

(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 - 525610

(P2003 - 525610A)

(43)公表日 平成15年9月2日(2003.9.2)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 2 4
38/00			N 4 B 0 6 3
39/395		48/00	4 B 0 6 4
		A 6 1 P 1/16	105 4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 (全139数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 564367(P2001 - 564367)

(86)(22)出願日 平成13年3月2日(2001.3.2)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月2日(2002.9.2)

(86)国際出願番号 PCT/US01/06839

(87)国際公開番号 W001/064884

(87)国際公開日 平成13年9月7日(2001.9.7)

(31)優先権主張番号 60/186,513

(32)優先日 平成12年3月2日(2000.3.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 キュラゲン コーポレイション
アメリカ合衆国 コネチカット 06511, ニューヘブン, ロングワーフドライブ
555, 11 ティーエイチフロアー

(71)出願人 ジェネンテック・インコーポレーテッド
GENENTECH, INC.
アメリカ合衆国カリフォルニア・94080 - 4990・サウス・サン・フランシスコ・ディー
エヌエー・ウェイ・1

(74)代理人 弁理士 園田 吉隆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 熱応答に関連する遺伝子 G 1 2 L

(57)【要約】

ここで記載されているのは、ポリペプチドをコードする新規ヒト及びマウス核酸配列である。また、開示されているのは、これら核酸によってコードされているポリペプチド、ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体と同様に、前出のポリペプチドの誘導体、変異体、突然変異体、又は断片である。本発明は、さらに、これら新規の核酸及びタンパク質の任意の一つが関与している疾患の診断、治療及び予防に関する治療的、診断的及び研究方法を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号：2及び4から成る群から選択されたアミノ酸配列の成熟型；

(b) 配列番号：2及び4から成る群から選択されたアミノ酸配列の成熟型の変異体であって、前記変異体が前記成熟型のアミノ酸配列とわずか15%のアミノ酸残基が異なるという条件で、前記変異体の一つ又は複数のアミノ酸残基が、前記成熟型のアミノ酸配列と異なる変異体；

(c) 配列番号：2及び4から成る群から選択されるアミノ酸配列；及び

(d) 配列番号：2及び4から成る群から選択されるアミノ酸配列の変異体であって、前記変異体が前記アミノ酸配列とわずか15%のアミノ酸残基が異なるという条件で、前記変異体の一つ又は複数のアミノ酸残基が成熟型のアミノ酸配列と異なる変異体：から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項2】 ポリペプチドが配列番号：2及び4から成る群から選択されるアミノ酸配列の天然発生対立遺伝子変異体のアミノ酸配列を含む、請求項1のポリペプチド。

【請求項3】 前記対立遺伝子変異体が、配列番号：1及び3から成る群から選択された核酸配列から一つヌクレオチドが異なる核酸配列の翻訳であるアミノ酸配列を含む、請求項2のポリペプチド。

【請求項4】 前記変異体のアミノ酸配列が保存的アミノ酸置換を含む、請求項1のポリペプチド。

【請求項5】 (a) 配列番号：2及び4から成る群から選択されるアミノ酸配列の成熟型；

(b) 配列番号：2及び4から成る群から選択されるアミノ酸配列の成熟型の変異体であって、前記変異体が前記成熟型のアミノ酸配列とわずか15%のアミノ酸残基が異なるという条件で、前記変異体の一つ又は複数のアミノ酸残基が前記成熟型のアミノ酸配列と異なる変異体；

(c) 配列番号：2及び4から成る群から選択されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号：2及び4から成る群から選択されるアミノ酸の変異体であって

、前記変異体が前記アミノ酸配列とわずか15%のアミノ酸残基が異なるという条件で、前記変異体の一つ又は複数のアミノ酸残基が、前記成熟型のアミノ酸配列と異なる変異体；

(e) 少なくとも配列番号：2及び4から成る群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの少なくとも一部分、又は前記ポリペプチドの変異体をコードする核酸断片であって、前記変異体が前記アミノ酸配列とわずか15%のアミノ酸残基が異なるという条件で、前記変異体の一つ又は複数のアミノ酸残基が、前記成熟型のアミノ酸配列と異なる変異体。

(f) (a)、(b)、(c)、(d)又は(e)の相補鎖を含んでなる核酸分子。

【請求項6】 核酸分子が天然発生対立遺伝子核酸変異体のヌクレオチド配列を含む、請求項5の核酸分子。

【請求項7】 核酸分子が、天然発生ポリペプチド変異体のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードする、請求項5の核酸分子。

【請求項8】 核酸分子が、配列番号：1及び3から成る群から選択される核酸配列から一つのヌクレオチドが異なる、請求項5の核酸分子。

【請求項9】 前記核酸分子が、

(a) 配列番号：1及び3から成る群から選択されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号：1及び3から成る群から選択されるヌクレオチド配列と一つ又は複数のヌクレオチドが異なるヌクレオチド配列であって、前記ヌクレオチド配列とわずか20%のヌクレオチドが異なるという条件で；

(c) (a)の核酸断片；及び

(d) (b)の核酸断片：から成る群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項5の核酸分子。

【請求項10】 前記核酸分子が、緊縮な条件下で、配列番号：1及び3から成る群から選択されるヌクレオチド配列、又は前記ヌクレオチド配列の相補鎖とハイブリダイズする、請求項5の核酸分子。

【請求項11】 核酸分子が、

(a) 前記アミノ酸配列をコードするコード化配列から一つ又は複数のヌクレオ

チドが異なっているコード化配列を含んでなる第一のヌクレオチドであって、前記第一のヌクレオチド配列のコード化配列のヌクレオチドのわずか20%が前記コード化配列と異なる条件の前記第一のヌクレオチド配列、

(b) 第一のポリヌクレオチドの相補鎖である単離された第二のポリヌクレオチド；及び

(c) (a)又は(b)の核酸断片：から成る群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項5の核酸分子。

【請求項12】 請求項11の核酸分子を含んでなるベクター。

【請求項13】 前記核酸分子と作用可能に連結している、プロモーターをさらに含んでなる請求項12のベクター。

【請求項14】 請求項12のベクターを含んでなる細胞。

【請求項15】 請求項1のポリペプチドと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の抗体。

【請求項17】 抗体がヒト化抗体である、請求項15の抗体。

【請求項18】 試料中に請求項1のポリペプチドの存在又は量を測定する方法であって、(a)試料を提供し；

(b) ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体と試料を接触させ；及び

(c) 前記ポリペプチドと結合する抗体の存在又は量を測定し、それによって前記試料中のポリペプチドの存在又は量を測定する方法：を含んでなる方法。

【請求項19】 試料中に請求項5の核酸分子の存在又は量を測定する方法であって、(a)試料を提供し；

(b) 前記核酸分子と結合するプローブと試料を接触させ；及び

(c) 前記核酸分子と結合するプローブの存在又は量を測定し、それによって前記試料中の核酸分子の存在又は量を測定する方法：を含んでなる方法。

【請求項20】 核酸分子の存在又は量が、細胞又は組織型のマーカーとして使用される、請求項19の方法。

【請求項21】 細胞及び組織型が癌性である、請求項20の方法。

【請求項22】 請求項1のポリペプチドと結合する薬剤を同定する方法であって、

- (a) 前記ポリペプチドと前記薬剤を接触させ；及び
- (b) 前記薬剤が前記ポリペプチドと結合するか否かを決定すること：を含んでなる方法。

【請求項23】 薬剤が細胞性レセプター又は下流エフェクターである、請求項22の方法。

【請求項24】 請求項1のポリペプチドの発現又は活性を調節する薬剤を同定する方法であって、

- (a) 前記ポリペプチドを発現する細胞を提供し；
- (b) 細胞を前記薬剤と接触させ、及び
- (c) 薬剤が前記ポリペプチドの発現又は活性を調節するかどうかを決定すること、

を含んでなり、それによって、前記ペプチドの発現又は活性の変化が、前記薬剤が前記ポリペプチドの発現又は活性を調節することを示す方法。

【請求項25】 請求項1のポリペプチドの活性を調節する方法であって、前記請求項のポリペプチドを発現している細胞試料を、ポリペプチドの活性を調節するために十分な量の前記ポリペプチドと結合する化合物と接触させることを含んでなる方法。

【請求項26】 g12L関連疾患を治療又は予防する方法であって、そのような治療又は予防が所望される被検体へ、該被検体の該g12L関連疾患を治療し予防するために十分な量の請求項1のポリペプチドを投与することを含んでなる方法。

【請求項27】 疾患が、癌、肥満、肥満関連疾患、糖尿病、及び悪液質から成る群から選択される、請求項26の方法。

【請求項28】 疾患が代謝に関連している、請求項26の方法。

【請求項29】 前記被検体がヒトである、請求項26の方法。

【請求項30】 g12L関連疾患を治療又は予防する方法であって、そのような治療又は予防が所望される被検体へ、該被検体の該g12L関連疾患を治療又は予防するために十分な量の請求項5の核酸を投与することを含んでなる方法。

。

【請求項31】 疾患が、癌、肥満、肥満関連疾患、糖尿病、及び悪液質から成る群から選択される、請求項30の方法。

【請求項32】 疾患が代謝に関連している、請求項30の方法。

【請求項33】 前記被検体がヒトである、請求項30の方法。

【請求項34】 g12L関連疾患を治療又は予防する方法であって、そのような治療又は予防が所望される被検体へ、被検体のg12L関連疾患を治療又は予防するために十分な量の請求項15の抗体を投与することを含んでなる方法。

【請求項35】 疾患が、癌、肥満、肥満関連疾患、糖尿病、及び悪液質から成る群から選択される、請求項34の方法。

【請求項36】 疾患が代謝に関連している、請求項34の方法。

【請求項37】 被検体がヒトである、請求項34の方法。

【請求項38】 請求項1のポリペプチド及び薬学的に許容可能な担体を含んでなる、薬学的な組成物。

【請求項39】 請求項5の核酸分子及び薬学的に許容可能な担体を含んでなる、薬学的組成物。

【請求項40】 請求項15の抗体及び薬学的に許容可能な担体を含んでなる、薬学的組成物。

【請求項41】 請求項38の薬学的組成物を一つ又は複数の容器に含むキット。

【請求項42】 請求項39の薬学的組成物を一つ又は複数の容器に含むキット。

【請求項43】 請求項40の薬学的組成物を一つ又は複数の容器に含むキット。

【請求項44】 第一の哺乳動物の被検体における、請求項1のポリペプチドの変化したレベルに関連する疾患の存在、又はその疾患の素因を決定する方法であって、

(a) 第一の哺乳動物被検体の試料中のポリペプチドの発現のレベルを測定し；及び

(b) 段階(a)の試料中の前記ポリペプチドの量を、前記疾患を有しない、又

はその疾患に罹りやすすくないことが知られている第二の哺乳動物被検体のコントロール試料に存在するポリペプチドの量と比較することを含んでなる、コントロール試料と比較した第一被検体のポリペプチドの発現レベルにおける変化が、前記疾患の存在、又はその疾患の素因を示す方法。

【請求項45】 素因が癌である、請求項44の方法。

【請求項46】 第一の哺乳動物被検体における、請求項5の核酸分子の変化したレベルに関連する疾患の存在、又はその疾患の素因を決定する方法であって、

(a) 第一の哺乳動物被検体からの試料の核酸の量を測定すること；及び

(b) 段階(a)の試料中の前記核酸の量と、前記疾患を有しない、又はその疾患に罹りやすすくないことが知られている第二の哺乳動物被検体のコントロール試料に存在する核酸の量と比較すること；を含んでなる、第一の被検体中の核酸のレベルの変化とコントロール試料との比較が、疾患の存在又はその疾患の素因を示す方法。

【請求項47】 素因が癌である、請求項46の方法。

【請求項48】 哺乳動物における病的症状を治療する方法であって、ポリペプチドが、配列番号：2及び4の少なくとも一つのアミノ酸配列を有するポリペプチドに少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する、又はその生物学的に活性な断片である、病的症状を緩和するために十分な量のポリペプチドを哺乳動物へ投与することを含んでなる方法。

【請求項49】 哺乳動物の病的症状を治療する方法であって、病的状態を緩和するのに十分な量の請求項15の抗体を哺乳動物へ投与することを含んでなる方法。

【請求項50】 前記化合物のg12L転写上流制御又は下流制御活性を測定する方法であって、前記化合物とRNAポリメラーゼ及び請求項5のポリヌクレオチドを含んでなる組成物を接触させることを含んでなる方法。

【請求項51】 前記組成物が細胞内にある、請求項50の方法。

【請求項52】 化合物とリボゾーム及び請求項5のポリヌクレオチドを含んでなる組成物を接触させることを含んでなる、前記化合物のg12L転写上流制

御又は下流制御活性を測定する方法。

【請求項53】 前記組成物が細胞内にある、請求項52の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(関連適用)**

本出願は、ここで参考文献としてすべてが取り入れられている2000年3月2日出願の米国仮出願番号第60/186,513号に対して優先権を主張する。

【0002】**(発明の分野)**

この発明は、概して、核酸及びそれにコードされているポリペプチドに関する。より具体的には、には、この発明は、ベクター、宿主細胞、抗体だけでなく、新規ポリペプチドをコードする核酸、そしてこれら核酸及びポリペプチドを生産するための組み換え方法に関する。

【0003】**(発明の背景)****肥満**

肥満は、合衆国において最もありふれた代謝疾患であり、成人の35%が患っており、推定300,000人の犠牲者に700億の直接及び間接な負担を与えている。超過体重又は肥満と考えることのできる子供の数が増加しているために、肥満は流行病として増加している。肥満は、体脂肪の超過と定義されており、頻繁に健康の顕著な障害を引き起こす。肥満は、ヒトの体での脂肪細胞の大きさ又は数が、一つ又は複数の身体的及び生理学的疾患を生じ得るレベルに増加する場合に起こる。正常な大きさのヒトは、300から350億の間の脂肪細胞を有する。ヒトの体重が増加すると、最初にこれら脂肪細胞の大きさが増加し、後に数が増加する。肥満は、遺伝的、代謝的、生化学的、生理学的、そして行動の要因によって影響される。従って、永続的な見通しのある臨床治療効果を達成するために、幾つかの分野で取り組むべき複合疾患である。

【0004】

個々の肥満は、II型糖尿病(NIDDM)、高血圧、冠状動脈性心臓病、高コレステロール血症、変形性関節症、胆石症、生殖器官の癌、及び睡眠時無呼吸が

含まれる病気に罹りやすい。睡眠時無呼吸は、睡眠の間に呼吸をしない発症であり、発作及び心臓発作のより高い発生に関連しており、2つの他の因子は、臨床的な肥満に含まれる肥満関連の罹患率及び死亡率の一因となっている。

非製薬的から製薬的な処置にわたる、幾つかの良く確立された治療方法がある。非製薬的処置には、ダイエット、運動、精神医学的処置、そして食物消費を減じる、又は脂肪を取り除く外科的処置、脂肪吸引法が含まれる。食欲抑制及びエネルギー消費/栄養改良剤は、薬学的処置の中心である。デックスフェンフルラミン (REDUX (登録商標)) 及び シブトラミン (MERIDIA (登録商標)) は前者であり、ベータ3-アドレナリンアゴニスト及びオーリスタット (XENICAL (登録商標)) が後者を代表する。

【0005】

動物モデルは、遺伝的性質が、肥満の性質及び程度を決定するのに影響を及ぼすという強力な証拠を提供する。動物で本当であることがヒトでは本当ではないが、肥満度指数 (BMI、体重と身長に関連する肥満の測定) の40 - 80%の変動は、遺伝的因子に起因する。ヒトの肥満が、概してメンデル性遺伝のパターンに従わない一方で、それに従う幾つかのげっ歯類のモデルがある (Spiegelman, Cell. 1996 Nov 1; 87(3): 377-89; Weigle, Bioessays. 1996 Nov; 18(11): 867-74)。ヒトの肥満は複合的特徴があるので、げっ歯類に見出されたのに類似の遺伝的障害がヒトにも数例あるものの、げっ歯類における一つの変異が多数の肥満のヒトでの主な原因ではないことは驚くことではない (Montague, Nature. 1997 Jun 26; 387(6636): 903-8; Clement, Nature. 1998 Mar 26; 392(6674): 398-401)。興味あることには、高血圧及び発作などの複合表現型の動物モデルも肥満である。これは、これら動物が、ヒト肥満の複雑さを理解するより手応えのあるモデルを示し得ることを示唆する。

【0006】

一つの遺伝的障害の遺伝なる、幾つかの肥満のげっ歯類モデルがある。良く特徴付けられているものの希であるマウスの単源性肥満は、あるとしても、ヒトに観察されることがあり：満腹因子レプチンの翻訳の異常停止であるobese(ob)を含む。レプチン受容体の変異は、肥満糖尿病性マウス (db) を引き起こす。アグ

ーチ (Ay) は、肥満の毛色変異体である。通常は肌のみで発現し、変異動物では偏在的に発現していて、メラニン形成細胞刺激ホルモン (MSH) と拮抗し得る。MSHは、プロホルモンであるプロオピオメラノコルチン (POMC) のタンパク質分解プロセッシングによって生じる主要な下垂体ホルモンである副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) から誘導される。太った表現型は、視床下部プロホルモン変換酵素カルボキシペプチダーゼEの変異の結果である。最も良く特徴付けられていない肥満マウス変異体はtubである。tubは、神経ペプチドY (NPY、食欲刺激ホルモン) 及びPOMCのような、視床下部神経ペプチドホルモンのプロセッシングに影響を与え得る細胞質基質タンパク質をコードしている。最近、POMCノックアウトマウスが肥満に関する幾つかのマウスモデルに対する表現型類似体、特にそのAyを有することが報告されている。POMCノックアウトは早発性肥満を有し、その副腎の明白な形態学的な欠如のため、副腎機能障害のみならず黄色を有する。これら動物には検出可能なコルチコステロン、並びにコルチコステロンによる食物摂取の増加がないことから、これら動物が肥満であることは驚きである。肥満表現型は、POMCから誘導されるペプチドホルモンである、アルファ-MSHで治療することが可能である (Yaswen, Nat Med. 1999 Sep; 5(9): 1066-70)。

【0007】

他の動物モデルには、上記で論じたob/ob及びdb/dbマウスと多くの類似性を生じるfa/fa (太った) ラットが含まれる。一つ異なる点は、fa/faラットが寒さに対して非常に敏感であるのに対して、それらの非ふるえ熱産生は正常である。熱産生と代謝が内分泌学的に密接に関連していることは、はっきりと確立されている。冬眠と昏睡に類似した症状である無感覚状態は、マウス変異体よりもfa/faラットにおける肥満の維持においてより大きな役割を果たすと思われる。更には、幾つかの砂漠のげっ歯類、例えばトゲマウスは自然の生息地では肥満にはならないが、標準的な研究室の食餌では肥満になる。

【0008】

(褐色脂肪細胞組織)

多房性脂肪組織としても知られている褐色脂肪細胞組織 (BAT) は、この組

織を形成している多くの毛細血管とミトコンドリアの色が原因のために、そのように呼ばれている。BATは、肩の部分、ヒト胚と新生児の脇腹に主に見出され、生後1ヶ月して消失する。動物、特に冬眠する動物及びげっ歯類では、更に豊富に存在する。BATは、毛細血管によって血管が発達するという点で内分泌器官の特徴を有し、交感神経による支配を直接に受けることができる。交感神経神経伝達は、ホルモン感受性リパーゼの活性化を引き起こすノルアドレナリン及びアドレナリンのカテコールアミンの放出につながる。これは脂肪酸及びグリセロールへのトリグリセリドの加水分解という結果となり、脱共役タンパク質(UCP)の活性を介するATPの形成によるミトコンドリアプロトン勾配の脱共役による酸素消費及び熱産生の増加につながる。カテコールアミンによるBAT刺激は、結果として非ふるえ熱産生を引き起こす。

【0009】

内分泌器官としてのBATの証拠は、1960年代後半におこなわれたHimms-Hagenの研究に由来する。異なる気温に順応させたラットからBATを取り除き、カテコールアミンに対する熱産生応答への効果に関わる実験は、次の知見につながる。i) 寒さに順応させたラットからの肩甲骨間BAT(IBAT)の除去は、カテコールアミンに対するラットの熱産生応答への直接の効果を有しない。重要性は、BATがこの刺激に対して直接に応答する器官ではないことである。ii) 経時的(日)に、IBATを取り除かれたラットによる増大したカテコールアミン応答の進行喪失があり、このことは、BATがカテコールアミン誘導による発熱性応答の長期にわたる維持を担っていることを示唆している。興味あることに、増大した応答を維持するIBATの能力は、寒さへの曝露の期間に相関した。これは、BATが、順応に対する短期及び長期の効果を有することを示唆している。長期間の寒さへの順応では、IBATで占有されている以外の領域へのBATの拡散がある可能性があり、従ってカテコールアミン応答が維持される。他の研究は、通常はBATの内分泌的性質をも支えない条件下で、寒さへ順応させた動物のIBATの暖かい中で生育させた動物への移植が、発熱性応答を与えることができることを示す。

【0010】

熱発生だけでなく体重の維持におけるこの内分泌器官の役割は、この組織の発生の間のジフテリアトキシンの発現を制御するBAT-特異的プロモーター（UCP1）を使用し、トランスジェニックマウスモデルでのBATの除去によって示された。動物は、寒さに曝されると深部体温を維持できなくなることが見出され、過食、レプチン耐性、そして肥満であった。これら後者の知見の重要性は、BATが無いと、BAT熱発生及び/又はBAT誘導ホルモンの損失のために、マウスが代謝効率を高めるということである。すなわち、BAT及びUCPが無いと、脂肪の形で貯蔵されているエネルギーの純蓄積がある。最終的には、単に一時的なBATの切除を伴うマウスの一系統では、代謝の欠陥は、BATの再出現によって回復する [Lowell, Nature. 1993 Dec 23-30; 366(6457): 740-2; Friedman, Nature. 1993 Dec 23-30; 366(6457): 720-1]。ともに取得されたこれらのデータは、BATは、それが観察された生物の代謝状況において中心的役割を果たす独特な熱発生及び内分泌性器官であるという論点を支持する。

【0011】

内分泌性器官が代謝を制御し、そうすることが否応なしに遺伝子発現を制御しなければならないことは、はっきりと確立されたことである。BATが内分泌及び熱発生活性を提供する機構を理解することによって、代謝の制御への洞察が得られる。BAT熱発生、増殖、又は分化に関連する遺伝子及びタンパク質は、代謝又は他の疾患を治療又は診断するための新規な手法を提供する。さらには、それらは、代謝及び他の疾患を治療するための医薬又は分子を発見するためのスクリーニングの試みに用いられてもよく、薬理ゲノム学などで使用される価値あるマーカーとなれる。

【0012】

（発明の概要）

本発明は、BATが環境因子へ応答する際の機構で理解されていることを示す。これら動物の中温区域以下でのマウスの管理に応じて調節した遺伝子は、代謝応答の重要なマーカー、又はそれを欠くと代謝疾患のための潜在的な薬剤の標的、及び/又は分泌/内在性膜タンパク質の場合は、薬剤そのものに相当する。

この発明は、新規ポリペプチドをコードする新規核酸配列の発見に部分的に基

づいている。本発明で開示されたポリペプチドをコードする核酸、並びにその誘導体及び断片は、以下において、「g 1 2 L」核酸又はポリペプチド配列としてまとめて命名されている。

【0013】

一側面では、本発明は、配列番号：1又は3に開示された核酸と同一性を有する核酸配列を含む、g 1 2 Lポリペプチドをコードする単離されたg 1 2 L核酸分子を提供する。幾つかの実施態様では、g 1 2 L核酸分子は、緊縮条件下で、g 1 2 L核酸配列のタンパク質コード化配列を含む核酸分子と相補的な核酸配列とハイブリダイズすることができる。又、本発明は、g 1 2 Lポリペプチド、又はその断片、相同体類似体又はその誘導体をコードする単離された核酸を含む。例えば、この核酸は、配列番号：2又は4のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドに対して、少なくとも80%の同一性のあるポリペプチドをコードすることができる。例えば、この核酸は、配列番号：1又は3の何れかの核酸配列を含むゲノムDNA断片又はcDNA分子であり得る。

【0014】

また、本発明に含まれるのは、オリゴヌクレオチド、例えば、g 1 2 L核酸（例えば、配列番号：1又は3）の少なくとも6連続ヌクレオチド、或いは前記オリゴヌクレオチドの相補鎖を含むオリゴヌクレオチドである。

また、本発明に含まれるのは、十分に精製されたg 1 2 Lポリペプチド（配列番号：2又は4）である。ある実施態様では、g 1 2 Lポリペプチドには、ヒトg 1 2 Lポリペプチドのアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列が含まれる。

また、本発明には、g 1 2 Lポリペプチドと免疫選択的に結合する抗体を主としている。

その他の側面では、本発明は、治療的及び製薬的に許容可能な担体の治療的又は予防的に有効な量を含む、製薬的組成物を含む。治療は、例えばg 1 2 L核酸、g 1 2 Lポリペプチド、或いはg 1 2 Lポリペプチドに対して特異的な抗体とすることができる。更なる側面では、本発明は、一つ又は複数の容器、この製薬的組成物の治療的又は予防的有効量を含む。

【0015】

更なる側面では、本発明には、DNAによってコードされているg12Lポリペプチドの発現を可能にする条件下で、g12L核酸を含む細胞を培養することによってポリペプチドを生産する方法が含まれる。所望するならば、次いでg12Lポリペプチドを回収できる。

その他の側面では、本発明には、試料中のg12Lポリペプチドの存在を検出する方法が含まれる。この方法では、ポリペプチドと化合物との間の複合体の形成が可能となる条件下で、試料をポリペプチドと選択的に結合する化合物と接触させる。この複合体は検出され、もし存在するならば、その結果に従って試料中のg12Lポリペプチドを同定する。

また、本発明には、g12Lの発現に基づく特定の細胞又は組織型を同定する方法が含まれる。

【0016】

また、本発明に含まれているのは、試料をg12L核酸プローブ又はプライマーと接触させことによって、試料中のg12L核酸分子の存在を検出する方法、並びに核酸プローブ又はプライマーが試料中のg12L核酸分子と結合しているかどうかを検出することである。

さらなる側面では、本発明は、g12Lポリペプチドを含む細胞試料を、このポリペプチドの活性を調節するのに十分な量のg12Lポリペプチドと結合する化合物と接触させることによって、g12Lポリペプチドの活性を調節するための方法を示す。この化合物は、例えば、ここでさらに記載されているような、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質又は他の有機炭素含有又は無機分子等の小分子であることができる。

【0017】

また、本発明の範囲内には、疾患又は症候群の治療又は予防のための薬剤の製造における治療剤の使用があり、これら疾患又は症候群には、例えば、肥満、糖尿病、及び悪液質等の代謝疾患及び疾病；過形成、癌、及び再狭窄等の細胞増殖疾患及び疾病；アルツハイマー病、多発性硬化症及びパーキンソン病等の神経変性疾患及び疾病；AIDS、炎症、及び自己免疫疾患等の免疫疾患及び疾病；S

C I D、周期性好中球減少症、及び血小板血症等の造血性疾患及び疾病が含まれる。好ましい実施態様では、治療剤は、肥満及び肥満関連疾患治療のための薬剤の製造に使用される。限定されるものではないが、肥満関連疾患には、II型糖尿病(N I D D M)、高血圧、冠状動脈性心臓病、高コレステロール血症、変形性関節症、胆石、生殖器官の癌、及び睡眠時無呼吸が含まれる。治療剤は、例えば、g 1 2 L核酸、g 1 2 Lポリペプチド、又はg 1 2 L-特異的抗体、又は生物学的に活性な誘導体又はその断片であることができる。

【0018】

更に、本発明には、疾患又は症候群のモジュレーターのスクリーニング方法が含まれ、これら疾患又は症候群には、例えば、肥満、糖尿病、及び悪液質等の代謝疾患及び疾病；過形成、癌、及び再狭窄等の細胞増殖疾患及び疾病；アルツハイマー病、及びパーキンソン病等の神経変性疾患及び疾病；A I D S、炎症、及び自己免疫疾患等の免疫疾患及び疾病；S C I D、周期性好中球減少症、及び血小板血症等の造血性疾患及び疾病が含まれる。好ましい実施態様では、方法は、肥満及び肥満関連疾患のモジュレーターをスクリーニングする。この方法には、被験化合物とg 1 2 Lポリペプチドを接触させ、被験化合物がg 1 2 Lポリペプチドと結合するか否かを決定することが含まれる。被験化合物のg 1 2 Lポリペプチドとの結合は、被験化合物が活性、又は前出の疾患又は症候群の潜在性又は素因のモジュレーターであることを示す。

【0019】

また、本発明の範囲内にあるのは、活性、又は例えば肥満、糖尿病、及び悪液質等の代謝疾患及び疾病；過形成、癌、及び再狭窄等の細胞増殖疾患及び疾病；アルツハイマー病、及びパーキンソン病等の神経変性疾患及び疾病；A I D S、炎症、及び自己免疫疾患等の免疫疾患及び疾病；S C I D、周期性好中球減少症、及び血小板血症等の造血性疾患及び疾病が含まれる疾患又は症候群の潜在性又は素因のモジュレーターのスクリーニング方法であり、被験化合物を前出の疾患又は症候群の増大した危険性がある被験動物へ投与することによる。好ましい実施態様では、被験動物は、肥満及び肥満関連疾患の増大した危険性を有する。被験動物は、g 1 2 L核酸によってコードされる組み換えポリペプチドを発現する

。次いで、組み換え的に g 1 2 L ポリペプチドを発現するコントロールの動物のタンパク質の発現又は活性のように、g 1 2 L ポリペプチドの発現又は活性が被験動物において測定され、疾患又は症候群の増大した危険性ではない。次に、被験動物とコントロールの動物の双方における g 1 2 L ポリペプチドの発現を比較する。コントロールの動物に関連した被験動物の g 1 2 L ポリペプチドの活性の変化は、疾患又は症候群の潜在性のモジュレーターであることを示す。

【0020】

更にその他の側面では、本発明には、被検体（例えばヒト被検者）での、g 1 2 L ポリペプチド、g 1 2 L 核酸、又は双方の改変レベルに関連した疾患の存在、又はその疾患にかかりやすい素因を決定する方法が含まれる。この方法には、被検体からの被験試料中の g 1 2 L ポリペプチドの量を測定し、被験試料中のポリペプチドの量をコントロールの試料中に存在する g 1 2 L ポリペプチドの量を比較することが含まれる。コントロールの試料と比較した、被験試料中の g 1 2 L ポリペプチドのレベルの変化は、被検体中の疾患の存在、又はこの疾患へののかかりやすい素因を示す。好ましくは、かかりやすい疾患には、例えば、肥満、糖尿病、及び悪液質等の代謝疾患及び疾病；過形成、癌、及び再狭窄等の細胞増殖疾患及び疾病；アルツハイマー病、及びパーキンソン病等の神経変性疾患及び疾病；A I D S、炎症、及び自己免疫疾患等の免疫疾患及び疾病；S C I D、周期性好中球減少症、及び血小板血症等の造血性疾患及び疾病が含まれる。より好ましい実施態様では、本発明の新しいポリペプチドは、肥満及び肥満に関連した疾患の存在、又はこれら疾患にかかりやすい素因をスクリーニングする方法で使用される。また、本発明の新しいポリペプチドの発現レベルは、種々の癌、例えば乳癌の存在又はその疾患にかかりやすい素因をスクリーニングするための方法で使用できる。

【0021】

更なる側面では、本発明には、病的症状を和らげる、又は予防するために十分な量の g 1 2 L ポリペプチド、g 1 2 L 核酸、又は g 1 2 L 特異的抗体を被検体（例えば、ヒト被検者）へ投与することによって、哺乳動物の疾患に関連した病的症状を治療又は予防する方法が含まれる。好ましい実施態様では、疾患には、

肥満、糖尿病、及び悪液質等の代謝疾患及び疾病；過形成、癌、及び再狭窄等の細胞増殖疾患及び疾病；アルツハイマー病、及びパーキンソン病等の神経変性疾患及び疾病；AIDS、炎症、及び自己免疫疾患等の免疫疾患及び疾病；SCID、周期性好中球減少症、及び血小板血症等の造血性疾患及び疾病が含まれる。より好ましい実施態様では、投与とは、肥満又は肥満関連疾患で苦しんでいると思われる被検体に対するものである。

【0022】

更にその他の側面では、本発明は、当該分野で共通に用いられている多数の技術のどれか一つによって、g12L核酸及びポリペプチドと相互作用をする細胞性レセプター及び下流のエフェクターを含む細胞性組成物を同定する方法に使用できる。2-ハイブリッドシステムに限定されるものではないが、これらには、アフィニティー精製、抗体又は他の特異的相互作用分子による共沈殿を含む。

ここに記載のものと類似又は同等の方法及び材料は本発明の実行又は試験に使用できるが、適切な方法及び材料は下記に記載されている。すべての出版物、特許出願、特許、並びにここで言及されている他の参考文献が、その全てが参考文献として取り入れられている。抵触する場合は、定義を含む本明細書がコントロールする。加えて、材料、方法、及び実施例は、単に例示的であり、限定することを意図していない。

【0023】

(詳細な説明)

褐色脂肪細胞組織(BAT)の代謝活性と増殖状態に影響を与える条件下でBATで発現する遺伝子を同定することによって、発明者らは、既知の核酸及びタンパク質に対して相当な相同性を有する新規核酸及びポリペプチドを単離した。そのような相同性のあるタンパク質の一つはSpot14である。

【0024】

ヒト、マウス、及びラットのSpot14は、およそ~18kDの核に位置するタンパク質であり、マウス、ラット、及びヒトで高頻度で保存されている。ヒト遺伝子は、ラットSpot14遺伝子に対するアミノ酸レベルで81%の同一性があり、マウスホモログは、ラット遺伝子産物に対して94%の同一性である(Grillasca,

FEBS Lett. 1997 Jan 13; 401(1): 32-42)。ラットSpot14は、相対的に良く研究されており、WAT(白色脂肪組織)、BAT(インシュリン、レチノイン酸、cAMP)、及び肝臓での代謝制御に関連する多くの条件下で、その発現が調節されていることが示されている。それは、インシュリン、炭水化物、及び甲状腺ホルモン(TH)によって上方制御されている。この後者で観察された調節は、肝臓においてそれがTH応答遺伝子として同定されることにつながる。インシュリン、TH、及び炭水化物がSpot14の発現を上方制御する一方で、食事性脂肪及びポリ不飽和脂肪酸は下方制御を引き起こす(Clarke, J Nutr. 1990 Feb; 120(2): 225-31; Jump, Proc Natl Acad Sci USA. 1993 Sep 15; 90(18): 8454-8)。代謝作用化合物に应答してその発現パターンと調節を示すSpot14は、正常及び疾患症状の下で、脂質生合成及び/又は脂質生合成組織の発生/増殖にとって重要な役割を果たす(Grillasca, FEBS Lett. 1997 Jan 13; 401(1): 38-42)。

【0025】

Spot14の増幅は癌と関連している。、腫瘍の成長と弱い予後の予想にとって必要な増大した長鎖脂肪酸合成は、乳癌で起こり得る。Spot14タンパク質は、脂肪酸合成の酵素をコードしている遺伝子を活性化する機能がある。ヒトSpot14遺伝子がある染色体領域11q13の増幅は、同じく乳癌の弱い予後を予言する。ヒトSpot14遺伝子は、11q13の増幅領域のテロメア末端のマーカーD11S906とD11S937の間に位置し、乳癌由来細胞株で増幅し発現していることが見出された。腫瘍代謝の決定因子としてのタンパク質の役割が他の発見で支持された。Spot14の発現は、乳癌の2つの予後インジケータの間の病理生理学的な関連を示した：増大した脂質生合成と11q13増幅(Moncur, Cytogenet Cell Genet. 1997; 78(2): 131-2; Cunningham, Thyroid. 1998 Sep; 8(9): 815-25; Moncuri, Proc Natl Acad Sci USA. 1998 Jun 9; 95(12): 6989-94)。

【0026】

Spot14タンパク質は、哺乳動物ホモログである小さなゼブラフィッシュ(Danio reio)原腸陥入特異的タンパク質によって、g12だと考えられる(Grillasca, FEBS Lett. 1997 Jan 13; 401(1): 38-42)。Spot14は、g12に対して高頻度のホモロジーを有する。Spotタンパク質及び密接に関連したタンパク質は、g

12様タンパク質のより大きなファミリーとして、正常及び疾患の状況下で、脂質合成（及び他）組織の発生及び/増殖の間の分化の役割を担う。推定上のファミリーメンバーは、幾つかの共通の特徴を有する：低分子量である「spot box」、及び恐らくは高アスパラギン酸及びグルタミン酸量を有する10-20アミノ酸のカルボキシ末端の高酸性領域が存在することによる酸性pI (Grillasca, FEBS Lett. 1997 Jan 13; 401(1): 38-42)。

本発明は、部分的に、マウス、ラット、及びヒトのSpot14タンパク質よりもg12に類似している新規ポリペプチドをコードする新規のマウス遺伝子のヒトホモログのみならず、新規マウス遺伝子の発見に基づいている。これら新規遺伝子及びポリペプチドは、ここでまとめて「g12様」(g12L)と命名されている。

【0027】

本発明の新規g12L核酸には、表1A及び2Aに示されている配列の核酸、又はその断片が含まれる。また、発明には、突然変異体又は変異体g12L核酸が含まれていて、その任意の塩基は表1A及び2Aに示された対応する塩基から変化し得るが、突然変異体又は変異体g12L核酸は、まだg12Lタンパク質断片、又はそのような核酸の断片の活性及び生理学的機能を維持するタンパク質をコードする。更に、本発明には、相補的核酸断片を含む、丁度記載したものと配列が相補的である核酸を更に含む。本発明には、更に、構造に化学的に修飾したものを含む、核酸又は核酸断片、或いはその相補鎖が含まれる。限定しない例によって、そのような修飾物には、修飾塩基、並びに糖リン酸骨格が修飾又は誘導体化されている核酸が含まれる。これらの修飾は、少なくとも部分的におこなわれ、修飾核酸の化学的安定性を増し、例えば、それらがアンチセンス結合核酸として被検体への治療上の用途に使用でき得るようにする。突然変異体又は変異体核酸、及び核酸相補鎖では、20%まで又はさらに多くの塩基がそのように変化し得る。

【0028】

本発明の新規g12Lタンパク質には、表1B及び2Bに示す配列のタンパク質断片が含まれる。また、発明には、g12L突然変異体又は変異体タンパク質

が含まれていて、その任意の塩基は表1B及び2Bに示された対応する塩基から変化し得るが、g12L突然変異体又は変異体タンパク質は、まだその天然活性及び生理学的機能、或いはその機能断片を維持するタンパク質をコードする。突然変異体又は変異体g12Lタンパク質では、20%まで、又はそれより多い残基がそのように変化し得る。本発明には、更に、本発明の任意のg12Lタンパク質と免疫特異的に結合する F_{ab} 又は $(F_{ab})_2$ のような抗体及び抗体断片が含まれる。

【0029】

ヒトg12L

表1Aは、ヒトg12Lタンパク質をコードするヌクレオチド断片の核酸配列を表している。推定上のATG開始コドンは、太字の下線タイプで標識されている。推定上の終止コドンは、太字のイタリック下線タイプである。配列は、ライン当たり45文字で表されている。

【0030】

表1A . ヒトg12Lヌクレオチド断片 (配列番号 : 1)

1 GCGCGCCAGGGGTGGCCCTGAGCGCCGGCGACACCTTTCCTGGAC
46 TATAAATTGAGCACCTGGGATGGGTAGGGGGCCAACGCAGTCACC
91 GCCGTCCGCAGTCACAGTCCAGCCACTGACCGCAGCAGCGCCCTT
136 GCGTAGCAGCCGCTTGCAGCGAGAACAACACTGAATTGCCAACGAGCA
181 GGAGAGTCTCAAGGCGCAAGAGGAGGCCAGGGCTCGACCCACAGA
226 GCACCCTCAGCCATCGCGAGTTTCCGGGCGCCAAAGCCAGGAGAA
271 GCCGCCCATCCCGCAGGGCCGGTCTGCCAGCGAGACGAGAGTTGG
316 CGAGGGCGGAGGAGTGCCGGGAATCCCGCCACACCGGCTATAGCC
361 AGGCCCCAGCGCGGGCCTTGGAGAGCGCGTGAAGGCGGGCATCC
406 CCTTGACCCGGCCGACCATCCCGTGCCCTGCGTCCCTGCGCTC
451 CAACGTCCGCGCGGCCACCATGATGCAAATCTGCGACACCTACAA
496 CCAGAAGCACTCGCTCTTTAACGCCATGAATCGCTTCATTGGCGC
541 CGTGAACAACATGGACCAGACGGTGATGGTGCCAGCTTGCTGCG
586 CGACGTGCCCTGGCTGACCCCGGGTTAGACAACGAGGTCAGCGT
631 GGAGGTAGGCGGCAGTGGCAGCTGCCTGGAGGAGCGCACGACCCC
676 GGCCCCAAGCCCGGGCAGCGCCAATGGAAGCTTTTTTCGCGCCCTC
721 CCGGGACATGTACAGCCACTACGTGCTGCTCAAGTCCATCCGCAA
766 CGATATTGAGTGGGAGTCTGCACCAGCCGCCTCCACCGGCTGG
811 GAGCGAGGAGGGCAGTGCCTGGAAGTCCAAGGACATCCTGGTGA
856 CCTGGGCCACTTGGAGGGTGC GGACGCCGCGAAGAAGACCTGGA
901 ACAGCAGTTCCACTACCACCTGCGCGGGCTGCACACTGTGCTCTC
946 GAAACTCACGCGCAAAGCCAACATCCTCACTAACAGATAACAAGCA
991 GGAGATCGGCTTCGGCAATTGGGGCCACTTGAGGGCGTGCGCCCGT
1036 GGCTGCCCAGCACCTTCTTCGACCCATCTCACCCTCTCTCATTCC
1081 TCAAAGCTTTTTTTTTTCCCTGGCTGGGGGGCGGAAAGGGCAAA
1126 CTG

配列番号：1によってコードされているポリペプチドは、表1Bにおいて一字コードを使用して表されている。

【0032】

表1B . ヒトg12Lポリペプチド配列 (配列番号：2)

```
1    MMQICDTYNQKHSLFNAMNRFIGAVNNMDQTMVPSLLRDVPLADPGLDNEVSVEVGGSGSCLEERTTPA
71   PSPGSANGSFFAPSRDMYSHYVLLKSIRNDIEWGVLHQPPPPAGSEEGSAWKSKDILVDLGHLEGADAGE
141  EDLEQQFHYHLRGLHTVLSKLTRKANILTNRKQEQEIGFGNWGH
```

【0033】

マウスg12L

表2Aは、マウスg12Lタンパク質をコードするヌクレオチド断片の核酸配列を表す。推定上のATG開始コドンは、太字下線タイプで標識されている。推定上の終止コドンは、太字のイタリック下線タイプである。推定上のポリアデニル化部位は、イタリックの下線タイプである。配列は、ライン当たり45文字で表している。

【0034】

表2A . マウスg12Lヌクレオチド断片 (配列番号：3)

1 CGGACGCGTG GGGGAGGTAGGAGGAGGAGACATCAGGGGTGGTCC
46 TGGGCGCCTGGGACACCTTTCCCGGACTATAAATTGAGCACCTGG
91 AATGGGCAGGGGGCCGGAGCAACCACAGTCGCCCTTACTCACAGT
136 CCGATCAGTGACCGCAGCAGCGCCCTTGGGCAGCCACCGTCCGCA
181 ACGCAAGCACTGAGAACCAGGGGATTTTCGCAGTGCAAGAGAAAA
226 GGCTAGACCCAGCCACCCACCGTCAATCCTGAGCCAAAGATAAGA
271 GCAGCCGGGCCTCACGAAGGGCTGAGCTGAGAAAGAAGCAAGTTA
316 GAGAGGGCGGAGAAGGATCTGGGAATCCCGTCACACCGGCTTCAA
361 GCAGGCTCCCGGCATCAGCCTCTGAGAGCGCTTGAAGGCGGCATC
406 GCCAGCGGTCTATCTCCGTGTACCAGCGTCCCTGTGTTTCCGCGC
451 CCGCTCGGCCACCAATGATGCAAATCTGCGACACATATAACCAGAA
496 GCACTCGCTCTTTAACGCCATGAATCGCTTCATTGGCGCGGTGAA
541 CAACATGGACCAGACGGTGATGGTGCCAGTCTGCTGCGCGACGT
586 ACCCCTGTCCGAGCCGGAGATAGACGAGGTCAGCGTGGAGGTAGG

631 CGGCAGTGGCGGCTGCCTGGAGGAGCGCACGACCCCGGCCCAAG
676 CCCGGGCAGCGCCAATGAAAGCTTTTTTCGCGCCCTCCCGGGACAT
721 GTACAGCCACTACGTGCTGCTCAAGTCCATCCGCAATGATATCGA
766 GTGGGGAGTCCTGCACCAGCCTTCGTCTCCGCCGGCCGGGAGCGA
811 GGAGAGCACCTGGAAGCCCAAGGACATCCTGGTGGGCCTGAGTCA
856 CTTGGAGAGCGCGGATGCGGGCGAGGAAGATCTGGAGCAGCAGTT
901 CCACTACCACCTGCGCGGGCTGCACACCGTGCTCTCCAAACTCAC
946 CCGAAAAGCCAACATCCTCACCAATAGATACAAGCAGGAGATCGG
991 CTTCAGTAATTGGGGCCACTGAGGCGGGGGCTGTCCCCGCTGCC
1036 AGCACCTCTCTCGGGTCGGCTCTACCACCCCTCTCTTTCCTCCA
1081 AGCTATTTTCTCCTGGTTGTGGGGCGCGAAGGGCACACTGTAAA
1126 GTTGGGCTGTGTACTTGGTGGGGTTAGTGTGGAGAAGAGGGCCTC
1171 ATCGCGAGAGCAGAGGAAAGTAGTCGCCAGAGAGGGGGTTCAA
1216 GACCCCGGAGGGGGCCTACTCTGTGTTGGTGGGAATGGAAGTGG
1261 GCCGATGTCCTTCATTCAGCCTGTGCCTTTCTTGGGGTTTCTTTT
1306 CTGTTTTTCTTTCCGGAAGAGAAGGGCCTGAGAAAGGGCCATGCC
1351 AGGGCACAGTGCTGGGTTGCCACACATGGGAGGGCAGCTTCTAGC
1396 CGGGTGCTTGGGGGAGGCGGGGCTCAGCCTCCTGCTGCCCTGCCT
1441 TGAGCTGCCAGAGGAGGCCTTGGCGTTGCTAGGATTGCGTCAGTT
1486 TTCCTGTTTGCACTATTTCTTTTTGTAACAGTGACCCTGTCTTAA
1531 GTCTTTCAGATCTCTTTGCTTTGAAACTTCGTCGATTCCATTGTG
1576 ATAAGCGCACAAACAGCACTGTTGGTAACCGGTACTACTTTATTA
1621 ATGATTTTCTGTTACACTGTACAGTAGTCCTGTGGCACCCCTATCC

1666 CTTTCACGCCACCCCTCCCCCGCCCGTGTGTGTAAACTGGCGATG
 1711 TGCCAGCTAGGATGAAGCTTGCCACTCGGCTAGCGAAAATAATTA
 1756 ACATTATTATGAGAAAGTGGATTTATCTAAAGTGGAAACCAGCTGA
 1801 CATTATATCTGTATCGTATGGAGAATGATGAAGGGCTCCACTGTT
 1846 GTTATATGTCTTGTTTATTTAAACTTTTTTTAATCCAGATGTAG
 1891 ACTATATTCTAAAAATAAAAACGCAGATGTGTAAAC

【0035】

配列番号：3によってコードされたポリペプチドは、表2Bにおいて、一文字コードを使用して表されている。

【0036】

表2B. マウスg12Lポリペプチド配列(配列番号：4)

1 MMQICDTYNQKHS LFNAMNRF IGA VNM DQTVMVPS LLRDVPLSEPE IDEVSVEVGGSGGCLEERTTPAP
 71 SPGSANESFFAPSRDMYSHYVLLKSIRNDIEWGV LHQPSSPPAGSEESTWKPKDILVGLSHLESADAGEE
 141 DLEQQFHYHLRGLHTVLSKLTRKANILTNRYKQEIGFSNWGH

【0037】

g12Lポリペプチドとゼブラフィッシュg12、及びマウス、ラット、そしてヒトSpot14ポリペプチドのアライメントが図1に示されている。

本発明のg12L核酸及びタンパク質は、例えば、肥満、糖尿病、及び悪液質等の代謝疾患及び疾病；過形成、癌、及び再狭窄等の細胞増殖疾患及び疾病；アルツハイマー病、多発性硬化症及びパーキンソン病等の神経変性疾患及び疾病；AIDS、炎症、及び自己免疫疾患等の免疫疾患及び疾病；SCID、周期性好中球減少症、及び血小板血症等の造血性疾患及び疾病に関連する強力な治療上の用途において有用である。好ましい実施態様では、本発明の核酸及びタンパク質は、肥満関連疾患、他の代謝疾患、増殖疾患、及び他の疾患に対する治療上の用途に使用されている。限定されるものではないが、肥満関連疾患には、II型糖尿病(NIDDM)、高血圧、冠状動脈性心臓病、高コレステロール血症、変形性関節症、胆石、生殖器官の癌、及び睡眠時無呼吸が含まれる。例えば、ヒトg1

2 LをコードするcDNAは遺伝子治療において有用であり得るし、ヒトg12Lタンパク質は、それを必要とする被検体へ投与する場合に有用であり得る。本発明のヒトg12Lタンパク質をコードする新規核酸、又はその断片は、核酸又はタンパク質の存在又は量を評価する診断用途、一塩基多型、又は他の変異によって更に有用であり得る。これらの材料は、治療上又は診断上の方法での使用に関する本発明の新規物質と免疫特異的に結合する抗体の生成にとって更に有用である。

【0038】

g12L核酸及びポリペプチド

本発明の一側面は、g12Lポリペプチド又はその生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸に関する。また、本発明に含まれるのは、g12Lコード化核酸（例えば、g12LmRNAs）及び断片を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての用途が十分な核酸断片であって、g12L核酸分子の増幅及び/又は変異のためのPCRプライマーとして使用するものである。ここで使用されているように、「核酸分子」という用語は、DNA分子（例えば、cDNA又はゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチド類似体を使用して生成したDNA又はRNAの類似体、及び誘導體、断片及びそのホモログを意図する。核酸分子は、一本鎖又は二重鎖であってもよいが、好ましくは二重鎖DNAからなる。

【0039】

g12L核酸は、成熟したg12Lポリペプチドをコードすることができる。ここで使用されているように、本発明で開示されているポリペプチド又はタンパク質の「成熟」型とは、天然発生ポリペプチド、又は前駆体型、又はプロタンパク質の産物である。天然発生ポリペプチド、前駆体又はプロタンパク質には、限定しない例によって、対応する遺伝子によってコードされた完全長遺伝子産物が含まれる。あるいは、ここで示されているオープンリーディングフレームによってコードされたポリペプチド、前駆体又はプロタンパク質として定義され得る。再び制限しない例のために、産物の「成熟」型は、遺伝子産物が生じる細胞、又は宿主細胞内で発生し得るように、一つ又は複数の天然発生プロセッシングス

トップの結果として生じる。ポリペプチド又はタンパク質の「成熟」型につながるそのようなプロセッシングステップの例には、オープンリーディングフレームの開始コドンによってコードされるN末端メチオニン残基の切断、或いはシグナルペプチド又はリーダー配列のタンパク質分解が含まれる。従って、残基1がN末端メチオニンである残基1からNを有する前駆体ポリペプチド又はタンパク質はから生じた成熟型は、N末端メチオニンの除去後に残る残基2からNを有する。或いは、N末端シグナル配列の残基1から残基Mが切断された、残基1からNを有する前駆体ポリペプチド又はタンパク質から生じる成熟型は、残基M+1から残りの残基Nまでの残基を有する。更にここで使用されているように、ポリペプチド又はタンパク質の「成熟」型は、タンパク分解性切断以外の翻訳後修飾の段階より生じ得る。このような付加的プロセスには、制限しない例のために、グリコシル化、ミリストイル化又はリン酸化が含まれる。一般的に、成熟ポリペプチド又はタンパク質は、単にこれらプロセスの一つ、又はこれらの何れかの組み合わせの作動によって生じる。

【0040】

ここで使用されるような「プローブ」という用語は、特定の用法に依存し、核酸配列の種々の長さ、好ましくは、少なくとも約10ヌクレオチド($n t$)、100 $n t$ 、或いはおよそ例えば6,000 $n t$ ほどに一致する。プローブは、同一性、類似性、又は相補的核酸配列の検出に使用される。より長いプローブは、一般的に天然又は組み換えソースから得られ、高い特異性があり、より短いオリゴマープローブよりもより遅くハイブリダイズする。プローブは一本鎖又は二本鎖であってもよく、PCR、膜に基づくハイブリダイゼーション技術、又は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ている。

【0041】

ここで使用されている「単離された」核酸分子という用語は、核酸の天然ソースに存在する他の核酸分子から分離されたものである。好ましくは、「単離された」核酸は、核酸が得られる生物のゲノムDNAの核酸(すなわち、核酸の5'-及び3'-末端に位置する配列)と天然に隣接する配列を有しない。例えば、種々の実施例では、単離されたg12L核酸分子は、核酸が得られる細胞/組織(例

例えば、脳、心臓、肝臓、脾臓等)のゲノムDNAの核酸分子と天然に隣接する、約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb又は0.1 kbより低いヌクレオチド配列を含むことができる。更には、cDNA分子のような「単離された」核酸分子には、組み換え技術によって生産された場合には、実質上他の細胞物質又は培養培地がなく、化学的に合成された場合には、化学前駆体又は他の化学物質がない。

【0042】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号：1又は3のヌクレオチド配列、又はこの前出のヌクレオチド配列の相補鎖は、標準的な分子生物学的技術及びここで提供される配列情報を用いることで単離することができる。ハイブリダイゼーションプローブとして配列番号：1又は3の核酸配列のすべて又は一部分を使用して、標準的ハイブリダイゼーション及びクローニング技術を使用して、g12L分子を単離することができる(例えば、Sambrookら.,に記載のように(編集者)、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 第2版., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989;及びAusubel,ら.,(編集者), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New Yorks, NY, 1993)。

本発明の核酸は、cDNA、mRNA又は代わりにゲノムDNAをテンプレートとして、並びに標準的なPCR増幅技術による適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用することで増幅することができる。そのようにして増幅させた核酸は、適切なベクターへクローニングし、DNA配列分析によって特徴付けることができる。さらには、g12Lヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば自動化DNAシンセサイザーを使用するなど、標準的な合成技術によって調製することができる。

【0043】

ここで使用されているように、「オリゴヌクレオチド」という用語は、連続して連結しているヌクレオチド残基を指し、そのオリゴヌクレオチドは、PCR反応に使用す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、ゲノム又はcDNA配列に基づいている、又はそれから設計され、特定の

細胞又は組織での同一、類似又は相補的DNA又はRNAの存在を増幅、確認、又は明かにするために使用される。オリゴヌクレオチドは、約10nt、50nt、又は100nt長を有する核酸配列の一部、好ましくは、約15ntから30nt長である。本発明の一つの実施態様では、100nt長より短い核酸分子からなるオリゴヌクレオチドは、更に、配列番号：1又は3の少なくとも6連続ヌクレオチド、或いはその相補鎖を含む。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成してもよく、プローブとしても使用されてよい。

【0044】

その他の実施態様では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号：1又は3に示すヌクレオチド配列の相補鎖である核酸分子、又はこのヌクレオチド配列の一部（例えば、プローブ又はプライマー、或いはg12Lポリペプチドの生物学的に活性な部分をコードする断片）を含む。配列番号：1又は3に示すヌクレオチド配列と相補的な核酸分子は、配列番号：1又は3に示すヌクレオチド配列と実質的に相補的なものであって、それは配列番号：1又は3に示すヌクレオチド配列と殆どのミスマッチがなく水素結合でき、それによって安定な二重鎖を形成する。

【0045】

ここで使用されるように、「相補的な」という用語は、核酸分子のヌクレオチド単位間のワトソン-クリック又はフーグスティーン塩基対を指し、「結合」という用語は、2つのポリペプチド、又は化合物、又は結合ポリペプチド、又は化合物、又はその組み合わせの間の物理的又は化学的相互作用を意味する。結合には、イオン性、非イオン性、ファンデルワールス、疎水性相互作用等が含まれる。物理的相互作用は、直接又は間接の何れかであってよい。間接相互作用は、その他のポリペプチド又は化合物の作用を介した、又はそれに起因するものである得る。直接結合とは、その他のポリペプチド又は化合物の作用を介して、又はそれに起因して生じる相互作用ではないが、その代替は、他の実質的な化学相互作用を含まない。

【0046】

ここで提供されているのは、少なくとも6（連続）核酸又は少なくとも4（連

続) アミノ酸の配列として定義され、それぞれ、核酸の場合は特異的なハイブリダイゼーション、アミノ酸の場合においてはエピトープの特異的認識を可能にする十分な長さであり、殆どの幾つかの部分が完全長配列より短い。断片は、選択した核酸又はアミノ酸配列の任意の連続した部分から誘導される。誘導体は、核酸配列又はアミノ酸配列であって、直接、或いは修飾又は部分置換によるの何れかで、天然化合物から形成される。類似体は、同一ではないが、天然化合物と構造的な類似性を有する核酸配列又はアミノ酸配列であるが、所定の成分又は側鎖に関して天然化合物と異なる。類似体は、合成又は異なる進化的起源からのもであり得て、野生型と比較して類似又は反対の代謝活性を有し得る。ホモログは、異なる種から誘導された特定の遺伝子の核酸配列又はアミノ酸配列である。

【0047】

下記に記載のように、誘導体又は類似体が修飾核酸又はアミノ酸を含む場合、誘導体及び類似体は完全長又は完全長以外であり得る。本発明の核酸又はタンパク質の誘導体又は類似体には、限定されるものではないが、種々の実施態様において、同じ大きさの核酸又はアミノ酸配列に対して、或いは当該分野で知られているコンピューターホモロジープログラムによってアライメントした配列と比較した場合、或いはコード化核酸が、緊縮性、中程度に緊縮性、又は低い程度の緊縮性の条件下で前出のタンパク質をコードする配列の相補鎖とハイブリダイズすることができるならば、少なくとも約70%、80%、又は95%同一性(好ましい同一性は80-95%)で本発明の核酸又はタンパク質と実質的に相同的である領域を含む分子が含まれる。Ausubelら., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993, 及び以下。

【0048】

「相同的核酸配列」又は「相同的アミノ酸配列」、又はその変異体とは、上記で論じたように、ヌクレオチドレベル又はアミノ酸レベルでの相同性によって特徴付けられる配列を指す。相同的ヌクレオチド配列は、g12Lポリペプチドのイソ型をコードする配列をコードする。イソ型は、例えばRNAの選択的スプライシングの結果として、同じ生物の異なる組織で発現できる。或いは、イソ型は、異なる遺伝子によってコードされている。本発明では、相同的ヌクレオチド配

列には、限定されるものではないが脊椎動物を含むヒト以外の種の g 1 2 L ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が含まれ、従って、このヒト以外の種には、例えば、カエル、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、そして他の生物が含まれることが可能である。また、相同的ヌクレオチド配列には、限定されるものではないが、ここで示したヌクレオチド配列の天然発生の対立遺伝子変異体及び突然変異が含まれる。しかしながら、相同的ヌクレオチド配列には、ヒト g 1 2 L タンパク質をコードする正確なヌクレオチド配列が含まれない。相同的核酸配列には、g 1 2 L の生物学的活性を有するポリペプチドとともに、配列番号：2 又は 4 の保存的アミノ酸置換（下記を参照）をコードする核酸配列が含まれる。g 1 2 L タンパク質の種々の生物学的活性は、下記に示されている。

【0049】

g 1 2 L ポリペプチドは、g 1 2 L 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ている。ORF は、潜在的にポリペプチドへ翻訳されるヌクレオチド配列に相当する。ORF を含む核酸の一続きには、終止コドンによる妨害がない。全タンパク質に関するコード化配列を表す ORF は、ATG 「開始」コドンで始まり、すなわち TAA、TAG、又は TGA の 3 つの「終止」コドンのうちのひとつで終止する。この発明の目的のためには、ORF は、開始コドン、終止コドン、或いは双方を有する又は有しないコード化配列の何れの部分でもよい。正真正銘のタンパク質をコードする良い候補として考えられる ORF のためには、最小の大きさの必修条件がしばしば設定され、それは例えば、50 又はそれより多いアミノ酸のタンパク質をコードする DNA の一続きである。

【0050】

ヒト g 1 2 L 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、他の脊椎動物の g 1 2 L ホモログのみならず、他の細胞型、例えば他の組織の g 1 2 L ホモログを同定し及び/又はクローニングするために設計されたプローブとプライマーの生成を可能にする。プローブ/プライマーは、典型的には、十分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、典型的には、

緊縮性の条件下で、配列番号：1又は3の少なくとも約12、25、50、100、150、200、250、300、350又は400連続センスヌクレオチド配列；配列番号：1又は3のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；或いは配列番号：1又は3の天然発生変異とハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【0051】

ヒトg12Lヌクレオチド配列に基づいたプローブは、同じ又は相同的なタンパク質をコードする転写物又はゲノム配列を検出するために使用できる。種々の実施例では、このプローブは、さらに、それへ結合した標識基を含み、例えば標識基は、ラジオアイソトープ、蛍光化合物、酵素、又は酵素の補因子とすることができる。そのようなプローブは、g12Lタンパク質を間違えて発現する細胞又は組織を同定する診断試験キットの一部として使用でき、それは例えば、被検体の細胞の試料中のg12Lコード化核酸のレベルを測定すること、例えば、g12L mRNAレベルを検出する、或いはゲノムg12L遺伝子に変異している、又は削除されたかどうかを決定することである。

【0052】

「g12Lポリペプチドの生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」とは、必ずしも同一ではないが、本発明のポリペプチドの活性と同じような活性を示すポリペプチドを指し、特定の生物学的アッセイで測定されるような用量依存性を有する又は有しない成熟型を含む。「g12Lの生物学的に活性な部分」をコードする核酸断片は、g12Lの生物学的活性を有するポリペプチドをコードする（g12Lタンパク質の生物学的活性は下記に記載）配列番号：1又は3の一部分を単離すること、g12Lタンパク質のコードされた部分を発現させること（例えば、インビトロで組み換え発現による）、そしてg12Lのコードされた部分の活性を評価することで調製できる。

【0053】

g12L核酸及びポリペプチド変異体

遺伝子コードの縮重のために、本発明は更に配列番号：1又は3に示すヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を含み、それ故に配列番号：1又は3に示すヌク

レオチド配列によってコードされているのと同じようなg12Lタンパク質をコードする。その他の実施態様では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号：2又は4に示す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。

【0054】

配列番号：1に示すヒトg12Lヌクレオチド配列に加えて、g12Lポリペプチドのアミノ酸配列の変化につながるDNA配列多型が個体群（例えば、ヒト個体群）の中に存在し得ることは、当該分野に熟練した者によって評価されている。そのようなg12L遺伝子の遺伝的多型は、天然対立遺伝子の変異の結果、個体集団の中の個人の中に存在し得る。ここで使用されているように、「遺伝子」及び「組み換え遺伝子」とは、g12L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（ORF）を含む核酸分子、好ましくは脊椎動物のg12Lタンパク質を含む核酸分子を指す。このような天然対立遺伝子の変異は、g12L遺伝子のヌクレオチド配列において1-5%の変動を生じる。天然対立遺伝子の変異の結果であり、g12Lポリペプチドの機能的活性に変化をもたらさない、g12Lポリペプチドの任意及びすべてのそのようなヌクレオチド変異体、及び結果として生じるアミノ酸多型は、本発明の範囲内にあるよう意図されている。

【0055】

更に、他の種のg12Lタンパク質をコードし、そしてそれ故に配列番号：1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よう意図されている。天然対立遺伝子の変異体、並びに本発明のg12L cDNAsのホモログに相当する核酸は、それらのヒトg12L核酸に対する相同性を基に、緊縮性のハイブリダイゼーション条件下で標準ハイブリダイゼーション技術に従ってヒトcDNAs、又はその一部分をハイブリダイゼーションプローブとして使用することで単離することができる。

【0056】

従って、その他の実施態様では、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、配列番号：1又は3のヌクレオチド配列を含む核酸分子と、緊縮性条件下でハイブリダイズする。その他の実施態様では、核酸は少な

くとも10、25、50、100、250、500、750、1000、1500、又は2000、或いはより長いヌクレオチドである。更なるその他の実施態様では、本発明の単離された核酸分子はコーディング領域とハイブリダイズする。ここで使用されているように、「緊縮性条件下でのハイブリダイズ」という用語は、少なくとも互いに対して60%の相同的なヌクレオチド配列が大体が、互いにハイブリダイズしたままとなるハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を表すように意図されている。

ホモログ(すなわち、ヒト以外の種に由来するg12Lタンパク質をコードする核酸)、又は他の関連する配列(例えば、パラログ)は、核酸ハイブリダイゼーション及びクローニングに関する分野において良く知られている方法を使用し、特定のヒト配列のすべて又は一部分をプローブとし、低度、中程度、高度の緊縮性ハイブリダイゼーションによって得ることができる。

【0057】

ここで使用されているように、「緊縮性ハイブリダイゼーション条件」という成句は、プローブ、プライマー又はオリゴヌクレオチドが、他の配列ではなく、その標的配列とハイブリダイズする条件を指す。緊縮性条件は配列依存性であり、異なった環境では違ったものである。より長い配列は、より短い配列に比べて、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般的に、緊縮性条件は、限定されたイオン強度とpHでの特異的配列の熱融解点(T_m)よりも約5%低く選択される。 T_m とは、標的配列に対して相補的なプローブの50%が、平衡時に標的配列とハイブリダイズする温度(限定されたイオン強度、pHそして核酸濃度)である。標的配列は、一般的に過度に存在するので、 T_m では、平衡時に50%のプローブが占められる。典型的には、緊縮性条件とは、塩濃度が約1.0M未満のナトリウムイオン、一般的には、pH7.0から8.3で約0.01から1.0Mナトリウムイオン(又は他の塩)、そして温度は、短いプローブ、プライマー、又はオリゴヌクレオチド(例えば、10ntから50nt)のためには少なくとも約30%、並びにより長いプローブ、プライマー及びオリゴヌクレオチドのためには少なくとも約60%である。また、緊縮性条件は、ホルムアルデヒドのような不安定化剤の添加によって達成され得る。

【0058】

緊縮性条件下は、当該分野に熟練している者には知られており、Ausubel等、(編集者)CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。好ましくは、条件は、少なくとも相互に約65%、70%、75%、85%、90%、95%、又は99%の相同性の配列が、大体は互いにハイブリダイズしたままのものである。緊縮性ハイブリダイゼーション条件の限定されない例とは、65 で6X SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.02% BSA、及び500mg/ml 変性サケ精子DNAを含む高塩バッファーでハイブリダイゼーションし、続いて0.2X SSC、0.01% BSAで50 で1又は複数回洗浄することである。緊縮性条件下で、配列番号：1又は3の配列とハイブリダイズする本発明の単離された核酸は、天然発生の核酸分子に相当する。ここで使用されているように、「天然発生」核酸分子とは、天然で生じるヌクレオチド配列を有するRNA又はDNA分子を指す(例えば、天然タンパク質をコードする)。

【0059】

二番目の実施態様では、中程度の緊縮性の条件下で、配列番号：1又は3のヌクレオチド配列、又はその断片、類似体、又は誘導体を含む核酸分子とハイブリダイズする核酸配列が提供される。中程度の緊縮性ハイブリダイゼーション条件の限定されない例とは、55 で6X SSC、5X デンハート液、0.5% SDS及び100mg/ml 変性サケ精子DNAでハイブリダイゼーションし、続いて37 で1X SSC、0.1% SDSで1又は複数回洗浄することである。使用され得る他の中程度の緊縮性の条件は、当該分野で良く知られている。例えば、Ausubel等、(編集者)1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY,及びKriegler, 1990; GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NYを参照のこと。

【0060】

三番目の実施例では、低度の緊縮性の条件下で、配列番号：1又は3のヌクレオチド配列、又はその断片、類似体、又は誘導体を含む核酸分子とハイブリダイ

ズする核酸配列が提供される。低度の緊縮性ハイブリダイゼーション条件の限定されない例とは、40℃で35%ホルムアルデヒド、5X SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.2% BSA、100mg/ml 変性サケ精子DNA、10% (wt/vol) 硫酸デキストランでハイブリダイゼーションし、続いて50℃で2X SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA、及び0.1% SDSで1又は複数回洗浄することである。使用され得る他の低度の緊縮性の条件は、当該分野で良く知られている(例えば、異種間ハイブリダイゼーション)。例えば、Ausubel等,(編集者)1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, 及びKriegler, 1990; GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; Shilo及びWeinberg, 1981. Proc Natl Acad Sci USA 78: 6789-6792。

【0061】

保存的変異

個体群の中に存在し得るg12L配列の天然発生対立遺伝子の変異体に加えて、突然変異によって、配列番号:1又は3のヌクレオチド配列へ変化を導入することができ、それによってg12Lタンパク質の機能を変えること無しに、コードされたg12Lタンパク質のアミノ酸配列を変化させることにつながることを、熟練者は更に理解している。例えば、「非必須」アミノ酸残基のアミノ酸置換につながるヌクレオチド置換は、配列番号:2又は4の配列において作成することができる。「非必須」アミノ酸残基とは、g12Lタンパク質の生物学的活性を変えることなしに、g12Lタンパク質の野生型配列で変えることができる残基であり、一方で、「必須」アミノ酸残基とは、そのような生物学的活性にとって必要であるものである。例えば、本発明のg12Lタンパク質中に保存されたアミノ酸残基は、特に変化に対して非感受性であると予測される。保存的置換されることが可能なアミノ酸は、当該分野において良く知られている。

【0062】

本発明のその他の側面は、活性にとって必須ではないアミノ酸残基の変化を含むg12Lタンパク質をコードする核酸分子に関する。そのようなg12Lタン

パク質は、アミノ酸配列に関して、配列番号：2又は4とは異なり、更には生物学的活性を保持する。一実施態様では、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、そのタンパク質は、配列番号：2又は4のアミノ酸配列に対して少なくとも約45%相同的な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たタンパク質は、配列番号：2又は4に対して少なくとも約60%相同的であり；より好ましくは、配列番号：2又は4に対して少なくとも約70%相同的であり；さらにより好ましくは、配列番号：2又は4に対して少なくとも約80%相同的であり；なおよりこのましくは、配列番号：2又は4に対して少なくとも約90%相同的であり；そして最も好ましくは、配列番号：2又は4に対して少なくとも約95%相同的である。

配列番号：2又は4のタンパク質に対して相同的なg12Lタンパクをコードする単離された核酸分子は、一つ又は複数のヌクレオチド置換、付加、又は削除を配列番号：1又は3のヌクレオチド配列へ導入することで生成が可能であるので、一つ又は複数のアミノ酸置換、付加又は削除をコードしているタンパク質へ導入する。

【0063】

部位特異的突然変異誘発、及びPCR媒介突然変異誘発のような標準的技術によって、配列番号：2又は4へ突然変異を導入することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、一つ又は複数の予想された非必須アミノ酸残基においてなされる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基を類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することを指す。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野において定義されている。これらファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベーター分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。従って、g12Lタ

タンパク質中の予測される非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーのその他のアミノ酸残基によって置換される。あるいは、その他の実施態様では、例えば飽和突然変異誘発によって、g 1 2 Lコード化配列のすべて又は一部分に沿ってランダムに変異を導入することができ、その結果生じた変異体を、活性を保持する変異体を同定するために、g 1 2 L生物学的活性についてスクリーニングすることができる。配列番号：2又は4の突然変異誘発に続いて、当該分野で知られている任意の組み換え技術によって、コードされているタンパク質を発現させることができ、そしてそのタンパク質の活性を測定することができる。

【0064】

また、アミノ酸ファミリーの関連性は、側鎖の相互作用によって決定することが可能である。置換されたアミノ酸は、完全に保存された「強い」な残基、又は完全に保存された「弱い」残基である。保存されたアミノ酸残基の「強い」群は、次の群の中の何れかである：S T A、N E Q K、N H Q K、N D E Q、N D E Q、Q H R K、M I L V、M I L F、H Y、F Y Wで、一文字アミノ酸コードは、互いに置換しあえるアミノ酸とグループ化されている。同様に、保存された残基の「弱い」群は、次の群の中の何れかである：C S A、A T V、S A G、S T N K、S T P A、S G N D、S N D E Q K、N D E Q H K、N E Q H R K、V L I M、H F Yで、各群の文字は、一文字アミノ酸コードを表す。

一実施態様では、脂肪組織の分化又は発生に作用する能力に関して、変異体g 1 2 Lタンパク質をアッセイすることができる。更にその他の実施態様では、より一般的な生物学的機能（例えば、動物の代謝）を制御する能力に関して、変異体g 1 2 Lタンパク質をアッセイすることができる。

【0065】

アンチセンス核酸

本発明のその他の側面は、配列番号：1又は3のヌクレオチド配列、又はその断片、類似体又は誘導体を含む核酸分子に対して、ハイブリダイスすることができる、又は相補的な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」核酸に対して相補的なヌクレオチド配列を含む（例えば、二重鎖c DNA分子のコード鎖に対して相補的、又はm

RNA配列に対して相補的)。特定の側面では、少なくとも約10、25、50、100、250又は500ヌクレオチド或いは全g12Lコード鎖に対して、或いは単にその一部分に対して相補的な配列を含むように、アンチセンス核酸分子が提供されている。配列番号：2又は4の断片、ホモログ、誘導体及びg12Lタンパク質の類似体；或いは配列番号：1又は3のg12L核酸配列に対して相補的なアンチセンス核酸がさらに提供されている。

【0066】

一実施態様では、アンチセンス核酸分子は、g12Lタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コーディング領域」に対してアンチセンスである。「コーディング領域」という用語は、アミノ酸残基へ翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を指す。その他の実施態様では、アンチセンス核酸分子とは、g12Lタンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コーディング領域」に対するアンチセンスである。「非コーディング領域」という用語は、アミノ酸へ翻訳されないコーディング領域に隣接する5'及び3'配列を指す(すなわち、5'及び3'非翻訳領域とも呼ぶ)。

【0067】

ここで開示されているg12Lタンパク質をコードするコード鎖配列を考えると、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソン及びクリック、又はフーグスティン塩基対則に従って設計できる。アンチセンス核酸分子は、g12L mRNAの全コーディング領域に対して相補的となることができるが、より好ましいのは、g12L mRNAのコーディング又は非コーディング領域の一部のみに対して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、g12L mRNAの翻訳開始部位の周辺領域に対して相補的となることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長である。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で知られている手法を用いる化学合成又は酵素ライゲーション反応を利用して構築できる。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)を、分子の生物学的安定性を増す、或いはアンチセンスとセンス核酸の間に形成される二重鎖の物理的安定性を増すよう

に設計された天然発生ヌクレオチド又は種々の修飾ヌクレオチドを用いて、化学的に合成することができる（例えば、ホスホロチオネート誘導体とアクリジン置換ヌクレオチドを用いることができる）。

【0068】

アンチセンス核酸の生成に利用できる修飾ヌクレオチドの例には、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、ベータ-D-ガラクトシルキユエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルキユエオシン、5'-メトキシカルボキシルメチルウラシル、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、プソイドウラシル、キユエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、及び2,6-ジアミノプリンが含まれる。或いは、核酸をアンチセンス方向にサブクローンした発現ベクターを用いて、アンチセンス核酸を生物学的に生成することができる（すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、対象である標的核酸に対してアンチセンス方向にあり、下記の小節に更に記載されている）。

【0069】

本発明のアンチセンス核酸分子は、大体において被検体へ投与される、或いはインサイツで生成され、g12Lタンパク質をコードする細胞性mRNA及び/又はゲノムDNAとハイブリダイズ又は結合して、それによってタンパク質の発現を阻害する（例えば、転写及び/又は翻訳を阻害することによって）。安定な

二重鎖を形成する相補的な従来型のヌクレオチドによって、或いは、例えばDNA二重鎖と結合するアンチセンス核酸の場合は、二重らせんの主溝における特異的相互作用を通して、ハイブリダイゼーションは可能である。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例には、組織部位での直接注入が含まれる。或いは、アンチセンス核酸分子を選択した細胞を標的とするように修飾し、全身投与することができる。例えば、全身投与のためには、選択した細胞の表層上に発現するレセプター又は抗原と特異的に結合するように、アンチセンス分子を修飾することができる(例えば、アンチセンス核酸を、細胞表層のレセプター又は抗原と結合するペプチド又は抗原と結合させる)。また、アンチセンス核酸分子を、ここに記載のベクターを用いて、細胞へ送達することができる。十分な核酸分子を実現するために、アンチセンス核酸分子を強力なp o l II又はp o l IIIプロモーターの制御下に配したベクター作成物が好まれる。

【0070】

更にその他の実施態様では、本発明のアンチセンス核酸分子は、 β -アノマー核酸分子である。 β -アノマー核酸分子は、通常の α -ユニットとは逆で、ストランドが互いに平行である相補的RNAと特異的な二重鎖ハイブリッドを形成する。Gaaultier, ら., 1987. Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641を参照せよ。アンチセンス核酸分子は、同じく2'- α -メチルリボヌクレオチド(例えば、Inoue, ら., 1987. Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148を参照せよ)、又はキメラRNA-DNAアナログ(Inoue, ら., 1987. FEBS Lett. 215: 327-330)を含むことができる。

【0071】

リボザイム及びPNA部分

制限のない例として、核酸修飾には、修飾塩基、並びに糖リン酸骨格が修飾又は誘導された核酸が含まれる。これらの修飾は、それらが、例えば、被検体での治療的用途においてアンチセンス結合核酸としてとして使用し得るように、修飾核酸の化学的安定性を増ように少なくとも部分的におこなわれる。

【0072】

一つの実施態様では、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザ

イムとは、例えばmRNAのような、相補性領域を有する一本鎖核酸を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子である。従って、リボザイム（例えば、Haselhoff及びGerlach 1988. Nature 334: 585-591に記載のようなハンマーヘッドリボザイム）を、g 1 2 L mRNA転写物を触媒的に切断することに用いることができ、それによってg 1 2 L mRNAの翻訳を阻害できる。1 2 L-コード化核酸に対して特異性を有するリボザイムを、ここで開示されたg 1 2 L cDNAのヌクレオチド配列に基づいて設計することができる（すなわち、配列番号：1又は3）。例えば、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体は、g 1 2 L-コード化mRNAの切断されるヌクレオチド配列に対して相補的である活性部位のヌクレオチド配列で構築できる。例えば、Cech, らへの米国特許第4, 987, 071号、及びCech, らへの米国特許第5, 116, 742号を参照せよ。また、g 1 2 L 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RNAを選択するために用いることができる。例えば、Bartelら., (1993) Science 261: 1411-1418を参照せよ。

【0073】

或いは、g 1 2 L 遺伝子発現は、標的細胞のg 1 2 L 遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成するよう、g 1 2 L 核酸の制御領域（例えば、g 1 2 L プロモーター及び/又はエンハンサー）に対して相補的なヌクレオチド配列を標的化することによって阻害することができる。Helene, 1991. Anticancer Drug Des. 6: 569-84; Helene, ら. 1992. Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27-36; Maher, 1992. Bioassays 14: 807-15を参照のこと。

【0074】

種々の実施態様では、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、又は溶解性を向上させるために、g 1 2 L 核酸は、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格を修飾することができる。例えば、ペプチド核酸を生成するために、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を修飾することができる。例えば、Hyrup, ら., 1996. Bioorg Med Chem 4: 5-23を参照せよ。ここで用いられているように、デオキシリボースリン酸骨格がシュードペプチド骨格で置換され、4つの核酸塩基のみが保持されているという点で、「ペプチド核酸」又は「PNAs」という用語は、核酸模

倣物（例えば、DNA倣物）を指す。PNAsの天然骨格は、低イオン強度の下で、DNA及びRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションが可能であることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup,ら., 1996. 上掲; Perry-0'Keefe,ら., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-14675に記載のように、標準的固相ペプチド合成プロトコルを用いておこなうことができる。

【0075】

g12LのPNAsは、治療的及び診断的用途に用いることができる。例えば、PNAsは、例えば、転写又は翻訳停止、又は複製の阻害を含むことによって、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンス又は抗遺伝子剤として使用することができる。また、g12LのPNAsは、例えば、遺伝子の単一塩基置換の分析において使用することができる（例えば、PNA定方向PCRクランピング；例えばS₁ヌクレアーゼ等、他の酵素との組み合わせで使用される人工制限酵素として（Hyrup,ら., 1996上掲を参照せよ）；又はDNA配列及びハイブリダイゼーションのためのプローブ又はプライマー（Hyrup,ら., 1996, 上掲；Perry-0'Keefe,ら., 1996.上掲を参照せよ）。

【0076】

その他の実施態様では、親油性又は他のヘルパー基をPNAへ結合させることによって、PNA-DNAキメラの形成によって、或いはリポソーム又は当該分野で知られている薬物送達の他の技術によって、g12LのPNAsを、その安定性又は細胞性取り込みを高めるために修飾することができる。例えば、g12LのPNA-DNAキメラを、PNA及びDNAの有利な特性を組み合わせるように生成することができる。そのようなキメラは、PNA部分が高い結合親和性及び特異性を示す一方で、DNA認識酵素（例えば、RNase H及びDNAポリメラーゼ）がDNA部分と相互作用することを可能にする。塩基スタッキング、核酸塩基間の結合数、及び配向性によって選択されるリンカーの適切な長さを用いて、PNA-DNAキメラを結合させることができる（Hyrup,ら., 1996.上掲）。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup,ら., 1996. 上掲及びFinn,ら., 1996. Nuc l Acids Res 24: 3357-3363に記載されているようにおこなうことができる。例えば、DNA鎖は、標準ホスホラミダイトカップリング化学法を用いて固体支持

体上で合成することができ、修飾ヌクレオシド類似体、例えば5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホラミダイトは、PNAとDNAの5'末端の間で使用することができる。Mag, ら., 1989. Nucl Acid Res 17: 5973-5988を参照せよ。次いで、PNAモノマーは段階的に連結し、5'PNA部分及び3'DNA部分によってキメラ分子を生成する。例えば、Finnら., 上掲を参照せよ。あるいは、キメラ分子は、5'DNA部分及び3'PNA部分によって合成できる。例えば、Petersenら., 1975. Bioorg. Med. Chem. Lett. 5: 1119-11124を参照せよ。

【0077】

他の実施態様では、オリゴヌクレオチドには、例えば、ペプチド(例えば、インビトロで宿主細胞のレセプターを標的化)、或いは細胞膜(Letsinger, ら., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556; Lemaitreら., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652; PCT公報WO88/09810を参照せよ)又は血液脳関門(例えば、PCT公報WO89/10134を参照せよ)を横断する輸送を促進する薬剤などの他の付加的グループが含まれる。加えて、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(Krol, ら., 1988. BioTechniques 6:958-976)、又は挿入剤(Zon, 1988. Pharm. Res. 5: 539-549を参照せよ)によって修飾できる。この最後までに、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等のその他の分子と、オリゴヌクレオチドは結合し得る。

【0078】

g12Lポリペプチド

本発明のポリペプチドのポリペプチドには、配列番号: 2又は4に示すg12Lポリペプチドのアミノ酸配列を包含するポリペプチドを含む。本発明は、g12L活性及び生理学的機能、又はその機能断片を維持するタンパク質を依然としてコードするが、任意の残基が配列番号: 2又は4に示すものに対応する残基から変化し得る、突然変異又は変異体タンパク質をも含む。

一般的に、g12L-様機能を維持するg12L変異体には、配列中の特定の位置の残基が他のアミノ酸によって置換されている任意の変異体が含まれ、そし

て更には、親配列から一つ又は複数の残基を削除する可能性のみならず、親タンパク質の2残基間に付加的な残基又は複数の残基を挿入する可能性を含む。任意のアミノ酸置換、挿入、又は欠失は、本発明に含まれる。好ましい状況では、上記にて定義したように、置換とは保存的置換である。

【0079】

本発明の一側面は、単離されたg12Lタンパク質、及びその生物学的に活性な部分、又は誘導体、断片、類似体又はそのホモログに関する。さらに示されていることは、抗-g12L抗体を産生するための免疫原として適したポリペプチド断片である。一実施態様では、標準的なタンパク質精製技術を用いた適切な精製スキームによって、天然g12Lタンパク質を細胞又は組織ソースから単離することができる。その他の実施態様では、g12Lタンパク質は、組み換えDNA技術によって生産される。組み換え発現に代わって、g12Lタンパク質又はポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を用いて化学的に合成することができる。

【0080】

「単離された」又は「精製された」ポリペプチド又はタンパク質、或いはその生物学的に活性な部分には、g12Lタンパク質が誘導された細胞又は組織ソースからの細胞性材料又は他の汚染タンパク質が殆ど無い、或いは化学的に合成された場合には、化学前駆体又は他の化学物質が殆ど無い。「細胞性材料が殆ど無い」という言葉には、細胞の細胞性成分から単離又は組み換え的に生産されたタンパク質で、その細胞の細胞性成分から分離したタンパク質であるg12Lタンパク質の調整品が含まれる。一実施態様では、「細胞性材料が殆ど無い」という言葉には、約30%（乾燥重量で）よりも少ない非g12Lタンパク質（ここでは、「汚染タンパク質」としても呼ばれている）を有するg12Lタンパク質の調整品が含まれ、より好ましくは約20%の非g12Lタンパク質より少なく、さらにより好ましくは約10%の非g12Lタンパク質より少なく、そして最も好ましくは約5%の非g12Lタンパク質より少ない。g12Lタンパク質又はその生物学的に活性な部分が組み換え的に生産された場合、又、それは、好ましくは殆ど培養培地がない、すなわち、培養培地は、約20%より少ない、より好

ましくは約10%より少ない、そして最も好ましくは約5%のg12Lタンパク質調整品の容量より少ない。

【0081】

「化学前駆体又は他の化学物質が殆ど無い」という言葉には、タンパク質の合成に参与している化学前駆体又は他の化学物質から分離したタンパク質である、g12Lタンパク質の調整品が含まれる。一実施態様では、「化学前駆体又は他の化学物質が殆ど無い」という言葉には、約30%（乾燥重量による）の化学前駆体又は非g12L化学物質より少ない、より好ましくは約20%の化学前駆体又は非g12L化学物質より少ない、さらに好ましくは約10%の化学前駆体又は非g12L化学物質より少ない、そして最も好ましくは約5%の化学前駆体又は非g12L化学物質より少ないg12Lタンパク質の調整品が含まれる。

g12Lタンパク質の生物学的に活性な部分には、全長g12Lタンパク質より僅かのアミノ酸を含むg12Lタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号：2又は4に示したアミノ酸配列）に対して十分に相同的、或いはそれから誘導されたアミノ酸を含むペプチドが含まれ、そしてg12Lタンパク質の少なくとも一つの活性を示す。通常は、生物学的に活性な部分は、g12Lタンパク質の少なくとも一つの活性を有するドメイン又はモチーフを含む。g12Lタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100又はより多いアミノ酸残基長であるポリペプチドであることが可能である。

【0082】

さらには、タンパク質の他の領域が欠失した他の生物学的に活性な部分は、組み換え技術によって調製、そして天然g12Lタンパク質の機能活性の一つ又は複数で評価することができる。

ある実施態様では、g12Lタンパク質は、配列番号：2又は4に示したアミノ酸配列を有する。他の実施態様では、g12Lタンパク質は、配列番号：2又は4に対して殆ど相同的であり、配列番号：2又は4のタンパク質の機能活性を保持し、更に下記において詳細に示すように、天然対立遺伝子変異又は突然変異誘発のために、アミノ酸配列が異なる。従って、その他の実施態様では、g12Lタンパク質は、配列番号：2又は4のアミノ酸配列に対して、少なくとも約4

5%の相同性のあるアミノ酸配列を含むタンパク質であり、配列番号：2又は4のg12Lタンパク質の機能活性を保持する。

【0083】

二つ又はそれより多い配列間のホモロジーの決定

二つのアミノ酸配列、又は二つの核酸のパーセントホモロジーを決定するために、配列を最適比較を目的として配列させた（例えば、二番目のアミノ又は核酸配列との最適アラインメントのために、ギャップを一番目のアミノ酸又は核酸配列へ導入することができる）。対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸又はヌクレオチドを、次に比較した。二番目の対応する位置のように、一番目の配列の位置が同じアミノ酸残基又はヌクレオチドで占められた場合、分子はその位置で相同的である（すなわち、ここで用いられているように、アミノ酸又は核酸「ホモロジー」とは、アミノ酸又は核酸「同一性」と同等である）。

【0084】

核酸配列のホモロジーは、二つの配列間の同一性の程度として決定され得る。ホモロジーは、例えばGCGプログラムパッケージにおいて提供されているGAPソフトウェア等の、当該分野で知られているコンピュータプログラムを用いて決定し得る。Needleman及びWunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48: 443-453を参照せよ。核酸配列比較のために、次の設定とともにGCG GAPソフトウェアを用いた：5.0のGAPクリエーションペナルティー、及び0.3のGAPエクステンションペナルティー、前記の類似核酸配列のコード化領域は、配列番号：1又は3に示したDNA配列のCDS（コード化）部分と、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の程度の同一性を示す。

【0085】

「配列同一性」という用語は、比較した特定の領域において残基を並列させることを基礎として、二つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の同一性の程度を指す。「配列同一性のパーセンテージ」という用語は、比較の領域にわたって最適に整列させた二つの配列を比較すること、同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合は、A, T, C, G, U又はI）が両配列で生じて一致する位置の数がお

こる位置の数を確定すること、一致した位置の数を比較の領域における位置の総数によって割ること(すなわちウインドウサイズ)、そして結果を100倍して配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。ここで使用されている「殆ど同一」という用語は、ポリヌクレオチドの特徴を示し、そのポリヌクレオチドは、比較領域にわたって参考の配列と比較し、少なくとも80パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも85%の配列同一性、及びしばしば90から95パーセントの配列同一性、より通常には少なくとも99パーセントの配列同一性を有する。

【0086】

キメラ及び融合タンパク質

本発明は、g12Lキメラ又は融合タンパク質をも提供する。ここで用いられているように、g12L「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、非g12Lポリペプチドと作用可能に連結しているg12Lポリペプチドを含む。「g12Lポリペプチド」とは、g12Lタンパク質(配列番号:2又は4)に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指し、「非g12Lポリペプチド」とは、例えばg12Lタンパク質とは異なり、同じ又は異なる生物に由来するタンパク質など、g12Lタンパク質とは殆ど相同的ではないタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。g12L融合タンパク質内では、g12Lポリペプチドは、g12Lタンパク質のすべて又は一部分に相当することができる。一実施態様では、g12L融合タンパク質は、少なくともg12Lタンパク質の一つの生物学的に活性な部分を含む。その他の実施態様では、g12L融合タンパク質は、少なくともg12Lタンパク質の二つの生物学的に活性な部分を含む。更にその他の実施態様では、g12L融合タンパク質は、少なくともg12Lタンパク質の三つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質内では、「作用可能に連結した」という用語は、g12Lポリペプチドと非g12Lポリペプチドが互いにフレーム単位で融合していることを示すために意図されている。非g12Lポリペプチドは、g12LポリペプチドのN末端又はC末端と融合することができる。

【0087】

一実施態様では、融合タンパク質は、g 1 2 L配列がG S T (グルタチオンS-トランスフェラーゼ)配列のC末端と融合したG S T-g 1 2 L融合タンパク質である。そのような融合タンパク質は、組み換えg 1 2 Lポリペプチドの精製を促進する。

その他の実施態様では、融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を有するg 1 2 Lタンパク質である。特定の宿主細胞(例えば哺乳動物宿主細胞)では、g 1 2 Lの発現及び/又は分泌は、異種シグナル配列を用いることで増大する。

【0088】

さらにその他の実施態様では、融合タンパク質は、g 1 2 L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から誘導された配列と融合したg 1 2 L免疫グロブリン融合タンパク質である。本発明のg 1 2 L免疫グロブリン融合タンパク質を製薬的組成物へ取り込ませ、被検体へ投与してg 1 2 Lリガンドとg 1 2 Lタンパク質の間の相互作用を阻害し、それによってインビボでのg 1 2 L媒介シグナル伝達機構を抑制することができる。g 1 2 L免疫グロブリン融合タンパク質は、g 1 2 L同系リガンドの生物学的利用能を作用するのに用いることができる。g 1 2 Lリガンド/g 1 2 L相互作用の阻害は、細胞生存の調整(例えば、促進したり、又は阻害したり)することと同時に増殖性及び分化性疾患の双方の治療にとって治療的に有用であり得る。さらには、本発明のg 1 2 L免疫グロブリン融合タンパク質は、被検体において抗-g 1 2 L抗体を産生するため、g 1 2 Lリガンドを精製するための免疫原として、そしてスクリーニングアッセイにおいてg 1 2 Lとg 1 2 Lリガンドの相互作用を阻害する分子を同定するために使用することができる。

【0089】

本発明のg 1 2 Lキメラ又は融合タンパク質は、標準的な組み換えDNA技術によって生産することができる。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片は、例えば、ライゲーションに平滑末端又は付着末端を用いる、適切な末端を提供するための酵素消化、適切なものとして付着末端の埋め合わせ、望ましくない結合、及び酵素ライゲーションを避けるためのアルカリフォスファタ

一ゼ処理によって、常套的技術にしたがってフレーム単位でライゲーションされる。その他の実施態様では、融合遺伝子は、自動化DNAシンセサイザーを含む常套的な技術によって合成できる。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、キメラ遺伝子配列を作成するために、後にアニール化し、再増幅してすることができる二つの連続遺伝子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使用しておこなうことができる (Ausubelら. (編) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992)。さらには、すでに融合部分をコードしている多くの発現ベクターは、商業的に入手可能である (例えば、GSTポリペプチド)。g12Lコード化核酸は、そのような発現ベクターへクローンすることが可能であり、その融合部分はフレーム単位でg12Lタンパク質と結合している。

【0090】

g12Lアゴニスト及びアンタゴニスト

g12L活性を増加させる、又は減少させる特性を有する化合物に関する試験は有用である。活性の増加は、例えば：(1)細胞の遺伝子のコピーを増加又は減少させることによって(アンプリファイア及びデアンプリファイア)；(2)g12L遺伝子の転写を増加又は減少させることによって(転写上方制御及び下方制御)；(3)g12L mRNAのタンパク質への翻訳を増加又は減少させることによって(翻訳の上方制御及び下方制御)；又は(4)g12Lそのものの活性を増加又は減少させることによって(アゴニスト及びアンタゴニスト)の種々の方法で生じ得る。

【0091】

アンプリファイア及びデアンプリファイアである化合物は、細胞又は生物を化合物と接触させること、次いでg12Lをコードする現存のDNAの量を測定することによって同定し得る (Ausubel, Brentら. 1987)。転写の上方制御因子及び下方制御因子である化合物は、細胞又は生物をその化合物と接触させ、次いでg12Lをコードする生成されたmRNAの量を測定することによって同定し得る (Ausubel, Brentら. 1987)。翻訳の上方制御因子及び下方制御因子である化合物は、細胞又は生物をその化合物と接触させ、次いで生成したg12Lポリペ

プチドの量を測定することによって同定し得る (Ausubel, Brentら. 1987)。アゴニスト又はアンタゴニストである化合物は、細胞又は生物をその化合物と接触させ、次いでg 1 2 L活性を測定することによって測定される；これもインビボでおこなわれる。

【0092】

また、本発明は、g 1 2 Lアゴニスト(すなわち模倣物)又はg 1 2 Lアンタゴニストのいずれかとして機能するg 1 2 Lタンパク質の変異体に関する。g 1 2 Lタンパク質の変異体は、突然変異誘発によって生成することができる(例えば、g 1 2 Lタンパク質の個々の点変異又は切断)。g 1 2 Lタンパク質のアゴニストは、殆ど同じ、又はサブセットの、g 1 2 Lタンパク質の天然発生型の生物学的活性を保持する。g 1 2 Lタンパク質のアンタゴニストは、例えば、g 1 2 Lタンパク質を含む細胞性シグナリングカスケードの下流又は上流のメンバーに競合して結合することで、g 1 2 Lタンパク質の天然発生型の一つ又は複数の活性を阻害することができる。従って、特定の生物学的効果は、限定された機能の変異体の処置によって誘発することができる。一つの実施態様では、タンパク質の天然発生型の生物学的活性のサブセットを有する変異体で被検体を処置することは、g 1 2 Lタンパク質の天然発生型で処置した場合と対比して、被検体には僅かの副作用がある。

【0093】

g 1 2 Lアゴニスト(すなわち模倣物)又はg 1 2 Lアンタゴニストのいずれかとして機能するg 1 2 Lタンパク質の突然変異体は、g 1 2 Lタンパク質アゴニスト又はアンタゴニスト活性に関して、g 1 2 Lタンパク質の突然変異体(例えば切断突然変異体)のコンビナトリアル・ライブラリをスクリーニングすることによって同定することができる。一実施態様では、g 1 2 L変異体の斑入りのライブラリは、核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発によって作成され、斑入りの遺伝子ライブラリによってコードされている。g 1 2 L変異体の多様化したライブラリは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列へ酵素的にライゲーションし、縮重な潜在的なg 1 2 L配列の一組が、個々のポリペプチドのように或いは代わって、その中にg 1 2 L配列の一組を含むより大き

な融合タンパク質の一組（例えば、ファージディスプレイのために）のように表現できる。縮重オリゴヌクレオチド配列から、潜在的 g 1 2 L 変異体のライブラリを生成することができる種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動化 DNA シンセサイザーによっておこなうことができ、次いで合成遺伝子は、適切な発現ベクターへライゲーションすることができる。縮重な遺伝子の一組の使用は、一つの混合物において、所望される潜在的 g 1 2 L 配列の一組をコードするすべての配列の供給を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は、当該分野において良く知っている。Narang, 1983. Tetrahedron 39: 3; Itakura, ら., 1984. Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura, ら., 1984. Science 198: 1056; Ike, ら., 1983. Nucl. Acids Res. 11:477。

【0094】

ポリペプチドライブラリ

加えて、g 1 2 L タンパク質コード化配列の断片のライブラリは、g 1 2 L タンパク質の変異体のスクリーニング及び後に続く選択のために、g 1 2 L 断片の多様化した集団を作成するために使用できる。一実施態様では、ニックングが分子辺り約一回のみおこる条件下で g 1 2 L コード化配列の二重鎖 PCR 断片をヌクレアーゼで処理すること、二重鎖 DNA を変性させること、異なるニック産物のセンス/アンチセンス対を含むことができる二重鎖 DNA を形成するように DNA を再生すること、 S_1 ヌクレアーゼによる処理によって再形成された二重鎖から一本鎖部分を取り除くこと、そして結果として生じた断片のライブラリを発現ベクターへライゲーションすることによって、コード化配列断片のライブラリを作成することができる。この方法によると、発現ライブラリは、どれが N 末端及び g 1 2 L タンパク質の種々の大きさの内部断片をコードするのかを導き出すことができる。

【0095】

点突然変異又は切断によって作られたコンビナトリアル・ライブラリの遺伝子産物、並びに選択される特性を有する遺伝子産物に関する cDNA ライブラリのスクリーニングに関して、種々の技術が当該分野で知られている。そのような技術は、g 1 2 L タンパク質のコンビナトリアル突然変異誘発によって作成された

遺伝子ライブラリの迅速なスクリーニングに適用できる。ハイスループット分析を施すことができ、大きな遺伝子ライブラリのスクリーニングのために最も広く用いられている技術には、通常は遺伝子ライブラリを複製可能な発現ベクターへクローニングすること、適切な細胞を結果として生じたベクターのライブラリで形質転換すること、そして所望する活性を検出することが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促進することになる条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることが含まれる。ライブラリの帰納的突然変異の頻度を高める新しい技術である帰納的アンサンブル突然変異誘発 (REM) は、g 1 2 L 変異体を同定するためにスクリーニングアッセイと組み合わせて用いることができる。Arkin及びYourvan, 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815 ; Delgrave, ら., 1993. Protein Engineering 6: 327-331を参照せよ。

【0096】

抗-g 1 2 L 抗体

本発明は、 F_{ab} 又は $(F_{ab})_2$ のような抗体及び抗体断片を含み、これらは前記抗体の任意の g 1 2 L ポリペプチドと免疫特異的に結合する。

ここで用いられる「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン (Ig) 分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原と特異的に結合する (免疫反応する) 抗原結合部位を含む分子を指す。そのような抗体には、限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、 F_{ab} 、 F_{ab} 、及び $F_{(ab)2}$ 断片、そして F_{ab} 発現ライブラリが含まれる。一般的には、ヒトから得られた抗体分子は、Ig G、Ig M、Ig A、Ig E 及び Ig D クラスの任意のものに関連し、分子に存在する重鎖の性質によって互いに異なる。特定のクラスには、Ig G₁、Ig G₂ 及び他のようなサブクラスも有する。さらには、ヒトにおいては、軽鎖はカッパ鎖又はラムダ鎖であり得る。抗体に関するここでの参考文献には、そのようなクラス、サブクラス、そしてヒト抗体種の型に関する参考文献が含まれる。

【0097】

抗原、或いはその一部分又は断片として意図されている本発明の単離されたタンパク質は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体調製に関する標準的な技術

を用いて、免疫特異的に抗原と結合する抗体を生成するための抗原として使用することができる。完全長タンパク質を用いることができる、或いは、代わって、本発明は、免疫原として用いる抗原の抗原性ペプチド断片を提供する。抗原性ペプチド断片は、配列番号：2又は4に示したアミノ酸配列のような、完全長タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも6アミノ酸残基を含み、そのエピトープを含んでいて、ペプチドに対して産生させた抗体は、完全長タンパク質又はエピトープを含む任意の断片と特異的免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、又は少なくとも15アミノ酸残基、又は少なくとも20アミノ酸残基、又は少なくとも30アミノ酸残基を含む。好ましくは、抗原性ペプチドによって含まれる好ましいエピトープは、表面に位置するタンパク質の領域である；一般的に、これらは親水性領域である。

【0098】

本発明の特定の実施態様では、抗原性ペプチドによって包含される少なくとも一つのエピトープは、タンパク質の表面に位置するg12Lの領域、例えば親水性領域である。g12Lタンパク質配列の疎水性分析は、g12Lポリペプチドのどの領域が特に親水性であり、それ故に抗体産生を標的にするために有用な表面残基をコードする傾向があるのかを示す。抗体産生を標的にするための手段として、親水性及び疎水性の領域を示すハイドロパシープロットは、例えば、フーリエ変換を伴う又は伴わないの何れかであるKyte Doolittle又はHopp Woods法を含む当該分野で良く知られた任意の方法によって作成され得る。例えば、そのすべてが参考文献として、ここで取り入れられている、Hopp及びWoods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828 ; Kyte及びDoolittle 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-142を参照せよ。抗原タンパク質内の一つ又は複数のドメインに対して特異的である抗体、又は誘導體、断片、その類似体又はホモログも、ここで示されている。

【0099】

本発明のタンパク質、又はその誘導體、断片、類似体、ホモログ又はオーソログは、これらタンパク質成分と免疫特異的に結合する抗体の生成において、免疫原として用いられ得る。

当該分野で知られている種々の方法は、本発明のタンパク質、又はその誘導体、断片、類似体ホモログ又はオーソログに対するポリクローナル又はモノクローナル抗体の産生のために用いられ得る（例えば、参考文献としてここで取り入れられている、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, 及びLane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,を参照せよ）。これら抗体の幾つかが下記において論じられている。

【0100】

1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体の生産のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス又は他の哺乳動物）を、天然タンパク質、その合成変異体、又は前出の誘導体による一回又は複数回の注射によって免疫化してもよい。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然発生免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質に相当する化学合成ポリペプチド、又は組み換え発現された免疫原性タンパク質を含むことができる。さらには、タンパク質は、免疫化された哺乳動物にとって免疫原性であることが知られている第二のタンパク質と結合して得る。キーホールリンペットヘモシアニンに限定されるものではないが、そのような免疫原性タンパク質の例としては、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、そして大豆トリプシンインヒビターが含まれる。調製物には、さらにアジュバンドを含めることができる。種々のアジュバンドには、限定されるものではないが、フロインド（完全又は不完全）、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、プルーロニックポリオール (pluronic polyols)、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、ジニトロフェノール、等）、カルメット-ゲラン杆菌 (BCG)及びコリネバクテリウム・パルヴム、又は類似の免疫刺激剤などのヒトに用いることが可能なアジュバンドなどが含まれる。用いることが可能な更なるアジュバンドの例には、MPL-TDMアジュバンド（モノホスホリルリピッドA, 合成トレハロース, ジコリノミコレート (dicorynomycolate)）が含まれる。

【0101】

免疫原性タンパク質に対するポリクローナル抗体は、哺乳動物（例えば血液）

から単離し、例えば、免疫血清のIgG分画を与えるプロテインA又はプロテインGを使用したアフィニティークロマトグラフィー等の良く知られた技術によってさらに精製することができる。続いて、又は代わって、求めている免疫グロブリンの標的である特異的抗原、又はそのエピトープは、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製するためのカラム上に固定化してもよい。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkinson (The Scientist, The Scientist, Inc., フィラデルフィア, ペンシルベニア, 14巻, 8号(2000年4月17日), pp. 25-28によって発行)において論じられている。

【0102】

2. モノクローナル抗体

ここで用いられている「モノクローナル抗体」(MAb)又は「モノクローナル抗体組成物」という用語は、独特の軽鎖遺伝子産物、及び独特の重鎖遺伝子産物からなる抗体分子の一つの分子種のみを含む抗体分子の集団を指す。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、個体群のすべての分子において同一である。MAbsは、従って、独特の結合親和性によって特徴付けられる抗原の特定のエピトープとの免疫反応が可能な抗原結合部位を含む。

モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256: 495(1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用して調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター、又は他の適切な宿主動物は、免疫剤と特異的に結合する抗体を生産又は生産することができるリンパ球を誘発する免疫剤によって通常は免疫される。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化される。

【0103】

免疫剤には、通常は、タンパク質抗原、その断片又はその融合タンパク質が含まれる。一般的には、ヒト起源の細胞が所望される場合は末梢血リンパ球が使用され、或いは非ヒト哺乳動物ソースが所望される場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用されるかのいずれかである。次いで、ポリエチレングリコールのような安定な融合剤を使用して、リンパ球を不死化細胞株と融合させてハイブリドーマ細胞を形成させる [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986)pp. 59-103]。不死化細胞株は、哺乳動物細胞、特

にげっ歯類、ウシ及びヒト起源のメラノーマ細胞、を典型的には形質転換する。通常は、ラット又はマウスメラノーマ細胞株を用いる。ハイブリドーマ細胞を、好ましくは、非融合、不死化細胞の成長又は生存を阻害する一つ又は複数の基質を含む、適切な培養培地で培養することができる。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT又はHPR T) を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン (「HAT培地」) を含み、これら物質はHGPRT欠損細胞の成長を阻害する。

【0104】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定で高いレベルの抗体の発現を支え、そしてHAT培地のような培地に対して感度がよい。より好ましい不死化細胞株とは、マウスメラノーマ株であり、例えば、ソーク研究所細胞ディストリビューションセンター、サンディエゴ、カリフォルニア、及びアメリカン タイプカルチャー コレクション、マナサス、バージニアから得ることができる。ヒトメラノーマ及びマウス-ヒトヘテロメラノーマ細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の生産のために記載されている [Kozbor, J. Immunol., 133: 3001(1984); Brodeurら., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)pp.51-63]。

【0105】

次いで、抗原に対するモノクローナル抗体の存在に関して、ハイブリドーマ細胞を培養する培養培地をアッセイすることができる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されたモノクローナル抗体の結合特異性は、ラジオイムノアッセイ (RIA) 又は酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) のような免疫沈降によって、又はインビトロ結合アッセイによって決定することができる。このような技術及びアッセイは、当該分野で知られている。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキッチャード分析によって決定することができる。それは、標的抗原に対して高い特異性と高い結合親和性を有する抗体を同定するために、客観的であり、モノ

クローナル抗体の治療的用途において特に重要である。

【0106】

所望するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを限界希釈法でサブクローンすることができ、標準的な方法で生育させることができる (Goding, 1986)。この目的のための適切な培養培地には、例えば、ダルベッコ変法イーグル培地及びRPMI-1640培地が含まれる。或いは、ハイブリドーマ細胞を、インビボを哺乳動物の腹水として、その中で生育させることができる。

サブクローンによって分泌するモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-セファロース、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなどの常套的な免疫グロブリン精製方法によって、培養培地又は腹水液から単離又は精製することができる。

【0107】

また、モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載されたような組み換えDNA法によって作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的方法(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)を用いて容易に単離及び並列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましいソースとしての役割を果たす。一度単離されると、このDNAは発現ベクターへ配されることが可能であり、次いで、このベクターを、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は別の方法では免疫グロブリンタンパク質を生産しないメラノーマ細胞のような宿主細胞へ形質移入し、組み換え宿主細胞でのモノクローナル抗体の合成を得ることができる。また、例えば、相同的なマウス配列をヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列で置き換えることによって(米国特許第4,816,567号; Morrison, Nature 368, 812-13(1994))、或いは免疫グロブリンコード化配列へ非免疫グロブリンポリペプチドの全て又は一部分を共有結合させることによって、DNAも修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインによって置換されることができる、或いは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメイン

によって置換されてキメラ二価抗体を生成することができる。

【0108】

3. ヒト化抗体

本発明のタンパク質抗原に対する抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含むことができる。投与された免疫グロブリンに対してヒトによって引き起こされた免疫応答がなく、これら抗体はヒトへの投与に関して適している。抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂又は抗体の他の抗原結合配列）で、主にヒト免疫グロブリンの配列で構成され、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小限の配列を含む。ヒト化は、Winte及び共同研究者の方法（Jonesら., Nature, 321: 522-525(1986); Riechmannら., Nature, 332: 323-327(1988); Verhoeyenら., Science, 239: 1534-1536(1988)）に従って、げっ歯類のCDR又はCDR配列をヒト抗体に対応する配列で置換することによっておこなうことができる（また、米国特許第5,225,539号を参照せよ）。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。また、ヒト化抗体は、受容抗体或いは移入CDR又はフレームワーク配列のどちらにも見出されない残基を含むことができる。一般的には、ヒト化抗体は、すべて又は殆どすべての非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域、及びフレームワーク領域のすべて又は殆どすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列である、少なくとも一つの殆どすべて、及び通常は二つの可変領域を含む。また、ヒト化抗体は、最適には、少なくとも免疫グロブリン定常領域（Fc）の一部、通常はそれのヒト免疫グロブリンを含む（Jonesら., 1986 Riechmannら., 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596(1992)）。

【0109】

4. ヒト抗体

完全なヒト抗体は、CDRを含む、軽鎖及び重鎖の双方の全配列がヒト遺伝子から生じる、抗体分子に基本的に関連している。このような抗体は、「ヒト抗体」又は「完全ヒト抗体」とここで呼ばれている。ヒトモノクローナル抗体は、トリオマ（trioma）技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら., 1983 Immu

nol Today 4: 72)、並びにヒトモノクローナル抗体を生産させるためのE B Vハイブリドーマ技術(Coleら., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)によって調製することができる。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実践することで用いられ得るし、ヒトハイブリドーマを使用すること(Coteら., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030)、或いはヒト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って生産され得る(Coleら., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。

【0110】

加えて、ヒト抗体も、ファージディスプレイライブラリを含む付加的な技術を使用して生産することができる(Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227: 381(1991); Marksら., J. Mol. Biol. 222: 581(1991))。同様に、ヒト抗体は、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウスのように、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物へ導入することによって作り出すことができる。この試みでは、ヒト抗体生産が観察され、それは、遺伝子再構成、構築、そして抗体レパートリーを含む、すべての面でヒトに見られることに極めて類似する。この方法は、例えば、米国特許第5,545,807号; 5,545,806号; 5,569,825号; 5,625,126号; 5,633,425号; 5,661,016号, 及びMarksら.(Bio/Technology 10, 779-783(1992)); Lonbergら.(Nature 368 856-859(1994)); Morrison(Nature 368, 812-13(1994)); Fishwildら,(Nature Biotechnology 14, 845-51(1996)); Neuberger(Nature Biotechnology 14, 826(1996)); 及びLonberg及びHusza(Intern. Rev. Immunol. 13 65-93(1995))に記載されている。

【0111】

抗原の挑戦に対する応答による動物の内因性抗体よりも完全なヒト抗体を生産するために、改良したトランスジェニック非ヒト動物を使用して、ヒト抗体を付加的に生産してもよい(PCT公報WO94/02602を参照せよ)。非ヒト宿主の重鎖及び軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子は能力が失われており、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリンをコードする活性遺伝子座は、宿主ゲノ

ムへ挿入されている。例えば、必須のヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を用いて、ヒト遺伝子は取り込まれる。すべての所望される修飾を提供する動物は、次いで、修飾物のすべての相補鎖より少数を含む中間トランスジェニック動物を交雑育種することによって子孫として得られる。このような非ヒト動物の好ましい実施態様はマウスであり、PCT公報WO96/33735及びWO96/34096に開示されているようにXenomouse（商品名）と名付けられている。この動物は、完全なヒト免疫グロブリンを分泌するB細胞を生産する。抗体は、例えば、ポリクローナル抗体の調製のように、対象である免疫原で免疫化した後で動物から直接に得るか、或いはそれに代わって、ハイブリドーマ産生モノクローナル抗体のように、動物に由来する不死化B細胞から得ることができる。加えて、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子を、回収して直接に抗体を得るために発現させることが可能であり、或いはさらに修飾して、例えば一本鎖Fv分子のような抗体の類似体を得ることが可能である。

【0112】

マウスで実証された、内因性の免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主を生産する方法の例は、米国特許第5,939,598号に開示されている。それは、胚幹細胞の少なくとも一つの内因性重鎖遺伝子座からJセグメント遺伝子を欠失させてその遺伝子座の再編成を防ぎ、そして再編成した免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の形成を防ぎ、その欠失が、選択可能なマーカーをコードしている遺伝子を含むベクターを標的とすることによって作用されること；並びに体細胞及び生殖細胞から選択可能なマーカーをコードする遺伝子を含むトランスジェニックマウスを生産させることを含む方法によって得ることができる。

【0113】

ヒト抗体のような対象である抗体を生産させる方法が、米国特許第5,916,771号に開示されている。それには、重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを培養液のある哺乳動物宿主細胞に導入すること、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターをその他の哺乳動物宿主細胞へ導入すること、そして二つの細胞を融合させてハイブリッド細胞を形成させることが含まれている。このハイブリッド細胞は、重鎖及び軽鎖を含む抗体を発現する。

この方法の更なる改良では、免疫原上の臨床学的に関連するエピトープを同定する方法、そして高い親和性によって関連するエピトープと免疫特異的に結合する抗体を選択する相関関係のある方法が、PCT公報WO99/53049に開示されている。

【0114】

5. F_{ab} 断片及び一本鎖抗体

本発明によると、本発明の抗原性タンパク質に対して特異的な一本鎖抗体の生産へ、技術を適用することができる(米国特許第4,946,778号)。加えて、タンパク質又は誘導体、断片、類似体又はそのホモログに対する所望される特異性を有するモノクローナル抗体 F_{ab} 断片の迅速で効果的な同定を可能にするために、 F_{ab} 発現ライブラリの構築(例えば、Huse,ら., 1989 Science 246: 1275-1281)へ方法を適用することができる。タンパク質抗原に対するイデオタイプを含む抗体断片は、限定されるものではないが:(i)抗体分子のペプシン消化によって生産された $F_{(ab')_2}$ 断片;(ii) $F_{(ab')_2}$ 断片のジスルフィド架橋を減らすことによって生成された F_{ab} 断片;(iii)パパイニン及び還元剤での抗体分子の処理によって生成された F_{ab} 、そして(iv) F_v 断片を含む当該分野で知られている技術によって生産され得る。

【0115】

6. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合においては、結合特異性の一方は本発明の抗原特性タンパク質に対してである。第二の結合標的は任意の他の抗原であり、そして有利には、細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく(Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合

物を生成し、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO93/08829、及びTrauneckerら, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

【0116】

所望の結合特異性(抗体 - 抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH₂及びCH₃領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH₁)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照されたい。

【0117】

WO96/27011に記載された他の方法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH₃領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの1つ又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0118】

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')₂二重特異性抗体)として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分

解性に切断して $F(a b')_2$ 断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生された $F a b'$ 断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。 $F a b' - TNB$ 誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により $F a b' -$ チオールに再転換し、他の $F a b' - TNB$ 誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【0119】

大腸菌から $F a b'$ フラグメントを直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(a b')_2$ 分子の製造を記述している。各 $F a b'$ フラグメントは大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞及びErbB2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【0120】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelnyら, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の $F a b'$ 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従

って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 Fv (sFv)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)を参照されたい。

【0121】

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら *J. Immunol.* 147:60(1991)。

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられたPROポリペプチドの2つの異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗-PROポリペプチドのアームは、特定のPROポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T細胞レセプター分子(例えばCD2、CD3、CD28、又はB7)等の白血球上のトリガー分子又はFcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFcレセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定のPROポリペプチドを発現する細胞に細胞毒性薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はPRO結合アーム及び細胞毒性薬又は放射性キレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETAと結合するアームを有する。興味の対象となる他の二重特異性抗体はPROポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合する。

【0122】

7. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロ結合抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4,676,980号]及びHIV感染の治療のために[WO91/00360; WO92/200373; EP03089]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的

に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されたものが含まれる。

【0123】

8. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させることが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を有する可能性がある。Caronら, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShope s, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolffら, Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevensonら, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

【0124】

9. 免疫複合体

また、本発明は、化学治療薬、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞毒性薬、あるいは放射性同位体(即ち、放射性抱合)と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、ク

ルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。放射性抱合抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{31}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re が含まれる。

【0125】

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPPD)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。WO94/11026参照。

【0126】

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトアビジン等)に抱合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬(例えば、放射性ヌクレオチド等)に抱合された「リガンド」(アビジン等)を投与する。

【0127】

10. 免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を

含むリポソームは、Epsteinら、Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985) ; Hwangら、Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4, 485, 045号及び第4, 544, 545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5, 013, 556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martinら、J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬(ドキシソルビシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

【0128】

11. 本発明のタンパク質に対する抗体の診断的用途

本発明のタンパク質に対する抗体は、このタンパク質の局在化及び/又は定量化に関する当該分野で知られた方法によって使用される(例えば、適切な生理学的試料内のこのタンパク質のレベルの測定における使用、診断方法での使用、タンパク質のイメージングでの使用等)。所定の実施態様では、抗原結合ドメインを含有するタンパク質に対する抗体、又はその誘導體、断片、類似体又はホモログを、薬理的な活性な化合物として使用した(下記を参照)。

【0129】

本発明のタンパク質に対する特異的な抗体は、免疫親和性クロマトグラフィー又は免疫沈降のような標準的技術によってタンパク質を単離することに使用できる。そのような抗体は、宿主細胞で発現した細胞の天然タンパク質抗原及び組み換えによって生産された抗原の精製を容易にする。さらには、抗原タンパク質の発現の豊富さ及びパターンを評価するために、抗原性タンパク質(例えば、細胞性可溶化液又は細胞上清)を検出するために使用することができる。タンパク質に対する抗体は、例えば、所定の治療法の効力を決定するための臨床試験法の一

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で用いることができる。抗体と検出可能な基質をカップリング（すなわち、物理的な結合）させることによって、検出は促進される。検出可能な基質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、及び放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが含まれ、適切な補欠分子族複合体には、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが含まれる；適切な蛍光物質の例には、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、ジクロロトリアジアミン フルオレセイン、ダンジル クロライド又はフィコエリトリン；発光物質の例にはルミノールが含まれる；生物発光物質の例には、ルシフェリン、及びエクオリン、並びに適切な放射活性物質の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 又は ^3H が含まれる。

【0130】

12. 抗体療法

ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化及び完全ヒト抗体を含む本発明の抗体は、治療薬として使用され得る。このような薬剤は、一般的に、被検体の疾患又は病理を治療又は予防するために用いられる。抗体製剤、好ましくは標的抗原に対して高い特異性と高い親和性を有する抗体の調製は、一般的に、その標的との結合に起因する効果を有する。所定の抗体分子と該当する標的間の相互作用の特異的な性質によって、このような効果は、二種類のうちの一つであり得る。最初の例では、抗体の投与は、自然に結合する標的と内因性リガンドの結合を抑止又は阻害し得る。この場合には、抗体は標的と結合し、天然に発生するリガンドの結合部位を遮蔽し、そのリガンドはエフェクター分子として機能する。従って、レセプターは、リガンドが引き起こすシグナル伝達機構経路を媒介する。

【0131】

或いは、この効果は、標的分子上のエフェクター結合部位と結合することによって、抗体が誘発する生理学的結果の一つである得る。この場合、疾患又は病態がない又は欠失しているであろう内因性リガンドを有するレセプターは、代理工

フェクターリガンドとして抗体と結合し、レセプターによるレセプターを基礎とするシグナル伝達機構を開始する。

【0132】

本発明の治療的に有効量の抗体は、一般的に、治療的目的を達成するのに必要な量に関連する。上記において記載のように、これは抗体とその標的抗原との結合相互作用である可能性があり、ある場合には標的の機能と妨害し、他の場合は生理学的応答を促進する。投与に必要な量は、さらに、特異的抗原に対する抗体の結合親和性に依存し、さらに投与された抗体が、抗体が投与される他の被検体の空隙率から枯渇する速度に依存する。本発明の抗体又は抗体断片の治療的有効量に関する通常範囲は、限定されない例によって、約0.1mg/kg体重量から約50mg/kg体重量である。例えば、通常投与頻度は、1日2回から1週間に1回の範囲である。

【0133】

13. 抗体の製薬的組成物

ここで開示したスクリーニングアッセイによって同定した他の分子と同様に、本発明のタンパク質と特異的に結合する抗体は、製薬的組成物の形態で種々の疾患の治療のために投与できる。成分の選択ガイドスと同様に、このような組成物を調製することに関与する原理及び検討材料は、例えばRemingtonに示されている：The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, 編者) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement : Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; 及びPeptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

【0134】

抗原性タンパク質が細胞内であり、すべての抗体が阻害剤として使用されるならば、内在化する抗体が好まれる。しかしながら、リポソームも抗体、又は抗体断片を細胞へ送達することに使用することができる。抗体断片が使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインと特異的に結合する最も小さな阻害性断片が好まれる。例えば、抗体の可変領域配列に基づき、標的タンパク質配列と結合する

能力を保持するように、ペプチド分子を設計することができる。このようはペプチドは、化学的に合成及び/又は組み換えDNA技術によって生産することができる。例えば、Marascoら., Proc., Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893(1993)を参照せよ。また、ここでの製剤形態は、治療される特定の徴候のために必要な複数の活性化合物を含み、好ましくは互いに逆作用しない相補的な活性を含む。或いは、又は加えて、組成物は、例えば細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤、又は成長阻害剤のような機能を高める薬剤を含むことができる。そのような分子は、目的とする意図に対して効果的な量の組み合わせで適当に存在する。

【0135】

また、活性成分を、例えばコアセルベーション技術により、又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルション中に包括することができる。

インビボ投与に使用される製剤は無菌であることが大いに好まれる。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0136】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及びD-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。

【0137】

g 1 2 L 組み換え発現ベクター及び宿主細胞

本発明のその他の側面はベクター、好ましくは、g 1 2 L タンパク質をコードする核酸、又はその誘導體、断片、類似体又はホモログを含む発現ベクターである。ここで使用されているように、「ベクター」という用語は、その他の核酸を、それが連結している場所へ輸送することのできる核酸を指す。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、付加的なDNAセグメントをライゲーションすることができる環状二重鎖DNAループを指す。その他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムヘライゲーションすることができる。所定のベクターは、それらが導入された宿主内において自己複製することができる（例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクター、及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入によって宿主細胞のゲノムと一体化し、宿主ゲノムに沿って複製する。さらには、所定のベクターは、それらが作用可能に連結している遺伝子の発現を方向づける。このようなベクターは、ここでは、「発現ベクター」と呼ばれている。一般的に、組み換えDNA技術での発現ベクターの用途は、しばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」及び「ベクター」は相互交換可能に使用することができる。しかしながら、本発明は、同等の機能を果たす、ウイルスベクター（例えば、複製を欠いたレトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルス）のような他の形態の発現ベクターを含むように意図されている。

【0138】

本発明の組み換え発現ベクターには、宿主細胞での核酸の発現に適した形態の本発明の核酸が含まれ、この組み換え発現ベクターには、発現される核酸配列と作用可能に連結していて、発現に使用される宿主細胞を基礎として選択される複数の制御配列が含まれる。組み換え発現ベクターでは、「作用可能に連結し」とは、対象であるヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現が可能となるような様式で制御配列と連結していることを意味する（例えば、ベクターが宿主細胞

へ導入された場合のインビトロ転写/翻訳系、又は宿主細胞)。

【0139】

「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー及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)を含むように意図されている。このような制御配列は、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。制御配列には、多くの型の宿主細胞でヌクレオチド配列の構成的発現を指示し、所定の宿主細胞のみでヌクレオチド配列を指示する制御配列が含まれる(例えば、組織特異的制御配列)。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、所望されるタンパク質の発現レベル等のようなファクターに依存することができることが当該分野に熟練している者によって認識されている。本発明の発現ベクターは、従って、ここで記載されているような核酸によってコードされた融合タンパク質又はペプチドを含むタンパク質又はペプチドを生産するために宿主細胞へ導入することができる(例えば、g12Lタンパク質、g12Lタンパク質の変異体型、融合タンパク質等)。

【0140】

本発明の組み換え発現ベクターは、原核生物又は真核生物でのg12Lタンパク質の発現のために設計することができる。例えば、g12Lタンパク質は、大腸菌のような細菌細胞、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを使用して)、酵母細胞又は哺乳動物細胞で発現することができる。適切な宿主細胞は、さらにGoeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif.(1990)。或いは、組み換え発現ベクターは、例えばT7プロモーター制御配列及びT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写し翻訳することができる。

【0141】

原核生物でのタンパク質の発現は、融合又は非融合タンパク質の何れかの発現を指示する構成性又は誘導性プロモーターを含有するベクターによって大腸菌で最も頻繁におこなわれる。融合ベクターは、通常は組み換えタンパク質のアミノ末端であるが、その中でコードされているタンパク質へ多くのアミノ酸を加える

。このような融合ベクターは、通常は三つの目的を担う：(i) 組み換えタンパク質の発現を高める；(ii) 組み換えタンパク質の溶解性を高める；(iii) リガンドとして作用することによって、組み換えタンパク質の精製をアフィニティ精製において補助する。しばしば、融合発現ベクターにおいて、融合部分と組み換えタンパク質の接合部にタンパク質加水分解部位を導入し、融合タンパク質の精製の後で融合部分から組み換えタンパク質を分離できるようにする。このような酵素、及びこれら同系の認識配列には、因子 X a、トロンビン及びエンテロキナーゼが含まれる。典型的な融合発現ベクターには、標的組み換えタンパク質ヘグルタチオン S-トランスフェラーゼ (G S T)、マルトース E 結合タンパク質、又はプロテイン A のそれぞれが融合した p G E X (Pharmacia Biotech Inc; Smith 及び Johnson, 1988. Gene 67: 31-40), p M A L (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 及び p R I T 5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) が含まれる。

【0142】

適切な誘導可能な非融合大腸菌発現ベクターの例には、p T r c (Amrannら., (1988)Gene 69: 301-315) 及び p E T 1 1 d (Studierら., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHOD IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89)。

大腸菌での組み換えタンパク質発現を最大限にする一つの方法は、組み換えタンパク質をタンパク質加水分解する能力正常に有しない宿主細菌内でタンパク質を発現させることである。例えば、Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif (1990) 119-128 を参照せよ。その他の戦略としては、発現ベクターに挿入されるべき核酸の核酸配列を改良し、各アミノ酸の個々のコドンが好ましく大腸菌で利用されるようにすることである (例えば、Wadaら., 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-21118 を参照せよ)。そのような本発明の核酸配列の改良は、標準的な D N A 合成技術によっておこなうことができる。

【0143】

その他の実施例では、g 1 2 L 発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母

サッカロマイセス・セレビシエでの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及び Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943)、pJRY88 (Schultzら., 1987. Gene 54: 113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、及びpicZ (In Vitrogen Corp, San Diego, Calif)が含まれる。

【0144】

或いは、バキュロウイルス発現ベクターを用いて、g12Lを昆虫細胞で発現させることができる。培養昆虫細胞(例えば、SF9細胞)でのタンパク質の発現に役立つ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) 及びpVLシリーズ (Lucklow及びSummers, 1989. Virology 170: 31-39)。

さらにその他の実施態様では、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞で発現させることができる。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) 及びpMT2PC (Kaufman, ら., 1987. EMBO J. 6: 187-195)が含まれる。哺乳動物細胞で使用された場合、発現ベクターコントロール機能は、しばしばウイルス制御エレメントによって提供される。例えば、広く使われているプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、及びシミアン・ウイルス40から誘導される。原核生物と真核生物細胞の双方にとって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章及び17章を参照せよ。

【0145】

その他の実施態様では、組み換え哺乳動物発現ベクターは、好ましくは特定の細胞型での核酸の発現を指示することができる(例えば、組織特異的制御エレメントが核酸の発現に用いられる)。組織特異的制御エレメントは、当該分野において知られている。適切な組織特異的プロモーターの限定されない例には、アルブミンプロモーター(肝臓特異的; Pinkert, ら., 1987. Genes Dev. 1: 268-277)、リンパ球特異的プロモーター (Calame及びEaton, 1988. Adv. Immunol. 43

: 235-275)、T細胞レセプター (Winoto及びBaltimore, 89 EMBO J. 8: 729-733)及び免疫グロブリン (Banerji, ら., 1983. Cell 33: 729-740; Queen及びBaltimore, 1983. Cell 33: 741-748)の特定なプロモーター、神経細胞特異的プロモーター (例えば、神経細線維プロモーター; Byrne及びRuddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477)、膵臓特異的プロモーター (Edlund, ら., 1985. Science 230: 912-916)及び乳腺特異的プロモーター (例えば、乳漿プロモーター; 米国特許第4,873,316号及び欧州出願公開第264,166号)が含まれる。また、発生的に制御されたプロモーター、例えばマウスhoxプロモーター (Kessel及びGruss, 1990. Science 249: 374-379)及び -胎児タンパク質プロモーター (Campes及びTilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537-546)が含まれる。

【0146】

さらに、本発明は、アンチセンスの方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む組み換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、g12LmRNAに対して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)を可能にするほどに制御配列と作用可能に連結している。アンチセンス方向でクローン化された核酸と作用可能に連結している制御因子、例えばウイルスプロモーター及び/又はエンハンサーを、種々の細胞型のアンチセンスRNA分子の連続発現を指示する点から選択することができ、或いは制御配列は、アンチセンスRNAの構成性、組織特異的又は細胞型特異的発現を指示するという点から選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、高効率の制御領域のコントロールの下でアンチセンス核酸が生産され、その活性がベクターが導入されている細胞型によって決定することができる、組み換えプラスミド、ファージミド又弱毒化ウイルスであることが可能である。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の制御に関する議論については、例えば、Weintraubら., 「遺伝子分析のための分子ツールとしてのアンチセンスRNA」Reviews-Trends in Genetics, 第1巻(1)1986を参照せよ。

【0147】

本発明のその他の側面は、本発明の組み換え発現ベクターが導入された宿主細

胞に関する。「宿主細胞」及び「組み換え宿主細胞」は、ここでは相互交換が可能に使用されている。このような用語は、特定の被検細胞にだけでなく、そのような細胞の子孫又は潜在的な子孫をも指すことが知られている。変異又は環境の影響の何れかに起因して所定の修飾が次世代に起こり得るために、そのような子孫は、実際には親細胞とは同一ではあり得ないが、ここで使用されている用語の範囲内に含まれる。

宿主細胞は、任意の原核細胞又は真核細胞である可能性がある。例えば、g 1 2 Lタンパク質は、大腸菌のような細菌細胞、酵母又は哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）又はCOS細胞）で発現させることが可能である。他の適切な宿主細胞が、当該分野に熟練した者に知られている。

【0148】

常套的な形質転換又は形質導入技術によって、ベクターDNAを原核生物又は真核生物細胞へ導入することができる。ここで使用されているように、「形質転換」及び「形質導入」という用語は、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介形質導入、リポフェクション、又はエレクトロポレーションを含む、宿主細胞へ外来核酸（例えばDNA）を導入するための種々の当該分野で認識された技術を指すことを意図している。宿主細胞を形質転換又は形質導入するのに適した方法は、Sambrookら（Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989）及び研究室マニュアルに見出すことができる。

【0149】

哺乳動物細胞の安定な形質導入のためには、用いられる発現ベクター及び形質導入技術に依存するが、細胞の小さな分画のみが外来DNAをそれらのゲノムへ一体化させ得る。これら成分を同定して選択するためには、一般的には、選択可能なマーカー（例えば、抗体に対する耐性）を対象としている遺伝子とともに宿主細胞へ導入する。種々の選択可能なマーカーには、G 4 1 8、ハイグロマイシン及びメトトレキサートのような薬剤に対する耐性を付与するものが含まれる。選択可能なマーカーをコードする核酸を、g 1 2 Lをコードするような宿主細胞の同じベクター上へ導入する、又は宿主細胞とは別に存在するベクターへ導入す

ることができる。導入された核酸で安定に形質導入された細胞は、薬剤選択によって同定することができる（例えば、選択可能なマーカー遺伝子を取り込ませた細胞は生存し、一方で他の細胞は死滅する）。

【0150】

培養中の原核生物又は真核生物宿主細胞のような、本発明の宿主細胞を、g12Lタンパク質の生産（すなわち発現）のために使用することができる。従って、本発明は、本発明の宿主細胞を使用してg12Lタンパク質を生産するための方法を提供する。一実施態様では、この方法は、本発明の宿主細胞（g12Lタンパク質をコードする組み換え発現ベクターが導入されている）を適切な培地で培養してg12Lタンパク質を生産させるを含む。その他の実施態様では、この方法は、さらに培地又は宿主細胞からg12Lタンパク質を単離することを含む。

【0151】

トランスジェニックg12L動物

また、本発明の宿主細胞は、非ヒトトランスジェニック動物を生産するために使用できる。例えば、一実施態様では、本発明の宿主細胞は授精卵母細胞、又はg12Lタンパク質コード化配列が導入された胚幹細胞である。このような宿主細胞は、次いで、外来性g12L配列がゲノムに導入されている、或いは内在性g12L配列が改変された相同組み換え動物である非ヒトトランスジェニック動物を作製するために用いることができる。このような動物は、g12Lタンパク質の機能及び/又は活性、並びにg12Lタンパク質活性のモジュレーターを同定及び/又は評価するのに有用である。ここで使用されているように、「トランスジェニック動物」とは、非ヒト動物、好ましくは動物、より好ましくはラット又はマウスのようなゲッ歯類であって、その動物の一つ又は複数の細胞は導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、羊、犬、牛、ヤギ、ニワトリ、両生類等が含まれる。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生した細胞のゲノムへ一体化して、成熟動物のゲノムにとどまっている外来性DNAであり、一つ又は複数の細胞型又はトランスジェニック動物の組織でのコードされた遺伝子産物の発現を指示する。ここで使用されているように、

「相同組み換え動物」とは非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであって、動物の発生の前に、その内在性 g 1 2 L 遺伝子は、例えば動物の胚幹性細胞などの動物の細胞へ導入された外来性 DNA 分子と内在性遺伝子との間の相同組み換えによって改変されている。

【0152】

本発明のトランスジェニック動物は、g 1 2 L コード化核酸を授精卵母細胞の雄性前核に導入し（例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染）、卵母細胞を偽妊娠雌養育動物で発育するさせることによって作製できる。配列番号：1のヒト g 1 2 L c DNA 配列は、導入遺伝子として非ヒト動物のゲノムへ導入することができる。或いは、マウス g 1 2 L 遺伝子（配列番号：3）のようなヒト g 1 2 L 遺伝子の非ヒトホモログは、導入遺伝子として使用することができる。また、イントロン性配列及びポリアデニル化シグナルは、導入遺伝子の発現の効率を高めるために、導入遺伝子へ含めることができる。組織特異的制御配列は、特定の細胞へ g 1 2 L タンパク質の発現を指示するために、g 1 2 L 導入遺伝子と作用可能に連結させることができる。特に、マウスのような動物で、胚操作及びマイクロインジェクションを介してトランスジェニック動物を作製する方法は、当該分野において常套手段となっており、例えば、米国特許第 4, 736, 866号；4, 870, 009；及び4, 873, 191；並びにHogan, 1986. In: MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。同様な方法を他のトランスジェニック動物の生産に使用する。トランスジェニック創始動物は、そのゲノムでの g 1 2 L 導入遺伝子の存在、及び/又は動物の組織又は細胞での g 1 2 L mRNA の発現に基づいて同定できる。トランスジェニック創始動物は、次いで導入遺伝子を有する付加的な動物を生育させるために使用できる。さらには、導入遺伝子コード化 g 1 2 L タンパク質を有する導入遺伝子動物は、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を生育することができる。

【0153】

相同組み換え動物を作製するためには、欠失、付加又は置換が g 1 2 L 遺伝子を改変、例えば機能的に崩壊させるように導入された、少なくとも g 1 2 L 遺伝

子の一部分を含むベクターを調製する。g 1 2 L 遺伝子はヒト遺伝子（例えば、配列番号：1のcDNA）であることが可能であるが、より好ましくはヒトg 1 2 L 遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、マウスホモログ（配列番号：3）は、マウスゲノムでの内在性g 1 2 L 遺伝子を改変するのに適切な相同組み換えベクターを構築するために使用できる。一つの実施態様では、ベクターは相同組み換えによって設計され、内在性g 1 2 L 遺伝子は機能的に破壊されている（すなわち、もはや機能性タンパク質をコードしない；また「ロックアウト」ベクターと呼ばれている）。

【0154】

或いは、ベクターは相同組み換えによって設計されることができ、内因性g 1 2 L 遺伝子は変異を受け、さもなければ改変されているが、機能性タンパク質をコードしたままである（例えば、上流制御領域は改変され、それによって内因性g 1 2 L タンパク質の発現が改良されている）。相同組み換えベクターでは、g 1 2 L 遺伝子の改変部分は、ベクターが有する外来性g 1 2 L 遺伝子と胚幹細胞の内在性g 1 2 L 遺伝子の間で相同組み換えが可能となるよう、g 1 2 L 遺伝子の付加的な核酸によってその5'-及び3'-末端で隣接している。付加的な隣接g 1 2 L 核酸は、内因性遺伝子との相同組み換えが成功するのに十分な長さである。典型的には、数キロベースの隣接DNA（5'-及び3'-末端）がベクターに含まれる。例えば、Thomasら., 1987. Cell 51: 503を相同組み換えベクターの説明として参照せよ。このベクターは、胚幹性細胞株へ10が導入され（例えば、エレクトロポレーションによって）、導入されたg 1 2 L 遺伝子が内因性g 1 2 L 遺伝子と相同的に組み換えられている細胞が選択される。Li, ら., 1992. Cell 69: 915を参照せよ。

【0155】

次いで、選択された細胞を動物（例えばマウス）の胚盤胞に注入し、凝集キメラを形成する。例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells : A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152を参照せよ。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、出産させた。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は、導入遺伝子の

生殖系伝達によって、動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。相同組み換えベクター及び相同組み換え動物を構築する方法は、さらに、Bradley, 1991. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2: 823-829 ; PCT国際公開第WO90/11354 ; WO91/01140 ; WO92/0968 ; 及びWO93/04169に記載されている。

【0156】

その他の実施態様では、トランスジェニック非ヒト動物を、導入遺伝子の制御発現が可能となるような選択系を含むように生産させることができる。そのような一例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系の説明については、例えば、Laks o., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-6236を参照せよ。リコンビナーゼ系のその他の例としては、サッカロマイセス・セレビシエのFLPリコンビナーゼ系がある。O'Gorman, ら., 1991. *Science* 251: 1351-1355を参照せよ。cre/loxPリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を制御するために使用される場合、Creリコンビナーゼと選択されたタンパク質の双方をコードする導入遺伝子を含有する動物が必要とされる。そのような動物は、例えば、選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物と、リコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含有する他のトランスジェニック動物を交配させることによる、「二重」トランスジェニック動物の構築を介して提供することができる。

【0157】

ここで記載されている非ヒトトランスジェニック動物のクローンは、Wilmut, ら., 1997. *Nature* 385 : 810-813に記載されている方法に従っても生産できる。要約すると、トランスジェニック動物の細胞（例えば、体細胞）を単離し、成長周期から抜け出て、G₀期に入るように誘導することができる。次に、例えば、電気パルスの使用を介して、静止細胞が単離された同種の動物の卵母細胞を除核することで、静止細胞を融合することができる。次に、再構築した卵母細胞を培養して、桑実胚又は未分化胚芽細胞に発育させ、次に偽妊娠雌乳母動物へ移植する。この雌乳母動物の生まれた子孫は、細胞（例えば、体細胞）が単離された動

物のクローンである。

【0158】

製薬的組成物

本発明の g 1 2 L 核酸分子、g 1 2 L タンパク質、及び抗-g 1 2 L 抗体（また、ここでは「活性化合物」と呼ぶ）、並びに誘導體、断片、その類似体及びホモログは、投与に適した薬学的組成物に取り入れることができる。そのような組成物は、典型的には、核酸分子、タンパク質、又は抗体及び薬学的に許容可能な担体を含む。ここで使用されているように、「薬学的に許容可能な担体」には、薬学的な投与と合致するどんなすべての溶剤、分散媒、被膜剤、抗細菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤等を含むように意図されている。適切な担体は、この分野で標準的な参考文献である、ここで参考文献としても取り入れられている最新版のRemington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。そのような担体又は希釈剤の好ましい例としては、限定されるものではないが、水、生理的食塩水、フィンガース溶液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンが含まれる。リポソームと不揮発性油のような非水溶性溶媒も使用してもよい。そのような媒体と薬剤を薬学的に活性な物質としての使用は、当該分野で良く知られている。何れの常套的培地又は薬剤が活性化合物と相容れない範囲にあることを除いて、組成物におけるその用途が考慮される。補助的な活性化合物も組成物へ取り込ませることができる。

【0159】

本発明の薬学的組成物は、その意図された投与経路と両立するように定式化されている。投与経路の例には、非経口、例えば静脈注射、皮内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（すなわち、局所的）、経粘膜、そして直腸投与が含まれる。非経口、皮内、又は皮下用途に使用される溶液又は懸濁液には、次の成分を含めることができる：注射のための水のような無菌希釈液、生理的食塩水、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又は他の合成溶剤；ベンジルアルコール又はメチルパラバンのような抗細菌薬剤、アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）のようなキレート剤、酢酸塩、クエン酸又はリン酸のようなバッファー

、そして塩化ナトリウム又はデキストロースのような弾力性を調製する薬剤。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムのような酸又は塩基によって調整できる。非経口調製物は、ガラス又はプラスチックで作られたアンプル、使い捨て注射器又は複数回投与バイアルに入れることができる。

【0160】

注射の用途に適した薬学的な組成物には、及び無菌注射用溶液又は分散物の即席調製のための無菌水溶液（水溶性）又は分散物、及び無菌パウダーが含まれる。静脈投与のためには、適切な担体には、生理学的食塩水、静菌性水、Cremophor EL（商品名）（BASF, Parsippany, N.J.）又はリン酸緩衝食塩水（PBS）が含まれる。すべての場合、その組成物は無菌であり、容易に注射器を通過できるほどの流動性を有するべきである。それは、製造と貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌及び真菌のような微生物の汚染作用から守られなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレン、グリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、及びその適切な混合を含む溶媒又は分散媒培地であってよい。適切な流動性は、例えばレシチンのような被覆剤の使用によって、分散の際に必要とされる粒子の維持によって、そして界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の活動の防止は、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、チメロサル等の種々の抗細菌及び抗真菌剤によって達成することができる。多くの場合、例えば、糖、組成物にマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどを含むポリアルコールの等張剤を含むことが好ましい。注入した組成物の長期吸収は、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンのような吸収を遅らせる薬剤を組成物に含めることによって生じせしめることができる。

【0161】

無菌の注射用溶液は、適当な溶媒中の必修量の活性化化合物（例えば、g12Lタンパク質又は抗-g12L抗体）へ必修である上記に列挙されている成分の一つ又は組み合わせを加えることによって調製できる。一般的には、分散液は、基礎的な分散培地及び必修である上記に列挙した他の成分を含む無菌溶媒へ、活性化化合物を加えることで調製される。無菌の注射用溶液の調製のための無菌パウダ

一の場合には、調製の方法とは、前もって無菌濾過された溶液の任意の付加的な所望の成分が加わった活性成分が加わった活性成分のパウダーを、真空乾燥及び凍結乾燥することである。

【0162】

経口組成物には、一般的に、不活性な希釈液又は食用担体が含まれる。それらは、ゼラチンカプセルに入れる又は錠剤に圧縮することができる。経口治療投与の目的のためには、活性化合物を、賦形剤に加え、錠剤、トローチ、又はカプセルの形態で使用することが可能である。また、経口組成物は、うがい薬としての用途のために、液体担体を使用して調製することができ、その液体担体中の化合物は経口的に適用され、ヒュッと音をたて、そして痰で吐かれる又は飲み込まれる。製薬的に適合する結合剤、及び/又はアジュバンド物質は、組成物の一部分として含めることができる。錠剤、ピル、カプセル、トローチ等は、次の成分の何れか、又は類似の性質の化合物を含むことができる：結合剤、例えば微結晶性セルロース、トラガカント又はゼラチン；賦形剤、例えば澱粉又はラクトース、崩壊剤、例えばアルギン酸、プリモゲル、又はトウモロコシ澱粉；滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、又はステロテス；流動促進剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えばシュークロース又はサッカリン；又は香料添加剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ香料。

【0163】

吸入による投与のためには、化合物は、例えば二酸化炭素のようなガスである適切な噴霧剤を含む圧力容器又はディスペンサーの噴霧器スプレー、又は噴霧器の形態から送達される。

また、全身投与は、経粘膜又は経皮的手法による。経粘膜又は経皮的投与のためには、浸透されるべきバリアーに対する適切な浸透剤が製剤として用いられる。そのような浸透剤には、一般的に当該分野で知られており、例えば経粘膜投与のために、界面活性剤、胆汁酸、及びフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻内噴霧又は座薬の使用を介して達成される。経皮的投与のためには、活性化合物が、当該分野で知られているような軟膏剤、軟膏、ゲル、又はクリームへ製剤化される。

【0164】

化合物は、直腸送達のための座薬（例えば、ココアバター及び他のグリセリドのような簡便な基礎座薬とともに）又は保持浣腸剤の形態で調製することもできる。

一実地態様では、活性化合物は、移植片及びマイクロカプセル送達システムを含む放出制御型製剤のような、体内からの迅速な放出に対する化合物を保護する担体とともに調製される。エチレン酢酸ビニール、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、及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤の調製方法は、当該分野に熟練者にとって明かである。その材料は、Alza Corporation及びNova Pharmaceuticals, Incから商業的に得ることができる。リポソーム懸濁（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体とともに感染細胞を標的としたリポソームを含む）も製薬的に許容される担体として使用される。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に示されているような当該分野に熟練した者に知られた方法によって調製することができる。

【0165】

投与の容易さと服用量の均一性のために、経口又は非経口組成物を服用量単位の形態で製剤化することは特に有益である。ここで使用されている服用量単位とは、治療すべき被検体のための単位服用量として適した物理的に別々の単位；必修の製薬的担体と関連する所望される治療効果を生産するために計算された、活性な化合物の予定量を含有する各単位を指す。本発明の服用量単位形態に関する明細書は、活性化合物の独特の特徴、及び達成されるべき特定の治療効果、そして個体の治療のためのそのような活性化合物を混合する当該分野に固有の限界によって指示され、直接に依存している。

【0166】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入して、遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈注射、局所投与（例えば、米国特許第5,328,470号を参照せよ）によって、又は定位注射（例えば、Chenら., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057を参照せよ）

によって被検体へ送達することができる。遺伝子治療ベクターの製薬的な調製方法には、許容可能な希釈剤中の遺伝子ベクター、又は遺伝子送達媒体が内臓されたマトリックスの緩やかな遊離が含まれことが可能である。

あるいは、例えばレトロウイルスのような、完全な遺伝子送達ベクターを組み換え細胞から無傷で生産することができ、製薬的調製物には、遺伝子送達系を生産する一つ又は複数の細胞が含まれることが可能である。

製薬的組成物は、投与に関する指示書とともに、容器、パック、又はディスペンサーに含めることができる。

【0167】

スクリーニング及び検出方法

本発明の単離された核酸分子は、g 1 2 Lタンパク質を発現させるために（例えば、遺伝子治療用途における、宿主細胞での組み換え発現ベクターを介して）、g 1 2 L mRNA（例えば、生物学的試料）又はg 1 2 L遺伝子の遺伝的損傷を検出するために、そしてg 1 2 L活性を調節するために、さらに下記に示しているように使用することができる。さらには、g 1 2 Lタンパク質は、g 1 2 Lタンパク質の不十分又は過度の生産、g 1 2 L野生型タンパク質と比較して減少した又は異常な活性を有するg 1 2 Lタンパク質形態の生産によって特徴付けられる疾患（例えば；肥満及び肥満関連障害、糖尿病、及び悪液質等の代謝障害及び疾患；過形成、癌、及び再狭窄のような細胞増殖障害及び疾患；アルツハイマー病及びパーキンソン病のような神経変性障害及び疾患；AIDS、炎症、及び自己免疫疾患のような免疫障害及び疾患；SCID、周期性好中球減少症、及び血小板血症のような造血性障害及び疾患）を治療すると同様に、g 1 2 Lタンパク質活性又は発現を調節するための薬剤又は化合物をスクリーニングするために使用することができる。加えて、本発明の抗-g 1 2 L抗体は、g 1 2 Lタンパク質及び検出し単離、そしてg 1 2 L活性を調節するために使用することができる。

本発明は更に、ここで記載されているスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤、そして上掲に記載したような治療に関するその用途に関する。

【0168】

スクリーニングアッセイ

本発明は、モジュレーター、すなわち、g 1 2 Lタンパク質と結合する、又は、例えばg 1 2 Lタンパク質発現又はg 1 2 Lタンパク質活性に対して刺激性又は阻害性効果を有する候補又は被験化合物、又は薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、小分子又は他の薬剤）を同定する方法（ここで「スクリーニングアッセイ」としても呼ばれている）を提供する。また、本発明には、ここで記載されているスクリーニングアッセイで同定された化合物を含む。

一実施態様では、本発明は、g 1 2 Lタンパク質又はポリペプチド、又はその生物学的に活性な部分の膜結合形態の活性を調節又は結合する候補又は被験化合物をスクリーニングするアッセイを提供する。本発明の被験化合物は、当該分野で知られているコンビナトリアルライブラリ法の多くの手法の何れかを用いて得ることができ、それらには含まれているのは：生物学的ライブラリ；空間的位置決定可能な並列固相又は水溶液相ライブラリ；デコンヴォリューションを必要とする合成ライブラリ法；「1ビーズ、1化合物」ライブラリ法；そしてアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリ法である。生物学的ライブラリ手法はペプチドライブラリに限定され、一方では、他の4つの手法は、ペプチド、非ペプチドオリゴマー、又は化合物の小分子ライブラリに応用可能である。例えば、Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145を参照せよ。

【0169】

ここで使用されている「小分子」とは、約5 k Dより少なく、最も好ましくは約4 k Dより少ない分子量を有する組成物を指すことを意味している。小分子とは、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質又は他の有機又は無機分子であることが可能である。真菌、細菌、又は藻類抽出物のような化学及び/又は生物学的混合物のライブラリは当該分野で知られており、本発明のアッセイの何れかによってスクリーニングされることが可能である。

分子ライブラリの合成のための方法の例は、当該分野で見出されることが可能であり、例えば、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 ; 及び Gallop, ら., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233。

【0170】

化合物のライブラリは溶液（例えば、Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421）, 又はビーズ（Lam, 1991. Nature 354: 82-84）, チップ（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）又はファージ（Scott及びSmith, 1990. Science 249: 386-390 ; Devlin, 1990. Science 249: 404-406 ; Cwirala, 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）に表示され得る。

【0171】

一実施態様では、アッセイは細胞ベースアッセイであり、それは細胞表面で g 1 2 L タンパク質の膜結合形態、又はその生物学的活性部分を発現する細胞を被験化合物と接触させ、被験化合物の g 1 2 L タンパク質との結合の能力を測定することである。例えば、細胞は、哺乳動物起源又は酵母細胞とすることができる。g 1 2 L タンパク質と結合する被験化合物の能力を測定することは、例えば、被験化合物を放射性同位元素又は酵素標識とカップリングさせ、被験化合物の g 1 2 L タンパク質又はその生物学的に活性な部分との結合が、複合体中の標識化合物を検出することによる測定によって完遂できる。例えば、被験化合物は、¹₂₅I, ³⁵S, ¹⁴C, ³Hによって直接又は間接的に標識することができ、放射性同位元素は、放射発光の直接計測によって、又はシンチレーション計測によって検出することができる。あるいは、被験化合物は、例えば西洋わさびパルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、又はルシェフェラーゼで酵素的に標識でき、酵素標識は、適切な基質の産物への変換の測定によって検出できる。一実施態様では、このアッセイは、g 1 2 L タンパク質の膜結合形態を発現する細

胞、又はその生物学的活性部分を、g 1 2 Lに結合してアッセイ混合物を形成する既知の化合物とともに細胞表面に接触させ、このアッセイ混合物を被験化合物と接触させ、そしてg 1 2 Lタンパク質と相互作用する被験化合物の能力を測定することを含む。g 1 2 Lタンパク質相互作用する被験化合物の能力を測定することは、この被験化合物が、既知の化合物と比較して、優先的にg 1 2 Lタンパク質、又はその生物学的に活性な部分と結合する能力を測定するを含む。

【0172】

その他の実施態様では、アッセイは、細胞表面で被験化合物とg 1 2 Lタンパク質の膜結合形態を発現する細胞、又はその生物学的活性部分と接触させ、g 1 2 Lタンパク質又はその生物学的活性部分の活性を調節する（例えば、刺激又は阻害）被験化合物の能力を測定することである。g 1 2 Lタンパク質又はその生物学的活性部分の活性を調節する被験化合物の能力を測定することは、例えば、g 1 2 L標的分子と結合又は相互作用するg 1 2 Lタンパク質の能力を測定することによって達成できる。ここで使用されているように、「標的分子」とは、天然において、g 1 2 Lタンパク質が結合又は相互作用する分子である。g 1 2 L標的分子は、非g 1 2 L分子、又は本発明のg 1 2 Lタンパク質又はポリペプチドである。一実施態様では、g 1 2 L標的分子は、細胞膜を介して及び細胞への細胞外シグナル（例えば、膜結合g 1 2 L分子との化合物の結合によって生じるシグナル）の伝達を促進するシグナル伝達経路の成分である。例えば、標的は、触媒活性を有する第2細胞間タンパク質、又は下流のシグナリング分子とg 1 2 Lの結合を促進するタンパク質である。

【0173】

g 1 2 L標的分子と結合又は相互作用するg 1 2 Lタンパク質の能力を測定することは、直接結合の測定することに関して上に記載した一つの方法によって完遂することができる。一実施態様では、g 1 2 L標的分子と結合又は相互作用するg 1 2 Lタンパク質の能力を測定することは、標的分子の活性を測定することによって完遂できる。例えば、標的分子の活性は、標的の細胞性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 、等）の誘導を検出すること、標的の適切な基質の触媒/酵素活性を検出すること、レポ

ーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼなどの検出可能なマーカーをコードする核酸と作用可能に連結している g 1 2 L 応答性制御エレメントを含む）の誘導の検出、又は細胞応答、例えば細胞生存、細胞性分化、又は細胞増殖を検出することによって測定できる。

【0174】

さらにその他の実施態様では、本発明のアッセイは、g 1 2 L タンパク質又はその生物学的活性な部分を被験化合物と接触させること、そして g 1 2 L タンパク質又はその生物学的活性な部分と結合する被験化合物の能力を測定することを含む無細胞アッセイである。g 1 2 L タンパク質と被験化合物の結合は、上に記載のように直接又は間接の何れかで測定することができる。一つのそのような実施態様では、このアッセイは、g 1 2 L タンパク質又はその生物学的に活性な部分を、g 1 2 L と結合してアッセイ混合物を形成する既知の化合物と接触させること、アッセイ混合物と被験化合物を接触させること、そして g 1 2 L タンパク質と相互作用する被験化合物の能力を測定することを含み、g 1 2 L タンパク質と相互作用する被験化合物の能力は、既知の化合物と比較して、被験化合物が優先的に g 1 2 L 又はその生物学的活性部分と結合する能力を測定することが含まれる。

【0175】

さらにその他の実施態様では、アッセイは無細胞アッセイであって、g 1 2 L タンパク質又はその生物学的活性部分と被験化合物を接触させること、そして g 1 2 L タンパク質又はその生物学的活性部分の活性を調節する（例えば、刺激又は阻害）被験化合物の能力を測定することを含む。g 1 2 L の活性を調節する被験化合物の能力を測定することは、例えば、直接結合を測定することに関して上に記載した一つの方法によって、g 1 2 L 標的分子と結合する g 1 2 L タンパク質の能力を測定することによって達成できる。代替の実施態様では、g 1 2 L タンパク質の活性を調節する被験化合物の能力を測定することは、g 1 2 L 標的分子をさらに調節する g 1 2 L タンパク質の能力を測定することによって達成することができる。例えば、適切な基質に対する標的分子の触媒/酵素活性は、上掲に記載のように測定することができる。

【0176】

さらにその他の実施態様では、無細胞アッセイは、g 1 2 Lタンパク質又はその生物学的に活性な部分を、g 1 2 Lタンパク質と結合してアッセイ混合物を形成する既知の化合物と接触させ、このアッセイ混合物を被験化合物と接触させ、そしてg 1 2 Lタンパク質と相互作用する被験化合物の能力を測定することを含み、g 1 2 Lタンパク質と相互作用する被験化合物の能力を測定することは、g 1 2 L標的分子と優先的に結合、又はその活性を調節するg 1 2 Lタンパク質の能力を測定することを含む。

【0177】

本発明の無細胞アッセイは、g 1 2 Lタンパク質の可溶形態又は膜結合形態の双方の用途の影響を受けやすい。g 1 2 Lタンパク質の膜結合形態を含む無細胞アッセイの場合には、可溶化剤を用いることが望ましく、g 1 2 Lタンパク質の膜結合形態は溶液中に維持される。そのような可溶化剤の例には、非イオン界面活性剤、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、Triton (登録商標) X-100、Triton (登録商標) X-114、Thesit (登録商標)、イソトリデシポリ (エチレングリコールエーテル)_n、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホン酸 (CHAPS)、又は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-プロパンスルホン酸 (CHAPSO) が含まれる。

【0178】

本発明の上記のアッセイ方法の複数の実施態様では、アッセイの自動化を施すのと同じく、一つ又は双方のタンパク質の非複合形態から複合物の分離を促進するためにg 1 2 Lタンパク質又はその標的分子の何れかを固定化することは望ましい。g 1 2 Lタンパク質との被験化合物の結合、又は候補化合物の存在及び非存在下でのg 1 2 Lタンパク質と標的分子の相互作用は、反応物を含有するのに適した任意の容器で達成することができる。そのような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管、そしてマイクロ遠心分離試験管が含まれる。一実施態様では、一つ又は双方のタンパク質がマトリックスに結合することを可能

にするドメインを加えることを融合タンパク質は提供する。例えば、GST-g 1 2 L融合タンパク質又は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) 又はグルタチオン誘導マイクロタイタープレート上に吸収させることができ、次にそれらを被験化合物又は被験化合物、及び非吸収標的タンパク質又はg 1 2 Lタンパク質の何れかと組み合わせ、この混合物を複合体形成につながる条件下でインキュベーションする (例えば、塩及びpHに関して生理学的条件)。インキュベーションの後で、ビーズ又はマイクロタイタープレートウェルを洗浄し、すべての非結合成分、ビーズの場合に固定化されたマトリックス、例えば上掲にて記載されていて、直接又は間接的の何れかによって測定された複合体を取り除いた。あるいは、この複合体をマトリックスから分離することができ、g 1 2 Lタンパク質結合又は活性のレベルは、標準技術を用いて決定することができる。

【0179】

マトリックス上にタンパク質を固定化する他の技術は、本発明のスクリーニングアッセイでも使用することができる。例えば、g 1 2 Lタンパク質又はその標的分子を、ビオチンとストレプトアビジンのコンジュゲイションを利用することで固定化できる。当該分野で知られた技術 (例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) を用いて、ビオチン化g 1 2 Lタンパク質又は標的分子をビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-スクシニミド) から調製して、ストレプトアビジン被膜96ウェルプレートのウェルに固定化できる (Pierce Chemical)。あるいは、g 1 2 Lタンパク質又は標的分子と反応性があり、g 1 2 Lタンパク質のその標的分子への結合を阻害しない抗体は、プレートのウェル、非結合標的又は抗体コンジュゲイションによってウェルにトラップされたg 1 2 Lタンパク質へ誘導体化することができる。このような複合体を検出する方法には、GST-固定化複合体に関して上記にて記載した内容に加えて、g 1 2 Lタンパク質又は標的分子と関連する酵素活性を検出することに基礎をおく酵素結合アッセイと同様に、g 1 2 Lタンパク質又は標的分子と反応性のある抗体を使用した複合体の免疫検出が含まれる。

【0180】

その他の実施態様では、細胞を候補化合物と接触させ、そして g 1 2 L m R N A 又はタンパク質の発現を測定するという方法で、g 1 2 L タンパク質発現のモジュレーターを同定する。候補化合物の存在下での g 1 2 L m R N A 又はタンパク質の発現のレベルを、候補化合物が存在しない下で、g 1 2 L m R N A 又はタンパク質の発現のレベルと比較する。次に、この比較に基づいて、候補化合物を g 1 2 L m R N A 又はタンパク質発現のモジュレーターとして同定することができる。例えば、候補化合物が存在しない場合よりも存在する場合に g 1 2 L m R N A 又はタンパク質の発現がより高い場合（すなわち、統計的に顕著に高い）、候補化合物は、g 1 2 L m R N A 又はタンパク質発現のスティミュレーターとして同定される。あるいは、候補化合物が無い場合よりも存在する場合に g 1 2 L m R N A 又はタンパク質の発現がより低い場合（統計的に顕著に低い）、候補化合物は、g 1 2 L m R N A 又はタンパク質発現のインヒビターとして同定される。細胞における g 1 2 L m R N A 又はタンパク質発現のレベルは、g 1 2 L m R N A 又はタンパク質の検出に関してここで記載されている方法によって測定することができる。

【0181】

本発明の更にその他の側面では、g 1 2 L タンパク質は、トゥーハイブリッドアッセイ又はスリーハイブリッドアッセイ（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；及びBrent WO 94 / 10300）における「ベイトタンパク質」として、g 1 2 L（「g 1 2 L-結合タンパク質」又は「g 1 2 L-b p」）と結合又は相互作用する他のタンパク質を同定するために使用することができる。そのような g 1 2 L-結合タンパク質は、また、例えば、g 1 2 L 経路の上流又は下流エレメントとしての g 1 2 L タンパク質によるシグナルの増幅に関与する傾向にある。

【0182】

トゥーハイブリッドシステムは、殆どの転写因子のモジュレーターとしての性質に基づいており、分離可能な D N A-結合及び活性化ドメインから成る。要約

すると、このアッセイは二つの異なるDNA構成物を利用する。一つの構成物では、g12Lをコードする遺伝子が、既知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子と融合している。他の構成物では、未同定タンパク質（「プレイ」又は「試料」）をコードするDNA配列のライブラリからのDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子と融合している。インビボでg12L依存性複合体を形成するように「ベイト」及び「プレイ」タンパク質が相互作用できるならば、転写因子のDNA結合及び活性化ドメインは、近接しておかれる。この近さは、転写制御因子部位と作用可能に連結しているレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写を、転写因子に対して応答性にする。レポーター遺伝子の発現は検出可能であり、機能性転写因子を含有する細胞コロニーを単離し、g12Lと相互作用するタンパク質をコードするクローン遺伝子を得るために使用できる。

本発明は、更に、前出において言及したスクリーニングアッセイによって同定した新規薬剤、及びここで記載されているそれを使用する治療に関する。

【0183】

検出アッセイ

ここで同定されたcDNA配列の一部又は断片（及び対応する完全な遺伝子配列）は、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法において使用できる。例えば、限定されるものではないが、これら配列は：（i）それらのそれぞれの遺伝子染色体上にマッピングする；そしてそれによって遺伝疾患に関連している遺伝子領域を位置付ける；（ii）最小量の生物学的試料からそれぞれを同定する（組織適合試験）；そして（iii）生物学的試料の法医学的な同定を補助することに使用できる。これら用途の幾つかは、以下の小節に示してある。

【0184】

クロモソームマッピング

一度、遺伝子の配列（又は配列の一部）が同定されると、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できる。この手法は、クロモソームマッピングと呼ばれている。従って、g12L配列の一部又は断片、配列番号：1又は3、又はその断片又は誘導体は、それぞれ染色体上のg12L遺伝

子の位置をマッピングするために使用できる。染色体への g 1 2 L 配列のマッピングは、これら配列と疾患に関連している遺伝子を相関させるための重要な第一ステップである。

要約すると、g 1 2 L 配列から P C R プライマー（好ましくは 1 5 - 2 5 b p 長）を調製することによって、g 1 2 L 遺伝子をクロモソームにマッピングすることができる。g 1 2 L 配列のコンピューター分析は、ゲノム DNA に 1 エクソンよりも多く架けないプライマーを迅速に選択するために使用でき、それ故に増幅プロセスを複雑にする。次に、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含有する体細胞ハイブリッドの P C R スクリーニングに使用できる。g 1 2 L 配列に一致するヒト遺伝子を含有するこれらハイブリッドのみが、増幅断片を産する。

【 0 1 8 5 】

体細胞ハイブリッドは、異なる哺乳動物（例えば、ヒト及びマウス細胞）の体細胞を融合させることによって調製することができる。ヒト及びマウス細胞のハイブリッドが成長して分割するように、それらは、マウス染色体を保持するが、次第にヒト染色体をランダムな順序で失う。ヒト細胞は成長するが、マウス細胞が成長することのできない培地を使用することによって、それらが特定の酵素を欠いているために、必要とする酵素をコードする遺伝子を含む一つのヒト染色体は保持される。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確立される。パネルの各細胞株は、単一のヒト染色体又は僅かのヒト染色体の何れか、そしてマウス染色体のフルセットを含み、特定のヒト染色体への個々の遺伝子の容易なマッピングを可能にする。D'Eustachio, ら., 1983. Science 220: 919-924を参照せよ。ヒト染色体の唯一の断片を含む体細胞ハイブリッドは、さらに、転座及び欠失をともなうヒト染色体を用いることによって生産される。

【 0 1 8 6 】

体細胞ハイブリッドの P C R マッピングは、特定の配列を特定の染色体へ割り当てる迅速な手法である。シングル熱サイクルを使用して、1 日辺り 3 又はより多い配列を割り当てることができる。設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

へg 1 2 L配列を使用すると、特定の染色体の断片のパネルでサブローカライゼーションが可能である。

【0187】

分散した分裂中期の染色体に対するDNA配列の蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)は、さらに、一段階で正確な染色体位置を提供するのに使用できる。染色体の分散は、紡錘体を破壊するコルセミドのような化学物質によって、分裂が分裂中期でブロックされる細胞を使用して生成できる。染色体は、トリプシンで手短かに処理でき、次にギームザ染色で染色できる。明白な明と暗のバンドが染色体上に現れ、これによって染色体が個々に同定される。このFISH技術は、500又は600塩基の短いDNA配列で使用される。しかしながら、1,000塩基より大きなクローンは、単純な検出にとって十分なシグナル強度で独特な染色体位置と結合するより高い傾向がある。好ましくは、1,000塩基、そしてより好ましくは2,000塩基が、相応な時間でよい結果を得るのに十分である。この技術の概説としては、Verm,ら., HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES (Pergamon Press, New York 1988)。

【0188】

クロモソームマッピングの試薬は、それぞれ、単一の染色体又はその染色体上の単一部位を印すことに使用でき、試薬のパネルは、重複部位及び/又は染色体を印すのに使用できる。遺伝子の非コード化領域に対応す試薬は、実際には、マッピングの目的にとって好ましい。コード化配列は、遺伝子ファミリー内で保存される傾向によりあり、従ってクロモソームマッピングの間のクロスハイブリダイゼーションの機会を増す。

一度、配列が染色体の正確な位置にマッピングされると、染色体上の配列の物理的な位置を遺伝的地図のデータと相関させることができる。そのようなデータは、例えば、オンラインでJohns Hopkins University Welch Medical Libraryを介して入手可能なMcKusick MENDELIAN INHERITANCE IN MANに見出せる。同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患の関係は、次に、例えばEgeland,ら., 1987. Nature, 325: 783-787に記載されている連鎖解析を介して同定できる(物理的に近接した遺伝子の同一遺伝)。

【0189】

さらには、g 1 2 L 遺伝子と関連する疾患によって影響又は影響を受けていない個体間のDNA配列の違いを決定することができる。任意の影響を受けていない個体においてではなく、幾つか又は全ての影響を受けた個体に変異が観察される場合、次いで、この変異は、特定の疾患の病因であり得る。影響を受けた、及び受けていない個体には、一般的に、例えば、染色体分散から視覚化できる、又はDNA配列に基づいたPCRを使用して検出可能な欠失又は転座のような、染色体における構造変化が一見して含まれる。結局は、変異の存在を確認すること、そして多型の変異を識別するために、幾つかの個体からの遺伝子の完全なシーケンシングをおこなうことができる。

【0190】

組織適合試験

また、本発明のg 1 2 L 配列は、最小量の生物学的試料から個体を同定するために使用することができる。この技術では、個々のDNAは一つ又は複数の制限酵素で消化され、そしてサザンブロットにプローブされて同定のために独特なバンドを産する。本発明の配列は、RFLPにおける付加的なDNAマーカーとして有用である（米国特許第5,272,057号に記載された「制限酵素断片長多型」）。

さらには、本発明の配列は、個々のゲノムの選択部分の実際の塩基-塩基DNA配列を決定する選択的技術を提供するために使用される。従って、ここで記載されたg 1 2 L 配列は、配列の5'-及び3'-末端からの二つのPCRプライマーを調製するために使用することができる。これらのプライマーは、次に、個々のDNAを増幅し、その後でそれをシーケンシングするために使用できる。

【0191】

この方法で調製された、個体からの一致するDNA配列のパネルは、独特な個々の同定を提供し、各個体は、対立遺伝子の違いに起因するそのようなDNA配列の独特な一組を有する。本発明の配列は、個体及び組織からのそのような同定配列を得るために使用できる。本発明のg 1 2 L 配列は、ヒトゲノム的一部分を比類なく表す。対立遺伝子の変異は、これら配列のコード化領域においてある程

度生じ、非コード化領域ではより高い程度で生じる。個々のヒトの間の対立遺伝子変異は、約500塩基辺り1つの頻度で生じる。対立遺伝子変異の多くは一塩基変異多型に起因し、それには制限酵素断片長多型(RFLPs)が含まれる。

【0192】

ここに記載の各配列は、個体からのDNAが同定の目的のために比較できるのに対して、ある程度は標準として使用できる。非コード領域においてより多くの数の多型が生じることから、より僅かな配列が個体を識別するために必要である。非コード配列は、楽に、ポジティブな個体の同定に、それぞれが100塩基の非コード化増幅配列を産する、恐らくは10から1,000プライマーのパネルを提供する。配列番号：1又は3にあるような予想コード化配列が使用されたならば、ポジティブな個体の同定についてのより適切な数のプライマーは、500-2,000である。

【0193】

予知医学

更に、本発明は、診断アッセイ、予後アッセイ、薬理ゲノム学、そして臨床試験のモニタリングが予後(予知)の目的に用いられ、それによって個体を予防的に治療する、予知医学の分野に関する。従って、本発明の一側面は、生物学的試料(例えば、血液、血清、細胞、組織)のからみで、g12L活性のみならず、g12Lタンパク質及び/又は核酸発現に関する診断アッセイに関し、それによって、個体が、異常なg12L発現又は活性に関連する、疾病又は疾患で冒されているのか、又は疾患の発達段階の危機にあるのかが決定できる。疾患には、代謝疾患及び疾病、例えば肥満及び肥満関連疾患、糖尿病、及び悪液質；細胞増殖疾患及び疾病、例えば過形成、癌、及び再狭窄；神経変性疾患及び疾病、例えばアルツハイマー病及びパーキンソン病；免疫疾患及び疾病、例えばAIDS、炎症、及び自己免疫疾患；そして造血性疾患及び疾病、例えばSCID、周期性好中球減少症、及び血小板血症が含まれる。更に、本発明は、個体が、g12Lタンパク質、核酸発現又は活性と関連する疾患の発達段階の危機にあるのかどうかを決定する予後(又は予知)アッセイを提供する。例えば、g12L遺伝子における変異は、生物学的試料でアッセイできる。そのようなアッセイは、予後又は

予知目的で使用することができ、それによって、g 1 2 Lタンパク質、核酸発現、又は生物学的活性で特徴付けられる又は関連する疾患の発症の前に個体を予防的に治療できる。

【0194】

本発明のその他の側面は、個体でのg 1 2 Lタンパク質、核酸発現又は活性を測定する方法を提供し、それによって、その個体にとって適切な治療又は予防的な薬剤を選択する方法を提供する（ここでは、「ゲノム薬理学」と呼ばれる）。ゲノム薬理学は、個体の遺伝子型に基づく治療的又は予防的治療に関する薬剤（例えば、薬）の選択を可能にする（例えば、特定の薬剤への応答する個体の能力を測定するために検査した個体の遺伝子型）。

本発明の更にその他の側面は、臨床試験でのg 1 2 Lの発現又は活性における薬剤（例えば、薬剤、化合物）の影響のモニタリングに関する。

これら及び他の薬剤は、下記の節において更に詳しく記載されている。

【0195】

診断アッセイ

生物学的試料中のg 1 2 Lの存否を検出する例示的な方法には、被検体から生物学的試料を得て、生物学的試料と化合物、又はg 1 2 Lタンパク質又はg 1 2 Lタンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出することが可能な薬剤を接触させ、生物学的試料におけるg 1 2 Lの存在を検出することが含まれる。g 1 2 Lタンパク質又はゲノムDNAを検出するための薬剤は、g 1 2 L mRNA又はゲノムDNAとハイブリダイズすることが可能な標識核酸プローブである。例えば、核酸プローブは、完全長g 1 2 L核酸、例えば配列番号：1又は3の核酸、又はその一部分、例えば少なくとも15，30，50，100，250又は500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであって、緊縮条件の下でg 1 2 L mRNA又はゲノムDNAと特異的にハイブリダイズするのに十分なものである。本発明の診断アッセイの用途にとって適切な他のプローブが、ここに記載されている。

【0196】

g 1 2 Lタンパク質を検出するための薬剤は、g 1 2 Lタンパク質と結合する

ことが可能な抗体であり、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、より好ましくはモノクローナルである。無傷の抗体、又はその断片（例えば、Fab又はF(ab')₂）を使用することができる。プローブ又は抗体に関する「標識」という用語は、直接に標識されたその他の試薬との反応性によるプローブ又は抗体の間接的な標識化だけでなく、検出可能な基質をプローブ又は抗体へカップリング（すなわち、物理的な結合）によるプローブ又は抗体の直接標識を包含することを意図している。間接標識の例には、蛍光性標識二次抗体を使用した一次抗体の検出、及びビオチンによるDNAプローブの末端標識を使用し、それによってそれを蛍光性標識ストレプトアビジンで検出できるようにすることが含まれる。「生物学的試料」という用語は、被検体中に存在する組織、細胞及び体液のみならず、被検体から単離した組織、細胞及び生物学的体液を含めることが意図されている。すなわち、本発明の検出方法は、インビボのみならずインビトロでの生物学的試料中のg12L mRNA、タンパク質、又はゲノムDNAを検出するために使用できる。例えば、g12L mRNAの検出に関するインビトロ技術には、ノーザンハイブリダイゼーション及びインサイツハイブリダイゼーションが含まれる。g12Lタンパク質の検出に関するインビトロ技術には、酵素結合免疫吸着検定法（ELISAs）、ウェスタンブロット、免疫沈降、そして免疫蛍光が含まれる。g12LゲノムDNAの検出に関するインビトロ技術には、サザンハイブリダイゼーションが含まれる。さらには、g12Lタンパク質の検出に関するインビボ技術には、被検体へ標識抗-g12L抗体を導入することが含まれる。例えば、抗体は、被検体におけるその存在及び位置を標準画像化技術によって検出できる、放射活性マーカで標識できる。

【0197】

一実施態様では、生物学的試料は、被験検体からのタンパク質分子を含む。あるいは、この生物学的試料は、被験検体又は被験検体のゲノムDNA分子からのmRNA分子を含むことができる。好ましい生物学的試料は、脂肪組織、腫瘍生検、又は血液試料である。

その他の実施態様では、この方法には、更に、コントロール被検体からコント

ロールの生物学的試料を得ること、コントロール試料とg12Lタンパク質、mRNA、又はゲノムDNAを検出することが可能な化合物又は薬剤と接触させ、g12Lタンパク質、mRNA又はゲノムDNAを生物学的試料から検出し、そしてコントロール試料中のg12Lタンパク質、mRNA又はゲノムDNAと、被験試料中のg12Lタンパク質、mRNA又はゲノムDNAの存在を比較することが含まれる。

【0198】

また、本発明には、生物学的試料中のg12Lの存在を検出するためのキットが含まれる。例えば、このキットは：生物学的試料中のg12Lタンパク質又はmRNAを検出することができる標識化合物又は薬剤；試料中のg12Lの量を測定する手段；及び試料中のg12Lの量を標準と比較するための手段を含む。この化合物又は薬剤を、適切な容器に詰めることができる。このキットは、更に、このキットをg12Lタンパク質又は核酸を検出するために使用するための指示書を含むことができる。

【0199】

予後アッセイ

ここに記載の診断方法は、さらに、異常なg12L発現又は活性と関連している疾病又は疾患を有している又はその進行の危機にある被検体の同定のために使用することができる。例えば、前述の診断アッセイ又は次のアッセイのような、ここに記載されているアッセイは、g12Lタンパク質、核酸発現又は活性と関連している疾患を有する又はその進行の危機ある被検体を同定するために使用することができる。あるいは、予後アッセイは、疾病又は疾患を有する、又はその進行の危機にある被検体を同定するために使用することができる。従って、本発明は、異常なg12L発現又は活性と関連する疾病又は疾患を同定する方法を提供し、その被験試料は被検体から得られて、g12Lタンパク質又は核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）が検出され、g12Lタンパク質又は核酸の存在は、異常なg12L発現又は活性と関連する疾病又は疾患を有する又はその進行の危機にある被検体に関する診断に用いられる。ここで使用されているように、「被験試料」とは、対象である被検体から得られた生物学的試料を指す。例えば

、被験試料は、生物学的体液（例えば、血清）、細胞試料、又は組織である。

【0200】

さらには、ここに記載の予後アッセイは、異常な g 1 2 L 発現又は活性に関連している疾病又は疾患を治療するために、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、小分子、又は他の薬候補物）を被検体へ投与してもよいかどうかを決定するために使用することができる。例えば、そのような方法は、疾患に対する薬剤によって被検体を効果的に治療することができるかどうかを決定するために使用できる。従って、本方法は、被験試料が得られて、g 1 2 L タンパク質又は核酸を検出する、異常な g 1 2 L 発現又は活性と関連する疾病に対する薬剤によって被検体が効果的に治療できるかどうかを決定する方法を提供する（例えば、異常な g 1 2 L 発現又は活性と関連する疾患を治療する薬剤を投与することができる被検体にとって、g 1 2 L タンパク質又は核酸の存在が診断上利用できる）。

【0201】

また、本発明の方法は、g 1 2 L 遺伝子の遺伝的損傷を検出し、それによって損傷した遺伝子を有する被検体が、異常な細胞増殖及び/又は分化によって特徴付けられる疾患の危機にあるかどうかを決定することに使用できる。種々の実施態様では、本方法には、被検体の細胞の試料において、g 1 2 L タンパク質をコードする遺伝子の整合性に影響する少なくとも一つの変化によって特徴付けられる遺伝的損傷の存否、又は g 1 2 L 遺伝子の誤発現を検出することが含まれる。例えば、そのような遺伝的損傷は：(i) g 1 2 L 遺伝子の一つ又は複数のヌクレオチドの欠失；(ii) g 1 2 L 遺伝子への一つ又は複数のヌクレオチドの付加；(iii) g 1 2 L 遺伝子の一つ又は複数の置換；(iv) g 1 2 L 遺伝子の染色体再編成；(v) g 1 2 L 遺伝子のメッセンジャーRNA転写のレベルでの変化，(vi) g 1 2 L 遺伝子の異常な修飾，例えばゲノムDNAのメチル化パターン，(vii) g 1 2 L 遺伝子のメッセンジャーRNA転写の非野生型スプライシングパターンの存在，(viii) g 1 2 L タンパク質の非野生型レベル，(ix) g 1 2 L 遺伝子の対立遺伝子損失，そして(x) g 1 2 L タンパク質の不適切な翻訳後修飾のうちの少なくとも一つの存在を確かなものにするによって検出される。

ここに記載されているように、g 1 2 L 遺伝子の損傷を検出するために使用できる、当該分野で知られている多くの数のアッセイ技術がある。好ましい生物学的試料は、被検体から常套的な方法で単離された脂肪組織試料、腫瘍生検、又は血液試料である。しかしながら、有核細胞を含有する生物学的試料が使用されてもよい。

【0202】

ある実施態様では、損傷の検出には、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）でのプローブ/プライマーの使用（例えば、米国特許第4,683,195号及び4,683,202号を参照せよ）、例えばアンカーPCR又はRACE PCRが含まれ、それに代わる方法としては、ライゲーション連鎖反応法（LCR）（例えば、Landegran,ら., 1988. Science 241: 1077-1080; 及びNakazawa,ら., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 360-364）でのこれらプローブの使用が含まれ、後者は、特にg 1 2 L 遺伝子の点変異を検出するために有用である（Abravaya,ら., 1995. Nucl. Acids Res. 23: 675-682）。この方法には、患者から細胞の試料を収集すること、試料の細胞から核酸（例えば、ゲノム、mRNA又は双方）を単離すること、g 1 2 L 遺伝子（存在していれば）のハイブリダイゼーション及び増幅が起こる条件下で、核酸試料を一つ又は複数のg 1 2 L 遺伝子と特異的にハイブリダイズするプライマーと接触させること、そして増幅産物の存否を検出すること、又は増幅産物の大きさを検出してコントロール試料に対して長さを比較することの段階が含まれる。ここに記載の変異を検出するために使用する任意の技術との組み合わせにおいて、PCR及び/又はLCRを予備的増幅段階として使用することは所望され得ることであると期待される。

【0203】

代替的な増幅方法には：自己持続性配列複製（Guatelli,ら., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878を参照せよ）；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）、又は任意の他の核酸増幅法と、これに続く当該分野に熟練した者にとって良く知られた技術を用いた増幅分子の検出が含まれる。これらの検出の基本構想は、核酸分子が極めて少なく存在しているなら

ば、特に核酸分子の検出にとって有用である。

これに代わる実施態様では、試料細胞の g 1 2 L 遺伝子の変異は、制限酵素切断パターンの変化によって同定することができる。例えば、試料及びコントロール DNA が単離され、増幅され（選択）、一つ又は複数の制限エンドヌクレアーゼで消化され、断片長の大きさをゲル電気泳動によって決定して比較する。試料とコントロール DNA の間の断片長の大きさの違いは、試料 DNA における変異を表す。さらには、配列特異的リボザイム（例えば、米国特許第 5, 493, 531 号を参照せよ）の使用は、リボザイム切断部位の発生又は損失による特異的変異の存在に切り目を付けるために使用できる。

【0204】

他の実施態様では、g 1 2 L の遺伝的変異は、試料と例えば DNA 又は RNA の核酸を、数百又は数千のオリゴヌクレオチドプローブを含有する高密度アレイへハイブリダイズさせることで同定できる。例えば、Cronin, ら., 1996. Human Mutation 7: 244-255 ; Kozal, ら., 1996. Nat. Med. 2: 753-759 を参照せよ。例えば、g 1 2 L の遺伝的変異は、Cronin, ら., 上掲に記載されているような、光生成 DNA プローブを含有する二次元アレイで同定することができる。要約すると、プローブの最初のハイブリダイゼーションアレイは、試料及びコントロール中の長いストレッチをスキャンするために使用することができ、それによって連続して重なり合っているプローブの線形アレイを作製して配列間の塩基の変化を同定することができる。この段階は、点変異の同定を可能にする。これには、すべての変異体又は検出された変異と相補的なより小さく、特化されたプローブを使用することで、特定の変異の特徴付けが可能となる二次ハイブリダイゼーションが続く。各変異アレイは、一つが野生型遺伝子に対して相補的、そして他が変異遺伝子に対して相補的な、並列するプローブのセットから構成される。

【0205】

さらにその他の実施態様では、当該分野で知られた任意の種々のシーケンシング反応を、g 1 2 L 遺伝子を直接にシーケンシングし、試料 g 1 2 L の配列とこれに相当する野生型（コントロール）配列を比較することによって変異を検出することに使用することができる。シーケンシング反応の例には、Maxim 及

びGilbert, 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560又はSanger, 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463によって開発された技術に基づいたものが含まれる。また、任意の種々の自動化シーケンシング法を、質量分析法によるシーケンシングを含めて (PCT国際公開WO 94 / 16101 ; Cohen, ら., 1996 Adv. Chromatography 36: 127-162 ; 及びGriffin, ら., 1993. Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147-159)、診断的アッセイ (例えば、Naeve, ら., 1995. Biotechniques 19: 448を参照せよ) をおこなう場合に利用することができる。

【0206】

g 1 2 L 遺伝子の変異を検出するための他の方法には、切断剤からの保護がRNA / RNA又はRNA / DNAヘテロ二重鎖のミスマッチ塩基を検出するために使用されている方法が含まれる。例えば、Myers, ら., 1985. Science 230: 1242を参照せよ。一般的には、「ミスマッチ切断」の技術は、組織試料から得られた変異RNA又はDNAを潜在的に有する野生型g 1 2 L配列を含有するRNA又はDNAをハイブリダイズ (標識された) することで形成されたヘテロ二重鎖を提供することによって開始する。二本鎖二重鎖を、コントロールと試料鎖の間の塩基対ミスマッチによって存在する二重鎖の一本鎖領域を切断する薬剤で処理する。例えば、ミスマッチ領域を酵素的に消化するために、RNA / DNA二重鎖をRNase、そしてDNA / DNAハイブリッドをS₁ヌクレアーゼで処理することができる。他の実施態様では、DNA / DNA又はRNA / DNA二重鎖の何れかを、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシアミン又は四酸化オスミウム、そしてピペリジンで処理することができる。ミスマッチ領域の消化の後、次に、この消化の結果で生じた物質を変性ポリアクリルアミドゲル上で大きさによって分離し、変異の位置を決定した。例えば、Cotton, ら., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397 ; Saleeba, ら., 1992. Methods Enzymol. 217: 286-295を参照せよ。ある実施態様では、検出のために、コントロールDNA又はRNAを標識することができる。

【0207】

更に、その他の実施態様では、ミスマッチ切断反応は、細胞の試料から得られたg 1 2 L c DNAの点変異を検出してマッピングするための定義されたシス

テムにおける二重鎖DNAのミスマッチ塩基対(「DNAミスマッチ修復」酵素と呼ばれる)のミスマッチ塩基対を認識する一つ又は複数のタンパク質を利用する。例えば、大腸菌のmutY酵素はG/AミスマッチのAを切断し、HeLa細胞のチミジンDNAグリコシラーゼはG/TミスマッチのTを切断する。例えば、Hsu,ら., 1994. *Carcinogenesis* 15: 1657-1662を参照せよ。例示的な実施態様によると、g12L配列に基づくプローブ、例えば野生型g12L配列は、被験細胞のcDNA又は他のDNA産物とハイブリダイズする。二重鎖はDNAミスマッチ修復酵素で処理され、存在するならば、切断産物は電気泳動プロトコール等で検出することができる。米国特許第5,459,039号を参照せよ。

【0208】

他の実施態様では、電気泳動的移動度の変化は、g12L遺伝子の変異を同定するために使用することができる。例えば、一本鎖DNA高次構造多型(SSCP)を、変異体と野生型核酸の間の電気泳動移動度の違いを検出するために使用できる。例えば、Orita,ら., 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 86: 2766; Cotton, 1993. *Mutat. Res.* 285: 125-144; Hayashi, 1992. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9: 73-79を参照せよ。試料及びコントロールg12L核酸の一本鎖DNA断片を変性し、再生させる。一本鎖核酸の二次構造は、配列によって変化し、電気泳動移動度で生じた変化によって、一塩基変化でさえも検出が可能となる。DNA断片を、標識プローブで標識又は検出してもよい。このアッセイの感度は、その二次構造が配列の変化に対してより感度の高いRNA(DNAよりも)を使用することによって増し得る。一実施態様では、この主題の方法は、電気泳動的移動度における変化に基づく二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離するためのヘテロ二重鎖分析を利用する。例えば、Keen,ら., 1991. *Trends Genet.* 7: 5を参照せよ。

【0209】

更にその他の実施態様では、変性グラジエントゲル電気泳動(DGGE)を使用して、変性剤のグラジエントを含有するポリアクリルアミドゲルにおける変異体又は野生型断片の移動をアッセイした。例えば、Myers,ら., 1985. *Nature* 313: 495を参照せよ。分析の方法としてDGGEを使用する場合、例えば、PCR

により、およそ40bpの高融点GC高含有DNAのGCクランプを添加することによって、完全に変性しないことを確かなものにするために、DNAを修飾する。更なる実施態様では、コントロールと試料DNAの移動度の違いを同定するために、変性グラジェントに代わって温度グラジェントを使用する。例えば、Rosenbaum及びReissner, 1987. *Biophys. Chem.* 265: 12753を参照せよ。

【0210】

点変異を検出するための他の例には、限定されるものではないが、選択性オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択性増幅、又は選択性プライマー伸張が含まれる。例えば、既知の変異を中心に配し、完全な一致が見出される場合にのみにハイブリダイゼーションを許容する条件下で、標的DNAとハイブリダイズさせることで、オリゴヌクレオチドプライマーは調製され得る。例えば、Saiki,ら., 1986. *Nature* 324: 163 ; Saiki,ら., 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230を参照せよ。オリゴヌクレオチドがハイブリダイズ化膜に結合して標識された標的DNAとハイブリダイズする場合、このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、PCR増幅標的DNA又は多くの異なる変異とハイブリダイズする。

【0211】

あるいは、選択性PCR増幅に依存する対立遺伝子増幅技術は、本発明と組み合わせ使用することができる。特定の増幅でプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、適切な条件下で、ミスマッチが防げる、又はポリメラーゼ伸張が減じられることが可能である、分子の中心(よって、増幅はディファレンシャルハイブリダイゼーションによる; 例えば、Gibbs,ら., 1989. *Nucl. Acids Res.* 17: 2437-2448を参照せよ)又は一つのプライマーの極端な3'-末端に対象である変異を有する(例えば、Prossner, 1993. *Tibtech.* 11: 238)。加えて、切断を基礎とする検出を引き起こすために、変異の領域に新しい制限酵素部位を導入することが所望されてもよい。例えば、Gasparini,ら., 1992. *Mol. Cell Probes* 6: 1を参照せよ。また、所定の実施態様の増幅が、増幅のためのTaqリガーゼを使用しておこなわれてもよい。例えば、Barany, 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189を参照せよ。そのような場合には、ライゲーションは、5

'配列の3'-末端で完全なる一致がある場合のみに起こり、増幅の存否を調べることによって、特定部位での既知の変異の存在を検出することを可能にする。

【0212】

ここで記載されている方法は、例えば、少なくとも一つのここで記載されている核酸又は抗体試薬を含むプリパッケージ診断キットを利用しておこなうことができ、それは、例えば、症状を示している患者、又は家族のg12L遺伝子が関与している疾病や病気の歴史を診断するための臨床的な条件において簡便に使用され得る。

さらには、g12Lが発現している任意の細胞型又は組織は、ここで記載されている予後アッセイで利用され得る。

【0213】

薬理ゲノム学

ここで記載されているスクリーニングアッセイによって同定されたような、g12L活性（例えば、g12L遺伝子発現）に対して刺激性又は阻害性効果を有する薬剤、又はモジュレーターは、個体へ投与し、疾患（この疾患には、代謝疾患及び疾病、例えば肥満及び肥満関連疾患、糖尿病、及び悪液質；細胞増殖疾患及び疾病、例えば過形成、癌、及び再狭窄；神経変性疾患及び疾病、例えばアルツハイマー病及びパーキンソン病；免疫疾患及び疾病、例えばAIDS、炎症、及び自己免疫疾患；そして造血性疾患及び疾病、例えばSCID、周期性好中球減少症、及び血小板血症が含まれる。）を治療（予防的又は治療的）することができる。このような治療と組み合わせて、個体のゲノム薬理学（すなわち、個体の遺伝型とその個体の外来性化合物又は薬への応答の間の関係に関する研究）が考慮されてもよい。治療薬の代謝の違いは、投与量と薬理学的活性剤の血中濃度との間の変化させることによって、重い毒性又は治療上の失敗につながる。従って、個体のゲノム薬理学は、個体の遺伝子型の考慮に基づいた予防的又は治療法のための有効な薬剤（例えば、薬）の選択を可能にする。このようなゲノム薬理学は、更に、適切な投薬量及び治療法を決定するために使用できる。従って、個体におけるg12Lタンパク質の活性、g12L核酸の発現、又はg12L遺伝子の変異量は、個体の治療的又は予防的両方にとって適切な薬剤を選択する

ことで決定することができる。

【0214】

ゲノム薬理学は、改変された薬物移行性、及び病気に冒された人の異常な反応に起因する、薬剤への応答における臨床学的に重要な遺伝的变化を扱う。例えば、Eichelbaum, 1996. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 23: 983-985 ; Linder, 1997. Clin. Chem., 43: 254-266を参照せよ。一般的には、2つの型の薬理遺伝的条件を区別することができる。遺伝的条件は、薬が体に作用する方法（変化した薬の作用）を変化させる単一要因として伝達した、又は薬が体に作用する方法を変化させる幾つかの単一要因として伝達した（変化した薬の代謝）。これら薬理遺伝的条件は、希な欠損又は多型のいずれかとして起こる。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）欠損は、よくある遺伝的酵素異常症であり、主要な合併症は、酸化剤（抗-マラリア剤、サルファ剤、鎮痛剤、ニトロフラン）の吸収、及び空豆の消化の後の溶血反応である。

【0215】

例示的な実施態様としては、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度と期間の双方の主要な決定要因である。薬物代謝酵素の遺伝的多型の発見（例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2（NAT2）及びチトクロームP450酵素CYP2D6及びCYP2C19）は、なぜある患者が、標準で安全な投与量を摂取した後に、期待される薬物効果を得られないのか、又は過大な薬物応答及び深刻な毒性を示すかに関する説明を提供する。これら多型は、個体群の中の二つの表現型である、迅速代謝型（EM）及び不全代謝型（PM）で発現される。PMの有病率は、異なる個体群では異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は、高度に多型であり、幾つかの変異がPMで確認され、それらすべては機能的CYP2D6の欠如につながる。CYP2D6及びCYP2C19の代謝能が低い型は、標準的な投与量を摂取した場合、極めて頻繁に過大な薬物応答と副作用を経験する。代謝産物が活性な治療成分ならば、PMは、CYP2D6形成代謝産物モルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果ために示されたように、治療上の応答を示さない。他の極端なものとしては、標準的な投与量に対して応答しない代謝能が超高速な型がある。最近、超高速代謝型の分子的機序が、CYP

2 D 6 遺伝子増幅のおかげで同定されている。

【0216】

従って、個体の g 1 2 L タンパク質の活性、g 1 2 L 核酸の発現、又は g 1 2 L 遺伝子の変異量は、個体の治療的又は予防的治療にとって適切な薬剤を選択することによって決定することができる。加えて、薬理遺伝学研究は、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個体の薬物応答性表現型の同定へ応用するために使用することができる。この知見が投薬又は薬物選択に応用されると、ここで記載されている例示的スクリーニングアッセイの一つによって同定されたモジュレーターのように、逆反応又は治療上の失敗を避けることができ、それ故に、被検体を g 1 2 L モジュレーターで処理すると、治療的又は予防的効果を高めることができる。

【0217】

臨床試験中の効果のモニタリング

g 1 2 L の発現又は活性（例えば、異常な細胞増殖及び / 又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、基礎的な薬物スクリーニングだけでなく、臨床試験にも応用できる。例えば、g 1 2 L 遺伝子発現、タンパク質レベル、又は g 1 2 L 活性の上方制御を高める、ここで記載の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の有効性は、低下した g 1 2 L 遺伝子発現、タンパク質レベル、又は下方制御 g 1 2 L 活性を示す被検体の臨床試験においてモニターすることができる。あるいは、g 1 2 L 遺伝子発現、タンパク質レベル、又は g 1 2 L 活性の下方制御を減じる、スクリーニングアッセイで決定された薬剤の有効性は、高まった g 1 2 L 遺伝子発現、タンパク質レベル、又は g 1 2 L の上方制御を示す被検体の臨床試験においてモニターすることができる。そのような臨床試験では、g 1 2 L の発現又は活性、及び好ましくは、例えば、細胞性増殖又は免疫疾患に関連している他の遺伝子が、特定の細胞の免疫応答性の「読み取り」又はマーカーとして使用することができる。

【0218】

実施例として、限定されるものではないが、g 1 2 L 活性（例えば、ここで記

載されているような、スクリーニングアッセイで同定された)を調節する薬剤(例えば、化合物、薬物又は小分子)による処置によって細胞で調節されるg12Lを含む遺伝子を同定することができる。従って、細胞性増殖疾患に対する薬剤の効果の研究するためには、例えば、臨床試験において、細胞を単離し、そしてRNAを調製し、g12Lの発現のレベル及び疾患に關与している他の遺伝子のために分析することができる。遺伝子発現(すなわち、遺伝子発現パターン)のレベルは、ここで記載されているように、ノーザンブロット分析又はRT-PCRによって、又は代わって生産されたタンパク質の量を測定することによって、ここで記載の方法の一つによって、又はg12L又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化することができる。この方法では、遺伝子発現パターンは、薬剤に対する細胞の生理学的応答を示すマーカーとしての機能を果たすことができる。従って、この応答状況は、薬剤による個体の治療の前、そしてその最中の種々の地点で測定し得る。

【0219】

一実施態様では、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、小分子、又はここに記載のスクリーニングアッセイによって同定された他の薬物候補)による被検体の治療の有効性をモニタリングするための方法を提供し、それには(i)薬剤の投与の前に、被検体から前投与試料を得ること；(ii)前投与試料のg12Lタンパク質、mRNA、又はゲノムDNAの発現のレベルを検出すること；(iii)被検体から一つ又は複数の投与後試料を得ること；(iv)投与後試料のg12Lタンパク質、mRNA、又はゲノムDNAの発現のレベルを検出すること；(v)前投与試料のg12Lタンパク質、mRNA、又はゲノムDNAの発現又は活性のレベルを、投与後試料のg12Lタンパク質、mRNA、又はゲノムDNAと比較すること；そして(vi)それに応じて、被検体への薬剤の投与を変えること、が含まれる。例えば、検出されたのよりもより高いレベルへg12Lの発現又は活性を高めるために、すなわち、薬剤の有効性を高めるためには、増加した薬剤の投与が所望され得る。あるいは、検出されたのよりもより低いレベルのg12Lの発現又は活性を低下させるために、すなわち薬剤の有効性を低下させるためには、

低下した薬剤の投与が所望され得る。

【0220】

治療の方法

本発明は、疾患の危機（又は罹りやすい）にある、又は異常な g 1 2 L 発現又は活性と関連している疾患を有する被検体を治療する予防的及び治療的方法の双方を提供する。この疾患には、代謝疾患及び疾病、例えば肥満及び肥満関連疾患、糖尿病、及び悪液質；細胞増殖疾患及び疾病、例えば過形成、癌、及び再狭窄；神経変性疾患及び疾病、例えばアルツハイマー病及びパーキンソン病；免疫疾患及び疾病、例えば A I D S、炎症、及び自己免疫疾患；そして造血性疾患及び疾病、例えば S C I D、周期性好中球減少症、及び血小板血症が含まれる。これら治療の方法は、下記においてより十分に論じられている。

【0221】

疾病及び疾患

増大した（疾病又は疾患を罹っていない被検体に対して）レベル又は生物学的活性によって特徴付けられる疾病及び疾患は、活性と拮抗する（すなわち、減少させる又は阻害する）薬物療法で治療し得る。活性と拮抗する薬物療法は、治療的又は予防的な方法で投与し得る。限定されるものではないが、利用され得る薬物療法には：（i）前出のペプチド、又はその類似体、誘導體、断片又はホモログ；（ii）前出のペプチドに対する抗体；（iii）前出のペプチドをコードする核酸；（iv）相同組み換えによって前出のペプチドの内在性の機能を「ノックアウト」するために利用される「機能障害性」（すなわち、前出のペプチドに対するコード化配列のコード化配列内での非相同的な挿入）のアンチセンス核酸及び核酸の投与（例えば、Capecchi, 1989. Science 244: 1288-1292）；又は（v）前出のペプチドとその結合パートナーの間の相互作用を変化させるモジュレーター（すなわち、阻害剤、アゴニスト及びアンタゴニストで、本発明の付加的ペプチド模倣物、又は本発明のペプチドに対して特異的な抗体）が含まれる。

【0222】

減少した（疾病又は疾患を罹っていない被検体に対して）レベル又は生物学的活性によって特徴付けられる疾病及び疾患は、活性を高める（すなわち、それに

対してアゴニスト)薬物療法で治療し得る。活性を上方制御する薬物療法は、治療的又は予防的な方法で投与し得る。限定されるものではないが、利用され得る薬物療法には、前出のペプチド、又はその類似体、誘導體、断片又はホモログ；又は生物学的利用能を高めるアゴニストが含まれる。

【0223】

増加した又は減少したレベルは、ペプチド及び/又はRNAを定量化することによって、患者の組織試料(例えば、生検組織から)を得て、それをインビトロでRNA又はペプチドレベル、発現したペプチド(又は前出のペプチドのmRNA)の構造及び/又は活性をアッセイすることによって容易に検出することができる。当該分野で良く知られた方法には、限定されるものではないが、免疫アッセイ(例えば、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、免疫細胞化学などに続くウェスタンブロット分析、免疫沈降によって)及び/又はmRNAs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、インサイトハイブリダイゼーション等)が含まれる。

【0224】

予防的な方法

一側面では、本発明は、g12L発現又は少なくとも一つのg12L活性を調節する薬剤を被検体へ投与することによって、被検体における、異常なg12L発現又は活性と関連する疾病又は症状を防ぐ方法を提供する。異常なg12L発現又は活性によって生じ又は貢献する疾病の危険のある被検体は、例えば、ここに記載の任意の又は診断又は予防的アッセイの組み合わせによって同定することができる。予防剤の投与は、g12L異常の特徴である症状の現れの前におこなうことができ、疾病又は疾患は予防される、又はそれに代わってその進行が遅らせられる。g12L異常の型によると、例えば、g12Lアゴニスト又はg12Lアンタゴニスト剤を、被検体を治療するために使用することができる。適した薬剤は、ここに記載したスクリーニングアッセイに基づいて決定することができる。本発明の予防的方法は、以下の小節において更に論じられている。

【0225】

治療方法

本発明のその他の側面は、治療目的に関する g 1 2 L 発現又は活性を調節する方法に関する。本発明の調節法には、細胞に関連する g 1 2 L タンパク質活性の一つ又は複数の活性を調節する薬剤と細胞を接触させることが含まれる。g 1 2 L タンパク質活性を調節する薬剤は、ここで記載の薬剤であって、例えば核酸又はタンパク質、g 1 2 L タンパク質の天然発生の同族リガンド、ペプチド、g 1 2 L ペプチド模倣物、又は他の小分子である。一実施態様では、この薬剤は、一つ又は複数の g 1 2 L タンパク質活性を刺激する。そのような刺激性薬剤の例には、活性 g 1 2 L タンパク質及び細胞へ導入された g 1 2 L をコードする核酸分子が含まれる。その他の実施態様では、この薬剤は g 1 2 L タンパク質活性の一つ又は複数を阻害する。そのような阻害剤には、アンチセンス g 1 2 L 核酸分子及び抗-g 1 2 L 抗体が含まれる。これら調節法は、インビトロ（例えば、細胞を薬剤とともに培養する）、又はそれに代わってインビボ（例えば、被検体へ薬剤を投与すること）でおこなうことができる。従って、本発明は、g 1 2 L タンパク質又は核酸分子の異常な発現又は活性によって特徴付けられる疾病又は疾患に罹っている個体の治療方法を提供する。一実施態様では、この方法には、薬剤（例えば、ここで記載されているスクリーニングアッセイによって同定される薬剤）、又は g 1 2 L 発現又は活性を調節する（例えば、上方制御又は下方制御する）薬剤の組み合わせを投与することが含まれる。その他の実施態様では、この方法には、減少した又は異常な g 1 2 L 発現又は活性を補う療法としての g 1 2 L タンパク質又は核酸分子の投与が含まれる。

【0226】

g 1 2 L 活性の刺激は、g 1 2 L が異常に下方制御されている、及び/又は増大した g 1 2 L 活性が有益な効果を有する傾向にある状況において所望される。そのような状況の一例は、被検体が異常な細胞増殖及び/又は分化（例えば、癌又は免疫関連疾患）によって特徴付けられる疾患を有する。そのような状況のその他の例は、被検体が妊娠病（例えば、子癩前症）を有する。

【0227】

療法の生物学的効果の決定

本発明の種々の実施態様では、適切なインビトロ又はインビボアッセイをおこない、特定の療法の効果と、その投与が病気に冒された組織の治療にとって望ましいものなのかどうかを決定する。

種々の特定の実施態様では、所定の療法が、細胞型に対して所望される効果を発揮するかどうかを決定するために、インビトロアッセイを、患者の疾患に関わっている代表的な細胞の型でおこなってもよい。療法で使用される化合物は、ヒトの被検者で試験する前に、限定されるものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギ等を含む適切な動物モデル系で試験してもよい。同じように、インビボ試験では、ヒト被検者へ投与する前に、当該分野で知られた任意の動物モデル系を使用してもよい。

【0228】

本発明の組成物の予防的及び治療的用途

本発明の g 1 2 L 核酸及びタンパク質は、限定されるものではないが：代謝疾患及び疾病、例えば肥満及び肥満関連疾患、糖尿病、及び悪液質；細胞増殖疾患及び疾病、例えば過形成、癌、及び再狭窄；神経変性疾患及び疾病、例えばアルツハイマー病及びパーキンソン病；免疫疾患及び疾病、例えばA I D S、炎症、及び自己免疫疾患；そして造血性疾患及び疾病、例えばS C I D、周期性好中球減少症、及び血小板血症を含む種々の疾患に関する潜在的な予防的及び治療的用途において有用である。

【0229】

例えば、本発明の g 1 2 L タンパク質をコードする c D N A は、遺伝子治療において有用であり、そのタンパク質は、それを必要としている被検体へ投与する場合に有用であり得る。限定されない例によると、本発明の組成物は、代謝疾患及び疾病、例えば肥満及び肥満関連疾患、糖尿病、及び悪液質；細胞増殖疾患及び疾病、例えば過形成、癌、及び再狭窄；神経変性疾患及び疾病、例えばアルツハイマー病及びパーキンソン病；免疫疾患及び疾病、例えばA I D S、炎症、及び自己免疫疾患；そして造血性疾患及び疾病、例えばS C I D、周期性好中球減少症、及び血小板血症に苦しんでいる患者の治療に関して有効性を有する。

【0230】

g 1 2 L タンパク質をコードする新規な核酸、及び本発明の g 1 2 L タンパク質、又はその断片の双方は、核酸又はタンパク質の存在又は量が評価される、診断的用途においても有用であり得る。さらなる用途は、抗-細菌分子（すなわち、抗-細菌特性を有することが見出されている幾つかのペプチド）としてである。これらの物質は、治療的又は診断的方法の用途のための本発明の新規物質と、免疫特異的に結合する抗体の生成にとってさらに有用である。

【0231】

実施例

以下の実施例は、限定されない例によって、本発明の種々の側面を例示する。

B A T 分化の間の差次的に制御されている Spot 14 に関する場合のように、B A T の代謝活性及び増殖に影響を与える条件下で、マウス g 1 2 L も B A T において調節される。B A T における差次的に発現された遺伝子の同定に関する実験的条件下では、c D N A（マウス g 1 2 L をコードする m R N A を表す）の断片は、低温度（4℃）に反応して調節された。上記にて示された実験的条件下で飼育された動物の B A T の c D N A 断片に関して観察された調節のパターンは、寒さ順化対コントロールでは上方制御、暖かさ順化対コントロールでは変化はなく、そして寒さ順化対暖かさ順化では上方制御であった。マウス g 1 2 L の TaqMan 誘導組織分布は、暖かさに順化させた動物の同じ組織に対して、マウスタンパク質発現が、W A T 及び B A T において、寒さに反応して顕著に上昇することを示した。

【0232】

調節された断片の同定は、予想分子量が 20355.6 D、予想 p I = 5.33、そして表 3 に示す予想物理的特性の 182 アミノ酸タンパク質（表 2 B；配列番号：4）をコードする完全長マウス c D N A（表 2 A；配列番号：3）の同定につながる。

ヒタンパク質ホモログ（表 1 B；配列番号：2）も、183 アミノ酸、20233.5 D、予想 p I = 5.55、そして他の予想物理的特性（表 4）として同定された。最適 c D N A は、公的及び私的データベースからの 85 E S T s の構築によって決定された（表 1 A；配列番号：1）。マウスの p I、ゼブラフィ

ツシュ g 1 2 タンパク質のヒトホモログ、及びゼブラフィッシュ g 1 2 (予想 p I = 4 . 9 3) タンパク質は、 g 1 2 L ファミリーメンバーと比較すると、 Spot 14 (Grillasca, FEBS Lett. 1997 Jan 13; 401(1)38-42) のより多数の酸高含有ドメインのために、 Spot14ファミリータンパク質 (ラット Spot14 pI=4.61, マウス Spot14 pI=4.76, ヒト Spot14 pI=4.64) より、よりアルカリ性が予測される p I を有する。これと他のデータは、ここで記載の新規のマウス及びヒト g 1 2 L 分子がゼブラフィッシュ原腸形成特異的タンパク質 g 1 2 の本物のホモログであるという論点を支持する。

【 0 2 3 3 】

配列分析は、 g 1 2 ファミリーメンバーが、 Spot14ファミリーメンバーのメンバーに関して観察される「スポットボックス」及び「酸ボックス」を有することを示す (図 . 1) 。 g 1 2 ファミリーメンバーは、スポットボックスの直後に保存された挿入部 (ゼブラフィッシュの挿入部は、マウス及びヒト g 1 2 L の挿入部よりも極めて小さい) を、そしてマウス配列のアミノ酸 5 4 の直後に二番目に高く保存されている挿入部を有する。 g 1 2 ファミリーメンバーは、 Spot14ファミリーメンバーと比較して、いくらかより低い酸性の酸ボックス (マウス Spot14 ポリペプチドのアミノ酸 8 7 - 1 1 4) を有する (図 . 1) 。この低下した酸ボックスは、 Spot14ファミリーメンバーと比較して、 g 1 2 ファミリーメンバーの相対的により高い p I の原因となる。

マウス及びヒト g 1 2 L は、タンパク質レベルとヌクレオチド配列のレベルの双方において、 Spot14 の g 1 2 よりもゼブラフィッシュの g 1 2 により類似している。

マウス g 1 2 L は、放射線ハイブリッドマッピングによって染色体 X の位置 DX Mit89 に位置付けられている。ヒト g 1 2 L 遺伝子は、染色体 X 上に見出され、 GeneBank AK001428 (DDBJ/EMBL/GenBank へ提出されている (16-FEB-2000)) 。

【 0 2 3 4 】

表3 マウス g 1 2L タンパク質の予想される物理的特性

すべての Cys 残基がハーフシスチンとして現れると仮定した値：

	276nm	278nm	279nm	280nm	282nm
吸光係数	23595	23927	23825	23590	22900
吸光度	1.159	1.175	1.170	1.159	1.125

NO の Cys 残基がハーフシスチンとして現れると仮定した値：

	276nm	278nm	279nm	280nm	282nm
吸光係数	23450	23800	23705	23470	22800
吸光度	1.152	1.169	1.165	1.153	1.120

注記：これらの式が有効な条件は：pH6.5, 6.0M 塩酸グアニジウム, 0.02M リン酸バッファー。

【0235】

表4 ヒト g 1 2L タンパク質の予想される物理的特性

すべての Cys 残基がハーフシスチンとして現れると仮定した値：

	276nm	278nm	279nm	280nm	282nm
吸光係数	23595	23927	23825	23590	22900
吸光度	1.166	1.183	1.178	1.166	1.132

NO の Cys 残基がハーフシスチンとして現れると仮定した値：

	276nm	278nm	279nm	280nm	282nm
吸光係数	23450	23800	23705	23470	22800
吸光度	1.159	1.176	1.172	1.160	1.127

注記：これらの式が有効な条件は：pH6.5, 6.0M 塩酸グアニジウム, 0.02M リン酸バッファー。

【0236】

要約すると、発明者は、代謝状態への応答において調節され、熱状態に应答性の遺伝子を同定する手段としての熱中立帯で飼育した動物の熱状況に应答する新規マウス及びヒト遺伝子を同定している。そのような分子は、BATの内分泌性の性質とその体温調節及び代謝における役割、及び体温調節及び代謝への应答性に関連することが考慮されている。

【0237】

相当語句

特定の実施態様の詳細がここで開示されているが、これは、例示のみの目的のための例によってなされ、後の添付された請求項に関して限定することを意図していない。特に、発明者によって、請求項によって定義される本発明の精神及び目的から外れることなく、種々の置換、改変、及び修飾が発明に施される得ることが考慮されている。核酸出発物質、対象のクローン、又はライブラリの型の選択は、ここに記載の実施態様の知識を伴う当該分野で普通の技術を有する者にとって日常的な問題である。他の側面、利点、及び修正点が、以下の請求項の範囲内にあると考えられた。

【図面の簡単な説明】

【図1】 複数の配列分析によって、Spot 14's及びg 1 2 'sは異なるが、関連したタンパク質のファミリーであることを示す。囲いの領域は、「スポットボックス」の位置であり、下線領域は、2つの遺伝子ファミリーの「酸性ボックス」を示す。mSpot14 = マウスSpot 14 (GenBank X95279 ; 配列番号 : 5)、rnSpot 14 = rat Spot14 (GenBank NM_003251 ; 配列番号 : 6)、hsSpot 14 = ヒト Spot 14 (GenBank Y08409 ; 配列番号 : 7)、hsdrg 12like = ヒト g 1 2 L (配列番号 : 2)、mmdrg12like = マウス g 1 2 L (配列番号 : 4)、及びdrg12 = ゼブラフィッシュ g 1 2 (GenBank U27121 ; 配列番号 : 8)。

【図2】 マウス g 1 2 L モジュレーター の TaqMan タイム コース。

【図3】 TaqMan分析による、4、22及び33で48時間にわたって順応させたマウス g 1 2 L の組織分布。

【図4】 Spot14's、ゼブラフィッシュ g 1 2、並びにヒト及びマウス g 1 2 L 'sの相対タンパク質ホモロジー。

【図5】 Spot14's、ゼブラフィッシュ g 1 2、並びにヒト及びマウス g 1 2 L 'sの相対cDNAホモロジー。

【図6】 マウス g 1 2 L の放射線ハイブリッドマップ。マウス 1 2 L は、染色体Xのセントロメア近傍に位置している。放射線ハイブリッドマップベクターを、14のロッドスコアのカットオフで、米国マサチューセッツ工科大学ホワイトヘッド研究所Center for Genome Research's radiation hybrid map of the

mouse genomeへ提示した。データのフォーマットは、ホワイトヘッドの慣例によって、93のハイブリッドを使用した (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mouse_rh/rhmap-auto/rhmapper.cgi.)。i0q0-90.5は、マウスg12Lに関する識別バンドである。Cybbはチトクロームb245 (GenBank U43384) であり、Xkh (GenBank AF155511) はXK遺伝子のマウスホモログである。スケールは71.5cR/cM。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Lewin, David A.
Adams, Sean H.

<120> NOVEL GENES ASSOCIATED WITH THE THERMAL RESPONSE

<130> 10716-31

<140> Not assigned

<141> 2001-03-02

<150> 60/186,513

<151> 2000-03-02

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1128

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gcgcgccagg ggtggccctg agcgccggcg acacctttcc tggactataa attgagcacc 60
tgggatgggt agggggccaa cgcagtcacc gccgtccgca gtcacagtcc agccactgac 120
cgcagcagcg ccottgcgta gcagccgctt gcagcgagaa cactgaattg ccaacgagca 180
ggagagtctc aaggcgcaag aggaggccag ggctcgaccc acagagcacc ctacgccaac 240
gcgagtttcc gggcgccaaa gccaggagaa gccgcccacc ccgcagggcc ggtctgccag 300
cgagacgaga gttggcgagg gcggaggagt gccgggaatc ccgccacacc ggctatagcc 360
aggccccag cgcgggcctt ggagagcgcg tgaaggcggg catccccttg acccggccga 420
ccatccccgt gcccctgcgt ccctgcgctc caacgtccgc gcggccacca tgatgcaaat 480
ctgcgacacc tacaaccaga agcactcgct ctttaacgcc atgaatcgct tcattggcgc 540
cgtgaacaac atggaccaga cggatgatgt gccagcttg ctgogcgacg tgcccctggc 600
tgacccggg ttagacaacg aggtcagcgt ggaggtaggc ggcagtggca gctgcctgga 660
ggagcgcacg accccggccc caagcccggg cagcgccaat ggaagctttt tcgcccctc 720
ccgggacatg tacagccact acgtgctgct caagtccatc cgcaacgata ttgagtggg 780
agtcctgcac cagccgcctc caccggctgg gagcgaggag ggcagtgcct ggaagtccaa 840
ggacatcctg gtggacctg gccacttga ggggtcggac gccggcgaag aagacctgga 900
acagcagttc cactaccacc tgcgcggtt gcacactgtg ctctcgaaac tcacgcgcaa 960
agccaacatc ctactaaca gatacaagca ggagatcggc ttcggaatt ggggccaactg 1020
aggcgtggcg ccggtggctg cccagcacct tcttcgaccc atctcacct ctctcattcc 1080
tcaaagcttt ttttttttcc ctggctggg ggcggaaagg gcaaacctg 1128

```

<210> 2

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Met Gln Ile Cys Asp Thr Tyr Asn Gln Lys His Ser Leu Phe Asn
  1                               10                    15

Ala Met Asn Arg Phe Ile Gly Ala Val Asn Asn Met Asp Gln Thr Val
      20                               25                    30

Met Val Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Pro Leu Ala Asp Pro Gly Leu
      35                               40                    45

Asp Asn Glu Val Ser Val Glu Val Gly Gly Ser Gly Ser Cys Leu Glu
      50                               55                    60

Glu Arg Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Gly Ser Ala Asn Gly Ser Phe
      65                               70                    75                    80

Phe Ala Pro Ser Arg Asp Met Tyr Ser His Tyr Val Leu Leu Lys Ser
      85                               90                    95

Ile Arg Asn Asp Ile Glu Trp Gly Val Leu His Gln Pro Pro Pro Pro
      100                              105                    110

Ala Gly Ser Glu Glu Gly Ser Ala Trp Lys Ser Lys Asp Ile Leu Val
      115                              120                    125

Asp Leu Gly His Leu Glu Gly Ala Asp Ala Gly Glu Glu Asp Leu Glu
      130                              135                    140

Gln Gln Phe His Tyr His Leu Arg Gly Leu His Thr Val Leu Ser Lys
      145                              150                    155                    160

Leu Thr Arg Lys Ala Asn Ile Leu Thr Asn Arg Tyr Lys Gln Glu Ile
      165                              170                    175

Gly Phe Gly Asn Trp Gly His
      180

```

<210> 3

<211> 1927

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

```

cggacgcgtg ggggaggtag gaggaggaga catcaggggt ggtcctgggc gcctgggaca 60

```

```

cctttcccg actataaatt gagcacctgg aatgggcagg gggccggagc aaccacagtc 120
gcccttactc acagtccgat cagtgaccgc agcagcgccc ttgggcagcc accgtccgca 180
acgcaagcac tgagaaccag gggatctcgc agtgcaagag aaaaaggcta gaccagcca 240
cccaccgtca atcctgagcc aaagataaga gcagccgggc ctcacgaagg gctgagctga 300
gaaagaagca agttagagag ggcggagaag gatctgggaa tcccgtcaca ccggcttcaa 360
gcaggtccc ggcacagcc tctgagagcg cttgaaggcg gcacgcccag cggcttatct 420
ccgtgtacca gcgccctgt gttccgcgc ccgctcggcc accatgatgc aaatctgcga 480
cacatataac cagaagcact cgtctttaa cgccatgaat cgcttcattg gcccggtgaa 540
caacatggac cagacggtga tggtgcccag tctgctgccc gacgtacccc tgtccgagcc 600
ggagatagac gaggtcagcg tggaggtagg cggcagtggc ggctgcctgg aggagcgcac 660
gaccccgccc ccaagcccgg gcagcgccaa tgaaagcttt ttcggccct cccgggacat 720
gtacagccac tacgtgtgc tcaagtccat ccgcaatgat atcgagtggg gagtccgca 780
ccagccttcg tctccgcgg ccgggagcga ggagagcacc tggagccca aggacatcct 840
ggtggccctg agtcacttg agagcgcgga tgcggcgag gaagatctgg agcagcagtt 900
ccactaccac ctgcgcggc tgcacaccgt gctctccaaa ctcaccgaa aagccaacat 960
cctcaccaat agatacaagc aggagatcgg cttcagtaat tggggccact gaggcgggg 1020
ctgtccccgc tgcccagcac cctctctcgg gtccgctcta ccaccctct ctttcccca 1080
agctatcttc ttccgtgtg tggggcgca agggcacact gtaaagtgg gctgtgtact 1140
tgggtggggt agtgtggaga agagggcctc atcgcgagag cagaggaaag tagtcgagc 1200
agaggggggt tcaaagacc ccggaggggg cctactctgt gttggtggga atggaactgg 1260
gccgatgtcc ttcattcagc ctgtgccttt cttggggttt cttttctgtt tttcttccg 1320
gaagagaagg gcctgagaaa gggccatgcc agggcacagt gctgggttgc cacacatggg 1380
agggcagctt ctagccgggt gctggggga gggcgggctc agcctcctgc tgcctgcct 1440
tgagctgcca gaggaggcct tggcgttgc aggattgct cagttttcct gtttgcacta 1500
tttctttttg taacagtgc cctgtcttaa gtcttcaga tctctttgct ttgaaacttc 1560
gtcgattcca ttgtgataag cgcacaaaaca gcaactgttg taaccggtac tactttatta 1620
atgattttct gttacactgt acagtagtcc tgtggcacc tatcccttc accgccccc 1680
tccccgccc gtgtgtgtaa actggcgatg tgccagctag gatgaagctt gccactcggc 1740
tagcgaat aattaacatt attatgagaa agtggattta tctaaagtgg aaccagctga 1800
cattatatct gtatcgtatg gagaatgatg aagggtcca ctgttgttat atgtcttgtt 1860
tatttaaac ttttttaac ccagatgtag actatattct aaaaaataaa aacgcagatg 1920
tgtaaac 1927

```

<210> 4

<211> 182

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

```

Met Met Gln Ile Cys Asp Thr Tyr Asn Gln Lys His Ser Leu Phe Asn
  1                   5                   10                   15

```

```

Ala Met Asn Arg Phe Ile Gly Ala Val Asn Asn Met Asp Gln Thr Val
                   20                   25                   30

```

```

Met Val Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Pro Leu Ser Glu Pro Glu Ile
                   35                   40                   45

```

Asp Glu Val Ser Val Glu Val Gly Gly Ser Gly Gly Cys Leu Glu Glu
 50 55 60
 Arg Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Gly Ser Ala Asn Glu Ser Phe Phe
 65 70 75 80
 Ala Pro Ser Arg Asp Met Tyr Ser His Tyr Val Leu Leu Lys Ser Ile
 85 90 95
 Arg Asn Asp Ile Glu Trp Gly Val Leu His Gln Pro Ser Ser Pro Pro
 100 105 110
 Ala Gly Ser Glu Glu Ser Thr Trp Lys Pro Lys Asp Ile Leu Val Gly
 115 120 125
 Leu Ser His Leu Glu Ser Ala Asp Ala Gly Glu Glu Asp Leu Glu Gln
 130 135 140
 Gln Phe His Tyr His Leu Arg Gly Leu His Thr Val Leu Ser Lys Leu
 145 150 155 160
 Thr Arg Lys Ala Asn Ile Leu Thr Asn Arg Tyr Lys Gln Glu Ile Gly
 165 170 175
 Phe Ser Asn Trp Gly His
 180

<210> 5
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5
 Met Gln Val Leu Thr Lys Arg Tyr Pro Lys Asn Cys Leu Leu Thr Val
 1 5 10 15
 Met Asp Arg Tyr Ser Ala Val Val Arg Asn Met Glu Gln Val Val Met
 20 25 30
 Ile Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Gln Leu Ser Gly Pro Gly Gly Ser
 35 40 45
 Val Gln Asp Gly Ala Pro Asp Leu Tyr Thr Tyr Phe Thr Met Leu Lys
 50 55 60
 Ser Ile Cys Val Glu Val Asp His Gly Leu Leu Pro Arg Glu Glu Trp

Glu Lys Ala Gln Glu Val Thr Arg Lys Tyr Gln Glu Met Thr Gly Gln
 130 135 140

Val Trp
 145

<210> 7
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Met Gln Val Leu Thr Lys Arg Tyr Pro Lys Asn Cys Leu Leu Thr Val
 1 5 10 15

Met Asp Arg Tyr Ala Ala Glu Val His Asn Met Glu Gln Val Val Met
 20 25 30

Ile Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Gln Leu Ser Gly Pro Gly Gly Gln
 35 40 45

Ala Gln Ala Glu Ala Pro Asp Leu Tyr Thr Tyr Phe Thr Met Leu Lys
 50 55 60

Ala Ile Cys Val Asp Val Asp His Gly Leu Leu Pro Arg Glu Glu Trp
 65 70 75 80

Gln Ala Lys Val Ala Gly Ser Glu Glu Asn Gly Thr Ala Glu Thr Glu
 85 90 95

Glu Val Glu Asp Glu Ser Ala Ser Gly Glu Leu Asp Leu Glu Ala Gln
 100 105 110

Phe His Leu His Phe Ser Ser Leu His His Ile Leu Met His Leu Thr
 115 120 125

Glu Lys Ala Gln Glu Val Thr Arg Lys Tyr Gln Glu Met Thr Gly Gln
 130 135 140

Val Trp
 145

<210> 8
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Danio rerio

【 図 1 】

```

mmspot14 ~MQVLTKRYPKNCILITVMMDRYSAVVVRNMEQVVMIPSLLRDVQLS      GPG
mspot14  ~MQVLTKRYPKNCILKVMMDRYSAVVVRNMEQVVMIPSLLRDVVELS      GSG
hspot14  ~MQVLTKRYPKNCILITVMMDRYSAAEVHNMEQVVMIPSLLRDVQLS      GPG
hsdrg12like MMQICDTYNQKHSLFNAMNRFICAVNNMDQITVMVPSLLRDVPLADPGLDNDYGVVEVCGSG
mmdrg12like MMQICDTYNQKHSLFNAMNRFICAVNNMDQITVMVPSLLRDVPLSEPEID.EVSVEVCGSG
drg12      ~MQMSEPLSQKNALYIAMNRFICAVNNMDQITVMVPSLLRDVPLDQE.....

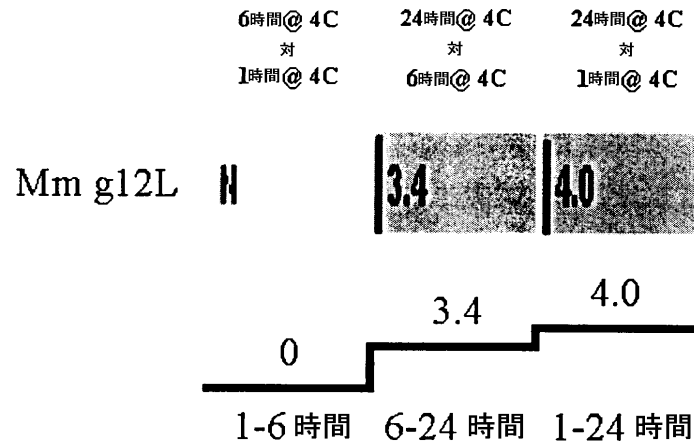
GSVQDGAP.....DLYTYFTMLKSI CVEVDHGLLPREEWQAKVAGNET
GSVQDGAP.....DLYTYFTMLKSI CVEVDHGLLPREEWQAKVAGNEG
GQAQAEAP.....DLYTYFTMLKAI CVDVDHGLLPREEWQAKVAGSE.
GCLEERTPPVDSGSANGSFFAPSRDMYSHYVLLKSI RND IEWGV LHQPPPPAGSEEGSA
GCLEERTTPAPSPGSANESFFAPSRDMYSHYVLLKSI RND IEWGV LHQPS SPPAGSEEST
... KEQQKLTNDP GSYLREAEA... DMYS YYSQLKSI RNN IEWGVIR..... SEDQ

mmspot14 SEAE NDA AE TEEAE EDR I SEELDLEAQFHLHFC SLHHI LTHLTRKAEVTRKYQEMTGOV
mspot14  SEAE NEAE TEEAE EDR L SEELDLEAQFHLHFS SLHHI LTHLTQKAEVTRKYQEMTGOV
hspot14  ... ENGTAE TEEVE DESASCELDLEAQFHLHFS SLHHI LMHLTEKAEVTRKYQEMTGOV
hsdrg12like WKSKDILVDLGHLEGADAGEE.DLEQQFHYHLRGLHTVLSKLTRKANILTNRYKQEI GFG
mmdrg12like WKP KDILVGLSHLESADAGEE.DLEQQFHYHLRGLHTVLSKLTRKANILTNRYKQEI GFS
drg12      RKKKDTSA S.EPVRTEESDM.DLEQLLQFHLKGLHGVLSQLT SQANNLTNR YKQEI GIS

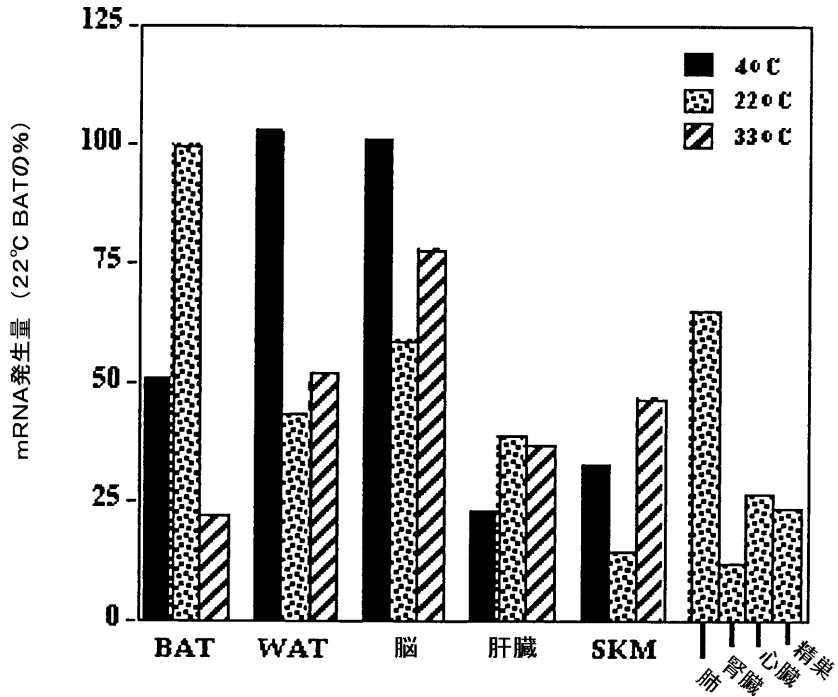
mmspot14 L~~~
mspot14  L~~~
hspot14  W~~~
hsdrg12like NWGH
mmdrg12like NWGH
drg12      GWGQ

```

【図2】



【図3】

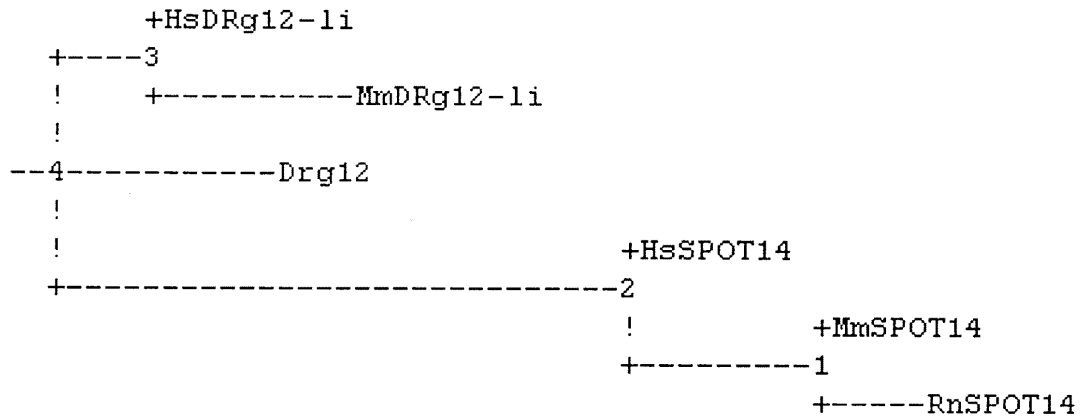


【図5】

近隣結合 / UPGMA法バージョン3.572c

近隣結合法

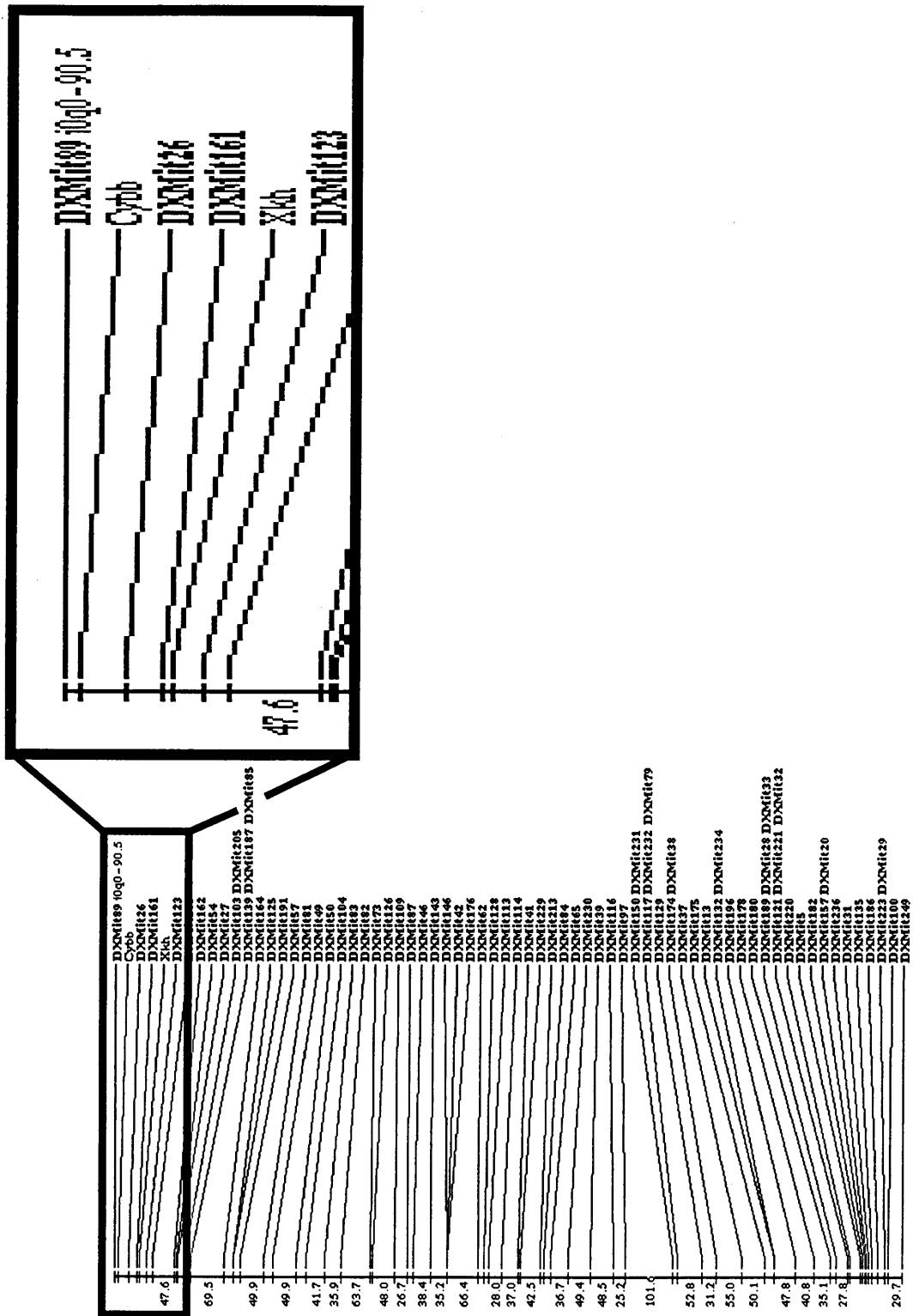
許容ネガティブブランチ長



留意：これは、無根系統！

間	及び	長さ
4	3	0.16933
3	HsDRg12-li	-0.14141
3	MmDRg12-li	0.34321
4	Drg12	0.39852
4	2	0.98623
2	HsSPOT14	-0.19599
2	1	0.33489
1	MmSPOT14	-0.09006
1	RnSPOT14	0.19296

【図 6】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 01/06839
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/18 G01N33/53 C12Q1/68 A61K38/17 C07K14/435		
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		
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, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! ISOGAI, T. ET AL.: "Homo sapiens cDNA FLJ10386 fis, clone NT2RM2002142, weakly similar to Gastrulation specific Protein G12" retrieved from EBI Database accession no. AK001248 XP002192898 the whole document	1-25, 38-43, 50-53
A	DATABASE EMBL 'Online! MARRA M. ET AL.: "The WashU-NCI Mouse EST Project 1999" retrieved from EBI Database accession no. AI466689 XP002192899 the whole document	1-25, 38-43, 50-53
		-/--
<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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 15 March 2002		Date of mailing of the international search report 05/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lanzrein, M

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No.

PCT/US 01/06839

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRILLASCA J-P ET AL: "Cloning and initial characterization of human and mouse Spot 14 genes" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 401, no. 1, 13 January 1997 (1997-01-13), pages 38-42, XP004262062 ISSN: 0014-5793 page 40, right-hand column, paragraph 2; figure 1	1-53
A	CONWAY G: "A NOVEL GENE EXPRESSED DURING ZEBRAFISH GASTRULATION IDENTIFIED BY DIFFERENTIAL RNA DISPLAY" MECHANISMS OF DEVELOPMENT, ELSEVIER SCIENCE IRELAND LTD, IE, vol. 52, no. 2-3, 1995, pages 383-391, XP000939100 ISSN: 0925-4773 page 389, paragraphs 2,3	1-53
P,X	WO 00 73443 A (INCYTE GENOMICS INC ;YUE HENRY (US); BAUGHN MARIAH R (US); KASER M) 7 December 2000 (2000-12-07) p. 13, line 21 - p. 14, line 12 SEQ ID NOS 1,2 page 5, line 29-32	1-53
P,X	EP 1 074 617 A (HELIX RES INST) 7 February 2001 (2001-02-07) SEQ ID NOS 11237, 11238 claim 8	1-53
E	WO 01 53312 A (CHEN RUI HONG ;GOODRICH RYLE (US); HYSEQ INC (US); WANG DUNRUI (US) 26 July 2001 (2001-07-26) SEQ ID NOS 1708, 3494 claim 1; example 6	1-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/06839

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0073443	A	07-12-2000	US 6245526 B1	12-06-2001
			AU 5018900 A	18-12-2000
			EP 1181364 A1	27-02-2002
			WO 0073443 A1	07-12-2000
EP 1074617	A	07-02-2001	AU 6180800 A	19-02-2001
			AU 6180900 A	19-02-2001
			AU 6181000 A	19-02-2001
			AU 6181100 A	19-02-2001
			AU 6181200 A	19-02-2001
			AU 6181300 A	19-02-2001
			AU 6181400 A	19-02-2001
			AU 6181500 A	19-02-2001
			AU 6181600 A	19-02-2001
			AU 6315800 A	19-02-2001
			EP 1074617 A2	07-02-2001
			WO 0109315 A1	08-02-2001
			WO 0109345 A1	08-02-2001
			WO 0109316 A1	08-02-2001
			WO 0109349 A1	08-02-2001
			WO 0109317 A1	08-02-2001
			WO 0109318 A1	08-02-2001
			WO 0109319 A1	08-02-2001
			WO 0109346 A1	08-02-2001
			WO 0109320 A1	08-02-2001
WO 0109321 A1	08-02-2001			
WO 0109322 A1	08-02-2001			
WO 0109323 A1	08-02-2001			
WO 0153312	A	26-07-2001	AU 2292401 A	31-07-2001
			AU 2591801 A	31-07-2001
			AU 2593601 A	31-07-2001
			AU 2595501 A	31-07-2001
			AU 2596501 A	31-07-2001
			AU 2598301 A	31-07-2001
			AU 2728401 A	31-07-2001
			AU 2734401 A	31-07-2001
			AU 2734801 A	31-07-2001
			AU 2738501 A	31-07-2001
			AU 3265701 A	31-07-2001
			WO 0153312 A1	26-07-2001
			WO 0153453 A2	26-07-2001
			WO 0153326 A1	26-07-2001
			WO 0153454 A2	26-07-2001
			WO 0153455 A2	26-07-2001
			WO 0153456 A2	26-07-2001
			WO 0153466 A1	26-07-2001
			WO 0152616 A2	26-07-2001
			WO 0153500 A1	26-07-2001
WO 0153515 A1	26-07-2001			
WO 0153485 A1	26-07-2001			
AU 5362001 A	30-10-2001			
WO 0179446 A2	25-10-2001			

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/16	1 0 5	3/06	4 C 0 8 5
3/04		3/10	4 C 0 8 6
3/06		7/00	4 H 0 4 5
3/10		9/10	
7/00			1 0 3
9/10		9/12	
	1 0 3	11/16	
9/12		19/02	
11/16		25/16	
19/02		25/28	
25/16		29/00	
25/28		31/18	
29/00		35/00	
31/18		37/02	
35/00		43/00	1 0 5
37/02		C 0 7 K 14/46	
43/00	1 0 5	14/47	
C 0 7 K 14/46		16/18	
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		1/48	Z
5/10		1/68	A
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/15	Z
1/48		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15			M
33/50		33/566	
33/53		C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566		5/00	A
// C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, 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 レビン, ディビッド, エイ.
アメリカ合衆国 コネチカット 06511,
ニューヘーブン, ローレンス ストリート
298

(72)発明者 アダムス, ショーン, エイチ.
アメリカ合衆国 ニュージャージー
07869, ランドルフ タウンシップ, アル
デバラン ドライブ 22

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36
FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09
EA04 GA11 HA17
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ08 QQ13
QQ20 QQ42 QQ53 QQ79 QR08
QR32 QR55 QR77 QR80 QS34
QS38
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA26X AA80X AA90X AA90Y
AA91X AB01 AC14 BA02
CA24 CA44
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA35
BA44 CA53 MA13 MA17 MA22
MA23 MA24 MA28 MA31 MA35
MA36 MA37 MA38 MA52 MA57
MA59 MA60 MA63 MA66 NA14
ZA162 ZA222 ZA402 ZA422
ZA512 ZA702 ZA772 ZA962
ZB072 ZB112 ZB212 ZB262
ZC212 ZC332 ZC352 ZC412
ZC552
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB36
BB41 BB43 BB44 CC02 CC04
CC05 CC12 CC17 CC22 DD22
DD23 DD33 DD35 DD41 DD43
DD63 DD86 DD88 EE01 EE06
FF02 FF03 FF13 FF14 FF20
GG02 GG04 GG05 GG08
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01
MA04 MA13 MA17 MA22 MA23
MA24 MA28 MA31 MA35 MA36
MA37 MA52 MA57 MA59 MA60
MA63 MA66 NA14 ZA16 ZA22
ZA36 ZA40 ZA42 ZA51 ZA70
ZA77 ZA96 ZB07 ZB09 ZB11
ZB21 ZB26 ZB33 ZC21 ZC33
ZC35 ZC41 ZC55
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41
CA40 DA75 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	基因与热响应G12L有关		
公开(公告)号	JP2003525610A	公开(公告)日	2003-09-02
申请号	JP2001564367	申请日	2001-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	库拉创公司 健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Kyuragen公司 Genentech公司		
[标]发明人	レビンディビッドエイ アダムスシヨーンエイチ		
发明人	レビン,ディビッド,エイ. アダムス,シヨーン,エイチ.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/16 A61P19/02 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/46 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/16 A61P19/02 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/47		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P1/16.105 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/10 A61P9/10.103 A61P9/12 A61P11/16 A61P19/02 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.105 C07K14/46 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS34 4B063/QS38 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA80X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA36 4C084/MA37 4C084/MA38 4C084/MA52 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA162 4C084/ZA222 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA512 4C084/ZA702 4C084/ZA772 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC212 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4C084/ZC412 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC12 4C085/CC17 4C085/CC22 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/DD33 4C085/DD35 4C085/DD41 4C085/DD43 4C085/DD63 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085/FF13 4C085/FF14 4C085/FF20 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA13 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA24 4C086/MA28 4C086/MA31 4C086/MA35 4C086/MA36 4C086/MA37 4C086/MA52 4C086/MA57 4C086/MA59 4C086/MA60 4C086/MA63 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA16 4C086/ZA22 4C086/ZA36 4C086/ZA40 4C086/ZA42 4C086/ZA51 4C086/ZA70 4C086/ZA77 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB09 4C086/ZB11 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZC21 4C086/ZC33 4C086/ZC35		

4C086/ZC41 4C086/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74

优先权 60/186513 2000-03-02 US

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本文描述了编码多肽的新型人和小鼠核酸序列。还公开了上述多肽的衍生物，变体，突变体或片段，以及由这些核酸编码的多肽，与该多肽免疫特异性结合的抗体。是的。本发明进一步公开了涉及涉及这些新颖核酸和蛋白质中的任何一种的疾病的诊断，治疗和预防的治疗，诊断和研究方法。

すべてのCys残基がハーフスチンとして現れると仮定した値:

	276nm	278nm	279nm	280nm	282nm
吸光係数	23595	23927	23825	23590	22900
吸光度	1.159	1.175	1.170	1.159	1.125