

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 520590

(P2003 - 520590A)

(43)公表日 平成15年7月8日(2003.7.8)

| (51) Int.Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-コード [*] (参考) |
|--------------------------|-------|-----------------|---------------------------|
| C 1 2 N 15/09 | ZNA | A 0 1 K 67/027 | 2 G 0 4 5 |
| A 0 1 K 67/027 | | A 6 1 K 31/7088 | 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 31/7088 | | 35/12 | 4 B 0 3 3 |
| | 35/12 | 35/76 | 4 B 0 5 0 |
| | 35/76 | 39/395 | D 4 B 0 6 3 |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全221数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 553816(P2001 - 553816)

(86)(22)出願日 平成13年1月18日(2001.1.18)

(85)翻訳文提出日 平成14年7月19日(2002.7.19)

(86)国際出願番号 PCT/US01/01700

(87)国際公開番号 W001/053344

(87)国際公開日 平成13年7月26日(2001.7.26)

(31)優先権主張番号 60/176,898

(32)優先日 平成12年1月19日(2000.1.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/724,310

(32)優先日 平成12年11月28日(2000.11.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アムジェン インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320,
サウザンド オークス, ワン アムジェ
ン センター ドライブ

(72)発明者 ニューエン, ハン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91360,
サウザンド オークス, セント チャー
ルズ ドライブ 881, アパートメント
10

(74)代理人 弁理士 大塩 竹志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コンドロモジュリン I 関連ペプチド

(57)【要約】

本発明は、コンドロモジュリン I に構造的に関連するポリペプチドをコードする新規ポリヌクレオチド、ならびにその精製タンパク質自体に関する。本発明はまた、このポリペプチドを産生するためのベクター、宿主細胞、抗体および組換え法に関する。本発明の1つの局面は、コンドロモジュリン I 関連ペプチドを産生するプロセスであって、このポリペプチドを発現するのに適切な条件下で上記の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含するプロセスである。さらに、本発明は、これらおよび関連産物について治療、診断および研究の有用性を開示する。

ヒト ChM1rp

```

SEQ ID NO:1 50
GCAACTCCACCTCAGGAGTGGCTCTCTCAGTCCCTCAAGCAGGAGGA
70 90
GTACTGTGTGCTGAGAGAGACATGCGAAGAGATCTCCCGAGATTGCGA
SEQ ID NO:2 100
M A K N F E N C S
110 130 150
GACTGTCACCTTCCAAATGCGAGAGGCTTTTAAATCGAAGAAATATGTA
D C H I L N A B A P K S K K I C K
170 190 210
AFCRCHTAAAGATTGUGACTGGGCTTGGTATCCCTGGCCCTACTCTAA
S L R F I C G L V F S I L A L T L
210 230 250
TGTGCTGCTTGTGGGAGCAGAGCACTTGTGGCCGAGGATCCCAAAAA
I V L F T F G S K H F T P B V P K K
270 290 310
GCCATGACATGAGCACACTTCCACAGCAATGGAGAGAGAGAGAT
A Y D M E H T P Y S N G S K K K I
310 330 350
TTCATGTAATGATGCTGTGACCCAGACCTGGAATATTCAGAAAGCGAA
Y M E I D P V T R T R I F E S G
370 390 410
ATGGCCTGATGAAACATGGAATGTCGCACTTTAAAGCAAGATGAC
N G T D H T L E V R D F K R G Y T
410 430 450
GGCACTGCTTGTGGCTCTCAAAATGCTTATCAAACTGAGATTA
G I Y F V G L Q K C F I K T Q T K
470 490 510
AGTGAATCCCGAATTTCTGAAACCGAGAGAGAAATGAGTGAAGATG
V I D E F E S E P E E R I D E M E
510 530 550
AAATTACCAACACTTCTTGAACAGTCAGTAAITGGGTCGCCAGAGAA
S I T T T F F B Q S V I W V P A S
570 590 610
AAGCCATTTAAACCGAGATTTCTTAAATTCGAAATTTGGAGAT
K P I E N R D F L K N S K I L E I
610 630 650
TTCGATGAGGATGACCATGATGAGATCAATCCCACTTAATATCAGTT
C D N V T M Y W H I N P T L I S V
670 690 710
CTGAGTACAGACTTTGAGAGAGAGAGAGATTTCTGCTTCTCTGCG
S E L Q D F E R E G E D L H F P A
710 730 750
AACGAAAGAAAGGATGACAAAGAAAGCTGGGGGGTCCCTCAAGT
H E K K G I E Q N E Q R V V F Q V
770 790 810
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
K V E K T R R A R Q A S E E H L
810 830 850
CAATAAATGACTACTAATAATGAAATGAAATTTGATCCCACTGAGAT
P I N D Y T R N G I E F D P M L D

```

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：

(a) 配列番号1に示されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(c) (a)または(b)の相補体に中程度または高度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であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(d) (a)～(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項2】 単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：

(a) 配列番号2に示されるポリペプチドに少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1に示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1、(a)または(b)のヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1または(a)～(c)のヌクレオチド配列；

(e) (a)～(d)のいずれかの相補体に中程度または高度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であって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
および

(f)(a)～(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項3】 単離された核酸分子であって、該核酸分子は、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端切断および/またはN末端切断を有する配列番号2に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端切断およびN末端切断からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)～(e)のヌクレオチド配列；

(g) (a)～(f)のいずれかの相補体に中程度または高度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であって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
および

(h) (a)～(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項4】 請求項1、2または3に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】 請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】 真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】 原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】 ChMIRpポリペプチドを産生するプロセスであって、請求項5に記載の宿主細胞を該ポリペプチドを発現するのに適切な条件下で培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。

【請求項9】 請求項8に記載のプロセスによって産生された、ポリペプチド。

【請求項10】 請求項8に記載のプロセスであって、前記核酸分子は、ネイティブChMIRpポリペプチドについてのプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含み、該プロモーターは、該ChMIRpポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結されている、プロセス。

【請求項11】 請求項2に記載の単離された核酸分子であって、ここで、前記同一性パーセントが、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFitおよびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される、核酸分子。

【請求項12】 ChMIRpポリペプチドの活性または産生の候補インヒビターを同定するためのプロセスであって、該プロセスは、請求項5、6または7に記載の細胞を該候補インヒビターに曝露する工程、該細胞におけるChMIRpポリペプチドの活性または産生を測定する工程、および該候補インヒビターに曝露された細胞におけるChMIRp活性を該候補インヒビターに曝露されなかった細胞における活性と比較する工程を包含する、プロセス。

【請求項13】 ChMIRpポリペプチドの活性または産生の候補刺激因子を同定するためのプロセスであって、該プロセスは、請求項5、6または7に記載の細胞を該候補刺激因子に曝露する工程、該細胞におけるChMIRpポリペプチドの活性または産生を測定する工程、および該候補刺激

因子に曝露された細胞におけるChMIRp活性を該刺激因子に曝露されなかった細胞における活性と比較する工程を包含する、プロセス。

【請求項14】 配列番号2に示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15】 単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：

(a) 配列番号2に示される成熟アミノ酸配列であって、残基1で成熟アミノ末端を含み、必要に応じてさらに、アミノ末端メチオニンを含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2のオルソログのアミノ酸配列であって、そのコードされるポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2に示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、フラグメント；

(e) 配列番号2あるいは(a)~(c)の少なくとも1つに示されるいずれかのアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項16】 単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端切断および/またはN末端切断を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端切断およびN末端切断からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項17】 配列番号2の第276位のアミノ酸が、システイン、セリンまたはアラニンである、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項18】 配列番号2の第280位のアミノ酸が、システイン、セリンまたはアラニンである、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項19】 配列番号2の第281位のアミノ酸が、グルタミン酸またはアスパラギン酸である、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項20】 配列番号2の第285位のアミノ酸が、グリシン、プロリンまたはアラニンである、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項21】 配列番号2の第297位のアミノ酸が、アルギニン、リジン、グルタミンまたはアスパラギンである、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項22】 配列番号2の第300位のアミノ酸が、システイン、セリンまたはアラニンである、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項23】 配列番号2の第306位のアミノ酸が、システイン、セリ

ンまたはアラニンである、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項24】 配列番号2の第310位のアミノ酸が、バリン、イソロイシン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アラニンまたはノルロイシンである、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項25】 請求項1、2または3に記載の核酸分子によってコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項26】 請求項15に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、前記同一性パーセントが、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFitおよびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される、ポリペプチド。

【請求項27】 配列番号2のアミノ酸配列を含むペプチドで動物を免疫することによって産生された、抗体。

【請求項28】 請求項14、15または16に記載のポリペプチドを特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項29】 モノクローナル抗体である、請求項28に記載の抗体。

【請求項30】 配列番号2のアミノ酸配列を含むペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項31】 サンプル中のChMIRpの量を検出または定量する方法であって、ChMIRpポリペプチドを含むことが疑われるサンプルに請求項27、28または29に記載の抗h2520-109抗体またはそのフラグメントを接触させる工程、および該抗体またはフラグメントの結合を検出する工程を包含する、方法。

【請求項32】 少なくとも1つのポリペプチドを特異的に結合する選択的結合因子またはそのフラグメントであって、該ポリペプチドは、以下：

- (a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列；
 - (b) 配列番号2の少なくとも1つに示されるアミノ酸配列のフラグメント；
- および
- (c) (a)または(b)の天然に存在する改変体

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、
選択的結合因子。

【請求項33】 抗体またはそのフラグメントである、請求項32に記載の
選択的結合因子。

【請求項34】 ヒト化抗体である、請求項32に記載の選択的結合因子。

【請求項35】 ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項32に記
載の選択的結合因子。

【請求項36】 ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求
項32に記載の選択的結合因子。

【請求項37】 モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求
項32に記載の選択的結合因子。

【請求項38】 キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項32に
記載の選択的結合因子。

【請求項39】 CDRグラフト化抗体またはそのフラグメントである、請
求項32に記載の選択的結合因子。

【請求項40】 抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請
求項32に記載の選択的結合因子。

【請求項41】 可変領域フラグメントである、請求項32に記載の選択的
結合因子。

【請求項42】 FabフラグメントまたはFab'フラグメントである、
請求項41に記載の可変領域フラグメント。

【請求項43】 選択的結合因子またはそのフラグメントであって、配列番
号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する特異性を有する、少なくとも
1つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子。

【請求項44】 検出可能な標識が結合されている、請求項32に記載の選
択的結合因子。

【請求項45】 ChMIRPポリペプチドの生物学的活性をアンタゴナイ
ズする、請求項32に記載の選択的結合因子。

【請求項46】 疾患、状態または障害を、処置、予防または改善するため

の方法であって、請求項32に記載の選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項47】 配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって産生された、選択的結合因子。

【請求項48】 請求項14、15または16に記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項49】 請求項14、15または16に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項50】 前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、可溶化剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項49に記載の組成物。

【請求項51】 前記ポリペプチドが、配列番号2に示される成熟アミノ酸配列を含む、請求項50に記載の組成物。

【請求項52】 請求項14、15または16に記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項53】 水溶性ポリマーで共有結合的に改変されている、請求項52に記載のポリペプチド。

【請求項54】 請求項53に記載のポリペプチドであって、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項55】 請求項1、2または3に記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項56】 前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項55に記載の組成物。

【請求項57】 請求項1、2または3に記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項58】 異種アミノ酸配列に融合された請求項14、15または1

6に記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項59】 前記異種アミノ酸配列が、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項58に記載の融合ポリペプチド。

【請求項60】 ChMIRpポリペプチドレベルの減少から生じる哺乳動物における医学的状態を、処置、予防または改善するための方法であって、請求項14、15または16に記載のポリペプチドあるいは請求項1、2または3に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを、該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項61】 異常なレベルのChMIRpポリペプチドによって引き起こされるかまたはそれから生じる、被験体における病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) サンプル中の請求項14、15または16に記載のポリペプチドあるいは請求項1、2または3に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現の存在または発現量を決定する工程；および

(b) 正常な被験体または早期の被験体由来の生物学的サンプル、組織サンプルまたは細胞サンプルにおけるChMIRpポリペプチドのレベルを比較する工程であって、ここで、病理学的状態に対する感受性は、該ポリペプチドの発現の存在または発現量に基づく、工程を包含する、方法。

【請求項62】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適合性の膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞、

含み、ここで、該細胞は、請求項14、15または16に記載のポリペプチドを分泌し、そして該膜は、該タンパク質に対して透過性でありかつ該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項63】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適合性の膜；および

(b) 該膜内にカプセル化されたChMIRpポリペプチド

を含み、ここで、該膜は、該ポリペプチドに対して透過性である、デバイス。

【請求項64】 ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、
以下：

(a) 請求項14、15または16に記載のポリペプチドに化合物を接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該ポリペプチドの結合の程度を決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項65】 動物におけるポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項1、2または3に記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項66】 請求項1、2または3に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項67】 診断試薬であって、配列番号2に示されるアミノ酸配列、あるいはそれらの対立遺伝子改変体およびスプライス改変体を含む、それらのフラグメント、改変体またはホモログをコードする、検出可能に標識されたポリヌクレオチドを含む、診断試薬。

【請求項68】 前記標識されたポリヌクレオチドが、一本鎖cDNAである、請求項67に記載の診断試薬。

【請求項69】 生物学的サンプル中のChMIRP核酸の存在を決定するための方法であって、以下の工程：

(a) ChMIRP核酸を含むことが疑われる生物学的サンプルを提供する工程；

(b) 該生物学的サンプルに請求項84に記載の診断試薬を接触させる工程であって、該工程は、該診断試薬が、該生物学的サンプル中に含まれるh2520-109核酸とハイブリダイズする条件下で行う、工程；

(c) 該生物学的サンプル中のChMIRP核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションを検出する工程；および

(d) 該生物学的サンプルと該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルを、既知の濃度のChMIRP核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルと比較する工程、

を包含する、方法。

【請求項70】 組織サンプルまたは細胞サンプル中のChMIRp核酸の存在を決定するための方法であって、以下の工程：

(a) ChMIRp核酸を含むことが疑われる組織サンプルまたは細胞サンプルを提供する工程；

(b) 該組織サンプルまたは細胞サンプルに請求項68に記載の診断試薬を接触させる工程であって、該工程は、該診断試薬が、ChMIRp核酸とハイブリダイズする条件下で行う、工程；

(c) 該組織サンプルまたは細胞サンプル中のChMIRp核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションを検出する工程；および

(d) 該組織サンプルまたは細胞サンプルと該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルを、既知の濃度のChMIRp核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルと比較する工程、

を包含する、方法。

【請求項71】 前記ChMIRpポリヌクレオチド分子が、DNAである、請求項70または71に記載の方法。

【請求項72】 前記ChMIRpポリヌクレオチド分子が、RNAである、請求項70または71に記載の方法。

【請求項73】 ChMIRpポリペプチド活性のアンタゴニストであって、該アンタゴニストは、ChMIRpポリペプチドに対する特異性を有する、ChMIRp選択的結合因子、低分子、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびペプチドまたはそれらの誘導体からなる群より選択される、アンタゴニスト。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願)

本出願は、2000年11月28日に出願された米国特許出願第09/724,310号および2000年1月19日に出願された米国特許仮出願第60/176,898による優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、コンドロモジュリン-I (ChMIRpと呼ばれる)に関連する新規のポリペプチド、およびそのペプチドをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、ベクター、宿主細胞、選択結合因子(例えば、抗体)、およびChMIRpポリペプチドを産生する方法に関する。また、ChMIRpと関連する障害の診断および障害のための方法を含む、ChMIRpの使用のための方法を提供する。

【0003】

(発明の背景)

核酸分子の同定、クローニング、発現および操作における技術の進歩は、ヒトゲノムの解読に基づいた新規の治療の発見を大いに加速した。急速な核酸配列決定技術は、現在、空前の速度で配列情報を生じ得、そしてコンピューターを使用した分析と結び付いて、ゲノム全体への重複配列の組立ておよびポリペプチドコード領域の同定を可能にする。公知のアミノ酸配列のデータベースコンパイルに対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および/または構造の顕著な特徴に対する相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。改変体およびその誘導体を産生するための、核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療薬剤として使用するための産物に対して有利な特性を与え得る。

【0004】

過去10年にわたるゲノム研究におけるかなりの技術進歩にかかわらず、ヒト

ゲノムに基づく新規の治療薬剤の開発能力は、まだ大部分実現されていない。潜在的に有益なタンパク質治療薬剤をコードする多数の遺伝子、または治療分子について「標的」として作用し得るポリペプチドをコードする遺伝子が、組換えDNA技術を使用して同定されたが、哺乳動物のゲノムにおける多数の遺伝子の構造および機能は、まだ未知である。

【0005】

従って、本発明の目的は、診断または治療の利点を有する新規ポリペプチドおよび新規ポリペプチドをコードする核酸分子を同定することである。

【0006】

コンドロモジュリン - I (ChM - I) は、ウサギの培養された成長板軟骨細胞 (growth plate chondrocyte) のDNA合成を刺激する線維芽細胞成長因子 - 2 (FGF - 2) の存在下において、胎仔ウシ軟骨抽出物中のタンパク質成分として、最初に同定された。続いて、この成長刺激因子を単離し、そしてアミノ酸配列を決定した。このアミノ酸配列に基づいて、縮重プライマーを、ウシ遺伝子のフラグメントをクローニングするPCRに使用した。このDNAフラグメントを使用して、ウシ骨端軟骨mRNA中の1.7kbのバンドを同定し、次いで、このDNAフラグメントを使用して、ウシ骨端軟骨cDNAライブラリーからウシコンドロモジュリン - I 遺伝子を単離した。Hirakiら、Biochem. Biophys. Res. Com., 175: 971 - 974, 1999)。次いで、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびニワトリからのChM - I オーソログ (orthologs) が単離された；ヒトおよびウサギのオーソログの単離のために、それぞれ、Hirakiら、(Eur. J. Biochemistry, 260: 869 - 878, 1999) およびShukunami およびHiraki (Biochem. Biophys. Res. Com., 249: 885 - 890, 1998) を参照のこと。ChM - I が軟骨細胞によって発現されることが見出された (Hirakiら、Eur. J. Biochemistry, 260: 869 - 878, 1999)。

【0007】

CHO細胞におけるヒトChM - I 遺伝子の発現は、分泌成熟タンパク質が軟

骨抽出物から単離されたポリペプチドよりも大きいことを明らかにした (Hirakiら、Eur. J. Biochemistry, 260: 869-878, 1999)。このタンパク分解性プロセッシングはまた、ChM-Iウサギオルソログ (ortholog) がサルCOS細胞において発現された場合に実証された (ShukunamiおよびHiraki, Biochem. Biophys. Res. Com., 249: 885-890, 1998)。成熟タンパク質および前駆体タンパク質のアミノ酸配列のアラインメントは、成熟タンパク質配列が、前駆体形態に存在するREERアミノ酸配列の直後に始まることを明らかにした。ChM-I前駆体は、膜挿入に関与すると考えられる、そのアミノ末端の近傍の単一の疎水性領域を含有する。REER配列は、成熟形態の分泌を生じるタンパク分解性切断を媒介するプロセッシングシグナルとして作用する。このプロセッシングにより、タンパク質の大部分のアミノ末端部分が、軟骨細胞の細胞膜内に挿入されたままになる。従って、これらの結果は、ChM-Iがより大きな膜貫通前駆体タンパク質として発現され、このタンパク質が、カルボキシ末端成熟形態へと切断されてそして軟骨に沈着するというを示す (Suzuki, Biochem. Biophys. Res. Comm. 259: 1-7, 1999に概説される)。

【0008】

ChM-I mRNAの発現は、胚を発生しているヒトおよびウシの軟骨においてのみ検出されている。詳細には、高レベルの発現が、増殖している軟骨帯に存在する軟骨細胞において検出され、より低いレベルは、隣接する休止帯および上部過形成性帯に存在する軟骨細胞において検出された。識別可能な発現は、関節帯および下部石灰化過形成性帯に存在する軟骨細胞において検出されなかった。ChM-Iポリペプチドは、増殖帯、休止帯および上部過形成帯の軟骨小腔周囲間 (inter-territorial) 領域に局在化された (Hirakiら、Eur. J. Biochemistry, 260: 869-878, 1999)。

【0009】

ChM-Iポリペプチドは、FGF-2の存在下または非存在下で、ウサギ培

養成長プレートの軟骨細胞におけるDNAおよびプロテオグリカン合成を刺激し得る。ChM-Iは、ウシ頸動脈内皮細胞における増殖および管形態発生を阻害し(インビトロ)、そしてニワトリ絨毛尿膜アッセイ(インビボ)における毛細血管形成を阻害する(Hirakiら、Eur. J. Biochemistry, 260:869-878, 1999)。ChM-Iポリペプチドは、FGF-2と相乗作用して、培養増殖プレート軟骨細胞の軟質寒天コロニー形成を誘導する(Inoueら、Biochem. Biophys. Res. Com., 241:395-400, 1999)。一次骨芽細胞およびMC3T3-e1骨芽細胞様細胞は、ChM-Iで刺激された場合に増殖する(Moriら、FEBS Lett., 406:310-314, 1999)。

【0010】

従って、コンドロモジュリン(chondromodulin)-Iの同定は、骨格成分の発達の媒介に関与するプロセス(骨成長、軟骨形成および軟骨血管新生の阻害を含む)の良好な理解に至った。本明細書中に記載されるようなコンドロモジュリン-I関連遺伝子およびポリペプチドならびに他のコンドロモジュリン関連ポリペプチドの同定は、これらのプロセスの理解をさらに明確にし、そして骨格成分の分解および増加した血管新生に関与する病理学的状態のための治療の開発を促進する。

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、新規なセリン/スレオニンキナーゼファミリーおよびその使用に関する。より詳細には、本発明は、新規なChMIrp核酸分子およびコードされるポリペプチド、ならびにそれらの使用に関する。

【0012】

本発明は、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：

- (a) 配列番号1に示されるヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号2に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- (c) 中程度または高度なストリンジェント条件下で、(a)または(b)の

相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここでこのコードされるポリペプチドが、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(d) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0013】

本発明はまた、以下の群から選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する：

(a) 配列番号2に示されるポリペプチドに対して少なくとも約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であり、ここで、このポリペプチドは、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される様に、配列番号2に示されるコードされるポリペプチドの活性を有する；

(b) 配列番号1に示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子変異体またはスライスバリエーションをコードするヌクレオチド配列であり、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号2に示されるコードされるポリペプチドの活性を有する；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1のヌクレオチド配列、(a)、または(b)であり、ここで、このポリペプチドが、配列番号2に示されるコードされるポリペプチドの活性を有する；

(d) 配列番号1~2のいずれかに示される1~250アミノ酸残基の置換および/または欠損を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であり、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号2に示されるコードされるポリペプチドの活性を有する；

(e) 配列番号1のヌクレオチド配列、または少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)~(d)；

(f) 穏やかなまたは高度にストリンジェントな条件下において (a) ~ (e) のいずれかの相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号 2 に示されるコードされるポリペプチドの活性を有する ; ならびに

(g) (a) ~ (e) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【 0 0 1 4 】

本発明は、以下の群から選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子をさらに提供する :

(a) 少なくとも 1 つの保存的置換アミノ酸を有する、配列番号 2 に示されるポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号 2 に示されるポリペプチドの活性を有する ;

(b) 少なくとも 1 つの保存的挿入アミノ酸を有する、配列番号 2 に示されるポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号 2 に示されるポリペプチドの活性を有する ;

(c) 少なくとも 1 つの保存的欠損アミノ酸を有する、配列番号 2 に示されるポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号 2 に示されるポリペプチドの活性を有する ;

(d) C 末端および / または N 末端欠損を有する、配列番号 2 に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号 2 に示されるコードされるポリペプチドの活性を有する ;

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠損、C 末端欠損、および N 末端欠損からなる群から選択される、少なくとも 1 つの修飾を有する、配列番号 2 に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドが、配列番号 2 に示されるコードされるポリペプチドの活性を有する ;

(f) 少なくとも約 1 6 ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a) ~ (e) のヌクレオチド配列 ;

(g) 穏やかなまたは高度にストリンジェントな条件下において (a) ~ (f) のいずれかの相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで

、コードされるポリペプチドが、配列番号2に示されるコードされるポリペプチドの活性を有する；ならびに

(h) (a) ~ (e) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0015】

本発明はまた、以下の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を提供する：

(a) 残基1において成熟アミノ酸末端を含み、そしてさらにメチオニンアミノ末端を任意に含む、配列番号2に示される成熟アミノ酸配列；

(b) 配列番号2のオーソログに対するアミノ酸配列であり、ここで、このポリペプチドが、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であり、ここで、このポリペプチドは、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される様に、配列番号2に示されるコードされるポリペプチドの活性を有する；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む、配列番号2に示されるアミノ酸配列フラグメントであり、ここで、このポリペプチドが、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する；

(e) 配列番号2に示されるアミノ酸配列、または(a) ~ (e)の少なくとも1つに示されるアミノ酸配列の、対立遺伝子変異体またはスプライスバリエントのいずれかであるアミノ酸配列であり、ここで、このポリペプチドが、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する；

本発明は、以下の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をさらに提供する：

(a) 少なくとも1つの保存的置換アミノ酸を有する、配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドが、配列番号2に示されるポ

リペプチドの活性を有する；

(b) 少なくとも1つの挿入アミノ酸を有する、配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドが、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する；

(c) 少なくとも1つの欠損アミノ酸を有する、配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドが、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する；

(d) C末端および/またはN末端欠損を有する、配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、ここで、コードされるポリペプチドが、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠損、C末端欠損、およびN末端欠損からなる群から選択される、少なくとも1つの修飾を有する、配列番号2に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドが、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する；

前記パラグラフの(a)～(e)のポリペプチド配列を含む融合ポリペプチドもまた提供される。

【0016】

本発明はまた、本明細書中に示す単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示す組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、ならびにこの宿主細胞を培養する工程および必要に応じてこのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含するChMIRpポリペプチドを産生する方法を提供する。

【0017】

ChMIRpポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた本発明によって包含される。ChMIRp核酸分子は、発現および増加したレベルのChMIRpポリペプチド(これは、増加した循環レベルを含み得る)を可能にする様式で動物中に導入される。トランスジェニック非ヒト動物は好ましくは、哺乳動物である。

【0018】

本発明のChMIRpポリペプチドの誘導体もまた提供される。

【0019】

本発明中において、配列番号2のChMIRpポリペプチドの保存的または非保存的アミノ酸置換から生じる、ChMIRpのアナログが提供される。このようなアナログは、276位におけるアミノ酸が、システイン、セリン、またはアラニンからなる群から選択されるChMIRpポリペプチドを含み、280位におけるアミノ酸が、システイン、セリン、またはアラニンからなる群から選択されるChMIRpポリペプチドを含み、281位におけるアミノ酸が、グルタミン酸、またはアスパラギン酸からなる群から選択されるChMIRpポリペプチドを含み、285位におけるアミノ酸が、グリシン、プロリン、またはアラニンからなる群から選択されるChMIRpポリペプチドを含み、297位におけるアミノ酸が、アルギニン、リジン、グルタミン、またはアスパラギンからなる群から選択されるChMIRpポリペプチドを含み、300位におけるアミノ酸が、システイン、セリン、またはアラニンからなる群から選択されるChMIRpポリペプチドを含み、306位におけるアミノ酸が、システイン、セリン、またはアラニンからなる群から選択されるChMIRpポリペプチドを含み、そして310位におけるアミノ酸が、バリン、イソロイシン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アラニン、またはノルロイシンからなる群から選択されるChMIRpポリペプチドを含む。

【0020】

本発明のChMIRpポリペプチドに特異的に結合する能力のある抗体およびペプチドのような、選択的結合因子がさらに提供される。このような抗体およびペプチドは、反発性または拮抗性であり得る。

【0021】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチドまたは選択的結合因子を含有する薬学的組成物、および1つ以上の薬学的に受容可能な処方因子はまた、本発明によって含まれる。この薬学的組成物は、本発明の治療学的に有効量のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、ポリペプチド、核酸分子および選択的結合因子を使用する方法に関する。本発明はまた、膜内でカプセル化されるChMIRpポリペプチドを投与するためのデバイスを提供する

。

【0022】

本発明のChMIRpポリペプチドおよびこれらの生物学的に活性な変異体、アナログ、相同体およびフラグメントを治療および/または診断目的で使用して、異常なレベルのChMIRpポリペプチドから生じる状態または病理学状態に対する感受性を処置、予防および/または検出し得、この状態は、chondromodulinファミリーメンバーに対する宿主の過剰反応または骨格状態(例えば、骨粗鬆症および矮化)において頻繁に観察されるようなこれらのタンパク質によって制御される自己調節的な網様構造の欠乏、および脈管形成を含む病理学状態(癌、炎症性疾患(例えば、乾癬および肝硬変)ならびに脈管疾患(例えば、アテローム性動脈硬化症)、冠状動脈性心臓病および高血圧を含む)に關与する。

【0023】

本発明は、生物学的に活性なChMIRpポリペプチドおよび/または1つ以上のその生物学的に活性な変異体、フラグメント、相同体もしくは変異体、他の薬学的因子を単独でかまたは組み合わせてのいずれかによって、哺乳動物に異常なレベルのChMIRpポリペプチドから生じる疾患の処置、予防または回復について提供する。本発明はまた、このような障害/疾患を診断する方法、あるいはChMIRpポリペプチドおよび/または抗体および/または体液におけるChMIRp遺伝子の量および/または組織を用いることを含む、哺乳動物についてのこのような障害/疾患に対する感受性を提供する。本発明はまた、プローブとして本発明の核酸分子を使用して、ChMIRp遺伝子の変異から生じる障害/疾患を診断する方法を提供する。この動物は、好ましくは哺乳動物であり、さらに好ましくはヒトである。

【0024】

本発明はまた、ChMIRpポリペプチドの発現の際の分子の衝突を試験する方法を提供する。発現および変調(つまり、増加するまたは減少する)レベルのChMIRpポリペプチドはまた、本発明によって含まれる。1つの方法はインビボで核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、ChMI

r pポリペプチドの発現を調節する要素を含む核酸分子は動物に投与され得る。これらの方法の例としては、遺伝子治療およびアンチセンス療法が挙げられる。

【0025】

発現を調節し、そしてChM I r pポリペプチドのレベルを変調する（つまり、増加するまたは減少する）方法はまた、本発明によって含まれる。1つの方法は、ChM I r pポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、ChM I r pポリペプチドの発現を調節または変調する要素を含む核酸分子が投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるように、遺伝子治療、細胞治療およびアンチセンス療法が挙げられる。

【0026】

ChM I r pポリペプチドは、原発性ヒト腫瘍の広範囲においてかなり発現された。従って、存在するポリペプチドおよびその有用な核酸中間体は、バックグラウンドから形質転換された細胞を分化する際の有用性を示している。

【0027】

本発明の別の局面において、ChM I r pポリペプチドは、そのレセプターまたは結合パートナー（「ChM I r pレセプター」または「ChM I r p結合パートナー」）を同定するために使用され得る。種々の形態の「発現クローニング」は、タンパク質または補助因子に対するレセプターをクローン化するために広範囲に使用されている。例えば、SimonsenおよびLodish、Trends in Pharmacological Sciences、15：437～441、1994ならびにTartagliaら、Cell、83：1263～1271、1995を参照のこと。ChM I r pレセプターまたはChM I r p結合パートナーの単離は、ChM I r pポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストの同定または開発に有用である。

【0028】

本発明の他の局面において、ChM I r pポリペプチドは、その結合パートナー（ChM I r pレセプターまたは他のChM I r p補助因子のような「ChM I r p結合パートナー」）を同定するために使用され得る（Chienら、Pr

oc. Natl. Acad. Sci. USA、88:9578~9583、1991)。ChMIRp結合パートナーの単離は、ChMIRp活性化の新規アゴニストおよびアンタゴニストの同定または開発に有用である。

【0029】

このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性ChMIRpリガンド、抗h2520-109選択的結合因子（例えば、ChMIRp抗体およびその誘導体）、低分子、ペプチドもしくはChMIRpポリペプチドを結合する能力のあるその誘導体、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらのうちのいずれかは、1つ以上の疾患または障害（本明細書中に開示されるものを含む）の処置に有用であり得る。

【0030】

特定の実施形態において、ChMIRpポリヌクレオチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、またはその活性化を調整するようにChMIRpポリペプチドと相互作用する低分子量の分子であり得る。

【0031】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の表題は、組織的な目的のみのためであり、そして記載される内容を限定するようには解釈されるべきではない。本願において列挙される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される。

【0032】

（定義）

用語「ChMIRpをコードする核酸分子」は核酸分子またはポリヌクレオチドのことを呼び、これらは、配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むかまたは本質的にそれからなり、そして/または配列番号2に示されるポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたは本質的にそれからなる。関連した核酸分子は、配列番号1に示されるとおりのヌクレオチド配列に対して約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなるか、または配列番号2に示すとおりのポリペプチドに対しても約75パーセン

ト同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号1に示されるとおりのヌクレオチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるか、またはヌクレオチド配列は、配列番号2に示されるとおりのポリペプチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連した核酸分子は、配列番号2に示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有するポリペプチドをコードする。

【0033】

関連する核酸分子はまた、上記のChMIRp核酸分子のフラグメントを含み、このフラグメントは、少なくとも約10の連続するヌクレオチド、もしくは約15、もしくは約20、もしくは約25、または約50、もしくは約75、もしくは約100、もしくは約100より大きい連続するヌクレオチドである。関連する核酸分子はまた、上記のChMIRp核酸分子のフラグメントを含み、このフラグメントは、少なくとも約25のアミノ酸残基、または約50、もしくは約75、もしくは約100、もしくは約100より大きいアミノ酸残基のポリペプチドをコードする。関連する核酸分子はまた、配列番号2のポリペプチドに比較して、1~317アミノ酸残基の置換および/または欠失を含むか、または本質的にこれから構成されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。関連するFhmリガンド核酸分子は、本明細書に規定される中程度または高度にストリンジェントな条件下で、任意の上記の核酸分子とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むような分子を含む。好ましい実施形態では、関連する核酸分子は、中程度もしくは高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1に示される配列と、またはポリペプチド(このポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む)をコードする分子と、または上記の核酸フラグメントと、または上記に規定されるポリペプチドをコードする核酸フラグメントと、ハイブリダイズする配列を含む。関連する核酸分子が上記の核酸のいずれかの対立遺伝子改

変体またはスプライス改変体を含むこと、そして上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的な配列を含むことがまた理解される。

【0034】

用語「単離された核酸分子」とは、(1) 総DNAが供給源細胞から単離される場合に、これが天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質のうち少なくとも約50パーセントから分離された本発明の核酸分子、(2) 「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、(3) 天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、または(4) より大きなポリヌクレオチド配列の一部として、天然には存在しない本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、任意の他の混入核酸分子、またはその天然の環境において見出される他の混入物(これらは、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる)を実質的に含まない。

【0035】

本明細書中で使用される場合、用語「核酸」配列または核酸分子は、DNAまたはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン(pseudoisocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、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、イノシン、N6-イソ-ペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、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-メチルアデニン、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-マンノシルキューオシン(-D-mannosylqueosine)、5'

- メトキシカルボニル - メチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシブトキソシン (oxybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - 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、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、および 2, 6 - ジアミノプリン。

【0036】

用語「作動可能に連結された」は、隣接配列の配置方法をいうために本明細書中に使用される。ここで、このように記載される隣接配列は、その有用な機能を実行するように構成されるかまたは組立てられる。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、コード配列の複製、転写および/または翻訳をもたらし得る。例えば、プロモーターがコード配列の転写を指向し得る場合、このコード配列は、このプロモーターに作動可能に連結される。隣接配列は、正確に機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、翻訳されないが転写される介在配列は、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そして、このプロモーター配列はなお、このコード配列に「作動可能に連結された」とみなされ得る。

【0037】

用語「ChMIRpポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体上の所定の遺伝子座を占める、いくつかの可能性のある天然に存在する別の形態の遺伝子の1つをいう。

【0038】

用語「ChMIRpポリペプチドスプライス改変体」とは、核酸分子（通常RNA）をいう。この核酸分子は、RNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される。

【0039】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切であり、そして挿入され

た異種核酸配列の発現を、指示および/または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング(イントロンが存在する場合)のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0040】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子(例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス)をいうために使用される。

【0041】

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含有するように改変された場合に形質転換される。例えば、細胞は、それがそのネイティブな状態から遺伝的に改変される場合に形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、DNAの形質転換は、物理的に細胞の染色体に組み込むことにより細胞のDNAと組換わり得るか、複製されることなしにエピソームエレメントとして一過的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立的に複製し得る。DNAが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたとみなされる。

【0042】

用語「トランスフェクション」は、細胞による異種または外因性DNAの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性DNAが細胞膜内に導入された場合には「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、*Virology* 52:456, 1973; Sambrookら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories (Cold Spring Harbor Laboratories, New York, 1989); Davisら、*Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, 1986; および Chuら、*Gene* 13:197, 1981を参照のこと。このような技術を使用して、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入し得る。

【0043】

用語「形質導入」とは、通常はファージによる1つの細菌から別の細菌への遺伝子の移入をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および移入をいう。

【0044】

用語「宿主細胞」は、目的の選択された遺伝子を含むベクターによって、核酸配列で形質転換されたか、または形質転換され得、次いでそのベクターはこの細胞によって発現される、細胞をいうために使用される。この用語には、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。

【0045】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。

【0046】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ顕著に不一致のDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、または42 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである。Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1989); Andersonら、Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章、IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。

【0047】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度が影響される。他の薬剤は、非特異的および/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニル-ピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、 NaDodSO_4 、(SDS)、フィコール(ficoll)、デンハルト溶液、超音波処理されたサケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH6.8~7.4で実施される。しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHからほぼ独立する。Andersonら, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, 第4章, IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。

【0048】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、長さおよび塩基対の不一致程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって評価され得る：

$$T_m(\text{ }) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(G + C\%) - 600/N - 0.72(\text{ホルムアミド}\%)$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中でのナトリウムイオンのモル濃度であり、G+C%は、ハイブリッド中での(グアニン+シトシン)塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度を、1%の不一致毎に約1℃低下する。

【0049】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50～65 °Cでの0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムまたは37～50 °Cでの0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例示として、0.015 Mナトリウムイオン中での50 °Cという「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を可能にする。

【0050】

「高度に」ストリンジェントな条件と「中程度に」ストリンジェントな条件との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって認識される。例えば、0.015 Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長さのDNAの融解温度は、約71 °Cである。65 °Cで（同じイオン強度で）の洗浄を用いると、このことは、約6%の不一致を可能にする。より遠く関連した配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。

【0051】

約20ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブについての1 M NaCl*中での融解温度の良好な評価は、以下によって与えられる：

$$T_m = A - T \text{塩基対あたり} 2 \quad + \quad G - C \text{塩基対あたり} 4$$

* 6 × 塩クエン酸ナトリウム (SSC) 中でのナトリウムイオン濃度は、1 Mである。Suggsら, *Developmental Biology Using Purified Genes* 683頁, BrownおよびFox (編) (1981) を参照のこと。

【0052】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェンシー洗浄条件は通常、6 × SSC、0.1% SDS中でのそのオリゴヌクレオチドのT_mよりも0～5 °C低い温度においてである。

【0053】

用語「ChMIRpポリペプチド」とは、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および本明細書に記載される関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、以下が挙げられる：ChMIRpポリペプチド対立遺伝子改変体、ChMIRpポリペプチドアナログ、ChMIRpポリペプチドスプライス改変体、ChMIRpポリペプチド改変体、ChMIRpポリペプチドフラグメント、ChMIRpポリペプチド誘導體、置換改変体、欠失改変体、および/または挿入改変体、ChMIRp融合ポリペプチド、ならびにChMIRpポリペプチドオルソログ。

【0054】

用語「ChMIRpポリペプチドアナログ」とは、保存アミノ酸置換および非保存アミノ酸置換を有する配列番号2に示されるChMIRpアミノ酸配列に対して類似のアミノ酸配列を有する関連ポリペプチドをいう。

【0055】

用語「ChMIRpポリペプチドオルソログ(ortholog)」は、配列番号2に示されるChMIRpポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのChMIRpポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0056】

ChMIRpポリペプチドは、本明細書において定義されるように、成熟ポリペプチドであり得、これらのポリペプチドを調製する方法に依存して、アミノ末端のメチオニン残基を有してもよいし、有しなくてもよい。用語「ChMIRpポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2に示されるようなChMIRpポリペプチドの全長アミノ酸配列よりも少なく含むペプチドまたはポリペプチドをいう。このようなフラグメントは、例えば、アミノ末端での短縮化(truncation)、カルボキシ末端での短縮化、および/またはアミノ酸配列の内部欠失によって生じる。ChMIRpフラグメントは、選択的RNAスプライシングによってかまたはインビボでのプロテアーゼ活性によって生じ得る。

【0057】

用語「ChMIRpポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2に示されるようなChMIRpポリペプチドの全長アミノ酸配列よりも少なく含むポリペプチドをいう。このようなChMIRpフラグメントは、6個以上のアミノ酸長であり得、そして例えば、アミノ末端(リーダー配列を有するかまたは有さない)での短縮化、カルボキシル末端での短縮化および/またはアミノ酸配列からの1個以上の残基の内部欠失によって生じ得る。ChMIRpフラグメントは、選択的RNAスプライシングによってかまたはインビボでのプロテアーゼ活性によって生じ得る。ChMIRpポリペプチドの膜結合形態はまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮化および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸を含む。このようなChMIRpポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、ChMIRpポリペプチドに対する抗体を生成するために使用され得ることが理解される。

【0058】

用語「ChMIRpポリペプチド改変体」は、ChMIRpポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失、および/または付加を有するアミノ酸配列を含むChMIRpポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在するか、または、組換えDNA技術を用いて人工的に構築され得る。このようなChMIRpポリペプチド改変体は、この改変体をコードする対応する核酸分子から調製され得る。従って、この改変体は、配列番号1に示されるような野生型ChMIRpポリペプチドについてのDNA配列から改変されるDNA配列を有する。

【0059】

当業者は、ネイティブ(native)ポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。例えば、当業者は、生物学的活性を破壊するこ

となく変化され得る分子の適切な領域を予測し得る。当業者はまた、活性のためにかまたは構造のために重要であり得る領域が、生物学的活性を破壊することがないかまたはポリペプチドの構造に悪影響を及ぼすことのない保存的なアミノ酸置換を前提とし得ることさえ認識する。

【0060】

活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を予測するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を決定し得る。当業者には、保存されていないChMIRp分子の領域における変化が、ChMIRpポリペプチドの生物学的活性および/または構造にさほど不利に影響を与えるようではないことが公知である。当業者にはまた、比較的保存された領域においてさえ、化学的に類似のアミノ酸で、活性を維持ながら天然に存在する残基に代えて置換し得ることが公知である（保存的アミノ酸残基置換）。

【0061】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造 - 機能研究を再調査し得る。このような比較の観点において、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応するChMIRpポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、ChMIRpポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似のアミノ酸置換を、選択し得る。

【0062】

可能な場合、当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。このような情報の観点において、当業者は、ChMIRpポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。

なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。

【0063】

本発明のChMIRpポリペプチドアナログは、ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列を関連ファミリーのメンバーと比較することによって決定され得る。具体的なChMIRpポリペプチド関連ファミリーメンバーとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ヒトコンドロモデュリン(chondromodulin) I、マウスChMIRp、マウスコンドロモデュリンI、ラットコンドロモデュリンI、ウシコンドロモデュリンI、ウサギコンドロモデュリンI。この比較は、Pileupアライメント(Wisconsin GCG Program Package)または保存領域および非保存領域内の複数ファミリーメンバーとの等価(重複)比較を用いることによって達成され得る。

【0064】

図4で示されたように、ヒトChMIRpポリペプチド(配列番号2)の推定アミノ酸配列はマウスChMIRp、マウスコンドロモジュリン I、ラットコンドロモジュリン I、ウシコンドロモジュリン I、ヒトコンドロモジュリン I、ウサギコンドロモジュリン I(配列番号4~9)と整列される。他のChMIRpポリペプチドアナログは、これらの、または他の当業者に周知の方法を用いて、決定され得る。これらの重複配列は、さらなるChMIRpアナログを生じる保存的および非保存的なアミノ酸置換についてガイダンスを提供する。これらのはのアミノ酸置換は、天然に存在するまたは非天然であるアミノ酸からなると理解される。例えば、図4で示したように、これらの関連ポリペプチドの整列は、潜在的なChMIRpアナログが、配列番号2における第276番目の位置(図4では第296番目の位置)でSerまたはAla残基と置換されたCys残基、配列番号2における第280番目(図4では第300番目の位置)の位置でSerまたはAla残基と置換されたCys残基を有し得ること、または、配列番号2において第281番目の位置のグルタミン酸残基(図4では、第301番目の位置)がAsp残基で置換され得ることを示す。さらに、配列番号2において第285番目の位置にあるグリシン残基(図4では、第305番目の位置

）が、ProおよびAlaで置換され得、配列番号2において第297番目の位置にあるArg残基（図4においては、第317番目の位置）が、Lys、Gln、またはAsn残基で置換され得、配列番号2において第300番目の位置にあるCys残基（図4では、第320番目の位置）がSerまたはAla残基で置換され得、配列番号2において第306番目の位置にあるCys残基（図4では、第326番目の位置）は、SerまたはAla残基で置換され得、そして、配列番号2において第310番目の位置にあるVal残基（図4では、第330番目）がIle、Met、Leu、Phe、Ala、ノルロイシンで置換され得る。

【0065】

さらに、当業者は、各アミノ酸残基において唯一つのアミノ酸置換を含む試験変異体を生成し得る。変異体は、本明細書中に記載の活性アッセイを使用してスクリーニングされ得る。このような変異体を使用して、適切な変異体の情報を集め得る。例えば、破壊された変異体、所望しない還元がなされた変異体、または不適切な活性の変異体に生じる特定のアミノ酸に対する変化が発見された場合、このような変化を有する変異体は回避される。換言すると、このような慣習的な実験によって収集された情報に基づいて、当業者は、さらなる単独または他の変異の組み合わせのいずれかで置換が避けられるべきアミノ酸を容易に決定し得る。

【0066】

同等の性質において、このような変化を行う際に、アミノ酸のヒドロパシー指数（疎水性親水性指標）が考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて、ヒドロパシー指数を割り当てられている。疎水性親水性指標は、以下である：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン/シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；スレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リジン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）。

)。

【0067】

タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能を確認する際の、疎水性親水性アミノ酸指数の重要性は、当該分野において一般的に理解されている (Kyteら、1982, J. Mol. Biol. 157: 105-31)。特定のアミノ酸が類似の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに使用され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。疎水性親水性指標に基づいて変化を起こす際に、疎水性親水性指標が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。

【0068】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得ること(特に、本発明の場合のように、これらにより生成された生物学的機能が同等のタンパク質またはペプチドが、免疫学的な実施形態における使用において想定された場合に)もまた、当該分野において理解されている。

【0069】

米国特許第4,554,101号で、タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される場合に、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に相関することが記載されている。米国特許第4,554,101号で詳述されているように、以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられた: アルギニン(+3.0); リジン(+3.0); アスパラギン酸(+3.0 \pm 1); グルタミン酸(+3.0 \pm 1); セリン(+0.3); アスパラギン(+0.2); グルタミン(+0.2); グリシン(0); スレオニン(-0.4); プロリン(-0.5 \pm 1); アラニン(-0.5); ヒスチジン(-0.5); システイン(-1.0); メチオニン(-1.3); バリン(-1.5); ロイシン(-1.8); イソロイシン(-1.8); チロシン(-2.3); フェニルアラニン(-2.5); およびトリプトファン(-3.4)。

【0070】

類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。米国特許第4,554,101号はまたは、親水性に基く一次アミノ酸配列からエピトープの同定および調製を教示する。米国特許第4,554,101号に記載の方法を通して、当業者は所定のアミノ酸配列内からエピトープを同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープ領域」と呼ばれる。

【0071】

多数の科学刊行物が、アミノ酸分析からの、二次構造の推定およびエピトープの同定に充てられてきた。Chouら、1974, *Biochemistry* 13:222-45; Chouら、1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chouら、1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chouら、1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; およびChouら、1979, *Biophys. J.* 26:367-84を参照のこと。さらに、コンピュータプログラムが、タンパク質における抗原性部位およびエピトープコア領域の推定を補助するために利用可能である。実施例としては、Jameson-Wolf分析 (Jamesonら、*Comput. Appl. Biosci.*、4(1):181~186、1998およびWolfら、*Comput. Biosci.*、4(1):187~191、1988); PepPlotプログラム (Brutlagら、*CABS*、6:237~245、1990、およびWeinbergerら、*Science*、228:740~742、1985) およびタンパク質三次構造予測のための新規プログラム (Fetrowら、*Biotechnology*、11:479~483、1993) に基くプログラムが挙げられる。

【0072】

コンピュータプログラムが、二次構造の推定を補助するために、現在利用可能である。二次構造を推定する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%より大きな配列同一性または40%より大きな類似性を有する2つのポ

リペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース (PDB) の近年の成長は、二次構造 (ポリペプチドまたはタンパク質の構造における可能な折り畳みの数を含む) の増強された推定性を提供してきた。Holmら、1999, *Nucleic Acids Res.* 27: 244 - 47を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質において制限された数の折り畳みが存在すること、および一旦、臨界数の構造が解明されると、構造推定は劇的により正確となることが、示唆されてきた (Brennerら、1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 369 ~ 376)。

【0073】

二次構造を推定するさらなる方法は、「スレッディング (threading)」 (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7(3): 377 - 87; Sipplら、1996, *Structure* 4(1): 15 - 19)、 「プロフィール分析」 (Bowieら、1991, *Science*, 253: 164 ~ 170; Gribskovら、1990, *Methods Enzymol.* 183: 146 - 59; Gribskovら、1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84(3): 4355 ~ 4358)、 および「進化学的連鎖 (evolutionary linkage)」 (Holmら、前出、およびBrennerら、前出を参照のこと) を包含する。

【0074】

好ましい実施形態において、改変体は1 ~ 3、または1 ~ 5、または1 ~ 10、または1 ~ 15、または1 ~ 20、または1 ~ 25、または1 ~ 50、または1 ~ 75、または、1 ~ 100、または100以上のアミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸付加および/またはアミノ酸欠失を含み、ここでこの置換は、本明細書中で示したように、保存的であるか、もしくは非保存的であるか、またはこれらの任意の組合せである。さらに、これらの変異体は、カルボキシル末端またはアミノ末端においてアミノ酸残基の付加を有し得る (リーダー配列を有するか、またはそれらを有さない)。

【0075】

好ましいChMIRpポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および/または型が天然のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、ChMIRpポリペプチド改変体は、配列番号2に示されるアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型糖鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN結合型糖鎖を除去する。1つ以上のN結合グリコシル化部位(代表的に、天然に存在するグリコシル化部位)が排除され、そして1つ以上の新たなN連結部位が作製される、N結合型糖鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいChMIRpポリペプチド改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2に示されるアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、ChMIRpポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な立体構造へとリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には偶数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【0076】

用語「ChMIRp融合ポリヌクレオチド」は、異質ペプチドまたは異質ポリヌクレオチドとChMIRpポリペプチド、フラグメントおよび/またはこれらの改変体との融合を指す。異質ペプチドおよび異質ポリペプチドとしては以下が含まれるがこれらに限定されない: ChMIRp融合ポリペプチドの検出および/または単離が可能にするエピトープ; 膜貫通レセプタータンパク質またはその部分(例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン); 膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその部分; 触媒的に活

性である、酵素またはその部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2に示されるようなアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいはChMIRpポリペプチド改変体とは異なる治療活性を有する、ポリペプチド。

【0077】

さらに、ChMIRpポリペプチドは、それ自身またはフラグメント、改変体、もしくはこれらの誘導体に融合され得る。融合は、ChMIRpポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、なされ得る。融合は、リンカーもしくはアダプター分子を用いずに直接であってもよいし、リンカーもしくはアダプター分子（例えば、1つ以上の約20アミノ酸までのアミノ酸残基～約50アミノ酸までのアミノ酸残基）を介してであってもよい。リンカーまたはアダプター分子はまた、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼについての切断部位を有して設計されて、融合した部分の分離を可能にし得る。一旦構築されると、この融合ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

【0078】

本発明のさらなる実施形態において、フラグメント、改変体、および/または誘導体を含むChMIRpポリペプチドは、ヒトIgGのFc領域に融合する。抗体は、以下の2つの機能的に独立した部分を含む。この独立した部分は、抗原を結合する「Fab」として公知の可変ドメイン、ならびに補体活性化および食細胞による攻撃のようなエフェクター機能に關与する、「Fc」として公知の定常ドメインである。Fcは、長い血清半減期を有し、一方でFabは、短寿命である（Caponら、Nature 337:525~31, 1989）。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテイン結合、補体結合、および恐らく、胎盤移入のような機能さえも組み込み得る。同書。表Iは、当該分野（融合化ChMIRpポリペプチドの産生に適用可能な材料および方法を含む）において公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

【0079】

【表1】

表I
治療タンパク質とのFc融合物

| Fcの形態 | 融合パートナー | 治療の目的 | 参考文献 |
|---|------------|-------------------------------|--|
| IgG1 | CD30-LのN末端 | ホジキン病; 未分化リンパ腫; T細胞白血病. | 米国特許第 5,480,981号 |
| マウス Fcγ2a | IL-10 | 抗炎症; 移植片拒絶 | Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600 |
| IgG1 | TNFレセプター | 敗血症性ショック | Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30 |
| IgG, IgA, IgM, またはIgE (炭水化物を 除く) | TNFレセプター | 炎症, 自己免疫障害 | 米国特許第 5,808,029号 (1999年9月15日出版) |
| IgG1 | CD4レセプター | AIDS | Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31 |
| IgG1, IgG3 | IL-2のN末端 | 抗癌、抗ウイルス | Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105 |
| IgG1 | OPGのC末端 | 変形性関節症; 骨密度 | WO 97/23614 (1997年7月2日出版) |
| IgG1 | レプティンのN末端 | 抗肥満 | PCT/US 97/23183, (1997年12月11日出版) |
| ヒト IgG1 | CTLA-4 | 自己免疫障害 | Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69 |

一つの例において、ヒトIgGヒンジ領域、CH2およびCH3領域は、当業者に公知の方法を使用して、ChMIRpポリペプチドのN末端またはC末端のいずれかに融合され得る。別の例として、ヒンジの部分領域ならびにCH2領域およびCH3領域は、融合され得る。得られるChMIRpFc-融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって精製され得る。Fc領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、融合されていない対応物よりもインビボで実質的に長い半減期を示すことが見出された。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化/多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または特定の質(例えば、治療的質、循環時間、凝集の減少など)を改善するために変更され得る。

【0080】

用語「ChMIRpポリペプチド誘導体」とは、ChMIRpポリペプチド、

改変体、またはこれらフラグメントをいい、これは、例えば、1つ以上の水溶性ポリマー、N結合型炭水化物、O結合型炭水化物、糖、リン酸、および/または他のこのような分子の共有結合によって、化学的に修飾されている。このような修飾は、精製タンパク質または粗タンパク質の標的アミノ酸残基を有機誘導体化剤（選択した側鎖または末端残基と反応し得る）と反応させることによって分子中に導入され得る。得られた共有誘導体は、また、生物学的活性について重要な残基を同定することを指向するプログラムにおいて有用である。この誘導体は、ChMIRpポリペプチドに結合した分子の型または位置のいずれかの点で、天然に存在するChMIRpポリペプチドとは異なる様式で改変される。誘導体はさらに、ChMIRpポリペプチドに天然に結合された1つ以上の化学基の欠失を含む。

【0081】

例えば、ポリペプチドは、1つ以上のポリマー（水溶性ポリマー、N結合型炭水化物、O結合型炭水化物、糖、リン酸、および/または他のこのような分子が挙げられるがこれらに限定されない）の共有結合によって改変され得る。例えば、選択されるポリマーは、典型的には水溶性であり、その結果、そのポリマーに連結されているタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的環境）下で沈殿しない。このポリマーは、任意の分子量であり得、そして分枝されていても分枝されていなくてもよい。ポリマーの混合物が、ChMIRpポリペプチドポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終生成物の調製物の治療的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0082】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ポリエチレン、グリコール（PEG）、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約6kDのデキストラン））、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-（N-ビニルピロリジン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびビニルアルコール。共有結

合したChMIRpポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性PEG架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【0083】

アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有する。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有する。例えば、反応性アルデヒド、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであり、これは、水溶性、またはモノ $C_1 - C_{10}$ アルコキシもしくはそのアリアルオキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

【0084】

ChMIRpポリペプチドのペギル化(pegylation)は、当該分野で公知の任意のペギル化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Francisら, 1992, Focus on Growth Factors 3:4-10; 欧州特許第0154316号および0401384号; ならびに米国特許第4,179,337号。例えば、ペギル化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子(または、類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。ポリエチレングリコール(PEG)は、本明細書中での使用に適切な水溶性ポリマーである。本明細書中で使用される場合、用語「ポリエチレングリコール」および「PEG」は、タンパク質(モノ($C_1 - C_{10}$)アルコキシポリエチレングリコールまたはアリアルオキシポリエチレングリコールを含む)を誘導化するのに使用されるPEGの任意の形態を含むことを意味する。

【0085】

一般に、化学誘導体化は、生物学的に活性な基質を活性化ポリマー分子と反応させるために使用される任意の適切な条件下で行われ得る。ペギル化ポリペプチドの化学誘導体を調製するための方法は、一般に、以下の工程を包含する：(a) ChMIRpポリペプチド改変体が、1つ以上のポリマー分子に結合されるような条件下で、ポリペプチドを、活性化したポリマー分子(例えば、ポリマー分

子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体)と反応させる工程、および(b)反応生成物を得る工程。一般に、最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子：タンパク質の比が大きいくほど、結合されるポリマー分子の割合は大きくなる。1つの実施形態において、ChMIRpポリペプチド誘導体は、そのアミノ末端で単一のポリマー分子部分を有し得る(例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと)。

【0086】

一般に、本発明のChMIRpポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る状態は、本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示されるChMIRpポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強または減少した生物学的活性、または他の特性(例えば、増加または減少した半減期)を有し得る。

【0087】

用語「生物学的に活性なChMIRpポリペプチド」、「生物学的に活性なChMIRpポリペプチドフラグメント」、「生物学的に活性なChMIRpポリペプチド改変体」、および「生物学的に活性なChMIRpポリペプチド誘導体」とは、少なくとも1つのChMIRpポリペプチドの活性特徴を有するChMIRpポリペプチドをいう。ChMIRpポリペプチドの免疫原性フラグメントは、このChMIRpフラグメントに対して惹起される抗体を宿主動物に誘導し得るフラグメントである。

【0088】

「天然に存在する」または「ネイティブの」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的物質と関連して使用される場合、天然において見出され、そしてヒトによって操作されていない物質をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」は、本明細書中で使用される場合、天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成された物質をいう。

【0089】

用語「単離されたポリペプチド」とは、(1)供給源細胞から単離される場合

に、天然で一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50%から分離された本発明のポリペプチド、(2)「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に(共有結合的もしくは非共有結合的相互作用によって)連結しない、本発明のポリペプチド、(3)天然には連結しないポリペプチドに(共有結合的もしくは非共有結合的相互作用によって)作動可能に連結する、本発明のポリペプチド、または(4)天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、任意の他の混入ポリペプチドまたはその天然の環境において見出される他の混入物(これは、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる)を実質的に含まない。

【0090】

用語「成熟ChMIRpポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したポリペプチドをいい、そして、成熟ChMIRpポリペプチドはまた、ポリペプチドの他の改変(例えば、アミノ末端(リーダー配列を有するかまたは有さない)および/またはカルボキシ末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N結合型および/またはO結合型グリコシル化など)を含み得る。

【0091】

用語、「ムテイン」は、ChMIRpポリペプチドの変異体タンパク質、ポリペプチド、改変体、アナログまたはフラグメントをいう。ChMIRpのムテインは、欠失、挿入、置換、点変異、短縮化、付加、転位、PCR増幅、部位特異的変異誘発、または当該分野で公知の他の方法によって調製され得る。

【0092】

用語「有効量」および「治療有効量」とは、意義ある患者利益(すなわち、処置、治癒、予防、または状態の緩和)をもたらすために、上記のChMIRpポリペプチドの1つ以上の生物学的活性のレベルの観察可能な変化を支持するために必要なChMIRpポリペプチド(またはChMIRpアンタゴニスト)の量をいう。個々の活性成分について適用する場合、用語、単独で投与されるとは、その成分が単独であることをいう。組合せに適用される場合、この用語は、続け

てか、または同時に、組合せて投与した場合、治療効果を生じる活性成分の組合せた量をいう。本発明を実施する際に用途を有するChMIRpポリペプチドは、天然に存在する全長ポリペプチド、または短縮化ポリペプチドまたは改変相同体またはアナログまたは誘導体またはペプチドフラグメントであり得る。例示的アナログとしては、2つの種の間1つ以上の互いに異なるアミノ酸が別の種由来の互いに異なるアミノ酸で置換されるものが挙げられる。互いに異なるアミノ酸はまた、任意の他のアミノ酸（これが保存的アミノ酸であっても、非保存的アミノ酸であっても）で置換され得る。

【0093】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのChMIRpポリペプチド、ChMIRp核酸分子、またはChMIRp選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な1つ以上の処方物質をいう。

【0094】

用語「選択的結合因子」は、ChMIRp分子に特異性を有する分子をいう。選択的結合因子としては、抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）、キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、可溶性形態もしくは結合形態で標識され得る抗体に対する抗イデオタイプ（抗Id）抗体）、ならびに公知の技術（酵素学的切断、ペプチド合成、または組換え技術を含むが、これらに限定されない）によって提供されるそのフラグメント、領域、または誘導体が挙げられる。本発明の抗ChMIRp選択的結合因子は、例えば、ChMIRp分子の一部を結合し得、これは、ChMIRp分子のChMIRpレセプターへの結合を阻害する。

【0095】

本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子が、ヒトChMIRpポリペプチドに結合し、かつヒト非ChMIRpポリペプチドに結合する能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、ChMIRpポリペプチドのオルソログ（すなわち、ChMIRpポリペプチドの種間型（例えば、マウスChMIRpポリペプチドおよびラットChMIRpポリペプ

チド))に結合し得ることが、理解される。好ましい実施形態は、ChM I r pポリペプチドに対して高度に特異的である抗体が、非ChM I r pポリペプチドに対して特異的に交差反応しない(すなわち、これらは結合しない)ことに関する。

【0096】

用語「抗原」は、選択的結合因子(例えば、抗体)により結合され得る分子または分子の一部であって、そしてさらに、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を動物に産生させ得る、分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。上記に参照される特異的な結合反応は、抗原が、高い選択的な様式でこの対応する抗体と反応し、他の抗原によって惹起され得る多数の他の抗体とは反応しないことを示すことを意味する。

【0097】

ChM I r pポリペプチド、フラグメント、改変体、および誘導体は、当該分野で公知の方法を用いてChM I r p選択的結合因子を調整するために使用され得る。従って、ChM I r pポリペプチドに結合する抗体および抗体フラグメントは、本発明の範囲内である。抗体フラグメントとしては、ChM I r pポリペプチドのエピトープに結合する抗体の一部が挙げられる。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって生成されるFabフラグメントおよびF(a b')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術(例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現)によって生成されるフラグメントが挙げられる。これらの抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、ポリクローナル一重特異的なポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、単鎖抗体、および二重特異的抗体であり得る。

【0098】

(核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野では、「同一性」はまた、ポリペプチド配列または核酸分子配列の

間の配列関連性の程度（この場合、おそらく、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列のストリングの間的一致により決定されるような）を意味する。「同一性」は、特定の算術モデルのコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって位置付けられた、ギャップ整列を有する2つ以上の配列の間の同一性一致のパーセントを測定する。

【0099】

用語「類似性」は、概念に関するが、「同一性」とは対照的に、同一による一致および保存的置換の一致の両方を含む類似性の基準をいう。関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology、Lesk, A.M. 編、Oxford University Press、New York、1988；Biocomputing: Informatics and Genome Projects、Smith, D.W. 編、Academic Press、New York、1993；Computer Analysis of Sequence Data、Part 1、Griffin, A.M. および Griffin, H.G. 編、Humana Press、New Jersey、1994；Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje, G.、Academic Press、1987；ならびに Sequence Analysis Primer、Gribskov, M. および Devereux, J. 編、M. Stockton Press、New York、1991）；ならびに Carillo および Lipman、SIAM J. Applied Math., 48:1073、1998 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。保存的置換が、ペプチドに適用され、そして核酸分子に適用されない場合、類似性は、ペプチド配列の比較のみに関係する。次いで、2つのポリペプチド配列が、例えば10/20の同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、パーセント同一性および類似性は、どちらも50%である。同じ例において、保存的置換であるさらに5つの位置が存在する場合、パーセント同一性は50%のままであるが、パーセ

ント類似性は75%(15/20)である。したがって、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド配列間の類似性の程度は、これらの2つの配列間のパーセント同一性よりも高い。

【0100】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology(A.M.Lesk編、Oxford University Press 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects(D.W.Smith編、Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data(Part 1, A.M.GriffinおよびH.G.Griffin編、Humana Press 1994); G.von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology(Academic Press 1987); Sequence Analysis Primer(M.GribskovおよびJ.Devereux編、M.Stockton Press 1991); ならびにCarilloら、1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073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。

【0101】

この核酸配列における差異は、配列番号2のアミノ酸配列に関連するアミノ酸配列の、保存的改変および/または非保存的改変を生じうる。

【0102】

用語「保存的アミノ酸置換」は、その位置でアミノ酸残基の極性または電荷にほとんど影響がないかまたは影響がないような、天然のアミノ酸残基の非天然の残基での置換をいう。例えば、保存的置換は、ポリペプチド中の非極性残基の他の任意の非極性残基での置換の結果生じる。さらに、「アラニンスキャニング変異誘発」として上記されたように、ポリペプチド中の任意の天然の残基をまた、アラニンで置換し得る。アミノ酸置換についての一般的規則を、以下の表IIに

示す。

【0103】

(表II)

【0104】

【表2】

| <u>アミノ酸置換</u> | | |
|---------------|--------------------------|---------------|
| <u>元の残基</u> | <u>例示的な置換</u> | <u>好ましい置換</u> |
| Ala | Val, Leu, Ile | Val |
| Arg | Lys, Gln, Asn | Lys |
| Asn | Gln | Gln |
| Asp | Glu | Glu |
| Cys | Ser, Ala | Ser |
| Gln | Asn | Asn |
| Glu | Asp | Asn |
| Gly | Pro, Ala | Ala |
| His | Asn, Gln, Lys, Arg | Arg |
| Ile | Leu, Val, Met, Ala, Phe, | Leu |
| Leu | Norleucine, Ile, Val, | Leu |
| Lys | Arg, 1,4 Diaminobutyric | Arg |
| Met | Leu, Phe, Ile | Leu |
| Phe | Leu, Val, Ile, Ala, Tyr | Arg |
| Pro | Ala | Gly |
| Ser | Thr, Ala, Cys | Thr |
| Thr | Ser | Ser |
| Tyr | Tyr, Phe | Tyr |
| Tyr | Trp, Phe, Thr, Ser | Phe |
| Val | Ile, Met, Leu, Phe, Ala, | Leu |

このアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対応する改変）は、天然に存在するChMIRPのものに類似した機能的特徴および化学的特徴を有するChMIRPを生成すると予想される。対照的に、ChMIRPの機能的特徴および/または化学的特徴における実質的な改変は、(a)この置換の領域における分子の骨格の構造（例えば、シート構造またはヘリックス構造）、(b)この標的部位での分子の電荷または疎水性、あるいは(c)この側鎖のバルクを維持するその効果において、有意に異なる置換を選択することによって達成され得る。天然に存在する残基は、一般的な側鎖の属性に基づいて、以下の分類に分けられ得る：

- 1) 疎水性 : Met、Ala、Val、Leu、Ile ;
- 2) 中性親水性 : Cys、Ser、Thr、Asn、Gln ;
- 3) 酸性 : Asp、Glu ;
- 4) 塩基性 : His、Lys、Arg ;
- 5) 鎖の方向に影響する残基 : Gly、Pro ; および
- 6) 芳香族 : Trp、Tyr、Phe。

【0105】

非保存的置換は、これらの分類の1つのメンバーの、別の分類からのメンバーとの交換を含み得る。このような置換される残基を、非ヒトChMIRPに相同なヒトChMIRP分子の領域中に、またはこの分子の非相同な領域中に導入し得る。

【0106】

保存的なアミノ酸置換はまた、生物学的系における合成よりむしろ化学的なペプチド合成によって典型的に取り込まれる、非天然に存在するアミノ鎖残基を含む。これらは、ペプチド模倣物 (peptidomimetics) ならびにアミノ酸成分の反対または逆の他の形態を含む。

【0107】

同一性および/または類似性を決定するための好ましい方法を、試験される配列間の最大の適合を与えるように設計する。同一性および類似性を決定するための方法は、公に入手可能なコンピュータープログラムに体系化される。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータープログラムとしては、GAP (Devereuxら、Nucleic Acids Research 12(1):387、1984); Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、WI)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Atschulら、J. Molec. Biol. 215:403-410、1990) を含むGCGプログラムパッケージが挙げられるが、これに限定されない。このBLAST Xプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源

(BLAST Manual、Altschulら、NCB NLM NIH Bethesda、MD 20894; Altschulら、J. Molec. Biol. 215:403-410、1990)から公に入手可能である。十分に公知のSmith Watermanアルゴリズムをまた、同一性を決定するために使用し得る。

【0108】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定の整列スキームは、2つの配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの整列された小領域は、2つの全長配列の間に重大な関連性がない場合でさえ、非常に高い配列の同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態においては、この選択された整列方法(GAPプログラム)は、特許請求されるポリペプチドの、少なくとも50の連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0109】

例えば、コンピューターアルゴリズムGAP(Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、WI)を使用して、配列の同一性の割合が決定されるべき2つのポリペプチドを、それぞれのアミノ酸の最適な適合(このアルゴリズムによって決定されるような「適合範囲」)のために整列する。ギャップ開始ペナルティー(不利益)(平均ダイアゴナル(diagonal)×3として計算する;この「平均ダイアゴナル」は、使用される比較マトリックスのダイアゴナルの平均であり;この「ダイアゴナル」は、特定の比較マトリックスによって完全なアミノ酸の各適合に割り当てられるスコアまたは数である)およびギャップ拡張ペナルティー(通常、ギャップ開始ペナルティーの1/10倍)、ならびにPAM 250またはBLOSUM 62のような比較マトリックスを、このアルゴリズムと共に使用する。標準的な比較マトリックス(PAM250比較マトリックスに関してはDayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure、vol.5、補遺3、1978中に、BLOSUM 62比較マトリックスに関してはHenikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:10915-10919、1992を

参照のこと。)はまた、このアルゴリズムによって使用される。

【0110】

ポリペプチド配列の比較のために好ましいパラメーターとしては、以下：

アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch、J.Mol.Biol. 48：443-453、1970、

比較マトリックス：HenikoffおよびHenikoff、Proc.Natl.Acad.Sci USA、89：10915-10919、1992からBLOSUM 62；

ギャップペナルティー：12

ギャップ長ペナルティー：4

類似性の閾値：0

が挙げられる。

【0111】

このGAPプログラムは、これら上記のパラメーターと共に有用である。これら前述のパラメーターは、このGAPアルゴリズムを使用したポリペプチドの比較のためのデフォルトパラメーター（末端ギャップのためのペナルティーを有さない）である。

【0112】

核酸分子配列の比較のための好ましいパラメーターとしては、以下：

アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch、J.Mol.Biol. 48：443-453、1970；

比較マトリックス：適合 = +10、不適合 = 0

ギャップペナルティー：50

ギャップ長ペナルティー：3

が挙げられる。

【0113】

このGAPプログラムはまた、これら上記のパラメーターと共に有用である。これら上記のパラメーターは、核酸分子の比較のためのデフォルトパラメーターである。

【0114】

Program Manual、Wisconsin Package、Version 9 (1997年9月)中に示されるものを含む、他の例示的なアルゴリズム、ギャップ開始ペナルティー、ギャップ拡張ペナルティー、比較マトリックス、類似性の閾値などは、当業者によって使用され得る。なされるべき特定の選択は、なされるべき特定の比較(例えば、DNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNA)に依存し;そしてさらに、この比較が、配列の間(この場合、GAPまたはBestFitが一般的に好ましい)であるかまたは1つの配列と大きい配列のデータベースとの間(この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい)であるかに依存する。

【0115】

(合成)

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子は、組換えおよび他の手段によって産生され得ることは、当業者によって理解される。

【0116】

(核酸分子)

ChMIRPポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の様式(化学合成、cDNAもしくはゲノムのライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および/またはcDNAのPCR増幅が挙げられるが、これらに限定されない)で容易に得られ得る。

【0117】

本明細書中において使用される組換えDNA法は、一般に、Sambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)および/またはAusubelら編(Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. およびWiley and Sons 1994)に記載されているがこれらに限定されない。

【0118】

本発明は、本明細書中に記載されるような核酸分子およびこの分子を得るための方法を提供する。「ChMIRpポリペプチド」またはそのフラグメントをコードする遺伝子またはcDNAは、ゲノムライブラリーもしくはcDNAライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングによってかまたはPCR増幅によって、得られ得る。ハイブリダイゼーションによって、ライブラリーをスクリーニングするために有用なプローブまたはプライマーは、例えば、保存された部位のような、同じまたは関連したファミリーの遺伝子由来の他の既知の遺伝子または遺伝子フラグメントについての配列情報に基づいて、作製され得る。

【0119】

ChMIRpポリペプチドをコードする遺伝子が、1つの種から同定される場合、その遺伝子の全てまたは部分が、他の種（オルソログ）から対応する遺伝子または同一種（ホモログ）から関連した遺伝子を同定するために、プローブとして使用され得る。このプローブまたはプライマーは、ChMIRp遺伝子を発現すると考えられている種々の組織供給源からcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。

【0120】

さらに、配列番号1に示されるような配列を有する核酸分子の部分または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、ChMIRpをコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的に、中程度または高いストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用されて、このスクリーニングから得られる誤った陽性の数を最小にする。ChMIRpをコードするcDNAの有効性またはその機能は、ゲノムDNAを得るための必要条件である。ストリンジェントな条件下で、DNAライブラリーはスクリーニングされ、そして、得られたクローンを調査して、これらが、コード領域に加えて、遺伝子発現について必要な制御配列エレメントを含むか否かが分かる（例えば、適切なレポーター遺伝子のコード領域と融合することによって、プロモーター機能をチェックする）。ストリンジェントな条件下でDNAライブラリーをスクリーニングするための方法は、例えば、公開された欧州特許出願番号EPA 0 174 143において

教示される。ゲノム配列を得ることは、遺伝子発現（例えば、転写因子またはステロイド）を調節する既知の物質との任意のありうる相互作用について、ChMIRpをコードしていない領域に位置する（特に5'隣接領域において）調節配列を調査することを可能にするか、または、おそらく、この遺伝子の発現に特定の影響を有し得る新しい物質を発見する。このような調査の結果は、ChMIRp発現を調節し、それゆえ、コンドロモジュリン（chondromodulin）レセプターと相互作用する細胞の能力に直接影響するための、このような物質の標的化された使用についての基礎を提供する。結果として、このレセプターとの特定の反応および得られた効果が抑制され得る。

【0121】

本発明の範囲はまた、本発明のChMIRpの性質とは異なった性質を有し得る、ChMIRpのサブタイプをコードするDNAを含む。これらは、選択的スプライシングによって形成された発現産物であり、そして、特定の領域における改変された構造（例えば、レセプターについての親和性および特異性の变化またはシグナル伝達の性質および効率の点での变化をもたらし得る構造）を有する。

【0122】

ChMIRpをコードするcDNAの助けによって、低いストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシーまたは高いストリンジェンシーの条件下で、cDNAまたはそのフラグメントとハイブリダイズし、そして、レセプターを結合し得るポリペプチドをコードするか、またはこのようなポリペプチドをコードする配列を含む核酸を得ることが可能である。

【0123】

ChMIRpポリペプチドをコードする核酸分子もまた、発現されたタンパク質の特性に基づいて陽性クローンの検出を使用する発現クローニングによって、同定され得る。代表的に、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）を、宿主細胞表面において発現および提示されたクローンタンパク質に結合させることによって、スクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

【0124】

以下に記載される説明に従って実施される組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを産生し得、そしてコードされたポリペプチドを発現し得る。例えば、ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望のヌクレオチド配列を容易に生成し得る。次いで、これらの配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを生成し得る。あるいは、ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされたChMIRpポリペプチドが、多量に産生され得る。

【0125】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。この方法において、cDNAは、酵素逆転写酵素を使用して、poly(A)+RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー(代表的には、ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNA(オリゴヌクレオチド)の2つの別個の領域に対して相補的である)が、Taqポリメラーゼのようなポリメラーゼを用いてこのcDNAに付加され、そしてこのポリメラーゼが、このcDNAのこれら2つのプライマー間の領域を増幅する。

【0126】

ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら(Angew.Chem.Intl.Ed.28:716-34,1989)によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントが

一緒に連結されて、ChMIRpポリヌクレオチドの全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATGを有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されるか否かに依存して、ChMIRpポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。

【0127】

いくつかの場合において、ChMIRpポリペプチド改変体またはムテインをコードする核酸分子を調製することが所望であり得る。この様式で改変されたDNAが、コンドロモジュリンファミリーの1つ以上のメンバーを結合し得るポリペプチドをコードするという条件で、改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点変異を有する部位特異的変異誘発、転移、欠失、付加、短縮、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して生成し得る（変異誘発技術の記載に関しては、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出を参照のこと）。Engelsら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0128】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるChMIRpポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択される宿主細胞およびChMIRpポリペプチドに依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先性のための「Eco_high.Cod」のようなコドン度数表を組み込むコンピュータアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI)によって提供される。他の有用なコドン度数表としては、「Celegans_high.cod」、「

Celegans__low.cod」、`「Drosophila__high.cod`」、`「Human__high.cod`」、`「Maize__high.cod`」、および`「Yeast__high.cod.`」が挙げられる。

【0129】

他の実施形態において、核酸分子は、上記定義されるような保存的なアミノ酸置換を有するChMIRp変体、1つ以上のN連鎖またはO連鎖グリコシル化部位の付加および/または欠失を含むChMIRp変体、または上記のようなChMIRpポリペプチドフラグメントをコードする。さらに、この様式で変えられたDNAが、リガンドおよびレセプターのコンドロモジュリンファミリーの1つ以上のメンバーを見出し得るポリペプチドをコードし得るという条件で、核酸分子は、ChMIRp変体、フラグメント、および本明細書中に記載の融合ポリペプチドの任意の組み合わせをコードし得る。

【0130】

(ベクターおよび宿主細胞)

ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入し得る。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される(すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じるように、宿主細胞機構と適合性である)。ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫(バキュロウイルス系)宿主細胞および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、ChMIRpポリペプチドが翻訳後修飾(例えば、グリコシル化および/またはリン酸化)されるか否かに一部依存する。そうである場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、Meth.Enz., vol.185(D.V.Goeddel, ed., Academic Press 1990)を参照のこと。

【0131】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のためならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含

む。このような配列（集合的に、「隣接配列」と呼ばれる）は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

【0132】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、ChMIRpポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；オリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、別の「タグ」（例えば、FLAG、HA（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）または（これらは、市販の抗体が存在する））mycをコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、ChMIRpポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立つ。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとしてタグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィー（6hisタグに対して親和性を有するニッケルカラムのような）によって達成され得る。必要に応じて、タグは、引き続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたChMIRpポリペプチドから除去され得る。

【0133】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または宿主細胞系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、ChMIRpポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物

、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0134】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、ChMIRP遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、1つ以上の隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

【0135】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、PCRを使用して、そして/あるいは適切なオリゴヌクレオチドならびに/または同じもしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、隣接配列は得られ得る。

【0136】

隣接配列が公知でない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子を含み得る大きなDNA断片から単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatsworth, CA）、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明かである。

【0137】

複製起点は、代表的に、市販される原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数へのベクターの増幅は、いくつかの場合において、ChMIRPポリペプチドの最適な発現

に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、公知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミド pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起点 (例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、またはHPVもしくはBPVのようなパピローマウイルス) は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターに必要とされない (例えば、SV40 起点は、ただそれが初期プロモーターを含むので、しばしば、使用される) を必要としない。

【0138】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の3'側に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメント、続いてポリ-T配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化され得るか、またはベクターの一部として市販されるが、これはまた、本明細書中上記のような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0139】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素 (例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン) に対する耐性を与えるか；(b) 細胞の栄養要求性の欠損を補うか；あるいは(c) あるいは複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0140】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は

、増殖に重要なタンパク質の産生に、より大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の染色体の連続的な生成内にタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように独特に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子とChMIRpポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量のChMIRpポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

【0141】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてシャイン・ダルガルノ配列(原核生物)またはコザック配列(真核生物)によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現されるChMIRpポリペプチドのプロモーターの3'側およびコード配列の5'側に配置される。シャイン・ダルガルノ配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン(すなわち、高いA-G含有量)である。多くのシャイン・ダルガルノ配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して容易に合成され得、そして原核生物ベクターにおいて使用され得る。

【0142】

リーダー配列、またはシグナル配列は、ChMIRpポリペプチドが合成される宿主細胞からChMIRpポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列は、ChMIRp核酸分子のコード領域に位置するか、または直接ChMIRpポリペプチドコード領域の5'側に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能性であるいずれかのシグナル配列が、ChMIRp遺伝子またはcDNAと組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、ChMIRp遺伝子またはcDNAに対して同種(天然)または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。大部分において、シグナルペプ

チドの存在による宿主細胞からのChMIRpポリペプチドの分泌は、ChMIRpポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。

【0143】

シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入されたChMIRp DNAの一部であり得る。ネイティブなChMIRp DNAは、成熟ChMIRpポリペプチド産物を形成するために分子の翻訳後処理の間に切断されるタンパク質のアミノ末端でシグナル配列をコードする。ネイティブなシグナル配列を有するChMIRpヌクレオチドならびにネイティブなシグナル配列が欠失され、異種のシグナル配列で置換されたChMIRpヌクレオチドが本発明の範囲内に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなChMIRpシグナル配列を認識せず、プロセスしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシンIIリーダーのグループから選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌について、ネイティブなChMIRpシグナル配列は、酵母インベルターゼ、因子、または酸ホスファターゼシグナル配列によって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ChMIRpポリペプチドのネイティブなシグナル配列が十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0144】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいようないくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々の核酸またはポリペプチド配列が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列（*pro-sequence*）を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最終タンパク質産物は、1位に（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）、発現に付随して1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に除去されないかもしれない。例えば、最終タンパク質産物は、N末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位

の使用は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域を切断する場合、所望の ChM I r p ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

【0145】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合、ChM I r p 遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない（大部分のcDNAについて）場合、イントロンは、別の供給源から得られ得る。5' - 隣接配列およびChM I r p 遺伝子に関してイントロンの位置は、イントロンが効果的に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、ChM I r p cDNA分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側で、ポリ-A転写終止配列の5'側である。好ましくは、イントロンは、コード配列を妨害しないように、cDNAの1つの側または他の側（すなわち、5'側または3'側）に配置される。任意の供給源（ウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまた本明細書中に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

【0146】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、ChM I r p ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。

【0147】

プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子（一般的に、約100~1000bp内）の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）に配置される非転写配列である。プロモーターは、通常、2つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）のうちの1つにグループ化される。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくらかの変化（例えば、栄養の存在または非存在、あ

るいは温度の変化)に应答してそれらの制御下で、DNAからの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対して遺伝子をほとんど制御しないかまたは制御しない。多数のプロモーター(種々の潜在的な宿主細胞によって認識される)が周知である。適切なプロモーターは、供給源のDNAからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、ChMIRpポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなChMIRpプロモーター配列は、ChMIRp核酸分子の増幅および/または発現を指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能である場合、および使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

【0148】

原核生物宿主との使用に適切なプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン(trp)プロモーター系；およびハイブリッドプロモーター(例えば、tacプロモーター)が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた、適切である。これらの配列は、公開されており、その結果、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNAにそれらの配列を連結し得る。

【0149】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(例えば、Adenovirus 2)、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、ヘルペスウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモ

ーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0150】

ChMIRp 遺伝子転写を制御する際に関心があり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40 初期プロモーター領域（Bernois and Chambon, Nature 290:304-10, 1980）；CMVプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'側の長い末端反復に含まれるプロモーター（Yamamoto, et al., Cell 22:787-97, 1980）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-45, 1981）；メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster et al., Nature 296:39-42, 1982）； β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31, 1978）；またはtacプロモーター（DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25, 1983）。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている以下の動物転写制御領域もまた関心がある：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼI 遺伝子制御領域（Swift et al., Cell 38:639-46, 1984；Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409, 1986；MacDonald, Hepatology 7:425-515, 1987）；膵臓細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域（Hanahan, Nature 315:115-22, 1985）；リンパ球において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl et al., Cell 38:647-58, 1984；Adames et al., Nature 318:533-38, 1985；Alexander et al., Mol. Cell. Biol., 7:1436-44, 1987）；精巣、乳房、リンパ球、および肥満細胞において活

性なマウス乳腺癌ウイルス制御領域 (Leder et al., Cell 45:485-95, 1986); 肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkert et al., Genes and Devel. 1:268-76, 1987); 肝臓において活性な α -フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol., 5:1639-48, 1985; Hammer et al., Science 235:53-58, 1987); 肝臓において活性な β -1-抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelsey et al., Genes and Devel. 1:161-71, 1987); 骨髄性細胞において活性な β -グロビン遺伝子制御領域 (Mogram et al., Nature 315:338-40, 1985; Kollias et al., Cell 46:89-94, 1986); 脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readhead et al., Cell 48:703-12, 1987); 骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (Sani, Nature 314:283-86, 1985); ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Mason et al., Science 234:1372-78, 1986)。

【0151】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明のChMIRpポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約100~300bpの長さのDNAのシス作用エレメントである。エンハンサーは、相対的な方向および位置が独立している。これらは、転写単位に対して5'側および3'側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である(例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインシュリン)。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化に対する例示的な増強エレメントで

ある。エンハンサーは、ChMIRp核酸分子に対して5'位または3'位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'位側に配置される。

【0152】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。所望な隣接配列の1つ以上がすでに使用されるベクター内がない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0153】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen, Company, Carlsbad, CA)、pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA)、pET15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA)、pETL (BlueBacII, Invitrogen)、pDSR-alpha (PCT公開番号WO 90/14363)ならびにpFastBac1、pFastBacHT、およびpFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY)が挙げられる。

【0154】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1-ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPO

TM TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA) のようなプラスミド、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはバキュロウイルス発現系のようなウイルスベクター (pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA) が挙げられる。

【0155】

ベクターが構築され、そしてChMIRpポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。ChMIRpポリペプチドに対する発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクチン、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、一部、使用される宿主細胞の型に依存する。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら、上記に記載される。

【0156】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞 (例えば、E. coli) または真核生物宿主細胞 (例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞) であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合、ChMIRpポリペプチドを合成し、このポリペプチドは、続いて、培養培地から (宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合) 収集され得るか、直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される (そのポリペプチドが分泌されない場合)。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性 (例えば、グリコシル化またはリン酸化) に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾、および生物学的に活性な分子に折り置まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0157】

酵母細胞および哺乳動物細胞は、本発明の好ましい宿主である。このような宿主の使用は、それらがまたグリコシル化を含む翻訳後ペプチド改変を行い得る実質的な利点を提供する。多くの組換えDNAストラテジーが存在し、これは、こ

これらの宿主において所望のタンパク質の産生に使用される強力なプロモーター配列および高コピー数のプラスミドを利用する。

【0158】

クローン化された哺乳動物遺伝子産物上の酵母認識リーダー配列は、ペプチド保有リーダー配列（すなわち、プレペプチド）を産生しそして分泌する。哺乳動物細胞は、正しい折り畳みまたは正しい部位でのグリコシル化を含むタンパク質分子に対する翻訳後修飾を提供する。

【0159】

宿主として有用であり得る哺乳動物細胞には、線維芽細胞起源の細胞（例えば、VEROまたはCHO-K1）およびそれらの誘導体が含まれる。哺乳動物宿主については、いくつかの可能なベクター系が所望のChMIRPポリペプチドの発現について利用可能である。広範な種々の転写および翻訳調節配列が、宿主の性質に依存して利用され得る。転写および翻訳の調節シグナルは、調節シグナルが高レベルの発現を有する特定の遺伝子と結合しているアデノウイルス、ウシパピローマウイルス、シミアンウイルスなどのようなウイルス供給源から由来し得る。あるいは、哺乳動物発現産物由来のプロモーター（例えば、アクチン、コラーゲン、ミオシンなど）が利用され得る。抑制または活性化を可能にする転写開始調節シグナルは、その遺伝子の発現が調節され得るように、選択され得る。有用なシグナルは、温度感受性である調節シグナルである（その結果、温度を変化させることにより、発現が抑制もしくは阻害され得る）か、または化学調節（例えば、代謝産物）に供される。

【0160】

広く公知であるように、真核生物mRNAの翻訳は、開始メチオニンをコードするコドンにおいて開始される。この理由のために、真核生物プロモーターと、メチオニンをコードし得る（すなわち、AUG）任意の介在コドンを含まない所望のレセプター分子をコードするDNA配列との間の連結を確実にすることが好ましい。このようなコドンの存在は、結果として、融合タンパク質の形成（AUGコドンが、DNA配列をコードする所望のレセプター分子として同じリーディングフレーム中に存在する場合）またはフレームシフト変異（AUGコドンが、

所望のChMIRpポリペプチドコード配列として同じリーディングフレーム中に存在しない場合)のどちらかを生じる。

【0161】

ChMIRpポリペプチドの発現はまた、原核細胞中で達成され得る。好ましい原核宿主としては、細菌(例えば、E. coli、バチルス属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、サルモネラ属、セラチア属など)が挙げられる。最も好ましい真核生物宿主は、E. coliである。特別な目的の細菌宿主としては、E. coli K12株294(ATCC 31446)、E. coli X1776(ATCC 31537)、E. coli W3110(F₊ , , 原栄養菌株(ATCC 27325))、および他の腸内細菌(例えば、Salmonella typhimuriumまたはSerratia marcescens)ならびに種々のシュードモナス種が挙げられる。原核宿主は、発現プラスミド中のレプリコンおよび制御配列と適合しなければならない。

【0162】

原核細胞(例えば、E. coli、枯草菌、シュードモナス属、ストレプトミセス属など)中で所望のChMIRpポリペプチドを発現するために、所望のレセプター分子をコードする配列を機能性原核プロモーターに作動可能に連結することが必要である。このようなプロモーターとしては、構成的またはより好ましくは、調節可能(すなわち、誘導的または抑制解除的)のいずれかであり得る。構成プロモーターの例としては、バクテリオファージのintプロモーター、およびpBR322の β -ラクタマーゼ遺伝子のblaプロモーターなどが挙げられる。誘導原核生物プロモーターの例としては、バクテリオファージ(P_LおよびP_R)の主要な右プロモーターおよび左プロモーター、ならびにE. coliのtrp、recA、lacZ、lacI、galおよびtacプロモーター、 β -アミラーゼ(Ulmaneら, J. Bacteriol. 162:176-182, 1985)、枯草菌の28-特異的プロモーター(Gilmaら, Gene 32:11-20, 1984)、バチルスのバクテリオファージのプロモーター(Gryczan, T. J., The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press

, Inc., New York, 1982)、およびストレプトミセス属プロモーター (Wardら, Mol. Gen. Genet. 203:468-478, 1986) が挙げられる。原核生物プロモーターは、Glick (J. Ind. Microbiol. 1:277-282, 1987); Cenatiempo, Biochimie 68:505-516, 1986); および Gottesman, Ann. Rev. Genet. 18:415-442, 1984) により概説される。

【0163】

原核生物細胞における適切な発現はまた、遺伝子コード配列から上流のリボソーム結合部位の存在を必要とする。このようなりボソーム結合部位は、例えば、Goldら (Ann. Rev. Microbiol. 35:365-404, 1981) により開示されている。

【0164】

所望のChMIRpポリペプチドコード配列および作動可能に連結されたプロモーターは、非複製DNA (またはRNA) 分子 (これは、直線状であってもよいし、またはより好ましくは閉じられた共有結合環状分子であってもよい) としてレシピエントの原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。このような分子は、自律複製不可能であることから、所望のレセプター分子の発現は、導入配列の一過性の発現を介して生じ得る。あるいは、持続性発現は、宿主染色体へ導入された配列の組み込みを介して生じ得る。

【0165】

1つの実施形態では、所望の遺伝子配列を宿主細胞染色体へ組み込み得るベクターが使用される。細胞の染色体へ導入DNAを安定に組み込んだ細胞は、発現ベクターを含む宿主細胞の選択を可能にする1以上のマーカーを導入することによっても選択され得る。マーカーは、宿主中に栄養要求性 (例えば、共通の酵母栄養要求性マーカーであるleu21またはura3)、殺生剤 (biocide) 耐性 (例えば、抗生物質) または重金属 (例えば、銅) などを補い得る。この選択マーカー遺伝子は、発現されるDNA遺伝子配列に直接連結されていてもよいし、同時トランスフェクションにより同じ細胞に導入されてもよい。

【0166】

好ましい実施形態では、導入された配列は、レシピエント宿主における自律複製し得るプラスミドベクターまたはウイルスベクターへ組み込まれる。広範な種々のベクターのいずれかが、この目的のために使用され得る。特定のプラスミドベクターまたはウイルスベクターを選択する際の重要な因子（例えば、ベクターを含むレシピエントな細胞での簡便性）（特定の宿主において所望されるベクターのコピーの数；および異なる種の宿主細胞間をベクターを「シャトル」し得るに望ましいか否か）は、認識され得、そしてこれらのベクターを含まないレシピエントな細胞から選択され得る。

【0167】

一連の酵母遺伝子発現系のいずれかがまた使用され得る。このような発現ベクターの例としては、酵母の2ミクロンの環、発現プラスミド（YEP13、YVPおよびYRPなど）またはそれらの誘導体が挙げられる。このようなプラスミドは当該分野で周知である（Botsteinら，Miami Wnter. Symp. 19: 265 - 274 (1982)；Broach, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 445 - 470頁 (1981)；Broach, Cell 28: 203 - 204 (1982)）。

【0168】

哺乳動物宿主について、いくつかの可能なベクター系が発現のために利用可能である。染色体外プラスミドを自律複製を提供するDNAエレメントを使用するベクターの1つのクラスは、動物ウイルス（例えば、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、またはSV40ウイルス）に由来する。ベクターの第2のクラスは、宿主染色体への所望の遺伝子配列の組み込みに依存する。導入DNAがそれらの染色体へ安定に組み込まれた細胞は、発現ベクターを含む宿主細胞の選択を可能にする1以上のマーカーを組み込むことによっても選択され得る。マーカーは、栄養要求性宿主に対してプロトトロピー（殺生物剤

耐性（例えば、抗生物質）、または重金属（例えば、銅）などを提供し得る。選択マーカー遺伝子は、発現されるDNA配列に作動可能に連結されていてもよいし、または同時形質転換により同じ細胞へ導入されても良い。さらなるエレメントはまた、mRNAの最適な合成に必要とされ得る。これらのエレメントは、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルを含み得る。このようなエレメントを組み込んでいるcDNA発現ベクターは、Okayama, H. (Mol. Cell. Biol. 3:280-283) により記載されるものが含まれる。好ましい真核生物ベクターとしては、PWLNEO、PSV2CAT、POG44、PXTI、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia) が挙げられる。

【0169】

好ましい原核生物ベクターとしては、E. coli 中で複製され得るプラスミドのようなプラスミド（例えば、pBR322、ColE1、pSC101、pACYC 184、VX、pQE70、pQE60、pQE9、pBG、pD10、Phage script、psix174、pbmescript SK、pbsks、pNH8A、pNHIBa、pNH18A、pNH46A (SL rare gone)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5) が挙げられる。例えば、このようなプラスミドは、Maniatis, T.ら (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982)) により開示される。Bacillus プラスミドとしては、pC194、pC221、pT127などが挙げられる。このようなプラスミドは、Gryczan, T. (The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, New York (1982) 307-329頁) により開示される。適切なストレプトミセス属プラスミドとしては、pISJ101 (Kendallら, J. Bacteriol. 169:4177-4183 1987) および C31のようなストレプトミセス属バクテリオファージ (Chaterら, Sixth International

1 Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kaido, Budapest, Hungary, 1986, 45-541頁)が挙げられる。ストレプトミセス属プラスミドは、Johnら(Rev. Infect. Dis. 8:693-704, 1986, およびIzaki, K. (Jpn. J. Bacteriol 33:729-742 1978)により概説される。しかし、任意の他のプラスミドまたはベクターは、それらが宿主細胞中で複製可能および生存可能であるかぎり使用され得る。

【0170】

一旦、ベクターまたは構築物を含むDNA配列が発現のために調製されると、DNA構築物は、適切な宿主へ導入され得る。種々の技術(例えば、プロトプラスト融合物、リン酸カルシウム沈澱、エレクトロポレーションまたは他の従来技術)が、使用され得る。融合後、細胞は、培地中で増殖され、そして適切な活性についてスクリーニングされる。配列の発現は、ChMIRpポリペプチドの産生を生じる。

【0171】

適切な宿主細胞または細胞株は、哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO; ATCC番号CCL61)、CHO DHFR細胞(Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 97:4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓(HEK), 293細胞もしくは293T細胞(ATCC番号CRL 1573)、または3T3細胞(ATCC番号CCL92))であり得る。

【0172】

適切な哺乳動物宿主細胞の選択ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物産生および精製のための方法は、当該分野で公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1(ATCC番号CRL 1650)およびCOS-7(ATCC番号CEL 1651)細胞株ならびにCV-1(ATCC番号CCL70)細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、形質転換された細胞株を含む、霊長類細胞株およびげっ歯類細胞株が挙げられる。正常

な二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養に由来する細胞株、ならびに一次外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子において遺伝子型的に欠損していてもよいし、または優性に作用する選択遺伝子を含んでいてもよい。他の適切な哺乳動物細胞株としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Swiss、Balb-cもしくはNIHマウスに由来するマウス神経芽細胞種N2A細胞、HeLa細胞、マウスL-929細胞、3T3株、またはBHKもしくはHaKハムスター細胞株（これらはATCCから入手可能である）。各々これらの細胞株は、タンパク質発現の分野の当業者に公知であり、そして利用可能である。

【0173】

同様に、本発明に適切な宿主細胞として同様に有用であるのは、細菌細胞である。例えば、E.coliの種々の株（例えば、HB101(ATCC No. 33694)、DH5、DH10、およびMC1061(ATCC No. 53338)）が、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞として周知である。B.subtilis、Pseudomonas spp.、他のBacillus spp.、Streptomyces spp.などの種々の株もまた、本方法において使用され得る。

【0174】

当業者に公知の酵母細胞の多くの株もまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である（例えば、Saccharomyces、ichia、Candida、Hansenula、およびTorulopsis）(Bitter, G., Heterologous Gene Expression in Yeast In: Berger, S.L. および Kimmel, A.R., 152:673-684, 1987)。好ましい酵母株には、例えば、Saccharomyces cerevisiaeが含まれ、これは、スフェロプラストの調製によるかまたはアルカリ塩（例えば、LiCl）によるしよりによるか、いずれかでDNAにより容易に形質転換され得る(Itohら、J. Bacteriol., 153:163, 1983)。酵母細胞中で発現されるいくつかのタンパク質は、培養培地中に効率的にスクリーニングされ-

方、その他は、細胞内に蓄積する。

【0175】

さらに、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら(Biotechniques 14:810~817、1993)、Lucklow(Curr. Opin. Biotechnol. 4:564~572、1993)およびLucklowら(J. Virol. 67:4566~4579、1993)に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5(Invitrogen、Carlsbad、CA)である。好ましくは、その昆虫細胞は、組換えバキュロウイルス粒子に感染し、これはそのゲノムに組み込まれているChMIRpポリペプチド配列を有する。そのバキュロウイルス感染は、組換えChMIRpの効率的な真核生物発現を導く。このようなバキュロウイルス発現系には、Bac-to-Bac(登録商標)システム(Life Technologies)およびBacPAK(登録商標)システム(Clontech)が含まれる。

【0176】

(ポリペプチド産生)

ChMIRpポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞が、当業者に周知の標準的培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、その細胞の増殖および生存に必要な栄養素すべてを含む。E. coli細胞を培養するのに適切な培地は、例えば、Luria Broth(LB)および/またはTerrific Broth(TB)である。真核生物細胞を培養するのに適切な培地は、Roswell Park Memorial Media 1640(RPMI 1640)、最少必須培地(MEM)、および/またはDulbecco's Modified Eagle Media(DMEM)であり、これらすべては、培養される特定の細胞株により示される血清および/または増殖因子が補充され得る。昆虫培養に適切な培地は、必要な場合にはyeastolate、ラクトアルブミン加水分解物および/またはウシ胎仔血清を補充した、グレース培地である。

【0177】

代表的には、形質転換細胞の選択的増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、この培地に補充物として添加される。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されたプラスミド上に存在する選択マーカーエレメントにより決定される。例えば、その選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に添加される化合物は、カナマイシンである。選択的増殖培地のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリンおよびネオマイシンが挙げられる。

【0178】

宿主細胞により産生されるChMIRpポリペプチドの量は、当該分野で公知の標準的方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定はしないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、HPLC分離、免疫沈降、および/または活性アッセイが挙げられる。

【0179】

ChMIRpポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計された場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地にて見出され得る。しかし、ChMIRpポリペプチドが宿主細胞から分泌される場合、ChMIRpポリペプチドは細胞質および/または核（真核生物宿主細胞について）あるいは細胞質ゾル（細菌宿主細胞）に存在する。

【0180】

宿主細胞の細胞質および/または核（真核生物宿主について）または細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に存在するChMIRpポリペプチドについては、その宿主細胞は、代表的には、まず、機械的に破壊されるか、界面活性剤で破壊され、細胞内の内容物を緩衝溶液中に放出する。ChMIRpポリペプチドは、次いで、この溶液から単離され得る。

【0181】

溶液からのChMIRpポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。そのポリペプチドがそのカルボキシ末端もしくはアミノ末端のいずれかに、ヘキサヒスチジンのようなタグ（ChMIRpポリペプチド/ヘキサHis）、または他の小さなペプチド、例えば、FLAG（Eastman Koda

k Co., New Haven, CT) もしくは myc (Invitrogen, Carlsbad, CA)、または融合された IgG Fc フラグメントを含むように合成されている場合、そのポリペプチドは、カラムマトリックスがそのタグに高い親和性を有するかまたはそのポリペプチドに直接高い親和性を有するアフィニティーカラム(すなわち、ChMIRp ポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体)にその溶液を通すことによって、1工程で本質的に精製され得る。例えば、ポリヒスチジンはニッケルに大きな親和性および特異性で結合し、従ってニッケルのアフィニティーカラム(例えば、Qiagen(登録商標)ニッケルカラム)が、ChMIRp ポリペプチド/ポリHis の精製に使用され得る。(例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、10.11.8節、John Wiley & Sons、New York、1993を参照のこと。)

さらに、ChMIRp ポリペプチドは、ChMIRp ポリペプチドを特異的に認識し得るモノクローナル抗体の使用を介して、精製され得る。

【0182】

ChMIRp ポリペプチドが付着した tag なしに調製される場合、そして抗体が利用可能でない場合、精製のための他の周知の手順が使用され得る。このような手順としては、限定はしないが、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、HPLC、ゲル溶出と組み合わせたネイティブゲル電気泳動、ならびに調製的等電点電気泳動(「Isoprime」マシーン/技術、Hofer Scientific)が挙げられる。いくつかの場合、2つ以上のこれらの精製技術が、純度の増加を達成するために組み合わせられ得る。

【0183】

ChMIRp ポリペプチドが細胞内で産生される場合、その細胞内物質(グラム陰性細菌についての封入体を含む)は、その宿主細胞から、任意の標準的な当業者に公知の方法を使用して、抽出され得る。例えば、宿主細胞は、界面活性剤での(例えば、Triton X-100)、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および/または超音波処理による溶解およびその後の遠心分離により溶解され、周辺質/細胞質の内容物を放出し得る。

【0184】

ChMIRpポリペプチドが細胞質内で封入体を形成している場合、その封入体は、しばしば、細胞膜の内面および/または外面に結合し得、したがって、遠心分離の後にペレット物質中に主に見出される。そのペレット物質は、次いで、極端なpHかまたはカオトロピック剤（例えば、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体）で、還元剤（例えば、アルカリpHでジチオスレイトール、または酸性pHでカルボキシエチルホスフィン）の存在下で処理され、封入体を放出、分断、および可溶化する。このように可溶化の形態となったChMIRpポリペプチドは、次いで、ゲル電気泳導、免疫沈降などを使用して分析され得る。ChMIRpポリペプチドを単離することが所望の場合、単離は、本明細書に記載されるかまたはMarstonら（Meth. Enz., 182: 264-275, 1990）に記載されるような標準的な方法を使用して、達成され得る。

【0185】

いくつかの場合には、ChMIRpポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性ではないかもしれない。ポリペプチドをその三次構造に「リフォールディング」または変換し、ジスルフィド結合を生成するための種々の方法が、生物学的活性を回復するために使用され得る。このような方法には、可溶化ポリペプチドを、通常pH7より高い、そして特定の濃度のカオトロピック剤の存在下で、pHに暴露することが含まれる。カオトロピック剤の選択は、封入体の可溶化のために使用される選択に非常に類似しているが、通常、カオトロピック剤は、低濃度で使用され、そして必ずしも、可溶化のために使用されるカオトロピック剤と同じではない。ほとんどの場合、そのリフォールディング/酸化溶液はまた、還元剤または還元剤プラスその酸化形態を特定の酸化還元ポテンシャルを生成するための特定の比率で含み、ジスルフィドのシャッフリングがタンパク質のシステイン架橋の形成において生じることを可能にする。一般的に使用される酸化還元の対のいくつかには、システイン/シスタミン、グルタチオン(GSH)/ジチオビスGSH、塩化銅、ジチオスレイトール(DTT)/ジチアンDTT、2-2-メルカプトエタノール(bME)/ジチオ-b(ME)が含まれる。共溶媒は

、リフォールディングの効率を増大させるために使用され得、そしてこの目的のために使用されるより一般的な試薬には、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが含まれる。

【0186】

封入体が、ChMIRpポリペプチドの発現の際に有意な程度まで形成されない場合、そのポリペプチドは、細胞ホモジネートの遠心分離の後に、主に、上清に見出される。そのポリペプチドは、さらに、本明細書に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

【0187】

夾雑物を部分的にまたは完全に含まないように、ChMIRpポリペプチドを部分的または完全に精製するために好ましい状況では、当業者に公知の標準的な方法が使用され得る。このような方法には、電気泳動による分離およびその後の電気溶出、種々のタイプのクロマトグラフィー（アフィニティー、免疫アフィニティー、分子ふるい、および/またはイオン交換）、および/または高圧液体クロマトグラフィーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの場合、完全な精製のためには、これらの方法のうちの1つ以上を使用することが好ましい。

【0188】

ChMIRpポリペプチド、そのフラグメント、および/または誘導体もまた、当該分野で公知の技術を使用して化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）により調製され得、その公知技術は、たとえば、Merrifieldら（J. Am. Chem. Soc. 85:2149、1963）、Houghtonら（Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132、1985）、ならびにStewartおよびYoung（Solid Phase Peptide Synthesis、Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、1984）に示される技術である。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含んで合成され得るし、または含まずに合成され得る。化学合成されたChMIRpポリペプチドもしくはフラグメントは、これらの参考文献に示される方法を使用して、ジスルフィド架橋を形成するように酸化され得る。化学合成されたChMIRpポリペプチド、フラグメントもしくは

誘導体は、組換え産生されるかもしくは天然の供給源から精製された対応するChMIRpポリペプチド、フラグメントもしくは誘導体に匹敵する生物学的活性を有すると予測され、従って、組換えChMIRpポリペプチドもしくは天然のChMIRpポリペプチドと互換可能に使用され得る。

【0189】

ChMIRpポリペプチドを得る別の手段は、ChMIRpポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および/または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、ChMIRpポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたChMIRpポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体を使用してモニターされ得る。

【0190】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、ChMIRpに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-12303、1997を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Roberts, R., Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73, 1999もまた参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、それぞれが、5'ランダム化配列、中心予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0191】

米国特許第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,723,323号；および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチ

ドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、確率論的遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0192】

ペプチドまたはポリペプチドを産生するための別の方法は、Athersys, Inc. によって出願されたPCT/US98/20094 (WO99/15650) (「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られている)に記載されており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同性組換えまたは異常な組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的DNAは、まず、放射線に供せられ、そして遺伝子プロモーターに挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方の分岐点に最終的に配置され、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現より生じる。

【0193】

これらの方法はまた、包括的なChMIRpポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ(例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび全生物アッセイ(例えば、植物、マウスなど))において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0194】

(ChMIRpのタンパク質、ポリペプチド、フラグメント、改変体およびムテイン)

本発明のポリペプチドは、単離されたChMIRpポリペプチドおよびそれに関するポリペプチド(本明細書中上記されるような、フラグメント、改変体、融

合ポリペプチドおよび誘導体を含む)を包含する。

【0195】

本発明のChMIRpフラグメントは、そのポリペプチドのアミノ末端での短縮化(リーダー配列を含むかまたは含まない)、カルボキシ末端での短縮化、および/または内部での欠失から生じ得る。ほとんどの欠失および挿入、ならびに特に置換は、ChMIRpタンパク質の特徴での極端な変化を生じると予測されない。しかし、実行する前に置換、欠失もしくは挿入の正確な効果を予測することが困難である場合、当業者は、この効果が慣用的スクリーニングアッセイにより評価されることを認識する。例えば、改変体は、代表的には、ChMIRpポリペプチドをコードする核酸の部位特異的変異誘発、組換え細胞培養物におけるその改変体核酸の発現、そして必要に応じてその細胞培養物からの精製により産生され、その精製は例えば、ポリクローナル抗ChMIRp抗体カラム上でのイムノアフィニティー吸着(少なくとも1つの残りの免疫エピトープにその改変体を結合することによりその改変体を吸着するため)による。好ましい実施形態において、短縮化および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100を超えるアミノ酸を含む。そうして産生されたポリペプチドフラグメントは、約25個連続するアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸、または約250アミノ酸、または約275アミノ酸、または約300アミノ酸を含む。このようなChMIRpポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。

【0196】

本発明のChMIRpポリペプチド改変体は、配列番号2と比較して、1つ以上のアミノ酸置換、付加および/または欠失を含む。好ましい実施形態において、この改変体は、1~3、または1~5、または1~10、または1~15、または1~20、または1~25、または1~50、または1~75、または1~100、または100を超える、アミノ酸置換、挿入、付加および/もしくは欠失を有し、ここでその置換が、上記のように保存的であり得るか、または非保存

的であり得るか、あるいはその組み合わせであり得る。より詳細には、ChMIRp 改変体は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含み得、この配列において、アミノ酸2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、2

70、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、または317までからなる群からの1つ以上のアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている。この改変体は、カルボキシ末端またはアミノ末端（リーダー配列を含むかもしくは含まない）のいずれかに、アミノ酸残基の付加を有し得る。

【0197】

好ましいChMIRpポリペプチド改変体は、ネイティブChMIRpポリペプチドと比較してグリコシル化部位の数および/または型が変化している、グリコシル化改変体を含む。1つの実施形態において、ChMIRp改変体は、より多くの数またはより少ない数のN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、配列Asn-X-Serにより特徴付けられ、ここでXとして示されるアミノ酸残基は、プロリンを除く任意の型のアミノ酸であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型等鎖の付加のために可能な新規な部位を提供する。あるいは、この配列を除去するための置換が、既存のN結合型等鎖を除去する。また、1つ以上のN結合型グリコシル化部位（代表的には天然に存在する部位）が除去されかつ1つ以上の新規なN結合部位が産生される、N結合型等鎖の再構成も提供される。

【0198】

当業者は、周知の技術を使用して、ネイティブのChMIRpポリペプチドの適切な改変体を決定し得る。例えば、生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を推定し得る。また、当業者は、生物学的活性または構造に重要であり得る領域さえも、その生物学的活性を破壊することもしくはそのポリペプチド構造に不利に影響することなく、保存的アミノ酸置換に供され得ることを認識する。

【0199】

活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を予測するために、当業者は、活性に重要であると考えられる領域を標的とし得る。例えば、同じ種または他の種由来の類似の活性を有する類似のポリペプチドが公知である場合、当業者は、ChMIRpポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を行った後、当業者は、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を決定し得る。当業者は、保存されないChMIRp分子の領域での変化が生物学的活性および/または構造に不利に影響しそうにないことを知っている。当業者はまた、比較的保存された領域においてさえ、活性を保持しつつ、天然に存在する残基に代わって化学的に類似するアミノ酸でおそらく置換し得る（例えば、保存的アミノ酸残基置換）。

【0200】

また、当業者は、活性もしくは構造に重要な類似のポリペプチド中の残基を同定する構造-機能研究を検討し得る。このような比較を考慮して、当業者は、類似のポリペプチド中の活性もしくは構造に重要なアミノ酸残基に対応するChMIRp中のアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、ChMIRpのこのような推定された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似のアミノ酸置換を選択し得る。

【0201】

利用可能な場合、当業者はまた、類似のポリペプチドにおける結晶構造、およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。その情報を考慮して、当業者は、その3次元構造に関するChMIRpポリペプチドのアミノ酸残基の整列を予測でき得る。当業者は、そのタンパク質の表面上にあると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を作製しないように選択し得る。なぜなら、そのような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。

【0202】

さらに、当業者は、各アミノ酸残基で単一アミノ酸置換を含む、試験改変体を産生し得る。この改変体は、本願に開示される活性アッセイを使用してスクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体についての情報を集めるために使用される、例えば、特定のアミノ酸残基への変化が活性の破壊を生じたこ

とを発見した場合、このような変化を含む改変体が回避される。従って、このような実験から収集された情報に基づいて、受容可能なさらなる改変体を見出すように試みる場合、当業者は、さらなる置換が単独でもしくは他の変異と組み合わせるいずれかで回避されるべきアミノ酸を知っている。

【0203】

本発明のChMIRp融合ポリペプチドは、ペプチドまたはタンパク質の異種の機能部分に融合された、ChMIRpポリペプチド、フラグメント、改変体もしくは誘導体を含む。異種ペプチドおよびタンパク質としては、ChMIRp融合ポリペプチドの検出および/もしくは単離を可能にするエピトープ、膜貫通レセプタータンパク質もしくはその部分（例えば、細胞外ドメイン）、または膜貫通レセプタータンパク質に結合するリガンドもしくはその部分、触媒活性な酵素もしくはその部分、オリゴマー化を促進するタンパク質もしくはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）および安定性を増大させるタンパク質もしくはペプチド、または循環の半減期（例えば、免疫グロブリン定常領域）が挙げられるが、これらに限定されない。ChMIRpポリペプチドは、それ自体またはそのフラグメント、改変体もしくは誘導体に融合され得る。融合は、ChMIRpポリペプチドのアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれかでなされ得、そしてリンカーまたはアダプター分子なしで直接であり得るし、あるいはリンカーまたはアダプター分子（例えば、1つ以上のアミノ酸残基～約20アミノ酸残基まで、もしくは約50アミノ酸残基まで）を介してであり得る。リンカーまたはアダプター分子はまた、融合部分の分離およびその後のフォールディングを可能にするように、DNA制限エンドヌクレアーゼについての切断部位もしくはタンパク質分解切断についての切断部位を含んで設計され得る。

【0204】

また、ChMIRpポリペプチドの循環的に入れ換えられた(circularly permuted)構造アナログが、本発明の一部として想像される。

【0205】

組換えDNA方法の開発により、タンパク質のフォールディング、構造および機能に対する配列転位の効果を研究することが可能になった。新規な配列を作製

する際に使用されるアプローチは、そのアミノ酸配列の線形再構成 (linear reorganization) による関連するタンパク質の天然に存在する対のアプローチと類似する (Cunninghamら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:3218~3222、1979; TeatherおよびErffle、J. Bacteriol. 172:3837-3841、1990; Schimmingら、Eur. J. Biochem. 204:13-19、1992; YamiuchiおよびMinamikawa、FEBS Lett. 260:127-130、1991; MacGregorら、FEBS Lett. 378:263~266、1996)。この型の再構成をタンパク質に初めてインビトロで適用したことが、GoldenbergおよびCreighton (J. Mol. Biol. 165:407~413、1983) により記載された。新規なN末端が、もとの配列の内部部位 (区切り点 (breakpoint)) に選択され、その新規な配列は、もとのC末端もしくはその付近にあるアミノ酸に到達するまで、その区切り点からもと同じアミノ酸順序を有する。この点で、新規な配列は、直接にかもしくはさらなる配列部分 (リンカー) を介してのいずれかで、もとのN末端もしくはその付近にあるアミノ酸に結合され、そしてその新規な配列は、もとの配列の区切り部位のN末端側にあったアミノ酸もしくはその付近点に到達するまで、もと同じ配列が続き、この残基はその鎖の新規なC末端を形成する。

【0206】

このアプローチは、58~462アミノ酸のサイズ範囲のタンパク質に適用されている (Goldenberg & Creighton、J. Mol. Biol. 165:407-413、1983; Li & Coffino、Mol. Cell. Biol. 13:2377-2383、1993)。試験されたタンパク質は、広範な構造的クラスを表し、これらには、主に α -ヘリックスを含むタンパク質 (インターロイキン-4; Kreitmanら、Cytokine 7:311-318、1995)、主に β -シートを含むタンパク質 (インターロイキン-1; Horlickら、Protein Eng. 5:427-431、1992) またはこの2つの混合物を含むタンパク質 (酵母ホスホリボシ

ルアントラニル酸イソメラーゼ; Lugerら、Science 243:206-210、1989)が挙げられる。

【0207】

好ましい実施形態において、ChMIRpポリペプチド、フラグメント、改変体および/または誘導体を、ヒトIgGのFc領域に融合させる。1つの例において、当業者に公知の方法を使用して、ヒトIgGのヒンジ、CH₂およびCH₃領域を、ChMIRpポリペプチドのN末端またはC末端のいずれかに融合させ得る。別の例において、ヒンジ領域の一部ならびにCH₂およびCH₃領域を、融合し得る。このように産生されたChMIRp Fc融合ポリペプチドは、Protein Aアフィニティーカラム(Pierce、Rockford、IL)を用いて精製され得る。さらに、Fc領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、その融合されていない対応物よりも実質的に大きい、インビボでの半減期を示すことが見い出されている。また、Fc領域への融合は、この融合ポリペプチドのダイマー化/マルチマー化を可能にする。このFc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または治療的品质、循環時間、凝集の減少などのような、特定の質を改善するように変更され得る。

【0208】

ChMIRpポリペプチド誘導体はまた、本発明の範囲に含まれる。本発明のChMIRpタンパク質の共有結合改変は、本発明の範囲内に含まれる。改変体ChMIRpタンパク質は、インビトロ合成によって都合よく調製され得る。このような改変は、精製タンパク質または粗タンパク質の標的アミノ酸残基を、選択した側鎖または末端残基と反応し得る有機誘導体化薬剤と反応させることによって、その分子内に導入され得る。得られた共有結合誘導体は、生物学的活性について重要な残基を同定するためのプログラムにおいて有用である。

【0209】

システイン残基は、最も通常には、 α -ハロアセテート(および対応するアミン)(例えば、クロロ酢酸またはクロロアセトアミド)と反応させて、カルボキシメチル誘導体またはカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システイン残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 α -プロモ-(5-イミダゾイル)プ

ロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルカリマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロメルクリ安息香酸、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

【0210】

ヒスチジン残基は、pH 5.5 ~ 7.0でのジエチルプロカーボネートとの反応によって誘導体化される。なぜなら、この薬剤は、ヒスチジン側鎖に比較的特異的であるからである。p-ブromoフェナシルブロミドもまた有用であり；この反応は、好ましくは、pH 6.0の0.1Mカコジル酸ナトリウム中で行われる。

【0211】

リジン残基およびアミノ末端残基は、コハク酸無水物またはカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤での誘導体化は、リジン残基の電荷を逆転させる効果を有する。 - アミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬としては、イミドエステル（例えば、メチルピコリンイミダート）；ピリドキサルホスフェート；ピリドキサル；クロロ水素化ホウ素；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2,4ペンタンジオン；およびトランスアミナーゼ（グリオキシレートとの触媒反応）が挙げられる。

【0212】

アルギニン残基は、1つまたはいくつかの従来試薬（とりわけ、フェニルグリオキサル、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオンおよびニンヒドリン）との反応によって改変される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高い pK_a に起因して、その反応が、アルカリ条件で行われることを必要とする。さらに、これらの試薬は、リジンの官能基およびアルギニンのアミノ基と反応し得る。

【0213】

チロシン残基の特異的改変は、それ自体、広範に研究されており、特に、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応による、チロシン残基

へのスペクトル標識の導入に特に関心が置かれる。最も通常には、N - アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンが、それぞれ、O - アセチルチロシン種および3 - ニトロ誘導体を形成するために使用される。チロシン残基は、¹²⁵Iまたは¹³¹Iを使用してヨウ素化され、ラジオイムイアッセイ（上記のクロラミンT法が適切である）における使用のための標識タンパク質を調製する。

【0214】

カルボキシル側鎖基（アスパラギン酸またはグルタミン酸）は、カルボジイミド（R¹）（例えば、1 - シクロヘキシル - 3 - （2 - モルホリニル - （4 - エチル）カルボジイミドまたは1 - エチル - 3（4アゾニア4，4 - ジメチルペンチル）カルボジイミド）との反応によって選択的に改変される。さらに、アスパラギン酸残基およびグルタミン残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギン酸残基およびグルタミン酸残基に変換される。

【0215】

二官能性薬剤を用いた誘導体化は、ChMIRpポリペプチド融合ポリペプチドを切断して切断されたポリペプチドを放出および回収するための方法において使用するための、水不溶性の支持体マトリクスまたは表面に対してChMIRpを架橋するために有用である。一般に使用されるか教材としては、1，1 - ビス（ジアゾアセチル） - 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキスクシンイミドエステル（例えば、4 - アジドサリチル酸を有するエステル）、ホモ二官能性のイミドエステル（3，3' - ジチオ（スクシンイミジルプロピオネートのようなジスクシンイミジルエステルを含む）、およびビス - N - マレイミド - 1，8 - オクタンのような二官能性マレイミドが挙げられる。メチル - 3 - [p - アジドフェニルジチオ]プロピオイミデートのような誘導体化剤は、光活性化可能な中間体を生成し、この中間体は、光の存在かで架橋を形成し得る。あるいは、米国特許第3，969，287号；同第3，691，016号；同第4，195，128号；同第4，247，642号；同第4，229，537号；および同第4，330，440号に記載される、反応性の水不溶性マトリクス（例えば、シアノゲンプロミド活性化炭水化物）および反応性の基質は、タンパク質の固定に使用される。

【0216】

グルタミン残基およびアスパラギン残基は、しばしば対応するグルタミル(グルタミン酸)残基およびアスパルチル(アスパラギン酸)残基へと脱アミド化される。あるいは、これらの残基は、穏和な酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も、本発明の範囲内にある。

【0217】

他の改変としては、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリン残基またはスレオニン残基の水酸基のリン酸化、リジン、アルギニンのアミノ酸およびヒスチジンの側鎖のメチル化(Creighton, T. E. Proteins: Structure and Molecule Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86, 1983)、N末端アミンのアセチル化、およびいくつかの場合において、C末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。そのような誘導体化は、化学的に改変されたChMIRpポリペプチド組成物であり、その組成物において、ChMIRpポリペプチドは、ポリマーに結合している。選択されるポリマーは、代表的に、水溶性であり、その結果、付着するそのタンパク質は、水性環境下(例えば、生理学的な環境下)では沈澱しない。選択されるポリマーは、通常、単一の反応基(たとえば、アシル化のための活性エステルまたはアルキル化のためのアルデヒド)であり、その結果、重合の程度は、本発明の方法において提供されるように制御され得る。

【0218】

このポリマーは、任意の分子量のものであり得、そして分岐していても分岐していなくてもよい。このポリマーは各々、代表的に、2kDaから約100kDaの間の平均分子量を有する(ここでは、用語「約」とは、水溶性ポリマーの調製物においては、いくつかの分子が、言及された分子量よりも多いか、いくらか少ないことをいう)。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5kDaと約50kDaの間、より好ましくは、約12kDaと約40kDaとの間、そして最も好ましくは、約20kDaと約35kDaとの間である。適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N

結合型炭水化物またはO結合型炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレン、グリコール(PEG)(これは、モノ-(C1-C10)、アルコキシ-ポリエチレングリコール、またはアリアルコキシ-ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導するために使用されたPEGの形態を含む)、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン(例えば、低分子量(例えば、約6kDのデキストラン))、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-(N-ビニルピロリジン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、およびビニルアルコール。配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはChMIRpポリペプチド改変体の、共有結合したポリペプチドのマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【0219】

一般に、化学的誘導体化は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に、以下の工程を包含する：(a)配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはChMIRpポリペプチド改変体が、1以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子(例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体)とポリペプチドを反応させる工程、および(b)反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子のタンパク質に対する比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。1実施形態において、ChMIRpポリペプチド誘導体は、アミノ末端の単一ポリマー分子部分を有し得る。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

【0220】

ChMIRpポリペプチドのPEG化(pegylation)は、当該分野で公知の任意のペギル化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Focus on Growth

h Factors 3:4-10、1992；欧州特許第0154316号および0401384号。例えば、PEG化は、以下に記載するように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。

【0221】

本明細書における使用のために特に好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（略称PEG）である。本明細書において使用されるように、ポリエチレングリコールとは、他のタンパク質を誘導体化させるために使用されてきた、PEGの任意の形態（例えば、モノ（C1-C10）アルコキシ-ポリエチレングリコールまたはアリアルコキシ-ポリエチレングリコール）を包含することが意味される。PEGは、広範な分子量で入手可能な、直鎖状または分枝状の中性のポリエーテルであり、水および多くの有機溶媒に可溶性である。PEGは、水中に存在する場合、他のポリマーまたはペプチドを排除するのに有効であり、これは、主に、その高い動的な鎖可動性および親水性性質により、したがって、他のタンパク質またはポリマー表面に結合した場合に、水のシェルまたは水和球（hydration sphere）を形成する。PEGは、非毒性であり、非免疫原性であり、そして内用消費に食品医薬庁（FDA）に承認されている。

【0222】

PEGに結合体化されたときにタンパク質または酵素は、動物に投与した場合に、生体活性、非抗原性特性およびクリアランス速度の減少を示した。F.M. Veroneseら、Preparation and Properties of Monomethoxypoly(ethylene glyco.)-modified Enzymes for Therapeutic Applications, J.M. Harris編、Poly(Ethylene Glycol Chemistry - Biotechnical and Biomedical Applications 127-36、1992（本明細書中に参考として援用される）。これは、免疫系による認識の阻止における、PEGの排除特性に起因する。さらに、PEGは、タンパク質吸着を減少させ、血液適合性を改善するための、表面改変手段に広範に使用されている。S.

W. Kimら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 516:116-30 1987; Jacobsら、Artif. Organs 12:500-501, 1988; Parkら、J. Poly. Sci, Part A 29:1725-31, 1991 (本明細書中で参考として援用される)。疎水性ポリマー表面 (例えば、ポリウレタンおよびポリスチレン) は、PEG (MW 3,400) のグラフト化によって改変され、非トロンボゲン形成性表面として使用されている。これらの研究において、表面特性 (接触角) は、PEGの水和効果に起因して、親水性表面とより一致した。より重要なことに、タンパク質 (アルブミンおよび他の血漿タンパク質) の吸着は、非常に減少され、これは、PEGの高い鎖可動性、水和球およびタンパク質排除特性から生じる。

【0223】

PEG (MW 3,4000) は、表面固定研究 (Parkら、J. Biomed. Mat. Res. 26:739-45, 1992) において最適なサイズとして決定され、一方、PEG (MW 5,000) は、タンパク質抗原性の減少において最も有利であった (F. M. Veroneseら、J. M. Harris編、Poly (Ethylene Glycol) Chemistry - - Biotechnical and Biomedical Applications 127-36、前出)。

【0224】

一般に、化学誘導体化は、生物学的に活性な物質を活性化ポリマー分子と反応させるために使用される任意の適切な条件下で行われ得る。PEG化ChMIRpポリペプチドを調製するための方法は、一般に以下の工程を包含する：(a) ChMIRpポリペプチドが、1以上のPEG基に結合されるような条件下でポリペプチドをポリエチレングリコール (例えば、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体) と反応させる工程、および (b) 反応生成物を得る工程。一般に、アシル化反応に最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、PEG：タンパク質の比が大きいほど、ポリペグ化生成物の割合が高くなる。

【0225】

好ましい実施形態において、ChMIRpポリペプチド誘導体は、N末端で単一のPEG部分を有する。米国特許第8,234,784号(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

【0226】

別の実施形態において、ChMIRpポリペプチドは、ビオチンに化学的に連結され得る。次いで、このビオチン/Cdk11ポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、その結果、4価のアビジン/ビオチン/Cdk11ポリペプチド分子が得られる。ChMIRpポリペプチドはまた、ジニトロフェノール(DNP)またはトリニトロフェノール(TNP)に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗-DNPまたは抗-TNP-IgMと共に沈殿し、10価の十量体の結合体を形成する。

【0227】

一般に、本発明のChMIRpポリペプチド誘導体の投与によって緩和または調節され得る状態としては、ChMIRpポリペプチドについて本明細書中で記載される状態が挙げられる。しかし、本明細書中に開示されるChMIRpポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較して、さらなる活性、増強または減少された生物学的活性、または他の特徴(例えば、増加または減少された半減期)を有し得る。

【0228】

(マイクロアレイ)

DNAマイクロアレイ技術が、本発明に従って利用され得ることは明らかである。DNAマイクロアレイは、固体支持体(例えば、ガラス)上に配置された、核酸の微小の高密度アレイである。このアレイ内の各セルまたはエレメントは、単一種のDNAの多くのコピーを有し、このDNAは、その同族のmRNAに対するハイブリダイゼーションのための標的として作用する。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、最初に、mRNAが、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素的に変換される。この材料を、マイクロアレイにハイブリダイズさせ、そして未結合cDNAを洗浄により除去する。次いで、アレイ上に提示される別々の遺伝子の発

現を、各標的DNAに特異的に結合された標識cDNAの量を定量することによって可視化する。このようにして、数千の遺伝子の発現を、生物学的材料の単一のサンプルから、高スループットの並行様式で定量し得る。

【0229】

この高スループット発現プロファイリングは、本発明のChMIRp分子に関する広範な適用を有する。これらの適用としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：治療用標的としてのChMIRp疾患関連遺伝子の同定および確証；ChMIRp分子およびそのインヒビターの分子毒性研究；集団の層別化および臨床試験用の代理マーカーの作製；ならびに高スループットスクリーニング（HTS）における選択的な化合物の同定を補助することによるCdk11関連小分子薬物発見の増大。

【0230】

（選択的結合因子）

本明細書中で使用される場合、用語「選択的結合因子」とは、1以上のChMIRpポリペプチドに対する特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに小分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的ポリペプチド選択的結合因子は、ChMIRpポリペプチドの特定の部分を結合し得、それによって、ChMIRpポリペプチドの活性または機能を阻害し得る。

【0231】

ChMIRpポリペプチドを結合する選択的結合因子（例えば、抗体および抗体フラグメント）は、本発明の範囲内にある。抗体は、ポリクローナル（単一特異的なポリクローナルを含む）抗体、モノクローナル抗体（mAb）、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体（例えば、CDRグラフト化抗体）、ヒト抗体、単鎖抗体および/または二特異性抗体、ならびにそれらのフラグメント、改変体または誘導体であり得る。抗体フラグメントは、ChMIRpポリペプチドのエピトープに結合する抗体の部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素的切断によって生成される、FabフラグメントおよびF(ab'

)フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術(例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現)によって精製されるフラグメントが挙げられる。

【0232】

ChMIRpポリペプチドに対して指向されるポリクローナル抗体は、一般に、ChMIRpおよびアジュバントの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって、動物(例えば、ウサギまたはマウス)において産生される。ChMIRpポリペプチドあるいはその改変体、フラグメントまたは誘導体を、キャリアタンパク質に結合体化することが有用であり得、このキャリアタンパク質は、免疫される種において免疫原性である(例えば、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またはダイズトリプシンインヒビター)。また、凝集化因子(例えば、ミョウバン)も、免疫応答を増強するために使用される。免疫後、動物を採血し、そして血清を、抗ChMIRp抗体力価についてアッセイする。

【0233】

ChMIRpに対して指向されるモノクローナル抗体は、培養物中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するための適切な方法の例としては、Kohlerら、Nature 256:495-497、1975のハイブリドーマ法、およびKozbor, J. Immunol. 133:3001、1984; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51~63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)のヒトB細胞ハイブリドーマ法が挙げられる。

【0234】

ChMIRpポリペプチドと反応性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。

【0235】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤としての使用のために改変され得る。

1つの実施形態は、「キメラ」抗体であり、ここで、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と、同一であるかまたは相同であり、鎖の残りの部分は、別の種に由来するかまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と、同一であるかまたは相同である。このような抗体のフラグメントもまた、それらが、所望の生物学的活性を示す限り、含まれる(米国特許第4,816,567号; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855、1985(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。

【0236】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である(米国特許第5,585,089号および同第5,693,762号を参照のこと)。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源由来のそのヒト化抗体に1以上のアミノ酸残基が導入されている。ヒト化は、例えば、齧歯目の相補的決定領域(CDR)の少なくとも一部を、ヒト抗体の対応する領域で置換することによる、当該分野で記載される方法(Jonesら、Nature 321:522-52、1986; Riechmannら、Nature 332:323-327、1988; Verhoeyenら、Science 239:1534-1536、1988)によって、行われ得る。

【0237】

ChMIRpポリペプチド、フラグメント、改変体および/または誘導体を結合する、完全ヒト抗体もまた、本発明に含まれる。このような抗体は、必要に応じてキャリアに結合体化されたChMIRp抗原(すなわち、少なくとも6個連続するアミノ酸を有する)で免疫することによって産生される。内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物(例えば、マウス)を使用する。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:2551-2555、1993; Jakobovitsら、Nature 362:255-258

、1993; Bruggermannら、Year in Immuno. 7: 33、1993を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をその中でコードする内因性遺伝子座を不能とし、ヒト重鎖および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座を、そのゲノム内に導入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物（完全未満の補体の改変を有する）を交雑育種して、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得る。免疫原を投与した場合、これらのトランスジェニック動物は、これらの抗原に免疫特異的な可変領域を含む、（例えば、マウスよりもむしろ）ヒトのアミノ酸配列を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US 96/05928およびPCT/US 93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、PCT出願番号PCT/US 91/245、PCT/GB 89/01207、ならびにEP 546073 B1およびEP 546073 A1に記載される。ヒト抗体はまた、本明細書中に記載されるような、宿主細胞における組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞における発現によって産生される。

【0238】

ヒト抗体はまた、本明細書において記載されるような、宿主細胞における組換えDNAの発現によるか、またはハイブリドーマ細胞における発現により産生され得る。代替的な実施形態において、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーにおいて生成され得る（Hoogenboomら、J. Mol. Biol. 227: 381, 1991; Marksら、J. Mol. Biol. 222: 581, 1991）。これらのプロセスは、繊維状バクテリオファージの表面上での抗体レパートリーのディスプレイ、引き続いて、選択された抗原に対するそれらの結合によるファージの選択によって免疫選択を模倣する。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US 98/17364（これは、このようなアプローチを用いたMPL-レセプターおよびmsk-レセプターに対する高親和性でかつ機能的なアゴニスト抗体の単離を記載する）に記載される。

【0239】

キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、およびヒト化抗体は、代表的には、組換

え方法により生成される。これらの抗体をコードする核酸は、宿主細胞に導入され、そして本明細書中に記載される材料および方法を用いて発現される。好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）において発現される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、宿主細胞における組換えDNAの発現によるか、または本明細書中に記載のハイブリドーマ細胞における発現により生成され得る。

【0240】

診断適用に関しては、抗ChMIRp抗体は、代表的には検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを生じ得る任意の部分である。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S または ^{125}I ）、蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミンもしくはルシフェリン）；または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る。Bayerら、Meth. Enz. 184:138-163, 1990を参照のこと。

【0241】

本発明の抗ChMIRp抗体は、ChMIRpポリペプチドの検出および定量について、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的サンドイッチアッセイおよび間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ（Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）において用いられ得る。抗体は、使用されるアッセイ方法に適切な親和性でChMIRpポリペプチドを結合する。

【0242】

次いで、細胞溶解物または精製ChMIRpタンパク質改変体の活性は、所望の特徴についての適切なスクリーニングアッセイにおいてスクリーニングされる。例えば、リガンドに対する結合親和性またはChMIRpタンパク質の免疫学的特徴（例えば、所定の抗体に対する親和性）の変化は、競合型のイムノアッセイにより測定される。免疫調節活性の変化は、適切なアッセイによって測定され

る。このようなタンパク質特性の改変は、酸化還元または熱安定性、疎水性、タンパク質分解に対する感受性またはキャリアとの凝集傾向またはマルチマーへの凝集傾向として、当業者に周知の方法によりアッセイされる。競合結合アッセイは、限定された量の抗ChMIRp抗体との結合について試験サンプル分析物（ChMIRpポリペプチド）と競合する標識された標準物質（例えば、ChMIRpポリペプチドまたはその免疫学的に反応性の部分）の能力に依存する。試験サンプル中のChMIRpポリペプチドの量は、この抗体に結合する標準物質の量に逆比例する。結合する標準物質の量の測定を容易にするために、この抗体は、一般に、競合の前または後に不溶化され、その結果、この抗体に結合する標準物質および分析物は、結合しないままの標準物質および分析物から簡単に分離され得る。

【0243】

サンドイッチイムノアッセイは、代表的には、2つの抗体（各々、検出され、そして/または定量されるタンパク質の異なる免疫原性部分、エピトープに結合し得る）の使用に関する。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル分析物は、代表的には、固体支持体に固定化された第1の抗体、その後第2の抗体が分析物に結合し、このようにして不溶性の3部分で構成される複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、それ自体検出可能な部分で標識され得るか（例えば、直接サンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定され得る（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）であり、この場合、この検出可能な部分は酵素である。

【0244】

選択的結合因子（抗ChMIRp抗体を含む）はまた、インビボ画像化のために有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物に（好ましくは、血流に）投与され得、そして宿主における標識化抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、動物において（核磁気共鳴、放射線学または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかで）検出可能な任意の部分で標識され得る。

【0245】

選択的結合因子（本発明の抗ChMIRp抗体を含む）は、治療剤として使用され得る。これらの治療的抗体は、一般に、それらがChMIRpポリペプチドの生物学的活性の少なくとも1つを増強または減少するかのいずれかであるという点で、それぞれ、アゴニストまたはアンタゴニストである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、ChMIRpポリペプチド、フラグメント、改変体および/または誘導体に特異的に結合し得、そしてChMIRpポリペプチドの機能的活性をインビボまたはインビトロで阻害または排除し得る抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、アンタゴニスト抗体は、ChMIRpポリペプチドの機能的活性を少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは90%、そして最も好ましくは100%阻害する。アゴニスト抗ChMIRp抗体およびアンタゴニスト抗ChMIRp抗体は、以下に記載のスクリーニングアッセイにより同定される。

【0246】

本発明はまた、ChMIRp選択的結合因子（例えば、抗体）および生物学的サンプルにおいてChMIRpポリペプチドレベルを検出するに有用な他の試薬を含むキットに関する。このような試薬としては、以下が挙げられ得る：第二活性、検出可能な標識、ブロッキング血清、陽性コントロールサンプルおよび陰性コントロールサンプル、ならびに検出試薬。

【0247】

ChMIRpポリペプチドは、「発現クローニング」ストラテジーを用いて、ChMIRp結合パートナーをクローニングするために使用され得る。放射性標識（¹²⁵ヨウ素）ChMIRpポリペプチドまたは親和性/活性タグ化ChMIRpポリペプチド（例えば、Fc部分またはアルカリホスファターゼの融合物）を結合アッセイに用いて、ChMIRp結合パートナーを発現する細胞型または細胞株または組織を同定し得る。このような細胞または組織から単離されたRNAは、cDNAに変換され、哺乳動物発現ベクターにクローニングされ、そして哺乳動物細胞（例えば、COS細胞または293細胞）にトランスフェクトされて、発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射性標識されたか、またはタ

グ化されたChMIRpポリペプチドは、親和性リガンドとして用いられて、ChMIRp結合パートナーを発現するこのライブラリー中の細胞のサブセットが同定および単離され得る。次いで、これらの細胞からDNAが単離され、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトされて、第2の発現ライブラリーが作製され得る。この第2の発現ライブラリーにおいて、ChMIRp結合パートナーを発現する細胞の割合は、最初のライブラリーの数倍高い。この富化プロセスは、ChMIRp結合パートナーを含む単一の組換えクローンが単離されるまで、繰り返し反復され得る。ChMIRpレセプターの単離は、ChMIRpポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、ChMIRp結合パートナー、サイクリン、Cdkインヒビター、Cdk補因子、抗CdkII結合パートナー抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0248】

(診断キットおよび試薬)

本発明は、レセプターおよび/または抗体またはリガンドの存在を検出するための種々の診断キットおよび方法におけるChMIRpポリペプチド、そのフラグメント、ペプチド、結合組成物、ならびにその融合産物の使用を企図する。代表的には、このキットは、ChMIRpペプチドもしくは遺伝子セグメント、またはその一方もしくは他方を認識する試薬(例えば、結合試薬)を含む区画を有する。

【0249】

ChMIRpに対するレセプターまたは試験化合物の結合親和性を決定するためのキットは、代表的には、レセプター試験化合物; 標識化合物(例えば、このタンパク質に対する公知の結合親和性を有する抗体); またはリガンドの供給源(天然に存在するか、または組換え)、および結合した標識化合物から遊離の標識化合物を分離するための手段(例えば、リガンドもしくはそのレセプターを固定化するための固相)を含む。一旦化合物がスクリーニングされると、リガンドまたはそのレセプターに対する適切な結合親和性を有する化合物を適切な生

物学的アッセイ（当該分野で周知）において評価して、これらの化合物がChMIRp活性のアゴニストまたはアンタゴニストとしてレセプターに働き得るか否かを決定し得る。組換えレセプターポリペプチドの利用可能性はまた、このようなアッセイを較正するためのまたは陽性コントロールサンプルとしての十分に規定された標準物質を提供する。

【0250】

例えば、サンプル中のChMIRpの濃度を決定するための好ましいキットは、代表的には、標的に対する公知の結合親和性を有する標識化合物（例えば、抗体）、リガンドまたはレセプターの供給源（天然に存在するか、または組換え）、および結合した標識化合物を遊離の標識化合物から分離するための手段（例えば、リガンドまたはレセプターを固定化するための固相）を含む。通常、試薬、および使用または廃棄のための説明書を含む区画が提供される。

【0251】

抗体（リガンドまたはレセプターに特異的な抗原結合フラグメントを含む）またはフラグメントは、リガンド、レセプターおよび/またはそのフラグメントの上昇したレベルの存在を検出するための診断適用において有用である。このような診断アッセイは、溶解物、生細胞、固定細胞、免疫蛍光、細胞培養物、体液を使用し得、そしてさらに、血清などにおいてリガンドまたはレセプターに関連する抗原の検出を含む。診断アッセイは、均質系（遊離の試薬と抗原複合体との間の分離工程が必要ない）であっても、不均質系（分離工程を必要とする）であってもよい。種々の市販のアッセイが存在し、これらとしては、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）、酵素イムノアッセイ（EIA）、酵素複合イムノアッセイ技術（enzyme-multiplied immunoassay technique）（EMIT）、基質標識蛍光イムノアッセイ（SLFIA）などが挙げられる。例えば、非標識抗体は、標識され、かつリガンドもしくはレセプターもしくはその特定のフラグメントに対する1次抗体を認識する二次抗体を用いることにより使用され得る。類似のアッセイはまた、文献中で広範に議論されている（例えば、Harlow and Lane（1988）Antibodies：A Labo

ratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと)。

【0252】

抗イディオタイプ抗体は、リガンドまたはレセプターに対する抗体の存在を診断するために類似の用途を有し得、このようにして種々の異常状態を診断し得る。例えば、リガンドまたはレセプターの過剰生成は、異常な生理的状态(特に種々の炎症状態またはアレルギー状態において)の診断であり得る種々の免疫学的反応の生成を生じ得る。

【0253】

頻繁には、診断アッセイについての試薬は、アッセイの感度を最適化するためにキット中で供給される。本発明に関しては、アッセイの性質、プロトコル、および標識、標識抗体もしくは非標識抗体のいずれかまたは標識リガンドもしくはレセプターに依存して、提供される。これは、通常、他の付加物(例えば、緩衝液、安定化剤、シグナル生成に必要な材料(例えば、酵素の基質など))と関連している。好ましくは、キットは、適正な使用および使用後の内容物の廃棄についての説明書もまた含む。代表的には、このキットは、各有用な試薬のための区画または容器を有する。望ましくは、この試薬は、凍結乾燥粉末として提供され、ここで、この試薬は、このアッセイを実行するための試薬の適切な濃度を提供する水性媒体中で再構成され得る。

【0254】

薬物スクリーニングおよび診断アッセイの前述の構成成分は、改変されずに使用されてもよいし、種々の方法で改変されても良い。例えば、標識化は、直接的または間接的に検出可能なシグナルを提供する部分を共有結合または非共有結合することにより達成され得る。これらのアッセイのいずれにおいても、リガンド、試験化合物、レセプター、またはそれらに対する抗体は、直接的または間接的にかのいずれかで標識され得る。直接標識化の可能性としては、以下の標識群が挙げられる：放射性標識(例えば、 ^{125}I)、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼのような酵素(米国特許第3,645,090号)、および蛍光強度の変化、波長シフトまたは蛍光分極をモニターし得る蛍光標識(米国特許

第3,940,475号)。間接標識化の可能性としては、以下が挙げられる：1つの成分のビオチン化に続き、上記の標識基の1つに結合したアビジンへの結合。

【0255】

結合リガンドを遊離リガンドから分離する方法、あるいは結合試験化合物から遊離試験化合物を分離する方法もまた多数存在する。このリガンドまたはレセプターは、おそらく界面活性剤または関連する脂質とともに、種々のマトリックスに固定化され得、続いて洗浄され得る。適切なマトリックスとしては、ELISAプレート、フィルター、およびビーズのようなプラスチックが挙げられる。リガンドまたはレセプターをマトリックスに固定化する方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：プラスチックへの直接接着、捕捉抗体の使用、化学的カップリング、およびビオチン-アビジン。このアプローチの最後の工程は、いくつかの方法（例えば、ポリエチレングリコールのような有機溶媒または硫酸アンモニウムのような塩を利用する方法を含む）のいずれかにより抗原/抗体複合体の沈降を含み得る。他の適切な分離技術としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Rattleら、Clin.Chem., 30:1457-1461, 1984に記載される蛍光抗体磁性可能粒子法、および米国特許第4,659,6178号（本明細書中に参考として援用される）に記載される二重磁性粒子分離。

【0256】

タンパク質またはそれらのフラグメントを種々の標識に連結するための方法は、文献中に広範に報告されており、本明細書中で詳細に議論する必要はない。この技術の多くは、ペプチド結合を形成するためのカルボジイミドまたは活性エステルの使用、メルカプト基と活性化ハロゲン（例えば、クロロアセチル）との反応によるチオエステルの形成、活性化オレフィン（例えば、マレイミド）、連結などのいずれかによる活性化カルボキシル基の使用を含む。融合タンパク質はまた、これらの適用における使用を見出す。

【0257】

本発明の核酸分子は、染色体に対するChMirp遺伝子または関連遺伝子の

位置をマッピングするために使用され得る。マッピングは、当該分野で公知の技術（例えば、PCR増幅、インサイチュハイブリダイゼーション、およびFISH）により行われ得る。

【0258】

本発明はまた、変異したChMIRp遺伝子の存在に関連した疾患またはこの疾患に対する感受性を検出するための診断アッセイの一部としてのChMIRp遺伝子の使用に関する。このような疾患は、ChMIRpの異常な発現（例えば、腫瘍および癌のような異常な細胞増殖）に関する。

【0259】

ヒトChMIRp遺伝子において変異を有する個体は、種々の技術によりDNAレベルで検出され得る。診断のための核酸は、例えば、血液、尿、唾液、組織生検および剖検材料のような患者の細胞から得られ得る。ゲノムDNAを検出のために直接用いてもよいし、分析前にPCRを用いて酵素的に増幅してもよい（Saikiら, Nature, 324:163-166, 1986）。RNAまたはcDNAはまた、同じ目的で使用され得る。例として、ChMIRpポリペプチドをコードする核酸に相補的なPCRプライマーは、ChMIRp変異を同定および分析するために用いられ得る。例えば、欠失および挿入は、正常遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズの変化により検出され得る。点変異は、増幅したDNAを、放射性標識したChMIRp RNAあるいは放射性標識したChMIRpアンチセンスDNA配列にハイブリダイズすることにより同定され得る。完全に適合した配列は、RNaseA消化によるか、または融解温度の差異により不一致二重鎖から区別され得る。

【0260】

DNA配列差異に基づく遺伝子試験は、変性剤を伴っても伴わなくても、ゲル中のDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化の検出により達成され得る。小さな配列欠失および挿入は、高分解能ゲル電気泳動により可視化され得る。異なる配列のDNAフラグメントは、変性したホルムアミド勾配ゲル上でのフラグメントに対して区別され得る。ここで、異なるDNAフラグメントの移動度は、それらの特異的融解温度または部分的融解温度に従って異なる位置でゲル中で妨害

される（例えば、Myersら, Science, 230:1242, 1985）。

【0261】

特異的位置での配列変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、RNaseおよびS1保護）または化学的切断方法により明らかにされ得る（例えば、Cottonら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:4397-4401, 1985）。

【0262】

従って、特異的DNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNase保護、化学的切断、直接DNA配列決定または制限酵素の使用（例えば、制限フラグメント長多型（RFLP））およびゲノムDNAのサザンブロットティングのような方法により達成され得る。

【0263】

より多くの従来のゲル電気泳動およびDNA配列決定に加えて、変異はまた、インサイチュ分析により検出され得る。

【0264】

本発明はまた、種々の組織におけるChMIRpタンパク質の変化したレベルを検出するための診断アッセイに関する。なぜなら、正常コントロール組織サンプルと比較して、タンパク質の過剰発現は、疾患（例えば、腫瘍、脳マラリアおよび遺伝性周期熱症候群）の存在または疾患に対する感受性を検出し得るからである。宿主から得られたサンプル中のChMIRpポリペプチドのレベルを検出するために用いられるアッセイは、当業者に周知であり、そして以下が挙げられる：ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析、ELISAアッセイおよび「サンドイッチ」アッセイ。ELISAアッセイ（Coliganら, Current Protocols in Immunology, 1(2), Chapter 6, 1991）は、部分的に、ChMIRp抗原に特異的な抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）の調製を包含する。さらに、レポーター抗体が、モノクローナル抗体に対して調製される。検出可能な試薬（例えば、放射活性、蛍光、またはこの例では西洋ワサビペルオキシダーゼ酵

素)がレポーター抗体に結合される。ここでサンプルは、宿主から取り出され、そしてサンプル中のタンパク質を結合する固体支持体(例えば、ポリスチレンディッシュ)上でインキュベートされる。次いで、このディッシュ上の任意のフリーのタンパク質結合部位は、ウシ血清アルブミン(BSA)のような非特異的タンパク質とともにインキュベートすることにより、覆われる。次に、モノクローナル抗体は、ポリスチレンディッシュに結合した任意のChMIRpタンパク質にモノクローナル抗体が結合する時間の中に、ディッシュ中でインキュベートされる。全ての非結合モノクローナル抗体は、緩衝液で洗い流される。西洋ワサビペルオキシダーゼに連結したレポーター抗体は、ここでディッシュに入れられ、ChMIRpに結合した任意のモノクローナル抗体に対するレポーター抗体の結合を生じる。次いで、結合していないレポーター抗体は、洗い流される。次いで、ペルオキシダーゼ基質がディッシュに添加され、そして所定の時間で発色した呈色の量は、標準曲線に対して比較した場合、所定の用量の患者サンプル中に存在するChMIRpポリペプチドの量の測定値である。

【0265】

競合アッセイが用いられ得、ここで、ChMIRpに特異的な抗体は、固体支持体に結合され、そして標識されたChMIRpおよび宿主由来のサンプルが、固体支持体に対して分配され、そして検出された標識の量(例えば、液体シンチレーションクロマトグラフィーによる)は、サンプル中のChMIRpの量と相関され得る。さらに、上記のサンドイッチイムノアッセイはまた、生物学的サンプル中のChMIRpリガンドの量を定量するために行われ得る。

【0266】

本発明の配列は、染色体同定およびマッピングについて評価可能である。この配列は、個々のヒト染色体上の特定位置に特異的に標的化され得、そしてこの位置とハイブリダイズし得る。さらに、遺伝子が位置し得る染色体上での特定の部位を同定することが現在必要である。実際の配列データ(反復多型)に基づく染色体マーキング試薬は、染色体位置をマーキングするには現在ほとんど利用可能ではない。本発明に従う染色体に対するDNAのマッピングは、配列と、疾患と関連する遺伝子とを相関させることにおいて重要な第一の工程である。

【0267】

簡潔には、配列は、cDNAからPCRプライマー（好ましくは、15～25 bp）を調製することにより染色体にマッピングされ得る。この配列の3'非翻訳領域のコンピューター分析は、ゲノムDNA中の1つのエクソンを超えてまたがらない、従って、増幅プロセスを複雑にするプライマーを迅速に選択するために用いられる。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために用いられる。このプライマーに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが増幅フラグメントを生じる。

【0268】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定のDNAを割り当てるための迅速な手順である。同じオリゴヌクレオチドプライマーとともに本発明を用いると、同様な様式で、特定の染色体またはより大きなゲノムクローンのプールからフラグメントのパネルを用いて下位の位置決定が達成され得る。その染色体に対してChMIRPをマッピングするために同様に用いられ得る他のマッピングストラテジーとしては、以下が挙げられる：インサイチュハイブリダイゼーション、フローソーティングされて標識された（labeled flow-sorted）染色体での予備スクリーニングおよび染色体特異的cDNAライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる予備選択。

【0269】

cDNAクローンの中期染色体スプレッドへの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）を用いて、一工程で正確な染色体位置を提供し得る。この技術は、500または600塩基程度の長さのcDNAとともに使用され得る；しかし、2,000bpより大きなクローンは、簡単な検出のために十分なシグナル強度で独特の染色体位置に結合するという尤度がより高い。FISHは、ゲノムクローンまたは発現配列タグ（EST）が由来するクローンの使用を必要とし、そして大きくなるほど、良好になる。例えば、2,000bpは好ましく、4,000bpはより好ましく、そして4,000を超えるものは、妥当な割合の時間で良好な結果を得るためにはおそらく必要でない。この技術の総説については、Vermaら、Human Chromosomes: A Manual

l of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988) を参照のこと。

【0270】

一旦、配列が正確な染色体の位置にマッピングされると、この染色体上のこの配列の物理的位置は、遺伝的マップデータと関連され得る。このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Library を介してオンラインで入手可能) において見出される。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関連は、連鎖解析 (物理的に隣接する遺伝子の共同相続 (coinheritance)) を通して同定される。

【0271】

次に、罹患した個体と罹患していない個体との間の cDNA またはゲノム配列における差異を決定することが必要である。変異が、罹患した個体のうちのいくつかまたは全てにおいて観察されるが、いずれの正常な個体においても観察されない場合、この変異は、おそらくこの疾患の原因となる因子である。

【0272】

物理的マッピングおよび遺伝的マッピング技術の現在の分解能では、この疾患に関連する染色体領域に正確に位置する cDNA は、50 と 500 との間の潜在的な原因となる因子のうちの 1 つであり得る。(これは、1メガベースのマッピング分解能および 20 kb あたり 1 つの遺伝子を想定する)。

【0273】

本発明の核酸分子はまた、ChMIRp 発現のアンチセンスインヒビターとしても有用である。このような阻害は、発現制御配列 (三重らせん形成) または ChMIRp mRNA に相補的でありかつハイブリダイズする核酸分子によってもたらされ得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示される ChMIRp の配列を使用して、利用可能な技術によって設計され得る。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物体における ChMIRp ポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供する。

【0274】

本発明の核酸分子は、遺伝子治療に使用され得る。インビボでChMIRpを発現する核酸分子は、細胞または生物体におけるこのポリペプチドの影響に関連する情報を提供する。それ自体では生物学的に活性なポリペプチドをコードしないChMIRp核酸分子、フラグメント、および/または誘導体は、定性的または定量的のいずれかで、哺乳動物組織または体液サンプルにおけるChMIRp DNAまたは対応するRNAの存在について試験するための診断アッセイにおいてハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0275】

ChMIRpポリペプチドフラグメント、改変体、および/または誘導体は、生物学的に活性であろうとなかろうと、ChMIRpポリペプチドに結合する抗体を調製するために有用である。この抗体は、インビボおよびインビトロでの診断目的に使用され得る（例えば、体液または細胞サンプル中のChMIRpポリペプチドの存在を検出するための標識化形態において）。この抗体は、ChMIRpポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を減少またはブロックようにChMIRpポリペプチドに結合し得るか、または活性を増大するようにポリペプチドに結合し得る。

【0276】

（遺伝的に操作された非ヒト動物）

マウス、ラット、または他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれ、ここで、この遺伝子はChMIRpポリペプチドをコードし、この哺乳動物のこの遺伝子の天然の形態または異種ChMIRpポリペプチド遺伝子のいずれかが、この哺乳動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」哺乳動物を作製する。このようなトランスジェニック哺乳動物は、米国特許第5,489,743号およびPCT公開番号WO94/28122号に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

【0277】

マウス、ラット、または他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家

畜のような非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれ、ここで、ネイティブのChMIRpポリペプチドをコードする遺伝子は分裂(「ノックアウト」)され、この遺伝子の発現レベルは、有意に減少するか、または完全に消滅される。このような哺乳動物は、米国特許第5,557,032号(本明細書中に参考として援用される)に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

【0278】

本発明は、非ヒト動物をさらに含み、ここで、本発明のChMIRpポリペプチドのうちの1つ以上についてのプロモーターは、(以下に記載されるような相同的な組換え方法を使用して)活性化されるかまたは不活化されるかのいずれかであり、ネイティブのChMIRpポリペプチドの1つ以上の発現のレベルを変更する。

【0279】

これらの非ヒト動物は、薬物候補物のスクリーニングのために使用され得る。動物におけるこの薬物候補物の影響が測定され得る。例えば、薬物候補物は、ChMIRpポリペプチド遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生されるChMIRpポリペプチドまたはフラグメントの量は、哺乳動物をこの薬物候補物に曝露した後に測定され得る。特定の実施形態において、哺乳動物についての薬物候補物の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、この遺伝子の発現を減少させる薬物候補物の能力または病理学的状態を予防または阻害するその能力を試験し得る。別の例において、ポリペプチドのフラグメントのような特定の代謝産物の産生は、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少させる薬物候補物の能力または病理学的状態を予防または阻害するその能力を試験し得る。

【0280】

(内部移行タンパク質)

TATタンパク質配列(HIV由来)が、細胞膜の脂質二分子層成分を標的化することによってタンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。

例えば、Falwellら、Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 664 - 668、1994を参照のこと。例えば、HIV TATタンパク質の11アミノ酸の配列(YGRKKRRQRRR; 配列番号16) (「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT PDTと称される)は、 β -ガラクトシダーゼおよびp27 Kipのような大きな生理活性タンパク質の、細胞質膜および細胞の核膜を横切る送達を媒介するように示される。Schwarzeら、Science 285: 1569 - 1572, 1999; およびNagaharaら、Nature Medicine, 4: 1449 - 1452, 1998を参照のこと。Schwarzeら (Science, 285: 1569 - 72, 1999)は、TAT PDTおよび β -ガラクトシダーゼの融合に暴露される場合に、培養される細胞が β -gal活性を獲得したことを実証した。マウスへのTAT- β -gal融合タンパク質の注入は、多くの組織(肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織を含む)における β -galの発現を生じる。

【0281】

従って、TATタンパク質配列は、所望のタンパク質またはポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。本発明の状況において、このTATタンパク質配列は、ChMIRpアンタゴニスト(すなわち、抗ChMIRp選択的な結合因子または低分子)のような別の分子に融合され得、そしてChMIRp分子の活性を阻害するために細胞内に投与され得る。所望の場合、ChMIRpタンパク質自体、あるいはChMIRpのペプチドフラグメントまたは改変形態は、上記に記載の手順を使用して細胞に投与するための、このようなタンパク質トランスデューサーに融合され得る。

【0282】

(ChMIRpポリペプチド活性の他の修飾因子についてのアッセイ)

いくつかの状況において、ChMIRpポリペプチドの活性の修飾因子である分子(すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト)を同定することが所望され得る。ChMIRpを調節する天然または合成分子は、以下に記載されるスクリーニングアッセイの1つ以上を用いて同定され得る。このような分子は、インビボ様式またはインビトロ様式のいずれかで、局所または静脈内(iv)注射によ

って、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。「試験分子」とは、ChMIRpポリペプチドに結合し、それによってその活性を調節する能力について評価中の分子をいう。試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは約 10^{-8} M、より好ましくは約 10^{-9} M、そしてなおより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数 (affinity constant) でChMIRpポリペプチドに結合する。

【0283】

ChMIRpポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明に包含される。一般に、ChMIRpポリペプチドは、試験分子のChMIRpポリペプチドへの結合を可能にする条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして結合の程度が測定される。この試験分子は、実質的に精製された形態または粗製混合物中でスクリーニングされ得る。試験分子は、核酸分子、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の有機または無機化合物であり得る。一旦、試験分子のセットがChMIRpポリペプチドに結合すると同定されると、この分子は、ChMIRp活性を増加または減少させるその能力についてさらに評価され得る。

【0284】

試験分子とChMIRpポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形態で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間ChMIRpポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてChMIRpポリペプチドへの結合の程度が、濾過、電気化学発光 (IGENによるECL、ORIGENシステム)、細胞ベースのアッセイまたは免疫アッセイによって決定される。

【0285】

放射活性についての均質アッセイ技術 (SPA; Amersham) および時間分解蛍光 (HTRF, Packard) もまた実施される。結合は、放射性同位体 (^{125}I 、 ^{35}S 、 ^3H)、蛍光色素 (フルオレセイン)、ランタニド (例えば、ユーロピウム (Eu^{3+}) キレーターまたはクリプタート)、またはビ

ピリジル - ルテニウム (Ru^{2+}) 錯体での標識によって検出され得る。標識されたプローブの選択は、使用される検出システムに依存することが理解される。あるいは、ChMIRpポリペプチドは、非標識エピトープタグ (例えば、ビオチン、ペプチド、His6、myc、Fc) を用いて改変され得、そして上記のような検出可能な標識を有するタンパク質 (例えば、ストレプトアビジン、抗ペプチドまたは抗タンパク質抗体) に結合され得る。

【0286】

試験分子とChMIRpポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して直接アッセイされ得る。あるいは、上記のようなエピトープタグを含むChMIRpポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0287】

1つの実施形態において、ChMIRpのアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得、これらは、ChMIRpと相互作用してその活性を調節する。ChMIRpの潜在的なタンパク質アンタゴニストとしては、このポリペプチドの活性領域に結合し、そしてChMIRpの少なくとも1つの活性を阻害または排除する抗体が挙げられる。ChMIRpポリペプチドの発現を調節する分子は、ChMIRpポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、またはポリペプチドの発現を指向または制御する核酸配列に対して相補的である核酸分子、および発現のアンチセンス制御因子として作用する核酸分子を含み得る。

【0288】

ChMIRpポリペプチドが、結合パートナー (例えば、レセプターまたはリガンド) との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のアッセイが、対応する結合パートナーへのChMIRpポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、その結合パートナーへのChMIRpポリペプチドの結合の速度および/または程度を増加または減少させるその能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1つのアッセイにおいて、ChMIRpポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェ

ルの底への付着によって固定される。次いで、放射標識されたChMIRp結合パートナー（例えば、ヨウ素化されたChMIRp結合パートナー）および試験分子は、このウェルに、一つずつ（いずれかの順序で）または同時にのいずれかで添加され得る。インキュベーション後に、このウェルは洗浄され得、そしてシンチレーションカウンターを使用して放射活性について計数し、結合パートナーがChMIRpポリペプチドに結合する程度を決定する。代表的に、分子は、ある範囲の濃度にわたって試験され、そして試験アッセイの1つ以上の要素を欠く一連のコントロールウェルが、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代替は、タンパク質の「位置」を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートのウェルにChMIRpポリペプチド結合パートナーを固定し、試験分子を放射標識したChMIRpポリペプチドと共にインキュベートし、そしてChMIRpの結合の程度を決定する工程）を包含する（例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 1995の第18章を参照のこと）。

【0289】

放射性標識に対する代替として、ChMIRpポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、次いで、ビオチン化されたタンパク質の存在が、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP））（これらは、比色定量的に検出され得る）に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。ChMIRpポリペプチドまたはChMIRp結合パートナーを指向し、そしてビオチンと結合体化されている抗体もまた使用され得、そしてこれはAPまたはHRPに連結した酵素連結ストレプトアビジンとのインキュベーションの後で検出され得る。

【0290】

ChMIRpポリペプチドおよびChMIRp結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、またはこのような不活性な基材の他の型への付着によって固定化され得る。基材 - タンパク質複合体は、相補タンパク質および試

験化合物を含む溶液内に配置され得；インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そしてChMIRpポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、上記の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材 - タンパク質複合体はカラム中に固定され得、そして試験分子および相補タンパク質はこのカラムを通過する。次いで、ChMIRpポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、上記の技術のいずれか（すなわち、放射性標識、抗体結合など）を使用して評価され得る。

【0291】

ChMIRp結合タンパク質とChMIRp結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するのに有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、Biacoreアッセイシステム（Pharmacia, Piscataway, NJ））である。このBiacoreシステムは、製造業者の手順を用いて実施され得る。このアッセイは、本質的に、ChMIRpまたはChMIRp結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（これは、検出器内に位置する）への共有結合に関与する。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得、そして互いに結合する相補タンパク質の量が、センサーチップのデキストランコート側面に物理的に関係する分子の質量の変化に基づいて評価され得；この分子の質量の変化が、検出器システムによって測定される。

【0292】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、ChMIRpポリペプチドとChMIRp結合パートナー複合体との間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、上記のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、上記に記載される通りである。

【0293】

上記のアッセイのようなインビトロアッセイは、ChMIRpとChMIRp結合パートナーによる複合体の形成に対する効果について、多数の化合物を迅速にスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0294】

ChMIRpポリペプチドとChMIRp結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少される化合物はまた、ChMIRpまたはChMIRp結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌ類またはげっ歯類の供給源由来である。その表面でChMIRp結合パートナーを発現する細胞へのChMIRpポリペプチドの結合は、試験化合物の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、ChMIRp結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、上記のタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0295】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、ChMIRpポリペプチド遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるChMIRpポリペプチドまたはフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物についての薬物候補の実際の影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物への特定の影響を有し得る。このような場合に、この遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を防止または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の生成は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少

する薬物候補の能力が試験され得る。

【0296】

酵母ツーハイブリッド系 (Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578-9583, 1991) は、ChMIRpポリペプチドに結合するか、またはこれと相互作用する新規なポリペプチドを同定するために使用され得る。例として、酵母ツーハイブリッド餌 (bite) 構築物が、ベクター (例えば、ClontechからのpAS2-1) において生成され得、これはChMIRpポリヌクレオチドに融合した酵母GAL4-DNA結合ドメインをコードする。この餌構築物は、ヒトcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用され得、ここでこのcDNAライブラリーの配列は、GAL4活性化ドメインに融合する。ポジティブな相互作用は、-Galのようなレポーター遺伝子の活性化を生じる。スクリーニングから生じるポジティブクローンは、相互作用するタンパク質を同定するためにさらに特徴付けられ得る。

【0297】

(ChMIRpポリペプチドの組成物および投与)

コンドロモジュリンファミリーのメンバーは、軟骨形成および骨成長を誘導することが公知である。さらに、これらのタンパク質は、血管新生のインヒビターであることが示唆されている。新脈管形成は、多くの病理学的状態を媒介する。これらの記載された生物学的活性は、コンドロモジュリンの投与の可能な治療用途を示唆する。

【0298】

ChMIRpのポリペプチドの薬学的組成物は、減少したレベルのChMIRpから生じる適応症に関するヒトおよび動物の予防的および治療処置のため、またはその適応症の改善または治癒をChMIRpポリペプチドの投与が生じることを決定する場合、本発明の範囲内である。そのような組成物は、治療有効量のChMIRpポリペプチドおよび/またはその結合パートナー、あるいは治療的に活性なそのフラグメント、改変体または誘導体を、薬学的に受容可能な添加物および/またはキャリアと混合されて含み得る。適切な処方物材料または薬学的に受容可能な因子としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化

剤、保存剤、着色料、矯味矯臭剤、希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的アジュバント。代表的には、ChMIRpポリペプチドを含む治療的化合物は、精製されたポリペプチド、フラグメント、改変体または誘導体を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

【0299】

中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、例示の適切なキャリアである。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH約7.0 - 8.5のTris緩衝液またはpH約4.0 - 5.5の酢酸緩衝液を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。その溶液のpHはまた、種々のpHにおいて、ChMIRpリガンドの相対的溶解度に基づいて選択されるべきである。

【0300】

組成物における主要な溶媒は、性質が水性または非水性のいずれかであり得る。さらに、そのビヒクルは、処方物の、pH、容量オスモル濃度、粘性、明澄性、色、滅菌性、安定性、等張性、溶解速度、または臭いを改変または維持するための他の処方物材料を含み得る。同様に、その組成物は、ChMIRpポリペプチドの放出速度を改変もしくは維持するため、またはChMIRpポリペプチドの吸収もしくは透過を促進するためのさらなる処方物材料を含み得る。

【0301】

ChMIRpポリペプチド組成物を含む組成物は、非経口的に投与され得る。あるいは、その組成物は、静脈内または皮下で投与され得る。全身投与される場合には、本発明における使用のための治療組成物は、発熱物質を含まない、非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能なタン

パク質溶液の調製は、pH、等張性、安定性などに相当な注意を払えば、当該分野の技術の範囲内である。

【0302】

本発明を実施するために有用なChMIRpポリペプチド組成物の治療処方物は、任意の生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, A. R. Gennaro, 編, Mack Publishing Company, 1990）と、所望の程度の純度を有する選択された組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。

【0303】

受容可能なキャリア、賦形剤または安定剤は、レシipientに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、そして以下が挙げられる：緩衝剤（例えば、リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに/あるいは非イオン性表面活性剤（例えば、Tween、プルロニックまたはポリエチレングリコール（PEG））。

【0304】

治療的に用いられる有効量のChMIRpポリペプチド組成物は、例えば、治療目的（例えば、組成物が用いられる適応症、投与経路（例えば、局所投与されるかまたは全身投与されるか）、および患者の状態（例えば、患者の一般的健康状態、アナウレウエシス（anaureuesis）、年齢、体重、性別））に依存する。治療有効用量を決定する場合、この疾患の原因であるChMIRpま

たは分泌コンドロモジュリンファミリーの他のメンバーの量および内因性ChM I r pの量を考慮することが必須である。従って、治療者は、最適な治療効果を得るために必要に応じて、投薬量を力価測定することおよび/または投与経路をインビボで改変することが必要である。代表的な日投薬量は、上記の因子に依存して約0.1mg/kg~100mg/kg以上の範囲であり得る。代表的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に到達するまで組成物を投与する。それゆえ、この組成物は、単一用量として、または経時的に2以上の用量（これは、同じ量のChM I r pポリペプチドを含んでも含まなくてもよい）で、または移植デバイスもしくはカテーテルを介して連続注入として投与され得る。

【0305】

投薬頻度は、用いられる処方物中のChM I r p分子の薬物動態学的パラメーターに依存する。代表的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に到達するまで組成物を投与する。それゆえ、組成物は、単一用量として、または経時的に2以上の用量（これは、同じ量の所望の分子を含んでも含まなくてもよい）として、または移植デバイスもしくはカテーテルを介して連続注入として投与され得る。適切な投薬量のさらなる改善は、当業者によって慣用的に行われ、そして当業者によって慣用的に行われる作業の範囲内に入る。適切な投薬量は、適切な用量応答データの使用を通して確認され得る。

【0306】

さらなる研究が行われるほど、種々の患者における種々の状態の処置のために適切な投薬量レベルに関する情報が明らかになり、そして当業者は、治療的状況、処置されている障害の種類、レシピエントの年齢および一般的健康状態を考慮して、適切な投薬を確実にし得る。

【0307】

インビボでの投与のために用いられるChM I r pポリペプチド組成物は無菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。組成物が凍結乾燥される場合、これらの方法を用いた滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかで行われ得る。非経口投与のための組成物は通常、凍結乾燥形態で、または溶液中に保存される。

【0308】

治療組成物は一般的に、無菌アクセスポートを有する容器（例えば、皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有する、静脈内溶液バッグまたはバイアル）中に入れられる。

【0309】

有効投与形態（例えば、（1）徐放（*slow-release*）処方物、（2）吸入ミスト（*inhalant mist*）または（3）経口活性な処方物）もまた、想定される。治療有効用量のChMIRpポリペプチドを含む薬学的組成物もまた、非経口投与のために処方され得る。このような非経口投与される治療的組成物は代表的に、薬学的に受容可能なビヒクル中にChMIRpを含む、発熱物質を含まない、非経口的に受容可能な水溶液の形態である。ChMIRpの薬学的組成物はまた、ポリマー性化合物（例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸など）の粒状調製物またはリポソームへのChMIRpの導入を含み得る。ヒアルロン酸もまた用いられ得、そしてこれは、循環中の持続期間を助長する効果を有し得る。

【0310】

非経口注射のために特に適切なビヒクルは、適切に保存された滅菌蒸留水であり、ここに、ChMIRpが無菌の等張性溶液として処方される。なお別の調製物は、タンパク質産物の制御されたかまたは持続した放出を提供し、次いで、蓄積注射として送達され得る、因子（例えば、注射可能なマイクロスフェア、生体侵食性（*bio-erodible*）粒子もしくはビーズ、またはリポソーム）を伴うChMIRpの処方物を含み得る。ChMIRpの導入のための他の適切な手段としては、ChMIRpおよび/またはその結合パートナーを含む、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

【0311】

本発明の調製物は、当該分野で周知のように、他の成分（例えば、非経口的に受容可能な保存剤、張度（*tonicity*）剤、共溶媒、湿潤剤、錯化剤、緩衝剤、抗菌剤、抗酸化剤および界面活性剤）を含み得る。例えば、適切な張度増強剤（*tonicity enhancing agent*）としては、アルカ

り金属ハロゲン化物（好ましくは、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。適切な保存剤としては、塩化ベンザルコニウム、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸などが挙げられるがこれらに限定されない。過酸化水素もまた、保存剤として用いられ得る。適切な共溶媒は、例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールである。適切な錯化剤は、例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンである。適切な界面活性剤または湿潤剤としては、ソルビタンエステル、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート80）、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサール（tyloxapal）などが挙げられる。緩衝剤は、従来の緩衝剤（例えば、ボレート、シトレート、ホスフェート、ビカーボネートまたはTris-HCl）であり得る。

【0312】

処方物成分は、投与部位に受容可能である濃度で存在する。例えば、緩衝剤は、組成物を生理学的pHにまたはわずかに低いpHに（代表的には、約5～約8のpH範囲内に）維持するために用いられ得る。

【0313】

非経口投与が意図される場合、本発明において使用するための治療的組成物は、所望のChMIRp分子を薬学的に受容可能なビヒクル中に含む、発熱物質を含まない、非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注射のために特に適切なビヒクルは、適切に保存された無菌蒸留水であり、ここに、ChMIRp分子が無菌の等張性溶液として処方される。なお別の調製物は、産物の制御されたかまたは持続した放出を提供し、次いで、蓄積注射を介して送達され得る、因子（例えば、注射可能なマイクロスフェア、生体侵食性粒子、ポリマー性化合物（ポリ乳酸またはポリグリコール酸）またはビーズもしくはリポソーム）とともに所望の分子の処方物を含み得る。ヒアルロン酸もまた用いられ得、そしてこれは、循環中の持続期間を助長する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段としては、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

【0314】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、ChMIRp分子は、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。ChMIRpポリペプチドまたはChMIRp核酸分子の吸入溶液はまた、エアゾール送達のためのプロペラントを用いて処方され得る。なお別の実施形態では、溶液が噴霧化され得る。肺投与はさらに、PCT出願第PCT/US94/001875号に記載される。PCT出願第PCT/US94/001875号は、化学的に改変されたタンパク質の肺性送達を記載した。

【0315】

ChMIRpを含む特定の処方物が経口投与され得ることもまた意図される。本発明の1つの実施形態では、この様式で投与されるChMIRp分子は、固体投薬形態の混合物（例えば、錠剤およびカプセル剤）において習慣的に用いられるキャリアを伴ってまたは伴わずに処方され得る。例えば、カプセル剤は、胃腸管にある時点で（このとき、バイオアベイラビリティが最大にされ、そして全身以前（pre-systemic）の分解が最少にされる）処方物の活性な部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤は、ChMIRp分子の吸収を促進するために含まれ得る。希釈剤、矯味矯臭剤、低融点ろう、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤および結合剤もまた用いられ得る。

【0316】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切である非毒性賦形剤との混合物中で有効量のChMIRp分子を含み得る。滅菌水または他の適切なビヒクル中に錠剤を溶解することによって、溶液は、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては、不活性希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム、ラクトースまたはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア）；または滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸または滑石）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0317】

さらなるChMIRpの薬学的組成物は、持続送達処方物または制御送達処方

物においてChMIRpポリペプチドを含む処方物を含めて、当業者には明らかである。種々の他の持続送達手段または制御送達手段を処方するための技術（例えば、リポソームキャリア、生体侵食性微粒子または多孔質ビーズおよび蓄積注射）もまた、当業者に公知である。例えば、薬学的組成物の送達のための制御放出多孔性ポリマー性微粒子を記載する、PCT出願第PCT/US93/00829号を参照のこと。

【0318】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または乾燥粉末または凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構築を必要とする形態（例えば、凍結乾燥された）のいずれかで保存され得る。

【0319】

特定の実施形態では、本発明は、単回用量投与単位を産生するためのキットに関する。このキットは各々、所望のタンパク質を有する第1の容器および水性処方物を有する第2の容器の両方を備え得る。本発明の範囲内には、単一の室および複数の室の予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび凍結乾燥シリンジ（lyosyringe））を含むキットもまた含まれ得る。

【0320】

投与形態にかかわらず、特定の用量は、器官の重量、表面積または大きさに従って計算される。各々の上記処方物を含む処置に適する投薬量を決定するために必要な計算のさらなる改善は、当業者によって慣用的になされ、そして当業者によって慣用的に実施される作業の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量応答データの使用により決定され得る。

【0321】

薬学的組成物の投与経路は、公知の方法（例えば、経口的、静脈内、腹腔内、大脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内もしくは病変内の経路による注射を通して、あるいは持続放出系によって、または移植デバイス（これは、必要に応じて、カテーテルの使用を含み得る）によって）に従う。所望の場合、組成物は、ポーラス注射によって、または注入によって連続的に、または移植デバ

イスによって投与され得る。あるいは、またはさらに、組成物は、ChMIRpポリペプチドが吸収された膜、スポンジまたは別の適切な材料の、罹患領域への移植を介して局所投与され得る。

【0322】

本発明の薬学的組成物を、肺投与によってさらに投与し得る。例えば、国際公開第WO 94/20069号を参照のこと。国際公開第WO 94/20069号は、化学的に改変されたタンパク質肺性送達を開示する。肺性送達については、粒子の大きさは、肺の遠位への送達に適切であるべきである。例えば、粒子の大きさは、1mm~5mmであり得るが、例えば、各粒子がかなり多孔性であれば、より大きな粒子が用いられ得る。あるいは、またはさらに、この組成物は、罹患した領域への、レセプターポリペプチドが吸収またはカプセル化された膜、スポンジまたは他の適切な材料の移植を介して局所投与され得る。移植デバイスが用いられる場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして送達は、ポラスを介して、または連続投与を介して、または連続注入を用いたカテーテルを介して、デバイスを通して直接的であり得る。

【0323】

ChMIRp-リガンドポリペプチドおよび/またはその結合パートナーもまた、持続放出処方物または調製物で投与され得る。適切なポリマー組成物は好ましくは、以下であるために固有のおよび制御可能な生分解性を有する：約1週間から約6週間持続し；有意な毒性モノマーを含まず、そして非毒性成分へと分解せず、非毒性であり；生体適合性であり、送達されるべき物質と化学的に適合性であり、そして活性な物質を変性させる傾向はなく；生物学的に活性な分子の取り込み、その後の拡散、腐食もしくはそれらの組み合わせによるポリマーからのそれらの遊離を可能にするに十分に多孔質であり；接着もしくは幾何学的作用（*geometric fraction*）によって適用部位に残存し得（例えば、適所に形成されるかもしくは軟化され、そしてその後、微粒子に成形および形成され、この微粒子は、所望の位置で捕獲される）；侵襲性が最少の技術によって（例えば、カテーテル、腹腔鏡または内視鏡によって）送達され得る。持続放出マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,7

73, 919号、EP 58, 481)、L-グルタミン酸と -エチル-L-グルタメートとのコポリマー (Sidmanら, Biopolymers, 22: 547-556, 1983)、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート) (Langerら, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277, 1981およびLanger, Chem. Tech., 12: 98-105, 1982)、エチレン酢酸ビニル (Langerら, 前出) またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (EP 133, 988) を含む。持続放出組成物はまた、リポソームを含み得る。リポソームは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る (例えば、Eppsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692, 1985; EP 36, 676; EP 88, 046; EP 143, 949)。

【0324】

ChMIRpポリペプチド、その改変体、誘導体またはフラグメントは、単独で、一緒に、または他の薬学的組成物と一緒に、もしくは組み合わせで用いられ得る。ChMIRpポリペプチド、フラグメント、改変体および誘導体は、処置される適応症について適切である場合、サイトカイン、サイトカインインヒビター、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および/または化学療法剤と組み合わせで用いられ得る。

【0325】

いくつかの場合、ChMIRpの薬学的組成物をエキソビボの様式で使うことが所望され得る。このような場合には、患者から取り出された細胞、組織または器官がChMIRpの薬学的組成物に曝露され、その後、この細胞、組織および/または器官が続いて、その患者に移植し戻される。

【0326】

他の場合、ChMIRpポリペプチドは、このポリペプチドを発現および分泌するために、本明細書中に記載されるような方法を用いて、遺伝子操作された特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であり得、そして自己由来、異種 (heterologous) 由来または異種 (xenogeneic) 由来であり得る。必要に応じて、この細

胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、この細胞は周辺組織の浸透を回避するためにカプセル化され得る。カプセル化材料は、代表的に、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）である。

【0327】

細胞の膜カプセル化のために使用される方法は、当業者に精通され、そしてカプセル化細胞の調製および患者へのそれらの移植は、過度の実験なしに達成され得る（例えば、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同第5,106,627号を参照のこと）。生存細胞をカプセル化するための系は、国際出願番号WO91/10425に記載される。種々の他の持続送達手段または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体侵食粒子もしくはビーズ）を処方するための技術はまた、当業者に公知であり、そして例えば、米国特許第5,653,975号に記載される。カプセル化有りまたは無しで細胞は、患者の適切な体組織または器官に移植され得る。

【0328】

上記のように、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を処置すること；適切なように、1つ以上のChMIRpポリペプチド、改変体、誘導体および/またはフラグメントを添加することが、望ましくあり得る。これは、単離された細胞を、ポリペプチド、改変体、誘導体、またはフラグメント（ここでこれらは、細胞膜に対して透過性の形態である）に直接曝露することによって達成され得る。

【0329】

本明細書中にさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方に関する、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび/または他の組換え産生方法）に関する。

【0330】

（相同組換え）

ChMIRpポリペプチドが、相同組換えによってか、またはChMIRpポリペプチドをコードするDNAを既を含む細胞に導入された制御エレメントを利用する組換え産生方法を用いて産生され得ることが、さらに想定される。例えば、相同組換え方法は、正常に転写的にサイレントなChMIRp遺伝子(すなわち、発現抑制されている遺伝子)を含む細胞を改変するために使用され得、そしてそれによって、治療有効量のChMIRpを発現する細胞が産生される。相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写的に活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である(Kucherlapatiら、1989、Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 36:301)。基本的な技術が、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するため(Thomasら、1986、Cell 44:419-428; ThomasおよびCapecchi、1987、Cell 51:503-512; Doetschmanら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:8583-8587)、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するため(Doetschmanら、1987、Nature 330:576-578)の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号;欧州特許第91903051号;欧州公開番号第505500号;PCT/US90/07642;国際公開番号WO91/09955)に記載されている。

【0331】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるDNA配列は、それを標的化DNAに付着させることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的化DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的(相同)であるヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に対して相補的な標的化DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、ハイブリダイズするために細胞に挿入されたDNAの一般的な特性であり、従って、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組み換わる。この相補鎖が、変異もしくは異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに付着される場合には、これはまた、この組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれ

る。ブルーフリーディング機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして作用することが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。

【0332】

ChMIRPポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るDNAの領域（例えば、隣接配列）が、標的化DNAのこれらの断片に付着される。例えば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サプレッサ、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムに、所望のChMIRPポリペプチドをコードするDNAの近位で、このDNAの転写に影響を与えるに十分な配向で、挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在するDNAの一部を制御する。従って、所望のChMIRPポリペプチドの発現は、ChMIRP遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、ChMIRP遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合した標的化DNA（目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む）の使用によって、達成され得る。

【0333】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライドナー部位を含むDNAの導入によって、変更される。これらの構成成分は、新たな転写単位の産生を実際に生じるような様式で、染色体（ゲノム）DNAに導入される（ここで、DNA構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結される）。染色体DNAへのこれらの構成成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化する。

【0334】

本明細書中で記載される場合、変更された遺伝子発現は、得られたときの細胞において通常はサイレントな（発現されていない）遺伝子の活性化（または発現させること）、ならびに得られたときの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加を、包含する。この実施形態はさらに、調節

または誘導のパターンを変化させる工程を包含し、その結果、これは、得られたときの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そして得られたときの細胞において発現される遺伝子の発現を減少させる（排除することを含む）。

【0335】

細胞の内因性ChMIRp遺伝子からのChMIRpポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同組換えが使用され得る1つの方法は、最初に、相同組換えを使用して、組換え配列を部位特異的組換え系から（例えば、Cre/loxP、FLP/FRT）（Sauerら、1994、Current Opinion In Biotechnology、5:521-527；Sauerら、1993、Methods Enzymology、225:890-900）を、細胞の内因性ゲノムChMIRpポリペプチドコード領域の上流（すなわち、5'側）に配置することを含む。ゲノムChMIRpポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼによって、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノムChMIRpポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位へのプラスミドの組み込みを引き起こす（BaubonisおよびSauer、1993、Nucleic Acids Res. 21:2025-29；O'Gormanら、1991、Science 251:1351-1355）。転写を増加させることが公知の任意の隣接配列（例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内因性ChMIRp遺伝子からの新規なまたは増加したChMIRpポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で組み込まれる。

【0336】

部位特異的組換え配列が細胞の内因性ゲノムChMIRpポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株のゲノムの他の位置に第2の組換え部位を導入するために相同組換えを使用することであ

る。適切なレコンビナーゼ酵素は、次いで、二つの組換え部位の細胞株に導入され、組換え事象（欠失、逆位、および転座）を生じ（Sauerら，1994，Current Opinion In Biotechnology（前出）；Sauer，1993，Methods In Enzymology（前出））、これは、細胞の内因性ChMIRp遺伝子からの新規なまたは増加したChMIRpポリペプチド産生を生じる新規または改変された転写単位を作製する。

【0337】

細胞の内因性ChMIRp遺伝子からのChMIRpポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内因性ChMIRp遺伝子からの新規なまたは増加したChMIRpポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増加するかまたは引き起こし、そして/または遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサ）の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然には存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的DNA結合ドメインを含むポリペプチド）を、細胞の内因性ChMIRp遺伝子からの新たなまたは増加したChMIRpポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

【0338】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なDNA構築物に関する。特定の実施形態において、例示的なDNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列；（b）制御配列；（c）エクソン；および（d）不對スプライスドナー部位。DNA構築物中の標的化配列は、エレメント（a）～（d）の細胞中の標的遺伝子への組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（d）は、内因性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、DNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列、（b）制御配列、（c）エクソン、（d）スプライスドナー部位、（e）イントロン、および（f）スプライサクセプター部位。ここで、標的化配列は、エレメント（a）～（f）の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（

b) ~ (f) は、内因性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同組換えが生じる細胞性染色体DNAの予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エキソンは、一般的に、調節配列の3'であり、そしてスプライドナー部位は、このエキソンの3'である。

【0339】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中で示されるChMIRpポリペプチドの核酸配列）が公知である場合、遺伝子を選択された領域に対して相補的なDNAの断片は、合成され得るか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブのDNAの適切な制限によって得られ得る。この断片は、細胞に挿入された際に、標的化配列として作用し、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA複製の間に生じる場合、このDNAの断片、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、岡崎フラグメントとして作用し、そしてDNAの新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、ChMIRpポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

【0340】

あるいは、遺伝子治療が、以下に記載されるように使用され得る。

【0341】

(ChMIRpの細胞治療および遺伝子治療)

ChMIRp細胞療法（例えば、ChMIRpを産生する細胞の移植）もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態のChMIRpポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を患者に移植する工程を包含する。このようなChMIRpポリペプチド産生細胞は、ChMIRpの天然のプロデューサーである細胞であり得るか、または組換え細胞であって、そのChMIRpポリペプチドを産生する能力が、所望のChMIRpポリペプチドをコードする遺伝子またはChMIRpポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、その発現および分泌を促進するのに適切なベクターによって達成され得る。ChM

I r pポリペプチドを投与されている患者における潜在的な免疫学的反応を最小化するために、外来種のポリペプチドの投与を伴い得る場合、ChM I r pポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒトChM I r pポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、ChM I r pポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトChM I r pポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【0342】

移植細胞は、周辺組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、ChM I r pポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）で患者に移植され得る。あるいは、ChM I r pポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化を伴わずに、患者に直接移植され得る。

【0343】

生存細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製および患者へのそれらの移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgeら（国際公開番号WO95/05452；国際出願番号PCT/US94/09299）は、生物学的に活性な分子の効率的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に回収可能（retrievable）である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インビボでダウンレギュレーションに供されないプロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、レシピエント内の特定の部位への生存細胞由来の分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号、同第5,011,472号、および同第5,106,627号を参照のこと。生存細胞をカプセル化するための系は、国際出願WO91/10425（Aebischerら）国際出願WO91/10470（Aebischerら）；Winnら、1

991, *Exper. Neurol.* 113:322-329; Aebischerら、1991, *Exper. Neurol.* 111:269-275; および Trescoら、1992, *ASAIO* 38:17-23に記載される。

【0344】

ChMIRPの、インビボおよびインビトロでの遺伝子治療送達もまた、本発明に含まれる。インビボ遺伝子治療は、ChMIRPをコードする遺伝子を、ポリヌクレオチド分子または他の適切な送達ベクターの局所的注射によって、細胞に導入することによって、達成され得る (Hefsti, *J. Neurobiol.* 25:1418-1435, 1994)。例えば、ChMIRPをコードするポリヌクレオチド分子は、標的化された細胞への送達のために、アデノ随伴ウイルスベクターに含まれ得る (国際公開番号WO 95/34670; 国際出願番号PCT/US95/07178)。組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムは、代表的に、機能的プロモーターに作動可能に連結したChMIRPをコードするDNA配列に隣接するAAV逆方向末端反復、およびポリアデニル化配列を含む。

【0345】

代替のウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクターおよびパピローマウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含む、インビボのウイルスにより媒介される遺伝子移入系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するようインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、患者に治療タンパク質を提供するためのプロセスの例を、提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号に記載され; アデノウイルスベクターを含む遺伝子治療は、米国特許第5,672,510号に記載され; そしてレトロウイルスベクターの使用を含む遺伝子治療は、米国特許第5,635,399号に記載されている。

【0346】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸のDNA送達（直接注射）、レセプター媒介移入（リガンド-DNA複合体）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降および微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃）が挙げられる。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導的プロモーター、組織特異的エンハンサー-プロモーター、部位特異的取り込みのために設計されたDNA配列、親細胞よりも優れた選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全性の尺度）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、ベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号、国際出願番号WO 9640958；米国特許第5,679,559号；U.S. 5,676,954号；米国特許第5,593,875号；および米国特許第4,945,050号に記載されている。発現制御技術としては、化学的に誘導される調節（例えば、国際出願番号WO 9641865およびWO 9731899）、改変されたステロイドホルモンレセプター系におけるプロゲステロンアンタゴニストの使用（例えば、米国特許第5,364,791号）、エクジソン制御系（例えば、国際出願番号WO 9637609）ならびにポジティブテトラサイクリン制御可能トランスアクチベーター（例えば、米国特許第5,589,362号；同第5,650,298号；および同第5,654,168号）が挙げられる。

【0347】

ChMIRpポリペプチドのインビボおよびインビトロ遺伝子治療送達がまた、想定される。遺伝子治療技術の1つの例は、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターに作動可能に連結され得るChMIRp遺伝子（ChMIRpポリペプチドをコードするゲノムDNA、cDNA、および/または合成DNA、あるいはそのフラグメント、改変体、または誘導体のいずれか）を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内因性ChMIRp遺伝子に対して同種であっても異種であってもよいが、但し、この構

築物が挿入される細胞または組織型において、このプロモーターは活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的取り込みのために設計されたDNA分子（例えば、相同組換えのために有用な内因性隣接配列）、組織特異的なプロモーター、エンハンサー、またはサイレンサー、親細胞よりも優れた選択的利点を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標的として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクターの製造を可能にする因子を含み得る。

【0348】

次いで、遺伝子治療DNA構築物は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して細胞に導入され得る（エキソビボまたはインビボのいずれか）。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの方法は、ウイルスベクターによる。適切なウイルスベクターは、本明細書において記載されるウイルスベクターの手段によって、代表的に遺伝子治療DNA構築物の送達のための遺伝子治療において用いられる。特定のレトロウイルスベクターは、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこのDNA構築物は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質中に残る。

【0349】

さらに他の実施形態において、制御エレメントを、標的細胞におけるChMIRp遺伝子の制御された発現のために含み得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答してオンになる（turn on）。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの従来制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性化タンパク質）を二量化するために用いられる、低分子二量化剤またはラパログ（rapalog）の使用を包含する（PCT公開WO9641865（PCT/US96/099486）；WO9731898（PCT/US97/03137）および、WO9

731899 (PCT/US95/03157) を参照のこと)。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【0350】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現されて、小胞体における凝集タンパク質の保持を生じる。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを特異的に破壊し、その結果、このタンパク質は細胞から分泌され得る。Science 287: 816 - 17および826 - 30を参照のこと。

【0351】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、以下の系が挙げられるが、これに限定されない。ミフェプリストン (RU486) は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2つの転写因子のダイマーを形成することによって、転写を活性化し、次いで、これは核に至り、DNAに結合する。このリガンド結合ドメインは、レセプターの能力が、天然のリガンドに結合する排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第5,364,791号、ならびにWO9640911およびWO9710337に記載される。

【0352】

さらに別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこれを活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは核にトランスロケーションし、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、トランス活性化ドメイン/DNA結合ドメイン/リガンド結合ドメインを含み、転写を開始する。エクジソン系はさらに、米国特許第

5, 514, 578号、およびWO9738117、WO9637609；およびWO9303162に記載される。

【0353】

別の制御手段は、陽性テトラサイクリン制御可能トランス活性化因子を使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異tetレプレッサタンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン制御トランス活性化因子タンパク質を生じさせる（すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する）変異tetR-4アミノ酸の変化）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号；同第5,650,298号、および同第5,654,168号に記載される。

【0354】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号（Innovir Laboratories Inc.）に記載される。

【0355】

インビボ遺伝子治療は、ChMIRpポリペプチドをコードする遺伝子を、ChMIRp核酸分子の局所的注射によって、または他の適切なウイルスもしくは非ウイルス性の送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。（Hefsti, Neurobiology 25:1418-35, 1994）。例えば、ChMIRpポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターに含まれ得る（例えば、Johnson, 国際公開番号WO95/34670；国際出願公開PCT/US95/07178）。組換えAAVゲノムは、典型的に、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結した、ChMIRpポリペプチドをコードするDNA配列に隣接するAAV逆末端反復を含む。

【0356】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウ

イルス、パラミクソウイルス、およびパピローマウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含むインビボウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するためにインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、治療タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号(アデノウイルスベクターに関する)、同第5,672,510号(レトロウイルスベクターに関する)、同第5,635,399号(サイトカインを発現するレトロウイルスベクターに関する)に記載される。

【0357】

非ウイルス送達法としては、リポソーム媒介移入、裸のDNAの直接注射、レセプター媒介移入(リガンド-DNA複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃)が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法はまた、誘導的プロモーター、組織特異的エンハンサー-プロモーター、部位特異的組込みのために設計されたDNA配列、親細胞を超える選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブな選択系および発現制御系(安全性の指標)、細胞特異的結合因子(細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増大する転写因子ならびにベクターの製造方法を含み得る。遺伝子治療技術の実施のためのこのようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号(エレクトロポレーション技術に関する); WO96/40958(核リガンドに関する); 同第5,679,559号(遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する); 同第5,676,954号(リポソームキャリアに関する); 同第5,593,875号(リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する)、および同第4,945,050号(生物学的に活性な粒子が一定の速度で細胞に噴霧され、それによりこの粒子がこの細胞の表面に浸透し、そしてこの細胞の内側に組み込まれるプロセスを記載する)に記載される。

【0358】

ChM I r p 遺伝子治療または細胞治療はさらに、同一または異なる細胞（単数または複数）における1つ以上のさらなるポリペプチドの送達を含み得ることもまた企図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこの細胞は、単一の移植可能デバイス（例えば、上記のカプセル化膜）に含められ得るか、あるいはこの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0359】

遺伝子治療による細胞における内因性ChM I r pポリペプチドの発現を増加する別の手段は、ChM I r p 遺伝子のプロモーターに1つ以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここでエンハンサーエレメントは、ChM I r pポリペプチド遺伝子の転写活性を増加させるように作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することを所望する組織に基づいて選択される - その組織においてプロモーター活性化を与えることが知られているエンハンサーエレメントが選択される。例えば、ChM I r pポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「オンに変わる (turn on)」場合、I c kプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、付加される転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、ChM I r pポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターおよび/または5'および/または3'隣接配列などに挿入される）。「相同組換え構築物」として公知のこの構築物は、次いで、エキソピボまたはインピボのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0360】

遺伝子治療を用いてまた、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、ChM I r pポリペプチド発現を減少させ得る。このような改変は、典型的に、相同組換え方法によって達成される。例えば、不活性化のために選択されたChM I r p 遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーターの断片を除去および/または置換するように操作され得る。例えば、プロモーターの転写活性化因子のT A T Aボックスおよび/または結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得；この

ような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、それによって、対応するChMIRp遺伝子の転写を阻止し得る。プロモーターにおけるTATAボックスまたは転写活性化因子結合部位の欠失は、ChMIRpポリペプチドプロモーター（調節されるChMIRp遺伝子と同じかまたは関連の種由来）のすべてまたは関連の部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のTATAボックスおよび/または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、および/または挿入によって変異される。結果として、TATAボックスおよび/または活性化因子結合部位は、活性を減少するか、または完全に不活化される。この構築物はまた、典型的に、改変されたプロモーターセグメントに隣接したネイティブの（内因性）5'および3' DNA配列に対応する少なくとも約500塩基のDNAを含む。この構築物は、直接または本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介してのいずれかで、適切な細胞に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）導入され得る。典型的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組込みは、相同組換えによってであり、ここで、このプロモーター構築物の5'および3' DNA配列は、内因性染色体DNAへのハイブリダイゼーションによって、改変プロモーター領域を組み込むのを補助するように作用し得る。

【0361】

（ChMIRp核酸およびポリペプチドのさらなる用途）

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）を使用して、ChMIRp遺伝子および関連遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術（例えば、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション）により行われ得る。

【0362】

ChMIRp核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、哺乳動物組織または体液サンプル中のChMIRp DNAまたは対応するRNAの存在について、定性的または定量的のいずれかで試験するための、診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。ChMIRpは、診断/予測マーカーとして働き得るか、または

広範な種々のヒト癌をアッセイし得る。癌処置の間のChMIRpの発現におけるモニタリングの変化は、腫瘍増殖および処置の成功をモニターするための代理マーカーとして用いられ得る。

【0363】

ChMIRpポリペプチドは、処置される状態に適切である場合、1つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および/または化学療法剤と組み合わせて(同時にかまたは引き続き)使用され得る。ChMIRpは、低分子インヒビターとして有用であり得る。さらに、ChMIRpポリペプチドから設計されたペプチドインヒビターは、ChMIRpポリペプチド活性を調節する治療物質または同定物質として用いられ得る。

【0364】

他の方法はまた、1つ以上のChMIRpポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列(三重らせん形成)またはChMIRp mRNAに相補的でありかつ発現制御配列(三重らせん形成)またはChMIRp mRNAにハイブリダイズする核酸分子によりもたらされ得る。例えば、アンチセンスDNAまたはRNA分子(これらは、選択されたChMIRp遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する)は、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるChMIRpポリペプチドの配列を使用して、利用可能な技術により設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、選択された各ChMIRp遺伝子の開始部位(5'末端)に相補的である。このアンチセンス分子が次いで、対応するChMIRp mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳は、防止されるかまたは低減される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物におけるChMIRpポリペプチドの減少または不在に関連する情報を提供する。

【0365】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1つ以上のChMIRpポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターを作製し得る。この状況において、各選択されたChMIRpポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするDNAが、調製

され得、そして本明細書中に記載されるウイルス性または非ウイルス性のいずれかの方法を使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的にはその生物学的役割において内因性ポリペプチドと競合するように設計される。詳細には、ChMIRpは、広範な種々の腫瘍における処置のためのドミナントネガティブな遺伝子治療を設計するのに有用であり得るキナーゼドメインを含む。

【0366】

さらに、ChMIRpポリペプチドは（生物学的に活性でも活性でなくても）免疫原として使用され得、すなわち、これらのポリペプチドは、それに対して抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含有する。ChMIRpポリペプチド（本明細書中に記載されるような）に結合する選択的結合因子は、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得、これらの目的としては、体液サンプルまたは細胞サンプル中のChMIRpポリペプチドの存在を検出するための標識された形態での使用を含むが、これに限定されない。これらの抗体をまた使用して、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む多数の疾患および障害を、予防、処置、または診断し得る。これらの抗体は、ChMIRpポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を低減するかまたは遮断するように、ChMIRpポリペプチドに結合し得るか、またはポリペプチドに結合してChMIRpポリペプチドに特有の少なくとも1つの活性（ChMIRpポリペプチドの薬物動態を増加させることによるものを含む）を増加し得る。

【0367】

本発明の被験物質は、以下の実施例によってさらに記載される。以下の実施例は、例示目的のみを意図しており、どのような方法でも本発明を限定すると解釈されるべきではない。

【0368】

（実施例1）

（コンドロモジュリン（Chondromodulin）-I関連遺伝子をコードするマウスcDNAの単離）

製造業者の指示に従って、市販のRNA抽出キット（Pharmacia B

iotech, Piscataway, NJ)を用いて、オステオプロゲリン(Osteoprogenin)トランスジェニックマウス(Simon et al., Cell, 89:309~319, 1997)の大理石骨病の骨から抽出した総RNAから、マウスcDNAライブラリーを作製した。Dynabeads Oligo(dT)25カラム(Dynal, Oslo, Norway)を用いて、ポリA+RNAを選択した。製造業者のプロトコールに従って、cDNA合成およびプラスミドクローニング用のSuperscript Plasmid System(Gibco-BRL, Rockville, MD)を用いて、このcDNAを、合成した。得られたcDNAをSalI制限酵素およびNotI制限酵素(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)を用いて消化し、ベクターへの連結を補助するための粘着末端を作製した。設計したcDNAを、T4 DNAリガーゼ(Promega, Madison, WI)を用いて、SAL I / NOT I事前設計pSPORTベクター(Gibco-BRL)中に連結した。連結した産物を、エレクトロポレーションによって、E. coli DB10Bエレクトロコンピテント菌(Gibco-BRL)に形質転換した。形質転換した細菌を、100mg/mlのアンピシリンを含有するLBアガロースプレート上にプレートした。配列決定用にクローンを無作為に選択した。

【0369】

上記のマウスcDNAライブラリーから生成したクローンの配列決定により、EST配列であるsmb02-00029-h3に対応するDNAを同定した。これは、コンドロモジュリン(chondromodulin)-1関連ペプチド(ChMIRp)と現在呼ばれている。SWISS-PROTデータベースのBLAST分析により、配列番号3に示されるマウスChMIRp cDNAが、ウシコンドロモジュリン-Iポリペプチド(配列番号7)のアミノ末端部分に、116アミノ酸にわたって32%同一性を示すタンパク質をコードしていることが確認された。コンドロモジュリン-Iに対する相同性によって、ChMIRpインサート全体の両方の鎖の決定が可能になった。図1に示すように、マウスChMIRpのポリヌクレオチド配列(配列番号3)は、951ヌクレオチド

のオープンリーディングフレームを有する。マウスChIrpポリヌクレオチド配列は、ブダペスト条約に従って、2000年8月8日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション(10801 University Boulevard Manassas, VA)に寄託され、ATCC登録番号PTA-2329を与えられた。

【0370】

(実施例2)

(マウスChMIrpのヒトオルソログの同定)

全長マウスChMIrpヌクレオチド配列(配列番号3)を用いたGenebank ESTデータベースのBLAST分析により、ChMIrpのヒトオルソログをコードしている、7つのヒトEST(Genebank登録番号 aa297231、t121280、t12179、ai123839、ai146280、11453695、およびai147044)が示された。以下表1に示される、プライマーを用いて3'RACEおよび5'RACEによって、全長ヒトcDNAを生成した。このプライマー配列は、7つのヒトESTの比較に由来するコンセンサス配列に基づく。

【0371】

【表3】

表3(表Ⅲ)

| プライマー | 配列 | SEQ ID NO: |
|---------|-------------------------------------|------------|
| 2244-23 | CAC GAA GTA GAT GCC AGT GTA TCC | 11 |
| 2244-24 | GTG TAC TTC CAA TGT TTC ATC AGT GC | 12 |
| 2244-19 | CCA GTT ACA AGG CAT GAT GAC ACG | 13 |
| 2244-20 | CGT CCT CCT TGG TAG CAG TAT GG | 14 |
| AP-1 | CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC | 15 |
| AP-2 | ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC | 16 |
| 2311-20 | GTC AGT GAT TTG GGT CCC AGC AG | 17 |
| 2311-21 | CGT GAC CAT GTA TTG GAT CAA TCC C | 18 |

ヒト骨格筋マラソン準備(Human Skeletal Muscle Marathon Ready)cDNAおよびヒト心臓マラソン準備(Human Heart Marathon Ready)cDNAを、5'RACEの

ためのテンプレートDNA (Clontech, Palo Alto, CA)として用いた。なぜなら、ノーザンブロット分析(以下、実施例3を参照)により、ヒト骨格筋およびヒト心臓においてChMIRpが検出されたからである。5' PCRプライマーとしてAP-1プライマー(配列番号15)、そして3' PCRプライマーとしてプライマー2244~19(配列番号13)を用いて、ヒト骨格筋マラソン準備cDNA (Human Skeletal Muscle Marathon Ready cDNA)由来の5' RACEを生成した。5' PCRプライマーとしてAP1(配列番号15)、そして3' PCRプライマーとしてプライマー2244~23(配列番号11)を用いて、ヒト骨格筋マラソン準備cDNA (Human Skeletal Muscle Marathon Ready cDNA)由来の5' RACEを生成した。製造業者(Clontech)のプロトコールに従って、第一回のRACE反応を実施した。第一5' RACE産物の1:50希釈の1ミリリットルを、ネスト化5' RACEのためのテンプレートとして用いた。骨格筋用のネスト化5' RACE反応プライマーは、5' プライマーの場合AP-2(配列番号16)、そして3' プライマーの場合プライマー2244~20(配列番号14)であった。ヒト心臓ネスト化5' RACEにおいて、AP-2(配列番号16)を、5' PCRネスト化プライマーとして用い、そして2244-22を、3' ネスト化プライマーとして用いた。製造業者(Clontech)のプロトコールに従って、ネスト化PCR反応を実施した。

【0372】

ヒト骨格筋マラソン準備cDNA (Human Skeletal Muscle Marathon Ready cDNA)を3' RACEのためのテンプレートDNAとして用いた。5' プライマーとしてプライマー2311-20(配列番号14)を用い、そして3' PCRプライマーとして、AP-1(配列番号15)を用いて、3' RACE産物を生成した。最初の3' RACE反応を製造業者(Clontech)のプロトコールに従って実行した。最初の3' RACE産物の1:50希釈の1マイクロリットルを、ネスト化3' RACE反応のテンプレートDNAとして用いた。プライマー2311-21(配列番号18

)を5' PCRネスト化プライマーとして用い、そしてAP-2 (配列番号16)を3' PCRネスト化プライマーとして用いた。ネスト化PCR反応を製造業者 (Clontech) のプロトコールに従って実施した。

【0373】

5' RACEおよび3' RACE反応の産物を1%アガロースゲル上の電気泳動によって分離した。適切にサイズ化したバンドをこのアガロースゲルから切り出して、製造業者の指示に従って、Qiaquickゲル抽出キット (Qiagen, Valencia, CA) によって精製した。抽出したDNAをTaqポリメラーゼ (Boehringer Mannheim) を含有する10mM Tris-HCl (pH8.3)、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、0.2mM dNTP's (dATP、dTTP、dGTP、dCTP) とともに、37℃で5分間インキュベートした。次いで、DNAをPCR2.1ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中に連結して、製造業者の指示に従って細菌中に形質転換した。インサート (挿入物) のサイズを、EcoRI制限酵素 (Boehringer Mannheim) 消化によって、続いて1%アガロースゲルでの電気泳動によって決定した。配列決定を行い、PCR2.1ベクターによって発現された5' RACEおよび3' RACE産物の同定を確実にした。

【0374】

図2に示されるように、ヒトChMIRp cDNA (配列番号1) は、5' 非翻訳領域における86bpおよび3' 非翻訳領域における182bpに加えて、953ヌクレオチド (配列番号2) のオープンリーディングフレームを構成する。ヒト (huChIRp) およびマウス (muChIRp) アミノ酸配列 (それぞれ、配列番号2および4) の配列 (図3) は、97%の同一性を示す。ヒトChMIRpポリペプチド配列は、ブダペスト条約に基づいて、アメリカンタイプカルチャーコレクション (10801 University Boulevard Manassas, VA) に、2000年8月8日に寄託され、そしてATCC受託番号PTA-2328を与えられた。

【0375】

図4に示されるように、huChMIRpおよびmuChMIRpは、マウス (Genebank登録番号: U43509)、ラット (Genebank登録番号: AF051425)、ウシ (Swiss-Prot登録番号: CHM1_BOVIN)、ヒト (Genebank登録番号: AB006000)、およびウサギ (Genebank登録番号: AF072129) (それぞれ、配列番号5~9) を含むいくつかの種由来のコンドロムジュリン-I (chondromodulin-I) の配列と比較した。BLAST分析は、muChMIRpオープンリーディングフレームがラットコンドロムジュリン-Iの289アミノ酸にわたって39%の同一性を示すことを決定した。さらに、ヒト、マウス、ウシおよびウサギのコンドロムジュリン-Iとの一致は、約35%の同一性を示した。BLAST分析は、muChMIRpのオープンリーディングフレームが、ラットコンドロムジュリン-Iポリペプチドについて、262アミノ酸にわたって41%の同一性を示し、マウスコンドロムジュリン-Iポリペプチドについて、262アミノ酸にわたって40%の同一性を示し、ウシコンドロムジュリン-Iポリペプチドについて、314アミノ酸にわたって36%の同一性を示し、ウサギコンドロムジュリン-Iポリペプチドについて、262アミノ酸にわたって37%の同一性を示し、そしてヒトコンドロムジュリン-Iポリペプチドについて、260アミノ酸にわたって37%の同一性を示すことを決定した。さらに、マウスChMIRpは、ニワトリコンドロムジュリン-Iポリペプチドについて、289アミノ酸にわたって39%の同一性を示す(示さず)。ヒトChMIRpとマウスChMIRpとの間の保存性は非常に高いため、huChMIRpと他の種のコンドロムジュリン-Iとの間のBLAST分析データは、上記のmuChMIRp同一性と比較可能であった。

【0376】

(実施例3)

(ChMIRpの組織特異的発現)

ChMIRp遺伝子の組織特異的発現パターンを、ノーザンブロットによって研究した。PCR産生³²P標識プローブを使用して、ヒトおよびマウスの両方由来の様々な組織におけるChMIRp転写物の存在を検出した。pSPORT

ベクター (Gibco - BRL) に挿入したマウス ChMIRp cDNA (配列番号3) を、テンプレートとして使用して、コード領域全体をPCR増幅して、ノーザンブロット分析のためのプローブとして使用した。5'プライマーを、Primer 2245-78として定義し、そしてこれは配列 ATGGCAAAGAACTCCTCCAGAGAAC (配列番号19) からなり、そして3'プライマーは、Primer 2245-79と命名し、そしてこれは、配列 CTATTAGACTCTCCCAAGCATGCG (配列番号20) からなった。10 mM Tris - HCl (pH 8.3)、1.5 mM MgCl₂、50 mM KCl、0.2 mM の dATP、dTTP および dGTP、0.01 mM の dCTP、0.17 mM (- ³²P) dCTP、0.4 mM の各プライマーおよび 10 ng の muChMIRp テンプレート DNA を含む 100 μl 容量中で、PCR 反応を行った。PCR パラメーターは、94 °C で 30 秒間、40 回循環する 2 分間、94 °C の変性工程、30 秒間 70 °C のアニーリング、および 72 °C で 1 分間の伸長を含んだ。このプローブは、Sepharose G50 カラム (5' - 3' Inc, Boulder, CO) で精製した。

【0377】

ヒト、胎児マウスおよび成体マウス組織を含む市販の多組織ノーザンブロット (Clontech, Palo Alto, CA)、ならびに市販の Zoo Blot (Clontech) を、muChMIRp を用いて調査した。さらに、標準的な技術 (Sambrook ら、Molecular Cloning, Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York, 1989) によって、RNA を、Osteoprotegerin (OPG) トランスジェニックマウス、OPG ノックアウトマウス (Bucay ら、Genes Dev., 12: 1260 - 1268) および正常な CD-1 マウスから単離した。組織を 20 ml の TRIzol 試薬 (Gibco - BRL) で溶解し、30 秒間ホモジナイズし、そして 40 ml のクロロホルムで抽出した。チューブを 4000 rpm で 30 分間遠心分離し、そして水相を新しいチューブに移した。10 ml のイソプロパノールを添加し、混合し、そして 4200 rpm で 30 分間遠心分離することによって、RNA を沈殿させた。この

RNAペレットを、10mlの70%エタノールで洗浄し、穏やかに乾燥し、そして0.5mlのTE緩衝液に再懸濁した。RNAを、ホルムアルデヒド/アガロースゲル電気泳動システムを使用して画分化した。電気泳動の後、このゲルを処理し、そしてRNAをナイロンメンブレンに移した(Sambrookら、前出を参照のこと)。

【0378】

ノーザンブロットを、Rapid-hyb緩衝液(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)中、65で30秒間プレハイブリダイゼーションした。このブロットを、次いで、³²P-標識したmuChMIRpプローブを添加した同じ溶液中で、65で2時間ハイブリダイズした。フィルターを、最初に2×SSC/0.1% SDSで、室温で5分間洗浄し、次いで、0.1×SSC/0.1% SDSで2回、55で15分間洗浄した。これらのブロットを、X線フィルムに-80で4日間暴露した。

【0379】

ストリンジェントな条件下におけるマウス胎児組織のノーザンブロット分析は、15日および17日の全胎児において、1.2kbの転写物を検出した。低レベルの発現は、11日目の胎児において検出されたが、15日および17日の胎児では高レベルに発現されなかった。マウス多組織ブロットは、骨格筋において、類似のサイズの転写物を検出した。

【0380】

muChMIRpプローブはまた、複数の組織由来のヒトmRNAにおいて、1.2kbの転写物を検出した。発現は、ヒト卵巣において検出され、より低い程度で、骨格筋、前立腺、および心臓において検出された。

【0381】

コントロールCD-1マウス由来の大腿骨および脛骨、ならびにOPGトランスジェニックマウスの大理石骨病の大腿骨および脛骨由来のRNAは、弱いレベルのmuChMIRpを発現したが、OPGノックアウトマウス由来の大理石骨病の大腿骨および脛骨において、発現は検出されなかった。

【0382】

Zoo Blot (Clontech) を、Rapid-hyb 緩衝液 (Amersham Life Sciences) 中、65 で30秒間、プレハイブリダイズした。次いで、プロットを、³²P - 標識 muChMIRp プローブを添加した同じ溶液中、65 で2時間ハイブリダイズした。このフィルターを、初めに 2 × SSC で15分間室温で2回洗浄し、次いで、0.1 × SSC / 0.1% SDS で、15分間55 で2回洗浄した。プロットを、X線フィルムに - 80 で3日間暴露した。

【0383】

この muChMIRp プローブは、Zoo Blot において、マウス、ラット、ウサギおよびウシ DNA から、2つのバンドを検出した。サザンプロット分析は、高ストリンジェンシーの洗浄を用いて実施され、これは muChMIRp とラット、ウサギおよびウシ由来の ChMIRp との間の相同性が高くなければならないことを示した。

【0384】

インサイチュハイブリダイゼーションを、ChMIRp 発現の組織部位を決定するために行った。正常な胎児 (E8.5 ~ E18.5) および成体マウスおよびラット組織のパネルを、4%パラホルムアルデヒドに固定し、パラフィン中に包埋し、そして5マイクロメートルに切り出した。インサイチュハイブリダイゼーションの前に、組織に 0.2 M HCl を透過させ、続いて、10 mg / ml プロテイナーゼ K で消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化した。切片を、全長 ChMIRp に相補的な ³³P 標識アンチセンス RNA プローブおよびセンス (コントロール) プローブで、55 で一晩ハイブリダイズした。このアンチセンスおよびセンス ³³P - 標識プローブを、muChMIRp cDNA を含むプラスミド DNA のインビトロ転写によって得た。ハイブリダイゼーションの後、切片を、55 で、4 × SSC で2回洗浄し、20 mg / ml の RNase A で処理して、ハイブリダイズしたプローブを除去し、次いで、0.1 × SSC 中、55 の高ストリンジェンシーの洗浄に供した。スライドを Kodak NTB2 エマルジョンに浸漬し、44 で2 ~ 3週間暴露

し、発色させ、そして濃縮した。切片を、暗視野照明法および標準的な照明法を使用して試験して、組織形態学およびハイブリダイゼーションシグナルの同時評価を行った。次いで、以下の組織を試験した：脳、耳下線、顎下腺および舌下腺、食道、胃、十二指腸、空腸、近位結腸および遠位結腸、肝臓、膵臓、心臓、肺、気管、血管、リンパ節、脾臓、胸腺、骨髄、腎臓、膀胱、甲状腺、副腎、精巣、前立腺、卵巣、子宮、卵管、胎盤、骨、骨格筋、皮膚、および脂肪組織。

【0385】

muChMIRpアンチセンスプローブは、センスコントロールプローブを用いて見られるバックグラウンドの非常に低いレベルより上で検出可能な明確なシグナルを生成した。E8.5、10.5または11.5の切片において、シグナルは検出されなかった。E13.5～成体切片の発現は、腱、おそらく筋膜において検出された。識別可能な腱の全てにおいて明確なシグナルが存在したが、筋肉、骨または軟骨においてシグナルは検出されなかった。シグナルはまた、皮膚の毛包に隣接する細胞、およびM細胞として公知の腸内のリンパ球斑上に存在する特殊な上皮細胞において検出された。発現のさらなる部位は、胸腺髄質、脳の脳梁のすぐ上の大脳皮質、および卵巣中の発生中の卵胞を取りまく顆粒細胞において検出された。

【0386】

(実施例4)

(ChMIRpゲノムDNAの特徴付け)

BLAST分析は、Genbank登録番号AL035608が、ヒトChMIRpゲノム配列を含むことを同定した。この配列は、染色体Xq21.33-23由来のヒトゲノムDNAを含むクローン479J7由来であった。このヒトChMIRpゲノムDNA(配列番号10)は、7個のエキソンおよび6このイントロンを含み、そして図5に示される。

【0387】

(実施例5)

(ChMIRpポリペプチドの産生)

(A.細菌中のChMIRpポリペプチドの発現)

PCRを使用して、配列の5'および3'末端に対応するプライマーを使用してChMIRpポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅した。この増幅したDNA産物を、制限酵素部位を含むように改変し、標準的な組換えDNA方法を使用して発現ベクターに挿入し得る。luxプロモーターおよびカンマイシン耐性をコードする遺伝子を含む代表的なベクター（例えば、pAMG21(ATCC NO:98113)を、挿入されたDNAの指向性クローニングのために、BamHIおよびNdeIで消化した。連結混合物を、電気泳動およびカナマイシン耐性について選択された形質転換体により、E. coli 宿主株Top10(Invitrogen)に形質転換した。選択したコロニー由来のプラスミドDNAを単離し、そして配列決定に供して、挿入物の存在を確認した。

【0388】

30mg/mlのカンマイシンを含む2xYT培地中で、形質転換した宿主細胞を、インキュベーションの前に、30分間インキュベーションした。N-(3-オキソヘキサノイル)-D1-ホモセリンラクトースを30ng/mlの最終濃度まで添加し、続いて30 または37 のいずれかで6時間インキュベーションすることによって、遺伝子発現を誘導する。この培養液を遠心分離し、細菌ペレットを再懸濁および溶解し、そしてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により宿主細胞タンパク質を分析することによって、ChMIRpポリペプチドの発現を評価する。

【0389】

ChMIRpを含む封入体を、以下のように精製した：細菌細胞を、遠心分離によりペレット化し、そして水に再懸濁した。この細胞懸濁物を、超音波処理によって溶解し、そして195,000xgで5~10分間遠心分離することによってペレット化した。この上清を捨て、そしてこのペレットを洗浄し、そしてホモジナイザーに移した。このペレットを、5mlのPercoll溶液(75%液体Percoll/0.15M NaCl)中で、均一に懸濁されるまでホモジナイズし、次いで希釈し、そして21,600xgで30分間遠心分離する。封入体を含む勾配画分を回収し、そしてプールする。この単離した封入体を、次

いで、SDS - PAGEにより分析する。

【0390】

E. coliが産生するChMIRpポリペプチドに対応するSDS - PAGEのシグナルバンドをゲルから切り取り、そしてN - 末端アミノ酸配列を、本質的に、Matsudariraら(J. Biol. Chem., 262:10 - 35, 1987)に記載されるようにして決定する。

【0391】

(B. 哺乳動物細胞におけるChMIRpポリペプチドの発現)

PCRを使用して、配列の5'および3'末端に対応するプライマーを使用して、ChMIRpポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。この増幅されたDNA産物を、制限酵素部位を含むように改変して、発現ベクターに挿入する。PCR産物をゲル精製し、そして標準的な組換えDNA方法を使用して発現ベクターに挿入する。代表的なベクターのpCEP4 (Invitrogen) (これは、複製のEpstein - Barrウイルス起点を含む) を、COS細胞におけるChMIRpの発現のために使用し得る。増幅しゲル精製したPCR産物を、pCEP4に連結し、そしてCOS細胞にリポフェクションする。トランスフェクトした細胞を、100mg/mlハイグロマイシン中で選択し、そして得られた薬物耐性培養物をコンフルーエンスまで増殖させる、次いで、この細胞を、血清を含まない培地で72時間培養し、馴化培地を除去し、そしてChMIRpポリペプチド発現を、SDS - PAGEで分析する。

【0392】

ChMIRpポリペプチドの発現は、例えば、銀染色によって検出され得る。あるいは、ChMIRpは、エピトープタグ(例えば、IgG接触ドメインまたはFLAGエピトープ)を有する融合タンパク質として産生され、これは、タグペプチドに対する抗体を使用するウエスタンブロット分析によって検出され得る。

【0393】

ChMIRpポリペプチドは、SDS - PAGEゲルから取り出されるか、またはChMIRp融合タンパク質がこのエピトープタグに対するアフィニティク

ロマトグラフィーによって精製され、そして上記のように、N-末端アミノ酸配列分析に供され得る。

【0394】

(実施例6)

(ChMIRp抗体の産生)

ChMIRpポリペプチドに対する抗体は、精製したタンパク質で免疫化することによって、または生物学的合成もしくは化学的合成により生成されるChMIRpペプチドで免疫化することによって得られ得る。実質的に純粋なChMIRpポリペプチドまたはポリペプチドは、実施例5に記載されるように、トランスフェクトした細胞から単離され得る。最終調製物中のタンパク質の濃度は、例えば、Amiconフィルターデバイスで濃縮することによって、数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のレベルまで調整され得る。このタンパク質に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、次いで、抗体を生成するために、当該分野で公知の手順(例えば、HudsonおよびBayに記載される方法(Practical Immunology 第2版、Blackwell Scientific Productions)のいずれかによって調製され得る。

【0395】

(A. 抗ChMIRpモノクローナル抗体産生)

上記のように同定および単離された任意のペプチドのエピトープに対するモノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein(Nature, 256:495, 1975)の古典的方法またはその派生的方法に従って、マウスハイブリドーマから調製され得る。手短には、マウスに、数週間にわたって数 μg の選択したタンパク質を繰り返して播種する。次いで、このマウスを屠殺し、そして脾臓の抗体産生細胞を単離する。これらの脾臓細胞を、マウス黒色腫細胞(例えば、NS-1細胞)と共に、ポリエチレングリコールによって融合し、そして過剰の融合されなかった細胞を、ヒポキサンチン;アミノプテリン;およびチミジンを含む選択培地(HAT培地)上でのこの系の増殖によって破壊する。首尾よく融合された細胞を希釈し、そしてこの希釈物のアリコート、マイクロタイタープレートのウェルに置き、ここで、培養物の増殖を継続する。選択

後、組織培養上清を、各融合体のウェルから採取し、そしてEIAによるChM I r p抗体産生について試験する。選択陽性クローンを拡大し得、そしてそれらのモノクローナル抗体産物を、使用のために回収し得る。モノクローナル抗体産生のための詳細な手順は、Davisら(Basic Methods in Molecular Biology, Section 21-2, Elsevier, New York, NY)に記載される。

【0396】

(B. ポリクローナルChM I r p抗体産生)

単一のタンパク質の異種エピトープに対する抗体を含有するポリクローナル抗血清を、上記のように、発現されたタンパク質で適切な動物を免疫することによって調製され得る。効果的なポリクローナル抗体産生は、抗原および宿主種の両方に関連する多くの因子によって影響される。例えば、小さい分子は、大きい分子よりも免疫原性がより低い傾向にあり、そしてキャリアアジュバントの使用を必要とし得る。また、宿主動物は、播種の部位および用量に応答して変化し、不十分かまたは過剰な用量の抗原のいずれもが、低力価の抗血清を生じる。複数の皮内部位に投与される少ない用量(ngレベル)の抗原が、最も確実であるようである。ウサギについての効果的な免疫プロトコルは、Vaitukaitisら(J. Clin. Endocrinol. Metab., 33:988-991, 1971)に見出され得る。

【0397】

ブースター注射が、定期的間隔で与えられ得、抗血清を、その抗体力価が半定量的に決定した場合(例えば、既知の濃度の抗原に対するアガー中での二重免疫拡散法によって)に低下し始めたときに、回収し得る。例えば、Ouchterlonyら(Chap. 19: Handbook of Experimental Immunology, D. Weir(編)、Blackwell, 1973)を参照のこと。抗体のプラトー濃度は、通常、0.1~0.2mg/1ml血清(約12mM)の範囲にある。抗原に対する抗血清の親和性は、競合結合曲線を作成することによって(例えば、Fischer, D., (Chap. 42: Manual of Clinical Immunology, 第2版(

RoseおよびFriedman編) Amer. Soc. For Microbiol, Washington, D.C., 1980)に記載されるように)決定する。

【0398】

抗ChMIRp抗体を得るための代替的手順(例えば、完全なヒト抗体の産生のためのヒトIgG遺伝子座を有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリー(抗体可変ドメインの変異誘発によって作製されるような)のスクリーニング)もまた、使用され得る。

【0399】

(実施例7)

(ChMIRpの役割の機能分析)

インビボにおけるChMIRpの機能的役割を決定するために、ChMIRp遺伝子を、動物の生殖系列において過剰発現させるか、または相同組換えにより哺乳動物の生殖系列において不活化させる。この遺伝子が外因性もしくは内因性プロモーターエレメントの調節制御下で過剰発現される動物は、トランスジェニック動物として知られる。内因性遺伝子が相同組換えにより不活化されている動物もまた、「ノックアウト」動物として知られている。代表的な哺乳動物には、ウサギおよびげっ歯類の種(例えば、マウス)が含まれる。例示的手順は、米国特許第5,489,743号および国際特許公開第WO94/28122号に記載される。

【0400】

トランスジェニック動物は、発生および疾患プロセスに対する、ChMIRpの過剰発現または不適切な発現の効果の決定を可能にする。ChMIRpトランスジェニック動物はまた、レセプター活性を調節し得る化合物を試験するためのモデル系として使用され得る。

【0401】

「ノックアウト」動物は、胚発生ならびに免疫応答および増殖応答におけるChMIRpポリペプチドの役割の決定を可能にする。発生および増殖応答におけるChMIRpポリペプチドの役割は、これらの動物において、胚の発生ならび

に種々の器官および組織（例えば、骨および軟骨のような骨格成分）の発生および分化に対する遺伝子ノックアウトの効果の分析により決定される。

【0402】

（実施例8）

（ChMIRpポリペプチドの生物学的活性）

増殖および形態学的アッセイを、ChMIRp生物学的活性が、コンドロモジュリン-Iの活性に類似するか否かを決定するために行い得る。全てのアッセイについて、組換えChMIRp（実施例5に記載のように調製および精製したCOS細胞由来）を使用する。

【0403】

（A. 軟骨細胞の刺激）

ChMIRpが軟骨細胞においてDNAおよびプロテオグリカン合成を刺激する能力を、コンドロモジュリンファミリー活性として調べ得る。軟骨細胞を、Shimomuraら（*Calcif. Tissue Res.* 19:179-187, 1975）に記載されるように若年ウサギ由来の肋骨の増殖プレート軟骨から単離する。単離した軟骨細胞を、96ウェルマイクロタイタープレート中に 1×10^4 細胞/ウェルでプレートし、そして10%胎仔ウシ血清（FBS）を補充した改変イーグル培地（MEM）中で培養する。コンフルエント時に、プロテオグリカン合成を、Hirakiら（*Eur. J. Biochem.*, 260:869-878, 1999）に記載のように測定する。手短には、軟骨細胞を、0.3%の血清中でプレインキュベートする。24時間後、培地を、0.3%血清および組換えChMIRpポリペプチド（10~1000ng/ml）を含有する培地と置換する。3時間後、細胞を、5mCi/ml [35 S]-スルフェートでさらに17時間標識する。その後、プロテオグリカンを、1%セチルピリジニウムクロリドによって沈殿し、そして取り込まれた放射活性を測定する。インスリン様増殖因子IまたはIIを、ポジティブコントロールとして使用し得る。

【0404】

DNA合成がChMIRpポリペプチドによって刺激されるか否かを決定する

ために、単離した軟骨細胞を、10% FBSを含むMEM培地中に、96ウェルマイクロタイタープレート中 1×10^4 細胞/ウェルでプレートする。24時間後、培地を、0.3%血清+組換えChMIRpポリペプチド(10~1000 ng/ml)を含む培地と交換し、そして細胞を、20時間インキュベートする。次いで、細胞を、 $[^3\text{H}]$ -チミジン(5 mCi/ml)でさらに4時間標識する。その後、細胞を、PBSで洗浄しそして冷100%メタノールで10分間固定する。固定後、取り込まれた放射活性を、10%トリクロロ酢酸で沈殿しそしてカウントする。

【0405】

コンドロモジュリン-Iは、FGF-2と協同して、ソフトアガー中で軟骨細胞のコロニー形成を誘導する。ChMIRpポリペプチドがこの活性を示すか否かを決定するために、単離した軟骨細胞(5×10^3 細胞/ウェル)を、Inoueら(Biochem. Biophys. Res. Comm., 241:395-400, 1997)に記載されるように5% FBS、0.2 mMヒドロコルチゾン、および60 mg/mlトランスフェリンを補充したHAM F-12培地中の0.5 mlの0.41%アガロースに懸濁する。この細胞懸濁物を、0.72%アガロースの基底層に注ぎ、そして一晩インキュベートする。漸増濃度の組換えChMIRpポリペプチド(1~1000 ng/ml)および1 ng/ml FGF-2を、0.5%ウシ血清アルブミンを含む無血清F-12培地中に希釈する。この混合物を、ウェルの上層に均一に添加する。10日後、コロニーを、位相差顕微鏡下でカウントする。

【0406】

(B. 内皮細胞刺激)

ChMIRpポリペプチドの存在下での内皮細胞の増殖および形態発生をアッセイし、内皮細胞増殖および管形成の阻害が、コンドロモジュリン-Iの存在下のそれらと類似して生じるか否かを決定する。インビトロでのウシ頸動脈内皮細胞における増殖および管形態発生を、Hirakiら(FEBS, 415:321-324, 1997)によって記載されるように測定する。手短には、ウシ頸動脈(BCAE)細胞を、頸動脈の内側表面を穏やかに掻き取ることによって単

離する。この単離したBCAE細胞を、10% FBSを補充したRPMI-1640中で増殖および拡大させる。組換えChMIRpがBCAE細胞の増殖を阻害し得るか否かを決定するために、 $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込みを、上記のように測定する。内皮細胞の管形態発生に対するChMIRpの効果を試験するために、BCAE細胞(1×10^5 細胞/ウェル)を、0.1M NaOHおよび10xMEM培地中に希釈した0.3% I型コラーゲンゲルを含有する12ウェルプレート中で増殖させる。24時間後、培地を吸引し、そして組換えChMIRpポリペプチド(10~1000ng/ml)を含む水性混合物(70ml)を添加する。次いで、コラーゲン溶液を重層して、上層を作製する。3日後、管様網への細胞の形態学的変化を、位相差顕微鏡下で観察する。内皮細胞血管新生を測定するためのインビボアッセイは、Hirakiら(Eur. J. Biochem. 260:869-878, 1999)によって記載されるような、ニワトリ絨毛尿膜アッセイである。手短には、受精白色レグホンニワトリ卵を、37.8でインキュベートする。5日目に、気腔を穿刺し、そして1cm²のウィンドウをこの卵に開ける。組換えChMIRpポリペプチド(500ng/ml)を、0.75%アガロース中に希釈した。この固定したゲルを、この卵内の絨毛尿膜上に24時間置く。この膜を、微細な毛細管形成について、解剖顕微鏡下で調べる。

【0407】

(C. 骨芽細胞刺激)

骨芽細胞増殖に対するChMIRpの効果もまた、Morira(FEBS 406:310-314, 1997)によって記載のように、コンドロモジュリン-I活性の指標として測定し得る。クローン骨芽細胞株MC3T3-E1を、漸増濃度の組換えChMIRp(10~1000ng/ml)で処理する。DNA合成の尺度として、骨芽細胞の $[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込みを、上記のように測定する。

【0408】

ChMIRpポリペプチドのこの想定された生物学的機能は、コンドロモジュリン-Iの機能に類似する。とりわけ、コンドロモジュリン-Iは、軟骨細胞の

増殖および分化を刺激することが公知である。さらに、コンドロモジュリン - I は、インビボで、内皮細胞増殖および微細な毛細管形成を阻害するので、コンドロモジュリン - I は、抗脈管形成活性を有する。ChMIRp は、それ自体で、軟骨の発生および血管の形成における役割を果し得る。

【0409】

ChMIRp ポリペプチドが、腱、骨格筋、胸腺、卵巣、脳の大脳皮質、腸の M 細胞、および毛包に隣接する細胞において発現されることが、ノーザンブロット分析およびインサイチュハイブリダイゼーションによって決定された。腱および筋肉における発現は、ChMIRp が、腱および筋肉の発生および骨への筋肉の付着における役割を果たし得ることを示す。胸腺、毛包および腸の M 細胞における発現は、免疫機能における ChMIRp の潜在的な役割を示す。ChMIRp は、腱、骨格筋、胸腺、卵巣、脳、腸および毛包に存在する組織および特定の細胞型の再生（増殖および発生）において関与する増殖因子として作用し得る。

【0410】

これらの潜在的な機能に基づいて、ChMIRp は、腱疾患（例えば、腱炎および腱の断裂）、骨格筋疾患（例えば、悪液質および筋ジストロフィー）、免疫系機能不全疾患（例えば、炎症およびアレルギー、乏しい創傷治癒、関節炎およびアレルギー）、ならびに不妊疾患の診断および/または処置に有用であり得る。

【0411】

本発明を好ましい実施形態に関して記載してきたが、バリエーションおよび改変が当業者に想到することが理解される。従って、添付の特許請求の範囲が、特許請求される本発明の範囲内に生じるこのような等価的バリエーションを全て包含することが、意図される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Amgen, Inc.

<120> Chondromodulin-I Related Peptide

<130> 01017/35944

<140>

<141>

<150> US 09/724,310

<151> 2000-11-28

<150> US 60/176,898

<151> 2000-01-19

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1206

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (71)..(1021)

<400> 1

```

gcaactccac ctcagcagtg gtctctcagt cctctcaaag caaggaaaga gtactgtgtg 60
ctgagagacc atg gca aag aat cct cca gag aat tgt gaa gac tgt cac      109
           Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His
             1             5             10
att cta aat gca gaa gct ttt aaa tcc aag aaa ata tgt aaa tca ctt      157
Ile Leu Asn Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu
  15             20             25
aag att tgt gga ctg gtg ttt ggt atc ctg gcc cta act cta att gtc      205
Lys Ile Cys Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val
  30             35             40             45
ctg ttt tgg ggg agc aag cac ttc tgg ccg gag gta ccc aaa aaa gcc      253
Leu Phe Trp Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala
             50             55             60
tat gac atg gag cac act ttc tac agc aat gga gag aag aag aag att      301
Tyr Asp Met Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile
             65             70             75
tac atg gaa att gat cct gtg acc aga act gaa ata ttc aga agc gga      349
Tyr Met Glu Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly
             80             85             90
aat ggc act gat gaa aca ttg gaa gtg cac gac ttt aaa aac gga tac      397
Asn Gly Thr Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr
  95             100             105

```

act ggc atc tac ttc gtg ggt ctt caa aaa tgt ttt atc aaa act cag 445
 Thr Gly Ile Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln
 110 115 120 125

att aaa gtg att cct gaa ttt tct gaa cca gaa gag gaa ata gat gag 493
 Ile Lys Val Ile Thr Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu
 130 135 140

aat gaa gaa att acc aca act ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtc 541
 Asn Glu Glu Ile Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val
 145 150 155

cca gca gaa aag cct att gaa aac cga gat ttt ctt aaa aat tcc aaa 589
 Pro Ala Glu Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys
 160 165 170

att ctg gag att tgt gat aac gtg acc atg tat tgg atc aat ccc act 637
 Ile Leu Glu Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr
 175 180 185

cta ata tca gtt tct gag tta caa gac ttt gag gag gag gga gaa gat 685
 Leu Ile Ser Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp
 190 195 200 205

ctt cac ttt cct gcc aac gaa aaa aaa ggg att gaa caa aat gaa cag 733
 Leu His Phe Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln
 210 215 220

tgg gtg gtc cct caa gtg aaa gta gag aag acc cgt cac gcc aga caa 781
 Trp Val Val Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln
 225 230 235

gca agt gag gaa gaa ctt cca ata aat gac tat act gaa aat gga ata 829
 Ala Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile
 240 245 250

gaa ttt gat ccc atg ctg gat gag aga ggt tat tgt tgt att tac tgc 877
 Glu Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys
 255 260 265

cgt cga ggc aac cgc tat tgc cgc cgc gtc tgt gaa cct tta cta ggc 925
 Arg Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly
 270 275 280 285

tac tac cca tat cca tac tgc tac caa gga gga cga gtc atc tgt cgt 973
 Tyr Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg
 290 295 300

gtc atc atg cct tgt aac tgg tgg gtg gcc cgc atg ctg ggg agg gtc 1021
 Val Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
 305 310 315

taataggagg tttgagctca aatgcttaaa ctgctggcaa catataataa atgcatgctca 1081

ttcaatgaat ttctgcctat gaggcactctg gcccttggtta gccagctctc cagaattact 1141

tgttaggtaat tccctctcttc atgttctaat aaactctctac attatcacca aaaaaaaaaa 1201

aaaaa 1206

<210> 2
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn
 1 5 10 15
 Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
 20 25 30
 Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
 35 40 45
 Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met
 50 55 60
 Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
 65 70 75 80
 Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
 85 90 95
 Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
 100 105 110
 Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
 115 120 125
 Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
 130 135 140
 Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
 145 150 155 160
 Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
 165 170 175
 Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser
 180 185 190
 Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe
 195 200 205
 Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
 210 215 220
 Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
 245 250 255
 Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
 260 265 270
 Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
 275 280 285

```

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
290                               295                300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
305                               310                315

<210> 3
<211> 951
<212> DNA
<213> mouse

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(951)

<400> 3
atg gca aag aat cct cca gag aac tgt gag ggc tgt cac att cta aat 48
Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn
1                               5                10                15

gca gaa gct ctg aaa tct aag aag ata tgt aaa tca ctg aag att tgt 96
Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
20                               25

gga cta gtg ttt ggt atc ctg gcc tta act cta att gtc ctg ttt tgg 144
Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
35                               40                45

ggg agc aaa cac ttc tgg ccc gag gta tcc aag aaa acc tat gac atg 192
Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met
50                               55                60

gag cac act ttc tac agc aac ggc gag aag aag aag att tac atg gaa 240
Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
65                               70                75                80

att gat ccc ata acc aga aca gaa ata ttc aga agt gga aat ggc act 288
Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
85                               90                95

gat gaa aca ttg gaa gtc cat gac ttt aaa aat gga tac act ggc atc 336
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
100                              105                110

tac ttt gta ggt ctt caa aaa tgc ttt att aaa act caa atc aaa gtg 384
Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
115                              120                125

att cct gaa ttt tct gaa cca gag gaa gaa ata gat gag aat gaa gaa 432
Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
130                              135                140

att act aca act ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtt ccc gca gaa 480
Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
145                              150                155                160

aag cct att gaa aac aga gac ttc ctg aaa aat tct aaa att ctg gag 528
Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
165                              170                175

```

att tgc gat aat gtg acc atg tac tgg atc aat ccc act cta ata gca 576
 Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala
 180 185 190

gtt tca gaa tta cag gac ttt gag gag gac ggt gaa gat ctt cac ttt 624
 Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe
 195 200 205

cct acc agt gaa aaa aag ggg att gac cag aat gag caa tgg gtg gtc 672
 Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
 210 215 220

ccg caa gtg aag gtg gag aag acc cgc cac acc aga caa gca agc gag 720
 Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu
 225 230 235 240

gaa gac ctt cct ata aat gac tat act gaa aat gga att gaa ttt gac 768
 Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
 245 250 255

cca atg ctg gat gag aga ggt tac tgt tgt att tac tgt cgt cga ggc 816
 Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
 260 265 270

aac cgt tac tgc cgc cgt gtc tgt gaa cct tta cta ggc tac tac cca 864
 Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
 275 280 285

tac ccc tac tgc tac caa gga ggt cga gtc atc tgt cgt gtc atc atg 912
 Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
 290 295 300

cct tgc aac tgg tgg gtg gcc cgc atg ctt ggg aga gtc 951
 Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
 305 310 315

<210> 4
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> mouse

<400> 4
 Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Gly Cys His Ile Leu Asn
 1 5 10 15
 Ala Glu Ala Leu Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
 20 25 30
 Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
 35 40 45
 Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Ser Lys Lys Thr Tyr Asp Met
 50 55 60
 Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
 65 70 75 80
 Ile Asp Pro Ile Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
 85 90 95
 Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
 100 105 110

Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
 115 120 125
 Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
 130 135 140
 Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
 145 150 155 160
 Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
 165 170 175
 Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ala
 180 185 190
 Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Asp Gly Glu Asp Leu His Phe
 195 200 205
 Pro Thr Ser Glu Lys Lys Gly Ile Asp Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
 210 215 220
 Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Asp Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
 245 250 255
 Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
 260 265 270
 Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
 275 280 285
 Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
 290 295 300
 Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
 305 310 315

<210> 5
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 5
 Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Thr Met Val Gly Pro Glu
 1 5 10 15
 Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Thr Thr Val Thr Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gly Ser Pro Thr Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu
 35 40 45
 Ile Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr
 50 55 60
 Phe Trp Lys Gly Asn Asp Asn His Ile Tyr Asn Val His Tyr Ser Met
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Val
 85 90 95

Asn Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Lys Glu Ala Ile
 100 105 110
 Glu Val Asn Asp Phe Lys Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly
 115 120 125
 Gly Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu
 130 135 140
 Val Gly Thr Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Glu Leu Glu Gly Lys Ile
 145 150 155 160
 Met Pro Val Asn Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
 165 170 175
 Gln Pro Val Lys Asp Ser Ser Phe Leu Ser Ser Lys Ile Leu Glu Leu
 180 185 190
 Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Met Tyr Pro Lys Glu
 195 200 205
 Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Asn Ser Ala Pro Ser Thr
 210 215 220
 Thr Arg Arg Pro His Ser Glu Pro Arg Gly Asn Ala Gly Pro Gly Arg
 225 230 235 240
 Leu Ser Asn Gly Thr Arg Pro Asn Val Gln Asp Asp Ala Glu Pro Phe
 245 250 255
 Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
 260 265 270
 Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
 275 280 285
 Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
 290 295 300
 Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Val
 305 310 315 320
 Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val
 325 330

<210> 6
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Rat

<400> 6
 Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Thr Met Val Gly Pro Glu
 1 5 10 15
 Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Val Thr Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gly Ser Pro Thr Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu
 35 40 45

Ile Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr
 50 55 60
 Phe Trp Lys Gly Asn Asp Asn His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met
 65 70 75 80
 Ser Ile Asn Gly Arg Leu Gln Asp Ala Ser Met Glu Ile Asp Ala Ala
 85 90 95
 Asn Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile
 100 105 110
 Glu Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly
 115 120 125
 Gly Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu
 130 135 140
 Val Ser Thr Gly Thr Lys Gln Ser Ile Ser Glu Leu Glu Gly Lys Ile
 145 150 155 160
 Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
 165 170 175
 Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Ser Ser Lys Ile Leu Glu Phe
 180 185 190
 Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Met Tyr Pro Lys Glu
 195 200 205
 Ile Pro Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Ser Ser Ala Pro Ser Thr
 210 215 220
 Thr Arg Arg Pro His Ser Glu Pro Arg Gly Asn Ala Gly Pro Gly Arg
 225 230 235 240
 Leu Ser Asn Arg Thr Arg Pro Ser Val Gln Asp Asp Glu Glu Pro Phe
 245 250 255
 Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
 260 265 270
 Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
 275 280 285
 Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
 290 295 300
 Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Val
 305 310 315 320
 Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val
 325 330

<210> 7
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Bovine

<400> 7

Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
1 5 10 15

Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Ala Val Thr Val Lys
20 25 30

Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
50 55 60

Trp Lys Gly Ser Asp Asn His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
65 70 75 80

Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
85 90 95

Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Val Glu
100 105 110

Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
115 120 125

Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
130 135 140

Gly Thr Met Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Glu Leu Glu Gly Lys Ile
145 150 155 160

Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Gly Asp
165 170 175

Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu
180 185 190

Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
195 200 205

Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Leu Val Arg Lys Ile Val Thr Thr Thr
210 215 220

Thr Thr Arg Arg Leu Arg Ser Gly Pro Gln Gly Thr Pro Ala Pro Gly
225 230 235 240

Arg Pro Asn Asn Gly Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ala Glu Pro
245 250 255

Phe Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr
260 265 270

Phe Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg
275 280 285

Arg Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr
290 295 300

His Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val
305 310 315 320

Ile Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val
325 330 335

<210> 8
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 Met Thr Glu Asn Ser Asp Lys Val Pro Ile Ala Leu Val Gly Pro Asp
 1 5 10 15
 Asp Val Glu Phe Cys Ser Pro Pro Ala Tyr Ala Thr Leu Thr Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Ser Pro Ala Arg Leu Leu Lys Val Gly Ala Val Val Leu Ile
 35 40 45
 Ser Gly Ala Val Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile Gly Ala Phe Tyr Phe
 50 55 60
 Trp Lys Gly Ser Asp Ser His Ile Tyr Asn Val His Tyr Thr Met Ser
 65 70 75 80
 Ile Asn Gly Lys Leu Gln Asp Gly Ser Met Glu Ile Asp Ala Gly Asn
 85 90 95
 Asn Leu Glu Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Ala
 100 105 110
 Val Asn Asp Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly
 115 120 125
 Glu Lys Cys Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Ile Pro Glu Val
 130 135 140
 Gly Ala Val Thr Lys Gln Ser Ile Ser Ser Lys Leu Glu Gly Lys Ile
 145 150 155 160
 Met Pro Val Lys Tyr Glu Glu Asn Ser Leu Ile Trp Val Ala Val Asp
 165 170 175
 Gln Pro Val Lys Asp Asn Ser Phe Leu Ser Ser Lys Val Leu Glu Leu
 180 185 190
 Cys Gly Asp Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu
 195 200 205
 Ile Gln Arg Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr
 210 215 220
 Thr Lys Arg Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg
 225 230 235 240
 Leu Asn Asn Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe
 245 250 255
 Asn Pro Asp Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe
 260 265 270
 Asp Pro Arg Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg
 275 280 285

Ser Tyr Thr His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr
290 295 300

Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile
305 310 315 320

Met Pro Cys Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val
325 330

<210> 9

<211> 234

<212> PRT

<213> Rabbit

<400> 9

Thr Phe Lys Met Gly Ser Gly Ala Glu Glu Ala Ile Glu Val Asn Asp
1 5 10 15

Phe Gln Asn Gly Ile Thr Gly Ile Arg Phe Ala Gly Gly Glu Lys Cys
20 25 30

Tyr Ile Lys Ala Gln Val Lys Ala Arg Val Pro Glu Val Gly Thr Val
35 40 45

Thr Gln Gln Ser Ile Ser Ser Glu Leu Glu Gly Lys Ile Met Pro Val
50 55 60

Lys His Glu Glu Glu Ala Leu Val Trp Val Ala Val Gly Gln Pro Val
65 70 75 80

Gln Asp Asn Ser Phe Leu Ser Ala Arg Val Leu Glu Leu Cys Gly Asp
85 90 95

Leu Pro Ile Phe Trp Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Lys Glu Ile Gln Arg
100 105 110

Glu Arg Arg Glu Val Val Arg Lys Thr Val Pro Thr Thr Thr Lys Arg
115 120 125

Pro His Ser Gly Pro Arg Gly Asn Pro Gly Pro Ala Arg Met Arg Asn
130 135 140

Asp Ser Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Glu Pro Phe Asn Pro Asp
145 150 155 160

Asn Pro Tyr His Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe Asp Pro Arg Leu
165 170 175

Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg Ser Tyr Thr His
180 185 190

Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Asn Pro Trp Pro Tyr
195 200 205

Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Val Met Pro Cys Ser
210 215 220

Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val
225 230

<210> 10
 <211> 20850
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 gtgctgttcc tttggcctgg aataatcttt tccccactca ttaccagcta acttctactc 60
 attattcagg tcttagctta agtgacaact cctcagcatg gatttccttc acccatocca 120
 cccaatccaa attaggtgct ttaaagcacc tgcacttttc cttcttagca tataatcatca 180
 tttatgtact tttatttaca ggattttttt ccttttagtt taatgtctgt ctaccaaca 240
 agactctgag ctctataaag gaggaactgt gtttgcttgt ctactactga atatatatct 300
 agctctata acaatgctg ccacataggg gacactgaat aaatacatgc taatcaatga 360
 acagtctatt gaaatgccat gtcctttgtg ccatttttcc tgcttttctg aatcagaatt 420
 aatcactctt ccctctatgt ttccatggaa tattgctttg actottggtt taattcaatc 480
 cttttaacaa gaaaggcatg ttttaaaaga tctcaaagtc tattcaggag aggaacacat 540
 aaaaaagaat tataatacag catacaaagt ataacggttg aagtatgagc aagatacaaa 600
 agtagagcaa gggaaaggg aattaactta acgaagtggg agagatgaga ccaggaaagg 660
 ctttcagggg gtgataacat ctaggcagca ttttgaaagc caaatgggaa ttttccaggt 720
 aaacaagggg aggcagaaaa ctccaggcaa tgaatatagc atgggcaaat gtcctacagt 780
 gtgaagaagt agggcatggt cattaatagg gtgtacagtg tgaggcaggc atcagaggca 840
 tagtgtgaat aacatcactg aggggaacca tctgacccaa taacataag tttctccatg 900
 agactgctct tgtggctttt cttttttctc tctttaagct tgaccaaaga attgtagaac 960
 atatagaatc gtgacatatt tcataattta tgtaatcagt ttaatgcaca atcatgtatc 1020
 caacaattag aaaattattt tccttgagac attaggatgt ggaggtagtc atatgtacat 1080
 gccccatttt cctgccagc tgcgacotcc cagttggctc catcgctgta gaaaaaaaaatt 1140
 gtccaaaatc aagactagag agttggacaa agtcgagatc attaaatgcc tactatgtca 1200
 caataagtgg ctgggatttt atagacaatg aatagatact aaaggatttt aagcaagggg 1260
 gagattatcc tcaaatttga gtcttagaaa gatcaccttg aagacaatgt atgagagaca 1320
 aggaaaacag aattctattg caatagtaaa agtgactgag aacctcaact taaacagtgg 1380
 tgattgacaa tggagagaat aggattgcag agctaattca gaggcagaat taactggact 1440
 taataattga ttagccatgg ggatgaacaa gacaggaaga aatcaaggat catctggaag 1500
 tttctattct agagactgat tatttgttca tttagtgaga gaggtaatac caaaaaaaaa 1560
 gtgcatggtt gaaaggagag ataactaatt cagttcggga tatatggaat ttgaggtgtc 1620
 tgttgggtat thtagatgtc tagcaggtta gatggacata tggatgtgga gctccaagag 1680

aacagcctgg gtaaaatata tggatgtgaa agttctcaaa aaggatgaca aactaaactg 1740
 ggggtgttagc agtgagcaca ataggaaaga acagctttca aagatataaa aatttagaat 1800
 agataggatc tagtgattga ttggaataga taggatctag tgattgattg gataaaggga 1860
 atgtgaaaaa gagacaaaac ctcaagatttt tggtttgaaa gacaaaacctc acatttttgg 1920
 tttgaaagac aaacctcaga ttttggtttg aaagactggg tgcgtgacaa ttccactatt 1980
 ataagctaag ttatgttccc tcaaaattca tatgttgatg ccctagcccc cagtatttct 2040
 atatttgact gtatttggtg atagggtttt taaagaggta attaaggtta agtgaagtca 2100
 tatgaatggg acctatcca atataactga tgttcttata atgaaaggag attaggatac 2160
 aggcatacat agagggagaa tgcctatgta atatggagat ggtcatctac aagccaagga 2220
 gagaggactc agaagaagcc aacctgata acacctgat cttggacttc tagcctccag 2280
 agcagtaaga atataaatct ctgccattta agctactcag tctgtggtat tttgttatgg 2340
 cagccctagc aaactaatat agccaccaac taaggttggg aatatgaggg gaaaaagtag 2400
 gtttaggaaa ggtgttgaaa gaagactttg atatagaaca tgttgagttt gagattcctg 2460
 aggtatatcc aggtggagat gttcaaatgg ccttgaaatt aaaagatata actgggttac 2520
 aggtacagat gtggaatca ctgatatgta ggtgatattt tcaactgtag gaatgaatga 2580
 tatcatctac gaagtctgtg taaagtgaga atgatcatca agaagagaac cataaggcat 2640
 gtgaacatta aaaagcagac tgaggaagag gacccaagaa aggagaaaaa tcagagacag 2700
 aagatgaaga gagagagctt agaattagtc tttattttat cctgttttca ttataattag 2760
 ttaagtacat attgatagca ccatttaaag agctttaact tagtgaagga ggcaatatct 2820
 tattcatttc tgaatctcaa acaccaagca cagtgcctga catttaatat ccctgcaata 2880
 aatatttgtt gaaccaaatg gaatcgaaat taggacttca ttcccttctt tgttttgtt 2940
 gcttatttct ggagtgtgca gcatgtattg ccactgatat ttttaagttca tagtgaaaaa 3000
 tcatttcaat gtgttctagg cttggctccc ttccaacca acccccagga caatagtttt 3060
 cattataacc ttctgtcttt gccattctgg atggaattct gtgcacagaa gttatataca 3120
 tatatgggta tatctatgta acaaatcgca gcacaggagt cccctgggct ccctcaggct 3180
 ctggatgac atatttgagc catataaatt cagcttctcc tctggcatct gttagcagac 3240
 tcacttgcaa ctccacctca gcagtgtct ctcagtcctc tcaaagcaag gaaagagtac 3300
 tgtgtgctga gagaccatgg caaagaatcc tccagagaat tgtgaagact gtcacattct 3360
 aatgtaagt tgattcatat tttttccctt ttgagcagaa gcatggtttc acagatttat 3420
 catattgcaa agtgaacatt agaaagtgga atcaaaggtg actttgaatt atggcttgct 3480
 tattgagatt tattgtgtat tgttttattc tctctgttct ttggtttaggc agaagctttt 3540
 aatccaaga aaatatgtaa atcacttaag atttgtggac tgggtgttgg tatcctggcc 3600

etaactctaa ttgtcctggt ttgggggagc aagcacttct ggccggaggt acccaaaaaa 3660
 gtaagtaaat acacatcata atctgatgct tctgttctga gtttgattga atttaattag 3720
 taggcataata aattattctg aaaatgaaaa tcattaagtc tcttttgtgt ttattttctg 3780
 gtggatgaa aaactgaatc aagatTTTTc tctccttcat ttgocctaatt attttggtaa 3840
 gggaaaaaaa tttatcttct atatTTTtgg tagtaatgat aggggtgtaga attaccatt 3900
 ctctcataat gcttatattt aaggagttaa gactcctcct aggagcaaag tttttacctt 3960
 aagaaaaaat acttttaatc tttctttcaa ttatctgggc agaaactgat ggaaaagtaa 4020
 ttagaccacc acataaggag aaaccacca aagtggcagc aaaggatttt caggattat 4080
 gtttctgact taatgcatct gcagtggaga caggcagcaa gctgcttttc aggaggagca 4140
 attctcatac ctgacttcac atttatttat gactttaaaa agaaactaga gcttttcagc 4200
 tccttgccag ctgcaatcat cactgtccca ctgagatagc aatgccacaa ggtagaagca 4260
 tggacacca agtcattaat cacagataac tcagaaagct tctgatactg gggtcatttg 4320
 gtgaagcttg gctagccact gtagtttata tttctgtacc ttagtgttat tgttattcct 4380
 gggctcatag gcaatgggca agtttagata taaaataaat aaataaaacc atagtcccaa 4440
 ataaaacct agtccttca tgctcacaat ttccatttga aagataatca acaaatatac 4500
 aaactacaag ttgtgaagat agttttctgg ctttgccatg tttttctggt ggtgtgtgga 4560
 ttgctgtga agttattggt attactgttg ttaattgggt gcataagat gctcatttct 4620
 atttggtaac agatgtaggg agaaaaagc acaaatccag gaaggaggat gatacaagaa 4680
 aatgggttg catggaccgt taggagccaa agggagcaata ggagcagaga gaaaaaata 4740
 tgggtcagtg gggagagaga ggcagagcag gaaaagcaga aaataagctg gctaagtgtc 4800
 tgaaagataa cagaggtata aagcataacc acccttgggt tctccacctc tgctgtcata 4860
 cccactttca tttagtccca aaggatatct tatcaggttt aagtaggagg gagagcaagc 4920
 cagcctactt tgtttgctt tttatttata ctttgttcca gaaaagattt caggcatcac 4980
 ccaatgccta tagttagccc tatccctac tctcctccc ctactgtctc cttgcttctg 5040
 aactacttac cgttcaaagc tccttctaga gaagccacct gtgttcaggc tggcagggtg 5100
 ggtaaagcaa tcgagatcag gaaggaaaca gcaaattaat aagagagcca aaatgcattc 5160
 caatacaatt ctggtaccac ttagctaatt cccaaggatga tatgtcacc cacaagttga 5220
 accttggatc ctcttgaaaa ttatccatga gttaaagggc cataaatcct ttgttctcca 5280
 cagccataat gtacttaact gggcatggtg gatagctagt ctttttgacc accttagat 5340
 gcttgcctaa ataaggggcc aaatggcctt tcttgtttta ttgttgcatt tggactgca 5400
 aatgctattc caaaagagta tatgtgtttt tataaattta cagtgtcatt tgcctcaacg 5460
 cagctataaa cgactaggtg gagaccttgc ctttttattg caaagtgtca aactcacttg 5520

cagcttcatg gtctcctctc tttccctatt atatcatctt tacatctcat tctagtctcg 5580
 tttttaatga ttataaggag caatcctatg atacctcaaa ccaaaataaa accttggtcag 5640
 tgcattgcaca gaagaggtgg gatatgctgc tgaataaagt ttatcaaaaa tcaaacctct 5700
 tgtgaagtaa tccattttgg gatgtcattt tcagcaaagg gactctcaga aatgaacaaa 5760
 gctattatga agtaatccag ataaagacaa cagggtgtccc ctaggggcaag tttctctacc 5820
 atgaacaaat attggttggt ttccattcca gtggggagtt atgattcatt gtctttgata 5880
 ttttaagtcag gcccttcata agaccagggt tggttcattg aaaactaaga aatcagctgg 5940
 aatgaggat gctttactta gtccactact accttcagggt cccagacaaa gatctcaaga 6000
 gaccatctat gtttccaatg ggtacgccta tcaacaagcc tgccttagag cagacttaag 6060
 aattctggga agagactagc agtcagatta gtcttggaag agttgcatag gaaagggaca 6120
 caggcatctt acataaatta aagactctcc ccttaatggt atggcctagc aagaaacaac 6180
 agcagattaa aatccaggct ctttgggctt tccttaacaa atctatgaga cttggtggga 6240
 ctctgtggcc cttggtagag agagctgtgc atgcaactgt gcttattggt ggcagtgatt 6300
 tgtttgcagt cctgggattt cctccaagct ccttagtgtt gctctcctag cctccaccac 6360
 gcctcctttt tttttgtct ttcaacatct gtgtataata aacagtattt atttaacatc 6420
 ccacatctgg tgttgacatt tccatgcaa taagtcttc tcctcactcc cgctttgggtg 6480
 tgtacaaaag atccagattc ctgtatccaa attgagaaca agccatgctt gacctcctcc 6540
 cctcacatac ctccaggtctg cgtgcacaca ggtgtgcaca cgcacagact cacacacaca 6600
 cagacacaca cacacacaca cacagaccag agagagaatg aatcaaaat aaagtgaac 6660
 aaggacgact aactctgggt gagctgctgc attttcttac aggtcccagg cccctgacc 6720
 acagccacat acaggagcca cctgagctaa atgaaagcca ggtccatcca gctctgaatt 6780
 cagctttctt aaacaagcag aagagaccta ttcagtccca gcaattttga gaaagcatcg 6840
 taatgaggct ccccttctag gcagtgactg ccctgggatac attgaagcag aatcaccaaa 6900
 gaaacattct tgcctaaagc cccctgtatt acacatttta ctggaaacag tcagaagcca 6960
 actcctcagc taattaatcc aacatgaagc aaacaaatca gaaaaatcct agcccttaa 7020
 ccaacagttt agaaacttag cacagacctt gtagccatc cctgccaatc ctttgtggag 7080
 cgaggcagaa gaatcataca tttataaat gaaagagtggt ccttactgcc ttacatagga 7140
 gctgcctggg gactttaggg ttgtttgaaa gccatcagga ccacagtaat caatagattc 7200
 gtgaggatgt tccttcaact tctatatatt accagagcaa tgaggagtgg tagggataag 7260
 cgggcacttt tctgcctcc tgcacacct cagttgcagg tgatcactaa aacagtctcc 7320
 cccagcgttg tgagtccact atcattctag gttgaaaatc ctttgcctag aagaagcact 7380
 ttcttgacga gtctgattgc aacattttgt gctgcctat ttcttggcac gcacaattgg 7440

gcattagccc aatattaact tttttcgctc ctctctaggc acacaaggaa gacaactttt 7500
 ttctccaggt cccttgggct ttcctacacc acagtccggg gggtgaaatg tgggtctaga 7560
 gaaacattaa tataacctca aggaaaaagt tgaaggagta gccggaatat ttttggcagg 7620
 gagactgagc tttaccagat ggtgccatgt tggcattttc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7680
 gacctctctt ctttttcctc ttaaagcatt .gtgagacca ggtccaccct tgtacaactc 7740
 tcactgggcc agctcttatt ctgggctact caagggcagc tcccagcaat tatgtggagc 7800
 caggctgtgg ctgtgatggg catgttcttc ttagtcagtc tcttcattct cctaaggcag 7860
 cttttgctga acaacttata tgacaccagg atgaagagcc tgggccttca aagacagctg 7920
 : ttctggagtg gttgagagtg gaattggggc tgtggaggaa gtagcctgga tgatcaacag 7980
 .atagtggcag taggcgtagt ccagtgatca acctgacagg ttgatctgag caaatctcag 8040
 cagactttgc taactatcta acattacaga tgaaggggg taaaggatta aaatagggaac 8100
 tgagtcccta gagacactca gtgatttgc caaaatcaca cagcttghaa gtgggtgggt 8160
 taaggttaga actagaggct agtctgaaga ttctttccac tttcttcag ctgcatttaa 8220
 gaatcaggya tggggataat gggtaggaga 'aaaacttact ggtcagctca cgtctgtaga 8280
 : taaaagaagt agctttttct tgttgaaaaa gaatgtctgt gctgcttatg ccaatatttt 8340
 .gcatattgcc aaatgggtgat tgaagatgca gaactctaac tttgcataag gaacaatctg 8400
 tctgctctgt gttggtaaag aaataccag .aggcccttta attccccgag agttaggtta 8460
 ataatagata tggtagagtg catctctctc :ccttccttc agcctaacac ctgctagcca 8520
 : gctattctga gcatgtatct caectttgga gagtgtacct cataacagac agtaagggat 8580
 gaagatggag tgaagagcag ctgattaat cacaggcttc aaaaaacaaa cctaagccaa 8640
 atgtctcaa atccctgtca ggacaggcta aagcttcttg cccctaaaac agatccatca 8700
 cactgaggtc tgagatagct ttacctttc taaatagctt tctttctga tctcagggac 8760
 tgccacagag gcaagaaaac aaggaaaact gtgaaagagg gatgttaggg ctcatctgct 8820
 gcctgaatgg aggatttaac tggactgaag acagaattcc tgggcaggya agaaaaatgg 8880
 gtgtgtcct ctacatattt tgtcagtggt gtcttctac acttctcact gcctggactt 8940
 aaccacatat ctgtctcatt tcacttctga ttctattcc actccattgg ctctctgtt 9000
 ccattccagt gttctggctc ttatagttaa ggcagcctt atgtgtgggt ggagtaagag 9060
 cccatttgag tgggtctgga aagatgcctc tgccccaaa tatctccat tctctgtgcc 9120
 actgtgccta ttagattggg gcaaaagtaa ctgtggtttt agccattgaa agtaatggca 9180
 aagtaataaa gtaataaaaat ccaactattag tacttcattc ctctgagtga agtattgcac 9240
 tcaaatTTTT aaacagacaa atattcatca ctaatatcta agtgtgaaat catgggtcag 9300
 attgatttct tctttgtcat aaggtaactg aagcaccacg agattcctag atgtctagac 9360

aggagacaaa gggacataaa tgggaagaga aagggaagg gctatgagg tatagaatga 9420
 acagaatatg aaaatagagc agaaaaggaa agctagaagc accacaaatt atctctctct 9480
 attttccaat tgggcagggg tgtactcctc atcataattct gtcccttgctc tatcctccct 9540
 ggaataaagc tgagttggag gcagctgaga tgagctactt gtagccact cacacctctc 9600
 ttcaggccag tcatcctgtc tctgctttag cttgctcctg gagaggacaa agccatttat 9660
 tctttcatct ccagaaagac cttcaacccc tgagccagga agcttagtag agagcaaagt 9720
 acttggtatg tcaaatggca tgagactcta cgtcttcata cgggccagtg aagcttgcat 9780
 agccattacc caagcaatgt gctccacagg gacccaggcg agacagtggt tctggatttg 9840
 ctcataccca tctccaaaca gtccaaagtg ggccaccagc atcatcttcc tagacgaaga 9900
 acagtctgtt ccaaaaggac acctttgata gtggaattct gtctgggtga atatatagct 9960
 cccactcct acccctacc aaggattcac acataaacga agtcattctg tcccactct 10020
 agtaacttat cactactaac ataaagccaa caagttggtt aatgaacaca atcagaatgg 10080
 accccttctc cctaccaa aaaactcttt gcaggaatgt tgaaaataat caagatctgc 10140
 tgagcttggc agtttccaat agttttcctc tagcaagggt tccaagtaa gtgcattgcc 10200
 aacagtgcag gaaactcat tccacagaag cacactgaaa ttctaatgt caccagtagg 10260
 ttccatagtc ttctaccagt gattgaaaat acagcctgta ttttctcttt cgcaccaggt 10320
 ggcagtgttc cagcatcccc tagtctctaa cctcattttt ccatacaata atccatcagt 10380
 ggtgctactg atgaaataaa caccaccacc cagcccccaa tggctagtgg catcaacatt 10440
 tgtctcaaaa atggatagta tttctaacaa aattccccg ttgggagagc tgacaggact 10500
 ggatctgaag tggatgcctc tcttttctac ttaggtcaga cagactgaga gctcaatttg 10560
 ttgccacagg tagaagtttc tcttctcaag ctggctgcag agctggaact gaggacatat 10620
 ttattgctag aagcaaataa caaacctaaa ggaatttgct acctatcaca aaccaggcca 10680
 gacttctga gttactctg cagttgccag agagtcttaa gtattgtttt tctttcactt 10740
 ttaaaatggt ttttttaaaa gaccttgcca atactcaaaa atgtctcttt aggaagataa 10800
 ggatgtgcca ttggtgggga caacttattc aacaaatact taggttcaa ccatgtcaa 10860
 agcactgtag ggctaccaag aggtaaatga cattgtctct tgtttttctc ttcagcagct 10920
 acattagact tgtcaccctt gaagtaacac ttgcttctac aaatggttcc aatttgttt 10980
 tctctagttg agttgggtgaa tatttcacca ggttaaacct acattcagtc aatggcatca 11040
 gcagagacta aaaaatgacc caacctggtg taagttctct ataaggctgc cactgggaac 11100
 cgtatcatta gaaagcaatg tgggctctga agaagacttg ctttttcagc ctttttagttt 11160
 cccagatttt ttccataagg aaaaatgaac atggagaaac tcgataaaca aaggtctcct 11220
 aatgacagag ataagataga cttccaaaag gcatcatcag gtctggcctg gtttgtgaca 11280

gataacaaat tcctttatgc ttatttgctt ctacctataa atatgtccta aaactataag 11340
ttatgggctt actcctaaac tgcagtgcca tatgggactg gtccctcttg tcttttagaaa 11400
tacaattgcc tcttttagag tgcaggagaa aatctggggt tttgttttag ccaactcaaga 11460
aagacctgat gagcagtctt tcttcttggg aggctccatg ttacttaatg caggacactt 11520
ggctcagttg gcttaattcc atatacacia aagaatccgt agaacttgaa aacaactgaa 11580
tatggcttgg gaaacagaac ccaggaataa actgggtggg gttggttgcc gtataaagag 11640
aaggctaagg gaaggcaata aatgtttcct ggagtttaag gggcaaaagg aagcaaacag 11700
agcagggtag ggctctaata ttggcaagga gaaagtcttc agattctaaa aggaatagac 11760
tcaaggctgt tgtggcaata ttaaagccct ggataaataa ggagacaaaa aacacttaac 11820
cattttaagt gtattcaaat ctctttctaa gcctaatga atttcacggg tgaggggagg 11880
ggcagtaagg ggggggtcgt gattacttag cacttggaaa gggagtggt agcttaaga 11940
agcagcatag gttttagggt atccctcagc ttaacacaag gggaaaatac tttatagget 12000
ggtttgcaa ctatcatttg ctgtttagtc aaggctgcca agaaaactgt tgggaattctt 12060
agtaattagc tcagcagctt ggcttgaatt caaaatacca gctctgaagg gatccccata 12120
tcagctccag cgccaaaaag cacctcactt tagggacaca ctgagtatct tagagattgt 12180
tttctctgt tctcccaggc ctatgacatg gagcacactt tctacagcaa tggagagaag 12240
aagaagattt acatggaaat tgatcctgtg accagaactg aaatattcag aagcggaaat 12300
ggcactgatg aaacattgga agtgcacgac tttaaaaacg taagttggat gttttcctcc 12360
taaggcttbc cacttaaaat attagagcag ttgagtcaag ttaaaaatag cctccatcta 12420
aaatttgaat tcaaatggaa agctagcctc ctctagcttt ccatttgaat tcaaattttg 12480
ctagtctggg accccaacag atcatggaac ttactaatag tggctctttt gggagcttt 12540
attgttgttt tgtctgtttt atagggatac actggcatct acttctgtgg tcttcaaaaa 12600
tgttttatca aaactcagat taaagtgatt cctgaatttt ctgaaccaga agaggaaata 12660
gatgaggtat gtaagaagaa taattgtggg ggcaaaagac atcatttatt ggatgctagc 12720
tatgtgcaa acattgtact aaatgcttta cttttctttg attctccaac aaccttataa 12780
atagatacta ttgttatcat cttttcaga tcaggaaact agaactcaga gccaaaaagt 12840
gacttgctca aggccacaca gctagttagt agcagattgg ggtcttgaac ttaggccttt 12900
cagaaaactc aagtgcataa ttttaggtgc aatgctatac tcttataccg gggcacccat 12960
taacattatg ttgattttct ctgaaaccaa agatttctag taagagggat gagccagaga 13020
aacaaaatca atcttgctc agataaagcg tttttaaaaa agaaagtcc aaagccacct 13080
ggggttcttg ccacttttgt cacacttcag tattcaccta ttttaagat tgtggttcat 13140
tcaccttacc attttatgct gggctgctaa tggaaataatt cacatttaac ctcagtagga 13200

aaggcaaaag caaagaagggt gaacactgca atgggataca aattctctga aaacaccctg 13260
ctagaccaaa gtaaggcaac ctagggtgct ggtgaaatca ctgaatggcc ctttaaaacc 13320
taatgggaga tggatgittat tgcoctaaaat acaacgatct gtaaggccct tgaggctctt 13380
tattgttccc tgataTTTTg totataatta cagtatggtt ttattagtgg gaggagaagg 13440
gggacctcag ttaaggfcat attgtgacag catatcccca ctatagcaag aaaaaacaaa 13500
cattggtttg gtttggttta gtgcttagtt .gccaaatcta aagtggaatt atggcaatgg 13560
tagaatgac tttcttcttc ttcttcttct tctttgtatt tttagtagag acggggtttc 13620
accatagcca ggatggcttc aatctcctga cctcatgac cgcctccta ggctctcaa 13680
agtctggga ttacaggcat cagccaccgc gccagccat ggcagagtga tctttctata 13740
aactataaaa acctcttctt ttctttcttt ctttcttctc tctctccctg ttcttttca 13800
ctttctctcc acccagctcc ctccatcttg attctacca acccatttat cttttccttt 13860
accttttct ttacctttt ctttatitgg gggcgggtgg tggggaggac tatttttctt 13920
tcccttacc aagtcttaga gctgtcattg gctcccactt tactcttca tgctactggt 13980
ctcctcgggg ccagaggagt tacagaccct tgttactaga atttgcaaga aaaaaagaa 14040
cgttctccca aagatgatgc tctgctccca aggtctacgg tagtgacaaa gtttgagac 14100
tttttttaa gtaagcataa gttagatgca tctgaggaat agatcgacgt tcaggatatt 14160
aggaatgact atagaaggca aaggtaagat aaaaggaaaa tcaataggat taaaaagcta 14220
ctatacacia taacatatgc tgattacata cagaaaataa tgtaagcatt tgagtaggcc 14280
actcagcaat gagaacctga agtgatataa taggatttat ttttttgaat gattaaggca 14340
aaggaggcgg ggcacggtgg ctcacgccta taatcccagc cctttgggag gccgaagagg 14400
gggatcactg gaggtcagga gttcgagacc actctggcca acatggtgaa aacgcatctc 14460
tactaaaaca aaacaaaaca aaacaaaatt agccgggcat ggtggcgatg tgcttgtaat 14520
cccagctact gaagaggatg aggtgggagg atcacttgaa cccgggagtg ggaggtttca 14580
gtaagccgag tttgcccac tgcactccag cctgggtgac agagcgggac tcagtgtcaa 14640
aaaataaata aataacaaa aaataaaggc aaaggctcat aatgtctcat tttggcccta 14700
atttagtctt cagttaattt caccaaata tttaaataac gcaaattcat ttcatgatag 14760
taagaacact gtaccttcaa gtaaactctg tttttatata tcacgccaca gatTTTTTT 14820
taatgagaca aatttgggt cctgaatgac aaaaacctc ttctgtaatt cctccacac 14880
tgtatccatg gcatgtgtat tttaaacatg cagagcagg atataaatag cctgatattt 14940
gctaacaaag ctagttagca taccaacctc atttatata attccttca atgcatctca 15000
aggtcgttac agactcaagg acaaagggtc taagacttta gaattgtaa tgattccggg 15060
agaaattagt aagaactagg tatacaaac aattacctca atactagaaa ctgaagagaa 15120

agtggcatcc ttcacaatat aaaaaaagct gcttaaagga aaaacactct gtgagataaa 15180
 ctctaagcat ttacaatgaa aggaatgcaa tagtaggaag gccagtgaag tcataaactg 15240
 gagacttgcc tttaaaacat aaaaggaat cttttgtact ataactagct accatcaaca 15300
 ggcaaactct gtaaaaccaa aatattagat tacattgtta ttgaattgat ctaccagtt 15360
 tggattatag gagttttgtc agcttcgggt caaatcctgc ttgccacca agatgcaaac 15420
 ctaaaataag gcaggtaat aaaatgtatt .tataaaaaag aaaacaaatg taaatcactt 15480
 agggttccag aagctcaagt taaaacatac acagaccag gccaccctga aaataacgaa 15540
 gccctttct gactttgagt gaaatggtaa .cagagaaggc tcctacttta gtaagcagtc 15600
 ttgctgttag acccaggaag gaggaaggat cagttgttaa ctcccccaag gccaccact 15660
 gaatgcaagg cacagagcta gttcaccagc agccctagga ttaaaattgt tactactcaa 15720
 atatattgct ttccagcacc ccataatgct .tcacttgctc tactaatttc tctgccaatc 15780
 cctaccctaa gctactttct tctttcagaa tgaagaaatt accacaactt tctttgaaca 15840
 gtcagtgatt tgggtcccag cagaaaagcc tattgaaaac cgagattttc ttaaaaattc 15900
 caaaattctg gagattttgt ataacgtgac catgtattgg atcaatcca ctotaatc 15960
 aggtatgaca ttctatcct catcctcctc .ctattttcta agacagtaac aggttaattg 16020
 .tcccagcatt tagaggctac atttctagga aaacaaatga tcggtttata tcttcttga 16080
 tgagtctata tatgctgact gccagtgagg agggaatttt tcacagccaa gttataaatc 16140
 agataaatta atgttgacag gcttttaaat atcccagcaa aggtaacacc accctaattg 16200
 gactagtgat agcaaaaaac taatctgtct ctctttgcac atctatattc attgcagtcg 16260
 gtatgccaga ctattgctca aaccactgtg ggtccaacc aagaatagag gagagaaggg 16320
 caaaaacaat gctctgctat caagaaggat tcctatgctc aaatggtggc attttcctta 16380
 gaagatagga caatcactgc aatacaaat tctttgttgc tgttttagga attactataa 16440
 aaatagttga gggcttgatg tccagagtag aagagtccag ccctcaactt ccagtcagcc 16500
 catagagaag gtaaaggccc ctggatgtct tagtctgttt agctaacatg gaatttggcc 16560
 tccctcattc tgcacagcat agattactct attacccaag agaggttatt ctaccaatg 16620
 taagcatctg tgggtactct ttagagatat taaaaagggt actaaatgca gtgtggtatc 16680
 ctggactgga tgctggaaca gaaaaaaca ttagtagaaa tactaatgaa atctgaataa 16740
 agtctgtagt ttagttaata acattgtacc aattctaact tctgattttt gatcattgta 16800
 ccattggtat gtgaggtaac attaggggaa accgggtgaa gaatatgtga actctgtact 16860
 atttctgcaa ctctccata aatctaagat ttttctaaa cagaaagttt aaaaaaatt 16920
 taagacaaga aacataaggg aagtggagg acagaggatg tcaaatcaat tcaggcaacc 16980
 aagaaatatt tattgagcat ctacatgggt aaaatcatca ttgtaggaga tacagaagtc 17040

ccttgtcctc agtttttaat ttagtgtgct attaagtcaa agcagtaaat gttt gatgcc 17100
aaagaagcaa agaagtttgt gtatgtagaa atgatcaggc ttgttttgga aactactcta 17160
aaatatcagc tgaaggagct tggaaaagtg gtccatgcct aaatgatgcc agttagaaga 17220
cacaatgaaa atctctatcc ccagctgcta ttctcccaag cacttctttc aggaacatct 17280
gcaaagcagt tgcacacaaa ctttgcattt attatcttag tttctgagtt acaagacttt 17340
gaggaggagg gagaagatct tcactttcct gccaacgaaa aaaaagggat tgaacaaaa 17400
gaacagtggtg tggtcctca agtgaaagta gagaagaccg gtcacgccag acaagcaagt 17460
gaggaagaac ttccaataaa tgactatgtg agttatggtt atgtaaactc ttgatagagg 17520
aggaaaaaag agccctcaca aaacttacta ccctcagat cacaatcatt ggaaggagaa 17580
cgatcatggc tttaacaaaa aaaaaaaaaat gtttaagaaa cttggaatct ccaggaggct 17640
cattcaaaat caatctcgat ctctgtagat abatctccat gatcaggcta aggagcttaa 17700
ttctcaciaa gcctccaact catacagtct tctagttctc ccctgcttgg tgagaactct 17760
tgctagttaa ccttctctc ccaccccaa cactggcttc ttcttcttc agactgaaaa 17820
tggaatagaa ttgatccca tgctggatga gagaggttat tgttgtattt actgccgtcg 17880
aggcaaccgc tattgoggcc gcgtctgtga accttacta ggctaactcc cataccata 17940
ctgctaccia ggaggacgag tcatctgtcg tgcacatctg ccttctaact ggtgggtggc 18000
ccgcatgctg gggagggtct aataggaggc ttgagctcaa atgcttaaac tgctggcaac 18060
atataataaa tgcattctat tcaatgaatt tctgcctatg aggcatctgg cccttggtag 18120
ccagctctcc agaattactt gtaggtaatt cctctcttca tgttctaata aactctaca 18180
ttatcaccaa cagcctgatt gctgctgaac acactgggta agtgtttctt gagaatattc 18240
acagcaactg aaatggagca gaccctcaa acatagatga ctatgctgag gctcagaaaa 18300
caatgcccc aatgaaagc ctcagaagca aaagttttc tctgacctc toctacctgc 18360
cagtctctca gtccattct ccccgaggc tagccataaa agctagaatc cctcttctc 18420
aaggcgtgct atataaatca aaacctttt ttccaaagc cagccttaa cctaaaaata 18480
tcactctgat ttttctctg cttttctgtg taaaagctgg ccataaggaa attatctgac 18540
ctaccttgtt tgactgtagg tcataagact ccctttccag agaggatcca acacaacagg 18600
tttggaahta gaaaagggca aagcataatg atacctaaat atcatatitt actctgtgtt 18660
attaagacag tggaaataag gagctgatga taaaatgtct ccataactga tgcattaaaa 18720
acatatcctt ttgtgcatag cccagtggt taattatag aaagatata tgtgaacttc 18780
cttaagtatc aattaagctg ctggacaggc agtgagtcac agcaggccaa cactaaaata 18840
ttccaaatgt gcagactcag caaaggagaa agctaaacta gcaaaaaggg tctcaggctc 18900
tcctcctata aacaggaact caacttagga caaattcaac attccatagc cttcacatct 18960

ggctcctcctt tataatcagtg tttgattaga tacctttcca aggcaattgt ctaaaaaaca 19020
 agaaccata aataccattc acagaaacag gcatcatagg aaattattga gatgaggaaat 19080
 caaatgggat tttccctccc aaatcacagg gagctagcag tataccagtt tctgaaagaa 19140
 aaggtaaggg catacttccc aatcactcca tactttgctt gggaaaggaa aagagggcaa 19200
 aggggaaaga gaaagaagtg gttaaaggg aacgtaacc ttgatgtccc tagagccagt 19260
 ttcagtttca aaattcatgc tctaccaate tgcacccct tctagtttca tttgaaggta 19320
 gcatatactt cattgctcaa ctccaagtt attgtgtcat gaaaatgtct gtctggaact 19380
 ttctatcaga aaaatatttt caaataaatt ctccaccaag atgcctgtgg gccagcagtc 19440
 attttctccc atttaagagt tgaggaaatc catagaaaat ggctttgcc aaggttgagt 19500
 tgtgattagc cagtcattaa ttggtaatta gcataatgc catacttaga ttaccaattt 19560
 tcacagaaag agagcacaat aaaatatatc taacaatgca cattactgaa aatattttta 19620
 attgatgatt tagaagacat ctgattgttt tagagtactt cgattatcat aacaagcatt 19680
 aatttatagt tgaatagaa aaacgtcaa gataggaaat tactttgagg ttatatgaac 19740
 tttatgatgt ttctatcatt gttttttaat aagactactc atttttaaca ttgctttttt 19800
 agatcagcca ataattttat tatatttaat tttttctatt ttttattat ttttccatag 19860
 gttattgggg tacaggaggt atttggttac atgagtaagt tatttagtga tgatttgtga 19920
 gattttggtg caccatcac ccaagcagta tacactgaac cctatttgtg gtcttttatc 19980
 cctcggcccc ccacccacc atttctcca agtcaccaa gtccattctg tatttttttt 20040
 tttttttgag acggagtctt cctttgtcgc ccaggctgga gtgcagtggt gcgatctctg 20100
 ctactgcaa gctcgcctc ccgagttcac gccattctcc tgcctcagcc tcccagtag 20160
 ctgcgactac aggtgcctgc caccagccc ggctaatttt ttttttttt ttttgtattt 20220
 ttagtagaga cagggttca cogtcttagt caggatcgtc tcatctcct gacctcaggt 20280
 gatccaccog cctcggcctc taaaagtgtt gggattacag gagtgagcca ccgcgcctgg 20340
 cccattgtat cattcttatg cttttgcgtc ctcatagctt agcttccagc tatctgtgag 20400
 aacatgcaat gtttggtttt ccattcttga gttacttcac ttagaataat agtctccagc 20460
 cgggcacggt ggctaagcct gtaatgacag cacttttggg aggccaaggt gggcggatca 20520
 cgaggtcagg agatcaagac catcctggct aacacgggta aacccgtct ctactaaaaa 20580
 tacaaaaaaa ttagccaggt gtggtggcag gcgcctgtag acccagccac tcaggaggct 20640
 gaggcaggag aatggcatga acccgggagg cggagcttgc actgagccga gatcgcacca 20700
 ctgcactcca gcctgggcca cagatcaaga ctctgtctca aaaaaaaaaa agaaagaata 20760
 atagtctcca atctcatcca tgttaactgca aatgccatta attcgttctt tgttatgact 20820
 gagtagtatt ccatcataca tatgtgtgtg 20850

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2244-23

 <400> 11
 cacgaagtag atgccagtgt atcc 24

 <210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 12
 gtgtacttcc aatgtttcat cagtgc 26

 <210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 13
 ccagttacaa ggcacgatga cacg 24

 <210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 14
 cgtcctcctt ggtagcagta tgg 23

 <210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 15
 ccaccccaat acgactcact tagggc 30

 <210> 16
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 16
 actcactata gggctcgagc ggc 23

 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 17
 gtcagtgatt tgggtcccag cag 23

 <210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 18
 cgtgaccatg tattggatca atccc 25

 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 19
 atggcaaaga atcctccaga gaac 24

 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 20
 ctattagact ctccaagca tgcg 24

 <210> 21
 <211> 11

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: peptide

 <400> 21
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

【図面の簡単な説明】**【図1】**

図1は、オープンリーディングフレーム（配列番号4）を含むマウスChMIRp cDNAの全コード領域を表す配列番号3として示されるポリヌクレオチド配列を示す。

【図2】

図2は、オープンリーディングフレーム（配列番号2）を含むヒトChMIRp cDNAの全コード領域を表す配列番号1として示されるポリヌクレオチド配列を示す。

【図3】

図3は、ヒトChMIRpポリペプチド配列（配列番号2）およびマウスChMIRpポリペプチド配列（配列番号4）の配列を示す。

【図4】

図4は、ヒトとマウスChMIRpポリペプチド配列（それぞれ、配列番号2および配列番号4）との間の相同性および種々の哺乳類種（配列番号5～9）由来のchondromodulin-Iポリペプチドを示す。

【図5】

図5は、ボールドにおいて下線を引いたエクソンおよびスプライスアクセプター/ドナー部位を有する、配列番号10として示されるヒトChMIRpの完全ゲノムDNA配列を示す。

【図1】

Figure 1 マウス ChMIrp

```

          10              30              50
SEQ ID NO:3 ATGGCAAAGAATCCTCCAGAGAACTGTGAGGGCTGTACATTCTAAATGC
SEQ ID NO:4 M A K N P P E N C E G C H I L N A
          70              90
AGAAGCTCTGAAATCTAAGAAGATATGTAAATCACTGAAGATTGTGGAC
  E A L K S K K I C K S L K I C G
          110              130              150
TAGTGTGGTATCCTGGCCTTAACTCTAATGTCTCTGTTTGGGGGAGC
  L V F G I L A L T L I V L F W G S
          170              190
AAACACTTCTGGCCCGAGGTATCCAAGAAAACCTATGACATGGAGCACAC
  K H F W P E V S K K T Y D M E H T
          210              230              250
TTTCTACAGCAACGGCGAGAAGAAGAAGATTACATGGAATTTGATCCCA
  F Y S N G E K K K I Y M E I D P
          270              290
TAACCAGAACAGAAATATTAGAAGTGGAAATGGCACTGATGAAACATTG
  I T R T E I F R S G N G T D E T L
          310              330              350
GAAGTCCATGACTTTAAAAATGGATACACTGGCATCTACTTTGTAGGTCT
  E V H D F K N G Y T G I Y F V G L
          370              390
TCAAAAATGCTTTTATAAACTCAAATCAAAGTGATTCTGAAATTTCTG
  Q K C F I K T Q I K V I P E P S
          410              430              450
AACCAGAGGAAGAAATAGATGAGAATGAAGAAATTACTACAACCTTTCTTT
  E P E E E I D E N E E I T T T F F
          470              490
GAACAGTCAGTGATTGGGTTCCCGCAGAAAAGCCTATTGAAAACAGAGA
  E Q S V I W V P A E K P I E N R D
          510              530              550
CTTCTGAAAAATCTAAAATTTCTGGAGATTTGGGATAATGTGACCATGT
  F L K N S K I L E I C D N V T M
          570              590
ACTGGATCAATCCCACTCTAATAGCAGTTTCAGAATTACAGGACTTTGAG
  Y W I N P T L I A V S E L Q D F E
          610              630              650
GAGGACGGTGAAGATCTTCACTTTCTACCAGTGAAAAAAGGGGATTGA
  E D G E D L H F P T S E K K G I D
          670              690
CCAGAATGAGCAATGGGTGGTCCCGCAAGTGAAGGTGGAGAAGACCCGCC
  Q N E Q W V V P Q V K V E K T R
          710              730              750
ACACCAGACAAGCAAGCGAGGAAGACCTTCTATAAATGACTATACTGAA
  H T R Q A S E E D L P I N D Y T E
          770              790
AATGGAATTGAATTTGACCCAATGCTGGATGAGAGAGGTTACTGTTGTAT
  N G I E F D P M L D E R G Y C C I

```

【図1-1】

Figure 1 (続き)

```

          810              830              850
SEQ ID NO:3 TTACTGTCTGTCGAGGCAACCGTTACTGCCCGCGTCTGTGAACTTTAC
SEQ ID NO:4 Y C R R G N R Y C R R V C E P L
          870              890
TAGGCTACTACCCATACCCCTACTGCTACCAAGGAGGTCGAGTCATCTGT
  L G Y Y P Y P Y C Y Q G G R V I C
          910              930              950
GTGTCAATCATGCCTTGCAACTGGTGGGTGGCCCGCATGCTGGGAGAGTC
  R V I M P C N W W V A R M L G R V

```

【図 2】

Figure 2 *ChMlrp*

```

          10              30              50
SEQ ID NO:1 GCAACTCCACCTCAGCAGTGGTCTCTCAGTCCTCTCAAAGCAAGGAAAGA
          70              90
          GTACTGTGTGCTGAGAGACCATGGCAAAGAATCCTCCAGAGAATTGTGAA
SEQ ID NO:2          M A K N P P E N C E
          110              130              150
          GACTGTACATTCTAAATGCAGAAGCTTTTAAATCCAAGAAAATATGTAA
          D C H I L N A E A F K S K K I C K
          170              190
          ATCACTTAAGATTTGTGGACTGGTGTGGTATCCTGGCCCTAACTCTAA
          S L K I C G L V F G I L A L T L
          210              230              250
          TTGTCTGTGTTTGGGGAGCAAGCACTTCTGGCCGGAGGTACCCAAAATA
          I V L F T G S K H F T P E V P K K
          270              290
          GCCTATGACATGGAGCACACTTCTACAGCAATGGAGAGAAGAAGAT
          A Y D M E H T F Y S N G E K K K I
          310              330              350
          TTACATGGAAATGTATCCTGTGACCAGAACTGAAATATTCAGAAGCCGAA
          Y M E I D P V T R T E I F R S G
          370              390
          ATGGCACTGATGAAACATTGGAAGTGCCGCACTTTAAAAACGGATACT
          N G T D E T L E V R D F K N G Y T
          410              430              450
          GGCATCTACTTCGTGGGTCTTCAAAAATGTTTATCAAAACTCAGATTAA
          G I Y F V G L Q K C F I K T Q I K
          470              490
          AGTGATTCTGAAATTTCTGAACCAGAAGAGGAAATAGATGAGAATGAAG
          V I P E F S E P E E E I D E N E
          510              530              550
          AAATTACCACAACCTTTCTTTGAACAGTCAGTGATTTGGGTCCCAGCAGAA
          E I T T T F F E Q S V I W V P A E
          570              590
          AAGCCTATGAAAACCGAGATTTCTTAAAAATCCAAAATCTGGAGAT
          K P I E N R D F L K N S K I L E I
          610              630              650
          TTGTGATAACCGTACCATGTATTGGATCAATCCCACTCTAATATCAGTTT
          C D N V T M Y W I N P T L I S V
          670              690
          CTGAGTTACAAGACTTTGAGGAGGAGGAGAAGATCTTCACTTTCTCGCC
          S E L Q D F E E E G E D L H F P A
          710              730              750
          AACGAAAAAAGGGATTGAACAAAATGAACAGTGGGTGGTCCCTCAAGT
          N E K K G I E Q N E Q W V V P Q V
          770              790
          GAAAGTAGAGAAGACCCGTCACGCCAGACAAGCAAGTGAGGAAGAAGTTC
          K V E K T R H A R Q A S E E E L
          810              830              850
          CAATAATGACTATACTGAAAATGGAATAGAATTTGATCCCATGCTGGAT
          P I N D Y T E N G I E F D P M L D

```


【図4】

Figure 4 複数の遺伝子ファミリーメンバーの相同性

| | | | |
|------------|----------|--|-----|
| SEQ ID NO: | 1 | | 50 |
| 2 | HuChMIrp | ----- --MAKNPPEN CEDCHILNAE AFKSKKICKS LKICGLVFGI | |
| 4 | MuChMIrp | ----- --MAKNPPEN CEGCHILNAE ALKSKKICKS LKICGLVFGI | |
| 5 | MuChMI | MTENS DKVPI TMVGPEDVEF CSPPAYATVT VKPSGSPTRL LKVGAVVLIS | |
| 6 | ラット ChMI | MTENS DKVPI TMVGPEDVEF CSPPAYATVT VKPSGSPTRL LKVGAVVLIS | |
| 7 | マウス ChMI | MTENS DKVPI ALVGPDDVEF CSPPAYAAVT VKPS.SPAPRL LKVGAVVLIS | |
| 8 | HuChMI | MTENS DKVPI ALVGPDDVEF CSPPAYATLT VKPS.SPAPRL LKVGAVVLIS | |
| 9 | ウサギ ChMI | MTENS DKVPI ALVGPDDVEF CGPPAYATVT VKPS.GPAPRL LKVGAVVLIS | |
| SEQ ID NO: | 51 | | 100 |
| 2 | HuChMIrp | LALTLIVLFW GSKHFVPEVP KKAYDMERTF YSNGEKKKIY MEIDPVTRE | |
| 4 | MuChMIrp | LALTLIVLFW GSKHFVPEVS KCTYDMERTF YSNGEKKKIY MEIDPVTRE | |
| 5 | MuChMI | GAVLLLP GAI GAFYFWKGD NHIYNVHYSM SINGKLQDGS MEIDAVNNLE | |
| 6 | ラット ChMI | GAVLLLP GAI GAFYFWKGD NHIYNVHYTM SINGRLQDAS MEIDAVNNLE | |
| 7 | マウス ChMI | GAVLLLP GAI GAFYFWKGD NHIYNVHYTM SINGKLQDGS MEIDAVNNLE | |
| 8 | HuChMI | GAVLLLP GAI GAFYFWKGD SBIYNVHYTM SINGKLQDGS MEIDAVNNLE | |
| 9 | ウサギ ChMI | GAVLLLP GAI GAFYFWKGD NHIYNVHYTM SINGKLQDGS MEIDAVNNLE | |
| SEQ ID NO: | 101 | | 150 |
| 2 | HuChMIrp | IFRSNGTDE TLEVHDFENG YTGILYFVGLQ KCFIKTQIKV .IPEFSEPEE | |
| 4 | MuChMIrp | IFRSNGTDE TLEVHDFENG YTGILYFVGLQ KCFIKTQIKV .IPEFSEPEE | |
| 5 | MuChMI | TFKMGSGAKE AIEVNDPQNG ITGIRFAGGE KCYIKAQVKA RIPEVGTVK | |
| 6 | ラット ChMI | TFKMGSGAKE AIEVNDPQNG ITGIRFAGGE KCYIKAQVKA RIPEVSTGTK | |
| 7 | マウス ChMI | TFKMGSGAKE AIEVNDPQNG ITGIRFAGGE KCYIKAQVKA RIPEVGTMTK | |
| 8 | HuChMI | TFKMGSGAKE AIAVNDPQNG ITGIRFAGGE KCYIKAQVKA RIPEVGVTK | |
| 9 | ウサギ ChMI | TFKMGSGAKE AIEVNDPQNG ITGIRFAGGE KCYIKAQVKA RVPEVGTVTQ | |
| SEQ ID NO: | 151 | | 200 |
| 2 | HuChMIrp | EID...ENE EITITFFRQS VIWVPAEKPI ENRDPLKNSK ILEICDNVIM | |
| 4 | MuChMIrp | EID...ENE EITITFFRQS VIWVPAEKPI ENRDPLKNSK ILEICDNVIM | |
| 5 | MuChMI | QSI.SELGK IMPVYEEES LIWVAVDQPV KDNSFL.SSK ILELCGDLPI | |
| 6 | ラット ChMI | QSI.SELGK IMPVYEEES LIWVAVDQPV KDNSFL.SSK ILEFCGDLPI | |
| 7 | マウス ChMI | QSISSLEGK IMPVYEEES LIWVAGDQPV KDNSFL.SSK VLELCGDLPI | |
| 8 | HuChMI | QSISSLEGK IMPVYEEES LIWVAVDQPV KDNSFL.SSK VLELCGDLPI | |
| 9 | ウサギ ChMI | QSISSLEGK IMPVYEEES LIWVAVDQPV QDNSFL.SAR VLELCGDLPI | |
| SEQ ID NO: | 201 | | 250 |
| 2 | HuChMIrp | YWINPTLISV SELQDFEEEG EDLHFPANEK KGIDQNEQWV VPQVKEVTR | |
| 4 | MuChMIrp | YWINPTLIAV SELQDFEEDG EDLHFPNSEK KGIDQNEQWV VPQVKEVTR | |
| 5 | MuChMI | FWLKPMYPKK IQRERREVVV NS.APSTTR PHSEPRGNAG PGRLSNGTRP | |
| 6 | ラット ChMI | FWLKPMYPKK IPRERREVVV SS.APSTTR PHSEPRGNAG PGRLSNRTTP | |
| 7 | マウス ChMI | FWLKPTYPKK IQRERRELVV KIVTTTTR LRSQPQTTPA PGRPNNGTRP | |
| 8 | HuChMI | FWLKPTYPKK IQRERREVVV KIV.PTTTR PHSGPRSNPG AGRLNNETRP | |
| 9 | ウサギ ChMI | FWLKPTYPKK IQRERREVVV KTV.PTTTR PHSGPRGNPG PARMRNDSEP | |
| SEQ ID NO: | 251 | | 300 |
| 2 | HuChMIrp | HARQASESEL PINDYTE... NGIEFDPLMD ERGYCCICYR RGNRYCRRVC | |
| 4 | MuChMIrp | HARQASEEDL PINDYTE... NGIEFDPLMD ERGYCCICYR RGNRYCRRVC | |
| 5 | MuChMI | NVQDDAEPFN PDNFXHQQEG ESMTFDPRLD HEGICCIER RSYTHCQKIC | |
| 6 | ラット ChMI | SVQDDEPFN PDNFXHQQEG ESMTFDPRLD HEGICCIER RSYTHCQKIC | |
| 7 | マウス ChMI | SVQDDEPFN PDNFXHQQEG ESMTFDPRLD HEGICCIER RSYTHCQKIC | |
| 8 | HuChMI | SVQEDSQAFN PDNFXHQQEG ESMTFDPRLD HEGICCIER RSYTHCQKIC | |
| 9 | ウサギ ChMI | SVQEDSEPFN PDNFXHQQEG ESMTFDPRLD HEGICCIER RSYTHCQKIC | |

【図4-1】

Figure 4 (続き)

| | | | |
|------------|----------|--|-----|
| SEQ ID NO: | | 301 | 337 |
| 2 | HuChMIrp | EPLGGYYP YCYQGRVIC RVIMPCNWWV ARMLGRV | |
| 4 | MuChMIrp | EPLGGYYP YCYQGRVIC RVIMPCNWWV ARMLGRV | |
| 5 | MuChMI | EPLGGYYP YNYQGRSAC RVVMPCSNWWV ARILGMV | |
| 6 | ラット ChMI | EPLGGYYP YNYQGRSAC RVVMPCSNWWV ARILGMV | |
| 7 | マウス ChMI | EPLGGYYP YNYQGRSAC RVIMPCSNWWV ARILGMV | |
| 8 | HuChMI | EPLGGYYP YNYQGRSAC RVIMPCSNWWV ARILGMV | |
| 9 | ウサギ ChMI | EPLGGYYP YNYQGRSAC RVVMPCSNWWV ARILGMV | |

【図5】

Figure 5 (SEQ ID NO: 10)

```

1  GTGCTGFTCC TTTGGCCTGG AATAATCTTT TCCCCACTCA TTACCAGCTA
51  ACTTCTACTC ATTATTCAGG TCTTAGCTTA AGTGACAACCT CCTCAGCATG
101 GATTTCCTC ACCCATCCCA CCCAATCCAA ATTAGGTGCT TTAAAGCACC
151 TGCACITTTTC CTTCTTAGCA TATATCATCA TTTATGTACT TTTATTTACA
201 GGATTTTTTTC CCTTTTAGTT TAATGTCTGT CTACCCAACA AGACTCTGAG
251 CTCTATAAAG GAGGAACTGT GTTTGCTTGT CTACTIONTGA ATATATATCT
301 AGCTCCTATA ACAATGCCTG CCACATAGGG GACACTGAAT AAATACATGC
351 TAATCAATGA ACAGTCTATT GAAATGCCAT GTCCTTTGTG CCATTTTTC
401 TGCTTTTCTG AATCAGAATT AATCACTCTT CCCTCTATGT TTCCATGGAA
451 TATTGCTTTG ACTCTTGGTT TAATTCAATC CTTTAAACA GAAAGGCATG
501 TTTTAAAAGA TCTCAAAGTC TATTCAGGAG AGGAACACAT AAAAAAGAAT
551 TATAATACAG CATACAAAGT ATAACGGTTG AAGTATGAGC AAGATACAAA
601 ACTAGAGCAA GGGAAAGGGT AATTAECTTA ACGAAGTGGG AGAGATGAGA
651 CCAGGAAAGG CTTTCAGGGG GTGATAACAT CTAGGCAGCA TTTTGAAAGC
701 CAAATGGGAA TTTTCCAGGT AAACAAGGGA AGGCAGAAAA CTCCAGGCAA
751 TGAATATAGC ATGGGCAAAT GTCCTACAGT GTGAAGAAGT AGGGCATGTT
801 CATTAAATAGG GTGTACAGTG TGAGGCAGGC ATCAGAGGCA TAGTGTGAAT
851 AACATCACTG AGGGGAACCA TCTGACCCAA TAAACATAAG TTTCTCCATG
901 AGACTGCTCT TGTGGCTTTT CTTTTTCTC TCTTAAAGCT TGACCAAAGA
951 ATTGTAGAAC ATATAGAATC GTGACATATT TCATAATTTA TGTAATCAGT
1001 PTAATGCACA ATCATGTATC CAACAATTAG AAAATTATTT TCCTTGAGAC
1051 ATTAGGATGT GGAGGTAGTC ATATGTACAT GCCCCATTTT CCTGCCCAGC
1101 TGCGACCTCC CAGTTGGCTC CATCGCTGTA GAAAAAATT GTCCAAAATC
1151 AAGACTAGAG AGTTGGACAA AGTCGAGATC ATTAAATGCC TACTATGTCA
1201 CAATAAGTGG CTTGGATTTT ATAGACAATG AATAGATACT AAAGGATTTT
1251 AAGCAAGGGA GAGATTATCC TCAAATTTGA GTCTTAGAAA GATCACCTTG
1301 AAGACAATGT ATGAGAGACA AGGAAAACAG AATTCTATTG CAATAGTAAA
1351 AGTGACTIONG AACCCTCACT TABACAGTGG TGATTGACAA TGGAGAGAAT
1401 AGGATTGCAG AGCTAATTCA GAGGCAGAAT TAACTGGACT TAATAATTGA
1451 TTAGCCATGG GGATGAACAA GACAGGAAGA AATCAAGGAT CATCTGGAAG

```

【図5 - 1】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

```

1501 TTTCTATTCT AGAGACTGAT TATTGTGTCA TTTAGTGAGA GAGGTAATAC
1551 CAAAAAAAAA GTGCATGTTT GAAAGGAGAG ATAACATAAT CAGTTCGGGA
1601 TATATGGAAT TTGAGGTGTC TGTGGGTAT TGTAGATGTC TAGCAGGTTA
1651 GATGGACATA TGGATGTGGA GCTCCAAGAG AACAGCCTGG GTAAAAATA
1701 TGGATGTGAA AGTTCTCAA AAGGATGACA AACTAACTG GGGTGTTAGC
1751 AGTGAGCACA ATAGGAAAGA ACAGCTTTC AAGATATAAA AATTTAGAAT
1801 AGATAGGATC TAGTGATTGA TTGGAATAGA TAGGATCTAG TGATTGATG
1851 GATAAAGGGA ATGTGAAAAA GAGACAAAAC CTCAGATTTT TGGTTTGAAA
1901 GACAAACCTC ACATTTTTGG TTTGAAAGAC AAACCTCAGA TTTTGGTTG
1951 AAAGACTGGG TCGGTGACAA TTCCACTATT ATAAGCTAAG TTATGTTCCC
2001 TCAAAATTCA TATGTTGATG CCCTAGCCCC CAGTATTTCT ATATTTGACT
2051 GTATTTGGTG ATAGGGTTTT TAAAGAGGTA ATTAAGGTTA AGTGAAGTCA
2101 TATGAATGGG ACCTTATCCA ATATAACTGA TGTTCCTATA ATGAAAGGAG
2151 ATTAGGATAC AGGCATACAT AGAGGGAGAA TGTCATGTGA ATATGGAGAT
2201 GGTCATCTAC AAGCCAAGGA GAGAGGACTC AGAAGAAGCC AACCTTGATA
2251 ACACCTTGAT CTGGACTTC TAGCCTCCAG AGCAGTAAGA ATATAAATTT
2301 CTGCCATTTA AGCTACTCAG TCTGTGGTAT TTTGTTATGG CAGCCCTAGC
2351 AAACATAATAT AGCCACCAAC TAAGGTTGGG AATATGAGGG GAAAAAGTAG
2401 GTTAGGAGAA GGTGTTGAAA GAAGACTTTG ATATAGAACA TGTTGAGTTT
2451 GAGATTCCTG AGGTATATCC AGGTGGAGAT GTTCAAATGG CCTTGAAATT
2501 AAAAGATATA ACTGGGTTAC AGGTACAGAT GTGGAAATCA CTGATATGTA
2551 GGTGATATTT TCAACTGTAG GAATGAATGA TATCATCTAC GAAGTCTGTG
2601 TAAAGTGAGA ATGATCATCA AGAAGAGAAC CATAAGGCAT GTGAACATTA
2651 AAAAGCAGAC TGAGGAAGAG GACCCAAGAA AGGAGAAAAA TCAGAGACAG
2701 AAGATGAAGA GAGAGAGCTT AGAATTAGTC TTTATTTTAT CCTGTTTTCA
2751 TTATAATTAG TTAAGTACAT ATTGATAGCA CCATTTAAAG AGCTTTAACT
2801 TAGTGAAGGA GGCAATATCT TATTCATTTT TGAATCTCAA ACACCAAGCA
2851 CAGTGCCTGA CATTTAATAT CCCTGCAATA AATATTTGTT GAACCAAATG
2901 GAATCGAAAT TAGGACTTCA TTCCCTTCTT TGTTTTGTTF GCTTATTTCT
2951 GGAGTGTGCA GCATGTATTG CCACTGATAT TTTAAGTTCA TAGTGAAAAA

```

【図5 - 2】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

3001 TCATTTCAAT GTGTTCTAGG CTTGGTCCCC TTCCAACCCA ACCCCCAGGA
 3051 CAATAGTTTT CATTATAACC TTCTGTCTTT GCCATTCTGG ATGGAATTCT
 3101 GTGCACAGAA GTTATATACA TATATGGGTA TATCTATGTA ACAAATCGCA
 3151 GCACAGGAGT CCCCTGGGCT CCCTCAGGCT CTGGIATGAC ATATTTGAGC
 3201 CATATAAATT CAGCTTCTCC TCTGGCATCT GTTAGCCGAC TCACTTGCAA
 3251 CTCCACCTCA GCAGTGGTCT CTCAGTCCTC TCAAAGCAAG GAAAGAGTAC
 3301 TGTGTGCTGA GAGACCATGG CAAAGAATCC TCCAGAGAAT TGTGAAGACT
 3351 GTCACATTCT AAATGTAAGT TGATTCATAT TTTTTCCCTT TTGAGCAGAA
 3401 GCATGGTTTC ACAGATTTAT CATATTGCAA AGTGAACATT AGAAAGTGGA
 3451 ATCAAAGGTG ACTTTGAATP ATGGCTTGCT TATTGAGATT TATTGTGTAT
 3501 TGTTTTATTC TCTCTGTTCT TTGGTTAGGC AGAAGCTTTT AAATCCAAGA
 3551 AAATATGTAA ATCACTTAAG ATTTGTGGAC TGGTGTTTGG TATCCTGGCC
 3601 CTAACTCTAA TTGTCTGTT TTGGGGGAGC AAGCACTTCT GGCCGGAGGT
 3651 ACCCAAAAAA GTAAGTAAAT ACACATCATA ATCTGATGCT TCTGTTCTGA
 3701 GTTTGATTGA ATTTAATTAG TAGGCATATA AATTATCTG AAAATGAAAA
 3751 TCATTAAGTC TCTTTTGTGT TTATTTCTG GTGGTATGAA AAACGAATC
 3801 AAGATTTTTT TCTCCTTCAT TTGCCTAATT ATTTTGGTAA GGGAAAAAAA
 3851 TTTATCTTCT ATATTTTGGT TAGTAATGAT AGGGTGTAGA ATTACCCATT
 3901 CTTCTATAAT GCTTATATTT AAGGAGTTAA GACTCCTCCT AGGAGCAAAG
 3951 TTTTACCTT AAGAAAAAAT ACTTTAATC TTCTTTTCAA TTATCTGGGC
 4001 AGAACTGAT GGAAAAGTAA TTAGACCACC ACATAAGGAG AAACCACCCA
 4051 AAGTGGCAGC AAAGGATTTT CAGGGATTAT GTTCTGACT TAATGCATCT
 4101 GCAGTGAGAA CAGGCAGCAA GCTGCTTTTC AGGAGGAGCA ATTCTCATAC
 4151 CTGACTTCAC ATTTATTTAT GACTTTAAAA AGAAACTAGA GCTTTTCAGC
 4201 TCCTTGCCAG CTGCAATCAT CACTGTCCCA CTGAGATAGC AATGCCACAA
 4251 GGTAGAAGCA TGCGACACCA AGTCATTAAT CACAGATAAC TCAGAAAGCT
 4301 TCTGATACTG GGGTCATTTG GTGAAGCTTG GCTAGCCACT GTAGTTTATA
 4351 TTTCTGTACC TTAGTGTAT TGTATTCTCT GGGCTCATAG GCAATGGGCA
 4401 AGTTTAGATA TAAAATAAAT AAATAAAACC ATAGTCCCAA ATAAAACCAT
 4451 AGTCCCTTCA TGCTCACAAT TTCCATTTGA AAGATAATCA ACAAATATAC

【図5-3】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

```
4501  AAACTACAAG TTGTGAAGAT AGTTTTCTGG CTTTGCCATG TTTTCTGTGTT
4551  GGTGTGTGGA TTGCTGCTGA AGTTATTGTT ATTACTGTTG TTAATTGTTT
4601  GTCATAAGAT GCTCATTCTT ATTTGGTAAC AGATGTAGGG AGAAAAAGC
4651  ACAAATCCAG GAAGGAGGAT GATACAAGAA AATGGGTTGG CATGGACCGT
4701  TAGGAGCCAA AGGAGCAATA GGAGCAGAGA GAAAAAATA TGGGTCAAGT
4751  GGGAGAGAGA GGCAGAGCAG GAAAAGCAGA AAATAAGCTG GCTAAGTGTC
4801  TGAAAGATAA CAGAGGTATA AAGCATAACC ACCCTTGGGT TCTCCACCTC
4851  TGCTGTCATA CCCACTTTCA TTTAGTCCCA AAGGATATCT TATCAGGTTT
4901  AAGTAGGAGG GAGAGCAAGC CAGCCTACTT TGTTCGCTT TTTATTATA
4951  CTTTGTTCOA GAAAAGATTT CAGGCATCAC CCAATGCCTA TAGTTAGCCC
5001  TATCCCCTAC TCCTCCTCCC CTTACTGCTC CTTGCTTCTG AACTACTTAC
5051  CGTTCAAATG TCCTTCTAGA GAAGCCACCT GTGTTCAAGC TGGCAGGGTG
5101  GGTAAAGCAA TCGAGATCAG GAAGGAAACA GCAAATTAAT AAGAGAGCCA
5151  AAATGCATTC CAATACAATT CTGGTACCAC TTAGCTAAT CCCAAGGTGA
5201  TATGTCACCC CACAAGTTGA ACCTTGGATC CTCTTGAAAA TTATCCATGA
5251  GTTAAAGGGC CATAAATCCT TTGTTCTCCA CAGCCATAAT GTACTTAACT
5301  GGGCATGGTG GATAGCTAGT CCTTTTGACC ACCCTTAGAT GCTTGCCATA
5351  ATAAGGGGCC AAATGGCCTT TCTTGTTTTA TTGTTGTCAT TGGTACTGCA
5401  AATGCTATTC CAAAAGAGTA TATGTGTTTT TATAAATTTA CAGTGCATAT
5451  TGCCTCAACG CAGCTATAAA CGACTAGGTG GAGACCTTGC CTTTTATTG
5501  CAAAGTGTCA AACTCACTTG CAGCTTCATG GTCTCCTCTC TTTCCCTATT
5551  ATATCATCTT TACATCTCAT TCTAGTCTG TTTTAAATGA TTATAAGGAG
5601  CAATCCTATG ATACCTCAA CAAAATAAA ACTTGGTCAG TGCATGCACA
5651  GAAGAGGTGG GATATGCTGC TGAATAAAGT TTATCAAAA TCAAACCTCT
5701  TGTGAAGTAA TCCATTTTGG GATGTCATTT TCAGCAAAGG GACTCTCAGA
5751  AATGAACAAA GCTATTATGA AGTAATCCAG ATAAAGACAA CAGGTGTCCC
5801  CTAGGGCAAG TTCTCTACC ATGAACAAAT ATTGTTGGTT TTCCATTCCA
5851  GTGGGAGTAT ATGATTCATT GTCTTTGATA TTTAAGTCAT GGCCTTCATA
5901  AGACCAGGTT TGGTTCATG AAAACTAAGA AATCAGCTGG AAATGAGGAT
5951  GCTTFACTTA GTCCACTACT ACCTTCAGGT CCCAGACAAA GATCTCAAGA
```

【図5-4】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

```

6001 GACCATCTAT GTTTCCAATG GGTACGCCTA TCAACAAGCC TGCCTTAGAG
6051 CAGACTTAAG AATTCTGGGA AGAGACTAGC AGTCAGATTA GTCTTGGGAG
6101 AGTTGCATAG GAAAGGGACA CAGGCATCTT ACATAAATTA AAGACTCTCC
6151 CCTTAATGGT ATGGCCTAGC AAGAAACAAC AGCAGATTAA AATCCAGGCT
6201 CTTTGGGCTT TCCTTAACAA ATCTATGAGA CTIGTTGGGA CTCTGTGGCC
6251 CTTGGTAGAG AGAGCTGTGC ATGCAACTGT GCTTATTGGT GGCAGTGATT
6301 TGTTCAGT CCTGGGATTT CCTCCAAGCT CTTAGTGTTT GCTCTCCTAG
6351 CCTCCACCAC GCCTCCTTTT TATTTTGTCT TTCACATCT GTGTATAATA
6401 AACAGTATTT ATTTAACATC CCACATCTGG TGTGACATP TCCATGCCAA
6451 TAAGTCCTTC TCCTCACTCC CGCTTGGTG TGTACAAAAG ATCCAGATTC
6501 CTGTATCCAA ATTGAGAACA AGCCATGCTT GACCTCCTCC CCTCACATAC
6551 CTCAGGTCTG CGTGCACACA GGTGTGCACA CGCACAGACT CACACACACA
6601 CAGACACACA CACACACACA CACAGACCAG AGAGAGAATG AAATCAAAT
6651 AAAGTGAAC AAGGACGACT AACTCTGGGT GAGCTGCTGC ATTTTCTTAC
6701 AAGTCCCAGG CCCCTGACCC ACAGCCACAT ACAGGAGCCA CCTGAGCTAA
6751 ATGAAAGCCA GGTCCATCCA GCTCTGAATT CAGCTTCTT AAACAAGCAG
6801 AAGAGACCTA TTCAGTCCCA GCAATTTTGA GAAAGCATCG TAATGAGGCT
6851 CCCCTTCTAG GCAGTGACTG CCCTGGGATC ATTGAAGCAG AATCACAAA
6901 GAAACATTCT TGCTTAAAGC CCCCTGTATT ACACATTTTA CTGGAACAG
6951 TCAGAAGCCA ACTCCTCAGC TAATTAATCC AACATGAAGC AAACAATCA
7001 GAAAAATCCT AGCCCTTAAA CCAACAGTTT AGAAACTTAG CACAGACCTT
7051 GTAGCCCATC CCTGCCAATC CTTTGTGGAG CGAGGCAGAA GAATCATACA
7101 TTTAATAAAT GAAAGAGTGT CCTTACTGCC TTACATAGGA GCTGCCTGGT
7151 GACTTTAGGG TTGTTTAAA GCCATCAGGA CCACAGTAAT CAATAGATTC
7201 GTGAGGATGT TCCTTCAACT TCTATATATT ACCAGAGCAA TGAGGAGTGG
7251 TAGGGATAAG CGGGCACTT TCTGCCCTCC TGCCACACCT CAGTTGCAGG
7301 TGATCACTAA AACAGTCTCC CCCAGCGTTG TGAGTCCACT ATCATCTAG
7351 GTTGAAAATC CTTTGTCTCAG AAGAAGCACT TTCTTGACGA GTCTGATTGC
7401 AACATTTTGT GCGTGCCTAT TTCTTGGCAC GCACAATTGG GCATTAGCCC
7451 AATATTAACT TTTTTCGCTC CTCTCTAGGC ACACAAGGAA GACAACTTTT

```

【図5-5】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

```

7501 TTCTCCAGGT CCCCTGGGCT TTCCTACACC ACAGTCCGGT GGGTGAAATG
7551 TGGGTCTAGA GAAACATTAA TATACCCCTCA AGGAAAAAGT TGAAGGAGTA
7601 GCCGGAATAT TTTTGGCAGG GAGACTGAGC TTTACCAGAT GGTGCCATGT
7651 TGGCATTTTC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GACCTCTCTT CATTTTCTTC
7701 TTAAAGCATT GTGAGACCCA GGTCCACCCT TGTACAACCT TCACTGGGCC
7751 AGCTCTTATT CTGGGCTACT CAAGGGCAGC TCCCAGCAAT TATGTGGAGC
7801 CAGGCTGTGG CTGTGATGGG CATGTTCTTC TTAGTCAGTC TCTTCATTCT
7851 CCTAAGGCAG CATTTGCTGA ACAACTTATA TGACACCAGG ATGAAGAGCC
7901 TGGGCCTTCA AAGACAGCTG TTCTGGAGTG GTTGAGAGTG GAATTGGGGC
7951 TGTGGAGGAA GTAGCCTGGA TGATCAACAG ATAGTGGCAG TAGGCGTAGT
8001 CCAGTGATCA ACCTGACAGG TTGATCTGAG CAAATCTCAG CAGACTTTGC
8051 TAACTATCTA ACATTACAGA TGAAAAGGGG TAAAGGATTA AAATAGGAAC
8101 TGAGTCCCTA GAGACACTCA GTGATTTGCC CAAAATCACA CAGCTTGTA
8151 GTGGTGGGGT TAAGGTTAGA ACTAGAGGCT AGTCTGAAGA TTCTTTCCAC
8201 TATTCCTCAG CTGCATTTAA GAATCAGGGA TGGGGATAAT GGGTAGGAGA
8251 AAAACTTACT GGTGAGCTCA CGTCTGTAGA TAAAAGAAGT AGCTTTTCT
8301 TGTTGAAAAA GAATGTCTGT GCTGCTTATG CCAATATTTT GCATATTGCC
8351 AAATGGTGAT TGAAGATGCA GAACTCTAAC TTTGCATAAG GAACAACTG
8401 TCTGCTCTGT GTTGGTAAAG AAATACCCAG AGGCCCTTTA ATTCCCBCG
8451 AGTTAGGTTA ATAATAGATA TGGTAGAGTG CATTCTCTTC CCTTCTTCC
8501 AGCCTAACAC CTGCTAGCCA GCTATTCTGA GCATGTATTT CACCTTTGGA
8551 GAGTGTACCT CATAACAGAC AGTAAGGGAT GAAGATGGAG TGAAGAGCAG
8601 CTAGATTAAT CACAGGCTTC AAAAAACAAA CCTAAGCCAA ATGTCTCAA
8651 ATCCCTGTCA GGACAGGCTA AAGCTTCTTG CCCCTAAAAC AGATCCATCA
8701 CACTGAGGTC TGAGATAGCT TTACCTTTTC TAAATAGCTT TCTTTTCTGA
8751 TCTCAGGGAC TGCCACAGAG GCAAGAAAAC AAGGAAAAC TGTAAAGAGG
8801 GATGTTAGGG CTCATTTGCT GCCTGAATGG AGGATTTAAC TGGACTGAAG
8851 ACAGAATTCC TGGGCAGGGA AGAAAAATGG GTTGTGTCCT CTACATATTT
8901 TGTCAGTGTG GTCTTCTTAC ACTTCTCACT GCCTGGACTT AACCACATAT
8951 CTGTCTCATT TCACTTCTGA TTCCTATTCC ACTCCATTGG CTTCCTTGT

```

【図5-6】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

9001 CCATTCCAGT GTTCTGGTTC TTATAGTTAA GGCCAGCCTT ATGTGTGGGT
9051 GGAGTAAGAG CCCATTTGAG TGGTGCTGGA AAGATGCCCT TGCCCCAAA
9101 TATCTCCCAT TCCTCGTGCC ACTGTGCCTA TTAGATTGGT GCAAAAGTAA
9151 CTGTGGTTTT AGCCATTGAA AGTAATGGCA AAGTAATAAA GTAATAAAAT
9201 CCACTATTAG TACTTCATTC CTCTGAGTGA AGTATTGCAC TCAAATTTTT
9251 AAACAGACAA ATATTCAATCA CTAATATCTA AGTGTGAAAT CATGGGTCAG
9301 ATTGATTTCT TCTTTGTTCAT AAGGTACCTG AAGCACCACG AGATTCCTAG
9351 ATGTCTAGAC AGGAGACAAA GGGACATAAA TGGGAAGAGA AAGGGGAAGG
9401 GCTATGAGGG TATAGAATGA ACAGAATATG AAAATAGAGC AGAAAAGGAA
9451 AGCTAGAAGC ACCACAAATF ATCTCTCTCT ATTTTCCAAT TGGCAGGGG
9501 TGTA CTCTC ATCATATTCT GTCCTTGCTC TATCTCCCT GGAATAAAGC
9551 TGAGTTGGAG GCAGCTGAGA TGAGCTACTT GTAGCCCACT CACACCTCTC
9601 TTCAGGCCAG TCATCCTGTC TCTGCTTTAG CTTGCTCCTG GAGAGGACAA
9651 AGCCATTTAT TCTTTTCATCT CCAGAAAGAC CTTCAACCCC TGAGCCAGGA
9701 AGCTTAGTAG AGAGCAAAGT ACTTGTATG TCAAATGGCA TGAGACTCTA
9751 CGTCTTCATA CGGGCCAGTG AAGCTTGCAT AGCCATTACC CAAGCAATGT
9801 GCTCCACAGG GACCCAGGCG AGACAGTGTG TCTGGATTTG CTCATACCCA
9851 TCTCCAAACA GTCCAAAGTG GGCCACCAGC ATCATCTTCC TAGACGAAGA
9901 ACAGTCTGTT CCAAAAGGAC ACCTTTGATA GTGGAATTCT GTCTGGGTGA
9951 ATATATAGCT CCCCCTCCT ACCCCCTACC AAGGATTCAC ACATAAACGA
10001 AGTCATTCTG TTCCCACTCT AGTAACTTAT CATTACTAAC ATAAAGCCAA
10051 CAAGTTGGTT AATGAACACA ATCAGAATGG ACCCCTTCTC CCCTACCAA
10101 AAAACTCTTT GCAGGAATGT TGAAAATAAT CAAGATCTGC TGAGCTTGGC
10151 AGTTTCCAAT AGFTTTCATC TAGCAAGGTG TCCAAGTAAA GTGCATTGCC
10201 AACAGTGCA GAAAACATCAT TCCACAGAAG CACTGAAA TTCTAAATGT
10251 CACCAGTAGG TTCCATAGTC TTCTACCAGT GATTGAAAAT ACAGCCTGTA
10301 TTTTCTCTTT CGCCAGGTA GGCAGTGTTC CAGCATCCCC TAGTCTCTAA
10351 CCTCATTFFF CCATACAATA ATCCATCAGT GGTGCTACTG ATGAAATAAA
10401 CACCCACCG CAGCCCCAA TGGCTAGTGG CATCAACATF TGTCTCAAAA
10451 ATGGATAGTA TTTCTAACAA AATTCCCCG TTGGGAGAGC TGACAGGACT
10501 GGATCTGAAG TGGATGCCTC TCTTTTCTAC TTAGGTGAGA CAGACTGAGA

【図5-7】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

10551 GCTCAATTTG TTGCCACAGG TAGAAGTTTC TCTTCTCAAG CTGGCTGCAG
 10601 AGCTGGAAC T GAGGACATAT TTATTGCTAG AAGCAAATAA CAAACCTAAA
 10651 GGAATTTGCT ACCTATCACA AACCAGGCCA GACTTCCTGA GTTAACTCTG
 10701 CAGTTGCCAG AGAGTTCCTAA GTATTGTTTT TCTTTCACTT TTAAAATGGT
 10751 TTTTTTAAAA GACCTTGCCA ATACTCAAAA ATGTCTCTTT AGGAAGATAA
 10801 GGATGTGCCA TTGGTGGGGA CAAC TTATTC AACAAACT TAGGTTCCAA
 10851 CCATGTCCAA AGCACTGTAG GGCTACCAAG AGGTAAATGA CATTGTCTCT
 10901 TGTTTTTCTC TTCAGCAGCT ACATTAGACT TGTCACCCTT GAAGTAACAC
 10951 TTGCTTCTAC AAATGGTTC AATTTGTTTT TCTCTAGTTG AGTTGGTGAA
 11001 TATTTCACCA GGTTAAACTA ACATTCAGTC AATGGCATCA GCAGAGACTA
 11051 AAAAATGACC CAACCTGGTG TAAGTCTCT ATAAGGCTGC CACTGGGAAC
 11101 CGTATCATTA GAAAGCAATG TGGGCTCTGA AGAAGACTTG CTTTTTCAGG
 11151 CTTTTAGTTT CCCAGATTTT TTTCATAAGG AAAAATGAAC ATGGAGAAAC
 11201 TCGATAAACA AAGGTCTCCT AATGACAGAG ATAAGATAGA CTTCCAAAAG
 11251 GCATCATCAG GTCTGGCCTG GTTTGTGACA GATAACAAAT TCCTTTATGC
 11301 TTATTGCTT CTACCTATAA ATATGTCTTA AAATAATAAG TTATGGGCTT
 11351 ACTCCTAAAC TGCAGTGCCA TATGGGACTG GTCTCTTGG TCTTTAGAAA
 11401 TACAATGCC TCTTTTAGAG TGCAGGAGAA AATCTGGGGT TTTGTTTTAG
 11451 CCACTCAAGA AAGACCTGAT GAGCAGTCTT TCTTCTTGGG AGGCTCCATG
 11501 TTACTTAATG CAGGACACTT GGCTCAGTTG GCTTAATTC ATATACACAA
 11551 AAGAATCCGT AGAACTTGAA AACAAC TGAA TATGGCTTGG GAAACAGAAC
 11601 CCAGGAATAA ACTGGGTGGG GTTGGTTGCC GTATAAAGAG AAGGCTAAGG
 11651 GAAGGCAATA AATGTTTCCT GGAGTTAAG GGGCAAAAGG AAGCAAACAG
 11701 AGCAGGGTAG GGCTCTAATA TTGGCAAGGA GAAAGTCTTC AGATTCTAAA
 11751 AGGAATAGAC TCAAGGCTGT TGTGGCAATA TTAAAGCCCT GGATAAATAA
 11801 GGAGACAAAA AACACTTAAC CATTTTAAGT GTATTCAAAT CTCTTTCTAA
 11851 GCCCTAATGA ATTTACGGG TGAGGGGCGG GGCAGTAAGG GGGGGTCTGT
 11901 GATTACTTAG CACTTGAAA GGGAACTGGT AGCTTAAAGA AGCAGCATAG
 11951 GTTTTAGGTG ATCCCTCAGC TTAACACAAG GGGAAAATAC TTTATAGGCT
 12001 GGTTTGCAAA CTATCATTG CTGTTTAGTC AAGGCTGCCA AGAAAAC TGT
 12051 TGGAATTCTT AGTAATTAGC TCAGCAGCTT GGCTTGAATT CAAAATACCA

【図5 - 8】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

12101 GCTCTGAAGG GATCCCCATA TCAGCTCCAG CGCCAAAAAG CACCTCACTT
 12151 TAGGGACACA CTGAGTATCT TAGAGATTGT TTFCTCTGT TCTCCAGGC
 12201 CTATGACATG GAGCACACTT TCTACAGCAA TGGAGAGAAG AAGAAGATTT
 12251 ACATGGAAAT TGATCCTGTG ACCAGAACTG AAATATTCAG AACCGGAAAT
 12301 GGCACTGATG AACATTGGA AGTGCACGAC TTTAAAAACG TAAGTTGGAT
 12351 GTTTTCTCC TAAGGCTTTC CACTTAAAT ATTAGAGCAG TTGAGTCAAG
 12401 TTAAAAATAG CCTCCATCTA AAATTGAAT TCAAATGGAA AGCTAGCCTC
 12451 CTCTAGCTTT CCATTTGAAT TCAAAATTTG CTAGTCTGGG ACCCCAACAG
 12501 ATCATGGAAC TTAATAATAG TGGCTCTTTT GGAAGCTTT ATTTGTTT
 12551 TGCTGTTTT ATAGGGATAC ACTGGCATCT ACTTCGTGGG TCTTCAAAA
 12601 TGTTTTATCA AACTCAGAT TAAAGTATT CCTGAATTTT CTGAACCAGA
 12651 AGAGGAAATA GATGAGGTAT GTAAGAAGAA TAATTGTGGT GGCAAAAGAC
 12701 ATCATTTATT GGATGCTAGC TATGTGCCAA ACATTGTACT AAATGCTTTA
 12751 CTTTTCTTTG APTCTCCAAC AACCTTATAA ATAGATACTA TTGTTATCAT
 12801 CATTTCAGA TCAGAAACT AGAACTCAGA GCCAAAAAGT GACTTGCTCA
 12851 AGGCCACACA GCTAGTGAGT AGCAGATTGG GGTCTGAAC TTAGGCCTTT
 12901 CAGAAACTC AAGTGCATAA TTTTAGGTGC AATGCTATAC TCTTATACC
 12951 GGGCACCCAT TAACATTATG TTGATTTTCT CTGAAACCAA AGATTTCTAG
 13001 TAAGAGGGAT GAGCCAGAGA AACAAAATCA ATCTTGCCCTC AGATAAAGCG
 13051 TTTTTAAAAA AGAAAGTTCC AAAGCCACT GGGGTTCTTG CCACTTTTGT
 13101 CACTTTCAG TATTCACCTA TTTTAAAGAT TGTGGTTCAT TCACCTTACC
 13151 ATTTTATGCT GGGCTGCTAA TGGAAATAAT CACATTTAAC CTCAGTAGGA
 13201 AAGGCAAAAG CAAAGAAGGT GAACACTGCA ATGGGATACA AATTCTCTGA
 13251 AAACACCCTG CTAGACCAA GTAAGGCAAC CTAGGGTGCT GGTGAAATCA
 13301 CTGAATGGCC CTTTAAACC TAATGGGAGA TGGATGTTAT TGCCTAAAAAT
 13351 ACAACGATCT GTAAGGCCCT TGAGGCTCTT TATTGTTCCC TGATATTTTG
 13401 TCTATAATTA CAGTATGGTT TTATTAGTGG GAGGAGAAGG GGGACCTCAG
 13451 TTAAGTCAT ATGTGACAG CATATCCCA CTATAGCAAG AAAAAACAAA
 13501 CATTGGTTTG GTTTGGTTTA GTGCTTAGTT GCCAAATCTA AAGTGAATTT
 13551 ATGGCAATGG TAGAATGATC TTTCTTCTC TTCTTCTTCT TCTTTGIATF
 13601 TTTAGTAGAG ACGGGGTTTC ACCATAGCCA GGATGGTCTC AATCTCCTGA

【図5-9】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO:10)

13651 CCTCATGATC CGCCCGCCTA GGCCTCTCAA AGTGCTGGGA TTACAGGCAT
 13701 CAGCCACCGC GCCCAGCCAT GGCAGAGTGA TCTTTCTATA AACTATAAAA
 13751 ACCTCTTTCT TTCTTTCTTT CTTTCTTCTC TCTCTCCCTG TTCTTTTTC
 13801 CTTTTCTCCC ACCCAGCTCC CTCCTCTTG ATTCTACCA ACCCATTAT
 13851 CTTTTCTTT ACCTTTTTCT TTACCTTTTT CTTTATTTGG GGGCGGTGGG
 13901 TGGGGAGGAC TATTTTTCTT TCCCTTACCC AAGTCTTAGA GCTGTCATTG
 13951 GCTCCCCTT TACTCTTTCA TGCTACTGGT CTCCTCGGG CCAGAGGAGT
 14001 TACAGACCCT GTTACTAGA ATTTGCAAGA AAAAAAGAA CGTTCTCCA
 14051 AAGATGATGC TCTGCTCCA AGGTCTACGG TAGTGACAAA GTTGGAGAC
 14101 TTTTTTAAA GTAAGCATA GTTAGATGCA TCTGAGGAAT AGATCGACGT
 14151 TCAGGATATT AGGAATGACT ATAGAAGGCA AAGGTAAGAT AAAAGGAAA
 14201 TCAATAGGAT TAAAAAGCTA CTATACACAA TAACATATGC TGATTACATA
 14251 CAGAAAATAA TGTAAGCATT TGAGTAGGCC ACTCAGCAAT GAGAACCCTGA
 14301 AGTGATATAA TAGGATTTAT TTTTTTGAAA GATTAAGGCA AAGGAGCGG
 14351 GGCACGGTGG CTCACGCCTA TAATCCCAGC CCTTTGGGAG GCCGAAGAGG
 14401 GGGATCACTG GAGGTCAGGA GTTCGAGACC ACTCTGGCCA ACATGGTGAA
 14451 AACGCATCTC TACTAAAACA AACAAAACA AAACAAAAT AGCCGGGCAT
 14501 GGTGGCGATG TGCTTGTAAT CCCAGCTACT GAAGAGGATG AGGTGGGAGG
 14551 ATCACTTGAA CCCGGGAGTG GGAGGTTTCA GTAAGCCGAG TTTGCGCCAC
 14601 TGCCTCCAG CCTGGGTGAC AGAGCGGAC TCAGTGTCAA AAAATAAATA
 14651 AATAAACAAA AAATAAAGGC AAAGGCTCAT AATGTCTCAT TTTGGCCCTA
 14701 ATTTAGTCTT CAGTTAATTT CACCAAATAT TTTAAATAAC GCAAATTCAT
 14751 TTCATGATAG TAAGAACACT GTACCTTCAA GTAAATCTTG TTTTTATAT
 14801 TCACGCCACA GATTTTTTTT TAATGAGACA AATTTGTGGT CCTGAATGAC
 14851 AAAAACCTTC TTCTGTAAT CCCTCCACAC TGTATCCATG GCATGTGTAT
 14901 TTTAAACATG CAGAGCAGGT ATATAAATAG CCCTGATTTT GCTAACAAAG
 14951 CTAGTCAGCA TACCAACCTC ATTTTATACA ATTCCTTTC AATGATCTCA
 15001 AGGTCGTAC AACTCAAGG ACAAGGTGC TAAGACTTTA GAATTGTAAA
 15051 TGATTCGGG AGAATFAGT AAGAACTAGG TATACAACAC AATTACCTCA
 15101 ATACTAGAAA CTGAAGAGAA AGTGGCATCC TTCACAATAT AAAAAAGCT
 15151 GCTTAAAGGA AAAACACTCT GTGAGATAAA CTCTAAGCAT TTACAATGAA

【図 5 - 10】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO:10)

15201 AGGAATGCAA TAGTAGGAAG GCCAGTGAAG TCATAAACTG GAGACTTGCC
 15251 TTTAAACAT AAAAGGAAAT CTTTGTACT ATAAGTAGCT ACCATCAACA
 15301 GGCAAATCTT GTAAAACCAA AATATTAGAT TACATTGTTA TTGAATTGAT
 15351 CTCACCACTT TGATTATAG GAGTTTGTG AGCTTCGGGT CAAATCCTGC
 15401 TTGCCACCCA AGATGCAAAC CTAAAATAAG GCAGGCTAAT AAAATGTATT
 15451 TATAAAAAAG AAAACAAATG TAAATCACTT AGGGTTCCAG AAGCTCAAGT
 15501 TAAACATAC ACAGACCCAG GGCACCCTGA AAATAACGAA GCCCCTTTCT
 15551 GACTTTGAGT GAAATGGTAA CAGAGAAGGC TCCTACTTTA GTAAGCAGTC
 15601 TTGCTGTTAG ACCCAGGAAG GAGGAAGGAT CAGTTGTAA CTCCCCCAAG
 15651 GGCACCCACT GAATGCAAGG CACAGAGCTA GTTCACCAGC AGCCCTAGGA
 15701 TTAAAATGT TACTACTCAA ATATATTGCT TTCCAGCATC CCATAATGTC
 15751 TCACCTGTTT TACTAATTTT TCTGCCAATC CCTACCCTAA GCTACTTTCT
 15801 TCTTTCAGAA TGAAGAAAT ACCACAACCT TCTTTGAACA GTCAGTGAT
 15851 TGGGTCCCAG CAGAAAAGCC TATTGAAAAC CGAGATTTTC TTAAAAATTC
 15901 CAAAATCTG GAGATTTGTG ATAACGTGAC CATGTATTGG ATCAATCCCA
 15951 CTCTAATATC AGGTATGACA TTCTTATCCT CATCCTCCTC CTATTTTCTA
 16001 AGACAGTAAC AGGTTAATGT TCCCAGCATT TAGAGGCTAC ATTTCTAGGA
 16051 AAACAAATGA TCGGTTTATA TCTTCTTGGA TGAGTCTATA TATGCTGACT
 16101 GCCAGTGAGG AGGGAATTTT TCACAGCCAA GTTATAAATC AGATAAATTA
 16151 ATGTTGACAG GCTTTTAAAT ATCCCAGCAA AGGTAACACC ACCCTAATGT
 16201 GACTAGTGAT AGCAAAAAAC TAATCTGTCT CTCTTTGCAC ATCTATATTC
 16251 ATTGCAGTCG GTATGCCAGA CTATTGCTCA AACCCTGTG GGTCCAACCC
 16301 AAGAATAGAG GAGAGAAGGG CAAAAACAAT GCTCTGCTAT CAAGAAGGAT
 16351 TCCCTATGTC AAATGGTGGC ATTTCCCTTA GAAGATAGGA CAATCACTGC
 16401 AATACAAATT TCTTTGTTGC TGTTTTAGGA ATTACTATAA AAATAGTTGA
 16451 GGGCTTGATG TCCAGAGTAG AAGAGTCCAG CCCTCAACTT CCAGTCAGCC
 16501 CATAGAGAAG GTAAAGGCC CTGGATGTCT TAGTCTGTTT AGCTAACATG
 16551 GAATTTGGCC TCCCTCAFTC TGCACAGCAT AGATTACTCT ATTACCCAAG
 16601 AGAGGTTATT CTCACCAATG TAAGCATCTG TGGGTACTCT TTAGAGATAT
 16651 TAAAAAGGTG ACTAAATGCA GTGTGGTATC CTGGACTGGA TGCTGGAACA
 16701 GAAAAAACA TTAGTAGAAA TACTAATGAA ATCTGAATAA AGTCTGTAGT

【図 5 - 11】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

16751 TTAGTTAATA ACATTGTACC AATCTAACT TCTGATTTT GATCATTGTA
 16801 CCATGGTTAT GTGAGGTAAC ATTAGGGGAA ACCGGGTGAA GAATATGTGA
 16851 ACTCTGTACT ATTTCTGCAA CTCTTCCATA AATCTAAGAT TATTTCTAAA
 16901 CAGAAAGTTT AAAAAAATT TAAGACAAGA AACATAAGGG AAGTGGGAGG
 16951 ACAGAGGATG TCAAATCAAT TCAGGCAACC AAGAAATATT TATGAGCAT
 17001 CTACATGGGT AAAATCATCA TTGTAGGAGA TACAGAAGTC CCTTGTCCTC
 17051 AGTTTTTAAT TTAGTGTGCT ATTAAGTCAA AGCAGTAAAT GTTTGATGCC
 17101 AAAGAAGCAA AGAAGTTTGT GTATGTAGAA ATGATCAGGC TTGTTTTGGA
 17151 AACTACTCTA AAATATCAGC TGAAGGAGCT TGGAAAAGTG GTCCATGCCT
 17201 AAATGATGCC AGTTAGAAGA CACAATGAAA ATCTCTATCC CCAGCTGCTA
 17251 TTCTCCAAG CACTTCTTTC AGGAACATTT GCAAAGCAGT TGCATCACAA
 17301 CTTTGCAATTT ATTATCTTAG TTTCTGAGTT ACAAGACTTT GAGGAGGAGG
 17351 GAGAAGATCT TCACTTTCTT GCCAACGAAA AAAAAAGGAT TGAACAAAA
 17401 GAACAGTGGG TGGTCCCTCA AGTGAAAGTA GAGAAGACCC GTCACGCCAG
 17451 ACAAGCAAGT GAGGAAGAAC TTCCAATAAA TGAATATGTG AGTTATGTTT
 17501 ATGTAAACTC TTGATAGAGG AGGAAAAAAG AGCCCTCACA AACTTACTA
 17551 CCCCTCAGAT CACAATCATT GGAAGGAGAA CGATCATGGC TTTAACAAAA
 17601 AAAAAAAT GTTTAAGAAA CTTGGAATCT CCAGGAGGCT CATTCAAAAT
 17651 CAATCTCGAT CTCTGTAGAT ATATCTCCAT GATCAGGCTA AGGAGCTTAA
 17701 TTTCTCACAA GCCTCCAAC TATACAGTCT TCTAGTTCTC CCCTGCTTGG
 17751 TGAGAATCTT TGCTAGTGAA CCTTCTCTC CCACCCCAA CACTGGCTTC
 17801 TTCTTCTTTC AGACTGAAA TGGAATAGAA TTTGATCCA TGCTGGATGA
 17851 GAGAGGTAT TGTGTATTT ACTGCCGTCG AGGCAACCGC TATTGCCGCC
 17901 GCGTCTGTGA ACCTTTACTA GGCTACTACC CATATCCATA CTGCTACCAA
 17951 GGAGGACGAG TCATCTGTCG TGTCATCATG CCTTGTAAC GGTGGGTGGC
 18001 CCGCATGCTG GGGAGGTCT AATAGGAGGT TTGAGCTCAA ATGCTTAAAC
 18051 TGCTGGCAAC ATATAATAAA TGCATGCTAT TCAATGAATT TCTGCCTATG
 18101 AGGCATCTGG CCCCTGGTAG CCAGCTCTCC AGAATTACTT GTAGGTAATT
 18151 CCTCTCTCA TGTCTAATA AACTTCTACA TTATCACCAA CAGCCTGATT
 18201 GCTGCTGAAC AACTGGGTA AGTGTGCT GAGAATATTC ACAGCAACTG
 18251 AAATGGAGCA GACCCGTC AAATAGATGA CTATGCTGAG GCTCAGAAAA

【図5 - 12】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

```

18301 CAATGCCCCA AAATGAAAGC CTCAGAAGCA AAAGTTTTTC TCTGACCTTC
18351 TCCTACCTGC CAGTCTCTCA GTCCCATTCCT CCCCAGAGGC TAGCCATAAA
18401 AGCTAGAATC CCTCTTCCTC AAGGCGTGTC ATATAAATCA AAACCCCTTT
18451 TTCCCAAAGC CAGCCTTAAA CCTAAAAATA TCACTCTGAT TTTTCCTCTG
18501 CTTTTCTGTG TAAAAGCTGG CCATAAGGAA ATTATCTGAC CTACCTTGTT
18551 TGACTGTAGG TCATAAGACT CCCTTCCAG AGAGGATCCA ACACAACAGG
18601 TTTGGAAGTA GAAAAGGGCA AAGCATAATG ATACCTAAAT ATCATATTTT
18651 ACTCTGCTGT ATTAAGACAG TGGAAATAAG GAGCTGATGA TAAAATGTCT
18701 CCATAACTGA TGCATTAATA ACATATCCTT TTGTGCATAG CCCCAGTGTT
18751 TAATTATATG AAAGATATAT TGTGAACTTC CTTAAGTATC AATTAAGCTG
18801 CTGGACAGGC AGTGAGTCAT AGCAGGCCAA CACTAAAATA TTCCAAATGT
18851 GCAGACTCAG CAAAGGAGAA AGCTAAACTA GCAAAAGGG TCTCAGGCTC
18901 TCCTCCTATA AACAGGAACT CAACTTAGGA CAAATCAAC ATTCCATAGC
18951 CTTACATCTT GGCTCCTCTT TATATCAGTG TTTGATTAGA TACCTTTCCA
19001 AGGCAATTGT CTAAAAACA AGAACCATA AATACCATTC ACAGAAACAG
19051 GCATCATAGG AAATTATTGA GATGAGGAAT CAAATGGGAT TTTCCCTCCC
19101 AAATCACAGG GAGCTAGCAG TATACCAGTT TCTGAAAGAA AAGGTAAGGG
19151 CATACTTCCC AATCACTCCA TACTTTGCTT GGGAAAGGAA AAGAGGGCAA
19201 AGGGGAAAGA GAAAGAAGTG GTTAAAGGGT AACGTTAACC TTGATGTCCC
19251 TAGAGCCAGT TTCAGTTTCA AAATTCATGC TCTACCAATC TGTACCCTCT
19301 TCTAGTTTCA TTTGAAGGTA GCATATACTT CATTGCTCAA CTTCAAAGTT
19351 ATTGTGTCAI GAAAATGTCT GTCTGGAATC TTCTATCAGA AAAATATTTT
19401 CAAATAAATF CTTACCAAG ATGCCTGTGG GCCAGCAGTC ATTTTCTCCC
19451 ATTTAAGAGT TGAGGAAATC CATAGAAAAT GGCTTTGCCC AAGGTTGAGT
19501 TGTGATTAGC CAGTCATTAA TTGGTAATTA GCATATATGC CATACTTAGA
19551 TTACCAATTT TCACAGAAAG AGAGCACAAT AAAATATATC TAACAATGCA
19601 CATTACTGAA AATATTTTTA ATTGATGATT TAGAAGACAT CTGATTGTTT
19651 TAGAGTACTT CGATTATCAT AACAGCATT AATTTATAGT TGAATAGAA
19701 AAACGTCAA GATAGGAAAT TACTTTGAGG TTATATGAAC TTTATGATGT
19751 TTCTATCATF GTTTTTTAAT AAGACTACTC ATTTTTAACA TTGCTTTTTT
19801 AGATCAGCCA ATAATTTTAT TATATTTAAT TTTTCTATT TTTTATTIAT

```

【図5 - 13】

Figure 5 (continued) (SEQ ID NO: 10)

```
19851 TTTTCCATAG GTTATTGGGG TACAGGAGGT ATTTGGTTAC ATGAGTAAGT
19901 TATTTAGTGA TGATTTGTGA GATTTTGGTG CACCCATCAC CCAAGCAGTA
19951 TACACTGAAC CCTATTTGTG GTCCTTTATC CCTCGGCCCC CCACCCCACC
20001 ATTTCTCCCA AGTCACCAA GTCCATTCTG TATTTTFTTT TTTTTTTGAG
20051 ACGGAGTCTT CCTTGTGTCG CCAGGCTGGA GTGCAGTGGT GCGATCTCTG
20101 CTCACTGCAA GCTCCGCCTC CCGAGTTCAC GCCATTCTCC TGCCCTCAGCC
20151 TCCCGAGTAG CTGCGACTAC AGGTGCCTGC CACCACGCCC GGCTAATTTT
20201 TTTTTTTTTT TTTTGTATTT TTAGTAGAGA CAGGGTTTCA CCGTCTTAGT
20251 CAGGATCGTC TCGATCTCCT GACCTCAGGT GATCCACCCG CCTCGGCCTC
20301 TCAAAGTGCT GGGATTACAG GAGTGAGCCA CCGCGCCTGG CCCATTGTAT
20351 CATTCTTATG CCTTTGCGTC CTCATAGCTT AGCTTCCACG TATCTGTGAG
20401 AACATGCAAT GTTTGGTTTT CCATTCTTGA GTTACTTCAC TTAGAATAAT
20451 AGTCTCCAGC CGGCACGGT GGCTAAGCCT GTAATGACAG CACTTTTGGG
20501 AGGCCAAGGT GGGCGGATCA CGAGGTCAGG AGATCAAGAC CAJCCCTGGCT
20551 AACACGGTGA AACCCCGTCT CTACTAAAAA TACAAAAAAA TTAGCCAGGT
20601 GTGGTGGCAG GCGCCTGTAG ACCCAGCCAC TCAGGAGGCT GAGGCAGGAG
20651 AATGGCATGA ACCCGGGAGG CGGAGCTTGC ACTGAGCCGA GATCGCACCA
20701 CTGCACTCCA GCCTGGGCGA CAGATCAAGA CTCTGTCTCA AAAAAAAAAA
20751 AGAAAGAATA ATAGTCTCCA ATCTCATCCA TGTTACTGCA AATGCCATTA
20801 ATTCGTTCTT TGTATGACT GAGTAGTATT CCATCATACA TATGTGTGTG
```

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | | | |
|--|---|--|--|---|
| International Application No. PCT/US 01/01700 | | | | |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/51 C12N15/71 C12N15/85 C12Q1/00 B01J13/02 C12N5/18 C12N15/62 G01N33/48 C12Q1/68 C12N15/86 A61K38/00 A01K67/027 A61K35/00 C07K16/00 | | | | |
| 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) | | | | |
| 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, BIOSIS, EMBL, CHEM ABS Data | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | | | Relevant to claim No. |
| X | WO 99 53051 A (GENSET SA ;DUCLERT AYMERIC (FR); DUMAS MILNE EDWARDS JEAN BAPTI (F) 21 October 1999 (1999-10-21) SEQ ID NO 1196 is 100% identical in a 67 aa overlap to SEQ ID NO 2. | | | 1-13,15, 16, 25-31, 33-43, 48-50, 52-72 |
| X | DATABASE EMBL 'Online! NCI-CGAP: retrieved from EBI Database accession no. AI123839 XP002175241 99.6% identity in 478 bp overlap to SEQ ID 1. abstract | | | 1-13,15, 16, 25-31, 33-43, 48-50, 52-72 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | | | |
| * Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family | | | | |
| Date of the actual completion of the international search | | | Date of mailing of the international search report | |
| 20 August 2001 | | | 05/09/2001 | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl, Fax. (+31-70) 340-3016 | | | Authorized officer Lanzrein, M | |

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/01700

| C.(Continuation) 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! NCI-CGAP: retrieved from EBI Database accession no. A1039039 XP002175242</p> <p>99.7% identity in 397 bp overlap to SEQ ID 1. abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-13, 15, 16, 25-31, 33-43, 48-50, 52-72 |
| X | <p>DATABASE EMBL 'Online! NCI-CGAP: retrieved from EBI Database accession no. A1147044 XP002175243</p> <p>100% identity in 298 bp overlap to SEQ ID 1. abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-13, 15, 16, 25-31, 33-43, 48-50, 52-72 |
| A | <p>HIRAKI Y ET AL: "MOLECULAR CLONING OF A NEW CLASS OF CARTILAGE-SPECIFIC MATRIX CHONDROMODULIN I WHICH STIMULATES GROWTH OF CULTURED CHONDROCYTES" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 175, no. 3, 1991, pages 971-977, XP001018911 ISSN: 0006-291X the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-73 |
| P, X | <p>WO 00 12708 A (BAKER KEVIN ; GENENTECH INC (US); GODDARD AUDREY (US); GURNEY AUSTI) 9 March 2000 (2000-03-09) SEQ ID 322 is 100% identical to SEQ ID 2 of the application over the entire length. SEQ ID NO 321 (Claim 2; Fig 115) is 100% identical in 1194 bp overlap to SEQ ID 1 of the application.</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-31, 33-43, 47-72 |
| P, X | <p>WO 00 29579 A (ZYMOGENETICS INC) 25 May 2000 (2000-05-25)</p> <p>Protein sequence is 100% identical over entire length to SEQ ID 2 Example 1; Page 75-77 shows DNA sequence which is 100% identical in 1178 bp overlap to SEQ ID 1.</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-31, 33-43, 47-72 |

I

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/01700

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|--------------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P, X | <p>WO 00 78961 A (FERRARA NAPOLEONE ; STEWART TIMOTHY A (US); WILLIAMS P MICKEY (US);) 28 December 2000 (2000-12-28) Protein #91 (Claim 1; Fig 182) is 100% identical to SEQ ID 2. Example 93 (p. 465) shows DNA seq which is 100% identical in 1194 bp overlap to SEQ ID 1.</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-31, 33-43, 47-72 |
| P, X | <p>WO 00 43495 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; NI JIAN (US); ROSEN CRAIG A (US); BIRSE) 27 July 2000 (2000-07-27) SEQ ID No 54 (Claim 11; Fig 1A-B) is 100% identical over entire length to SEQ ID 2. SEQ ID No 11 (Claim 1; Fig 1A-B;) is 100% identical over entire length to SEQ ID 1.</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-31, 33-43, 47-72 |
| E | <p>WO 01 16318 A (EATON DAN L ; GENENTECH INC (US); FILVAROFF ELLEN (US); GODDARD AUD) 8 March 2001 (2001-03-08) Fig 116 (claim 12): 100% identical to SEQ ID 2 over the entire length. Seq. 115 is 100% identical in 1194 bp overlap to SEQ ID 2.</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1-31, 33-43, 47-72 |

1

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 32, 44-46, 73

Present claims 32, 44-46, 73 relate to an extremely large number of possible compounds/products that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible.

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 01/01700

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|--|--|
| WO 9953051 A | 21-10-1999 | AU 3050199 A EP 1068312 A | 01-11-1999 17-01-2001 |
| WO 0012708 A | 09-03-2000 | AU 5590899 A AU 6041399 A EP 1115863 A WO 0017353 A | 21-03-2000 10-04-2000 18-07-2001 30-03-2000 |
| WO 0029579 A | 25-05-2000 | AU 1622200 A | 05-06-2000 |
| WO 0078961 A | 28-12-2000 | AU 1748200 A AU 2215300 A AU 2495200 A AU 2600800 A AU 2883600 A AU 2883700 A AU 3514400 A AU 3774300 A AU 5441200 A AU 5591100 A WO 0053753 A WO 0053755 A WO 0053756 A WO 0053758 A WO 0073454 A WO 0073445 A WO 0073348 A WO 0032221 A WO 0075316 A AU 1749800 A AU 1749900 A AU 2390700 A AU 2399300 A AU 3107000 A AU 3381600 A AU 4011300 A AU 5460100 A WO 0153486 A WO 0053757 A WO 0105972 A WO 0073452 A WO 0032778 A WO 0055319 A WO 0037638 A WO 0105836 A WO 0053751 A AU 2883900 A AU 3246100 A AU 5152700 A WO 0104311 A WO 0075327 A WO 0077037 A AU 2192800 A AU 3107700 A AU 5590899 A AU 7079300 A AU 7573000 A WO 0116318 A | 19-06-2000 28-12-2000 28-09-2000 28-09-2000 28-09-2000 09-01-2001 28-09-2000 18-12-2000 18-12-2000 18-12-2000 14-09-2000 14-09-2000 14-09-2000 07-12-2000 07-12-2000 07-12-2000 08-06-2000 14-12-2000 04-10-2000 12-07-2000 05-02-2001 28-09-2000 19-06-2000 28-09-2000 05-02-2001 18-12-2000 26-07-2001 14-09-2000 25-01-2001 07-12-2000 08-06-2000 21-09-2000 29-06-2000 25-01-2001 14-09-2000 30-01-2001 28-12-2000 02-01-2001 18-01-2001 14-12-2000 21-12-2000 12-07-2000 28-09-2000 21-03-2000 26-03-2001 26-03-2001 08-03-2001 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/01700

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 0078961 A | | WO 0116319 A | 08-03-2001 |
| WO 0043495 A | 27-07-2000 | AU 3208700 A | 07-08-2000 |
| WO 0116318 A | 08-03-2001 | AU 1748200 A | 19-06-2000 |
| | | AU 2192800 A | 12-07-2000 |
| | | AU 2600800 A | 28-09-2000 |
| | | AU 2883700 A | 09-01-2001 |
| | | AU 3107700 A | 28-09-2000 |
| | | AU 3381600 A | 28-09-2000 |
| | | AU 3514400 A | 28-09-2000 |
| | | AU 5152700 A | 02-01-2001 |
| | | AU 5441200 A | 18-12-2000 |
| | | AU 5460100 A | 18-12-2000 |
| | | AU 5590899 A | 21-03-2000 |
| | | AU 5591100 A | 18-12-2000 |
| | | AU 7079300 A | 26-03-2001 |
| | | AU 7573000 A | 26-03-2001 |
| | | WO 0053753 A | 14-09-2000 |
| | | WO 0153486 A | 26-07-2001 |
| | | WO 0078961 A | 28-12-2000 |
| | | WO 0053757 A | 14-09-2000 |
| | | WO 0053758 A | 14-09-2000 |
| | | WO 0073445 A | 07-12-2000 |
| | | WO 0077037 A | 21-12-2000 |
| | | WO 0073348 A | 07-12-2000 |
| | | WO 0073452 A | 07-12-2000 |
| | | WO 0116319 A | 08-03-2001 |
| | | WO 0032221 A | 08-06-2000 |
| | | WO 0053750 A | 14-09-2000 |
| | | WO 0037640 A | 29-06-2000 |
| | | AU 1747100 A | 17-04-2001 |
| | | AU 1749800 A | 04-10-2000 |
| | | AU 1749900 A | 12-07-2000 |
| | | AU 2215300 A | 28-12-2000 |
| | | AU 2390700 A | 05-02-2001 |
| | | AU 2883900 A | 30-01-2001 |
| | | AU 3774300 A | 18-12-2000 |
| | | AU 3878400 A | 10-04-2001 |
| | | AU 5922999 A | 03-04-2000 |
| | | AU 6391000 A | 19-02-2001 |
| | | EP 1114152 A | 11-07-2001 |
| | | WO 0104311 A | 18-01-2001 |
| | | WO 0118210 A | 15-03-2001 |
| | | WO 0073454 A | 07-12-2000 |
| | | WO 0109327 A | 08-02-2001 |
| | | WO 0119987 A | 22-03-2001 |
| | | WO 0055319 A | 21-09-2000 |
| | | WO 0037638 A | 29-06-2000 |
| | | WO 0075316 A | 14-12-2000 |
| | | WO 0105836 A | 25-01-2001 |
| | | AU 3864800 A | 09-10-2000 |
| | | AU 5459900 A | 18-12-2000 |

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 38/00 | | A 6 1 K 39/395 | N 4 B 0 6 4 |
| 38/22 | | 45/00 | 4 B 0 6 5 |
| 39/395 | | 47/48 | 4 C 0 7 6 |
| | | 48/00 | 4 C 0 8 4 |
| 45/00 | | A 6 1 P 1/16 | 4 C 0 8 5 |
| 47/48 | | 9/00 | 4 C 0 8 6 |
| 48/00 | | 9/10 | 1 0 1 4 C 0 8 7 |
| A 6 1 P 1/16 | | 9/12 | 4 H 0 4 5 |
| 9/00 | | 17/06 | |
| 9/10 | 1 0 1 | 19/10 | |
| 9/12 | | 29/00 | |
| 17/06 | | 35/00 | |
| 19/10 | | C 0 7 K 16/40 | |
| 29/00 | | 16/42 | |
| 35/00 | | 16/46 | |
| C 0 7 K 16/40 | | C 1 2 N 1/15 | |
| 16/42 | | 1/19 | |
| 16/46 | | 1/21 | |
| C 1 2 N 1/15 | | 9/12 | |
| 1/19 | | 11/04 | |
| 1/21 | | C 1 2 Q 1/02 | |
| 5/10 | | 1/48 | Z |
| 9/12 | | 1/68 | A |
| 11/04 | | G 0 1 N 33/53 | D |
| C 1 2 Q 1/02 | | | M |
| 1/48 | | 33/566 | |
| 1/68 | | 33/577 | B |
| G 0 1 N 33/53 | | 33/58 | A |
| | | C 1 2 P 21/08 | |
| 33/566 | | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| 33/577 | | 5/00 | A |
| 33/58 | | | B |
| // C 1 2 P 21/08 | | A 6 1 K 37/24 | |
| | | 37/02 | |

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

(72)発明者 ユン, ジーニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91316,
エンシノ, ニューキャッスル アベニ
ュー 5348, アpartment 227

(72)発明者 クラーキン, クリスティー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 93030,
オックスナード, イーグル クリーク
レーン 2318

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB07 BB20 BB50
CB01 DA13 DA36 FA16 FB02
FB03 FB08

4B024 AA01 AA11 BA10 BA41 CA04
CA07 CA09 CA11 DA02 DA06
EA02 EA04 GA01 GA11 GA18
GA19 HA03 HA14 HA17

4B033 NA16 NA25 NB58 NC06 ND12
NF06

4B050 CC01 CC03 DD11 FF13E
LL03

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ27
QQ42 QR32 QR38 QR41 QR55
QR69 QR77 QR82 QS12 QS25
QS34 QS39 QX07

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
DA13

4B065 AA26X AA90X AA91X AA93Y
AB02 AC14 BA02 BA08 CA25
CA29 CA44 CA46

4C076 AA94 BB11 BB16 BB32 CC04
CC11 CC27 EE59

4C084 AA01 AA02 AA03 AA06 AA13
AA16 BA01 BA02 BA08 CA17
CA23 DB52 DB60 MA17 MA22
MA24 MA27 MA37 MA43 MA44
MA55 MA56 MA65 MA66 MA67
NA14 ZA362 ZA422 ZA452
ZA752 ZA972 ZB112

4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB41
BB43 BB44 CC22 CC23 EE01
GG02 GG04

4C086 AA02 AA03 EA16 MA01 MA05
MA17 MA22 MA23 MA24 MA35
MA37 MA44 MA52 MA55 MA56
MA65 MA66 MA67 NA14 ZA26
ZA36 ZA45 ZA75 ZA89 ZA97
ZB11

4C087 BB33 BC83 MA22 MA23 MA24
MA27 MA35 MA37 MA43 MA44
MA52 MA56 MA58 MA65 MA66
NA14 ZA26 ZA36 ZA42 ZA75
ZA89 ZA97 ZB11

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40
DA75 DA76 DA86 DA89 EA50
FA72 FA74

【要約の続き】

```

      870              890
SEQ ID NO:1 GAGAGAGGTTATTGTGTATTACTGCGCTCGAGGCAACCGCTATIGCCG
SEQ ID NO:2 E R G Y C C I Y C R R G N R Y C R
      910              930              950
      CCGCGTCTGTGAACCTTACTAGGCTACTACCCATATCCATCTGCTACC
      R V C E P L L G Y Y P Y P Y C Y
      970              990
AAGGAGGACGAGTCATCTGTCGTGTCATCATGCTTGTAACTGGTGGGTG
Q G G R V I C R V I M P C N W W V
      1010              1030              1050
GCCCACATGCTGGGGAGGGTCTAATAGGAGTTTGAGCTCAAATGCTTAA
A R M L G R V
      1070              1090
ACTGCTGGCAACATATAATAAATGCAATGCTATTCAATGAATTCGCTCA
      1110              1130              1150
TGAGGCATCTGGCCCTGGTAGCCAGCTCTCCAGATTACTTGTAGGTAA
      1170              1190
TTCCTCTCTCATGTTCTAATAAACTTCTACATTATCCAAAAA
1206
AAAAA

```

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 软骨素I相关肽 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003520590A | 公开(公告)日 | 2003-07-08 |
| 申请号 | JP2001553816 | 申请日 | 2001-01-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 安姆根有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 安进公司 | | |
| [标]发明人 | ニューエンハン ユンジーニー クラークンクリスティー | | |
| 发明人 | ニューエン, ハン ユン, ジーニー クラークン, クリスティー | | |
| IPC分类号 | A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/22 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61P1/16 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P17/06 A61P19/10 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/51 C07K16/40 C07K16/42 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N11/04 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33 /566 G01N33/577 G01N33/58 | | |
| CPC分类号 | A01K2217/05 A61K38/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P17/06 A61P19/10 A61P29/00 C07K14/51 C07K2319/00 | | |
| FI分类号 | A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K47 /48 A61K48/00 A61P1/16 A61P9/00 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P17/06 A61P19/10 A61P29/00 A61P35/00 C07K16/40 C07K16/42 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12N11/04 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B G01N33 /58.A C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/24 A61K37/02 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB07 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045 /DA36 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024 /EA02 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA14 4B024/HA17 4B033/NA16 4B033/NA25 4B033/NB58 4B033/NC06 4B033/ND12 4B033/NF06 4B050 /CC01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/FF13E 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ27 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR38 4B063/QR41 4B063/QR55 4B063 /QR69 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065 /AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065 /CA25 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA94 4C076/BB11 4C076/BB16 4C076/BB32 4C076/CC04 4C076/CC11 4C076/CC27 4C076/EE59 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084 /AA06 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/CA17 4C084/CA23 4C084/DB52 4C084/DB60 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA24 4C084/MA27 4C084/MA37 4C084 /MA43 4C084/MA44 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA752 4C084/ZA972 4C084/ZB112 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC22 4C085 /CC23 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG04 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA05 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA24 4C086/MA35 4C086/MA37 4C086 /MA44 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA56 4C086/MA65 4C086/MA66 4C086/MA67 4C086/NA14 4C086/ZA26 4C086/ZA36 4C086/ZA45 4C086/ZA75 4C086/ZA89 4C086/ZA97 4C086/ZB11 4C087 /BB33 4C087/BC83 4C087/MA22 4C087/MA23 4C087/MA24 4C087/MA27 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA43 4C087/MA44 4C087/MA52 4C087/MA56 4C087/MA58 4C087/MA65 4C087/MA66 4C087 | | |

/NA14 4C087/ZA26 4C087/ZA36 4C087/ZA42 4C087/ZA75 4C087/ZA89 4C087/ZA97 4C087/ZB11
4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045
/DA86 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74

优先权 60/176898 2000-01-19 US
09/724310 2000-11-28 US

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明涉及编码与软骨调节蛋白I结构相关的多肽的新型多核苷酸，以及其纯化的蛋白质本身。本发明还涉及用于产生这种多肽的载体，宿主细胞，抗体和重组方法。本发明的一方面是产生软骨调节蛋白I相关肽的方法，在适合表达多肽的条件下如上所述培养宿主细胞，以及任选地，一种方法，其包括从培养物中分离多肽的步骤。此外，本发明公开了用于这些和相关产品的治疗，诊断和研究用途。

```
10 30 50
SEQ ID NO:1 GCACTGTCGCTCAGCGGCGGGTCTCTCTAGTCCCTCCRAAGCAAGGAAGA 70
GCTACTGTGCTCTGAGAGACCATGTCARAGAAATCTCCAGAGAAATGAGAA
70 90 110
GACTGTGACATTCGAAATCCAGAAAGCTTTEAAATCCAGAAATATCTAA 150
D C N T L E A E A F K S K K I C K
110 130
ATCCCTPAGATTTTGGACCTGGGTGTTTGTATATCTGGCCCTAATCTAAA 170
E L K I C G L V F G I L A L T L
130 150
TTGTCCTTTTGGGGAGCCAGGCATTCGCCCCGGAGGACCCCAAAA 210
I V L P F G S E F T D V F K K
150 170
GCTTATGACATGGGTCGCTTCTGACAGCAATGGAGAAAGAGAGAT 230
A Y D M E H T P E S K C E K K I
170 190
ITACAGAAATTTGATTCCTGTCGACAGCAAAATATTCAGAGAGCCAA 250
Y M E I D P V T R D H I P E S G
190 210
ATGGCACTGAGAAACATTTGAAATGCGGACTTTEAAAGAGATGAGT 270
M G T D E T L E V E D F K N G Y E
210 230
GCACTACTCTGGTGGCTTCAAAAATCTTTATCAAAACTCAGATTA 290
M X Y F V G L Q X C P I K T Q I K
230 250
AGTGAATCCGAAATTTCTGACCCAGAGACCAAAATGATGAGAAATGAG 310
V I S E P E E P E E E I D E E E
250 270
AAATPACCGCAACTTCTTTGAACTGTCAGTATCTGGGTCGCCAGCGAA 330
E I C T E P F E Q S V I W V P A E
270 290
AGCCCTCTGAAAGCCGAGATTTCTTAAATTCGCAAAATTTCTGGAGAT 350
K P I E N A D P L K N S E I L E I
290 310
TTGCGATAGCCGACCGAGATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 370
C D H V Z M X W I N F T L E S V
310 330
CTGATTCAGACATTTGACAGCAGGAGAGATTTCTGACTTCTCTGCG 390
S E L Q D F E E E Q E D L H F E A
330 350
AACGAAAGAAAGGATTTGACAAATGACAGTGGGTCGCTCCCTCAGT 410
N E K K G I E Q N E Q W V V P Q V
350 370
GAAAGTGAAGAGACCTCTCCGCCAGCAGCACTGACAGCAAGCACTTC 430
K V S K T R E A R Q A S E E E L
370 390
CATTAATGACTTACTGAAATGGAATGGAATTTGATCCCATGCCGGAI 450
P I N D Y T E N G I E F D P M L D
```