

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-522510

(P2012-522510A)

(43) 公表日 平成24年9月27日(2012.9.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-503657 (P2012-503657)
(86) (22) 出願日 平成22年3月31日 (2010.3.31)
(85) 翻訳文提出日 平成23年11月18日 (2011.11.18)
(86) 国際出願番号 PCT/US2010/029377
(87) 国際公開番号 W02010/120509
(87) 国際公開日 平成22年10月21日 (2010.10.21)
(31) 優先権主張番号 61/165,194
(32) 優先日 平成21年3月31日 (2009.3.31)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510325880
エータイアー ファーマ, インコーポレ
イテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
21, サン ディエゴ, ジェネラル
アトミックス コート 3565, スイ
ート 103
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非標準的な生物活性を有するアスパルチル tRNA 合成酵素を含む組成物および方法

(57) 【要約】

非標準的な生物活性を有する、単離されたアスパルチル tRNA 合成酵素ポリペプチドおよびポリヌクレオチド、ならびにそれに関する組成物および方法が提供される。本ある実施形態では、本発明のアスパルチル tRNA 合成酵素ポリペプチドによって示される非標準的な生物活性は、細胞増殖の調整、アポトーシスの調整、炎症の調整、細胞分化の調整、血管新生の調整、細胞結合の調整、Akt を介した細胞シグナル伝達の調整、細胞の代謝の調整、サイトカイン産生または活性の調整、toll 様受容体シグナル伝達の調整などを含み得るが、これらに限定されない。

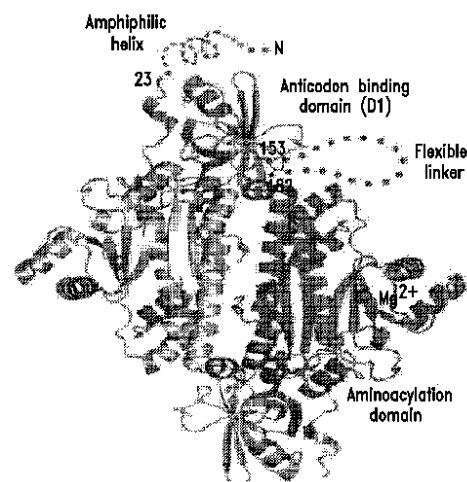


FIG. 12C

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

非標準的な生物活性を有する、単離されたアスパルチル t R N A 合成酵素 (A s p R S) ポリペプチドまたはその活性変異体。

【請求項 2】

前記非標準的な生物活性は、細胞増殖の調整、アポトーシスの調整、炎症の調整、細胞分化の調整、血管新生の調整、細胞結合の調整、A k t を介した細胞シグナル伝達の調整、細胞の代謝の調整、サイトカイン産生または活性の調整、および t o l l 様受容体シグナル伝達の調整からなる群から選択される、請求項 1 に記載の単離されたアスパルチル t R N A 合成酵素ポリペプチド。

10

【請求項 3】

配列番号 1 に記載の完全長ヒトアスパルチル t R N A 合成酵素配列の断片である、請求項 1 に記載の単離されたアスパルチル t R N A 合成酵素ポリペプチド。

【請求項 4】

前記その活性変異体は、配列番号 1 に記載のヒトアスパルチル t R N A 合成酵素配列に対してその長さにわたり少なくとも 80 % または 90 % の同一性を有するポリペプチドである、請求項 1 に記載の単離されたアスパルチル t R N A 合成酵素ポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号 1 のアミノ酸残基 1 ~ 31、1 ~ 154、1 ~ 171、もしくは 1 ~ 174 またはその活性断片もしくは変異体から本質的に成る、請求項 1 に記載の単離されたアスパルチル t R N A 合成酵素ポリペプチド。

20

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドおよび異種の融合パートナーを含む融合ポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の少なくとも 1 つの単離されたアスパルチル t R N A 合成酵素ポリペプチドを含む二量体または多量体複合体。

【請求項 8】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドまたはその相補体。

30

【請求項 9】

請求項 8 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 8 に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

プライマー、プローブ、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される、請求項 11 に記載オリゴヌクレオチド。

40

【請求項 13】

請求項 1 に記載の単離された A s p R S ポリペプチド、前記 A s p R S ポリペプチドの細胞性結合パートナー、またはその両方に対して結合特異性を示す結合剤。

【請求項 14】

抗体、その抗原結合断片、ペプチド、ペプチドミメティック、小分子、およびアプタマーから選択される、請求項 13 に記載の結合剤。

【請求項 15】

前記 A s p R S ポリペプチドの非標準的な活性に拮抗する、請求項 13 に記載の結合剤。

【請求項 16】

50

前記 A s p R S ポリペプチドの非標準的な活性を刺激する、請求項 13 に記載の結合剤。

【請求項 17】

試料中のアスパルチル t R N A 合成酵素 (A s p R S) ポリペプチドの存在またはレベルを決定する方法であって、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の A s p R S ポリペプチドに特異的に結合するものまたは結合剤と前記試料を接触させるステップ、前記結合剤の存在または非存在を検出するステップ、およびそれによって、前記 A s p R S ポリペプチドの存在またはレベルを決定するステップを含む方法。

【請求項 18】

試料中のアスパルチル t R N A 合成酵素 (A s p R S) ポリペプチドの存在またはレベルを決定する方法であって、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の A s p R S ポリペプチドを特異的に同定することができる分子検出器の中に前記試料を導入するステップ、およびそれによって、前記 A s p R S ポリペプチドの存在またはレベルを決定するステップを含む方法。

10

【請求項 19】

前記分子検出器は質量分析計 (M S) である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 A s p R S タンパク質断片の存在またはレベルをコントロール試料または所定の値と比較するステップを含む、請求項 17 または 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記試料とコントロールを区別するために前記試料の状態を特徴付けるステップを含む、請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記試料およびコントロールは細胞または組織を含み、前記方法は、異なる種の細胞もしくは組織、異なる組織または器官の細胞、異なる細胞発生段階の細胞、異なる細胞分化状態の細胞、または健常な細胞および罹患した細胞を区別するステップを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のアスパルチル t R N A 合成酵素 (A s p R S) ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーの 1 つもしくは複数に特異的に結合する化合物を同定する方法であって、a) 適した条件下で、少なくとも 1 つの試験化合物と、前記 A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーまたはその両方を組み合わせるステップ、および b) 前記試験化合物に対する前記 A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーまたはその両方の結合を検出し、それによって、前記 A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーまたはその両方に特異的に結合する化合物を同定するステップを含む方法。

30

【請求項 24】

前記試験化合物は、ポリペプチドもしくはペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片、ペプチドミメティック、または小分子である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記試験化合物は、前記 A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーの非標準的な生物活性を刺激する、請求項 23 に記載の方法。

40

【請求項 26】

前記試験化合物は、前記 A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーの非標準的な生物活性に拮抗する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

請求項 23 から 26 のいずれか一項に記載の方法によって同定される化合物。

【請求項 28】

生理学的に許容できる担体と、(i) 請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド；(i i) 請求項 6 に記載の融合タンパク質；(i i i) 請求項 7 に記載の二量体または多量体

50

複合体；(i v) 請求項 8 に記載の単離されたポリヌクレオチド；(v) 請求項 9 に記載の発現ベクター；(v i) 請求項 11 に記載のオリゴヌクレオチド；(v i i) 請求項 13 に記載の結合剤；および(v i i i) 請求項 27 に記載の化合物からなる群から選択される少なくとも 1 つの成分とを含む組成物。

【請求項 29】

細胞または組織を請求項 28 の組成物と接触させるステップを含む、細胞の活性を調整するための方法。

【請求項 30】

前記細胞の活性は、細胞移動、細胞増殖、アポトーシス、炎症、細胞分化、血管新生、細胞結合、A k t を介した細胞シグナル伝達、細胞の代謝、サイトカイン産生、および t o l l 様受容体シグナル伝達の調整からなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。

10

【請求項 31】

前記細胞の活性はサイトカイン産生である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記サイトカインは、I L 1 - 、I L - 6、I L - 8、I L - 10、I L - 12 p 40、M I P 1 - 、M I P - 1、G R O - 、M C P - 1、または I L - 1 r a のうちのいずれか 1 つまたは複数である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記細胞の活性は t o l l 様受容体 (T L R) シグナル伝達である、請求項 31 に記載の方法。

20

【請求項 34】

前記 T L R は、T L R 2、T L R 4、またはその両方である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

先天免疫応答を刺激する方法である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記細胞は被験体中に存在する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 37】

炎症性疾患、自己免疫疾患、新生物性疾患、代謝病、神経学的な疾患、感染症、心血管疾患、および異常な血管新生と関連する疾患からなる群から選択される状態を治療するための方法であって、治療を必要とする被験体に、請求項 29 に記載の組成物を投与するステップを含む方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2009 年 3 月 31 日に米国仮特許出願第 61 / 165, 194 号 (これは、その全体が参考として本明細書に援用される) の利益を主張する。

40

【0002】

配列表に関する記載

本出願と関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキスト形式で提供され、これによって、参照によって本明細書の中に組み込まれる。配列表を含有するテキストファイルの名称は、120161__412PC__SEQUENCE__LISTING. txt である。テキストファイルは、13KB であり、2010 年 3 月 31 日に作成されたものであり、E F S - W e b を介して電子的手段により提出されている。

【0003】

本発明は、概して、アスパルチル t R N A 合成酵素 (A s p R S) ポリペプチドの形態に、そのようなポリペプチドを含む組成物、およびそのようなポリペプチドを使用するた

50

めの方法に関する。

【背景技術】

【0004】

tRNA分子のアミノアシル化を触媒するアミノアシルtRNA合成酵素は、翻訳のプロセスの間に遺伝情報を解読するのに不可欠である。より高等な真核生物では、アミノアシルtRNA合成酵素は、他のポリペプチドと結合して、超分子多酵素複合体を形成する。それぞれの真核生物tRNA合成酵素は、tRNA合成酵素の原核生物の対応物と密接に関係するコア酵素およびコア酵素のアミノ末端またはカルボキシル末端に追加されるさらなるドメインからなる。ヒトチロシルtRNA合成酵素(TyrRS)は、例えば、原核生物およびより下等な真核生物TyrRS分子の一部ではないカルボキシル末端ドメインを有する。

10

【0005】

いくつかのアミノアシルtRNA合成酵素は、翻訳へのそれらの関与とは異なる、非標準的な(non-canonical)機能を有することが実証されてきた。例えばミニチロシルtRNA合成酵素(ミニTyrRS)は、アミノ酸残基1~364に相当し、多形核細胞エラストーゼおよびプラスミンによって切断されるTyrRSのN末端ドメインであり、アミノアシルtRNA合成酵素「AARS」多機能サイトカイン様タンパク質およびペプチドのメンバーである。インビトロにおいて、ミニTyrRSは、好中球活性化および走化性、内皮細胞増殖および移動(migration)を刺激することが示され、ヒヨコ漿尿膜(CAM)およびマウスマトリゲルアッセイにおいて血管新生促進性である。ミニTyrRSは、IL-8などのCXCKケモカインのように、そのケモカイン活性および血管新生活性を与えるELRモチーフを有する。他のELR含有サイトカインのように、このモチーフの突然変異により、ミニTyrRS結合ならびに白血球および血管新生の刺激が阻害される。

20

【0006】

さらに、切断型形態またはTrpRSは、血管新生特性を有することが実証されてきた。正常なヒト細胞において、検出することができる2つの形態のTrpRSがある：完全長分子(アミノ酸残基1~471)からなる主要な形態および少数の切断型形態。少数の形態は、プレmRNAの選択的スプライシングを通してのアミノ末端ドメインの欠失によって生成される。ミニTrpRSのアミノ末端は、完全長TrpRS分子の位置48のメチオニン残基であることが決定された。その代わりに、切断型TrpRSは、タンパク質分解によって生成することができる。例えば、ウシTrpRSは、脾臓中で高度に発現され、脾液の中に分泌され、したがって、切断型TrpRS分子の産生がもたらされる。さらなる研究は、ミニTrpRSが、VEGF誘発性の細胞増殖および移動を阻害することを示す(非特許文献1)。特に、ヒヨコCAMアッセイは、ミニTrpRSが、VEGFの血管新生活性をブロックすることを示す。対照的に、完全長TrpRSは、血管新生を阻害しない。したがって、最初の48アミノ酸残基の除去により、TrpRSの抗血管新生活性が曝露する。そのため、TyrRSと同様に、TrpRSのある種の形態は、tRNAのアミノアシル化以外の活性を有する。

30

【先行技術文献】

40

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Wakasugiら、Proc. Natl. Acad. Sci. (2002年)99巻:173~177頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

非標準的で、治療上適切な活性に関連する、TyrRSおよびTrpRSの代替形態のこれらの知見を考慮すれば、タンパク質のこのファミリーの十分な治療上の可能性を活用するために、他のアミノアシルtRNA合成酵素タンパク質の生物学的に適切な形態およ

50

び／または活性を同定する必要性がある。したがって、本発明は、これらの必要性を検討し、他の関係する利点を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、ある種のアスパルチル tRNA 合成酵素 (AspRS) ポリペプチドが、治療上関連性の非標準的な生物活性を有するという発見に由来する。そのため、一態様によれば、本発明は、少なくとも1つの非標準的な生物活性を有する、単離された AspRS ポリペプチド、ならびに前述の非標準的な活性を実質的に保持するその活性断片および変異体を提供する。本明細書において使用される「非標準的な」活性は、アミノアシル化以外の、より具体的には、tRNA^{Asp} 分子上へのアスパラギン酸の付加以外の、本発明の AspRS ポリペプチドが有する活性を一般に指す。本明細書において詳述されるように、ある実施形態では、本発明の AspRS ポリペプチドによって示される非標準的な生物活性は、細胞増殖の調整、アポトーシスの調整、炎症の調整、細胞分化の調整、血管新生の調整、細胞結合の調整、Akt を介した細胞シグナル伝達の調整、細胞の代謝の調整、サイトカイン産生または活性の調整、tol l 様受容体シグナル伝達の調整などを含み得るが、これらに限定されない。

10

【0010】

ある実施形態では、本発明の AspRS ポリペプチドは、完全長哺乳類 AspRS タンパク質の隣接断片である。より特定の実施形態では、AspRS ポリペプチドは、配列番号1に記載のヒト AspRS タンパク質配列の隣接断片である。説明として、断片は、本質的に、任意の長さであってもよい、ただし、それらが、完全長ではないことを条件とし、さらに、それらが、対象の少なくとも1つの非標準的な生物活性を保持することを条件とする。ある例示的な実施形態では、本発明の AspRS ポリペプチドは、長さが、約20～50、20～100、20～200、20～300、20～400、または20～500のアミノ酸のサイズの範囲にわたるであろう。他の実施形態では、本発明の AspRS ポリペプチドは、長さが、約50～100、50～200、50～300、50～400、または50～500のアミノ酸のサイズの範囲にわたるであろう。他の実施形態では、本発明の AspRS ポリペプチドは、長さが、約100～200、100～300、100～400、または100～500のアミノ酸のサイズの範囲にわたるであろう。さらなる他の例示的な実施形態では、本発明の AspRS ポリペプチドは、長さが、約200～300、200～400、または200～500のアミノ酸のサイズの範囲にわたるであろう。

20

30

【0011】

本発明のさらなる実施形態では、AspRS ポリペプチドは、配列番号1に記載のヒト AspRS タンパク質配列などの AspRS タンパク質配列の断片の活性変異体（つまり、対象の少なくとも1つの非標準的な生物活性を保持する）を含む。より特定の実施形態では、活性変異体は、配列番号1に記載のヒトアスパルチル tRNA 合成酵素配列に対してその全長にわたり少なくとも70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するポリペプチドである。

【0012】

本発明の他の実施形態は、天然に存在するかまたは天然に存在しないに関わらず、1つまたは複数の非標準的な活性を有する AspRS スプライス変異体および点突然変異体を提供する。ある実施形態では、AspRS は、両親媒性のヘリックスドメインを含む。

40

【0013】

本発明のより特定の実施形態では、AspRS ポリペプチドは、アミノ酸残基1～154、1～171、1～174、1～31、399～425、413～476、もしくは397～425から本質的に成る、配列番号1のヒト AspRS 配列の断片または対象の少なくとも1つの非標準的な生物活性を実質的に保持するその活性断片もしくは変異体を含む。

【0014】

50

他の特定の実施形態では、A s p R S ポリペプチドは、N C B I 受託番号 N P 0 0 1 3 4 0 に記載のポリペプチドではない。

【 0 0 1 5 】

本発明の他の態様によれば、本明細書に記載の少なくとも1つのA s p R S ポリペプチドおよび異種の融合パートナーを含む融合タンパク質が提供される。

【 0 0 1 6 】

本発明の他の態様によれば、本明細書に記載のポリペプチドおよび融合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドならびにそのようなポリヌクレオチドを含む発現ベクターおよびそのような発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。A s p R S ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドも含まれる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、プライマー、プローブ、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。他の実施形態は、A s p R S ポリヌクレオチドを標的とするR N A i 作用物質に関する。

10

【 0 0 1 7 】

本発明の他の態様によれば、本発明のA s p R S ポリペプチドに対して結合特異性を有する結合剤 (b i n d i n g a g e n t) (例えば抗体およびその抗原結合断片) またはその細胞性結合パートナーのうちの1つが提供される。ある実施形態では、結合剤は、抗体、その抗原結合断片、ペプチド、ペプチドミメティック、小分子、またはアプタマーである。いくつかの実施形態では、結合剤は、A s p R S ポリペプチドの非標準的な活性に拮抗する。他の実施形態では、結合剤は、A s p R S ポリペプチドの非標準的な活性を刺激する (a g o n i z e) 。

20

【 0 0 1 8 】

本発明の他の態様によれば、組成物、例えば、生理学的に許容できる担体および本明細書に記載の、本発明の単離されたポリペプチド、融合タンパク質、抗体などの結合剤、単離されたポリヌクレオチド、発現ベクター、宿主細胞などのうちの少なくとも1つを含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 1 9 】

ある実施形態は、試料中のA s p R S ポリペプチドの存在またはレベルを決定する方法であって、本明細書に記載のA s p R S ポリペプチドに特異的に結合するものまたは結合剤と試料を接触させるステップ、結合剤の存在または非存在を検出するステップ、およびそれによって、A s p R S ポリペプチドの存在またはレベルを決定するステップを含む方法に関する。ある実施形態は、試料中のA s p R S ポリペプチドの存在またはレベルを決定する方法であって、本明細書に記載のA s p R S ポリペプチドを特異的に同定することができる分子検出器の中に試料を導入するステップ、およびそれによって、A s p R S ポリペプチドの存在またはレベルを決定するステップを含む方法を含む。特定の実施形態では、分子検出器は、質量分析計 (M S) である。ある実施形態は、A s p R S タンパク質断片の存在またはレベルをコントロール試料または所定の値と比較することを含む。いくつかの実施形態は、それとコントロールを区別するために試料の状態を特徴付けることを含む。特定の実施形態では、試料およびコントロールは、細胞または組織を含み、方法は、異なる種の細胞もしくは組織、異なる組織もしくは器官の細胞、異なる細胞発生段階の細胞、異なる細胞分化状態の細胞、または健常な細胞および罹患した細胞を区別するステップを含む。

30

40

【 0 0 2 0 】

A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーの1つもしくは複数に特異的に結合する化合物を同定する方法であって、a) 適した条件下で、少なくとも1つの試験化合物と、A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーまたはその両方を組み合わせるステップ、およびb) 試験化合物に対するA s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーまたはその両方の結合を検出し、それによって、A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーまたはその両方に特異的に結合する化合物を同定するステップを含む方法も含まれる。ある実施形態では、試験化合物は、ポリペプチドも

50

しくはペプチド、抗体もしくはその抗原結合断片、ペプチドミメティック、または小分子である。いくつかの実施形態では、試験化合物は、A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーの非標準的な生物活性を刺激する。他の実施形態では、試験化合物は、A s p R S ポリペプチドまたはその細胞性結合パートナーの非標準的な生物活性に拮抗する。本明細書において提供される方法のうちのいずれかによって同定される化合物も含まれる。

【0021】

他の態様において、本発明は、本明細書に記載のように、細胞または組織を本発明の組成物と接触させることによって、細胞の活性を調整するための方法であって、調整される細胞の活性は、細胞移動、細胞増殖、アポトーシス、炎症、細胞分化、血管新生、細胞結合、A k t を介した細胞シグナル伝達、細胞の代謝、サイトカイン産生、および t o l l 様受容体シグナル伝達の調整などからなる群から選択される方法も提供する。ある実施形態では、細胞の活性は、サイトカイン産生である。特定の実施形態では、サイトカインは、I L 1 - 、I L - 6、I L - 8、I L - 10、I L - 12 p 40、M I P 1 - 、M I P - 1、G R O - 、M C P - 1、または I L - 1 r a のうちのいずれか1つまたは複数である。いくつかの実施形態では、細胞の活性は、t o l l 様受容体 (T L R) シグナル伝達である。特定の実施形態では、T L R は、T L R 2、T L R 4、またはその両方である。ある実施形態は、先天免疫応答を刺激する方法を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、被験体中に存在する。

10

【0022】

他の態様では、本発明は、本発明による組成物を投与することによって、治療を必要とする被験体において、疾患、障害、または他の状態を治療するための方法を提供する。例示として、そのような疾患、障害、または状態は、炎症性疾患、自己免疫疾患、新生物性疾患（例えば癌）、代謝病、神経学的な疾患、感染症、心血管疾患、および異常な血管新生と関連する疾患を含み得るが、これらに限定されない。

20

【0023】

配列識別子の簡単な説明

配列番号1は、ヒトアスパルチル t R N A 合成酵素 (A s p R S) の完全長アミノ酸配列である。

【0024】

配列番号2は、配列番号1の A s p R S ポリペプチドをコードする核酸配列である。

30

【0025】

配列番号3は、32アミノ酸ヒト A s p R S ペプチドのアミノ酸配列である。

【0026】

配列番号4は、32アミノ酸ラット A s p R S ペプチドのアミノ酸配列である。

【0027】

配列番号5は、A s p R S 両親媒性ヘリックスの正電荷残基のコンセンサス配列である。

【0028】

配列番号6は、A n o p h e l e s m o s q u i t o A s p R S N末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

40

【0029】

配列番号7は、シカダニ A s p R S N末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【0030】

配列番号8は、フクロウカサガイ (o w l l i m p e t) A s p R S N末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【0031】

配列番号9は、ヒル (l e a c h) A s p R S N末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【0032】

50

配列番号 10 は、ツメガエル (X e n o p u s) A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 3 】

配列番号 11 は、ニホンフグ A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 4 】

配列番号 12 は、ミドリフグ A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 5 】

配列番号 13 は、トゲウオ A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

10

【 0 0 3 6 】

配列番号 14 は、ニワトリ A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 7 】

配列番号 15 は、ウシ A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 8 】

配列番号 16 は、ラット A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 9 】

配列番号 17 は、マウス A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

20

【 0 0 4 0 】

配列番号 18 は、ロックハイルックス A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 1 】

配列番号 19 は、オポッサム A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 2 】

配列番号 20 は、メガネザル A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 3 】

配列番号 21 は、オランウータン A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

30

【 0 0 4 4 】

配列番号 22 は、チンパンジー A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 5 】

配列番号 23 は、ヒト A s p R S N 末端ヘリックスの一部のアミノ酸配列である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 6 】

【 図 1 】 図 1 A ~ 1 D は、A s p R S (配列番号 1) の (A) ドメイン構造および (B) アミノ酸配列を示す図である。 (C および D) は、ヒト好中球エラスターゼを用いる完全長 A s p R S タンパク質のタンパク質分解制御によって生成される、A s p R S の断片の S D S - P A G E 分離を示す図である。図 1 C は、完全長 A s p R S および P M N エラスターゼを用いる消化を示す S D S - P A G E ゲル、4 ~ 12 % M O P S である。図 1 D は、完全長 A s p R S および P M N エラスターゼを用いる消化を示す S D S - P A G E ゲル、12 % M E S である。

40

【 図 2 】 図 2 A ~ 2 B は、本発明の A s p R S (D R S とも言われる) 断片を用いて処理された内皮細胞 (b A E C) における A k t の活性化を示す図である。図 2 A は、エラスターゼ生成 A s p R S 断片のプールを用いる処理によって誘発された A k t のリン酸化を示し、図 2 B は、A s p R S の切断プールによる A k t リン酸化の時間経過を示す。

50

【図3】図3は、完全長A s p R S (D R S) またはポジティブコントロールである内皮単球活性化ポリペプチドI I (E M A P) を用いて処理されたP B M C によるT N F - 分泌と比較した、本発明のA s p R S 断片、D 1 を用いて処理された、末梢血単核細胞 (P B M C) によるT N F - の分泌の増加を示す図である。P B M C は、D 1、D R S、またはE M A P I I タンパク質を用いて24時間処理し、T N F - 分泌についてアッセイした。

【図4】図4は、A s p R S 断片D 1 を用いるP B M C の処理後に分泌される例示的なサイトカインを示す図である。P B M C は、24時間処理し、27の異なるサイトカインの分泌についてアッセイし、I L 1 - 、I L - 6、I L - 8、I L - 10、I L - 12 p 40、M I P 1 - 、M I P - 1、G R O - 、M C P - 1、およびI L - 1 r a の分泌を増加させることがわかった。

【図5】図5は、A s p R S 断片D 1 が細胞型特異的に単球を活性化することを示す図である。P B M C は、ネガティブコントロールとしてのP B S、ポジティブコントロールとしてのP H A、およびA s p R S 断片D 1 を用いて24時間処理し、単球およびリンパ球上の活性化の細胞表面マーカーを検出するためにアッセイした。

【図6】図6は、A s p R S 断片D 1 が、単球 (例えばT H P - 1) およびマクロファージ (例えばR A W 267.7) 細胞株からのT N F - の分泌を誘発することを示す図である。

【図7】図7は、A s p R S 断片D 1 が、マクロファージ細胞株の走化性を誘発することを示す図である。図7Aは、b o u d i n チャンバーを使用して細胞移動をアッセイするための実験装置を示し、図1Bは、R A W 264.7マクロファージ細胞が、D 1断片に向かって用量依存的に移動することを示す。

【図8】図8は、T H P - 1単球においてA s p R S 断片D 1によって媒介されるT N F - 分泌が、P I 3キナーゼシグナル伝達の阻害剤 (L Y 294022) によってではなく、M A Pキナーゼシグナル伝達経路における主要成分であるM E K (U O 126) の阻害剤によって阻害されることを示す図である。L P S は、ポジティブコントロールとして使用され、その活性は、両方の阻害剤によってブロックされる。

【図9】図9は、A s p R S 断片D 1 が、V E G F 誘発性の血管新生を阻害することを示す図である。V E G F と組み合わせたP B S、スーテント、またはD 1断片を含有するマトリゲル溶液を、マウスの中に注入し、マトリゲルプラグの中への新たな血管浸潤について分析した。

【図10】図10は、A s p R S 断片D 1 のN末端領域がそのサイトカイン活性を担うことを示唆する実験の結果を示す図である。D 1 のN末端上の6 x h i s アフィニティータグの存在により、D 1 のC末端と比較して、断片のT N F - 分泌活性が低下する。

【図11】図11は、A s p R S 断片D 1 が、そのN末端に、哺乳類特異的32アミノ酸配列を含有することを示す図である。配列番号3は、ヒトA s p R S 32アミノ酸ペプチドであり、配列番号4は、ラットA s p R S 32アミノ酸ペプチドである。哺乳類A s p R S のN末端にのみ見つけられ、酵母A s p R S 中に見つけれない32アミノ酸ペプチドは、標準的なt R N A 合成酵素活性に不要であり、推定上のヘリックスを含有することが予測される (J a c o b o - M o l i n a およびY a n g (1989年); ならびにE s c a l a n t e およびY a n g , J B C (1992年) を参照されたい)。

【図12-1】図12は、ヒトA s p R S 断片D 1 の同定、進化、および結晶化を示す図である。図12Aは、R A W 264.7マウスマクロファージがS D S - P A G E 分析にかけられるステップを示し、タンパク質バンドを切り取り、L C M S / M S によって分析し、A s p R S のN末端断片は、D 1として同定された。図12Bは、A s p R S の追加のN末端が進化したドメインであることを示す。図12Cは、1.9Åの分解能まで解析した完全長二量体ヒトA s p R S の結晶構造を示す; N末端t R N A アンチコドン結合ドメイン、アミノアシル化ドメイン、およびD 1断片およびアミノアシル化ドメインをつなぐ30アミノ酸リンカーが示される。

【図12-2】図12は、ヒトA s p R S 断片D 1 の同定、進化、および結晶化を示す図

10

20

30

40

50

である。図 1 2 A は、RAW 2 6 4 . 7 マウスマクロファージが SDS - PAGE 分析にかけられるステップを示し、タンパク質バンドを切り取り、LC MS / MS によって分析し、AspRS の N 末端断片は、D 1 として同定された。図 1 2 B は、AspRS の追加の N 末端が進化したドメインであることを示す。図 1 2 C は、1 . 9 A の分解能まで解析した完全長二量体ヒト AspRS の結晶構造を示す；N 末端 tRNA アンチコドン結合ドメイン、アミノアシル化ドメイン、および D 1 断片およびアミノアシル化ドメインをつなぐ 3 0 アミノ酸リンカーが示される。

【図 1 3】図 1 3 は、D 1 が、インビボおよびインビトロにおいて炎症促進性および抗炎症性サイトカイン分泌を誘発することを示す図である。図 1 3 A は、1 0 m g / k g D 1 を静脈内に注射したマウスからのインビボにおける TNF - および IL - 1 0 の血清レベルを示す。マウスは、6 時間までに直ちに除去される、2 時間後の TNF - の増加を示し、一方、IL - 1 0 レベルは増加し続ける。図 1 3 B は、それぞれ、4 & 2 4 時間後の、PBMC からの、インビトロにおける TNF - & IL - 1 0 の放出を示す。細胞は、完全長 AspRS (2 5 0 n M) ではなく D 1 (2 5 0 n M) 処理で増加を示し、LPS (1 0 E U) も、強い TNF - 応答を示す。図 1 3 C におけるフローサイトメトリー分析は、初代単球の 8 3 % および全リンパ球集団の 1 4 % への D 1 結合を示す。初代リンパ球内では、D 1 は、CD 1 9 + B 細胞の 7 6 % に結合する。

【図 1 4 A】図 1 4 は、D 1 が、t o l l 様受容体 2 および 4 (TLR 2 および TLR 4) を介して NF - k B を活性化することを示す図である。図 1 4 A は、D 1 が、RAW 2 6 4 . 7 マウスマクロファージにおいて NF - k B を活性化することを示し、NF - B 誘発性分泌胚アルカリホスファターゼレポーター遺伝子をコードする RAW - B l u e 細胞は、AspRS による活性化の欠如と比較して、D 1 で、NF - B の用量依存的な活性化を示した。図 1 4 B において示されるように、D 1 (1 μ M) は、TLR 2 および TLR 4 を過剰発現する HEK 2 9 3 細胞の両方を活性化するのに対して、AspRS (1 μ M) は、活性を示さなかった；NF - B 誘発性レポーターと共に TLR 2 または TLR 4 を発現する、安定してトランスフェクトされた HEK 2 9 3 細胞は、D 1 が、NF - B 活性化を誘発することができることを実証した。図 1 4 C において、フローサイトメトリーは、D 1 が、TLR 2 または TLR 4 を過剰発現する HEK 細胞に結合するが、コントロール細胞に結合しないことを示す。

【図 1 4 B】図 1 4 は、D 1 が、t o l l 様受容体 2 および 4 (TLR 2 および TLR 4) を介して NF - k B を活性化することを示す図である。図 1 4 A は、D 1 が、RAW 2 6 4 . 7 マウスマクロファージにおいて NF - k B を活性化することを示し、NF - B 誘発性分泌胚アルカリホスファターゼレポーター遺伝子をコードする RAW - B l u e 細胞は、AspRS による活性化の欠如と比較して、D 1 で、NF - B の用量依存的な活性化を示した。図 1 4 B において示されるように、D 1 (1 μ M) は、TLR 2 および TLR 4 を過剰発現する HEK 2 9 3 細胞の両方を活性化するのに対して、AspRS (1 μ M) は、活性を示さなかった；NF - B 誘発性レポーターと共に TLR 2 または TLR 4 を発現する、安定してトランスフェクトされた HEK 2 9 3 細胞は、D 1 が、NF - B 活性化を誘発することができることを実証した。図 1 4 C において、フローサイトメトリーは、D 1 が、TLR 2 または TLR 4 を過剰発現する HEK 細胞に結合するが、コントロール細胞に結合しないことを示す。

【図 1 4 C】図 1 4 は、D 1 が、t o l l 様受容体 2 および 4 (TLR 2 および TLR 4) を介して NF - k B を活性化することを示す図である。図 1 4 A は、D 1 が、RAW 2 6 4 . 7 マウスマクロファージにおいて NF - k B を活性化することを示し、NF - B 誘発性分泌胚アルカリホスファターゼレポーター遺伝子をコードする RAW - B l u e 細胞は、AspRS による活性化の欠如と比較して、D 1 で、NF - B の用量依存的な活性化を示した。図 1 4 B において示されるように、D 1 (1 μ M) は、TLR 2 および TLR 4 を過剰発現する HEK 2 9 3 細胞の両方を活性化するのに対して、AspRS (1 μ M) は、活性を示さなかった；NF - B 誘発性レポーターと共に TLR 2 または TLR 4 を発現する、安定してトランスフェクトされた HEK 2 9 3 細胞は、D 1 が、NF -

10

20

30

40

50

B活性化を誘発することができることを実証した。図14Cにおいて、フローサイトメトリーは、D1が、TLR2またはTLR4を過剰発現するHEK細胞に結合するが、コントロール細胞に結合しないことを示す。

【図15-1】図15は、部分的にN末端両親媒性ヘリックスに関するD1活性の特徴づけを示す。図15Aにおけるヘリカルホイールは、ヒトAspRSのN末端を表し、両親媒性ヘリックスを示す。図15Bにおけるアライメント（上から下に配列番号6～23）は、N末端ヘリックスを考慮して設計された2つのD1突然変異体；負電荷残基を中和するための3アラニン（AAA）突然変異および酵母配列を示す部分的電荷逆転突然変異体（SKK）を示す。図15Cは、完全長AspRS（50nM）または22突然変異体（50nM）ではなく、D1（50nM）での、24処理後の、PBMCからのインビトロにおけるTNF- α & IL-10の放出における増加を示し、電荷突然変異体（AAAおよびSKK）も活性の減少を示す。図15Dは、どのようにD1が、マクロファージ細胞から放出され、TLR2およびTLR4の受容体を介して単球、T細胞、およびB細胞に結合して、TNF- α 放出の初期炎症促進性応答、その後続くIL-10放出の抗炎症性応答を誘発することができるのかを示す。

10

【図15-2】図15は、部分的にN末端両親媒性ヘリックスに関するD1活性の特徴づけを示す。図15Aにおけるヘリカルホイールは、ヒトAspRSのN末端を表し、両親媒性ヘリックスを示す。図15Bにおけるアライメント（上から下に配列番号6～23）は、N末端ヘリックスを考慮して設計された2つのD1突然変異体；負電荷残基を中和するための3アラニン（AAA）突然変異および酵母配列を示す部分的電荷逆転突然変異体（SKK）を示す。図15Cは、完全長AspRS（50nM）または22突然変異体（50nM）ではなく、D1（50nM）での、24処理後の、PBMCからのインビトロにおけるTNF- α & IL-10の放出における増加を示し、電荷突然変異体（AAAおよびSKK）も活性の減少を示す。図15Dは、どのようにD1が、マクロファージ細胞から放出され、TLR2およびTLR4の受容体を介して単球、T細胞、およびB細胞に結合して、TNF- α 放出の初期炎症促進性応答、その後続くIL-10放出の抗炎症性応答を誘発することができるのかを示す。

20

【図15-3】図15は、部分的にN末端両親媒性ヘリックスに関するD1活性の特徴づけを示す。図15Aにおけるヘリカルホイールは、ヒトAspRSのN末端を表し、両親媒性ヘリックスを示す。図15Bにおけるアライメント（上から下に配列番号6～23）は、N末端ヘリックスを考慮して設計された2つのD1突然変異体；負電荷残基を中和するための3アラニン（AAA）突然変異および酵母配列を示す部分的電荷逆転突然変異体（SKK）を示す。図15Cは、完全長AspRS（50nM）または22突然変異体（50nM）ではなく、D1（50nM）での、24処理後の、PBMCからのインビトロにおけるTNF- α & IL-10の放出における増加を示し、電荷突然変異体（AAAおよびSKK）も活性の減少を示す。図15Dは、どのようにD1が、マクロファージ細胞から放出され、TLR2およびTLR4の受容体を介して単球、T細胞、およびB細胞に結合して、TNF- α 放出の初期炎症促進性応答、その後続くIL-10放出の抗炎症性応答を誘発することができるのかを示す。

30

【図16】図16は、D1活性が内毒素混入によらないことを示す図である。図16Aにおいて、哺乳類発現D1が、末梢血単核細胞においてサイトカイン分泌を誘発する。D1は、HEK293細胞において通常の分泌配列と共に発現された。分泌されたD1を含有する条件培地は、収集し、濃縮し、PBMCと共にインキュベートした；D1含有培地は、偽トランスフェクト培地において観察されなかったTNF- α 放出を誘発した。図16Bにおいて示されるように、D1活性は、内毒素混入と無関係であり、D1サイトカイン放出は、内毒素の失活剤であるポリミキシンBの存在下において不変であったのに対して、リポ多糖（LPS）は完全に阻害された。図16Cは、プロテイナーゼKによるD1消化がPBMCサイトカイン刺激能力を消滅させることを示す。D1は、プロテイナーゼKを用いる一晩の処理によって完全に消化され、消化されたD1をPBMCに追加し、TNF- α 分泌をELISAによって測定した。

40

50

【発明を実施するための形態】

【0047】

本発明の実施には、それと反対に明確に示されない限り、多くが例示の目的で下記に記載される、分子生物学の通常の方法および当技術分野の技術の範囲内の組換えDNA技術を利用するであろう。そのような技術は、文献において十分に説明されている。例えば Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年); Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982年); DNA Cloning: A Practical Approach、第I&II巻(D. Glover編); Oligonucleotide Synthesis(N. Gait編、1984年); Nucleic Acid Hybridization(B. Hames & S. Higgins編、1985年); Transcription and Translation(B. Hames & S. Higgins編、1984年); Animal Cell Culture(R. Freshney編、1986年); A Practical Guide to Molecular Cloning(B. Perbal編、1984年)を参照されたい。

10

【0048】

本明細書において引用される刊行物、特許、および特許出願はすべて、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0049】

20

定義

その他に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、当業者らによって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものに類似し、または等価である任意の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料が記載される。本発明の目的のために、以下の用語が下記に定義される。

【0050】

本明細書および添付される請求項において使用されるように、単数形「1つの(a)」 「1つの(an)」、および「その(the)」は、内容が明白に規定しない限り、複数形の指示を含む。例として、「要素」は、1つの要素または1つを超える要素を意味する。

30

【0051】

「約」によって、参照の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して30、25、20、25、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%までも変動する数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。

【0052】

「アゴニスト」は、AspRSの非標準的な生物活性を強化または模倣する分子を指す。アゴニストは、AspRSもしくはその結合パートナーと直接相互作用することによってまたはAspRSが関与する生物学的経路の成分に作用することによってAspRSの活性を調整するタンパク質、核酸、炭水化物、小分子、または任意の他の化合物もしくは組成物を含んでいてもよい。部分的なおよび完全なアゴニストが含まれる。

40

【0053】

用語「アンタゴニスト」は、AspRSの非標準的な生物活性を阻害または減弱する分子を指す。アンタゴニストは、AspRSもしくはその結合パートナーと直接相互作用することによってまたはAspRSが関与する生物学的経路の成分に作用することによってAspRSまたはその結合パートナーの活性を調整する、抗体などのタンパク質、核酸、炭水化物、小分子、または任意の他の化合物もしくは組成物を含んでいてもよい。部分的なおよび完全なアンタゴニストが含まれる。

【0054】

50

「コード配列」によって、遺伝子のポリペプチド産物についての遺伝暗号に寄与する任意の核酸配列を意味する。対照的に、用語「非コード配列」は、遺伝子のポリペプチド産物についての遺伝暗号に寄与しない任意の核酸配列を指す。

【0055】

本明細書の全体にわたって、文脈がその他に定めない限り、単語「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、および「含む (comprising)」は、任意の他のステップまたは要素もしくはステップもしくは要素の群の排除ではなく、指定されるステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群の包含を暗示するように理解されるであろう。

【0056】

「からなる」によって、語句「からなる」に続くいかなるものも含み、それに限定されることを意味する。したがって、語句「からなる」は、列挙される要素が必要とされるまたは必須であり、他の要素が存在しなくてもよいことを示す。「から本質的に成る」によって、語句の後に列挙されるあらゆる要素を含み、列挙される要素についての開示において指定される活性または作用に干渉しないまたは寄与しない他の要素に限定されることを意味する。したがって、語句「から本質的に成る」は、列挙される要素が必要とされるまたは必須であるが、他の要素は、随意であり、列挙される要素の活性または作用に実質的に影響を与えるかどうかに依存して存在しても存在しなくてもよいことを示す。

【0057】

本明細書において使用されるように、用語「機能」および「機能的な」などは、生物学的な、酵素の、または治療上の機能を指す。

【0058】

「遺伝子」によって、染色体上の特定の遺伝子座を占め、転写および／もしくは翻訳調節配列ならびに／またはコード領域ならびに／または非翻訳配列（つまりイントロン、5' および 3' 非翻訳配列）からなる、遺伝の単位を意味する。

【0059】

「相同性」は、同一であるまたは保存的置換と見なされるアミノ酸の百分率数を指す。相同性は、参照によって本明細書において組み込まれる G A P などの配列比較プログラムを使用して決定されてもよい (Deveraux ら、1984 年、Nucleic Acids Research 12 巻、387 ~ 395 頁)。このように、本明細書に記載のものに類似し、またはそれと実質的に異なる長さの配列は、アライメントの中へのギャップの挿入によって比較することができ、そのようなギャップは、例えば、G A P によって使用される比較アルゴリズムによって決定される。

【0060】

用語「宿主細胞」は、本発明の任意の組換えベクター（複数可）または単離されたポリヌクレオチドのレシピエントとすることができるまたはレシピエントである個々の細胞または細胞培養物を含む。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含み、子孫は、自然の、偶発的な、または故意の突然変異および／または変化により、元々の親細胞と必ずしも、完全に同一でなくてもよい（形態または全 DNA 相補体 (complement) が）。宿主細胞は、本発明の組換えベクターまたはポリヌクレオチドを用いてインビボにおいてまたはインビトロにおいてトランスフェクトされたまたは感染させた細胞を含む。本発明の組換えベクターを含む宿主細胞は、組換え宿主細胞である。

【0061】

「単離された」によって、その天然の状態において通常それに付随する成分が実質的にまたは本質的にない材料を意味する。例えば、「単離されたポリヌクレオチド」は、本明細書において使用されるように、その天然に存在する状態においてその側面に位置する配列から精製されたポリヌクレオチド例えば、断片に通常近接する配列から取り出された DNA 断片を含む。その代わりに、「単離されたペプチド」または「単離されたポリペプチド」などは、本明細書において使用されるように、その自然の細胞環境からのおよび細胞の他の成分との関連からのペプチド分子またはポリペプチド分子のインビトロにおける単

10

20

30

40

50

離および/または精製を含む、つまり、それは、インビボにおける物質と有意に関連していない。

【0062】

本明細書において使用される用語「mRNA」または時に称される「mRNA転写物」は、プレmRNA転写物（複数可）、転写プロセッシング中間体、1つもしくは複数の遺伝子の翻訳および転写の準備ができている成熟mRNA（複数可）、またはmRNA転写物（複数可）に由来する核酸を含むが、これらに限定されない。転写プロセッシングは、スプライシング、エディティング、および分解を含んでもよい。本明細書において使用されるように、mRNA転写物に由来する核酸は、mRNA転写物またはそのサブ配列が最終的に鋳型としてその合成に役立つ核酸を指す。mRNAから逆転写されたcDNA、そのcDNAから転写されたRNA、cDNAから増幅されたDNA、増幅されたDNAから転写されたRNAなどはすべて、mRNA転写物に由来し、そのような由来産物の検出は、試料中の元々の転写物の存在および/または存在量を示す。したがって、mRNA由来の試料は、（1つまたは複数の）遺伝子のmRNA転写物、mRNAから逆転写されたcDNA、cDNAから転写されたcRNA、遺伝子から増幅されたDNA、増幅されたDNAから転写されたRNAなどを含むが、これらに限定されない。

10

【0063】

本明細書において使用される「非標準的な」活性は、一般に、アミノアシル化以外の、より具体的にはその関係のあるtRNA分子上へのその関係のあるアミノ酸の追加以外の、本発明のAspRSポリペプチドが有する活性を指す。非標準的な活性の非限定的な例は、RNA結合、アミノ酸結合、細胞増殖の調整、細胞移動の調整、細胞分化（例えば造血）の調整、アポトーシスまたは細胞死の他の形態の調整、細胞シグナル伝達の調整、血管新生の調整、細胞結合の調整、細胞の代謝の調整、サイトカイン産生または活性の調整、サイトカイン受容体活性の調整、炎症の調整などを含む。

20

【0064】

用語「調整する」は、典型的に、コントロールと比較して統計的に有意なまたは生理学的に有意な量で、「増加させる」または「刺激する」および「減少させる」または「低下させる」を含む。「増加した」または「増強した」量は、典型的に「統計的に有意な」量であり、組成物なし（作用物質もしくは化合物の非存在）またはコントロール組成物によってもたらされる量の1、1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍以上（例えば500、1000倍）（中間の1を超えるすべての整数および小数点、例えば1.5、1.6、1.7、1.8などを含む）の増加を含んでもよい。「減少した」または低下した量は、典型的に、「統計的に有意な」量であり、組成物なし（作用物質もしくは化合物の非存在）またはコントロール組成物によってもたらされる量の、中間の整数をすべて含む1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の減少を含んでもよい。「統計的に有意な」量の他の例は、本明細書に記載の。

30

【0065】

「から得られる」とは、例えばポリヌクレオチド抽出物またはポリペプチド抽出物などの試料が対象の特定の供給源から単離されているか、またはそれに由来することを意味する。例えば、抽出物は、被験体から直接単離される組織または生体液から得ることができる。「由来する」または「から得られる」は、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の供給源を指すこともできる。例えば、本発明のAspRS配列は、天然に存在するかまたは人工的に生成されるに関わらず、AspRSタンパク質分解断片もしくはAspRSスプライス変異体またはその部分の配列情報に「由来する」ものでもよく、したがって、その配列を含むものでも、それから本質的に成るものでも、それからなるものでもよい。

40

【0066】

50

本明細書において使用される「配列同一性」の記述または例えば、「50%同一の配列」を含むとは、比較のウィンドウに関してヌクレオチド毎にまたはアミノ酸毎に配列が同一である程度を指す。したがって、「配列同一性の百分率」は、比較のウィンドウに関して2つの最適にアライメントされた配列を比較し、同一の核酸塩基（例えばA、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（例えばAla、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、およびMet）が、両方の配列中に存在する位置の数を決定して、一致する位置の数を得、比較のウィンドウにおける位置の総数（つまりウィンドウサイズ）で一致する位置の数を割り、結果に100を掛けて、配列同一性の百分率を得ることによって計算されてもよい。

10

【0067】

本明細書において使用される「スプライスジャンクション」は、第1のエクソンの3'末端が第2のエクソンの5'末端と結合する、成熟mRNA転写物またはコードポリペプチド中の領域を含む。領域のサイズは、変動してもよく、1つのエクソンの3'末端が他のエクソンの5'末端と結合するまさにその残基の両側に2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100以上（中間の整数をすべて含む）のヌクレオチドまたはアミノ酸残基を含んでいてもよい。「エクソン」は、前駆体RNAの両方の部分（イントロン）がシススプライシングによって除去されたまたは2つ以上の前駆体RNA分子がトランススプライシングによってライゲーションされた後のRNA分子の成熟形態で示される核酸配列を指す。成熟RNA分子は、メッセンジャーRNAまたはrRNAもしくはtRNAなどの非コードRNAの機能的な形態とすることができる。文脈に依存して、エクソンは、DNAまたはそのRNA転写物中の配列を指すことができる。「イントロン」は、遺伝子内の非コード核酸領域を指し、これはタンパク質に翻訳されない。非コードイントロンセクションは、前駆体mRNA（プレmRNA）および他のいくつかのRNA（長い非コードRNAなど）に転写され、続いて、成熟RNAへのプロセッシングの間にスプライシングによって除去される。

20

【0068】

「スプライス変異体」は、RNA（一次遺伝子転写物またはプレmRNA）のエクソンが、RNAスプライシングの間に複数の方法で再結合されるプロセスを選択的スプライシングによって産生される成熟mRNAおよびそのコードタンパク質を指す。結果として生じる異なるmRNAは、異なるタンパク質アイソフォームに翻訳され、単一の遺伝子が複数のタンパク質をコードすることを可能にしてもよい。

30

【0069】

本明細書において使用される「被験体」は、本発明のAspRSポリヌクレオチドまたはポリペプチドを用いて治療または診断することができる症状を示すまたは症状を示す危険性のある任意の動物を含む。適した被験体（患者）は、実験動物（マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットなど）、家畜、および飼育慣らされた動物またはペット（ネコまたはイヌなど）を含む。非ヒト霊長類、好ましくはヒト患者が含まれる。

40

【0070】

本明細書において使用される「治療」または「治療する」は、本明細書に記載のように、AspRSポリヌクレオチドまたはポリペプチドの非標準的な活性によってもたらすことができる、疾患または状態の症状または病状に対する任意の望ましい効果を含み、治療されている疾患または状態の1つまたは複数の測定可能なマーカーにおける微小であれその変化または改善を含んでいてもよい。非AspRS療法に関する治療も含まれ、本明細書に記載のAspRS配列は、治療の臨床マーカーを提供する。「治療」または「治療する」は、疾患もしくは状態または関連する症状の完全な根絶または治癒を必ずしも示さない。この治療を受けている被験体は、それを必要とする任意の被験体である。臨床的改善の典型的なマーカーは、当業者らに明らかとなるであろう。

50

【 0 0 7 1 】

「ベクター」または「核酸構築物」によって、ポリヌクレオチド分子、好ましくは、例えば、ポリヌクレオチドを挿入またはクローニングすることができるプラスミド、バクテリオファージ、酵母、またはウイルスに由来するDNA分子を意味する。ベクターは、好ましくは、1つまたは複数の特有の制限部位を含有し、標的細胞もしくは組織またはその前駆細胞もしくは組織を含む、決定された宿主細胞において自律増殖が可能であるまたはクローニングされた配列が複製可能となるように決定された宿主のゲノムと統合可能である。したがって、ベクターは、自律的に複製するベクター、つまり、その複製が染色体の複製と無関係である、染色体外の要素として存在するベクター、例えば線状もしくは閉環状プラスミド、染色体外の要素、微小染色体、または人工染色体とすることができる。ベクターは、自己複製を確実にするための任意の手段を含有することができる。その代わりに、ベクターは、宿主細胞の中に導入された場合に、ゲノムの中に統合され、それが統合された染色体（複数可）と一緒に複製されるものとして行うことができる。

10

【 0 0 7 2 】

用語「野生型」および「天然に存在する」は、天然に存在する供給源から単離された場合に、その遺伝子または遺伝子産物の特徴を有する遺伝子または遺伝子産物を指すために区別なく使用される。野生型遺伝子または遺伝子産物（例えばポリペプチド）は、集団において最も頻繁に観察され、したがって、遺伝子の「正常」または「野生型」形態として便宜的に設計されるものである。

20

【 0 0 7 3 】

アスパルチル tRNA 合成酵素ポリペプチド

本発明は、一般に、単離された AspRS ポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのようなポリペプチドに結合する結合剤、そのようなポリペプチドの類似体、変異体、および断片などならびに先のもののいずれかを使用する組成物および方法に関する。そのため、本発明の一態様によれば、治療上関連性の非標準的な活性を有する AspRS ポリペプチドおよびそれを含む組成物が提供される。

【 0 0 7 4 】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーならびにその変異体および合成アナログを指すために本明細書において区別なく使用される。したがって、これらの用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の化学的アナログなどの、天然に存在しない合成のアミノ酸である、アミノ酸ポリマーおよび天然に存在するアミノ酸ポリマーに当てはまる。

30

【 0 0 7 5 】

ポリペプチドは、特定の長さには限定されないが、本発明との関連において、典型的に、完全長タンパク質の断片を示し、翻訳後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化など、および当技術分野において公知の、天然に存在するおよび天然に存在しない他の修飾を含んでもよい。本発明のポリペプチドおよびタンパク質は、様々な周知の組換えおよび/または合成技術のいずれかを使用して調製されていてもよく、これらの例示的な例は、下記にさらに議論される。

【 0 0 7 6 】

記述「ポリペプチド変異体」は、少なくとも1つのアミノ酸残基の追加、欠失、および/または置換によって、参照 AspRS ポリペプチドと区別され、本明細書に記載のように、典型的に少なくとも1つの非標準的な活性を保持するポリペプチドを指す（例えば配列番号1または配列番号1のアミノ酸残基1～154、1～171、1～174、1～177、1～31、399～425、413～476、もしくは397～425からなる断片を含むD1などのその断片のいずれか）。ある実施形態では、ポリペプチド変異体は、本明細書において記載され、当技術分野において公知のように、保存的または非保存的であってもよい、1つまたは複数の置換によって参照ポリペプチドと区別される。ある実施形態では、ポリペプチド変異体は、保存的置換を含み、この点で、いくつかのアミノ酸が、ポリペプチドの活性の性質を変化させることなく、大まかに類似する特性を有する他の

40

50

ものに変更されてもよいことが当技術分野において十分に理解されるであろう。

【0077】

本発明によって包含されるポリペプチド変異体は、典型的に、配列番号1または配列番号1のアミノ酸残基1~154、1~171、1~174、1~177、1~31、399~425、413~476、もしくは397~425からなる断片を含む、D1などのその断片のいずれかなどの、野生型哺乳類AspRSタンパク質の対応する領域に対して、それらの全長に沿って、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を示すであろう（下記に記載されるように決定される）。1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、または150以上のアミノ酸の追加、欠失、または置換によって参照AspRS配列と異なるが、非標準的な活性などの参照AspRSポリペプチドの特性を保持する配列も含まれる。ある実施形態では、アミノ酸の追加または欠失は、配列番号1または配列番号1のアミノ酸残基1~154、1~171、1~174、1~177、1~31、399~425、413~476、もしくは397~425からなるその断片のC末端および/またはN末端に存在する。ある実施形態では、アミノ酸の追加は、これらのAspRS断片のC末端および/またはN末端の近位にある1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、または50以上の野生型残基（つまり対応する完全長AARSポリペプチドに由来する）を含む。

10

20

【0078】

他の実施形態では、変異体ポリペプチドは、残基の少なくとも1%であるが、20%、15%、10%、または5%未満、対応するAspRS参照配列と異なる（この比較にアライメントを必要とする場合、配列は、類似度が最大となるようにアライメントされるべきである。欠失もしくは挿入またはミスマッチのゆえに「ループ」アウトした配列は、差異と考えられる）。差異は、適切には、非必須残基または保存的置換の差異または変化である。

【0079】

AspRS参照ポリペプチドの生物活性「断片」も含まれる。代表的な生物活性断片は、一般に、相互作用、例えば分子内または分子間相互作用に関与する。分子間相互作用は、特異的な結合相互作用または酵素の相互作用とすることができる。分子間相互作用は、AspRSポリペプチドおよびAspRSポリペプチドの非標準的な活性に関与する細胞受容体または他の宿主分子などの細胞性結合パートナーの間のものとしてすることができる。

30

【0080】

典型的に、生物活性断片は、AspRS参照ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含み、様々な活性ドメインの1つまたは複数（いくつかの場合ではすべて）を含んでいてもよく、非標準的な活性を有する断片を含む。いくつかの場合には、AspRSポリペプチドの生物活性断片は、完全長AspRSポリペプチドがその活性を有していなくてもよいような、特定の切断型断片に特有である生物活性を有する。ある場合には、生物活性は、他の完全長AspRSポリペプチド配列から生物活性AspRSポリペプチド断片を分離することによってまたは生物活性ドメインをアンマスクするように完全長AspRS野生型ポリペプチド配列のある種の残基を改変することによって示されてもよい。例えば、ある例示的な実施形態では、AspRSポリペプチドは、本明細書において示されるように、両親媒性ヘリックス（例えば配列番号3を参照されたい）および/または正電荷残基の領域（例えば配列番号5を参照されたい）のすべてまたは一部を含んでいてもよい。ある実施形態では、両親媒性ヘリックスは、本明細書に記載のように、22アミノ酸領域である。

40

【0081】

AspRS参照ポリペプチドの生物活性断片は、例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列の、中間の整数をすべて含む10、11、12、13、14、15、16、17、1

50

8、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、250、260、280、300以上の隣接または非隣接アミノ酸であるポリペプチド断片とすることができる。他の例示的な実施形態では、配列番号1のAspRS断片は、長さが、約20~30、20~40、20~50、20~60、20~70、20~80、20~90、20~100、20~125、20~150、または20~175アミノ酸のサイズの範囲にわたってもよい。他の実施形態では、断片は、長さが、約30~40、30~50、30~60、30~70、30~80、30~90、30~100、30~125、30~150、または30~175アミノ酸のサイズの範囲にわたるであろう。他の実施形態では、断片は、長さが、約40~50、40~60、40~70、40~80、40~90、40~100、40~125、40~150、または40~175アミノ酸のサイズの範囲にわたるであろう。さらに他の例示的な実施形態では、断片は、長さが、約50~60、50~70、50~80、50~90、50~100、50~125、50~150、または50~175アミノ酸のサイズの範囲にわたるであろう。

10

20

30

40

50

【0082】

ある実施形態では、AspRSポリペプチドは、切断型AspRSポリペプチドである。本明細書において使用される「切断型」AspRSは、例えば、そのNおよび/またはC末端からのアミノ酸の除去によりその対応する完全長AspRSタンパク質よりも短いアスパルチルトRNA合成酵素タンパク質を指す。切断の程度、すなわち、完全長のAspRSタンパク質から除去されたNおよび/またはC末端アミノ酸残基の数は、本明細書に記載のように、細胞、組織、または被験体に投与された場合に、所望の細胞の効果をなお提供しながら、相当に変動することができる。ある実施形態では、中間の長さをすべて含む、少なくとも約5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、350アミノ酸以上が、完全長哺乳類AspRSタンパク質のNおよび/またはC末端から切断される。中間の長さは、その間の整数をすべて含むように意図され、6、7、8など、51、52、53など、201、202、203などである。適切に、生物活性断片は、AspRS参照ポリペプチドの非標準的な生物活性の約1%、10%、25%、または50%以上を有する。

【0083】

様々な技術に従って特徴付け、同定し、または誘導することができる、AspRSポリペプチドのタンパク質分解断片も含まれる。例えば、タンパク質分解断片は、選択されたプロテアーゼと共に完全長もしくは他のAspRSポリペプチドをインキュベートすることなどによって、インビトロにおいて同定することができ、またはそれらは、内因的に（つまりインビボにおいて）同定することができる。ある実施形態では、内因性タンパク質分解断片などのタンパク質断片は、例えば、1つもしくは複数の選択されたプロテアーゼを含有するように修飾され、または選択されたAspRSポリペプチドに作用することができる、1つもしくは複数のプロテアーゼを天然に含有している選択された微生物または真核細胞において完全長または他のAspRSポリペプチドを組換え発現し、内因的に産生されたタンパク質断片をそれから単離し、特徴付けることによって生成または同定することができる。

【0084】

ある実施形態では、内因性（例えば天然に存在する）タンパク質分解断片などのタンパク質断片は、例えば、様々な細胞の画分（例えば細胞質ゾル、膜、核）ならびに/または例えば、RAWマクロファージ（例えばRAW 264.7マクロファージ）などのマクロファージ、初代T細胞およびJurkatなどのT細胞株を含むT細胞、ならびにとりわけナチュラルキラー（NK）細胞を含む様々な細胞型の成長培地から生成または同定することができる。ある実施形態では、内因性タンパク質分解断片などのタンパク質断片は、どのように生成されても、質量分析法などの技術または等価な技術によって同定するこ

とができる。一度、インビトロにおいてまたは内因的に同定されたタンパク質断片が生成されたまたは同定されたら、それは、マッピングし、または配列決定し、例えば、組換え産生用の発現ベクターの中にクローニングすることができるまたは合成して産生することができる。

【0085】

種々様々のプロテアーゼは、A s p R S タンパク質分解断片の配列を産生、同定、誘導し、または特徴付けるために使用することができる。一般に、プロテアーゼは、3つの主要な基準に従って普通分類される：(i)触媒される反応、(ii)触媒部位の化学的性質、および(iii)構造によって示される進化的関係。触媒のメカニズムによって分類されるプロテアーゼまたはプロテイナーゼの一般的な例は、アスパラギン酸プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、およびメタロプロテアーゼを含む。

10

【0086】

ほとんどのアスパラギン酸プロテアーゼは、ペプシンファミリーに属する。このファミリーは、ペプシンおよびキモシンならびにリソソームカテプシンDおよびレニンなどのプロセシング酵素、ならびにある種の真菌プロテアーゼ(例えばペニシロペプシン、リゾブスぺプシン、エンドチアペプシン)などの消化酵素を含む。アスパラギン酸プロテアーゼの第2のファミリーは、レトロペプシンとも呼ばれるAIDSウイルス(HIV)に由来するプロテアーゼなどのウイルスプロテイナーゼを含む。

【0087】

セリンプロテアーゼは、2つの異なるファミリーを含む。第1に、キモトリプシン、トリプシン、エラスターゼ、およびカリクレインなどの哺乳類酵素を含むキモトリプシンファミリーならびに第2に、サブチリシン(subtilisin)などの細菌酵素を含むサブチリシンファミリー。これらの2つのファミリーの間の一般的な3D構造は、異なるが、それらは、同じ活性部位の形状を有し、触媒は、同じメカニズムを介して進行する。セリンプロテアーゼは、異なる基質特異性、主として様々な酵素サブサイト(基質残基相互作用部位)中のアミノ酸置換に関する差異を示す。いくつかのセリンプロテアーゼは、基質との広範囲の相互作用部位を有するが、他のものは、P1基質残基に制限される特異性を有する。

20

【0088】

システインプロテアーゼファミリーは、パパイン、アクチニジン、およびプロメラインなどの植物プロテアーゼ、いくつかの哺乳類リソソームカテプシン、細胞質ゾルカルpain(カルシウム活性化)、ならびにいくつかの寄生虫プロテアーゼ(例えばTrypanosoma、Schistosoma)を含む。パパインは、原型であり、ファミリーのうちで最も研究されたメンバーである。インターロイキン1ベータ変換酵素のX線構造の最近の解明により、システインプロテイナーゼについての新しいタイプのフォールドが示された。

30

【0089】

メタロプロテアーゼは、細菌、菌類、および高等生物において見つめられた、より古いクラスのプロテアーゼのうちの1つである。それらは、配列およびその3D構造が広く異なるが、非常に大多数の酵素は、触媒として活性である亜鉛原子を含有する。いくつかの場合には、亜鉛は、タンパク質分解活性を失うことなく、コバルトまたはニッケルなどの他の金属と交換されてもよい。細菌サーモリシンは、十分に特徴付けられており、その結晶構造は、亜鉛に2つのヒスチジンおよび1つのグルタミン酸が結合していることを示す。多くのメタロプロテアーゼは、配列モチーフH E X X Hを含有し、これは、亜鉛に対して2つのヒスチジン配位子を提供する。第3の配位子は、グルタミン酸(サーモリシン、ネプリライシン、アラニルアミノペプチダーゼ)またはヒスチジン(アスタシン、セラリシン)である。

40

【0090】

ある例示的な実施形態では、切断型A s p R S ポリペプチドは、当技術分野において公知であり、入手可能である技術を使用して、様々なタンパク質分解酵素のいずれかを使用

50

して産生されてもよい。例示的なプロテアーゼは、例えばアクロモペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、アンクロッド、アンギオテンシン変換酵素、プロメライン、カルpain、カルpain I、カルpain II、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB、カルボキシペプチダーゼG、カルボキシペプチダーゼP、カルボキシペプチダーゼW、カルボキシペプチダーゼY、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンG、カテプシンH、カテプシンL、キモパイン、キマーゼ、キモトリプシン、クロストリパイン、コラゲナーゼ、補体C1r、補体C1s、補体因子D、補体因子I、ククミシン、ジペプチジルペプチダーゼIV、エラスターゼ（白血球）、エラスターゼ（膵臓）、エンドプロテイナーゼArg-C、エンドプロテイナーゼAsp-N、エンドプロテイナーゼGlu-C、エンドプロテイナーゼLys-C、エンテロキナーゼ、第Xa因子、フィシン、フューリン、グランザイムA、グランザイムB、HIVプロテアーゼ、Igase、カリクレイン組織、ロイシンアミノペプチダーゼ（全体的）、ロイシンアミノペプチダーゼ（細胞質ゾル）、ロイシンアミノペプチダーゼ（ミクロソーム）、マトリックスメタロプロテアーゼ、メチオニンアミノペプチダーゼ、ニュートラーゼ、パpain、ペプシン、プラスミン、プロリダーゼ、プロナーゼE、前立腺特異性抗原、Streptomyces griseusに由来する好アルカリ性プロテアーゼ、Aspergillusに由来するプロテアーゼ、Aspergillus saitoiに由来するプロテアーゼ、Aspergillus sojaeに由来するプロテアーゼ、プロテアーゼ（Bliecheniformis）（アルカリン（alkaline）またはアルカラゼ）、Bacillus polymyxaに由来するプロテアーゼ、Bacillus種に由来するプロテアーゼ、Rhizopus属種に由来するプロテアーゼ、プロテアーゼS、プロテアソーム、Aspergillus oryzaeに由来するプロテイナーゼ、プロテイナーゼ3、プロテイナーゼA、プロテイナーゼK、プロテインC、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ、レンニン、ストレプトキナーゼ、サブチリシン、サーモリシン、トロニン、組織プラスミノゲン活性化因子、トリプシン、トリプターゼ、およびウロキナーゼを含む。

【0091】

ある実施形態は、内因性で天然に存在するAspRSポリペプチド断片に由来するアミノ酸配列を含む、それから本質的に成る、またはそれからなる単離されたAspRSポリペプチドおよび前述の断片を含む医薬組成物ならびにその使用のための方法に関する。ある実施形態では、上記に述べられるように、内因性タンパク質分解断片などのAspRSタンパク質断片の配列は、例えば、様々な細胞の画分（細胞質ゾルで、例えば、膜、核）および/または初代細胞および細胞株を含む様々な細胞型に由来する条件培地から生成または同定することができる。そのような細胞型の例は、限定を伴うことなく、単球、樹状細胞、マクロファージ（例えばRAW264.7マクロファージ；実施例5を参照されたい）、好中球、好酸球、好塩基球、ならびに初代T細胞およびJurkat T細胞などのT細胞株を含む、B細胞およびT細胞（例えばCD4+ヘルパー細胞およびCD8+キラー細胞）ならびにナチュラルキラー（NK）細胞などのリンパ球などの免疫細胞を含む。

【0092】

ある実施形態では、AspRSタンパク質断片は、質量分析法などの技術または等価な技術によって同定することができる。限定ではなく単に例示として、ある実施形態において、様々な生理学的状態（例えば低酸素、食事、年齢、疾患）に由来する、様々な細胞型、組織、もしくは体液またはその画分に由来するプロテオームは、1D SDS-PAGEによって分離され、ゲルレーンは、一定の間隔で切り取られてバンドにされてもよく、この後に、バンドは、トリプシンなどの適切なプロテアーゼを用いて任意選択で消化され、ペプチドが放出されてもよく、これは、次いで、1D逆相LC-MS/MSによって分析されてもよい。結果として生じるプロテオミクスデータは、いわゆるペプトグラフ（p

e p t o g r a p h) に統合されてもよく、これは、左のパネルに、水平寸法 (N ~ C 末端、左 ~ 右) の所与のタンパク質についての配列適用範囲対垂直寸法 (高 ~ 低分子量、上 ~ 下) の S D S - P A G E 移動をプロットする。次いで、特異的なペプチド断片は、配列決定またはマッピングすることができる。ある実施形態では、A s p R S 参照断片は、例えば、対応する完全長 A s p R S の分子量と比較されるように、その特有の分子量によって特徴付けられてもよい。

【 0 0 9 3 】

上記のように、ポリペプチド変異体は、1つまたは複数の置換、欠失、追加、および/または挿入で本発明の A s p R S ポリペプチドと異なってもよい。そのような変異体は、天然に存在するものでもよく、または例えば、本発明の上記のポリペプチド配列の1つまたは複数を修飾し、当技術分野において周知の多くの技術のいずれかを使用して、本明細書に記載のそれらの生物活性を評価することによって、合成して生成されてもよい。

10

【 0 0 9 4 】

他の例示的な実施形態では、変異体は、天然に存在するかまたは天然に存在しないに関わらず、スプライス変異体であってもよくポリペプチドは、例えば本明細書に記載のように、少なくとも1つの非標準的な活性を有する。他の例示的な実施形態では、変異体は、天然に存在するまたは天然に存在しないに関わらず、野生型 A s p R S ポリペプチド配列に比べて1つまたは複数の点突然変異を含有し、ポリペプチドは、例えば本明細書に記載のように、少なくとも1つの非標準的な活性を有する。

【 0 0 9 5 】

20

ある実施形態では、変異体は、保存的置換を含有するであろう。「保存的置換」は、アミノ酸が、類似する特性を有する他のアミノ酸に置換されるものであり、ペプチド化学の技術分野における熟練者により、ポリペプチドの二次構造および疎水性親水性指標の性質が、実質的に不変であることが予想されるであろう。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造において修飾がなされてもよく、それにより、望ましい特徴を有する変異体または誘導体ポリペプチドをコードする機能分子がなお得られてもよい。本発明の A s p R S ポリペプチドの等価なまたはさらに改善された変異体を生成するために、ポリペプチドのアミノ酸配列を改変することが所望の場合、当業者は、例えば、表1に従って、コードDNA配列のコドンの1つまたは複数を変化させることができる。

【 0 0 9 6 】

30

例えば、ある種のアミノ酸は、例えば抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位などの構造との相互作用的結合能力を大きく失うことなく、タンパク質構造において他のアミノ酸に置換されてもよい。一般にそのタンパク質の生物学的な機能的な活性を決定するのは、タンパク質の相互作用的能力および性質であるので、ある種のアミノ酸配列置換は、タンパク質配列、もちろん、その基礎をなすDNAコード配列においてなすことができる。したがって、様々な変化は、それらの所望の有用性または活性を大きく失うことなく、開示される組成物のポリペプチド配列または前述のポリペプチドをコードする対応するDNA配列においてなされてもよいことが企図される。

【 0 0 9 7 】

40

【表 1】

表1

アミノ酸			コドン						
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
システイン	Cys	C	UGC	UGU					
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU					
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG					
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU					
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU					
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
リシン	Lys	K	AAA	AAG					
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
メチオニン	Met	M	AUG						
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU					
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG					
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
トリプトファン	Trp	W	UGG						
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU					

10

20

30

そのような変化を加える際に、アミノ酸の疎水性親水性指標インデックスも、考慮されてもよい。タンパク質に相互作用的生物学的機能を与える際の疎水性親水性指標アミノ酸インデックスの重要性は、当技術分野において一般に理解されている（参照によって本明細書において組み込まれる K y t e および D o o l i t t l e、1982年）。例えば、アミノ酸の相対的な疎水性親水性指標の特性は、合成タンパク質の二次構造に寄与し、これは、次に、他の分子、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとのタンパク質の相互作用を決定することが公知である。それぞれのアミノ酸に、疎水性および電荷特徴に基づいて疎水性親水性指標インデックスが割り当てられている（K y t e および D o o l i t t l e、1982年）。これらの値は、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（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；トレオニン（-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）；リシン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）である。

40

【0098】

ある種のアミノ酸は、類似する疎水性親水性指標インデックスまたはスコアを有する他

50

のアミノ酸と置換されてもよく、類似する生物活性を有するタンパク質をなおもたらしめてもよい、つまり、生物学的機能的等価タンパク質をなお得てもよいことが当技術分野において公知である。そのような変化を加える際に、疎水性親水性指標指数が ± 2 内にあるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 内のものが特に好ましく、 ± 0.5 内のものがさらに特に好ましい。

【0099】

親水性に基づいて類似のアミノ酸の置換を有効になすことができることも当技術分野において理解されている。米国特許第4,554,101号において詳述されるように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）；リシン（+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）；トレオニン（-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）；トリプトファン（-3.4）。アミノ酸は、類似する親水性値を有する他のものに置換し、生物学的等価タンパク質をなお得ることができることが理解される。そのような変化では、親水性値が ± 2 内にあるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 内のものが特に好ましく、 ± 0.5 内のものがさらに特に好ましい。

10

【0100】

上記に概説されるように、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖置換基の相対的な類似度、例えばそれらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づくものであってもよい。様々な先の特徴を考慮に入れる典型的な置換は、当業者らに周知であり、アルギニンおよびリシン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンを含む。

20

【0101】

さらに、任意のポリヌクレオチドは、インピボにおいて安定性を増加させるためにさらに修飾されてもよい。可能な修飾は、5'および/もしくは3'末端のフランキング配列の追加；バックボーンにおけるホスホジエステラーゼ連結以外のホスホロチオエートもしくは2'-O-メチルの使用；ならびに/またはイノシン、キューオシン、およびワイプトシンなどの通例とは異なる塩基ならびにアデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンのアセチル、メチル、チオ、および他の修飾形態の包含を含むが、これらに限定されない。

30

【0102】

アミノ酸置換は、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、および/または両親媒性の性質における類似度に基づいてさらになされてもよい。例えば、負荷電アミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含み、正荷電アミノ酸は、リシンおよびアルギニンを含み、類似する親水性値を有する無電荷極性頭部を有するアミノ酸は、ロイシン、イソロイシン、およびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンを含む。保存的な変化を示してもよいアミノ酸の他の群は、(1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr；(2) cys, ser, tyr, thr；(3) val, ile, leu, met, ala, phe；(4) lys, arg, his；および(5) phe, tyr, trp, hisを含む。変異体はまたまたはその代わりに、非保存的な変化を含有し得る。好ましい実施形態では、変異体ポリペプチドは、5アミノ酸以下の置換、欠失、または追加によって天然の配列と異なる。変異体はまた（またはその代わりに）、例えばポリペプチドの二次構造および疎水性親水性指標の性質に最小限の影響を有するアミノ酸の欠失または追加によって修飾されてもよい。

40

【0103】

ポリペプチドは、タンパク質のN末端にシグナル（またはリーダー）配列を含んでいてもよく、これは、翻訳と同時にまたは翻訳後にタンパク質の移行を指示する。ポリペプチ

50

ドはまた、ポリペプチドの合成、精製、もしくは同定を容易にするために（例えばポリHis）または固体支持体へのポリペプチドの結合を増強するためにリンカーまたは他の配列にコンジュゲートされてもよい。例えば、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域にコンジュゲートされてもよい。

【0104】

ポリペプチド配列を比較する場合、下記に記載されるように、一致が最大となるようにアライメントされた場合に2つの配列におけるアミノ酸の配列が同じである場合、2つの配列は、「同一である」と言える。2つの配列の間の比較は、配列類似度について局所的な領域を同定し、比較するために、比較ウィンドウに関して配列を比較することによって典型的に実行される。本明細書において使用される「比較ウィンドウ」は、2つの配列を最適にアライメントした後に配列が同数の隣接位置の参照配列と比較されてもよい、少なくとも約20、普通30～約75、40～約50の隣接位置のセグメントを指す。

10

【0105】

比較のための配列の最適なアライメントは、例えば、デフォルトパラメーターを使用して、バイオインフォマティクスソフトウェア（DNASTAR, Inc., Madison, WI）のLasergeneスーツにおけるMegalignプログラムを使用して行われてもよい。このプログラムは、以下の参考文献に記載の、いくつかのアライメント方式を包含する：Dayhoff, M.O. (1978年) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (編) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC第5巻、補足3、345～358頁；Hein J. (1990年) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis 626～645頁 Methods in Enzymology第183巻、Academic Press, Inc., San Diego, CA；Higgins, D.G.およびSharp, P.M. (1989年) CABIOS 5巻：151～153頁；Myers, E.W.およびMuller W. (1988年) CABIOS 4巻：11～17頁；Robinson, E.D. (1971年) Comb. Theor 11巻：105頁；Santou, N.Nes, M. (1987年) Mol. Biol. Evol. 4巻：406～425頁；Sneath, P.H.A.およびSokal, R.R. (1973年) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA；Wilbur, W.J.およびLipman, D.J. (1983年) Proc. Nat'l Acad., Sci. USA 80巻：726～730頁。

20

30

【0106】

その代わりに、比較のための配列の最適なアライメントは、SmithおよびWaterman (1981年) Add. Appl. Math 2巻：482頁の局所的同一性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch (1970年) J. Mol. Biol. 48巻：443頁の同一性アライメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman (1988年) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85巻：2444頁の類似度検索のための方法によって、これらのアルゴリズム（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG)、575 Science Dr., Madison、ウィスコンシン州におけるGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA）のコンピューター化された実行によって、または検証によって行われてもよい。

40

【0107】

50

配列同一性パーセントおよび配列類似度を決定するのに適したアルゴリズムの例は、B L A S TおよびB L A S T 2 . 0 アルゴリズムであり、これらは、それぞれA l t s c h u l ら (1 9 7 7 年) N u c l . A c i d s R e s . 2 5 巻 : 3 3 8 9 ~ 3 4 0 2 頁およびA l t s c h u l ら (1 9 9 0 年) J . M o l . B i o l . 2 1 5 巻 : 4 0 3 ~ 4 1 0 頁において記載されている。B L A S TおよびB L A S T 2 . 0 は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドについて配列同一性パーセントを決定するために、例えば本明細書に記載のパラメーターを用いて使用することができる。B L A S T分析を実行するためのソフトウェアは、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o nを通して公的に入手可能である。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスは、累積スコアを計算するために使用することができる。各方向におけるワードヒットの伸展は、累積アライメントスコアがその最大達成値から数量X分減少した場合；1つもしくは複数の負のスコアリング残基アライメントの累積により蓄積スコアが0以下になった場合；または一方の配列の末端に到達した場合、停止する。B L A S TアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、アライメントの感度および速度を決定する。

10

20

30

40

50

【0108】

例示的なアプローチでは、「配列同一性の百分率」は、少なくとも20の位置の比較のウィンドウに関して2つの最適にアライメントされた配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウにおけるポリペプチド配列の部分は、2つの配列の最適なアライメントについて参照配列（追加または欠失を含まない）と比較して、普通5～15パーセントまたは10～12パーセントの20パーセント以下の追加または欠失（つまりギャップ）を含んでいてもよい。百分率は、同一のアミノ酸残基が両方の配列中に存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を得、参照配列における位置の総数（つまりウィンドウサイズ）で一致する位置の数を割り、結果に100を掛けて、配列同一性の百分率を得ることによって計算される。

【0109】

本発明のある実施形態では、融合ポリペプチドおよび融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。融合ポリペプチドは、アミノ酸リンカーを介して1つまたは複数の異種ポリペプチド配列（融合パートナー）に直接または間接的に共有結合された本発明のA s p R S ポリペプチドを指す。融合タンパク質を形成するポリペプチドは、典型的に、C末端がN末端に連結されるが、それらは、C末端がC末端に、N末端がN末端に、またはN末端がC末端に連結され得る。融合タンパク質のポリペプチドは、任意の順とすることができる。

【0110】

融合パートナーは、本質的に任意の所望の目的のために設計され、含まれていてもよい、ただし、それらが、ポリペプチドの所望の活性に悪影響を及ぼさないことを条件とする。例えば、一実施形態では、融合パートナーは、天然の組換えタンパク質よりも高い収量でタンパク質を発現するのを支援する配列（発現エンハンサー）を含む。他の融合パートナーは、タンパク質の可溶性を増加させるためにまたはタンパク質が所望の細胞内コンパートメントを標的とすることを可能にするように選択されてもよい。さらなる融合パートナーは、タンパク質の精製を促進するアフィニティータグを含む。

【0111】

より一般には、Fc断片などの異種の配列への融合は、A s p R S ポリペプチドの不要な特徴を除去し、または所望の特徴（例えば薬物動態学的特性）を改善するために利用されてもよい。例えば、異種の配列への融合は、A s p R S ポリペプチドの化学的安定性を増加させてもよい、免疫原性を減少させてもよい、インビボにおけるターゲティングを改善してもよい、および/または循環における半減期を増加してもよい。

【0112】

異種の配列への融合はまた、A s p R S ポリペプチドを通して、選択された非標準的な活性を有するだけでなく、異種ポリペプチドを通して他の経路を修飾する（つまり刺激ま

たは阻害する)ことができる二機能性タンパク質などの二機能性融合タンパク質を生成するために使用されてもよい。そのような経路の例は、自然もしくは適応免疫活性化経路などの様々な免疫系関連性の経路または血管新生などの細胞増殖調節性の経路を含むが、これらに限定されない。ある態様では、異種ポリペプチドは、被験体における細胞の経路を調整するために、A s p R S ポリペプチドと相乗的に作用してもよい。二機能性融合タンパク質を生成するために利用されてもよい異種ポリペプチドの例は、その生物活性断片および/または変異体に加えて、トロンボポイエチン、サイトカイン(例えばIL-11)、ケモカイン、および様々な造血成長因子を含むが、これらに限定されない。

【0113】

融合タンパク質は、一般に、標準的な技術を使用して調製されていてもよい。例えば、所望の融合物のポリペプチド成分をコードするDNA配列は、別々に構築され、適切な発現ベクターの中にライゲーションされてもよい。一方のポリペプチド成分をコードするDNA配列の3'末端は、配列のリーディングフレームが一致するように、第2のポリペプチド成分をコードするDNA配列の5'末端にペプチドリinkerありまたはなしでライゲーションされる。これは、両方の成分ポリペプチドの生物活性を保持する単一融合タンパク質への翻訳を可能にする。

【0114】

ペプチドリinker配列は、所望の場合に、それぞれのポリペプチドがその二次および三次構造にフォールドすることを確実にするのに十分な距離によって、第1および第2のポリペプチド成分を隔てるために利用されてもよい。そのようなペプチドリinker配列は、当技術分野において周知の標準的な技術を使用して、融合タンパク質の中に組み込まれる。あるペプチドリinker配列は、下記因子に基づいて選ばれてもよい:(1)それらが、柔軟な広範囲のコンホメーションを取ることができること;(2)それらが、第1および第2のポリペプチド上の機能的なエピトープと相互作用し得る二次構造を取ることができないこと;ならびに(3)ポリペプチド機能的エピトープと反応し得る疎水性残基または電荷残基の欠如。好ましいペプチドリinker配列は、グリシン、アスパラギン、およびセリン残基を含有する。ThrおよびAlaなどの他の中性に近いアミノ酸も、リンカー配列において使用されてもよい。リンカーとして有用に利用されてもよいアミノ酸配列は、Marateaら、Gene 40巻:39-46頁(1985年);Murphyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83巻:8258-8262頁(1986年);米国特許第4,935,233号および米国特許第4,751,180号において開示されるものを含む。リンカー配列は、一般に、長さが1~約50アミノ酸であってもよい。リンカー配列は、第1および第2のポリペプチドが、機能的なドメインを隔て、かつ立体障害を予防するために使用することができる非必須N末端アミノ酸領域を有する場合、必要とされない。

【0115】

ライゲーションされたDNA配列は、適した転写または翻訳調節エレメントに作動可能に連結される。DNAの発現を担う調節エレメントは、第1のポリペプチドをコードするDNA配列に対して5'にのみ配置される。同様に、翻訳を終えるために必要とされる終止コドンおよび転写終結シグナルは、第2のポリペプチドをコードするDNA配列に対して3'にのみ存在する。

【0116】

一般に、ポリペプチドおよび融合ポリペプチド(ならびにそれらのコードポリヌクレオチド)は、単離される。「単離された」ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、その元々の環境から取り出されるものである。例えば、それが天然の系において共存する物質のいくつかまたはすべてから分離されている場合、天然に存在するタンパク質は単離されている。好ましくは、そのようなポリペプチドは、少なくとも約90%純粋、より好ましくは少なくとも約95%純粋、最も好ましくは少なくとも約99%純粋である。ポリヌクレオチドは、例えば、それが、自然環境の一部ではないベクターの中にクローニングされる場合、単離されていると考えられる。

10

20

30

40

50

【0117】

さらに他の実施形態では、本発明のA s p R Sポリペプチドは、二量体の一部であってもよい。二量体は、例えば、2つの同一のA s p R Sポリペプチドの間のホモ二量体、2つの異なるA s p R Sポリペプチドの間のヘテロ二量体（例えば完全長A s p R Sポリペプチドおよび切断型A s p R Sポリペプチドもしくは2つの異なる切断型A s p R Sポリペプチド）、ならびに/またはA s p R Sポリペプチドおよび異種ポリペプチドの間のヘテロ二量体を含んでいてもよい。単量体および/または二量体は、可溶性であってもよく、単離され、精製されて、均一性にされてもよい。A s p R Sポリペプチドおよび異種ポリペプチドの間のものであるヘテロ二量体は、二機能性であってもよい。

【0118】

1つまたは複数の置換、切断、欠失、追加、化学的修飾、またはこれらの改変の組合せに関わらず、それら自体（ホモ二量体化）とまたは第2のA s p R Sポリペプチド（ヘテロ二量体化）と実質的に二量体化しない単離されたA s p R S単量体を含むA s p R Sポリペプチドの単量体も含まれる。ある実施形態では、単量体A s p R Sポリペプチドは、非標準的な活性を含む生物活性を有し、これは、二量体または多量体A s p R Sポリペプチド複合体は有していない。

【0119】

他の実施形態では、本発明のA s p R Sポリペプチドは、多ユニット複合体の一部であってもよい。本発明の多ユニット複合体は、例えば、少なくとも2、3、4、または5以上の単量体を含むことができる。本発明の単量体および/または多ユニット複合体は、可溶性であってもよく、単離され、精製されて、均一性にされてもよい。多ユニット複合体の単量体ユニットは、異なっても、相同性であっても、実質的に相同性であっても、または互いに同一であってもよい。しかしながら、本発明の多ユニット複合体は、本明細書に記載のA s p R Sポリペプチドを含む少なくとも1つの単量体または他の実施形態では本明細書に記載の少なくとも2以上のA s p R Sポリペプチドを含む。

【0120】

共有結合された単量体は、直接（結合によって）または間接的に（例えばリンカーを介して）連結することができる。本明細書におけるポリペプチド単量体を直接連結するために、二量体化を増強するために本明細書におけるポリペプチドを修飾することは有益であってもよい。例えば、A s p R Sポリペプチドの1つまたは複数のアミノ酸残基は、1つまたは複数のシステインによる追加または置換によって修飾されてもよい。連結を促進するためのシステイン置換などのアミノ酸置換または他の修飾を生成するための方法は、当業者らに周知である。

【0121】

本発明のある実施形態はまた、本明細書に記載のように、A s p R Sポリペプチドの所望の特徴を改善する修飾を含む、修飾されたA s p R Sポリペプチドの使用を企図する。本発明のA s p R Sポリペプチドの例示的な修飾は、1つまたは複数の構成アミノ酸の化学的なおよび/または酵素による誘導体化、アセチル化、ヒドロキシル化、メチル化、アミド化、ならびに炭水化物または脂質成分、補因子などの付加を含む側鎖修飾、バックボーン修飾、ならびにNおよびC末端修飾を含むが、これらに限定されない。典型的な修飾はまた、A s p R Sポリペプチドのペグ化をも含む（例えば、本明細書において参照によって組み込まれるVeroneseおよびHarris、Advanced Drug Delivery Reviews 54巻：453～456頁、2002年を参照されたい）。

【0122】

ある態様では、化学選択的ライゲーション技術は、部位特異的にかつ制御下でポリマーを付加することによってなどのように、本発明の切断型A s p R Sポリペプチドを修飾するために利用されてもよい。そのような技術は、化学的または組換え手段によるタンパク質バックボーンの中への化学選択的アンカーの組込みおよび補完的なリンカーを運ぶポリマーを用いる続く修飾に典型的に依存する。その結果として、構築プロセスおよび結果と

10

20

30

40

50

して生じるタンパク質 - ポリマーコンジュゲートの共有結合構造は、制御され、効能および薬物動態学的特性などの薬物特性の合理的な最適化を可能にしてもよい（例えば K o c h e n d o e r f e r、C u r r e n t O p i n i o n i n C h e m i c a l B i o l o g y 9 巻：555～560頁、2005年を参照されたい）。

【0123】

本明細書に記載の A s p R S ポリペプチドは、組換え技術によってなどのように、当業者らに公知の任意の適した手段によって調製されていてもよい。例えば、A s p R S ポリペプチドは、(a) 調節エレメントに作動可能に連結される、A s p R S ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む構築物を調製するステップ；(b) 構築物を宿主細胞の中に導入するステップ；(c) A s p R S ポリペプチドを発現するために宿主細胞を培養するステップ；および(d) 宿主細胞から A s p R S ポリペプチドを単離するステップを含む手段によって調製されていてもよい。組換え A s p R S ポリペプチドは、例えば S a m b r o o k ら、(1989年、前掲)、特に第16および17セクション；A u s u b e l ら、(1994年、前掲)、特に第10および16章；ならびに C o l i g a n ら、C u r r e n t P r o t o c o l s i n P r o t e i n S c i e n c e (J o h n W i l e y & S o n s , I n c . 1995～1997年)、特に1、5、および6章に記載のように標準的なプロトコールを使用して好都合に調製することができる。

10

【0124】

組換え産生方法に加えて、本発明のポリペプチドおよびその断片は、固相技術を使用して、直接的なペプチド合成によって産生されてもよい（M e r r i f i e l d、J . A m . C h e m . S o c . 85巻：2149～2154頁（1963年））。タンパク質合成は、手動の技術を使用してまたは自動化によって実行されてもよい。自動合成は、例えば A p p l i e d B i o s y s t e m s 431A P e p t i d e S y n t h e s i z e r (P e r k i n E l m e r) を使用して達成されてもよい。その代わりに、様々な断片は、化学的に別々に合成され、所望の分子を産生するための化学的な方法を使用して組み合わせられてもよい。

20

【0125】

ポリヌクレオチド組成物

本発明はまた、本発明の A s p R S ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドおよびそのようなポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。本明細書に記載のように、これらの参照ポリヌクレオチドのすべてもしくは一部に相補的であるまたはこれらの参照ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする、A s p R S 参照ポリヌクレオチドのすべてまたは一部を含むプライマー、プローブ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびRNA干渉剤も、本発明の A s p R S ポリヌクレオチドの範囲内に含まれる。

30

【0126】

本明細書において使用されるように、用語「DNA」、「ポリヌクレオチド」、および「核酸」は、単離されて、特定の種の全ゲノムDNAから独立しているDNA分子を指す。そのため、ポリペプチドをコードするDNAセグメントは、なお、DNAセグメントが得られる種の全ゲノムDNAから実質的に単離され、精製され、全ゲノムDNAから独立している1つまたは複数のコード配列を含有するDNAセグメントを指す。DNAセグメントおよびそのようなセグメントのより小さな断片ならびにまた、例えばプラスミド、コスミド、ファージミド、ファージ、ウイルスなどを含む組換えベクターが、用語「DNAセグメント」および「ポリヌクレオチド」の範囲内に含まれる。

40

【0127】

当業者らによって理解されるように、本発明のポリヌクレオチド配列は、ゲノム配列、ゲノム外配列、およびプラスミドコード配列、ならびにタンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどを発現し、または発現するのに適している可能性があるより小さな遺伝子操作された遺伝子セグメントを含むことができる。そのようなセグメントは、天然に単離されるまたは人の手によって合成して修飾されてもよい。

50

【0128】

当業者によって認識されるように、ポリヌクレオチドは、一本鎖（コードもしくはアンチセンス）または二本鎖であってもよく、DNA（ゲノム、cDNA、もしくは合成）またはRNA分子であってもよい。さらなるコードまたは非コード配列は、本発明のポリヌクレオチド内に存在してもよいが、存在する必要はなく、ポリヌクレオチドは、他の分子および／または指示物質に連結されてもよいが、連結される必要はない。

【0129】

ポリヌクレオチドは、天然の配列（つまりA s p R Sもしくはその部分をコードする内因性配列）を含んでいてもよく、またはそのような配列の変異体もしくは生物学的機能的等価物を含んでいてもよい。ポリヌクレオチド変異体は、好ましくは、コードされたポリペプチドの所望の活性が無修飾ポリペプチドに比べて実質的に減少しないように、下記にさらに記載されるように、1つまたは複数の置換、追加、欠失、および／または挿入を含有してもよい。本明細書に記載のように、コードされたポリペプチドの活性に対する効果は、一般に、評価することができる。

10

【0130】

さらなる実施形態では、本発明は、アスパルチル tRNA 合成酵素と同一であるまたはそれに相補的である配列の様々な長さの隣接ストレッチを含む単離されたポリヌクレオチドであって、本明細書に記載のA s p R Sをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。例えば、本発明のA s p R Sポリペプチドの少なくとも約100、150、200、250、300、350、400、450、または500以上およびすべての中間の長さの隣接アミノ酸残基をコードするポリヌクレオチドが、本発明によって提供される。「中間の長さ」は、この文脈において、101、102、103など；151、152、153など；201、202、203など、などの、示される値の間の任意の長さを意味することが容易に理解されるであろう。

20

【0131】

本発明のポリヌクレオチドは、コード配列それ自体の長さには関係なく、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、マルチクローニングサイト、他のコードセグメントなどの他のDNA配列と組み合わせられてもよく、それらの全長は、相当に変動してもよい。そのため、ほぼ任意の長さのポリヌクレオチド断片が利用されてもよいことが企図され、全長は、好ましくは、意図される組換えDNAプロトコールにおける調製および使用の容易さによって制限される。

30

【0132】

さらに、遺伝コードの縮重の結果として、本明細書に記載のポリペプチドをコードする多くのヌクレオチド配列があることが当業者らによって十分に理解されるであろう。これらのポリヌクレオチドのいくつかは、任意の天然の遺伝子のヌクレオチド配列に対する最小限の相同性を有する。それにも関わらず、コドン使用頻度における差異により変動するポリヌクレオチド、例えば、ヒトおよび／または霊長類のコドン選択のために最適化されるポリヌクレオチドが、本発明によって特に企図される。さらに、本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内にある。対立遺伝子は、ヌクレオチドの欠失、追加、および／または置換などの1つまたは複数の突然変異の結果として改変される内因性遺伝子である。結果として生じるmRNAおよびタンパク質は、改変された構造または機能を有していてもよいが、有する必要はない。対立遺伝子は、標準的な技術（ハイブリダイゼーション、増幅、および／またはデータベース配列比較など）を使用して同定されてもよい。

40

【0133】

ポリヌクレオチドおよびその融合物は、当技術分野において公知で入手可能である様々な十分に確立された技術のいずれかを使用して、調製、操作、および／または発現されてもよい。例えば、本発明のポリペプチドまたはその融合タンパク質もしくは機能的等価物をコードするポリヌクレオチド配列は、適切な宿主細胞においてA s p R Sポリペプチドの発現を指示するために組換えDNA分子中に使用されてもよい。遺伝コードの固有の縮

50

重により、同じまたは機能的に等価なアミノ酸配列を実質的にコードする他のDNA配列が、產生されてもよく、これらの配列は、所与のポリペプチドをクローニングし発現するために使用されてもよい。

【0134】

当業者らによって理解されるように、天然に存在しないコドンを含む、ポリペプチドコードヌクレオチド配列を產生することはいくつかの実例において有利であってもよい。例えば、特定の原核生物または真核生物宿主に好ましいコドンは、タンパク質発現の速度を増加させるまたは天然に存在する配列から生成された転写物よりも長い半減期などの望ましい特性を有する組換えRNA転写物を產生するために選択することができる。

【0135】

さらに、本発明のポリヌクレオチド配列は、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、発現、および/または活性を修飾する改変を含むが、これに限定されない、様々な理由で、配列をコードするポリペプチドを改変するために、当技術分野において一般に公知の方法を使用して遺伝子操作することができる。

【0136】

所望のポリペプチドを発現するために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列または機能的等価物は、適切な発現ベクター、つまり挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含有するベクターの中に挿入されてもよい。当業者らに周知の方法は、対象のポリペプチドをコードする配列ならびに適切な転写および翻訳コントロールエレメントを含有する発現ベクターを構築するために使用されてもよい。これらの方法は、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えを含む。そのような技術は、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989年)およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology (1989年)において記載されている。

【0137】

様々な発現ベクター/宿主系は、公知であり、ポリヌクレオチド配列を含有し、発現するために利用されてもよい。これらは、組換えバクテリオファージ、プラスミド、もしくはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌などの微生物；酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）を用いて感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）を用いてまたは細菌発現ベクター（例えばTiもしくはpBR322プラスミド）を用いて形質転換された植物細胞系；またはウイルスベクターの発現系などの動物細胞系を含むが、これらに限定されない。

【0138】

発現ベクターの中に存在する「コントロールエレメント」または「調節配列」は、転写および翻訳を実行するために宿主細胞タンパク質と相互作用する、ベクターのそれらの非翻訳領域 - エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域 - である。そのようなエレメントは、それらの強度および特異性が変動してもよい。利用されるベクター系および宿主に依存して、恒常的および誘発性プロモーターを含む、任意の数の適した転写および翻訳エレメントが、使用されてもよい。例えば、細菌系においてクローニングする場合、PBLUESCRIPTファージミド (Stratagene, La Jolla, Calif.) またはPSPORT1プラスミド (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) のハイブリッドlacZプロモーターなどの誘発性プロモーターが使用されてもよい。哺乳類細胞系では、哺乳類遺伝子に由来する、または哺乳類ウイルスに由来するプロモーターが一般に好ましい。ポリペプチドをコードする配列の複数のコピーを含有する細胞系を生成することが必要である場合、SV40またはEBVをベースとするベクターは、適切な選択マーカーと共に有利に使用されてもよい。

【0139】

特異的な開始シグナルも、対象のポリペプチドをコードする配列の、より効率的な翻訳

10

20

30

40

50

を達成するために使用されてもよい。そのようなシグナルは、A T G 開始コドンおよび近接する配列を含む。ポリペプチド、その開始コドン、および上流の配列をコードする配列が、適切な発現ベクターの中に挿入される場合、さらなる転写または翻訳コントロールシグナルは必要ではなくてもよい。しかしながら、コード配列またはその部分のみが挿入される場合、A T G 開始コドンを含む外因性翻訳コントロールシグナルが提供されるべきである。さらに、開始コドンは、全挿入物の翻訳を確実にするために、正確なリーディングフレーム中になければならない。外因性翻訳エレメントおよび開始コドンは、自然および合成の両方の種々の起源のものであってもよい。発現の効率は、文献に記載のものなどのように、使用される特定の細胞系に適切であるエンハンサーの包含によって増強されてもよい (Scharf ら、Results Probl. Cell Differ. 20 巻: 125 ~ 162 頁 (1994 年))。

10

【0140】

さらに、宿主細胞株は、挿入された配列の発現を調整するか、または所望の方法において発現されたタンパク質を処理するその能力について選ばれてもよい。ポリペプチドのそのような修飾は、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化を含むが、これらに限定されない。タンパク質の「プレプロ」形態を切断する翻訳後プロセッシングも、正確な挿入、フォールディング、および/または機能を促進するために使用されてもよい。そのような翻訳後の活性に特異的な細胞の機構および特徴的なメカニズムを有する、CHO、HeLa、MDCK、HEK293、およびW138などの異なる宿主細胞は、外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確実にするために選ばれてもよい。

20

【0141】

組換えタンパク質の長期の高収量産生のために、安定性の発現が一般に好ましい。例えば対象のポリヌクレオチドを安定して発現する細胞株は、同じまたは別々のベクター上にウイルスの複製開始点および/または内因性発現エレメントおよび選択マーカー遺伝子を含含有していてもよい発現ベクターを使用して形質転換されてもよい。ベクターの導入後に、それらが選択培地に切り替えられる前に、濃縮培地中で1~2日間、細胞を成長させてもよい。選択マーカーの目的は、選択に対する抵抗性を与えることであり、その存在は、導入された配列の発現に成功する細胞の成長および回収を可能にする。安定して形質転換された細胞の抵抗性クローンは、細胞型に適切な組織培養技術を使用して増殖されてもよい。

30

【0142】

任意の数の選択系が、形質転換細胞株を回収するために使用されてもよい。これらは、それぞれ tk 細胞または aprt 細胞において利用することができる単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ (Wigler ら、Cell 11 巻: 223 ~ 232 頁 (1977 年)) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy ら、Cell 12 巻: 817 ~ 823 頁 (1990 年)) 遺伝子を含むが、これらに限定されない。代謝拮抗剤、抗生物質、または除草剤抵抗性も、選択のための基礎として使用することができる; 例えば、それぞれ、メトトレキサートに対する抵抗性を与える dhfr (Wigler ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 巻: 3567 ~ 70 頁 (1980 年)); アミノグリコシド、ネオマイシン、および G-418 に対する抵抗性を与える npt (Colbere-Garapin ら、J. Mol. Biol. 150 巻: 1 ~ 14 頁 (1981 年)); ならびにクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する抵抗性を与える als または pat (Murry、前掲)。

40

【0143】

産物に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して、ポリヌクレオチドコード産物の発現を検出し、測定するための様々なプロトコールは、当技術分野において公知である。例として、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、および蛍光活性化細胞分類 (FACS) を含む。これらおよび他の

50

アッセイは、Hamptonら、Serological Methods, a Laboratory Manual (1990年)およびMaddoxら、J. Exp. Med. 158巻: 1211~1216頁(1983年)において他の所に記載されている。

【0144】

種々様々な標識およびコンジュゲーション技術は、当業者らによって公知であり、様々な核酸およびアミノ酸アッセイにおいて使用されてもよい。ポリヌクレオチドに係る配列を検出するために標識ハイブリダイゼーションまたはPCRプローブを産生するための手段は、標識ヌクレオチドを使用するオリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識、またはPCR増幅を含む。その代わりに、配列またはその任意の部分は、mRNAプローブの産生のためにベクターの中にクローニングされてもよい。そのようなベクターは、当技術分野において公知であり、市販で入手可能であり、T7、T3、またはSP6などの適切なRNAポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドの追加によってインビトロにおいてRNAプローブを合成するために使用されてもよい。これらの手段は、様々な市販のキットを使用して行われてもよい。使用されてもよい、適したレポーター分子または標識は、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、または発色剤ならびに基質、補因子、阻害剤、磁気微粒子などを含む。

10

【0145】

対象のポリヌクレオチド配列を用いて形質転換された宿主細胞は、タンパク質の発現および細胞培養物からの回収に適した条件下で培養されてもよい。組換え細胞によって産生されるタンパク質は、使用される配列および/またはベクターに依存して、細胞内に分泌されてもまたは含有されてもよい。当業者らによって理解されるように、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターは、原核または真核細胞膜を通る、コードされたポリペプチドの分泌を指示するシグナル配列を含有するように設計されてもよい。他の組換え構築物は、可溶性タンパク質の精製を促進するであろう、ポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に対象のポリペプチドをコードする配列を結びつけるために使用されてもよい。

20

【0146】

本発明の他の態様によれば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば、遺伝子療法技術を使用してインビボにおいて被験体に送達されてもよい。遺伝子療法は、そのような療法が求められる障害または状態を有する哺乳類、特にヒトのある種の細胞および標的細胞への異種核酸の移行を一般に指す。核酸は、異種DNAが発現され、それによってコードされる治療用産物が産生される方法において、選択される標的細胞の中に導入される。

30

【0147】

本明細書において教示される遺伝子療法に利用することができる様々なウイルスベクターは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、または好ましくは、レトロウイルスなどのRNAウイルスを含む。好ましくは、レトロウイルスベクターは、マウスもしくはトリレトロウイルスの誘導體またはレンチウイルスベクターである。好ましいレトロウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。単一の外来遺伝子を挿入することができるレトロウイルスベクターの例は、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMuLV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス(HaMuSV)、Maus 乳癌ウイルス(MuMTV)、SIV、BIV、HIV、およびニワトリ肉腫ウイルス(RSV)を含むが、これらに限定されない。多くのさらなるレトロウイルスベクターは、複数の遺伝子を組み込むことができる。これらのベクターはすべて、形質導入された細胞を同定し、生成することができるように、選択マーカーのための遺伝子を移入し、または組み込むことができる。例えば、特異的な標的細胞上の受容体に対するリガンドをコードする他の遺伝子と共に、ウイルスベクターの中に対象の垂鉛フィンガー由来DNA結合ポリペプチド配列を挿入することによって、ベクターは、標的的特異的となってもよい。レトロウイルスベクターは、例えば、タンパク質(二量体)をコードするポリヌ

40

50

クレオチドを挿入することによって、標的特異的にすることができる。レトロウイルスベクターを標的に向けるための抗体を使用することによって例示的なターゲティングが達成されてもよい。当業者らは、亜鉛フィンガー - ヌクレオチド結合タンパク質ポリヌクレオチドを含有するレトロウイルスベクターの標的特異的な送達を可能にするためにレトロウイルスゲノムの中に挿入することができる特異的なポリヌクレオチド配列を知っているであろう、または不必要な実験作業を伴わないで容易に確認することができるであろう。

【0148】

組換えレトロウイルスが不完全であるので、それらは、感染性ベクター粒子を産生するための援助を必要とする。この援助は、例えば、LTR内の調節配列のコントロール下にレトロウイルスの構造遺伝子をすべてコードするプラスミドを含有するヘルパー細胞系を使用することによって提供することができる。これらのプラスミドは、封入のためにRNA転写物を認識するパッケージングメカニズムを可能にするヌクレオチド配列を欠いている。パッケージングシグナルの欠失を有するヘルパー細胞株は、例えば、.PSI.2、PA317およびPA12を含むが、これらに限定されない。ゲノムがパッケージにされないで、これらの細胞株は、空のビリオンを産生する。パッケージシグナルが完全であるが、構造遺伝子が他の興味のある遺伝子と交換されたそのような細胞の中にレトロウイルスベクターが導入される場合、ベクターをパッケージし、ベクタービリオンを産生することができる。次いで、この方法によって産生されたベクタービリオンは、NIH 3T3細胞などの組織細胞株を感染させるために使用して、大量のキメラレトロウイルスビリオンを産生することができる。

10

20

【0149】

例えばDNA - リガンド複合体、アデノウイルス - リガンド - DNA複合体、DNAの直接的な注射、CaPO₄沈澱、遺伝子銃技術、エレクトロポレーション、リポソーム、リポフェクションなどを含む、遺伝子療法のための「非ウイルス」送達技術も、使用することができる。これらの方法のいずれも、当業者に広く入手可能であり、本発明において使用するのに適しているであろう。他の適した方法が、当業者に入手可能であり、トランスフェクションの入手可能な方法のいずれかを使用して、本発明を達成することができることが理解されたい。リポフェクションは、リポソーム粒子内に単離されたDNA分子を被包し、標的細胞の細胞膜とリポソーム粒子を接触させることによって達成することができる。リポソームは、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルコリンなどの両親媒性分子から構成される脂質二重層が周囲の培地の一部を、脂質二重層が親水性の内部を囲むように、被包する自己集合コロイド粒子である。単層または多重膜リポソームは、内部が、所望の化学的な薬剤または本発明では単離されたDNA分子を含有するように構築することができる。

30

【0150】

ある実施形態は、下記に記載されるストリンジェンシーの条件下で、参照AspRSポリヌクレオチド配列またはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。本明細書において使用されるように、用語「低ストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての条件を説明するものである。ハイブリダイゼーション反応を実行するための手引きは、Ausubelら、(1998年、前掲)、セクション6.3.1~6.3.6において見つけることができる。水性および非水性の方法は、その参考文献において記載されており、どちらも使用することができる。

40

【0151】

低ストリンジェンシーの条件に対する本明細書における言及は、42でのハイブリダイゼーションのための少なくとも約1% v/v ~ 少なくとも約15% v/vホルムアミドおよび少なくとも約1M ~ 少なくとも約2Mの塩ならびに42での洗浄のための少なくとも約1M ~ 少なくとも約2Mの塩を含み、かつ包含する。低ストリンジェンシーの条件はまた、65でのハイブリダイゼーションのための1%ウシ血清アルブミン(BSA)

50

、1 mM EDTA、0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2)、7% SDS および室温での洗浄のための (i) 2 × SSC、0.1% SDS；または (ii) 0.5% BSA、1 mM EDTA、40 mM NaHPO₄ (pH 7.2)、5% SDS をも含んでいてもよい。低ストリンジェンシーの条件の一実施形態は、約 45 での 6 × 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) 中でのハイブリダイゼーション、その後続く少なくとも 50 での 0.2 × SSC、0.1% SDS 中での 2 回の洗浄を含む (洗浄の温度は、低ストリンジェンシーの条件について 55 まで増加させることができる)。

【0152】

中程度のストリンジェンシーの条件は、42 でのハイブリダイゼーションのための少なくとも約 16% v/v ~ 少なくとも約 30% v/v ホルムアミドおよび少なくとも約 0.5 M ~ 少なくとも約 0.9 M の塩ならびに 55 での洗浄のための少なくとも約 0.1 M ~ 少なくとも約 0.2 M の塩を含み、かつ包含する。中程度のストリンジェンシーの条件はまた、65 でのハイブリダイゼーションのための 1% ウシ血清アルブミン (BSA)、1 mM EDTA、0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2)、7% SDS および 60 ~ 65 での洗浄のための (i) 2 × SSC、0.1% SDS；または (ii) 0.5% BSA、1 mM EDTA、40 mM NaHPO₄ (pH 7.2)、5% SDS をも含んでいてもよい。中程度のストリンジェンシーの条件の一実施形態は、約 45 での 6 × SSC 中でのハイブリダイズ、その後続く 60 での 0.2 × SSC、0.1% SDS 中での 1 回または複数回の洗浄を含む。高ストリンジェンシーの条件は、42 でのハイブリダイゼーションのための少なくとも約 31% v/v ~ 少なくとも約 50% v/v ホルムアミドおよび約 0.01 M ~ 約 0.15 M の塩ならびに 55 での洗浄のための約 0.01 M ~ 約 0.02 M の塩を含み、かつ包含する。

【0153】

高ストリンジェンシーの条件はまた、65 でのハイブリダイゼーションのための 1% BSA、1 mM EDTA、0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2)、7% SDS および 65 を超える温度での洗浄のための (i) 0.2 × SSC、0.1% SDS；または (ii) 0.5% BSA、1 mM EDTA、40 mM NaHPO₄ (pH 7.2)、1% SDS をも含んでいてもよい。高ストリンジェンシーの条件の一実施形態は、約 45 での 6 × SSC 中でのハイブリダイズ、その後続く 65 での 0.2 × SSC、0.1% SDS 中での 1 回または複数回の洗浄を含む。非常に高いストリンジェンシーの条件の一実施形態は、65 での 0.5 M リン酸ナトリウム、7% SDS 中でのハイブリダイズ、その後続く、65 での 0.2 × SSC、1% SDS 中での 1 回または複数回の洗浄を含む。

【0154】

他のストリンジェンシーの条件は、当技術分野において周知であり、当業者は、ハイブリダイゼーションの特異性を最適化するために様々な因子を操作することができることを認識するであろう。最終の洗浄のストリンジェンシーの最適化は、高度のハイブリダイゼーションを確実にするための役目を果たし得る。詳述される例については、Ausubel ら、前掲 2.10.1 ~ 2.10.16 頁および Sambrook ら (1989 年、前掲) セクション 1.101 ~ 1.104 を参照されたい。

【0155】

ストリンジェントな洗浄は、約 42 ~ 68 の温度で典型的に実行されるが、当業者は、他の温度がストリンジェントな条件に適していてもよいことを認識するであろう。最大のハイブリダイゼーション速度は、典型的に、DNA-DNA ハイブリッドの形成のために T_m 未満の約 20 ~ 25 で生じる。T_m は、融解温度または 2 つの相補的なポリヌクレオチド配列が解離する温度であることが当技術分野において周知である。T_m を推測するための方法は、当技術分野において周知である (Ausubel ら、前掲 2.10.8 頁を参照されたい)。

【0156】

一般に、DNA の完全に一致した二重鎖の T_m は、式：T_m = 81.5 + 16.6 (1

10

20

30

40

50

$0.01 \log_{10} M) + 0.41 (\%G + C) - 0.63 (\% \text{ホルムアミド}) - (600 / \text{長さ})$ によって近似値として予測されてもよく、 M は、 Na^+ の濃度であり、好ましくは0.01モル～0.4モルの範囲にあり、 $\%G + C$ は、30%～75% $G + C$ の間の範囲内の塩基の総数の百分率としてのグアノシンおよびシトシン塩基の合計であり、 $\% \text{ホルムアミド}$ は、体積によるホルムアミドパーセント濃度であり、長さは、DNA二重鎖における塩基対の数である。二重鎖DNAの T_m は、無作為にミスマッチした塩基対の数が1%増加する毎に約1℃ずつ減少する。洗浄は、一般に、高ストリンジェンシーについては $T_m - 15$ または中位のストリンジェンシーについては $T_m - 30$ で実行される。

【0157】

ハイブリダイゼーション手段の一例では、固定されたDNAを含有する膜（例えばニトロセルロース膜またはナイロン膜）は、標識プローブを含有するハイブリダイゼーションバッファー（50%脱イオン化ホルムアミド、5×SSC、5×デンハルト溶液（0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、および0.1%ウシ血清アルブミン）、0.1%SDS、ならびに200mg/mL変性サケ精子DNA）中、42℃で一晩ハイブリダイズされる。次いで、膜は、2回の連続する中程度のストリンジェンシー洗浄（つまり、45℃で15分間、2×SSC、0.1%SDS、その後に続く、50℃で15分間、2×SSC、0.1%SDS）、その後に続く、2回の連続する、より高いストリンジェンシー洗浄にかけられる（つまり、55℃で12分間、0.2×SSC、0.1%SDS、その後に続く、65～68℃で12分間、0.2×SSCおよび0.1%SDS溶液）。

【0158】

本発明の実施形態はまた、検出、増幅、アンチセンス療法、または他の目的に関わらず、オリゴヌクレオチドをも含む。これらの関係する目的のために、用語「オリゴヌクレオチド」または「オリゴ」または「オリゴマー」は、単数の「オリゴヌクレオチド」および複数の「オリゴヌクレオチド」を包含するように意図され、本発明の増幅方法および続く検出方法において試薬として使用される、2つ以上のヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、または関連化合物の任意のポリマーを指す。オリゴヌクレオチドは、DNAおよび/もしくはRNAならびに/またはその類似体であってもよい。

【0159】

用語オリゴヌクレオチドは、必ずしも試薬についての特定の機能を示すわけではなく、むしろ、それは、本明細書に記載のそのような試薬をすべて包含するために総称的に使用される。オリゴヌクレオチドは、様々な異なる機能を果たしてもよく、例えば、それが相補体とハイブリダイズすることができ、核酸ポリメラーゼの存在下においてさらに伸長することができる場合、それはプライマーとして機能してもよく、それがRNAポリメラーゼによって認識される配列を含有し、転写を可能にする場合、それはプロモーターを提供してもよく、適切に位置しているおよび/または修飾されている場合、それは、ハイブリダイゼーションを予防し、またはプライマー伸長を妨害するように機能してもよい。オリゴヌクレオチドはまた、プローブまたはアンチセンス作用物質として機能してもよい。オリゴヌクレオチドは、事実上、任意の長さとすることができ、例えば増幅反応における、増幅反応の増幅産物を検出する際の、またはアンチセンスもしくはRNA干渉の適用におけるその特異的な機能によってのみ制限される。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれも、プライマー、プローブ、アンチセンスオリゴマー、またはRNA干渉剤として使用することができる。

【0160】

本明細書において使用される用語「プライマー」は、4つの異なるヌクレオシド3リン酸およびDNAもしくはRNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合のための作用物質の存在下において、例えばバッファーおよび温度によって決定された、適した条件下で、鋳型特異的DNA合成についての開始点として作用することができる一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。プライマーの長さは、任意の所定の場合において、例えば、プライマーの意図される使用に依存し、より短く、より長いプライマーが使用されてもよいが、一般

に、約15～30のヌクレオチドの範囲にわたる。短いプライマー分子は、一般に、鋳型と十分に安定性のハイブリッド複合体を形成するために、より低温の温度を必要とする。プライマーは、鋳型の厳密な配列を反映する必要はないが、そのような鋳型とハイブリダイズするのに十分に相補的でなければならない。プライマー部位は、プライマーがハイブリダイズする鋳型のエリアである。プライマー対は、増幅されることとなる配列の5'末端とハイブリダイズする5'上流プライマーおよび増幅されることとなる配列の3'末端の相補配列とハイブリダイズする3'下流プライマーを含む、プライマーのセットである。

【0161】

本明細書において使用される用語「プローブ」は、特定の標的によって認識することができる表面に固定された分子を指す。例えば、10、12以上の塩基を有するプローブのあらゆる可能な組合せをすべて有するアレイの例について、米国特許第6,582,908号を参照されたい。本明細書において典型的に使用されるプローブおよびプライマーは、公知の配列の少なくとも10～15隣接ヌクレオチドを含む。特異性を増強するために、AspRS参照配列またはその相補配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または少なくとも150のヌクレオチドを含むプローブおよびプライマーなどの、より長いプローブおよびプライマーも利用されてもよい。プローブおよびプライマーは、これらの例よりも相当に長くてもよく、表、図、および配列表を含む当技術分野および本明細書における知識によって支持されるあらゆる長さが、使用されてもよいことが理解される。

【0162】

プローブおよびプライマーを調製および使用するための方法は、参考文献、例えばSambrook, J.ら(1989年)Molecular Cloning: A Laboratory Manual、補足第2版、1～3巻、Cold Spring Harbor Press、Plainview N.Y.; Ausubel, F. M.ら(1987年)Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences、New York N.Y.; Innis, M.ら(1990年)PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications、Academic Press、San Diego Califにおいて記載されている。PCRプライマー対は、例えば、Primer (Version 0.5、1991年、Whitehead Institute for Biomedical Research、Cambridge Mass.)などの、その目的のために意図されるコンピュータープログラムを使用することによって公知の配列から誘導することができる。

【0163】

プライマーまたはプローブとして使用されるオリゴヌクレオチドは、当技術分野において公知のソフトウェアを使用して選択されてもよい。例えば、OLIGO4.06ソフトウェアは、それぞれ100までのヌクレオチドのPCRプライマー対の選択にならびに32キロベースまでの入力ポリヌクレオチド配列からのオリゴヌクレオチドおよび5,000までのヌクレオチドのより大きなポリヌクレオチドの分析に有用である。Primer3プライマー選択プログラム(Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research、Cambridge Mass.から公に入手可能である)は、ユーザーが「ミスプライミングライブラリー(mispriming library)」を入力することを可能にし、プライマー結合部位として避けるための配列がユーザーによって指定される。上記の選択法のいずれかによって同定されるオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド断片は、例えば、核酸の試料において完全にまたは部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定するために、PCRプライマーもしくは配列決定プライマー、マイクロアレイエレメント、または特異的プローブとしてハイブリダイゼーション技術において有用である。オリゴヌクレオチド選択の方法は、本明

細書に記載のものに限定されない。

【0164】

用語「アンチセンスオリゴマー」、「アンチセンス化合物」、または「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、区別なく使用され、ワトソン-クリック型塩基対によって核酸（典型的にRNA）中の標的配列に塩基対成分がハイブリダイズすることを可能にし、標的配列内で核酸：オリゴマーヘテロ二重鎖を形成して、それによって通常そのRNAの翻訳を予防するサブユニット間連結によって連結される塩基対成分をそれぞれ有する環状サブユニットの配列を指す。スプライス変異体もしくはタンパク質分解断片および/またはその対応するポリペプチドなどの選択されたAspRS転写物の発現を調整するためのその使用の方法も含まれる。

10

【0165】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約8～40のサブユニット、典型的に約8～25のサブユニット、および好ましくは約12～25のサブユニットを含有してもよい。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、下記に定義されるように、標的配列に対して厳密な配列相補性を有していても、またはおおよその相補性を有していてもよい。ある実施形態では、標的配列およびアンチセンスターゲティング配列の間の相補性の程度は、安定性の二重鎖を形成するのに十分である。標的RNA配列とのアンチセンスオリゴマーの相補性の領域は、8～11塩基ほどの長さであってもよいが、好ましくは12～15塩基以上、例えば12～20塩基または12～25塩基であり、これらの範囲の中間の整数をすべて含む。約14～15塩基のアンチセンスオリゴマーは、一般に、選択されるAspRS

20

【0166】

ある実施形態では、40塩基ほどの長さのアンチセンスオリゴマーは、適していてもよく、少なくとも最少数の塩基、例えば10～12塩基は、標的配列に相補的である。しかしながら、一般に、細胞における取り込みの促進または活性は、約30未満のオリゴマー長で最適化される。下記にさらに記載されるある種のオリゴマーについては、結合安定性および取り込みの最適のバランスは、一般に、18～25塩基の長さで生じる。少なくとも約6、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、または40の隣接または非隣接塩基が、それらのAspRS標的配列またはその変異体に相補的である、約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、または40塩基からなるアンチセンスオリゴマー（例えばPNA、LNA、2'-OMe、MOE、モルホリノ）が含まれる。

30

【0167】

ある実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、AspRS核酸標的配列に100%相補的であってもよく、またはオリゴマーおよびAspRS核酸標的配列の間で形成されるヘテロ二重鎖が細胞のヌクレアーゼおよびインピボにおいて生じる可能性がある分解の他のモードの作用に耐えるのに十分に安定性である限り、それは、例えば変異体に適応させるためにミスマッチを含んでいてもよい。ヌクレアーゼによる切断にそれほど感受性ではないオリゴマーバックボーンは、下記に議論される。ミスマッチは、存在する場合、中間においてよりも、ハイブリッド二重鎖の末端領域に対して不安定ではない。許容されるミスマッチの数は、二重鎖安定性の十分に理解される原理に従って、オリゴマーの長さ、二重鎖におけるG:C塩基対の百分率、および二重鎖におけるミスマッチ（複数可）の位置に依存するであろう。そのようなアンチセンスオリゴマーは、AspRS核酸標的配列に必ずしも100%相補的ではないが、標的配列に安定して特異的に結合することが有効であり、その結果として、核酸標的の生物活性、例えばAspRSタンパク質の発現が調整される。

40

【0168】

50

オリゴマーおよび標的配列の間で形成された二重鎖の安定性は、結合 T_m および細胞の酵素による切断に対する二重鎖の感受性の関数である。相補的配列RNAに関してのアンチセンスオリゴヌクレオチドの T_m は、Hamesら、Nucleic Acid Hybridization、IRL Press、1985年、107～108頁によって記載されるものなどの通常の方法によってまたはMiyada C. G. およびWallace R. B.、1987年、Oligonucleotide hybridization techniques、Methods Enzymol. 154巻94～107頁に記載のように測定されてもよい。ある実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、体温よりも大きな、好ましくは50以上の相補的配列RNAに関しての結合 T_m を有していてもよい。60～80以上の範囲の T_m が好ましい。周知の原理に従って、相補性に基づくRNAハイブリッドに関してのオリゴマー化合物の T_m は、二重鎖におけるC：G対塩基の比率を増加させることによっておよび/またはヘテロ二重鎖の長さ（塩基対の）を増加させることによって増加させることができる。

10

20

30

40

50

【0169】

アンチセンスオリゴマーは、mRNAの翻訳をブロックもしくは阻害するようにまたは天然のプレmRNAスプライスプロセッシングを阻害するように、または標的とされたmRNAの分解を誘発するように設計することができ、それがハイブリダイズする標的配列「に向けられる」または「を標的とする」と表現されてもよい。ある実施形態では、標的配列は、AspRS mRNA転写物の任意のコードまたは非コード配列を含んでいてもよく、したがってエクソン内またはイントロン内の付近にあってもよい。ある実施形態では、標的配列は、AspRSの中で相対的に特有または例外的であり、選択されるAspRSタンパク質分解断片またはスプライス変異体の発現を低下させるために選択的である。ある実施形態では、標的部位は、予め処理されたmRNAの3'もしくは5'スプライス部位または枝分かれ部位を含む。スプライス部位についての標的配列は、予め処理されたmRNAにおいて、スプライスアクセプタージャンクションの1～約25～約50塩基対下流にまたはスプライスドナージャンクションの1～約25～約50塩基対上流にその5'末端を有するmRNA配列を含んでいてもよい。オリゴマーは、本明細書に記載の方法で標的核酸を標的とする場合、参照AspRSポリヌクレオチドなどの生物学的に関連する標的「を標的とする」とより一般に表現される。

【0170】

オリゴヌクレオチドの「サブユニット」は、1つのヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）単位を指す。用語は、付加されたサブユニット間連結を有するまたは有していないヌクレオチド単位を指してもよいが、「電荷サブユニット」を指す場合、電荷は、典型的に、サブユニット間連結（例えばリン酸もしくはホスホロチオエート連結または陽イオン性連結）内に存在する。

【0171】

オリゴヌクレオチドの環状サブユニットは、リボースもしくは他のペントース糖またはある実施形態では、代替の基もしくは修飾基に基づくものであってもよい。修飾オリゴヌクレオチドバックボーンの例は、限定を伴うことなく、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホロアミデートおよびアミノアルキルホスホロアミデートを含むホスホロアミデート、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびに通常の3'-5'連結を有するボラノホスフェート、これらの2'-5'連結類似体、および逆の極性を有するものを含み、近接する対のヌクレオチド単位は、3'-5'～5'-3'または2'-5'～5'-2'に連結されている。当技術分野において公知の他のオリゴヌクレオチドの中で、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、2'-O-メチルオリゴヌクレオチド（2'-OMe）、2'-メトキシエトキシオリゴヌクレオチド（MOE）、モルホリノも企図される。

【 0 1 7 2 】

プリンまたはピリミジン塩基対成分は、典型的に、アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、チミン、またはイノシンである。ピリジン - 4 - オン、ピリジン - 2 - オン、フェニル、偽ウラシル、2, 4, 6 - トリメチルピリジン、3 - メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5 - アルキルシチジン（例えば5 - メチルシチジン）、5 - アルキルウリジン（例えばリボチミジン）、5 - ハロウリジン（例えば5 - ブロモウリジン）または6 - アザピリミジンまたは6 - アルキルピリミジン（例えば6 - メチルウリジン）、プロピン、キューオシン、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、ワイプトシン、ワイプトキソシン、4 - アセチルチジン（4 - acetylthidine）、5 - （カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、5' - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン、D - ガラクトシルキューオシン、1 - メチルアデノシン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアノシン、3 - メチルシチジン、2 - メチルアデノシン、2 - メチルグアノシン、N6 - メチルアデノシン、7 - メチルグアノシン、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - メチルアミノメチルウリジン、5 - メチルカルボニルメチルウリジン（5 - methylcarbonylmethyluridine）、5 - メチルオキシウリジン、5 - メチル - 2 - チオウリジン、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデノシン、D - マンノシルキューオシン、ウリジン - 5 - オキシ酢酸、2 - チオシチジン、トレオニン誘導体、および他などの塩基も含まれる（Burginら、1996年、Biochemistry, 35巻、14090頁；Uhlman & Peyman、前掲）。本態様における「修飾塩基」によって、上記に示されるように、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）、およびウラシル（U）以外のヌクレオチド塩基を意味し、そのような塩基は、アンチセンス分子における任意の位置に使用することができる。当業者らは、オリゴマーの使用に依存して、TおよびUが交換可能であることを十分に理解するであろう。例えば、よりRNA様の2' - O - メチルアンチセンスオリゴヌクレオチドなどのように他のアンチセンス化学では、T塩基は、Uとして示されてもよい。

10

20

30

40

【 0 1 7 3 】

オリゴヌクレオチドは、標的DNAまたはRNAなどの標的配列に典型的に相補的である。用語「相補的」および「相補性」は、塩基対合則によって関連するポリヌクレオチド（つまりヌクレオチドの配列）を指す。例えば、配列「A - G - T」は、配列「T - C - A」に相補的である。相補性は、「部分的」であってもよく、核酸の塩基のいくつかのみが塩基対合則に従って一致する。または、核酸の間に「完全な」もしくは「全体にわたる」相補性（100%）があってもよい。核酸鎖の間の相補性の程度は、核酸鎖の間のハイブリダイゼーションの効率および強度に著しい効果がある。完全な相補性が所望されることが多いが、いくつかの実施形態は、標的配列に関して1つまたは複数のミスマッチを含んでいてもよいが、好ましくは、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1つのミスマッチを含んでいてもよい。オリゴマー内の任意の位置の変異が含まれる。ある実施形態では、オリゴマーの末端の近くの配列における変異は、内部における変異より一般に好ましく、存在する場合、典型的に、5' および/または3' 末端の約10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1つのヌクレオチドの範囲内である。

【 0 1 7 4 】

用語「標的配列」は、オリゴヌクレオチドが向けられる標的RNAの一部、つまり相補的配列のワトソン - クリック型塩基対によってオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする配列を指す。ある実施形態では、標的配列は、AspRS mRNAの隣接領域（例えばAspRS mRNAの特有のスプライスジャンクション）であってもよく、mRNAの非隣接領域から構成されてもよい。

【 0 1 7 5 】

用語「ターゲティング配列」またはある実施形態では、「アンチセンスターゲティング

50

配列」は、DNAまたはRNA標的分子における標的配列に相補的である（実質的に相補的であることをさらに意味する）、オリゴヌクレオチドにおける配列を指す。アンチセンス化合物の全配列または一部のみが、標的配列に相補的であってもよい。例えば、20～30塩基を有するオリゴヌクレオチドにおいて、約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29が、標的部位に相補的なターゲティング配列であってもよい。典型的に、ターゲティング配列は、隣接塩基から形成されるが、その代わりに、例えばオリゴヌクレオチドの両端から一か所に配置される場合に標的配列にわたる配列を構成する非隣接配列から形成されてもよい。

【0176】

標的配列およびターゲティング配列は、ハイブリダイゼーションが逆平行の配置で生じる場合、互いに「相補的な」ものとして記載される。ターゲティング配列は、標的配列に対する「おおよその」または「実質的な」相補性を有していてもよく、なお、本発明の目的のために機能する、すなわち、それは、なお、機能的に「相補的」であってもよい。

【0177】

オリゴマーが、実質的に45を超える、好ましくは少なくとも50、典型的に60～80以上の T_m で、生理学的条件下で、標的（例えばAspRS参照ポリヌクレオチドまたはその相補体）とハイブリダイズする場合、オリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドと「特異的にハイブリダイズする」。そのようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に相当する。所与のイオン強度およびpHで、 T_m は、標的配列の50%が相補的なポリヌクレオチドとハイブリダイズする温度である。なおまた、そのようなハイブリダイゼーションは、標的配列に対するアンチセンスオリゴマーの「おおよその」または「実質的な」相補性および厳密な相補性で生じてもよい。

【0178】

特異的に結合する、または特異的にハイブリダイズするという用語は、選択されたハイブリダイゼーション条件下で試料中のその意図される標的遺伝子配列に結合するだけでなく、試料中の他の標的配列に有意に結合せず、それによって、標的プール中のその意図される標的および他のすべての標的を区別する、オリゴヌクレオチドプローブまたはポリヌクレオチド配列を一般に指す。その意図される標的配列と特異的にハイブリダイズするプローブはまた、本明細書に記載のように、選択されるハイブリダイゼーション条件下で濃度差異を検出してもよい。

【0179】

上記に述べられるように、本明細書において提供されるある種のオリゴヌクレオチドは、ペプチド核酸（PNA）を含む。「ロックド核酸」サブユニット（LNA）も含まれる。LNAの構造は、当技術分野において公知である：例えばWengelら、Chemical Communications（1998年）455頁；Tetrahedron（1998年）54巻、3607頁およびAccounts of Chem. Research（1999年）32巻、301頁）；Obikaら、Tetrahedron Letters（1997年）38巻、8735頁；（1998年）39巻、5401頁、ならびにBioorganic Medicinal Chemistry（2008年）16巻、9230頁。ある種のオリゴヌクレオチドは、無電荷または実質的に無電荷の連結によって結びつけられる塩基対成分を有する、モルホリノベースのサブユニットを含んでもよい。用語「モルホリノオリゴマー」または「PMO」（ホスホロアミデートもしくはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー）は、モルホリノサブユニット構造から構成されるオリゴヌクレオチド類似体を指し、（i）構造は、近接するサブユニットの5'環外炭素に1つのサブユニットのモルホリノ窒素を結びつける、1～3原子長、好ましくは2原子長の、好ましくは無電荷または陽イオン性であるリン含有連結によってともに連結され、（ii）モルホリノ環はそれぞれ、ポリヌクレオチド中の塩基に塩基特異的水素結合によって結合するのに有効なプリンもしくはピリミジンまたは等価な塩

10

20

30

40

50

基対成分を有する。

【0180】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、混合物または無電荷および陽イオン性バックボーン連結を有するオリゴヌクレオチドの合成に関して上記および下記に記載される参考文献において詳述される方法を利用して、段階的な固相合成によって調製することができる。いくつかの場合には、例えば、薬物動態を増強するまたは化合物の捕捉もしくは検出を促進するために、オリゴヌクレオチドにさらなる化学成分を追加することが望ましくてもよい。そのような成分は、標準的な合成方法に従って、典型的にオリゴマーの末端に共有結合されてもよい。例えば、ポリエチレングリコール成分または他の親水性ポリマー、例えば10～100単量体サブユニットを有するものの追加は、可溶性を増強するのに有用であってもよい。1つまたは複数の電荷基（例えば有機酸などの陰イオン性電荷基）は、細胞取り込みを増強してもよい。

10

【0181】

様々な検出可能な分子は、直接（例えば光放射によって）または間接的に（例えば蛍光標識抗体の結合によって）検出することができる放射性同位元素、蛍光色素、色素、酵素、ナノ粒子、化学発光マーカー、ビオチン、または当技術分野において公知の他の単量体などのように、オリゴヌクレオチドを検出可能にするために使用されてもよい。

【0182】

ある実施形態は、その断片および変異体を含む、AspRS参照ポリヌクレオチドの1つまたは複数のmRNA転写物を標的とするRNA干渉（RNAi）作用物質に関する。AspRSスプライス変異体またはタンパク質分解断片などの、選択されるAspRS転写物のレベルを調整するためのその使用の方法も含まれる。

20

【0183】

用語「二本鎖」は、鎖の少なくとも一部が、水素結合して、二重鎖構造を形成するのに十分に相補的である領域を含む2つの別々の核酸鎖を意味する。用語、「二重鎖」または「二重鎖構造」は、2つの別々の鎖が実質的に相補的であり、したがって互いにハイブリダイズする二本鎖分子の領域を指す。「dsRNA」は、2つの相補的な逆平行核酸鎖（つまりセンス鎖およびアンチセンス鎖）を含む二重鎖構造を有するリボ核酸分子を指す。dsRNAのすべてのヌクレオチドがワトソン-クリック型塩基対を示さなければならないとは限らず、2つのRNA鎖は、実質的に相補的であってもよい。RNA鎖は、同じまたは異なる数のヌクレオチドを有していてもよい。

30

【0184】

dsRNAの鎖は、ハイブリダイズして、二重鎖構造を形成するのに十分に相補的である。ある実施形態では、相補的RNA鎖は、長さが30未満のヌクレオチド、25未満のヌクレオチド、または長さがさらに19～24のヌクレオチドであってもよい。ある態様では、相補的なヌクレオチド配列は、長さが20～23のヌクレオチドまたは長さが22のヌクレオチドであってもよい。

【0185】

ある実施形態では、RNA鎖の少なくとも1つは、長さが1～4ヌクレオチドのヌクレオチドオーバーハングを含む。他の実施形態では、一方または両方の鎖は、平滑末端である。ある実施形態では、dsRNAは、少なくとも1つの化学的に修飾されたヌクレオチドをさらに含んでいてもよい。

40

【0186】

本発明のある実施形態は、マイクロRNAを含んでいてもよい。マイクロRNAは、生物において天然に産生される小さなRNAの大きな群を示し、これらのいくつかは、標的遺伝子の発現を調節する。マイクロRNAは、ダイサーによって、約70ヌクレオチド一本鎖ヘアピン前駆体転写物から形成される（V. AmbrosらCurrent Biology 13巻：807頁、2003年）。

【0187】

ある実施形態はまた、低分子干渉RNA（siRNA）を利用してもよい。siRNA

50

作用物質の鎖はそれぞれ、長さが 3 5、3 0、2 5、2 4、2 3、2 2、2 1、2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、または 1 5ヌクレオチド以下とすることができる。鎖は、好ましくは、長さが少なくとも 1 9ヌクレオチドである。例えば、鎖はそれぞれ、長さが 2 1 ~ 2 5ヌクレオチドとすることができる。好ましい s i R N A 作用物質は、1 7、1 8、1 9、2 9、2 1、2 2、2 3、2 4、または 2 5ヌクレオチド対の二重鎖領域および 1 つまたは複数のオーバーハング、好ましくは 2 ~ 3ヌクレオチドの 1 または 2 つの 3 ' オーバーハングを有する。

【0188】

本明細書において使用される「一本鎖 R N A i 作用物質」は、単一の分子から構成される R N A i 作用物質である。それは、鎖内対合によって形成される二重鎖領域を含んでいてもよい、例えば、それは、ヘアピンまたはフライパンの柄の構造をしていても、それを含んでいてもよい。一本鎖 R N A i 作用物質は、長さが少なくとも 1 4、より好ましくは少なくとも 1 5、2 0、2 5、2 9、3 5、4 0、または 5 0ヌクレオチドである。長さが 2 0 0、1 0 0、または 6 0未満のヌクレオチドが好ましい。

10

【0189】

ヘアピン R N A i 調整作用物質は、1 7、1 8、1 9、2 9、2 1、2 2、2 3、2 4、または 2 5ヌクレオチド対に等しい、または少なくとも 1 7、1 8、1 9、2 9、2 1、2 2、2 3、2 4、または 2 5ヌクレオチド対の二重鎖領域を有していてもよい。二重鎖領域は、好ましくは、長さが、2 0 0、1 0 0、または 5 0以下であってもよい。二重鎖領域についてのある範囲は、長さが 1 5 ~ 3 0、1 7 ~ 2 3、1 9 ~ 2 3、および 1 9 ~ 2 1のヌクレオチド対である。ヘアピンは、好ましくは 3 '、好ましくはヘアピンのアンチセンス側に、一本鎖オーバーハングまたは末端不對領域を有していてもよい。ある実施形態では、オーバーハングは、長さが 2 ~ 3ヌクレオチドである。

20

【0190】

本発明は、リボザイムを利用するオリゴヌクレオチドをさらに包含する。本明細書に記載の A s p R S ターゲティング配列を発現することができるベクター送達系も含まれる。s i R N A または他の二重鎖形成 R N A 干渉分子を発現するベクターが含まれる。典型的な送達系は、とりわけ当技術分野において公知のレトロウイルス（例えばレンチウイルス）ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、およびヘルペスウイルスベクターを含むが、これらに限定されないウイルスベクター系（つまりウイルス媒介形質導入）を含んでいてもよい。

30

【0191】

A s p R S ポリヌクレオチド参照配列またはその相補配列の 1 つまたは複数の部分を標的とするオリゴヌクレオチドおよび R N A i 作用物質は、本明細書において記載され、当業者らに明らかな治療上の、診断上の、または薬剤スクリーニングの方法のいずれかにおいて使用されてもよい。

【0192】

抗体組成物、その断片、および他の結合剤

他の態様によれば、本発明は、本明細書において開示されるポリペプチドに対してまたはその部分、変異体、もしくは誘導体に対して結合特異性を示す抗体、その抗原結合断片、可溶性受容体、小分子、アプタマーなどの結合剤およびそれを使用するための方法をさらに提供する。好ましくは、そのような結合剤は、本発明の A s p R S ポリペプチドによって媒介される、非標準的な活性の 1 つまたは複数进行调整するのに有効である。ある実施形態では、例えば、結合剤は、本発明の A s p R S ポリペプチドに結合し、その細胞性結合パートナーの 1 つまたは複数に結合するためのその能力を阻害するものである。したがって、そのような結合剤は、その活性に拮抗することによって、本発明の A s p R S ポリペプチドによって媒介される疾患、障害、または他の状態を治療または予防するために使用されてもよい。

40

【0193】

抗体またはその抗原結合断片は、それがポリペプチドと検出可能なレベル（例えば E L

50

ISAアッセイ内で)で反応し、類似する条件下で無関係なポリペプチドと検出可能に反応しない場合、本発明のポリペプチドに対して「特異的に結合する」、「免疫学的に結合する」、および/または「免疫学的に反応性である」と言える。

【0194】

この文脈において使用される免疫学的結合は、一般に、免疫グロブリン分子および免疫グロブリンが特異的な抗原の間に生じるタイプの非共有結合相互作用を指す。免疫学的結合相互作用の強度または親和性は、相互作用の解離定数 (K_d) の点から表現することができ、 K_d が小さいほど、親和性が大きくなることを示す。選択されるポリペプチドの免疫学的結合特性は、当技術分野において周知の方法を使用して定量化することができる。あるそのような方法は、抗原結合部位/抗原複合体の形成および解離の速度を測定すること
10
を要し、それらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および等しく両方向に、速度に影響を及ぼす幾何学的パラメーターに依存する。したがって、「on速度定数」(K_{on}) および「off速度定数」(K_{off}) の両方は、濃度ならびに結合および解離の実際の速度の計算によって決定することができる。 K_{off} / K_{on} の比は、親和性に関係しないすべてのパラメーターを無効にすることができ、したがって、解離定数 K_d と等しい。例えば Davies ら (1990 年) *Annual Rev. Biochem.* 59 巻: 439 ~ 473 頁を参照されたい。

【0195】

「抗原結合部位」または抗体の「結合部分」は、抗原結合に関与する免疫グロブリン分子の部分
20
を指す。抗原結合部位は、重 (「H」) および軽 (「L」) 鎖の N 末端可変 (「V」) 領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖および軽鎖の V 領域内の高度に相違する 3 つのストレッチは、「フレームワーク領域」または「FR」として公知のより保存されたフランキングストレッチの間に介在している「超可変領域」と称される。したがって、用語「FR」は、免疫グロブリンにおいて超可変領域の間に近接して天然に見つけられるアミノ酸配列を指す。抗体分子において、軽鎖の 3 つの超可変領域および重鎖の 3 つの超可変領域は、三次元空間で互いに関連して配置されて、抗原結合表面を形成する。抗原結合表面は、結合抗原の三次元表面に相補的であり、重鎖および軽鎖のそれぞれの 3 つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と称される。

【0196】

結合剤は、例えば、ペプチド成分、RNA 分子、またはポリペプチドを有するまたは有していないリボソームであってもよい。好ましい実施形態では、結合剤は、抗体またはその抗原結合断片である。抗体は、当業者らに公知の様々な技術のいずれかによって調製されてもよい。例えば Harlow および Lane、*Antibodies: A Laboratory Manual*、Cold Spring Harbor Laboratory、1988 年を参照されたい。例えば、対象のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、Kohler および Milstein、*Eur. J. Immunol.* 6 巻: 511 ~ 519 頁、1976 年の技術およびそれに対して改善された技術を使用して調製されてもよい。本発明のポリペプチドは、精製プロセスにおいて、例えば親和性クロマトグラフィーステップにおいて使用されてもよい。
30

【0197】

「Fv」断片は、IgM、まれに IgG または IgA 免疫グロブリン分子の選択的なタンパク質分解切断によって産生することができる。しかしながら、より一般には、Fv 断片は、当技術分野において公知の組換え技術を使用して誘導される。Fv 断片は、天然の抗体分子の抗原認識および結合能力の多くを保持する抗原結合部位を含む非共有結合 V_H : : V_L ヘテロ二量体を含む。Inbar ら (1972 年) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69 巻: 2659 ~ 2662 頁; Hochman ら (1976 年) *Biochem* 15 巻: 2706 ~ 2710 頁; および Ehrlich ら (1980 年) *Biochem* 19 巻: 4091 ~ 4096 頁。
40

【0198】

単鎖 Fv (「sFv」) ポリペプチドは、ペプチドコードリンカーによって連結される
50

V_H および V_L コード遺伝子を含む遺伝子融合物から発現される、共有結合された V_H : V_L ヘテロ二量体である。Hus t on ら (1988 年) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85 巻 (16 号) : 5879 ~ 5883 頁。自然に集合しているが、化学的に分離している軽および重ポリペプチド鎖を抗体 V 領域から、フォールドして、抗原結合部位の構造に実質的に類似する三次元構造になるであろう s F v 分子に変換するために、多くの方法が、化学構造を識別するために記載されている。例えば、Hus t on らに対する米国特許第 5,091,513 号および第 5,132,405 号ならびに Ladner らに対する米国特許第 4,946,778 号を参照されたい。

【0199】

上記分子のそれぞれは、CDR を支持し、互いに関連して CDR の空間的関係を決定する重鎖および軽鎖 FR セットの間にそれぞれ介在している重鎖および軽鎖 CDR セットを含む。本明細書において使用されるように、用語「CDR セット」は、重鎖または軽鎖 V 領域の 3 つの超可変領域を指す。重鎖または軽鎖の N 末端から進んで、これらの領域は、「CDR 1」、「CDR 2」、および「CDR 3」としてそれぞれ示される。抗原結合部位は、そのため、重鎖および軽鎖 V 領域のそれぞれに由来する CDR セットを含む 6 つの CDR を含む。単一の CDR (例えば CDR 1、CDR 2、または CDR 3) を含むポリペプチドは、「分子認識単位」と本明細書において呼ばれる。多くの抗原 - 抗体複合体の結晶解析により、CDR のアミノ酸残基が、結合した抗原と広範囲な接触を形成し、最も広範囲な抗原接触が、重鎖 CDR 3 とのものであることが実証された。したがって、分子認識単位は、抗原結合部位の特異性を主として担う。

【0200】

本明細書において使用されるように、用語「FR セット」は、重鎖または軽鎖 V 領域の CDR セットの CDR の骨組をつくる 4 つのフランキングアミノ酸配列を指す。いくつかの FR 残基は、結合した抗原に接触してもよいが、FR、特に CDR に直接近接する FR 残基は、主として、V 領域の抗原結合部位へのフォールディングを担う。FR 内では、ある種のアミノ残基およびある種の構造的な特徴が、非常に高度に保存されている。この点で、V 領域配列はすべて、約 90 のアミノ酸残基の内部ジスルフィドループを含有する。V 領域がフォールドして結合部位になる場合、CDR は、抗原結合表面を形成する、突出するループモチーフとして表される。厳密な CDR アミノ酸配列には関係なく、ある種の「標準的な」構造にフォールドした形状の CDR ループに影響を及ぼす、FR の保存構造領域があることが一般に認識されている。さらに、ある種の FR 残基は、抗体重鎖および軽鎖の相互作用を安定化する、非共有結合ドメイン間接触に関与することが公知である。

【0201】

ヒト定常ドメインに融合されたげっ歯類 V 領域およびそれらの関連する CDR (Winter ら (1991 年) Nature 349 巻 : 293 ~ 299 頁 ; Lobuglio ら (1989 年) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 巻 : 4220 ~ 4224 頁 ; Shaw ら (1987 年) J Immunol. 138 巻 : 4534 ~ 4538 頁 ; および Brown ら (1987 年) Cancer Res. 47 巻 : 3577 ~ 3583 頁)、適切なヒト抗体定常ドメインとの融合に先立ってヒト支持 FR の中に移植されたげっ歯類 CDR (Riechmann ら (1988 年) Nature 332 巻 : 323 ~ 327 頁 ; Verhoeyen ら (1988 年) Science 239 巻 : 1534 ~ 1536 頁 ; および Jones ら (1986 年) Nature 321 巻 : 522 ~ 525 頁)、ならびに組換えで上張りされた (veneered) げっ歯類 FR によって支持されるげっ歯類 CDR (欧州特許出願公開第 519,596 号、1992 年 12 月 23 日公開) を有するキメラ抗体を含む、非ヒト免疫グロブリンに由来する抗原結合部位を含む、多くの「ヒト化」抗体分子が記載されている。これらの「ヒト化」分子は、ヒトレシピエントにおいてそれらの成分の治療上の適用の期間および有効性を制限する、げっ歯類抗ヒト抗体分子に対する不要な免疫学的応答を最小限にするように設計されている。

【0202】

上記に述べられるように、「ペプチド」は、結合剤として含まれる。ペプチドという用

語は、典型的に、アミノ酸残基のポリマーならびにその変異体および合成アナログを指す。ある実施形態では、用語「ペプチド」は、中間の整数および範囲をすべて含む（例えば 5 ~ 10、8 ~ 12、10 ~ 15）、約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、または 50 アミノ酸から成り、A s p R S ポリペプチド、その細胞性結合パートナー、またはその両方と相互作用するペプチドを含む、相対的に短いポリペプチドを指す。ペプチドは、本明細書に記載のように、天然に存在するアミノ酸および / または天然に存在しないアミノ酸から構成することができる。

【0203】

結合剤は、ペプチドミメティックまたは他の小分子を含んでいてもよい。「小分子」は、合成または生物学的な起源（生体分子）であるが、典型的にポリマーではない有機化合物を指す。有機化合物は、分子が炭素を含有している大きなクラスの化学化合物を指す。典型的に、炭酸塩、炭素の単純な酸化物、またはシアン化物のみを含有するものを除外する。「生体分子」は、その上、ペプチド、多糖、および核酸などの大きなポリマー分子（バイオポリマー）ならびに一次二次代謝産物、脂質、リン脂質、糖脂質、ステロール、グリセロ脂質、ビタミン、およびホルモンなどの小分子を含む、生物によって産生される有機分子を一般に指す。「ポリマー」は、共有化学結合によって典型的につながれる反復構造単位から構成される大きな分子または高分子を一般に指す。

10

【0204】

ある実施形態では、小分子は、1000 ダルトン未満の、典型的に約 300 ~ 700 ダルトンの、約 50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、または 1000 ダルトンを含む分子量を有する。

20

【0205】

アプタマーも、結合剤として含まれる。アプタマーの例は、核酸アプタマー（例えば DNA アプタマー、RNA アプタマー）およびペプチドアプタマーを含んだ。核酸アプタマーは、小分子、タンパク質、核酸、ならびにさらに細胞、組織、および生物などの様々な分子標的に結合するように、インビトロセレクション法または S E L E X（指数関数的な濃縮によるリガンドのシステムティックな進化）などの等価な方法を繰り返して作られた核酸種を一般に指す。したがって、本明細書に記載の A s p R S ポリペプチドおよび / またはそれらの細胞性結合パートナーに結合する核酸アプタマーが含まれる。

30

【0206】

ペプチドアプタマーは、ペプチドアプタマーの結合親和性を、抗体と同等のレベルまで（例えばナノモルの範囲で）典型的に増加させる二重の構造的な制約となる、タンパク質の骨格の両端に付加される可変ペプチドループを典型的に含む。ある実施形態では、可変ループ長は、約 10 ~ 20 アミノ酸（中間の整数をすべて含む）から構成されてもよく、骨格は、好適な可溶性および密集（c o m p a c i t y）特性を有する任意のタンパク質を含んでいてもよい。ある典型的な実施形態は、骨格タンパク質として細菌タンパク質チオレドキシン - A を利用してもよく、可変ループは、還元性活性部位（野生型タンパク質における - C y s - G l y - P r o - C y s - ループ）内に挿入され、2つのシステイン側鎖はジスルフィド架橋を形成することができる。したがって、本明細書に記載の A s p R S ポリペプチドおよび / またはそれらの細胞性結合パートナーに結合するペプチドアプタマーが含まれる。ペプチドアプタマー選択は、酵母ツーハイブリッド系を含む、当技術分野において公知の異なる系を使用して実行することができる。

40

【0207】

上記に述べられるように、本発明の A s p R S ポリペプチドおよび結合剤は、本明細書に記載の診断上の、薬剤発見の、または治療上の方法のいずれかにおいて使用することができる。

【0208】

本発明の他の実施形態では、本発明のモノクローナル抗体などの結合剤は、対象の 1 つ

50

または複数の作用物質にカップルされてもよい。例えば、治療剤は、適したモノクローナル抗体に直接または間接的に（例えばリンカー基を介して）カップルされてもよい（例えば共有結合されてもよい）。それぞれが他方と反応することができる置換基を有する場合、作用物質および抗体の間の直接的な反応は可能である。例えば、一方の上にあるアミノ基またはスルフヒドリル基などの求核基は、無水物もしくは酸ハロゲン化物などのカルボニル含有基とまたは他方の上にある好適な脱離基（例えばハロゲン化物）を含有するアルキル基と反応することができてよい。

【0209】

その代わりに、リンカー基を介して治療剤および抗体をカップルすることは望ましい可能性がある。リンカー基は、結合能力に対する干渉を避けるために作用物質と抗体の距離を置くために、スペーサーとして機能することができる。リンカー基はまた、作用物質または抗体上の置換基の化学反応性を増加させ、したがって、カップリング効率を増加させる役割を果たすことができる。化学反応性における増加はまた、作用物質または作用物質上の官能基の使用を促進してもよく、これは、他の場合には可能とならないであろう。

【0210】

ホモおよびヘテロ官能性の両方の様々な二官能性または多官能性試薬（Pierce Chemical Co.、Rockford、ILのカatalogに記載のものなど）が、リンカー基として利用されてもよいことは、当業者らに明らかであろう。カップリングは、例えば、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、または酸化炭水化物残基を通してもたらされてもよい。そのような方法論を記載している多数の参考文献、例えば、R 20
odwellらに対する米国特許第4,671,958号がある。

【0211】

本発明の免疫複合体の抗体部分が遊離する場合に、治療剤がより強力となる場合、細胞の中へのインターナリゼーションの間にまたはその際に切断可能なリンカー基を使用することは望ましい可能性がある。多くの異なる切断可能なリンカー基が記載されている。これらのリンカー基からの作用物質の細胞内放出についてのメカニズムは、ジスルフィド結合の還元による（例えば、Spittlerに対する米国特許第4,489,710号）、感光性結合の照射による（例えば、Senterらに対する米国特許第4,625,014号）、誘導体化されたアミノ酸側鎖の加水分解による（例えば、Kohnらに対する米国特許第4,638,045号）、血清補体媒介性の加水分解による（例えば、R 30
odwellらに対する米国特許第4,671,958号）、および酸触媒加水分解による（例えば、Blattlerらに対する米国特許第4,569,789号）切断を含む。

【0212】

抗体に1つを超える作用物質をカップルすることは望ましい可能性がある。一実施形態では、複数の分子の作用物質が、1つの抗体分子にカップルされる。他の実施形態では、1つを超えるタイプの作用物質が、1つの抗体にカップルされてもよい。特定の実施形態には関係なく、1つを超える作用物質とのイムノコンジュゲートは、様々な方法において調製されてもよい。例えば、1つを超える作用物質は、抗体分子に直接カップルされてもよく、または付加のための複数の部位を提供するリンカーを使用することができる。

【0213】

製剤および投与

本発明の組成物（例えばポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体など）は、一般に、単独でまたは1つもしくは複数の他の治療法と組み合わせて、細胞、組織、または動物への投与のために、薬学的に許容できるまたは生理学的に許容できる溶液中で製剤される。所望の場合、本発明の組成物は、その上、例えば他のタンパク質もしくはポリペプチドまたは様々な薬学的に活性の作用物質などの他の作用物質と組み合わせて投与されてもよいことが理解されるであろう。組成物中に含まれていてもよい他の成分に対する制限は事実上ない、ただし、さらなる作用物質が、本発明のAspRSポリペプチドにより達成されることとなる、所望の、所望の効果に悪影響を及ぼさないことを条件とする。

【0214】

10

20

30

40

50

本発明の医薬組成物において、薬学的に許容できる賦形剤および担体溶液の製剤は、例えば経口、非経口、静脈内、鼻腔内、頭蓋内、および筋肉内の投与および処方を含む様々な治療レジメンにおいて本明細書に記載の特定の組成物を使用するための、適した投薬および治療レジメンの開発のように、当業者らに周知である。

【0215】

ある適用では、本明細書において開示される医薬組成物は、経口投与を介して被験体に送達されてもよい。そのため、これらの組成物は、不活性の希釈剤もしくは吸収できる食用の担体と共に製剤されてもよく、またはそれらは、ハードもしくはソフトシェルゼラチンカプセル中に包まれてもよく、またはそれらは、圧縮されて錠剤にされてもよく、またはそれらは、食事の食糧と共に直接取り込まれてもよい。

10

【0216】

ある状況では、例えば米国特許第5,543,158号；米国特許第5,641,515号、および米国特許第5,399,363号（それぞれ、その全体が参照によって本明細書において明確に組み込まれる）に記載のように、本明細書において開示される医薬組成物を非経口的に、静脈内に、筋肉内に、またはさらに腹腔内で送達することは望ましいであろう。遊離塩基または薬理学的に許容できる塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水において調製されてもよい。分散液も、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物中であらゆる油中で調製されてもよい。保存および使用の通常の条件下で、これらの調製物は、微生物の成長を予防するために防腐剤を含有する。

20

【0217】

注射可能な使用に適した医薬形態は、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射剤または分散液の即時の調製のための滅菌粉末剤を含む（その全体が参照によって本明細書において明確に組み込まれる米国特許第5,466,468号）。すべての場合で、形態は、滅菌であるべきであり、容易な注射可能性（*syringability*）が存在する程度まで流動性であるべきである。それは、製造および保存の条件下で安定性であるべきであり、細菌および菌類などの微生物の汚染作用に対して保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、その適した混合物、ならびに/または植物油を含有する溶剤または分散媒とすることができる。例えば、適切な流動性は、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合に必要なとされる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持されてもよい。微生物の作用の予防は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって促進することができる。多くの場合では、等張作用物質、例えば糖または塩化ナトリウムを含むことは望ましいであろう。注射可能な組成物の吸収の延長は、吸収を遅らせる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物における使用によってもたらすことができる。

30

【0218】

水溶液中での非経口投与のために、例えば、必要ならば、溶液は、適切に緩衝されるべきであり、液体の希釈剤は、最初に、十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張にされるべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、利用することができる滅菌水性媒体は、本発明の開示に照らして当業者らに公知になるであろう。例えば、一投薬量は、1mlの等張NaCl溶液中で溶解されてもよく、1000mlの皮下注入液に追加されてもよく、または注入が提案される部位に注射されてもよい（例えばRemington's Pharmaceutical Sciences、第15版、1035~1038頁および1570~1580頁を参照されたい）。投薬量におけるいくつかの変動は、治療されている被験体の状態に依存して必ず生じるであろう。投与の担当者は、いかなる場合も、個々の被験体についての適切な用量を決定するであろう。さらに、ヒト投与については、調製物は、滅菌性、発熱性、および一般的な安全性ならびにFDA Office of Biol

40

50

ogics standardによって必要とされる純度基準を満たすべきである。

【0219】

滅菌注射剤は、必要とされるように、上記に列挙される様々な他の成分と共に、適切な溶剤において必要とされる量で活性化化合物を組み込み、その後続く滅菌ろ過によって調製することができる。一般に、分散液は、基本的な分散媒および上記に列挙されるものからの、必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクルの中に様々な滅菌活性成分を組み込むことによって調製される。滅菌注射剤の調製物についての滅菌粉末剤の場合には、調製の好ましい方法は、その予め滅菌ろ過した溶液から活性成分の粉末および任意のさらなる所望の成分が得られる真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0220】

本明細書において開示される組成物は、中性または塩の形態で製剤されてもよい。薬学的に許容できる塩は、例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸により形成される酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基により形成される）を含む。遊離カルボキシル基により形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基ならびにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基から誘導することができる。処方に際して、溶液は、投薬処方と適合するように治療上有効な量で投与されるであろう。製剤は、注射剤、薬剤放出カプセルなどの様々な剤形で容易に投与される。

【0221】

本明細書において使用されるように、「担体」は、任意のおよびすべての溶剤、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、バッファー、担体溶液、懸濁剤、コロイドなどを含む。医薬活性物質についてのそのような培地および作用物質の使用は、当技術分野において周知である。任意の通常の媒体または作用物質が活性成分と不適合である場合を除いて、治療組成物におけるその使用が企図される。補足の活性成分も、組成物の中に組み込むことができる。

【0222】

語句「薬学的に許容できる」は、ヒトに投与された場合にアレルギーまたは類似する好ましくない反応をもたらさない分子要素および組成物を指す。活性成分としてタンパク質を含有する水性組成物の調製物は、当技術分野において十分に理解されている。典型的に、そのような組成物は、液体溶液または懸濁剤として注射液として調製される；液体中での溶解または懸濁に適した固体形態も、注射に先立って、調製することができる。その調製物はまた、乳化することもできる。

【0223】

ある実施形態では、医薬組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および/または他のエアロゾル送達ビヒクルによって送達されてもよい。鼻エアロゾルスプレーを介して肺に遺伝子、ポリヌクレオチド、およびペプチド組成物を直接送達するための方法は、例えば米国特許第5,756,353号および米国特許第5,804,212号（それぞれ、その全体が参照によって本明細書において明確に組み込まれる）において記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂を使用する薬剤の送達（Takenagaら、1998年）およびリソホスファチジル-グリセロール化合物（その全体が参照によって本明細書において明確に組み込まれる米国特許第5,725,871号）も、医薬の技術分野において周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン（polytetrafluoroethylene）支持マトリックスの形態をした口腔粘膜薬剤送達は、米国特許第5,780,045号（その全体が参照によって本明細書において明確に組み込まれる）において記載されている。

【0224】

ある実施形態では、送達は、適した宿主細胞の中への本発明の組成物の導入のために、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、マイクロスフェア、脂質粒子、小胞などの使用によって生じてもよい。特に、本発明の組成物は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェ

10

20

30

40

50

ア、ナノ粒子などにおいて被包される送達のために製剤されてもよい。そのような送達ビヒクルの製剤および使用は、公知の通常の技術を使用して実行することができる。

【0225】

本発明の組成物を含むキット

本発明は、他の態様では、本明細書に記載のように、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、多ユニット複合体、その組成物などの1つまたは複数が充填された1つまたは複数の容器を含むキットを提供する。キットは、そのような組成物を使用するための方法についての書面の説明書を含むことができる（例えば細胞シグナル伝達、血管新生、癌、炎症性の状態などを調整するための）。

【0226】

本明細書におけるキットは、1つまたは複数のさらなる治療剤または治療されている徴候に適しているもしくは所望である他の成分を含んでいてもよい。所望の場合、さらなる治療剤は、第2の容器中に含有されてもよい。さらなる治療剤の例は、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、血管新生剤などを含むが、これらに限定されない。

【0227】

本明細書におけるキットはまた、1つまたは複数の注射器または意図されるモードの送達（例えばステント、移植可能なデポ剤など）を促進するのに必要なまたは所望される他の成分を含むこともできる。

【0228】

使用法

本発明の実施形態はまた、診断上の、薬剤発見の、および/または治療上の目的のためにAspRS組成物または本明細書に記載の「作用物質」を使用するための方法を含む。AspRS「作用物質」という用語は、AspRSポリヌクレオチド、AspRSポリペプチド、結合剤、および本明細書に記載の他の化合物を一般に指す。診断上の目的のために、AspRS作用物質は、異なる細胞型もしくは異なる細胞の状態を区別するためにまたは関連する疾患もしくは状態を有する被験体を同定するためになどのように、様々な非限定的な方法において使用することができる。薬剤発見の目的のために、AspRS作用物質は、AspRSポリペプチドの1つもしくは複数の細胞性「結合パートナー」を同定するために、AspRSポリペプチドの1つもしくは複数の「非標準的な」活性を特徴付けるために、その結合パートナー（複数可）とのAspRSポリペプチドの相互作用に選択的にもしくは非選択的に刺激するもしくはそれに拮抗する作用物質を同定するために、および/またはAspRSポリペプチドの1つもしくは複数の「非標準的な」活性に選択的にもしくは非選択的に刺激するもしくはそれに拮抗する作用物質を同定するために使用することができる。治療上の目的のために、本明細書において提供されるAspRS作用物質または組成物は、下記に詳述される、様々な疾患または状態を治療するために使用することができる。

【0229】

A. 診断

上記に述べられるように、本明細書に記載のAspRS作用物質は、診断アッセイにおいて使用することができる。これらの実施形態は、AspRSポリヌクレオチド配列（複数可）または1つもしくは複数の新しく同定されたAspRSタンパク質断片の対応するポリペプチド配列（複数可）もしくはその部分の検出を含む。ある実施形態では、1つまたは複数の新しく同定されたAspRS配列の存在またはレベルは、1つまたは複数の細胞型または細胞の状態と関連または相関する。したがって、上記に述べられるように、AspRS配列の存在またはレベルは、異なる細胞型または異なる細胞の状態を区別するために使用することができる。AspRS配列の存在またはレベルは、ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドベースの診断法に従って検出することができる。

【0230】

本明細書において提供されるある種の方法は、細胞、組織、または被験体の状態または状態を特徴付けるためにかつそれと他の細胞、組織、または被験体を区別するために、A

10

20

30

40

50

s p R S 配列の発現差異に依存する。非限定的な例は、異なる種の細胞または組織、異なる組織または器官の細胞、新生児および成人などの細胞発生段階、細胞分化状態、健常である、罹患している、および治療されているなどの状態、初代細胞培養物および不死化細胞培養物などの他の細胞培養物に加えての細胞内および細胞外画分を区別するために、生物学的試料において A s p R S 配列の存在またはレベルを検出するための方法を含む。

【0231】

発現差異は、適切なコントロールにおける同じ配列の発現レベルと比較した、A s p R S ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列における1つまたは複数の遺伝子発現レベルの統計的有意差を一般に指す。統計的有意差は、RNAレベル、タンパク質レベル、タンパク質機能、または本明細書に記載のものなどの遺伝子発現の任意の他の関連する手段によって測定されるような、発現レベルにおける増加または減少に関するものであってもよい。

10

【0232】

結果は、偶然生じそうもない場合、典型的に、統計的に有意な、と言われる。試験または結果の有意レベルは、従来より、f r e q u e n t i s t 統計学的仮説検定の概念に関する。単純な場合では、統計的有意差は、帰無仮説が実際に真実である場合に帰無仮説を棄却するために決定を下す確率として定義されてもよい（第I種過誤または「偽陽性決定」として公知の決定）。この決定は、p 値を使用して下されることが多い：p 値が有意レベル未満である場合、帰無仮説は棄却される。p 値が小さいほど、結果はより有意となる。ベイズの因子も、統計的有意差を決定するために利用されてもよい（例えばG o o d m a n S . , A n n I n t e r n M e d 130巻：1005～13頁、1999年を参照されたい）。

20

【0233】

より複雑であるが、実際に重要な場合では、試験または結果の有意レベルは、帰無仮説が実際に真実である場合に帰無仮説を棄却するために決定を下す確率が、指定された確率以下となる分析を反映してもよい。この種の分析は、棄却することを決定する確率が、帰無仮説内に包含される仮定のいくつかのセットについての有意レベルよりもはるかに小さくてもよいそれらの応用を可能にする。

【0234】

ある典型的な実施形態では、統計的に有意な発現差異は、所与のA s p R S 配列の発現レベルが、適切なコントロールと比較して、疑われている生物学的試料において、発現における、中間の整数および小数点をすべて含む（例えば1 . 2 4 x、1 . 2 5 x、2 . 1 x、2 . 5 x、6 0 . 0 x、7 5 . 0 xなど）約1 . 2 x、1 . 3 x、1 . 4 x、1 . 5 x、1 . 6 x、1 . 7 x、1 . 8 x、1 . 9 x、2 . 0 x、2 . 2 x、2 . 4 x、2 . 6 x、2 . 8 x、3 . 0 x、4 . 0 x、5 . 0 x、6 . 0 x、7 . 0 x、8 . 0 x、9 . 0 x、1 0 . 0 x、1 5 . 0 x、2 0 . 0 x、5 0 . 0 x、1 0 0 . 0 x以上の差異をもたらす状況を含んでいてもよい（つまり、より高いまたはより低い発現であってもよい発現差異）。ある実施形態では、統計的に有意な発現差異は、所与のA s p R S 配列の発現レベルが、適切なコントロールと比較して、疑われている生物学的試料において、発現における、中間の整数および小数点をすべて含む、少なくとも約4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0、1 0 0 0パーセント（%）以上の差異をもたらす状況を含んでいてもよい（つまり、より高いまたはより低い発現であってもよい発現差異）。

30

40

【0235】

さらなる例として、発現差異はまた、本明細書において記載され、当技術分野において公知であるように、Z 検定を実行して、つまり絶対的Z スコアを計算して決定されてもよい（実施例1を参照されたい）。Z 検定は、試料平均および母平均の間の有意差を同定するために典型的に利用される。例えば95%の信頼区間で（つまり5%有意レベルで）標

50

準正規表（例えばコントロール組織）と比較して、1.96を超える絶対値を有するZスコアは、非偶然性を示す。99%の信頼区間については、絶対的Zが2.58を超える場合、それは、 $p < .01$ を意味し、差異はより有意である - 帰無仮説はより大きな確信をもって棄却することができる。これらおよび関係する実施形態では、中間の小数点をすべて含む（例えば10.1、10.6、11.2など）1.96、2、2.58、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20以上の絶対的Zスコアは、統計的有意差の強い基準を提供してもよい。ある実施形態では、6を超える絶対的Zスコアは、例外的に高い統計的有意差を提供してもよい。

【0236】

実質的な類似度は、生物学的試料および参照コントロールの間の発現レベルにおける統計的有意差の欠如に一般に関する。実質的に類似する発現レベルの例は、所与のSSCIGSの発現レベルが、参照試料と比較して、疑われている生物学的試料において、発現における、中間の小数点をすべて含む（例えば、1.5x、0.25x、0.35xなど）約0.05x、0.1x、0.2x、0.3x、0.4x、0.5x、0.6x、0.7x、0.8x、0.9x、1.0x、1.1x、1.2x、1.3x、または1.4x未満の差異をもたらす状況を含んでいてもよい（つまり、より高いまたはより低い発現であってもよい発現差異）。ある実施形態では、発現差異は、所与のAspRS配列の発現レベルが、参照試料と比較して、疑われている生物学的試料において、発現における、中間の小数点をすべて含む約0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50パーセント（%）未満の差異をもたらす状況を含んでいてもよい（つまり、より高いまたはより低い発現であってもよい発現差異）。

【0237】

AspRSポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の発現レベルを測定するためにAffymetrix Microarrayを使用する場合などのある実施形態では、発現差異はまた、典型的に、1000の計られた中間発現値を用いて、Affymetrix Microarrayスーツ5ソフトウェア（Affymetrix、Santa Clara、CA）または他の類似するソフトウェアによって集計された平均発現値によって決定されてもよい。

【0238】

本発明の実施形態は、異なる生物または種の細胞、組織、または他の生物学的試料を区別するために、AspRSポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列またはその部分の存在またはレベルを検出するための方法であって、その配列の存在またはレベルは、選択される生物または種と関連する方法を含む。一般的な例は、ヒトならびに細菌、菌類、植物、および他の非ヒト動物の任意の組合せを区別する方法を含む。ヒトならびに魚類、両生類、爬虫類、鳥類、および非ヒト哺乳類などの脊椎動物ならびに昆虫、軟体類、甲殻類、およびサンゴなどの無脊椎動物を含む、脊椎動物および無脊椎動物の任意の組合せを区別するための方法が動物内に含まれる。アフリカトガリネズミ目、ハネジネズミ目、管歯目、イワダヌキ目、長鼻目、カイギュウ目、被甲類、有毛目（Pilosa）、ツバメ目、皮翼目、霊長類、げっ歯類、ウサギ目、ハリネズミ目（Erinaceomorpha）、トガリネズミ目（Soricomorpha）、翼手目、有鱗目、クジラ目、食肉目、奇蹄目、または偶蹄目からヒトおよび非ヒト哺乳類の任意の組合せを区別するための方法が、非ヒト哺乳類内に含まれる。当技術分野において公知である、とりわけサル、類人猿、ゴリラ、およびチンパンジーが霊長目内に含まれる。したがって、本明細書に記載のAspRSポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列または変異体の存在またはレベルは、生物のパネルなどのように、これらの生物の任意の組合せを区別することによって、またはヒトおよび任意の1つもしくは複数のこれらの生物を区別することによって、細胞、組織、または器官などの所与の生物学的試料の供給源を同定するために使用されてもよい。ある実施形態では、所与の生物学的試料の供給源はまた、AspRS配列または

その部分の存在またはレベルを、予め決定された値と比較することによって決定されてもよい。

【0239】

本発明の実施形態は、異なる組織または器官に起源する細胞または他の生物学的試料を区別するために、A s p R S ポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列またはその部分の存在またはレベルを検出するための方法を含む。非限定的な例は、皮膚（例えば真皮、表皮、皮下の層）、毛包、神経系（例えば脳、脊髄、末梢神経）、聴覚系または平衡器官（例えば内耳、中耳、外耳）、呼吸器系（例えば鼻、気管、肺）、胃食道組織、胃腸系（例えば口、食道、胃、小腸、大腸、直腸）、血管系（例えば心臓、血管、および動脈）、肝臓、胆嚢、リンパ/免疫系（例えばリンパ節、リンパ濾胞、脾臓、胸腺、骨髄）、尿生殖系（例えば腎臓、尿管、膀胱、尿道、頸、ファローピウス管、卵巣、子宮、外陰、前立腺、尿道球腺、精巣上体、前立腺、精嚢、精巣）、筋骨格系（例えば骨格筋、平滑筋、硬骨、軟骨、腱、靱帯）、脂肪組織、乳房、および内分泌系（例えば視床下部、脳下垂体、甲状腺、膵臓、副腎）の任意の組合せに起源する細胞または他の生物学的試料を区別するための方法を含む。したがって、本明細書に記載のA s p R S ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の結合に基づいて、これらの方法は、細胞または他の生物学的試料が由来する組織または器官を同定し、または特徴付けるために使用されてもよい。

10

【0240】

本発明の実施形態は、細胞の発生または分化状態を区別し、または特徴付けるために、A s p R S ポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列またはその部分の存在またはレベルを検出するための方法を含む。生殖細胞、幹細胞、および体細胞を区別するための方法も含まれる。発生段階の例は、新生児および成人を含む。細胞分化状態の例は、全能細胞、多能性細胞、多分化能前駆幹細胞、および成熟し、完全に分化した細胞の間の目立たない、同定可能なステージのすべてを含む。

20

【0241】

全能細胞は、全可能性を有し、典型的に、有性および無性生殖の間に生じ、胞子および接合体を含むが、ある実例において、細胞は脱分化し、全能性を取り戻すことができる。多能性細胞は、内胚葉（内側の胃内臓、胃腸管、肺）、中胚葉（筋肉、硬骨、血液、尿生殖）、ならびに外胚葉（表皮組織および神経系）を含む3つの胚葉のいずれかに分化するための可能性を有する幹細胞を含む。多分化能前駆細胞は、限られた数の組織型に典型的に分化することができる。多分化能細胞の例は、限定を伴うことなく、赤血球、白血球、および血小板などの免疫細胞を生じさせる、骨髄に由来する造血幹細胞（成体幹細胞）、間質細胞、脂肪細胞、および様々なタイプの骨細胞を生じさせる、骨髄に由来する間葉系幹細胞（成体幹細胞）、様々なタイプの皮膚細胞および分化した筋組織に寄与する筋肉衛星細胞（前駆細胞）を生じさせる、上皮幹細胞（前駆細胞）を含む。したがって、特定のA s p R S ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の存在またはレベルは、コントロールまたは所定のレベルと比較して、上記に述べられる細胞分化状態を区別し、または特徴付けるために使用することができる。

30

【0242】

本発明の実施形態は、状態または細胞、組織、器官、またはその状態が、健常である、罹患している、罹患している危険性がある、または治療されていると見なされてもよい被験体の特徴付けるまたは診断するために、A s p R S ポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列の存在またはレベルを検出するための方法を含む。そのような診断上の目的については、用語「診断上の」または「診断される」は、病的状態の存在もしくは性質を同定すること、そのような状態を発症する危険性の特徴付けること、および/または療法に応じた病的状態の変化（もしくは不変）を測定することを含む。診断上の方法は、それらの感度および特異性において異なってもよい。ある実施形態では、診断アッセイの「感度」は、試験して陽性となる、罹患した細胞、組織、または被験体の百分率を指す（「真陽性」のパーセント）。アッセイによって検出されない罹患した細胞、組織、または被験体は、典型的に「偽陰性」と言われる。罹患しておらず、アッセイにおいて試験して陰性と

40

50

なる細胞、組織、または被験体は、「真陰性」と称されてもよい。ある実施形態では、診断アッセイの「特異性」は、(1) マイナス偽陽性率のひとつ、として定義されてもよく、「偽陽性」率は、その疾患を有さず、試験して陽性となるそれらの試料または被験体の割合として定義される。特定の診断上の方法が状態の決定的な診断を提供しなくてもよいが、方法が診断を支援する陽性の徴候を提供する場合、十分である。

【0243】

ある実例では、病的状態の存在またはそれを発症する危険性は、適したコントロールと比較して増加したまたは減少したレベルによってに関わらず、状態と相関する1つまたは複数の選択されるA s p R Sポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列またはその部分の存在またはレベルを比較することによって診断することができる。「適したコントロール」または「適切なコントロール」は、細胞または組織または生物の他の生物学的試料、例えば、状態の非存在などの正常な特色を示す、例えばコントロールまたは正常な細胞、組織、もしくは生物において決定された値、レベル、特徴、特質、または特性を含む。ある実施形態では、「適したコントロール」または「適切なコントロール」は、予め決められた値、レベル、特徴、特質、または特性である。他の適したコントロールは、当業者らに明らかになるであろう。疾患と状態の例は、本明細書において別記される。

10

【0244】

本発明の実施形態は、A s p R Sポリヌクレオチドまたは核酸ベースの検出技術を含み、これは、検出の感度によりある種の利点を提供する。したがって、ある実施形態は、診断上の方法またはアッセイの一部としてA s p R Sポリヌクレオチドの使用または検出に関する。A s p R Sポリヌクレオチドの存在および/またはレベルは、とりわけノーザンブロット法などのハイブリダイゼーションアッセイ、定量的もしくは定質的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、定量的もしくは定質的逆転写酵素PCR(RT-PCR)、マイクロアレイ、ドットもしくはスロットブロット、または蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)などのインサイツハイブリダイゼーションを含む、当技術分野において公知の任意の方法によって測定されてもよい。ある種のこれらの方法は、より詳細に下記に記載される。

20

【0245】

DNAおよびRNAなどのA s p R Sポリヌクレオチドは、Kingston、(2002年Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc.、NY、NY(例えば、NelsonらProc Natl Acad Sci U S A、99巻:11890~11895頁、2002年によって記載されるように、これを参照されたい)および他に記載のものなどの、当技術分野において公知の技術を使用して、血液、生体液、組織、器官、細胞株、または他の関連する試料から収集および/または生成することができる。

30

【0246】

相補的DNA(cDNA)ライブラリーは、Ausubelら(2001年Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc.、NY、NY); Sambrookら(1989年Molecular Cloning、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Plainview、NY); Maniatisら(1982年Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratory、Plainview、NY)および他に記載のものなどの、当技術分野において公知の技術を使用して生成することができる。

40

【0247】

ある実施形態は、A s p R Sポリヌクレオチド配列を検出するためのハイブリダイゼーション法を使用してよい。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイを行うための方法は、当技術分野において十分に開発されている。ハイブリダイゼーションアッセ

50

イの手段および体調は、適用に依存して変動するであろう、また、Maniatisら Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版 Cold Spring Harbor, N.Y., 1989年); Bergerおよび Kimmel Methods in Enzymology, 152巻、Guide to Molecular Cloning Techniques (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987年); Youngおよび Davis, P.N.A.S., 80巻: 1194頁 (1983年)において言及されるものを含む、公知の一般的な結合方法に従って選択される。繰り返され、制御されるハイブリダイゼーション反応を実行するための方法および装置は、それぞれ、参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第5,871,928号、第5,874,219号、第6,045,996号、および第6,386,749号、第6,391,623号において記載されている。

10

20

30

40

50

【0248】

ある実施形態は、AspRSポリヌクレオチド配列を検出するための核酸増幅方法を利用してよい。用語、「増幅」または「核酸増幅」は、意図される特異的な標的核酸配列の少なくとも1つの部分を含有する標的核酸の複数のコピーの産生を指す。複数のコピーは、アンプリコンまたは増幅産物と言われてもよい。ある実施形態では、増幅された標的は、完全な標的遺伝子配列（イントロンおよびエクソン）未満のものまたは発現された標的遺伝子配列（エクソンおよびフランキング非翻訳配列のスプライス転写物）を含有する。例えば、特異的なアンプリコンは、標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズし、その内部の位置からポリメリゼーションを始める増幅プライマーを使用し、標的ポリヌクレオチドの一部を増幅することによって産生されてもよい。好ましくは、増幅された部分は、様々な周知の方法のいずれかを使用して検出されてもよい、検出可能な標的配列を含有する。

【0249】

本明細書において使用される「選択的増幅」または「特異的増幅」は、本発明による標的核酸配列の増幅を指し、標的配列の検出可能な増幅は、試験されている被験体の核酸試料によって提供される標的配列の増幅に実質的に限られており、他のいくつかの試料源、例えば増幅反応の間に使用される試薬または増幅反応が実行される環境中に存在する混入物質によって提供される標的核酸配列によって提供されない。

【0250】

「増幅条件」によって、本発明に従って核酸増幅を可能にする条件を意味する。増幅条件は、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」ほどストリンジェントでなくてもよい。本発明の増幅反応において使用されるオリゴヌクレオチドは、増幅条件下で、それらの意図される標的とハイブリダイズするが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズしてもハイブリダイズしなくてもよい。他方では、本発明の検出プローブは、典型的にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。本発明に従って核酸増幅を実行するための許容できる条件は、利用される増幅の特定の方法に依存して当業者によって容易に確認することができる。

【0251】

核酸増幅の多くの周知の方法は、交互に、二本鎖核酸を変性させ、かつプライマーをハイブリダイズするために熱サイクリングに必要とするが、核酸増幅の他の周知の方法は、等温である。一般にPCRと言われるポリメラーゼ連鎖反応（米国特許第4,683,195号；第4,683,202号；第4,800,159号；第4,965,188号）は、標的配列のコピー数を指数関数的に増加させるために、変性、反対の鎖へのプライマー対のアニール、およびプライマー伸長の複数のサイクルを使用する。RT-PCRと呼ばれるバリエーションでは、逆転写酵素（RT）は、mRNAから相補的DNA（cDNA）を作製するために使用され、次いで、cDNAは、DNAの複数のコピーを産生するためにPCRによって増幅される。

【0252】

上記に述べられるように、用語「PCR」は、標的核酸種を選択的に増幅する複数の増幅サイクルを指す。定量的PCR(qPCR)、リアルタイムPCR、逆転写PCR(RT-PCR)が含まれ、定量的逆転写PCR(qRT-PCR)は、当技術分野において十分に記載されている。用語「ppPCR」は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応を指し、用語「qRT-PCR」は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を指す。qPCRおよびqRT-PCRは、標的とされるcDNA分子を増幅し、同時に定量化するために使用されてもよい。それは、選択されたAspRS遺伝子または転写物などのcDNAプールにおいて特異的配列の検出および定量化の両方を可能にする。

【0253】

用語「リアルタイムPCR」は、PCRにおいて、すべての二本鎖(ds)DNAに結合するようにDNA結合色素を使用し、色素の蛍光を引き起こしてもよい。そのため、PCRの間のDNA産物の増加は、蛍光強度の増加をもたらし、各サイクルで測定され、したがって、DNA濃度を定量化するのを可能にする。しかしながら、SYBRグリーンなどのdsDNA色素は、すべてのdsDNA PCR産物に結合するであろう。蛍光は、リアルタイムPCRサーモサイクラーにおいて検出され、測定され、産物の指数関数的な増加に相当するその幾何学的な増加は、各反応における閾値サイクル(「Ct」)を決定するために使用される。

【0254】

用語「Ctスコア」は、閾値サイクル数を指し、これは、PCR増幅が閾値レベルを超えたサイクルである。試料において特定の遺伝子についてのより多量のmRNAがある場合、それは、増幅することとなる、より多くの出発RNAがあるので、発現が低い遺伝子よりも早く閾値に交差するであろう。そのため、低Ctスコアは、試料において高遺伝子発現を示し、高Ctスコアは、低遺伝子発現を示す。

【0255】

ある実施形態は、一般にLCRと言われるリガーゼ連鎖反応(Weiss, R. 1991年、Science 254巻: 1292頁)を利用してもよく、これは、標的核酸の近接する領域とハイブリダイズする2セットの相補的DNAオリゴヌクレオチドを使用する。DNAオリゴヌクレオチドは、熱変性、ハイブリダイゼーション、およびライゲーションの繰り返しのサイクルにおいてDNAリガーゼによって共有結合され、検出可能な二本鎖のライゲーションされたオリゴヌクレオチド産物を産生する。

【0256】

ある実施形態では、マイクロアレイ分析(Han, M.ら、Nat Biotechnol, 19巻: 631~635頁、2001年; Bao, P.ら、Anal Chem, 74巻: 1792~1797頁、2002年; Schenaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93巻: 10614~19頁、1996年; および Hellerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94巻: 2150~55頁、1997年)ならびにSAGE(遺伝子発現の連続的分析)を含む他の技術は、特定のcDNAライブラリーに由来する転写物のRNA転写物を評価するために使用されてもよい。MPSSのように、SAGEは計数的であり、桁は、MPSSなどの技術から入手可能であるものよりも少ないが、多くのシグネチャ配列を生成することができる(例えばVelculescu, V. E.ら、Trends Genet, 16巻: 423~425頁、2000年; Tuteja R. および Tuteja N. Bioprocess, 2004年Aug; 26巻(8号): 916~22頁を参照されたい)。

【0257】

ある実施形態では、用語「マイクロアレイ」は、基質に結合された複数の核酸を有する「核酸マイクロアレイ」および別々に検出可能である複数の結合された核酸のそれぞれへのハイブリダイゼーションを含む。基質は、固体または多孔性、平面状または非平面状、一元的または広範囲のものとすることができる。核酸マイクロアレイは、いわゆる、Sc

10

20

30

40

50

hena (編)、DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series)、Oxford University Press (1999年); Nature Genet. 21巻(1号)(補足): 1~60頁(1999年); Schena(編)、Microarray Biochip: Tools and Technology、Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000年)におけるデバイスをすべて含む。核酸マイクロアレイは、例えば、Brennerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97巻(4号): 1665~1670頁(2000年)に記載のように、複数の核酸が、一元的な平面状の基質上ではなく、複数のビーズ上に配置される、基質に結合された複数の核酸を含んでいてもよい。核酸マイクロアレイの例は、これらの開示が参照によって組み込まれる米国特許第6,391,623号、第6,383,754号、第6,383,749号、第6,380,377号、第6,379,897号、第6,376,191号、第6,372,431号、第6,351,712号、第6,344,316号、第6,316,193号、第6,312,906号、第6,309,828号、第6,309,824号、第6,306,643号、第6,300,063号、第6,287,850号、第6,284,497号、第6,284,465号、第6,280,954号、第6,262,216号、第6,251,601号、第6,245,518号、第6,263,287号、第6,251,601号、第6,238,866号、第6,228,575号、第6,214,587号、第6,203,989号、第6,171,797号、第6,103,474号、第6,083,726号、第6,054,274号、第6,040,138号、第6,083,726号、第6,004,755号、第6,001,309号、第5,958,342号、第5,952,180号、第5,936,731号、第5,843,655号、第5,814,454号、第5,837,196号、第5,436,327号、第5,412,087号、および第5,405,783号において見つけれられてもよい。

【0258】

さらなる例は、ブランド名GeneChip(商標)の下でAffymetrix(Santa Clara, Calif.)から市販で入手可能な核酸アレイを含む。アレイを製造および使用するためのさらに典型的な方法は、例えば米国特許第7,028,629号;第7,011,949号;第7,011,945号;第6,936,419号;第6,927,032号;第6,924,103号;第6,921,642号;および第6,818,394号において提供される。

【0259】

アレイおよびマイクロアレイに関する本発明はまた、固体基質に付加されたポリマーについての多くの使用を企図する。これらの使用は、遺伝子発現モニタリング、プロファイリング、ライブラリースクリーニング、遺伝子型同定、および診断を含む。遺伝子発現モニタリング法およびプロファイリング法ならびに遺伝子発現モニタリングおよびプロファイリングに有用な方法は、米国特許第5,800,992号、第6,013,449号、第6,020,135号、第6,033,860号、第6,040,138号、第6,177,248号、および第6,309,822号において示されている。そのため、遺伝子型同定およびその使用は、米国10/442,021、10/013,598(米国特許出願第2003/0036069号)ならびに米国特許第5,925,525号、第6,268,141号、第5,856,092号、第6,267,152号、第6,300,063号、第6,525,185号、第6,632,611号、第5,858,659号、第6,284,460号、第6,361,947号、第6,368,799号、第6,673,579号、および第6,333,179号において示されている。本明細書において開示される方法と組み合わせて使用されてもよい核酸増幅、標識、および分析の他の方法は、米国特許第5,871,928号、第5,902,723号、第6,045,996号、第5,541,061号、および第6,197,506号において具体化され

ている。

【0260】

当業者らに明らかであるように、ある実施形態は、本明細書に記載のように、増幅または検出のために、プライマーまたはプローブなどのオリゴヌクレオチドを使用してもよい。オリゴヌクレオチドの設計および配列は、本明細書に記載のそれらの機能に依存しているが、いくつかの変数が一般に考慮に入れられる。最も関連するものの中には、長さ、融解温度（ T_m ）、特異性、系における他のオリゴヌクレオチドとの相補性、G/C含有率、ポリピリミジン（T、C）またはポリプリン（A、G）のストレッチ、および3'末端配列がある。

【0261】

そのため、ある実施形態は、試料における標的A s p R Sポリヌクレオチドを検出するための方法であって、典型的に、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載の参照A s p R Sポリヌクレオチドの配列を含み、a) 試料における標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を含むプローブと試料をハイブリダイズするステップであって、このプローブは、前述のプローブおよび前述の標的ポリヌクレオチドまたはその断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、前述の標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするステップならびにb) 前述のハイブリダイゼーション複合体の存在または非存在を検出し、任意選択で、存在する場合、その量を検出するステップを含む方法を含む。試料における標的A s p R Sポリヌクレオチドを検出するための方法であって、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載のように参照A s p R Sポリヌクレオチドの配列を含み、a) 標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅するステップおよびb) 前述の増幅された標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在または非存在を検出し、任意選択で、存在する場合、その量を検出するステップを含む方法も含む。

【0262】

本発明の実施形態は、抗体ベースの検出技術を含む、様々なA s p R Sポリペプチドベースの検出技術を含む。典型的に被験体に由来する細胞または他の生物学的試料において選択されるA s p R Sポリペプチドを検出または定量するために診断上の方法および組成物において次いで使用されてもよい抗体または他の結合剤を生成するためのA s p R Sポリペプチドの使用が、これらの実施形態において含まれる。

【0263】

ある実施形態は、ウェスタンブロット法および免疫沈降、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ（E L I S A）、フローサイトメトリー、ならびに免疫蛍光アッセイ（I F A）などの標準的な方法論を利用してもよい。これらの周知の方法は、典型的に、本発明の選択されるA s p R SポリペプチドまたはそのA s p R Sポリペプチドの特有の領域に特異的に結合し、一般に、完全長A s p R Sポリペプチドなどの他のA s p R Sポリペプチドに有意に結合しない、本明細書に記載の1つまたは複数のモノクローナルまたはポリクローナル抗体を利用する。ある実施形態では、A s p R Sポリペプチドの特有の領域は、新しく同定された代替スプライス変異体またはタンパク質分解断片などのタンパク質断片の特有のスプライスジャンクションまたは特定の三次元構造によってコードされてもよい。

【0264】

ある実施形態は、「マイクロアレイ」などの「アレイ」を利用してもよい。ある実施形態では、「マイクロアレイ」はまた、基質に結合された収集物または複数のポリペプチドを有し、複数の結合されたポリペプチドのそれぞれへの結合が別々に検出可能な「ペプチドマイクロアレイ」または「タンパク質マイクロアレイ」を指してもよい。その代わりに、ペプチドマイクロアレイは、本明細書に記載のA s p R Sポリペプチドの結合を特異的に検出することができる、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ファージディスプレイ結合剤、酵母2ハイブリッド結合剤、およびアプタマーを含むが、これらに限定されない複数の結合剤を有していてもよい。例えば、アレイは、Robinsonら、Nature Medicine 8巻（3号）：295～301頁（2002年）に記載のように、これらのA s p R Sポリペプチドの自己抗体検出に基づくものであってもよい。ペ

プチドアレイの例は、それぞれが参照によって組み込まれる W O 0 2 / 3 1 4 6 3、W O 0 2 / 2 5 2 8 8、W O 0 1 / 9 4 9 4 6、W O 0 1 / 8 8 1 6 2、W O 0 1 / 6 8 6 7 1、W O 0 1 / 5 7 2 5 9、W O 0 0 / 6 1 8 0 6、W O 0 0 / 5 4 0 4 6、W O 0 0 / 4 7 7 7 4、W O 9 9 / 4 0 4 3 4、W O 9 9 / 3 9 2 1 0、および W O 9 7 / 4 2 5 0 7、ならびに米国特許第 6, 2 6 8, 2 1 0 号、第 5, 7 6 6, 9 6 0 号、および第 5, 1 4 3, 8 5 4 号において見つけられてもよい。

【 0 2 6 5 】

ある実施形態は、M S または診断上で A s p R S ポリペプチド配列を検出する、他の分子ベースの方法を利用してよい。質量分析法 (M S) は、試料または分子の元素組成を決定するための分析技術を一般に指す。M S はまた、ペプチドおよび他の化学化合物などの分子の化学構造を決定するために使用されてもよい。

10

【 0 2 6 6 】

一般に、M S の原理は、化学化合物をイオン化して、電荷分子または分子断片を生成し、次いで、それらの質量電荷比を測定することからなる。例示的な M S の手段では、試料は M S 機器に装填され、気化を受け、試料の成分は、様々な方法のうちの 1 つによってイオン化され (例えば電子ビームとそれらを衝突させることによって)、これにより正電荷粒子の形成がもたらされ、次いで、陽イオンは、磁界によって加速され、計算は、それらが電磁場を通過する時のイオンの運動についての詳細および前のステップにおいて m/z に従ってソートされたイオンの検出に基づいて、粒子の質量電荷比 (m/z) について実行される。

20

【 0 2 6 7 】

例示的な M S 機器は 3 つのモジュールを有する：気相試料分子をイオンに変換する (またはエレクトロスプレーイオン化法の場合には、溶液中に存在するイオンを気相の中に移動させる) イオン源、電磁場を印加することによってそれらの質量によってイオンをソートする質量分析器；およびインジケータ数量の値を測定し、したがって、存在するそれぞれのイオンの存在量を計算するためのデータを提供する検出器。

【 0 2 6 8 】

M S の技術は、定質的および定量的な使用の両方を有し、未知の化合物を同定すること、分子における元素の同位体組成を決定すること、およびその断片化を観察することによって化合物の構造を決定することを含む。他の用途は、試料における化合物の量を定量化することまたは気相イオン化学の基礎 (真空におけるイオンおよび中性物質の化学的性質) を研究することを含む。したがって、M S 技術は、生物学的試料における本発明の A s p R S ポリペプチドの存在またはレベルを測定するためおよびそれらのレベルをコントロール試料または予め決定された値と比較するために、本明細書において提供される方法のいずれかに従って使用されてもよい。

30

【 0 2 6 9 】

B . 化合物および治療剤の発見

ある実施形態は、典型的に、参照 A s p R S の非標準的な活性の 1 つまたは複数を調整する作用物質を同定するための、薬剤発見における A s p R S ポリペプチドまたは A s p R S ポリヌクレオチド参照配列の使用に関する。例えば、ある実施形態は、A s p R S ポリペプチドと結合し、その 1 つまたは複数の非標準的な活性に関与する、細胞タンパク質または他の宿主分子などの、A s p R S 参照ポリペプチドまたは A s p R S 参照配列を含むポリペプチドの 1 つまたは複数の「結合パートナー」を同定するための方法を含む。A s p R S ポリペプチドおよび / またはその細胞性結合パートナーの 1 つまたは複数と相互作用することによってなどのように、A s p R S 参照ポリペプチドまたはその活性変異体の非標準的な活性を刺激するかまたはそれに拮抗する化合物 (例えばポリペプチド) または他の作用物質を同定するための方法も含まれる。

40

【 0 2 7 0 】

そのため、ある実施形態は、A s p R S 参照ポリペプチドの結合パートナーを同定するための方法であって、a) 適した条件下で生物学的試料と A s p R S ポリペプチドを組み

50

合わせるステップ、およびb) 結合パートナーへのA s p R S ポリペプチドの特異的な結合を検出し、それによって、A s p R S 参照ポリペプチドに特異的に結合する結合パートナーを同定するステップを含む方法を含む。A s p R S 参照ポリペプチドまたはA s p R S ポリペプチドの結合パートナーに特異的に結合する化合物をスクリーニングするための方法であって、a) 適した条件下で、少なくとも1つの試験化合物と、ポリペプチドまたは結合パートナーを組み合わせるステップ、およびb) 試験化合物へのポリペプチドまたは結合パートナーの結合を検出し、それによって、ポリペプチドまたはその結合パートナーに特異的に結合する化合物を同定するステップを含む方法も含まれる。ある実施形態では、化合物は、ポリペプチドまたはペプチドである。ある実施形態では、化合物は、小分子または他の(例えば非生物学的)化学化合物である。ある実施形態では、化合物は、ペプチドミメティックである。

10

【0271】

タンパク質間相互作用を検出するのに適した任意の方法は、A s p R S 参照ポリペプチドと相互作用する、1つもしくは複数のその細胞性結合パートナーと相互作用し、またはその両方である細胞タンパク質を同定するために使用されてもよい。利用されてもよい従来の方法の例は、A s p R S ポリペプチドと相互作用する溶解物におけるタンパク質を主として同定するための、細胞溶解物または細胞溶解物から得られるタンパク質の免疫共沈降、架橋、および勾配またはクロマトグラフィーカラムを通しての同時精製を含む。

【0272】

これらのおよび関係する実施形態では、A s p R S ポリペプチドまたはその結合パートナーと相互作用するタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部分は、エドマン分解法を介してなどのように、当業者らに周知の技術を使用して確認することができる。例えばC reighton Proteins: Structures and Molecular Principles、W. H. Freeman & Co.、N. Y.、34 49頁、1983年を参照されたい。得られるアミノ酸配列は、そのようなタンパク質をコードする遺伝子配列をスクリーニングするために使用することができるオリゴヌクレオチド混合物の生成のためのガイドとして使用されてもよい。スクリーニングは、本明細書において記載され、当技術分野において公知であるように、例えば、標準的なハイブリダイゼーションまたはPCR技術によって達成されてもよい。オリゴヌクレオチド混合物の生成およびスクリーニングの技術は、周知である。例えばAusubelらCurrent Protocols in Molecular Biology Green Publishing Associates and Wiley Interscience、N. Y.、1989年;およびInnisら編PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, Inc.、New York、1990年を参照されたい。

20

30

【0273】

さらに、方法は、結合パートナーまたは他のポリペプチドをコードする遺伝子の同時の同定において利用されてもよい。これらの方法は、例えば、標識A s p R S タンパク質または他のポリペプチド、ペプチド、もしくは融合タンパク質、例えば変異体A s p R S ポリペプチドまたはマーカー(例えば酵素、蛍光、発光タンパク質、もしくは色素)またはIg-Fcドメインに融合されたA s p R S ドメインを使用して、ラムダgt11ライブラリーを探索する抗体の周知の技術に類似する方法で、発現ライブラリーを探索することを含む。

40

【0274】

インビボにおいてタンパク質相互作用を検出する1つの方法は、2ハイブリッド系である。この系の例は、記載されており(C hienら、PNAS USA 88巻:9578 9582頁、1991年)、C lonte ch(Palo Alto、Calif.)から市販で入手可能である。ある実例では、2ハイブリッド系または他のそのような方法論は、「ベイト」遺伝子産物と相互作用するタンパク質について活性化ドメインライブ

50

ラリーをスクリーニングするために使用されてもよい。限定としてではなく例として、A s p R S 参照ポリペプチドまたは変異体は、ベイト遺伝子産物として使用されてもよい。A s p R S 結合パートナーも、「ベイト」遺伝子産物として使用されてもよい。全ゲノム配列またはc D N A 配列は、活性化ドメインをコードするD N A に融合される。このライブラリーおよびD N A 結合ドメインに融合されたベイトA s p R S 遺伝子産物のハイブリッドをコードするプラスミドは、酵母レポーター株の中に同時形質転換され、結果として生じる形質転換体は、レポーター遺伝子を発現するものについてスクリーニングされる。

【0275】

酵母においてR N A タンパク質相互作用の検出を可能にする3ハイブリッド系も含まれる。例えばH o o k ら、R N A . 1 1 巻：227～233頁、2005年を参照されたい。したがって、これらのおよび関係する方法は、A s p R S ポリペプチドの細胞性結合パートナーを同定するために使用することができる。これらのおよび関係する方法はまた、A s p R S ポリペプチド、その細胞性結合パートナー、またはその両方と相互作用する結合剤または核酸などの他の化合物を同定するために使用することができる。

【0276】

上記に述べられるように、単離されると、結合パートナーは、同定することができ、次に、それが相互作用するタンパク質または他の化合物を同定するために標準的な技術と共に使用することができる。したがって、ある実施形態は、A s p R S 参照ポリペプチドの結合パートナーに特異的に結合する化合物をスクリーニングするための方法であって、a) 適した条件下で、少なくとも1つの試験化合物と、結合パートナーを組み合わせるステップ、およびb) 試験化合物への結合パートナーの結合を検出し、それによって結合パートナーに特異的に結合する化合物を同定するステップを含む方法に関する。ある実施形態では、試験化合物は、ポリペプチドである。ある実施形態では、試験化合物は、小分子化合物またはペプチドミメティックなどの化学化合物である。

【0277】

ある実施形態は、A s p R S 参照ポリペプチドの活性を調整する化合物をスクリーニングするための方法であって、a) ポリペプチドの活性に許容的な条件下で少なくとも1つの試験化合物とポリペプチドを組み合わせるステップ、b) 試験化合物の存在下においてポリペプチドの活性を評価するステップ、およびc) 試験化合物の存在下におけるポリペプチドの活性を試験化合物の非存在下におけるポリペプチドの活性と比較するステップを含み、試験化合物の存在下におけるポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調整する化合物を示す方法を含む。

【0278】

ある実施形態は、A s p R S 参照ポリペプチドの結合パートナーの活性を調整する化合物をスクリーニングするための方法であって、a) 結合パートナーの活性に許容的な条件下で少なくとも1つの試験化合物とポリペプチドを組み合わせるステップ、b) 試験化合物の存在下において結合パートナーの活性を評価するステップ、およびc) 試験化合物の存在下における結合パートナーの活性を試験化合物の非存在下における結合パートナーの活性と比較するステップを含み、試験化合物の存在下における結合パートナーの活性の変化は、結合パートナーの活性を調整する化合物を示す方法を含む。典型的に、これらのおよび関係する実施形態は、A s p R S ポリペプチドまたはその結合パートナーに関連する、選択される非標準的な活性を評価することを含む。細胞培養条件などのインビトロおよびインビボにおける条件が含まれる。

【0279】

ある実施形態は、A s p R S 参照ポリペプチドまたはその活性断片もしくは変異体の完全なまたは部分的なアゴニストとしての有効性について化合物をスクリーニングするための方法であって、a) ポリペプチドを含む試料を化合物に曝露するステップ、およびb) 典型的にA s p R S ポリペプチドの非標準的な活性の増加を測定することによって、試料におけるアゴニスト活性を検出するステップを含む方法を含む。ある方法は、a) A s p R S ポリペプチドの結合パートナーを含む試料を化合物に曝露するステップ、およびb)

典型的に A s p R S ポリペプチドの、選択される非標準的な活性の増加を測定することによって、試料におけるアゴニスト活性を検出するステップを含む。ある実施形態は、方法によって同定されるアゴニスト化合物および薬学的に許容できる担体または賦形剤を含む組成物を含む。

【0280】

A s p R S 参照ポリペプチドの完全なまたは部分的なアンタゴニストとしての有効性について化合物をスクリーニングするための方法であって、a) ポリペプチドを含む試料を化合物に曝露するステップ、および b) 典型的に A s p R S ポリペプチドの非標準的な活性の減少を測定することによって、試料におけるアンタゴニスト活性を検出するステップを含む方法も含まれる。ある方法は、a) A s p R S ポリペプチドの結合パートナーを含む試料を化合物に曝露するステップ、および b) 典型的に A s p R S ポリペプチドの、選択される非標準的な活性の減少を測定することによって、試料におけるアンタゴニスト活性を検出するステップを含む。ある実施形態は、方法によって同定されるアンタゴニスト化合物および薬学的に許容できる担体または賦形剤を含む組成物を含む。

10

【0281】

ある実施形態では、インビトロ系は、A s p R S 参照配列またはその結合パートナーと相互作用し、またはそれを調整することができる化合物を同定するように設計されてもよい。そのような系によって同定されるある種の化合物は、例えば、経路の活性を調整する際におよび経路それ自体の成分を作り出す際に有用であってもよい。それらはまた、経路の成分の間の相互作用を破壊する化合物を同定するためにスクリーニングにおいて使用されてもよく、またはそのような相互作用を直接破壊してもよい。典型的な1つのアプローチは、2つが相互作用し、結合し、したがって、反応混合物から取り出すことができるおよび/またはその中で検出することができる複合体を形成することを可能にするのに十分な条件下でおよび時間で、A s p R S ポリペプチドおよび試験化合物の反応混合物を調製することを含む。

20

【0282】

インビトロスクリーニングアッセイは様々な方法において行うことができる。例えば、A s p R S ポリペプチド、細胞性結合パートナー、または試験化合物(複数可)は、固相上に固定することができる。これらのおよび関係する実施形態では、結果として生じる複合体は、反応の終わりに固相上に捕捉され、検出されてもよい。そのような方法の一実施例では、A s p R S ポリペプチドおよび/またはその結合パートナーは、固体表面上に固定され、固体表面上の成分によるそれらの捕捉を検出することができるように、固定されていない試験化合物(複数可)は、直接または間接的に標識されてもよい。他の実施例では、試験化合物(複数可)は、固体表面に固定され、固定されていない A s p R S ポリペプチドおよび/またはその結合パートナーは、標識されるまたはいくつかの方法において検出可能である。ある実施形態では、マイクロタイタープレートは、固相として好都合に利用されてもよい。固定された成分(または試験化合物)は、非共有結合または共有結合によって固定されてもよい。非共有結合は、タンパク質の溶液を用いて固体表面を単にコーティングし、乾燥することによって達成されてもよい。その代わりに、固定されることとなるタンパク質に特異的な固定された抗体、好ましくは、モノクローナル抗体は、固体表面にタンパク質を固定するために使用されてもよい。表面は、予め調製され、保存されてもよい。

30

40

【0283】

典型的なアッセイを行うために、固定されていない成分は、固定された成分を含有するコーティング表面に典型的に追加される。反応が完了した後に、反応しなかった成分は、形成されたあらゆる特異的な複合体が固体表面上に固定されたまま残る条件下で除去される(例えば洗浄によって)。固体表面上に固定された複合体の検出は、多くの方法において達成することができる。例えば、予め固定されていない成分が予め標識される場合、表面上に固定された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。予め固定されていない成分が予め標識されない場合、間接的な標識は、例えば、予め固定されていない成分に特

50

異的な標識抗体を使用して表面上に固定された複合体を検出するために使用することができる（抗体は、次に、直接標識されても、標識抗 I g 抗体を用いて間接的に標識されてもよい）。

【0284】

その代わりに、試験化合物の結合の存在または非存在は、例えば表面プラズモン共鳴（S P R）および指標としての共鳴角度の変化を使用して、決定することができ、A s p R S ポリペプチドまたは細胞性結合パートナーは、通常の方法に従って、市販で入手可能なセンサチップ（例えば、B i a c o r e（商標）によって製造される）の表面上に固定され、試験化合物は、それと接触し、センサチップは、特定の角度からの特定の波長の光を照射される。試験化合物の結合はまた、A s p R S ポリペプチドまたは細胞性結合パートナーが、質量分析計に適応可能なタンパク質チップの表面上に固定される方法によって、試験化合物に相当するピークの出現を検出することによって測定することができ、試験化合物は、それと接触し、M A L D I - M S、E S I - M S、F A B - M Sなどのイオン化法は、質量分析計（例えば、二重収束質量分析計、四重極質量分析計、飛行時間型質量分析計、フーリエ変換質量分析計、イオンサイクロトロン質量分析計など）と組み合わせられる。

10

【0285】

ある実施形態では、細胞ベースのアッセイ、膜小胞ベースのアッセイ、または膜画分ベースのアッセイは、選択されるA s p R S ポリペプチドの非標準的な経路において相互作用を調整する化合物を同定するために使用することができる。この目的のために、A s p R S ポリペプチドおよび/または結合パートナーまたはそのようなタンパク質のドメインもしくは断片を含有する融合タンパク質（またはその組合せ）を発現する細胞株またはそのようなタンパク質（複数可）または融合タンパク質（複数可）を発現するために遺伝子的に遺伝子操作された細胞株（例えばC O S細胞、C H O細胞、H E K 2 9 3細胞、H e L a細胞など）を使用することができる。非標準的な活性に影響を及ぼす試験化合物（複数可）は、コントロールまたは所定の量と比較したその活性における変化（例えば統計的に有意な変化）をモニターすることによって同定することができる。

20

【0286】

アンチセンス作用物質およびR N A i作用物質に関する実施形態については、例えば、A s p R S参照ポリヌクレオチドの発現を改変する際の有効性について化合物をスクリーニングするための方法であって、a) A s p R S参照ポリヌクレオチドを含む試料を、可能性のあるアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの化合物に曝露するステップ、およびb) A s p R Sポリヌクレオチドの発現の改変を検出するステップを含む方法も含まれる。ある非限定的な実施例では、これらのおよび関係する実施形態は、当技術分野におけるルーチン的な技術に従って、細胞ベースのアッセイにおいてまたは無細胞翻訳アッセイにおいて利用することができる。そのような方法によって同定されるアンチセンス作用物質およびR N A i作用物質も含まれる。

30

【0287】

ハイスループットスクリーニング（H T S）に適している上記の方法または当技術分野において公知の他のスクリーニング法のいずれも含まれる。H T Sは、典型的に、候補化合物のライブラリーに対するアッセイ、例えば、本明細書に記載の、非標準的な活性の増加または減少を測定するアッセイのスクリーニングを実行するために自動化を使用する。

40

【0288】

C．治療の方法

他の態様では、本発明は、本明細書に記載の組成物を用いて細胞、組織、または被験体を治療するために本発明の組成物を使用するための方法に関する。本発明によって調整されてもよい細胞または組織は、好ましくは哺乳類細胞またはより好ましくはヒト細胞である。そのような細胞は、健常な状態または罹患した状態のものとすることができる。

【0289】

したがって、A s p R Sポリペプチド、A s p R Sポリヌクレオチド、A s p R Sポリ

50

ヌクレオチドベースのベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびRNAi作用物質ならびにペプチド、抗体、および抗原結合断片などの結合剤、ペプチドミメティック、ならびに他の小分子を含む、本明細書に記載のAspRS作用物質は、参照AspRSの非標準的な活性と関連する様々な非限定的な疾患または状態を治療するために使用することができる。そのような非標準的な活性の例は、細胞増殖の調整、細胞移動の調整、細胞分化（例えば造血）の調整、アポトーシスまたは細胞死の他の形態の調整、細胞シグナル伝達の調整、血管新生の調整、細胞結合の調整、細胞の代謝の調整、サイトカイン産生または活性の調整、サイトカイン受容体活性の調整、炎症の調整などを含む。

【0290】

典型的に、他の場合にはその非標準的な活性を提供する、AspRSポリペプチドの特定のスプライス変異体またはAspRSポリペプチドの細胞性結合パートナーなどの標的分子の発現の低下に関する、アンチセンス療法およびRNAi干渉療法などのポリヌクレオチドベースの療法が含まれる。アンチセンス療法またはRNAi療法は、典型的に、AspRS参照ポリペプチドの発現を低下させることによってなどのように、非標準的な活性に拮抗する。AspRSポリペプチド、その細胞性結合パートナー（複数可）、またはその両方と直接相互作用することによってなどのように、AspRS参照ポリペプチドの非標準的な活性を刺激するかまたはそれに拮抗する、ポリペプチド、抗体、ペプチドミメティック、または他の小分子ベースの療法も含まれる。

10

【0291】

ある実施形態では、例えば、方法は、細胞の代謝、細胞分化、細胞増殖、細胞死、細胞動員、細胞移動、遺伝子転写、mRNA翻訳、細胞インピーダンス、サイトカイン産生などを含む、治療上関連する細胞の活性を調整するために提供され、本明細書に記載のAspRS組成物と細胞を接触させるステップを含む。したがって、AspRS組成物は、1つまたは複数のそのような活性の調整が有益である任意の細胞もしくは組織または被験体を本質的に治療するために利用されてもよい。

20

【0292】

例えば、AspRS組成物はまた、例えば新生物性疾患、免疫系疾患（例えば自己免疫疾患および炎症）、伝染病、代謝病、ニューロン/神経学的な疾患、筋/心血管疾患、異常な造血と関連する疾患、異常な血管新生と関連する疾患、異常な細胞生存と関連する疾患、ならびに他の治療または予防に関するものを含む、多くの治療上の状況のいずれかに

30

【0293】

例えば、ある例示的な実施形態では、本発明のAspRS組成物は、例えば、内皮細胞増殖および/またはシグナル伝達の調整を介して、血管新生を調整するために使用されてもよい。内皮細胞増殖および/または細胞シグナル伝達は、多くが当技術分野において公知であり、入手可能である適切な細胞株（例えばヒト微小血管内皮肺細胞（HMVEC-L）およびヒト臍静脈内皮細胞（HUEC））を使用してならびに適切なアッセイ（例えば内皮細胞移動アッセイ、内皮細胞増殖アッセイ、管形成アッセイ、マトリゲルブラグアッセイなど）を使用してモニターされてもよい。

40

【0294】

そのため、関係する実施形態では、本発明の組成物は、血管新生の調整が有益であるであろう本質的に任意の細胞または組織または被験体の治療において利用されてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、血管新生（例えば血管新生状態）を経験しているまたはそれに対して感受性である細胞または組織または被験体は、血管新生状態を阻害するために、本発明の適した組成物と接触させてもよい。他の実施形態では、不十分な血管新生（例えば血管新生抑制状態）を経験しているまたはそれに対して感受性である細胞または組織は、血管新生抑制活性に干渉し、および/または血管新生を促進するために本発明の適切な組成物と接触させてもよい。

【0295】

血管新生状態の例示的な例は、加齢黄斑変性（AMD）、癌（固形および血液の両方）

50

、発育異常（器官発生）、糖尿病性失明、子宮内膜症、眼血管新生、乾癬、関節リウマチ（RA）、ならびに皮膚変色（例えば血管腫、火炎状母斑、または単純性母斑（nevus simplex））を含むが、これらに限定されない。抗血管新生状態の例は、心血管疾患、再狭窄、虚血性組織または心不全の再灌流の後の組織損傷、慢性炎症、および創傷治癒を含むが、これらに限定されない。

【0296】

本発明の組成物はまた、自己免疫および/または炎症性疾患、状態、および障害を直接または間接的に媒介する細胞を調整することによって、抗炎症性または炎症促進性の徴候を治療するための免疫調整物質として有用であってもよい。免疫調整物質としての本発明の組成物の有用性は、例えば、移動アッセイ（例えば白血球もしくはリンパ球を使用して）

10

【0297】

「炎症」は、病原体、損傷を受けた細胞（例えば創傷）、および刺激薬などの有害な刺激に対する組織の生物学的応答を一般に指す。用語「炎症反応」は、単に例示として、とりわけ、本明細書において記載され、当技術分野において公知である免疫細胞の活性化または移動、サイトカイン産生、キニン放出、フィブリン溶解、および凝固を含む血管拡張作用を含む炎症が達成され、調節される特異的なメカニズムを指す。理想的には、炎症は、傷害性の刺激を除去し、かつ影響を受けた1つまたは複数の組織の治癒プロセスを始め

20

【0298】

慢性炎症の臨床症候は、病気の期間に、炎症性病変、原因、および影響を受けた解剖学的なエリアに依存する（例えば、Kumarら、Robbins Basic Pathology - 第8版、2009年Elsevier、London；Miller, L M、Pathology Lecture Notes、Atlantic Veterinary College、Charlottetown、PEI、Canadaを参照されたい）。慢性炎症は、例えば、とりわけ、本明細書において記載され、当技術分野において公知であるアレルギー、アルツハイマー病、貧血、大動脈弁狭窄、関節リウマチおよび変形性関節症などの関節炎、癌、うっ血性心不全、線維筋痛症、線維症、心臓発作、腎不全、狼瘡、膵炎、発作、手術合併症、炎症性肺疾患、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、神経学的障害、糖尿病、代謝障害、肥満および乾癬を含む、様々な病理学的状態または疾患と関連する。したがって、AspRS組成物は、慢性炎症を治療もしくは管理する、1つもしくは複数の個々の慢性炎症反応のいずれかを調整し、または慢性炎症と関連する任意の1つもしくは複数の疾患もしくは状態を治療するために使用されてもよい。

30

40

【0299】

ある特定の炎症反応は、サイトカイン産生および活性ならびに関係する経路を含む。例えば、ある典型的な実施形態は、この転写因子の下流の活性を増加させることによってなどのように、核因子kB（NF-kB）を通して細胞シグナル伝達を調整することに関する。ある実例では、NF-kB活性の増加は、炎症促進性サイトカイン（例えばTNF- α ）および抗炎症性サイトカイン（例えばIL-10）などのサイトカインシグナル伝達または活性の増加をもたらすことができる。

【0300】

炎症性および他の状態の症候および症状を評価するための基準は、差別的な診断をなし、また、例えば、容認された臨床基準に従って改善を決定することによって、治療有効用

50

量が治療の過程で投与されたかどうかを決定するなどのように、治療をモニターするための目的を含めて、当業者らに明らかであろう、また、例えばBerkowら編、The Merck Manual、第16版、Merck and Co.、Rahway, N. J.、1992年；Goodmanら編、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics、第10版、Pergamon Press, Inc.、Elmsford、N. Y. (2001年)；Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics、第3版ADIS Press, Ltd.、Williams and Wilkins、Baltimore, MD. (1987年)；Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston、(1985年)；Osolciら編、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Mack Publishing Co.、Easton、PA (1990年)；Katzung、Basic and Clinical Pharmacology、Appleton and Lange、Norwalk、CT (1992年)の教示によって例証される。

10

【0301】

先天免疫応答などの免疫応答を調整する方法も含まれる。本明細書において使用されるように、用語「免疫応答」は、抗原、ワクチン組成物、または免疫系の1つもしくは複数の細胞によって媒介される免疫調節性分子に対する測定可能なまたは観察可能な反応を含む。免疫応答は、免疫系細胞への抗原または免疫調節性分子の結合から典型的に始まる。抗原または免疫調節性分子に対する反応は、抗原または免疫調節性分子に最初に結合する細胞および自然、体液性、細胞性免疫応答を媒介するのに関与する細胞を含む、多くの細胞型によって媒介されてもよい。

20

【0302】

本明細書において使用される「先天免疫応答」は、tol l様受容体などの細胞表面受容体への病原体関連分子パターン(PAMP)またはAspRSポリペプチドの結合を伴ってもよい。PAMPまたは他のシグナルに応じたtol l様受容体およびIpa f -シグナル伝達経路の活性化はサイトカインおよび同時刺激分子などの免疫調節性分子の産生をもたらし、これらは、免疫応答を誘発および/または増強する。先天免疫応答に関与する細胞は、とりわけ、例えば樹状細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、および好中球を含む。

30

【0303】

ある実施形態は、先天免疫応答を増加させることに関する。他の実施形態は、先天免疫応答を減少させることに関する。ある態様では、先天免疫応答は、TLR2および/またはTLR4などの1つまたは複数のtol l様受容体(TLR)によって媒介される。本発明のある種のAspRSポリペプチドは、TLR2および/またはTLR4などのTLRに結合する。感染病原体と自己を区別し、有効な適応免疫の発生に必要なサイトカインなどの免疫調節性分子の産生を媒介するTLRは、PAMPを認識する(参照によって本明細書において組み込まれるAderem, AおよびUlevitch, R. J. Nature 406巻: 782~787頁(2000年)およびBrightbill, H. D., Immunology 101巻: 1~10頁(2000年))。tol l様受容体ファミリーのメンバーは、様々な抗原型を認識し、病原体を見分けることができる。例えば、TLR2は、様々な真菌成分、グラム陽性成分、およびマイコバクテリウム成分を認識し、TLR4は、グラム陰性産物リポ多糖(LPS)を認識し、TLR9は、細菌DNAにおけるCpGリピートなどの核酸を認識する。

40

【0304】

自然免疫を刺激するAspRS組成物(例えば、TLR2および/またはTLR4を介して)は、種々様々の状態の治療において単独でまたは他の療法と組み合わせて有用となり得る。そのような状態の特定の例は、細菌、ウイルス、および寄生虫の伝染病などの伝染

50

病を含む。自然免疫を刺激する A s p R S 組成物はまた、生きている、減弱された、または他のタイプのワクチンに関わらず、一次抗原への被験体の免疫応答を増強するためにワクチンアジュバントとして有用となり得る。

【0305】

ウイルス伝染病または感染病原体（およびそれらの対応するワクチン）の例は、とりわけ、本明細書において別記される A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、E 型肝炎、カリシウイルス関連性の下痢、ロタウイルス下痢、Haemophilus influenzae B 肺炎および侵襲性疾患、インフルエンザ、麻疹、ムンプス、風疹、パラインフルエンザ関連性の肺炎、呼吸器多核体ウイルス（RSV）肺炎、重症急性呼吸器症候群（SARS）、ヒトパピローマウイルス、単純ヘルペス 2 型外陰部潰瘍、HIV/AIDS、 Dengue 熱、日本脳炎、ダニ媒介脳炎、西ナイルウイルス関連性の疾患、黄熱病、エプスタイン - バーウイルス、ラッサ熱、クリミア - コンゴ出血熱、エボラ出血熱、マールブルク出血熱、狂犬病、リフトバレー熱、天然痘、らい病、上および下気道感染、灰白髄炎を含むが、これらに限定されない。

10

【0306】

細菌伝染病または感染病原体の例は、とりわけ、本明細書において別記される Bacillus anthracis、Borellia burgdorferi、Brucella abortus、Brucella canis、Brucella melitensis、Brucella suis、Campylobacter jejuni、Chlamydia pneumoniae、Chlamydia psittaci、Chlamydia trachomatis、Clostridium botulinum、C. difficile、C. perfringens、C. tetani、Corynebacterium diphtheriae（つまりジフテリア）、Enterococcus、Escherichia coli、Haemophilus influenza、Helicobacter pylori、Legionella pneumophila、Leptospira、Listeria monocytogenes、Mycobacterium leprae、M. tuberculosis、Mycoplasma pneumoniae、Neisseria gonorrhoea、N. meningitidis、Pseudomonas aeruginosa、Rickettsia rickettsii、Salmonella typhi、S. typhimurium、Shigella sonnei、Staphylococcus aureus、S. epidermidis、S. saprophyticus、Streptococcus agalactiae、S. pneumoniae、S. pyogenes、Treponema pallidum、Vibrio cholera、Yersinia pestis、Bordetella pertussis、中耳炎（例えば、Streptococcus pneumoniae、Haemophilus influenzae、または Moraxella catarrhalis によって引き起こされることが多い）を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0307】

寄生虫伝染病の例は、アメーバ症（例えば Entamoeba histolytica）、鉤虫病（例えば Necator americanus および Ancylostoma duodenale などの線虫の寄生虫）、リーシュマニア症、マラリア（4 種の原因寄生体 Plasmodium; P. falciparum、P. vivax、P. ovale、および P. malariae）、住血吸虫症（寄生虫 Schistosoma; S. mansoni、S. haematobium、および S. japonicum）、Onchocerca volvulus（河川盲目症）、Trypanosoma cruzi（シャガス疾患 / アメリカ睡眠病）、ならびに Dracunculus medinensis、リンパ系フィラリア症を含むが、これらに限定されない。

40

【0308】

ある種の A s p R S 組成物は、リボ多糖（LPS）などの外来抗原に対する曝露に起因

50

することが多い内毒素ショックの治療または低下において有用であってもよい。内毒素ショックは、TLRシグナル伝達によって媒介され得、天然に存在する内因性AspRS断片がTLRを刺激し得るので、本明細書において提供される、ある種の結合剤、アンチセンス作用物質、またはRNAi作用物質は、TLR2および/またはTLR4の内因性のAspRS断片を介した刺激に拮抗し、あるいはそれを低下させることによって、内毒素ショックに対して被験体をより抵抗性にしてもよい。

【0309】

免疫疾患を治療するための方法も、含まれる。本発明に従って治療されてもよい例示的な免疫系疾患、障害、または状態は、原発性免疫不全症、免疫媒介性血小板減少症、川崎症候群、骨髄移植（例えば成体または子どもにおける近時の骨髄移植）、慢性B細胞リンパ性白血病、HIV感染（例えば成人または小児のHIV感染）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー、輸血後紫斑病などを含むが、これらに限定されない。

10

【0310】

加えて、さらなる疾患、障害、および状態は、ギラン・バレー症候群、貧血（例えば、パルボウイルスB19と関連する貧血、感染症（例えば再発性感染）の高い危険性がある、安定性の多発性骨髄腫を有する患者、自己免疫溶血性貧血（例えば温暖型自己免疫溶血性貧血）、血小板減少症（例えば新生児性血小板減少症）、および免疫媒介性好中球減少症）、移植（例えば、CMV陽性器官のサイトメガロウイルス（CMV）陰性レシピエント）、低ガンマグロブリン血症（例えば感染症または病的状態についての危険因子を有する低ガンマグロブリン症の新生児）、癲癇（例えば難治性癲癇）、全身性血管炎症候群、重症筋無力症（例えば重症筋無力症における代償不全）、皮膚筋炎、ならびに多発筋炎を含む。

20

【0311】

さらなる自己免疫疾患、障害、および状態は、自己免疫溶血性貧血、自己免疫性新生児血小板減少、特発性血小板減少症紫斑病、自己免疫性血球減少症、溶血性貧血、抗リン脂質抗体症候群、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、心筋炎、再発性多発性軟骨炎、リウマチ性心疾患、糸球体腎炎（例えばIgA腎症）、多発性硬化症、神経炎、ブドウ膜炎眼炎、多発性内分泌腺症、紫斑病（例えばヘノッホシェーンライン紫斑病）、ライター病、スティフマン症候群、自己免疫肺炎症、ギラン・バレー症候群、インスリン依存型糖尿病、および自己免疫炎症性眼疾患を含むが、これらに限定されない。

30

【0312】

さらなる自己免疫疾患、障害、または状態は、自己免疫性甲状腺炎；橋本甲状腺炎ならびに例えば、細胞媒介性のおよび体液性の甲状腺の細胞毒性によって特徴付けられる甲状腺炎を含む甲状腺機能低下症；SLE（例えば循環しており、局所的に生成される免疫複合体によって特徴付けられることが多い）；グッドパスチャー症候群（例えば抗基底膜抗体によって特徴付けられることが多い）；天疱瘡（例えば表皮の棘融解抗体によって特徴付けられることが多い）；例えばグレーブス病（例えば甲状腺刺激ホルモン受容体の抗体によって特徴付けられることが多い；重症筋無力症（例えばアセチルコリン受容体抗体によって特徴付けられることが多い）などの受容体自己免疫；インスリン抵抗性（例えばインスリン受容体抗体によって特徴付けられることが多い）；自己免疫溶血性貧血（例えば抗体感作赤血球の食作用によって特徴付けられることが多い）；また自己免疫性血小板減少性紫斑病（例えば抗体感作血小板の食作用によって特徴付けられることが多い）を含むが、これらに限定されない。

40

【0313】

さらなる自己免疫疾患、障害、または状態は、関節リウマチ（例えば関節における免疫複合体によって特徴付けられることが多い）；抗コラーゲン抗体を有する強皮症（例えば核小体抗体および他の核抗体によって特徴付けられることが多い）；混合結合組織病（例えば可溶性核抗原、例えばリボ核タンパク質の抗体によって特徴付けられることが多い）；多発筋炎／皮膚筋炎（例えば非ヒストン抗核抗体によって特徴付けられることが多い）；悪性貧血（例えば抗壁細胞、抗ミクロソーム、および抗内因子抗体によって特徴付けら

50

れることが多い) ; 特発性アジソン病 (例えば体液性および細胞媒介性副腎細胞毒性によって特徴付けられることが多い) ; 不妊症 (例えば抗精子抗体によって特徴付けられることが多い) ; 糸球体腎炎 (例えば糸球体基底膜抗体または免疫複合体によって特徴付けられることが多い) ; IgA腎症による原発性糸球体腎炎 ; 水疱性類天疱瘡 (例えば基底膜におけるIgGおよび補体によって特徴付けられることが多い) ; シェーグレン症候群 (例えば多組織抗体および / または特異的な非ヒストン抗核抗体 (SS-B) によって特徴付けられることが多い) ; 糖尿病 (例えば細胞媒介性および体液性膵島細胞抗体によって特徴付けられることが多い) ; ならびに喘息または嚢胞性線維症を有するアドレナリン作動性薬物抵抗性を含むアドレナリン作動性薬物抵抗性 (例えばベータアドレナリン作動性受容体抗体によって特徴付けられることが多い) を含むが、これらに限定されない。

10

【0314】

さらなる自己免疫疾患、障害、または状態は、慢性活動性肝炎 (例えば平滑筋抗体によって特徴付けられることが多い) ; 原発性胆汁性肝硬変 (例えば抗ミトコンドリア抗体によって特徴付けられることが多い) ; 他の内分泌腺不全 (例えばいくつかの場合では特異的な組織抗体によって特徴付けられることが多い) ; 尋常性白斑 (例えば抗メラノサイト抗体によって特徴付けられることが多い) ; 血管炎 (例えば、血管壁における免疫グロブリンおよび補体ならびに / または低血清補体によって特徴付けられることが多い) ; 心筋梗塞後状態 (例えば抗心筋抗体によって特徴付けられることが多い) ; 心臓切開症候群 (例えば抗心筋抗体によって特徴付けられることが多い) ; 蕁麻疹 (例えば、IgEに対するIgGおよびIgM抗体によって特徴付けられることが多い) ; アトピー性皮膚炎 (例えば、IgEに対するIgGおよびIgM抗体によって特徴付けられることが多い) ; 喘息 (例えば、IgEに対するIgGおよびIgM抗体によって特徴付けられることが多い) ; 炎症性ミオパシー ; ならびに他の炎症性、肉芽腫性、変性、および萎縮性の障害を含むが、これらに限定されない。

20

【0315】

造血および関係する状態を調整するための方法も含まれる。本発明のAspRSポリペプチドによって調整されてもよい造血プロセスの例は、限定を伴うことなく、骨髄性細胞 (例えば赤血球系細胞、肥満細胞単球 / マクロファージ、骨髄性樹状細胞、好塩基球、好中球、および好酸球などの顆粒球、巨核球、血小板) ならびにリンパ系細胞 (例えばナチュラルキラー細胞、リンパ系樹状細胞、B細胞、およびT細胞) の形成を含む。ある種の特定の造血プロセスは、赤血球形成、顆粒球形成、リンパ球生成、巨核球生成、血小板生成、および他を含む。造血幹細胞、前駆細胞、赤血球、顆粒球、リンパ球、巨核球、および血小板を含む造血細胞の輸送または動員を調整するための方法も含まれる。

30

【0316】

造血を調整するための方法は、インビボ、インビトロ、エクスビボ、またはその任意の組合せで実行されてもよい。これらの方法は、造血幹細胞、造血前駆細胞、または造血系統 (例えば脂肪組織由来幹細胞) に沿って分化することができる他の幹細胞もしくは前駆細胞を含有する任意の生物学的試料、細胞培養物、または組織に対して実行することができる。インビトロおよびエクスビボ方法については、幹細胞および前駆細胞は、造血起源またはその他に関わらず、本明細書において記載され、当技術分野において公知である技術および特質に従って単離および / または同定することができる。

40

【0317】

他の実施形態では、本発明のAspRS組成物は、細胞の増殖および / または生存を調整するために、したがって、細胞の増殖および / または生存における異常によって特徴付けられる疾患、障害、または状態を治療または予防するために使用されてもよい。例えば、ある実施形態では、AspRS組成物は、アポトーシスを調整するためにおよび / または異常なアポトーシスと関連する疾患もしくは状態を治療するために使用されてもよい。アポトーシスは、プログラム細胞死としての公知の細胞シグナル伝達カスケードを説明するために使用される用語である。様々な治療上の徴候は、アポトーシス (例えば癌) を誘発する分子およびアポトーシスを阻害するもの (つまり発作、心筋梗塞、敗血症など) の

50

ために存在する。アポトーシスは、例えば、DNAの断片化を測定するアッセイ、膜非対称性における改変、アポトーシスカスパーゼの活性化、ならびにノまたはシトクロムCおよびAIFの放出を含む、当技術分野において公知であり、入手可能である、多くの入手可能な技術のいずれかによってモニターすることができる。

【0318】

細胞生存の増加またはアポトーシスの阻害に関連する例示的な疾患は、癌（結腸癌、心臓腫瘍、膀胱癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、膠芽腫、肺癌、腸癌、精巣癌、胃癌、神経芽腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳癌、前立腺癌、カポジ肉腫、および卵巣癌を含むが、これらに限定されない濾胞性リンパ腫、癌腫、およびホルモン依存性腫瘍など）；自己免疫障害（多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、橋本甲状腺炎、自己免疫性糖尿病、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クローン病、多発筋炎、全身性エリテマトーデス、および免疫関連性糸球体腎炎、自己免疫性胃炎、自己免疫性血小板減少性紫斑病、ならびに関節リウマチなど）、ならびにウイルス感染（ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、およびアデノウイルスなど）、炎症、移植片対宿主病（急性およびノまたは慢性）、急性移植片拒絶反応、ならびに慢性移植拒否反応を含むが、これらに限定されない。

10

【0319】

細胞生存の増加に関連する、さらなる例示的な疾患または状態は、白血病（急性白血病（例えば急性リンパ性白血病、骨髄芽球、前骨髄球、骨髄単球性、単球、および赤白血病を含む急性骨髄球性白血病）を含む）ならびに慢性白血病（例えば慢性骨髄球（顆粒球性）白血病および慢性リンパ性白血病）、骨髄異形成症候群真性赤血球増加症、リンパ腫（例えばホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、ならびに線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛膜癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、希突起神経膠腫、髄膜腫（meningioma）、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽細胞腫などの肉腫および癌腫を含むが、これらに限定されない固形腫瘍などの悪性腫瘍ならびに関係する障害の進行ならびにノまたは転移を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0320】

アポトーシスの増加に関連する例示的な疾患は、AIDS（HIV誘発性の腎症およびHIV脳炎など）、神経変性障害（アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性症、および脳腫瘍または先の関連する疾患など）、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、橋本甲状腺炎、自己免疫性糖尿病、胆汁性肝硬変、ベーチェット病、クローン病、多発筋炎、全身性エリテマトーデス、免疫関連性糸球体腎炎、自己免疫性胃炎、血小板減少性紫斑病、および関節リウマチなどの自己免疫障害、骨髄異形成症候群（再生不良性貧血など）、移植片対宿主病（急性およびノまたは慢性）、虚血性傷害（心筋梗塞、発作、および再灌流障害によって引き起こされるものなど）、肝傷害または疾患（例えば肝炎関連肝傷害、硬変、虚血ノ再灌流障害、胆汁うっ滞（cholestasis）（胆管傷害）、および肝臓癌）、毒素誘発性肝疾患（アルコールによって引き起こされるものなど）、敗血症性ショック、潰瘍性大腸炎、悪液質、ならびに食欲不振を含むが、これらに限定されない。

40

【0321】

さらなる実施形態では、本発明の組成物は、ニューロンノ神経学的な疾患または障害の治療において使用されてもよく、これらの例示的な例は、パーキンソン病、アルツハイマー病、ピック病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、交代性片麻痺、筋萎縮性側索硬化症、運動失調症、脳性小児麻痺、慢性疲労症候群、慢性疼痛症候群、先天

50

性神経学的異常、脳神経学的な疾患、せん妄、認知症、脱髄症、自律神経異常症、癲癇、頭痛、ハンチントン病、水頭症、髄膜炎、運動障害、筋肉疾患、神経系新生物、神経皮膚症候群、神経変性疾患、神経毒症候群、眼球運動障害、末梢神経系障害、脳下垂体障害、孔脳症、レット症候群、睡眠障害、脊髄障害、発作、シデナム舞蹈病、ツレット症候群、神経系外傷、および傷害などを含む。

【0322】

さらに、さらなる実施形態は、副腎脳白質ジストロフィー、クラッペ病（グロボイド細胞性ロイコジストロフィー）、異染性ロイコジストロフィー、アレキサンダー病、キャナヴァン病（海綿状白質ジストロフィー）、ペリツェウス・メルツバッハー病、コケーン症候群、ハーラー病、ロー症候群、リー病、ウィルソン病、ハレルフォルデン・スパッツ病、テイ・サックス病などの代謝障害の治療における本発明の組成物の使用に関する。代謝プロセスの調整における本発明の組成物の有用性は、例えば脂肪細胞脂質生成または脂肪細胞脂肪分解を測定するアッセイを含む、当技術分野において公知であり、入手可能である様々な技術のいずれかを使用してモニターされてもよい。

【0323】

本発明のより特定の実施形態では、本発明の A s p R S 組成物は、例えば、細胞シグナル伝達タンパク質（例えば A k t）を介して、細胞のシグナル伝達を調整するために使用されてもよい。細胞シグナル伝達は、多くの周知のアッセイのいずれかを使用してモニターされてもよい。例えば、一般的な細胞シグナル伝達事象の誘発は、様々な標的タンパク質のリン酸化パターンの改変を通してモニターすることができる。そのため、A s p R S ポリペプチドを用いる細胞の治療に応じた細胞シグナル伝達活性の検出は、異なる生物学的効果のインジケータとして役立つ。このアッセイに使用される標的タンパク質は、主要な細胞のシグナル伝達カスケードの主要成分を包含するように選択され、それによって、細胞シグナル伝達状況およびその治療上の関連性についての広範囲の状態を提供してもよい。一般に、そのようなアッセイは、A s p R S ポリペプチドを用いる細胞治療、その後続く、標的タンパク質のリン酸化（活性化）形態を特異的に検出する抗体を用いる免疫検出を伴う。

【0324】

治療上関連する細胞シグナル伝達事象のモニターのために使用される例示的な標的タンパク質は、p 3 8 M A P K（マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ；細胞のストレスおよび炎症性サイトカインによって活性化される；細胞分化およびアポトーシスを関与する）；S A P K / J N K（ストレス活性化プロテインキナーゼ / J u n アミノ末端キナーゼ；細胞のストレスおよび炎症性サイトカインによって活性化される）；E r k 1 / 2、p 4 4 / 4 2 M A P K（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ E r k 1 および E r k 2；多種多様の細胞外シグナルによって活性化される；細胞の成長および分化の調節に関与する）；ならびに A k t（インスリンおよび様々な成長因子または生存因子によって活性化される；アポトーシスの阻害、グリコーゲン合成の調節、細胞サイクル調節、および細胞成長に関与する）を含んでもよいが、これらに限定されない。チロシン残基の一般的なリン酸化も、リン酸化によって媒介される細胞シグナル伝達における変化の一般的なインジケータとしてモニターされてもよい。

【0325】

当然、細胞接着分子（例えばカドヘリン、インテグリン、クローディン、カテニン、セレクチンなど）および / またはイオンチャネルタンパク質などの他のクラスのタンパク質も、本発明の組成物によって調整される細胞の事象または活性をモニターするためにアッセイされてもよいことが認識されるであろう。

【0326】

本発明の他の特定の実施形態では、本発明の A s p R S 組成物は、細胞によって、例えば、単球および / または白血球などの免疫細胞によってサイトカイン産生を調整するために使用されてもよい。サイトカイン産生は、当技術分野において公知の多くのアッセイのいずれかを使用してモニターされてもよい（つまり R T - P C R、E L I S A、E L I S

10

20

30

40

50

p o t、フローサイトメトリーなど)。一般に、そのようなアッセイは、A s p R S ポリペプチドを用いる細胞治療、その後に続く、サイトカイン産生における変化を測定するためのサイトカインm R N Aまたはポリペプチドの検出を伴う。そのため、A s p R S ポリペプチドを用いる細胞の治療に応じたサイトカイン産生における増加および/または減少の検出は、異なる生物学的効果のインジケータとして役立つ。本発明のA s p R S ポリペプチドは、サイトカイン産生を調整することによって、免疫または炎症性応答を誘発し、増強し、および/または阻害してもよい。例えば、本発明のA s p R S ポリペプチドおよび組成物は、被験体におけるサイトカインプロファイル(つまり1型対2型)を改変するために使用されてもよい。A s p R S 組成物の生物学的効果をモニターするために測定されてもよい例示的なサイトカインは、I L - 1 r a、I L - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 10、I L - 12、I L - 12 p 40、I L - 15、I L - 18、I L - 23、T G F -、T N F -、I F N -、I F N -、I F N -、R A N T E S、M I P - 1、M I P - 1、M C P - 1、G R O -、G M - C S F、G - C S Fなどを含むが、これらに限定されない。

10

【0327】

本明細書に記載の刊行物および特許出願はすべて、あたかも、個々の刊行物または特許出願がそれぞれ参照によって組み込まれるように明確にかつ個々に示されるかのよう、参照によって本明細書において組み込まれる。

20

【0328】

先の発明は、理解を明瞭にする目的のために例示および例としてかなり詳細に記載されたが、本発明の教示に照らして、ある変化および修飾が、添付される請求項の精神または範囲から逸脱することなくなされてもよいことが当業者に容易に明らかとなるであろう。以下の実施例は、限定としてではなく例示としてのみ提供される。当業者らは、本質的に類似する結果を得るために変化させるまたは修飾することができる、様々な重大でないパラメーターを容易に認識するであろう。

【実施例】

【0329】

(実施例1)

ヒトアスパルチルT R N A合成酵素(A S P R S)断片の生成

30

配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する完全長組換えヒトA s p R Sは、発現され、ニッケルI M A Cクロマトグラフィーを使用してE . c o l iから精製した。タンパク質分解制御によってA s p R Sの断片を生成するために、完全長タンパク質は、4 ~ 12 % M O P Sまたは12 % M E Sバッファー(図1 CおよびD)において実行するS D S - P A G Eによる断片の分離の前に、30分間、42 n Mヒト好中球エラスターゼを用いて処理した。4 ~ 12 % M O P SにおけるS D S - P A G Eゲル上で実行した消化は、約19 k D aの単一のタンパク質断片のみを示した(図1 C)が、12 % M E SバッファーにおけるS D S - P A G Eゲル上で実行した消化は、3 ~ 6 k D aの少なくとも3つのさらなるより小さなペプチド断片を示した(図1 D)。

【0330】

40

(実施例2)

A S P R S断片は、内皮細胞においてA k tを活性化する

A s p R S断片のプールは、37 で、30分間、2 u g完全長組換えA s p R Sに42 n M好中球エラスターゼを追加することによって生成した。反応は、10倍過剰のプロテアーゼ中アルファ1抗トリプシン(セルピンA1)の追加によって止めた。ウシ大動脈内皮細胞(b A E C)は、好中球エラスターゼを用いて切断されなかったまたは切断された50 n M完全長A s p R Sタンパク質のプールを用いて処理した。細胞は、10および15分間、A s p R S断片と共にインキュベートし、採取し、シグナル伝達分子A k tのリン酸化(活性化)形態のみを特異的に認識する抗体と共にウエスタンブロット法にかけた。この処理により、リン酸化を介しての、A k tの強く再現可能な活性化がもたらされ

50

た（図 2 A および 2 B）。この結果は、アポトーシスの調節、グリコーゲン合成、細胞サイクル調節、および細胞成長における A k t の役割により有意となる。

【 0 3 3 1 】

（実施例 3）

A S P R S 上の好中球エラスターゼ切断部位の同定

好中球エラスターゼを用いる切断によって生成した断片（図 1 D）は、各断片についての正確な質量を決定するために L C / M S / M S を使用して分析した。さらに、個々の断片は、4 ~ 12 % M O P S または 12 % M E S バッファーにおいて実行した S D S - P A G E ゲルから切り取り、断片が生成される完全長タンパク質の部分を同定し、好中球エラスターゼに起因し得る非トリプシン切断部位を同定するために、インゲルトリプシン消化

10

【 0 3 3 2 】

【表 2】

表2-AspRSペプチド範囲

断片	全質量 (Da)	使用した プロテアーゼ	N末端境界	C末端境界
D1	19437 18370	エラスターゼ	1	154
D2	21590	エラスターゼ	1	174
D3	4367 4468	エラスターゼ	1	31
D4	3309	エラスターゼ	399	425
D5	2517	エラスターゼ	413	476
D6	3479	エラスターゼ	397	425

20

（実施例 4）

A S P R S 断片は、P B M C からの T N F - 分泌を増加させる

健常なドナーに由来する末梢血単核細胞（P B M C）は、24 時間、100 nM 用量の完全長 A s p R S タンパク質および A s p R S、D 1 の断片（表 2）を用いて処理した。P B M C からの T N F - 分泌を増加させることが公知である E M A P I I（内皮単球活性化ポリペプチド I I）は、ポジティブコントロールとして使用した。T N F - 分泌の増加は、完全長 A s p R S に応じて観察され、この増加は、E M A P I I ポジティブコントロールについて観察された大きさに類似した。しかしながら、予想外に、A s p R S の D 1 断片は、完全長 A s p R S または E M A P I I ポジティブコントロールについて観察されたものよりも約 6 倍高いレベルで、T N F - 分泌を誘発した（図 3）。したがって、A s p R S の D 1 断片は、完全長タンパク質内で概してマスクされている新しい機能を有する。

30

【 0 3 3 3 】

40

（実施例 5）

A S P R S 断片 D 1 は、完全長 A S P R S とは異なる、サイトカインのインビトロにおける分泌を誘発する

完全長 A s p R S（100 nM）または A s p R S の断片、D 1（100 nM）は、24 時間、 1×10^6 末梢血単核細胞（P B M C）と共にインキュベートした。24 時間のインキュベーションの後に、上清は、採取し、液体窒素中でスナップ凍結し、次いで、複数のサイトカインについて分析した。上清は、27 の異なるサイトカインについて測定し、バッファー処理した P B M C 上清と比較した。誤差バーは、2 つの集団比較（b i o l o g i c a l r e p l i c a t e）を示す。図 4 において示されるように、A s p R S 断片 D 1 は、完全長 A s p R S により観察される刺激を超える、多数のサイトカインの大

50

きな刺激を示した（例えばIL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、MIP-1、MIP-1、GRO-、MCP-1、およびIL-1ra）。

【0334】

（実施例6）

ASPRS断片は、単球におけるCD71マーカーアップレギュレーションを誘発する末梢血単核細胞（PBMCの）は、正常な血液ドナーから単離した。1.5 × 10⁶ PBMCは、24時間、200 nM用量のAspRS断片D1（完全長のタンパク質の最初の154アミノ酸からなる）を用いて処理した。10 μg/mLの植物レクチンフィトヘマグルチニン（PHA）を用いて処理したPBMCは、ポジティブコントロールとした。図5において示されるように、CD71増殖マーカーのアップレギュレーションは、抗CD71抗体（Beckton-Dickinson）を用いて染色し、フローサイトメトリーによって試料を分析した後に、D1処理ゲート制御単球において見られた。同じ試料のゲート制御リンパ球集団においてCD71アップレギュレーションの有意な増加はなかった。したがって、D1は、PBMC混合物における単球を活性化するための細胞型に特異的な能力を有する。

10

【0335】

（実施例7）

ASPRS断片は、単球およびマクロファージからのTNF-分泌を増加させる単球（THP-1）およびマクロファージ（RAW264.7）細胞株の両方は、100 nMのC末端にタグをつけたD1（C-D1）または完全長AspRS（C-DRS）を用いて処理した。上清は、2、4、8、および24時間に収集し、次いで、TNF-分泌について分析した。図6において示されるように、最大の量のTNF-分泌は、C-D1を用いる処理の2～4時間後に見られたが、次いで、8および24時間で減少した。C-DRSを用いる処理の後のTNF-分泌は、検査したすべての時点で無視できるものであった。C-D1を用いる処理の後のTNF-分泌の増加は、用量依存的であった。さらに、4時間の、100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、および6 nM C-D1、N-D1、およびC-DRSを用いる細胞の処理により、C-D1処理のみがTNF-分泌を増加させることが実証された。

20

【0336】

（実施例8）

DRS断片D1は、マクロファージ細胞株の走化性を誘発するインビトロにおいて細胞移動を評価するために、ポリカーボネート膜を有する24ウェルTranswellチャンバー（5 μm孔径、Costar）は、PBS中0.5 mg/mLのゼラチンを用いてコーティングし、風乾させた。脱離したRAW264.7細胞（マウス単球/マクロファージ細胞株）は、新鮮なDMEMを用いて一度洗浄し、0.1% BSA/DMEMを用いて2 × 10⁷ 細胞/mLの中に懸濁した。完全長AspRS（DRS）またはD1は、0.1% BSA/DMEMを用いて異なる濃度に希釈した。RAW264.7細胞は、ウェル当たり100 μL中2 × 10⁶ 細胞で上部のチャンバーに追加した。下部のチャンバーは、ウェル当たり500 μLの、DRSまたはD1を含有する培地を用いて充填した。37 °Cでの24時間後に、カルセインAM（Invitrogen）は、移動した細胞を染色するために8 μMの最終濃度で下部のチャンバーに追加した。30分間のインキュベーションの後に、移動しなかった細胞は、綿棒を用いて、Transwell膜の上部の表面から除去した。下部の膜表面上で移動する細胞は、高倍率視野において蛍光顕微鏡下で数えた。図7において示されるように、D1は、用量依存的に移動を誘発したが、移動は、同じ濃度の完全長AspRSによってほとんどまたは全く刺激されなかった。

30

40

【0337】

（実施例9）

ASPRS断片が誘発したTNF-分泌マクロファージはU0126によって阻害することができる

50

マクロファージ (RAW264.7) 細胞は、1時間、100 nMで、小分子阻害剤 U0126 または LY294022 を用いて予め処理し、その後、さらに4時間、50 nM の D1 または 1 ng/ml の LPS を用いる処理を続けた。上清は、収集し、TNF- 分泌について分析した。図8において示されるように、TNF- の分泌は、D1 および LPS で処理した細胞において U0126 によって阻害された。しかしながら、LY294022 は、LPS で処理した細胞における TNF- 分泌を阻害したのみであった。

【0338】

(実施例10)

ASPRS 断片 D1 は、VEGF 誘発性の血管新生を阻害する

この実験の目的は、Asprs の D1 断片の抗血管新生活性を評価することとした。D1 タンパク質は、Modified Matrigel (登録商標) プラグアッセイにおいて VEGF 誘発性の血管新生を阻害するその能力を決定するために、Matrigel (登録商標) プラグの中に直接組み込んだ。手短に言えば、実験の1日目に体重が 21 ~ 25 g あるメスの NCR ノードマウス (8匹のマウス/群) を得た。空気嚢は、27 ゲージ針を使用して、1、4、および6日目に肩甲骨の間の皮下のスペースに 1 ml の空気を注射することによって試験動物において生成した。7日目に、VEGF (Cell Sciences) + 生理食塩水、VEGF + スーテント (Pfizer Pharmaceuticals)、または VEGF + D1 タンパク質を含有する 0.5 ml Matrigel (登録商標) (VWR) は、予め生成した空気嚢の中に注射した。13日目 (移植の6日後) に、動物は安楽死させ、Matrigel (登録商標) プラグは、切り取り、写真を撮り、計量した。活性を評価するために使用する一次エンドポイントは、湿性の Matrigel (登録商標) プラグ重量の 1 mg 当たりのヘモグロビン含有率とした。図9において示されるように、D1 は、VEGF 誘発性の血管新生の阻害を引き起こした。

【0339】

(実施例11)

C末端にタグをつけた ASPRS 断片は、単球における TNF- 分泌を誘発した

単球 (THP-1) 細胞は、4時間、100 nM の C または N 末端にタグをつけた D1 または完全長 Asprs を用いて処理した。その後、上清は、収集し、TNF- 分泌について分析した。図10において示されるように、TNF- 分泌の誘発は、C末端にタグをつけた D1 を用いて処理した細胞において最も大きかった。N末端にタグをつけた D1 は、はるかに小さな応答を誘発し、D1 断片の N 末端領域が、おそらく、そのサイトカイン活性における重要な役割を果たすことを示す。他のすべての処理群は、TNF- 分泌の有意に低い誘発を有した。

【0340】

(実施例12)

ASPRS 断片 D1 は、ヒト DRS の哺乳類特異的ドメインを含有する

図11において示されるように、32 アミノ酸ペプチドは、哺乳類 DRS の N 末端にのみ見つけられ、酵母 DRS において見つからなかった。タンパク質のこの領域は、標準的な tRNA 合成酵素アミノアシル化活性に不要であり、推定上の両親媒性ヘリックスを含有することが予測される (Jacobson-Molina および Yang (1989年)、Escalante および Yang、JBC (1992年) において報告される)。そのサイトカイン活性に関しての D1 の N 末端の観察される重要性に基づいて、この特有の領域は、D1 についてここで報告されるサイトカイン活性の重要なメディエーターとなり得る。

【0341】

(実施例13)

マクロファージからの内因性 D1 断片の同定

図12Aにおいて示されるように、Asprs の断片は、LC/MS/MS プロテオミクス分析を使用して、マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) において検出した。図12Aは、RAW264.7 マウスマクロファージを SDS-PAGE 分析にかけ

るステップを示し、タンパク質バンドは、切り取り、LC MS/MSによって分析し、AspRSのN末端断片は、D1として同定した。この質量スペクトル分析は、D1断片が、AspRSホモ二量体の501残基単量体ユニットのN末端部分を含むことを示した（完全長AspRSの約残基1～171からなる）。D1断片は、ヒトAspRSのアンチコドン結合ドメインを含み（図12Bを参照されたい）、高度に類似するOBフォールドドメインを含有するEMAPIIサイトカインに対して構造的な類似度を有する。EMAPIIサイトカインは、p43において異なるドメインとして見つけられ（哺乳類細胞の多tRNA合成酵素複合体で結合するタンパク質）、アポトーシスの条件下で、それは、免疫調節性サイトカインとして役立つように切り取られ、分泌される。類似するEMAPII様のドメインは、ヒトTyRSのC末端領域において存在する。しかしながら、EMAP-IIならびにTyRSおよびp43において見つけられる相同性のドメインとは対照的に、D1は、高等真核生物においてのみ見付き、両親媒性ヘリックスを形成する、N末端に特有の22アミノ酸伸長を有する。

10

20

30

40

50

【0342】

（実施例14）

ASPRSの構造分析

D1の構造および生理学的な起源をよりよく理解するために、天然のヒトAspRSは、結晶化し、その3次元構造は、1.9 Åの分解能で決定した（図12Cを参照されたい）。D1に相当する構造の一部は、別々のOBフォールド含有ドメインを形成するが、C末端触媒ドメインは、酵母および細菌のAspRSにかなり類似している。D1断片および触媒ドメインをつなぐ残基154および182を包含するリンカーは、構造的に不規則であり、その高度な可撓性を示唆する。このリンカー領域の可撓性およびプロテアーゼへのその明らかな到達性は、内因性プロテアーゼによるその切断により天然のAspRSからD1が遊離されるはずであることを示唆した。PMNエラスターゼを用いる組換え天然ヒトAspRSの処理は、残基154でのD1の切断および完全な放出によって、この予想が確認された（実施例3を参照されたい）。

【0343】

（実施例15）

ASPRS断片D1は、サイトカインのインビボおよびインビトロにおける分泌を誘発し、免疫細胞に結合する

マクロファージは、自然免疫においてキープレイヤーであり、細胞の代謝および炎症に参与するものを含む多くのタンパク質サイトカインを産生し、分泌する。AspRSのD1断片および炎症の間の可能性のある関係を探るために、D1タンパク質（10mg/kg）は、健常なマウスに、静脈内に注射し、変化は、ビヒクルコントロールに比べた、血流の中に分泌された炎症性サイトカイン（炎症促進性および抗炎症性の両方）において測定した。ヒトおよびマウスのAspRSおよびD1が96.8%の配列同一性を有するので、組換えヒトAspRSおよびD1は、すべての研究に使用した。

【0344】

図13Aは、10mg/kg D1を静脈内に注射したマウスからのインビボにおけるTNF-αおよびIL-10の血清レベルを示す。マウスは、6時間までに直ちに除去される、2時間後のTNF-αの増加を示し、一方、IL-10レベルは増加し続ける。

【0345】

これらのインビボにおける結果を確認するために、単球およびリンパ球の両方の混合物を示し、ヒトドナーから単離されたPBMCはまた、インビトロにおいてD1タンパク質（および完全長AspRSタンパク質）に曝露し、処理に応じたTNF-αまたはIL-10の分泌について培地を試験した。インビボにおいて観察された効果に類似して、D1を用いる処理により、この混合細胞集団からのTNF-αおよびIL-10の両方の分泌がもたらされた（図13B）。効果は、D1に特異的であり、天然のAspRSでは見られず、切り取りのプロセスによって親tRNA合成酵素からこのN末端ドメインを単離する効果を示す。

【0346】

P B M C 混合物内のどの細胞が D 1 によって標的とされたかを調査するために、混合物内の細胞の異なる亜集団へのその結合を、フローサイトメトリーを使用して分析した。図 1 3 C において示されるように、単球への D 1 の強い結合が観察され、混合物における単球のほぼ 1 0 0 % に D 1 分子が結合した。対照的に、単球への天然の A s p R S の結合は検出されなかった（データ示さず）。D 1 タンパク質の結合はまた、リンパ球のサブセットについても観察された（約 1 4 %）。さらに、結合したリンパ球集団の分析により、D 1 結合が、B 細胞（全 B 細胞の約 8 0 % に結合した）および T 細胞（全 T 細胞の約 2 0 % に結合した）の両方で生じることが示された（図 1 3 C、挿入図を参照されたい）。単球およびリンパ球の両方について、効果は、D 1 に特異的であり、天然の A s p R S では見られなかった（データ示さず）。これらのデータは、免疫応答に関与する細胞に直接結合し、かつおそらく調整する際に D 1 についての役割を支持する。

10

【0347】

(実施例 1 6)

核因子 K B (N F - K B) を通しての D 1 シグナル

核因子 - k B (N F - k B) は、炎症促進性サイトカイン (T N F - のような) の転写の刺激を通して、炎症の発症において重要な役割を果たし、炎症の消散の間に、次いで、I L - 1 0 のような抗炎症性サイトカインの発現を刺激すると思われる転写因子である。N F - K B はまた、酸化ストレス、ウイルスおよび細菌の病原体、ならびに炎症性サイトカインを含む、多くの刺激に対する細胞応答を指示する際に中心的な役割を果たす。そのため、マクロファージにおける N F - K B の活性化に対する D 1 の効果を調査した。

20

【0348】

この実験のために、N F - B 誘発性の分泌胚アルカリホスファターゼレポーター遺伝子をコードする R A W - B l u e 細胞は、P B S、D 1、または完全長 A s p R S と共にインキュベートした。図 1 4 A において示されるように、処理された細胞は、完全長 A s p R S または P B S による活性化の欠如と比較して、D 1 による、N F - B の強い用量依存的な活性化を示した。

【0349】

(実施例 1 7)

D 1 は、T L R 2 および T L R 4 に結合し、それらを通してシグナル伝達する

30

N F - B は、パターン認識 t o l l 様受容体 (T L R) を含む、多くのマクロファージ細胞表面受容体を通してトリガーすることができる。T L R 受容体ファミリーへの可能性のある連結を調査するために、7つの異なる H E K 2 9 3 細胞株に、N F - B 誘発性レポーター遺伝子 (分泌胚アルカリホスファターゼをコードする) ならびに別々の t o l l 様受容体 (T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 7、T L R 8、および T L R 9) のパネルをコードする遺伝子を安定して、コトランスフェクトした。図 1 4 B において示されるように、N F - B の D 1 誘発性の活性化は、T L R 3、5、7、8、または 9 ではなく T L R 2 または T L R 4 を通してのみ観察された。

【0350】

フローサイトメトリー実験は、D 2 が T L R 2 および / または T L R 4 に結合するかどうかを確証するために利用した。これらの実験では、V 5 タグつき D 1 (1 0 0 n M) または A s p R S (1 0 0 n M) は、T L R 2 または T L R 4 を安定して発現する H E K 2 9 3 細胞と共にインキュベートした。空のベクターは、H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクトし、n u l l の結合コントロールとした。結合は、フローサイトメトリーを使用して、F I T C - V 5 検出によって評価した。図 1 4 C は、T L R 2 または T L R 4 を過剰発現する、安定してトランスフェクトされた H E K 細胞に D 1 が強く結合したことを示すが、ベクターのみを用いてトランスフェクトされ、T L R 2 または T L R 4 を発現しなかった H E K 細胞にはほとんど結合しなかった。

40

【0351】

(実施例 1 8)

50

D 1 活性における両親媒性ヘリックス

先の作業は、TLR2 および 4 についてのリガンドとしての LPS を確立した。確かに、TLR2 および 4 についてのリポド A アゴニスト (OM174) リガンドは、D 1 について観察されたもの、すなわち TNF- の一時的な放出 (1 ~ 2 時間) および IL-10 分泌の続く増加に類似する効果をインビボにおいて示した。D 1 は、EMAP- II 様の OB フォールドをコードする。D 1 のように、EMAP- II ドメインは、タンパク質分解の切断によって p43 から放出された場合、単球からの TNF- の分泌を刺激する。EMAP- II ドメインはまた、好中球上でさらなる活性を示す (ミエロペルオキシダーゼの移動および分泌を刺激する)。しかしながら、D 1 は、好中球上で作用しなかった (データ示さず)。EMAP- II および D 1 のある相違は、D 1 の最初の 22 アミノ酸内に含有される特有の両親媒性ヘリックスである。そのため、D 1 活性における両親媒性ヘリックスの役割を調査した。

10

【0352】

最初に、22 アミノ酸の全両親媒性ヘリックス領域は、22 D 1 を得るために D 1 から欠失させた。ある種の点突然変異も生成した。例えば、両親媒性ヘリックスとして、ヒト D 1 N 末端ヘリックスは、ヘリックスの一方の側に正電荷残基を、他方に負電荷残基を含有する。下等真核生物の D 1 は、両側に正電荷のわずかに長いヘリックスを有する。このヘリックスの正電荷残基は、tRNA 結合を強くすることが実証されており、コンセンサス配列 LSKKX LKKX X K (配列番号 6) は特に重要である。正電荷から両親媒性ヘリックスへのこのヘリックスの進化 (下等から高等真核生物 AspRS への進行を通して) は、3 つの高度に保存された残基の協調スイッチ (concerted switch) を介して生じ、高等真核生物において厳密に保存されているヘリックスの一方の側に負電荷のクラスターを生成する (図 4 A および B)。これらの負電荷残基が、特に EMAP- II 様の OB フォールドとの関連において、D 1 に追加される新規な 22 アミノ酸ヘリックスの活性に寄与することができることを仮定した。この可能性を探るために、置換を、負電荷高等真核生物クラスター (E12、E16、D19) の 3 つの保存残基でなし (図 15 B を参照)、その正電荷クラスター (SKK D1) を有する下等真核生物形態 (E12S、E16K、D19K) にそれらをスイッチして戻した。

20

【0353】

次いで、PBMC は、50 nm D 1、完全長 AspRS、22 突然変異体、ならびに電荷突然変異体 AAA および SKK を用いて処理した。完全な D 1 と比較して、22 D 1 は、PBMC からの TNF- または IL-10 の放出をほとんど誘発しなかった (図 15 C を参照されたい)。AAK および SKK D 1 突然変異体も、D 1 と比較して、TNF- α および IL-10 の分泌の両方について活性を低下させた (SKK について約 4 分の 1)。これらの知見は、受容体結合における N 末端両親媒性ヘリックスについての役割を示唆する。

30

【0354】

この結論をさらに支持するものとして、C 末端ではなく N 末端に V5 タグを有する N-V5-D 1 も、構築し、TNF- 放出および結合アッセイの両方において試験した。N-V5-D 1 は、PBMC に結合することもできず、PBMC から TNF- 分泌を誘発することもできなかった (データ示さず)。したがって、D 1 の活性は、N 末端でのペプチド融合により低下し得、D 1 活性における N 末端両親媒性の領域の役割をさらに支持する。

40

【0355】

(実施例 19)

D 1 活性は内毒素混入物質によらない

これらの研究において使用される組換え D 1 は、E. coli から精製し、12 EU / mg 未満の LPS 含有細菌内毒素レベルを有することが示された。それにも関わらず、LPS は、TLR2 および TLR4 シグナル伝達の強い刺激物質であり、実験は、D 1 を用いて見られる結果を担う微量内毒素のいかなる可能性も取り除くために実行した。この

50

目的のために、分泌配列と共にD1をコードする遺伝子は、トランスフェクトしたHEK293細胞において発現された。分泌されたD1を含有する条件培地は、収集し、濃縮し、PBMCと共にインキュベートした。

【0356】

図16Aにおいて示されるように、これらの培地は、TNF- α の分泌を刺激したが、ベクターのみを用いてトランスフェクトされた細胞からの培地は、分泌を刺激しなかった。さらに、D1に刺激されたTNF- α 放出は、内毒素の公知の失活剤であるポリミキシンBに影響されなかった(図16Bを参照されたい)。対照的に、また図16Bにおいて示されるように、TNF- α の分泌の、LPSにより刺激された活性化は、ポリミキシンBによって完全にブロックされた。図16Cにおいて示されるように、内毒素ではなくタンパク質を完全に消化するプロテイナーゼKを用いて処理したD1は、PBMCにおけるTNF- α 活性の完全な抑止をもたらした。そのため、D1活性は、内毒素混入物質によらない。

10

【0357】

(実施例20)

22 AspRSインビボマウスノックイン実験

AspRSの22変異体が、上記に示されるように、TLR2およびTLR4を通してのTNF- α 分泌を刺激しないので、22 AspRSノックインマウスの生成は、AspRSの標準的で不可欠なアミノアシル化活性を損なうことなく、AspRSのN末端の生理学的な効果について検討することを可能にする。最初の実験は、TLR2およびTLR4内因性リガンドとしてAspRS活性に寄与することが示された、AspRSの22領域の除去について、可能性のある保護効果を検査するものに集中する。

20

【0358】

内毒素ショック実験は、22 AspRSノックインを有するマウスが、TLR2およびTLR4についての内因性リガンドをそれらの欠如しているために、内毒素ショックに対してより抵抗性であるかどうかを試験するために実行する。この実験では、野生型および22 AspRSノックインマウスに、用量当たり200 μ Lの食塩水中D-GalN(20mg)と組み合わせたLPS(1 μ g/マウス)を腹腔内に注射する。これは、野生型マウスにおいておよそその完全な致死をもたらす内毒素ショックまたは敗血症についての一般に使用されるモデルである(Carrら、J Exp Med, 179巻: 1437~44頁、1994年を参照されたい)。内因性炎症促進性tol1様受容体リガンドを除去することによって(つまり22によって示されるAspRS領域)、マウスは内毒素ショックに誘発される致死に対して抵抗性となるはずであるということが考えられる。

30

【0359】

LPS耐性実験は、22 AspRSマウスに由来するマクロファージが、tol1様受容体シグナル伝達の脱感作の欠如によりLPS刺激に対してそれほど耐性ではないかどうかを試験するために実行する。これらのノックインマウスに由来するマクロファージは、内因性TLR2&TLR4リガンドの炎症促進性効果に対して曝露されなかったはずである(つまり22によって示されるAspRS領域)。この可能性を検査するために、野生型および22 AspRSノックインマウス腹膜マクロファージは、24時間、ELISAによって分析することができるサイトカインの活性化および産生をもたらすLPS(100ng/mL)を用いてイクスピボにおいて刺激した(Satoら、J Immunol, 165巻: 7096-101頁、2000年を参照されたい)。22 AspRSマウスに由来するマクロファージは、他の場合には耐性の誘発に寄与する炎症促進性シグナルの欠如により、LPSに対してより強い応答を示すはずである。

40

【0360】

述べたように、上記の開示は説明的で、例示的で、典型的なものであり、続く添付の請求項によって定義される範囲を限定するものとして解釈されない。

【 図 3 】

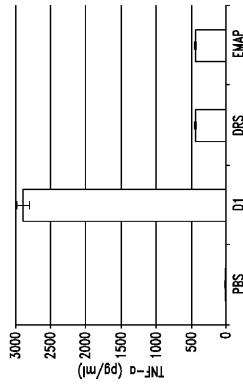


FIG. 3

【 図 4 】

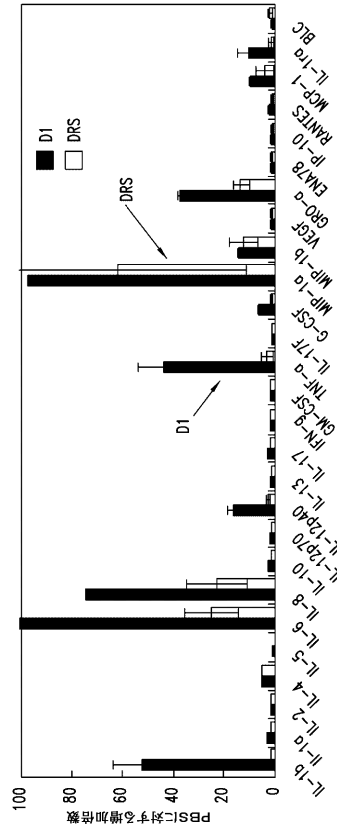


FIG. 4

【 図 6 】

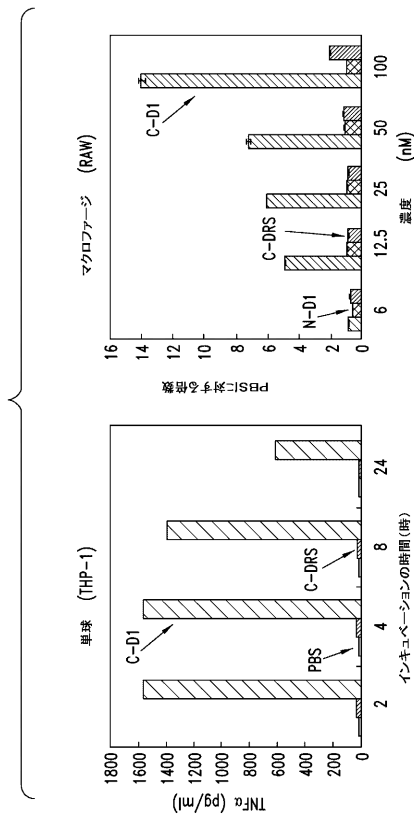


FIG. 6

【 図 8 】

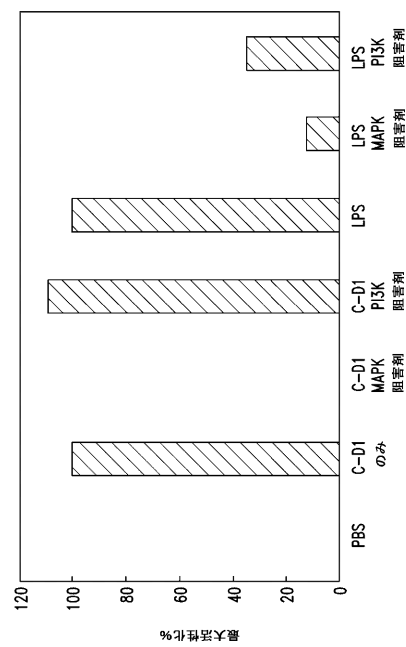


FIG. 8

【図 9】

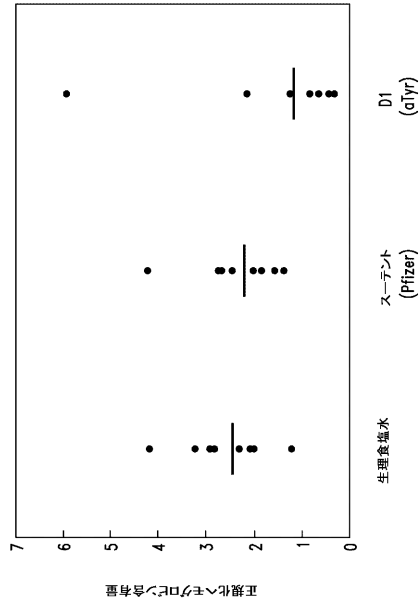


FIG. 9

【図 10】

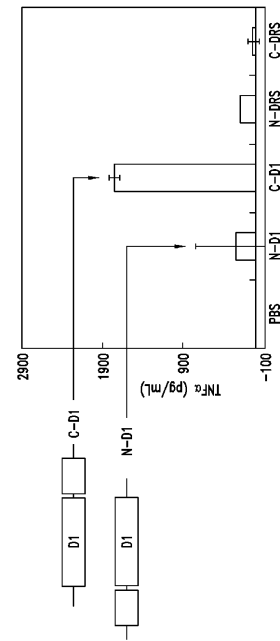


FIG. 10

【図 13】

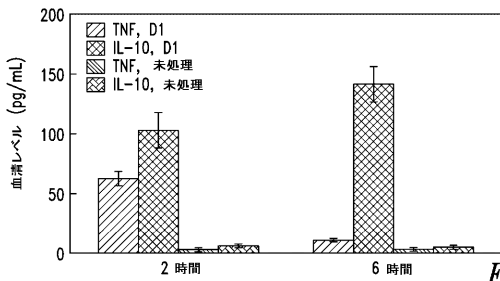


FIG. 13A

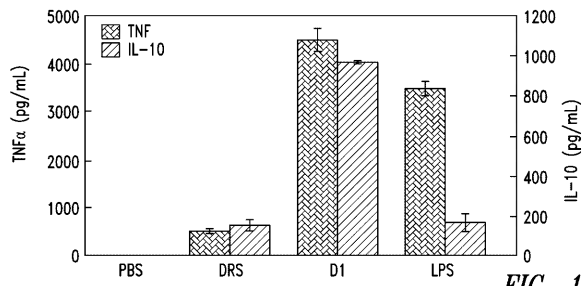


FIG. 13B

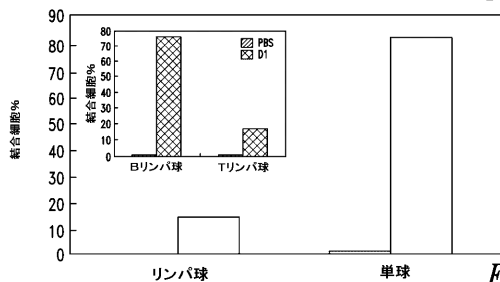


FIG. 13C

【図 14 A】

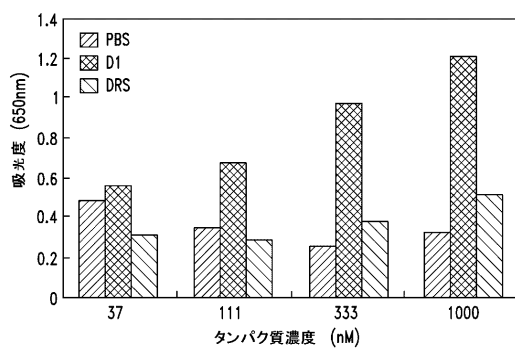


FIG. 14A

【図 14 B】

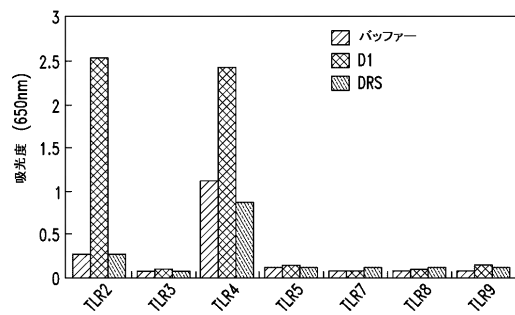


FIG. 14B

【図 14C】

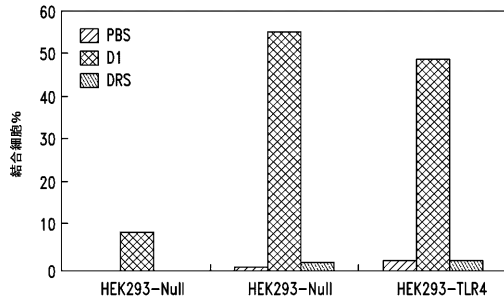


FIG. 14C

【図 15 - 2】

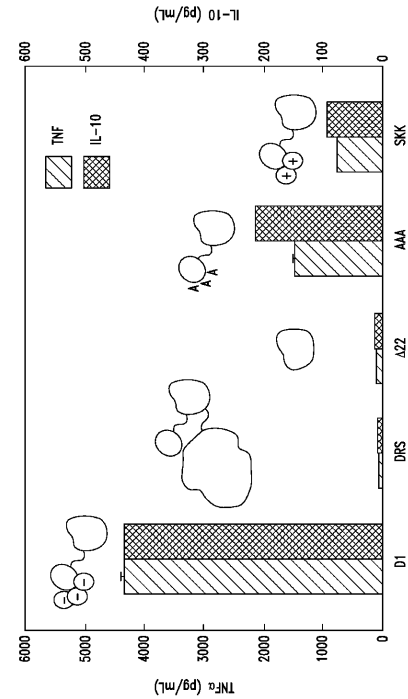


FIG. 15C

【図 15 - 3】

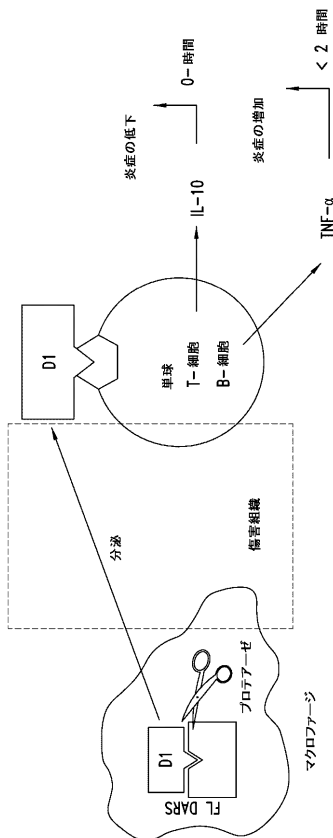


FIG. 15D

【図 16】

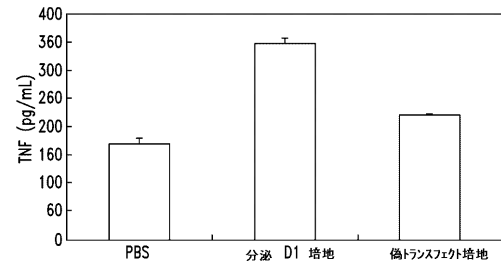


FIG. 16A

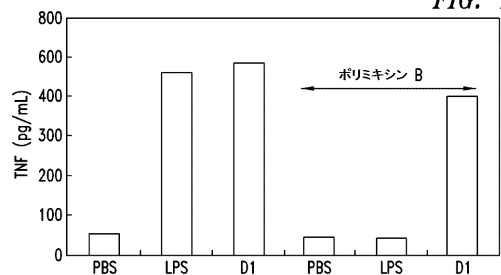


FIG. 16B

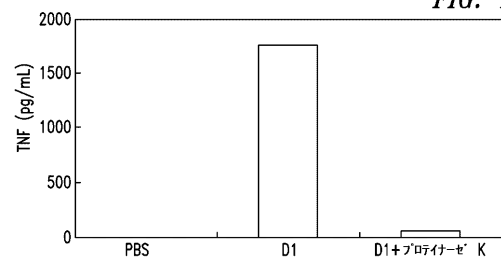


FIG. 16C

【 図 1 】

1MPSASASRKQKPREIMDAEDYAKERYGISSMI
 QSQEKPDRLVVRDLTIQKADFAVWVRARVHTSR
 AKGKQICFLVRQIQFNVQALVAVGDHASKDMVKFA
 ANINKESVQVEGVVRKVNQKIGSCTQQDVELHYQKI
 YVSLAEPRLPLQDDAVRPEAEGESEEGRATVNGDT
 RLQNRVIDLRTSTSQAVFRLQSGICHLEFRETINKGFV
 EIQTPIKISAASEGGANVFTVSFKNNAYLAQSPOLYK
 QMCICADFEKVFESIGPVFRAEDSNTHRLTEFVGLDI
 EMAFNYHYHEYMEEIADTMVQIFKGLQERFQTEIGTV
 NKQFPCEPFKLEPTLRLEYCEALMLREAGVEMGD
 EDDLSTPNEKLLGHLVKEKYDTDFYILDKYPLAVRPF
 YTMPDPRNPKQSNQSYDMFMERGEELSGAQRIHDPQ
 LLTERALHHGIDLEKIKAYIDSFREFGAPPHAGGGIGLE
 RVTMLFLGLHNVRQTSMFPRDPKRLTP 501

FIG. 1B

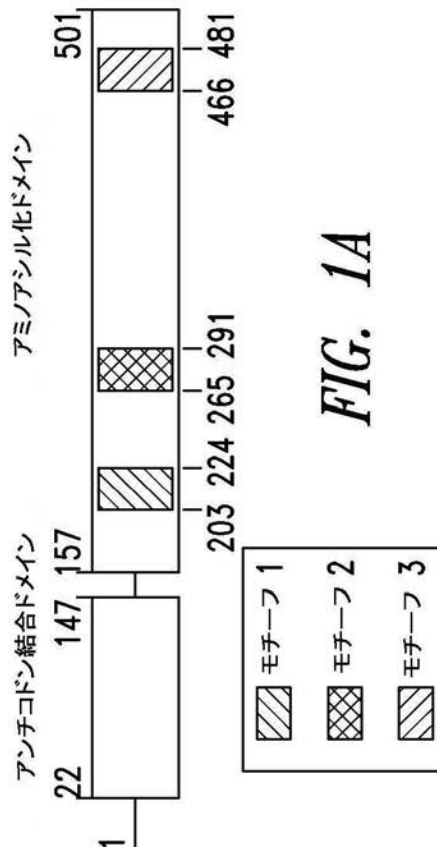


FIG. 1A

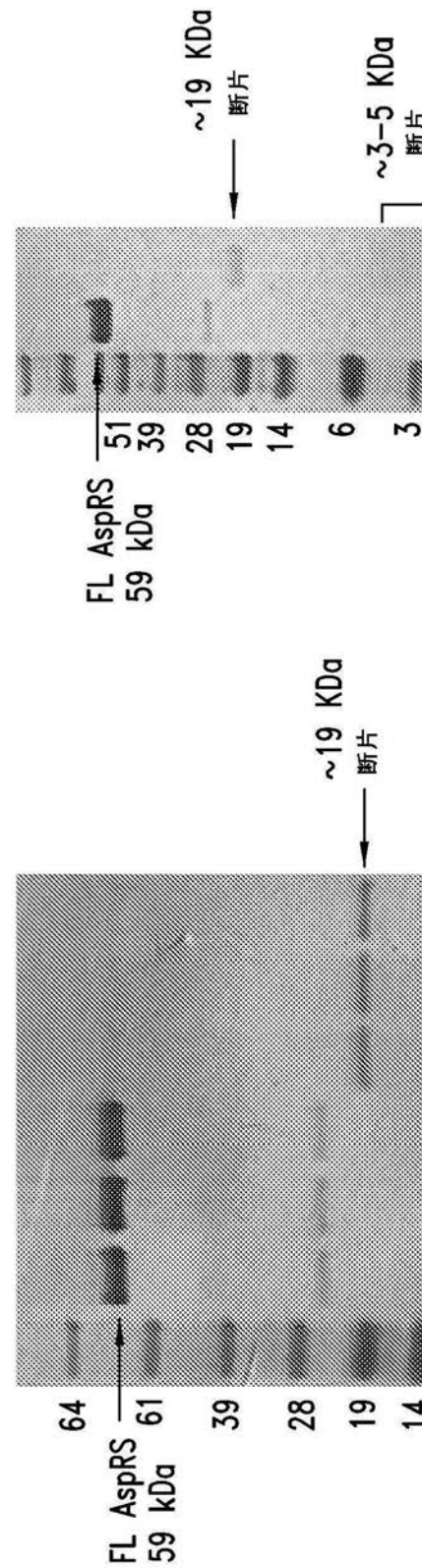


FIG. 1C

FIG. 1D

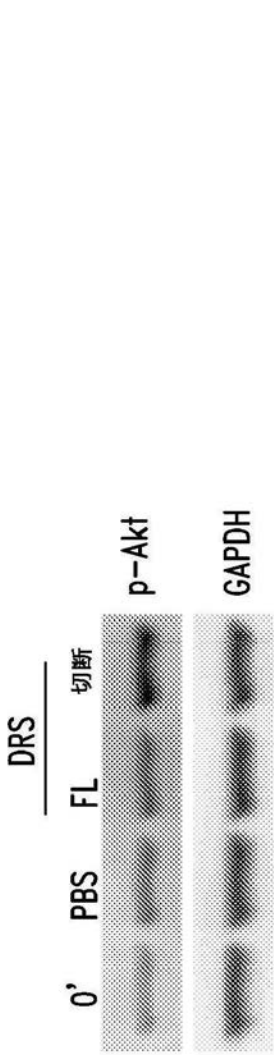


FIG. 2A

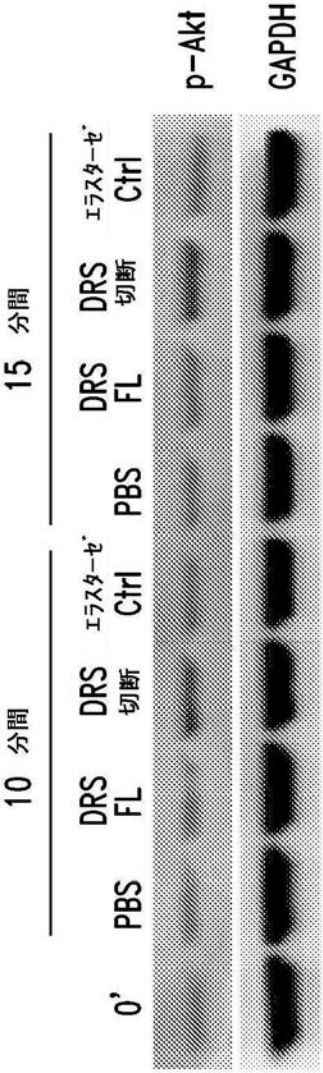
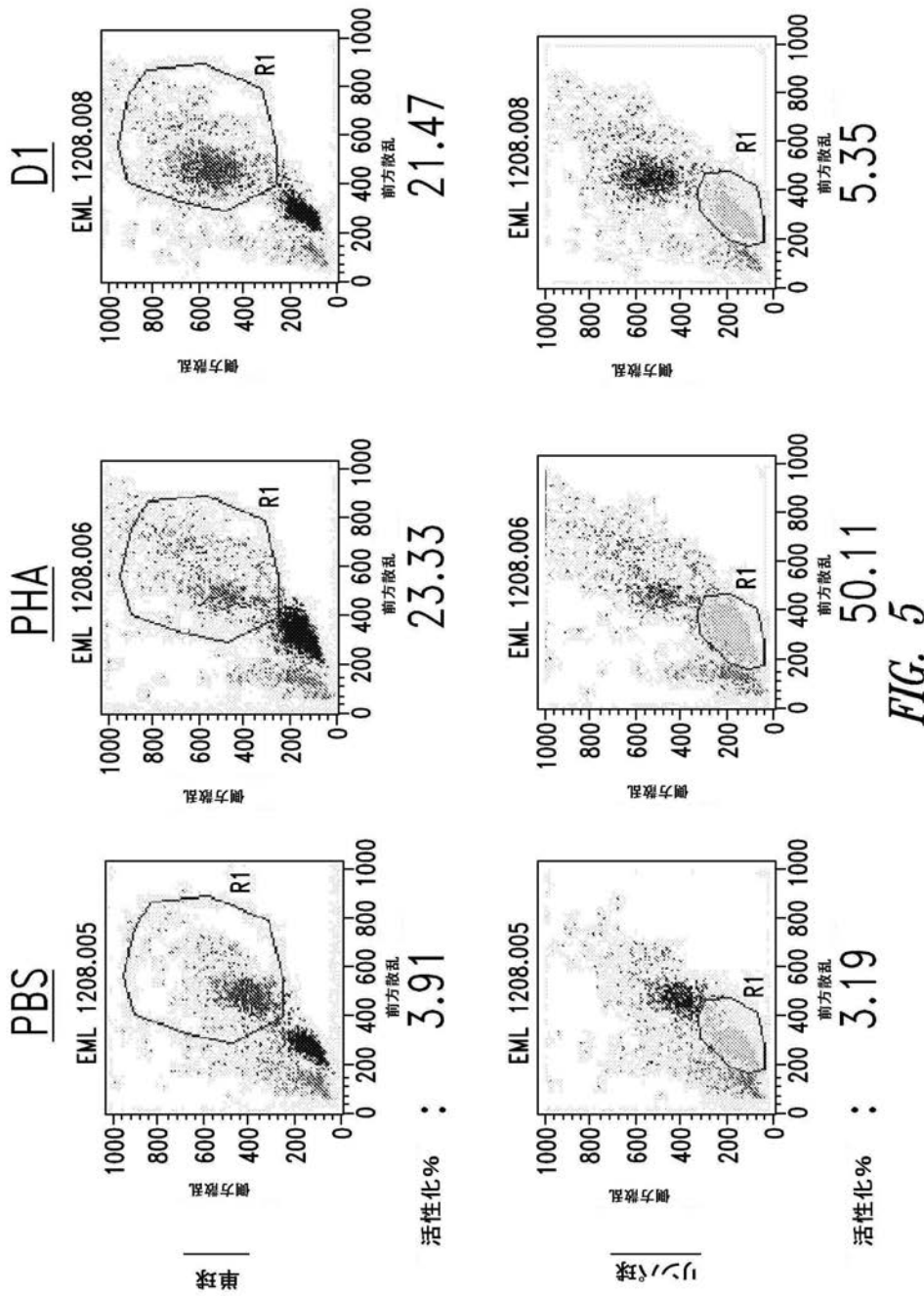


FIG. 2B

【図 5】



【 図 7 】

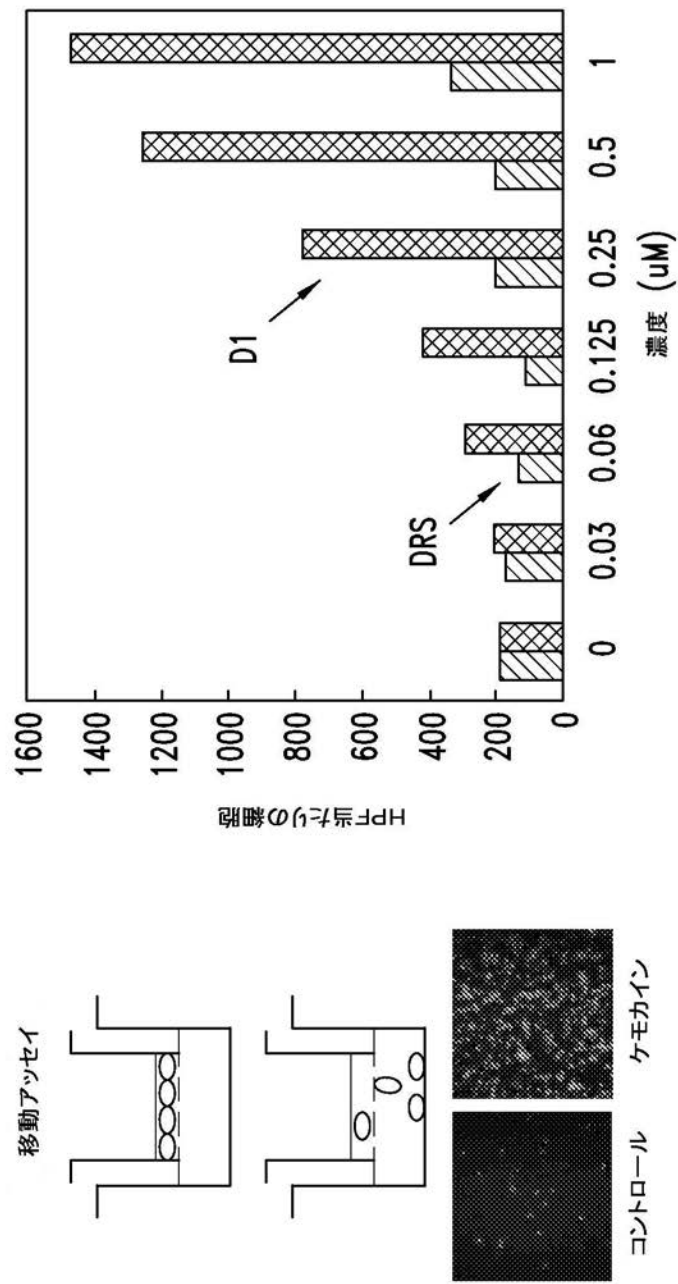
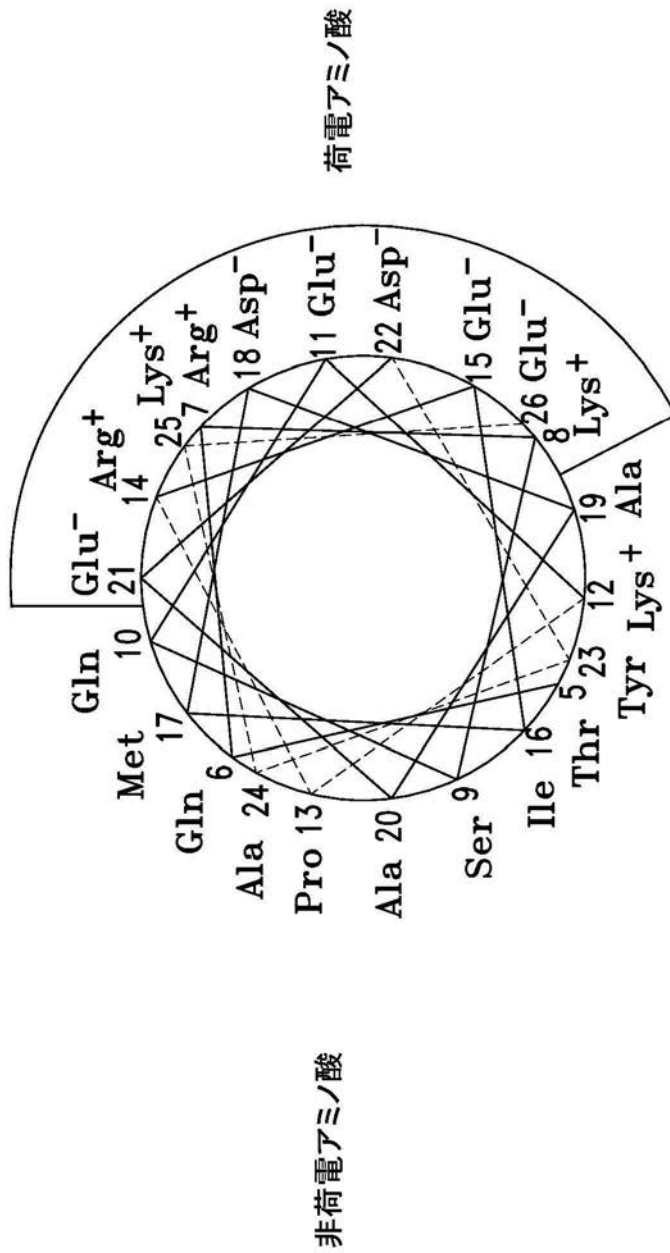


FIG. 7

【 図 1 1 】



ヒト **DRS** MPSASASRKSEQEKPREDIMDAEDYAKERYGIS
ラット **DRS** MPSANASRKGEKPREIYDAEDYAKERYGVS
*****.*****:*****

FIG. 11

【図 12 - 1】

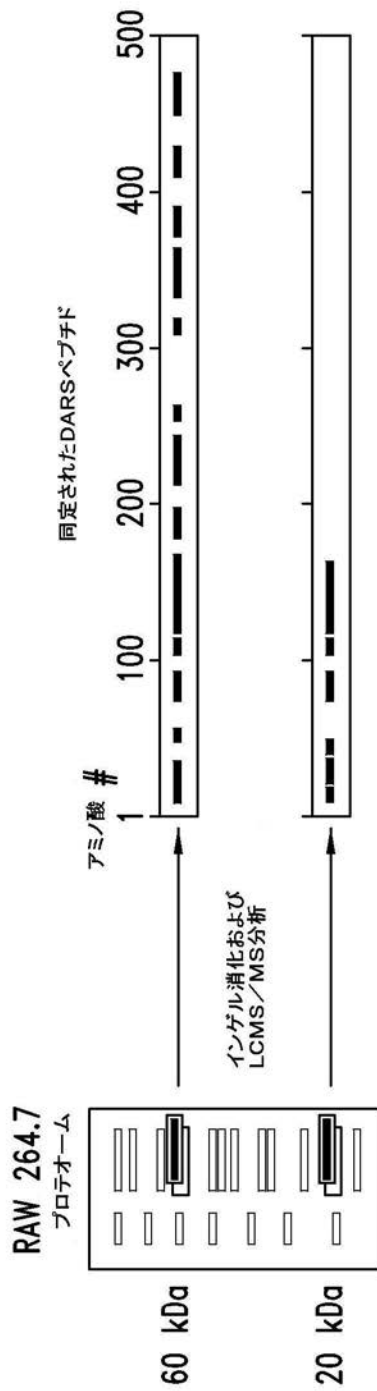


FIG. 12A

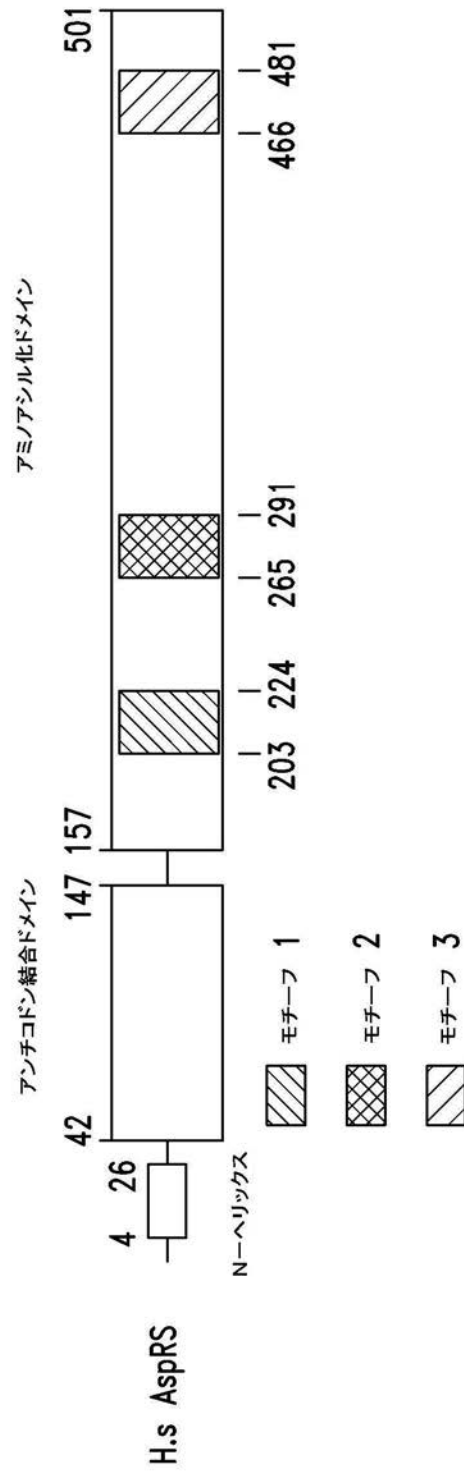


FIG. 12B

【図 12 - 2】

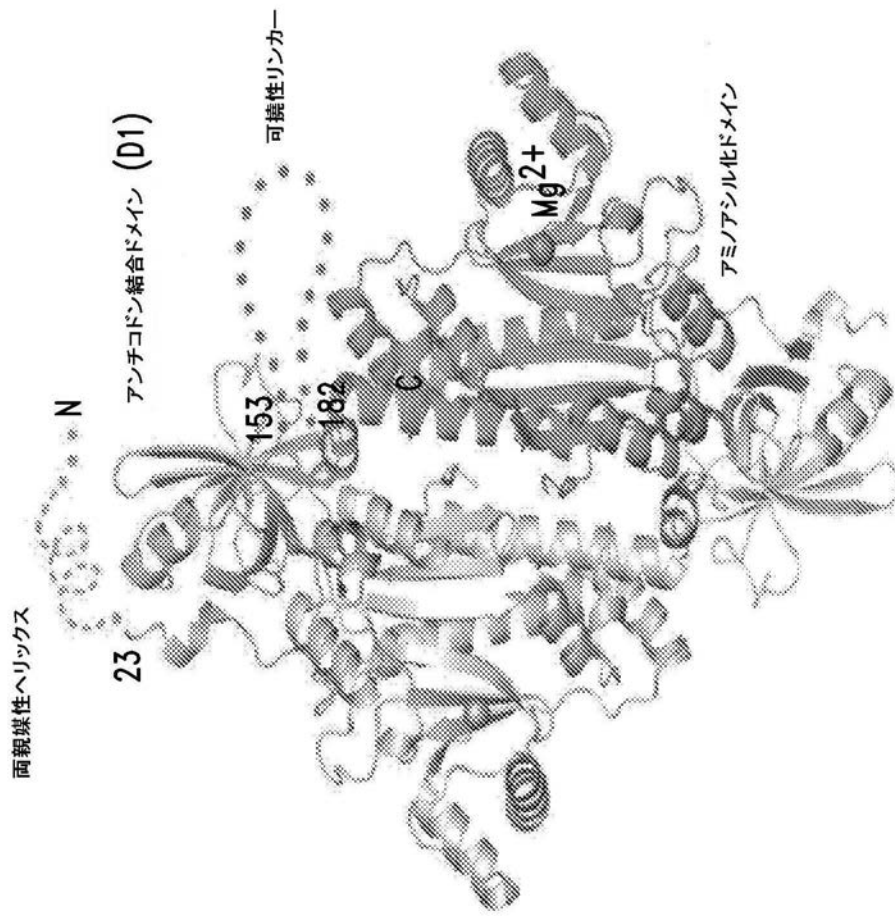


FIG. 12C

【補正対象項目名】配列表



【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2012522510000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2010/029377
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 9/10(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/573(2006.01)i, A61K 38/43(2006.01)i</i>		
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) C12N 9/10; A61K 38/53; C07H 21/04; A61P 7/02; C12N 9/99; A61K; A61K 31/713; C12N 9/22		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 2007-064941 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE et al.) 07 June 2007 See the abstract.	1-4,6-12,18-26 1-4,6-12,18-26 5
X Y A	US 6548060 B1 (KIM; SUNGHOON) 15 April 2003 See the abstract.	1-4,6-12,18-26 1-4,6-12,18-26 5
X Y A	US 2003-0017564 A1 (PAUL SCHIMMEL et al.) 23 January 2003 See the abstract.	1-4,6-12,18-26 1-4,6-12,18-26 5
X Y A	WO 03-094862 A2 (RIGEL PHARMACEUTICALS, INC. et al.) 20 November 2003 See the abstract.	1-4,6-12,18-26 1-4,6-12,18-26 5
X	WO 2006-016217 A1 (PFIZER INC. et al.) 16 February 2006 See the abstract.	1-4,6-12,18-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 25 JANUARY 2011 (25.01.2011)		Date of mailing of the international search report 26 JANUARY 2011 (26.01.2011)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, JI YUN Telephone No. 82-42-481-8288 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/029377

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A		1-4, 6-12, 18-26 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/029377

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 36, 37
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Said claims pertain to methods for treatment of the human body, thus relate to a subject-matter which International Searching Authority is not required to search under PCT Art. 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.: 13-17, 27-37
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See Extra sheet.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/029377

(1) The subject-matter of claims 13-17 and 27-37 is not considered to comply with the requirements of PCT Article 6, as said claims only describe a binding agent, a composition, or a method comprising a binding agent by characterizing the activity indication, i.e. binding specifically to an isolated AsPRS of claim 1, without reference to the structural features.

(2) Claims 8,17,18,20,23,27,and 28 does not comply with PCT Rule 6.4(a) because multiple dependent claims should not serve as a basis for any other multiple dependent claim. However, the search and the examination have been carried out.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/029377

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007-064941 A2	07.06.2007	AU 2006-320361 A1 CA 2631765-A1 CN 101336299 A CN 101336299 A EP 1977004 A2 EP 1977004 A4 JP 2009-519241 A JP 2009-519241 T US 2009-110672 A1 WO 2007-064941 A2 WO 2007-064941 A3 WO 2007-064941 A3	07.06.2007 07.06.2007 31.12.2008 31.12.2008 08.10.2008 13.05.2009 14.05.2009 14.05.2009 30.04.2009 07.06.2007 07.06.2007 11.10.2007
US 6548060 B1	15.04.2003	None	
US 2003-0017564 A1	23.01.2003	AU 2001-245899 B2 AU 2001-250904 B2 AU 2001-45889 A1 AU 2001-50904 A1 CA 2404484-A1 CA 2404488-A1 EP 1272506 A1 EP 1274834 A1 EP 1274834 B1 EP 2258834 A1 JP 2003-529354 A JP 2004-500121 A US 2004-0009163 A1 US 2004-0152079 A1 US 2005-0197298 A1 US 2006-0216745 A1 US 2007-0048322 A1 US 2007-0218527 A1 US 2008-0064639 A1 US 7067126 B2 US 7144984 B2 US 7273844 B2 US 7413885 B2 US 7476651 B2 US 7521215 B2 WO 01-74841 A1 WO 01-75078 A1	15.06.2006 13.04.2006 15.10.2001 15.10.2001 11.10.2001 11.10.2001 08.01.2003 15.01.2003 07.07.2010 08.12.2010 07.10.2003 08.01.2004 15.01.2004 05.08.2004 08.09.2005 28.09.2006 01.03.2007 20.09.2007 13.03.2008 27.06.2006 05.12.2006 25.09.2007 19.08.2008 13.01.2009 21.04.2009 11.10.2001 11.10.2001
WO 03-094862 A2	20.11.2003	AU 2003-234600 A1 AU 2003-234600 A8 WO 03-094862 A3 WO 0309-4862A3	11.11.2003 11.11.2003 20.11.2003 26.02.2004
WO 2006-016217 A1	16.02.2006	AT 446105 T	15.11.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/029377

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 2575694-A1	16.02.2006
		EP 1776138 A1	25.04.2007
		EP 1776138 B1	21.10.2009
		ES 2332799 T3	12.02.2010
		JP 2008-508349 A	21.03.2008
		MX 2007001505 A	11.06.2007
		US 2006-0024286 A1	02.02.2006
		US 2006-0024287 A1	02.02.2006
		US 2006-0024288 A1	02.02.2006
		US 2006-0078553 A1	13.04.2006
		US 2006-0078556 A1	13.04.2006
		US 2006-0078886 A1	13.04.2006
		US 2006-0078887 A1	13.04.2006
		US 2006-0079441 A1	13.04.2006
		US 2006-0079472 A1	13.04.2006
		US 2006-0079473 A1	13.04.2006
		US 2006-0079474 A1	13.04.2006
		US 2006-0079672 A1	13.04.2006
		US 2006-0079673 A1	13.04.2006
		WO 2006-016217 A1	16.02.2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 H	
C 1 2 Q 1/25 (2006.01)	C 1 2 Q 1/25	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/573 A	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/573 Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 Y	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 P	
	G 0 1 N 33/53 D	
	G 0 1 N 33/50 Z	
	G 0 1 N 33/15 Z	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, S I, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, I N, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM , PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アダムス, ライアン エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 9, サン ディエゴ, ダイヤモンド ストリート
1 2 6 0

(72)発明者 ホン, フェイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 2, サン ディエゴ, カミニート ディア 7 9
7 9, ナンバー 2

(72)発明者 チャオ, チー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0, サン ディエゴ, エル カミーノ リアル
1 2 6 3 7, ナンバー 5 2 0 2

(72)発明者 ビエール, クリスティ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 0, サン ディエゴ, ザイオン アベニュー 5
3 2 1

(72)発明者 アームアー, エバ アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 7, サン ディエゴ, ウエスト ポイント ロー
マ ブールバード 4 5 4 8

(72)発明者 ダリゴ, ケニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 4, サン ディエゴ, テキサス ストリート 3
9 8 0

(72)発明者 グリーン, レスリー エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 9, サン ディエゴ, ダベンポート アベニュー
1 3 9 4 1

(72)発明者 メリマン, イブ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 1 0, サン ディエゴ, サン ディエゴ アベニュー
2 0 1 0

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA25 AA26 AA28 AA40 BA13 BB20 CA17 CA20 CB01
CB09 CB17 CB19 CB21 CB26 DA14 DA20 DA36 DA37 FA37
FB01 FB02 FB03 FB05 FB12 FB15 GC11
4B024 AA01 AA11 BA07 CA01 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04
GA11 HA08
4B050 CC03 CC04 DD07 EE10 LL01 LL03
4B063 QA01 QA18 QQ40 QS39 QX04
4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA01 CA27 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 CA53 MA02 NA14 ZA011 ZA012 ZA361
ZA362 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB311 ZB312 ZC211
ZC212
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 NA14 ZA01 ZA36 ZB08 ZB11
ZB26 ZB31 ZC21
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 CA40 DA75 DA89 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2012522510A5	公开(公告)日	2013-03-28
申请号	JP2012503657	申请日	2010-03-31
申请(专利权)人(译)	Etaia制药公司		
[标]发明人	アダムスライアンエー ホンフェイ チャオチー ピエールクリステイ アームアーエバアール ダリゴケニー グリーンレスリーエー メリマンイブ		
发明人	アダムス, ライアン エー. ホン, フェイ チャオ, チー ピエール, クリステイ アームアー, エバ アール. ダリゴ, ケニー グリーン, レスリー エー. メリマン, イブ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N9/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/113 C07K16/40 C12N15/115 C12Q1/25 C07K19/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P35/00 A61P3/00 A61P25/00 A61P31/00 A61P9/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61K38/00 G01N33/573 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	A61K38/00 A61P3/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C12N9/93 C12Q1/25 C12Y601/01012 G01N33/573 G01N2500/00 Y02A50/385 Y02A50/389 Y02A50/411 Y02A50/423 Y02A50/463 Y02A50/53 Y02A50/58 C07K16/00 C07K2319/30 C07K2319/33		
FI分类号	C12N15/00.A C12N9/00.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N15/00.G C07K16/40 C12N15/00.H C12Q1/25 C07K19/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P35/00 A61P3/00 A61P25/00 A61P31/00 A61P9/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61K37/02 G01N33/573.A G01N33/573.Z G01N33/53.Y G01N33/53.P G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/AA28 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CA17 2G045/CA20 2G045/CB01 2G045/CB09 2G045/CB17 2G045/CB19 2G045/CB21 2G045/CB26 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC11 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B050/CC03 4B050/CC04 4B050/DD07 4B050/EE10 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ40 4B063/QS39 4B063/QX04 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA27 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/CA53 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA012 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB311 4C084/ZB312 4C084/ZC211 4C084/ZC212 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA03 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA36 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4C086/ZB31 4C086/ZC21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		

优先权	61/165194 2009-03-31 US
-----	-------------------------

其他公开文献	JP2012522510A JP5848236B2
--------	------------------------------

摘要(译)

提供了分离的天冬氨酰-tRNA合成酶多肽和具有非规范生物活性的多核苷酸，以及与其相关的组合物和方法。