、先に記載されたタンパク質に対するドメインおよび配列の関連性の存在に従って、特にタンパク質ファミリーの新規なメンバーとして有用である。

【0031】

例えば、PTMA1~6、9および10核酸ならびにそれらをコードするポリペプチドは、タンパク質のプロサイモシンファミリーに属するタンパク質の特

徴である構造的モチーフを含む。プロサイモシン は、免疫調節活性、造血活性、および抗新生物活性を有する胸腺ホルモンである。特に、プロサイモシン は、サイモシン と同じ量および質の生物学的活性を有する；すなわち、免疫不全疾患、免疫抑制癌患者の処置のため、および免疫抑制患者における日和見感染を予防するために効力を有する。従って、本発明に従うPTMA 1～6、9および10核酸およびポリペプチド、抗体および関連化合物は、種々の癌および免疫不全障害（例えば、AIDS、自己免疫疾患、例えば、エリテマトーデスおよび慢性関節リウマチ）において関連した治療的適用において有用である。

#### 【0032】

28アミノ酸残基を含むペプチド（サイモシン - - 1と呼ばれる）は、本来、ウシサイモシン画分5から単離され、そしてインビトロの試験系およびインビボの試験系において別々に免疫機能の種々の局面を回復することが示された。サイモシン - - 1は、胸腺によって産生されるいくつかのホルモンまたはホルモン様物質の1つであり、ポリペプチド前駆体から誘導される。1984年において、Haritosらは、新鮮なラット胸腺から113アミノ酸を含む大量のポリペプチド前駆体（プロサイモシン - と呼ばれる）（これは、そのNH<sub>2</sub>末端においてサイモシン - - 1配列を含む）を単離した。

#### 【0033】

サイモシン - - 1は、続いて、ヒト胸腺から類似の画分から単離され、そしてウシサイモシン - - 1として同じアミノ酸配列を有することが報告された。ヒト胸腺から単離されたプロサイモシン は、サイモシン 1、サイモシン 11、および他のフラグメントがサイモシン画分5の単離の間に生成されるネイティブなポリペプチドを表すようである。ヒトプロサイモシン は、109～114アミノ酸残基のポリペプチドであり、そしてそのアミノ末端に全サイモシン 1配列を含む。ペプチドは、胸腺依存性のリンパ球の制御、分化および機能に関与し、日和見感染に対して被験体動物の保護において、重量基準でサイモシン と少なくとも同じ程度に強力であるようである。

#### 【0034】

一般的に、本発明のプロキモシン 様タンパク質は、サイモシン と比較可能

な量および質の生物学的活性を有すると考えられている。予想投薬量範囲は、おそらく約1～100：g/kg/日である。遺伝子治療適用に使用される本発明の核酸の投薬量は、このタンパク質に関して示される投薬量よりも、おそらくより低く、そして投与はおそらくより少ない頻度である。

#### 【0035】

ヒト末梢血単球は、培養上清中にプロキモシン 放出サイモシン 1を用いてインキュベートされる。加えて、総RNAは増加することが見出される。サイモシン 1の産生は、その放出動力学ならびにアクチノアイシンDおよびシクロヘキシミドによるその合成阻害によって示されるように、新規タンパク質合成を含む。サイモシン 1放出は、おそらくHLA-DRと関連して、T細胞集団の増殖を刺激する。

#### 【0036】

Eckertら(Int J Immunopharmacol 1997 Sep-Oct; 19(9-10): 493-500)は、腫瘍患者由来の単核細胞に対してプロキモシン 1を用いて、前臨床研究を実行した。彼らは、健康なコントロールと比較した場合の、癌患者における黒色腫および直腸結腸癌のリンパ球および単球指向された抗腫瘍反応に対する、胸腺タンパク質、プロキモシン 1(Pro 1)の免疫調節能力を研究した。平均して、彼らは、健康なコントロールよりも、腫瘍患者がより低いNK細胞およびLAK細胞の活性を示し、腫瘍標的細胞へのより低い接着能力と関連していることを見出した。腫瘍患者のNK細胞活性は、腫瘍段階に逆比例的に関連した。Pro 1は、疾患の初期段階においてのみ健康を害した患者のLAK細胞活性を刺激した。Pro 1効果は、腫瘍標的細胞へのリンパ球の増加した接着ならびに欠損IFN- $\gamma$ およびIL-2分泌の増加した分泌と関連した。フローサイトメトリーによって、Eckertらは、IL-2と組み合わせたpro 1が、NK細胞マーカーのCD56、CD16/56およびCD25ならびにCD18/1Ia接着分子発現を増加することを見出した。腫瘍患者からの単球は、健康なコントロールと比較して、混乱した抗腫瘍性(turnoristatic)活性を示した。Pro 1は、単独またはrIFN- $\gamma$ と組み合わせて適用された場合、抗腫瘍

活性の平均値を上昇した。IFN の存在下、Pro 1は、培養腫瘍細胞への単球の接着を、主に漸増するCD54発現によって刺激した。Pro 1は、単独またはIFN との組み合わせで、単球によるTNF およびIL-1分泌を刺激し、そして高いPGE2およびTGF レベルを特に試験患者群において減少した。

#### 【0037】

さらに、プロキモシン は、抗ウイルス剤および化学療法剤の効果を増強することが示された。従って、本発明のPTMA 1~6、9および10の核酸、ポリペプチド、抗体および関連化合物は、C型肝炎のようなウイルス疾患ならびに種々の悪性腫瘍を処置するための使用され得る。さらに、プロキモシン は、新生物形成性に形質転換された細胞の生成物として検出されている。本発明に従うPTMA 1~6、9および10の核酸、およびポリペプチド、抗体および関連化合物は、癌に関する診断マーカーとして治療適用および診断適用を有し得る。以下の実施例2に記載されるような組織発現分析は、種々の癌（例えば、黒色腫、結腸癌および乳癌）における高い発現のPTMAX核酸を示し、これは、これらの癌に関する診断マーカーとしてかこれらの癌の処置においてかのいずれかでの、PTMAX核酸およびポリペプチドの潜在的な治療適用を示唆する。

#### 【0038】

PTMA 7の核酸およびコード化ポリペプチドは、オンコスタチンタンパク質ファミリーに属するタンパク質に特徴的である構造モチーフを含む。オンコスタチンは、血管拡張CXCサイトカインである。新脈管形成は、胚形成、創傷修復および女性の生殖周期における重要な正常な生理学的プロセスである。しかし、病理学的プロセスとして、これは、慢性炎症、線維増殖性障害および腫瘍形成において中心的な役割を果たす。従って、本発明に従うPTMA 7核酸およびポリペプチド、抗体および関連化合物は、種々の癌、冠状動脈疾患、関節炎および糖尿病性網膜症に関連する治療適用において有用である。さらに、オンコスタチンは、アポトーシスのインヒビターとして関連付けられている。従って、本発明のPTMA 7の核酸、ポリペプチド、抗体および関連化合物は、自己免疫疾患（例えば、エリテマトーデスおよび慢性関節リウマチ）、免疫不全障害（例えば、A

I D S )、および癌(例えば、黒色腫、頸部癌およびパーキットリンパ腫)を処置するために使用され得る。

【0039】

P T M A 8の核酸およびコード化ポリペプチドは、神経成長因子のタンパク質ファミリーに属するタンパク質の特徴である構造モチーフを含む。ニューロトロフィン(例えば、神経成長因子)は、ニューロンの成長、分化および維持に不可欠な役割を果たす。従って、本発明に従うP T M A 8の核酸、およびポリペプチド、抗体ならびに関連化合物は、種々の神経学的疾患(例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症および精神医学障害)に関連する治療適用に有用である。さらに、神経成長因子は、神経免疫相互作用に役割を有することが示されている。従って、本発明のP T M A 8の核酸、ポリペプチド、抗体および関連化合物は、炎症疾患(例えば、角結膜炎および喘息)を処置するため、ならびに組織リモデリングを調節するために使用され得る。

【0040】

本発明に従うP T M A X核酸およびP T M A Xポリペプチドのさらなる使用は、本明細書中に開示される。

【0041】

(1. P T M A - 1)

本発明に従うP T M A - 1核酸およびポリペプチドは、クローンA C 0 0 9 4 8 5 \_\_Aの核酸配列およびコード化ポリペプチド配列を含む。

【0042】

この核酸配列は、327ヌクレオチド長であり(配列番号1)、このヌクレオチド1~327(配列番号1)は、109アミノ酸のポリペプチド(配列番号2)をコードするオープンリーディングフレームを規定する。

【0043】

このA C 0 0 9 4 8 5 \_\_A核酸は、以下の配列:

【0044】

【化1】

ATGTCAGATGCAGCTGTAGACACCAGCTCTGAAATCATTGCCAAGGACTTAAAGG  
 AGAAGAAGGAAGTTGTGAAAGAGGCGGAAAATGGAAGAGACGCCCTGCTAACG  
 GGAATGCTAATGAGGAAAATGGGGAGCAGGAGGCTGACAAGGAGGTAGATGAAG  
 AAGGGGAAGAAAGTGGGGAGGAAGAGGAGGAGGAAAAAGAAGGTGATGGTGAG  
 GAAGAGGATGGAGATGAAGAGGAAGCTGAGTCTGCTACAGGCAAGCGGGCAGCT  
 GAAGATGATGAGGATGATGATGTCGATACCAAGAAGCAGAAGACCGACAAGGAT  
 GAC (配列番号1)

を有する。

【0045】

クローンAC009485\_\_Aによってコードされるポリペプチドは、以下の配列：

【0046】

【化2】

MSDAAVDTSSIIAKDLKEKKEVVKEAENGRDAPANGNANEENGEQEADKEVDEEG  
 EESGEEEEEEKEGDGEEEDGDEEEAESATGKRAAEDDEDDVDTKKQKTDKDD  
 (配列番号2)

を有する。

【0047】

PTMA-1の算出された分子量は、11909.9ダルトンである。クローンAC009485\_\_Aは、BLASTプログラムを用いて配列データベースの検索に供された。例えば、本発明のこのアミノ酸配列は、109のアミノ酸残基を有するヒトプロキモシン (登録番号ptnr:SP TREMBL-ACC:Q15249 PROTHYMOSIN ALPHA (PROT-ALPHA)-HOMO SAPIENS) に対して同一である109残基のうちの100残基(91%)、またはこれに対して陽性である109残基のうちの103残基(94%)を有することが、見出された。

【0048】

実施例2B(以下に記載)は、クローンAC009485\_\_Aが胸腺組織に非常に発現されることを示し、これは、胸腺ホルモンとしてのその同定と一致する

。

## 【0049】

(2.PTMA-2)

本発明に従うPTMA-2の核酸およびポリペプチドは、AC010175\_\_A.0.1の核酸配列およびコード化ポリペプチド配列を含む。

## 【0050】

この核酸配列は、555ヌクレオチド長であり(配列番号3)、このヌクレオチド1~342(配列番号3)は、114アミノ酸のポリペプチド(配列番号4)をコードするオープンリーディングフレームを規定する。

## 【0051】

このAC010175\_\_A.0.1核酸は、以下の配列：

## 【0052】

## 【化3】

```

ATGTCAGACGCAGCCGTAGACACCAGCTCCGAAATCACCACCGAGGACTTAAAGG
AGAAGAAGGAAGTTGTGGAAGAGGCGGAAAATGGAAGAGACGCCCTGCTCACG
GGAATGCTAATGAGGAAAATGGGGAGCCGGAGGCTGACAACGAGGTAGATGAAG
AAGAGGAAGAAGGTGGGGAGGAAGAAGGTGATGGTGAGGAAGAGGATGGAGAT
GAAGATGAGGGAGCTGAGTCAGCTACGGGCAAGCGGGCAGCTGAAGATGATGAG
GATAACGATGTCGATACCCAGAAGCAGAAGACCGACGAGGATGACCAGACGGCA
AAAAAGGAAAAGTTAAACTAAAAAAAAGGCCGCCGTGACCTATTCACCCTCCAC
TTCCCGTCTCAGAATCTAAACGTGGTCACTTCGAGTAGAGGGGCCCGCCCGCCC
ACCGTGGGCAGTGCCACCCGCAGATGACACGCGCTCTCCACCACCCAACCCAAAC
CATGAGAATTTGCAACAGGGGAGGGGAAAAGAACCAAACTTCCAAGGCCCTGC
TTTTTTTTTTT(配列番号3)

```

を有する。

## 【0053】

クローンAC010175\_\_A.0.1によってコードされるポリペプチドは、以下の配列：

## 【0054】

## 【化4】

MSDAAVDTSSSEITTEDLKEKKEVVEEAENGRDAPAHGNANEENGEPEADNEVDEEEE  
 EGGEEEGDGEEEDGDEDEGAESATGKRAAEDDEDNDVDTQKQKTDEDDQTAKKEKL  
 N(配列番号4)

を有する。

【0055】

推定タンパク質の算出された分子量は、12389.2ダルトンである。クローンAC010175\_\_A.0.1は、BLASTプログラムを用いて配列データベースの検索に供された。例えば、本発明のこのアミノ酸配列は、117のアミノ酸残基を有するヒトプロキモシン 偽遺伝子(登録番号ACC:AAA36485 HUMAN PROTHYMOSIN-ALPHA PSEUDOGENE-HOMO SAPIENS)に対して同一である117残基のうちの112残基(95%)、またはこれに対して陽性である117残基のうちの113残基(96%)を有することが、見出された。

【0056】

(3.PTMA-3)

本発明に従うPTMA-3の核酸およびポリペプチドは、AC010175\_\_A.9.5の核酸配列およびコード化ポリペプチド配列を含む。

【0057】

この核酸配列は、675ヌクレオチド長であり(配列番号5)、このヌクレオチド55~397(配列番号5)は、114アミノ酸のポリペプチド(配列番号6)をコードするオープンリーディングフレームを規定する。

【0058】

このAC010175\_\_A.9.5核酸は、以下の配列:

【0059】

【化5】

TGAACTCTCGCTTTCTTTTTAATCCCCTGCATCGGATCACCGGCGTGCCCCACCAT  
 GTCAGACGCAGCCGTAGACACCAGCTCCGAAATCACCAACAAGGACTTAAAGGA  
 GAAGAAGGAAGTTGTGGAAGAGGCAGAAAATGGAAGAGACGCCCTGCTAACGG  
 GAATGCTAATGAGGAAAATGGGGAGCAGGAGGCTGACAATGAGGTAGACGAAGA  
 AGAGGAAGAAGGTGGGGAGGAAGAAGGTGATGGTGAGGAAGAGGATGGAGATG  
 AAGATGAGGAAGCTGAGTCAGCTACGGGCAAGCGGGCAGCTGAAGATGATGAGG  
 ATAACGATGTCGATACCAAGAAGCAGAAGACCGACGAGGATGACCAGACGGCAA  
 AAAAGGAAAAGTTAAACTAAAAAAAAAAAAAGGCCCGCTGACCTATTCACCCTC  
 CACTTCCCGTCTCAGAATCTAAACGTGGTCACCTTCGAGTAGAGAGGCCCGCCCG  
 CCCACCGTGGGCAGTGCCACCCGCAGATGACACGCGCTCTCCACCACCCAACCCA  
 AACCATGAGAATTTGCAACAGGGGAGGAAAAAGAACCAAACTTCCAAGGCCT  
 GCTTTTTTCTTAAAAGTACTTTAAAAGGAAATTTGTTTGTATTTTTATTCCAT  
 TTTATATTTTTGTACATATTG (配列番号5)

を有する。

【0060】

クローンAC010175\_\_A.9.5によってコードされるポリペプチドは、以下の配列：

【0061】

【化6】

MSDAAVDTSSEITNKDLKEKKEVVEEAENGRDAPANGNANEENGEQEADNEVDEBE  
 EEGEEEEGDGEEEDGDEDEEAESATGKRAAEDDEDNDVDTKKQKTDEDDQTAKKEK  
 LN (配列番号6)

を有する。

【0062】

このタンパク質の算出された分子量は、12481.4ダルトンである。クローンAC010175\_\_A.9.5は、BLASTプログラムを用いて配列データベースの検索に供された。例えば、本発明のこのアミノ酸配列は、117のアミノ酸残基を有するヒトプロキモシン 偽遺伝子 (登録番号remtreml-ACC:AAA36485 HUMAN PROTHYMOSIN-ALPH

A PSEUDOGENE - HOMO SAPIENS) に対して同一である 117 残基のうち 106 残基 (90%)、またはこれに対して陽性である 117 残基のうち 110 残基 (94%) を有することが、見出された。

## 【0063】

(4. PTMA - 4)

本発明に従う PTMA - 4 の核酸およびポリペプチドは、AC009533\_\_A の核酸配列およびコード化ポリペプチド配列を含む。

## 【0064】

この核酸配列は、345 ヌクレオチド長であり (配列番号 7)、このヌクレオチド 1 ~ 342 (配列番号 7) は、114 アミノ酸のポリペプチド (配列番号 8) をコードするオープンリーディングフレームを規定する。

## 【0065】

この AC009533\_\_A 核酸は、以下の配列：

## 【0066】

## 【化 7】

```
atgtcagacgcagccgtagacaccagctccgaaatcaccaccgaggactaaaggagaagaaggaagtgtggaagagggcggaaaa
lggaagagacgccctgctcacgggaatgctaagaggaaaatggggagccggaggctgacaacgaggtagatgaagaagaggaa
gaaggaggaggagaagaaggtgatggtgaggaagaggatggagatgaagatgagggagctgagtcagctacgggcaagcgggca
gctgaagatgatgaggatgacgatgctgataccagaagcagaagaccgacgaggatgaccagacagcaaaaaggaaaagttaa
ctaa (配列番号 7)
```

を有する。

## 【0067】

クローン AC009533\_\_A によってコードされるポリペプチドは、以下の配列：

## 【0068】

## 【化 8】

MSDAAVDTSSEITTEDLKEKKEVVEEAENGRDAPAHGNANEENGEPEADNEVDDEEEE  
 EGEEEEGDGEEEDGDEDEGAESATGKRAAEDDEDDVDVTQKQKTDEDDQTAKKEKL  
 N(配列番号8)

を有する。

【0069】

このタンパク質の算出された分子量は、12390.2ダルトンである。クローンAC009533\_\_Aは、BLASTプログラムを用いて配列データベースの検索に供された。例えば、この核酸配列は、ヒトプロキモシン 遺伝子(クローンpHG4)(GENBANK-ID:HUMPROC/acc:L21695)に同一である322塩基のうちの282塩基(87%)を有することが見出された。例えば、本発明のアミノ酸配列は、ヒトプロキモシン 偽遺伝子(登録番号ptnr:REMTREMBL-ACC:G190372)に対して同一である117残基のうちの111残基(94%)、またはこれに対して陽性である117残基のうちの113残基(96%)を有すること;あるいは、ヒトプロキモシン(登録番号ptnr:SPTREMBL-ACC:Q15249)に関する配列に対して同一である109残基のうちの99残基(90%)、またはこれに対して陽性である109残基のうちの102残基(93%)を有することが、見出された。現在記載されたタンパク質の主要な識別は、同定された関連配列と比較して、63位より後の、4つの連続するグルタミン酸残基の続きが欠失することである。

【0070】

実施例2C(以下に記載)は、クローンAC009533\_\_Aは、胸腺組織で非常に発現されることを示し、これは、胸腺ホルモンとしての同定と一致する。

【0071】

(5.PTMA-5)

本発明に従うPTMA-5の核酸およびポリペプチドは、AL121585\_\_Aの核酸配列およびコード化ポリペプチド配列を含む。

【0072】

この核酸配列は、501ヌクレオチド長であり（配列番号9）、このヌクレオチド134～460（配列番号9）は、109アミノ酸のポリペプチド（配列番号10）をコードするオープンリーディングフレームを規定する。本発明に従うPTMA-6ヌクレオチド配列はまた、クローンAL121585\_\_Aに存在する。この配列は、ヒト第20番染色体に局在する。

## 【0073】

このAL121585\_\_A核酸は、以下の配列：

## 【0074】

## 【化9】

ATTGTTCCCTTGTCCCGGCTCCTTGCTCGCCGCAGCCGCCTTTACCGCTGCGGACTCC  
GGACACTTCATCACCACAGTCCCTGAACTCTCGCTTTCTTTTAATCCCCTGCATCG  
GATCACTGGTGTGCCGGACCATGTCAGACGCAGCCGTAGACACCAGCTCCGAAAT  
 CACCACCAAGGACTTAAAGAAGAAGGAAGCTGTGGAGGAAGCGGAAAATGGAAG  
 AGACACCCCTGCTAATGGGAAGGCTAATGAGGAAAATGGGGAGCAGGAAGCTGA  
 CAATGAAGTAGATGAAGAAGAGGAAGAAGGTGGGGAGGAAGACGAGGAGGAAG  
 AAGAAGGCGATGGTGAGGAAGAGGATGGTGATGAAGACGAGGAAGCTGAGTCCG  
 CTACGGTCAAGCGGGCAGCTGAAGATGATGAGAATGATGATGCCTATACCAAGAA  
  
 GCAGAAGACCAACAAGGATGACTAGACAGCAAAAAAGGAAATGTTAGGAGGGTG  
ACCTATTCA (配列番号9)

を有する。

## 【0075】

クローンAL121585\_\_Aによってコードされるポリペプチドは、以下の配列：

## 【0076】

## 【化10】

MSDAAYDTSSEITTKDLKKKEAVEEAENGRDTPANGKANEENGEQADNEVDEEEEE  
 GGEDEEEEEEGDGEEDGDEDEEAESATVKRAAEDDENDDAYTKKQKTNKDD  
 (配列番号10)

を有する。

【0077】

このタンパク質の算出された分子量は、12005.8ダルトンである。クローンAL121585\_\_Aは、BLASTプログラムを用いて配列データベースの検索に供された。例えば、本発明のこのヌクレオチド配列は、ヒトプロキモシン 偽遺伝子(登録番号gb:GENBANK-ID:HUMPROAD/acc:J04800 HUMAN PROTHYMOSIN-ALPHA PSEUDOGENE-HOMO SAPIENS)に対して同一である501塩基のうちの496塩基(99%)、またはこれに対して陽性である501塩基のうちの496塩基(99%)を有することが見出された。例えば、本発明のアミノ酸配列は、ヒトプロキモシン(登録番号ptnr:PIR-ID:TNHUA PROTHYMOSIN-ALPHA-HUMAN)に対して同一である110残基のうちの99残基(90%)、またはこれに対して陽性である110残基のうちの103残基(93%)を有することが見出された。

【0078】

(6.PTMA-6)

本発明に従うPTMA-6の核酸およびポリペプチドは、クローンAC010175の核酸配列およびコード化ポリペプチド配列を含む。

【0079】

この核酸配列は、342ヌクレオチド長であり(配列番号11)、このヌクレオチド1~342(配列番号11)は、114アミノ酸のポリペプチド(配列番号12)をコードするオープンリーディングフレームを規定する。

【0080】

AC010175の核酸およびコード化ポリペプチドは、以下の配列:

【0081】

【化11】

1 ATGTCAGACGCAGCCGTAGACACCAGCTCCGAAATCACCACCGAG  
     MetSerAspAlaAlaValAspThrSerSerGluIleThrThrGlu  
 46 GACTTAAAGGAGAAGAAGGAAGTTGTGGAAGAGGCGGAAAATGGA  
     AspLeuLysGluLysLysGluValValGluGluAlaGluAsnGly  
 91 AGAGACGCCCTGCTCACGGGAATGCTAATGAGGAAAATGGGGAG  
     ArgAspAlaProAlaHisGlyAsnAlaAsnGluGluAsnGlyGlu  
 136 CCGGAGGCTGACAACGAGGTAGATGAAGAAGAGGAAGAAGGTGGG  
     ProGluAlaAspAsnGluValAspGluGluGluGluGlyGly  
 181 GAGGAAGAAGGTGATGGTGAGGAAGAGGATGGAGATGAAGATGAG  
     GluGluGluGlyAspGlyGluGluGluAspGlyAspGluAspGlu  
 226 GGAGCTGAGTCAGCTACGGGCAAGCGGGCAGCTGAAGATGATGAG  
     GlyAlaGluSerAlaThrGlyLysArgAlaAlaGluAspAspGlu  
 271 GATAACGATGTCGATACCCAGAAGCAGAAGACCGACGAGGATGAC  
     AspAsnAspValAspThrGlnLysGlnLysThrAspGluAspAsp  
 316 CAGACGGCAAAAAAGGAAAAGTTAAAC (配列番号11)  
     GlnThrAlaLysLysGluLysLeuAsn (配列番号12)

を有する。

【0082】

このタンパク質の算出された分子量は、12389.2ダルトンである。クローンAC010175は、BLASTプログラムを用いて配列データベースの検索に供された。例えば、本発明のこのアミノ酸配列は、例えば、米国特許第4,659,694号および同第4,716,148号に開示されるヒトプロキモシンに関するヒトプロキモシン a配列に対して同一である109残基のうちの98残基(89%)、またはこれに対して陽性である109残基のうちの102残基(93%)を有することが見出された。

【0083】

実施例2A(以下に記載)は、クローンAC010175は、胸腺組織で高度に発現されることを示し、これは、胸腺ホルモンとしての同定と一致する。

**【0084】**

(7. PTMA - 7)

本発明に従うPTMA - 7の核酸およびポリペプチドは、クローンAC010784 - 1の核酸配列およびコード化ポリペプチド配列を含む。

**【0085】**

この核酸配列は、324ヌクレオチド長であり(配列番号13)、このヌクレオチド1~324(配列番号13)は、108アミノ酸のポリペプチド(配列番号14)をコードするオープンリーディングフレームを規定する。

**【0086】**

このAC010784 - 1の核酸およびコード化ポリペプチドは、以下の配列  
:

**【0087】**

**【化12】**

1 ATGAGCTCCGCCAGCCGGGTTTTGCGCCTTCAGGCCCCCGGGTTG  
     MetSerSerAlaSerArgValLeuArgLeuGlnAlaProGlyLeu  
 46 GTGTTCTGGGGTTGGTGCTCCTTCCCTCCCCTCGTCCTCTCTT  
     ValPheLeuGlyLeuValLeuLeuSerLeuProSerSerSerLeu  
 91 ACCCTCTCCATTTCCCCCTCAGCTGAAGCTGAAGAAGATGGGGAC  
     ThrLeuSerIleSerProSerAlaGluAlaGluGluAspGlyAsp  
 136 CTGCAGTGCCTGTGTGTGAAGACCACCTCCCAGGTCCGTCACAGG  
     LeuGlnCysLeuCysValLysThrThrSerGlnValArgProArg  
 181 CACATCACCAGCCTGGAGGTGATCAAGGCCGGACCCCACTGCCCC  
     HisIleThrSerLeuGluValIleLysAlaGlyProHisCysPro  
 226 ACTGCCCAACTGATGGCCACGCTGAAGAATGGAAGGAAAATTTGC  
     ThrAlaGlnLeuMetAlaThrLeuLysAsnGlyArgLysIleCys  
 271 TTGGACCTGCAAGCCCCGCTGTACAAGAAAAGGATTAAGAACTT  
     LeuAspLeuGlnAlaProLeuTyrLysLysArgIleLysLysLeu  
 316 TTGAAGAGT (配列番号13)  
     LeuLysSer (配列番号14)

を有する。

【0088】

このタンパク質の算出された分子量は、11680.7ダルトンである。クローンAC010784-1は、BLASTプログラムを用いて配列データベースの検索に供された。例えば、本発明のこのアミノ酸配列は、血小板因子4(PF-4)(オンコスタチンA)の配列に対して同一である108残基のうちの84残基(77%)、またはこれに対して陽性である108残基のうちの93残基(86%)を有することが見出された。このような関連核酸およびタンパク質は、例えば、Poncz, M., Surrey, S., LaRocco, P., We

iss, M. J.、Rappaport, E. F.、Conway, T. M.およびSchwartz, E. (Blood 69(1)219-223(1987))、ならびに米国特許第5,656,724号に開示される。

【0089】

本発明の新規オンコスタチン様ポリペプチドは、ヒトの体内の種々の細胞および組織が応答する、新規増殖調節因子として作用し得る。従って本発明は、潜在的な治療適用において有用であり、オンコスタチンA様ポリペプチドをコードするcDNAは、遺伝子治療に有用であり得、そしてオンコスタチンA様ポリペプチドは、その必要がある被験体へ投与される場合有用であり得る。本発明のオンコスタチンA様ポリペプチドをコードするこの新規核酸およびそのポリペプチド、またはこれらのフラグメントは、診断適用にさらに有用であり得、ここで、この核酸またはポリペプチドの存在または量が、評価される。これらの物質は、治療方法または診断方法において本発明の新規物質へ免疫特異的に結合する抗体を産生する際に、さらに有用である。

【0090】

(8.PTMA-8)

本発明に従うPTMA-8の核酸およびポリペプチドは、クローンAL049825の核酸配列およびコード化ポリペプチド配列を含む。

【0091】

この核酸配列は、738ヌクレオチド長であり(配列番号15)、このヌクレオチド13~735(配列番号15)は、241アミノ酸のポリペプチド(配列番号16)をコードするオープンリーディングフレームを規定する。

【0092】

このAL049825の核酸およびコード化ポリペプチド配列は、以下の配列：  
：

【0093】

【化13】

1 GTGCATAGCGTAATGTCCATGTTGTTCTACACTCTGATCACAGCT  
MetSerMetLeuPheTyrThrLeuIleThrAla

46 TTTCTGATCGGCATACAGGCGGAACCACACTCAGAGAGCAATGTC  
PheLeuIleGlyIleGlnAlaGluProHisSerGluSerAsnVal

91 CCTGCAGGACACACCATCCCCAAGCCCCTGGACTAAACTTCAG  
ProAlaGlyHisThrIleProGlnAlaHisTrpThrLysLeuGln

136 CATTCCCTTGACACTGCCCTTCGCAGAGCCCGCAGCGCCCCGGCA  
HisSerLeuAspThrAlaLeuArgArgAlaArgSerAlaProAla

181 GCGGCGATAGCTGCACGCGTGGCGGGGCAGACCCGCAACATTACT  
AlaAlaIleAlaAlaArgValAlaGlyGlnThrArgAsnIleThr

226 GTGGACCCAGGCTGTTTAAAAAGCGGCGACTCCGTTACCCCGT  
ValAspProArgLeuPheLysLysArgArgLeuArgSerProArg

271 GTGCTGTTTAGCACCCAGCCTCCCCGTGAAGCTGCAGACACTCAG  
ValLeuPheSerThrGlnProProArgGluAlaAlaAspThrGln

316 GATCTGGACTTCGAGGTCGGTGGTGCTGCCCCCTTCAACAGGACT  
AspLeuAspPheGluValGlyGlyAlaAlaProPheAsnArgThr

361 CACAGGAGCAAGCGGTCATCATCCCATCCCATCTTCCACAGGGGC  
HisArgSerLysArgSerSerSerHisProIlePheHisArgGly

406 GAATTCTCGGTGTGTGACAGTGTGACGCGTGTGGGTTGGGGATAAG  
GluPheSerValCysAspSerValSerValTrpValGlyAspLys

[化13]の続き

451 ACCACCGCCACAGACATCAAGGGCAAGGAGGTGATGGTGTGGGA

ThrThrAlaThrAspIleLysGlyLysGluValMetValLeuGly

496 GAGGTGAACATTAACAACAGTGTATTCAAACAGTACTTTTTTGAG

GluValAsnIleAsnAsnSerValPheLysGlnTyrPhePheGlu

541 ACCAAGTGCCGGGACCCAAATCCCGTTGACAGCGGGTGCCGGGGC

ThrLysCysArgAspProAsnProValAspSerGlyCysArgGly

586 ATTGACTCAAAGCACTGGAACACTCATATTGTACCACGACTCACACC

IleAspSerLysHisTrpAsnSerTyrCysThrThrThrHisThr

631 TTTGTCAAGGCGCTGACCATGGATGGCAAGCAGGCTGCCTGGCGG

PheValLysAlaLeuThrMetAspGlyLysGlnAlaAlaTrpArg

676 TTTATCCGGATAGATACGGCCTGTGTGTGTGTGCTCAGCAGGAAG

PheIleArgIleAspThrAlaCysValCysValLeuSerArgLys

721 GCTGTGAGAAGAGCCTGA (配列番号 15)

AlaValArgArgAla (配列番号 16)

を有する。

【0094】

このタンパク質の算出された分子量は、26958.5ダルトンである。クローンAL049825は、BLASTプログラムを用いて配列データベースの検索に供された。例えば、本発明のこのアミノ酸配列は、ヒト - 神経成長因子前駆体 (SWISSPROT - ACC: P01138) に関する241残基の配列に対して類似する241残基のうちの240残基 (99.5%) を有することが、見出された。

【0095】

このヒト - 神経成長因子前駆体様核酸およびポリペプチドは、PCT公開W

WO 98 2 1 2 3 4 中の核酸およびポリペプチドにもまた類似する。本発明のタンパク質は、35位にアラニンを含み、これは、この位置にバリンを表すこの開示されたタンパク質と異なる。WO 98 2 1 2 3 4 に従って、このポリペプチドのプロセッシング領域は、残基1～残基121にひろがる。従って、本発明の改変体は、不適切なプロセッシングまたは不正確なプロセッシングから生じ得る病理学的状態に関係し得る。これが生じる場合、1つの細胞内コンパートメントから別のコンパートメントまたは外部培地へのタンパク質分泌、あるいは神経成長因子鎖の成熟ドメインのフォールディングのいずれかが、不都合に影響され得る。従って、本発明の改変体に特徴的なヌクレオチド配列およびペプチド配列またはタンパク質配列は、診断スクリーニング方法における使用、ならびに神経学的障害を処置する方法における使用、ならびに改変体遺伝子および/またはその遺伝子産物の発生と関連した任意の病理学的状態を克服する治療剤に関するスクリーニングにおける使用を見出す。

【0096】

(9 . PTMA - 9 )

本発明に従うPTMA - 9核酸およびポリペプチドは、クローンAL121585\_\_da1の核酸およびコードされたポリペプチド配列を含む。

【0097】

核酸配列は、345ヌクレオチド長(配列番号17)であり、このうちヌクレオチド10～339(配列番号17)は、110アミノ酸(配列番号18)のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを規定する。

【0098】

AL121585\_\_da1核酸は以下の配列を有する：

TGCCGGACCATGTCAGACGACGCGTAGACACCCAGC  
TCCGAAATCACCAACCAAGGACTTAAAGGAGAAGAAG  
GAAGTTGTGGAAGAGGCGAGAAAATGGAAGAGACGCC  
CCTGCTAACGGGAATGCTAATGAGGAAAATGGGGAG  
CAGGAGGCTGACAATGAGGTAGACGAAGAAGAGGAA  
GAAGGTGGGGAGGAAGAGGAGGAGGAAGAAGAAGGT

GATGGTGAGGAAGAGGATGGAGATGAAGATGAGGAA  
 GCTGAGTCAGCTACGGGCAAGCGGGCAGCTGAAGAT  
 GATGAGGATGACGATGTCGATACCAAGAAGCAGAAAG  
 ACCAACAAAGGATGACTAGACA (配列番号17)。

【0099】

AL121585 da1ポリペプチドは、以下の配列を有する(一文字のアミノ酸コードを使用する)：

MSDAAVDTSSEITTKDLKEKKEVVEEAENGRDAPAN  
 GNANEENGEQEADNEVDEEEEEEGGEEEEEEEEEGDGE  
 EEDGDEDEEAESATGKRAAEDDEDVDTKKQKTNK  
 DD (配列番号18)。

【0100】

このタンパク質の計算された分子量は、12071.8ダルトンである。クローンAC010175は、BLASTプログラムを使用して配列データベースの検索にかけられた。例えば、本発明のアミノ酸配列は、ヒトプロチモシン(prothymosin) (PIR ID: TNHUA) と同一の110個の残基のうち108個(98%)を有するか、またはこれに対して陽性な110個の残基全て(100%)を有することが見出された。

【0101】

(10.PTMA-10)

本発明に従うPTMA-10核酸およびポリペプチドは、クローンAL121585\_\_da2の核酸およびコードされたポリペプチド核酸を含む。

【0102】

核酸配列は、350ヌクレオチド長であり(配列番号19)、このうちヌクレオチド10~348(配列番号19)は、113アミノ酸(配列番号20)のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを規定する。

【0103】

AL121585\_\_da2核酸は、以下の配列を有する：

TGCCGGACCATGTCAGACGCAGCCGTACACACCACC

TCCGAAATCACCAACCAAGGACTTAAAGGAGAAGAAG  
GAAGTTGTGGAAGAGGCGAGAAAATGGAAGAGACGCC  
CCTGCTAACGGGAATGCTAATGAGGAAAATGGGGAG  
CAGGAGGCTGACAATGAGGTAGACCAAGAAGAGGAA  
GAAGGTGGGGAGGAAGAGGAGGAGGAAGAAGAAGGT  
GATGGTGAGGAAGAGGATGGAGATGAAGATGAGGAA  
GCTGAGTCACCTACGGGCAACCGGGCAGCTGAAGAT  
GATGAGGATGACGATGTCAATACCAAGGAAGGCGGA  
AGGACCAACCAAGGGATGACTAGACA (配列番号19)。

【0104】

AL121585 \_\_da2ポリペプチドは、以下の配列を有する(一文字のアミノ酸コードを使用する)：

MSDAAVHTTSEITTKDLKEKKEVVEEAENGRDAPAN  
GNANEENGEQEADNEVDQEEEEEGEEEEEEEEEGDGE  
EEDGDEDEEAESPTGNRAAEDDEDVNTKEGGRTN  
QGMTR (配列番号20)。

【0105】

このタンパク質の計算された分子量は、12348.2ダルトンである。クローンAL121585 \_\_da2は、BLASTプログラムを使用して配列データベースの検索にかけられた。例えば、本発明のアミノ酸配列は、110残基のヒトプロチモシン (PIR ID: TNHUA) と同一の103個の残基のうち96個(93%)を有するか、またはこれに対して陽性な1039個の残基のうち100個(97%)を有することが見出された。

【0106】

(PTMAX核酸)

本発明の1つの局面は、PTMAXポリペプチドまたはそれらの生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子に関する。また、PTMAXをコードする核酸(例えば、PTMAX mRNA)を同定するためにハイブリダイゼーションプローブとして使用するための十分な核酸フラグメントおよびPTMAX

核酸分子の増幅または変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーとして使用するためのフラグメントも含まれる。本明細書において使用されるように、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチドアナログを使用して産生されるDNAまたはRNAのアナログ、ならびにそれらの誘導體、フラグメントおよびホモログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは、二本鎖DNAである。

#### 【0107】

「プローブ」とは、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、使用に依存して、少なくとも約10ヌクレオチド（nt）、100nt、または例えば、約6,000ntほどの大きさの間である。プローブは、同一、類似または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長いプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から入手され、非常に特異的であり、そしてオリゴマーよりもはるかに遅くハイブリダイズする。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得、そしてPCR、メンブレンベースのハイブリダイゼーション技術またはELISAのような技術において特異性を有するように設計される。

#### 【0108】

「単離された」核酸分子は、この核酸の天然の供給源中に存在するその他の核酸分子から分離されているものである。好ましくは、「単離された」核酸は、この核酸が由来する生物のゲノムDNA中でこの核酸に天然に隣接する配列（すなわち、この核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態で、単離されたPTMAX核酸分子は、この核酸が由来する細胞のゲノムDNA中でこの核酸に天然で隣接する、約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、または0.1kb未満のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技術により産生される場合、その他の細胞物質または培養培地を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、化学物質前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。

#### 【0109】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の相補体は、標準的な分子生物学的技法および本明細書で提供される配列情報を用いて単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の核酸の全部または一部を使用して、PTMAX分子は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニング技術(例えば、Sambrookら(編)、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, NY、1989; およびAusubelら、(編)、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993)を用いて単離され得る。

#### 【0110】

本発明の核酸は、標準的なPCR増幅技法に従って、テンプレートとしてcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され、そしてDNA配列分析により特徴付けられ得る。さらに、PTMAXヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術、例えば、自動化DNA合成機を用いることにより調製され得る。

#### 【0111】

本明細書で用いられる用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、PCR反応で用いられ得る十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づき得るか、またはそれから設計され得、そして特定の細胞もしくは組織において、同一、類似もしくは相補的DNAまたはRNAを増幅し、確認し、もしくはその存在を示すために用いられる。オリゴヌクレオチドは、約10nt、50nt、または100ntの長さ、好ましくは約15nt~30ntの長さを有する核酸配列の部分を含む。1つの実施形態では、10

0 ntより少ない長さの核酸分子を含むオリゴヌクレオチドは、さらに、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の少なくとも6個連続するヌクレオチド、またはその相補体を含む。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得、そしてプローブとして用いられ得る。

#### 【0112】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示されるヌクレオチド配列またはこのヌクレオチド配列の一部（例えば、プローブもしくはプライマーとして使用され得るフラグメント、またはPTMAXの生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）の相補体である核酸分子を含む。配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示されるヌクレオチド配列に十分相補的である核酸分子であり、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示される核酸配列に対しミスマッチがほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二本鎖を形成する。

#### 【0113】

本明細書で用いる用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位間のWatson-CrickまたはHoogsteen塩基対形成をいい、そして用語「結合」は、2つのポリペプチドまたは化合物または関連ポリペプチドまたは化合物またはその組合せ間の物理的または化学的相互作用を意味する。結合は、イオン性、非イオン性、ファンデルワールス性、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用は直接的であるかまたは間接的であり得る。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物を介するか、またはその効果に起因し得る。直接的結合は、別のポリペプチドもしくは化合物を介して、またはその効果に起因して生じない、その他の実質的な化学的中間体がない相互作用をいう。

#### 【0114】

本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6の（連続する）核酸または少なくとも4の（連続する）アミノ酸として規定され、それぞれ、核酸の場

合特異的ハイブリダイゼーションを、またはアミノ酸の場合エピトープの特異的認識を可能にするに十分な長さであり、そして多くとも完全長配列より少ない特定の部分である。フラグメントは、選択される核酸またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。誘導体は、直接的であるかまたは部分的置換によるかのいずれかでネイティブな化合物から形成される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、ネイティブな化合物と類似ではあるが、同一ではなく、特定の成分または側鎖に関してそれとは異なる構造を有する核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成によるか、または異なる進化的起源に由来し得、そして野生型と比較して類似であるかまたは反対の代謝活性を有し得る。ホモログは、異なる種由来である特定の遺伝子の核酸配列またはアミノ酸配列である。

#### 【0115】

誘導体またはアナログが、以下に記載のように、改変された核酸またはアミノ酸を含む場合、誘導体およびアナログは、完全長であるかまたは完全長以外であり得る。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、種々の実施形態で、本発明の核酸またはタンパク質に、同じサイズの核酸またはアミノ酸配列に対して、またはアラインメントが当該分野で公知のコンピューター相同性プログラム（例えば以下を参照のこと）によりなされるアラインされた配列に比較するとき、少なくとも約30%、50%、70%、80%、または95%同一性（80-95%同一性が好適である）で実質的に相同である領域を含む分子であるか、またはそのコードする核酸配列が、前記のタンパク質をコードする配列の相補物に、ストリンジェントな条件下、中程度にストリンジェントな条件下、または低いストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る分子を含むが、これらに限定される訳ではない。例えば、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993、および以下を参照のこと。

#### 【0116】

「相同な核酸配列」もしくは「相同なアミノ酸配列」、またはその改変体とは

、上記で考察したように、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおける相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同なヌクレオチド配列は、PTMAXポリペプチドのアイソフォームをコードする配列をコードする。アイソフォームは、例えば、RNAの選択的スプライシングの結果として、同一の生物の異なる組織において発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、相同なヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（哺乳動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられ得る）のPTMAXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同なヌクレオチド配列はまた、天然に生じる対立遺伝子改変体および本明細書に記載されるヌクレオチド配列の変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、相同的ヌクレオチド配列は、ヒトPTMAXタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない。相同核酸配列は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）、およびPTMAX活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。PTMAXタンパク質の生物学的活性は以下に記載されている。相同的アミノ酸配列は、ヒトPTMAXポリペプチドのアミノ酸配列をコードしない。

#### 【0117】

PTMAXポリペプチドは、PTMAX核酸のオープンリーディングフレーム（「ORF」）によってコードされる。本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の核酸配列のストレッチを含む核酸配列を含み、これは、そのアミノ酸配列のORFを含み、そして配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20のポリペプチドをコードする。

#### 【0118】

「オープンリーディングフレーム」（「ORF」）は、潜在的にポリペプチドに翻訳され得るヌクレオチドに対応する。ORFを含む核酸のストレッチは、終止コドンにより中断されない。完全タンパク質のコード配列を示すORFは、ATG「開始」コドンで始まり、そして3つの停止コドン、すなわち、TAA、TAG、またはTGAの1つで停止する。本発明の目的には、ORFは、開始コドン

、ストップコドン、またはその両方をともなうか、またはそれらのないコード配列の任意の部分であり得る。真実の細胞タンパク質をコードするための良好な候補として考慮されるべきORFには、最小サイズの要求（例えば、50アミノ酸またはそれ以上のタンパク質をコードするDNAのストレッチ）がしばしば設定される。

#### 【0119】

ヒトPTMAX遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織由来）におけるPTMAXホモログ、ならびに他の哺乳動物由来のPTMAXホモログを同定および/またはクローニングする際の使用のために設計されるプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ/プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいは配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の天然に存在する変異体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

#### 【0120】

ヒトPTMAXヌクレオチド配列に基づくプローブは、同じまたは相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用され得る。種々の実施形態において、このプローブはさらに、プローブに付着した標識基を含み、例えば、この標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、PTMAXタンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のPTMAXをコードする核酸のレベルを測定すること（例えば、PTMAX mRNAレベルを検出すること、またはゲノムPTMAX遺伝子に変異しているかまたは欠失しているか否かを決定すること）によって使

用され得る。

【0121】

「PTMAXの生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、本発明のポリペプチドの活性に類似するが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいい、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような成熟形態を含む。「PTMAXの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、PTMAXの生物学的活性（PTMAXタンパク質の生物学的活性は、以下に記載される）を有するポリペプチドをコードする、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の一部を単離し、PTMAXタンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてPTMAXのコードされた部分の活性を評価することによって調製され得る。

【0122】

（PTMAXの改変体）

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示されるヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含する。それにより、これらの核酸は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じPTMAXタンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0123】

配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19に示されるヒトPTMAXヌクレオチド配列に加えて、PTMAXのアミノ酸配列における変化を導くDNA配列多型は、集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることが、当業者によって理解される。PTMAX遺伝子中のこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、P

PTMAXタンパク質、好ましくは哺乳動物のPTMAXタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のバリエーションは、代表的には、PTMAX遺伝子のヌクレオチド配列において1～5%の変動性を生じ得る。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、そしてPTMAXの機能的活性を変化させない、PTMAX内の任意および全てのこのようなヌクレオチドのバリエーションならびに得られるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であると意図される。

#### 【0124】

さらに、他の種由来のPTMAXタンパク質をコードし、従って、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明のPTMAXのcDNAの天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、本明細書中に開示されるヒトPTMAX核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジントハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとしてヒトcDNAまたはその一部を用いて単離され得る。例えば、可溶性ヒトPTMAX cDNAは、ヒトの膜結合PTMAXに対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜結合ヒトPTMAX cDNAは、可溶性ヒトPTMAXに対するその相同性に基づいて単離され得る。

#### 【0125】

従って、別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも6ヌクレオチド長であり、そしてストリンジント条件下で配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも10、25、50、100、250、500、750、1000、1500、または2000以上のヌクレオチド長である。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、互いに少なくとも60%相同なヌクレオチド配列が代表的に

は互いにハイブリダイズしたままである条件を記載することを意図する。

【0126】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のPTMAXタンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（paralogs））は、特定のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。

【0127】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHで、特定の配列の熱融解点（ $T_m$ ）より約5℃低いように選択される。この $T_m$ は、標的配列に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする（規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度下）温度である。標的配列は一般に過剰で存在するので、 $T_m$ では、50%のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジェントな条件は、pH7.0~8.3で、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオンより少なく、代表的には約0.01~1.0Mナトリウムイオン（またはその他の塩）、そして温度が短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド（例えば、10nt~50nt）について少なくとも約30℃、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについて少なくとも約60℃であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

【0128】

ストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そしてAusubelら（編）、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.

3.1-6.3.6に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%または約99%相同な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500mg/ml変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液中での65でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションに、0.2×SSC、0.01% BSA中での50での1回以上の洗浄が続く。ストリンジェント条件下で配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する(例えば、天然のタンパク質をコードする)ヌクレオチド配列を有する、RNA分子またはDNA分子をいう。

#### 【0129】

第2の実施形態では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、55での6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100mg/ml変性サケ精子DNA中でのハイブリダイゼーション、続いて1×SSC、0.1% SDS中での37での1回以上の洗浄である。用いられ得る中程度のストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYおよびKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NYを参照のこと。

#### 【0130】

第3の実施形態では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100mg/mlの変性サケ精子DNA、10% (重量/容量) デキストラン硫酸中での40 でのハイブリダイゼーション、続いて2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDS中での50 での1回以上の洗浄である。用いられ得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である(例えば、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように)。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYならびにKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; ShiloおよびWeinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78:6789-6792を参照のこと。

#### 【0131】

(保存的変異)

集団中に存在し得る、PTMAX配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、PTMAXタンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされるPTMAXタンパク質のアミノ酸配列に変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を有意に変更するこ

となく、PTMAXの野生型配列から、変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のPTMAXタンパク質の間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される。保存的置換が行われ得るためのアミノ酸は、当該分野で公知である。

#### 【0132】

本発明の別の局面は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、PTMAXタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなPTMAXタンパク質は、アミノ酸配列が、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18および20とは異なるが、生物学的活性をなお保持する。1つの実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、それぞれ、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20のアミノ酸配列に少なくとも約45%の相同性であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、この核酸分子によってコードされるタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に少なくとも約60%相同性であり、より好ましくは配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に少なくとも約80%相同性であり、さらにより好ましくは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に少なくとも約90%相同性であり、そして最も好ましくは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に少なくとも約95%相同性である。

#### 【0133】

配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20のタンパク質に相同なPTMAXタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20のヌクレオチド配列に1以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失を導入することにより作製され得、その結果、1以上のアミノ酸の置換、付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入される。

#### 【0134】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発）

によって配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アルパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。従って、PTMAX中の推定された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、PTMAXコード配列の全てまたは一部に沿って（例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって）ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、PTMAXの生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20の変異誘発に続いて、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そしてこのタンパク質の活性が決定され得る。

#### 【0135】

1つの実施形態では、変異PTMAXタンパク質は、以下についてアッセイされ得る：（1）他のPTMAXタンパク質、他の細胞表面タンパク質、または生物学的に活性なそれらの部分と、タンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、（2）変異PTMAXタンパク質と、PTMAXリガンドとの間の複合体形成；（3）変異PTMAXタンパク質が細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力；（例えば、アビジンタンパク質）。

## 【0136】

## (アンチセンス)

本発明の別の局面は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズし得るかまたは相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である(例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である)ヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、少なくとも約10、約25、約50、約100、約250もしくは約500ヌクレオチドまたは全体のPTMAXコード鎖、またはそれらの一部のみに相補的な配列を含む、アンチセンス核酸分子が提供される。配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20のPTMAXタンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、または配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19のPTMAXの核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

## 【0137】

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、PTMAXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含む、ヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、PTMAXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する、アミノ酸に翻訳されない、5'配列および3'配列をいう(すなわち、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域ともいわれる)。

## 【0138】

本明細書中に開示されるPTMAXをコードするコード鎖配列を考慮すれば、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickまたはHoogsteenの塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、PTMAX mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、

PTMAX mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、PTMAX mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45または約50ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学的合成または酵素連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、またはこの分子の生物学的安定性を増大させるように、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるように設計された種々に改変されたヌクレオチドを用いて化学的に合成され得る（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る）。

#### 【0139】

アンチセンス核酸を作製するために用いられ得る改変されたヌクレオチドの例としては以下が挙げられる：5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 $\beta$  - D - ガラクトシルクエオシン (galactosylqueosine)、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 $\beta$  - D - マンノシルクエオシン (mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2

- チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6 - ジアミノプリン。あるいは、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下の小節にさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である)。

#### 【0140】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果それらは、PTMAXタンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれに結合し、それによってこのタンパク質の発現を、例えば転写および/または翻訳を阻害することによって阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によってか、または例えばDNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんのメジャーグループ(major groove)における特異的相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身に投与される。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。これは、例えば、そのアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによる。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なpol IIプロモーターまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が、好ましい。

#### 【0141】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、 $\beta$ -アノマー核酸分子である。 $\beta$ -アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する。ここで、通常の $\beta$ -ユニットとは対照的に、鎖は、互いに平行に走行する(Gaultierら(1987)Nucleic Acids Res 15:6625~6641)。このアンチセンス核酸分子はまた、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoueら、(1987)Nucleic Acids Res 15:6131~6148)またはキメラRNA-DNAアナログ(Inoueら(1987)FEBS Lett 215:327~330)を含み得る。

#### 【0142】

(リボザイムおよびPNA成分)

核酸改変は、非制限的な例として、改変された塩基、および糖リン酸骨格が改変または誘導体化されている核酸を含む。これらの改変は、少なくとも一部分、改変された核酸の化学的安定性を、それらが、例えば、被験体における治療的適用にアンチセンス結合性核酸として用いられ得るように増大するために実施される。

#### 【0143】

1つの実施形態では、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それらに対してリボザイムが相補的領域を有する一本鎖核酸、例えばmRNAを切断し得るリボヌクレアーゼ活性をもつ触媒的RNA分子である。従って、リボザイム(例えば、ハンマーヘッドリボザイム(HaselhofおよびGerlach(1988)Nature 334:585-591に記載されている))は、PTMAX mRNA転写物を触媒的に切断し、それによってPTMAX mRNAの翻訳を阻害するために用いられ得る。PTMAXをコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示のPTMAX cDNAのヌクレオチド配列(すなわち、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、または19)に基づいて設計され得る。例えば、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が、PTMAXをコードするmRNAにおいて切断されるべきヌクレオチド配列に相補

のであるように構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、PTMAX mRNAは、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒的RNAを選択するために用いられ得る。例えば、Bartelら(1993) Science 261:1411-1418を参照のこと。

#### 【0144】

あるいは、PTMAX遺伝子発現は、PTMAXの調節領域(例えば、PTMAXプロモーターおよび/またはエンハンサー)に相補的であるヌクレオチド配列を標的化し、標的細胞中のPTMAX遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。一般に、Helene(1991) Anticancer Drug Des. 6:569-84; Heleneら(1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; およびMaher(1992) Bioassays 14:807-15を参照のこと。

#### 【0145】

種々の実施形態では、PTMAXの核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変してペプチド核酸を生成し得る(Hyrupら(1996) Bioorg Med Chem 4:5-23を参照のこと)。本明細書で用いられる場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格がプソイドペプチド(pseudopeptide)骨格で置換され、かつ4つの天然のヌクレオ塩基のみが保持されている、核酸模倣物、例えば、DNA模倣物をいう。PNAの中性の骨格は、低イオン強度条件下で、DNAおよびRNAへの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrupら(1996) 上述; Perry-O'Keefeら(1996) PNAS 93:14670-675に記載のような、標準的な固相ペプチド合成プロトコールを用いて実施され得る。

#### 【0146】

PTMAXのPNAは、治療適用および診断適用で用いられ得る。例えば、PNAは、例えば、転写または翻訳抑止 (arrest) を誘導すること、または複製を阻害することにより、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンス剤またはアンチ遺伝子剤として用いられ得る。PTMAXのPNAはまた、例えば、PNA指向PCRクランピングによる、例えば、遺伝子中の1塩基対変異の分析に；他の酵素、例えば、S1ヌクレアーゼと組み合わせて用いる場合、人工の制限酵素として (Hyrup B. (1966) 上述)；またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプローブまたはプライマーとして (Hyrupら (1966) 上述；Perry-O'Keefe (1996) 上述) 用いられ得る。

#### 【0147】

別の実施形態では、PTMAXのPNAは、例えば、それらの安定性または細胞性の取り込みを増大するために、PNAに親油性基またはその他の補助基を結合することによるか、PNA-DNAキメラの形成によるか、またはリボソームの使用もしくは当該分野で公知の薬物送達のその他の技法によって改変され得る。例えば、PNAとDNAの有利な性質を組み合わせ得る、PTMAXのPNA-DNAキメラが生成され得る。このようなキメラは、PNA部分の高い結合親和性および特異性を提供しながら、DNA部分と相互作用するために、DNA認識酵素、例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼを可能にする。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、ヌクレオ塩基間の結合の数、および配向の点から選択された適切な長さのリンカーを用いて連結され得る (Hyrup (1996) 上述)。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup (1966) 上述およびFinnら (1996) Nucl Acids Res 24:3357-63に記載のように実施され得る。例えば、DNA鎖を、標準的なホルホルアミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成し得、そして改変ヌクレオシドアナログ、例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホルアミダイトを、PNAとDNAの5'末端との間に用い得る (Magら (1989) Nucl Acid Res 17:5973-88)。次いで、PNAモノマーを段階的様式でカップリングし、5'PNAセ

グメントと3' DNAセグメントをもつキメラ分子を生成する (Finnら (1996) 上述)。あるいは、キメラ分子は、5' DNAセグメントと3' PNAセグメントを有して合成され得る。Petersenら (1975) *Bioorg Med Chem Lett* 5:1119-11124を参照のこと。

【0148】

その他の実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、ペプチド (例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的にするため)、または細胞膜を横切る輸送を容易にする薬剤 (例えば、Letsingerら、1989、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6553-6556; Lemaitreら、1987、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:648-652; PCT公開公報番号WO88/09810を参照のこと) もしくは血液脳関門を横切る輸送を容易にする薬剤 (例えば、PCT公開公報番号WO89/10134を参照のこと) のような他の付属基を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーショントリガー切断剤 (例えば、Krolら、1988、*BioTechniques* 6:958-976を参照のこと) またはインターカーレーティング剤 (例えば、Zon、1988、*Pharm. Res.* 5:539-549を参照のこと) を用いて改変され得る。この目的のために、このオリゴヌクレオチドは、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーショントリガー架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーショントリガー切断剤などの他の分子に連結され得る。

【0149】

(PTMAXポリペプチド)

本発明のポリペプチドは、その配列が配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20によって提供されるPTMAXポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。本発明はまた、なおそのPTMAX活性および生理学的機能を維持するタンパク質、またはその機能的フラグメントをコードしながら、その任意の残基が配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20に示される対応する残基から変化し得る、変異体または改変体タンパク質を含む。この変異体または改変体タンパク質において、20%

までまたはそれ以上の残基がそのように変化し得る。

#### 【0150】

一般に、PTMAX様機能を保持するPTMAX改変体は、配列中の特定位置の残基が他のアミノ酸により置換され、そしてさらに、親タンパク質の2つの残基間にさらなる残基(単数または複数)を挿入する可能性、および親配列から1つ以上の残基を欠失する可能性を含む任意の改変体を含む。任意のアミノ酸置換、挿入または欠失は、本発明に包含される。好適な状況では、この置換は、上記で規定されるような保存的置換である。

#### 【0151】

本発明の1つの局面は、単離されたPTMAXタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに関する。抗PTMAX抗体を惹起するための免疫原としての使用に適するポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態では、ネイティブPTMAXタンパク質が、標準的なタンパク質精製技法を用いる適切な精製スキームにより、細胞供給源または組織供給源から単離され得る。別の実施形態では、PTMAXタンパク質は、組換えDNA技法により生産される。組換え発現の代替として、PTMAXタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技法を用いて化学的に合成され得る。

#### 【0152】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドまたはタンパク質または生物学的に活性なその部分は、PTMAXタンパク質が由来する細胞供給源または組織供給源からの細胞性物質またはその他の夾雑タンパク質を実質的に含まないが、化学的に合成された場合、化学的前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、PTMAXタンパク質が、単離されるかまたは組換えにより産生された細胞の細胞成分から分離されているこのタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態では、用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、非PTMAXタンパク質(本明細書ではまた「汚染タンパク質」と呼ばれる)が約30%(乾燥重量による)より少ない、より好ましくは約20%より少ない非PTMAXタンパク質、なおより好ましくは約10%よ

り少ない非PTMAXタンパク質、そして最も好ましくは約5%より少ない非PTMAXタンパク質を有する、PTMAXタンパク質の調製物を含む。このPTMAXタンパク質または生物学的に活性なその部分が組換えにより産生される場合、培養培地を実質的に含まないこともまた好ましい。すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の容量の約20%より少ないか、より好ましくは約10%より少ないか、そして最も好ましくは約5%より少ない。

#### 【0153】

用語「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質の合成に関与する化学的前駆体またはその他の化学物質からこのタンパク質が分離されているPTMAXタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態では、用語「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない」は、化学的前駆体または非PTMAX化学物質を約30%（乾燥重量による）より少なく、より好ましくは化学的前駆体または非PTMAX化学物質を約20%より少なく、なおより好ましくは化学的前駆体または非PTMAX化学物質を約10%より少なく、そして最も好ましくは化学的前駆体または非PTMAX化学物質を約5%より少なく有するPTMAXタンパク質の調製物を含む。

#### 【0154】

PTMAXタンパク質の生物学的に活性な部分は、完全長のPTMAXタンパク質より少ないアミノ酸配列を含み、そしてPTMAXタンパク質の少なくとも1つの活性を示す、PTMAXタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20に示されるアミノ酸配列）に十分に相同であるか、またはそれに由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、PTMAXタンパク質の少なくとも1つの活性をともなうドメインまたはモチーフを含む。PTMAXタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100またはそれ以上のアミノ酸の長さのポリペプチドであり得る。

#### 【0155】

さらに、このタンパク質のその他の領域が欠失したその他の生物学的に活性な部分が、組換え技法により調製され、ネイティブなPTMAXタンパク質の1つ

以上の機能的活性について評価され得る。

#### 【0156】

ある実施形態では、このPTMAXタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態では、このPTMAXタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20に実質的に相同であり、そして以下に詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子変動または変異誘発に起因してアミノ酸配列がなお異なるが、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20のタンパク質の機能的活性を保持する。従って、別の実施形態では、このPTMAXタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20のアミノ酸配列に少なくとも約45%相同であるアミノ酸配列を含み、そして配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20のPTMAXタンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

#### 【0157】

(2つ以上の配列間の相同性の決定)

2つのアミノ酸配列の相同性または2つの核酸の相同性のパーセントを決定するために、これらの配列を、最適な比較の目的にアラインする(例えば、第2のアミノ酸配列または核酸配列との最適アラインメントのために第1のアミノ酸配列または核酸配列の配列中にギャップを導入し得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、この分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書で用いられる場合、アミノ酸「相同性」または核酸「相同性」は、アミノ酸「相同性」または核酸「同一性」と等価である)。

#### 【0158】

核酸配列相同性は、2つの配列間の同一性の程度として決定され得る。この相同性は、GCGプログラムパッケージで提供されるGAPソフトウェアのような当該分野で公知のコンピュータープログラムを用いて決定され得る。Need1

emanおよびWunsch 1970 J Mol Biol 48:443-453を参照のこと。GCG GAPソフトウェアを使用して核酸配列比較のために以下の設定を用い：5.0のGAP作成ペナルティーおよび0.3のGAP伸長ペナルティー、上記で言及した類似の核酸配列のコード領域は、好ましくは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、または19に示されたDNA配列のCDS（すなわちコードする）部分と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の同一性の程度を示す。

#### 【0159】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、比較の特定の領域にわたって残基対残基の基本に基づいて同一である程度をいう。用語「配列同一性のパーセント」は、その比較の領域にわたり最適にアラインされた配列を比較すること、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合、A、T、C、G、U、またはI）が生じる位置の数を決定し、一致した位置の数を生成すること、比較領域中の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）によって一致した位置の数を除すること、およびこの結果に100を乗じ配列同一性のパーセントを得ることにより算出される。本明細書で用いられる場合、用語「実質的に同一」は、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここで、このポリヌクレオチドは、比較領域にわたって参照配列と比較した場合、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の配列同一性そしてしばしば90～95%の配列同一性、より通常は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

#### 【0160】

（キメラおよび融合タンパク質）

本発明はまた、PTMAXキメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書で使用される場合、PTMAX「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非PTMAXポリペプチドと作動可能に連結されたPTMAXポリペプチドを含む。「PTMAXポリペプチド」は、PTMAXに相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、一方、「非PTMAXポリペプチド」は、このPT

MAXタンパク質に実質的に相同ではないタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう(例えば、PTMAXタンパク質とは異なり、しかも同一かまたは異なる生物に由来するタンパク質)。PTMAX融合タンパク質の中で、PTMAXポリペプチドは、PTMAXタンパク質のすべてか、またはその一部分に対応する。1つの実施形態では、PTMAX融合タンパク質は、PTMAXタンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。なお別の実施形態では、PTMAX融合タンパク質は、PTMAXタンパク質の少なくとも3つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結される」は、PTMAXポリペプチドおよび非PTMAXポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すことを意図する。非PTMAXポリペプチドは、PTMAXポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

#### 【0161】

1つの実施形態では、この融合タンパク質は、GST-PTMAX融合タンパク質であり、ここでPTMAX配列が、GST(すなわち、グルタチオンS-トランスフェラーゼ)配列のC末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換えPTMAXの精製を容易にし得る。

#### 【0162】

別の実施形態では、この融合タンパク質は、そのN末端に異質シグナル配列を含むPTMAXタンパク質である。例えば、ネイティブなPTMA-7シグナル配列(すなわち、配列番号14のほぼアミノ酸1~40)を除去し得、そして別のタンパク質からのシグナル配列で置き換え得る。特定の宿主細胞では(例えば、哺乳動物宿主細胞)、PTMAXの発現および/または分泌は、異質シグナル配列の使用を通じて増大され得る。

#### 【0163】

なお別の実施形態では、この融合タンパク質は、PTMAX-免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここでPTMAX配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合される。本発明のこのPTMAX-免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に組み込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でPTMAXリガントとPTMAXタンパク質との間

の相互作用を阻害し、それによってインビボのPTMAX媒介信号伝達を抑制し得る。このPTMAX-免疫グロブリン融合タンパク質を用い、PTMAX同族リガンドの生体利用性に影響を与え得る。PTMAXリガンド/PTMAX相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害の両方の処置、ならびに細胞生存の調節（例えば、促進または阻害）に、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのPTMAX-免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗PTMAX抗体を産生するための免疫原として用いられ得、PTMAXリガンドを精製し、そしてPTMAXリガンドとのPTMAXの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。

#### 【0164】

本発明のPTMAXキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着(stagger)末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて粘着(cohesive)末端のフィルイン、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を採用することにより、インフレームで一緒に連結する。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅を、次いでアニールおよび再増幅され得る、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて、キメラ遺伝子配列を生成するために実施し得る（例えば、Ausbelら（編）CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。PTMAXをコードする核酸は、この融合部分がPTMAXタンパク質にインフレーム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

#### 【0165】

（PTMAXアゴニストおよびアンタゴニスト）

本発明はまた、PTMAXアゴニスト（模倣物）またはPTMAXアンタゴニストのいずれかとして機能するPTMAXタンパク質の改変体に関する。PTMAXタンパク質の改変体、例えば、PTMAXタンパク質の離散した点変異または短縮型が、変異誘発により生成され得る。PTMAXタンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態のPTMAXタンパク質と実質的に同じ生物学的活性、またはその生物学的活性のサブセットを保持し得る。PTMAXタンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態のPTMAXタンパク質の1つ以上の活性を、例えば、PTMAXタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流メンバーまたは上流メンバーに競合的に結合することにより阻害され得る。従って、特異的生物学的効果が、限られた機能の改変体を用いた処理により惹起され得る。1つの実施形態では、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、PTMAXタンパク質の天然に存在する形態を用いた処置に関する被験体におけるより少ない副作用を有する。

#### 【0166】

PTMAXアゴニスト（模倣物）またはPTMAXアンタゴニストのいずれかとして機能するPTMAXタンパク質の改変体は、PTMAXタンパク質アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性についてのPTMAXタンパク質の変異体、例えば短縮型変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。1つの実施形態では、PTMAX改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。PTMAX改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的なPTMAX配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にPTMAX配列のセットを含む（例えば、ファージディスプレイのための）より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、遺伝子配列中に酵素的に連結することにより産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なPTMAX改変体のライブラリーを産生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機中で実施され得、次いでこの合成

遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なPTMAX配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給量を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で公知である(例えば、Narang(1983)Tetrahedron 39:3; Itakuraら(1984)Annu Rev Biochem 53:323; Itakuraら(1984)Science 198:1056; Ikeら(1983)Nucl Acid Res 11:477を参照のこと)。

#### 【0167】

(ポリペプチドライブラリー)

さらに、PTMAXタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、PTMAXタンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続き選択のためのPTMAXフラグメントの多彩な集団を生成し得る。1つの実施形態では、コード配列フラグメントのライブラリーは、PTMAXコード配列の二本鎖PCRフラグメントを、1分子あたり約1つのみのニックが生じる条件下において、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成するためにこのDNAを再生すること、S1ヌクレアーゼを用いた処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成し得る。この方法により、PTMAXタンパク質の種々のサイズのN末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが派生し得る。

#### 【0168】

点変異または短縮により作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、選択された性質を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該分野で公知である。このような技法を、PTMAXタンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に

適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、および所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下でこのコンビナトリアル遺伝子を発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセブル変異誘発 (REM) を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、PTMAX 改変体を同定し得る (Arkin および Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave ら (1993) Protein Engineering 6:327-331)。

【0169】

(抗PTMAX抗体)

本発明は、本発明の任意のポリペプチドに免疫特異的に結合する、 $F_{ab}$  または  $(F_{ab})_2$  のような抗体または抗体フラグメントを包含する。

【0170】

単離されたPTMAXタンパク質、またはその部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体調製およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技法を用いて、PTMAXに結合する抗体を生成するための免疫原として用いられ得る。完全長のPTMAXタンパク質が用いられ得るが、あるいは、本発明は、免疫原としての使用のためのPTMAXの抗原性ペプチドフラグメントを提供する。PTMAXの抗原性ペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20で示されるアミノ酸配列の少なくとも4アミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体がPTMAXと特異的な免疫複合体を形成するように、PTMAXのエピトープを含む。好ましくは、この抗原性ペプチドは、少なくとも6、8、10、15、20、または30のアミノ酸残基を含む。より長い抗原性ペプチドが、使用および当業者に周知の方法により依存して、より短い抗原性ペプチドよりむしろ好適である。

【0171】

本発明の特定の実施形態では、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも1

つのエピトープは、タンパク質の表面上に位置するPTMAXの領域、例えば、親水性領域である。抗体産生を標的化する手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換を伴うかまたは伴わない、Kyte Doolittle法またはHopp Woods法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、それらの全体が本明細書に参考として援用される、HoppおよびWoods、1981、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824-3828; KyteおよびDoolittle 1982、J. Mol. Biol. 157:105-142を参照のこと。

#### 【0172】

本明細書で開示されるように、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20のPTMAXタンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログを、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の生成における免疫原として利用し得る。本明細書で用いられる場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、PTMAXのような抗原に特異的に結合（免疫反応）する抗原結合部位を含む分子をいう。このような抗体は、制限されずに、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、F<sub>ab</sub>フラグメントおよびF<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>フラグメント、およびF<sub>ab</sub>発現ライブラリーを含む。特定の実施形態では、ヒトPTMAXタンパク質に対する抗体が開示される。当該分野で公知の種々の手順が、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、または20のPTMAXタンパク質配列、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生のために用いられ得る。

#### 【0173】

ポリクローナル抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたはその他の哺乳動物）は、ネイティブタンパク質、またはその合成改変体、または前述の誘導体での注射により免疫化され得る。適切な免疫原調製物は、例えば、組換えにより発現されたPTMAXタンパク質または化学

的に合成されたポリペプチドを含有し得る。この調製物は、アジュバントをさらに含み得る。免疫学的応答を増大するために用いられる種々のアジュバントは、制限されずに、フロイント（完全および不完全）アジュバント、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど）、Bacille Calmette - GuerinおよびCorynebacterium parvumのようなヒトアジュバント、または類似の免疫刺激剤を含む。所望であれば、PTMAXに対して指向された抗体分子は、哺乳動物（例えば、血液）から単離され得、そしてさらに、IgGフラクションを得るためのプロテインAクロマトグラフィーのような、周知の技法により精製され得る。

#### 【0174】

本明細書で用いられる場合、用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、PTMAXの特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の1種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、代表的には、モノクローナル抗体組成物は、それと免疫反応する特定のPTMAXタンパク質に対し、単一の結合親和性を示す。特定のPTMAXタンパク質配列、またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモログに対して指向されたモノクローナル抗体の調製には、連続的な細胞株培養による抗体分子の産生のために提供する任意の技法が利用され得る。このような技法は、制限されずに、ハイブリドーマ技法（Kohler & Milstein, 1975 Nature 256:495-497を参照のこと）；トリオーマ技法；ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kozborら、1983 Immunol Today 4:72）およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技法（Coleら、1985 MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. 77-96頁を参照のこと）を含む。ヒトモノクローナル抗体を、本発明の実施において利用し得、そしてヒトハイブリドーマを用いることによるか（Coteら、1983. Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030を参照の

こと)、またはインビトロでヒトB細胞をエプスタイン-バーウイルスで形質転換することにより(Coteら、1985 MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liss、Inc. 77-96頁を参照のこと)産生され得る。上記の引用の各々は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。

【0175】

本発明によれば、技法は、PTMAXタンパク質に特異的な単鎖抗体の産生のために適合され得る(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、方法は、 $F_{ab}$ 発現ライブラリーの構築のために適合され得(例えば、Huseら、1989 Science 246:1275-1281を参照のこと)、PTMAXタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対し、所望の特異性を有するモノクローナル $F_{ab}$ フラグメントの迅速かつ有効な同定を可能にする。非ヒト抗体は、当該分野で周知の技法により「ヒト化」され得る。例えば、米国特許第5,225,539号を参照のこと。PTMAXタンパク質に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントを、当該分野で公知の技法により産生し得、以下を含むがこれらに限定されない:(i)抗体分子のペプシン消化により産生される $F_{(ab')_2}$ フラグメント;(ii) $F_{(ab')_2}$ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより生成される $F_{ab}$ フラグメント;(iii)抗体分子のパパインおよび還元剤での処理により生成される $F_{ab}$ フラグメント、ならびに(iv) $F_v$ フラグメント。

【0176】

さらに、ヒトおよび非ヒト部分の両方を含むキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体のような、組換え抗PTMAX抗体(これらは、標準組換えDNA技術を用いて作製され得る)は、本発明の範囲内である。このようなキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術により生成され得る。この技術は例えば、以下に記載の方法を用いる:国際出願番号PCT/US86/02269;欧州特許出願番号第184,187号;欧州特許出願番号第171,496号;欧州特許出願番号第173,494号;PCT国際公開番号WO 86/01533;米国特許第4,816,567号;米国特許

第5, 225, 539号; 欧州特許出願番号第125, 023号; Better (1988) Science 240:1041~1043; Liu (1987) PNAS 84:3439~3443; Liu (1987) J Immunol 139:3521~3526; Sun (1987) PNAS 84:214~218; Nishimura (1987) Cancer Res 47:999~1005; Wood (1985) Nature 314:446~449; Shaw (1988) J Natl Cancer Inst 80:1553~1559; Morrison (1985) Science 229:1202~1207; Oi (1986) BioTechniques 4:214; Jones (1986) Nature 321:552~525; Verhoeyan (1988) Science 239:1534; ならびに Beidler (1988) J Immunol 141:4053~4060。上記引用の各々は、それらの全体において参考として本明細書中に援用される。

#### 【0177】

1つの実施形態において、所望の特異性を保有する抗体のスクリーニングのための方法は、当該分野内で公知の酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (ELISA) および他の免疫学的に媒介された技術を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態において、PTMAXタンパク質の特定のドメインに対して特異的である抗体の選択は、このようなドメインを所有しているPTMAXタンパク質のフラグメントに結合するハイブリドーマの生成により容易にされる。従って、PTMAXタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログ内の所望のドメインに対して特異的である抗体がまた、本明細書において提供される。

#### 【0178】

抗PTMAX抗体は、PTMAXタンパク質の局在化および/または定量化に関する当該分野で公知の方法において用いられ得る (例えば、適切な生理学的なサンプル内のPTMAXタンパク質のレベルを測定する使用のために、診断的方法における使用のために、タンパク質の画像化における使用のために、など)。

所定の実施形態において、PTMAXタンパク質、またはそれらの誘導體、フラグメント、アナログまたはホモログに対する抗体（抗体由来の結合ドメインを含む）は、薬理的に活性な化合物〔本明細書中、以下において「治療剤」〕として利用される。

#### 【0179】

抗PTMAX抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準技術（例えばアフィニティークロマトグラフィまたは免疫沈降）によって、PTMAXを単離するために用いられ得る。抗PTMAX抗体は、細胞からの天然のPTMAX、そして宿主細胞において発現される組換え的に産生されたPTMAXの精製を容易にし得る。さらに、抗PTMAX抗体が、（例えば、細胞性溶解物または細胞上清における）PTMAXタンパク質を検出するために用いられ、PTMAXタンパク質の発現の量およびパターンを評価し得る。抗PTMAX抗体は、例えば、所定の治療レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として組織におけるタンパク質レベルをモニターするために診断的に用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質に連結する（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易にされ得る。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン（dichlorotriazinylamine）フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられる；そして、適切な放射性物質の例としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ が挙げられる。

#### 【0180】

（PTMAX組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、PTMAXタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログをコードする核酸を含む、ベクター、好ましくは、発現ベクターに関する。本明細書において使用する場合、用語「ベクター」は、それに連結された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。1つの型のベクターは、「プラスミド」である。これはさらなるDNAセグメントが連結され得る環状の二本鎖DNAループをいう。他の型のベクターは、ウイルスベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントが、ウイルスゲノムに連結され得る。特定のベクターは、ベクターが導入される宿主細胞中で自律複製し得る（例えば、細菌性の複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そして、これにより宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を導き得る。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術における有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本願明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に用いられる形態のベクターであるので、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、等価の機能を果たす、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウィルス、アデノウィルス、およびアデノ随伴ウィルス）のような、このような他の形態の発現ベクターを含むことを意図する。

#### 【0181】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で本発明の核酸を含む。これは、組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結されている、発現に用いられるべき宿主細胞に基づいて選択される、1つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結する」とは、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インピトリ口の転写/翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入される場合は、宿主細胞において）ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されるという意味が意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサ

ーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。このような調節配列は、例えば、Goeddel ; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY : METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990) に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指向する配列（例えば、組織特異的調節配列）を含む。発現ベクターの設計が、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは、当業者には明白である。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され得、それにより、本明細書に記載される核酸によりコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質またはペプチドを含む）（例えば、PTMAXタンパク質、PTMAXの変異形態、融合タンパク質など）を生成し得る。

#### 【0182】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における、PTMAX発現のために設計され得る。例えば、PTMAXは、細菌細胞（例えば、E. coli）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel ; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY : METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990) にさらに考察されている。あるいは、組換え型発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳され得る。

#### 【0183】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを用いてE. coliにおいて実行される。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、

以下の3つの目的のために役立つ：(1)組換えタンパク質の発現を増加させること；(2)組換えタンパク質の可溶性を増加させること；および(3)アフィニティー精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製の際に補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位が、融合部分の結合部に導入され、そしてこの組換えタンパク質により、融合タンパク質の精製の後に融合部分から組換えタンパク質を分離することが可能になる。このような酵素、およびその同族の認識配列は、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、それぞれ、標的の組換えタンパク質に融合するpGEX(Pharmacia Biotech Inc.; Smith and Johnson(1988)Gene 67:31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, N.J.)が挙げられる。

#### 【0184】

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

#### 【0185】

E.coliにおける組換えタンパク質発現を最大化するための1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でタンパク質を発現することである。Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif.(1990)119-128を参照のこと。別の戦略は

、各アミノ酸についての個々のコドンが、E. coliにおいて優先的に利用されるコドンであるように発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである(Wadaら(1992)Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本発明のこのような核酸配列の変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

【0186】

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

【0187】

あるいは、PTMAXは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養昆虫細胞(例えば、SF9細胞)中でのタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ(Smithら(1983)Mol Cell Biol 3:2156-2165)およびpVLシリーズ(LucklowおよびSummers(1989)Virology 170:31-39)が挙げられる。

【0188】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8(Seed(1987)Nature 329:840)およびpMT2PC(Kaufmanら(1987)EMBO J 6:187-195)が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロ

モーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方について他の適切な発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0189】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する）中で優先的に核酸の発現を指向し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的なプロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkertら（1987）Genes Dev 1:268-277）、リンパ特異的プロモーター（CalameおよびEaton（1988）Adv Immunol 43:235-275）、T細胞レセプターの特定のプロモーターにおいて（WinotoおよびBaltimore（1989）EMBO J 8:729-733）および免疫グロブリンの特定のプロモーターにおいて（Banerjiら（1983）Cell 33:729-740；QueenおよびBaltimore（1983）Cell 33:741-748）、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle（1989）PNAS 86:5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlundら（1985）Science 230:912-916）、ならびに乳腺特異的プロモーター（例えば、ミルク乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州出願公開第264,166号）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターもまた含まれる（例えば、マウスホックス（murine hox）プロモーター（KesselおよびGruss（1990）Science 249:374-379）およびa-フェトプロテインプロモーター（CampesおよびTilg

hman (1989) Genes Dev 3:537-546)。

【0190】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、そのDNA分子は、PTMAX mRNAに対するアンチセンスであるRNA分子の発現(DNA分子の転写によって)を可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。調節配列は、種々の細胞型においてアンチセンスRNA分子の連続的な発現を指向する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結される調節配列(例えば、ウイルスプロモーターおよび/もしくはエンハンサー)が選択され得るか、または例えば、アンチセンスRNAの構成的発現、組織特異的発現、または細胞特異的発現を指向する調節配列が、選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態であり得、ここではアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、Weintraubら、「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」、Reviews - - Trends in Genetics、第1巻(1)1986を参照のこと。

【0191】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象の細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をいうことが理解される。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変が次の世代において生じ得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書中で使用されるような用語の範囲内に含まれる。

【0192】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、PTMAXタンパク質は、細菌細胞(例えば、E. coli)、昆虫細胞、酵母ま

たは哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0193】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことが意図され、これらには、リン酸カルシウム同時沈殿もしくは塩化カルシウム同時沈殿、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションするための適切な方法は、Sambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0194】

安定な哺乳動物細胞のトランスフェクションのために、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部のみが外来DNAをそのゲノムに組み込み得ることが知られている。これらの要素を同定および選択するために、選択可能マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、一般的には目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択可能マーカーには、薬物（例えば、G418、ハイグロマイシンおよびメトトレキサート）に対する耐性を付与するものが含まれる。選択可能マーカーをコードする核酸は、PTMAXをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、あるいは別々のベクター上で導入され得る。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択可能マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存し、一方他の細胞は死滅する）。

## 【0195】

本発明の宿主細胞（例えば、培養中の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞）は、PTMAXタンパク質を産生（すなわち、発現）するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して、PTMAXタンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、PTMAXタンパク質が産生されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞（ここに、PTMAXをコードする組換え発現ベクターが導入された）を培養する工程を包含する。別の実施形態において、この方法はさらに、培地または宿主細胞からPTMAXを単離する工程を包含する。

## 【0196】

（トランスジェニック動物）

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を生成するために使用され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、PTMAXコード配列が導入された、受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞は、外因性のPTMAX配列がそのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物、または内因性のPTMAX配列が変更された相同組換え動物を作成するために使用され得る。このような動物は、PTMAXの機能および/または活性を研究するため、ならびにPTMAX活性のモジュレーターを同定および/または評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのような齧歯類であり、その動物の1つ以上の細胞が、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、細胞（この細胞からトランスジェニック動物が発生する）のゲノムに組み込まれかつ成熟動物のゲノムに残存する、外因性のDNAであり、それによって、トランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織においてコードされた遺伝子産物の発現を指示する。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはマウスであり、ここで内因性のPTMAX遺伝子は、内因性の遺伝子

と、その動物の発生の前にその動物の細胞（例えば、その動物の胚細胞）に導入された外因性のDNA分子との間の相同組換えによって変更されている。

【0197】

本発明のトランスジェニック動物は、PTMAXをコードする核酸を、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって、受精した卵母細胞の雄性前核に導入すること、および卵母細胞が偽妊娠した雌性養育動物（foster animal）中で発生することを可能にすることによって作成され得る。配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17または19のヒトPTMAX cDNA配列は、非ヒト動物のゲノムに導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトPTMAX遺伝子の非ヒトホモログ（例えば、マウスPTMAX遺伝子）は、ヒトPTMAX cDNAに対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得（上にさらに記載された）、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた導入遺伝子中に含まれ得、その導入遺伝子の発現の効率を増大させ得る。組織特異的調節配列は、特定の細胞に対して、PTMAXタンパク質の発現を指示するように、PTMAX導入遺伝子に作動可能に連結される。胚の操作およびマイクロインジェクションを介するトランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を生成するための方法は、当該分野で慣習的になっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号；同第4,870,009号；および同第4,873,191号；ならびにHogan 1986、MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。同様の方法は、他のトランスジェニック動物の作成のために使用される。トランスジェニック初代（founder）動物は、そのゲノムにおけるPTMAX導入遺伝子の存在および/またはその動物の組織または細胞中のPTMAX mRNAの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック初代動物は、導入遺伝子を有するさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、PTMAXをコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物に繁殖させ得

る。

【0198】

相同組換え動物を作成するために、PTMAX遺伝子の少なくとも一部を含むベクターを調製する。この遺伝子において、欠失、付加、または置換が導入されて、それによってそのPTMAX遺伝子が増加されている（例えば、機能的に破壊される）。PTMAX遺伝子はヒト遺伝子（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17または19のcDNA）であり得るが、より好ましくは、ヒトPTMAX遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号29のヒトPTMAX遺伝子のマウスホモログは、マウスゲノムにおいて内因性のPTMAX遺伝子を変更するのに適切な相同組換えベクターを構築するために使用され得る。1つの実施形態において、そのベクターは、相同組換えに際して、その内因性のPTMAX遺伝子が、機能的に破壊されるように設計される（すなわち、機能的タンパク質をもはやコードしない；「ロックアウト」ベクターともいわれる）。

【0199】

あるいは、このベクターは、相同組換えに対して、内因性PTMAX遺伝子が増変されるか、またはさもなければ、変更されるが、なお機能的タンパク質をコードするように、設計され得る（例えば、上流の調節領域が増変され、それによって内因性PTMAXタンパク質の発現を増変し得る）。相同組換えベクターにおいて、PTMAX遺伝子が増変された部分は、PTMAX遺伝子のさらなる核酸によって、その5'末端および3'末端で隣接され、相同組換えが、ベクターによって保有される外因性PTMAX遺伝子と胚幹細胞中の内因性PTMAX遺伝子との間で起こることを可能にする。さらなる隣接するPTMAX核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えのために十分な長さである。典型的に、数千ベースの隣接するDNA（5'末端および3'末端の両方における）が、ベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの記述についてThomasら（1987）Cell 51:503を参照のこと。このベクターは、（例えば、電圧クランプによって）胚幹細胞株に導入され、導入されたPTMAX遺伝子が内因性PTMAX遺伝子と相同組換えした細胞が、選択される（例え

ば、Liら(1992)Cell 69:915を参照のこと)。

【0200】

次いで、選択された細胞が、動物(例えば、マウス)の胚盤胞へ注入され、凝集キメラを形成する。例えば、Bradley(1987)のTERATOCA RCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH、ROBERTSON編、IRL、Oxford、113頁~152頁を参照のこと。次いで、キメラ胚が、適切な偽妊娠雌性養育動物に移植され得、そしてその胚は分娩に到る。その生殖細胞中に相同組換えされたDNAを保有する子孫が、動物を繁殖させるために使用され得、この動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達による、相同組換えされたDNAを含む。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法が、さらに以下に記載される; Bradley(1991)Curr Opin Biotechnol 2:823-829; PCT国際公開番号: WO90/11354; WO91/01140; WO92/0968; およびWO/93/04169。

【0201】

別の実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含むトランスジェニック非ヒト動物が産生され得る。このような系の1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の記述については、例えば、Laksora(1992)PNAS 89:6232-6236を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である(O'Gormanら(1991)Science 251:1351-1355)。cre/loxPリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が必要となる。このような動物は、例えば、2種のトランスジェニック動物(一方は選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含む)を交配することによる「二重の」トランスジェニック動物の構築によって

提供され得る。

### 【0202】

本明細書中に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンはまた、Wilmutら(1997) Nature 385:810-813に記載される方法に従って、生成され得る。簡単には、トランスジェニック動物からの細胞(例えば、体細胞)は単離および誘導され、増殖サイクルから出、そしてG<sub>0</sub>期に入り得る。次いで、静止性細胞が、例えば、電気パルスの使用により、その静止性細胞が単離される同種の動物から摘出された卵母細胞へ融合され得る。次いで、この再構築された卵母細胞は培養され、これにより、これは桑実胚または未分化胚芽細胞に発達し、次いで、偽妊娠雌性養育動物に移される。この雌性養育動物から生まれた子孫は、その細胞(例えば、その体細胞)が単離された動物のクローンである。

### 【0203】

(薬学的組成物)

本発明のPTMAX核酸分子、PTMAXタンパク質、および抗PTMAX抗体(これはまた、本明細書中で、「活性な化合物」とも呼ばれる)、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、および相同体が、投与に適した薬学的組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、典型的に、核酸分子、タンパク質または抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与に適合した、任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤(delaying agent)などを含むことが意図される。適切なキャリアは、Remington's Pharmaceutical Sciences(当該分野の標準的参考文献)(本明細書中に参考として援用される)の最新版に記載される。このようなキャリアまたは希釈剤の好ましい例としては、水、生理食塩水、finger溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。リポソームおよび非水性ビヒクル(例えば、不揮発性油)もまた、使用され得る。薬学的に活性な物質におけるこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任

意の従来の媒体または薬剤が活性な化合物と不適合である範囲を除いて、組成物におけるその使用が考慮される。補助活性化合物はまた、組成物へ組み込まれ得る。

#### 【0204】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与の経路と適合するように処方される。投与の経路の例には、非経口（例えば、静脈、皮内、皮下）投与、経口（例えば、吸入）投与、経皮（局所的）投与、経粘膜（transmucosal）投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような、滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような、抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムのような、抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のような、キレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のような、緩衝液、および塩化ナトリウムまたはデキストロースのような、張度の調節のための薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、あるいはガラスまたはプラスチックから作成される多用量のバイアル中に入れられ得る。

#### 【0205】

注入可能な使用に適した薬学的組成物は、滅菌水性溶液（ここで、水溶解性）または分散液、および滅菌の注入可能な溶液または分散液の即座の調製のための滅菌粉末を含む。静脈投与において、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL™（BASF、Parsippany、N.J.）またはリン酸塩緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌性でなければならず、そして容易な注入性（syringability）が存在する程度に流動性であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌のような微生物の汚染行為に対して保護されるべきである。このキャリアは、例えば、以下を含む溶媒または分散媒であり得る：水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロ

ール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)ならびにそれらの適切な混合物。適切な流動性が、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散液の場合に、要求される粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤(例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど)によって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張剤(例えば、砂糖、ポリアルコール(例えば、マンニトール(mannitol)、ソルビトール)、塩化ナトリウム)を含むことが好ましい。注入可能な組成物の長時間吸収は、組成物に吸収を遅らせる薬剤(例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチン)を含ませることによってもたらされ得る。

#### 【0206】

滅菌注射可能溶液は、必要量のこの活性化化合物(例えば、PTMAXタンパク質あるいは抗PTMAX抗体)を、適切な溶媒中に、上記で列挙される成分の1つまたは組み合わせと共に組み込み、必要な場合、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般的に、分散液は、活性化化合物を、塩基性分散媒および上記で列挙される成分から必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中へ組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合において、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、活性成分および既に滅菌濾過されたその溶液からの任意のさらなる所望の成分の粉末を得る。

#### 【0207】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤へと圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュとしての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そしてさっと動かされ、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、任意の以下の成分または同様の性

質を有する化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、Primogel、またはコーンスターチ）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes）；滑り剤（glidant）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは香味剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー）。

#### 【0208】

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

#### 【0209】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透される障壁に適切な浸透剤が、処方物において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻噴霧または坐剤の使用によって達成され得る。経皮投与については、この活性化化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏剤、軟膏、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

#### 【0210】

この化合物はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤ベースと共に）または貯留（retention）浣腸の形態で調製され得る。

#### 【0211】

1つの実施形態において、この活性化化合物は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、制御放出処方物）、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。

このような処方物の調製のための方法は、当該業者には明らかである。これらの材料はまた、Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. から市販され、手に入れることができる。リポソーム懸濁剤（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を感染させた細胞へ標的化されるリポソームを含む）がまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

#### 【0212】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用される投薬単位形態は、処置される被験体のための単位投薬量として適切な物理的に個々の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアと関連して所望の治療的効果を生じるように計算された、所定量の活性化化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、この活性化化合物の独特の特徴、および達成される特定の治療効果、ならびに個体の処置のためのこのような活性化化合物を調合する当該分野に固有の制限によって決定されるか、あるいはこれらに直接依存する。

#### 【0213】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、被験体へ、例えば静脈注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）によって、または定位注射（例えば、Chenら（1994）PNAS 91:3054-3057を参照のこと）によって送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物には、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターが挙げられ得、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれる除放射性マトリックスが挙げられ得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞からインタクトで産生され得（例えば、レトロウイルスベクター）、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。

#### 【0214】

薬学的組成物は、投与のための使用説明書と共の容器、包装、またはディスペンサーに含まれ得る。

## 【0215】

(本発明の使用および方法)

本発明の単離された核酸分子は、PTMAXタンパク質を発現するために(例えば、遺伝子治療適用の際に宿主細胞における組み換え発現ベクターを介して)使用され、PTMAX mRNA(例えば、生物学的サンプルにおける)またはPTMAX遺伝子における遺伝的病変を検出し得、かつ以下にさらに記載されるようなPTMAX活性を調節し得る。さらに、PTMAXタンパク質は、PTMAX活性または発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングし、ならびにPTMAXタンパク質の不十分もしくは過剰な産生またはPTMAX野生型タンパク質と比較して減少もしくは異常な活性を有するPTMAXタンパク質形態の産生によって特徴づけられる障害を処置するために使用され得る(例えば、癌などの増殖傷害および免疫傷害(例えば、多発性硬化症))。さらに、本発明の抗PTMAX抗体は、PTMAXタンパク質を検出および単離し、ならびにPTMAX活性を調節するために使用され得る。

## 【0216】

本発明は、さらに、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される新規の薬剤および本明細書中に記載される処置のためのそれらの使用に関する。

## 【0217】

(スクリーニングアッセイ)

本発明は、調節因子、すなわち、PTMAXタンパク質に結合するか、あるいは例えば、PTMAX発現またはPTMAX活性に対して刺激効果または阻害効果を有する、候補化合物または候補薬剤、あるいは試験化合物または試験薬剤(例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子または他の薬物)を同定するための方法(本明細書中において「スクリーニングアッセイ」とも称される)を提供する。本発明はまた、本明細書中で記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定される化合物を含む。

## 【0218】

1つの実施形態において、本発明は、PTMAXのタンパク質またはポリペプ

チド、あるいはその生物学的に活性な部分の膜結合形態に結合するか、またはそれら膜結合形態の活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における任意の多数のアプローチを使用して得られ得、これらのライブラリーには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である(Lam(1997) Anticancer Drug Des 12:145)。

#### 【0219】

本明細書中で使用される場合、「低分子」とは、約5 kD未満の分子量、最も好ましくは約4 kD未満の分子量を有する組成物をいうように意味される。低分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、糖、脂質または他の有機分子(炭素含有)もしくは無機分子であり得る。化学的および/または生物学的混合物(例えば、真菌、細菌または藻類抽出物)のライブラリーは、当該分野で公知であり、そして本発明のアッセイのいずれかを用いてスクリーニングされ得る。

#### 【0220】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら(1993) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 90:6909；Erbら(1994) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 91:11422；Zuckermannら(1994) J Med Chem 37:2678；Choら(1993) Science 261:1303；Carrellら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2059；Carrellら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2061；およ

びGallopら(1994) J Med Chem 37:1233。

【0221】

化合物のライブラリーは、溶液中で(例えば、Houghten(1992) Biotechniques 13:412~421)、あるいはビーズ上(Lam(1991) Nature 354:82~84)、チップ上(Fodor(1993) Nature 364:555~556)、細菌(Ladner 米国特許第5,223,409号)、孢子(Ladner 米国特許第5,233,409号)、プラスミド(Cullら(1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1865~1869)またはファージ上(ScottおよびSmith(1990) Science 249:386~390; Devlin(1990) Science 249:404~406; Cwirllaら(1990) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 87:6378~6382; Felici(1991) J Mol Biol 222:301~310; Ladner、米国特許第5,233,409号)において示され得る。

【0222】

1つの実施形態において、アッセイは細胞ベースのアッセイであり、ここで、膜結合形態のPTMAXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物が、PTMAXタンパク質に結合する能力が、決定される。例えば、細胞は、哺乳動物起源または酵母細胞であり得る。この試験化合物がPTMAXタンパク質に結合する能力の決定は、例えば、その試験化合物を放射性同位体標識または酵素標識とカップリングさせて、その結果、この試験化合物のPTMAXタンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する結合が、複合体におけるその標識化合物を検出することによって決定され得ることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、または $^3\text{H}$ で直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてその放射性同位体が、放射線放射の直接の計数により、またはシンチレーション計数により、検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで

酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識が、適切な基質の生成物への転換を決定することにより、検出され得る。

#### 【0223】

1つの実施形態において、このアッセイは、膜結合形態のPTMAXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分とその細胞表面上に発現する細胞を、PTMAXと結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物に試験化合物を接触させる工程、ならびにこの試験化合物がPTMAXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がPTMAXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、PTMAXまたはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

#### 【0224】

別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、これは、膜結合形態のPTMAXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物が、PTMAXタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物が、PTMAXまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力の決定は、例えば、PTMAXタンパク質が、PTMAX標的分子に結合またはこれら標的分子と相互作用する能力を決定することによって、達成され得る。本明細書中において使用する場合には、「標的分子」とは、PTMAXタンパク質が自然に結合または相互作用する分子であり、例えば、PTMAX相互作用タンパク質を発現する細胞表面上の分子、第二の細胞表面上の分子、細胞外環境中の分子、細胞膜の内部表面と会合する分子、核膜に会合する分子、核中の分子、または細胞質分子である。PTMAX標的分子は、非PTMAX分子あるいは本発明のPTMAXタンパク質またはポリペプチドであり得る。

#### 【0225】

1つの実施形態において、PTMAX標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を通過して細胞内への細胞外シグナル（例えば、化合物

が膜結合PTMAX分子に結合することにより発生するシグナル)の伝達を促進する。その標的は、例えば、触媒活性を有する第二の細胞内タンパク質、または下流シグナル分子のPTMAXとの会合を容易にするタンパク質であり得る。

#### 【0226】

PTMAXタンパク質がPTMAX標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、直接的結合を決定するための上記方法の1つにより、達成され得る。1つの実施形態において、PTMAXタンパク質がPTMAX標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、その標的分子の活性を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の活性は、その標的の細胞セカンドメッセンジャー(すなわち、細胞内 $Ca^{2+}$ 、ジアシルグリセロール、 $IP_3$ など)の誘導を検出すること、適切な基質への標的の触媒活性/酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子(検出可能なマーカー(例えば、ルシフェラーゼ)をコードする核酸に作動的に連結されたPTMAX応答性調節エレメントを含む)の誘導を検出すること、または細胞応答(例えば、細胞生存度、細胞死、細胞分化、または細胞増殖)を検出することにより、決定され得る。

#### 【0227】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞アッセイであり、PTMAXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がPTMAXタンパク質またはその生物学的に活性な部分と結合する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物の、PTMAXタンパク質への結合は、上記のように、直接的または間接的にのいずれかで決定され得る。1つの実施形態において、このアッセイは、PTMAXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、PTMAXを結合する公知の化合物に接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がPTMAXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がPTMAXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、PTMAX、またはその生物学的に活性な部分と優先的に相互作用する

能力を決定する工程を包含する。

【0228】

別の実施形態において、アッセイは、無細胞アッセイであり、PTMAXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させる工程、ならびにその試験化合物がPTMAXタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物がPTMAXの活性を調節する能力の決定は、例えば、PTMAXタンパク質が、PTMAX標的分子に結合する能力を、直接的結合の決定のための上記方法の1つによって決定することにより、達成され得る。代替の実施形態において、この試験化合物がPTMAXの活性を調節する能力の決定は、PTMAXタンパク質が、PTMAX標的分子をさらに調節する能力を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の適切な基質に対する触媒活性/酵素活性は、上記のように決定され得る。

【0229】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、PTMAXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、PTMAXを結合する公知の化合物に接触させてアッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物がPTMAXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がPTMAXタンパク質と相互作用する能力の決定は、PTMAXタンパク質が、PTMAX標的分子と優先的に結合するか、またはその標的分子の活性を優先的に調節する能力を決定する工程を包含する。

【0230】

本発明の無細胞アッセイは、PTMAXの、可溶性の形態または膜結合形態の両方の使用に受け入れられる。膜結合形態のPTMAXを含む無細胞アッセイの場合には、PTMAXの膜結合形態が溶液中に維持されるように、可溶化剤を利用することが望ましくあり得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤が挙げられ、例えば、n-オクチルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル

- N - メチルグルカミド、Triton (登録商標) X - 100、Triton (登録商標) X - 114、Thesit (登録商標)、イソトリデシルポリ(エチレングリコールエーテル)<sub>n</sub> (Isotridecypoly(ethylene glycol ether)<sub>n</sub>、N - ドデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、3 - (3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ - 1 - プロパンスルホネート(3 - (3 - cholamidopropyl)dimethylamminiol - 1 - propane sulfonate) (CHAPS)、または3 - (3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホネート(3 - (3 - cholamidopropyl)dimethylamminiol - 2 - hydroxy - 1 - propane sulfonate) (CHAPSO)である。

#### 【0231】

本発明の上記アッセイ方法の1つより多い実施形態において、PTMAXまたはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合形態からの複合形態の分離を促進し、そしてそのアッセイの自動化に適用させることが、望ましくあり得る。試験化合物の、PTMAXへの結合、または候補化合物の存在下および非存在下での、PTMAXの標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するために適切な任意の容器内で、達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、そのタンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、GST - PTMAX融合タンパク質またはGST標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical、St. Louis、MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いでこれらは、試験化合物と合わせられるか、あるいは試験化合物および吸着されない標的タンパク質、またはPTMAXタンパク質のいずれかと合わせられ、そしてこの混合物が、複合体形成に貢献する条件下(例えば、塩およびpHに関して生理学的条件)でインキュベートされる。インキュベーションに続いて、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、

結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体がマトリックスから解離され得、そしてPTMAXの結合レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使用して決定し得る。

#### 【0232】

タンパク質をマトリックスに固定するための他の技術がまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、PTMAX、またはその標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンとの結合を利用して、固定され得る。ビオチニル化PTMAX、または標的分子は、当該分野において周知の技術を使用して、ビオチン-NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)から調製され得(例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals、Rockford、Ill.)、そしてストレプトアビジンで被覆した96ウェルのプレート(Pierce Chemical)のウェルに固定され得る。あるいは、PTMAX、または標的分子と反応性であるがPTMAXタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、そのプレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的またはPTMAXが、抗体の結合によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定複合体に関しての上記のものに加えて、PTMAXまたは標的分子と反応性の抗体を使用する、複合体の免疫検出、ならびにPTMAX、または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

#### 【0233】

別の実施形態において、PTMAX発現のモジュレーターは、細胞を候補化合物と接触させ、そして細胞中のPTMAX mRNAまたはタンパク質の発現を決定する方法において同定される。候補化合物の存在下でのPTMAX mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、候補化合物の非存在下でのPTMAX mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較される。次いで、候補化合物は、この比較に基づいて、PTMAX発現のモジュレーターとして同定され得る。例えば、PTMAX mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下より、その存在下における方が大きい(統計的に有意に大きい)場合、この候補化合

物は、PTMAX mRNAまたはタンパク質の発現の刺激物質として同定される。あるいは、PTMAX mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりその存在下の方が少ない(統計的に有意に少ない)場合、この候補化合物は、PTMAX mRNAまたはタンパク質の発現のインヒビターとして同定される。細胞中のPTMAX mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、PTMAX mRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書中に記載の方法によって決定され得る。

#### 【0234】

本発明のなお別の局面において、PTMAXタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「ベイトタンパク質」として使用されて(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosら(1993) Cell 72:223-232; Maduraら、(1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartelら、(1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchiら、(1993) Oncogene 8:1693-1696; および Brent WO94/10300を参照のこと)、PTMAX(「PTMAX結合タンパク質」または「PTMAX-bp」)に結合するか、またはこれと相互作用し、そしてPTMAX活性を調節する他のタンパク質を同定し得る。このようなPTMAX結合タンパク質はまた、例えば、PTMAX経路の上流または下流エレメントとしてPTMAXタンパク質によるシグナル伝達に關与するようである。

#### 【0235】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる、大部分の転写因子のモジュール的性質に基づく。簡潔には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。一方の構築物においては、PTMAXをコードする遺伝子が公知の転写因子(例えば、GAL-4)のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物においては、DNA配列のライブラリー由来の、未同定タンパク質(「プレイ」または「サンプル」)をコードするDNA配列が、公知の転写因子の活性化ドメインをコード

する遺伝子に融合される。「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用して、PTMAX依存性複合体を形成し得る場合、この転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、非常に近くにある。近位にあることにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写を可能にする。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーは、単離され得、そしてPTMAXと相互作用するタンパク質をコードするクローニングされた遺伝子を得るために使用され得る。

#### 【0236】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な薬剤および本明細書中に記載されるような処置のためのこの薬剤の使用に関する。

#### 【0237】

（染色体マッピング）

一旦、遺伝子の配列（または配列の部分）が単離されると、この配列は、染色体上の遺伝子の位置をマッピングするために使用され得る。このプロセスは、染色体マッピングとよばれる。従って、本明細書中に記載される、PTMAX配列の部分またはフラグメントは、それぞれ、染色体上のPTMAX遺伝子の位置をマッピングするために使用され得る。染色体に対するPTMAX配列のマッピングは、これらの配列を疾患に関連する遺伝子と関連付ける最初の重要な工程である。

#### 【0238】

手短には、PTMAX遺伝子は、PTMAX配列からPCRプライマー（好ましくは15～25bpの長さ）を調製することによって染色体にマッピングされ得る。PTMAX配列のコンピュータ分析は、ゲノムDNA中の1つより多いエキソンにわたらない（従って、増幅プロセスを複雑にする）プライマーを迅速に選択するために使用され得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために使用され得る。PTMAX配列に対応するヒト遺伝子を含むこれらのハイブリッドのみが、増幅されたフラグメントを産生する。

## 【0239】

体細胞ハイブリッドは、異なる哺乳動物（例えば、ヒトおよびマウス細胞）由来の体細胞を融合することによって調製される。ヒトおよびマウス細胞のハイブリッドが増殖および分裂する場合、これらは次第に、ランダムな順序でヒト染色体を喪失するが、マウスの染色体を保持する。特定の酵素を欠くためにマウス細胞は増殖し得ないが、ヒト細胞は増殖し得る培地を使用することによって、必要とされる酵素をコードする遺伝子を含む1つのヒト染色体が保持される。種々の培地を使用することによって、ハイブリッド細胞株のパネルが樹立され得る。パネルにおける各細胞株は、単一のヒト染色体または少数のヒト染色体のいずれか、およびマウス染色体の全セットを含み、特定のヒト染色体に対する個々の遺伝子の容易なマッピングを可能にする（D' E u s t a c h i o ら、（1983）*Science* 220:919-924）。ヒト染色体のフラグメントのみを含む体細胞ハイブリッドはまた、転座および欠失を有するヒト染色体を使用することによって産生され得る。

## 【0240】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の配列を特定の染色体に割り当てるための迅速な手段である。単一のサーマルサイクラー（*t h e r m a l c y c l e r*）を使用して、1日当たり、3個以上の配列が割り当てられ得る。オリゴヌクレオチドプライマーを設計するためにPTMAX配列を使用して、特定の染色体由来のフラグメントのパネルを用いて、準位置決定（*s u b l o c a l i z a t i o n*）が達成され得る。

## 【0241】

中期染色体スプレッド（*s p r e a d*）に対するDNA配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（*F I S H*）は、さらに、1工程で正確な染色体位置を提供するために使用され得る。染色体スプレッドは、紡錘体を破壊するコルセミドのような化合物によって中期で分裂がブロックされた細胞を使用して、作成され得る。染色体は、トリプシンで手短かに処理され、次いで、*G i e m s a*で染色され得る。明暗バンドのパターンが各染色体上で生成し、その結果、染色体が個々に同定され得る。このFISH技術は、500または600塩基ほどの長さ

のDNA配列を用いて使用され得る。しかし、1,000塩基よりも大きいクローンは、サンプル検出に十分なシグナル強度を伴い、固有の染色体位置に結合する可能性がより高い。好ましくは、1,000塩基、より好ましくは、2,000塩基が、合理的な時間の量で良好な結果を得るのに十分である。この技術の総説については、Vermaら、HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES (Pergamon Press, New York 1988)を参照のこと。

#### 【0242】

染色体マッピングのための試薬は、単一の染色体またはその染色体上の単一の部位をマークするために個々に使用され得るか、あるいは試薬のパネルが複数の部位および/または複数の染色体をマークするために使用され得る。実際、遺伝子の非コード領域に対応する試薬が、マッピングの目的のために好ましい。コード配列は、遺伝子ファミリー内でより保存されているようであり、それゆえ染色体マッピングの間、クロスハイブリダイゼーションの機会が増加する。

#### 【0243】

一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされると、その配列の染色体上の物理的位置は、遺伝子マップデータと相関し得る。このようなデータは、例えば、McKusick, MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通じてオンラインで入手可能)において見いだされる。次いで、同じ染色体領域にマッピングされる遺伝子と疾患との間の関係は、例えば、Egelandら(1987) Nature, 325:783-787に記載される連鎖分析(物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝)によって同定され得る。

#### 【0244】

さらに、PTMAX遺伝子と関連する疾患に罹患した個体と、この疾患に罹患していない個体との間のDNA配列における差異が決定され得る。罹患した個体のいくらかまたは全てにおいて変異が認められるが、非罹患個体のいずれにおいても認められない場合、この変異は特定の疾患の原因薬剤である可能性が高い。

罹患個体と非罹患個体の比較は、一般に、染色体における構造的変化（例えば、染色体スプレッドから可視であるか、またはそのDNA配列に基づいたPCRを用いて検出可能な欠失または転座）を最初に探すことを包含する。最終的に、いくらかの個体に由来する遺伝子の完全な配列決定を行って、変異の存在を確認し得、かつ多型に由来する変異を区別し得る。

#### 【0245】

(組織型決定 (tissue typing))

本発明のPTMAX配列はまた、わずかな生物学的サンプルから個体を識別するために使用され得る。この技術において、個体のゲノムDNAは、1つ以上の制限酵素で消化され、そして同定のために独特のバンドを生成するためにサザンプロット上でプローブされる。本発明の配列は、RFLP（米国特許第5,272,057号に記載の「制限フラグメント長多型」）のためのさらなるDNAマーカーとして有用である。

#### 【0246】

さらに、本発明の配列を用いて、個体のゲノムの選択された部分について実際の塩基ごとにDNA配列を決定する代替的技術を提供し得る。従って、本明細書中に記載のPTMAX配列を用いて、配列の5'末端および3'末端から2つのPCRプライマーを調製し得る。次いで、これらのプライマーを使用して、個体のDNAを増幅し得、そしてこれを逐次的に配列決定し得る。

#### 【0247】

このように調製された個体由来の対応するDNA配列のパネルは、各個体が、対立遺伝子差異に起因するこのようなDNA配列の独特のセットを有するので、唯一の個体識別を提供し得る。本発明の配列は、個体由来および組織由来の配列のこのような識別を得るために使用され得る。本発明のPTMAX配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。対立遺伝子のバリエーションは、これらの配列のコード領域においてある程度生じ得、そして非コード領域においてより大きな程度に生じる。個々のヒト間での対立遺伝子のバリエーションは、各500塩基につき約1回の頻度で生じると推定される。対立遺伝子のバリエーションの多さは、制限フラグメント長多型(RFLP)を含む単一ヌクレオチド多型(SNP)に

起因する。

【0248】

本明細書中で記載の配列の各々は、標準物質（これに対して個体からのDNAが識別の目的で比較され得る）として使用され得る。より多くの多型が非コード領域で生じるので、個体を区別するために、それほど多くの配列が必要であるわけではない。配列番号1、3、5、または7の非コード配列は、おそらく10～1,000プライマーのパネルを用いてポジティブな個体識別を不自由なく提供し得る。これらのプライマーは、各々が100塩基の増幅された非コード配列（例えば、配列番号9、10、11、または12のコード配列）を生じる。推定コード配列が使用される場合、ポジティブな個体識別に関するプライマーのより多くの適切な数は、500～2,000である。

【0249】

（予測医療）

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬物ゲノム（*pharmacogenomics*）およびモニタリング臨床試験が、予後（予測）の目的に使用され、これによって個体を予防的に処置する、予測医療の分野に関する。従って、本発明の1つの局面は、PTMAXタンパク質および/または核酸の発現、ならびにPTMAXの活性を、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞、組織）の関連で決定し、これによって、異常なPTMAXの発現または活性に関連して、個体が疾患または障害に罹患するかどうか、あるいは障害を発症するリスクがあるかどうかを決定することに関する。本発明はまた、個体が、PTMAXのタンパク質、核酸の発現または活性と関連した障害を発症するリスクがあるかどうかを決定するための予後的（または予測的）アッセイを提供する。例えば、PTMAXの遺伝子における変異が、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後的または予測的な目的に使用され得、これによってPTMAXのタンパク質、核酸の発現または活性によって特徴付けられるかまたは関連した障害の発病の前に個体を予防的に処置する。

【0250】

本発明の別の局面は、個体におけるPTMAXのタンパク質、核酸の発現ある

いはPTMAXの活性を決定するための方法を提供し、これによって、その個体についての適切な治療的または予防的試薬（本明細書において「薬物ゲノム」とよばれる）を選択する。薬物ゲノムは、個体の遺伝型（例えば、特定の試薬に対して応答する個体の能力を決定するために試験された個体の遺伝型）に基づいて個体の治療的または予防的処置のための試薬（例えば、薬物）の選択を可能にする。

#### 【0251】

本発明のなお別の局面は、臨床試験におけるPTMAXの発現または活性に対する試薬（例えば、薬剤、化合物）の影響をモニタリングすることに関する。

#### 【0252】

これらおよび他の試薬は、以下の節でさらに詳細に記載される。

#### 【0253】

（診断アッセイ）

生物学的サンプルにおけるPTMAXの存在または非存在を検出するための例示的な方法は、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、およびその生物学的サンプルをPTMAXのタンパク質またはPTMAXタンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出し得る化合物もしくは薬剤とを接触させ、その結果、PTMAXの存在が、その生物学的サンプルにおいて検出される、工程を包含する。PTMAXのmRNAもしくはゲノムDNAを検出するための薬剤は、PTMAX mRNAもしくはゲノムDNAにハイブリダイズし得る、標識された核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長のPTMAXの核酸（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19の核酸）もしくはその部分の核酸（例えば、少なくとも、15、30、50、100、250もしくは500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、ストリンジェントな条件下でPTMAXのmRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズするに十分である核酸）であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書において記載されている。

#### 【0254】

P T M A Xのタンパク質を検出するための薬剤は、P T M A Xのタンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルであり得るか、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント（例えば、F a bまたはF ( a b ' )<sub>2</sub>）が使用され得る。用語「標識（された）」とは、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をそのプローブもしくは抗体にカップリングさせる（すなわち、物理的に連結する）ことによってそのプローブまたは抗体を直接標識すること、ならびに、直接標識された別の試薬との反応性によってそのプローブもしくは抗体の間接的な標識をすることを包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いた一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようにDNAプローブのビオチンを用いた末端標識が挙げられる。用語「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された、組織、細胞および生物学的流体ならびに被験体に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を用いて、P T M A Xのm R N A、タンパク質またはゲノムD N Aを、生物学的サンプル中で、インビトロおよびインビボで検出し得る。例えば、P T M A Xのm R N Aの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。P T M A Xのタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素連結免疫吸着アッセイ（E L I S A）、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられる。P T M A XのゲノムD N Aを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、P T M A Xのタンパク質の検出のためのインビボ技術としては、標識された抗P T M A X抗体を被験体に導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、放射性マーカを用いて標識され得る。被験体における放射性マーカの存在および位置は、標準的な画像化技術によって検出され得る。

#### 【0255】

1つの実施形態において、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのタンパク質分子を含む。あるいは、この生物学的サンプルは、その試験被験体から

のmRNA分子またはその試験被験体からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来的手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

【0256】

別の実施形態において、本発明の方法はさらに、コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、そのコントロールサンプルを、PTMAXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAを検出し得る化合物もしくは薬剤と接触させ、その結果、PTMAXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在がその生物学的サンプルにおいて検出される、工程、およびそのコントロールサンプルにおけるPTMAXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在と、その試験サンプルにおけるPTMAXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

【0257】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるPTMAXの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、このキットは、以下を備え得る：生物学的サンプルにおいてPTMAXのタンパク質またはmRNAを検出し得る、標識された化合物もしくは薬剤；そのサンプルにおいてPTMAXの量を決定するための手段；およびそのサンプルにおいて、標準と、PTMAXの量とを比較するための手段。この化合物または薬剤は、適切な容器内に包装され得る。このキットは、さらに、PTMAXのタンパク質または核酸を検出するためにキットを用いるための指示書を備え得る。

【0258】

(予後アッセイ)

本明細書において記載された診断方法をさらに利用して、PTMAXの異常発現または異常活性に関連した疾患もしくは障害を有するかまたはその発症の危険にある被験体を同定し得る。例えば、本明細書に記載されるアッセイ(例えば、上述の診断アッセイまたは下記のアッセイ)を利用して、PTMAXのタンパク質、核酸の発現または活性に関連する障害(例えば、癌、免疫系に関連する障害(例えば、多発性硬化症)または繊維症障害)を有するかまたはその発症の危険

に有る被験体を同定し得る。あるいは、この予後アッセイを利用して、疾患または障害を有するかまたはその発症の危険に有する被験体を同定し得る。従って、本発明は、PTMAXの異常発現または異常活性に関連する疾患もしくは障害を同定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルは、被験体から得られ、そしてPTMAXのタンパク質または核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）が検出され、ここで、PTMAXのタンパク質または核酸の存在は、PTMAXの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を有するかまたはその発症の危険にある被験体についての診断指標である。本明細書において使用される「試験サンプル」とは、目的の被験体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的流体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織であり得る。

#### 【0259】

さらに、本明細書に記載される予後アッセイを使用して、被験体が薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）が投与されてPTMAXの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を処置し得るか否かを決定し得る。例えば、そのような方法を用いて、被験体が障害（例えば、癌、免疫系に関連する障害（例えば、多発性硬化症））について薬剤を用いて有効に処置され得るか否かを決定し得る。従って、本発明は、PTMAXの異常発現または異常活性に関連する障害についての薬剤を用いて被験体が有効に処置され得るか否かを決定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルが得られ、そしてPTMAXのタンパク質または核酸が検出される（例えば、ここで、PTMAXのタンパク質または核酸の存在は、PTMAXの異常発現または異常活性に関連する障害を処置するための薬剤をその被験体に投与し得ることについての診断指標である）。

#### 【0260】

本発明の方法はまた、PTMAXの遺伝子における遺伝的損傷を検出し、それによって、その損傷遺伝子を有する被験体が異常な細胞増殖および/または分化によって特徴付けられる障害についての危険に有るか否かを決定するためにも使用され得る。種々の実施形態において、本発明の方法は、その被験体からの細胞

のサンプルにおいて、PTMAXのタンパク質をコードする遺伝子の統合性に影響を与える変更の少なくとも1つによって特徴付けられる遺伝的損傷、あるいはPTMAXの遺伝子の誤発現の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝的損傷は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：(1)PTMAXの遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；(2)PTMAXの遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；(3)PTMAXの遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、(4)PTMAXの遺伝子の染色体再配置；(5)PTMAXの遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変更、(6)PTMAXの遺伝子の異常改変（例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの異常改変）、(7)PTMAXの遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(8)PTMAXのタンパク質の非野生型レベル、(9)PTMAXの遺伝子の対立遺伝子の欠失、ならびに(10)PTMAXのタンパク質の不適切な翻訳後修飾。本明細書において記載されるように、当該分野において、多数の公知のアッセイ技術が存在し、これらは、PTMAXの遺伝子における損傷を検出するために使用され得る。好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって被験体から単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプルが使用され得、これには、例えば、頬粘膜細胞が挙げられる。

#### 【0261】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)におけるプローブ/プライマーの使用を包含する(例えば、米国特許第4,683,195号および同4,683,202号を参照のこと)(例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR)あるいは、連結連鎖反応(LCR)におけるプローブ/プライマーの使用を包含する(例えば、Landegranら(1988)Science 241:1077-1080;およびNakazawaら(1994)PNAS 91:360-364を参照のこと)。後者は、PTMAXの遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る)(Abravayaら(1995)Nucl Acids Res 23:675-682を参照のこと)。この方法は、患者から細胞のサンプルを収集する工程、核酸(例

例えば、ゲノム、mRNAまたはその両方)をそのサンプルの細胞から単離する工程、PTMAXの遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと、その核酸サンプルとをPTMAXの遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が(存在する場合)生じるような条件下で、接触させる工程、ならびに増幅産物の存在もしくは非存在を検出する工程、またはその増幅産物の大きさを検出する工程およびその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含し得る。PCRおよび/またはLCRは、本明細書に記載される変異を検出するために使用される技術のいずれかとともに予備的増幅工程として使用されるために所望され得ることが予想される。

#### 【0262】

代替的な増幅方法としては、以下が挙げられる：自己維持配列複製(Guattelliら、1990、Proc Natl Acad Sci USA 87:1874-1878)、転写増幅系(Kwoh、ら、1989、Proc Natl Acad Sci USA 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ(Lizardiら、1988、BioTechnology 6:1197)、または他の任意の核酸増幅方法、それに続いて、当業者に周知な技術を用いたその増幅された分子の検出。これらの検出スキームは、そのような分子が非常に極少数で存在する場合、核酸分子の検出のために特に有用である。

#### 【0263】

代替の実施形態において、サンプル細胞からのPTMAXの遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールのDNAが単離され、増幅され(必要に応じて)、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて消化され、そしてフラグメント長の大きさがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長の大きさにおける差違は、そのサンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイムの使用(例えば、米国特許第5,493,531号を参照のこと)を使用して、リボザイム切断部位の発生または喪失によって特異的な変異の存在についてスコア付けし得る。

#### 【0264】

他の実施形態において、PTMAXにおける遺伝的変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸（例えば、DNAまたはRNA）を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る（Croninら（1996）*Human Mutation* 7:244-255；Kozalら（1996）*Nature Medicine* 2:753-759）。例えば、PTMAXにおける遺伝的変異は、Croninら、上記のように光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、第一のプローブハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおける長いストレッチのDNAを通じて走査して、連続的に重複するプローブの線形アレイを作成することによってその配列の間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程に続いて、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さな特化されたプローブアレイを用いて、特定の変異の特徴付けを可能にする第二のハイブリダイゼーションアレイがある。各変異アレイは、一方が野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方が変異遺伝子に対して相補である並行プローブセットから構成される。

#### 【0265】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、PTMAX遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルのPTMAX配列と対応する野生型（コントロール）配列とを比較することによって、変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、MaximおよびGilbert（1977）*PNAS* 74:560またはSanger（1977）*PNAS* 74:5463によって開発された技術に基づくものが挙げられる。診断アッセイを実施する場合、種々の自動化配列決定手順のいずれかを利用し得ることもまた意図される（Naeverら、（1995）*BioTechniques* 19:448）。これらには、質量分析法による配列決定法（例えば、PCT国際公開番号WO 94/16101；Cohenら（1996）*Adv Chromatogr* 36:127-162；およびGriffinら（1993）*Appl Biochem Biotechnol* 38:147-159を参照の

こと)が含まれる。

【0266】

P T M A X 遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断薬剤からの保護を使用して、RNA / RNAもしくはRNA / DNAのヘテロ二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出する方法が挙げられる (Myersら (1985) Science 230:1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野の技術は、野生型のP T M A X 配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルから得られた潜在的な変異体RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供する工程によって始まる。この二本鎖の二重鎖を、二重鎖の一本鎖領域(例えば、そのコントロールとサンプルの鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するもの)を切断する薬剤を用いて処理する。例えば、RNA / DNA二重鎖を、RNaseを用いて処理し得、そしてDNA / DNAハイブリッドを、そのミスマッチ領域を酵素的に消化することに対して、S1ヌクレアーゼを用いて処理し得る。他の実施形態において、DNA / DNAまたはRNA / DNAのいずれかの二重鎖を、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムを用いて、およびピペリジンを用いて処理し得る。次いで、そのミスマッチ領域の消化後、得られた材料を変性ポリアクリルアミドゲル上で、大きさで分離して、変異の部位を決定する。例えば、Cottonら(1988)Proc Natl Acad Sci USA 85:4397; Saleebaら(1992)Methods Enzymol 217:286-295を参照のこと。1つの実施形態において、コントロールのDNAまたはRNAは、検出のために標識され得る。

【0267】

なお別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)を、細胞のサンプルから得られたP T M A X cDNAにおける点変異を検出およびマッピングするために規定された系において使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G / AミスマッチでAを切断し、そしてHe

L a細胞からのチミジンDNAグリコシダーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(Hsuら(1994)Carcinogenesis 15:1657~1662)。例示的な実施形態に従って、PTMAX配列(例えば、野生型PTMAX配列)に基づくプローブは、試験細胞由来のcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素を用いて処理され、そしてその切断産物(もしあれば)は、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

#### 【0268】

他の実施形態において、電気泳動の移動度における変化は、PTMAX遺伝子における変異を同定するために使用される。例えば、一本鎖配座多型(SSCP)は、変異体と野生型核酸との間の電気泳動の移動度における差異を検出するために使用され得る(Oritaら(1989)Proc Natl Acad Sci USA:86:2766、またCotton(1993)Mutat Res 285:125~144;Hayashi(1992)Genet Anal Tech Appl 9:73~79を参照のこと)。サンプルおよびコントロールPTMAX核酸の一本鎖DNAフラグメントは、変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動の移動度において得られる変化は、1つの塩基変化さえも検出し得る。DNAフラグメントは、標識され得るか、または標識されたプローブを用いて検出され得る。アッセイの感度は、二次構造が、配列中の変化に対してより感受的である、(DNAよりもむしろ)RNAを使用することによって増強され得る。1つの実施形態において、本発明の方法は、ヘテロ二重鎖分析を利用して、電気泳動の移動度における変化に基づいて二本鎖のヘテロ二重鎖分子を分離する(Keenら(1991)Trends Genet 7:5)。

#### 【0269】

なお別の実施形態において、一定勾配の変性剤を含有するポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)を使用してアッセイされる(Myersら(1985)Nature 313:495)。DGGEが分析の方法として使用される場合、DNAは

、例えば、PCRにより約40bpの高融点GCリッチDNAのGCクランプを付加することによって、完全には変性されないことを確実に改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールおよびサンプルDNAの移動度における差異を同定するために、変性剤勾配の代わりに使用される(RosenbaumおよびReissner(1987)Biophys Chem 265:12753)。

#### 【0270】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の変異が中心的に配置されるように調製され得、次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的DNAにハイブリダイズされる(Saikiら(1986)Nature 324:163)；Saikiら(1989)Proc Natl Acad Sci USA 86:6230)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に付着され、そして標識された標的DNAでハイブリダイズされる場合に、PCR増幅された標的DNAまたは多くの異なる変異にハイブリダイズされる。

#### 【0271】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と合わせて使用され得る。特異的増幅についてのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において(その結果、増幅は、差次的ハイブリダイゼーションに依存する)(Gibbsら(1989)Nucleic Acids Res 17:2437~2448)か、あるいは適切な条件下でミスマッチが妨げされ得るかまたはポリメラーゼ伸長を減少し得る、1つのプライマーの3'の最末端で、目的の変異を保有し得る(Prossner(1993)Tibtech 11:238)。さらに、変異の領域において新規な制限部位を導入することは、切断に基づく検出を行うために望ましくあり得る(Gaspariniら(1992)Mol Cell Probes 6:1)。特定の

実施形態において、増幅はまた、増幅用Taqリガーゼを使用して実施され得ることが予測される(Barany(1991)Proc Natl Acad Sci USA 88:189)。このような場合において、連結は、5'配列の3'末端に完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、増幅の存在または非存在を探索することによって、特定の部位で既知の変異の存在を検出することを可能にする。

#### 【0272】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実施され得、これは、例えば、PTMAX遺伝子を含む疾患または疾病の症状または家族病歴を示す患者を診断するための臨床的設定において簡便に使用され得る。

#### 【0273】

さらに、PTMAXが発現される任意の細胞型または組織(好ましくは、末梢白血球)は、本明細書中に記載される予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプル(例えば、頬粘膜細胞を含む)が、使用され得る。

#### 【0274】

(薬理ゲノム学(Pharmacogenomics))

PTMAX活性(例えば、PTMAX遺伝子発現)に対する刺激性または阻害性の影響を有する因子、すなわちモジュレーターは、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるように、異常なPTMAX活性に関連する障害(例えば、癌または免疫障害)を処置(予防的または治療的に)するために個体に投与され得る。このような処置と合わせて、個体の薬理ゲノム学(すなわち、個体の遺伝子型と外来化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係についての研究)が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗を導き得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づく予防的または治療的処置のために有効な薬剤(例えば、薬

物)の選択を許容する。このような薬理ゲノム学は、さらに、適切な投薬量および治療剤レジメンを決定するために使用され得る。従って、PTMAXタンパク質の活性、PTMAX核酸の発現、あるいは個体におけるPTMAX遺伝子の変異含量が決定されて、それによって個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。

#### 【0275】

薬理ゲノム学は、罹患された人において変更された薬物の性質および異常な作用に起因する、薬物に应答する臨床的に有意な遺伝性変更を扱う。例えば、Eichelbaum、Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996, 23:983~985およびLinder、Clin Chem, 1997, 43:254~266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学状態が、区別され得る。遺伝的状态は、薬物が身体に作用する方法を変更する1つの因子として伝達されるか(変更された薬物作用)、または遺伝的状态は、身体が薬物に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される(変更された薬物代謝)。これらの薬理ゲノム学状態は、稀な欠損としてか、または多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)欠損は、一般的な遺伝性酵素病であり、この主な臨床的合併症は、酸化剤薬物(抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

#### 【0276】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および期間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素(例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)およびシトクロムP450酵素CYP2D6およびCYP2C19)の遺伝的多型の発見は、なぜ幾人かの患者が予期される薬物効果を得ないか、または薬物の標準的かつ安全な用量を摂取した後に過大な薬物应答および深刻な毒性を示すことに関しての説明を提供した。これらの多型は、集団において2つの表現型(高い代謝能を持つ人(extensive metabolizer)(EM)および低い代謝能を持つ人(poor metabolizer)(PM))で発現される。PMの罹患率は、異なる集団の間で異なる

。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしていくらかの変異がPMにおいて同定されており、この全ては機能的CYP2D6の非存在に至る。CYP2D6およびCYP2C19の低い代謝能を持つ人は、彼らが標準的な用量を受ける場合に、かなり頻繁に過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝産物が活性な治療的部分である場合、そのCYP2D6形成代謝産物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるように、PMは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に応答しない、いわゆる超迅速な代謝能を持つ人である。最近、超迅速な代謝の基準となる分子は、CYP2D6遺伝子増幅に起因していることが同定されている。

#### 【0277】

従って、PTMAXのタンパク質の活性、PTMAXの核酸の発現、あるいは個体におけるPTMAXの遺伝子の変異内容を決定されて、それによって、その個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。さらに、薬理ゲノム学の研究を使用して、個体の薬物応答性の表現型の同定に対して薬物代謝酵素をコードする多型対立遺伝子の遺伝子型を適用し得る。この知見は、用量または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、従って、被験体をPTMAXの調節因子（例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイの1つによって同定される調節因子）を用いて処置する場合に治療的または予防的効率を増強し得る。

#### 【0278】

（臨床試験の間の効果のモニタリング）

PTMAXの発現または活性（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力）に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることは、基本的なスクリーニングにおいてのみならず、臨床試験においてもまた適用され得る。例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される薬剤が、PTMAXの遺伝子発現、タンパク質レベルを増加、またはPTMAX活性をアップレギュレートする効力を、減少したPTMAXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたPTMAXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターし得る。あるいは、スクリーニ

ングアッセイによって決定される薬剤が、PTMAXの遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはPTMAXの活性をダウンレギュレートする効力を、増加したPTMAXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたPTMAXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターし得る。このような臨床試験において、PTMAXの発現または活性、および好ましくは、例えば、細胞性増殖障害、または免疫障害に関与した他の遺伝子が、「リードアウト(読み出し)(read out)」、すなわち、特定の細胞の免疫応答のマーカ―として使用され得る。

#### 【0279】

例えば、限定の目的ではないが、PTMAXを含む遺伝子(これは、PTMAX活性(例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される)を調節する薬剤(例えば、化合物、薬物または低分子)を用いる処置によって、細胞内で調節される)が、同定され得る。従って、細胞性増殖障害に対する薬剤の効果を研究するために、例えば、臨床試験において、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、そしてPTMAXおよびこの障害に関与する他の遺伝子の発現のレベルについて分析され得る。遺伝子発現のレベル(すなわち、遺伝子発現パターン)は、本明細書中に記載されるように、ノーザンブロット分析もしくはRT-PCRによるか、あるいは産生されるタンパク質の量を測定することによるか、本明細書中に記載されるような方法の1つによるか、あるいはPTMAXまたは他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この様式で、この遺伝子発現パターンは、この薬剤に対する細胞の生理学的応答の指標であるマーカ―として作用し得る。従って、この応答状態は、この薬剤を用いる個体の処置の前、および処置の間の種々の時点で、決定され得る。

#### 【0280】

1つの実施形態において、本発明は、薬剤(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補物)を用いる、被験体の処置の効力をモニタリングするための方法を提供し、これは、

以下の工程を包含する：(i) 薬剤の投与の前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；(ii) この投与前サンプルにおいて、PTMAXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現のレベルを検出する工程；(iii) この被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程；(iv) この投与後サンプルにおいて、PTMAXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを検出する工程；(v) この投与前サンプルにおけるPTMAXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを、この投与後サンプルにおけるPTMAXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルと比較する工程；ならびに(vi) 従って、この被験体に対する薬剤の投与を変更する工程。例えば、この薬剤の増加した投与は、検出されるよりも高いレベルにPTMAXの発現または活性を増加するために（すなわち、この薬剤の効力を増加するために）望ましくあり得る。あるいは、この薬剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルにPTMAXの発現または活性を減少するために（すなわち、この薬剤の効力を減少するために）望ましくあり得る。

#### 【0281】

（処置の方法）

本発明は、異常なPTMAXの発現または活性に関連する障害の危険性のある（または感受性）か、またはこの障害を有する被験体を処置する予防的および治療的の両方の方法を提供する。例えば、PTMA 1～6、9、および10は、種々の癌、ウイルス性の病気、および免疫欠乏障害を処置する予防的および治療的の両方の方法に対して有用である。さらなる例として、PTMA 7は、種々の癌、冠状動脈障害、関節炎、糖尿病性網膜症、自己免疫疾患および免疫欠乏障害を処置する予防的および治療的の両方の方法に対して有用である。さらなる例として、PTMA 8は、神経性疾患、神経医学的な障害、および炎症性の障害を処置する予防的および治療的の両方の方法に対して有用である。

#### 【0282】

（障害）

（その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して）増加したレベルま

たは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を拮抗する（すなわち、低減または阻害する）治療剤を用いて処置され得る。活性を拮抗する治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：（i）上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導體、フラグメントもしくはホモログ；（ii）上記ペプチドに対する抗体；（iii）上記ペプチドをコードする核酸；（iv）アンチセンス核酸および「機能不全性」である（すなわち、上記ペプチドに対するコード配列のコード配列内の異種挿入に起因する）核酸の投与が、相同組換えによって上記ペプチドの内因性機能を「ロックアウトする」ために利用される（例えば、Capecci、1989、Science 244：1288～1292を参照のこと）；または（v）上記ペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させる、調節因子（すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト（本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに対して特異的な抗体を含む））。

#### 【0283】

（その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して）減少したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増加させる（すなわち、活性に対するアゴニストである）治療剤を用いて処置され得る。活性をアップレギュレートする治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導體、フラグメントもしくはホモログ；あるいはバイオアベイラビリティーを増加させるアゴニスト。

#### 【0284】

増加したレベルまたは減少したレベルは、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって、容易に検出され得る。この定量は、患者の組織サンプルを（例えば、生検組織から）入手し、そしてそのサンプルを、その発現したペプチド（または上記ペプチドのmRNA）のRNAレベルまたはペプチドレベル、構造および/または活性をインビトロでアッセイすることによる。当該分野において周知の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イムノア

ッセイ（例えば、ウェスタンブロット分析、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動が後に続く免疫沈降、免疫細胞化学などによる）および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）。

#### 【0285】

##### （予防的方法）

1つの局面において、本発明は、被験体において異常なPTMAXの発現または活性と関連する疾患または状態を、PTMAXの発現または少なくとも1つのPTMAX活性を調節する薬剤をこの被験体に投与することによって予防するための方法を提供する。異常なPTMAXの発現または活性によって引き起こされるかまたはこれらに起因する、疾患にかかる危険がある被験体は、例えば、本明細書中に記載の診断アッセイまたは予後アッセイのいずれか、またはそれらの組み合わせによって、同定され得る。予防薬剤の投与は、疾患または障害が予防されるか、あるいはその進行を遅らせられるように、このPTMAX異常の特徴である症状の発現の前に行い得る。このPTMAX異常の型に依存して、例えば、PTMAXアゴニスト薬剤またはPTMAXアンタゴニスト薬剤が、その被験体を処置するために使用され得る。その適切な薬剤は、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。本発明の予防方法は、以下の小区分において、さらに議論される。

#### 【0286】

##### （治療方法）

本発明の別の局面は、治療目的のためのPTMAXの発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、その細胞に関するPTMAXタンパク質活性の活性のうちの1つ以上を調節する薬剤と接触させる工程を包含する。PTMAXタンパク質活性を調節する薬剤は、核酸またはタンパク質、PTMAXタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、PTMAXペプチド模倣物、または他の低分子のような、本明細書中に記載されるような薬剤であり得る。1つの実施形態において、この薬剤は、PTMAXタンパク質活性のう

ちの1つ以上を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、活性なPTMAXタンパク質、およびその細胞に導入されたPTMAXをコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、PTMAXタンパク質活性のうち1つ以上を阻害する。このような阻害薬剤の例としては、アンチセンスPTMAX核酸分子、および抗PTMAX抗体が挙げられる。これらの調節方法は、インビトロで（例えば、その薬剤とともにその細胞を培養することによって）、あるいはインビボで（例えば、被験体にその薬剤を投与することによって）実施され得る。このように、本発明は、PTMAXのタンパク質または核酸分子の、異常な発現または異常な活性によって特徴付けられる、疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、PTMAXの発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）薬剤（例えば、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される薬剤）あるいはそのような薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、PTMAXのタンパク質または核酸分子を、低減したかまたは異常な、PTMAXの発現または活性を補償するための治療として、投与する工程を包含する。

#### 【0287】

PTMAX活性の刺激は、PTMAXが異常にダウンレギュレートされている状況、および/またはPTMAX活性の増加が有益な効果を有するようである状況において、望ましい。このような状況の1つの例は、被験体が、異常な細胞増殖および/または細胞分化によって特徴付けられる障害（例えば、癌または免疫に関連する障害）を有する場合である。このような状況の別の例は、被験体が妊娠疾患（例えば、プレクランプシア（preclampsia））を有する場合である。

#### 【0288】

（治療剤の生物学的効果の決定）

本発明の種々の実施形態において、適切なインビトロまたはインビボアッセイを利用して、特定の治療剤の効果およびその投与が罹患組織の処置を示すか否かを決定する。

## 【0289】

種々の特定の実施形態において、インビトロアッセイが患者の障害に關与する代表的な細胞型で行われ、所定の治療剤がこの細胞型に対して所望の効果を発揮したか否かを決定し得る。治療において使用する化合物は、ヒト被験体において試験する前に適切な動物モデル系において試験され得る。これらの動物モデル系としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなど。同様に、インビボ試験については、当該分野で公知の任意の動物モデル系が、ヒト被験体に対する投与の前に使用され得る。

## 【0290】

(悪性疾患)

本発明の治療剤は、細胞の過剰増殖および/または細胞増殖の制御の欠損(例えば、癌、悪性疾患および腫瘍)に關連する疾患または障害の治療的処置または予防的処置において有用であり得る。そのような過剰増殖障害の総説について、例えば、Fishmanら、1985、MEDICINE、第2版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PAを参照のこと。

## 【0291】

本発明の治療剤を、悪性疾患および關連する障害の処置または予防における効力について、当該分野内において公知の任意の方法によってアッセイし得る。そのようなアッセイとしては、形質転換された細胞または患者の腫瘍由来の細胞を利用するインビトロアッセイ、ならびに癌または悪性疾患の動物モデルを使用するインビボアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。可能性のある有効な治療剤は、例えば、コントロールと比較して、培養物中での腫瘍由来細胞または形質転換細胞の増殖を阻害するか、または動物モデルにおいて腫瘍の後退を生じる治療剤である。

## 【0292】

本発明の実施において、一旦、悪性疾患または癌が、活性を調節すること(すなわち、阻害するか、アンタゴナイズするか、またはアゴナイズする)による処置に対して感受性であることが示されると、引き続いて、その癌または悪性疾患が、タンパク質機能を調節するように作用する治療剤の投与によって処置または

予防され得る。

【0293】

(前悪性状態)

癌または悪性疾患の治療または予防処置において有効な本発明の治療剤はまた、前悪性状態の処置のためおよび/または前悪性から新生物状態もしくは悪性疾患状態への進行を防ぐために投与され得る。そのような予防的用途または治療的用途が、先行する新生物または癌への進行が知られているか、またはそれが疑われる状態(特に、過形成、化生、または最も特に、異形成からなる非新生物細胞増殖が生じた場合)において、示される。そのような異常な細胞増殖の総説について、例えば、RobbinsおよびAngell、1976、BASIC PATHOLOGY、第2版、W.B. Saunders Co.、Philadelphia、PAを参照のこと。

【0294】

過形成は、細胞の構造または機能における有意な変化なしに、組織または器官における細胞数の増加を含む、制御された細胞の増殖の形態である。例えば、子宮内膜の過形成は、しばしば子宮内膜癌に進行することが実証されている。化生は、成熟した細胞または十分に分化した細胞の1つの型が、成熟した細胞の別の型に置換する、制御された細胞増殖の形態である。化生は、上皮組織細胞または結合組織細胞において生じ得る。異形成は、一般に癌の前駆体であると考えられ、そして上皮において主に見出される。異形成は、非新生物細胞増殖の最も無秩序な形態であり、個々の細胞の均一性および細胞の構築上の配向の損失を含む。異形成は、慢性の刺激または炎症が存在する場所で特徴的に生じ、そしてしばしば、頸部、気道、口腔、および胆嚢において見出される。

【0295】

あるいは、または過形成、化生、もしくは異形成として特徴付けられる異常な細胞増殖の存在に加えて、患者由来の細胞サンプル内で、インビボまたはインビトロのいずれかにおいて示される形質転換表現型または悪性疾患表現型の1つ以上の特徴の存在が、上記のタンパク質の活性を調節する能力を有する治療剤の予防的/治療的投与の望ましさを示す。形質転換された表現型の特徴としては、以

下が挙げられるが、これらに限定されない：(i)形態学的変化；(ii)よりゆるい、下層への付着；(iii)細胞間接触阻止の喪失；(iv)足場依存性の喪失；(v)プロテアーゼ放出；(vi)増加した糖輸送；(vii)減少した血清要求性；(viii)胎児抗原の発現；(ix)250kDa細胞表面タンパク質の消滅など。例えば、Richardsら1986、MOLECULAR PATHOLOGY、W.B.Saunders Co、Philadelphia、PAを参照のこと。

#### 【0296】

本発明の特定の実施形態において、悪性疾患についての以下の1つ以上の素因を示す患者が、治療剤の有効量の投与によって処置される：(i)悪性疾患に関連する染色体転座（例えば、慢性骨髄性白血病についてのフィラデルフィア染色体(bcr/abl)および濾胞性リンパ腫についてのt(14;18)など）；(ii)家族性ポリープ症またはガードナー症候群（結腸癌の可能性のある前兆）；(iii)未確認の重要性の単クローン性高ガンマグロブリン血症（多発性骨髄腫の可能性のある前駆体）；ならびに(vi)メンデル（遺伝子）遺伝パターンを示す癌または前癌疾患（例えば、結腸の家族性ポリープ症、ガードナー症候群、遺伝性外骨腫症、多発性内分泌腺腫症(polyendocrine adenomatosis)、ポイツ-ジェガーズ症候群、フォン・レックリングハウゼン病の神経線維腫症、アミロイド産生および褐色細胞腫をともなう甲状腺髄様癌(medullary thyroid carcinoma)、網膜芽細胞腫、頸動脈小体腫瘍、皮膚の黒色癌、眼内の黒色癌、色素性乾皮症、毛細血管拡張性運動失調、チェディアック-東症候群、白子症、ファンコーニ再生不良性貧血およびブルーム症候群)を有する人の一親等。

#### 【0297】

別の実施形態において、本発明の治療剤が、ヒト患者に投与されて、乳癌、結腸癌、肺癌、膵臓癌、または子宮癌、あるいは黒色腫または肉腫の進行を防ぐ。

#### 【0298】

(過剰増殖性障害および異常増殖性(dysproliferative)障害)

本発明の1つの実施形態において、治療剤が、過剰増殖性障害または良性の異常増殖性障害の治療的処置または予防的処置において投与される。過剰増殖性疾患または障害の処置または予防における本発明の治療剤の効力が、当該分野において公知の任意の方法によってアッセイされ得る。そのようなアッセイとしては、インビトロの細胞増殖アッセイ、過剰増殖性疾患または障害の動物モデルを使用するインビトロまたはインビボアッセイなどが挙げられる。可能性のある効果的な治療剤は、例えば、コントロールとの比較において、培養物中の細胞増殖を促進し得るか、あるいは動物モデルにおける増殖または細胞増殖を生じ得る。

#### 【0299】

本発明の特定の実施形態は、肝臓の肝硬変（癒痕が、通常の肝臓再生プロセスを上回る状態）；癒痕プロセスが通常の再生を妨げる、皮膚の形状を損じることを生じるケロイド（過形成性癒痕）形成の処置；乾癬（皮膚の過剰な増殖および適切な細胞運命の決定の遅延によって特徴付けられる一般的な皮膚の状態）；良性腫瘍；線維性嚢状態および組織肥厚（例えば、良性脾臓肥厚）の処置または予防に関する。

#### 【0300】

（神経変性障害）

P T M A X タンパク質は、細胞成熟の脱調節およびアポトーシス（この両方が神経変性疾患の特徴である）に関係している。従って、本発明の治療剤（限定されることはないが、特に上記のタンパク質の活性を調節（または供給）する治療剤）が、神経変性疾患の処置または予防において効果的であり得る。神経変性障害に關与する上記のタンパク質の活性を調節する本発明の治療剤を、そのような神経変性疾患および障害を処置または予防することにおける効力について、当該分野において公知の任意の方法によってアッセイし得る。そのようなアッセイとしては、調節された細胞成熟もしくはアポトーシスの阻害についてのインビトロアッセイ、または神経変性疾患もしくは障害の動物モデルを使用するインビボアッセイ、あるいは以下に記載する任意のアッセイが挙げられる。可能性のある効果的な治療剤は、例えば限定されないが、コントロールと比較して、調節された細胞成熟を促進し、培養物中の細胞アポトーシスを防ぎ、あるいは動物モデルに

おける神経変性を減少する。

【0301】

一旦、神経変性疾患または障害が、調節活性による処置に対して感受性であることが示されると、その神経変性疾患または障害が、活性を調節する治療剤の投与によって処置または予防され得る。そのような疾患としては、加齢に關与する全ての变性性障害（特に、変形性関節症および神経変性障害）が挙げられる。

【0302】

（器官移植に關連する障害）

P T M A Xは、器官移植に關連する障害（特に、限定されないが、器官拒絶反応）に關係している。本発明の治療剤（特に、活性を調節（または供給）する治療剤）は、器官移植に關連する疾患または障害の処置または予防において効果的であり得る。本発明の治療剤（特に、上記タンパク質のレベルまたは活性を調節する治療剤）は、このような器官移植に關連する疾患および障害の処置または予防における効力について、当該分野で公知の任意の方法によってアッセイされ得る。このようなアッセイとしては、下記のような細胞培養モデルを使用するインビトロアッセイ、または器官移植に關連する疾患および障害の動物モデルを使用するインビボアッセイが挙げられる（例えば、以下を参照のこと）。潜在的に効果的な治療剤は、例えば、限定されないが、コントロールに対して比較して、動物モデルにおける免疫拒絶応答を減少する。

【0303】

従って、一旦、器官移植に關連する疾患および障害が、活性の調節による処置に対して感受性であることが示されると、このような疾患または障害は、活性を調節する治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0304】

（サイトカインおよび細胞増殖/分化活性）

本発明のP T M A Xタンパク質は、サイトカイン活性、細胞増殖活性（誘導するか、または阻害するかのいずれか）、または細胞分化活性（誘導するか、または阻害するかのいずれか）を示し得るか、あるいは特定の細胞集団における他のサイトカインの産生を誘導し得る。全ての既知のサイトカインを含む、現在まで

に発見された多くのタンパク質因子は、因子依存性の1以上の細胞増殖アッセイにおいて活性を示し、従って、これらのアッセイは、サイトカイン活性の簡便な確認法として作用する。本発明のタンパク質の活性は、以下を含むが、これらに限定されない細胞株についての多くの従来の因子依存性細胞増殖アッセイの任意の1つによって確認される：32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BaF3、MC9/G、M+(preB M+)、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTLL2、TF-1、Mo7eおよびCMK。

#### 【0305】

本発明のタンパク質の活性は、数ある方法でもとりわけ、以下の方法によって測定され得る：以下に記載されるアッセイを含むが、これらに限定されない、T細胞増殖または胸腺細胞増殖についてのアッセイ：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Coliganら編、Green Publishing Associates and Wiley-Interscience (第3章および第7章)；Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986；Bertagnoliら、J Immunol 145:1706-1712、1990；Bertagnoliら、Cell Immunol 133:327-341、1991；Bertagnoliら、J Immunol 149:3778-3783、1992；Bowmanら、J Immunol 152:1756-1761、1994。

#### 【0306】

脾細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞のサイトカイン産生および/または増殖についてのアッセイとしては、KruisbeekおよびShevach：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、3.12.1-14頁、John Wiley and Sons, Toronto 1994；およびSchreiber：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.8.1-8頁、John Wiley and Sons, Toron

to 1994に記載のアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。

【0307】

造血細胞およびリンパ球産生細胞の増殖および分化についてのアッセイとしては、以下によって記載されるアッセイが挙げられるが、これに限定されない：Bottomlyら：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.3.1-6.3.12頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991；deVriesら、J Exp Med 173:1205-1211, 1991；Moreauら、Nature 336:690-692, 1988；Greenbergerら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 80:2931-2938, 1983；Nordanら：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.6.1-5頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991；Smithら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 83:1857-1861, 1986；Measurement of human Interleukin 11 - Bennettら：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.15.1頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991；Ciarlettaら：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.13.1頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991。

【0308】

抗原に対するT細胞クローン応答についてのアッセイ（とりわけ、増殖およびサイトカイン産生を測定することによって、APC-T細胞相互作用に影響し、そしてT細胞の効果を指向するタンパク質を同定する）としては、以下に記載されるアッセイが挙げられるが、これらに限定されない：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、Green Publishing Associates and Wiley-Interscience（第3章、第6章および第7章）；Weinbergerら

、Proc Natl Acad Sci USA 77:6091-6095, 1980; Weinbergerら、Eur J Immun 11:405-411, 1981; Takaiら、J Immunol 137:3494-3500, 1986; Takaiら、J Immunol 140:508-512, 1988。

#### 【0309】

(免疫刺激活性または免疫抑制活性)

本発明のPTMAXタンパク質はまた、免疫刺激活性または免疫抑制活性（アッセイが本明細書中に記載される活性を含むが、これらに限定されない）を示し得る。タンパク質は、種々の免疫不全および免疫障害（重症複合型免疫不全（SCID）を含む）の処置（例えば、Tリンパ球および/またはBリンパ球の成長および増殖の（上方または下方）調節、ならびにNK細胞および他の細胞集団の細胞溶解活性の誘発）において有用であり得る。これらの免疫不全は、遺伝性であり得るか、またはウイルス（例えば、HIV）および細菌感染または真菌感染によって引き起こされ得るか、あるいは自己免疫障害から生じ得る。より詳細には、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染または他の感染によって引き起こされる感染性疾患は、本発明のタンパク質を使用して処置可能であり得、この感染としては、HIV、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ミコバクテリア、リーシュマニア種、マラリア種による感染、およびカンジダ症のような種々の真菌感染が挙げられる。もちろん、この点に関して、本発明のタンパク質はまた、免疫系に対するブーストが、一般に所望され得る（すなわち、癌の処置において）場合に有用であり得る。

#### 【0310】

本発明のタンパク質を使用して処置され得る自己免疫障害としては、例えば、以下が挙げられる：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、インスリン依存性真性糖尿病、重症筋無力症、対宿主性移植片病および自己免疫性炎症性眼疾患。本発明のこのようなタンパク質はまた、喘息（特に、アレルギー性喘息）または他の呼吸系障害のような、アレルギー反応およびアレルギー

状態の処置に有用であり得る。免疫抑制が所望される他の状態（例えば、器官移植を含む）もまた、本発明のタンパク質を使用して処置可能であり得る。

#### 【0311】

本発明のタンパク質を使用して、多くの方法で、免疫応答することが可能であり得る。下方調節は、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であり得るか、免疫応答の誘導を妨げることを含み得る。活性化T細胞の機能は、T細胞応答を抑制することによってか、またはT細胞における特異的寛容を誘導することによってか、あるいはその両方によって阻害され得る。T細胞応答の免疫抑制は、一般に、抑制剤に対するT細胞の連続的曝露を必要とする、能動的な非抗原特異的プロセスである。寛容（T細胞における非応答性またはアネルギー（energy）を誘導することを含む）は、一般的に抗原特異的であり、そして寛容化剤に対する曝露が停止した後で持続するという点で免疫抑制と識別可能である。操作的には、寛容は、寛容化剤の非存在下における特異的抗原に対する再曝露の際に、T細胞応答の欠如によって実証され得る。

#### 【0312】

1以上の抗原機能（Bリンパ球抗原機能（例えば、B7のような）を含むが、限定されない）を下方調節するか、または妨げる（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を妨げる）ことは、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細胞機能のブロックは、組織移植における組織破壊の減少を生じるはずである。代表的に、組織移植において、移植片の拒絶は、T細胞によるその外来としての認識、それに続く移植片を破壊する免疫反応を介して開始される。移植前に免疫細胞上でB7リンパ球抗原のその天然のリガンドとの相互作用を阻害またはブロックする分子（例えば、B7-2活性を有するペプチドの可溶性モノマー形態単独、あるいは別のBリンパ球抗原（例えば、B7-1、B7-3）またはブロッキング抗体の活性を有するペプチドのモノマー形態との組み合わせ）の投与は、対応する同時刺激シグナルの伝達を伴わずに、免疫細胞上でその分子の天然のリガンドへの結合を導き得る。このような形態でBリンパ球抗原機能をブロックすることは、免疫細胞（例えば、T細胞）によるサイトカイン合成を妨げ、従

って、免疫抑制剤として作用する。さらに、同時刺激の欠如はまた、T細胞を活性化して、それによって被験体において寛容を誘導するのに十分であり得る。Bリンパ球抗原ブロッキング試薬による長期の寛容の誘導は、これらのブロッキング試薬の繰り返しの投与の必要性を回避し得る。被験体において十分な免疫抑制または寛容を達成するために、Bリンパ球抗原の機能をブロックすることもまた必要であり得る。

#### 【0313】

器官移植片拒絶またはGVHDの予防における特定のブロッキング試薬の効力は、ヒトにおける効力を予測する動物モデルを使用して評価され得る。使用され得る適切な系の例としては、ラットにおける同種異系の心臓移植片およびマウスにおける異種膵臓島細胞移植片が挙げられ、その両方は、Lenschowら、*Science* 257:789-792(1992)およびTurkaraら、*Proc Natl Acad Sci USA*, 89:11102-11105(1992)に記載されるようなインビゴでのCTLA4Ig融合タンパク質の免疫抑制効果を試験するために使用されている。さらに、GVHDのマウスモデル(Paul編、*FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY*、Raven Press、New York、1989、846~847頁を参照のこと)は、その疾患の発症に対する、インビゴでのBリンパ球抗原機能のブロックの効果を決定するために使用され得る。

#### 【0314】

ブロッキング抗原機能はまた、自己免疫疾患の処置に治療的に有用であり得る。多くの自己免疫疾患は、自己組織に対して反応性であり、そしてその疾患の病理に関係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である。自己反応性T細胞の活性化の予防は、疾患の症状を軽減し得るか、または排除し得る。Bリンパ球抗原のレセプター：リガンド相互作用を破壊することによってT細胞の同時刺激をブロックする試薬の投与は、T細胞の活性化を阻害し、そしてその疾患プロセスに関係し得る自己抗体またはT細胞誘導性サイトカインの産生を妨げるために使用され得る。さらに、ブロッキング試薬は、疾患の長期の軽減を導き得る自己反応性T細胞の抗原特異的寛容を誘導し

得る。自己免疫障害の予防または軽減におけるブロック試薬の効力は、ヒト自己免疫疾患のよく特徴付けられた多くの動物モデルを使用して決定され得る。例としては、マウス実験用自己免疫脳炎、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、マウス自己免疫コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBラットにおける真性糖尿病、ならびにマウス実験用重症筋無力症が挙げられる(Paul編、FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY、Raven Press、New York、1989、840～856頁を参照のこと)。

#### 【0315】

免疫応答を上方調節する手段として、抗原機能(好ましくは、Bリンパ球抗原機能)の上方調節もまた、治療に有用であり得る。免疫応答の上方調節は、既存の免疫応答を増強するか、または初期免疫応答を誘発する形態であり得る。例えば、Bリンパ球抗原機能の刺激を介して免疫応答を増強することは、ウイルス感染の場合において有用であり得る。さらに、全身性ウイルス疾患(例えば、インフルエンザ、感冒および脳炎)は、Bリンパ球抗原の刺激形態の全身性投与によって軽減され得る。

#### 【0316】

あるいは、抗ウイルス免疫応答は、患者からT細胞を除去し、本発明のペプチドを発現するか、または本発明の可溶性ペプチドの刺激形態を伴うかのいずれかの、ウイルス抗原でパルスしたAPCで、このT細胞をインビトロで同時刺激し、そして患者にこのインビトロ活性化T細胞を再導入することによって、感染患者において増強され得る。抗ウイルス免疫応答を増強する別の方法は、患者から感染細胞を単離し、本明細書中に記載されるような本発明のタンパク質をコードする核酸を、この感染細胞にトランスフェクトして(その結果、これらの細胞がその表面上にこのタンパク質の全てまたは一部を発現する)、そしてこのトランスフェクト細胞を患者に再導入することである。ここで、この感染細胞は、インビボでT細胞に対して同時刺激シグナルを送達し、それによってT細胞を活性化することが可能である。

#### 【0317】

別の適用では、抗原機能（好ましくはBリンパ球抗原機能）の上方調節または増大が腫瘍免疫の誘導において有用であり得る。本発明の少なくとも1つのペプチドをコードする核酸をトランスフェクトされた腫瘍細胞（例えば、肉腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、癌腫）を、被験体中の腫瘍特異的寛容を克服するために被験体に投与し得る。所望であれば、腫瘍細胞はトランスフェクトされてペプチドの組み合わせを発現し得る。例えば、患者から得られた腫瘍細胞に、B7-2-様活性を有するペプチド単独、またはB7-1-様活性および/またはB7-3-様活性を有するペプチドを組み合わせで発現する発現ベクターを用いて、エクスピボでトランスフェクトし得る。このトランスフェクトされた腫瘍細胞は、患者に戻され、トランスフェクトされた細胞の表面上にペプチドの発現を生じる。あるいは、遺伝子治療技法を用いて、インスピボのトランスフェクションのために腫瘍細胞を標的化し得る。

#### 【0318】

腫瘍細胞の表面上のB細胞リンパ球抗原の活性を有する本発明のペプチドの存在は、T細胞に対して必要な同時刺激シグナルを提供し、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対するT細胞媒介免疫応答を誘導する。さらに、MHCクラスIまたはMHCクラスII分子を欠くか、または十分な量のMHCクラスIまたはMHCクラスII分子を再発現しない腫瘍細胞は、MHCクラスI鎖タンパク質および<sub>2</sub>マイクログロブリンタンパク質、またはMHCクラスII a鎖タンパク質およびMHCクラスII鎖タンパク質のすべてまたは一部（例えば、細胞質-ドメイン短縮化部分）をコードする核酸でトランスフェクトされ得、それによって細胞表面上にMHCクラスIまたはMHCクラスIIタンパク質を発現する。Bリンパ球抗原（例えば、B7-1、B7-2、B7-3）の活性を有するペプチドと組み合わせた適切なクラスIまたはクラスII MHCの発現は、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対するT細胞媒介性免疫応答を誘導する。必要に応じて、不変鎖（invariant chain）のようなMHCクラスII関連タンパク質の発現をブロックするアンチセンス構築物をコードする遺伝子もまた、Bリンパ球抗原の活性を有するペプチドをコードするDNAで同時トランスフェクトされ得、腫瘍関連抗原の提示を促進し、そして腫瘍特異的免疫を誘導する

。従って、ヒト被験体におけるT細胞媒介免疫応答の誘導は、被験体における腫瘍特異的寛容を十分に克服し得る。

【0319】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法により測定され得る：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第3章、第7章)；Herrmannら、Proc Natl Acad Sci USA 78:2488-2492、1981；Herrmannら、J Immunol 128:1968-1974、1982；Handaら、J Immunol 135:1564-1572、1985；Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986；Takaiら、J Immunol 140:508-512、1988；Herrmannら、Proc Natl Acad Sci USA 78:2488-2492、1981；Herrmannら、J Immunol 128:1968-1974、1982；Handaら、J Immunol 135:1564-1572、1985；Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986；Bowmanら、J Virology 61:1992-1998；Takaiら、J Immunol 140:508-512、1988；Bertagnolliら、Cell Immunol 133:327-341、1991；Brownら、J Immunol 153:3079-3092、1994に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない、胸腺細胞または脾細胞の細胞傷害性のための適切なアッセイ。

【0320】

T細胞依存性免疫グロブリン応答およびアイソタイプスイッチングのための(特に、T細胞依存性抗体応答を調節し、しかもTh1/Th2プロフィールに影響するタンパク質を同定する)アッセイとしては、Maliszewski、J Immunol 144:3028-3033、1990；ならびにMondおよびBrunswick、CURRENT PROTOCOLS IN IM

MUNOLOGY、Coliganら編、第1巻、3.8.1.-3.8.16頁、John Wiley and Sons、Toronto 1994に記載のようなアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0321】

混合リンパ球反応(MLR)アッセイ(特に、優先的にTh1およびCTL応答を生成するタンパク質を同定するアッセイ)としては、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganら編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(第3章、第7章); Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986; Takaiら、J Immunol 140:508-512、1988; Bertagnolliら、J Immunol 149:3778-3783、1992に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0322】

樹状細胞依存性アッセイ(特に、ナイーブなT細胞を活性化する樹状細胞により発現されるタンパク質を同定するアッセイ)としては、Gueryら、J Immunol 134:536-544、1995; Inabaら、J Exp Med 173:549-559、1991; Macatoniaら、J Immunol 154:5071-5079、1995; Porgadorら、J Exp Med 182:255-260、1995; Nairら、J Virol 67:4062-4069、1993; Huangら、Science 264:961-965、1994; Macatoniaら、J. Exp Med 169:1255-1264、1989; Bhardwajら、J Clin Investig 94:797-807、1994; および Inabaら、J Exp Med 172:631-640、1990に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0323】

リンパ球生存/アポトーシスのためのアッセイ(特に、スーパー抗原誘導後にアポトーシスを妨げるタンパク質およびリンパ球ホメオスタシスを調節するタン

パク質を同定する)としては、Darzynkiewiczら、Cytometry 13:795-808、1992;Gorczycaら、Leukemia 7:659-670、1993;Gorczycaら、Cancer Res 53:1945-1951、1993;Itohら、Cell 66:233-243、1991;Zacharchuk、J Immunol 145:4037-4045、1990;Zamaiら、Cytometry 14:891-897、1993;Gorczycaら、Internat J Oncol 1:639-648、1992に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0324】

T細胞の拘束および発生の初期段階に影響するタンパク質のアッセイとしては、Anticaら、Blood 84:111-117、1994;Fineら、Cell Immunol 155:111-122、1994;Galyら、Blood 85:2770-2778、1995;Tokiraら、Proc Nat Acad Sci USA 88:7548-7551、1991に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0325】

(造血調節活性)

本発明のPTMAXタンパク質は、造血の調節において、そして結果として骨髄細胞不全またはリンパ球細胞不全の処置において有用であり得る。コロニー形成性細胞または因子依存性細胞株を支援する周縁の生物学的活性でさえ、造血を調節することにおける、例えば、単独またはその他のサイトカインとの組み合わせで、赤血球系前駆体細胞の成長および増殖を支援することにおける関与を示し、それによって、例えば、種々の貧血を処置することにおけるか、または赤血球系前駆体細胞および/または赤血球細胞の産生を刺激するための照射/化学療法と組み合わせた使用のための有用性;例えば、結果として骨髄抑制を防ぐかまたは処置するための化学療法と組み合わせる有用な、骨髄細胞(例えば、顆粒球および単球/マクロファージ)の成長および増殖を支持する(すなわち伝統的なCSF活性)ことにおける有用性;巨核球そして結果として血小板の成長および増

殖を支持し、それによって血小板減少症のような種々の血小板障害の予防または処置を可能にすること、そして一般に、血小板輸血に代わる使用か、またはそれへの優待のための有用性；および/または上記の任意および全ての造血幹細胞に成熟し得、そしてそれ故、種々の幹細胞障害（再生不良性貧血および発作性夜行性ヘモグロビン尿を含むがこれらに限定されない、通常、移植で処置されるような障害）における治療有用性を見出す、造血幹細胞の成長および増殖を支持することにおける有用性、ならびに正常細胞または遺伝子治療のために遺伝子操作された細胞として、インビボまたはエキソビボ（すなわち、骨髄移植または末梢前駆体細胞移植（同種または異種）と組み合わせた）のいずれかで、照射/化学療法後に幹細胞区画を再増殖させることにおける有用性を示す。

【0326】

本発明のタンパク質の活性は、特に、以下の方法により測定され得る：  
種々の造血株の増殖および分化の適切なアッセイは上記で引用される。

【0327】

胚幹細胞分化のアッセイ（特に、胚分化造血に影響するタンパク質を同定するアッセイ）は、制限されずに：Johanssonら、Cell Biology 15：141-151、1995；Kellerら、Mol. Cell. Biol. 13：473-486、1993；McClanahanら、Blood 81：2903-2915、1993に記載のアッセイを含む。

【0328】

幹細胞生存および分化のアッセイ（特にリンパ-造血を調節するタンパク質を同定するアッセイ）は、制限されずに：メチルセルロースコロニー形成アッセイ、Freshney：CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 265-268頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994；Hirayamaら、Proc Natl Acad Sci USA 89：5907-5911、1992；McNieceおよびBridgeli：CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 23-39頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1

994; Nebenr, Exp Hematol 22:353-359, 1994; Ploemacher: CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyr, 編, Vol 1-21頁, Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994; Spooncer etr: CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyr, 編, Vol 163-179頁, Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994; Sutherland: CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyr, 編, Vol 139-162頁, Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994に記載のアッセイを含む。

【0329】

(組織増殖活性)

本発明のPTMAXタンパク質はまた、神経組織成長または再生のために使用される組成物、ならびに創傷治癒および組織修復および組織置換のために使用される組成物における有用性を有し得る。

【0330】

本発明のタンパク質はまた、ニューロン細胞の増殖のため、および神経および脳組織の再生のために、すなわち、中枢神経系疾患および末梢神経系疾患および神経障害、ならびにニューロン細胞または神経組織への変性、死滅または外傷を含む機械的および外傷障害の処置のために有用であり得る。より詳細には、タンパク質は、末梢神経損傷、末梢神経障害および局所神経障害のような末梢神経系の疾患、ならびにアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮側索硬化症、およびシャイ-ドレーガー症候群のような中枢神経系の疾患の処置で用いられ得る。本発明に従って処置され得るさらなる症状は、脊髄障害、頭部外傷および発作のような脳血管性疾患のような機械的および外傷的障害を含み得る。化学的療法またはその他の医療治療から生じる末梢神経障害もまた、本発明のタンパク質を用いて治療可能であり得る。

【0331】

本発明のタンパク質はまた、圧迫性潰瘍、血管不全に関連する潰瘍、手術およ

び外傷創傷などを含むがこれらに限定されない非治癒創傷のより良好な、またはより迅速な閉鎖を促進するために有用であり得る。

#### 【0332】

本発明のタンパク質がまた、器官（例えば、脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮を含む）、筋肉（平滑筋、骨格筋または心筋）および血管（血管内皮を含む）組織のようなその他の組織の生成または再生に、またはこのような組織を含む細胞の増殖を促進するために活性を示し得ることが予想される。所望の効果の一部は、線維症瘢痕の阻害または調整によってであり得、正常組織を再生させる。本発明のタンパク質はまた、血管形成活性を示し得る。

#### 【0333】

本発明のタンパク質はまた、腸の保護または再生のため、および肺もしくは肝臓の線維症、種々の組織における再灌流傷害、および全身サイトカイン損傷から生じる症状の処置のために有用であり得る。

#### 【0334】

本発明のタンパク質はまた、前駆体組織または細胞から上記の組織の分化を促進もしくは阻害するため；または上記の組織の増殖を阻害するために有用であり得る。

#### 【0335】

本発明のタンパク質の活性はまた、特に、以下の方法により測定され得る：  
組織生成活性のためのアッセイは、制限されずに：国際特許公開番号WO95/16035（骨、軟骨、腱）；国際特許公開番号WO95/05846（神経、ニューロン）；国際特許公開番号WO91/07491（皮膚、内皮）に記載されるアッセイを含む。

#### 【0336】

創傷治癒活性のためのアッセイは、制限されずに：Eaglst einおよびMenz、J. Invest. Dermatol 71:382-84(1978)によって改変されるような、Winter、EPIDERMAL WOUND HEALING、71-112頁(MaibachおよびRovee編)、Year Book Medical Publishers、Inc.、Ch

i c a g oに記載のアッセイを含む。

【0337】

(走化性/ケモキネシス活性)

本発明のタンパク質は、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/または内皮細胞を含む)についての走化性またはケモキネシス活性(例えば、ケモカインとして作用する)を有し得る。走化性およびケモキネシスタンパク質を使用して、所望の細胞集団を所望の作用部位に動員または誘引し得る。走化性またはケモキネシスタンパク質は、組織に対する創傷および他の外傷の処置、ならびに局所的感染の処置において、特に利点を提供する。例えば、リンパ球、単球または好中球の、腫瘍または感染部位への誘引は、腫瘍または感染因子に対する改善された免疫応答を生じ得る。

【0338】

タンパク質またはペプチドは、それが直接的または間接的に、特定の細胞集団の指向された方向付けまたは移動を刺激し得る場合、そのような細胞集団について走化性活性を有する。好ましくは、タンパク質またはペプチドは、細胞の移動を直接刺激する能力を有する。特定のタンパク質が細胞の集団について走化性活性を有するか否かは、細胞の走化性についての任意の公知のアッセイにおいて、そのようなタンパク質またはペプチドを使用することによって、容易に決定され得る。

【0339】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る。走化性活性についてのアッセイ(走化性を誘導するか、または妨げるタンパク質を同定する)は、細胞の膜を横切った移動を誘導するタンパク質の能力、ならびに1つの細胞集団の別の細胞集団に対する接着を誘導するタンパク質の能力を測定するアッセイからなる。移動および接着についての適切なアッセイとしては以下に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganら編(第6.12章、MEASUREMENT OF ALPHA AND BETA CHEMOKINES 6.12.1~6.12.28); Taubら、J C

lin Invest 95:1370~1376、1995; Lindã、A  
PMIS 103:140~146、1995; Mullerã、Eur J  
Immunol 25:1744~1748; Gruberetã、J Imm  
unol 152:5860~5867、1994; Johnstonã、J  
Immunol 153:1762~1768、1994。

#### 【0340】

(レセプター/リガンド活性)

本発明のタンパク質はまた、レセプター、レセプターリガンドまたはレセプター/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を実証し得る。そのようなレセプターおよびリガンドの例としては、限定することなく、サイトカインレセプターおよびそのリガンド、レセプターキナーゼおよびそのリガンド、レセプターホスファターゼおよびそのリガンド、細胞間相互作用に關与するレセプターおよびそのリガンド(限定することなく、細胞接着分子(例えば、セレクトリン、インテグリンおよびそのリガンド)、ならびに抗原提示、抗原認識および細胞性免疫応答および体液性免疫応答の發生に關与するレセプター/リガンド対を含む)が挙げられる。レセプターおよびリガンドはまた、關連するレセプター/リガンド相互作用の可能性のあるペプチドまたは低分子インヒビターのスクリーニングにおいて有用である。本発明のタンパク質(限定することなく、レセプターおよびリガンドのフラグメントを含む)が、それ自体で、レセプター/リガンド相互作用のインヒビターとして有用であり得る。

#### 【0341】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る。レセプター-リガンド活性の適切なアッセイとしては、限定することなく、以下に記載されるものが挙げられる: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganã編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第7.28章、Measurement of Cellular Adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22)、Takaiã、Proc.Natl.Acad.Sci.U

SA 84:6864~6868、1987; Biererら、J. Exp. Med. 168:1145~1156、1988; Rosensteinら、J. Exp. Med. 169:149~160 1989; Stoltenborgら、J. Immunol. Methods 175:59~68、1994; Stittら、Cell 80:661~670、1995。

#### 【0342】

##### (抗炎症活性)

本発明のタンパク質はまた、抗炎症活性を示し得る。抗炎症活性は、炎症応答に関与する細胞に対する刺激を提供すること(細胞間相互作用(例えば、細胞接着)を阻害するか、または促進することによって)によってか、炎症プロセスに関与する細胞の走化性を阻害するか、または促進することによってか、細胞の血管外遊出を阻害するか、または促進することによってか、あるいは炎症応答を直接的により阻害するか、またはより促進する他の因子の産生を刺激するか、または抑制することによって、達成され得る。そのような活性を示すタンパク質を使用して、炎症状態(慢性状態または急性状態を含む)(限定することなく、感染に関連する炎症(例えば、敗血症性ショック、敗血症または全身性炎症応答症候群(SIRS))、虚血-灌流損傷、内毒素の致死性、関節炎、補体媒介性激症拒絶症、腎炎、サイトカイン誘導性肺損傷またはケモカイン誘導性肺損傷、炎症性腸疾患、クローン病、またはTNFのようなサイトカインの過剰産生または抗原性物質もしくは抗原性材料に対する過敏症により生じるものが挙げられる)を処置し得る。

#### 【0343】

##### (腫瘍阻害活性)

腫瘍の免疫学的処置または予防について上記に記載された活性に加えて、本発明のタンパク質は、他の抗腫瘍活性を示し得る。タンパク質は、直接的または間接的(例えば、ADCCを介して)腫瘍増殖を阻害し得る。タンパク質は、腫瘍組織または腫瘍前駆体組織に作用することによって、腫瘍増殖を支持するために必要な組織の形成を阻害することによって(例えば、新脈管形成を阻害することによって)、腫瘍増殖を阻害する他の因子、物質または細胞型の産生を生じるこ

とによって、あるいは腫瘍増殖を促進する因子、物質または細胞型を、抑制、除去または阻害することによって、その腫瘍阻害活性を示し得る。

【0344】

(実施例)

(実施例1. 種々のクローンについての放射ハイブリッドマッピング)

(放射ハイブリッドマッピングはクローンの染色体位置を提供する)

ヒト染色体マーカーを用いる放射ハイブリッドマッピングを、本発明に記載の多数のクローンについて実施した。これらの結果を得るために使用した手順は、Steen, RGら (A High-Density Integrated Genetic Linkage and Radiation Hybrid Map of the Laboratory Rat, Genome Research 1999 (1999年5月21日にオンラインで公開された) 第9巻, API-AP8, 1999) に記載される手順に類似する。無作為化した放射により誘導したヒト染色体フラグメントを含む93細胞クローンのパネルを、96ウェルプレート内で、所定のクローンを独特の様式で同定するように設計したPCRプライマーを使用して、スクリーニングした。表3は、クローンAC010784-1およびAC010175\_A.0.1について得られた結果を提供する。

【0345】

【表3】

表 3. 放射ハイブリッドの結果からの染色体マッピング

クローン	染色体	マーカーまでの距離, cR	マーカーまでの距離, cR
AC010784-1	4	WI-4767, 8.4cR	WI-5565, 0.0cR
AC010175_A.0.1	12	D12S358, 4.2cR	AFMA184ZC1, 2.5 cR

(実施例2. PTMAX核酸の定量的発現分析)

種々のクローンの定量的発現を、Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM (登録商標) 7700 配列検出システムで実施されるリアルタイム定量PCR (TAQMAM (登録商標)) によって、約40個の正常サンプルおよび約54個の腫瘍サンプル(これらのサンプルは、以下の表に同定される) 中で評価した。

【0346】

最初に、96 RNAサンプルを - アクチンに対して正規化し、そしてGAPDH RNA (約50 ng 総RNAまたは約1 ng ポリA+RNA) を、TAQMAN (登録商標) Reverse Transcription Reagents Kit (PE Biosystems, Foster City, CA; cat # N808-0234) および製造者のプロトコールに従ったランダムな6量体を使用してcDNAに変換した。反応を、20  $\mu$ l 中で実施し、そして30分間48  $^{\circ}$ C でインキュベートした。次いで、cDNA (5  $\mu$ l) を、製造業者のプロトコールに従って、- アクチンおよびGAPDH TAQMAN (登録商標) Assay Reagents (PE Biosystems; cat. # 's 4310881E および4310884E の各々) およびTAQMAN (登録商標) universal PCR Master Mix (PE Biosystems; cat # 4304447) を使用するTAQMAN (登録商標) 反応のために、分離プレートに移した。反応を、以下のパラメータを使用して25  $\mu$ l 中で実施した: 50  $^{\circ}$ C で2分; 95  $^{\circ}$ C で10分; 95  $^{\circ}$ C で15秒/60 で1分(40サイクル)。結果を、ログスケールを使用するCT値(所与のサンプルは、蛍光の閾値レベルを通過するサイクル)として記録し、所定のサンプルと最も小さいCT値を有するサンプルとの間のRNA濃度の差は、2のCT乗として示した。%相対発現を、このRNA差の逆数を取り、そして100をかけることによって得る。- アクチンおよびGAPDHについて得られた平均CT値は、RNAサンプルを正規化するために使用した。最も高いCT値を発生するRNAサンプルは、さらなる希釈を必要としないが、他の全てのサンプルは、これらの- アクチン/GAPDHの平均CT値に従うこのサンプルと比較して希釈した。

## 【0347】

正規化RNA (5  $\mu$ l) を、cDNAに転換し、製造者の指示に従って、One Step RT-PCR Master Mix Reagents (PE Biosystems; cat. #4309169) および遺伝子特異的プライマーを使用するTAQMAN (登録商標) によって分析した。プローブおよびプライマーを、インプットとして目的のクローンの配列を使用する、Perkin Elmer Biosystem's Primer Express Softwareパッケージ (Apple Computer's Macintosh Power PC用のバージョンI) に従って、各アッセイに対して設定した。デフォルトの設定を、反応条件に対して使用し、そして以下のパラメータを、プライマーを選択する前に設定した：プライマーの濃度 = 250 nM、プライマーの融点 ( $T_m$ ) 範囲 = 58 ~ 60、プライマーの最適  $T_m$  = 59、プライマーの最大差 = 2、プローブは、5' Gを有さず、プローブ  $T_m$  は、プライマー  $T_m$  よりも10 高くなければならず、アンプリコンサイズ = 75 bp ~ 100 bp。選択されるプローブおよびプライマー (以下を参照のこと) は、Synthegen (Houston, TX, USA) によって合成された。プローブを、未反応の色素を除去するためにHPLCによって2回精製し、プローブの5' 末端および3' 末端の各々へのレポーター色素およびクエンチャー色素のカップリングを立証するために、質量分析法によって評価した。正方向プライマーおよび逆方向プライマーの最終濃度は、各々900 nMであり、そしてプローブの最終濃度は、200 nMであった。

## 【0348】

PCR条件：各組織および各細胞株由来の正規化RNAを、96 ウェルPCRプレート (Perkin Elmer Biosystems) の各ウェルにスポットした。2つのプローブ (PROTHYAXプローブで多重化されたPROTHYAX特異的プローブおよび別の遺伝子特異的プローブ) を含むPCRカクテルを、PE Biosystems 770のための1x TaqMan™ PCR Master Mix (5mMのMgCl<sub>2</sub>、dNTP (dA、G、C、U (1:1:1:2の比))、0.25 U/ml AmpliTaq Gold™

(PE Biosystems)、および0.4 U/lのRNaseインヒビターを有する)、ならびに0.25 U/lの逆転写酵素を用いて設定した。逆転写を、48℃で30分間実施し、次いで以下のPCR増幅サイクルを実施した：95℃で10分、次いで90℃で15秒間、60℃で1分間を40サイクル。

## 【0349】

(A. クローン番号：AC010175 (PTMA6))

(プローブ名：Ag165)

## 【0350】

【表4】

プライマー	配列	配列番号
正方向	5'-ATGTCAGACGCAGCCGTAGA-3'	21
プローブ	TET-5'-ACCAGCTCCGAAATCACCACCGAG-3'-TAMRA	22
逆方向	5'-CTTCCACAACCTTCCTTCTCTCT-3'	23

## 【0351】

【表5】

組織名	%相對 實驗值	組織名	%相對 實驗值
內皮細胞	11.7	腎臟 (胎兒)	51.1
內皮細胞 (外置型)	15.2	腎臟 ca. 786-0	12.9
脾臟	24.2	腎臟 ca. A498	4.7
脾臟 ca. CAPAN 2	34.6	腎臟 ca. RXF 393	4.7
脂肪	37.6	腎臟 ca. ACHN	13.6
副腎	25.9	腎臟 ca. UO-31	6.0
甲狀腺	34.9	腎臟 ca. TK-10	13.9
唾液腺	16.8	肝臟	26.8
下垂體	11.1	肝臟 (胎兒)	15.7
腦 (胎兒)	17.3	肝臟 ca. (肝系細胞) HepG2	5.1
腦 (全体)	36.1	肺	13.9
腦 (扁桃體)	14.7	肺 (胎兒)	29.5
腦 (小腦)	50.4	肺 ca. (小細胞) LX-1	24.2
腦 (海馬)	23.3	肺 ca. (小細胞) NCI-H69	13.2
腦 (嗅覺)	33.2	肺 ca. (s.cell var.) SHP-77	0.0
腦 (視床)	21.8	肺 ca. (大細胞) NCI-H460	0.0
腦 (視床下部)	8.6	肺 ca. (non-sm.細胞) A549	9.6
脊骨道	16.0	肺 ca. (non-s.細胞) NCI-H23	13.3
CNS ca. (glio/astro) U87-MG	7.4	肺 ca. (non-s.細胞) HOP-62	7.1
CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	8.4	肺 ca. (non-s.cl) NCI-H522	28.5
CNS ca. (astro) SW1783	6.6	肺 ca. (squam.) SW 900	37.6
CNS ca.* (neuro; met) SK-N-AS	24.3	肺 ca. (squam.) NCI-H596	27.6
CNS ca. (astro) SF-539	7.3	乳腺	27.4
CNS ca. (astro) SNB-75	9.0	乳房 ca.* (pl. effusion) MCF-7	50.4
CNS ca. (glio) SNB-19	13.9	乳房 ca.* (pl.ef) MDA-MB-231	11.5

(表5)の続き

CNS ca. (glio) U251	7.4	乳房 ca.* (pl. effusion) T47D	27.4
CNS ca. (glio) SF-295	7.1	乳房 ca. BT-549	0.0
心臓	10.1	乳房 ca. MDA-N	23.0
骨格筋	3.0	卵巣	23.5
骨髄	24.2	卵巣 ca. OVCAR-3	8.8
胸腺	74.2	卵巣 ca. OVCAR-4	7.3
脾臓	22.9	卵巣 ca. OVCAR-5	17.4
心臓	37.6	卵巣 ca. OVCAR-8	23.5
結腸(上行)	28.1	卵巣 ca. IGROV-1	8.4
胃	19.6	卵巣 ca.* (腹水) SK-OV-3	19.8
小腸	21.6	子宮	17.1
結腸 ca. SW480	9.2	胎盤	34.9
結腸 ca.* (SW480 met)SW620	17.7	前立腺	21.6
結腸 ca. HT29	27.6	前立腺 ca.* (骨 met)PC-3	0.0
結腸 ca. HCT-116	0.0	精巣	26.6
結腸 ca. CaCo-2	17.6	黒色腫 Hs688(A).T	8.9
結腸 ca. HCT-15	19.9	黒色腫 *(met) Hs688(B).T	5.3
結腸 ca. HCC-2998	20.6	黒色腫 UACC-62	1.7
胃 ca.* (肝臓 met) NCI-N87	42.9	黒色腫 M14	19.2
膀胱	28.1	黒色腫 LOX IMVI	100.0
気管	31.0	黒色腫 *(met) SK-MEL-5	13.6
腎臓	18.8	黒色腫 SK-MEL-28	19.3

ca. = 癌

\* = 転移から確立された

met = 転移

s cell var = 小細胞改変体

non-s = non-sm = 非小

squam = 鱗状

pl. eff = pl effusion = 胸水

g l i o = 神経膠腫

a s t r o = 星状細胞腫

n e u r o = 神経芽細胞腫

上の表から、クローンAC010175は、アッセイされたほとんどの正常細胞および癌細胞で発現されることが理解される。特に、黒色腫 LOX IMV Iおよび胸腺において、顕著である。

【0352】

(B. クローン番号: AC009485\_\_A (PTMA 1))

(プローブ名: Ag184)

【0353】

【表6】

プライマー	配列	配列番号
正方向	5'-AGAGGAAGCTGAGTCTGCTACAGG-3'	24
プローブ	5'-CCTCATCATCTTCAGCTGCCCGCTT-3'- TAMRA	25
逆方向	5'-TCTGCTTCTTGGTATCGACATCAT-3'	26

【0354】

【表7】

組織名	% 相対 実験値	組織名	% 相対 実験値
内皮細胞	31.6	腎臓(胎児)	76.8
内皮細胞(双層扁平)	36.6	腎臓 ca. 786-0	37.6
脾臓	68.8	腎臓 ca. A498	20.3
脾臓 ca. CAPAN 2	79.0	腎臓 ca. RXF 393	29.7
脂肪	69.3	腎臓 ca. ACHN	41.8
副腎	47.0	腎臓 ca. UO-31	28.9
甲状腺	87.1	腎臓 ca. TK-10	60.3
唾液腺	26.8	肝臓	55.1
下垂体	48.6	肝臓	38.4
脳(胎児)	42.0	肝臓 ca. (肝芽細胞) HepG2	24.8
脳(全体)	53.2	肺	31.4
脳(扁桃)	34.6	肺(胎児)	77.4
脳(小脳)	59.1	肺 ca. (小細胞) LX-1	57.8
脳(海馬)	39.2	肺 ca. (小細胞) NCI-H69	33.9
脳(黒質)	76.8	肺 ca. (s.cell var.) SHP-77	82.9
脳(視床)	46.7	肺 ca. (大細胞) NCI-H460	62.0
脳(視床下部)	43.5	肺 ca. (non-sm.細胞) A549	33.9
脊髄	59.9	肺 ca. (non-s.細胞) NCI-H23	36.1
CNS ca. (glio/astro) U87-MG	28.3	肺 ca. (non-s.細胞) HOP-62	31.4
CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	39.5	肺 ca. (non-s.cl) NCI-H522	69.7
CNS ca. (astro) SW1783	12.4	肺 ca. (squam.) SW 900	62.4
CNS ca.* (neuro; met) SK-N-AS	76.3	肺 ca. (squam.) NCI-H596	75.8
CNS ca. (astro) SF-539	16.7	乳房	71.2
CNS ca. (astro) SNB-75	25.2	乳房 ca.* (pl. effusion) MCF-7	68.8
CNS ca. (glio) SNB-19	45.7	乳房 ca.* (pl.cf) MDA-MB-231	27.0

## 〔表7〕の続き

CNS ca. (glio) U251	20.6	乳房 ca.* (pl. effusion) T47D	49.0
CNS ca. (glio) SF-295	19.6	乳房 ca. BT-549	73.7
心臓	26.4	乳房 ca. MDA-N	60.7
骨格筋	22.4	卵巣	59.1
骨髄	65.1	卵巣 ca. OVCAR-3	43.2
胸腺	100.0	卵巣 ca. OVCAR-4	37.4
脾臓	76.3	卵巣 ca. OVCAR-5	75.3
リンパ節	81.2	卵巣 ca. OVCAR-8	59.1
結腸(上行)	55.5	卵巣 ca. IGROV-1	27.0
胃	60.3	卵巣 ca.* (腹水) SK-OV-3	67.8
小腸	57.8	子宮	58.2
膵臓 ca. SW480	48.0	胎盤	65.5
膵臓 ca.* (SW480 met)SW620	66.4	前立腺	50.0
膵臓 ca. HT29	88.3	前立腺 ca.* (骨 met)PC-3	66.9
膵臓 ca. HCT-116	98.6	精巣	77.4
膵臓 ca. CaCo-2	39.5	黒色腫 Hs688(A).T	30.8
膵臓 ca. HCT-15	51.8	黒色腫 *(met) Hs688(B).T	8.9
膵臓 ca. HCC-2998	50.0	黒色腫 UACC-62	3.2
胃 ca.* (肝臓met) NCI-N87	65.5	黒色腫 M14	27.4
膀胱	63.3	黒色腫 LOX IMVI	94.0
気管	75.3	黒色腫 *(met) SK-MEL-5	47.0
腎臓	51.1	黒色腫 SK-MEL-28	47.0

上の表から理解されるように、クローンAC009485\_\_Aは、試験されたほとんどの正常および癌細胞株（特に、胸腺および黒色腫 LOX IMVI）において高度に発現される。

【0355】

(C. クローン番号: AC009533\_\_A (PTMA 4))

(プローブ名: Ag185)

【0356】

【表8】

方向	配列	配列番号
正方向	5'-AGATGTCAGACGCAGCCGTA-3'	27
7'0-7"	TET-5'-CAGCTCCGAAATCACCACCGAGGAC-3'- TAMRA	28
逆方向	5'-TCCACAACCTCCTTCTTCTCCTTT-3'	29

【0357】

【表9】

組織名	% 相对		組織名	% 相对	
	实验值 tm381t	实验值 tm336t		实验值 tm381t	实验值 tm336t
内皮细胞	4.3	1.5	腎臟 (胎兒)	37.6	39.0
内皮细胞 (双重标记)	15.4	3.3	腎臟 ca. 786-0	8.8	2.9
脾臟	20.2	20.6	腎臟 ca. A498	0.9	0.6
脾臟 ca. CAPAN 2	22.9	22.2	腎臟 ca. RXF 393	1.2	0.6
脂肪	44.4	55.9	腎臟 ca. ACHN	2.8	2.6
副腎	6.7	2.5	腎臟 ca. UO-31	0.4	0.6
甲状腺	30.4	51.1	腎臟 ca. TK-10	4.6	8.1
唾液腺	5.2	2.2	肝臟	21.9	11.6
下垂体	3.6	8.4	肝臟 (胎兒)	4.7	6.0
脑 (胎兒)	2.4	4.1	肝臟 ca. (肝芽细胞) HepG2	1.5	0.6
脑 (全体)	14.1	11.7	肺	10.7	16.0
脑 (扁桃)	2.3	3.5	肺 (胎兒)	13.2	44.4
脑 (小脑)	37.4	28.5	肺 ca. (小细胞) LX-1	27.4	27.9
脑 (海马)	6.8	8.3	肺 ca. (小细胞) NCI-H69	5.3	3.3
脑 (黑质)	22.4	15.0	肺 ca. (s.cell var.) SHP-77	59.5	65.5
脑 (视床)	12.9	12.9	肺 ca. (大细胞) NCI-H460	14.2	25.4
脑 (视床下部)	1.9	8.6	肺 ca. (non-sm.细胞) A549	3.3	5.0
脊髓	10.1	4.2	肺 ca. (non-s.细胞) NCI-H23	9.9	6.8
CNS ca. (glio/astro) U87-MG	3.0	0.6	肺 ca. (non-s.细胞) HOP-62	0.8	0.6
CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	2.5	1.9	肺 ca. (non-s.cl) NCI-H522	19.2	26.8
CNS ca. (astro) SW1783	1.2	0.6	肺 ca. (squam.) SW 900	27.0	33.9
CNS ca.* (neuro; met) SK-N-AS	29.1	33.9	肺 ca. (squam.) NCI-H596	23.8	37.4
CNS ca. (astro) SF-539	1.0	0.6	乳腺	25.4	34.4
CNS ca. (astro) SNB-75	1.4	0.6	乳腺 ca.* (pl. effusion) MCF-7	50.0	66.0
CNS ca. (glio) SNB-19	4.3	5.9	乳腺 ca.* (pl.ef) MDA-MB-231	3.1	0.8
CNS ca. (glio) U251	0.7	0.8	乳腺 ca.* (pl. effusion) T47D	13.7	12.2

## 〔表 9〕の続き

CNS ca. (glio) SF-295	0.5	1.5	乳房 ca. BT-549	40.1	38.7
心臓	3.6	1.3	乳房 ca. MDA-N	13.1	25.4
骨格筋	0.0	0.6	卵巣	33.2	23.0
骨 骨道	13.3	26.4	卵巣 ca. OVCAR-3	4.4	4.4
胸腺	66.0	100.0	卵巣 ca. OVCAR-4	2.4	2.4
脾臓	14.7	25.0	卵巣 ca. OVCAR-5	12.2	27.0
リハ節	27.6	46.7	卵巣 ca. OVCAR-8	12.3	17.2
結腸(上行)	29.3	27.4	卵巣 ca. IGROV-1	1.3	0.6
胃	12.9	19.5	卵巣 ca.*(腹水)SK-OV-3	11.7	21.6
小腸	18.4	25.2	子宮	9.7	11.6
結腸 ca. SW480	3.1	1.4	胎盤	33.5	33.7
結腸 ca.*(SW480 met)SW620	11.8	17.1	前立腺	14.6	15.5
結腸 ca. HT29	14.1	40.1	前立腺 ca.*(骨 met)PC-3	20.0	16.2
結腸 ca. HCT-116	64.6	82.9	精巣	22.2	22.5
結腸 ca. CaCo-2	7.6	7.8	黒色腫 Hs688(A).T	1.1	0.6
結腸 ca. HCT-15	13.2	13.5	黒色腫 *(met) Hs688(B).T	0.1	0.6
結腸 ca. HCC-2998	9.9	5.1	黒色腫 UACC-62	0.0	0.6
胃 ca.*(肝臓 met) NCI-N87	26.2	40.3	黒色腫 M14	6.8	8.4
膀胱	18.7	28.7	黒色腫 LOX IMVI	100.0	76.8
気管	27.6	33.0	黒色腫 *(met) SK-MEL-5	3.3	10.0
腎臓	10.7	7.5	黒色腫 SK-MEL-28	9.5	6.0

上の表は、クローンAC009533\_\_Aが、多くの正常および癌細胞株において高度に発現されることを示す。このクローンは、特に、黒色腫 LOX IMVI、乳房ca.\*(pl.effusion)MCF-7、肺ca.(s.cell var.)SHP-77、および結腸ca.HCT-116、ならびに正常な胸腺細胞において、高度に発現される。

【0358】

(D.クローン番号AL121585\_\_A(P.TMA 5))

(プローブ名: Ag1091)

【0359】

【表10】

プライマー	配列	配列 番号
正方向	5'-TGCCTATACCAAGAAGCAGAAG-3'	30
プライマー	FAM-5'-CCAACAAGGATGACTAGACAGCAAAA-3'- TAMRA	31
逆方向	5'-TGAATAGGTCACCCTCCTAACA-3'	32

【0360】

【表11】

組織名	% 相对 実験値	組織名	% 相对 実験値
内皮細胞	0.0	腎臓 (胎児)	10.4
内皮細胞 (人腎臓)	0.0	腎臓 ca. 786-0	0.0
脾臓	8.7	腎臓 ca. A498	0.0
脾臓 ca. CAPAN 2	27.7	腎臓 ca. RXF 393	0.0
脂肪	100.0	腎臓 ca. ACHN	0.0
副腎 (新細胞*)	0.0	腎臓 ca. UO-31	0.0
甲状腺	2.0	腎臓 ca. TK-10	2.7
唾液腺	47.0	肝臓	0.0
下垂体	4.5	肝臓 (胎児)	0.0
肝臓 (胎児)	2.5	肝臓 ca. (肝細胞) HepG2	0.0
肝臓 (全体)	0.8	肝臓	7.0
肝臓 (扁桃)	0.4	肝臓 (胎児)	4.8
肝臓 (小肝臓)	0.0	肝臓 ca. (肝細胞) LX-1	2.1
肝臓 (海馬)	0.8	肝臓 ca. (肝細胞) NCI-H69	94.6
肝臓 (乳腺)	0.0	肝臓 ca. (s.cell var.) SHP-77	0.0
大腸皮膚質	0.9	肝臓 ca. (肝細胞) NCI-H460	0.0
脊髄	0.0	肝臓 ca. (non-sm.細胞) A549	0.6
CNS ca. (glio/astro) U87-MG	0.0	肝臓 ca. (non-s.細胞) NCI-H23	0.0
CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	0.0	肝臓 ca. (non-s.細胞) HOP-62	0.0
CNS ca. (astro) SW1783	0.0	肝臓 ca. (non-s.cl) NCI-H522	0.0
CNS ca.* (neuro; met) SK-N-AS	0.0	肝臓 ca. (squam.) SW 900	37.4
CNS ca. (astro) SF-539	0.0	肝臓 ca. (squam.) NCI-H596	28.3
CNS ca. (astro) SNB-75	0.0	乳腺	10.2
CNS ca. (glio) SNB-19	0.0	乳房 ca.* (pl. effusion) MCF-7	2.7
CNS ca. (glio) U251	0.0	乳房 ca.* (pl.ef) MDA-MB-231	0.0

〔表 11〕 の続き

CNS ca. (glio) SF-295	0.0	乳房 ca.* (pl. effusion) T47D	41.2
心臓	0.0	乳房 ca. BT-549	0.0
骨格筋 (new lot*)	0.0	乳房 ca. MDA-N	0.0
骨髄	0.0	卵巣	0.0
胸腺	0.0	卵巣 ca. OVCAR-3	17.2
脾臓	0.0	卵巣 ca. OVCAR-4	7.9
肋骨	0.0	卵巣 ca. OVCAR-5	3.5
結腸直腸	3.7	卵巣 ca. OVCAR-8	0.0
胃	88.3	卵巣 ca. IGROV-1	0.0
小腸	30.8	卵巣 ca.* (腹水) SK-OV-3	2.7
結腸 ca. SW480	0.2	子宮	1.4
結腸 ca.* (SW480 met)SW620	0.0	胎盤	1.4
結腸 ca. HT29	1.5	前立腺	81.8
結腸 ca. HCT-116	0.0	前立腺 ca.* (骨 met)PC-3	0.0
結腸 ca. CaCo-2	9.7	精巣	3.5
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3866)	3.4	黒色腫 Hs688(A).T	0.0
結腸 ca. HCC-2998	93.3	黒色腫 *(met) Hs688(B).T	0.0
胃 ca.* (肝臓 met) NCI-N87	64.6	黒色腫 UACC-62	0.0
膀胱	20.2	黒色腫 M14	1.5
気管	14.7	黒色腫 LOX IMVI	0.0
腎臓	19.5	黒色腫 *(met) SK-MEL-5	0.0

上の表から、クローンAL121585\_\_Aが、特定の細胞株において高度に発現され、そして多くの他の細胞株においては弱くかまたは全く発現されないことが理解される。このクローンは、正常な前立腺、胃および脂肪、ならびに乳房 ca.\* (pl. effusion) T47D、肺 ca. (小細胞) NCI-H69、胃 ca.\* (肝臓 met) NCI-N87、および結腸 ca. HCC-2998において高度に発現される。

【0361】

(他の実施形態)

本発明は、その詳細な説明とともに記載されてきたが、前述の説明は例示であって、本発明の範囲を限定することを意図するのではないことが理解されるべきである。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲の範囲により規定される。他の局面、利点および改変は、上記の特許請求の範囲の範囲内にある。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/41035
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/50 C12Q1/68 A61K38/17		
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) IPC 7 C12N C07K G01N C12Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBL, STRAND, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 99 63116 A (SCHNEIDER PATRICK A ; REPROGEN INC (US); FRENCH CYNTHIA K (US); YAM) 9 December 1999 (1999-12-09) page 15 -page 16; claims 1-56 ---	1-43
X	EP 0 131 252 A (HOFFMANN LA ROCHE) 16 January 1985 (1985-01-16) the whole document --- -/--	1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"I" 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
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 11 June 2001		Date of mailing of the international search report 04.10.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer ESPEN, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/41035

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>o</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOODALL ET AL: "Molecular cloning of cDNA for human prothymosin alpha" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 83, 1986, pages 8926-8928, XP001002621 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON., US ISSN: 0027-8424 the whole document -----	1,2,5-7, 9-14,19

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/41035

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

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.: 22 (in part)  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1-43, all as far as applicable.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box I.1

Although claims 40,41 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.  
Although claims 23-28,42,43 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 22 (in part)

Present claim 22 relates to a method referring to a compound "that binds to said polypeptide in an amount sufficient to modulate the activity of the polypeptide".

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the antibodies described on page 47-51 of the description.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 56.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1; Claims: in part: 1-43; all as far as applicable

Polypeptide relating to SEQ ID NO 2 or a fragment, variant, homolog, analog or derivative thereof, nucleic acid molecule encoding said polypeptide or fragment, variant, homolog, analog or derivative. Nucleic acid molecule relating to SEQ ID NO 1, vector comprising said nucleic acid molecule, cell comprising said vector. Antibody binding to said peptide. Method for determining the presence or amount of the polypeptide/nucleic acid molecule. Method of identifying an agent that binds to the polypeptide, for identifying an agent for use in treatment of a pathology or for modulating the activity of the said polypeptide. Method of treating or preventing a pathology by making use of said polypeptide. Pharmaceutical composition comprising said polypeptide, nucleic acid, or antibody. Kit comprising said pharmaceutical composition. Use of said nucleic acid or antibody for the manufacture of a medicament. Method for screening for a modulator of activity or of latency or predisposition to a pathology associated with the polypeptide of claim 1. Method for determining the presence of or predisposition to a disease associated with altered levels of said polypeptide or said nucleic acid molecule. Method of treating a pathological state in a mammal by using said polypeptide or said antibody.

Inventions 2-10; Claims: in part 1-43, all as far as applicable

as invention 1 but limited to subject-matter relating to SEQ ID Nos 3-20; wherein

invention 2 is limited to SEQ ID NOs 3 and 4,  
invention 3 is limited to SEQ ID Nos 5 and 6, etc ...  
invention 10 is limited to SEQ ID NOs 19 and 20.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/41035

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9963116 A	09-12-1999	AU 4230599 A EP 1002136 A	20-12-1999 24-05-2000
EP 0131252 A	16-01-1985	DE 3479663 D JP 60036500 A US 4614731 A	12-10-1989 25-02-1985 30-09-1986

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 P 9/10	1 0 1	A 6 1 P 25/14	4 C 0 8 5
19/02		25/28	4 H 0 4 5
25/14		29/00	
25/28		31/18	
29/00		35/00	
31/18		C 0 7 K 14/47	
35/00		16/18	
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/15	
16/18		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 Q 1/02	
1/21		1/68	A
5/10		G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/02			N
1/68		C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
// C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	

- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 5 9 , 2 4 8  
(32)優先日 平成11年10月13日(1999 . 10 . 13)  
(33)優先権主張国 米国 ( U S )  
(31)優先権主張番号 6 0 / 1 6 9 , 3 4 4  
(32)優先日 平成11年12月6日(1999 . 12 . 6)  
(33)優先権主張国 米国 ( U S )  
(31)優先権主張番号 6 0 / 2 1 5 , 0 4 8  
(32)優先日 平成12年6月29日(2000 . 6 . 29)  
(33)優先権主張国 米国 ( U S )  
(31)優先権主張番号 0 9 / 6 7 2 , 6 6 5  
(32)優先日 平成12年9月28日(2000 . 9 . 28)  
(33)優先権主張国 米国 ( U S )

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

(72)発明者 バーネット, コリーン  
 アメリカ合衆国 フロリダ 32060, ゲイネスビル, エヌダブリュー, 43アールディー ストリート ピーナンバー-253 4830

(72)発明者 シムケッツ, リチャード エイ.  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06516, ウェスト ハイブン, リート ストリート 191

(72)発明者 バーゲス, キャサリン  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06109, ウェザーズフィールド, キャリエイジヒル ドライブ 90

(72)発明者 スパイテック, キンバリー エイ.  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06511, ニュー ハイブン, コート ストリート ナンバー-1 28

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 FA02 GA11  
 HA12  
 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ42  
 QR32 QR72 QS24 QS34 QX01  
 4B064 AG27 CA19 CC24 DA13  
 4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02  
 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA13 DC50 NA14 ZA152  
 ZA162 ZA242 ZA362 ZA452  
 ZA942 ZA962 ZB082 ZB112  
 ZB262 ZC552  
 4C085 AA13 BB31 BB36 CC04 DD32  
 DD86 FF03 FF20  
 4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA21  
 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	多核苷酸和由其编码的多肽		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003510080A</a>	公开(公告)日	2003-03-18
申请号	JP2001526954	申请日	2000-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	プレイヤーガスーディルダスケイ バーネットコリーン シムケッツリチャードエイ バーゲスキャサリン スパイテックキンバリーエイ		
发明人	プレイヤーガ, スーディルダスケイ. バーネット, コリーン シムケッツ, リチャード エイ. バーゲス, キャサリン スパイテック, キンバリー エイ.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P9/10 A61P19/02 A61P25/14 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P19/02 A61P25/14 A61P25/28 A61P29/00 C07K14/47 Y02A50/55 Y02A50/58		
FI分类号	A61K39/395.N A61K48/00 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P19/02 A61P25/14 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.N C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR72 4B063/QS24 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA242 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/BB31 4C085/BB36 4C085/CC04 4C085/DD32 4C085/DD86 4C085/FF03 4C085/FF20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA21 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/156745 1999-09-30 US 60/158942 1999-10-06 US 60/159248 1999-10-13 US 60/169344 1999-12-06 US 60/215048 2000-06-29 US 09/672665 2000-09-28 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明称为PTMAX多肽，新型多肽和编码PTMAX多肽的多核苷酸，以及与PTMAX免疫特异性结合的抗体或PTMAX多肽，多核苷酸或抗体衍生物，提供了变体，突变体或片段。本发明进一步提供了通过使用PTMAX多肽，多核苷酸和抗体来检测和治疗各种病理状况以及其他应用的方法。

10-2 識別 番号	10-2-1 識別 番号 注記	10-2-2 識別 番号 注記	10-2-3 識別 番号 注記	10-2-4 識別 番号 注記	10-2-5 識別 番号 注記	10-2-6 識別 番号 注記	10-2-7 識別 番号 注記
AC00945_A	Genome, 327	1337	109	10909	PhaenITREMBL	Meze	Cytoplasm
AC00945_A.1	Genome, placenta, spleen	1342	114	12082	ACC00937, human prothymosin-alpha pseudogenes.Ptms-SP7E MBL-ACC00949, human prothymosin-alpha	Meze	Cytoplasm
AC00945_A.5	Genome, placenta, spleen	1357	114	12414	PhaenITREMBL-ACC00945, human prothymosin-alpha pseudogene	Meze	Nucleus