

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、以下：

a) 配列番号2、4、6、8、10および12からなる群から選択されるアミノ酸配列；

b) 配列番号2、4、6、8、10および12からなる群から選択されるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、選択された配列中で特定されるアミノ酸の1つ以上が、異なるアミノ酸に変更され、ただし、該改変体のアミノ酸配列中の15%以下のアミノ酸残基が変更される、改変体；

c) 配列番号2、4、6、8、10および12からなる群から選択されるアミノ酸配列の成熟形態；および

d) 配列番号2、4、6、8、10および12からなる群から選択されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで、選択された配列中で特定されるアミノ酸の1つ以上が、異なるアミノ酸に変更され、ただし、該成熟形態の改変体のアミノ酸配列中の15%以下のアミノ酸残基が変更される、改変体；ならびに

e) a) ~ d) に記載されるアミノ酸配列のフラグメント、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項2】 前記ポリペプチドがF C T R Xポリペプチドのフラグメントである、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 前記ポリペプチドが、配列番号2、4、6、8、10または12の天然に存在する対立遺伝子改変体である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 前記改変体が、前記ポリペプチドをコードする核酸における一ヌクレオチド多型の翻訳である、請求項3に記載のポリペプチド。

【請求項5】 前記ポリペプチドが、配列番号2、4、6、8、10または12のアミノ酸配列と、1つ以上の保存的置換によって異なるアミノ酸配列を含む改変体ポリペプチドである、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項6】 請求項1に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項7】 請求項2に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項8】 前記核酸分子が、配列番号2、4、6、8、10または12を含むポリペプチドをコードする核酸の天然に存在する対立遺伝子核酸改変体のヌクレオチド配列を含む、請求項6に記載の核酸分子。

【請求項9】 前記核酸分子が改変体ポリペプチドをコードし、ここで該改変体ポリペプチドが、天然に存在するポリペプチド改変体のポリペプチド配列を有する、請求項6に記載の核酸分子。

【請求項10】 前記核酸分子が、前記改変体ポリペプチドをコードする一ヌクレオチド多型を含む、請求項6に記載の核酸分子。

【請求項11】 前記核酸分子が、以下：

a) 配列番号1、3、5、7、9および11からなる群から選択されるヌクレオチド配列；

b) 配列番号1、3、5、7、9および11からなる群から選択される参照ヌクレオチド配列と、1つ以上のヌクレオチドだけ異なり、ただし、該ヌクレオチドの20%以下が該参照ヌクレオチド配列と異なる、ヌクレオチド配列；

c) a)に記載される配列の核酸フラグメント；

d) b)に記載される配列の核酸フラグメント；および

e) a)～d)のいずれかの相補体、

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項6に記載の核酸分子。

【請求項12】 前記核酸が全長FCTRXポリペプチドをコードしない、請求項11に記載の核酸。

【請求項13】 前記核酸分子が、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、3、5、7、9および11からなる群から選択されるヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズする、請求項6に記載の核酸分子。

【請求項14】 請求項6に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項15】 請求項14に記載のベクターを含む細胞。

【請求項16】 請求項1に記載のポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体。

【請求項17】 モノクローナル抗体である、請求項16に記載の抗体。

【請求項18】 ポリクローナル抗体である、請求項16に記載の抗体。

【請求項19】 ヒト化抗体である、請求項16に記載の抗体。

【請求項20】 ヒト抗体である、請求項18に記載の抗体。

【請求項21】 サンプル中の請求項1に記載のポリペプチドを同定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該サンプルを提供する工程；

(b) 該サンプルを、請求項1に記載のポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体と接触させる工程；

(c) 該ポリペプチドに結合した抗体の存在または量を決定し、それにより該サンプル中のポリペプチドの存在または量を決定する、工程、を包含する方法。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチドに結合する因子を同定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該ポリペプチドを候補物質と接触させる工程；および

(b) 該候補物質が該ポリペプチドに結合するか否かを決定する工程、を包含し、ここで該候補物質の該ポリペプチドへの結合は、該物質が該ポリペプチドに結合する因子であることを示す、方法。

【請求項23】 前記候補物質が、約1500Da以下の分子量を有する、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法は、該ポリペプチドの活性を調節するのに十分な量の該ポリペプチドに結合する化合物と、該ポリペプチドを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項25】 治療因子を同定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを発現する細胞を提供する工程；

(b) 該細胞を試験因子と接触させる工程；

(c) 該物質が、DNA合成、タンパク質翻訳、細胞増殖、および細胞分裂からなる群から選択される活性を調節するか否かを決定する工程、を包含し、

ここで該物質の存在下での該活性の変更は、該因子が治療因子であることを示す、方法。

【請求項26】 前記候補物質が、約1500Da以下の分子量を有する、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記特性または機能が、細胞成長または細胞増殖を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 請求項25の方法に従って同定される治療因子。

【請求項29】 約1500Da以下の分子量を有する、請求項28に記載の治療因子。

【請求項30】 請求項26に記載の方法に従って同定される治療因子。

【請求項31】 約1500Da以下の分子量を有する、請求項30に記載の治療因子。

【請求項32】 被験体において請求項1に記載のポリペプチドに関連する障害を処置または予防する方法であって、該方法は、該処置または予防を必要とする被験体に、請求項1のポリペプチドを、該被験体において該タンパク質関連障害を処置または予防するために十分な量でかつ十分な期間にわたって投与する工程を包含し、ここで該被験体は、該障害の傾向があるかまたは該障害を罹患しているとみなされる、方法。

【請求項33】 前記被験体がヒトである、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 FCTRXポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する障害を処置または予防する方法であって、ここで該障害が、細胞または組織の不十分な成長または効果的でない成長を特徴とし、該方法は、被験体に請求項6の核酸を、該被験体において該障害を処置または予防するために十分な量でかつ十分な期間にわたって投与する工程を包含し、ここで該被験体は、該障害の傾向があるかまたは該障害を罹患してい

るとみなされる、方法。

【請求項35】 前記被験体がヒトである、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 請求項1のポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する障害を処置または予防する方法であって、ここで該障害が、細胞または組織の過形成または新形成を特徴とし、該方法は、被験体に治療剤を、該被験体において該障害を処置または予防するために十分な量で投与する工程を包含し、ここで該被験体は、該障害の傾向があるかまたは該障害を罹患していると考えられる、方法。

【請求項37】 前記治療剤が、抗FCRX抗体である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 前記被験体がヒトである、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 請求項1に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項40】 請求項6に記載の核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項41】 請求項16に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項42】 請求項28に記載の治療因子および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項43】 請求項30に記載の治療因子および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項44】 1つ以上の容器に請求項40に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項45】 1つ以上の容器に請求項41に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項46】 1つ以上の容器に請求項42に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項47】 請求項1のポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する障害に対する潜伏性または素因の

モジュレーターについてのスクリーニングのための方法であって、該方法は、以下：

a) 該障害の高い危険性にある試験動物を提供する工程であって、ここで該試験動物は、請求項1に記載のポリペプチドを組換え発現する、工程；

b) 試験化合物を該試験動物に投与する工程；

c) 工程(a)の該化合物を投与する工程の後に該試験動物における該ポリペプチドの活性を測定する工程；および

d) 該試験動物における該タンパク質の活性を、該ポリペプチドを投与されていないコントロール動物における該ポリペプチドの活性と比較する工程；

を包含し、

ここで、該コントロール動物と比較した該試験動物における該ポリペプチドの活性の変化は、該試験化合物が該障害に対する潜伏性または素因のモジュレーターであることを示す、方法。

【請求項48】 前記試験動物が、組換え試験動物であり、該試験動物が、野生型試験動物と比較して増加したレベルで試験タンパク質導入遺伝子を発現するかまたはプロモーターの制御下で該導入遺伝子を発現し、ここで該プロモーターは、該導入遺伝子のネイティブ遺伝子プロモーターではない、請求項47に記載の方法。

【請求項49】 請求項1に記載のポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する障害に対する潜伏性または素因のモジュレーター。

【請求項50】 第1の哺乳動物被験体における請求項1に記載のポリペプチドの変更したレベルに関連する疾患の存在または該疾患に対する素因を決定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 該第1の哺乳動物被験体由来のサンプルにおける該ポリペプチドの発現レベルを測定する工程；および

b) 工程(a)のサンプル中の該ポリペプチドの量を、該疾患を有していないか、または該疾患に対する素因を有していないことが既知である第2の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する

工程、

を包含し、ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第1の被験体における該ポリペプチドの発現レベルの変更が、該疾患の存在または該疾患に対する素因を示す、方法。

【請求項51】 第1の哺乳動物被験体における請求項6に記載の核酸分子の変更したレベルに関連する疾患の存在または該疾患に対する素因を決定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 該第1の哺乳動物被験体由来のサンプルにおける該核酸の量を測定する工程；および

b) 工程(a)のサンプル中の該核酸の量を、該疾患を有していないか、または該疾患に対する素因を有していないことが既知である第2の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該核酸の量と比較する工程、を包含し、ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第1の被験体における該核酸の発現レベルの変更が、該疾患の存在または該疾患に対する素因を示す、方法。

【請求項52】 哺乳動物における病理学的状態を処置する方法であって、ここで、該病理が、請求項1のポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連し、該方法は、該哺乳動物にポリペプチドを、該病理学的状態を軽減するのに十分な量で投与する工程を包含し、ここで該ポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10または12の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその生物学的に活性なフラグメントである、方法。

【請求項53】 哺乳動物における病理学的状態を処置する方法であって、ここで、該病理が、FCTRXポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連し、該方法は、該哺乳動物に請求項16に記載の抗体を、該病理学的状態を軽減するのに十分な量でかつ十分な期間にわたって投与する工程を包含する、方法。

【請求項54】 被験体における細胞の増殖を促進する方法であって、該被験体に請求項1に記載されるポリペプチドを、細胞成長を促進するのに効果的な

量でかつ効果的な期間にわたって投与する工程を包含する、方法。

【請求項55】 前記ポリペプチドが、請求項2に記載のフラグメントである、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 前記被験体がヒトである、請求項54に記載の方法。

【請求項57】 成長が促進されるべき細胞が、創傷の近傍の細胞、脈管系の細胞、造血に關与する細胞、赤血球形成に關与する細胞、胃腸管の管壁細胞、および毛包細胞からなる群から選択される、請求項54に記載の方法。

【請求項58】 被験体における細胞成長を阻害する方法であって、ここで、該成長が請求項1に記載のポリペプチドの発現に關連し、該被験体に該細胞の成長を阻害する組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項59】 前記組成物が、前記被験体におけるFCTRXPポリペプチドの開裂を阻害する、請求項58に記載の方法。

【請求項60】 前記組成物が、抗FCTRXP抗体を含む、請求項59に記載の方法。

【請求項61】 前記被験体がヒトである、請求項60に記載の方法。

【請求項62】 成長が阻害されるべき細胞が、形質転換された細胞、過形成細胞、腫瘍細胞、および新形成細胞からなる群から選択される、請求項61に記載の方法。

【請求項63】 FCTRXPポリペプチドの発現を可能にする条件下で、FCTRXPポリペプチドをコードする核酸を含む細胞を培養することにより、FCTRXPポリペプチドを産生する方法。

【請求項64】 さらに、前記FCTRXPポリペプチドが回収される、請求項63に記載の方法。

【請求項65】 哺乳動物PDGF AA、哺乳動物PDGF BB、哺乳動物PDGF CC以外の、哺乳動物血小板由来成長因子(PDGF)様第1ポリペプチドであって、ここで、該第1ポリペプチドが、該第1ポリペプチドのフラグメントである第2ポリペプチドを生じるように処理され、そしてここで、該第2ポリペプチドは、以下：

- a) 該第2ポリペプチドは血小板由来成長因子レセプターを結合する；

b) 該第2ポリペプチドは哺乳動物細胞の成長を誘導する；および

c) 該第2ポリペプチドは哺乳動物細胞の成長を誘導する；

からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する、ポリペプチド。

【請求項66】 前記レセプターがPDGFレセプターである、請求項65に記載の第1ポリペプチド。

【請求項67】 前記哺乳動物細胞が、平滑筋細胞である、請求項65に記載の第1ポリペプチド。

【請求項68】 前記ポリペプチドが、請求項1に記載のポリペプチドを含む、請求項65に記載の第1ポリペプチド。

【請求項69】 前記ポリペプチドフラグメントが、配列番号2の残基248～370で示される配列または配列番号2の残基250～370で示される配列のいずれかを含む、請求項2に記載のポリペプチドフラグメント。

【請求項70】 前記ポリペプチドフラグメントが、以下：

a) 該フラグメントは血小板由来成長因子レセプターを結合する；

b) 該フラグメントは哺乳動物細胞の成長を誘導する；および

c) 該フラグメントは哺乳動物細胞の成長を誘導する；

からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する、請求項2に記載のポリペプチドフラグメント。

【請求項71】 請求項65に記載の第2ポリペプチドに免疫特異的に結合し、そして前記選択された特性を阻害する、抗体。

【請求項72】 請求項69に記載のポリペプチドフラグメントに免疫特異的に結合する、抗体。

【請求項73】 請求項70に記載のポリペプチドフラグメントに免疫特異的に結合し、そして請求項70に記載される前記選択された特性を阻害する、抗体。

【請求項74】 ポリクローナル抗体である、請求項71、72、または73に記載の抗体。

【請求項75】 モノクローナル抗体である、請求項71、72、または73に記載の抗体。

【請求項76】 完全なヒト抗体である、請求項71、72、または73に記載の抗体。

【請求項77】 哺乳動物細胞の成長を促進する方法であって、該細胞をFCRXポリペプチドまたは請求項65に記載のポリペプチドと接触させる工程を包含する、方法。

【請求項78】 哺乳動物細胞の増殖を促進する方法であって、該細胞をFCRXポリペプチドまたは請求項65に記載のポリペプチドと接触させる工程を包含する、方法。

【請求項79】 前記細胞が平滑筋細胞である、請求項77または78に記載の方法。

【請求項80】 哺乳動物細胞の成長を阻害する方法であって、該細胞を請求項71、72、または73に記載の抗体を含む組成物と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項81】 哺乳動物細胞の増殖を阻害する方法であって、該細胞を請求項71、72、または73に記載の抗体を含む組成物と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項82】 前記細胞が平滑筋細胞である、請求項80または81に記載の方法。

【請求項83】 請求項65に記載の第1ポリペプチドをコードする配列を含む核酸。

【請求項84】 請求項69に記載のポリペプチドフラグメントをコードする配列を含む核酸。

【請求項85】 サンプル中の核酸分子の存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該サンプルを提供する工程；

(b) 該サンプルを、請求項6に記載の核酸分子に結合するプローブと接触させる工程；および

(c) 該核酸分子に結合したプローブの存在または量を決定し、それにより該サンプル中の該核酸分子の存在または量を決定する、工程、

を包含する方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、核酸およびポリペプチドに関する。より詳細には、本発明は、哺乳動物において成長因子活性を有する新規な核酸およびポリペプチドを開示する。さらに、これらのポリペプチドに特異的な抗体を開示する。

【0002】**(発明の背景)**

種々の組織に影響を及ぼすポリペプチド成長因子が記載されてきた。これらの成長因子には、骨形態発生タンパク質 - 1 (BMP - 1)、血管内皮成長因子 (VEGF)、および血小板誘導成長因子 (PDGF) がある。

【0003】

複数の影響はBMP - 1に起因した。例えば、BMP - 1は、インビボで軟骨の形成を誘導し得る。BMP 1はまた、精製されたプロコラーゲンCプロテイナーゼ (PCP) と同一であり、これは、軟骨および骨形成に必要であると報告された分泌カルシウム依存性メタロプロテアーゼである。BMP - 1は、プロコラーゲンI、IIおよびIIIのC末端プロペプチドを切断し、そしてその活性を、プロコラーゲンC - エンドペプチダーゼエンハンサータンパク質により増加させる。

【0004】

血管内皮成長因子 (VEGF) ポリペプチドは、主に血管内皮細胞のミトジェンとして作用すると報告された。血管内皮細胞に対する特異性により、VEGFポリペプチドは、他のポリペプチドミトジェン (例えば、広い範囲の細胞型に対して活性である基本的な線維芽細胞成長因子および血小板誘導成長因子) と対照をなす。

【0005】

VEGFはまた、腫瘍新脈管形成に影響すると報告された。例えば、VEGFは、酸素および栄養素が欠如した培養において非増殖内皮細胞の延長、ネットワーク形成、および分枝形成を刺激することが示された。

【0006】

血小板由来成長因子(PDGF)ファミリーは、現在では、少なくとも3つの異なる遺伝子(PDGF A、PDGF B、およびPDGF C)からなり、これらの遺伝子産物は、選択的に2つのPDGFRを介してシグナル伝達し、種々の細胞機能を調節する。PDGF A、PDGF B、およびPDGF Cは、溶液中で二量化してホモダイマー、ならびにヘテロダイマーを形成する。

【0007】

PDGF AおよびPDGF BサブユニットをコードするRNAの発現は、アテローム性動脈硬化症に関与する血管組織で報告された。PDGF AおよびPDGF BのmRNAは、それぞれアテローム性動脈硬化プラークの間葉顕示内膜細胞および内皮細胞に存在することが報告された。さらに、PDGFレセプターmRNAはまた、主にプラーク内膜細胞に局在化された。

【0008】

PDGF Bは、サル肉腫ウイルスの形質転換遺伝子(v-sis)に関する。PDGF Bはまた、間葉起源の細胞に対するミトジェンであることが報告された。PDGF Bは、さらに、神経膠芽腫において特徴的に見出される内皮細胞の病的増殖におけるオートクライン成長刺激に関していた。PDGFはまた、細胞増殖を促進し、そしてアポトーシスを阻害することが報告された。

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、部分的に骨形態発生タンパク質-1(BMP-1)、血管内皮成長因子(VEGF-E)、および血小板誘導成長因子(PDGF)に関するポリペプチドをコードする核酸の発見に基づく。本明細書中に記載される核酸、ポリヌクレオチド、タンパク質およびポリペプチド、またはこれらのフラグメントを、まとめてFCTRX核酸およびFCTRXポリペプチドという。

【0010】

1つの局面において、本発明は、単離されたFCTRXポリペプチドまたはFCTRXポリペプチドのフラグメントを提供する。FCTRXポリペプチドは、例えば、配列番号2、4、6、8、10および12からなる群から選択されるア

ミノ酸配列を含み得る。配列番号2、4、6、8、10および12のアミノ酸配列の改変体のアミノ酸配列を含むF C T R Xポリペプチドもまた本発明の範囲内である。いくつかの実施形態において、この改変体配列における1つ以上のアミノ酸は、異なるアミノ酸に変更される。いくつかの実施形態において、この改変体のアミノ酸配列中の15%以下のアミノ酸残基が変更される。本発明のF C T R Xポリペプチドはまた、配列番号2、4、6、8、10および12のポリペプチドの成熟形態（例えば、配列番号2のアミノ酸24～370のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号4における対応するフラグメント）を含む。他の実施形態において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10および12のアミノ酸配列を含むポリペプチドの成熟形態の改変体を含む。改変体形態において、選択された配列において特定された1つ以上のアミノ酸は、異なるアミノ酸に変更される。いくつかの実施形態において、この成熟形態の改変体のアミノ酸配列における15%以下のアミノ酸残基は、配列番号2、4、6、8、10および12のポリペプチドの配列と異なる。

【0011】

F C T R Xポリペプチドのフラグメント、F C T R Xポリペプチドの改変体形態のフラグメント、F C T R Xポリペプチドの成熟形態のフラグメント、またはF C T R Xポリペプチドの成熟形態の改変体のフラグメントもまた本発明により提供される。F C T R Xポリペプチドのフラグメントとしては、例えば、配列番号2のアミノ酸247～370、配列番号2のアミノ酸247～338、および配列番号2のアミノ酸339～370、ならびに配列番号4における対応する相同フラグメントが挙げられる。

【0012】

本発明はまた、F C T R X核酸分子を提供し、これらとしては、F C T R Xポリペプチドをコードする配列番号1、3、5、7、9および11のような核酸分子、F C T R Xポリペプチドの改変体をコードする核酸、F C T R Xポリペプチドの成熟形態をコードする核酸、またはF C T R Xポリペプチドの成熟形態の改変体をコードする核酸が挙げられる。

【0013】

本発明はまた、F C T R Xポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体を特徴とする。この抗体は、例えば、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であり得る。

【0014】

別の局面において、本発明は、治療的有効量または予防的有効量の治療剤および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を含む。治療剤は、例えば、F C T R X核酸、F C T R Xポリペプチド、またはF C T R Xポリペプチドに特異的な抗体であり得る。さらなる局面において、本発明は、1つ以上の容器に治療的有効量または予防的有効量のこの薬学的組成物を含む。

【0015】

さらなる局面において、本発明は、F C T R X核酸を含む細胞をこのF C T R X核酸にコードされるF C T R Xポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養することにより、ポリペプチドを産生する方法を含む。所望の場合、F C T R Xポリペプチドは次いで回収され得る。

【0016】

別の局面において、本発明は、サンプル中のF C T R Xポリペプチドの存在を検出する方法を含む。この方法において、サンプルをこのポリペプチドに選択的に結合する化合物と、このポリペプチドとこの化合物との間の複合体形成を可能にする条件下で接触させる。この複合体は、存在する場合検出され、それにより、サンプル中のF C T R Xポリペプチドを同定する。この化合物は、例えば、抗F C T R X抗体、または別のF C T R Xポリペプチドに結合するポリペプチドであり得る。

【0017】

サンプルをF C T R X核酸プローブまたはプライマーと接触させることにより、サンプル中のF C T R X核酸の存在を検出し、そしてこの核酸プローブまたはプライマーがサンプル中のF C T R X核酸分子に結合しているか否かを検出する方法はまた本発明に含まれる。

【0018】

さらなる局面において、本発明は、F C T R Xポリペプチドの活性を調節する

ための方法を提供する。この方法は、F C T R Xポリペプチドを含む細胞サンプルを、F C T R Xポリペプチドにこのポリペプチドの活性を調節するために十分な量で結合する化合物と接触させる工程を包含する。この化合物は、さらに本明細書中に記載されるように、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチドミメティック、炭水化物、脂質または有機（炭素含有）分子もしくは無機分子のような低分子であり得る。

【0019】

本発明はさらに、例えば癌を含む障害または症候群のモジュレーターについてスクリーニングするための方法を含む。この方法は、試験化合物を、F C T R Xポリペプチドと接触させる工程およびこの試験化合物がこのF C T R Xポリペプチドに結合したか否かを決定する工程を包含する。試験化合物のF C T R Xポリペプチドとの結合は、この試験化合物が活性のモジュレーター、または障害もしくは症候群に対する潜伏性もしくは素因のモジュレーターであることを示す。1つの実施形態において、候補試験化合物は、約1500Da以下の分子量を有する。

【0020】

任意のF C T R X関連障害または症候群に対する活性のモジュレーター、または潜伏性もしくは素因のモジュレーターについてスクリーニングするための方法もまた本発明の範囲内であり、この方法は、試験化合物を上述の障害または症候群の増加した危険性を有する試験動物に投与する工程を包含する。この試験動物は、F C T R X核酸にコードされる組換えポリペプチドを発現する。次いでF C T R Xポリペプチドの発現または活性は、この試験動物において測定され、F C T R Xポリペプチドを組換え発現しかつ障害または症候群に対する危険性のないコントロール動物におけるタンパク質の発現または活性も同様に測定する。次に、試験動物およびコントロール動物の両方におけるF C T R Xポリペプチドの発現を比較する。コントロール動物に対する試験動物におけるF C T R Xポリペプチドの活性の変化は、この試験化合物が障害または症候群の潜伏性のモジュレーターであるということを示す。

【0021】

なお別の局面において、本発明は、被験体（例えば、ヒト被験体）における、F C T R Xポリペプチド、F C T R X核酸の変更したレベルに関連する疾患の存在またはこの疾患に対する素因を決定するための方法を含む。この方法は、被験体由来の試験サンプル中のF C T R Xポリペプチドの量を測定する工程およびこの試験サンプル中のポリペプチドの量を、コントロールサンプル中に存在するF C T R Xポリペプチドの量と比較する工程を包含する。コントロールサンプルと比較した場合の試験サンプル中のF C T R Xポリペプチドのレベルの変更は、この被験体における疾患の存在またはこの疾患に対する素因を示す。

【0022】

さらなる局面において、本発明は、被験体（例えば、ヒト被験体）にF C T R Xポリペプチド、F C T R X核酸、またはF C T R X特異的抗体を、病理学的状態を低減するかまたは予防するために十分な量で、投与することにより、哺乳動物における障害に関する病理学的状態を処置または予防する方法を含む。

【0023】

本発明に従うF C T R X核酸を使用して、種々の細胞型（癌性細胞を含む）を同定し得る。例えば、実施例7は、クローン30664188.0.99（配列番号1）が、CNS癌、肺癌および卵巣癌において特異的に強く発現されるということを示す。配列番号1が、トランスフェクトHEK293細胞から生じる馴化培地においてインタクトなままでいるか、またはタンパク質分解で切断されるかのいずれかである遺伝子産物を産生することも実施例に示す。実施例13に示される証拠は、種々の実験において活性である（実施例に報告される）30664188.0.99タンパク質（配列番号2）の形態が、30664188.0.99タンパク質のタンパク質分解産物であることを示唆する。実施例に示されるように、これらの基質のうちの1つまたは両方に起因する活性としては、BrdUのDNAの組込みによりモニターされる場合の正味のDNA合成を刺激する能力、細胞数の増殖、培養物において細胞を形質転換する能力、およびインビボで腫瘍形成を誘導する能力が挙げられる。これらの種々の活性は、多様な細胞型において起きる。

【0024】

F C T R X 核酸、およびそのコードされるポリペプチドはまた、細胞増殖を調節するために使用され得る。例えば、配列番号 2、4、6、8、10 および 12 または全てのアミノ酸配列を有するポリペプチドが、種々の細胞において特定の機能を有しているようである。特定の細胞の成長および増殖を刺激することに加えて、これは、腫瘍細胞株の特定のクラスにおいて内因的に発現される。従って、F C T R X ポリペプチド（例えば、配列番号 2、4、6、8、10 および 12 のアミノ酸配列を有するポリペプチド）は、正味の細胞成長および細胞増殖が所望される場合、および細胞増殖が阻害されるかまたは排除される異なる環境において使用され得る。

【0025】

F C T R X 核酸または遺伝子産物（例えば、配列番号 2、4、6、8、10 および 12 をコードする核酸）は、創傷治癒、新血管形成および組織成長の促進、ならびに類似の組織再生が必要な際の治療因子として有用である。より詳細には、F C T R X 核酸またはポリペプチドは、貧血および白血球減少、腸管感受性および禿頭症の処置の際に有用であり得る。このような状態の処置は、例えば、放射線または化学療法を受けた患者に示され得る。このような場合において、F C T R X 核酸またはポリペプチド（例えば、配列番号 2、4、6、8、10 または 12 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはこれらのポリペプチドをコードする核酸配列（例えば、配列番号 1、3、5、7、9 または 11）の投与は、いずれの過剰増殖副作用も最少にされるように用量が制御されることが意図される。

【0026】

あるいは、腫瘍（例えば CNS 癌および卵巣癌）の場合において、ここで F C T R X 核酸は、高レベルで発現され（例えば、配列番号 1 における腫瘍は、高レベルで発現される）、F C T R X 核酸または遺伝子産物（例えば、配列番号 2 もしくは配列番号 4、またはこれらのポリペプチドの 1 つをコードする核酸）の産生の効果を阻害するかまたは排除することが所望される。例えば、これは、配列番号 2 もしくは配列番号 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはそのフラグメントに対して指向される抗体の投与により達成され得る。特に、抗体は、本明細書中で同定される活性フラグメント p 35（実施例を参照のこと）に対し

て指向され得る。代替例は、p 85からのp 35の形成に關与する推定プロテアーゼの同定を含む（実施例を参照のこと）。このプロテアーゼの活性を特異的に阻害するが、他のプロテアーゼの活性を阻害しない物質の投与は、F C T R Xポリペプチド（例えば、クローン30664188.0.99ポリペプチド）の活性p 35形態の形成を防ぐために有効である。

【0027】

悪性疾患進行および本明細書中に記載される遺伝子発現プロファイルにおけるF C T R XポリペプチドおよびF C T R X核酸（例えば、BMP - 1、ファロテイン（fallotin）のようなVEGF様ポリペプチド、およびPDGF）に關する分子の役割に基づいて、ヒト神経膠腫および卵巣上皮癌のサブセットについて、抗体を使用したF C T R Xポリペプチドの標的化は、腫瘍成長、基質浸潤、化学療法抵抗性、放射線抵抗性および転移性異化に対する阻害性の影響を有することが予測される。種々の実施形態において、F C T R Xポリペプチドは、モノクローナル抗体、ヒト化抗体または完全な（fully）ヒト抗体に連結される。

【0028】

F C T R Xポリペプチドは、潜在的に腫瘍新血管形成の延長を遮断するかまたは制限し得る。有効な抗体治療剤の古典的な投与様式に加えて、新しく開発された投与様式が有用であり得る。例えば、外科切除後の原発性脳腫瘍の処置のための¹³¹I標識モノクローナル抗体の局所投与が報告されている。さらに、モノクローナル抗体およびそのフラグメントの直接定位脳内注射はまた、臨床的および前臨床的に研究されている。頸動脈間高浸透圧灌流は、薬物結合体化ヒトモノクローナル抗体を用いて原発性脳悪性腫瘍を標的化するための実験的戦略である。

【0029】

さらに、本発明の核酸およびそのフラグメントおよび改変体は、非限定的な例として、（a）対応するコードされるタンパク質、ポリペプチド、フラグメントおよび改変体の生合成を、組換え遺伝子産物または異種遺伝子産物として指向するため、（b）本明細書中に開示される核酸の検出および定量のためのプローブ

として、(c) アンチセンス分子を調製するための配列テンプレートとしてなどに使用され得る。このような使用は、以下の開示により十分に記載される。

【0030】

さらに、本発明のタンパク質およびポリペプチド、ならびにそのフラグメントおよび改変体は、(a) 抗FCRX抗体の産生を刺激するための免疫原として役立つこと、(b) このような抗体についての免疫原性アッセイにおける捕捉抗原、および(c) 本発明のFCRXポリペプチドに結合する物質についてのスクリーニングのための標的として、を含む方法において使用され得る。FCRX核酸、ポリペプチド、抗体、アゴニスト、アンタゴニストおよび他の関連化合物についてのこれらの用途および他の用途は、以下により十分に開示される。

【0031】

他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者に通常理解される意味と同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または等価な方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書中で言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参考としてそれらの全体が援用される。矛盾する場合は、本明細書(定義を含む)が優先する(control)。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみであり、そして限定することを意図されない。

【0032】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【0033】

(発明の詳細な説明)

本発明は、骨 - モルフォゲンプロテイン - 1 (BMP - 1) 血管内皮増殖因子 (VEGF - E) および血小板由来増殖因子 (PDGF) に関連するポリペプチドをコードする核酸を提供する。

【0034】

新規核酸配列およびそれらのコードされるポリペプチドが本発明に含まれる。

これらの配列は、集合的に「F C T R X核酸」または「F C T R Xポリヌクレオチド」といわれ、そして対応するコードされるポリペプチドは、「F C T R Xポリペプチド」または「F C T R Xタンパク質」といわれる。他に示されない限り、「F C T R X」は、本明細書中に開示される新規配列のいずれかをいうことを意図する。さらに、本発明のポリペプチドおよび核酸は、本明細書中で集合的に「P D G F D」と代替的にいわれる。さらに、「P D G F X X」（ここで「X」は、A、B、CまたはDのいずれかである）に言及する場合、これは、特定のP D G Fのホモ二量体をいうことが意図される。あるいは、「P D G F X Y」（ここでXおよびYは、A、B、CまたはDのいずれかであり、そして「X」は、「Y」と異なる）に言及する場合、これは、P D G Fヘテロ二量体をいうことが意図される。

【0035】

P D G F Dが、高分子量潜在的形態（p 85と称される）および低分子量活性形態（p 35と称される）を有することが、本明細書中で示される。

【0036】

（F C T R 1核酸およびポリペプチド）

本発明のF C T R 1ポリヌクレオチドは、クローン30664188.0.99と表される核酸を含む。クローン30664188.0.99は、1828ヌクレオチド長である。F C T R 1（30664188.0.99またはP D G F Dともいわれる）のヌクレオチド配列は、表1（配列番号1）に報告される。このクローンは、もともとは、下垂体組織由来のRNAから得た。そしてこれは、ヒト子宮微小血管内皮細胞（Clonetics, San Diego, CA）、ヒト赤白血病細胞（ATCC, Manassas, VA）、甲状腺、小腸、リンパ球、副腎および唾液腺由来のRNAにも存在する。

【0037】

（表1.ヌクレオチド（配列番号1）およびタンパク質（配列番号2）

F C T R 1（30664188-0-99ともいわれる）の配列

翻訳されたタンパク質 - フレーム：2 - ヌクレオチド182 ~ 1292）

【0038】

【表1】

1 CTAAAAAATATGTTCTCTACAACACCAAGGCTCATTAAAATATTT
46 TAAATATTAATATACATTTCTTCTGTCAGAAATACATAAACTTT

91 ATTATATCAGCGCAGGGCGGCGGCGTCCCGGGAGCAGAA
136 CCCGGCTTTTCTTGGAGCGACGCTGTCTCTAGTCGCTGATCCCA

181 AATGCACCGGCTCATCTTTGTCTACACTCTAATCTGCGCAAACCTT
MetHisArgLeuIlePheValTyrThrLeuIleCysAlaAsnPh

226 TTGCAGCTGTCGGGACACTTCTGCAACCCCGCAGAGCGCATCCAT
eCysSerCysArgAspThrSerAlaThrProGlnSerAlaSerIl

271 CAAAGCTTTGCGCAACGCCAACCTCAGGCGAGATGAGAGCAATCA
eLysAlaLeuArgAsnAlaAsnLeuArgArgAspGluSerAsnHi

316 CCTCACAGACTTGTACCGAAGAGATGAGACCATCCAGGTGAAAGG
sLeuThrAspLeuTyrArgArgAspGluThrIleGlnValLysGl

361 AAACGGCTACGTGCAGAGTCCTAGATTCCCGAACAGCTACCCAG
yAsnGlyTyrValGlnSerProArgPheProAsnSerTyrProAr

406 GAACCTGCTCCTGACATGGCGGCTTCACTCTCAGGAGAATACACG
gAsnLeuLeuLeuThrTrpArgLeuHisSerGlnGluAsnThrAr

451 GATACAGCTAGTGTGTTGACAATCAGTTTGGATTAGAGGAAGCAGA
gIleGlnLeuValPheAspAsnGlnPheGlyLeuGluGluAlaGl

496 AAATGATATCTGTAGGTATGATTTTGTGGAAGTTGAAGATATATC
uAsnAspIleCysArgTyrAspPheValGluValGluAspIleSe

541 CGAAACCAGTACCATTATTAGAGGACGATGGTGTGGACACAAGGA
rGluThrSerThrIleIleArgGlyArgTrpCysGlyHisLysGl

586 AGTTCCTCCAAGGATAAAATCAAGAACGAACCAAATTAATCAC
uValProProArgIleLysSerArgThrAsnGlnIleLysIleTh

631 ATTCAAGTCCGATGACTACTTTGTGGCTAAACCTGGATTCAAGAT
rPheLysSerAspAspTyrPheValAlaLysProGlyPheLysIl

676 TTATTATTCTTTGCTGGAAGATTTCCAACCCGCAGCAGCTCAGA
 eTyrTyrSerLeuLeuGluAspPheGlnProAlaAlaAlaSerGl
 721 GACCAACTGGGAATCTGTCACAAGCTCTATTTTCAGGGGTATCCTA
 uThrAsnTrpGluSerValThrSerSerIleSerGlyValSerTy
 766 TAACTCTCCATCAGTAACGGATCCCCTCTGATTGCGGATGCTCT
 rAsnSerProSerValThrAspProThrLeuIleAlaAspAlaLe
 811 GGACAAAAAATTCGAGAATTTGATACAGTGAAGATCTGCTCAA
 uAspLysLysIleAlaGluPheAspThrValGluAspLeuLeuLy
 856 GTACTTCAATCCAGAGTCATGGCAAGAAGATCTTGAGAATATGTA
 sTyrPheAsnProGluSerTrpGlnGluAspLeuGluAsnMetTy
 901 TCTGGACACCCCTCGGTATCGAGGCAGGTCATACCATGACCGGAA
 rLeuAspThrProArgTyrArgGlyArgSerTyrHisAspArgLy
 946 GTCAAAAGTTGACCTGGATAGGCTCAATGATGATGCCAAGCGTTA
 sSerLysValAspLeuAspArgLeuAsnAspAlaLysArgTy
 991 CAGTTGCACTCCCAGGAATTACTCGGTCAATATAAGAGAAGAGCT
 rSerCysThrProArgAsnTyrSerValAsnIleArgGluGluLe
 1036 GAAGTTGGCCAATGTGGTCTTCTTTCCACGTTGCCTCCTCGTGCA
 uLysLeuAlaAsnValValPhePheProArgCysLeuLeuValGl
 1081 GCGCTGTGGAGGAAATTGTGGCTGTGGAAGTGTCAACTGGAGGTC
 nArgCysGlyGlyAsnCysGlyCysGlyThrValAsnTrpArgSe
 1126 CTGCACATGCAATTCAGGGAAAACCGTGAAAAAGTATCATGAGGT
 rCysThrCysAsnSerGlyLysThrValLysLysTyrHisGluVa
 1171 ATTACAGTTTGAGCCTGGCCACATCAAGAGGAGGGGTAGAGCTAA
 lLeuGlnPheGluProGlyHisIleLysArgArgGlyArgAlaLy
 1216 GACCATGGCTCTAGTTGACATCCAGTTGGATCACCATGAACGATG
 sThrMetAlaLeuValAspIleGlnLeuAspHisHisGluArgCy
 1261 TGATTGTATCTGCAGCTCAAGACCACCTCGATAAGAGAATGTGCA
 SAspCysIleCysSerSerArgProProArg
 1306 CATCCTTACATTAAGCCTGAAAGAACCTTTAGTTTAAGGAGGGTG
 1351 AGATAAGAGACCCTTTTCCTACCAGCAACCAAACCTTACTACTAGC
 1396 CTGCAATGCAATGAACACAAGTGGTTGCTGAGTCTCAGCCTTGCT
 1441 TTGTTAATGCCATGGCAAGTAGAAAGGTATATCATCAACTTCTAT
 1486 ACCTAAGAATATAGGATTGCATTTAATAATAGTGTGTTGAGGTTAT
 1531 ATATGCACAAACACACACAGAAATATATTCATGTCTATGTGTATA
 1576 TAGATCAAATGTTTTTTTTGGTATATATAACCAGGTACACCAGAG
 1621 CTTACATATGTTGAGTTAGACTCTTAAAATCCTTTGCCAAAATA
 1666 AGGGATGGTCAAATATATGAAACATGTCTTTAGAAAATTTAGGAG
 1711 ATAAATTTATTTTTAAATTTTGAAACACAAAACAATTTGAATCT
 1756 TGCTCTCTTAAAGAAAGCATCTTGTATATAAAAATCAAAGATG
 1801 AGGCTTTCTTACATATACATCTTAGTTG

配列番号1のヌクレオチド182～1292は、分泌タンパク質の特徴的な配
 列を含む370アミノ酸タンパク質(配列番号2)をコードする。コードされる
 タンパク質の配列(これは、本明細書中で「30664188.0.99タンパ

ク質」、「30664188.0.99」、「PDGFD」または「ヒトPDGFD」ともいわれる)が、表1に表される。30664188.0.99タンパク質の推定分子量は、42847.8ダルトンであり、7.88のpIを有する。

【0039】

BLASTNおよびBLASTP分析は、30664188.0.99ポリペプチドが、ヒト血管内皮増殖因子E(VEGF-E)および他の脊椎動物種由来のVEGF-Eに対して類似性を有することを示す。例えば、ヒト分泌増殖因子様タンパク質(VEGF-Eまたはファロテイン(fallotin); 受託番号:AAF00049(これは、ジーンバンクIDをいう):核酸配列についてはAF091434)に対して44%の同一性が存在する。VEGF-Eとの30664188.0.99ポリペプチドのアミノ酸配列のアラインメントは、図1に示される。BLASTP分析はまた、FCTR1が、ヒトPDGFC、PDGFBおよびPDGFA(各々、42%、27%、および25%のアミノ酸全体の同一性)に関連することを示す。

【0040】

PFAMおよびPROSITE分析は、30664188.0.99ポリペプチドアミノ酸配列が、PDGFドメイン(アミノ酸272~362)およびN結合グリコシル化部位(残基276)を含むことを示す。

【0041】

30664188.0.99ポリペプチドアミノ酸配列は、ヒトプロコラーゲンC-エンドペプチダーゼ(骨形態発生タンパク質-1; BMP-1; PIR-ID: A58788)(これは、823残基のポリペプチドである)の配列に対する類似性を示す。30664188.0.99ポリペプチドの残基54~169は、BMP-1ポリペプチドの3つのセグメントにわたって30~41%同一性を示す。この30664188.0.99ポリペプチドはまた、Xenopus laevis(ACC番号: P98070)由来のBMP-1(これは、707残基のタンパク質である)に対する同程度の同一性を示す。後者のタンパク質は、軟骨および骨の形成の際に亜鉛プロテアーゼとして作用し得る(Wozne

ら、Science 242:1528~34, 1988)。

【0042】

30664188.0.99ポリペプチドは、他の増殖因子にも関連する。例えば、これは、ニワトリ脊髄由来増殖因子(TREMBLNEW-ACC:BAB03265)に対して42%同一性および59%類似性、ヒト分泌増殖因子様タンパク質ファロテイン(SPTREMBL-ACC:Q9UL22)に対して42%同一性および59%同一性、ヒト血小板由来増殖因子C(TREMBLNEW-ACC:AAF80597)に対して42%同一性および39%類似性、そしてマウスファロゲン(SPTREMBL-ACC:Q9QY71)に対して39%同一性および59%類似性を示す。

【0043】

上記で議論された相同性は、BMP-1/VEGF-E/PDGFタンパク質ファミリーのメンバーとして30664188.0.99ポリペプチドを同定する。BMP-1タンパク質は、EGF様ドメイン、3つのCUBドメインおよびPDGF/VEGFドメインを含む。BMP-1タンパク質はまた、アスタシンサブファミリーのメンバーである。

【0044】

SignalPおよびPSORT分析は、30664188.0.99についてのアミノ酸配列が、23位と24位との間(TSA-TP)に切断部位を有する切断可能なアミノ末端シグナルペプチドを含むことを予測する。このタンパク質は、たいがい細胞の外に分泌され局在化される。InterProソフトウェアプログラムは、残基53~残基167の30664188.0.99中のCUBドメイン、残基272~306および350~362にわたるPDGFドメイン、ならびに残基302~残基365のメタロチオネインドメインの存在を予測する。本発明のFCTR1ポリペプチドは、1、2、3または4つのこれらのドメインまたはそれらの組み合わせを有するポリペプチドを含む。

【0045】

本発明のFCTR1ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸24~370を含むFCTR1ポリペプチドの成熟形態を含む。これらの配列はまた、クローン3

0664188.0.m99によりコードされる構築物にコードされ、これは、以下により詳細に記載される。アミノ酸配列247~370、247~338もしくは339~370またはそれらの改変体形態を含むFCTRXPoliペプチドフラグメントをコードする核酸も本発明の範囲内である。いくつかの実施形態では、これらのフラグメントは、細胞の増殖を刺激する。これらの核酸によりコードされるFCTRXPoliペプチドフラグメント、またはそれらの改変体もまた、本発明の範囲内である。

【0046】

(FCTR2核酸およびポリペプチド)

本発明のFCTR2ポリヌクレオチドは、クローン306664188.0.331に存在する核酸配列を含む。クローン306664188.0.331は、1587ヌクレオチド長であり、そしてもともとは、下垂体組織由来のRNAから単離された。FCTR2(306664188.0.331としてもいわれる)のヌクレオチド配列は、表2(配列番号3)に示される。

【0047】

(表2.FCTR2(306664188-0-331)のヌクレオチド(配列番号3)およびタンパク質(配列番号4)配列

翻訳されたタンパク質 - フレーム : 3 - ヌクレオチド540~936)

【0048】

【表2】

1 AGAGGCTCTCAAATTAGATCAAGAAATGCCTTTAACAGAAGTGAA
 46 GAGTGAACCTGCTCCTGACATGGCGGCTTCACTCTCAGGAGAATA
 91 CACGGATACAGCTAGTGTGGACAATCAGTTTGGATTAGAGGAAG
 136 CAGAAAATGATATCTGTAGGTATGATTTTGTGGAAAGTTGAAGATA
 181 TATCCGAAACCAGTACCATTATTAGAGGACGATGGTGTGGACACA
 226 AGGAAGTTCCTCCAAGGATAAAATCAAGAACGAACCAAATTAATA
 271 TCACATTCAAGTCCGATGACTACTTTGTGGCTAAACCTGGATTCA
 316 AGATTTATTATTCTTTGCTGGAAGATTTCCAACCCGAGCAGCTT
 361 CAGAGACCAACTGGGAATCTGTCACAAGCTCTATTTTCAGGGGTAT
 406 CCTATAACTCTCCATCAGTAACGGATCCCCTCTGATTGCGGATG
 451 CTCTGGACAAAAAATTGCAGAATTTGATACAGTGGAAAGATCTGC

 496 TCAAGTACTTCAATCCAGAGTCATGGCAAGAAGATCTTGAGAATA
 M
 541 TGTATCTGGACACCCCTCGGTATCGAGGCAGGTCATACCATGACC
 etTyrLeuAspThrProArgTyrArgGlyArgSerTyrHisAspA
 586 GGAAGTCAAAGTTGACCTGGATAGGCTCAATGATGATGCCAAGC
 rgLysSerLysValAspLeuAspArgLeuAsnAspAspAlaLysA
 631 GTTACAGTTGCACTCCCAGGAATTACTCGGTCAATATAAGAGAAG
 rgTyrSerCysThrProArgAsnTyrSerValAsnIleArgGluG
 676 AGCTGAAGTTGGCCAATGTGGTCTTCTTTCCACGTTGCCTCCTCG
 luLeuLysLeuAlaAsnValValPhePheProArgCysLeuLeuV
 721 TGCAGCGCTGTGGAGGAAATTGTGGCTGTGGAAGTGTCAACTGGA
 alGlnArgCysGlyGlyAsnCysGlyCysGlyThrValAsnTrpA
 766 GGTCTGCACATGCAATTCAGGGAAAACCGTGAAAAAGTATCATG
 rgSerCysThrCysAsnSerGlyLysThrValLysLysTyrHisG
 811 AGGTATTACAGTTTGAGCCTGGCCACATCAAGAGGAGGGGTAGAG
 luValLeuGlnPheGluProGlyHisIleLysArgArgGlyArgA
 856 CTAAGACCATGGCTCTAGTTGACATCCAGTTGGATCACCATGAAC
 laLysThrMetAlaLeuValAspIleGlnLeuAspHisHisGluA
 901 GATGTGATTGTATCTGCAGCTCAAGACCACCTCGATAAGAGAATG
 RgCysAspCysIleCysSerSerArgProProArg
 946 TGCACATCCTTACATTAAGCCTGAAAGAACCCTTAGTTTAAGGAG
 991 GGTGAGATAAGAGACCCTTTTCTACCAGCAACCAAACCTACTAC
 1036 TAGCCTGCAATGCAATGAACACAAGTGGTTGCTGAGTCTCAGCCT
 1081 TGCTTTGTTAATGCCATGGCAAGTAGAAAGGTATATCATCAACTT
 1126 CTATACCTAAGAATATAGGATGCAATTAATAATAGTGTGTTGAGG
 1171 TTATATATGCACAAACACACACAGAAATATATTCATGCTATGTG
 1216 TATATAGATCAAATGTTTTTTTTGGTATATATAACCAGGTACACC
 1261 AGAGCTTACATATGTTTGGAGTTAGACTCTTAAAATCCTTTGCCAA
 1306 AATAAGGGATGGTCAAATATATGAAACATGTCTTTAGAAAATTTA
 1351 GGAGATAAATTTATTTTTAAATTTTGAACACAAAACAATTTTGA
 1396 ATCTTGCTCTCTTAAAGAAAGCATCTTGTATATTAATAATCAAAA
 1441 GATGAGGCTTTCTTACATATACATCTTAGTTGATTATTAATAAAG
 1486 GAAAAATATGGTTTCCAGAGAAAAGGCCAATACCTAAGCATTTTT
 1531 TCCATGAGAAGCACTGCATACTTACCTATGTGGACTATAATAACC
 1576 TGTCTCCAAAAC

クローン306664188.0.331は、オープンリーディングフレーム
ヌクレオチド540～936を含む。このオープンリーディングフレームは、1
32アミノ酸（配列番号4）のポリペプチドをコードする。このコードされたポ

リペプチドは、本明細書中で「306664188.0.331タンパク質」または「306664188.0.331ポリペプチド」といわれる。306664188.0.331核酸配列の推定アミノ酸配列は、表2（配列番号4）に示される。

【0049】

クローン306664188.0.331のヌクレオチド50～1472は、クローン30664188.0.99のヌクレオチド406～1828に対して100%同一である。このクローン306664188.0.331タンパク質の132アミノ酸は、30664188.0.99のタンパク質配列のカルボキシ末端領域に100%同一である。従って、クローン30664188.0.99および306664188.0.331の核酸は、このようにして、共通の遺伝子のスプライス改変体として関連付けられる。

【0050】

306664188.0.331タンパク質は、ヒト増殖因子FIGF（c-fos誘導増殖因子；ptnr：SPTREMBL-ACC：043915）、血小板由来増殖因子/血管内皮増殖因子（PDGF/BEGF）ファミリーのメンバー、およびラット血管内皮増殖因子D（ptnr：SPTREMBL-ACC：035251）に対して類似性を示す。

【0051】

（FCR3核酸およびポリペプチド）

本発明に従うFCR3（本明細書内で、PDGFDまたはマウスPDGFDもしくはmPDFGDともいう）核酸およびポリペプチドは、表3（配列番号5および6）に示される核酸およびコードされるポリペプチド配列を含む。FCR3核酸配列は、マウス脳ライブラリーから同定された。推定オープンリーディングフレームは、370アミノ酸長分泌タンパク質についてコードする。このFCR3は、42,808ダルトンの推定分子量および7.53のpIを有する。

【0052】

PFAMおよびPROSITEを使用するタンパク質構造分析は、FCR3

ポリペプチド配列内のコアPDFGドメインを同定した。このドメインのアライメントが、図12に示される。

【0053】

(表3 . FCTR3のヌクレオチド(配列番号5)およびタンパク質(配列番号6)配列)

【0054】

【表3】

1 ATGCAACGGCTCGTTTTAGTCTCCATTCTCCTGTGCGCGAACTTTAGCTGCTATCCGGACACTTTTGGACTCCGCAGAG
M Q R L V L V S I L L C A N F S C Y P D T F A T P Q R

81 AGCATCCATCAAAGCTTTGGCAATGCCAACCTCAGGAGAGATGAGAGCAATCACCTCAGACTTGTACCAGAGAGAGG
A S L K A L R N A N L R R D E S N H L T D L Y Q R E E

161 AGAATTCAGGTGACAAGCAATGGCCATGTGCAGAGTCTCGCTTCCCGAACAGCTACCCAGGAACCTGCTTCTGACA
N I Q V T S N G H V Q S P R F P N S Y P R N L L L T

241 TGGTGGCTCCGTTCCAGGAGAAAACCGGATACAACTGTCTTTGACCATCAATTCGGACTAGAGGAAGCAGAAAATGA
W W L R S Q E K T R I Q L S F D H Q F G L E E A E N D

321 CATTGTAGGTATGACTTTGTGGAAGTTGAAGAAGTCTCAGAGAGCAGCACTGTGTGTCAGAGGAAGATGGTGTGGCCACA
I C R Y D F V E V E E V S E S S T V V R G R W C G H K

401 AGGAGATCCCTCCAAGGATACGTCAAGAACAACCAGATTAATAATCACATTTAAGTCTGATGACTACTTTGTGGCAAAA
E I P P R I T S R T N Q I K I T F K S D D Y F V A K

481 CCTGGATTCAAGATTATTATTATTATTGTTGGAAGATTTCCAACCGGAAGCAGCCTCAGAGACCAACTGGGAATCAGTCAC
P G F K I Y Y S F V E D F Q P E A A S E T N W E S V T

561 AAGCTCTTCTCTGGGGTGTCTATCACTCTCCATCAATAACGGACCCCACTCTCACTGCTGATGCCCTGGCAAAAATG
S S F S G V S Y H S P S I T D P T L T A D A L D K T V

641 TCGCAGAATTCGATACCGTGAAGATCTACTTAAGCACTTCAATCCAGTGTCTTGGCAAGATGATCTGGAGAATTTGTAT
A E F D T V E D L L K H F N P V S W Q D D L E N L Y

721 CTGGACACCCCTCATTATAGAGGCAGGTCAATACCATGATCGGAAGTCCAAAGTGGACCTGGACAGGCTCAATGATGATGT
L D T P H Y R G R S Y H D R K S K V D L D R L N D E V

801 CAAGCGTTACAGTTGCACTCCAGGAATCACTCTGTGAACCTCAGGGAGGAGCTGAAGCTGACCAATGCAGTCTTCTTCC
K R Y S C T P R N H S V N L R E E L K L T N A V F F P

881 CACGATGCCCTCCTCGTGCAGCGCTGTGGTGGCAACTGTGGTTGCGGAAGTGTCAACTGGAAGTCTGCACATGCAGCTCA
R C L L V Q R C G G N C G C G T V N W K S C T C S S

961 GGGAAAGCAGTGAAGAAGTATCATGAGGTATTGAAGTTGAGCCTGGACATTTCAAGAGAAGGGGCAAGCTAAGAATAT
G K T V K K Y H E V L K F E P G H F K R R G K A K N M

1041 GGCTCTTGTGATATCCAGCTGGATCATCATGAGCGATGTGACTGTATCTGCAGCTCAAGACCACCTCGATAA (配列
番号 5)

A L V D I Q L D H H E R C D C I C S S R P P R (配列番号
6).

(F C T R 4 核酸およびポリペプチド)

本発明に従う F C T R 4 (本明細書内で、 P D G F D またはマウス P D G F D もしくは m P D F G D と もいう) 核酸およびポリペプチドは、表 4 (配列番号 7 および 8) に示される核酸およびコードされるポリペプチド配列を含む。 F C T

R4核酸配列は、マウス脳ライブラリーから同定され、そしてFCTR3のサブライス改変体である。しかし、FCTR3と異なり、FCTR4は、PDGF様ドメインの有意な部分を欠く。

【0055】

(表4 . FCTR4のヌクレオチド(配列番号7)およびタンパク質(配列番号8)配列)

【0056】

【表4】

1 ATGCAACGGCTCGTTTTAGTCTCCATTCTCCTGTGCGCGAACTTTAGCTGCTATCCGGACACTTTTGCGACTCCGCAGAG
 M Q R L V L V S I L L C A N F S C Y P D T F A T P Q R

81 AGCATCCATCAAAGCTTTGCGCAATGCCAACCTCAGGAGAGATGAGAGCAATCACCTCACAGACTTGTACCAGAGAGAGG
 A S I K A L R N A N L R R D E S N H L T D L Y Q R E E

161 AGAACATTCAGGTGACAAGCAATGGCCATGTGCAGAGTCCCTCGCTTCCCGAACAGCTACCCAAGGAACCTGCTTCTGACA
 N I Q V T S N G H V Q S P R F P N S Y P R N L L L T

241 TGGTGGCTCCGTTCCAGGAGAAAACACGGATACAACACTGTCCTTTGACCATCAATTCGGACTAGAGGAAGCAGAAAATGA
 W W L R S Q E K T R I Q L S F D H Q F G L E E A E N D

321 CATTGTAGGTATGACTTTGTGGAAGTTGAAGAAGTCTCAGAGAGCAGCACTGTTGTCAGAGGAAGATGGTGTGGCCACA
 I C R Y D F V E V E E V S E S S T V V R G R W C G H K

401 AGGAGATCCCTCCAAGGATAACGTCAAGAACAACCCAGATTAAAATCACATTTAAGTCTGATGACTACTTTGTGGCAAAA
 E I P P R I T S R T N Q I K I T F K S D D Y F V A K

481 CCTGGATTCAAGATTTATTATTTCATTTGTGGAAGATTTCCAACCGGAAGCAGCCTCAGAGACCAACTGGGAATCAGTCAC
 P G F K I Y Y S F V E D F Q P E A A S E T N W E S V T

561 AAGCTCTTTCTCTGGGGTGTCTCTACTCTCCATCAATAACGGACCCCACTCTCACTGCTGATGCCCTGGACAAAACCTG
 S S F S G V S Y H S P S I T D P T L T A D A L D K T V

641 TCGCAGAATTCGATACCGTGGGAAGATCTACTTAAGCACTTCAATCCAGTGTCTTGGCAAGATGATCTGGAGAATTTGTAT
 A E F D T V E D L L K H F N P V S W Q D D L E N L Y

721 CTGGACACCCCTCATTATAGAGGCAGGTCATACCATGATCGGAAGTCCAAAGGTATTGAAGTTTGAGCCTGGACATTCA
 L D T P H Y R G R S Y H D R K S K G I E V (配列番号 10)

801 AGAGAAGGGGCAAAGCTAAGAATATGGCTCTTGTGGATATCCAGCTGGATCATCATGAGCGATGTGACTGTATCTGCAGC
 881 TCAAGACCACCTCGATAA (配列番号 9).

(F C T R 5 核酸およびポリペプチド)

本発明に従う F C T R 5 (本明細書内で、 P D G F D または ヒト P D G F D もしくは h P D F G D と もいう) 核酸およびポリペプチドは、クローン p C R 2 . 1 - S 8 5 2 _ 2 B の核酸およびコードされるポリペプチド配列を含み、そして表 5 (配列番号 9 および 1 0) に示される。 F C T R 5 核酸配列は、 F C T R 1 のスプライス改変体として同定された。

【 0 0 5 7 】

F C T R 1と同様に、タンパク質構造分析プログラムP S O R T、P F A MおよびP R O S I T Eは、F C T R 5が、特徴的なシグナルペプチド(アミノ酸1~23)、P D G Fドメイン(アミノ酸272~362)およびN結合グリコシル化部位(残基276)を含むことを予測した。B L A S T P分析は、ヒトF G T R 5がP D F G C、P D F G BおよびP D F G A(各々、42%、27%および25%の全体アミノ酸同一性)に最も緊密に関連することを明らかにした。ヒトP D F G DとのP D F G C、P D F G BおよびP D F G AのコアP D G Fドメインのアラインメントは、図12に提示される。このアラインメントから、P D F G Dが、他の配列において保存される5番目のシステインがグリシン残基に置換されている鎖内および鎖間ジスルフィド結合に関与する8つの不変システインのうち7つを保有することが明らかである(図12、アスタリスク)。

【0058】

(表5 . F C T R 5 (クローンp C R 2 . 1 - S 8 5 2 _ 2 B) のヌクレオチド(配列番号9)およびタンパク質(配列番号10)配列)

【0059】

【表5】

ATGCACCGGCTCATCTTGTCTACACTCTAATCTGCGCAAACCTTTTGCAGCTGTGCGGACACTTCTGCAA
CCCCGCAGAGCGCATCCATCAAAGCTTTGCGCAACGCCAACCTCAGGCGAGATGTTGACCTGGATAGGCTCAATGA
TGATGCCAAGCGTTACAGTTGCACTCCCAGGAATTACTCGGTCAATATAAGAGAAGAGCTGAAGTTGGCCAAATGTG
GTCTTCTTTCCACGTTGCCTCCTCGTGCAGCGCTGTGGAGGAAATTGTGGCTGTGGAACCTGTCAACTGGAGGTCT
GCACATGCAATTCAGGGAAAACCGTGAAAAAGTATCATGAGGTATTACAGTTTGAGCCTGGCCACATCAAGAGGAG
GGGTAGAGCTAAGACCATGGCTCTAGTTGACATCCAGTTGGATCACCATGAACGATGCGATTGTATCTGCAGCTCA
AGACCACCTCGA (配列番号 9) .

MHRLILFYTLICANFCSCRDTSATPQSASIKALRNANLRRDVDLDRNLNDDAKRYSCTPRNYSVNIREEELK
LANVVFFPRCLLVQRCGGNCGCGTVNWRSCNCGKTVKKYHEVLQFEPGHIKRRGRAKTMLVDIQLDHERCDC
ICSSRPPR (配列番号 10) .

(F C T R 6 核酸およびポリペプチド)

本発明に従うFCTR6（本明細書内で、PDGFDまたはヒトPDGFDもしくはhPDFGDともいう）核酸およびポリペプチドは、クローンpCR2.1-S869__4Bの核酸およびコードされるポリペプチド配列を含み、そして表6（配列番号11および12）に示される。FCTR6核酸配列は、FCTR1のスプライス改変体として同定された。

【0060】

FCTR6は、全長遺伝子（FCTR1）の5'末端の多くを含むが、コード配列の極端な3'末端での潜在性の非コンセンサススプライス部位までスプライスされる。このスプライシングは、このスプライス部位にすぐ下流の終止コドンを導入する。このスプライス改変体は、30664188.0.99のインタクトなCUBドメインを含むが、PDGFドメインを欠失し、このことは、分子の可能な調節機能を示す。

【0061】

しかし、FCTR1と同様に、タンパク質構造分析プログラムPSORT、PFAMおよびPROSITEは、FCTR6が、特徴的なシグナルペプチド（アミノ酸1~23）、CUBドメイン（アミノ酸53~167）およびN結合グリコシル化部位（残基276）を含むことを予測した。BLASTP分析は、ヒトFGTR5がPDFG C、PDFG BおよびPDFG A（各々、42%、27%および25%の全体アミノ酸同一性）に最も緊密に関連することを明らかにした。ヒトPDFGDとのPDFG C、PDFG BおよびPDFG AのコアPDGFドメインのアラインメントは、図12に提示される。このアラインメントから、PDFG Dが、他の配列において保存される5番目のシステインがグリシン残基に置換されている鎖内および鎖間ジスルフィド結合に關与する8つの不変システインのうち7つをを保有することが明らかである（図12、アスタリスク）。

【0062】

（表6．FCTR6（クローンpCR2.1-S869__4B）のヌクレオチド（配列番号11）およびタンパク質（配列番号12）配列）

【0063】

【表6】

ATGCACCGGCTCATCTTTGTCTACACTCTAATCTGCGCAAACCTTTTGCAGCTGTCGGGACACTTCTGCAACCCCGCA
 GAGCGCATCCATCAAAGCTTTGCGCAACGCCAACCTCAGGCGAGATGAGAGCAATCACCTCACAGACTTGTACCGAAGAGATGA
 GACCATCCAGGTGAAAGGAAACGGCTACGTGCAGAGTCCCTAGATTCCCGAACAGCTACCCCGGAACCTGCTCCTGACATGGCG
 GCTTCACTCTCAGGAGAATACACGGATACAGCTAGTGTTTGACAATCAGTTTGGATTAGAGGAAGCAGAAAATGATATCTGTAG
 GTAGAGCTAAGACCATGGCTCTAGTTGACATCCAGTTGGATCACCATGAACGATGCGATTGTATCTGCAGCTCAAGACCACCTC
 GA (配列番号 11).

MHRLIFVYTLICANFCSCRDTSATPOSASIKALRNANLRRDES NHLTDLYRRDETIQVKNGYVQSPREFNSYPRNL
 LLTWRLHSQENTRIQLVFDNQFGLLEEAENDICR (配列番号 12).

前に記載されたBMP-1 VEG-EおよびPDGFポリペプチドに対する開示されたFCRXポリペプチドの類似性は、本発明のFCRX核酸およびポリペプチドによる機能の類似性を示す。これらの有用性は、以下により詳細に記載される。

【0064】

BMP-1がまた、インビボで軟骨の形成を誘導し得る場合、FCRX核酸およびポリペプチドを使用して、軟骨の形成を誘導し得る(Wozneyら、Science 242:1528~34, 1988)。

【0065】

FCRX核酸およびポリペプチドについてのさらなる使用は、コラーゲン形成の調節における。組換え的に発現されたBMP1および精製プロコラーゲンCプロテイナーゼ(PCP)、カルシウムを要求しそして軟骨および骨の形成に必要とされる分泌メタロプロテアーゼは、実際、同一である。Kesslerら、Science 271:360~62(1996)を参照のこと。BMP-1は、プロコラーゲンI、IIおよびIIIのC末端プロペプチドを切断し、そしてこの活性は、プロコラーゲンCエンドペプチダーゼエンハンサータンパク質により増強される。FCRX核酸およびポリペプチドは、コラーゲン調節経路において同様の役割を果たし得る。

【0066】

FCRX核酸およびポリペプチドをまた使用して、種々の癌を起こす(st

age) 得る。例えば、骨転移は、ほとんどたいがい特定の前立腺癌の罹患率および死亡率に相関させることができる。例えば、骨形態形成タンパク質は、種々の癌において重要な役割を有するとして関連づけられる。骨形態形成タンパク質 (BMP) - 4 および BMP - 2 mRNA の過剰発現は、わずかし分化していないタイプの胃癌細胞株において報告された。Kathoら、*J. Gastroenterol* 31(1):137~9(1996)を参照のこと。この観察は、胃癌のびまん性骨形成骨転移を有する患者の貧弱な予後に関する関連性を有し得る。さらに、骨形態形成タンパク質 (BMP) を生成する骨肉腫は、臨床的特徴において、BMP を生成しない骨肉腫とは異なる。Yoshikawara *Cancer* 56:1682~7(1985)を参照のこと。これらは、垂直スピクラにより放射線学的に、破骨細胞型細胞により組織学的に、そして増加した血清アルカリホスファターゼレベル、Adriamycin (ドキソルビシン) および高用量メトトレキサートを用いる手術前科学療法に対する相対耐性、ならびに他の骨および肺に対する転移する傾向により臨床的に、特徴付けられた。

【0067】

VEGF に対する FCTR X ポリペプチドの関連性は、新血管形成における FCTR X 核酸およびポリペプチドの用途を明らかにする。新血管形成は、新たな血管の発生に寄与するプロセスである。新血管形成の間、新たな毛細血管が既存の血管から発生する。Risau *FASEB J.* 9(10):926~33(1995); Risauら、*Ann. Rev. Cell Dev Biol.* 11:73~91(1995)を参照のこと。成人哺乳動物では、新たな血管は、新脈管形成を介して生成される。新脈管形成が病理の出現および維持に寄与する病理学的段階は、腫瘍の発生および増殖を含む。血管内皮増殖因子 F は、新脈管形成に関与することが報告されている。

【0068】

血管内皮増殖因子 (VEGF) は、非ヒトおよびヒトの両方における多くの腫瘍細胞により高レベルで発現されそして分泌される多機能性サイトカインである。Ferrara, *Curr Top Microbiol Immunol* 237:1~30(1999)における概説を参照のこと。VEGF は、少なく

とも2つのレセプター（これは、細胞表面に発現される）を介して血管内皮にその効果を及ぼす。第1は、キナーゼ挿入ドメイン含有レセプター（KDR）/胎児肝臓キナーゼ1（Flk-1）であり、そして第2は、FLT-1である（Warrenら、*J Clin Invest* 95（4）：1789～97（1995））。これらの2つレセプターは、VEGFについて異なる親和性を有し、そして異なる細胞応答を有するようである。Athanasopoulosら、*Placenta* 19（7）：465～73（1998）；Liら、*Cell Res* 9（1）：11～25（1999）を参照のこと。FLT-1ヌルマウスは、胚段階（約8.5日）で死亡し、一方、KDRヌルマウスは、誕生から生存し、そして内皮細胞および造血細胞発生を維持した。KDRの活性化は、有糸分裂誘発ならびにe-酸化窒素シンターゼ（eNOS）および誘導NOS（血管拡張の調節に寄与する酸化窒素経路における酵素であり、そしてこれは、血管腫瘍発生において役割を果たす）の上方制御を生じる。

【0069】

VEGFが、新たに血管を形成するために生存因子として作用することも報告されている。例えば、発生しつつある網膜においては、高酸素症に応答した血管後退は、グリア細胞によるVEGF放出の阻害に相関されてきた。Alonら、*Nat Med* 1（10）：1024～8（1995）を参照のこと。さらに、抗VEGFモノクローナル抗体の投与は、異種移植片の出るにおける既に確立された腫瘍関連血管系の後退を生じる。Yuanら、*Proc Natl Acad Sci USA* 93（25）：14765～70（1996）を参照のこと。従って、FCTRXPオリゴペプチドに対する抗体はまた、新たに形成された血管の後退を誘導するかまたは促進するために使用され得る。

【0070】

腫瘍細胞は、VEGFを分泌することにより低酸素症に対してさらに応答した。この応答は、新生血管形成を促進し、そして引き続き腫瘍増殖させる。さらに、いくつかの腫瘍細胞（造血細胞を含む）（Bellamyら、*Cancer Res* 59（3）：728～33（1999））、乳癌細胞（Speirsら、*Br J Cancer* 80（5～6）：898～903（1999））お

よびカポジ肉腫 (Masoodら、Proc Natl Acad Sci USA 94(3):979~84(1997))が、KDRレセプターを発現することが見出されている。このような結果は、これらの腫瘍において、VEGFが、内皮細胞の増殖および/または生存を刺激し、そして/または腫瘍細胞の生存を促進するために、新脈管形成と同様にパラクリン様式だけでなく、同様にオートクライン機構を介しても作用していることを示唆する。従って、FCTR X抗体、FCTR X核酸の他のアンタゴニストまたはポリペプチド機能による新脈管形成の調節はまた、無酸素症関連状態において、内皮細胞増殖および/または腫瘍細胞(例えば、造血細胞、乳ガン細胞およびカポジ肉腫)を阻害するために使用され得る。

【0071】

FCTR XポリペプチドとVEGFポリペプチドとの間の類似性は、FCTR X核酸およびそれらのコードされるポリペプチドが細胞生存を調節するために使用され得ることを示唆する。VEGFシグナル伝達が細胞生存のために重要であることは報告されている。レセプター(VEGFレセプター-2(VEGFR-2/F1k1/KDR))へのVEGFの結合は、VE-カドヘリン、 β -カテニン、ホスホイノシチド-3-OHキナーゼ(PI3-K)およびKDR.PI3-Kの複合体(この複合体は、リン酸化によりセリン/スレオニンプロテインキナーゼAkt(プロテインキナーゼB)を活性化する)の形成を誘導することが報告される。Carmelietら, 1999 Cell 98(2):147~57を参照のこと。次いで、活性化Aktは、VEGF依存性生存シグナルを媒介するに必要かつ十分であると考えられる。Gerberら, 1998 J Biol Chem 273(46):30336~43を参照のこと。これらの知見は、VEGFシグナル伝達と細胞生存との間に関係が存在することを示す。

【0072】

FCTR XポリペプチドとPDGFポリペプチドとの間の類似性は、FCTR X核酸とそれらのコードされるポリペプチドが、治療および診断適用において使用され得ることを示唆する。例えば、FCTR X核酸およびそれらのコードされ

るポリペプチドは、癌、心臓血管疾患および線維症疾患ならびに糖尿病性潰瘍を処置するために使用され得る。さらに、F C T R X 核酸およびそれらのコードされる配列は、遺伝子治療を介する動脈瘤の阻止および創傷閉鎖の加速に治療的に有用である。さらに、F C T R X 核酸およびそれらのコードされるポリペプチドは、細胞増殖を刺激するために使用され得る。

【0073】

本発明に従うF C T R X 核酸を使用して、種々の細胞型（癌性細胞を含む）を同定するために使用され得る。例えば、実施例7は、クローン30664188.0.99（配列番号1）が、CNS癌、肺癌および卵巣癌において特異的に強力に発現されることを示す。この実施例において、配列番号1が、HEK293細胞のトランスフェクトから生じる馴化培地中でインタクトなままであるか、またはタンパク質分解される、遺伝子産物を産生することもまた示される。実施例13に示される証拠は、この実施例において報告された実験において活性である、30664188.0.99タンパク質（配列番号2）の形態が、この30664188.0.99タンパク質のタンパク質分解産物であることを示唆する。これらの物質の1つまたは両方に起因する活性としては、DNAへのBrdUの取り込み、細胞数の増加によってモニターされるような正味のDNA合成を刺激する能力、培養物において細胞を形質転換する能力、およびインビボで腫瘍形成を誘導する能力が挙げられる。これらの種々の活性は、種々の細胞型において生じる。

【0074】

F C T R X 核酸または遺伝子産物（例えば、配列番号2または配列番号4をコードする核酸）は、創傷治癒の促進、新生血管形成および腫瘍増殖、および類似の組織再生要件における、治療剤として有用である。より詳細には、F C T R X 核酸またはポリペプチドは、貧血および白血球減少症、腸管過敏症（intestinal tract sensitivity）および禿頭症の処置において有用である。このような状態の処置は、例えば、照射または化学療法を受けている患者に望ましくあり得る。このような場合において、F C T X 核酸またはポリペプチド（例えば、配列番号2または配列番号3のアミノ酸配列を含むポリペ

プチド、またはこれらのポリペプチドをコードする核酸配列（例えば、配列番号1または配列番号3）の投与は、任意の過剰増殖性の副作用を最少化するような用量で制御されることが意図される。

【0075】

あるいは、FCTR X核酸が高レベルで発現される（例えば、配列番号1が高レベルで発現される）腫瘍（CNSの癌および卵巣癌）の場合において、FCTR X核酸または遺伝子産物（例えば、配列番号2または配列番号4、あるいはこれらのポリペプチドのうちの1つをコードする核酸）の産生の効果を阻止または排除することが所望される。例えば、これは、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドあるいはそのフラグメントに対する抗体の投与によって達成され得る。特に、抗体は、本明細書中に同定される活性フラグメントp35（実施例を参照のこと）に対して指向され得る。代替的な例は、p85からのp35の形成に関与する推定プロテアーゼの同定を含む（実施例を参照のこと）。このプロテアーゼの活性を特異的に阻害し、他のプロテアーゼの活性を阻害しない物質の投与は、FCTR Xポリペプチド（例えば、30664188・0・99ポリペプチド）の活性p35形態の形成を妨げるのに効果的である。

【0076】

悪性疾患進行および本明細書中に記載の遺伝子発現プロファイルにおける、FCTR Xポリペプチドおよび核酸に関連する分子（例えば、BMP-1およびVEGF様ポリペプチド（例えば、ファロテイン（fallotin））の役割に基づいて、ヒト神経膠腫および卵巣上皮癌のサブセットについて、抗体を使用するFCTR Xポリペプチドの標的化は、腫瘍増殖、マトリクス浸潤、化学耐性、放射線耐性および悪性播種に対する阻害効果を有することが予測される。種々の実施形態において、このFCTR Xポリペプチドは、モノクローナル抗体、ヒト化抗体または完全なヒト抗体に連結される。

【0077】

さらに、染色体位置分析（実施例15を参照のこと）に基づいて、PDGFD核酸は、染色体11q23-24に局在する。Dマップに対するこの染色体遺伝子座は、種々の新形成（A. Ferti - Passantonopoulou ,

A. Panani, S. Raptis, Cancer Genet. Cytogenet. 51, 183 - 188 (1991); M. Tarkkanenら、Genes Chromosomes Cancer 25, 323 - 331 (1999) およびヤコブセン症候群(これは、異常な増殖因子発現によって部分的に説明され得る)(E. Pivnickら、J. Med. Genet. 33, 772 - 778 (1996))において変更されている、ゲノムの不安定性の領域である(H. Kurahashiら、Hum. Mol. Genet. 9, 1665 - 1670 (2000))。ヤコブセン症候群は、脳顔面頭蓋異常、心臓欠陥、腺異常および脳発達の欠失によって特徴付けられる(E. Pivnickら、(1996))。従って、本発明に従うFCTR X核酸およびポリペプチドは、これらの疾患状態の種々の診断適用および治療適用において使用され得る。

【0078】

さらに、およそ11q23 - 24遺伝子座の増幅または欠失を生じる再編成が、乳癌(A. Ferti - Passantonopoulou, A. Panani, S. Raptis, Cancer Genet. Cytogenet. 51, 183 - 188 (1991); K. Shenら、J. Surg. Oncol. 74, 100 - 107 (2000))、原発性肉腫、それらの肺転移(M. Tarkkanenら(1999))および骨髄性白血病(L. Michauxら、Genes Chromosomes Cancer 29, 40 - 47 (2000); P. Crossen, L. Savage, D. Heaton, M. Morrison, Cancer Genet. Cytogenet. 112, 144 - 148 (1999))において報告されている。従って、本発明に従うFCTR X核酸、ポリペプチドおよび抗体はまた、これらの癌の検出および処置における診断適用および治療適用を有し得る。

【0079】

FCTR Xポリペプチドは、腫瘍新生血管形成の程度を潜在的にブロックまたは制限し得る。潜在的な抗体治療剤の古典的様式の投与に加え、新しく開発された投与様式が有用であり得る。例えば、外科的切除後の原発性脳腫瘍の処置のための、¹³¹I標識モノクローナル抗体の局所投与が、報告されている。さらに、

モノクローナル抗体およびそれらのフラグメントの直接的な定位的脳内注射もまた、臨床的または前臨床的に研究されている。頸動脈間高浸透圧灌流は、薬物結合体化ヒトモノクローナル抗体を用いて、原発性の脳の悪性疾患を標的化するための実験的ストラテジーである。

【0080】

さらに、本発明の核酸、ならびにそのフラグメントおよび改変体は、非限定的な例として、以下のために使用され得る：(a)組換え遺伝子産物または異種遺伝子産物として、この対応するコードタンパク質、ポリペプチド、フラグメントおよび改変体の生合成を指向するため、(b)本明細書中に開示される核酸の検出および定量のためのプローブとして、(c)アンチセンス分子を調製するための配列テンプレートとして、など。このような用途は、以下の開示においてより十分に説明する。

【0081】

さらに、本発明のタンパク質およびポリペプチド、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体は、(a)抗FCRX抗体の産生を刺激するための免疫原として作用する、(b)このような抗体についての免疫原性アッセイにおける捕捉抗原、および(c)本発明のFCRXポリペプチドに結合する物質のスクリーニングのための標的として、これらを含む方法において、使用され得る。FCRX核酸、ポリペプチド、抗体、アゴニスト、アンタゴニストおよび他の関連化合物についての、これらの有用性および他の有用性を、以下により十分に開示する。細胞増殖の調節におけるその強力な効果を考慮して、FCRXポリペプチドの発現または活性の増加は、細胞生存を促進するために使用され得る。反対に、FCRXポリペプチド発現における減少は、細胞死を誘導するために使用され得る。

【0082】

(FCRX核酸)

本発明の新規核酸は、FCRXポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分をコードする核酸を含む。これらの核酸には、配列番号2、4、6、8、10および12の1以上のアミノ酸配列を含むFCRXポリペプチドをコードする

核酸が含まれる。いくつかの実施形態において、配列番号2、4、6、8、10および12の1以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸は、配列番号1、3、5、7、9および11のいずれかの核酸配列、またはそのフラグメントを含む。

【0083】

さらに、本発明のFCTRX核酸には、配列番号1、3、5、7、9および11のいずれかの変異体または改変体核酸、あるいはそれらのフラグメントが含まれ、これらの任意の塩基は、その開示された配列から変化され得るが、FCTRX様活性および生理学的な機能を維持するタンパク質をなおコードする。本発明はさらに、配列番号1、3、5、7、9および11のいずれかの核酸配列の相補体（そのフラグメント、誘導體、アナログおよびホモログを含む）をさらに含む。本発明はさらに、その構造に化学修飾が含まれる、核酸もしくは核酸フラグメント、またはその相補体を含む。

【0084】

本発明のFCTRX核酸は、FCTRXポリペプチドの成熟形態をコードし得る。本明細書中で使用される場合、ポリペプチドの「成熟」形態またはタンパク質は、天然に存在するポリペプチドまたは前駆体形態またはプロタンパク質の産物をいう。天然に存在するポリペプチド、前駆体形態またはプロタンパク質としては、非限定的な例として、その対応する遺伝子によりコードされる、全長遺伝子産物が含まれる。あるいは、これらは、本明細書中に開示されるオープンリーディングフレームによりコードされるポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質として規定され得る。産物の「成熟」形態は、また非限定的な例として、天然に存在する1以上のプロセッシング工程（これらの工程が、この遺伝子産物が生じる細胞または宿主細胞内で起こる場合）の結果として生じる。ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態に導くこのようなプロセッシング工程の例としては、オープンリーディングフレームの開始コドンによりコードされるN末端メチオン残基の切断、あるいはシグナルペプチド配列またはリーダー配列のタンパク質分解切断が挙げられる。従って、残基1～N（ここで、残基1は、N末端メチオンである）を有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態

は、このN末端メチオニンの除去後に残存する、残基2～Nを有する。あるいは、残基1～N（ここで、残基1～MのN末端シグナル配列が切断される）を有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟形態は、残りの残基M+1～残基Nを有する。さらに、「成熟」タンパク質またはフラグメントは、開始メチオニンの除去またはシグナルペプチドの除去以外の切断事象により生じ得る。さらに、本明細書中で使用される場合、ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解事象以外の、翻訳後修飾の工程から生じ得る。このようなさらなるプロセスとしては、非限定的な例として、グリコシル化、ミリスチル化またはリン酸化が挙げられる。一般に、成熟ポリペプチドまたはタンパク質は、これらのプロセスの1つのみまたはこれらの任意の組み合わせの操作から生じ得る。

【0085】

F C T R Xポリペプチドをコードする核酸（例えば、配列番号2または配列番号4をコードするF C T R X mRNA）を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用について十分な核酸フラグメント、およびF C T R X核酸分子の増幅または変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（P C R）プライマーとしての使用のためのフラグメントもまた含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチドアナログを使用して生成されたDNAまたはRNAのアナログ、ならびにそれらの誘導體、フラグメントおよびホモログを含むことを意図する。核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0086】

「プローブ」とは、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、用途に依存して、少なくとも約10ヌクレオチド（nt）、100nt、または、例えば、約6,000ntほどの大きさの間である。プローブは、同一、類似または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長いプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から入手され（しかし、これらは、同様に化学合成により調製され得る）、非常に特異的かつオリゴマーよりもはるかに遅くハイブリダイズ

する。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得、そしてPCR、メンブレンベースのハイブリダイゼーション技術またはELISAのような技術において特異性を有するように設計される。

【0087】

「単離された」核酸分子は、この核酸の天然の供給源中に存在するその他の核酸分子から分離された核酸分子である。単離された核酸分子の例としては、ベクター中に含まれる組換えDNA分子、異種宿主細胞中に維持される組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成DNAまたはRNA分子が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、「単離された」核酸は、この核酸が由来する生物のゲノムDNA中でこの核酸に天然に隣接する配列（すなわち、この核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態で、単離されたFCTR X核酸分子は、この核酸が由来する細胞のゲノムDNA中でこの核酸に天然で隣接する、約50 kb、25 kb、5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kbまたは0.1 kb未満のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技術により産生される場合、その他の細胞物質または培養培地を実質的に含まないものであり得るか、または化学的に合成される場合、化学物質前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。

【0088】

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

OTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993に記載されるような)を用いて単離され得る。

【0089】

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

【0090】

本明細書で用いられる場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、PCR反応で用いられるに十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づき得るか、またはそれから設計され得、そして特定の細胞もしくは組織において、同一、類似もしくは相補的DNAまたはRNAを増幅し、確認し、もしくはその存在を示すために用いられる。オリゴヌクレオチドは、約10nt、50ntまたは100ntの長さ、好ましくは約15nt~30ntの長さを有する核酸配列の部分を含む。1つの実施形態では、100ntより少ない長さの核酸分子を含むオリゴヌクレオチドは、さらに、配列番号1、3、5、7、9および11の少なくとも6個連続するヌクレオチド、またはその相補体を含む。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得、そしてプローブとして用いられ得る。

【0091】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9および11のいずれかに示されるヌクレオチド配列の相補体である核酸分子を含む。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9および11のいずれかに示されるヌクレオチド配列の相補体である核酸分子またはそのヌクレオチド配列の一部を含む。配列番号1、3、5、7、9

および11に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9および11に示されるヌクレオチド配列に十分相補的である核酸分子であり、配列番号1、3、5、7、9および11に示される核酸配列に対しミスマッチがほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二本鎖を形成する。

【0092】

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

【0093】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9および11の核酸配列の一部のみ（例えば、プローブまたはプライマーとして使用され得るフラグメント、あるいはFCRXの生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）を含み得る。本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6個の（連続する）核酸または少なくとも4個の（連続する）アミノ酸（それぞれ、核酸の場合には、特異的ハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な長さ、またはアミノ酸の場合には、エピトープの特異的な認識を可能にするに十分な長さ）の配列として規定され、そして多くとも全長配列未満のいくらかの部分である。フラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。「誘導體」は、直接的にかまたは改変もしくは部分的置換によってかのいずれかで、ネイティブな化合物から形成される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、そのネイティブな化合物に類似する（しかし、同一では

ない)構造を有するが、特定の成分または側鎖に関してそのネイティブな化合物とは異なる、核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成物であり得るか、または進化的に異なる起源に由来し得、そして野生型と比較して、類似の代謝活性または反対の代謝活性を有し得る。

【0094】

誘導体およびアナログは、全長であり得るか、または、以下に記載のように、その誘導体またはアナログが、修飾された核酸またはアミノ酸を含む場合、全長以外のものであり得る。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログとしては、種々の実施形態において、同一の大きさの核酸またはアミノ酸配列にわたって、または整列化した配列(この整列化は、当該分野で公知であるコンピューター相同性プログラムによって行う)と比較した場合に、少なくとも約70%、80%、85%、90%、95%、98%、もしくは99%もの同一性(好ましい同一性は、80~99%)で、本発明の核酸もしくはタンパク質に実質的に相同である領域、あるいはそのコードする核酸が、ストリンジェント条件下、中程度のストリンジェント条件下、または低いストリンジェント条件下で、上記のタンパク質をコードする配列の相補体にハイブリダイズし得る領域を含む分子が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993、および以下を参照のこと。例示的なプログラムは、デフォルト設定を使用する、Gapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package、Version 8 for UNIX(登録商標)、Genetics Computer Group、University Research Park、Madison、WI)であり、これは、SmithおよびWatermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math.、1981、2:482-489、これらは、その全体が参考として本明細書中に援用される)を使用する。

【0095】

「相同な核酸配列」もしくは「相同なアミノ酸配列」、またはその改変体とは

、上記で考察したように、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおける相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同なヌクレオチド配列は、F C T R Xポリペプチドのアイソフォームをコードする配列をコードする。アイソフォームは、例えば、RNAの選択的スプライシングの結果として、同一の生物の異なる組織において発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、相同なヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（哺乳動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられ得る）のF C T R Xポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同なヌクレオチド配列はまた、天然に存在する対立遺伝子改変体および本明細書に記載されるヌクレオチド配列の変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、相同的ヌクレオチド配列は、ヒトF C T R Xタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない。相同核酸配列は、配列番号2、4、6、8、10および12、ならびにF C T R X活性を有するポリペプチドのいずれかにおける、保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）をコードする核酸配列を含む。F C T R Xタンパク質の生物学的活性は以下に記載されている。

【0096】

本明細書中で使用される場合、「同一な」残基は、2つの配列間の比較における同一の残基に対応し、ここで、2つの配列のアラインメントにおける等価なヌクレオチド塩基またはアミノ酸残基が、同じ残基である。1つのアラインメントにおける2つの配列間の比較により、比較における等価な位置における残基が、同じアミノ酸または以下に規定される保存アミノ酸のいずれかであることが示される場合に、残基は、「類似」または「ポジティブ」として代替的に記載される。

【0097】

ヒトF C T R X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、開示された細胞型の同定ならびに/または他の細胞型（例えば、他の組織由来）におけるF C T R Xタンパク質ホモログおよび他の哺乳動物由来のF C T R Xホモログのクローニングにおける使用のために設計される、プローブおよびプライマ

一の作製を可能にする。このプローブ/プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号1、3、5、7、9および11の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号1、3、5、7、9および11のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいは配列番号1の天然に存在する変異体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【0098】

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

【0099】

「FCTRXの生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような、本発明のポリペプチドの活性に類似する（しかし、必ずしも同一ではない）活性を示すポリペプチド（成熟形態を含む）をいう。「FCTRXポリペプチドの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、本明細書中に開示されるようなFCTRXの生物学的活性を有するポリペプチドをコードする配列番号1または3の一部を単離し、そのFCTRXタンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてこのFCTRXポリペプチドのコードされた部分の活性を評価することによって、調製され得る。

【0100】

(F C T R X 改変体)

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、開示される F C T R X ヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含する。従って、これらの核酸は、配列番号 1、3、5、7、9 および 11 に示されるヌクレオチド配列によりコードされるのと同じ F C T R X タンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号 2、4、6、8 および 10 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0101】

配列番号 1、3、5、7、9 および 11 のいずれかに示されるヒト F C T R X ヌクレオチド配列に加えて、F C T R X のアミノ酸配列における変化を導く DNA 配列多型が、集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることが、当業者によって理解される。F C T R X 遺伝子中のこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、F C T R X タンパク質、好ましくは哺乳動物の F C T R X タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のバリエーションは、代表的には、F C T R X 遺伝子のヌクレオチド配列において 1 ~ 5 % の変動性を生じる。任意のおよび全てのヌクレオチドのバリエーション、および天然の対立遺伝子バリエーションの結果でありそして F C T R X の機能的活性を変化させない F C T R X 遺伝子の得られたアミノ酸多型は、本発明の範囲内であることが意図される。

【0102】

さらに、他の種由来の F C T R X タンパク質をコードし、従って、配列番号 1、3、5、7、9 および 11 のいずれかのヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明の F C T R X c DNA の天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、本明細書中に開示されるヒト F C T R X 核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼー

ション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとして、そのヒトcDNAまたはその一部を用いて、単離され得る。

【0103】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも6ヌクレオチド長であり、そして配列番号1、3、5、7、9および11のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも10、25、50、100、250、500または750ヌクレオチド長である。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する条件を記載することを意図し、この条件下では、互いに最小の程度の類似性を超えるヌクレオチド配列が、代表的に、互いにハイブリダイズしたままである。例えば、課されたストリンジェンシーの程度に依存して、互いに少なくとも約60%相同なヌクレオチド配列がハイブリダイズし得る。

【0104】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズし；必要に応じて、そのプローブは、その他の配列に最適にはハイブリダイズせず、そしてより一般的には、そのプローブに対する特定の程度の類似性未満の配列にハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況において異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHで、特定の配列についての熱融解点(T_m)より約5℃低く選択される。この T_m は、標的配列に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする(規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度下)温度である。標的配列は一般に過剰に存在するので、 T_m では、プローブの50%が平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジェントな条件は、pH7.0~8.3で、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオン未満、代表的には約0.01~1.0Mナトリウムイオン(またはその他の

塩)、そして温度は、短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10nt~50nt)については少なくとも約30℃、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについては少なくとも約60℃であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

【0105】

上記のようなストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そしてCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%または約99%同一な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500mg/ml変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液中での65℃でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションの後に0.2×SSC、0.01% BSA中での50℃での1回以上の洗浄が続く。ストリンジェント条件下で配列番号1、3、5、7、9および11いずれかの配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する(例えば、天然のタンパク質をコードする)ヌクレオチド配列を有する、RNA分子またはDNA分子をいう。

【0106】

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

【0107】

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

【0108】

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

, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; ShiloおよびWeinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78:6789-6792を参照のこと。

【0109】

(保存的変異)

集団中に存在し得る、F C T R Xヌクレオチド配列の天然に存在する対立遺伝子改変体(例えば、遺伝子配列)に加えて、当業者は、配列番号1、3、5、7、9、および11のいずれかのヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、F C T R Xタンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされるF C T R Xタンパク質のアミノ酸配列に変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号1、3、5、7、9、および11のいずれかの配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更することなく、F C T R Xポリペプチドの野生型配列から変更され得る配列中のある位置における残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされるある位置における残基である。例えば、F C T R Xタンパク質ファミリー(これは、本発明のF C T R Xタンパク質がメンバーである)のメンバー間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される。

【0110】

例えば、本発明に従うF C T R Xタンパク質は、典型的にF C T R Xタンパク質ファミリーメンバー中の保存領域である少なくとも1つのドメインを含み得る。そのようなので、これらの保存されたドメインは、変異を受けそうにない。しかし、他のアミノ酸残基(例えば、F C T R Xタンパク質ファミリーのメンバーの間の、ほとんど保存されていない残基)は、活性に必須でないかもしれず、従って、おそらくより変更を受けやすい。

【0111】

本発明の別の局面は、活性に必須ではない配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列に関連して、アミノ酸残基に変化を含むF C T R Xタンパク質をコード

する核酸分子に関する。1つの実施形態において、この単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10および12のいずれかのアミノ酸配列に対して、少なくとも約75%の類似性であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、この核酸によってコードされるタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10および12のいずれかに少なくとも約80%相同性であり、より好ましくは配列番号2に少なくとも約90%、約95%、約98%相同性であり、そして最も好ましくは少なくとも約99%相同性である。

【0112】

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

【0113】

変異は、標準技術（例えば、部位指向型変異誘発およびPCR媒介変異誘発）によって配列番号1、3、5、7、9、および11に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で規定されている。特定のアミノ酸は、1より多くの分類可能な特徴を有する側鎖を有する。これらのファミリーとしては、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アルパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、トリプトファン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、チロシン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を

有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。従って、F C T R Xポリペプチド中の推定された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、F C T R Xコード配列の全てまたは一部に沿って（例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって）ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、F C T R Xポリペプチドの生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。配列番号1、3、5、7、9、および11の変異誘発に続いて、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そしてこのタンパク質の活性が決定され得る。

【0114】

アミノ酸ファミリーの関連性がまた、側鎖の相互作用に基づいて決定され得る。置換されたアミノ酸は、完全に保存された「強い」残基であっても、完全に保存された「弱い」残基であってもよい。保存アミノ酸残基の「強い」基は、以下の群：S T A、N E Q K、N H Q K、N D E Q、Q H R K、M I L V、M I L F、H Y、F Y Wのうちのいずれか1つであり得、ここで、1文字アミノ酸コードは、互いに置換され得るアミノ酸によってグループ化される。同様に、保存残基の「弱い」基は、以下：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のうちのいずれか1つであり得る。

【0115】

1つの実施形態では、変異体F C T R Xポリペプチドは、以下についてアッセイされ得る：（1）他のF C T R Xタンパク質、他の細胞表面タンパク質、または生物学的に活性なそれらの部分と、タンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、（2）変異体F C T R Xタンパク質とF C T R Xレセプターとの間の複合体形成；（3）変異体F C T R Xタンパク質が細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力；（例えば、アビジンタンパク質）；（4）B R Aタンパク質に結合する能力；あるいは（5）F C T R Xポリペプチドに対する抗体に特異的に結合する能力。

【0116】

他の実施形態において、変異体FCTRXタンパク質は、腫瘍形成を誘導するその能力、または細胞（例えば、NIH 3T3細胞）をトランスフォームするその能力に関して、以下の実施例に記載されるようにアッセイされ得る。

【0117】

（アンチセンスFCTRX核酸）

本発明の別の局面は、FCTRX核酸にハイブリダイズし得るかまたは相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関し、例えば、このアンチセンス核酸は、配列番号1、3、5、7、9、および11、またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に相補的であり得る。

「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である）ヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、少なくとも約10、約25、約50、約100、約250もしくは約500ヌクレオチドのFCTRXコード鎖もしくは全体のFCTRXコード鎖、またはそれらの一部のみに相補的な配列を含む、アンチセンス核酸分子が提供される。配列番号2、4、6、8、10および12のいずれかのFCTRXタンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、または配列番号1、3、5、7、9、および11のFCTRXの核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

【0118】

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、FCTRXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含む、ヌクレオチド配列の領域をいう（例えば、配列番号2、4、6、8、10および12のいずれかに対応する、FCTRXポリペプチドのタンパク質コード領域）。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、FCTRXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する、アミノ酸に翻訳され

ない、5'配列および3'配列をいう(すなわち、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域ともいわれる)。

【0119】

本明細書中に開示されるFCTRXコード鎖配列(例えば、配列番号1、3、5、7、9、および11)は、アンチセンス核酸がWatsonおよびCrickまたはHoogsteenの塩基対合の規則に従って設計されることを可能にする。アンチセンス核酸分子は、FCTRX mRNAのコード領域全体に対して相補的であり得る。あるいは、アンチセンス核酸分子は、FCTRX mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドであり得る。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、FCTRX mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45または約50ヌクレオチドであり得る。

【0120】

本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学的合成または酵素連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)は、天然に存在するヌクレオチド、またはこの分子の生物学的安定性を増大させるように、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるように設計された種々に改変されたヌクレオチドを用いて化学的に合成され得る(例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る)。

【0121】

アンチセンス核酸を作製するために用いられ得る改変されたヌクレオチドの例としては以下が挙げられる: 5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β-D-ガラクトシルクエオシン(galactosylqueosine)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチ

ルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 - D - マンノシルクエオシン (mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2 , 6 - ジアミノプリン。あるいは、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る (すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下の小節にさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である)。

【0122】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果それらは、FCTRXタンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれらに結合し、それによってこのタンパク質の発現を、例えば転写および/または翻訳を阻害することによって阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によってか、または例えばDNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主溝における特異的相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身に投与される。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され

得る。これは、例えば、そのアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによる。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、アンチセンス核酸分子が強力な *pol I* プロモーターまたは *pol III* プロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が、一般的に好ましい。

【0123】

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

【0124】

このような改変としては、非制限的な例として、改変塩基、および糖リン酸骨格が改変または誘導体化された核酸が挙げられる。これらの改変は、少なくとも一部は、改変された核酸の化学的安定性を増強するために実施され、その結果、それらは、例えば、被験体での治療的適用におけるアンチセンス結合核酸として使用され得る。

【0125】

FCRXリボザイムもまた、本発明の範囲内である。リボザイムは、一本鎖核酸 (例えば、FCRX mRNA) を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子であり、これらは、その一本鎖核酸に対して相補領域を有する。従って、リボザイム (例えば、ハンマーヘッド型リボザイム (HaselhoffおよびGerlach (1988) *Nature* 334:585~591に記載される)) を使用して、FCRX mRNA転写物を触媒的に切断

し、それによってF C T R X mRNAの翻訳を阻害し得る。F C T R Xをコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示されるF C T R X核酸のヌクレオチド配列(すなわち、配列番号1、3、5、7、9、および11)に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、F C T R XをコードするmRNA内で切断されるヌクレオチド配列に相補的である、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体が構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号;およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、F C T R X mRNAを使用して、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性RNAを選択し得る。例えば、Bartelら(1993)Science 261:1411~1418を参照のこと。

【0126】

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

【0127】

種々の実施形態において、F C T R X核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、その分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変して、ペプチド核酸を生成し得る(Hyrupら(1996)Bioorg Med Chem 4:5~23を参照のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置換され、そして4つの天然の核塩基(nucleobase)のみが保持されている核酸模倣物(例えば、DNA模倣物)をいう。PNAの中性の

骨格は、低いイオン強度の条件下でDNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、上記のHyrupら(1996); Perry-O'Keefeら(1996) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 93:14670~675において記載されるような標準的固相ペプチド合成プロトコルを用いて行われ得る。

【0128】

FCTRX核酸に基づくPNAは、治療適用および診断適用において使用され得る。例えば、PNAは、例えば転写または翻訳の停止を誘導することまたは複製を阻害することによる、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子剤として使用され得る。FCTRX核酸に基づくPNAはまた、例えばPNA指向性PCRクランピングによる遺伝子における一塩基対変異の分析において;他の酵素(例えば、S1ヌクレアーゼ)と組み合わせて使用される場合の人工制限酵素として(Hyrup B. (1996) 上記);またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプローブもしくはプライマーとして(Hyrupら(1996) 上記; Perry-O'Keefe (1996) 上記)、使用され得る。

【0129】

さらなる実施形態において、FCTRX核酸のPNAは、例えば、それらの安定性または細胞性取り込みを増強するために、PNAに脂溶性基または他のヘルパー基を結合することによって、PNA-DNAキメラの形成によって、またはリポソームもしくは当該分野において公知の薬物送達の他の技術の使用によって改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組合せ得る、この核酸のPNA-DNAキメラが生成され得る。PNA部分が高い結合親和性および特異性を提供する一方で、そのようなキメラは、DNA認識酵素(例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼ)がDNA部分と相互作用するのを可能にする。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング、核塩基間の結合数および方向を考慮して選択される適切な長さのリンカーを使用して連結され得る(Hyrup (1996) 上記)。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup (19

96) 上記および Finnら (1996) Nucl Acids Res 24 : 3357 ~ 63 において記載されるように行われ得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホラミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ (例えば、5' - (4 - メトキシトリチル) アミノ - 5' - デオキシ - チミジンホスホラミダイト) が、PNAとDNAの5'末端との間に使用され得る (Magら (1989) Nucl Acid Res 17 : 5973 ~ 88)。次いで、PNAモノマーが段階様式でカップリングされ、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する (Finnら (1996) 上記)。あるいは、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを用いて、キメラ分子が合成され得る。Petersenら (1975) Bioorg Med Chem Lett 5 : 1119 ~ 11124を参照のこと。

【0130】

他の実施形態において、FCTRX核酸またはFCTRXアンチセンス核酸は、以下のような他の付属の基を含み得る：ペプチド (例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するため)、または細胞膜を横切る輸送を容易にする因子 (例えば、Letsingerら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 : 6553 ~ 6556 ; Lemaitreら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. 84 : 648 ~ 652 ; PCT公開番号WO88/09810を参照のこと)、または血液脳関門 (例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと)。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断剤 (例えば、Krolら、1988、BioTechniques 6 : 958 ~ 976を参照のこと)、またはインターカレーター剤 (例えば、Zon, 1988、Pharm. Res. 5 : 539 ~ 549を参照のこと) で改変され得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子 (例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤など) に結合され得る。

【0131】

(FCTRXポリペプチド)

本発明のF C T R Xポリペプチドは、その配列が配列番号2または4に提供されるタンパク質を含む。本発明はまた、成熟形態のF C T R Xポリペプチドならびに変異体形態もしくは改変体形態のF C T R Xポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、変異体F C T R Xまたは改変体F C T R Xは、任意の残基が図1に示される対応する残基から変更され得るが、なおそのF C T R X用活性および生理学的機能を維持するタンパク質、またはその機能的フラグメントをコードするタンパク質を含む。本発明は、上記の改変体F C T R X核酸によってコードされるポリペプチドを含む。この変異体または改変体タンパク質において、20%以上の残基がそのように変化され得る。

【0132】

一般に、F C T R X機能を保持するF C T R Xポリペプチド改変体は、配列中の特定位置の残基が他のアミノ酸により置換された任意のF C T R Xポリペプチド改変体を含む。F C T R X改変体ポリペプチドとしてはまた、親タンパク質の2つの残基間にさらなる残基が導入されたF C T R Xポリペプチド、ならびに1つ以上の残基が参照F C T R Xポリペプチド配列から欠失されたタンパク質挙げられる（例えば、配列番号2もしくは配列番号4、または配列番号2もしくは配列番号4の成熟形態）。従って、参照F C T R Xポリペプチド配列（例えば、配列番号2もしくは配列番号4、または配列番号2もしくは配列番号4の成熟形態）に対して任意のアミノ酸置換、挿入または欠失が、本発明に包含される。いくつかの実施形態において、変異タンパク質または改変体タンパク質は、参照F C T R X配列に対して1つ以上の置換、挿入または欠失を含み得る。

【0133】

本発明はまた、単離されたF C T R Xタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモロを含む。抗F C T R X抗体を惹起するための免疫原としての使用に適するポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態では、ネイティブなF C T R Xタンパク質が、標準的なタンパク質精製技法を用いる適切な精製スキームにより、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態では、F C T R Xタンパク質は、組換えDNA技法により生産される。組換え発現の代替えとして、F C T

R Xタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技法を用いて化学的に合成され得る。

【0134】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、F C T R Xタンパク質の由来する細胞または組織供給源由来の細胞性物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、あるいは化学合成される場合に化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、F C T R Xタンパク質の調製物を含み、この調製物において、F C T R Xタンパク質が単離または組換え産生される細胞の細胞性成分から、F C T R Xタンパク質は分離されている。1つの実施形態において、用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、非F C T R Xタンパク質（本明細書中において「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは非F C T R Xタンパク質を約20%未満、なおより好ましくは非F C T R Xタンパク質を約10%未満、そして最も好ましくは非F C T R Xタンパク質を約5%未満有する、F C T R Xタンパク質の調製物を含む。F C T R Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合、これらはまた好ましくは、培養培地を実質的に含まない。すなわち、培養培地は、そのタンパク質調製物の容量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満を示す。

【0135】

用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質が、そのタンパク質の合成に関与する化学前駆体または他の化学物質から分離されているF C T R Xタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態において、用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、化学前駆体または非F C T R Xポリペプチドを約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは化学前駆体または非F C T R Xポリペプチドを約20%未満、なおより好ましくは化学前駆体または非F C T R Xポリペプチドを約10%未満、そして最も好ましくは化学前駆体または非F C T R Xポリペプチドを約5%未満有する、F C T R Xタンパク質の調製物を含む。

【0136】

F C T R Xタンパク質の生物学的に活性な部分は、全長F C T R Xタンパク質より少ないアミノ酸を含み、そしてF C T R Xタンパク質の少なくとも1つの活性を示す、F C T R Xタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列）に十分に相同なアミノ酸配列、またはこのF C T R Xタンパク質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、F C T R Xタンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。F C T R Xタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、長さが10、25、50、100またはそれより多いアミノ酸であるポリペプチドであり得る。

【0137】

本発明のF C T R Xの生物学的に活性な部分は、F C T R Xファミリータンパク質間に保存される上記の同定されたドメインの少なくとも1つを含み得る。さらに、タンパク質の他の領域が欠失している他の生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブなF C T R Xタンパク質の機能的活性のうちの1つ以上について評価され得る。

【0138】

いくつかの実施形態において、F C T R Xタンパク質は、以下に詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なるが、配列番号2、4、6、8、10、および12のいずれかに実質的に相同であり、そして配列番号2、4、6、8、10、および12のいずれかのタンパク質の機能的活性を保持する。従って、別の実施形態において、F C T R Xタンパク質は、配列番号2、4、6、8、10、および12のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約45%相同な、そしてより好ましくは約55、65、70、75、80、85、90、95、98、またはなお99%相同なアミノ酸配列を含み、そして、配列番号2、4、6、8、10、および12の配列を有する対応するポリペプチドのF C T R Xタンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

【0139】

(2つ以上の配列間の相同性の決定)

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の相同性のパーセントを決定するために、配列は、至適な比較の目的のために整列される(例えば、ギャップは、配列間の最適な整列について比較される配列のいずれかに導入され得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と等価である)。

【0140】

核酸配列の相同性は、2つの配列間の同一性の程度として決定され得る。相同性は、当該分野において公知のコンピュータープログラム(例えば、GCGプログラムパッケージにおいて提供されるGAPソフトウェア)を用いて決定され得る。NeedlemanおよびWunsch 1970 J Mol Biol 48:443~453を参照のこと。核酸配列比較のための以下の設定(GAP作製ペナルティー、5.0、およびGAP伸長ペナルティー、0.3)を用いてGCG GAPソフトウェアを使用すると、上記で言及される類似の核酸配列のコード領域は、配列番号1、3、5、7、9、および11に示されるDNA配列のCDS(コード)部分と、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の同一性の程度を示す。配列同一性の程度を決定するための等価なソフトウェア手順が当該分野で広く公知であり、本文脈中に使用され得る。

【0141】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、特定の比較領域にわたって、残基毎を基準として同一である程度をいう。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、以下により算出される:この比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較すること、両方の配列において同一の核酸塩基(例えば、核酸の場合にはA、TもしくはU、C、G、またはI)が生じる位置の数を決定し、一致した位置の数を導くこと、この一致した位置の数

を、比較領域の内の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）で除算すること、およびその結果を100で乗算して、配列同一性のパーセンテージを導くこと。用語「実質的な同一性」は、本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここでこのポリヌクレオチドは、比較領域にわたり参照配列と比較して、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の配列同一性、そして頻繁には90～95%の配列同一性、より通常には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。用語「陽性（positive）残基のパーセンテージ」は、以下により算出される：その比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較すること、同一のアミノ酸および保存的アミノ酸の置換が、上記のように両方の配列で生じる位置の数を決定し、一致した位置の数を導くこと、この一致した位置の数を、比較領域中の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）で除算すること、およびその結果を100で乗算して、陽性残基のパーセンテージを導くこと。

【0142】

（キメラFCRXタンパク質および融合FCRXタンパク質）

本発明はまた、FCRXキメラタンパク質またはFCRX融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、FCRX「キメラタンパク質」またはFCRX「融合タンパク質」は、非FCRXポリペプチドに作動可能に連結された、FCRXポリペプチドを含む。「FCRXポリペプチド」は、FCRXポリペプチド、またはそのフラグメント、改変体もしくは誘導体に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、「非FCRXポリペプチド」は、FCRXタンパク質に対して実質的に相同ではないタンパク質（例えば、FCRXタンパク質とは異なり、かつ同一でかまたは異なる生物体由来するタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。従って、FCRX融合タンパク質において、このFCRXポリペプチドは、FCRXタンパク質のすべてまたは一部分に対応し得る。1つの実施形態では、FCRX融合タンパク質は、FCRXタンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態では、FCRX融合タンパク質は、FCRXタンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質

において、用語「作動可能に連結された」は、F C T R Xポリペプチドおよび非F C T R Xポリペプチドが、インフレームで互いに融合されていることを示すことが意図される。非F C T R Xポリペプチドは、F C T R XポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

【0143】

例えば、1つの実施形態では、F C T R X融合タンパク質は、第2のタンパク質の細胞外ドメインに作動可能に連結されたF C T R Xポリペプチドを含む。このような融合タンパク質は、F C T R X活性を調節する化合物についてのスクリーニングアッセイでさらに利用され得る（このようなアッセイは、以下に詳細に記載される）。

【0144】

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

【0145】

さらに別の実施形態において、融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を含むF C T R Xタンパク質である。例えば、ネイティブなF C T R Xシグナル配列は、取り除かれて、別のタンパク質由来のシグナル配列で置換され得る。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、F C T R Xの発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用を介して増加され得る。

【0146】

さらなる実施形態においては、この融合タンパク質は、F C T R X - 免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここでは1つ以上のドメインを含むF C T R X配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合される。本発明のこのF C T R X - 免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に取り込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でF C T R XリガントとF C T R Xタンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボのF C T R X媒介シグナル伝達を抑制し得る。1つの例においては、意図される

本発明のFCTR Xリガンドは、FCTR Xレセプターである。このFCTR X - 免疫グロブリン融合タンパク質を用い、FCTR X同族リガンドのバイオアベイラビリティを調節し得る。FCTR Xリガンド/FCTR X相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害の両方の処置、および細胞生存を調節（例えば、促進または阻害）することに、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのFCTR X - 免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗FCTR X抗体を産生するための免疫原として用いられ得、FCTR Xリガンドを精製し、そしてFCTR XリガンドとのFCTR Xの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。本発明のFCTR Xキメラタンパク質またはFCTR X融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントは、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着（stagger）末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合、粘着（cohesive）末端の充填、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を採用することにより、インフレームで一緒に連結される。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅は、キメラ遺伝子配列を生成するために次いでアニールおよび再増幅され得る、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的な張り出しを生じるアンカープライマーを用いて実施され得る（例えば、Ausbelら（編）CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと）。さらに、融合成分（例えば、GSTポリペプチド）を既にコードした多くの発現ベクターが市販されている。FCTR Xをコードする核酸は、この融合成分がFCTR Xタンパク質にインフレーム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

【0147】

（FCTR Xアゴニストおよびアンタゴニスト）

本発明はまた、FCTR Xアゴニスト（模倣物）またはFCTR Xアンタゴニストのいずれかとして機能するFCTR Xタンパク質の改変体に関する。FCTR

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

【0148】

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

クレオチドを合成する方法は当該分野で公知である（例えば、Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraら (1984) Annu Rev Biochem 53:323; Itakuraら (1984) Science 198:1056; Ikeら (1983) Nucl Acid Res 11:477を参照のこと）。

【0149】

（ポリペプチドライブラリー）

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

【0150】

点変異または短縮化により作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、選択された性質を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該分野で公知である。このような技法を、FCRXタンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、およびこのコンビナトリアル遺伝子を、所望

の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセブル変異誘発 (REM) を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、FCTRX 改変体を同定し得る (Ark in および Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave ら (1993) Protein Engineering 6:327-331)。

【0151】

(抗FCTRX抗体)

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン (Ig) 分子の免疫学的に活性な部分 (すなわち、抗原に特異的に結合する (免疫反応する) 抗原結合部位を含む分子) をいう。このような抗体としては、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、 F_{ab} フラグメント、 F_{ab} フラグメントおよび $F_{(ab)2}$ フラグメント、ならびに F_{ab} 発現ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。一般的に、ヒト由来の抗体分子は、IgG、IgM、IgA、IgE および IgD の任意のクラスに関連し、これらは分子内に存在する重鎖の性質によって互いに異なる。特定のクラスは同様にサブクラス (例えば、 IgG_1 、 IgG_2 など) を有する。さらに、ヒトにおいては、軽鎖は鎖または鎖であり得る。本明細書中で抗体に対する参照は、ヒト抗体種のすべてのこのようなクラス、サブクラスおよび型に対する参照を含む。

【0152】

本発明の単離されたタンパク質は、抗原、またはその一部もしくはフラグメントとして働くことが意図され得、そしてさらに、免疫原として使用され、ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体の調製のための標準的な技術を用いて、抗原を免疫特異的に結合する抗体を生成し得る。全長タンパク質が使用され得るか、あるいは本発明は、免疫原として使用するための抗原の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。抗原性ペプチドフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸配列 (例えば、配列番号 2、4、6、8、10、および 12 において示される

アミノ酸配列)の少なくとも6アミノ酸残基を含み、そしてそれらのエピトープを含み、その結果このペプチドに対して惹起された抗体は、全長タンパク質またはこのエピトープを含む任意のフラグメント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、または少なくとも15アミノ酸残基、または少なくとも20アミノ酸残基、または少なくとも30アミノ酸残基を含む。この抗原性ペプチドにより含まれる好ましいエピトープは、そのペプチド表面上に位置するタンパク質の領域であり；通常、これらは親水性領域である。

【0153】

本発明の特定の実施形態では、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも1つのエピトープは、タンパク質の表面上に位置するF C T R Xの領域、例えば、親水性領域である。ヒトF C T R X関連タンパク質配列の疎水性分析は、F C T R Xポリペプチドのどの領域が特に親水性であるか、そしてそれ故、抗体産生を標的化するために有用な表面残基をコードするようであることを示す。抗体産生を標的化する手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換と伴うかまたは伴わないのいずれかでの、K y t e D o o l i t t l e法またはH o p p W o o d s法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、それらの全体が本明細書に参考として各々援用される、H o p pおよびW o o d s、1981、P r o c . N a t . A c a d . S c i . U S A 78:3824-3828；K y t eおよびD o o l i t t l e 1982、J . M o l . B i o l . 157:105-142を参照のこと。抗原性タンパク質またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモログ内の1つ以上のドメインに対して特異的な抗体はまた、本明細書中で提供される。

【0154】

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

【0155】

当該分野において公知の種々の手順が、本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログに対して指向されるポリクロナール抗体またはモノクロナール抗体の産生のために使用され得る（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, および Lane D, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。これらの抗体のうちのいくつかは、以下で考察される。

【0156】

（ポリクロナール抗体）

ポリクロナール抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の動物）は、ネイティブなタンパク質、その合成改変体、または前記の誘導体を用いる1以上の注射によって免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然に存在する免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質を提示する化学的に合成されたポリペプチド、または組換え的に発現される免疫原性タンパク質を含み得る。さらに、このタンパク質は、免疫される哺乳動物において免疫原性であることが公知の第2のタンパク質に結合体化され得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、および大豆トリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。この調製物はさらに、アジュバントを含み得る。種々のアジュバントが免疫学的応答を増加させるために使用され得、このようなアジュバントとしては、フロインド（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニック（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど）、ヒトにおいて使用可能なアジュバント（例えば、Bacille Calmette-Guérin および Corynebacterium parvum）または類似の免疫刺激剤が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、MPL-TDMアジュバント（モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコ

レート)が挙げられる。

【0157】

免疫原性タンパク質に対して指向されるポリクロナール抗体分子は、哺乳動物から(例えば、血液から)単離され得、そして周知の技術(例えば、プロテインAまたはプロテインGを用いるアフィニティクロマトグラフィー(これは、主に免疫血清のIgG画分を提供する))によってさらに精製され得る。続いて、または代替的に、求められている免疫グロブリンの標的である特異的抗原またはそのエピトープがカラムに固定され、免疫アフィニティクロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製し得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkinson (The Scientist (The Scientist, Inc., Philadelphia PAより発行)、第14巻、第8号(2000年4月17日)、25~28頁)によって考察される。

【0158】

(モノクローナル抗体)

本明細書で用いられる場合、用語「モノクローナル抗体」(MAb)または「モノクローナル抗体組成物」は、独特の軽鎖遺伝子産物および独特の重鎖遺伝子産物からなる唯一の分子種の抗体分子を含む抗体分子の集団をいう。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、集団のすべての分子に同一である。従って、MAbは、抗原への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免疫反応可能な抗原結合部位を含む。

【0159】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法(例えば、当該分野において記載されるような方法)を使用して調製され得る。例えば、KohlerおよびMilstein, Nature, 256:495(1975)を参照のこと。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物は、免疫因子で代表的に免疫され、免疫因子に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生し得るリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

【0160】

免疫因子としては、代表的に、タンパク質抗原、そのフラグメントまたはその融合タンパク質が挙げられる。一般的には、以下のいずれかである：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、または非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合は、脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用される。次いで、適切な融合因子（例えば、ポリエチレングリコール）を使用して、リンパ球を不死化細胞株に融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, *Monoclonal Antibodies: PRINCIPLES AND PRACTICE*, Academic Press (1986)、59~103頁）。不死化細胞株は、哺乳動物細胞、特にげっ歯類起源、ウシ起源およびヒト起源の骨髓腫細胞に通常形質転換される。通常、ラットまたはマウスの骨髓腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、1以上の物質（融合されていない不死化細胞の増殖も生存も阻害する）を適切に含む適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親の細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRT）を欠く場合、ハイブリドーマについての培養培地は、代表的にヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み（「HAT培地」）、それらの物質はHGPRT欠失細胞の増殖を阻害する。

【0161】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合する細胞株であり、それらは選択された抗体産生細胞によって抗体の安定な高レベルの発現を支持し、そしてHAT培地のような培地に感受性である。より好ましい不死化細胞株はマウス骨髓腫細胞株であり、それらを、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CaliforniaおよびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginiaから得ることが可能である。ヒト骨髓腫細胞株およびマウス-ヒト骨髓腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載される（例えば、Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeurら、MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATION, Marcel Dekker, Inc., New York, (

1987)第51-63頁を参照のこと)。

【0162】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって決定されるか、またはインビトロ結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)もしくは酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA))によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、スキャッチャード分析によって決定され得る。例えば、MunsonおよびPollard, Anal. Biochem., 107: 220(1980)を参照のこと。標的抗原に対する高い程度の特異性および高結合親和性を有する抗体を同定することが、モノクローナルの治療的適用において特に重要な目的である。

【0163】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、希釈手順を限定することによって、クローンをサブクロニングし得、そして標準方法によって増殖し得る(Godding, 1986)。この目的のために適切な培養培地としては、例えば、ダルベッコ変法イーグル培地およびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物内の腹水としてインビボで増殖され得る。

【0164】

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

【0165】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号に記載される方法)によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプロ

ープを使用することによって)容易に単離され得、そして配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として働く。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに配置され得、次いでそれらは、宿主細胞(例えば、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髓腫細胞)にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖定常ドメインおよびヒト軽鎖定常ドメインについてのコード配列の置換(米国特許第4,816,567号; Morrison, Nature 368, 812-13(1994))によってか、または非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列のすべてまたは一部の配列をコードする免疫グロブリンへの共有結合的な連結によって改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常領域に置換され得るか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変領域に置換され得、キメラの二価抗体を作製する。

【0166】

(ヒト化抗体)

本発明のタンパク質抗原に対する抗体は、さらにヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。これらの抗体は、投与された免疫グロブリンに対してヒトによる免疫応答を引き起こさないヒトへの投与に適する。抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または他の抗体の抗原結合サブ配列)であり、それらは主にヒト免疫グロブリンの配列から構成され、そして非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列についてのげっ歯類CDRまたはCDR配列の置換によって、Winterおよ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))に従って達成され得る。(米国特許第5,225,539号もまた参照のこと。)。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFv骨格(fr

amework) 残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエントの抗体においても、移入されたCDRまたは骨格配列においても見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、すべての少なくとも1つ、および代表的には2つの可変ドメインを実質的に含む。これらの領域内で、すべてのまたは実質的にすべてのCDR領域は非ヒト免疫グロブリンの領域に対応し、そしてすべてまたは実質的にすべての骨格領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の領域に対応する。ヒト化抗体はまた、必要ならば、免疫グロブリン定常領域(Fc)(代表的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域)の少なくとも一部を含む(Jonesら、1986; Riechmannら、1988; およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992))。

【0167】

(ヒト抗体)

CDRを含む軽鎖および重鎖の両方の全体配列がヒト遺伝子から生じる抗体分子に、完全なヒト抗体は本質的に関連する。このような抗体を、「ヒト抗体」、または「完全なヒト抗体」と本明細書中で呼ぶ。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ(trioma)技術; ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら、1983 Immunol Today 4:72を参照のこと)およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁を参照のこと)によって調製され得る。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施において使用され得、そしてヒトハイブリドーマの使用(Coteら、1983 Proc Natl Acad USA 80:2026-2030を参照のこと)によってか、またはインビトロでのエプスタインバーウイルスでのヒトB細胞の形質転換(Coleら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁を参照のこと)によって産生され得る。

【0168】

さらに、ヒト抗体はまた、さらなる技術(ファージディスプレイライブラリー(HoogenboomおよびWinter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marksら、J. Mol. Biol., 222:581(1991))を含む)を使用して産生され得る。同様に、ヒト免疫グロブリン位置をトランスジェニック動物(例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が、部分的または完全に不活化されているマウス)に導入することによって、ヒト抗体は作製され得る。チャレンジに際して、ヒト抗体産生が観察され、このことはすべての点(遺伝子再配列、アセンブリー、および抗体レパートリーを含む)でヒトにおいて観察されたものに密接に類似する。このアプローチは、例えば、以下に記載される: 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,611,016号、および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)); ならびにLonbergおよびHuszar(Intern. Rev. Immunol. 13 65-93(1995))。

【0169】

ヒト抗体は、抗原によるチャレンジに应答して動物の内因性抗体よりもヒト抗体を十分に産生するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を使用して、さらに産生され得る。(刊行物WO94/02602を参照のこと。)。非ヒト宿主における免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖をコードする内因性遺伝子は、耐えられなくなっており、そしてヒト重鎖免疫グロブリンおよびヒト軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な位置は、宿主のゲノムに挿入される。例えば、要求性ヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を使用して、ヒト遺伝子は組み込まれる。次いで、すべての所望の改変を提供する動物を、改変の完全な相補体よりもより少ない改変の相補体を含む中間トランスジェニック動物を

交雑することによって子孫として得る。このような非ヒト動物の好ましい実施形態は、マウスであり、PCT刊行物WO96/33735およびWO96/34096に開示されるようにXenomous™と呼ばれる。この動物は、ヒト免疫グロブリンを十分に分泌するB細胞を産生する。目的の免疫原での免疫後の動物から（例えば、ポリクローナル抗体の調製）、あるいは動物由来の不死化されたB細胞（例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ）から、抗体を直接得ることが可能である。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子は、抗体を直接得るために回復され得かつ発現され得るか、または抗体のアナログ（例えば、1本鎖Fv分子）を得るために、さらに改変され得る。

【0170】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主（マウスとして例証される）を作製するための方法の例は、米国特許第5,939,598号に開示される。それを、以下の工程を包含する方法によって得ることが可能である：座の再配列を防ぎ、そして、再配列された免疫グロブリン重鎖座の転写物の形成、および選択マーカーをコードする遺伝子を含む標的化ベクターによってもたらされる欠失を防ぐために、胚性幹細胞における少なくとも1つの内因性重鎖座由来のJセグメント遺伝子を欠失する工程；ならびにトランスジェニックマウス（その体細胞および生殖細胞は、選択マーカーをコードする遺伝子を含む）を、胚性幹細胞から作製する工程。

【0171】

目的の抗体（例えば、ヒト抗体）を産生する方法は、米国特許第5,916,771号に開示される。それは、以下の工程を包含する：重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、培養物中の1つの哺乳動物宿主細胞に導入する工程、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、別の哺乳動物宿主細胞に導入する工程、およびハイブリッド細胞を形成するために2つの細胞融合する工程。ハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。

【0172】

この手順のさらなる改善において、免疫原上の臨床的に関連するエピトープを同定する方法、および関連するエピトープに高い親和性で免疫特異的に結合する抗体を選択するための関連する方法は、PCT刊行物WO99/53049に開示される。

【0173】

(F_{ab} フラグメントおよび単鎖抗体)

技術は、本発明の抗原性タンパク質に特異的な単鎖抗体の産生に適用され得る(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、方法は、 F_{ab} 発現ライブラリーの構築に適用され得(例えば、Huseら、1989 Science 246:1275-1281を参照のこと)、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対して所望の特異性を有するモノクローナル F_{ab} フラグメントの迅速かつ効果的な同定を可能にする。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメント((i)抗体分子のペプシン消化によって産生される $F_{(ab')_2}$ フラグメント;(ii) $F_{(ab')_2}$ フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって産生された F_{ab} フラグメント;(iii)ペプシンおよび還元剤を用いた抗体分子の処理によって産生された F_{ab} フラグメント、ならびに(iv) F_v フラグメントを含むが、これらに限定ない)は、当該分野で公知の技術によって産生され得る。

【0174】

(二重特異的抗体(bispecific antibodies))

二重特異的抗体は、モノクローナル抗体(好ましくはヒトモノクローナル抗体またはヒト化されたモノクローナル抗体)であって、これは少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有する。この場合において、結合特異性の1つは、本発明の抗原性タンパク質に対してである。第2の結合標的は、任意の他の抗原であり、そして有利には細胞表面タンパク質あるいはレセプターまたはレセプターサブユニットである。

【0175】

二重特異的抗体を作製する方法は、当該分野で公知である。伝統的に、二重特異的抗体の組換え生成は、2つの免疫グロブリンの重鎖/軽鎖の対の同時発現に

基づき、ここでこの2つの重鎖は異なる特異性を有する (MilsteinおよびCuello、Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせのために、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の異なる抗体分子の潜在的混合物を作製し、このうち1つのみが正確な二重特異的構造を有する。この正確な分子の精製は、通常アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順は、1993年5月13日に公開されたWO93/08829、およびTraunckerら、1991 EMBO J., 10:3655-3659において開示される。

【0176】

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

【0177】

WO96/27011に記載される別の手段に従って、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するために操作され得る。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置換される。大きな側鎖に同一のサイズまたは同様のサイズの代償的な「空洞」は、大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖(例えば、アラニンまたはスレオニン)で置換することによって、第2の抗体分子の界面上に作製され

る。このことは、ホモダイマーのような他の不必要な最終生成物よりも、ヘテロダイマーの収量を増加するための機構を提供する。

【0178】

二重特異的抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、 $F(ab')_2$ 二重特異的抗体）として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を作製するための技術は、文献において記載される。例えば、二重特異的抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Brennanら、*Science* 229: 81 (1985) は、インタクトな抗体がタンパク分解的に切断されて $F(ab')_2$ フラグメントを作製する手順を記載する。これらのフラグメントは、ビスナルジチオールを安定化し、そして分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール錯化剤ナトリウム亜ヒ酸塩の存在下で還元される。次いで、この作製された $F(ab')$ フラグメントは、チオニトロベンゾエート (TBN) 誘導体に変換される。次いで、 $F(ab') - TBN$ 誘導体の1つは、メルカプトエチルアミンでの還元によって $F(ab') -$ チオールに再変換され、そしてこれは等モル量の他の $F(ab') - TBN$ 誘導体と混合されて二重特異的抗体を形成する。生成された二重特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

【0179】

さらに、 $F(ab')$ フラグメントは、*E. coli* から直接回収され得、そして化学的にカップリングされて二重特異的抗体を形成する。Shalabyら、*J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) は、完全にヒト化された二重特異的抗体 $F(ab')_2$ 分子の生成を記載する。各 $F(ab')$ フラグメントは、*E. coli* から別々に分泌され、そして指向されたインビトロの化学的カップリングに供され、二重特異的抗体を形成する。従って、形成されたこの二重特異的抗体は、Erbb2レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合し得、そしてヒト乳癌標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解性活性を誘因し得る。

【0180】

組換え細胞培養物から直接二重特異的抗体フラグメントを作製し、そして単離するための種々の技術もまた、記載されてきた。例えば、二重特異的抗体は、口

イシンジッパーを使用して産生される。K o s t e l n y ら、J . I m m u n o l . 1 4 8 (5) : 1 5 4 7 - 1 5 5 3 (1 9 9 2) 。 F o s タンパク質および J u n タンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体の F a b ' 部分に結合される。この抗体ホモダイマーは、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで再度酸化され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産生のために利用され得る。H o l l i n g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 (1 9 9 3) に記載されるこの「ディアボディー (d i a b o d y) 」技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための代替的な機構を提供した。このフラグメントは、短すぎて同じ鎖上の2つのドメインの間を対にできないリンカーによって軽鎖可変領域 (V_L) に接続された重鎖可変領域 (V_H) を含む。従って、1つのフラグメントの V_H ドメインおよび V_L ドメインは、別のフラグメントの相補的な V_L ドメインおよび V_H ドメインと対になるように強制され、これによって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーの使用によって二重特異的抗体フラグメントを作製するための別の戦略もまた、報告されてきた。G r u b e r ら、J . I m m u n o l . 1 5 2 : 5 3 6 8 (1 9 9 4) を参照のこと。

【0181】

2より多い以上の結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る。T u t t ら、J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 (1 9 9 1)

。

【0182】

例示的な二重特異的抗体は、2つの異なるエピトープに結合し得、このうち少なくとも1つは、本発明のタンパク質抗原に起源を有する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞の防御機構に焦点を合わせるように、T細胞レセプター分子(例えば、CD2、CD3、CD28、またはB7)、あるいはIgGに対するFcレセプター(FcR)(例えば、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16))のような白血球上のトリガーする分子に結合するアーム

に結合され得る。二重特異的抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に対して細胞傷害性因子を指向するために使用され得る。これらの抗体は、抗原結合アーム、および細胞傷害性因子または放射性核種キレーター（例えば、EOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETA）を結合するアームを保有する。目的の別の二重特異的抗体は、本明細書中に記載のタンパク質抗原を結合し、そしてさらに組織因子（TF）を結合する。

【0183】

（ヘテロ結合体化抗体）

ヘテロ結合体化抗体はまた、本発明の範囲内である。ヘテロ結合体化抗体は、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、免疫系細胞を不必要な細胞に標的化するために（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の処置のために（WO91/00360；WO92/200373；EP03089）提案されてきた。この抗体（架橋剤を含む抗体を含む）は、インビトロで、合成タンパク質化学において公知の方法を使用して調製され得ることが意図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応の使用またはチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第4,676,980号において開示される試薬が挙げられる。

【0184】

（エフェクター機能操作）

本発明の抗体を、エフェクター機能について、例えば癌の処置における抗体の効力を増大するように改変することが望ましい。例えば、システイン残基は、Fc領域に導入され得、これによってこの領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にする。従って、作製されるこのホモダイマー抗体は、改良されたインターナリゼーションの可能性および/または増加した補体媒介細胞死滅、ならびに抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を有し得る。Caronら、1192、J. Exp. Med.、176：1191-1195およびShopes、1992、J. Immunol. 148：2918-2922を参照のこと。増大した

抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体はまた、Wolffら、1993、Cancer Research、53:2560-2656に記載されるヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、抗体は操作され得、これは二重のFc領域を有し、そしてこれによって増大した補体溶解およびADCCの可能性を有し得る。Stevensonら、1989、Anti-Cancer Drug Design、3:219-230を参照のこと。

【0185】

(免疫接合体)

本発明はまた、細胞傷害性の薬剤(例えば、化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素学的に活性な毒素、あるいはそれらのフラグメント)、または放射性同位体(すなわち、放射性接合体))に結合体化した抗体を含む免疫接合体に関する。

【0186】

このような免疫接合体の作製において有用な化学療法剤は、上記に記載される。使用され得る酵素学的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(Pseudomonas aeruginosa由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、 α -サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、Phytolacca americanaタンパク質(PAPI、PAPII、およびPASP)、モモルディカチャラチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcun)、クロチン(crotin)、セパオナリアオフィシナリス(sepaonaria 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)、およびトリコテセン(tricothecen)が挙げられる。種々の放射性核種は、放射性結合した抗体の作製のために利用可能である。その例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re が挙げられる。

【0187】

抗体および細胞傷害性因子の接合体は、種々の二官能性タンパク質結合因子（例えば、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール) プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (iminothiolane) (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート HCL）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド (glutarelddehyde)）、ビスアジド化合物（例えば、ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン）、ビス - ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン 2 , 6 - ジイソシアネート）、およびビス - 活性フッ素化合物（例えば、1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン））を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、Science, 238 : 1098 (1987) に記載されるように調製され得る。炭素 - 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結合のための例示的なキレート剤である。WO94 / 11026を参照のこと。

【0188】

別の実施形態において、腫瘍の前標的化における利用のために、この抗体は、「レセプター」（例えば、ストレプトアビジン）に結合され得、ここで抗体 - レセプター接合体は患者に投与され、続いて除去剤を使用して結合していない接合体が循環から除去され、次いで細胞傷害性因子に次々に結合体化される「リガンド」（例えば、アビジン）が投与される。

【0189】

（免疫リポソーム）

本明細書中に開示された抗体は、免疫リポソームとして処方され得る。この抗体を含むリポソームは、当該分野で公知の方法によって調製される（例えば、Epsteinら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 3688 ; Hwangら、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 4030 ; および米国特許第 4 , 485 , 045号および

同第4, 544, 545号において記載される)。増強された循環時間を有するリポソームは、米国特許第5, 013, 556号に開示される。

【0190】

特に、有用であるリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物との逆層蒸発法によって生成され得る。リポソームは、規定された孔径のフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームを生じる。本発明の抗体のFab'フラグメントは、Martinら、1982、J. Biol. Chem., 257:286-288に記載のようにジスルフィド交換反応を介してリポソームに結合体化され得る。化学治療剤(例えば、ドキソルビシン)は、必要に応じてリポソーム内に含まれ得る。Gabizonら、1989、J. National Cancer Inst., 81(19):1484を参照のこと。

【0191】

(本発明のタンパク質に対して指向された抗体の診断的適用)

本発明のタンパク質に対して指向される抗体は、タンパク質の局在および/または定量化に関連する、当該分野で公知の方法において使用され得る(例えば、適切な生理学的サンプル内のタンパク質のレベルの測定における使用のため、診断方法における使用のため、タンパク質の画像化における使用のためなど)。所定の実施形態では、タンパク質に対する抗体または抗原結合ドメインを含むその誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログは、薬理学的に活性な化合物として使用される(以下を参照のこと)。

【0192】

本発明のタンパク質に特異的な抗体は、標準技術(例えば、免疫親和性クロマトグラフィまたは免疫沈降)によって、タンパク質を単離するために用いられ得る。このような抗体は、細胞からの天然のタンパク質抗原の精製および宿主細胞において発現される組換え的に産生された抗原の精製を容易にし得る。さらに、抗原タンパク質の発現の量およびパターンを評価するために、このような抗体を用いて(例えば、細胞の溶解液または細胞上清における)抗原タンパク質を検出

し得る。このタンパク質に対して指向される抗体は、例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質にカップリングする（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン(dichlorotriazinylamine)フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ、そして、適切な放射性物質の例としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

【0193】

(抗体の薬学的組成物)

本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体、ならびに本明細書中で開示されるスクリーニングアッセイによって同定される他の分子は、薬学的組成物の形態で種々の障害の処置のために投与され得る。このような組成物を調製する際に関する原理および考慮、ならびに成分の選択の際の手引きは、例えば、RemingtonのThe Science And Practice Of Pharmacy 第19編(Alfonso R. Gennaroら、編) Mack Pub. Co., Easton, Pa: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; およびPeptide And Protein Drug Deliver

y (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4)、1991、M. Dekker, New York. に提供される。

【0194】

抗原性タンパク質が、細胞内にあり、そして完全な抗体が、インヒビターとして使用される場合、抗体を内在化することが、好ましい。しかし、リポソームはまた、抗体または抗体フラグメントを細胞に送達するために使用され得る。抗体フラグメントが、使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の抑制フラグメントが、好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を維持するペプチド分子が、設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得、そして/または組み換えDNA技術によって産生され得る。例えば、Marascoら、1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893を参照のこと。本明細書中の処方物はまた、処置される特定の指標について必要な1より多くの活性化化合物を含み得、好ましくは、互いに悪影響を与えない相補的活性を有する化合物を含み得る。あるいは、またはさらに、この組成物は、その機能を増強する薬剤（例えば、細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤または増殖抑制剤のような）を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効である量で組み合わせて適切に存在する。

【0195】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術または界面重合化によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン - マイクロカプセルおよびポリ - (メタクリル酸メチル) マイクロカプセル) で、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンにおいてトラップされ得る。

【0196】

インビボ投与のために使用される処方物は、滅菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0197】

(抗体療法)

本発明の抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、および完全なヒト抗体を含む）は、治療剤として使用され得る。このような薬剤は、一般的に、被験体における疾患および病理を処置または予防するために使用される。抗体調製物（好ましくは、その標的抗原について高い特異性および高い親和性を有するもの）は、被験体に対して投与され、そして一般的に、その標的との結合に起因して効果を有する。このような効果は、所定の抗体分子と問題の標的抗原との間の相互作用の特異的性質に依存して、2つの種類のうちの1つであり得る。第1の例では、抗体の投与は、標的が天然に結合する内因性リガンドとその標的との結合を抑止または阻害し得る。この場合、抗体は、標的に結合し、そして天然に存在するリガンドの結合部位をマスクし、ここでそのリガンドは、エフェクター分子として働く。従って、レセプターは、シグナル伝達経路を媒介し、リガンドが、シグナル伝達に関係する。

【0198】

あるいは、その効果は、標的分子上のエフェクター結合部位への結合によって、抗体が生理学的結果を誘発するものであり得る。この場合、標的（存在し得ないかまたは疾患もしくは病理を欠損し得る内因性リガンドを有するレセプター）が、代理のエフェクターリガンドとして抗体を結合して、レセプターによって、レセプターに基づくシグナル伝達事象を開始する。

【0199】

治療的に有効な量の本発明の抗体は、治療目的を達成するために必要とされる量を一般的にいう。上記のように、これは、ある場合において標的の機能を妨害し、そして他の場合において生理学的応答を促進する、抗体とその標的抗原との間の結合相互作用であり得る。投与されるために必要とされる量は、その特異的抗原についての抗体の結合親和性にさらに依存し、そしてまた、その量は、投与される抗体が、その抗体が投与される自由な体積の他の被験体から枯渇される速度に依存する。本発明の抗体または抗体フラグメントの治療的有効用量の一般的な範囲は、非限定的な量として、約0.1 mg/kg体重～約50 mg/kg体重である。一般的な投薬の頻度は、例えば、毎日2回～1週間に1回の範囲であ

り得る。

【0200】

(FCTRX組換え発現ベクターおよび宿主細胞)

本発明の別の局面は、FCTRXタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、核酸分子が結合された別の核酸を輸送し得るその核酸分子をいう。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これはさらなるDNAセグメントが連結し得る環状の二本鎖DNAループをいう。ベクターの別の型はウイルス性ベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントはこのウイルス性ゲノムに連結され得る。特定のベクターは宿主細胞中で自発的に複製し得、この中に導入される(例えば、細菌の複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソームの哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳類ベクター)は、宿主細胞に導入される際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そしてこれによって宿主のゲノムと同調して複製される。さらに、特定のベクターは、これが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、このプラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるため、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、ウイルス性ベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような発現ベクターのこのような他の形態を含むことを意図し、これは等価な機能を果たす。

【0201】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で含み、これはこの組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基いて選択される1つ以上の調節配列を含むこと意味し、これは発現される核酸配列に作動可能に連結される。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可

能にするような様式（例えば、このベクターが宿主細胞に導入される場合、インビトロ転写／翻訳系または宿主細胞において）で調節配列に連結されることを意味することを意図する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。このような調節配列は、例えば、Goeddel、1990、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif.に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指向する配列（例えば、組織特異的調節配列）を含む。発現ベクターの設計が形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に理解される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載されるような核酸によりコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質または融合ペプチドを含む）（例えば、FCTR Xタンパク質、FCTR Xの変異形態、融合タンパク質など）を生成し得る。

【0202】

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

【0203】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性

プロモーターを含むベクターを有する *E. coli* において実行される。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の3つの目的のために役立つ：(i) 組換えタンパク質の発現を増加させること；(ii) 組換えタンパク質の溶解度を増加させること；および(iii) 親和性精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製の際に補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位が、融合部分の結合部に導入され、そして融合タンパク質の精製の後に、組換えタンパク質が組換えタンパク質の融合部分から分離されることを可能にする。このような酵素、およびその同族の認識配列は、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを、それぞれ、標的の組換えタンパク質に融合するpGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) Gene 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) およびpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) が挙げられる。

【0204】

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

【0205】

E. coli における組換えタンパク質発現を最大化するための1つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中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 I

N ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128を参照のこと。別のストラテジーは、各アミノ酸についての個々のコドンが、E. coliにおいて優先的に利用されるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである(例えば、Wadaら(1992) Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118を参照のこと)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

【0206】

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

【0207】

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

【0208】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8(Seed(1987)Nature 329:840)およびpMT2PC(Kaufmanら(1987)EMBO J 6:187-195)が挙げられ

る。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方のための他の適切な発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0209】

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

uss (1990) Science 249:374-379) および - フェトプロテインプロモーター (Campes および Tilghman (1989) Genes Dev 3:537-546)。

【0210】

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

【0211】

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

【0212】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、F C T R X タンパク質は、細菌細胞（例えば、E . c o l i i）、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、ヒトチャイニーズハムスター卵巣細胞（C H O）またはC O S細胞）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0213】

ベクターDNAは、従来的な形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、D E A E デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、S a m b r o o k ら（M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L . 第2版、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . , 1 9 8 9）および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0214】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションについては、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部のみが外来DNAをそのゲノム中に組み込み得ることが知られている。これらの要素を同定および選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、一般的には目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マーカーには、薬物に対する耐性を付与するマーカー（例えば、G 4 1 8、ハイグロマイシン、およびメトトレキサート）が含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、増殖プロモーターをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、あるいは別々のベクター上で導入され得る。導入され

た核酸とともに安定にトランスフェクトされる細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存するが、他の細胞は死滅する）。

【0215】

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

【0216】

（トランスジェニック動物）

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、F C T R Xコード配列が導入される、受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞は、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得、ここで外因性のF C T R X配列は、それらのゲノムまたは相同組換え動物（ここで内因性のF C T R X配列が変更されている）に導入される。このような動物は、F C T R Xの機能および/または活性を研究するため、およびF C T R Xの活性のモジュレーターを同定および/または評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」とは、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのような齧歯動物であり、ここでこれらの動物の1つ以上の細胞は、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、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などを含む。導入遺伝子は、細胞のゲノムに組み込まれ（この細胞からトランスジェニック動物が発生する）、そして成熟動物のゲノムに残存する外因性のDNAであり、それによって、このトランスジェニック動物の1つ

以上の細胞型または組織においてコード遺伝子産物の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであり、ここで、内因性F C T R X遺伝子は、この内因性の遺伝子と、動物の発生の前に動物の細胞（例えば、動物の胚細胞）に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって、変更されている。

【0217】

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

、導入遺伝子を有するさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、F C T R Xをコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物へと繁殖させ得る。

【0218】

相同組換え動物を作製するために、欠失、付加、または置換が導入されて、それによってF C T R X遺伝子が増加（例えば、機能的に破壊）されている、少なくとも、F C T R X遺伝子の一部を含むベクターを調製する。F C T R X遺伝子は、ヒト遺伝子（例えば、配列番号1、3、5、7、9および11のDNA）であり得るが、より好ましくは、ヒトF C T R X遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号1、3、5、7、9および11のヒトF C T R X遺伝子のマウスホモログは、マウスゲノムにおいて内因性F C T R X遺伝子を変更するのに適切な相同組換えベクターを構築するために使用され得る。1つの実施形態において、そのベクターは、相同組換えに際して、内因性F C T R X遺伝子が、機能的に破壊される（すなわち、機能的タンパク質をもはやコードしない；「ノックアウト」ベクターともいわれる）ように設計される。

【0219】

あるいは、このベクターは、相同組換えの際に、内因性F C T R X遺伝子が増加されるか、あるいはさもなければ、変更されるが、なお機能的タンパク質をコードするように設計される（例えば、上流の調節領域を変更して、それによって内因性F C T R Xの発現を変更し得る）。相同組換えベクターにおいて、F C T R X遺伝子の変更された部分は、F C T R X遺伝子のさらなる核酸によって、その5'末端および3'末端で隣接され、相同組換えが、ベクターによって運ばれる外因性F C T R Xタンパク質遺伝子と胚幹細胞中の内因性F C T R Xタンパク質遺伝子との間で起こることを可能にする。さらなる隣接するF C T R Xタンパク質核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えに十分な長さである。代表的に、数キロベースの隣接するDNA（5'末端および3'末端の両方）が、ベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの記載について、Thomasら（1987）Cell 51:503を参照のこと。このベクターは、胚幹細胞株に導入され（例えば、エレクトロポレーションによって）、この導入されたF

C T R X 遺伝子が、内因性 F C T R X 遺伝子と相同組換えされた細胞が、選択される(例えば、Liら(1992) Cell 69:915を参照のこと)。

【0220】

次いで、この選択された細胞を、動物(例えば、マウス)の胚盤胞へ注入して、凝集キメラを形成する。例えば、Bradley(1987)の T E R A T O C A R C I N O M A S A N D E M B R Y O N I C S T E M C E L L S : A P R A C T I C A L A P P R O A C H、Robertson編、I R L、O x f o r d 113頁~152頁を参照のこと。次いで、キメラ胚を、適切な偽妊娠雌性フォスター動物に移植し得、そしてこの胚を、一定期間置く。それらの胚芽細胞中に相同組換えDNAを保有する子孫を使用して、動物を繁殖し得、ここで、この動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達によって、この相同組換えDNAを含む。相同的組換えベクターおよび相同的組換え動物を構築するための方法が、さらに以下に記載される; Bradley(1991) Cur r . O p i n . B i o t e c h n o l . 2 : 8 2 3 - 8 2 9 ; P C T 国際公開番号: W O 9 0 / 1 1 8 4 ; W O 9 1 / 0 1 1 4 0 ; W O 9 2 / 0 9 6 8 ; および W O 9 3 / 0 4 1 6 9 。

【0221】

別の実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含む、非ヒトトランスジェニック動物が産生され得る。このような系の1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の記載については、例えば、Laksora、1992、P . N . A . S . 8 9 : 6 2 3 2 - 6 2 3 6 を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である(O'Gormanら、1991、Science 251:181-185を参照のこと)。cre/loxPリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が、必要となる。このような動物は、例えば、2種のトランスジェニック動物(一方は選択されたタンパク質をコードした導入遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコー

ドした導入遺伝子を含む)を交配することによる、「二重の」トランスジェニック動物の構築によって提供され得る。

【0222】

本明細書中に記載されるトランスジェニック非ヒト動物のクローンがまた、Wilmutら、1997、Nature 385:810-813に記載される方法に従って、産生され得る。簡単には、トランスジェニック動物由来の細胞(例えば、体細胞)を、単離および誘導し、増殖サイクルから出し、そしてG₀期に入らせ得る。次いで、この静止細胞を、例えば、電気パルスの使用により、静止細胞が単離される同種動物由来の、摘出された卵母細胞へ融合し得る。次いで、この再構築された卵母細胞を培養し、これにより、これは桑実胚または未分化胚芽細胞に発達し、次いで、偽妊娠雌性フォスター動物に移される。この雌性フォスター動物の産生子孫は、この細胞(例えば、体細胞)が単離される動物のクローンである。

【0223】

(薬学的組成物)

本発明のFCTRX核酸分子、FCTRXタンパク質、および抗FCTRX抗体、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、およびホモログは、本明細書中で「活性化合物」、または「治療剤」といわれる。さらに、本発明のFCTRX核酸分子、FCTRXタンパク質、および抗FCTRX抗体、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、およびホモログに結合するか、またはFCTRX核酸分子、FCTRXタンパク質、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、およびホモログに共通して起因する薬学的アゴニストまたはアンタゴニスト応答を誘導するかのいずれかである特性を有する低分子量の化合物をまた、本明細書中で「活性化合物」または「治療剤」と呼ぶ。これらの治療剤は、被験体への投与に適した薬学的組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、代表的に、核酸分子、タンパク質または抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。

【0224】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な

投与に適合した、任意および全ての溶媒、分散液、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤 (delaying agent) などを含むことが意図される。適切なキャリアは、当該分野における標準的な参考書である、Remington's Pharmaceutical Scienceの最新版(本明細書中で参考として援用される)に記載される。このようなキャリアまたは賦形薬の好ましい例としては、水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンを含むが、これらに限定されない。リポソームおよび非水性ビヒクル(例えば、不揮発性油)もまた、使用され得る。このような媒体および薬剤の、薬学的に活性物質としての使用は、当該分野で周知である。この活性化合物と不適合性である任意の従来の媒体または薬剤の範囲を除いて、組成物におけるその使用は、意図される。補足的な活性化合物はまた、この組成物に組み込まれ得る。

【0225】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与の経路と適合可能に処方される。投与経路の例としては、非経口(例えば、静脈内、皮内、皮下)、経口(例えば、吸入)、経皮的(すなわち、局所的)、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液としては、以下の成分が挙げられ得る：滅菌賦形薬(例えば、注射のための水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒)；抗菌剤(例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン)；抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム)；キレート剤(例えば、エチレンジアミン四酢酸)；緩衝液(例えば、アセテート、シトレートまたはホスフェート)；および張度の調整のための薬剤(例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース)。pHは、酸または塩基(例えば、塩酸または水酸化ナトリウム)を用いて調整され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量バイアルに封入され得る。

【0226】

注射使用に適した薬学的組成物は、滅菌の水溶液(ここで、水溶性)または分

散液および滅菌注射可能な溶液または分散液の即席調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与について、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌性水、Cremophor EL™ (BASF、 Parsippany、 N. J.) またはリン酸塩緩衝化生理食塩水 (PBS) が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌性であるべきであり、そして容易な注入性 (syringeability) が存在する程度に流動的であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されるべきである。このキャリアは、以下を含む溶媒または分散媒体であり得る：例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど) ならびにそれらの適切な混合物。適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散に関しては、要求される粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の予防は、種々の抗菌および抗真菌剤 (例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど) によって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張剤 (例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウム) を含むことが好ましい。注射可能組成物の長期の吸収は、吸収を遅らせる薬剤 (例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチン) を組成物に含ませることによってもたらされ得る。

【0227】

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

【0228】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤へ圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュ (mouthwash) としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして素早く動かされ (swish)、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、以下のいずれかの成分または同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤 (例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン)；賦形剤 (例えば、デンプンまたはラクトース)、崩壊剤 (例えば、アルギン酸、Primogel、またはコーンスターチ)；滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes)；グライダント (glidant) (例えば、コロイド状二酸化ケイ素)；甘味剤 (例えば、スクロースまたはサッカリン)；あるいは矯味矯臭剤 (例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー)。

【0229】

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

【0230】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透されるバリアに対して適切な浸透剤が、処方において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤によって達成され得る。経皮投与については、この活性化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏剤、

軟膏、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

【0231】

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

【0232】

1つの実施形態において、この活性化合物は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、制御放出処方物）、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当該業者には明らかである。これらの材料はまた、Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手可能である。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を含む、感染させた細胞へ標的化されるリポソームを含む）がまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【0233】

徐放性調製物は、調製され得る。徐放性調製物の適切な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形された粒子（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリックスの例としては、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）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸のコポリマーおよびエチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-ビニルアセテート、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（例えば、LUPRON DEPOT™（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドで構成される注入可能なミクロスフェア）、ならびにポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が挙げら

れる。エチレン - ビニルアセテートおよび乳酸 - グリコール酸のようなポリマーは、100日を超えて分子の放出を可能にする一方で、特定のヒドロゲルは、より短い期間でタンパク質を放出する。

【0234】

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

【0235】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、被験体へ、任意の複数の経路（例えば、米国特許第5,703,055号に記載される）に送達され得る。従って、送達は、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）または定位注射（例えば、Chenら(1994)Proc.Natl.Sci.USA.91:3054-3057を参照のこと）が挙げられる。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物には、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターが挙げられ得、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれる徐放性マトリックスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが、組換え細胞からインタクトで産生され得（例えば、レトロウイルスベクター）、この薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。

【0236】

薬学的組成物は、投与のための使用説明書をととも、キット（例えば、容器、包装、またはディスペンサー）に含まれ得る。

【0237】

ヒトの疾患に關与する症候群を処置するための薬剤の製造において、治療に使

用することはまた、本発明の範囲内であり、この疾患は、F C T R X関連障害から選択され、ここで、この治療は、F C T R Xポリペプチド、F C T R X核酸、および抗F C T R X抗体からなる群から選択される。

【0238】

(本発明のさらなる使用および方法)

本明細書中で記載される核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、および抗体が、以下の方法の1つ以上において使用され得る：(a)スクリーニングアッセイ；(b)検出アッセイ(例えば、染色体マッピング、細胞および組織のタイピング、法医学生物学)；(c)予測医学(例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、臨床試験モニタリング、および薬理ゲノミクス)；ならびに(d)処置の方法(例えば、治療および予防)。

【0239】

本発明の単離された核酸分子は、以下にさらに説明されるように、F C T R Xタンパク質を(例えば、遺伝子治療用途における宿主細胞中の組換え発現ベクター介して)発現するため、F C T R X mRNA(例えば、生物学的サンプルにおいて)またはF C T R X遺伝子における遺伝子損傷を検出するため、ならびにF C T R X活性を調節するために使用され得る。さらに、F C T R Xタンパク質は、F C T R X活性または発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングするために、ならびにF C T R Xタンパク質の不十分なもしくは過剰な産生によって、あるいはF C T R X野生型タンパク質と比較して減少したもしくは異常な活性を有するF C T R Xタンパク質形態の産生によって特徴付けられる障害(例えば、増殖障害または分化障害)を処置するために使用され得る。さらに、本発明の抗F C T R X抗体が、F C T R Xタンパク質を検出して単離するため、およびF C T R X活性を調節するために使用され得る。

【0240】

本発明は、さらに、上述のスクリーニングアッセイによって同定される新規の薬剤、および本明細書中で記載されるような処置のためのそれらの使用に関する

。

【0241】

(スクリーニングアッセイ)

本発明は、調節因子、すなわち、F C T R Xタンパク質に結合するか、あるいは例えば、F C T R X発現またはF C T R X活性に対して刺激効果または阻害効果を有する、候補物または試験化合物もしくは試験薬剤（例えば、タンパク質、ポリペプチド、核酸またはポリヌクレオチド、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子（アゴニストもしくはアンタゴニスト）または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中において「スクリーニングアッセイ」とも称される）を提供する。F C T R Xポリペプチドに結合し得る候補物または試験化合物もしくは試験薬剤は、以下の分子量を有する：約50Da、100Da、150Da、300Da、330Da、350Da、400Da、500Da、750Da、1000Da、1250Da、1500Da、1750Da、2000Da、5000Da、10,000Da、25,000Da、50,000Da、75,000Da、100,000Daまたは100,000Da以上。特定の実施形態において、F C T R Xポリペプチドと結合する候補物は、約1500Da未満の分子量を有する。

【0242】

機能的アッセイの詳細は、本明細書中で以下にさらに提供される。記載されるアッセイのいずれか、および薬理学、血液学、内科学、腫瘍学などの当業者に公知のさらなるアッセイは、治療剤としてそれらの特性について候補物をスクリーニングするために使用され得る。記載されるが、本発明の治療剤は、タンパク質、ポリペプチド、核酸またはポリヌクレオチド、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子（アゴニストもしくはアンタゴニストを含む）または本明細書中に記載される他の薬物を含む。

【0243】

1つの実施形態において、本発明は、F C T R Xのタンパク質またはポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分の膜結合形態に結合するか、またはそれら膜結合形態の活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における任意の多数のアプローチを使用

して得られ得、これらのライブラリーには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアクセス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である(Lam(1997) Anticancer Drug Design 12:145)。

【0244】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら(1993) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 90:6909；Erbら(1994) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 91:11422；Zuckermannら(1994) J Med Chem 37:2678；Choら(1993) Science 261:1303；Carrellら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2059；Carellら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2061；およびGallopら(1994) J Med Chem 37:1233。

【0245】

化合物のライブラリーは、溶液中で(例えば、Houghten(1992) Biotechniques 13:412~421)、あるいはビーズ上(Lam(1991) Nature 354:82~84)、チップ上(Fodor(1993) Nature 364:555~556)、細菌(Ladner 米国特許第5,223,409号)、孢子(Ladner 米国特許第5,233,409号)、プラスミド(Cullら(1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1865~1869)またはフェージ上(ScottおよびSmith(1990) Science 249:386~390；Devlin(1990) Science 249:404~406；Cwirllaら(1990) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 8

7 : 6 3 7 8 ~ 6 3 8 2 ; F e l i c i (1 9 9 1) J M o l B i o l 2
2 2 : 3 0 1 ~ 3 1 0 ; L a d n e r (上 述)) において示され得る。

【 0 2 4 6 】

1つの実施形態において、アッセイは細胞ベースのアッセイであり、ここで、膜結合形態のF C T R Xタンパク質、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物が、F C T R Xタンパク質に結合する能力が、決定される。例えば、細胞は、哺乳動物起源または酵母細胞であり得る。この試験化合物がF C T R Xタンパク質に結合する能力の決定は、例えば、その試験化合物を放射性同位体標識または酵素標識とカップリングさせて、その結果、この試験化合物のF C T R Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する結合が、複合体におけるその標識化合物を検出することによって決定され得ることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてその放射性同位体が、放射線放射の直接の計数により、またはシンチレーション計数により、検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識が、適切な基質の生成物への転換を決定することにより、検出され得る。1つの実施形態において、このアッセイは、膜結合形態のF C T R Xタンパク質、またはその生物学的に活性な部分をその細胞表面上に発現する細胞を、F C T R Xと結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物に試験化合物を接触させる工程、ならびにこの試験化合物がF C T R Xタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がF C T R Xタンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、F C T R Xまたはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

【 0 2 4 7 】

別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、これは、膜結合形態のF C T R Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分を細胞表面

上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物が、F C T R Xタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物が、F C T R Xポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力の決定は、例えば、F C T R Xタンパク質が、F C T R X標的分子に結合またはこれら標的分子と相互作用する能力を決定することによって、達成され得る。本明細書中において使用する場合には、「標的分子」とは、F C T R Xタンパク質が自然に結合または相互作用する分子であり、例えば、F C T R Xタンパク質を発現する細胞表面上の分子、第二の細胞表面上の分子、細胞外環境中の分子、細胞膜の内部表面と会合する分子、または細胞質分子である。F C T R X標的分子は、非F C T R X分子あるいは本発明のF C T R Xタンパク質またはポリペプチドである。1つの実施形態において、F C T R X標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を通過して細胞内への細胞外シグナル（例えば、化合物が膜結合F C T R X分子に結合することにより発生するシグナル）の伝達を促進する。その標的は、例えば、触媒活性を有する第二の細胞内タンパク質、または下流シグナル分子のF C T R Xポリペプチドとの会合を容易にするタンパク質であり得る。

【0248】

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

る。

【0249】

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

【0250】

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

【0251】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、F C T R Xタンパク質または

その生物学的に活性な部分に、F C T R Xポリペプチドに結合する公知の化合物を接触させてアッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、およびこの試験化合物がF C T R Xタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がF C T R Xタンパク質と相互作用する能力の決定は、F C T R Xタンパク質が、F C T R X標的分子と優先的に結合するか、またはその標的分子の活性を優先的に調節する能力を決定する工程を包含する。

【0252】

本発明の無細胞アッセイは、F C T R Xポリペプチドの可溶性形態または膜結合形態の両方の使用に受け入れられる。膜結合形態のF C T R Xポリペプチドを含む無細胞アッセイの場合には、膜結合形態のF C T R Xポリペプチドが溶液中に維持されるように、可溶化剤を利用することが望ましくあり得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤が挙げられ、例えば、n - オクチルグルコシド、n - ドデシルグルコシド、n - ドデシルマルトシド、オクタノイル - N - メチルグルカミド、デカノイル - N - メチルグルカミド、T r i t o n (登録商標) X - 100、T r i t o n (登録商標) X - 114、T h e s i t (登録商標)、イソトリデシルポリ(エチレングリコールエーテル)_n (I s o t r i d e c y p o l y (e t h y l e n e g l y c o l e t h e r)_n)、N - ドデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、3 - (3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ - 1 - プロパンスルホネート (3 - (3 - c h o l a m i d o p r o p y l) d i m e t h y l a m m i n i o l - 1 - p r o p a n e s u l f o n a t e) (CHAPS)、または3 - (3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホネート (3 - (3 - c h o l a m i d o p r o p y l) d i m e t h y l a m m i n i o l - 2 - h y d r o x y - 1 - p r o p a n e s u l f o n a t e) (CHAPSO)である。

【0253】

F C T R Xポリペプチドまたはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合体化形態からの複合体化形態の分離を促進し、

そしてそのアッセイの自動化に適用させることが、望ましくあり得る。試験化合物のF C T R Xポリペプチドへの結合、または候補化合物の存在下および非存在下でのF C T R Xポリペプチドの標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するために適切な任意の容器内で、達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、そのタンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、G S T - F C T R Xポリペプチド融合タンパク質またはG S T標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いで、これらは、試験化合物と合わせられるか、あるいは試験化合物および非吸着の標的タンパク質またはF C T R Xタンパク質のいずれかと合わせられ、そしてこの混合物が、複合体形成に貢献する条件下(例えば、塩およびpHに関して生理学的条件)でインキュベートされる。インキュベーションに続いて、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば、上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体がマトリックスから解離され得、そしてF C T R Xの結合レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使用して決定し得る。

【0254】

タンパク質をマトリックス上に固定するための他の技術もまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、F C T R Xポリペプチドまたはその標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンとの結合体化を利用して固定され得る。ビオチン化されたF C T R Xタンパク質または標的分子は、当該分野において周知の技術を使用して、ビオチンNHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)から調製され得(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.)、そしてストレプトアビジン被覆した96ウェルのプレート(Pierce Chemical)のウェルに固定され得る。あるいは、F C T R Xタンパク質または標的分子と反応性であ

るが、F C T R Xタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、そのプレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的またはF C T R Xタンパク質が、抗体の結合体化によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、G S T固定複合体に関しての上記のものに加えて、F C T R Xタンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する複合体の免疫検出、ならびにF C T R Xタンパク質または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

【0255】

別の実施形態において、F C T R Xの発現のモジュレーターは、細胞が候補化合物と接触され、そして細胞中におけるF C T R Xのm R N Aまたはタンパク質の発現が決定される方法で同定される。候補化合物の存在下での、F C T R Xのm R N Aまたはタンパク質の発現のレベルは、候補化合物不在下でのF C T R Xのm R N Aまたはタンパク質の発現のレベルと比較される。次いで、候補化合物は、この比較に基づいて、F C T R Xの発現のモジュレーターとして同定され得る。例えば、F C T R Xのm R N Aまたはタンパク質の発現が、候補化合物の存在下で、その候補化合物が不在下よりも大きい（統計的に有意に大きい）場合、この候補化合物は、F C T R Xのm R N Aまたはタンパク質の発現の刺激因子として同定される。あるいは、F C T R Xのm R N Aまたはタンパク質の発現が、候補化合物の存在下でその候補化合物の不在下よりも小さい（統計的に有意に小さい）場合、この候補化合物は、F C T R Xのm R N Aまたはタンパク質の発現のインヒビターとして同定される。細胞中におけるF C T R Xのm R N Aまたはタンパク質の発現のレベルは、F C T R Xのm R N Aまたはタンパク質を検出するための本明細書中に記載される方法によって決定され得る。

【0256】

本発明のなお別の局面において、F C T R Xタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおける「ベイト (b a i t) タンパク質」として使用され得（例えば、米国特許第5,283,317号；Zer vosら、(1993) Cell 72:223-232；Maduraら、(1993) J Biol Chem 268:12046-12054；Bar

telら、(1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchiら、(1993) *Oncogene* 8:1693-1696; およびBrent WO94/10300を参照のこと)、FCTR Xと結合するかまたは相互作用するタンパク質(「FCTR X結合タンパク質」または「FCTR X - bp」)、ならびにFCTR Xの活性を調節する他のタンパク質を同定する。このようなFCTR X結合タンパク質はまた、例えば、FCTR X経路の上流または下流のエLEMENTとして、FCTR Xタンパク質によるシグナルの伝播に関与するようである。

【0257】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる、大部分の転写因子の調節(modular)性質に基づく。手短には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を使用する。1つの構築物において、FCTR Xをコードする遺伝子は、公知の転写因子(例えば、GAL-4)のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物において、DNA配列のライブラリー由来の、未同定タンパク質(「プレイ(pre y)」または「サンプル」)をコードするDNA配列は、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用し得る場合、FCTR X依存複合体を形成して、転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインが、密接に近接される。この近接は、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されるレポーター遺伝子(例えば、LacZ)の転写を可能にする。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そしてこの機能性転写因子を含む細胞コロニーを単離および使用して、FCTR Xと相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を獲得し得る。

【0258】

スクリーニングはまた、インビボで実施され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明は、試験化合物をFCTR X関連障害の危険性が増加した試験動物に投与することによる、HDGC X関連障害の活性または潜伏もしくは素因のモジュレーターをスクリーニングするための方法を含む。いくつかの実施形態に

において、試験動物は、H D G C Xポリペプチドを組換え的に発現する。化合物の投与後の試験動物におけるこのポリペプチドの活性が測定され、そして試験動物におけるこのタンパク質の活性が、このポリペプチドを投与されなかったコントロール動物におけるこのポリペプチドの活性と比較される。コントロール動物に対するこの試験動物におけるこのポリペプチドの活性の変化は、この試験化合物が、F C T R X関連障害の潜伏または素因のモジュレーターであることを示す。

【0259】

いくつかの実施形態において、試験動物は、試験タンパク質導入遺伝子を発現するか、または野生型試験動物と比較して増加したレベルでプロモーターの制御下で導入遺伝子を発現する、組換え試験動物である。好ましくは、プロモーターは、導入遺伝子のネイティブな遺伝子プロモーターではない。

【0260】

本発明は、さらに、上記スクリーニングアッセイによって同定される新規試薬および本明細書中に記載される処置のためのこれらの使用に関する。

【0261】

(検出アッセイ)

本明細書中で同定されるcDNA配列の部分またはフラグメント(および対応する完全遺伝子配列)は、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法で使用され得る。例えば、これらの配列は、(i)それぞれの遺伝子を染色体上にマッピングし;それによって遺伝病に関連する遺伝子領域を位置決めする;(ii)微小な生物学的サンプルから個体を同定する(組織型決定);そして(iii)生物学的サンプルの法医学的同定における補助のために使用され得る。

【0262】

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

【0263】

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

【0264】

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

【0265】

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

【0266】

(法医学的生物学における部分的FCTRX配列の使用)

FCTRX核酸配列またはポリペプチド配列に基づくDNAベース識別技術は

また、法医学的生物学において使用され得る。法医学的生物学は、例えば、犯罪者をポジティブに識別するための手段として、犯罪現場で見いだされた生物学的証拠の遺伝子型決定を利用する科学分野である。このような識別を行うために、PCR技術を用いて非常に少量の生物学的サンプル（例えば、組織（例えば、犯罪現場で見いだされた毛髪もしくは皮膚、または血液、唾液もしくは精液のような体液））から得られたDNA配列を増幅し得る。次いで、増幅された配列は標準物質と比較され、それによって、生物学的サンプルの起源の識別を可能にし得る。

【0267】

本発明の配列を使用して、ヒトゲノムにおける特定の遺伝子座に標的化され得るポリヌクレオチド試薬（例えば、PCRプライマー）を提供し得る。このPCRプライマーは、例えば、別の「識別マーカ―」（すなわち、特定の個体に独特な別のDNA配列）を提供することにより、DNAベースの法医学的識別の信頼性を増大し得る。上記のように、実際の塩基配列情報は、制限酵素で生成したフラグメントにより形成されるパターンに対する正確な代替手段として識別のために使用され得る。配列番号 $2n-1$ （ここで、 $n=1\sim 13$ ）の非コード領域に標的化される配列は、より多くの多型が非コード領域に生じ、このことにより、この技術を使用して個体を区別することがより容易になるので、この用途のために特に適切である。ポリヌクレオチド試薬の例としては、FCTRX配列またはその部分（例えば、配列番号 $2n-1$ （ここで、 $n=1\sim 13$ ）の1つ以上の非コード領域に由来するフラグメント）が挙げられ得、この部分は、少なくとも20塩基、好ましくは少なくとも30塩基の長さを有する。

【0268】

本明細書中に記載のFCTRX配列は、ポリヌクレオチド試薬（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション技術において使用され得る標識プローブまたは標識可能プローブ）を提供して、特定の組織（例えば、脳組織など）を同定するためにさらに使用され得る。これは、法医学的病理学者に未知の起源の組織が提示された場合に非常に有用であり得る。このようなFCTRXプローブのパネルを使用して、種により、および/または器官の型により組織を同定し得る。

【0269】

このように、これらの試薬（例えば、FCTR Xプライマーまたはプローブ）を用いて、組織培養物を夾雑物質についてスクリーニングし得る（すなわち、培養物中の異なる型の細胞の混在についてのスクリーニング）。

【0270】

（予測医療）

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

【0271】

本発明の別の局面は、個体におけるFCTR Xのタンパク質、核酸の発現あるいは活性を決定するための方法を提供し、これによって、その個体についての適切な治療的または予防的試薬を選択する（本明細書において「薬理遺伝学」とよばれる）。薬理遺伝学は、個体の遺伝型（例えば、特定の薬剤に対して応答する個体の能力を決定するために試験された個体の遺伝型）に基づいて個体の治療的または予防的処置のための薬剤（例えば、薬物）の選択を可能にする。

【0272】

本発明のなお別の局面は、臨床試験におけるFCTR Xの発現または活性に対

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に関する。これらおよび他の薬剤は、以下の節でさらに詳細に記載される。

【0273】

（診断アッセイ）

細胞の増殖が役割を果たす他の状態としては、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュブユイトラン拘縮、糖尿病合併症、カポジ肉腫および慢性関節リウマチが挙げられる。

【0274】

F C T R Xポリペプチドを使用して、サンプルまたは組織と相互作用するポリペプチドを同定し得る。この方法は、サンプルまたは組織をF C T R Xと接触させる工程、F C T R Xポリペプチドと、相互作用するポリペプチドとの間で複合体を形成させる工程、および存在する場合には、この複合体を検出する工程を包含する。

【0275】

本発明のタンパク質を使用して、このタンパク質を特異的に結合する抗体の産生を刺激し得る。このような抗体は、サンプル中のタンパク質の発生を検出するための免疫診断手順において、使用され得る。本発明のタンパク質を使用して、細胞の増殖が好ましい状態において、細胞の成長（growth）および細胞の増殖（proliferation）を刺激し得る。一例は、例えば、造血および血小板形成、胃腸管の管壁、ならびに毛包に対する化学療法剤の毒性副作用を阻害することである。これらはまた、例えばアルツハイマー病を含む神経学的障害における、新たな細胞増殖を刺激するために使用され得る。あるいは、拮抗処置剤が投与され得、ここで、本発明のF C T R X様タンパク質を特異的に結合する抗体が、このタンパク質の特異的増殖誘導効果を阻止する。このような抗体は、例えば、種々の腫瘍および良性過形成を含む増殖性障害の処置において、有用であり得る。

【0276】

配列番号1、3、5、7、9および11のF C T R X核酸のいずれかの一部に対応するポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを使用して、対応するO

R F 遺伝子を含むDNAを検出し得るか、または対応するF C T R X 遺伝子もしくはF C T R X 様遺伝子の発現を検出し得る。例えば、表3に見られるように、特定の細胞または組織において発現されるF C T R X 核酸を使用して、その特定の細胞型の存在を同定し得る。

【0277】

生物学的サンプルにおけるF C T R X の存在または非存在を検出するための例示的な方法は、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、およびその生物学的サンプルをF C T R X のタンパク質またはF C T R X タンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出し得る化合物もしくは薬剤とを接触させ、その結果、F C T R X の存在が、その生物学的サンプルにおいて検出される、工程を包含する。F C T R X のmRNAもしくはゲノムDNAを検出するための薬剤は、F C T R X mRNAもしくはゲノムDNAにハイブリダイズし得る、標識された核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長のF C T R X の核酸（例えば、配列番号2n-1（ここで、n=1~13）の核酸配列）もしくはその部分の核酸（例えば、少なくとも、15、30、50、100、250もしくは500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、ストリンジェントな条件下でF C T R X のmRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズするに十分である核酸）であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書において記載されている。

【0278】

F C T R X のタンパク質を検出するための薬剤は、F C T R X のタンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルであり得るか、またはより好ましくはモノクローナルであり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント（例えば、F_{ab}またはF_{(ab')₂}）が使用され得る。本明細書中で使用される場合、用語「標識（された）」とは、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をそのプローブもしくは抗体にカップリングさせる（すなわち、物理的に連結する）ことによってそのプローブまたは抗体を直接標識すること、ならびに、直接標識された別の試薬との反応性によってそのプローブもしくは抗体の間接的な標識をすることを包含することが

意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いた一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようにDNAプローブのビオチンを用いた末端標識が挙げられる。本明細書中で使用される場合、用語「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された、組織、細胞および生物学的流体ならびに被験体に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を用いて、FCTRXのmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを、生物学的サンプル中で、インビトロおよびインビボで検出し得る。例えば、FCTRXのmRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。FCTRXのタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられる。FCTRXのゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、FCTRXのタンパク質の検出のためのインビボ技術としては、標識された抗FCTRX抗体を被験体に導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、放射性マーカーを用いて標識され得る。被験体における放射性マーカーの存在および位置は、標準的な画像化技術によって検出され得る。

【0279】

1つの実施形態において、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのタンパク質分子を含む。あるいは、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのmRNA分子またはその試験被験体からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来的手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

【0280】

別の実施形態において、これらの方法はさらに、コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、そのコントロールサンプルを、FCTRXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAを検出し得る化合物もしくは薬剤と接触させ、その結果、FCTRXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在がその生物学的サンプルにおいて検出される、工程、およびそのコン

トロールサンプルにおけるF C T R Xのタンパク質、m R N AもしくはゲノムD N Aの存在と、その試験サンプルにおけるF C T R Xのタンパク質、m R N AもしくはゲノムD N Aの存在とを比較する工程を包含する。

【0281】

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

【0282】

(予後アッセイ)

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

る。

【0283】

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

【0284】

本発明の方法はまた、FCTR Xの遺伝子における遺伝的損傷を検出し、それによって、その損傷遺伝子を有する被験体が異常な細胞増殖および/または分化によって特徴付けられる障害についての危険に有るか否かを決定するためにも使用され得る。種々の実施形態において、本発明の方法は、その被験体からの細胞のサンプルにおいて、FCTR Xのタンパク質をコードする遺伝子の統合性に影響を与える変更の少なくとも1つによって特徴付けられる遺伝的損傷、あるいはFCTR Xの遺伝子の誤発現の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝的損傷は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：(i) FCTR Xの遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；(ii) FCTR Xの遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；(iii) FCTR Xの遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、(iv) FCTR Xの遺伝子の染色体再配置；(v) FCTR Xの遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変更；(vi) FCTR Xの遺伝子の異常改変（例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの異常改変）；(vii) FCTR Xの遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在；(

v i i i) F C T R X のタンパク質の非野生型レベル ; (i x) F C T R X の遺伝子の対立遺伝子の欠失 ; ならびに (x) F C T R X のタンパク質の不適切な翻訳後修飾。本明細書において記載されるように、当該分野において、多数の公知のアッセイ技術が存在し、これらは、F C T R X の遺伝子における損傷を検出するために使用され得る。好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって被験体から単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプルが使用され得、これには、例えば、頬粘膜細胞が挙げられる。

【0285】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) (例えば、米国特許第 4 , 6 8 3 , 1 9 5 号および同第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号を参照のこと) (例えば、アンカー P C R または R A C E P C R) あるいは、連結連鎖反応 (L C R) (例えば、L a n d e g r a n ら , 1 9 8 8 , S c i e n c e 2 4 1 : 1 0 7 7 - 1 0 8 0 ; および N a k a z a w a ら , 1 9 9 4 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 1 : 3 6 0 - 3 6 4 を参照のこと) におけるプローブ / プライマーの使用を包含する。後者は、F C T R X の遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る (A b r a v a y a ら , 1 9 9 5 , N u c l . A c i d s R e s . 2 3 : 6 7 5 - 6 8 2 を参照のこと) 。この方法は、患者から細胞のサンプルを収集する工程、核酸 (例えば、ゲノム、m R N A またはその両方) をそのサンプルの細胞から単離する工程、F C T R X の遺伝子に特異的にハイブリダイズする 1 つ以上のプライマーと、その核酸サンプルとを F C T R X の遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が (存在する場合) 生じるような条件下で、接触させる工程、ならびに増幅産物の存在もしくは非存在を検出する工程、またはその増幅産物の大きさを検出する工程およびその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含し得る。P C R および / または L C R は、本明細書に記載される変異を検出するために使用される技術のいずれかとともに予備的増幅工程として使用されるために所望され得ることが予想される。

【0286】

代替的な増幅方法としては、以下が挙げられる：自己維持配列複製 (G u a t

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

【0287】

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

【0288】

他の実施形態において、FCTRXにおける遺伝的変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸(例えば、DNAまたはRNA)を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る(例えば、Croninら, 1996, Human Mutation 7: 244 - 255; Kozalら, 1996, Nat. Med. 2: 753 - 759を参照のこと)。例えば、FCTRXにおける遺伝的変異は、Croninら、上記のように光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、第一のプローブハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおける長いストレッチのDNAを通じて走査して、連続的に重複するプローブの線形アレイを作成することによってその配列の間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。

この工程に続いて、検出される全ての改変体または変異に相補的な、より小さな特化されたプローブアレイを使用することによって、特定の変異の特徴付けを可能にする第二のハイブリダイゼーションアレイがある。各変異アレイは、一方が野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方が変異遺伝子に対して相補である並行プローブセットから構成される。

【0289】

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

【0290】

F C T R X 遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断薬剤からの保護を使用して、RNA/RNAもしくはRNA/DNAのヘテロ二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出する方法が挙げられる（Myersら、1985, Science 230:1242）。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野の技術は、野生型のF C T R X 配列を含む（標識された）RNAまたはDNAを、組織サンプルから得られた潜在的な変異体RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供することによって始まる。この二本鎖の二重鎖を、二重鎖の一本鎖領域（例えば、そのコントロールとサ

ンプルの鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するもの)を切断する薬剤を用いて処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖を、RNaseを用いて処理し得、そしてDNA/DNAハイブリッドを、そのミスマッチ領域を酵素的に消化することに対して、S₁ヌクレアーゼを用いて処理し得る。他の実施形態において、DNA/DNAまたはRNA/DNAのいずれかの二重鎖を、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウム、およびピペリジンを用いて処理し得る。次いで、そのミスマッチ領域の消化後、得られた材料を変性ポリアクリルアミドゲル上で、大きさで分離して、変異の部位を決定する。例えば、Cottonら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397; Saleebaら、1992、Methods Enzymol. 217:286-295を参照のこと。1つの実施形態において、コントロールのDNAまたはRNAは、検出のために標識され得る。

【0291】

なお別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)を、細胞のサンプルから得られたFCTRXC DNAにおける点変異を検出およびマッピングするために規定された系において使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、そしてHeLa細胞からのチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(Hsuら(1994)Carcinogenesis 15:1657~1662を参照のこと)。例示的な実施形態に従って、FCTRXC配列(例えば、野生型FCTRXC配列)に基づくプローブは、試験細胞由来のcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素を用いて処理され、そしてその切断産物(もしあれば)は、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

【0292】

他の実施形態において、電気泳動の移動度における変化は、FCTRXC遺伝子における変異を同定するために使用される。例えば、一本鎖コンホメーション多

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

【0293】

なお別の実施形態において、一定勾配の変性剤を含有するポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を使用してアッセイされる。例えば、Myersら (1985) Nature 313: 495 を参照のこと。DGGE が分析の方法として使用される場合、DNA は、例えば、PCR により約 40 bp の高融点 GC リッチ DNA の GC クランプを付加することによって、完全には変性されないことを確実に改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールおよびサンプル DNA の移動度における差異を同定するために、変性剤勾配の代わりに使用される。例えば、Rosenbaum および Reissner (1987) Biophys Chem 265: 12753 を参照のこと。

【0294】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、

既知の変異が中心的に配置されるように調製され得、次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的DNAにハイブリダイズされる。例えば、Saikiら(1986)Nature 324:163; Saikiら(1989)Proc Natl Acad Sci USA 86:6230を参照のこと。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に付着され、そして標識された標的DNAとハイブリダイズされる場合に、PCR増幅された標的DNAまたは多くの異なる変異にハイブリダイズされる。

【0295】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と合わせて使用され得る。特異的増幅についてのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において(その結果、増幅は、差次的ハイブリダイゼーションに依存する)(Gibbsら(1989)Nucleic Acids Res 17:2437~2448)か、あるいは適切な条件下でミスマッチが妨げられ得るかまたはポリメラーゼ伸長を減少し得る、1つのプライマーの3'の最末端で、目的の変異を保有し得る(Prossner(1993)Tibtech 11:238)。さらに、切断に基づく検出を行うために、変異領域に新規な制限部位を導入することは、望ましくあり得る。例えば、Gaspariniら(1992)Mol Cell Probes 6:1を参照のこと。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅用Taqリガーゼを使用して実施され得ることが予測される。例えば、Barany(1991)Proc Natl Acad Sci USA 88:189を参照のこと。このような場合において、連結は、5'配列の3'末端に完全なマッチが存在する場合のみ生じ、増幅の存在または非存在を探索することによって、特定の部位における既知の変異の存在を検出することを可能にする。

【0296】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実施され得、これは、例えば、FCTR X遺伝子を含

む疾患または疾病の症状または家族病歴を示す患者を診断するための臨床的設定において簡便に使用され得る。

【0297】

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

【0298】

（薬理ゲノム学（Pharmacogenomics））

FCRX活性（例えば、FCRX遺伝子発現）に対する刺激性または阻害性の効果を有する因子、すなわちモジュレーターは、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるように、異常なFCRX活性と関連する障害（例えば、癌または免疫障害）を処置（予防的または治療的に）するために個体に投与され得る。このような処置と合わせて、個体の薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と外来化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係についての研究）が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗を導き得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づく予防的または治療的処置のために有効な薬剤（例えば、薬物）の選択を許容する。このような薬理ゲノム学は、さらに、適切な投薬量および治療剤レジメンを決定するために使用され得る。従って、FCRXタンパク質の活性、FCRX核酸の発現、あるいは個体におけるFCRX遺伝子の変異含量が決定されて、それによって個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。

【0299】

薬理ゲノム学は、罹患した人における変更された薬物の性質および異常な作用に起因して、薬物に反応する臨床的に有意な遺伝性変更を扱う。例えば、Eichelbaum、1996、Clin Exp Pharmacol Physiol, 23:983~985およびLinder、1997、Clin Che

m, 43 : 254 ~ 266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学状態が、区別され得る。薬物が身体に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される遺伝的状态(変更された薬物作用)、または身体が薬物に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される遺伝的状态(変更された薬物代謝)。これらの薬理ゲノム学状態は、稀な欠損としてか、または多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)欠損は、一般的な遺伝性酵素病であり、この主な臨床的合併症は、酸化剤薬物(抗マリア剤、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

【0300】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続期間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素(例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)およびシトクロムP450酵素CYP2D6およびCYP2C19)の遺伝的多型の発見は、幾人かの患者が予期される薬物効果をなぜ得ないか、または標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に過大な薬物応答および深刻な毒性をなぜ示すかについての説明を提供した。これらの多型は、集団において2つの表現型(高い代謝能を持つ人(extensive metabolizer)(EM)および低い代謝能を持つ人(poor metabolizer)(PM))で表現される。PMの有病率は、異なる集団の間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしていくらかの変異がPMにおいて同定されており、この全ては機能的CYP2D6の非存在に至る。CYP2D6およびCYP2C19の低い代謝能を持つ人は、彼らが標準的な用量を受けの場合に、かなり頻繁に過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝産物が活性な治療的部分である場合、そのCYP2D6形成代謝産物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるように、PMは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に応答しない、いわゆる超迅速な代謝能を持つ人である。最近、超迅速な代謝の基準となる分子は、CYP2D6遺伝子増幅に起因していることが同定されている。

【0301】

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

【0302】

（臨床的効力のモニタリング）

F C T R Xの発現または活性（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力）に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることは、基本的な薬物スクリーニングおよび臨床試験に適用され得る。例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される、F C T R Xの遺伝子発現、タンパク質レベルを増加するため、またはF C T R X活性をアップレギュレートする薬剤の効力は、減少したF C T R Xの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたF C T R Xの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、スクリーニングアッセイによって決定される、F C T R Xの遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはF C T R Xの活性をダウンレギュレートする薬剤の効力は、増加したF C T R Xの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたF C T R Xの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験において、F C T R Xの発現または活性、および好ましくは、例えば、細胞増殖または免疫障害に関与している他の遺伝子が、「リードアウト（読み出し）（read out）」、すなわち、特定の細胞の応答性のマーカーとして使用され得る。

【0303】

例えば、制限しないが、P O L Yを含む遺伝子（これは、F C T R X活性（例

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

【0304】

1つの実施形態において、本発明は、薬剤(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド模倣物、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補物)を用いる、被験体の処置の効力をモニタリングするための方法を提供し、これは、以下の工程を包含する：(i)薬剤の投与の前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；(ii)この投与前サンプルにおいて、FCTRXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現のレベルを検出する工程；(iii)この被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程；(iv)この投与後サンプルにおいて、FCTRXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを検出する工程；(v)この投与前サンプルにおけるFCTRXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを、この投与後サンプルにおけるFCTRXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルと比較する工程；ならびに(vi)従って、この被験体に対する薬剤の投与を変更する工程。例えば、この薬剤の増加した投与は、検出されるよりも高いレベルにFCTRXの発現または活性を増加すること(す

なわち、この薬剤の効力を増加すること)が望ましくあり得る。あるいは、この薬剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルにFCTR Xの発現または活性を減少すること(すなわち、この薬剤の効力を減少すること)が望ましくあり得る。

【0305】

(処置の方法)

本発明は、異常なFCTR Xの発現または活性に関連する障害の危険性のある(または感受性)被験体か、またはこの障害を有する被験体を処置する予防的および治療的の両方の方法を提供する。

【0306】

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

【0307】

(その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して)減少したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増加させる(すなわち、活性に対するアゴニストである)治療剤を用いて処置され得る。活

性をアップレギュレートする治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：F C T R Xペプチド、またはそのアナログ、誘導體、フラグメントもしくはホモログ；あるいはバイオアベイラビリティを増加させるアゴニスト。

【0308】

増加したレベルまたは減少したレベルは、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって、容易に検出され得る。この定量は、患者の組織サンプルを（例えば、生検組織から）入手し、そしてそのサンプルを、その発現したポリペプチド（またはF C T R XポリペプチドをコードするmRNA）のRNAレベルまたはポリペプチドレベル、構造および/または活性をインビトロでアッセイすることによる。当該分野において周知の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イムノアッセイ（例えば、ウェスタンブロット分析、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動が後に続く免疫沈降、免疫細胞化学などによる）および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）。

【0309】

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

【0310】

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

【0311】

(治療剤の生物学的効果の決定)

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

【0312】

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

【0313】

(悪性疾患)

いくつかのFCTRXポリペプチドは、癌性細胞において発現され、従って、細胞の増殖の調節に關連付けられている。従って、本発明の治療剤は、細胞の過剰増殖および/または細胞増殖の制御の欠損(例えば、癌、悪性疾患および腫瘍)に關連する疾患または障害の治療的処置または予防的処置において有用であり得る。そのような過剰増殖障害の総説について、例えば、Fishmanら、1985、MEDICINE、第2版、J.B.Lippincott Co.、Philadelphia、PAを参照のこと。

【0314】

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

【0315】

本発明の実施において、一旦、悪性疾患または癌が、活性を調節すること(すなわち、阻害するか、アンタゴナイズするか、またはアゴナイズする)による処

置に対して感受性であることが示されると、引き続いて、その癌または悪性疾患が、タンパク質機能を調節するように作用する治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0316】

(前悪性状態)

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

【0317】

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

【0318】

あるいは、または過形成、化生、または異形成として特徴付けられる異常な細胞増殖の存在に加えて、インビボまたは患者由来の細胞サンプル内でのインビトロのいずれかにおいて示される形質転換表現型または悪性疾患表現型の1つ以上

の特徴の存在が、上記のタンパク質の活性を調節する能力を有する治療剤の予防的/治療的投与の望ましさの指標である。形質転換された表現型の特徴としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：(i)形態学的変化；(ii)下層へのゆるい接着；(iii)細胞間接触阻害の喪失；(iv)足場依存性の喪失；(v)プロテアーゼ放出；(vi)糖輸送の増加；(vii)血清要求度の減少；(viii)胎児抗原の発現；(ix)250kDa細胞表面タンパク質の消滅など。例えば、Richardsら、1986、MOLECULAR PATHOLOGY、W.B.Saunders Co、Philadelphia、PAを参照のこと。

【0319】

本発明の特定の実施形態において、悪性疾患についての以下の1つ以上の素因を示す患者が、治療剤の有効量の投与によって処置される：(i)悪性疾患に関連する染色体転座（例えば、慢性骨髄性白血病についてのフィラデルフィア染色体(bcr/abl)および濾胞性リンパ腫についてのt(14;20)など）；(ii)家族性ポリープ症またはガードナー症候群（結腸癌の可能性のある前兆）；(iii)未確認の重要性の単クローン性高ガンマグロブリン血症（多発性骨髄腫の可能性のある前駆体）；ならびに(vi)メンデル（遺伝子）遺伝パターンを示す癌または前癌疾患（例えば、結腸の家族性ポリープ症、ガードナー症候群、遺伝性外骨腫症、多発性内分泌腺腫症(polyendocrine adenomatosis)、ポイツ-ジェガーズ症候群、フォン・レックリングハウゼン病の神経線維腫症、アミロイド産生および褐色細胞腫をともなう甲状腺髄様癌(medullary thyroid carcinoma)、網膜芽細胞腫、頸動脈小体腫瘍、皮膚の黒色癌、眼内の黒色癌、色素性乾皮症、毛細血管拡張性運動失調、チェディアック-東症候群、白子症、ファンコーニ再生不良性貧血およびブルーム症候群)を有する人物の一親等。

【0320】

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

【0321】

(過剰増殖性障害および異常増殖性(dysproliferative)障害)

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

【0322】

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

【0323】

(神経変性障害)

いくつかのFCTRXTANパク質は、細胞成熟の脱調節およびアポトーシス(この両方が神経変性疾患の特徴である)に関係した細胞型において見出される。従って、本発明の治療剤(限定されることはないが、特に上記のタンパク質の活性を調節(または供給)する治療剤)が、神経変性疾患の処置または予防において有効であり得る。神経変性障害に関与する上記のタンパク質の活性を調節する本発明の治療剤を、そのような神経変性疾患または障害を処置または予防することにおける効力について、当該分野において公知の任意の方法によってアッセイし得る。そのようなアッセイとしては、調節された細胞成熟もしくはアポトーシスの阻害についてのインビトロアッセイ、または神経変性疾患もしくは障害の動

物モデルを使用するインビボアッセイ、あるいは以下に記載する任意のアッセイが挙げられる。可能性のある有効な治療剤は、例えば限定されないが、コントロールと比較して、調節された細胞成熟を促進するか、培養物中の細胞アポトーシスを防ぐか、あるいは動物モデルにおける神経変性を減少する。

【0324】

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

【0325】

（器官移植に関連する障害）

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

【0326】

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

【0327】

（心臓血管疾患）

FCTRXタンパク質に関連したタンパク質は、アテローム性動脈硬化症のプ

ラク形成を含む、心臓血管障害に関係し得る。心臓血管疾患（脳血栓症または脳出血を含む）、虚血性心臓病または虚血性腎臓病、末梢血管疾患、または他の主要な血管の血栓症、および他の疾患（真性糖尿病、高血圧、甲状腺機能不全、コレステロールエステル貯蔵病、全身性エリテマトーデス、ホモシスチン血症、および家族性のタンパク質または脂質プロセッシング疾患（processing disease）などを含む）のような疾患は、アテローム性動脈硬化症に直接的または間接的のいずれかで関連する。従って、本発明の治療剤（特に、活性または形成を調節（または供給）する治療剤）は、アテローム性動脈硬化症に関連する疾患または障害の処置または予防に有効であり得る。本発明の治療剤（特に、レベルまたは活性を調節する治療剤）は、このような疾患および障害の処置または予防における効力について、当該分野で公知の任意の方法（以下に記載の方法を含む）によってアッセイされ得る。

【0328】

広範な動物モデルおよび細胞培養モデルが、アテローム性動脈硬化症に関与するプロセスについて存在する。限られており、かつ非排他的な動物モデルのリストとしては、以下が挙げられる：早発性アテローム性動脈硬化症についてのノックアウトマウス（KurabayashiおよびYazaki, 1996, *Int. Angiol.* 15: 187-194）、アテローム動脈硬化症のトランスジェニックマウスモデル（Kappelら, 1994, *FASEB J.* 8: 583-592）、動物モデルのアンチセンスオリゴヌクレオチド処理（Callow, 1995, *Curr. Opin. Cardiol.* 10: 569-576）、アテローム性動脈硬化症についてのトランスジェニックウサギモデル（Taylor, 1997, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 811: 146-152）、高コレステロール血症動物モデル（Rosenfeld, 1996, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 30（補遺）: 1-11）、高脂血症マウス（Paigenら, 1994, *Curr. Opin. Lipidol.* 5: 258-264）、および動物におけるリポキシゲナーゼの阻害（Sigalら, 1994, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 714: 211-224）。さらに、インビトロ細胞モデルとしては、以下が挙げられるが、これ

らに限定されない：低密度リポタンパク質に曝露された単球 (Frostegardら、1996、Atherosclerosis 121:93-103)、クローン化された血管平滑筋細胞 (Suttlesら、1995、Exp. Cell Res. 218:331-338)、内皮細胞由来の化学誘引物質に曝されたT細胞 (Katzら、1994、J. Leukoc. Biol. 55:567-573)、培養されたヒト大動脈内皮細胞 (Farberら、1992、Am. J. Physiol. 262:H1088-1085)、および泡沫細胞培養物 (Libbyら、1996、Curr Opin Lipidol 7:330-335)。潜在的に有効な治療剤は、例えば、限定されないが、コントロールと比較して、細胞培養モデルにおける泡沫細胞形成を減少するか、またはアテローム性動脈硬化症の高コレステロール血症マウスモデルにおけるアテローム性動脈硬化症のプラーク形成を減少する。

【0329】

従って、一旦、アテローム性動脈硬化症に関連する疾患または障害が、活性または形成の調節による処置に対して感受性であることが示されると、この疾患または障害は、活性を調節する治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0330】

(サイトカインおよび細胞増殖/分化活性)

本発明のFCTRXタンパク質または同族の治療剤は、サイトカイン活性、細胞増殖活性(誘導するか、または阻害するかのいずれか)、または細胞分化活性(誘導するか、または阻害するかのいずれか)を示し得るか、あるいは特定の細胞集団における他のサイトカインの産生を誘導し得る。全ての既知のサイトカインを含む、現在までに発見された多くのタンパク質因子は、因子依存性の1以上の細胞増殖アッセイにおいて活性を示し、従って、これらのアッセイは、サイトカイン活性の簡便な確認法として作用する。本発明のタンパク質の活性は、以下を含むが、これらに限定されない細胞株についての多くの従来の因子依存性細胞増殖アッセイの任意の1つによって確認される：32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BaF3、MC9/G、M+(preB M+)、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTLL2、TF-1、

Mo7eおよびCMK。

【0331】

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

【0332】

脾細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞のサイトカイン産生および/または増殖についてのアッセイとしては、KruisbeekおよびShevach：Current Protocols in Immunology. Coliganら編、第1巻、3.12.1-14頁、John Wiley and Sons, Toronto 1994；およびSchreiber：Current Protocols in Immunology. Coliganら編、第1巻、6.8.1-8頁、John Wiley and Sons, Toronto 1994に記載のアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。

【0333】

造血細胞およびリンパ球産生細胞の増殖および分化についてのアッセイとしては、以下によって記載されるアッセイが挙げられるが、これに限定されない：Bottomlyら：Current Protocols in Immunology. Coliganら編、第1巻、6.3.1-6.3.12頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991；deVrie

sら、J Exp Med 173:1205-1211, 1991; Moreauら、Nature 336:690-692, 1988; Greenbergerら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 80:2931-2938, 1983; Nordan: Current Protocols in Immunology. Coliganら編、第1巻、6.6.1-5頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991; Smithら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 83:1857-1861, 1986; Measurement of human Interleukin 11 - Bennettら: Current Protocols in Immunology. Coliganら編、第1巻、6.15.1頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991; Ciarlettaら: Current Protocols in Immunology. Coliganら編、第1巻、6.13.1頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991。

【0334】

抗原に対するT細胞クローン応答についてのアッセイ(とりわけ、増殖およびサイトカイン産生を測定することによって、APC-T細胞相互作用に影響し、そしてT細胞の効果を指向するタンパク質を同定する)としては、以下に記載されるアッセイが挙げられるが、これらに限定されない: Current Protocols in Immunology. Coliganら編、Green Publishing Associates and Wiley-Interscience(第3章、第6章および第7章); Weinbergerら、Proc Natl Acad Sci USA 77:6091-6095, 1980; Weinbergerら、Eur J Immun 11:405-411, 1981; Takaiら、J Immunol 137:3494-3500, 1986; Takaiら、J Immunol 140:508-512, 1988。

【0335】

(免疫刺激または抑制活性)

本発明のF C T R Xタンパク質または同系の治療剤はまた、免疫刺激活性または免疫抑制活性（アッセイが本明細書に記載されている活性を含むがこれに限定されない）を示し得る。タンパク質は、種々の免疫不全および障害（重症複合型免疫不全（S C I D））の処置において、例えば、Tおよび/またはBリンパ球の成長および増殖を調節（上方制御または下方制御）するのに、ならびにNK細胞および他の細胞集団の細胞溶解性活性に影響するのに、有用であり得る。これらの免疫不全は、遺伝的であり得るか、または致命的（例えば、H I V）、ならびに細菌感染もしくは真菌感染によって引き起こされるか、または自己免疫障害から生じ得る。より詳細には、致命的な、細菌、真菌または他の感染によって生じる感染性疾患（H I V、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、マイコバクテリア、リーシュマニア属、マラリア属およびカンジタのような種々の真菌感染による感染を含む）は、本発明のタンパク質を用いて処理可能であり得る。当然ながら、これに関して、免疫系へのブーストが一般に所望され得る（すなわち、癌の処置において）場合、本発明のタンパク質はまた有用であり得る。

【0336】

本発明のタンパク質または同系の治療剤を用いて処置され得る自己免疫障害としては、例えば、以下が挙げられる：結合組織疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、自己免疫性肺炎、ギャン - バレー症候群、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性真性糖尿病、重症筋無力症、対宿主性移植片病および自己免疫性炎症性眼疾患。本発明のこのようなタンパク質はまた、喘息（特に、アレルギー性喘息）または他の呼吸系障害のような、アレルギー反応およびアレルギー状態の処置に有用であり得る。免疫抑制が所望される他の状態（例えば、器官移植を含む）もまた、本発明のタンパク質を使用して処置可能であり得る。

【0337】

本発明のタンパク質または同系の治療剤を使用して、多くの方法で、免疫応答することが可能であり得る。下方調節は、すでに進行中の免疫応答を阻害またはブロックする形態であり得るか、免疫応答の誘導を妨げることを含み得る。活性化T細胞の機能は、T細胞応答を抑制することによってか、またはT細胞におけ

る特異的寛容を誘導することによってか、あるいはその両方によって阻害され得る。T細胞応答の免疫抑制は、一般に、抑制剤に対するT細胞の連続的曝露を必要とする、能動的な非抗原特異的プロセスである。寛容（T細胞における非応答性またはアネルギー（energy）を誘導することを含む）は、一般的に抗原特異的であり、そして寛容化剤に対する曝露が停止した後で持続するという点で免疫抑制と識別可能である。操作的には、寛容は、寛容化剤の非存在下における特異的抗原に対する再曝露の際に、T細胞応答の欠如によって実証され得る。

【0338】

1以上の抗原機能を（Bリンパ球抗原機能（例えば、B7のような）を含むが、限定されない）を下方調節するか、または妨げる（例えば、活性化T細胞による高レベルのリンホカイン合成を妨げる）ことは、組織、皮膚および器官の移植の状況、ならびに対宿主性移植片病（GVHD）において有用である。例えば、T細胞機能のブロックは、組織移植における組織破壊の減少を生じるはずである。代表的に、組織移植において、移植片の拒絶は、T細胞によるその外来としての認識、それに続く移植片を破壊する免疫反応を介して開始される。移植前に免疫細胞上でB7リンパ球抗原のその天然のリガンドとの相互作用を阻害またはブロックする分子（例えば、B7-2活性を有するペプチドの可溶性モノマー形態単独、あるいは別のBリンパ球抗原（例えば、B7-1、B7-3）またはブロッキング抗体の活性を有するペプチドのモノマー形態との組み合わせ）の投与は、対応する同時刺激シグナルの移行を伴わずに、免疫細胞上でその分子の天然のリガンドへの結合を導き得る。このような形態でBリンパ球抗原機能をブロックすることは、免疫細胞（例えば、T細胞）によるサイトカイン合成を妨げ、従って、免疫抑制剤として作用する。さらに、同時刺激の欠如はまた、T細胞を活性化して、それによって被験体において寛容を誘導するのに十分であり得る。Bリンパ球抗原ブロッキング試薬による長期の寛容の誘導は、これらのブロッキング試薬の繰り返しの投与の必要性を回避し得る。被験体において十分な免疫抑制または寛容を達成するために、Bリンパ球抗原の機能をブロックすることが必要であり得る。

【0339】

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

【0340】

ブロッキング抗原機能はまた、自己免疫疾患の処置に治療的に有用であり得る。多くの自己免疫障害は、自己組織に対して反応性であり、そしてその疾患の病理に関係するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進する、T細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性T細胞の活性化の予防は、疾患の症状を軽減し得るか、または排除し得る。Bリンパ球抗原のレセプター：リガンド相互作用を破壊することによってT細胞の同時刺激をブロックする試薬の投与は、T細胞の活性化を阻害し、そしてその疾患プロセスに関係し得る自己抗体またはT細胞誘導性サイトカインの産生を妨げるために使用され得る。さらに、ブロッキング試薬は、疾患の長期の軽減を導き得る自己反応性T細胞の抗原特異的寛容を誘導し得る。自己免疫障害の予防または軽減におけるブロッキング試薬の効力は、ヒト自己免疫疾患のよく特徴付けられた多くの動物モデルを使用して決定され得る。例としては、マウス実験用自己免疫脳炎、MRL/lpr/lprマウスまたはNZBハイブリッドマウスにおける全身性エリテマトーデス、マウス自己免疫コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBラットにおける真性糖尿病、ならびにマウス実験用重症筋無力症が挙げられる(Paul編、*Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, 198

9、840～856頁を参照のこと)。

【0341】

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

【0342】

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

【0343】

別の適用では、抗原機能(好ましくはBリンパ球抗原機能)の上方調節または増大が腫瘍免疫の誘導において有用であり得る。本発明の少なくとも1つのペプチドをコードする核酸をトランスフェクトされた腫瘍細胞(例えば、肉腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、癌腫)を、被験体中の腫瘍特異的寛容を克服するために被験体に投与し得る。所望であれば、腫瘍細胞はトランスフェクトされてペプチドの組み合わせを発現し得る。例えば、患者から得られた腫瘍細胞に、B7-2-様活性を有するペプチド単独、またはB7-1-様活性および

／またはB7-3-様活性を有するペプチドを組み合わせて発現する発現ベクターを用いて、エクスピボでトランスフェクトし得る。このトランスフェクトされた腫瘍細胞は、患者に戻され、トランスフェクトされた細胞の表面上にペプチドの発現を生じる。あるいは、遺伝子治療技法を用いて、インスピボのトランスフェクションのために腫瘍細胞を標的化し得る。

【0344】

腫瘍細胞の表面上のB細胞リンパ球抗原の活性を有する本発明のペプチドの存在は、T細胞に対して必要な同時刺激シグナルを提供し、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対するT細胞媒介免疫応答を誘導する。さらに、MHCクラスIまたはMHCクラスII分子を欠くか、または十分な量のMHCクラスIまたはMHCクラスII分子を再発現しない腫瘍細胞は、MHCクラスIα鎖タンパク質およびβ₂マイクログロブリンタンパク質、またはMHCクラスIIα鎖タンパク質およびMHCクラスIIβ鎖タンパク質のすべてまたは一部(例えば、細胞質-ドメイン短縮化部分)をコードする核酸でトランスフェクトされ得、それによって細胞表面上にMHCクラスIまたはMHCクラスIIタンパク質を発現する。Bリンパ球抗原(例えば、B7-1、B7-2、B7-3)の活性を有するペプチドと組み合わせた適切なクラスIまたはクラスII MHCの発現は、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対するT細胞媒介性免疫応答を誘導する。必要に応じて、不変鎖(invariant chain)のようなMHCクラスII関連タンパク質の発現をブロックするアンチセンス構築物をコードする遺伝子もまた、Bリンパ球抗原の活性を有するペプチドをコードするDNAで同時トランスフェクトされ得、腫瘍関連抗原の提示を促進し、そして腫瘍特異的免疫を誘導する。従って、ヒト被験体におけるT細胞媒介免疫応答の誘導は、被験体における腫瘍特異的寛容を克服するのに十分であり得る。

【0345】

本発明のタンパク質または同系の治療剤の活性は、とりわけ、以下の方法により測定され得る: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(第3章、第7

章) ; Herrmannら、Proc Natl Acad Sci USA 78:2488-2492、1981; Herrmannら、J Immunol 128:1968-1974、1982; Handaら、J Immunol 135:1564-1572、1985; Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986; Takaiら、J Immunol 140:508-512、1988; Herrmannら、Proc Natl Acad Sci USA 78:2488-2492、1981; Herrmannら、J Immunol 128:1968-1974、1982; Handaら、J Immunol 135:1564-1572、1985; Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986; Bowmanら、J Virology 61:1992-1998; Takaiら、J Immunol 140:508-512、1988; Bertagnolliら、Cell Immunol 133:327-341、1991; Brownら、J Immunol 153:3079-3092、1994に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない、胸腺細胞または脾細胞の細胞傷害性のための適切なアッセイ。

【0346】

T細胞依存性免疫グロブリン応答およびアイソタイプスイッチングのための(とりわけ、T細胞依存性抗体応答を調節し、しかもTh1/Th2プロフィールに影響するタンパク質を同定する)アッセイとしては、Maliszewski、J Immunol 144:3028-3033、1990;ならびにMondおよびBrunswick、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganら編、第1巻、3.8.1.-3.8.16、John Wiley and Sons、Toronto 1994に記載のようなアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0347】

混合リンパ球反応(MLR)アッセイ(とりわけ、優先的にTh1およびCTL応答を生成するタンパク質を同定するアッセイ)としては、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganら編、Gr

eene Publishing Associates and Wiley - Interscience (第3章、第7章); Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986; Takaiら、J Immunol 140:508-512、1988; Bertagnolliら、J Immunol 149:3778-3783、1992に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0348】

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

【0349】

リンパ球生存/アポトーシスのためのアッセイ(とりわけ、スーパー抗原誘導後にアポトーシスを妨げるタンパク質およびリンパ球ホメオスタシスを調節するタンパク質を同定する)としては、Darzynkiewiczら、Cytometry 13:795-808、1992; Gorczycaら、Leukemia 7:659-670、1993; Gorczycaら、Cancer Res 53:1945-1951、1993; Itohら、Cell 66:233-243、1991; Zacharchuk、J Immunol 145:4037-4045、1990; Zamaiら、Cytometry 14:891-897、1993; Gorczycaら、Internat J O

ncol 1:639-648、1992に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0350】

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

【0351】

(造血調節活性)

本発明のFCTRXタンパク質および同系の治療剤は、造血の調節において、そして結果として骨髄細胞不全またはリンパ球細胞不全の処置において有用であり得る。コロニー形成性細胞または因子依存性細胞株を支援する周縁の生物学的活性でさえ、造血を調節することにおける、例えば、単独またはその他のサイトカインとの組み合わせで、赤血球系前駆体細胞の成長および増殖を支援することにおける関与を示し、それによって、例えば、種々の貧血を処置することにおけるか、または赤血球系前駆体細胞および/または赤血球細胞の産生を刺激するための照射/化学的療法と組み合わせた使用のための有用性;例えば、結果として骨髄抑制を防ぐかまたは処置するための化学的療法と組み合わせて有用な、骨髄細胞(例えば、顆粒球および単球/マクロファージ)の成長および増殖を支持する(すなわち伝統的なCSF活性)ことにおける有用性;巨核球そして結果として血小板の成長および増殖を支持し、それによって血小板減少症のような種々の血小板障害の予防または処置を可能にすること、そして一般に、血小板輸血に代わる使用か、またはそれへの優待のための有用性;および/または上記の任意および全ての造血幹細胞に成熟し得、そしてそれ故、種々の幹細胞障害(再生不良性貧血および発作性夜行性ヘモグロビン尿を含むがこれらに限定されない、通常、移植で処置されるような障害)における治療有用性を見出す、造血幹細胞の成長および増殖を支持することにおける有用性、ならびに正常細胞または遺伝子治

療のために遺伝子操作された細胞として、インビボまたはエキソビボ（すなわち、骨髄移植または末梢前駆体細胞移植（同種または異種）と組み合わせた）のいずれかで、照射／化学的療法後に幹細胞区画を再増殖させることにおける有用性を示す。

【0352】

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

【0353】

胚幹細胞分化のアッセイ（とりわけ、胚分化造血に影響するタンパク質を同定するアッセイ）としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：Johanssonら、Cell Biol 15:141-151、1995；Kellerら、Mol Cell Biol 13:473-486、1993；McClellanら、Blood 81:2903-2915、1993に記載のアッセイ。

【0354】

幹細胞生存および分化のアッセイ（とりわけ、リンパ-造血を調節するタンパク質を同定するアッセイ）としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：メチルセルロースコロニー形成アッセイ、CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 265-268頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、Freshney、；Hirayamaら、Proc Natl Acad Sci USA 89:5907-5911、1992；CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 23-39頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、McNieceおよびBridgeli；Nebeら、Exp Hematol 22:353-359、1994；CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 1-21頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、Ploemacher；CULTURE OF H

EMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 1 63 - 179頁、Wiley - Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、Sponceretら; CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 139 - 162頁、Wiley - Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、Sutherland、に記載のアッセイ。

【0355】

(組織増殖活性)

本発明のFCTRXタンパク質または同系の治療剤はまた、骨、軟骨、腱、靭帯および/または神経組織成長もしくは再生のために使用される組成物、ならびに創傷治癒および組織修復および組織置換のために使用される組成物、そして火傷、切開および潰瘍の処置において有用性を有し得る。

【0356】

本発明のタンパク質または同系の治療剤は、骨が正常に形成されない状況で軟骨および/または骨増殖を誘導し、ヒトおよびその他の動物における骨折および軟骨損傷または欠損の治癒における適用を有する。本発明のタンパク質を採用するこのような調製物は、閉鎖骨折整復および開放骨折整復における予防的使用、そしてまた人工関節の改善された固定における使用を有し得る。骨形成剤により誘導されたデノボ骨形成は、先天的、外傷誘導、または腫瘍切除誘導脳顔面頭蓋欠陥の修復に寄与し、そしてまた美容成形手術に有用である。

【0357】

本発明のタンパク質または同系の治療剤はまた、歯周病の処置において、およびその他の歯修復プロセスで用いられ得る。このような薬剤は、骨形成性細胞を誘因するか、骨形成性細胞の増殖を刺激するか、骨形成性細胞の前駆体の分化を誘導する環境を提供し得る。本発明のタンパク質はまた、骨および/または軟骨修復の刺激によるか、または炎症プロセスにより媒介される組織破壊の炎症またはプロセス(コラゲナーゼ活性、破骨細胞活性など)をブロックすることによるような、骨粗鬆症または変形性関節炎の処置で有用であり得る。

【0358】

本発明のタンパク質に寄与し得る組織再生活性の別のカテゴリーは、腱/靭帯形成である。このような組織が通常形成されない状況で、腱/靭帯様組織またはその他の組織形成を誘導する本発明のタンパク質は、ヒトおよびその他の動物における、腱または靭帯断裂、変形およびその他の腱または靭帯欠陥の治療における適用を有する。腱/靭帯様組織誘導性タンパク質を採用するこのような調製物は、腱または靭帯組織への損傷を防ぐことにおける予防的用途、ならびに腱または靭帯を骨またはその他の組織に対して固定することの改善、および腱または靭帯組織への欠陥を修復することにおいて用途を有し得る。本発明の組成物により誘導されるデノボの腱/靭帯様組織形成は、先天的、外傷誘導、またはその他の起源のその他の腱または靭帯欠陥の修復に寄与し、そしてまた腱または靭帯の付着または修復のための美容成形手術で有用である。本発明の組成物は、腱形成性細胞または靭帯形成性細胞を誘引するか、腱形成性細胞または靭帯形成性細胞の増殖を刺激するか、腱形成性細胞または靭帯形成性細胞の前駆体の分化を誘導するか、または組織修復を行うためにインビボに戻すためにエキソビボで腱/靭帯の細胞または前駆体の増殖を誘導する環境を提供し得る。本発明の組成物はまた、腱炎、毛根管症候群およびその他の腱または靭帯欠陥の処置において有用であり得る。この組成物はまた、当該分野で周知であるキャリアとして、適切なマトリックスおよび/または金属イオン封鎖剤を含み得る。

【0359】

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

障害もまた、本発明のタンパク質を用いて治療可能であり得る。

【0360】

本発明のタンパク質はまた、圧迫性潰瘍、血管不全に関連する潰瘍、手術または外傷創傷などを含むがこれらに限定されない非治癒創傷のより良好な、またはより迅速な閉鎖を促進するために有用であり得る。

【0361】

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

【0362】

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

【0363】

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

【0364】

本発明のタンパク質の活性はまた、とりわけ、以下の方法により測定され得る：

組織生成活性のためのアッセイとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：国際特許公開番号WO95/16035（骨、軟骨、腱）；国際特許公開番号WO95/05846（神経、ニューロン）；国際特許公開番号WO91/07491（皮膚、内皮）に記載されるアッセイ。

【0365】

創傷治癒活性のためのアッセイとしては、以下が挙げられるがこれらに限定さ

れない: EaglsteinおよびMenz、J. Invest. Dermatol 71:382-84(1978)によって改変されるような、Winter、Epidermal Wound Healing、71-112頁(MaibachおよびRovee編)、Year Book Medical Publishers、Inc.、Chicagoに記載のアッセイ。

【0366】

(アクチビン/インヒビン活性)

本発明のFCTRXタンパク質または同系の治療剤はまた、アクチビン関連活性またはインヒビン関連活性を示し得る。インヒビンは、卵胞刺激ホルモン(FSH)の放出を阻害するその能力によって特徴付けられ、一方、アクチビンは、卵胞刺激ホルモン(FSH)の放出を刺激するその能力によって特徴付けられる。従って、本発明のタンパク質は、単独またはインヒビンファミリーのメンバーとのヘテロ二量体において、雌性哺乳動物における受胎能を減少し、そして雄性哺乳動物における精子形成を減少するインヒビンの能力に基づく避妊薬として有用であり得る。他のインヒビンの十分な量の投与は、これら哺乳動物における不妊症を誘導し得る。あるいは、本発明のタンパク質は、ホモ二量体としてか、またはインヒビンb群の他のタンパク質サブユニットとのヘテロ二量体として、下垂体前葉の細胞からのFSH放出を刺激するアクチビン分子の能力に基づいて、受胎能誘導治療として有用であり得る。例えば、米国特許第4,798,885号を参照のこと。本発明のタンパク質はまた、ウシ、ヒツジ、およびブタのような家畜の生涯生殖効率を増加するように、性的に未熟な哺乳動物における受胎の開始の促進のために有用であり得る。

【0367】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る：
 アクチビン/インヒビン活性のアッセイとしては、以下に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない: Valeら、Endocrinology 91:562~572、1972; Lingら、Nature 321:779~782、1986; Valeら、Nature 321:776~779、1986; Masonら、Nature 318:659~663、1985;

Forager, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3091~3095, 1986。

【0368】

(走化性/ケモキネシス活性)

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

【0369】

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

【0370】

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

6.12章、Measurement of alpha and beta Chemokines 6.12.1~6.12.28); Taubら、J Clin Invest 95:1370~1376、1995; Lindら、A PMIS 103:140~146、1995; Mullerら、Eur J Immunol 25:1744~1748; Gruberetら、J Immunol 152:5860~5867、1994; Johnstonら、J Immunol 153:1762~1768、1994。

【0371】

(止血活性および血栓崩壊活性)

本発明のタンパク質または同系の治療剤はまた、止血活性または血栓崩壊活性を示し得る。結果として、そのようなタンパク質は、種々の凝固障害(血友病のような遺伝性疾患を含む)の処置において有用であること、または凝固および外傷、外科手術または他の原因によって生じる創傷の処置における他の止血事象を促進することが予測される。本発明のタンパク質はまた、血栓症の溶解または形成阻害のため、およびそこから生じる状態(例えば、心臓血管および中枢神経系血管の梗塞(例えば、発作))の処置および予防のために有用であり得る。

【0372】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る：止血および血栓崩壊活性のアッセイとしては、以下に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない：Linnetら、J. Clin. Pharmacol. 26:131~140、1986; Burdickら、Thrombosis Res. 45:413~419、1987; Humphreyら、Fibrinolysis 5:71~79(1991); Schaub、Prostaglandins 35:467~474、1988。

【0373】

(レセプター/リガンド活性)

本発明のタンパク質または同系の治療剤はまた、レセプター、レセプターリガンドまたはレセプター/リガンド相互作用のインヒビターもしくはアゴニストとしての活性を実証し得る。そのようなレセプターおよびリガンドの例としては、

以下が挙げられるがこれらに限定されない：サイトカインレセプターおよびそのリガンド、レセプターキナーゼおよびそのリガンド、レセプターホスファターゼおよびそのリガンド細胞間相互作用に關与するレセプターおよびそのリガンド（限定することなく、細胞接着分子（セレクチン、インテグリンおよびそのリガンド）、ならびに抗原提示、抗原認識および細胞性免疫応答および液性免疫応答の發生に關与するレセプター／リガンド対を含む）。レセプターおよびリガンドはまた、關連するレセプター／リガンド相互作用の可能性のあるペプチドまたは低分子インヒビターのスクリーニングにおいて有用である。本發明のタンパク質（限定することなく、レセプターおよびリガンドのフラグメントを含む）が、それ自体で、レセプター／リガンド相互作用のインヒビターとして有用であり得る。

【0374】

本發明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る：レセプター - リガンド活性の適切なアッセイとしては、限定することなく、以下に記載されるものが挙げられる：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganら編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience（第7.28章、Measurement of Cellular Adhesion under static conditions 7.28.1 - 7.28.22）、Takaiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6864~6868、1987；Biererら、J. Exp. Med. 168:1145~1156、1988；Rosensteinら、J. Exp. Med. 169:149~160 1989；Stoltenborgra、J. Immunol. Methods 175:59~68、1994；Stittら、Cell 80:661~670、1995。

【0375】

（抗炎症活性）

本發明のタンパク質または同系の治療剤はまた、抗炎症活性を示し得る。抗炎症活性は、炎症応答に關与する細胞に対する刺激を提供すること（細胞間相互作用（例えば、細胞接着など）を阻害するか、または促進することによって）によ

ってか、炎症プロセスに關与する細胞の走化性を阻害するか、または促進することによってか、細胞の血管外遊出を阻害するか、または促進するかによってか、あるいは炎症応答を直接的により阻害するか、またはより促進する他の因子の産生を刺激するか、または抑制することによって、達成され得る。そのような活性を示すタンパク質を使用して、炎症状態（慢性状態または急性状態を含む）（限定することなく、感染に關連する炎症（例えば、敗血症性ショック、敗血症または全身性炎症応答症候群（SIRS））、虚血 - 灌流損傷、内毒素の致死性、關節炎、補体媒介性激症拒絶症、腎炎、サイトカイン誘導性胚損傷またはケモカイン誘導性肺損傷、炎症性腸疾患、クローン病、またはTNFもしくはIL-1のようなサイトカインの過剰産生より生じるものが挙げられる）を処置し得る。本発明のタンパク質はまた、抗原性物質または抗原性材料に対する、アナフィラキシーおよび過敏症の処置のためにも、有用であり得る。

【0376】

（腫瘍阻害活性）

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

【0377】

（他の活性）

本発明のタンパク質または同系の治療剤はまた、以下のさらなる活性または効果の1つ以上を示し得る：限定はされないが、細菌、ウイルス、真菌および他の寄生物を含む感染因子の、増殖、感染または機能を阻害するか、あるいは死滅させること；身体的特徴（限定することなく身長、体重、髪の色、目の色、皮膚、脂肪対除脂肪比率、または他の組織色素沈着、あるいは器官または身体部分の

サイズまたは形状（例えば、胸部増大または減少、骨の形態または形状の変化）など）を生じること（抑制することまたは増強すること）；バイオリズムあるいはサーカディアンサイクルまたはサーカディアンリズムを生じること；雄性被験体または雌性被験体の受胎能を生じること；食事脂肪、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子または他の栄養因子もしくは栄養成分の、代謝、異化作用、同化作用、プロセッシング、利用、貯蔵または除去を生じること；行動的特徴（食欲、性欲、ストレス、認識（認識障害を含む）、うつ病（抑うつ障害を含む）および狂暴症を含むが、これらに限定されない）を生じること；鎮痛性効果または他の疼痛減少効果を提供すること；造血系列以外の系列における胚性幹細胞の分化または増殖を促進すること；ホルモン活性または内分泌活性；酵素の場合、酵素の欠損を矯正すること、および欠損関連疾患を処置すること；過剰増殖障害（例えば、乾癬）の処置；免疫グロブリン様活性（例えば、抗原または補体に結合する活性など）；ならびにワクチン組成物において抗原として作用し、そのようなタンパク質または他の物質あるいはそのようなタンパク質と交差反応する実体に対する免疫応答を惹起する能力。

【0378】

神経障害としては一般に、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、多発性硬化症、筋萎縮側索硬化症（ALS）、末梢神経障害、神経系の腫瘍、神経毒に対する曝露、急性脳傷害、抹消神経外傷もしくは損傷、および他の神経傷害、てんかん、ならびに/または振戦が挙げられる。

【0379】

本発明はさらに以下の非限定的実施例に例示される。

【0380】

（実施例）

（実施例1．クローン30664188.0.99由来の成熟形態（30664188.0.m99）の分子クローニング）

クローン30664188.0.99の成熟形態（配列番号2のアミノ酸配列の残基24～370をコードする）をクローニングした。このフラグメントは30664188.0.m99と呼ばれ、そして残基23と残基24との間で切断

されると推測されるシグナルペプチドが除去された後に残るポリペプチド配列に対応する。以下のオリゴヌクレオチドプライマーを、30664188.0.99の推定成熟形態をPCR増幅するために設計した。

【0381】

30664188 Eco 順方向：

CTCGTC GAATTC ACC CCG CAG AGC GCA T
CC ATC AAA GC (配列番号25)

3066418 Xho 逆方向：

CTCGTC CTC GAG TCG AGG TGG TCT TGA
GCT GCA GAT ACA (配列番号26)

順方向プライマーはインフレームEcoRI制限部位を含み、そして逆方向プライマーはXhoI制限部位を含んでいた。EcoRI/XhoIフラグメントは、pET28 E. coli発現ベクターおよびpMelV5Hisバキュロウイルス発現ベクターに適合性である。

【0382】

PCR反応を、5ngのヒト脾臓および胎児肺cDNAテンプレートを使用して設定した。反応混合物は、50μリットル容積で、それぞれ1μMの30664188 Eco順方向プライマーおよび3066418Xho逆方向プライマー、5マイクロモルdNTP(Clontech Laboratories, Palo Alto CA)および1マイクロリットルの50xAdvantage-HF2ポリメラーゼ(Clontech Laboratories, Palo Alto CA)を含んでいた。以下のPCR反応条件を使用した：

a) 96 3分

b) 96 30秒変性

c) 70 30秒、プライマーアニーリング。この温度は、1 / サイクル

で徐々に下げられた。

【0383】

d) 72 1分伸長

工程(b)~(d)を10回繰り返す

- e) 96 30秒変性
 f) 60 30秒アニーリング
 g) 72 1分伸長
 工程(e)~(g)を25回繰り返す
 h) 72 5分の最終伸長。

【0384】

1041bpを有すると予測される増幅された産物を、両方のサンプルにおいてアガロースゲル電気泳動により検出した。これらのフラグメントを、アガロースゲルから精製し、pCR2.1ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)に連結した。クローン化したインサートを、M13順方向プライマーおよびM13逆方向プライマーおよび以下の遺伝子特異的プライマー:

3066418 S1: GGA CGA TGG TGT GGA CAC
 AAG (配列番号27)、

3066418 S2: CTT GTG TCC ACA CCA TCG
 TCC (配列番号28)、

3066418 S3: TAT CGA GGC AGG TCA TAC
 CAT (配列番号29)および

3066418 S4: ATG GTA TGA CCT GCC TCG
 ATA (配列番号30)

を使用して配列決定した。

【0385】

クローニングされたインサートを、30664188.0.99の推定成熟形態をコードするオープンリーディングフレームとして確かめた。胎児肺由来の構築物(30664188-S311aと呼ばれる)を、発現ベクターへさらにサブクローニングするために使用した(以下を参照のこと)。制限部位内の30664188-S311aのヌクレオチド配列は、30664188.0.99のORFにおける対応するフラグメントと100%同一であることが見出された(表1;配列番号1)。

【0386】

(実施例2. 哺乳動物発現ベクターpCEP4/Secの調製)

FCTR X核酸を、pCEP4/SECという名前のベクターで哺乳動物細胞において発現させた。このベクターを、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して調製した：

pSec-V5-His順方向

CTCGTCCTCGAGGGTAAGCCTATCCCTAAC (配列番号31) および

pSec-V5-His逆方向

CTCGTCGGGCCCTGATCAGCGGGTTTAAAC (配列番号32)。

【0387】

これらのプライマーを、V5およびHis6を含むpcDNA3.1-V5His (Invitrogen, Carlsbad, CA) 発現ベクターからフラグメントを増幅するように設計した。PCR産物を、XhoIおよびApaIで消化し、そしてIg リーダー配列 (Invitrogen, Carlsbad CA) を含む、XhoI/ApaI消化したpSecTag2Bベクターに連結した。得られたベクターpSecV5Hisの正確な構造 (インフレームでIg - リーダーおよびV5-His6を含む) を、DNA配列分析により確認した。ベクターpSecV5HisをPmeIおよびNheIで消化して、上記エレメントを正確なフレームで保持するフラグメントを提供した。このPmeI-NheIフラグメントを、BamHI/KlenowおよびNheI処理されたベクターpCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) に連結した。得られたベクターはpCEP4/Secと命名され、そしてPCMVおよび/またはPT7プロモーターの制御下に、インフレームIg リーダー、目的のクローンの挿入部位、ならびにV5および6xHisを含む。pCEP4/Secは、任意のタンパク質をIg 鎖シグナルペプチド融合することによって異種タンパク質発現および分泌を可能にする発現ベクターである。発現タンパク質の検出および精製は、C-末端におけるV5エピトープタグおよび6xHisタグの存在により補助される (Invitrogen, Carlsbad, CA)

。

【0388】

(実施例3 . E . coliにおける30664188 . m99ポリペプチドの発現)

ベクターpRSETA (Invitrogen Inc. , Carlsbad . CA)をXhoIおよびNcoI制限酵素で消化した。オリゴヌクレオチドリンカー：

CATGGTCAGCCTAC (配列番号33) ; および

TCGAGTAGGCTGAC (配列番号34)

を、摂氏37度にてアニールし、XhoI - NcoI処理したpRSETAに連結した。得られたベクターを、制限分析および配列決定によって確認し、そしてpETMYと命名した。30664188配列を含む配列のBglII - XhoIフラグメント (実施例3) を、BamHIおよびXhoIで消化したベクターpETMYに連結した。得られた発現ベクターは、pETMY - 30664188と命名される。このベクターにおいて、30664188を、そのN末端において6xHisタグおよびT7エピトープに融合した。次いで、プラスミドpETMY - 30664188を、E . coli発現宿主BL21 (DE3 , pLys) (Novagen , Madison , WI) にトランスフェクトし、そしてタンパク質発現を、製造業者の指示に従って誘導した。誘導後、E . coli細胞を収集し、そしてタンパク質を、抗 - His6Gly抗体 (Invitrogen , Carlsbad , CA) を使用して、ウェスタンブロッティング法により分析した。図2は、30664188 . m99が、見かけの分子量40kDaのタンパク質として発現されたということを示す。これは、30664188 . m99配列に予測された分子量に近い。

【0389】

(実施例4 . ヒト胚性腎臓293細胞における0664188 . m99ポリペプチドの発現)

30664188 . m99配列含有EcoRI - XhoIフラグメントを、30664188 - S311a (実施例1) から単離し (実施例1) 、そしてベク

ターpE28a (Novagen, Madison, WI) にサブクローン化し、プラスミドpE28a-30664188を作製した。続いてpE28a-30664188を部分的にBamHI制限酵素で消化し、次いで完全にXhoIで消化した。1.1kbのフラグメントを単離し、そしてBamHI-XhoI消化pCEP4/Sec (実施例2) に連結して、発現ベクターpCEP4/Sec-30664188を生成した。pCEP4/Sec-30664188ベクターを、ヒト胚性腎臓293細胞(ATCC番号CRL-1573, Manassas, VA) に、Lipofectamine Plus 試薬を使用して製造者の指示(Gibco/BRL/Life Technologies, Rockville, MD) に従ってトランスフェクトした。細胞ペレットおよび上清を、トランスフェクション後72時間で収集し、抗V5抗体を用いて還元条件下SDS-PAGE操作のウェスタンブロットティング法によって、30664188.m99タンパク質発現について試験した。図3は、30664188.m99が、293細胞により分泌される50、60、および98kDaのタンパク質の見掛けの分子量を有する3つの異なるタンパク質バンドとして発現されることを示す。50kDaのバンドは、30664188.m99のモノマーグリコシル化形態に期待されるサイズ(sized)で移動し、そして98kDaのバンドは、このモノマー形態のダイマーに一致するサイズで移動した。

【0390】

(実施例5. 30664188.0.99の放射ハイブリッドマッピング)

ヒト染色体マーカーを使用する放射ハイブリッドマッピングをクローン30664188.0.99について実施した。これらの結果を得るために使用される手順は、Steen, RGらにおいて記載される手順と類似している。(A High-Density Integrated Genetic Linkage and Radiation Hybrid Map of the Laboratory Rat, Genome Research 1999 (1999年5月21日にオンラインで公開された) 第9巻、AP1-AP8, 1999)。無作為化放射線誘導ヒト染色体フラグメントを含む93細胞クローンのパネルを、独特の様式で、得ようとするクローンを同定するために設計されたP

CRプライマーを使用して、96ウェルプレートにおいてスクリーニングした。クローン30664188.0.99は、第11染色体に位置することが見出された(マーカーWI-9345から3.1cRおよびマーカーCHLC.GATA6C11から1.7cR)。

【0391】

(実施例6.30664188.m99タンパク質の発現および精製)

実施例1においてクローニングされた成熟タンパク質を提示するセグメントを切除し、そしてpCEP4プロモーターの制御下でHEK293細胞のトランスフェクションに適切なベクターpCEP4/Sec(実施例2)にサブクローニングした。得られたベクターをpCEP4/Sec/30664188と名付けた。

【0392】

HEK293細胞をダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)/10%ウシ胎児血清培地において90%のコンフルエンスまで増殖させた。これらの細胞を、製造者の指示(Gibco/BRL/Life Technologies、Rockville、MD)に従ってLipofectamine 2000を使用してpCEP4secまたはpCEP4sec/30664188.m99でトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、2日間DMEMと共にインキュベートし、そして馴化培地を細胞上清を集めることにより調製した。この馴化培地を、Talon金属アフィニティクロマトグラフィー(Clontech、Palo Alto、CA)により富化した。簡単には、7mlの馴化培地を、1mlのTalon金属アフィニティ樹脂とスピンカラム中でインキュベートした。このスピンカラムを2回1mlのPBSで洗浄した。これらのカラムを次いで2回0.65mlのPBS/0.5MイミダゾールpH8.0で溶出し、そして溶離液をプールした。イミダゾールを、Microcon遠心分離フィルターデバイス(Millipore Corp.、Bedford、MA)を使用してPBSへの緩衝液交換透析により除去した。富化遺伝子産物を4で貯蔵した。

【0393】

得られた精製されたタンパク質を、還元条件下でSDS-PAGEにかけ、そして抗V5抗体でプローブ化し(probed)、これを酵素標識で検出した。2つの別のトランスフェクションおよび精製操作の結果を、ゲルで示す。これらは、産物がV5含有ポリペプチドの混合物であることを示す。最も大きいものは約50kDaの見かけの分子量を有する(図4)。プログラムproSiteは、成熟タンパク質中の1つのNグリコシル化部位を予想する。グリコシル化は、検出された見かけの分子量を説明し得る。従って、50kDaのバンドは、全長遺伝子産物に期待される長さと一致する。主に約20~25kDaの見かけの分子量を有する他のバンドも生じた。これらは、293細胞の細胞内またはそれらからの分泌後の細胞外の何れかで起きるタンパク質分解の結果であると推定される。

【0394】

(実施例7. 定量的PCRによる配列30664188の実時間組織発現プロファイリング)

次いで、実時間PCRを、3'クエンチャーを有する得意的オリゴヌクレオチドプローブからの5'蛍光発生性(fluorogenic)標識の放出をモニタリングすることにより、複数の組織または細胞サンプルについて行った。TaqMan(登録商標)PCR試薬キット(Roche Molecular Systems, Inc.)およびPerkin-Elmer Biosystems ABI PRISM(登録商標)7700配列検出システムを用いる蛍光発生性5'ヌクレアーゼアッセイを使用して、OCRが起こるにつれて、30664188転写物に特異的な標的配列を実時間で検出およびモニターする。

【0395】

プローブおよびプライマーを、入力として30664188の配列を使用するPerkin Elmer Biosystem's Primer Expressソフトウェアパッケージ(Apple ComputerのMacintosh Power PC用バージョンI)に従って設計した。デフォルト設定を反応条件に使用し、そして以下のパラメータをプライマーを選択する前に設定した: プライマー濃度 = 250 nM、プライマー融解温度(T_m) 範囲 = 58

~ 60 、プライマー最適 $T_m = 59$ 、最大プライマー差 = 2 、プローブは、5' Gを有さず、プローブ T_m は、プライマー T_m よりも10 高くなければならない、アンプリコンサイズは、75 bp ~ 100 bp でなければならない。3組のプローブおよびプライマーを、Synthegen (Houston, TX, USA) によって合成し、HPLCにより二重精製して、結合していない色素を取り除いた。質量分析法を使用して、それぞれ、プローブの5' 末端および3' 末端へのレポーター色素および消光色素の有効なカップリングを確認した。

【0396】

PCR調製および条件は、以下の工程を含んでいた：各組織（ポリA + RNA、2.8 pg）および細胞株（全RNA、70 ng）からのサンプルRNAを、96ウェルPCRプレート（Perkin Elmer Biosystems）の各ウェルにスポットした。41の正常ヒト組織および55のヒト癌細胞株を採用した。

【0397】

（表7．実時間TaqMan™組織プロファイリングの結果）

【0398】

【表7】

	正常組織及び腫瘍組織	相対発現 (%)		
		Ag33	Ag66	Ag168
1	内皮細胞	1.66	1.23	0.00
2	内皮細胞 (如置)	2.80	1.51	0.00
3	膵臓	36.35	28.72	37.89
4	膵臓 ca. CAPAN2	1.05	0.46	0.00
5	脳	10.37	30.57	54.34
6	副腎	100.00	100.00	0.00
7	甲状腺	20.45	8.19	1.42
8	唾液腺	6.52	6.75	0.19
9	下垂体	5.83	4.01	0.00
10	脳 (胎児)	2.16	2.32	0.00
11	脳 (全体)	3.54	2.66	0.00
12	脳 (扁桃)	1.29	0.85	0.05
13	脳 (小脳)	1.30	1.02	0.00
14	脳 (海马)	3.26	1.88	0.00
15	脳 (視床下部)	42.93	37.11	46.98
16	脳 (嗅覚)	2.05	0.00	0.00
17	脳 (視床)	0.39	0.25	0.00
18	脊髄	4.58	2.78	0.00
19	CNS ca. (glio/astro) U87-MG	0.00	0.00	0.00
20	CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	0.00	0.07	0.00
21	CNS ca. (astro) SW1783	1.94	1.49	0.00
22	CNS ca.* (神経; met) SK-N-AS	2.05	1.04	0.00
23	CNS ca. (astro) SF-539	0.32	0.13	0.00
24	CNS ca. (astro) SNB-75	5.29	5.26	0.00
25	CNS ca. (glio) SNB-19	3.85	3.64	0.03
26	CNS ca. (glio) U251	2.82	1.67	0.00
27	CNS ca. (glio) SF-295	82.36	53.59	100.00
28	心臓	14.66	13.58	1.42
29	尿管筋	1.29	0.96	0.00
30	骨髄	1.23	0.69	0.00
31	胸腺	6.04	2.78	0.00
32	脾臓	2.24	1.78	0.00
33	リンパ節	5.79	3.74	0.03
34	経腸 (上行)	2.06	3.61	0.01
35	胃	24.66	26.06	15.07
36	小腸	5.95	5.11	0.02
37	経腸 ca. SW480	0.00	0.00	0.00
38	経腸 ca.* (SW480 met)SW620	0.00	0.00	0.00
39	経腸 ca. HT29	0.00	0.02	0.00
40	経腸 ca. HCT-116	0.00	0.00	0.00
41	経腸 ca. CaCo-2	0.01	0.03	0.00
42	経腸 ca. HCT-15	0.00	0.00	0.00
43	経腸 ca. HCC-2998	0.00	0.00	0.00

44	胃 . ca.* (肝癌 m) NCI-N87	0.00	0.00	0.00
45	膀胱	2.92	13.21	0.00
46	食管	24.49	15.82	17.43
47	肾脏	5.40	4.09	0.23
48	肾脏 (胎兒)	14.16	10.08	0.00
49	肾脏 ca. 786-0	0.00	0.00	0.00
50	肾脏 ca. A498	0.82	0.55	0.00
51	肾脏 ca. RXF 393	0.08	0.06	0.00
52	肾脏 ca. ACHN	0.69	0.44	0.00
53	肾脏 ca. UO-31	0.12	0.09	0.00
54	肾脏 ca. TK-10	1.50	0.57	0.00
55	肝脏	5.37	4.45	1.75
56	肝脏 (胎兒)	1.56	1.12	0.00
57	肝脏 ca. (胎芽腫) HepG2	0.00	0.00	0.00
58	肺	0.34	1.30	0.00
59	肺 (fetal)	2.68	1.62	0.00
60	肺 ca. (小細胞) LX-1	0.00	0.00	0.00
61	肺 ca. (小細胞) NCI-H69	0.63	0.44	0.00
62	肺 ca. (s.cell var.) SHP-77	0.00	0.00	0.01
63	肺 ca. (大細胞) NCI-H460	0.63	0.48	0.00
64	肺 ca. (non-sm.細胞) A549	6.98	6.12	0.00
65	肺 ca. (non-s.細胞) NCI-H23	0.22	0.12	0.00
66	肺 ca. (non-s.細胞) HOP-62	2.78	2.03	0.00
67	肺 ca. (non-s.cl) NCI-H522	0.03	0.01	0.00
68	肺 ca. (squam.) SW 900	11.50	11.19	2.40
69	肺 ca. (squam.) NCI-H596	4.97	4.09	0.00
70	乳腺癌	32.76	31.43	24.32
71	乳腺癌 ca.* (pl. effusion) MCF-7	0.00	0.00	0.00
72	乳腺癌 ca.* (pl.ef) MDA-MB-231	0.00	0.01	0.00
73	乳腺癌 ca.* (pl. effusion) T47D	0.00	0.11	0.00
74	乳腺癌 ca. BT-549	7.59	7.38	0.00
75	乳腺癌 ca. MDA-N	0.00	0.02	0.00
76	卵巢	9.61	11.03	0.00
77	卵巢 ca. OVCAR-3	0.84	0.22	0.00
78	卵巢 ca. OVCAR-4	0.31	0.20	0.00
79	卵巢 ca. OVCAR-5	81.79	78.46	93.95
80	卵巢 ca. OVCAR-8	2.08	1.54	0.00
81	卵巢 ca. IGROV-1	3.00	2.05	0.00
82	卵巢 ca.* (腹水) SK-OV-3	0.12	0.05	0.00
83	子宫内膜	5.08	7.38	0.26
84	子宫	8.30	4.94	0.20
85	胎盘	7.33	5.79	0.29
86	前列腺	5.56	4.01	0.04
87	前列腺 ca.* (骨 met)PC-3	19.75	9.47	0.00
88	结肠	20.88	21.46	6.89
89	黑色素瘤 Hs688(A).T	0.89	0.45	0.00
90	黑色素瘤 *(met) Hs688(B).T	0.91	0.46	0.00
91	黑色素瘤 UACC-62	0.21	0.13	0.00
92	黑色素瘤 M14	0.68	0.20	0.00

93	黒色腫	LOX IMVI	1.57	0.99	0.00
94	黒色腫	*(met) SK-MEL-5	1.47	0.50	0.00
95	黒色腫	SK-MEL-28	5.95	4.45	0.00
96	黒色腫	UACC-257	3.69	3.21	1.99

表7において、以下の略語を使用する：

ca = 癌腫、

* = 転移から樹立された、

met = 転移、

small cell var = 小細胞改変体、

non-s = non-sm = 非小、

squam = 扁平、

pl. eff = pleffusion = 胸水、

glio = 神経膠腫、

astro = 神経膠星状細胞腫、

neuro = 神経芽細胞腫。

【0399】

2組のプライマーおよびプローブ(30664188特異的プローブ、一般にアクチンおよび/またはGAPDH、および参照遺伝子特異的プローブ30664188プローブと多重化される(multiplexed))を含むPCRカクテルを、PE Biosystems 7700用1×TaqMan™PCR Master Mixを使用して、5mM MgCl₂, dNTPs(dA、dG、dC、dU(1:1:1:2比率))、0.25 U/ml AmpliTaq Gold™(PE Biosystems)および0.4 U/μl RNaseインヒビター、ならびに0.25 U/μl逆転写酵素と共にセットした。逆転写を、48℃で30分間実施し、次いで、以下のような増幅/PCRサイクルを実施した：95℃で10分間、次いで、以下の40サイクル：95℃で15秒間、60℃で1分間。

【0400】

使用したTaqManプローブおよびプライマーは以下であった：

【0401】

【化1】

Ag33 (F) : 5'-CGCTTGGCATCATCATTGAG-3' (配列番号 35),
 Ag33 (R) : 5'-CGGTATCGAGGCAGGTCATAC-3' (配列番号 36), 下記
 Ag33 (P) : TET-5'-TCCAGGTCAACTTTTGACTTCCGGTCA-3'-TAMRA (配列番号 37);

Ag66 (R) : 5'-CACAAGGAAGTTCCTCCAAGGATA-3' (配列番号 38),
 Ag66 (F) : 5'-AATCCAGGTTTAGCCACAAAGTAGTC (配列番号 39), 下記
 Ag66 (P) : FAM-5'-AGAACGAACCAAATTTAAATCACATTCAAGTCCGA-TAMRA (配列番号
 40); 下記

Ag 168 (F) : 5'-GCATGTGCAGGACCTCCAGT-3' (配列番号 41),
 Ag 168 (R) : 5'-TCCACGTTGCCTCCTCGT-3' (配列番号 42), 下記
 Ag 168 (P) : TET-5'-CAGTCCACAGCCACAATTTCTCCAC-3'-TAMRA (配列番号
 43).

【0402】

試験された正常組織の中で、クローン30664188は、脾臓、副腎、脂肪組織、胃、気管、乳腺および精巣において高度に発現される。種々の癌細胞株の中で、このクローンは、特にCNS癌(CNS ca. (glio) SF-295)、肺癌(扁平上皮細胞、SW900)および卵巣癌(卵巣ca. OVCAR-5)において特に強く発現した。

【0403】

(実施例8. クローン30664188. 0. m99タンパク質は、細胞DNA合成を誘導する)

ヒトCCD-1070線維芽細胞(ATCC番号CRL-2091、Manassas、VA)またはマウスNIH 3T3(ATCC番号CRL-1658、Manassas、VA)を、それぞれ10%胎児ウシ血清または10%子ウシ血清を補充したDMEMで培養した。線維芽細胞をコンフルエンスまで37で10%CO₂/空气中で成長させた。細胞をDMEMで24時間飢餓状態にし

た。pCEP4/Sec(実施例2)またはpCEP4/Sec/30664188.m99(実施例6)富化馴化培地を18時間添加した(10 μ L/培地100 μ L)。BrdU(10 μ M)を次いで添加し、そして細胞と共に5時間インキュベートした。BrdU取り込みを、測色免疫アッセイにより製造者(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)の指示に従ってアッセイした。

【0404】

図5は、30664188.m99が、コントロール馴化培地または未処理細胞に比較していずれの細胞型においても約4倍~5倍のBrdU組込みにおける増加を誘導したことを実証する。観察された増殖の増加は、血小板由来FCTR X(PDGF)、基礎線維芽細胞成長因子(bFGF)、または血清処理により誘導されるBrdU組込みにおける増加と類似であった。さらに、30664188.m99の部分的に精製された馴化培地は、ヒトMG-63内皮細胞またはCCD1106ケラチノサイト(データ示されず)においてBrdU組込みを誘導しなかった。これらの結果は、30664188がヒトおよびマウスの線維芽細胞においてDNA合成を選択的に誘導するが、内皮細胞株において誘導しないということを示唆する。

【0405】

別の実験において、pCEP4/Sec/30664188で処理されたCCD-1070細胞およびMG-63骨肉腫細胞(ATCC Cat.No.CRL-1427)は、各々BrdUを用量依存様式で組み込んだ(1 μ g/mlは、完全な効果(コントロールに対して約2.5~3倍の増加)を生じ、100ng/mlは、この効果の半分よりわずかに少ない効果を生じ、そして10および1ng/mlは、コントロールの組込みレベルに近いレベルを生じた)。さらに、NIH3T3細胞の用量応答は、50%応答が、pCEP4/Sec/30664188の10ng/mlと50ng/mlとの間で起こることを示す(図6)。

【0406】

(実施例9.30664188.m99によるNIH 3T3細胞の増殖の誘

導)

マウスNIH3T3線維芽細胞を、40%のコンフルエンスでプレートし、そして10%ウシ胎児血清または10%子ウシ血清を補充したDMEMで24時間培養した。培養培地を除去し、そして等容積のpCEP4/Sec(実施例2)またはpCEP4/Sec/30664188(実施例6)馴化培地で置き換えた。48時間後、細胞をZeiss Axiovert 100で写真撮影した。細胞数をトリプシン化次いでCoulter Z1 Particle Counterを使用して計数した。

【0407】

NIH3T3線維芽細胞の、30664188トランスフェクトHEK293腎臓内皮細胞由来の馴化培地での処理は、2日間にわたって細胞数の6~8倍の増加を生じた(図7)。pCEP4/Secベクター単独でトランスフェクトされたHEK293細胞由来のコントロール馴化培地で処理された細胞は、成長をほとんどまたは全く示さなかった(図7)。

【0408】

30664188.m99馴化培地が細胞形質転換に特徴的な表現型変化を誘導し得たか否かを決定するために、30664188馴化培地または模擬(mock)馴化培地の何れかで処理された細胞を光学顕微鏡で調べた。図8は、30664188.m99で処理されたNIH3T3細胞が顕著な細胞数増加および屈折特性を示したが、コントロール処理されたNIH3T3細胞は示さなかったことを示す。成長の接触阻止の損失が明らかであった。コンフルエントなNIH3T3細胞に特徴的な丸石状の外観は失われ、そして密度非依存性成長が明らかであった。後者はまた、かすかな屈折に起因するNIH3T3細胞のより丸い外観によっても示唆された。pCEP4/Sec/30664188.m99のトランスフェクションはまた、培養2~5日目に形質転換有効性におけるほとんど同一の効力を示した。しかし、培養7~10日後、形態学的に形質転換された表現型が復帰したようであった。

【0409】

(実施例10.30664188タンパク質によるヒト一次(primary

) 骨芽細胞の増殖の誘導)

実施例9に記載の実験と同様の実験において、ヒト一次骨芽細胞(NHost; Clonetics)はまた、3~4倍の細胞数の用量依存性増加を受けた(図9)。図9における50%応答を誘発するために必要な用量は、100ng/mL未満のpCEP4/Sec/30664188.m99である。さらに、30664188遺伝子産物を含有する部分的に精製された馴化培地と接触されたジャーカット細胞は、模擬トランスフェクションからの培地と比較してBrdU取り込みの倍増を示したが、一方、他の成長促進活性を有すると考えられるCuragen Corporationの遺伝子産物と接触させた13の同じ細胞は、全く効果を誘発しなかった。

【0410】

まとめると、タンパク質が、DNA合成(実施例8)、細胞成長(実施例9および10)、および形態学的形質転換(実施例9)を誘導するという結果は、このタンパク質が形質転換特性を有するというを示す。

【0411】

(実施例11. 30664188タンパク質による腫瘍形成の誘導)

pCEP4/SecまたはpCEP4/Sec/30664188でトランスフェクトされた細胞からの馴化培地で処理されたNIH3T3細胞を、上記のように培養した。0.1mLPBS中の 10^6 の細胞を次いで、雌性ヌードマウス(Charles River Laboratory)の側方浅在筋膜中に皮下注射した(1群あたりn=5)(例えば、pCEP4/Sec/30664188.m99マウスと称する)。11日および14日後に、腫瘍形成をカリパスでアッセイした。

【0412】

11日後に、腫瘍形成は、pCEP4/Sec/30664188.m99マウスにおいて明らかであった。pCEP4/Sec/30664188.m99マウス(5/5)は、腫瘍サイズ $6.73 \pm 0.58 \text{ mm}^3$ の腫瘍形成についてポジティブであった。培養14日後、腫瘍サイズにおける顕著な減少がpCEP4/Sec/30664188.m99マウスにおいて明らかであり、3/5の

マウスはポジティブであり、そして平均腫瘍容積は、 $1.44 \pm 0.88 \text{ mm}^3$ であった。顕著に、そしてポジティブコントロールとして、bFGFで処理された5匹のマウスのうち5匹は、容積が $66.56 \pm 13.2 \text{ mm}^3$ に増加した腫瘍を発生した。コントロールベクターマウス(0/5)は、腫瘍形成についてネガティブであった。これらのデータは、30664188.m99過剰発現がヌードマウスにおける腫瘍形成を誘導するが、腫瘍は時間の関数として消失するようであることを強く示唆する。顕著なことに、これらのデータは、NIH3T3形質転換アッセイにおいて述べた形態学的復帰特性と等しい。

【0413】

(実施例12.30664188.m99タンパク質のインタクトおよび切断産物の精製)

特定の実験において、ベクターpCEP4/Sec/30664188.m99での処理が、DNA合成または細胞増殖を生じないということが観察された。さらなる実験において、30664188.m99馴化培地は、血清の存在下で成長したHEK293細胞から得られた(実施例6)。30664188.m99遺伝子産物を、カチオン交換クロマトグラフィー、次いでニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。このタンパク質産物を、SDS-PAGEで非還元条件および還元条件下で操作し、そしてクマシー染色を現像した。結果を図10Aおよび10Bに示す。血清の存在下、30664188.m99遺伝子産物は、約35kDaのタンパク質として非還元条件下で現れた(図10B)。しかし、このポリペプチドは、還元条件下で操作した場合は3つの分解バンドとして現れる。2つのバンドの見かけの分子量は、22~25kDa(バンドI)、約16kDa(バンドII)および約5~6kDa(バンドIII)であった。これらのフラグメントのN末端アミノ酸分析は、バンドIおよびIIの両方が30664188.m99アミノ酸配列の残基247で始まり、そしてバンドIIIが残基339で始まるということを示した。これらの結果は、バンドIに対応するポリペプチドの切断がバンドIIおよびIIIのフラグメントを生成することと一致する。非還元条件下で観察された35kDaのバンドが、バンドIを含むダイマーであり、そして/または還元条件下で観察されたバンドIおよ

びIIIを含む結合したポリペプチドであるという可能性がある。

【0414】

アミノ末端分析は、血清の存在下で成長したpCEP4sec/30664188.m99-トランスフェクト293細胞からの遺伝子産物(上記の手順に従って単離される)が、全長タンパク質のカルボキシ末端フラグメントであるというを示す。非還元条件下で見出された35kDaのバンドは、以下でp35と呼ぶ。

【0415】

293細胞が血清の非存在下で培養され、次いで前の段落に記載された同じ単離手順および検出手順を行う場合、異なる遺伝子産物が観察される。非還元条件下で、約85kDaにバンドが観察される(図10A)。このタンパク質は、以下でp85と呼ぶ。還元条件下で観察された対応する遺伝子産物は、約53~54kDaで見出される。この遺伝子産物のN末端アミノ酸分析は、pCEP4sec/30664188.m99(実施例6)において使用される複数のクローニング部位のアミノ酸を提供する。Igリーダー配列に対応する残基(複数のクローニング部位から上流にクローニングされる)は、無い。これらの結果は、血清の非存在下で得られる遺伝子産物が、pCEP4sec/30664188.m99にコードされる完全アミノ酸配列を表わす。p85ポリペプチドは、還元SDS-PAGEで観察された50kDa種のダイマーであると考えられる。

【0416】

(実施例13.30664188.m99タンパク質のインタクトなフラグメントおよび切断フラグメントの活性)

精製されたp85およびp35FCTRXTタンパク質を、ある範囲の濃度でNIH3T3細胞に別々に適用した。BrdUの組込みを、実施例8に記載のように評価した。結果を図11に示す。p85が、使用された最も高い濃度を除いてコントロールのレベルと同じである成長促進活性を有することが分かる。他方、p35は、非分別pCEP4/Sec/30664188馴化培地よりも少なくとも活性であった。50%の最大DNA合成を与えるp35の濃度は、20ng/mLと50ng/mLとの間である。

【0417】

これらの結果は、インタクトな30664188 . m99由来のp35フラグメントが、成長促進活性を有するが、. m99タンパク質のインタクトなダイマー形態(p85)は、活性を有さないことを示唆する。従って、実施例9および11で見られた形質転換および腫瘍形成の復帰は、このようなより長い時間の培養物においてp35様種のp85からの形成を阻害するかまたは防ぐ種の発生の結果であり得る。

【0418】

(実施例14 . マウスPDGFDcDNAの単離)

PDGFDポリペプチドをコードするマウス核酸配列を、マウス脳ライブラリー(Clontech)からPCRにより順方向プライマー；

【0419】

【化2】

5'-CGCGGATCCATGC AACGGCTCGTTTTAGTCTCCATTCTCC-3'

(配列番号44)および逆方向プライマー：

【0420】

【化3】

5'-CGCGGATCCTTATCGAGGTGGTCTTGAGCTGCAGATA CAGTC-3'

(配列番号45)を使用して増幅した。

【0421】

マウスポリヌクレオチド(配列番号5)およびそれにコードされる対応するポリペプチド(配列番号6)を、表3に示す。

【0422】

(実施例15 . PDGFD遺伝子のゲノム構成)

GenBankから得られるゲノムDNA配列を利用して、PDGFD遺伝子のエキソン/イントロン構成を決定した。イントロン/エキソン境界は、標準コンセンサススライスパラメータ(1616 . S . Mount、Nucleic Acids Res . 10 , 459 - 472 . (1982) .)を利用して推定した。第I相ゲノムDNA配列は、PDGFD遺伝子が、PDGFAおよびPDGFBと同様に、7つのエキソン(図13)から構成されることを明らかにする。BLASTN分析は、以下のゲノムクローンに対するヒット(>99%)を生じた:登録番号AC026640、AC023129、AC024052、およびAC067870。全てのクローンは、第11q23.3-24染色体にマッピングされた。染色体位置を、さらに放射ハイブリッド分析により精密化した。

【0423】

開始コドンはエキソン1に位置し、そしてTAA終止コドンはエキソン7に位置する。エキソン1はAC023129に位置し、一方エキソン2~7は、AC024052上に位置する。これらのエキソンの過半数を含むクローン(AC023129およびAC024052)は、第I相の順番でないゲノムクローンであり、イントロンサイズは決定できなかった。PDGFDについては、CUB(エキソン2および3)およびPDGF(エキソン6および7)ドメインの両方は、2つのエキソンにわたっていた。PDGFDは、PDGFAエキソン6スプライス改変体およびPDGFBにおいて見出されるCOOH末端保持モチーフを欠く(W . LaRoche lle、M . May - Siroff、K . Robbins、S . Aaronson、Genes Dev . 5 , 1191 - 1199 (1991) .)。インフレーム終止コドンは、開始メチオニンの9bp上流に見出された。

【0424】

(実施例16 . 30664188 . 0 . 99の新規スプライス改変体の分子クローニング)

この実施例において、クローニングは、クローン30664188 . 0 . 99

の新規なスプライス (s p i c e) 改変体について記載される。オリゴヌクレオチドプライマーを、この配列をPCR増幅するために設計した。これらのプライマーは、以下：

【0425】

【化4】

30664188 TOPO F: CCACC ATG CAC CGG CTC ATC TTT GTC TAC ACT C

(配列番号46)、および

【0426】

【化5】

30664188 TOPO R: TCG AGG TGG TCT TGA GCT GCA GAT ACA

(配列番号47)を含む。

【0427】

PCR反応を、5 ngのヒト膵臓cDNAテンプレートを使用して設定した。反応混合物は、50 µリットル容積で、それぞれ1 µMの30664188 E c o順方向プライマーおよび3066418 X h o逆方向プライマー、5マイクロモルdNTP (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) および1マイクロリットルの50×Advantage-HF2ポリメラーゼ (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) を含んでいた。以下のPCR反応条件を使用した：

a) 96 3分

b) 96 30秒変性

c) 70 30秒、プライマーアニーリング。この温度は、1 / サイクル

で徐々に下げられた。

【0428】

d) 72 1分伸長

工程(b)～(d)を10回繰り返す

e) 96 30秒変性

f) 60 30秒アニーリング

g) 72 1分伸長

工程(e)～(g)を25回繰り返す

h) 72 5分の最終伸長。

【0429】

1041bpを有する30664188.0.99の全長クローンについて推定される増幅産物(1041bpを有する)に加えて、2つのさらなるバンドが検出された。これらのフラグメントをアガロースゲルから精製し、そしてpCR2.1ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)に連結した。クローン化したインサートを、M13順方向プライマーおよびM13逆方向プライマーおよび実施例1に示される4つの遺伝子特異的プライマーを使用して配列決定した。

【0430】

両方のクローニングされたインサートを、配列決定し、そして30664188.0.99のより短いスプライス形態が確かめられた。

【0431】

(実施例17.組換えPDGF DDの精製) PDGF Dの遺伝子産物を、1Lスピナーフラスコ中の多孔性マイクロキャリア(Cultisphere-G L, Hyclone; Logan, UT)上で成長させたHEK293細胞で発現させた。実施例2および4に示されるように、組換えPDGF D遺伝子は、3'末端に6×His融合を含む。細胞を、5%ウシ胎児血清(FBS)の存在下または非存在下で、1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有DMEM/F12培地で成長させた。この馴化培地を、遠心分離(4000×g4で15分間)により採取し、POROS HS50カラム(PE Biosystems; Foster City, CA)(20mM Tris-アセテート(pH7.

0) で予め平衡化されている) 上にロードした。平衡化緩衝液で洗浄した後、結合したタンパク質をNaCl段階勾配(0.25M、0.5M、1.0Mおよび2.0M)で溶出した。PDGF DD p35(1.0M NaCl段階溶出)またはp85(0.5M NaCl段階溶出)(実施例12を参照のこと)を含有するフラクションをプールし、そして等容積のリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)(pH8.0、0.5M NaCl含有)で希釈し、次いで硫酸ニッケル(PE Biosystems)を予め充填したPOROS MC20カラム上にロードした。PBS/0.5M NaClで洗浄した後、結合しているタンパク質をイミダゾールの線形勾配(0~0.5M)で溶出した。PDGF DD(PDGF Dのホモダイマー)を含有する(100~150mMイミダゾールフラクションをプールし、そして2回1000容積の20mM Tris-HCl(pH7.5、50mM NaCl)に対して透析した。タンパク質純度を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE; 4-20% Tris-グリシン勾配ゲル; Invitrogen、Carlsbad、CA)分析により>95%であると見積もられた(例えば、図10Aを含む実施例12の結果を参照のこと)。

【0432】

(PDGF Dの生化学的特性) PDGF Dの遺伝子産物の生化学的特性を調べるために、cDNAがコードするPDGF Dタンパク質を哺乳動物発現ベクターpCEP4/Sec-30664188(実施例4)にサブクローニングした。この構築物は、エピトープタグ(V5)およびポリヒスチジンタグをタンパク質のCOOH末端に組み込み、その同定および精製を補助する(発現ベクターpCEP4/Sec-30664188; 実施例4)。

【0433】

293HEK細胞へのトランスフェクションおよび無血清培地での成長に続いて、約49kDaの見かけの分子量を有する分泌されたポリペプチド(p49種)を、還元条件下でウエスタンブロット分析により同定した(図14、レーン2)。p49の見かけの分子量が約43kDaの期待された値より大きいという事実は、グリコシル化に起因し得る。対照的に、20kDタンパク質は、PDGF

Dトランスフェクト細胞をFBSの存在下で成長させた場合に分泌された(図14A、レーン3)。模擬トランスフェクト細胞からの馴化培地は、抗V5抗体(図14A、レーン1)と反応しなかった。

【0434】

さらに、PDGF-Dを、FBSの存在下または非存在下で発現させ、そして>95%の均質性まで精製した。図14B(レーン2)に示されるように、PDGF-Dの無血清条件下での発現は、このゲルをクマシーブルーで染色した場合に、還元条件下で期待された49kDaの遺伝子産物の検出をもたらした。約84kDaの見かけの分子量を有するポリペプチド種(p49のダイマーp85種に対応する)は、非還元条件下で見られた(図14B、レーン1)。PDGF-Dを血清含有馴化培地から精製し、そして非還元条件下で操作した場合に、約35kDa(p35)の見かけの分子量を有する種が観察された(図14B、レーン3)。還元条件下でp35がクマシーブルーで可視化された場合に3つのバンドを生じることが見出され、これらは、約20、14、および6kDaの見かけの分子量で移動する(図14B、レーン4)。

【0435】

p35のアミノ末端配列分析は、R247またはR249後のタンパク質分解を示した(図15)。図15のパネルAに示されるように、2つのペプチドが見出され、1つはGlyArgで始まり(これらの2つの残基は下線を付して示される)、そして2つ目は第3の残基Serで始まる。これらのペプチドの比は、SYHDR:GRSYHDR=4:1であることが見出された。図15(パネルBおよびC)におけるさらなる配列決定結果は、さらなるプロセッシングがクマシーブルー染色で示されるが抗V5ウエスタンブロットでは示されない残りのポリペプチド、すなわち16kDaおよび6kDaの種を示した。これらは、結合してp35を生じる。

【0436】

この実施例に示される結果は、PDGF-D遺伝子産物がホモ蛋白(holo protein)形態(p85)およびC末端フラグメント(p35)の両方のダイマーであることを示す。p85形態は、FBSの存在下でプロセッシングされ

てp35形態を生じるようである。これらのダイマー形態を、PDGF DDと呼ぶ。

【0437】

(実施例18．ウシ胎児血清および子ウシ血清の存在下での30664188遺伝子産物のプロセシング)

30664188遺伝子産物を、増加する濃度の子ウシ血清(図16、パネルA)またはウシ胎児血清(パネルB)の存在下でインキュベートした。これらの結果は、ウシ胎児血清(パネルB)のみが30664188遺伝子産物のp85形態をプロセシングしてp35を生じるが、子ウシ血清(パネルA)は生じないことを実証した。

【0438】

(実施例19．DNA合成の誘導)

この実施例は、PDGF DDのDNA合成を誘導する能力を実証する。

【0439】

種々の細胞を、96ウェルプレートで約100%のコンフルエンスまで培養し、洗浄し、DMEMを供給し、そして24時間飢餓状態にした。次いで組換えPDGF DD、PDGF AA、またはPDGF BBを、示された濃度で18時間細胞に添加した。いくつかの例において、細胞は未処理であるかまたは10%FBSで処理した。BrdUアッセイを、製造者(Roche Molecular Biochemicals、Indianapolis、IN)の指示に従って5時間のBrdU組込み時間を使用して行った。

【0440】

ヒトCCD1070包皮線維芽細胞において、p35が約20ng/mlの最大濃度の半分でDNA合成を誘導することが決定された(図17A)。対照的に、p85は、100ng/mlの濃度まで出DNA合成を誘導しなかった。比較的に、PDGF AAおよびPDGF BBは、それぞれ約5および8ng/mlの最大DNA合成の半分を誘導した。PDGF DDおよびPDGF BBは、最大用量において同様のDNA合成を誘導したが、PDGF AAは、4倍低い効力であった。

【0441】

NIH3T3 胚性肺線維芽細胞において、p35は、約20ng/mlの半最大濃度でDNA合成を誘導した(図17B)。対照的にp85は1μg/mlまでの濃度でDNA合成組み込みを誘導せず(図17B)、p35またはPDGF BB誘導DNA合成を遮断しなかった。

【0442】

p35はまた、種々のヒト細胞(MG-63骨肉腫細胞および一次平滑筋細胞)においてDNA合成を誘導した。このことは、PDGF DDが、潜伏性成長因子であり、その活性はPDGFコアドメインのCUB含有領域からのタンパク質分解解離に依存するということを示唆する。

【0443】

(実施例20 細胞増殖)

この実施例は、PDGF DDが細胞成長を持続させ得るということを実証する。NIH3T3線維芽細胞を、6ウェルプレートで約35%のコンフルエンスまで培養し、DMEMで洗浄し、次いで8時間飢餓状態にする。次いで細胞を、組換えPDGF DD、PDGF AA、またはPDGF BB(200ng/ml)または5%FBSを補充したDMEMのいずれかで処理した。成長因子を24時間後に添加し、そしてトリプシン処理後にBeckman Coulter Z1シリーズカウンター(Beckman Coulter、Fullerton、CA)を使用して定量した。

【0444】

PDGF DDは、未処理の細胞に比較して、1日目後にNIH3T3細胞数が約2倍増加し、そして2日目後に約4倍増加した。この増殖の増加は、PDGF AAおよびPDGF BBの増加と同様である(図17C)。PDGF DDはまた、CCD1070線維芽細胞の成長、およびいくつかの平滑筋型由来の細胞の成長を数日間にわたって持続させ得、そしてPDGF BBと組み合わせ使用される場合、NIH3T3細胞の成長速度をわずかに増大させる。

【0445】

(実施例21 PDGFレセプターチロシンリン酸化)

この実施例は、PDGF DのPDGFレセプターに結合する能力を実証する

。

【0446】

NIH3T3線維芽細胞を、血清飢餓状態にし、次いで200ng/mlのPDGF DD、PDGF AAまたはPDGF BBで10分間処理した。細胞を一回PBS、100μMのオルトバナジン酸ナトリウムで洗浄した。全細胞溶解物を、RIPA緩衝液[50mM Tris-HCl、pH7.4、50mM NaCl、1.0% Triton X-100、5mM EDTA、10mM ピロリン酸ナトリウム、50mM フッ化ナトリウム、1mM オルトバナジン酸ナトリウム、1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、ロイペプチン(10μg/ml) ペプスタチン(10μg/ml)、およびアプロチニン(1μg/ml)]に可溶化し、超音波処理し、そして氷上で30分間インキュベートした。溶解物を15,000×gで10分間遠心分離することにより清澄化した。等量の全タンパク質を含む上清を抗PDGFR抗体または抗PDGFR抗体(Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz、CA、5μg)と共に2時間インキュベートした。次に、100μlの1:1スラリーのGタンパク質アガロースを2時間添加した。免疫複合体を、3回RIPA緩衝液で洗浄した。100mMジチオトレイトールを含有するSDS-PAGEサンプル緩衝液を添加し、そしてこのサンプルを4~15%SDS-ポリアクリルアミドゲルで分別した。Immobilon P膜(Millipore; Bedford、MA)に電気泳動移行した後、フィルターをTTBS(20mM Tris-HCl、pH7.4、150mM NaCl、0.05% Tween 20)、3%無脂肪乳でブロックした。次いで膜を抗もしくはP PDGFR抗体(1:500)または抗ホスホチロシンモノクローナル抗体(Upstate Biotechnology Inc.; Lake Placid、NY、1:1000)と共に1~2時間TTBS、1%BSA、中でインキュベートし、そして4回TTBSで洗浄した。結合した抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(Boehringer Mannheim、Indianapolis、IN)に結合体化したヤギ抗ウサギIgG(全分子; 1:2,000

0) またはヤギ抗マウスIgG (H&L; 1:10,000) と共に1時間インキュベーションし、次いでTTBSで4回洗浄した後検出した。増強化学発光 (Amersham; Piscataway, NJ) を製造者のプロトコルに従って実行した。

【0447】

PDGF DDが および/または PDGFRを介してシグナル伝達し得る可能性を調べるために、チロシン残基上でのPDGFR自己リン酸化をリガンド処理の後に調べた。NIH3T3線維芽細胞を、血清飢餓状態にし、そして100 ng/ml 3066、PDGF AAまたはPDGF BBで10分間刺激した。細胞を1回PBS、100 μM オルトバナジン酸ナトリウムで洗浄した。全細胞溶解物を、RIPA緩衝液 [50 mM Tris pH7.4, 50 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 5 mM EDTA, 10 mM ピロリン酸ナトリウム、50 mM フッ化ナトリウム、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、ロイペプチン (10 μg/ml)、ペプスタチン (10 μg/ml)、およびアプロチニン (1 μg/ml)] への溶解、超音波処理、および氷上での30分間のインキュベーションにより調製した。溶解物を14,000 rpmで10分間遠心分離することにより清澄化した。等量の全タンパク質を含む溶解物を抗 PDGFR抗体または抗 PDGFR抗体と共に2時間インキュベートした。次に、100 μlの1:1スラリーのGタンパク質アガロースを2時間添加した。免疫複合体を、3回RIPA緩衝液で洗浄した。100 mM ジチオトレイトールを含有するドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) サンプル緩衝液を添加し、そしてこのサンプルを4~15% SDS - ポリアクリルアミドゲルで分別した。Immobilon P膜に電気泳動移行した後、フィルターをTTBS (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)、3%無脂肪乳でブロックした。次いで膜を抗 もしくは PDGFR抗体 (1:1000) または抗ホスホチロシン (1:1000) と共に1~2時間TTBS、1% BSA、中でインキュベートし、そして4回TTBSで洗浄した。結合した抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (Amersham

、Arlington Heights、IL)に結合体化したヤギ抗ウサギIgG(全分子; 1:10,000)またはヤギ抗マウスIgG(1:10,000)と共に30分間インキュベーションし、次いでTTBSで4回洗浄した後検出した。増強化学発光(Amersham)を製造者のプロトコルに従って実行した。

【0448】

図17Dに示されるように、NIH3T3線維芽細胞のPDGF DDへの10分間の曝露は、およびPDGFRのチロシンリン酸化を誘導する。観察されたリン酸化は、PDGF BB処理の後に観察されたリン酸化と同一であった。予想されるように、PDGF AAは、PDGFRリン酸化のみを誘導し、このアッセイの特異性を確認した。PDGF DDは、(PDGF BBと同様、しかしPDGF AAは同様でない)はまた、PDGFRのみ発現するH-157細胞におけるPDGFRのチロシンリン酸を誘導し得る(K. Forsberg、J. Bergh、B. Westermarck、Int. J. Cancer 53, 556-560(1993))。これらのデータは、PDGF DD(PDGF BBも同様)は、PDGFRおよびPDGFRの両方の活性化により細胞の成長および増殖を刺激する。

【0449】

(実施例22.30664188 p85の、NIH/3T3細胞の成長を誘導する他の成長因子との競合)

NIH3T3細胞を、PDGF BB単独と共に、30664188 p35単独と共に、100倍増加濃度のp85の存在下のp35と共に、または100倍増加濃度のp85の存在下のPDGF BB(図18において左から右)と共にインキュベートした。細胞成長を、BrdU組込みアッセイにより決定した。30664188 p35単独およびPDGF BB単独は、細胞を飢餓状態にすることにより生じるよりもNIH3T3細胞の成長を深く刺激する(図18、左)。p85は、これらの成長因子の何れかにより誘導される成長に対して、非常に高濃度の5000 ng/mLでさえ全く効果を有さないことが示される。従って、p85(これは、全長遺伝子産物のダイマー)は、p35およびPDGF

BBが結合するレセプター（単数または複数）についてのアフィニティを全く有さない。この実験は、p85のp35へのプロセッシングは、30664188遺伝子産物はその活性をはたらかせるための必要条件であることを示す。

【0450】

（実施例23．成長因子での処理により誘導される差次的遺伝子発現）

Gene Calling™反応を、3時間200ngのPDGF DD、PDGF BB、PDGF AAまたはコントロール緩衝液（20 mM Tris-HCl、pH 7.5, 50mM NaCl）で処理されたCCD1070一次ヒト包皮線維芽細胞に対して行われる。Gene Calling™分析は、米国特許第5,871,697号、およびShimkets et al., 「Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query」Nature Biotechnology 17: 198-803（1999）（本明細書中にその全体が参考として援用される）で完全に記載される。

【0451】

3つの同じサンプルを各処理のために調製した。全DNAをTrizol（Life Technologies、Inc.; Rockville MD）で単離し、そしてポリ（A）+mRNAを調製した。cDNAをSuperscript II（Life Technologies、Inc.）を使用して合成し、次いで6bpの認識部位制限エンドヌクレアーゼの48の別々の対により消化した。この制限フラグメントを、次いでビオチンおよび蛍光標識の両方でタグ化し、そしてPCRで20サイクル増幅した。個々の消化由来の得られた産物を、ストレプトアビジンカラムで分離し、そして両方の制限酵素認識部位を含有するフラグメントを溶出し、そしてこれらをMegaBace機器（Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA）でのキャピラリー電気泳動で分割した。トレースデータ出力を、Open Genome Initiativeソフトウェア（Shimkets et al.,（1999））で分析し、そして各処理の間で差次的に発現したピークおよびビヒクル

コントロールを、GeneScape™データ分析スーツを使用して同定した。差次的に発現されたフラグメントの各々についての推定の遺伝子を、各フラグメントについて決定されたサイズならびに末端制限部位の存在により予め決定された12bpの公知の配列を使用して帰属した。遺伝子帰属を、上記に記載されるオリゴヌクレオチド中毒化を使用するデータベースルックアップにより確かめた。オリゴヌクレオチド中毒化は、米国特許出願第09/381,779号(1999年8月7日出願)に完全に、およびShimketsら(1999)(本明細書中に参考として援用される)に記載される。

【0452】

cDNAの48対の制限酵素でのフラグメンテーションは、約85%、またはCCD1070転写物(transcriptome)の19,000の個々の遺伝子フラグメント(R. Shimkets et al., (1999))の概観をもたらした。図19Aに示されるように301の遺伝子フラグメント(全ての発現された遺伝子の1.6%を表わす)は、少なくとも1つの処理により差次的に調節される(±2倍より多い、影を付けた枠または線を引いた枠)ことが見出された。PDGF AAは、最も制限された活性を実証し、57の遺伝子フラグメントのみの発現を変更した(図19A; 発現された線維芽細胞遺伝子の0.3%)。PDGF DDおよびPDGF BBは、209(発現された遺伝子の1.1%)および289(発現された遺伝子の1.5%)の遺伝子フラグメントをそれぞれ調節した。検出された全ての遺伝子フラグメントのうち237(78.5%)がアッセイされた処理において上方調節されたので、全てのPDGFタンパク質は、転写に対する優先的誘導効果を示した(図19A)。

【0453】

驚くべきことに、PDGF DDにより調節された209遺伝子フラグメントのうち、199は、PDGF BBにより同様に影響を受けた(図19A)。図19Bに示されるように、PDGF DDおよびBBの両方に調節された遺伝子としては、分泌サイトカイン/ケモカイン(例えば、血管内皮細胞成長因子(VEGF)、IL-11、プレB細胞増強因子、単球走化性タンパク質(MCP-1))、レセプター(例えば、IL-1レセプター)、プロテアーゼおよびプロ

テアーゼインヒビタ - (例えば、プラスミノゲン活性化因子インヒビター - 1)、シグナル伝達モジュール/転写因子(例えば、グアニレート結合タンパク質1およびアデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ)、および基質関連タンパク質が挙げられる。さらに、PDGF BBは、差次的にさらなる90の遺伝子フラグメントを調節したが、PDGF DDによって有意には影響しなかった(±2倍)。PDGF BBにより優先的に誘導される遺伝子の例としては、例えば、プラスミノゲン活性化因子インヒビター - 2、進行性(progression)関連タンパク質、グリセロールキナーゼ、およびアミノペプチダーゼN/C D13が挙げられる。これらの結果は、PDGF DDおよびPDGF BBが、同様のシグナル伝達機構を共有することを示し、これらが同一のレセプターを介してシグナル伝達するというを示唆する(Fambrough D、McClure K、Kazlauskas A、L.ES、Cell 97, 727-741(1999))。

【0454】

(実施例24. レセプター抗体の非存在下または存在下での成長因子に応じたCCD1070細胞の成長の競合)

CCD1070細胞を、30664188、PDGF AAまたはPDGF BBの精製したp35形態の存在下でインキュベートした。各場合において、成長因子をそれ自体でインキュベートするか、または非特異的抗体(Rab)と共に、またはPDGFレセプター(Rab)に得意的な抗体、PDGFレセプター(Rab)に得意的な抗体、または両方の特異的抗体の存在下でインキュベートした。特異的抗体を、R&DSystems由来であり、そして10μg/mlで添加した。細胞の成長を、BrdUの取り込みを決定することにより、BrdU取り込みに特異的なELISAアッセイを使用してモニターした。

【0455】

これらの結果を図20に示す。p35の存在下で、BrdUの取り込みは、抗PDGFレセプターとの共インキュベーション、または両方の特異的抗体の混合物との共インキュベーションにより減少することが分かる。同じパターンは、PDGF BBにより誘導される成長で観察される。他方では、PDGF AA

では、成長因子により誘導される成長は、抗 PDGF レセプター抗体の存在下で減少するか、またはこの混合物の存在下で減少する。

【0456】

この実験の結果は、30664188 遺伝子産物の活性形態 p35 が、PDGF レセプターに対して優先的に、または排他的に結合し、そして レセプターに対して最少に結合するか全く結合しないということを示す。

【0457】

(実施例25 . 成長因子による肺動脈平滑筋細胞成長の刺激)

この実施例は、PDGF DDの肺動脈平滑筋細胞の成長を刺激する能力を実証する。

【0458】

30664188、PDGF AAまたはPDGF BBのp35ダイマーを、種々の濃度で肺動脈平滑筋細胞(Clonetics)に、6ウェルプレートで約35%のコンフルエンスまで培養した後に添加し、DMEMで洗浄し、そして一晩飢餓状態にした。18時間後、BrdUを添加し、そして5時間後に細胞をBrdU組込みについてBrdU指向ELISAを使用して分析した。

【0459】

これらの結果を図21に示す。p35ダイマーでの処理により達成された最大の効果は、PDGF AAおよびPDGF BBの両方により生じた効果を超える。実施例23に見出されるように、p35ダイマーの効果とPDGF BBの効果は、PDGF AAで得られる効果より密接に互いに似ていることが分かる。試験された3つ全ての成長因子のうち、p35ダイマーは、BrdU組込みにより決定される場合、平滑筋細胞において最大の成長を誘導し、得られた50%最大効果は、12.5 ng/mL未満であった。

【0460】

(実施例26 : 種々の増殖促進処置に応じた肺動脈平滑筋細胞の増殖)

本実施例は、肺動脈平滑筋細胞の増殖を刺激するPDGF DDの能力を示す

。

【0461】

肺動脈平滑筋細胞を、6ウェルプレートに約35%コンフルエントまで培養し、DMEMで洗浄し、そして一晚血清除去(starve)した。次いで、細胞を、組換え30664188、PDGF AA、もしくはPDGF BB(200 ng/ml)または10% FBSを補充したDMEMで3日間給餌した。培養液を除去して、そしてさらなる2~3日間同一の培地と置換した。平滑筋細胞増殖アッセイを定量化するために、細胞をトリプシン処理し、そしてBeckman Coulter Z1シリーズカウンター(Beckman Coulter, Fullerton, CA)を用いて計数した。

【0462】

これらの結果を図22に示す。PDGFは細胞数において中程度の増加を生成し、一方、30664188での処置は、コントロールと比較して、PDGFで観察されたもののほぼ2倍の効果を提供する。10%FBSでの処置を用いるポジティブコントロールは、非常に目立った効果を与えた。30664188およびPDGF BBでの平滑筋細胞の処置は、血清で観察された平坦な棍棒(cub)形状の表現型とは対照的に、伸長した二極性の紡錘体形状の表現型を導いた。

【0463】

30664188は、肺動脈平滑筋細胞増殖の効果的な刺激剤であり、30664188および30664188抗体は創傷治癒、組織修復および軟骨修復における治療的使用を有することを示唆する。さらに、30664188に対して指向された抗体は、患者の脈間構造の再狭窄の阻害または防止における治療的使用を有し得る。

【0464】

(実施例27:種々の増殖促進処置に応じた伏在静脈細胞の増殖)

本実施例は、伏在静脈細胞における増殖を刺激するPDGF DDの能力を示す。伏在静脈細胞を、実施例26に記載されるように処置し、そして分析した。これらの結果を図23に示す。PDGFは、細胞数においてコントロールで見られる細胞数のほぼ5倍の増殖を提供する30664188での処置によるよりもわずかに低い増加を生成するようだ。10%FBSでの処置を使用するポジティブ

ブコントロールは、非常に目立った効果を与えた。30664188は、伏在静脈細胞増殖の効果的な刺激剤であり、30664188および30664188抗体は創傷治癒、組織修復および軟骨修復における治療的使用を有することを示唆する。さらに、30664188に対して指向された抗体は、患者の脈間構造の再狭窄の阻害または防止における治療的使用を有し得る。

【0465】

(実施例28：NIH3T3マウス細胞の増殖の阻害)

本実施例は、抗30664188抗体のNIH3T3細胞の増殖を阻害する能力を示す。NIH3T3線維芽細胞を、30664188単独の存在下、または増加する濃度の抗体と組合わせた30664188の存在下で増殖する。30664188に対して指向された完全なヒトポリクローナル抗体、またはコントロールとしての非免疫抗体のいずれかを使用した。発明の詳細な説明の「抗体」の項に上記されたもののような方法によって、ポリクローナル抗体を得た。

【0466】

これらの結果を、図24に示す。30664188特異的抗体は、30664188単独での処置によって誘導される増殖効果を排除するようである。非免疫抗体での処置は、誘導された増殖において何ら減少をもたらさない。特異的抗体は、約500ng/mlの濃度で50%最大効果を有する。平行した実験において、抗30664188抗体は、PDGF AAまたはPDGF BBによって誘導されるNIH/3T3細胞の増殖に何ら影響を及ぼさない。

【0467】

30664188特異的抗体での処置についての治療的適用は、例えば、30664188によって刺激される増殖が有利に阻害または防止される任意の病理学または疾患を含む。これらの病理学としては、例えば、脈間構造の増殖に関する疾患、炎症障害(例えば、関節炎)、腸疾患、アテローム硬化症、開存性脈間構造の再狭窄、および種々の固形腫瘍が挙げられる。

【0468】

(他の実施形態)

本発明はその詳細な説明と組合わせて記載されるが、前述の記載は、添付の特

許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を例示することを意図し、本発明の範囲を限定することを意図しないことが理解される。他の局面、利点、および改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、クローン30664188.0.99のアミノ酸配列の、ヒト分泌成長因子様タンパク質VEGF-Eアミノ酸配列(配列番号24)のアミノ酸配列との整列の図である。

【図2】

図2は、E.coli細胞において発現される30664188.m99タンパク質のウエスタンブロットの図である。

【図3】

図3は、ヒト283細胞により分泌される30664188.m99タンパク質のウエスタンブロットの図である。

【図4A】

図4Aは、クローン30664188.0.99のタンパク質の成熟形態の組換え産生、精製および正確な分子量についてのスキームの概略図である。

【図4B】

図4Bは、30664188.m99ポリペプチドの発現を示す2つのウエスタンブロット分析の図を含む。

【図5】

図5は、種々の処置に応じたBrdUのNIH3T3細胞およびCCD-1070細胞への組込みを示すグラフである。

【図6】

図6は、種々の処置に応じたNIH3T3 5-24細胞の増殖を示すグラフである。

【図7】

図7は、模擬(mock)処置または30664188に曝露されたNIH3T3細胞における細胞数を示すグラフである。

【図8】

図8は、pCEP4sec CMまたは30664188タンパク質での処理に応じたNIH 3T3細胞の細胞密度および細胞形態学を示す顕微鏡写真である。

【図9】

図9は、種々の処理に応じたNHost骨芽細胞における細胞数の変化を示すグラフ (photomicrograph) である。

【図10】

図10Aは、血清の非存在下で培養されたHEK293細胞により発現された30664188.m99のウエスタンブロットの図である。図10Bは、血清の存在下で培養されたHEK293細胞により発現された30664188.m99タンパク質のSDS-PAGEの図である。

【図11】

図11は、30664188.m99タンパク質のp85フラグメントに刺激されたNIH3T3細胞およびp35フラグメントに刺激されたNIH3T3細胞に組み込まれたBrdUの用量適定の図である。

【図12】

図12は、PDGFファミリーメンバー間のコアPDGFドメインの比較を示す図である。ヒトおよびマウスPDGF DコアPDGFドメインは、ヒトPDGF C、ヒトPDGF BおよびヒトPDGF AコアPDGFドメイン (GenBank登録番号:それぞれAAF80597、P01127およびP04085) と整列された。恒常システイン残基に影をつける。アスタリスクは、PDGF Dには無い保存システイン残基を示す。

【図13】

図13は、ヒトPDGF D遺伝子のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列の図である。ヒトPDGF Dゲノム構造もまた示される。開始コドンおよび終止コドンは、四角で囲まれ、そしてイントロン/エキソン境界は、矢印で示される。

。

【図14】

図14は、PDGF DのウエスタンブロットおよびSDS-PAGE分析の図を示す。パネルAにおいて、pCEP4/Sec(レーン1)またはpCEP4/Sec-PDGF D(レーン2および3)で一時的にトランスフェクトされ、そしてFBSの存在下(レーン3)または非存在下(レーン1および2)で培養されたHEK293細胞の馴化培地由来のサンプルを、還元条件下でSDS-PAGEにより試験し、次いで抗V5抗体を使用する免疫ブロット分析した。パネルBにおいて、FBSの存在下(レーン3および4)または非存在下(レーン1および2)で培養されたpCEP4/Sec-PDGF DトランスフェクトHEK293細胞由来の精製されたPDGF Dを、SDS-PAGEにより分割し、そしてクマシーブルーで染色した。サンプルを、DTTを用いて(+)および用いずに(-)処理した。分子量マーカを左に示す。

【図15】

図15は、p35から得られ、そしてN末端配列決定により同定されたフラグメントの図を示す。各パネルにおいて、黒い上の配列はクローン由来の推定配列であり、そして灰色の下配列は、N末端配列決定から得られた配列である。斜線の影は、p35の2つのフラグメントを示す。水平の影は、V5エピトープを示しそして垂直な影は、6Hisタグを示し、これらの両方は、ベクターpCEP4/Sec-30664188に起源を有する(実施例4)。パネルAにおいて、2つの配列は同定され、1つはGlyArgで始まり(これら2つの残基は下線を付してしめされる)、そして2つ目は、第3の残基Serで始まる。

【図16】

図16は、ウシ胎児血清(パネルB)および子ウシ血清(パネルA)の存在下での30664188遺伝子産物のSDS-PAGEの図である。各パネルにおけるレーン1およびレーン2は、基準30664188 p35単独または血清存在下をそれぞれ示す。各パネルにおけるレーン3は、血清非存在下でのp85を示し、そしてレーン4~6は、増加した濃度の各血清の存在下のp85を示す。

【図17】

図17は、組換えPDGF DDの生物学的活性およびPDGFレセプターの活性化(DNA合成および細胞増殖に対するその効果を含む)を示す図を含む。

パネルAおよびBは、BrdU組込みアッセイを示す。CCD1070ヒト(A)線維芽細胞またはNIH 3T3マウス(B)線維芽細胞を、血清飢餓状態にし、PDGF DD p35(黒丸)、PDGF DD p85(黒三角) PDGF BB(白三角)またはPDGF AA(黒四角)と共に18時間インキュベートし、そしてBrdU組込みアッセイで分析した。パネルCは、増殖アッセイを示す。NIH 3T3細胞を、示された因子(記号は上に示す)または5%子ウシ血清(白丸)を補充した無血清培地でインキュベートし、そして示された時間間隔で計数した。パネルDは、線維芽細胞におけるPDGFR活性化を示す。NIH 3T3線維芽細胞を、18時間血清飢餓状態にし、そしてPDGF DD、PDGF AA、またはPDGF BB(200 ng/ml)の非存在下または存在下で10分間インキュベートした。次いで、全細胞溶解物を、またはPDGFレセプター(PDGFR)に対して指向される抗体を用いて免疫沈降(IPと称する)し、そして抗ホスホチロシンmAb(抗PY)、抗PDGFR抗体または抗PDGFR抗体を用いてウエスタンブロット分析にかけた。PDGFRの位置を示す。

【図18】

図18は、30664188 p85の、NIH/3T3細胞の増殖を誘導する他の成長因子との競合、およびNIH/3T3細胞の細胞増殖に対する30664188 p35またはPDGF BBのいずれかの存在下での100倍範囲の30664188 p85の添加の効果を示す図である。

【図19】

図19は、PDGF DD、PDGF BB、およびPDGF AA処理後の差次的遺伝子発現分析の図である。パネルAにおいて、一次ヒト包皮線維芽細胞を、PDGF DD、PDGF BB、PDGF AAまたはコントロール緩衝液で3時間処理した。全RNAを採取し、そしてGene Calling(米国特許第5,871,697号およびR. Shimkets et al., Nat. Biotechnol. 18, 798-803(1999))にかけた。各処理により誘導された(灰色の影をつけた枠)または抑制された(灰色の線引きをした枠)共有遺伝子フラグメントの数を右に示す。パネルBにおいて、P

DGF DDおよびPDGF BBにより誘導された代表的な遺伝子を示す。倍増 (fold) 誘導 (灰色の影をつけた枠) または抑制 (灰色の線引きをした枠) を各枠に示す。

【図20】

図20は、レセプター抗体の非存在下または存在下での成長因子に応じたCCD1070細胞の増殖の競合の結果を示す図である。CCD1070細胞を、30664188のp35形態、PDGF AAまたはPDGF BBの存在下でインキュベートした。各場合において、成長因子をそれ自体で、非特異的抗体 (Rab) と共に、PDGFレセプターに特異的な抗体 (Rab) またはPDGFレセプターに特異的な抗体 (Rab) と共に、あるいは両方の特異的抗体の存在下でインキュベートした。

【図21】

図21は、成長因子による肺動脈平滑筋細胞の増殖の刺激の図である。平滑筋細胞を、精製したp35PDGF DD、PDGF AAまたはPDGF BBで示された濃度において処理し、そしてDNAに組み込まれたBrdUの量を決定した。

【図22】

図22は、種々の処理に応じた肺動脈平滑筋細胞の増殖を示す図である。

【図23】

図23は、種々の処理に応じた伏在静脈細胞の増殖を示す図である。

【図24】

図24は、特異的抗体での処理による、30664188により誘導されたNIH 3T3マウス細胞の増殖の中和を示す図である。

FIG. 1.

多量 整列:

30664188.0.99	1	MHRL	FVYTL	CANFCS	CRDT	SAT	POS	ASIK	KALRN	NLRR	DES	NH	TD	LYR	R	E	T	Q	V	K	G	60		
VEGF-E	1	..MS	FGLLL	T	S	A	G	Q	R	Q	G	K	F	Q	S	N	K	..	E	O	N	G	54	
30664188.0.99	61	NGY	Q	S	P	R	F	P	N	S	Y	P	R	N	L	L	T	W	R	H	S	..	119	
VEGF-E	55	NGS	H	S	P	R	F	P	H	E	Y	P	R	N	T	L	V	W	R	L	V	A	..	114
30664188.0.99	120	S	E	T	S	I	I	R	E	R	W	C	G	H	K	E	V	P	P	I	K	S	..	179
VEGF-E	115	S	G	..	T	L	E	R	W	C	G	S	G	T	V	P	G	Q	I	S	K	..	165	
30664188.0.99	180	E	T	N	W	E	S	V	T	S	S	G	V	S	N	S	P	S	V	T	D	P	..	238
VEGF-E	166	214	
30664188.0.99	239	M	V	L	D	T	P	R	Y	R	S	M	H	D	..	R	K	S	..	K	V	D	..	296
VEGF-E	215	M	V	R	P	T	W	Q	L	L	S	A	V	F	E	R	K	S	R	V	D	L	..	274
30664188.0.99	297	L	V	Q	R	C	G	G	N	C	G	T	V	N	W	R	S	T	N	S	G	K	..	356
VEGF-E	275	L	L	V	K	R	C	G	G	N	C	E	L	H	N	C	N	E	Q	V	P	S	..	331
30664188.0.99	357	H	E	R	C	D	C	S	S	R	P	P	R	370
VEGF-E	332	H	E	E	C	D	C	E	R	G	S	T	G	345

【图2】

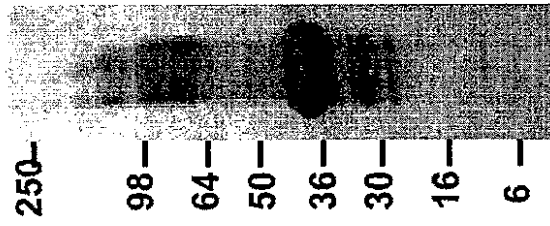


FIG. 2.

【图3】

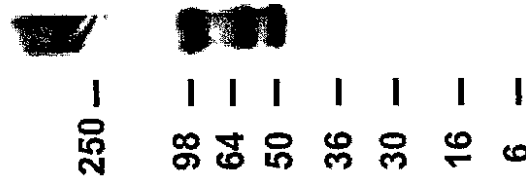
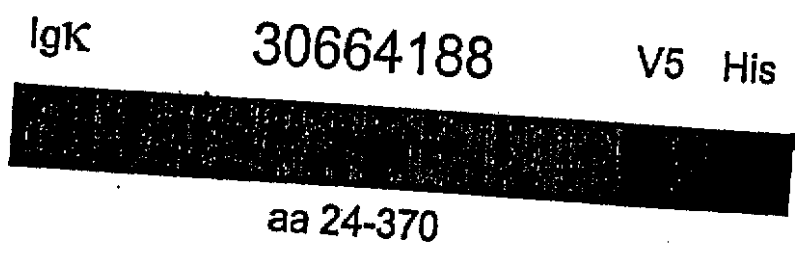


FIG. 3.

【図4A】

FIG. 4A



293トランスフェクション



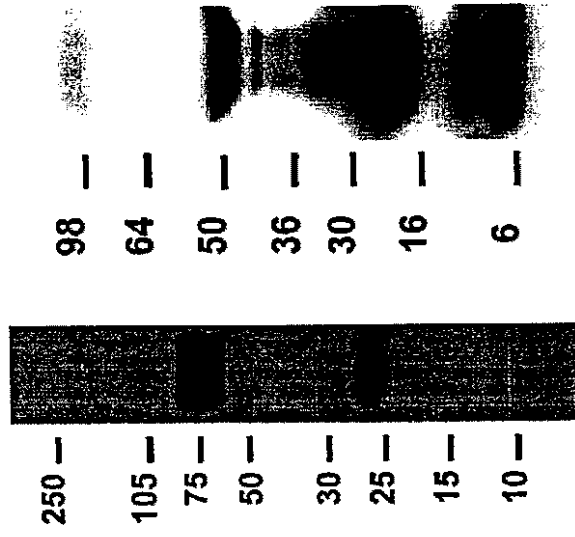
Ni アライメント クロマトグラフィー



イソプロピル 溶出

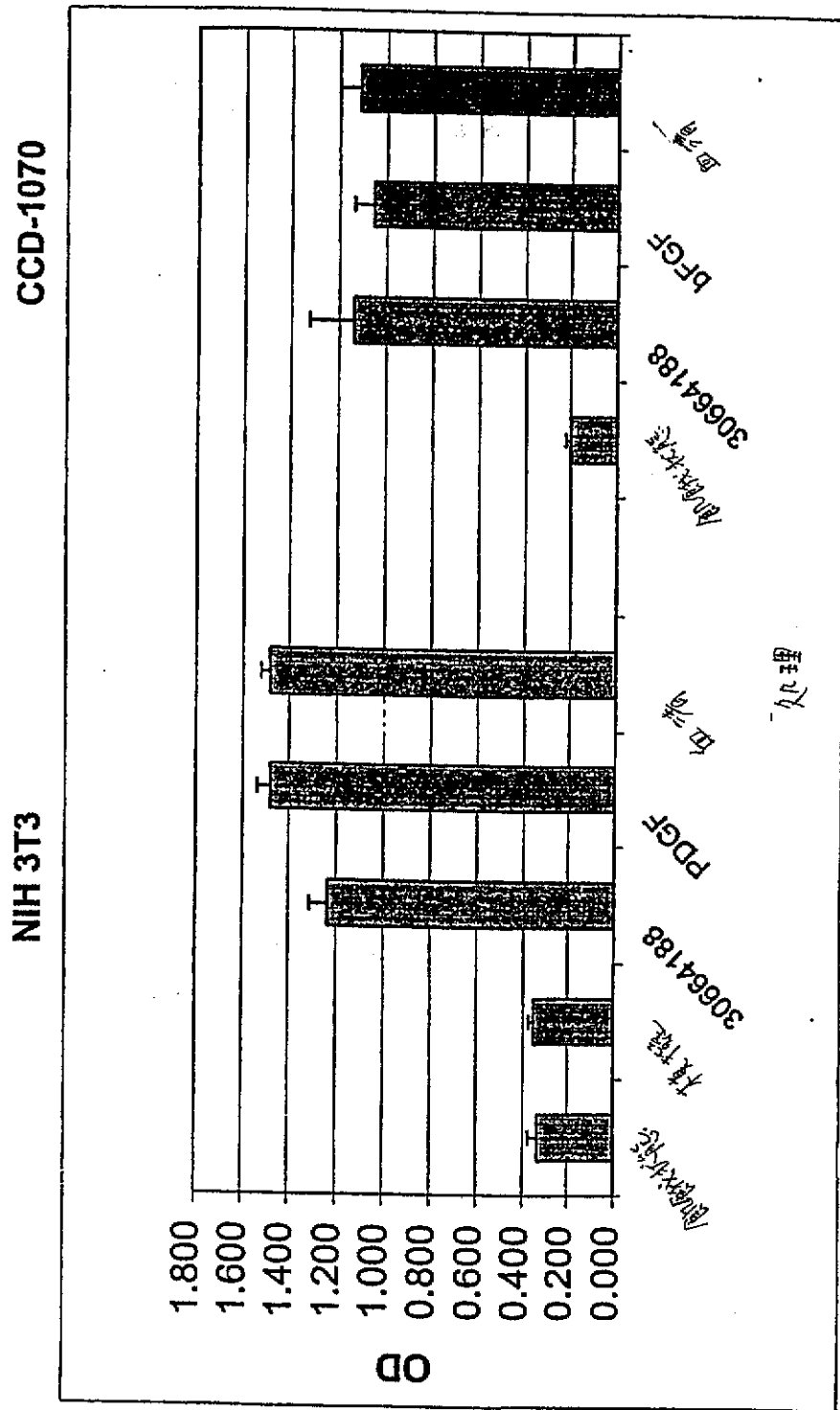
【图4B】

FIG. 4B



【图5】

FIG. 5.



【图6】

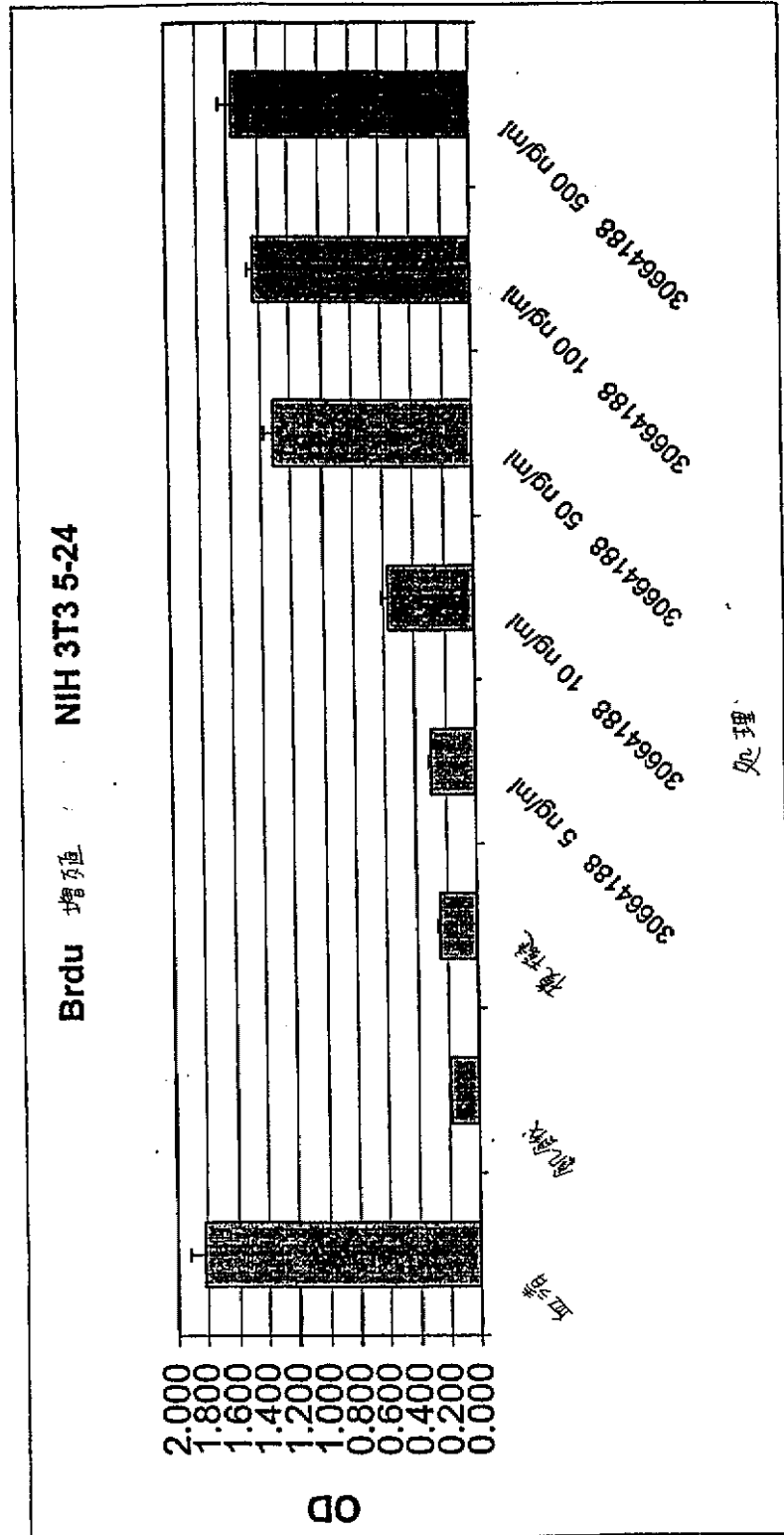


FIG. 6.

【図7】

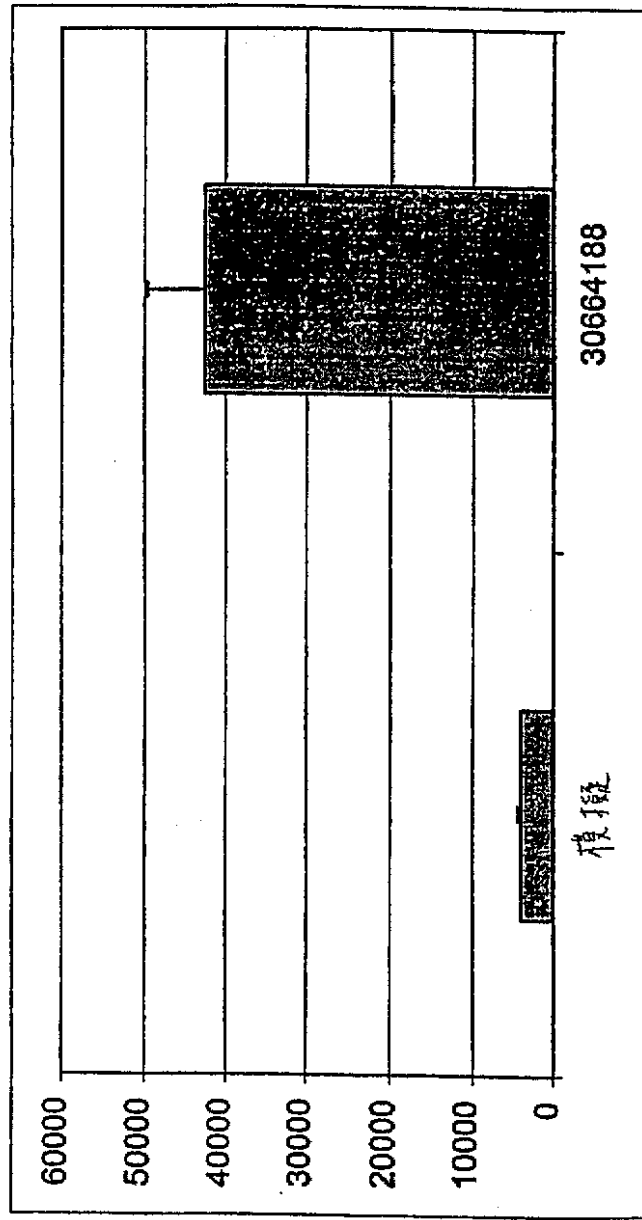
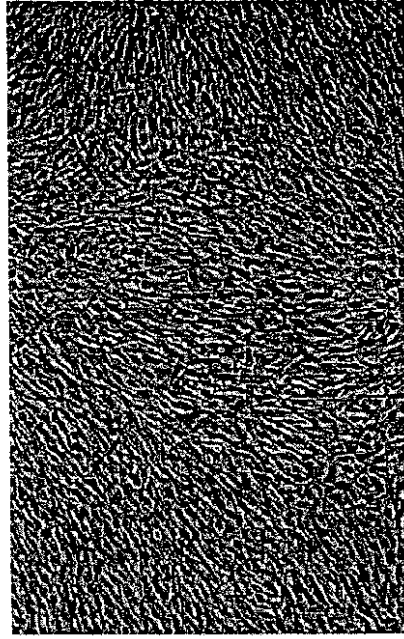


FIG. 7.

細胞数

【 図 8 】

pCEP4sec(30664188) CM



pCEP4sec CM

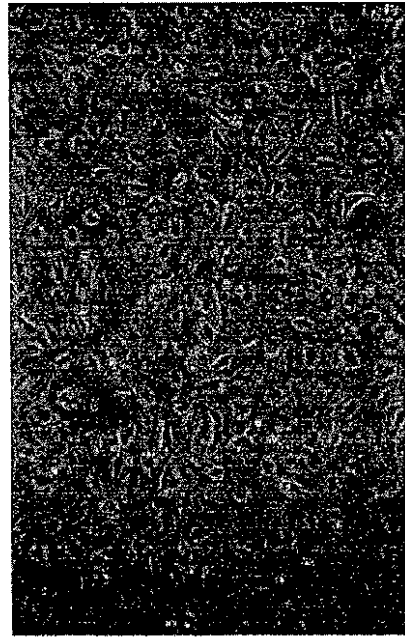


FIG. 8.

【图9】

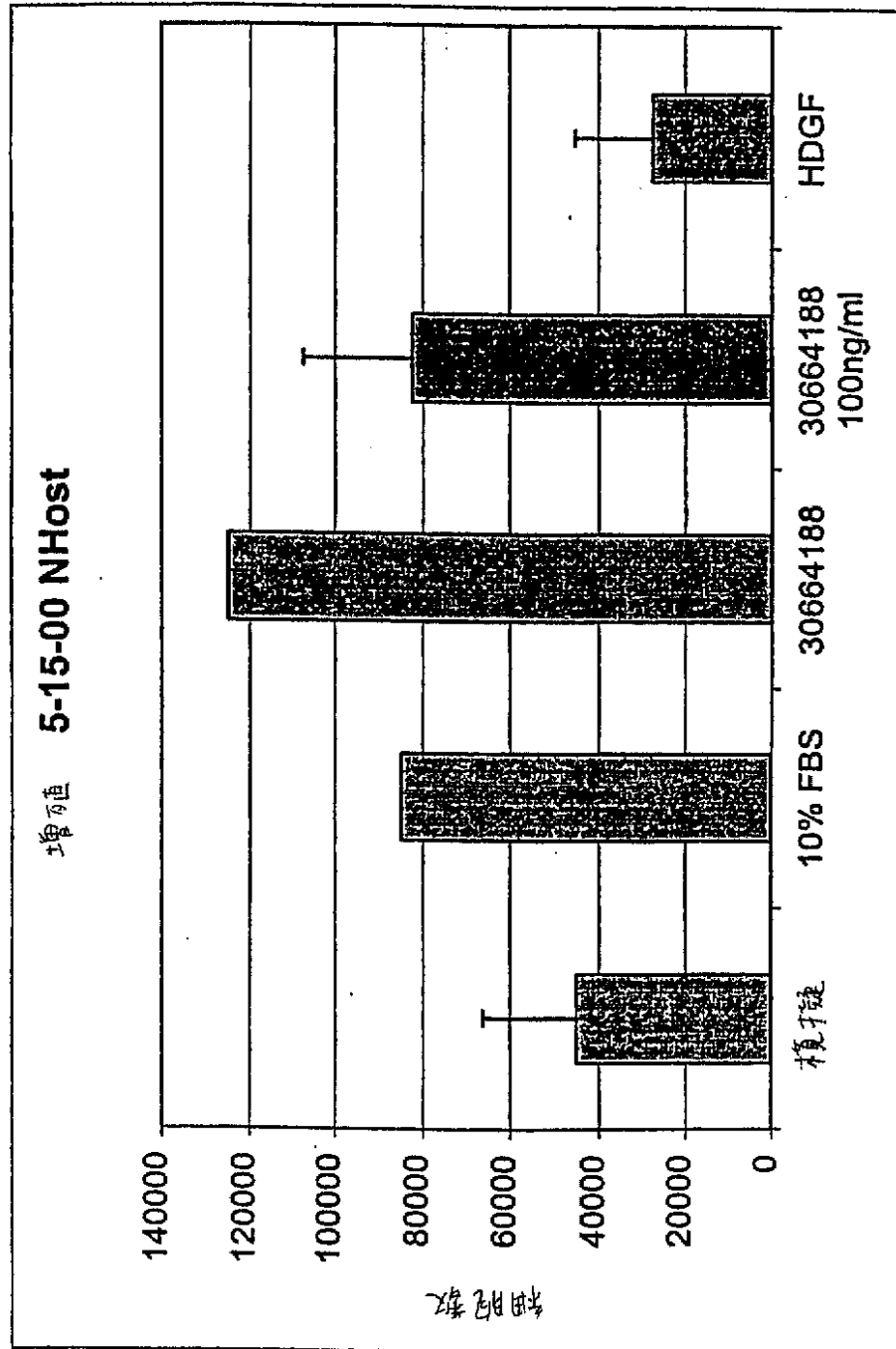


FIG. 9.

【图10】

FIG. 10B (血清蛋白)

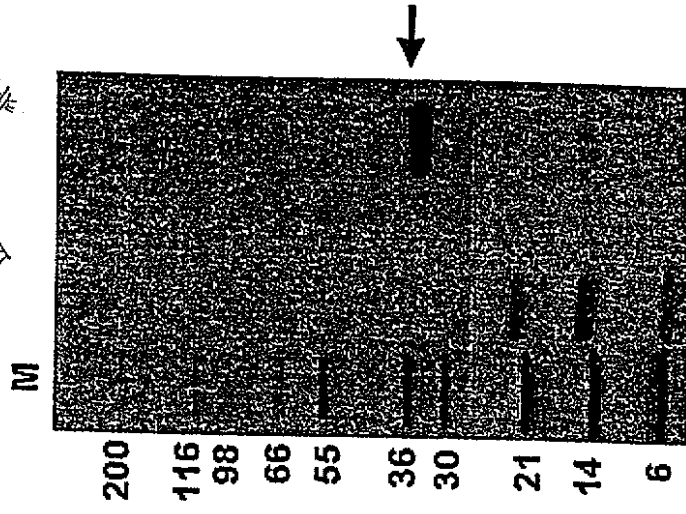


FIG. 10A (血清蛋白)

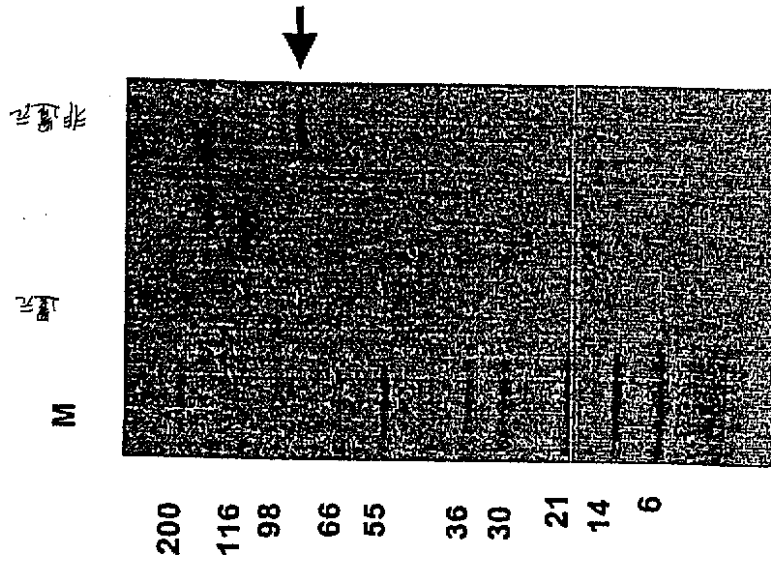


FIG. 10.

【図11】

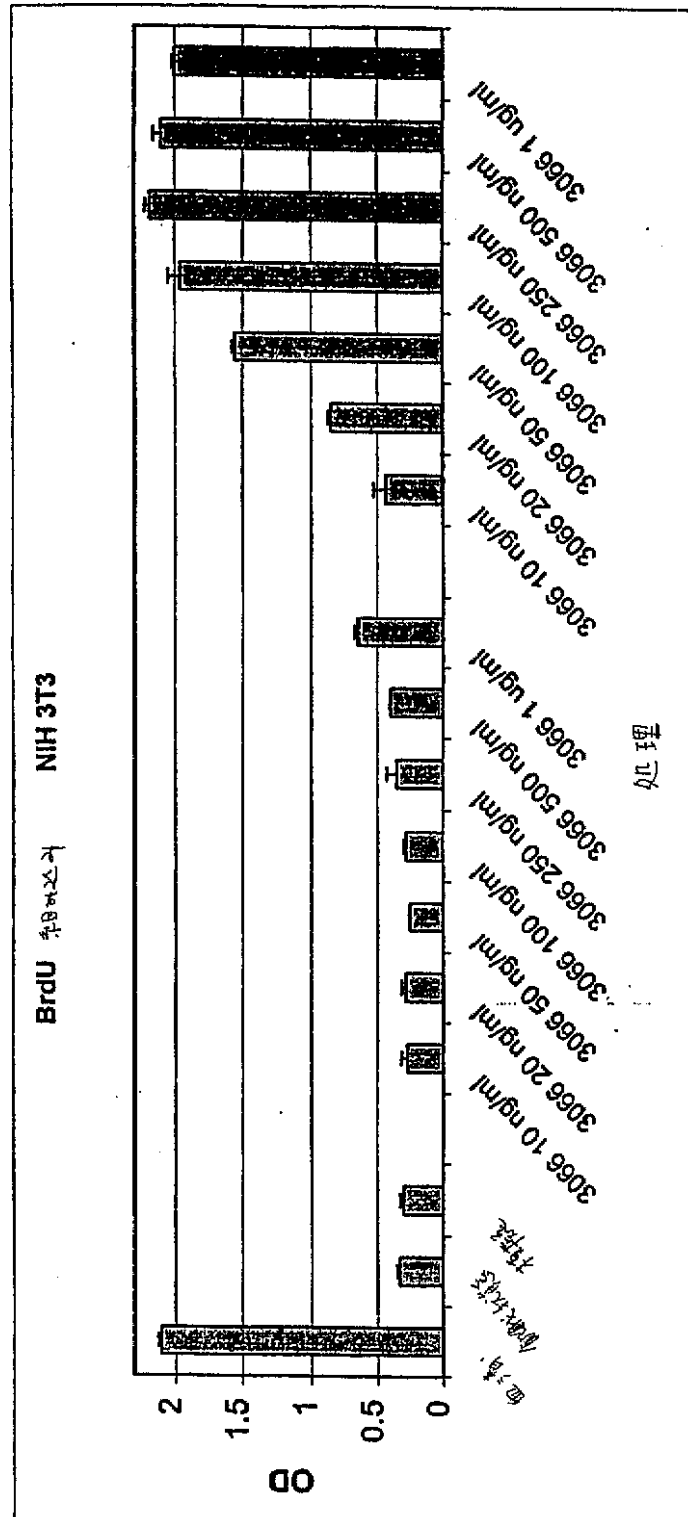


FIG. 11.

【図 12】

FIG. 12

hPDGF D	CTPRNYSVNI-REELKLANVVF--FPRCLLVQRGGNCGGTVNWRSGTC	
mPDGF D	CTPRNHSVNL-REELKLINAVF--FPRCLLVQRGGNCGGTVNWKSGTC	
PDGF C	CTPRNFSVSI-REELKRDTDTIF--WPGCLLVKRCGGNCAQLHNCNEQC	
PDGF B	CKTRTEVFVEISRRLIDRTNANFLVWPPQVEVQRCSG---CENNRNVQSRP	
PDGF A	CKTRTVIYEIPRSQVDPTSANFLIWPPQVEVKRGTG---CENNTSSVKQSP	
hPDGF D	NS---GKTVKKYHEVLQFEPGHIKRRGRAKTMALVDIQLDHERGDS	(白列番号 13)
mPDGF D	SS---GKTVKKYHEVLKFEPGHFKRRGKAKNMALVDIQLDHERGDS	(白列番号 14)
PDGF C	VP---SKVTKKYHEVLQLRPKTGVRGLH-KSLTDVA--LEHHERGDS	(白列番号 15)
PDGF B	TQVQLRPVQVRKIEIVRKKPIF-----KKAT-VT----LEDHLAAGK	(白列番号 16)
PDGF A	SRVHHRSVKVAKVEYVRKKPKL-----KEVQ-VR----LEEHLAAGK	(白列番号 17)

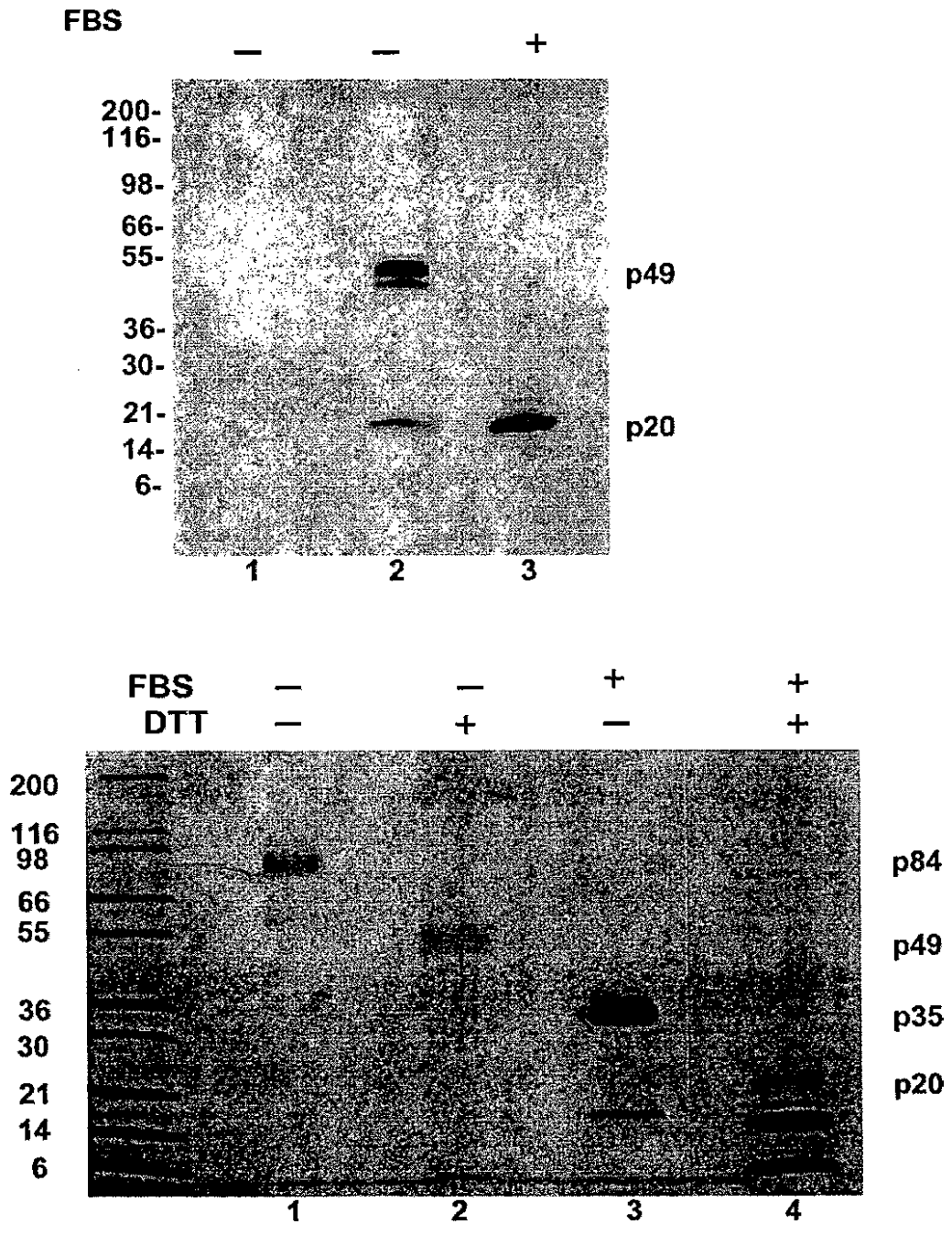
【図13】

FIG. 13

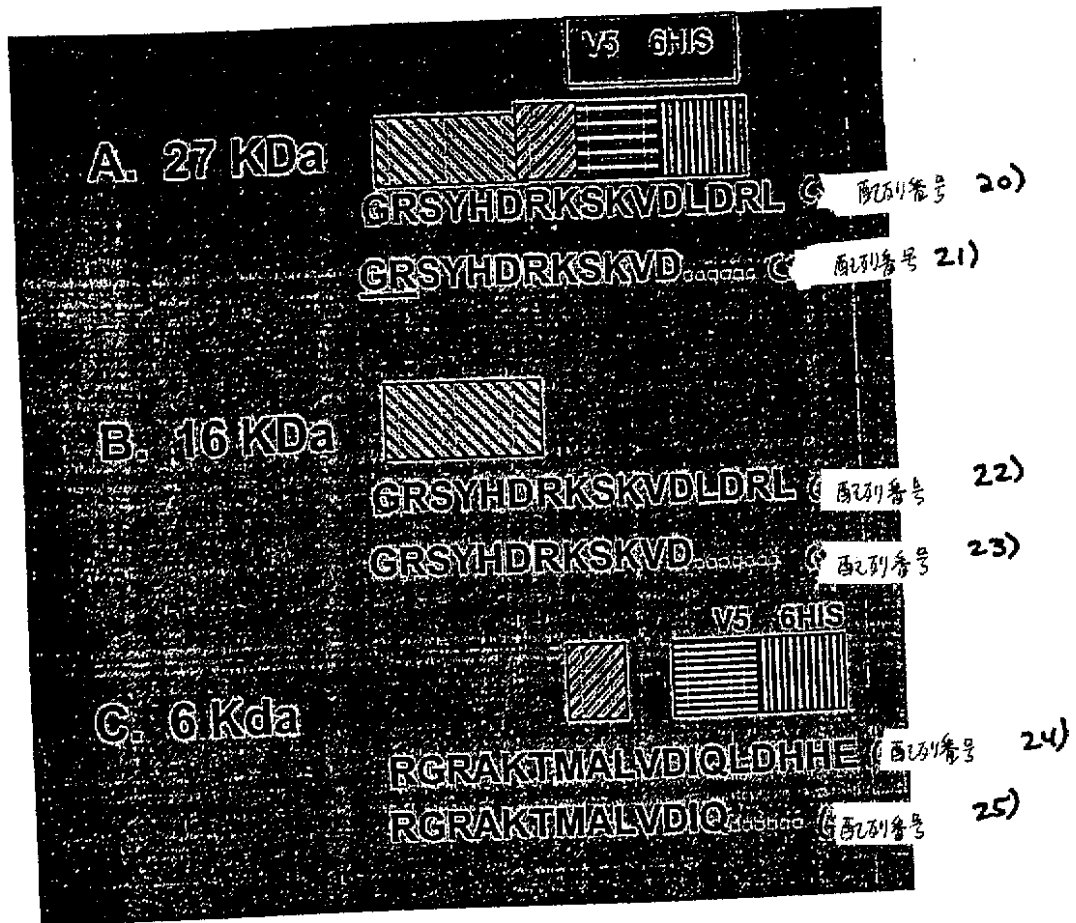
1 CGCAGGGCGGGCGGGCGGCTCGGTCGGGGAGCAGAACCCGGCTTTTTCTTGGAGCGAGCGCTGTCTCTAGTCGGTGAATCCCA
 81 ATGACCGGCTCATCTTTGCTACACTCTAATCTGCCAAACTTTTGCAGCTGTGGGACACTTCTGCAACCCCGCAGA
 H H R L I F V Y T L I C A N F C S C R D T S A T P Q S
 161 GCGCATCCATCAAAGCTTTGGCAAGCCACCTCAGGGCAGATGAGAGCAATCACCTCACAGACTTGTACCGAAGAGAT
 A S I K A L R N A N L R R D E S N H L T D L Y R R D
 241 GAGACCATCCAGGTGAAAGGAACGGCTACGTGCAGAGTCTAGATTCCCGAACAGCTACCCCAGGAACCTGCTCCTGAC
 E T I Q V K G N G Y V Q S P R F P N S Y P R N L L L T
 321 ATGGCGGCTTCACTCTCAGGAGAATACCGGATACAGCTAGTGTGTTGACAATCAGTTTGGATTAGAGGAAGCAGAAATG
 W R L H S Q E N T R I Q L V F D N Q F G L E E A E N D
 401 ATATCTGTAGGTATGATTTTGTGGAAAGTTGAAGATATATCCGAAACAGTACCATTATTAGAGGACGATGGTGTGGACAC
 I C R Y D F V E V E D I S E T S T I I R G R W C G H
 481 AAGGAAGTTCCTCCAAGGATAAAATCAAGAACGAACCAAATTAATACATTCAAGTCCGATGACTACTTTGTGGCTAA
 K E V P P R I K S R T N Q I K I T F K S D D Y F V A K
 561 ACCTGGATTCAAGATTTATTCTTTGCTGGAAGATTTCCAAACCCGAGCAGCTTCAGAGACCAACTGGGALTCTGTCA
 P G F K I Y Y S L L E D F Q P A A A S E T N W E S V T
 641 CAAGCTCTATTTCAAGGGTATCCTATACTCTCCATCAGTAAACGGATCCCCTCTGATTGGCGATGCTCTGGACAAAAA
 S S I S G V S Y N S P S V T D P T L I A D A L D K K
 721 ATTGCAGAATTTGATACAGTGAAGATCTGCTCAAGTACTTCAATCCAGAGTCATGGCAAGAGATCTTGAGAATATGTA
 I A E F D T V E D L L K Y F N P E S W O E D L E N H Y
 801 TCTGGACACCCCTCGGTATCGAGGCAGGTACATACCACCGGAAGTCAAAGTTGACCTGGATAGGCTCAATGATGATG
 L D T P R Y R G R S Y H D R K S K V D L D R L N D D A
 881 CCAAGCGTTACAGTTCAGTCCCAAGAACTTCTCGGTCAATATAAGAGAGAGCTGAAGTTGGCCAATGTGGTCTCTTT
 K R Y S C T P R N Y S V N I R E E L K L A N V V F F
 961 CCACGTTGCTCCTCGTGCAGCGCTGTGGAGGAAATGTGGCTGTGGAAGTGTCAACTGGAGGTCCTGCACATGCAATTC
 P R C L L V Q R C G G N C G C G T V N W R S C T C N S
 1041 AGGGAACCCGTAAGAAAGTATCATGAGGTATTACAGTTTGGAGCTGGCCACATCAAGAGGAGGGGTAGAGCTAAGACCA
 G K T V K K Y H E V L Q F E P G H I K R R G R A K T H
 1121 TGGCTCTAGTTGACATCCAGTTGGATCACCATGAACGATGTGATTGATCTGCAGCTCAAGACCACCTCGATAGAGAAAT
 A L V D I Q L D H H E R C D C I C S S R P P R (舊列番号)
 1201 GTGCACATCCTTACATTAAGCCTGAAGAACCTTTAGTTTAAAGGAGGGTGAGATAAGAGACCCTTTTCTACCAGCAACC
 1281 AAATCTACTACTAGCCTGCAATGCAATGAAACAAAGTGGTTGCTGAGTCTCAGCCTTGCTTTGTTAATGCCATGGCAAGT
 1361 AGAAAGGTATATCATCAACTTCTATACCTAAGAATATAGGATTGCATTTAATAATAGTGTITGAGGTTATATATGCACAA
 1441 ACACACACAGAAATATATTCATGTCTATGTGTATATAGATCAATGTTTTTTTTGGTATATATAACCAGGTACACCAGAG
 1521 CTTACATATGTTTTGAGTTAGACTCTTAAATCCTTTGCCAAATTAAGGGATGGTCAATATATGAACATGTCTTTAGAA
 1601 AATTTAGGAGATAAATTTATTTTAAATTTTGAACACAAAATTTTGAATCTTGCTCTCTTAAAGAAAGCATCTTGT
 1681 ATATTAATAAATCAAAAGATGAGGCTTTCTTACATATACATCTTAGTTG (舊列番号) (18)

【図 14】

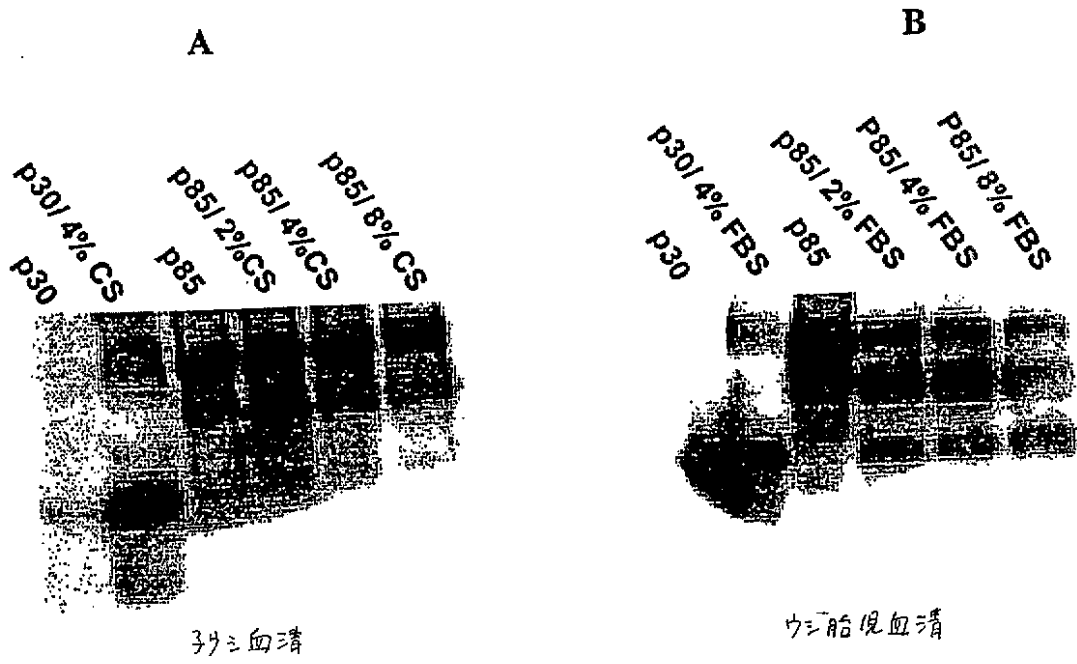
FIG. 14



【图 15】
FIG. 15

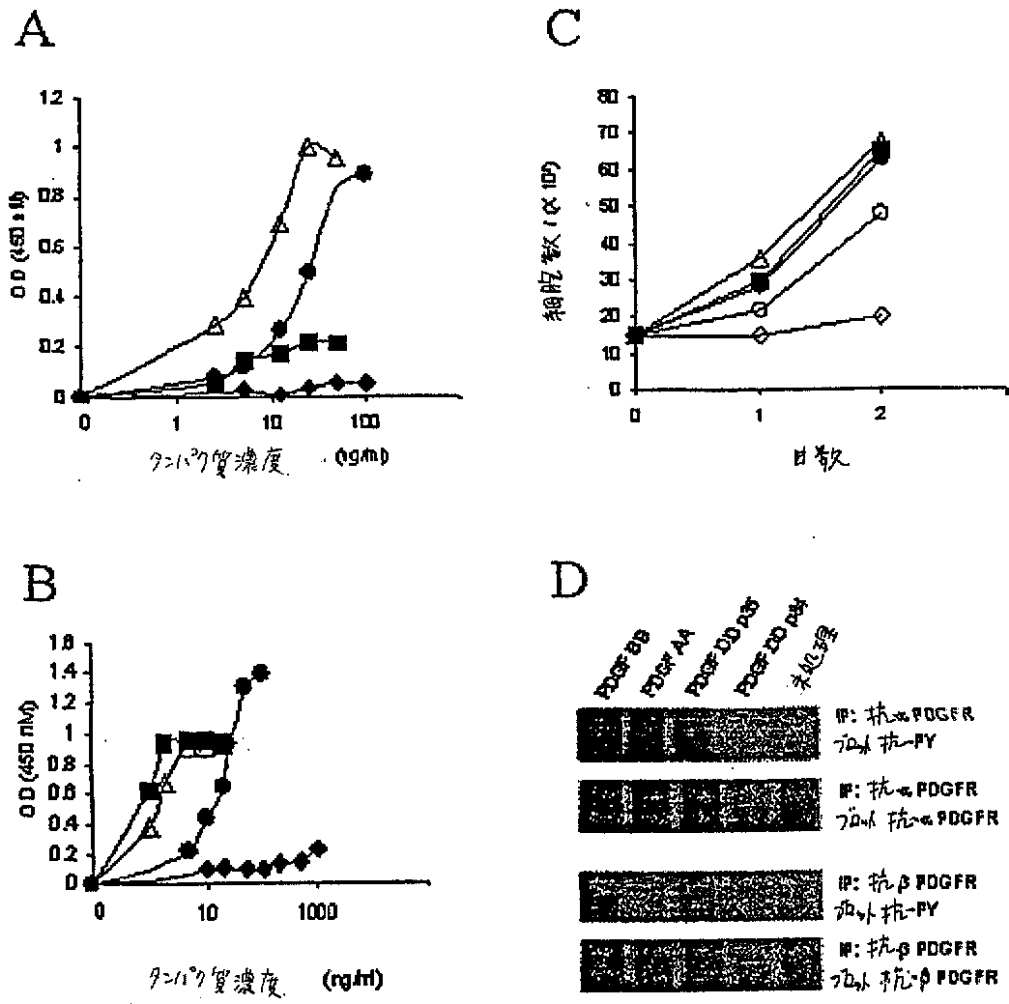


【図16】
FIG. 16



【圖17】

FIG. 17



【図18】

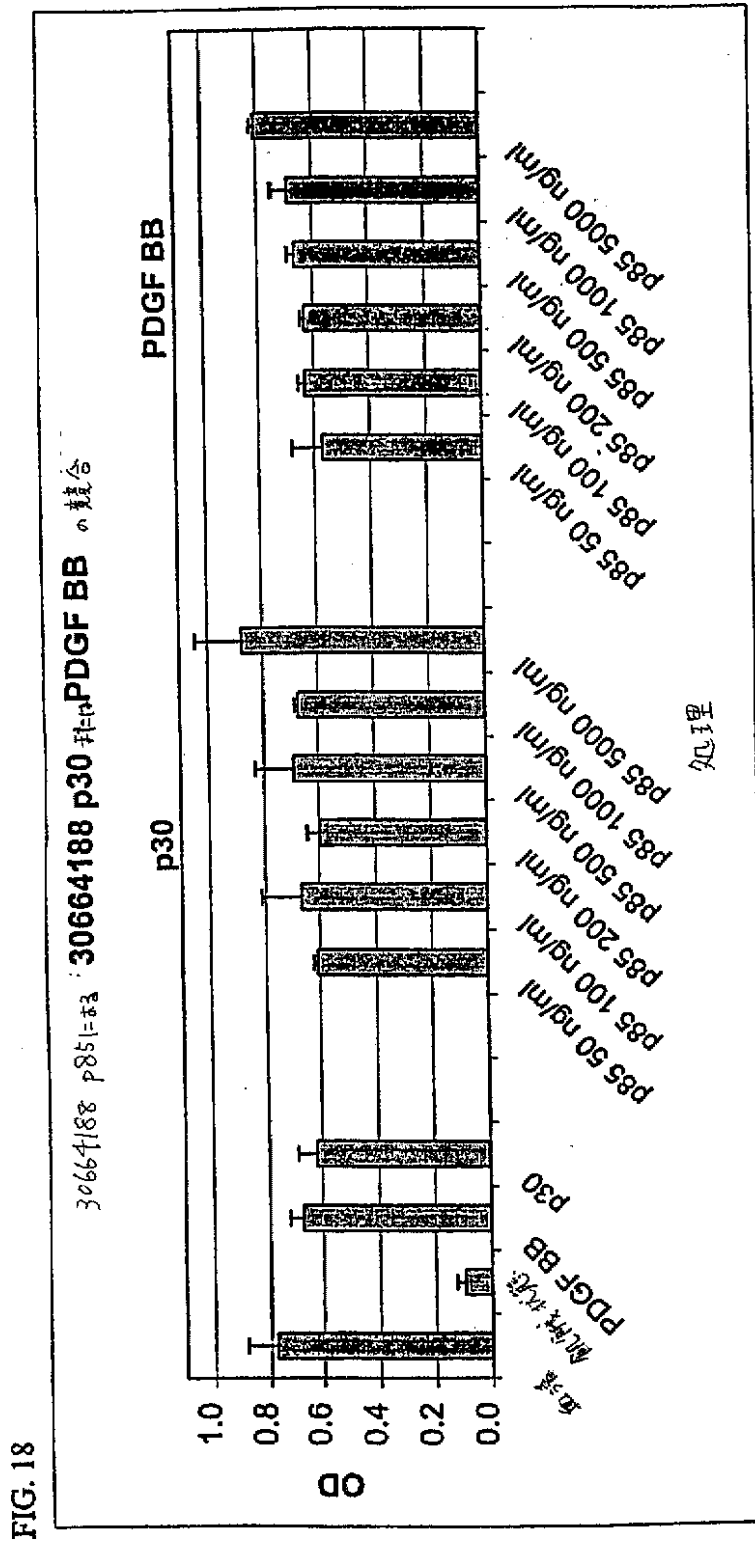


FIG. 18

【図 19】

FIG. 19

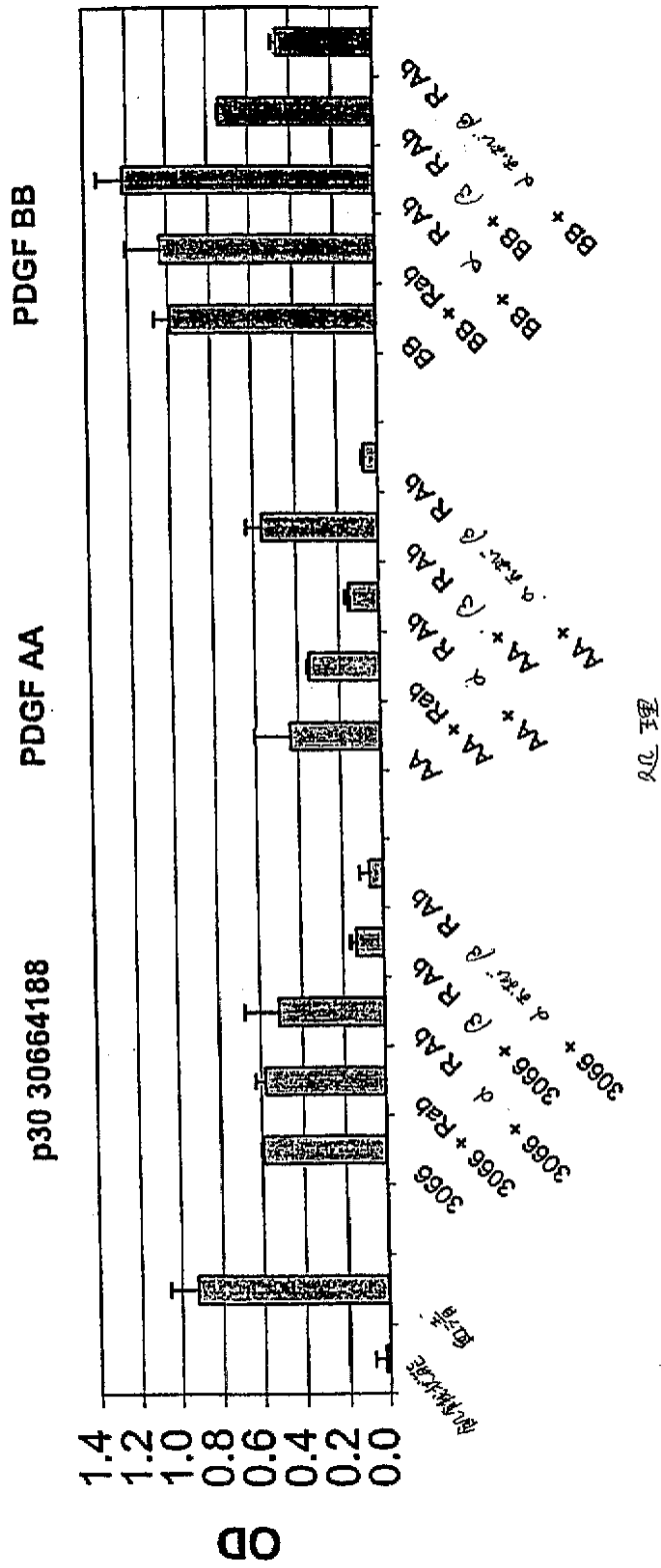
A

	PD GF D	PD GF B	PD GF A	選配子759/s>
				21
				32
				22
				124
				2
				8
				19
				69
				0
				2
				1
				1
	<hr/> <hr/>			302

【図20】

FIG. 20

CCD1070 増殖: 抗Lセ79抗体に阻害



【图 21】

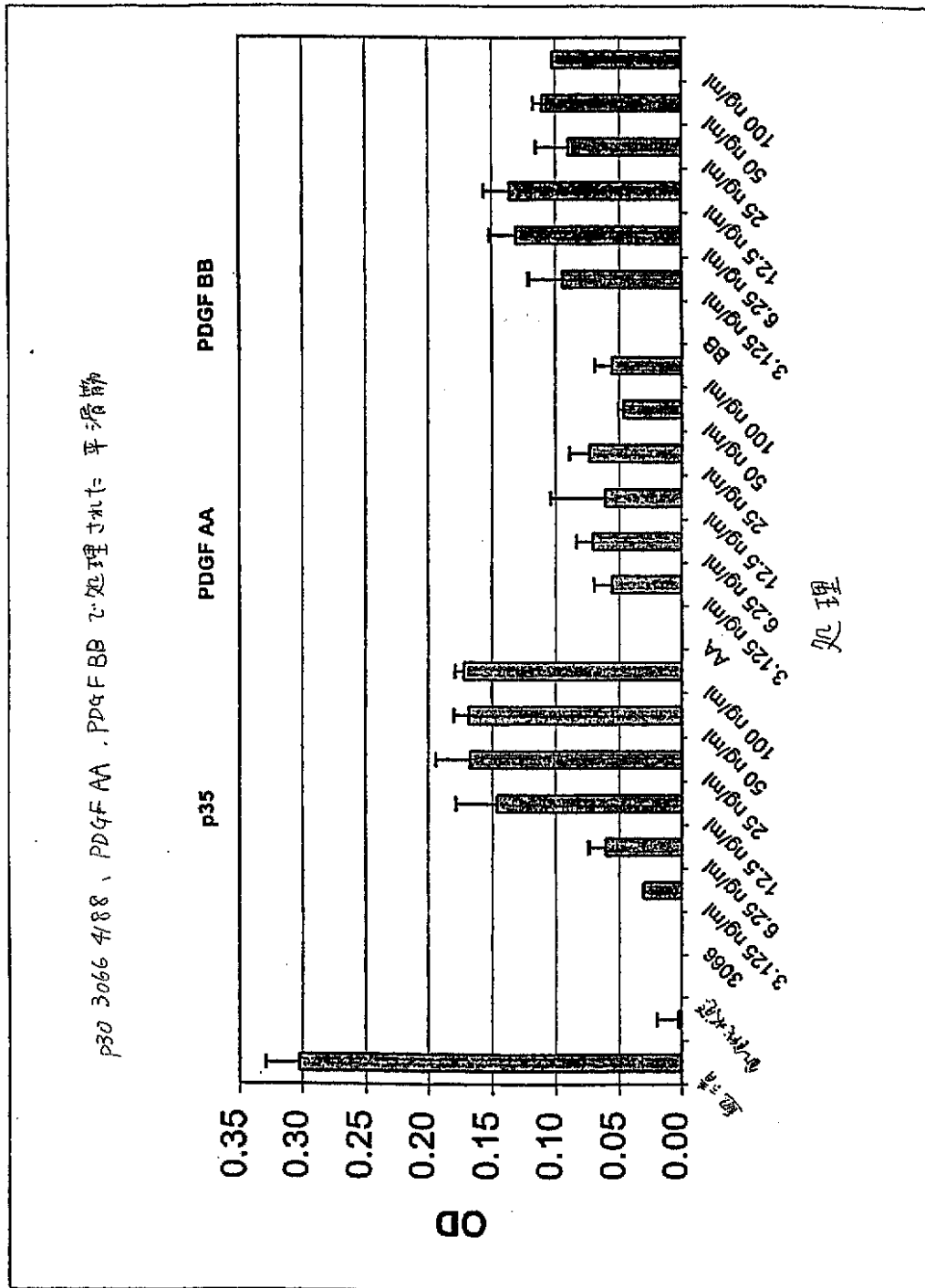


FIG. 21.

【図22】

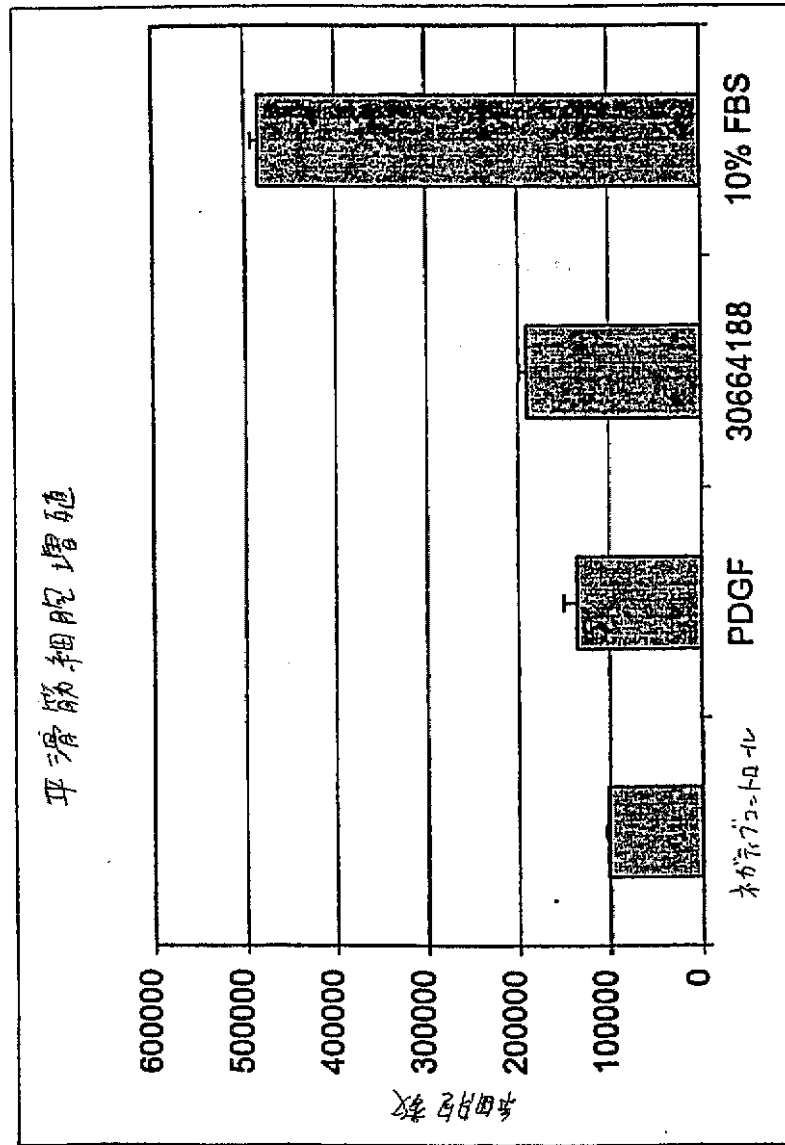


FIG. 22

【図23】

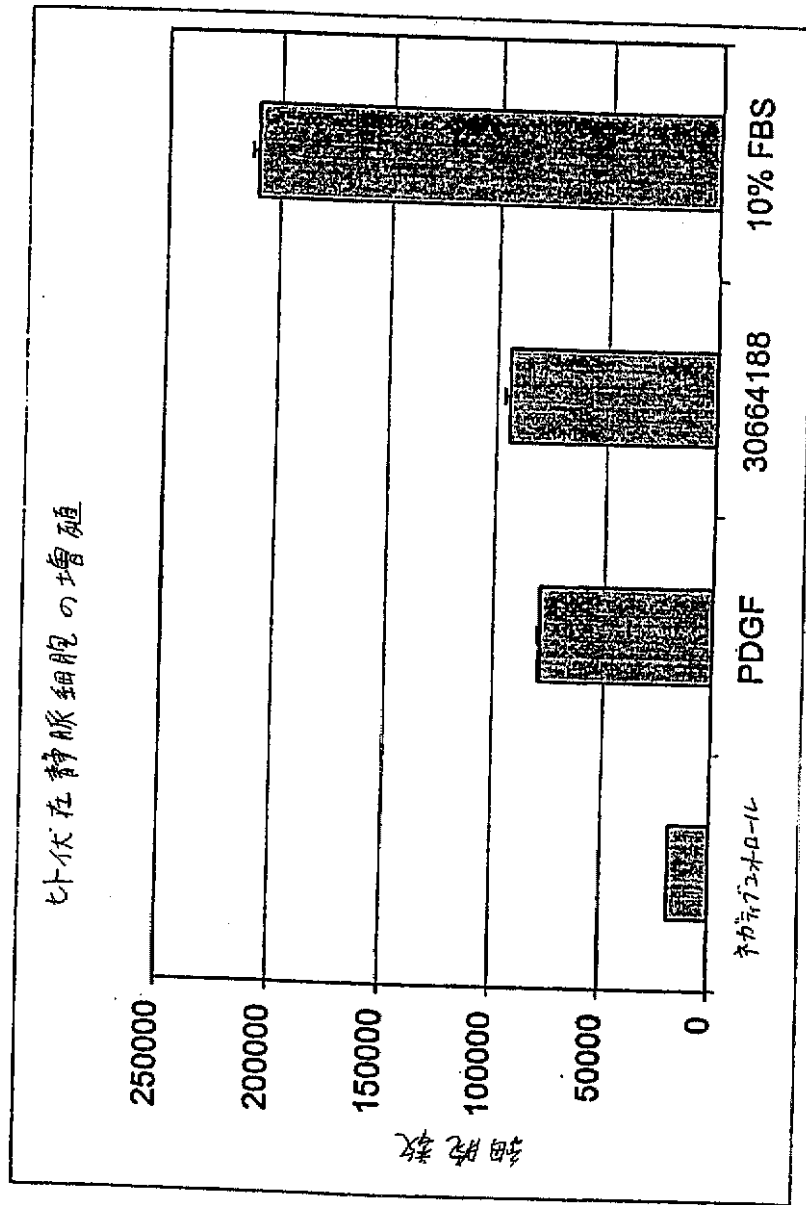


FIG. 23

【図24】

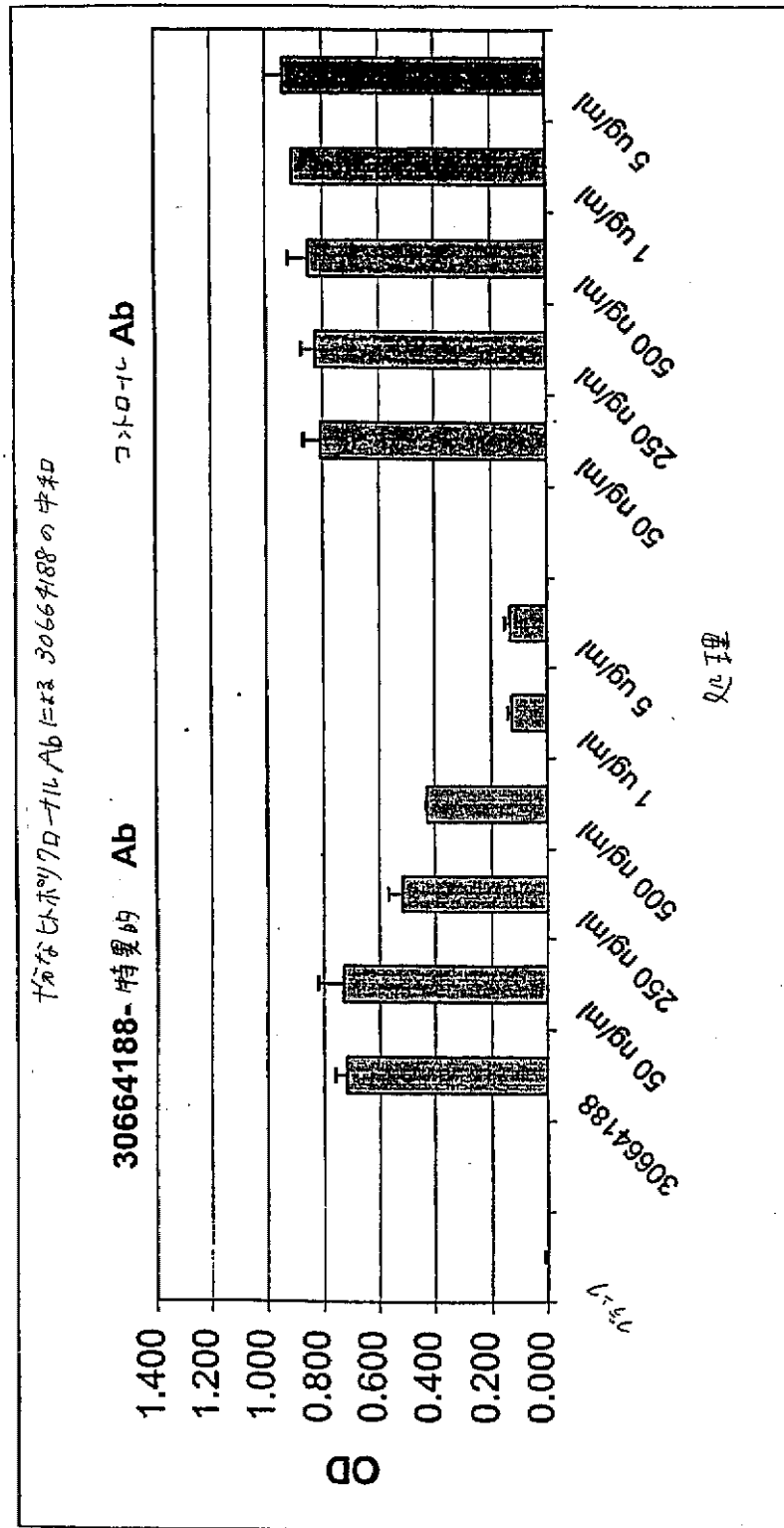


FIG. 24

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Intern. Appl. Application No. PCT/US 00/27671
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/18 C12N15/19 C07K16/22 C07K16/24 A61K38/17	C07K14/52 C07K14/51 C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53
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 C07K C12N		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL [Online] 1 July 1997 (1997-07-01) ROBERT STRAUSBERG: " aa54ci0.r1 NCI CGAP GCB1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:824754 5'" retrieved from EBI Database accession no. AA488780 XP002182497 99.444% identity (99.444% ungapped) in 360 nt overlap (1094-1453:1-360) with seq.1 abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-32, 40-49, 51,52, 64-66, 68-86</p>
<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:		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 14 November 2001		Date of mailing of the international search report 15. 02. 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 Gurdjian, D

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/27671
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 47677 A (GENENTECH INC) 23 September 1999 (1999-09-23) page 2, paragraph 3 page 13, paragraph 2 page 70, paragraph 3; claims 1-33 ---	1-32, 40-49, 51,52, 64-66, 68-86
P,X	WO 00 27879 A (UNIV HELSINKI LICENSING ;LUDWIG INST CANCER RES (US)) 18 May 2000 (2000-05-18) claims 1-68; figure SEQ.ID.8 ---	1-32, 40-49, 51,52, 64-66, 68-86
P,X	WO 00 34474 A (ZYMOGENETICS INC) 15 June 2000 (2000-06-15) claims 1-48; figure SEQ.ID.37 ---	1-32, 40-49, 51,52, 64-66, 68-86
E	WO 00 66736 A (ZYMOGENETICS INC) 9 November 2000 (2000-11-09) claims 1-54; figure SEQ.ID.2 ---	1-32, 40-49, 51,52, 64-66, 68-86
E	WO 01 00878 A (MILLENNIUM PHARM INC) 4 January 2001 (2001-01-04) claims 1-25; figure SEQ.ID.1 -----	1-32, 40-49, 51,52, 64-66, 68-86

7

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/27671**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 24,78-83, as far as they concern an in vivo method, and claims 33-39, 53-63 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 50
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-65,69,71,74-77,81,82,86 partly and 70,73,85 completely

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-65,69,71,74-77,81,82,86 partly and 70,73, 85 completely

polypeptides with amino acid sequence with seq.id.2 and corresponding nucleotide sequence with seq.id.1 , corresponding fragments , vector, cell , antibody , method of determination of presence and predisposition to a disease , method of identifying a binding/modulating agent and pharmaceutical .

2. Claims: 1-65, 69,71,74-77,81-82,86 partly

polypeptides with amino acid sequence with seq.id.4 and corresponding nucleotide sequence with seq.id.3 , corresponding fragments ,vector, cell , antibody , method of determination of presence and predisposition to a disease , method of identifying a binding/modulating agent and pharmaceutical .

3. Claims: 1-65, 69,71,74-77,81-82,86 partly

polypeptides with amino acid sequence with seq.id.6 and corresponding nucleotide sequence with seq.id.5 , corresponding fragments ,vector, cell , antibody , method of determination of presence and predisposition to a disease , method of identifying a binding/modulating agent and pharmaceutical .

4. Claims: 1-65, 69,71,74-77,81-82,86 partly

polypeptides with amino acid sequence with seq.id.8 and corresponding nucleotide sequence with seq.id.7 , corresponding fragments ,vector, cell , antibody , method of determination of presence and predisposition to a disease , method of identifying a binding/modulating agent and pharmaceutical .

5. Claims: 1-65, 69,71,74-77,81-82,86 partly

polypeptides with amino acid sequence with seq.id.10 and corresponding nucleotide sequence with seq.id.9 , corresponding fragments ,vector, cell , antibody , method of determination of presence and predisposition to a disease , method of identifying a binding/modulating agent and pharmaceutical .

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

6. Claims: 1-65, 69,71,74-77,81-82,86 partly

polypeptides with amino acid sequence with seq.id.12 and corresponding nucleotide sequence with seq.id.11 , corresponding fragments ,vector, cell , antibody , method of determination of presence and predisposition to a disease , method of identifying a binding/modulating agent and pharmaceutical .

7. Claims: 75-77,81,82 partly and 66-68,72,78-80,83, 84 completely

mammalian platelet-derived growth factor-like polypeptide other than mammalian PDGF AA,BB,CC wherein the first polypeptide is processed to provide a second polypeptide that is a fragment of the first polypeptide , and wherein the second polypeptide has at least one property chosen from the group consisting of

- a) the second polypeptide binds a platelet derived growth factor receptor
- b) the second polypeptide indices growth of mammalian cells
- c) the second polypeptide induces proliferation of mammalian cells ,

their corresponding nucleic acid , antibodies and methods of modulating proliferation or growth , insofar as not provided in above mentioned inventions 1-6 .

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 50

Claim 50 relating to modulators to the polypeptide of claim 1 could not be searched as its subject-matter was insufficiently disclosed .

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/27671

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9947677	A	23-09-1999	AU 3072199 A	27-09-1999
			AU 3075099 A	11-10-1999
			EP 1064382 A2	03-01-2001
			WO 9946281 A2	16-09-1999
			WO 9947677 A2	23-09-1999
WO 0027879	A	18-05-2000	AU 1613600 A	29-05-2000
			CN 1325407 T	05-12-2001
			EP 1129110 A1	05-09-2001
			WO 0027879 A1	18-05-2000
WO 0034474	A	15-06-2000	AU 2167900 A	26-06-2000
			EP 1137773 A2	04-10-2001
			WO 0034474 A2	15-06-2000
			US 2002004225 A1	10-01-2002
			AU 8031700 A	30-04-2001
WO 0066736	A	09-11-2000	WO 0128586 A1	26-04-2001
			AU 4714500 A	17-11-2000
			EP 1177293 A1	06-02-2002
			WO 0066736 A1	09-11-2000
			AU 5125900 A	14-08-2001
WO 0100878	A	04-01-2001	WO 0157083 A1	09-08-2001
			AU 5903600 A	31-01-2001
			WO 0100878 A2	04-01-2001

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 45/00		A 6 1 P 7/02	4 C 0 8 4
48/00		7/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 7/02		7/06	4 C 0 8 6
7/04		9/10	4 H 0 4 5
7/06		25/00	
9/10		29/00	
25/00		35/00	
29/00		37/04	
35/00		37/06	
37/04		43/00	1 0 5
37/06			1 0 7
43/00	1 0 5		1 1 1
	1 0 7	C 0 7 K 14/485	
	1 1 1	14/49	
C 0 7 K 14/485		14/51	
14/49		16/18	
14/51		16/22	
16/18		C 1 2 N 1/15	
16/22		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	C
1/21			H
5/06		C 1 2 Q 1/02	
5/10		1/68	A
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/15	Z
		33/50	Z
C 1 2 Q 1/02		33/53	D
1/68			M
G 0 1 N 33/15			N
33/50			
33/53			
			B
		C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
			E
// C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 7 4 , 4 8 5		
(32)優先日	平成12年1月4日(2000.1.4)		
(33)優先権主張国	米国(U S)		
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 8 6 , 7 0 7		
(32)優先日	平成12年3月3日(2000.3.3)		
(33)優先権主張国	米国(U S)		
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 8 8 , 2 5 0		
(32)優先日	平成12年3月10日(2000.3.10)		
(33)優先権主張国	米国(U S)		

- (31)優先権主張番号 60/223,879
 (32)優先日 平成12年8月8日(2000.8.8)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 09/662,783
 (32)優先日 平成12年9月12日(2000.9.12)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/234,082
 (32)優先日 平成12年9月20日(2000.9.20)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW
- (72)発明者 ハーマン, ジョン エル.
 アメリカ合衆国 コネチカット 06437,
 ギルフォード, バーンシュト レーン
 78
- (72)発明者 ボルドッジ, フェレンチ エル.
 アメリカ合衆国 コネチカット 06473,
 ノース ハイブン, ジャンセン レーン
 22
- (72)発明者 ミンスコフ, ステイシー
 アメリカ合衆国 コネチカット 06903,
 スタンフォード, フェアウェイ ドライブ
 57
- (72)発明者 ジェファース, マイケル
 アメリカ合衆国 コネチカット 06405,
 ブランフォード, フラックス ミル
 ホロウ 14

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB14 BB20 BB50
BB51 CB01 DA13 DA36 FB02
FB03 FB05 FB07 FB08
4B024 AA01 AA11 BA03 BA63 CA04
CA09 GA11 HA01 HA14 HA15
HA17
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ43
QR55 QR62 QS34
4B064 AG13 AG27 CA19 CC24 DA01
DA05 DA06 DA07
4B065 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17
BA01 BA08 BA22 BA23 DB55
DB57 DB60 MA01 NA14 ZA012
ZA402 ZA532 ZA542 ZA552
ZB022 ZB052 ZB082 ZB092
ZB112 ZB212 ZB222 ZB262
4C085 AA13 AA14 CC32 DD62 EE01
GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA40
ZA53 ZA54 ZA55 ZB02 ZB05
ZB08 ZB09 ZB11 ZB21 ZB22
ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40
DA20 DA50 DA76 EA21 EA22
EA27 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	编码生长因子多肽和生长因子多肽的核酸		
公开(公告)号	JP2003511030A	公开(公告)日	2003-03-25
申请号	JP2001528589	申请日	2000-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	シムケッツリチャードエイ リシェンスタインヘンリー ハーマンジョンエル ボルドッジフェレンチエル ミンスコフステイシー ジェファースマイケル		
发明人	シムケッツ, リチャード エイ. リシェンスタイン, ヘンリー ハーマン, ジョン エル. ボルドッジ, フェレンチ エル. ミンスコフ, ステイシー ジェファース, マイケル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/485 C07K14/49 C07K14/51 C07K14/52 C07K16/18 C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/18 C12N15/19 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/49 C07K14/51 C07K14/52		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00.105 A61P43/00.107 A61P43/00.111 C07K14/485 C07K14/49 C07K14/51 C07K16/18 C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/02.H C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.N G01N33/566 G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.E A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA03 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS34 4B064/AG13 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA06 4B064/DA07 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DB55 4C084/DB57 4C084/DB60 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA402 4C084/ZA532 4C084/ZA542 4C084/ZA552 4C084/ZB022 4C084/ZB052 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C084/ZB222 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA40 4C086/ZA53 4C086/ZA54 4C086/ZA55 4C086/ZB02 4C086/ZB05 4C086/ZB08 4C086/ZB09 4C086/ZB11 4C086/ZB21 4C086/ZB22 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA20 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		

优先权 60/158083 1999-10-07 US
 60/159231 1999-10-13 US
 60/174485 2000-01-04 US
 60/186707 2000-03-03 US
 60/188250 2000-03-10 US
 60/223879 2000-08-08 US
 09/662783 2000-09-12 US
 60/234082 2000-09-20 US

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明部分地基于发现编码用于骨形态发生蛋白-1 (BMP-1)，血管内皮生长因子 (VEGF-E) 和血小板衍生的生长因子 (PDGF) 的多肽的核酸。本文所述的核酸，多核苷酸，蛋白质和多肽或其片段统称为FCRTX核酸和FCRTX多肽。一方面，本发明提供了分离的FCRTX多肽或FCRTX多肽的片段。

序号	组织名称	相对表达 (%)		
		Ag33	Ag66	Ag168
1	内皮细胞	1.66	1.23	0.00
2	内皮细胞 (0.5)	2.80	1.51	0.00
3	胰腺	36.33	28.72	37.89
4	胰腺 ca. CAPAN 2	1.03	0.46	0.00
5	胰腺	10.37	30.57	54.34
6	前列腺	100.00	100.00	0.00
7	前列腺	20.45	8.19	1.42
8	前列腺	6.52	6.75	0.19
9	前列腺	5.83	4.01	0.00
10	肺 (腺泡)	2.16	2.32	0.00
11	肺 (腺泡)	3.54	2.66	0.00
12	肺 (腺泡)	1.29	0.85	0.05
13	肺 (腺泡)	1.30	1.02	0.00
14	肺 (腺泡)	3.26	1.88	0.00
15	肺 (腺泡)	42.93	37.11	46.98
16	肺 (腺泡)	2.05	0.00	0.00
17	肺 (腺泡)	0.39	0.25	0.00
18	肺 (腺泡)	4.58	2.78	0.00
19	CNS ca. (glio/astro) U87-MG	0.00	0.00	0.00
20	CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	0.00	0.07	0.00
21	CNS ca. (astro) SW1783	1.94	1.49	0.00
22	CNS ca. (胶质, met) SK-N-AS	2.03	1.04	0.00
23	CNS ca. (astro) SF-539	0.32	0.13	0.00
24	CNS ca. (astro) SNB-75	5.29	5.26	0.00
25	CNS ca. (glio) SNB-19	3.35	3.64	0.03
26	CNS ca. (glio) U251	2.82	1.67	0.00
27	CNS ca. (glio) SF-295	82.36	53.59	100.00
28	心脏	14.66	13.55	1.42
29	心脏	1.29	0.96	0.00
30	心脏	1.23	0.69	0.00
31	心脏	6.04	2.78	0.00
32	心脏	2.24	1.78	0.00
33	心脏	5.79	3.74	0.03
34	心脏 (上行)	2.06	2.61	0.01
35	肾	24.66	26.06	15.07
36	小肠	5.95	5.11	0.02
37	结肠 ca. SW480	0.00	0.00	0.00
38	结肠 ca. (SW480 met)SW620	0.00	0.00	0.00
39	结肠 ca. HT29	0.00	0.02	0.00
40	结肠 ca. HCT-116	0.00	0.00	0.00
41	结肠 ca. Colo-2	0.01	0.03	0.00
42	结肠 ca. HCT-15	0.00	0.00	0.00
43	结肠 ca. HCC-2998	0.00	0.00	0.00