(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2008-529505
(P2008-529505A)
(43)公表日　平成20年8月7日(2008.8.7)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 14/55	(2006.01)	C07K	14/55		4C084
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4C085
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4H045
C07K 14/715	(2006.01)	C07K	14/715		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 259 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-554384 (P2007-554384)
(86)(22)出願日　平成17年11月24日 (2005.11.24)
(85)翻訳文提出日　平成19年9月25日 (2007.9.25)
(86)国際出願番号　PCT/AU2005/001780
(87)国際公開番号　WO2006/086823
(87)国際公開日　平成18年8月24日 (2006.8.24)
(31)優先権主張番号　60/653,323
(32)優先日　平成17年2月15日 (2005.2.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504439090
アポロ　ライフ　サイエンシズ　リミテッド
ＡＰＯＬＬＯ　ＬＩＦＥ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ　ＬＩＭＩＴＥＤ
オーストラリア国　２０１５　ニューサウスウェールズ州　ビーコンズフィールド　クイーンズ　ストリート　１４７　レベル　１
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】分子およびそのキメラ分子

(57)【要約】
本発明は、一般的にタンパク質、診断、治療、および栄養の分野に関する。より詳しくは、本発明は、一つまたは複数の薬理学的特質を示す、そのような特質に関連する、またはそのような特質の基礎を形成する測定可能な生理化学的パラメータのプロフィールを有する、IL-2、IL-2-Ra、IL-2-Rb、IL-2-RgのようなIL-2タンパク質ファミリーに属するもしくは関する単離タンパク質分子、またはIL-2-Fc、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb-Fc、およびIL-2Rg-Fcのようなタンパク質分子の少なくとも一部を含むそのキメラ分子を提供する。本発明はさらに、一連の診断、予防、治療、栄養、および/または研究応用における単離タンパク質またはそのキメラ分子の使用を企図する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
一つまたは複数の特有の薬理学的特質を示す、そのような特質に関連した、またはそのような特質の基礎を形成する、測定可能な生理化学的パラメータのプロフィールを含む単離タンパク質。
【請求項２】
多数の測定可能な生理化学的パラメータ{$[P_x]_1$、$[P_x]_2$、...$[P_x]_n$}を含む生理化学的プロフィールを含む請求項1記載の単離タンパク質であって、式中P_xは測定可能な生理化学的パラメータを表し、「n」は≧1の整数であり、$[P_x]_1$～$[P_x]_n$のそれぞれは異なる測定可能な生理化学的パラメータであり、測定可能な生理化学的特徴のいずれか一つの値または一つより多い測定可能な生理化学的特徴の一連の値は、特有の薬理学的特質T_yまたは一連の特有の生理化学的特質{$[T_y]_1$、$[T_y]_2$、...$[T_y]_m$}を示すか、そのような特質に関連するか、またはそのような特質の基礎を形成し、式中T_yは特有の薬理学的特質を表し、mは≧1の整数であり、$[T_y]_1$～$[T_y]_m$のそれぞれは異なる薬理学的特質である、単離タンパク質。
【請求項３】
IL-2、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb-Fc、IL-2Rg-Fcを含む群より選択される、請求項1または2記載の単離タンパク質。
【請求項４】
表2に記載される測定可能な生理化学的パラメータを含む、請求項3記載の単離タンパク質。
【請求項５】
表3に記載される一つまたは複数の特有の薬理学的特質を含む、請求項3または4記載の単離タンパク質。
【請求項６】
一つまたは複数のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質部分に融合した、請求項3～5のいずれか一項記載のIL-2またはその断片を含むキメラ分子。
【請求項７】
ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質部分がヒト免疫グロブリンの定常領域(Fc)またはフレームワーク領域を含む、請求項6記載のキメラ分子。
【請求項８】
キメラ分子がIL-2-Fcである、請求項6または7記載のキメラ分子。
【請求項９】
請求項1～8のいずれか一項記載の単離タンパク質またはキメラ分子を含む薬学的組成物。
【請求項１０】
請求項1～5のいずれか一項記載の単離タンパク質、請求項6～8のいずれか一項記載のキメラ分子、または請求項9記載の薬学的組成物の有効量を哺乳動物被験体に投与する段階を含む、タンパク質の量または活性を増加させることによって状態が改善され得る、哺乳動物被験体における状態を処置または予防する方法。
【請求項１１】
単離タンパク質が請求項5記載の単離タンパク質である、請求項10記載の方法。
【請求項１２】
キメラ分子が請求項8記載のキメラ分子である、請求項10記載の方法。
【請求項１３】
SEQ ID NO:27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93からなる一覧、または前述の一覧の配列の任意の一つと少なくとも約65%の同一性を有するヌクレオチド配列、もしくは低ストリンジェンシー条件下で上記配列もしくはその相補型の任意の一つとハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列。
【請求項１４】

SEQ ID NO:27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93からなる一覧、または前述の一覧の配列の任意の一つと少なくとも約60%の同一性を有するヌクレオチド配列、もしくは低ストリンジェンシー条件下で上記配列もしくはその相補型の任意の一つとハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列によってコードされる単離タンパク質またはキメラ分子。

【請求項１５】

SEQ ID NO:27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93と少なくとも60%の類似性を有する、または最適に整列させた後におよび/または低ストリンジェンシー条件下でSEQ ID NO:27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93、もしくはその相補型の一つもしくは複数とハイブリダイズすることができるヌクレオチドの配列を含む、タンパク質もしくはキメラ分子またはその機能的部分をコードする単離核酸分子。

【請求項１６】

SEQ ID NO:28、30、32、34、38、40、42、44、46、48、50、52、54、58、60、62、64、66、68、70、72、74、78、80、82、84、86、88、90、92、94の一つもしくは複数において実質的に記述されているアミノ酸配列、または最適に整列させた後にSEQ ID NO:28、30、32、34、38、40、42、44、46、48、50、52、54、58、60、62、64、66、68、70、72、74、78、80、82、84、86、88、90、92、94の一つもしくは複数と少なくとも約60%の類似性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質またはキメラ分子をコードするヌクレオチドの配列を含む単離核酸分子。

【請求項１７】

(a) 固相支持体マトリクス；(b) ヒトタンパク質またはキメラ分子に対する一つまたは複数の抗体；(c) ブロッキング溶液；(d) 一つまたは複数の基質保存溶液；(e) 基質緩衝溶液；(f) 標準的なヒトタンパク質試料またはキメラ分子試料；および(g) 使用説明書を含む、生物学的調製物中に存在するヒト細胞発現ヒトタンパク質またはキメラ分子のレベルを決定するためのキット。

【請求項１８】

標準的なヒトタンパク質試料またはキメラ分子試料が、請求項5記載の単離タンパク質または請求項8記載のキメラ分子の調製物である、請求項17記載のキット。

【請求項１９】

そのまたはそれぞれの抗体が、請求項5記載の単離タンパク質または請求項8記載のキメラ分子を含む調製物による哺乳動物の免疫化に由来する、請求項17または18記載のキット。

【請求項２０】

ヒト細胞発現ヒトタンパク質が、天然に存在するヒトIL-2、IL-2Ra、IL-2Rb、IL-2Rgである、請求項17～19のいずれか一項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

発明の分野

本発明は、一般的にタンパク質、診断、治療、および栄養の分野に関する。より詳しくは、本発明は、一つまたは複数の薬理学的特質を示す、特質に関連する、または特質の基礎を形成する測定可能な生理化学的パラメータのプロフィールを有する、IL-2、IL-2Ra、IL-2Rb、IL-2RgのようなIL-2タンパク質ファミリーに属するまたは関する単離タンパク質分子、またはIL-2-Fc、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb-FcおよびIL2Rg-Fcのようなタンパク質分子の少なくとも一部を含むそのキメラ分子を提供する。または本発明はさらに、一連の診断、予防、治療、栄養および／または研究応用における単離タンパク質またはそのキメラ分子の使用を企図する。

【背景技術】
【０００２】
先行技術の説明
本明細書における任意の先行技術に対する参照は、この先行技術が共通の一般的知識の一部を形成すると認めるもの、またはいかなる形でも示唆するものではなく、そのように解釈してはならない。
【０００３】
IL-2は、主に抗原で活性化されたCD4$^+$T細胞によって発現される糖タンパク質である。IL-2は当初、Tリンパ球の増殖を促進することが認められ、T細胞増殖因子と命名された(Morgan et al. Science 993(4257):1007-8, 1976（非特許文献1）)。IL-2は現在では、免疫応答に関与する多くの機能を媒介する多面的な活性を示すことが知られている。これらの機能には、抗原で活性化されたTリンパ球の増殖の促進、ナチュラルキラー(NK)細胞の細胞溶解活性の増強(Domzig et al. J Immunol 130:1970-1973, 1983（非特許文献2）)、GM-CSF、IL-1β、およびIL-6の合成を誘導することによる単球における抗腫瘍活性の促進(Malkovsky et al. Nature 325:262-265, 1987（非特許文献3）；Musso et al. J Exp Med 181:1425-1431, 1995（非特許文献4）)、さらに大顆粒性リンパ球の増殖の促進(Harel-bellan et al. J Immunol 136:2463-2469, 1986（非特許文献5）)、ならびにインビトロにおけるマイトジェンで活性化されたBリンパ球の増殖および分化の増強(Waldmann et al. J Exp Med 160:1450-1466, 1984（非特許文献6）)が含まれる。
【０００４】
当初同定されたIL-2の活性と相反して、IL-2およびIL-2受容体を欠くマウスモデルに関する研究から、免疫系におけるIL-2の顕著な役割は、調節性T細胞の産生を媒介し、T細胞依存性の寛容を促進することであることが実証されている。IL-2欠損表現型は、活性化T細胞のリンパ節および脾臓への浸潤を特徴とする自己免疫をもたらし、T細胞恒常性の制御における機能障害が示唆される(Willerford et al. Immunity 3:521, 1995（非特許文献7）)。
【０００５】
インビボでのT細胞寛容を媒介するIL-2の能力を示す証拠にもかかわらず、IL-2を投与すると、リンパ球増加、好酸球増加、ならびにTNF、IL-1、およびIFNγの産生を伴う細胞性免疫の活性化を含む、用量依存的な、臨床的に関連した多くの免疫応答が起こる。さらに、IL-2と共にインキュベートした後、ナチュラルキラー細胞は、腫瘍細胞に対して自発的な非MHC拘束性細胞傷害性を示す。
【０００６】
IL-2の生物学的効果は、主に活性化T細胞、B細胞、および単球上に発現されるIL-2受容体を介して媒介される。異なる組み合わせで会合してIL-2受容体を形成し得る三つのサブユニットが存在する。これらのサブユニットには、IL-2Ra、IL-15受容体と共有されるIL-2Rb、ならびにIL-4、IL-7、IL-9、IL-15、およびIL-21の受容体と共有されることから共通サイトカイン受容体γ鎖(γ_c)としても知られるIL-2Rg(IL-2Rγ)が含まれる。これらのサブユニットの種々の会合により、低親和性、中親和性、または高親和性IL-2受容体が形成される。低親和性受容体はIL-2Ra糖ペプチドを含み、中親和性受容体はIL-2Rbとγ_cの会合によって形成され、高親和性受容体はIL-2Ra、IL-2Rb、およびγ_c鎖を含む。
【０００７】
IL-2は単独でまたは他の薬物もしくは治療と併用して、HIV感染(例えば、T細胞の数および機能を増強するために抗レトロウイルス剤と併用する)(Pahwa et al. AIDS Patient Care STDS 12:187, 1998（非特許文献8）)；多くの悪性疾患状態を含む疾患の処置のために、ならびに分類不能型免疫不全症、潰瘍性大腸炎、ならびにB型肝炎およびC型肝炎の処置において用いられるか、またはそのような処置の可能性を有する。
【０００８】
IL-2/IL-2受容体複合体の競合的阻害は、IL-2の活性化およびシグナル伝達に関連する疾患の処置の魅力的な標的を表す。この阻害は、可溶性IL-2受容体サブユニットFc融合タ

ンパク質またはIL-2受容体サブユニットの組み合わせにより達成され得る。

【０００９】

IL-2シグナル伝達の阻害は、リンパ性悪性腫瘍を含むIL-2駆動性増殖応答、ならびに腎臓および心臓移植片などの同種移植片拒絶の阻害、さらに骨髄移植後のGVHDの重症度の調節において有益であることが示されている。さらに、IL-2シグナル伝達の阻害は、抗腫瘍免疫を高めることができ、HIV患者におけるT細胞数を増強することができ、また注入された治療用T細胞の生存を延長することができる(Morris et al. Ann Rheum Dis 59:109, 2000（非特許文献9）、およびPahwa 1998 前記)。

【００１０】

IL-2が、IL-2Ra、IL-2Rb、IL-2Rgのような、その結合タンパク質との相互作用によって発揮する生物学的エフェクター機能は、タンパク質およびその受容体が、生理的プロセスを調節するための治療物質として有意な可能性を有し得ることを意味している。しかし、一次、二次、三次または四次構造のような分子に対する軽微な変化、および翻訳と同時のまたは翻訳後改変パターンは、タンパク質の活性、分泌、抗原性、およびクリアランスに対して有意な影響を及ぼし得る。従って、特異的一次、二次、三次、または四次構造を有する、または独自のもしくは特に有用な特性を付与する翻訳時もしくは翻訳後の構造もしくは構成を有するタンパク質が生成されうることが可能である。その結果、それらが有用な生理化学特徴または他の薬理学的特質を有するか否かを決定するために、異なる産生条件においてタンパク質の生理化学的特性を評価することが必要である。

【００１１】

今日まで、問題は、市販されているタンパク質の産生が、細菌、酵母、真菌、および昆虫のようなヒトとは進化的に離れた種に由来する細胞において行われている点である。これらの細胞は、グリコシル化を欠損するか、またはヒト細胞とは異なるグリコシル化レパートリーを示すタンパク質を発現して、このことは、その臨床的有用性に実質的に影響を及ぼす。例えば、酵母またはアスペルギルス（Aspergillus）のような真菌系において発現されたタンパク質は、高密度のマンノースを保有し、このためにタンパク質は治療的に無効となる（Herscovics et al. FASEB J 7:540-550, 1993（非特許文献10））。

【００１２】

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞のような非ヒト哺乳動物発現系においても、ヒト細胞のパターンと比較してグリコシル化パターンの有意な変化が報告されている。例えば、齧歯類を含むほとんどの哺乳動物が、糖タンパク質においてGal（α1,3）-Gal（β1,4）-GlcNAcオリゴ糖を生成する酵素（α1,3）ガラクトトランスフェラーゼを発現する。しかし、ヒト、サル、旧世界ザルでは、この酵素の発現は遺伝子におけるフレームシフト変異を通して不活化されるようになった（Larsen et al. J Biol Chem 265:7055-7061, 1990（非特許文献11））。Dux-B11のような組換え型タンパク質合成において用いられるCHO細胞株のほとんどは、（α1,3）ガラクトトランスフェラーゼを発現する遺伝子を不活化させたが、それらはなおも、ヒト細胞に存在する（α2,6）-結合型末端シアル酸の合成のための機能的（α2,6）シアリルトランスフェラーゼを欠損する。さらに、CHO細胞発現糖タンパク質上に存在するシアル酸モチーフはCHO細胞の内因性のシアリダーゼによって分解されることが多い（Gramer et al. Biotechnology 13(7):692-8, 1995（非特許文献12））。

【００１３】

その結果として、これらの非ヒト発現系から産生されたタンパク質は、ヒト細胞由来タンパク質とは異なる半減期、抗原性、安定性、および機能的効力のような生理化学的および薬理学的特徴を示すと思われる。

【００１４】

幹細胞技術の最近の進歩により、移植治療、薬物スクリーニング、毒性試験、および機能的ゲノム学のような応用に幹細胞を利用する可能性が実質的に増加した。しかし、幹細胞は非ヒトタンパク質を含む培養培地において日常的に維持され、従って非ヒト感染性材料が混入する可能性のために、臨床応用にとって適していない。さらに、非ヒト由来培地

における幹細胞の培養によって、非ヒト炭水化物部分が組み入れられる可能性があり、この場合も移植応用を損ねる（Martin et al. Nature Medicine 11 (2) :228-232, 2005（非特許文献13））。従って、幹細胞の維持および／または分化において特異的ヒト由来タンパク質を用いることは、異種タンパク質の取り込みを改善して、幹細胞の臨床有用性を増強すると思われる。

【００１５】

従って、診断、予防、治療、および／または栄養学的研究応用において用いるために特に望ましい生理化学的および薬理学的特性を有するタンパク質およびその受容体を開発する必要があり、本発明は、臨床、商業的および研究応用のための、IL-2タンパク質ファミリーに属するタンパク質および受容体を提供する。

【００１６】

【非特許文献１】Morgan et al. Science 993(4257):1007-8, 1976
【非特許文献２】Domzig et al. J Immunol 130:1970-1973, 1983
【非特許文献３】Malkovsky et al. Nature 325:262-265, 1987
【非特許文献４】Musso et al. J Exp Med 181:1425-1431, 1995
【非特許文献５】Harel-bellan et al. J Immunol 136:2463-2469, 1986
【非特許文献６】Waldmann et al. J Exp Med 160:1450-1466, 1984
【非特許文献７】Willerford et al. Immunity 3:521, 1995
【非特許文献８】Pahwa et al. AIDS Patient Care STDS 12:187, 1998
【非特許文献９】Morris et al. Ann Rheum Dis 59:109, 2000
【非特許文献１０】Herscovics et al. FASEB J 7:540-550, 1993
【非特許文献１１】Larsen et al. J Biol Chem 265:7055-7061,1990
【非特許文献１２】Gramer et al. Biotechnology 13(7):692-8, 1995
【非特許文献１３】Martin et al. Nature Medicine 11 (2) :228-232, 2005

【発明の開示】

【００１７】

発明の概要

本明細書を通して、本文がそうでないことを必要としている場合を除き、「含む（comprise）」という用語、または「含む（comprises）」もしくは「含む（comprising）」のような変化形は、記述の要素もしくは整数が含まれる、または要素もしくは整数の群が含まれるが、他の任意の要素もしくは整数、または要素もしくは整数の群を除外しないことを意味すると理解されると思われる。

【００１８】

ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、配列識別子番号（SEQ ID NO：）によって参照される。SEQ ID NO：は、配列識別子＜400＞1（SEQ ID NO：1）＜400＞2（SEQ ID NO：2）等に数字で対応する。配列識別子の要約を表1に提供する。配列表は、特許請求の範囲の後に提供される。

【００１９】

本発明は一般的に、一つまたは複数の特有の薬理学的特質を示すか、それに関連するか、またはその基礎を形成する生理化学的パラメータのプロフィールを含む、IL-2タンパク質ファミリーに属するまたは関する単離タンパク質またはそのキメラ分子に関する。より詳しく述べると、本発明は、多数の測定可能な生理化学的パラメータ、すなわち$\{[P_x]_1$、$[P_x]_2$、...$[P_x]_n\}$を含む生理化学的プロフィールを含むIL-2、IL-2-Fc、IL-2Ra、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb、IL-2Rb-Fc、IL-2RgおよびIL-2Rg-Fcの一覧より選択される単離タンパク質またはそのキメラ分子を提供し、式中、P_xは、測定可能な生理化学的パラメータを表し、「n」は≧1の整数であり、$[P_x]_1$～$[P_x]_n$の間の、およびそれらを含むそれぞれのパラメータは、異なる測定可能な生理化学的パラメータであり、任意の一つまたは複数の測定可能な生理化学的特徴の値は、特有の薬理学的特質T_yまたは一連の特有の薬理学的特質$\{[T_y]_1$、$[T_y]_2$、 ....$[T_y]_m\}$を示すか、それに関連するか、またはその基礎を形成し、式中T_yは特有の薬理学的特質を表し、mは≧1の整数であり、$[T_y]_1$～$[T_y]_m$のそれぞれは、異なる薬理

学的特質である。

【００２０】

本明細書において用いられるように、本発明のタンパク質またはそのキメラ分子の薬理学的特質に関して「特有の」という用語は、特定の生理化学的プロフィールに関して特有であるタンパク質またはそのキメラ分子の一つまたは複数の薬理学的特質を指す。特定の態様において、単離タンパク質またはそのキメラ分子の一つまたは複数の薬理学的特質は、原核細胞または下級真核細胞または非ヒト種高等真核細胞において産生された同じタンパク質またはそのキメラ分子の型と比較して異なるか、または特有である。もう一つの態様において、対象の単離タンパク質またはそのキメラ分子の薬理学的特質は、所望の機能的転帰に寄与する。本明細書において用いられるように、「測定可能な生理化学的パラメータ」という用語、またはPxは、単離タンパク質またはそのキメラ分子の一つまたは複数の測定可能な特徴を指す。本発明の特定の態様において、対象単離タンパク質またはそのキメラ分子の測定可能な生理化学的パラメータは、誘導された薬理学的特質T_yに寄与するか、そうでなければその原因である。

【００２１】

本発明の単離タンパク質またはそのキメラ分子は、全体としてとらえた場合に、タンパク質分子またはキメラ分子を定義する生理化学的パラメータ（P_x）を含む。生理化学的パラメータは、見かけの分子量（P_1）、等電点（pI）（P_2）、イソ型の数（P_3）、異なる数のイソ型の相対強度（P_4）、炭水化物の重量百分率（P_5）、N-結合型オリゴ糖の脱グリコシル化後に観察された分子量（P_6）、N-結合型およびO-結合型オリゴ糖の脱グリコシル化後に観察された分子量（P_7）、酸性単糖類の含有百分率（P_8）、単糖類含有量（P_9）、シアル酸含有量（P_{10}）、硫酸塩およびリン酸塩含有量（P_{11}）、セリン／スレオニン：GalNAc比（P_{12}）、中性N-結合型オリゴ糖の含有百分率（P_{13}）、酸性N-結合型オリゴ糖の含有百分率（P_{14}）、中性O-結合型オリゴ糖の含有百分率（P_{15}）、酸性O-結合型オリゴ糖の含有百分率（P_{16}）、N-結合型オリゴ糖比（P_{17}）、O-結合型オリゴ糖比（P_{18}）、N-結合型オリゴ糖分画の構造（P_{19}）、O-結合型オリゴ糖分画の構造（P_{20}）、N-結合型オリゴ糖の位置および構成（P_{21}）、O-結合型オリゴ糖の位置および構成（P_{22}）、翻訳時修飾（P_{23}）、翻訳後修飾（P_{24}）、アシル化（P_{25}）、アセチル化（P_{26}）、アミド化（P_{27}）、脱アミド化（P_{28}）、ビオチニル化（P_{29}）、カルバミル化またはカルバモイル化（P_{30}）、カルボキシル化（P_{31}）、脱カルボキシル化（P_{32}）、ジスルフィド結合形成（P_{33}）、脂肪酸のアシル化（P_{34}）、ミリストイル化（P_{35}）、パルミトイル化（P_{36}）、ステアロイル化（P_{37}）、ホルミル化（P_{38}）、糖化（P_{39}）、グリコシル化（P_{40}）、グリコホスファチジルイノシトールアンカー（P_{41}）、ヒドロキシル化（P_{42}）、セレノシステインの取り込み（P_{43}）、脂質化（P_{44}）、リポ酸付加（P_{45}）、メチル化（P_{46}）、N-またはC-末端ブロッキング（P_{47}）、N末端またはC末端除去（P_{48}）、ニトロ化（P_{49}）、メチオニンの酸化（P_{50}）、リン酸化（P_{51}）、タンパク質分解切断（P_{52}）、プレニル化（P_{53}）、ファルネシル化（P_{54}）、ゲラニルゲラニル化（P_{55}）、ピリドキサルリン酸付加（P_{56}）、シアリル化（P_{57}）、脱シアリル化（P_{58}）、硫酸化（P_{59}）、ユビキチニル化またはユビキチン化（P_{60}）、ユビキチン様分子の付加（P_{61}）、一次構造（P_{62}）、二次構造（P_{63}）、三次構造（P_{64}）、四次構造（P_{65}）、化学的安定性（P_{66}）、熱安定性（P_{67}）からなる群より選択されてもよい。これらのパラメータの一覧を表2に要約する。

【００２２】

特定の態様において、本発明のIL-2は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 kDaなどの1～100 kDa、特定の態様においては13～36 kDaの見かけの分子量(P_1)を含む生理化学的パラメータ(P_x)および薬理学的特質(T_x)のプロフィールを特徴とする。本発明のIL-2のpI(P_2)は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12

などの2～12であり、特定の態様においては5～9であり、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45個など約2～45個のイソ型、特定の態様においては5～40個のイソ型(P_3)を有する。本発明のIL-2の糖質重量百分率(P_5)は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80%など0～80%であり、特定の態様においては0～58%である。N-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2の分子量(P_6)は、13～36 kDaである。N-結合型およびO-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2の分子量(P_7)は、13～25 kDaである。本発明のIL-2の単糖類含有量(P_9)およびシアル酸含有量(P_{10})は、GalNAcに対して標準化した場合、1対0～2フコース、1対0～8 GlcNAc、1対0.1～5ガラクトース、および1対0～8 NeuNAcであり、特定の態様においては、1対0～1フコース、1対2～5 GlcNAc、1対1～4ガラクトース、および1対0.3～6 NeuNAcである。本発明のIL-2の単糖類含有量の割合として表したシアル酸含有量(P_{10})は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50%など0～50%であり、特定の態様においては0～25%である。本発明のIL-2の硫酸含有量(P_{11})は、GalNAcに対して標準化した場合、1～1-105硫酸であり、特定の態様においては1～1-70硫酸である。本発明のIL-2の単糖類含有量の割合として表した硫酸化(P_{59})は10～100%であり、特定の態様においては20～100%である。本発明のIL-2には、N-結合型グリカン構造は存在しない。本発明のIL-2の熱安定性(T_8)は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2の熱安定性とは異なり、詳細には、37℃での7日間のインキュベーション後にELISAアッセイ法によって決定される本発明のIL-2のタンパク質濃度は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2のタンパク質濃度よりも高い。本発明のIL-2の免疫反応性プロフィール(T_{13})は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2の免疫反応性プロフィールとは異なり、詳細には、本発明のIL-2のタンパク質濃度は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2を含むELISAキットを用いてアッセイした場合に過小評価される。本発明のIL-2の増殖能(T_{32})は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2の増殖能とは異なり、詳細には、CTLL-2細胞に対する本発明のIL-2の増殖能(T_{32})は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2の増殖能よりも高い。

【００２３】

特定の態様において、本発明のIL-2Ra-Fcは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250 kDaなどの1～250 kDa、特定の態様においては40～110 kDaの見かけの分子量(P_1)を含む生理化学的パラメータ(P_x)および薬理学的特質(T_x)のプロフィールを特徴とする。本発明のIL-2Ra-FcのpI(P_2)は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14などの2～14であり、特定の態様においては3.5～8であり、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個など約2～50個のイソ型、特定の態様においては5～80個のイソ型(P_3)を有する。本発明のIL-2Ra-Fcの糖質重量百分率(P_5)は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、

20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%など0～99%であり、特定の態様においては0～54%である。N-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2Ra-Fcの分子量(P_6)は51～90 kDaであり、特定の態様においては51～85 kDaである。N-結合型およびO-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2Ra-Fcの分子量(P_7)は51～85 kDaであり、特定の態様においては51～80 kDaである。本発明のIL-2Ra-FcのN-グリコシル化部位(P_{21})には、N-328(シグナル配列の開始点からの番号付け)が含まれる。本発明のIL-2Ra-Fcの免疫反応性プロフィール(T_{13})は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2Ra-Fcの免疫反応性プロフィールとは異なり、詳細には、本発明のIL-2Ra-Fcのタンパク質濃度は、非ヒト細胞系において発現された可溶性ヒトIL-2Raを用いて標準化するELISAキットでアッセイした場合に過剰評価される。

【００２４】

特定の態様において、本発明のIL-2Rb-Fcは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250 kDaなどの1～250 kDaの見かけの分子量(P_1)を含む生理化学的パラメータ(P_x)および薬理学的特質(T_x)のプロフィールを特徴とする。IL-2Rb-FcのpI(P_2)は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14などの2～14であり、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個など約2～50個のイソ型(P_3)を有する。本発明のIL-2Rb-Fcの糖質重量百分率(P_5)は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%など0～99%である。

【００２５】

特定の態様において、本発明のIL-2Rg-Fcは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、 110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250 kDaなどの1～250 kDa、特定の態様においては60～125 kDaの見かけの分子量(P_1)を含む生理化学的パラメータ(P_x)および薬理学的特質(T_x)のプロフィールを特徴とする。本発明のIL-2Rg-FcのpI(P_2)は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14などの2～14であり、特定の態様においては4～8.5であり、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個のような約2～50個のイソ型、特定の態様においては5～30個のイソ型(P_3)を有する。本発明のIL-2Rg-Fcの糖質重量百分率(P_5)は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68

、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%など0～99%であり、特定の態様においては8～56%である。N-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2Rg-Fcの分子量(P_6)は、55～100 kDaである。N-結合型およびO-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2Rg-Fcの分子量(P_7)は、55～95 kDaである。本発明のIL-2Rg-FcのN-グリコシル化部位(P_{21})には、N-159およびN-249(シグナル配列の開始点からの番号付け)が含まれる。

【００２６】

一つの特定の態様において、本発明は、IL-2、IL-2-Fc、IL-2Ra、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb、IL-2Rb-Fc、IL-2RgおよびIL-2Rg-Fcを含む群から選択される、IL-2タンパク質ファミリーに属するまたは関する単離型タンパク質またはそのキメラ分子を企図する。本発明の単離タンパク質またはキメラ分子は、治療効率（T_1）、有効治療量（$TCID_{50}$）（T_2）、生物学的利用率（T_3）、治療レベルを維持するための投与間隔（T_4）、吸収速度（T_5）、排泄速度（T_6）、特異的活性（T_7）、熱安定性（T_8）、凍結乾燥安定性（T_9）、血清／血漿安定性（T_{10}）、血清半減期（T_{11}）、血流での溶解度（T_{12}）、免疫反応性プロフィール（T_{13}）、免疫原性（T_{14}）、中和抗体による阻害（T_{14A}）、副作用（T_{15}）、受容体／リガンド結合親和性（T_{16}）、受容体／リガンド活性化（T_{17}）、組織または細胞タイプ特異性（T_{18}）、生体膜または障壁（すなわち、腸管、肺、血液脳関門、皮膚等）の通過能（T_{19}）、血管新生能（T_{19A}）、組織取り込み（T_{20}）、分解に対する安定性（T_{21}）、凍結融解に対する安定性（T_{22}）、プロテアーゼに対する安定性（T_{23}）、ユビキチン化に対する安定性（T_{24}）、投与の容易さ（T_{25}）、投与様式（T_{26}）、他の薬学的賦形剤または担体との適合性（T_{27}）、生物または環境における持続性（T_{28}）、貯蔵安定性（T_{29}）、生物および環境における毒性（T_{30})等を含む、またはそれらからなる群より選択される特有の薬理学的特質を含む。

【００２７】

さらに、本発明のタンパク質またはキメラ分子は、リンパ球、赤血球、網膜細胞、肝細胞、ニューロン、ケラチノサイト、内皮細胞、内胚葉細胞、外胚葉細胞、中胚葉細胞、上皮細胞、腎細胞、肝細胞、骨細胞、骨髄細胞、リンパ節細胞、表皮細胞、線維芽細胞、T-細胞、B-細胞、プラズマ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、顆粒球、好中球、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、好酸球、好塩基球、乳腺細胞、小葉細胞、前立腺細胞、肺細胞、食道細胞、膵細胞、ベータ細胞（インスリン分泌細胞）、血管芽細胞、筋細胞、楕円細胞（肝細胞）、間葉細胞、脳微小血管内皮細胞、星状細胞、グリア細胞、成人および胎児幹細胞を含む様々な幹細胞、様々な前駆細胞のようなヒト初代培養細胞、および他のヒトの不死化、形質転換、または癌細胞株が含まれるがこれらに限定されるわけではない、異なる細胞タイプに対して変更された生物学的効果（T_{31}）を有してもよい。

【００２８】

細胞に対する生物学的効果には、増殖（T_{32}）、分化（T_{33}）、アポトーシス（T_{34}）、細胞の大きさの成長（T_{35}）、サイトカイン接着（T_{36}）、細胞接着（T_{37}）、細胞の伸展（T_{38}）、細胞の運動性（T_{39}）、遊走および浸潤（T_{40}）、走化性（T_{41}）、細胞の包み込み（T_{42}）、シグナル伝達（T_{43}）、受容体／リガンドに対するタンパク質の動員（T_{44}）、JAK/STAT経路の活性化（T_{45}）、Ras-erk経路の活性化（T_{46}）、AKT経路の活性化（T_{47}）、PKC経路の活性化（T_{48}）、PKA経路の活性化（T_{49}）、srcの活性化（T_{50}）、fasの活性化（T_{51}）、TNFRの活性化（T_{52}）、NFkBの活性化（T_{53}）、p38MAPKの活性化（T_{54}）、c-fosの活性化（T_{55}）、分泌（T_{56}）、受容体のインターナリゼーション（T_{57}）、受容体のクロストーク（T_{58}）、表面マーカーのアップまたはダウンレギュレーション（T_{59}）、FACS前方／側方散乱プロフィールの変更（T_{60}）、サブグループ比の変更（T_{61}）、示差的遺伝子発現（T_{62}）、細胞の壊死（T_{63}）、細胞の塊形成（T_{64}）、細胞の反発（T_{65}）、ヘパリン硫酸に対する結合（T_{66}）、グリコシル化構造に対する結合（T_{67}）、コンドロイチン硫酸に対する結合（T_{68}）、細胞外マトリクス（コラーゲン、フィブロネクチンのような）に対する結合（T_{69}）、人工材料（足場のような）に対する結合（T_{70}）、担体に対す

る結合（T_{71}）、共因子に対する結合（T_{72}）に対する効果、幹細胞の増殖、分化、および／または自己再生に及ぼす単独または他のタンパク質との併用効果（T_{73}）等が含まれる。これらを表3に要約する。

【００２９】

本発明はさらに、単離タンパク質、または一つもしくは複数のタンパク質リンカーによってヒト免疫グロブリンの定常領域（Fc）もしくはフレームワーク領域に連結した、膜結合型タンパク質の細胞外ドメインのようなその断片を含むキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子も同様に、本明細書においてタンパク質-Fcと呼ばれる。本発明によって企図されるそのようなタンパク質-Fcの例には、IL-2-Fc、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb-Fc、およびIL2Rg-Fcが含まれる。

【００３０】

そのようなタンパク質-Fcは、単離されたタンパク質-Fcの一つまたは複数の特有の薬理学的特質を示す、またはそれに関連した測定可能な生理化学的パラメータのプロフィールを有する。本発明によって企図される他のキメラ分子には、多価不飽和脂肪酸分子のような脂質部分に連結したタンパク質、タンパク質-Fc、またはその断片が含まれる。そのような脂質部分は、分子の骨格におけるアミノ酸残基、またはそのようなアミノ酸残基の側鎖に連結してもよい。

【００３１】

本発明はさらに、単離タンパク質、または一つもしくは複数のタンパク質リンカーを通して哺乳動物の免疫グロブリンの定常領域(Fc)もしくはフレームワーク領域に連結した、膜結合型タンパク質の細胞外ドメインのような、その断片を含むキメラ分子を提供する。もう一つの局面において、哺乳動物の免疫グロブリンFcまたはフレームワーク領域は、ヒト、マーモセット、オランウータン、およびゴリラを含む霊長類、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ロバ）、実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、コンパニオン動物（例えば、ネコ、イヌ）、および捕獲された野生動物（例えば、齧歯類、キツネ、シカ、カンガルー）からなる群より選択される哺乳動物に由来する。もう一つの態様において、Fcまたはフレームワーク領域はヒト免疫グロブリンである。特定の態様において、哺乳動物はヒトである。そのようなキメラ分子はまた、本明細書においてタンパク質-Fcと呼ばれる。本発明によって企図される他のキメラ分子には、多価不飽和細胞酸分子のような脂質分子に連結したタンパク質、タンパク質-Fc、またはその断片が含まれる。そのような脂質部分は、分子の骨格におけるアミノ酸残基、またはそのようなアミン素案残基の側鎖に連結してもよい。IL-2-Fc、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb-Fc、およびIL2Rg-Fcを含む本発明のキメラ分子は、単離タンパク質-Fcの一つまたは複数の特有の薬理学的特質を示す、またはそれに関連した測定可能な生理化学パラメータのプロフィールを有する。

【００３２】

従って、本発明は、SEQ ID NO：27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93からなる一覧から選択されるヌクレオチド配列、または前述の一覧の配列の任意の一つに対して少なくとも約65％の同一性を有するヌクレオチド配列、または低ストリンジェンシー条件で上記の配列もしくはその相補型のいずれか一つとハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列によってコードされる単離ポリペプチドを提供する。

【００３３】

本発明のもう一つの局面は、細胞プロセスによってそのそれぞれのmRNA種のスプライシング後のSEQ ID NO：95からなるヌクレオチド配列によってコードされる単離ポリペプチドを提供する。

【００３４】

本発明のさらにもう一つの局面は、SEQ ID NO：28、30、32、34、38、40、42、44、46、48、50、52、54、58、60、62、64、66、68、70、72、74、78、80、82、84、86、88、90、92、94からなるアミノ酸配列、または上記の配列の一つまたは複数に対して少なくとも

約65％の類似性を有するアミノ酸配列を含む、単離ポリペプチドを提供する。

【００３５】

本発明はさらに、タンパク質またはそのキメラ分子の少なくとも一部を、薬学的に許容される担体、共因子、および／または希釈剤と共に含む薬学的組成物を企図する。

【００３６】

一次構造に関して、本発明は、SEQ ID NO：27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93からなる一覧から選択されるヌクレオチド配列、または前述の一覧の配列の任意の一つに対して少なくとも約60％の同一性を有するヌクレオチド配列、または低ストリンジェンシー条件で上記の配列もしくはその相補型のいずれか一つとハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列によってコードされる単離タンパク質、そのキメラ分子、またはその断片を提供する。

【００３７】

本発明のなおもう一つの局面は、SEQ ID NO：27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93からなる一覧から選択される少なくとも60％の類似性を有するヌクレオチド配列、または最適に整列させた後に、SEQ ID NO：27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93、またはその相補型の一つもしくは複数と低ストリンジェンシー条件でハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を含む、タンパク質、そのキメラ分子、またはその機能的部分をコードする単離核酸分子を提供する。

【００３８】

特定の態様において、本発明は、IL-2、IL-2-Fc、IL-2Ra、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb、IL-2Rb-Fc、IL-2Rg、IL-2Rg-Fcまたはその断片を含む群から選択されるIL-2タンパク質ファミリーに属するまたは関するタンパク質またはキメラ分子、SEQ ID NO：28、30、32、34、38、40、42、44、46、48、50、52、54、58、60、62、64、66、68、70、72、74、78、80、82、84、86、88、90、92、94の一つもしくは複数において実質的に上記で記載された通りのアミノ酸配列、または整列させた後にSEQ ID NO：28、30、32、34、38、40、42、44、46、48、50、52、54、58、60、62、64、66、68、70、72、74、78、80、82、84、86、88、90、92、94の一つもしくは複数に対して少なくとも約60％の類似性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子に向けられる。

【００３９】

もう一つの局面において、本発明は、SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17もしくは19の一つもしくは複数において実質的に記述された通りのヒト免疫グロブリンの定常領域（Fc）もしくはフレームワーク領域をコードするヌクレオチド配列に対して、直接連結した、もしくは当技術分野で公知のタンパク質リンカーをコードする一つもしくは複数のヌクレオチド配列によって連結した、SEQ ID NO：29、31、39、41、59、61、79、81からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、IL-2、IL-2Ra、IL-2Rb、IL-2Rg、またはその断片からなる群より選択されるIL-2タンパク質ファミリーに属するまたは関するタンパク質またはキメラ分子をコードする単離核酸分子を提供する。特定の態様において、タンパク質リンカーは、IP、GSSNT、TRAまたはVDGIQWIPを含む。

【００４０】

もう一つの局面において、本発明は、SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18もしくは20の一つもしくは複数において実質的に記載通りのヒト免疫グロブリンの定常領域（Fc）もしくはフレームワーク領域に、直接連結した、または当技術分野において公知の一つもしくは複数のタンパク質リンカーによって連結したSEQ ID NO：30、32、40、42、60、62、80、82からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、IL-2、IL-2Ra、IL-2Rb、IL-2Rg、またはその断片を含む群から選択されるIL-2タンパク質ファミリーに属するまたは関する単離タンパク質を提供する。

【００４１】

本発明はさらに、診断、予防、治療、栄養、および／または研究用途において、単離タンパク質、そのキメラ分子、またはそれらをコードする核酸分子を用いることに拡大される。より詳しくは、本発明は、単離タンパク質またはそのキメラ分子の有効量を動物被験体に投与する段階を含む、動物被験体における状態を処置もしくは予防する、または動物被験体における状態の症状を改善する方法に拡大される。

【００４２】

さらに、本発明は、多様な診断、予防、治療、栄養、および／または研究応用を有する可能性がある低分子をスクリーニングするためのタンパク質またはそのキメラ分子の使用に拡大される。

【００４３】

本発明はさらに、治療または診断応用のために抗体を産生するための免疫原として単離タンパク質またはそのキメラ分子を用いることを企図する。

【００４４】

本発明はさらに、幹細胞または関連治療において用いられる幹細胞のための培養培地において単離タンパク質またはそのキメラ分子を用いることを企図する。

【００４５】

本発明はまた、診断、予防、治療、栄養、および／または研究応用のための処方の製造におけるタンパク質またはキメラ分子の使用を提供する。

【００４６】

本発明はまた、イムノアッセイおよびそのキットにおける標準タンパク質として用いるためのヒト由来のタンパク質またはそのキメラ分子を提供する。本発明はまた、生物学的調製物におけるヒト細胞発現ヒトタンパク質またはそのキメラ分子のレベルを決定する方法にも拡大される。

【００４７】

（表１）配列同定子

配列識別子	配列
SEQ ID NO:1	ヒトIgG1 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:2	ヒトIgG1 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:3	ヒトIgG1 Fcヌクレオチド配列(変種)
SEQ ID NO:4	ヒトIgG1 Fcアミノ酸配列(変種)
SEQ ID NO:5	ヒトIgG2 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:6	ヒトIgG2 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:7	ヒトIgG3 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:8	ヒトIgG3 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:9	ヒトIgG4 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:10	ヒトIgG4 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:11	ヒトIgA1 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:12	ヒトIgA1 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:13	ヒトIgA2 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:14	ヒトIgA2 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:15	ヒトIgM Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:16	ヒトIgM Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:17	ヒトIgE Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:18	ヒトIgE Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:19	ヒトIgD Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:20	ヒトIgD Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:21	ヒトIgG1 Fcフォワードプライマー(pIRESbleo IPクローニング用)(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:22	ヒトIgG1 Fcリバースプライマー(pIRESbleo IPクローニング用)(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:23	ヒトIgG1 Fcフォワードプライマー(pIRESbleo GSSNTクローニング用)(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:24	ヒトIgG1 Fcリバースプライマー(pIRESbleo GSSNTクローニング用)(ヌクレオチド配列)

SEQ ID NO:25	IL-2フォワードプライマー(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:26	IL-2リバースプライマー(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:27	シグナルペプチドに関するIL-2ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:28	シグナルペプチドに関するIL-2アミノ酸配列
SEQ ID NO:29	成熟ペプチドに関するIL-2ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:30	成熟ペプチドに関するIL-2アミノ酸配列
SEQ ID NO:31	(シグナルペプチド+成熟ペプチド)に関するIL-2ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:32	(シグナルペプチド+成熟ペプチド)に関するIL-2アミノ酸配列
SEQ ID NO:33	全構築物(シグナルペプチド+成熟ペプチド+GSSNTリンカー+IgG1 Fc)に関するIL-2ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:34	全構築物(シグナルペプチド+成熟ペプチド+GSSNTリンカー+IgG1 Fc)に関するIL-2アミノ酸配列
SEQ ID NO:35	IL-2Raフォワードプライマー(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:36	IL-2Raリバースプライマー(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:37	シグナルペプチドに関するIL-2Raヌクレオチド配列
SEQ ID NO:38	シグナルペプチドに関するIL-2Raアミノ酸配列
SEQ ID NO:39	成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Raヌクレオチド配列
SEQ ID NO:40	成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Raアミノ酸配列
SEQ ID NO:41	シグナルペプチド+成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Raヌクレオチド配列
SEQ ID NO:42	シグナルペプチド+成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Raアミノ酸配列
SEQ ID NO:43	成熟ペプチド(ECD)+GIPリンカー IgG1 Fcに関するIL-2Ra-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:44	成熟ペプチド(ECD)+GIPリンカー IgG1 Fcに関するIL-2Ra-Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:45	成熟ペプチド(ECD)+GIPリンカー IgG1 Fc(変種)に関するIL-2Ra-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:46	成熟ペプチド(ECD)+GIPリンカー IgG1 Fc(変種)に関するIL-2Ra-Fcアミノ酸配列

SEQ ID NO:47	成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Ra-Fc ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:48	成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Ra-Fc アミノ酸配列
SEQ ID NO:49	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GIPリンカー IgG1 Fc)に関するIL-2Ra-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:50	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GIPリンカー IgG1 Fc)に関するIL-2Ra-Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:51	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GIPリンカー IgG1 Fc (変種))に関するIL-2Ra-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:52	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GIPリンカー IgG1 Fc (変種))に関するIL-2Ra-Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:53	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Ra-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:54	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Ra-Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:55	IL-2Rbフォワードプライマー(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:56	IL-2Rbリバースプライマー(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:57	シグナルペプチドに関するIL-2Rbヌクレオチド配列
SEQ ID NO:58	シグナルペプチドに関するIL-2Rbアミノ酸配列
SEQ ID NO:59	成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Rbヌクレオチド配列
SEQ ID NO:60	成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Rbアミノ酸配列
SEQ ID NO:61	シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Rb ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:62	シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Rb アミノ酸配列
SEQ ID NO:63	成熟ペプチド(ECD)＋IPリンカー＋IgG1 Fcに関するIL-2Rb-Fc ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:64	成熟ペプチド(ECD)＋IPリンカー＋IgG1 Fcに関するIL-2Rb-Fc アミノ酸配列

SEQ ID NO:65	成熟ペプチド(ECD)＋IPリンカー＋IgG1 Fc(変種)に関するIL-2Rb-Fc ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:66	成熟ペプチド(ECD)＋IPリンカー＋IgG1 Fc(変種)に関するIL-2Rb-Fc アミノ酸配列
SEQ ID NO:67	成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fcに関するIL-2Rb-Fc ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:68	成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fcに関するIL-2Rb-Fc アミノ酸配列
SEQ ID NO:69	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋IPリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Rb-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:70	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋IPリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Rb-Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:71	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋IPリンカー＋IgG1 Fc(変種))に関するIL-2Rb-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:72	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋IPリンカー＋IgG1 Fc(変種))に関するIL-2Rb-Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:73	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Rb-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:74	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Rb-Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:75	IL-2Rgフォワードプライマー(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:76	IL-2Rgリバースプライマー(ヌクレオチド配列)
SEQ ID NO:77	シグナルペプチドに関するIL-2Rgヌクレオチド配列
SEQ ID NO:78	シグナルペプチドに関するIL-2Rgアミノ酸配列
SEQ ID NO:79	成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Rgヌクレオチド配列
SEQ ID NO:80	成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Rgアミノ酸配列
SEQ ID NO:81	シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Rg ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:82	シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)に関するIL-2Rg アミノ酸配列

SEQ ID NO:83	成熟ペプチド(ECD)＋WIPリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Rg-Fc ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:84	成熟ペプチド(ECD)＋WIPリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Rg-Fc アミノ酸配列
SEQ ID NO:85	成熟ペプチド(ECD)＋WIPリンカー＋IgG1 Fc(変種)に関するIL-2Rg-Fc ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:86	成熟ペプチド(ECD)＋WIPリンカー＋IgG1 Fc(変種)に関するIL-2Rg-Fc アミノ酸配列
SEQ ID NO:87	成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Rg-Fc ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:88	成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋IgG1 Fc)に関するIL-2Rg-Fc アミノ酸配列
SEQ ID NO:89	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋WIPリンカー＋ IgG1 Fc)に関するIL-2Rg-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:90	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋WIPリンカー＋ IgG1 Fc)に関するIL-2Rg-Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:91	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋ WIPリンカー＋IgG1 Fc(変種))に関するIL-2Rg-Fc ヌクレオチド配列
SEQ ID NO:92	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋ WIPリンカー＋IgG1 Fc(変種))に関するIL-2Rg-Fc アミノ酸配列
SEQ ID NO:93	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋ IgG1 Fc)に関するIL-2Rg-Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:94	全構築物(シグナルペプチド＋成熟ペプチド(ECD)＋GSSNTリンカー＋ IgG1 Fc)に関するIL-2Rg-Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:95	IL-2ゲノムヌクレオチド配列

【００４８】
（表２）生理化学的パラメータの一覧

P_x	生理化学的パラメータ	IL-2	IL-2Ra-Fc	IL-2Rb-Fc	IL-2Rg-Fc
P_1	見かけの分子量	13-36 kDa	40-110 kDa	1-250 kDa	60-125 kDa
P_2	等電点(pI)	5-9	3.5-8	2-14	4-8.5
P_3	イソ型の数	5-40	5-80	2-50	5-30
P_4	異なる数のイソ型の相対強度				
P_5	糖質(重量%)	0-58 %	0-54%	0-99%	8-56%
P_6	N-結合型オリゴ糖の脱グリコシル化後に観察される分子量	13-36 kDa	51-85 kDa		55-100 kDa
P_7	N-結合型オリゴ糖の脱グリコシル化およびO-結合型オリゴ糖の脱グリコシル化後に観察される分子量	13-25 kDa	51-80 kDa		55-95 kDa

P_8	酸性 単糖類 含有量率				
P_9	単糖類 含有量	GalNAcに対して標準化した場合： 1対0～2フコース、 1対0～8 GlcNAc 1対0.1～5ガラクトース。			
P_{10}	シアル酸含有量	GalNAcに対して標準化した場合： 1対0～8 NeuNAc； 単糖類含有量の割合として表した場合： 0～50%。			
P_{11}	硫酸およびリン酸 含有量	GalNAcに対して標準化した場合： 1対1～105硫酸。			

P_{12}	Ser/Thr:GalNAc 比				
P_{13}	N-結合型 オリゴ糖 含有量の 中性率				
P_{14}	N-結合型 オリゴ糖 含有量の 酸性率				
P_{15}	O-結合型 オリゴ糖 含有量の 中性率				
P_{16}	O-結合型 オリゴ糖 含有量の 酸性率				

P_{17}	N-結合型 オリゴ糖比						
P_{18}	O-結合型 オリゴ糖比						
P_{19}	N-結合型画分の 構造						
P_{20}	O-結合型画分の 構造						
P_{21}	N-結合型 オリゴ糖の位置 および構成	N-結合型グリカン構造は存在しない。	N-328 (シグナル配列の 開始点からの 番号付け)を 含む。		N-159およびN-249 (シグナル配列の 開始点からの 番号付け)を含む。		
P_{22}	O-結合型 オリゴ糖の位置 および構成						
P_{23}	翻訳時 修飾						
P_{24}	翻訳後 修飾						

P_{25}	アシル化																		
P_{26}	アセチル化																		
P_{27}	アミド化																		
P_{28}	脱アミド化																		
P_{29}	ビオチン化																		
P_{30}	カルバミル化またはカルバモイル化																		
P_{31}	カルボキシル化																		
P_{32}	脱カルボキシル化																		
P_{33}	ジスルフィド結合形成																		
P_{34}	脂肪酸アシル化																		
P_{35}	ミリストイル化																		
P_{36}	パルミトイル化																		
P_{37}	ステアロイル化																		
P_{38}	ホルミル化																		
P_{39}	糖化																		

P_{40}	グリコシル化							
P_{41}	グリコホスファチジル イノシトールアンカー							
P_{42}	ヒドロキシル化							
P_{43}	セレノシステインの 取り込み							
P_{44}	脂質化							
P_{45}	リボ酸付加							
P_{46}	メチル化							
P_{47}	N末端またはC末端 ブロッキング							
P_{48}	N末端またはC末端 除去							
P_{49}	ニトロ化							
P_{50}	メチオニンの 酸化							
P_{51}	リン酸化							
P_{52}	タンパク質分解切断							

P_{53}	プレニル化																		
P_{54}	ファルネシル化																		
P_{55}	ゲラニルゲラニル化																		
P_{56}	ピリドキサルリン酸 付加																		
P_{57}	シアル化																		
P_{58}	脱シアル化																		
P_{59}	硫酸化	単糖類含有量の割合として 表した場合：10～100‰																	
P_{60}	ユビキチニル化または ユビキチン化																		
P_{61}	ユビキチン様分子の 付加																		
P_{62}	一次構造																		
P_{63}	二次構造																		
P_{64}	三次構造																		
P_{65}	四次構造																		
P_{66}	化学的安定性																		
P_{67}	熱安定性																		

【００４９】

（表３）薬理学的特質の一覧

T_y	薬理学的特質	IL-2	IL-2Ra-Fc	IL-2Rb-Fc	IL-2Rg-Fc
T_1	治療効率				
T_2	有効治療量 ($TCID_{50}$)				
T_3	生物学的利用率				
T_4	治療レベルを維持する ための投与間隔				
T_5	吸収速度				
T_6	排泄速度				
T_7	比活性				
T_8	熱安定性	37℃での7日間の インキュベーション後に ELISA法によって決定される タンパク質濃度は、 大腸菌において発現された 組換えヒトIL-2タンパク質の タンパク質濃度よりも高い。			

T_9	凍結乾燥安定性				
T_{10}	血清/血漿安定性				
T_{11}	血清半減期				
T_{12}	血流中での溶解度				
T_{13}	免疫反応性プロフィール	大腸菌において発現された 組換えヒトIL-2タンパク質 標準物質を用いて ELISA法によりアッセイした 場合、タンパク質濃度は 過小評価される。	NS0マウス細胞において 発現された可溶性IL-2Ra タンパク質を用いて標準化する ELISAキットによりアッセイした 場合、タンパク質濃度は 過剰評価される。		
T_{14}	免疫原性				
T_{14A}	中和抗体による 阻害				
T_{15}	副作用				
T_{16}	受容体/リガンド結合 親和性				
T_{17}	受容体/リガンド活性化				
T_{18}	組織または細胞種特異性				

T_{19}	生体膜または生物学的障壁 (すなわち、腸管、肺、 血液脳関門、皮膚など) の通過能							
T_{19A}	血管新生能							
T_{20}	組織取り込み							
T_{21}	分解に対する安定性							
T_{22}	凍結融解に対する安定性							
T_{23}	プロテアーゼに対する安定性							
T_{24}	ユビキチン化に対する安定性							
T_{25}	投与の簡便性							
T_{26}	投与様式							
T_{27}	他の薬学的賦形剤 または担体との 適合性							
T_{28}	生物または環境における 持続性							
T_{29}	貯蔵安定性							
T_{30}	生物および環境などに おける毒性							

T_{31}	異なる細胞種に対する 生物学的効果の変化					
T_{32}	増殖	大腸菌で発現された組換えヒトIL-2タンパク質よりも、CTLL-2細胞に対する増殖活性が高い。				
T_{33}	分化					
T_{34}	アポトーシス					
T_{35}	細胞サイズの成長					
T_{36}	サイトカイン接着					
T_{37}	細胞接着					
T_{38}	細胞伸展					
T_{39}	細胞運動性					
T_{40}	遊走および浸潤					
T_{41}	走化性					
T_{42}	細胞貪食(Cell engulfment)					
T_{43}	シグナル伝達					
T_{44}	受容体/リガンドへの タンパク質の動員					

| | | |

T_{59}	表面マーカーの上方または 下方制御														
T_{60}	FACS前方/側方散乱 プロファイルの変化														
T_{61}	サブグループ比の変化														
T_{62}	差次的遺伝子発現														
T_{63}	細胞壊死														
T_{64}	細胞凝集														
T_{65}	細胞反発														
T_{66}	ヘパリン硫酸への結合														
T_{67}	グリコシル化構造への 結合														
T_{68}	コンドロイチン硫酸への 結合														
T_{69}	細胞外基質(コラーゲン、 フィブロネクチンなど) への結合														
T_{70}	人工材料(足場など)への 結合														
T_{71}	担体への結合														
T_{72}	補因子への結合														
T_{73}	幹細胞の増殖、分化、 および/または 自己再生に及ぼす、 単独でのまたは他の タンパク質と併用した効果。														

【００５０】

本明細書において一般的に使用する略語の一覧を表4および表5に提供する。

【００５１】

（表４）略語および別称

略語	説明
AAA	アミノ酸解析
AFC	アフィニティークロマトグラフィー
bFGF	塩基性線維芽細胞増殖因子、FGF2
BSA	ウシ血清アルブミン
cDLC	組み合わせ色素リガンドクロマトグラフィー
CSF	コロニー刺激因子
DCS	ドナー仔ウシ血清
DeoxGlc	2-デオキシグルコース
DLC	色素リガンド疑似アフィニティークロマトグラフィー
DSC	示差走査熱量測定
ECD	細胞外ドメイン
EGF	上皮増殖因子
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
EPO	エリスロポエチン
EST	発現配列タグ
Fc	結晶化可能断片または免疫グロブリン定常領域
FCS	ウシ胎仔血清
FGF2	塩基性線維芽細胞増殖因子、bFGF
FTIS	フーリエ変換赤外分光法
Fuc	フコース
G-CSF	顆粒球コロニー刺激因子
Gal	ガラクトース
GalNAc, ガラクトサミン	2-デオキシ, 2アミノガラクトース
GFC	ゲル濾過クロマトグラフィー
GlcA	グルクロン酸

GlcNAc, グルコサミン	2-デオキシ,2アミノグルコース
Glc	グルコース
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HBS	Hepes緩衝生理食塩水
hES	ヒト胚性幹細胞
HIC	疎水性相互作用クロマトグラフィー
HPAEC-PAD	パルスアンペロメトリック検出器を備えた高pH陰イオン交換クロマトグラフィー
HPLC	高圧液体クロマトグラフィーまたは高速液体クロマトグラフィー
HSA	ヒト血清アルブミン
HTS	ハイスループットスクリーニング
IdoA	イズロン酸
IEC	イオン交換クロマトグラフィー
IEF	等電点電気泳動
IFN	インターフェロン
Ig	免疫グロブリン
IL	インターロイキン
lacNAc	N-アセチルラクトサミン
IL-2	インターロイキン2(IL2)；幼若化因子(BF)；好酸球分化因子(EDF)；キラー細胞ヘルパー因子(KHF)；リンパ球分裂促進因子(LMF)；リンパ球馴化培地因子(LCM因子)；リンパ球増殖因子(LPF)；細胞障害性に関するマクロファージ活性化因子I(MAC-CI)；プラーク形成細胞促進因子(PFC-EA)；二次細胞傷害性T細胞誘導因子(SCIF)；T細胞増殖因子(TCGF)；Tコロニー促進活性(TCPA)；胸腺細胞分化因子(TDF)；胸腺細胞分裂促進因子(TMF)；T細胞成熟因子(TMF)；T細胞分裂促進因子(TMF)；T細胞置換因子-3(TRF-3)；胸腺細胞刺激因子(TSF)。

IL-2Ra	インターロイキン2受容体α(IL2Ra)；CD25；T細胞活性化(Tac)；P55。
IL-2Rb	インターロイキン2受容体β(IL2Rb)；CD122；P75。
IL-2Rg	インターロイキン2受容体γ(IL2Rg)
lacdiNAc	N,N'-ジアセチルラクトースジアミン
LC	液体クロマトグラフィー
MALDI-TOF	マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型
Man	マンノース
MCC	金属キレートクロマトグラフィー
MS	質量分析
NacSial, NeuAcまたはNeuNAc	N-アセチルノイラミン酸
NGlySial, NeuGcまたはNeuGly	N-グリコリルノイラミン酸
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
PCS	光子相関分光法
PDGF-AA	血小板由来増殖因子Aホモ二量体
PNGase	ペプチド-N4-(N-アセチル-β-D-グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼ
RMLP	受容体媒介性リガンドクロマトグラフィー
RPC	逆相クロマトグラフィー
SDS PAGE	ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
SEC	サイズ排除クロマトグラフィー
Sia	シアル酸
TCA	トリクロロ酢酸
TFF	接線流濾過
TGF	トランスフォーミング増殖因子
TNF	腫瘍壊死因子
TNFR	腫瘍壊死因子受容体
Xyl	キシロース

【００５２】
（表５）アミノ酸の略語

アミノ酸	三文字 表記	一文字 表記
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
スレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【００５３】

（表６）幹細胞の一覧

細胞タイプ
一般的な幹細胞タイプ
胚性幹細胞
体性幹細胞
生殖幹細胞
ヒト胚性幹細胞
ヒト上皮幹細胞
脂肪由来幹細胞
脳
成人神経幹細胞
ヒトニューロン
ヒト星状細胞
上皮
ヒトケラチノサイト幹細胞
ヒトケラチノサイト一過性増殖細胞
ヒトメラノサイト幹細胞
ヒトメラノサイト
皮膚
ヒト包皮線維芽細胞

膵臓
ヒト膵管細胞
ヒト膵島
ヒト膵β細胞
腎臓
ヒト成人腎幹細胞
ヒト胚腎上皮幹細胞
ヒト腎上皮細胞
肝臓
ヒト肝楕円細胞
ヒト肝細胞
ヒト胆管上皮細胞
ヒト胚内胚葉幹細胞
ヒト成人肝細胞幹細胞（存在は論争中）
乳房
ヒト乳腺上皮幹細胞
肺
骨髄由来幹細胞
ヒト肺線維芽細胞
ヒト気管支上皮細胞
ヒト肺胞II型肺胞細胞
筋
ヒト骨格筋幹細胞（衛星細胞）
心臓
ヒト心筋細胞
骨髄間葉幹細胞
単純扁平上皮細胞
下行大動脈内皮細胞
大動脈弓内皮細胞
大動脈平滑筋細胞
眼

辺縁幹細胞
角膜上皮細胞
CD34+造血幹細胞
間葉幹細胞
骨芽細胞（前駆体は間葉幹細胞）
末梢血単核前駆細胞（造血幹細胞）
破骨細胞（前駆体は上記の細胞タイプ）
間質細胞
脾臓
ヒト脾臓前駆幹細胞
ヒト脾細胞
免疫細胞
ヒトCD4+ T細胞
ヒトCD8+ T細胞
ヒトNK細胞
ヒト単球
ヒトマクロファージ
ヒト樹状細胞
ヒトB-細胞
鼻
杯細胞（鼻の粘液分泌細胞）
偽線条線毛円柱細胞（鼻の嗅覚領域下に存在）
偽線条線毛上皮（鼻咽喉管に沿って並ぶ細胞）
気管
重層上皮細胞（気管に沿って並びにこれを構築する細胞）
線毛円柱細胞（気管に沿って並びにこれを構築する細胞）
杯細胞（気管に沿って並びにこれを構築する細胞）
基底細胞（気管に沿って並びにこれを構築する細胞）
食道
輪状咽頭筋細胞
生殖
女性の一次卵胞
男性の精原細胞

【００５４】

好ましい態様の詳細な説明

特に明記していなければ、特異的な処方、製造法、診断法、アッセイプロトコール、栄

養プロトコール、または研究プロトコール等は変化する可能性があることから、本発明はそれらに限定されないと理解すべきである。同様に、本明細書において用いられた用語は、特定の態様を説明する目的に限られ、制限的に解釈されるべきではないと理解すべきである。

【００５５】

本明細書において用いられるように、単数形「一つの（a）」、「一つの（an）」および「その（the）」には、本文が既にそうでないことを指図している場合を除き、複数の局面が含まれることに注意しなければならない。このように、例えば、「タンパク質」、「サイトカイン」、「キメラ分子」、または「受容体」に対する言及には、一つのタンパク質、サイトカイン、受容体、またはキメラ分子と共に二つもしくはそれより多いタンパク質、サイトカイン、受容体、またはキメラ分子が含まれ；「生理化学的パラメータ」には、一つのパラメータと共に二つまたは複数のパラメータが含まれる。

【００５６】

「化合物」、「活性物質」、「化学物質」、「薬理活性物質」、「薬剤」、「活性な」および「薬物」という用語は、本明細書において化学化合物を指すために、特に所望の薬理学的および／または生理学的効果を誘導するタンパク質またはそのキメラ分子を指すために互換的に用いられる。この用語はまた、塩、エステル、アミド、プロドラッグ、活性代謝物、類似体等が含まれるがこれらに限定されるわけではない、本明細書において具体的に言及されたそれらの活性物質の薬学的に許容される、薬理学的に活性な成分を含む。「化合物」、「活性物質」、「化学物質」、「薬理活性物質」、「薬剤」、「活性な」および「薬物」という用語が用いられる場合、この用語には活性物質自身と共に薬学的に許容される、薬理学的に活性な塩、エステル、アミド、プロドラッグ、代謝物、類似体等が含まれると理解すべきである。

【００５７】

「化合物」、「活性物質」、「化学物質」、「薬理活性物質」、「薬剤」、「活性な」および「薬物」という言及には、二つまたはそれより多いサイトカインのような、二つまたはそれより多い活性物質の組み合わせが含まれる。「組み合わせ」にはまた、物質が個別に提供されて個別に与えられるもしくは投薬される、または投薬前に共に十分に混合される、二部組成物のような多数の部分が含まれる。

【００５８】

例えば、多数の部分の薬学パックは、個別に維持されたIL-2、IL-2-Fc、IL-2Ra、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb、IL-2Rb-Fc、IL-2Rg、IL-2Rg-Fcを含む群より選択される二つまたはそれより多いIL-2タンパク質ファミリーに属するまたは関するタンパク質またはキメラ分子を有してもよい。

【００５９】

本明細書において用いられるように、「有効量」および「治療的有効量」という用語は、所望の治療効果、生理的効果または転帰を提供するために、単独で、または他の物質と併用したタンパク質またはそのキメラ分子の十分量を意味する。望ましくない効果、例えば副作用が、時に所望の治療効果と共に現れる。従って、医師は、何が適当な「有効量」であるかを決定する場合には、起こり得るリスクに対して起こり得る利益を考量する。必要な正確な量は、被験体の種、年齢および全身状態、投与様式等に応じて、被験体によって変化すると思われる。このように、正確な「有効量」を明記することは可能ではないかもしれない。しかし、任意の個々の症例における適当な「有効量」は、日常的な実験のみを用いて当業者によって決定される可能性がある。

【００６０】

「薬学的に許容される」担体、賦形剤、または希釈剤は、生物学的にまたはそれ以外でも望ましくないことがない材料を含む薬学的媒体を意味し、すなわち材料は、いかなるまたは実質的な有害反応を引き起こすことなく、選択された活性物質と共に被験体に投与してもよい。担体には、賦形剤、および希釈剤、洗浄剤、着色剤、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、保存剤等のような他の添加物が含まれてもよい。

【００６１】
同様に、本明細書において提供された化合物の「薬学的に許容される」塩、エステル、アミド、プロドラッグ、または誘導体は、生物学的またはそれ以外でも望ましくないことがない塩、エステル、アミド、プロドラッグ、または誘導体である。
【００６２】
本明細書において用いられるように「処置する」および「処置」という用語は、処置される状態の症状の重症度および／または回数の低減、症状および／または基礎となる原因の消失、状態の症状および／または基礎となる原因の発生の予防、ならびに状態後の損傷の改善、治療、または回復を指す。
【００６３】
被験体を「処置する」ことは、状態の症状を回復させることによって、臨床症候性の個体を処置すると共に、感受性のある個体における状態または他の有害な生理的事象の予防を含んでもよい。
【００６４】
本明細書において用いられる「被験体」は、動物を指し、特定の態様において、哺乳動物を指し、さらなる態様において、本発明の薬学的処方および方法によって恩恵を得ることができるヒトを指す。本発明に記述される薬学的処方および方法によって恩恵を受けることができるであろう動物のタイプに制限はない。ヒトまたは非ヒト動物か否かによらず、被験体は個体、患者、動物、宿主、またはレシピエントと呼ばれる。本発明の化合物および方法は、一般的に家畜または野生動物の管理と共にヒト医学、獣医学において用途を有する。
【００６５】
先に示したように、特定の態様において動物とは、ヒトまたはオランウータン、ゴリラ、マーモセットのような他の霊長類、家畜動物、実験動物、コンパニオン動物、または捕獲された野生動物、および鳥類である。
【００６６】
実験動物の例には、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、およびハムスターが含まれる。ウサギ、ならびにラットおよびマウスのような齧歯類動物は、簡便な試験系または動物モデルを提供する。家畜動物には、ヒツジ、ウシ、ブタ、ヤギ、ウマ、およびロバが含まれる。鳥類、魚類、およびツメガエル種を含む両生類のような非哺乳動物、原核細胞および非哺乳動物真核細胞。
【００６７】
「サイトカイン」という用語は、その最も一般的な意味で用いられ、これには、免疫系を調節する、個々の細胞および／または組織の機能的活性を調整する、および／または一連の生理的反応を誘導するために、細胞によって分泌される任意の様々なタンパク質が含まれる。本明細書において用いられるように、「サイトカイン」という用語は、一つまたは複数のアミノ酸付加、欠失、または置換を含むが、完全なサイトカインの生物活性を実質的に保持しているその断片、誘導体、相同体、またはキメラと共に「完全な」サイトカインを指すと理解すべきである。
【００６８】
「サイトカイン受容体」は、サイトカインのシグナル伝達または調節に関係するサイトカイン受容体の細胞膜会合部分または可溶性部分である。本明細書において用いられるように、「サイトカイン受容体」という用語は、一つまたは複数のアミノ酸付加、欠失、または置換を含むが、完全なサイトカイン受容体の生物活性を実質的に保持しているその断片、誘導体、相同体、またはキメラと共に「完全な」サイトカイン受容体を指すと理解すべきである。
【００６９】
「タンパク質」という用語は、その最も広い意味において用いられ、これにはサイトカインおよびサイトカイン受容体が含まれる。本明細書において用いられるように、「タンパク質」という用語は、一つまたは複数のアミノ酸付加、欠失、または置換を含むが、完

全なタンパク質の生物活性を実質的に保持しているその断片、誘導体、相同体、またはキメラと共に「完全な」タンパク質を指すと理解されるべきである。

【００７０】

本発明は、一つまたは複数の特有の薬理学的特質（T_y）を示すか、それに関連するか、またはそれの基礎を形成する、測定可能な生理化学的パラメータ（P_x）のプロフィールを有する、単離タンパク質またはそのキメラ分子を企図する。単離タンパク質またはキメラ分子がIL-2タンパク質ファミリーに属するまたは関するタンパク質であり、IL-2、IL-2-Fc、IL-2Ra、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb、IL-2Rb-Fc、IL-2RgおよびIL-2Rg-Fcを含む群より選択される。本明細書において用いられるように、IL-2、IL-2-Fc、IL-2Ra、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb、IL-2Rb-Fc、IL-2RgおよびIL-2Rg-Fcという用語には、その断片と共にポリペプチド全体に対する言及が含まれる。

【００７１】

より詳しく述べると、本発明は、測定可能な生理化学的パラメータ、すなわち$\{[P_x]_1$、$[P_x]_2$、....$[P_x]_n\}$のアレイを含む生理化学的プロフィールを有する単離タンパク質またはそのキメラ分子を提供し、式中、P_xは、測定可能な生理化学的パラメータを表し、「n」は≧1の整数であり、$[P_x]_1$～$[P_x]_n$のそれぞれは、異なる測定可能な生理化学的パラメータであり、任意の一つまたは複数の測定可能な生理化学的特徴の値は、特有の薬理学的特質T_yまたは多数の特有の薬理学的特質$\{[T_y]_1$、$[T_y]_2$、 ....$[T_y]_m\}$を示すか、それに関連するか、またはその基礎を形成し、T_yは特有の薬理学的特質を表し、mは≧1の整数であり、$[T_y]_1$～$[T_y]_m$のそれぞれは、異なる薬理学的特質である。

【００７２】

本明細書において用いられるように、「測定可能な生理化学的パラメータ」（P_x）という用語は、単離タンパク質またはそのキメラ分子の一つまたは複数の測定可能な特徴を指す。例としての「特有の生理化学的パラメータ」には、見かけの分子量（P_1）、等電点（pI）（P_2）、イソ型の数（P_3）、異なる数のイソ型の相対強度（P_4）、炭水化物の重量百分率（P_5）、N-結合型オリゴ糖の脱グリコシル化後に観察された分子量（P_6）、N-結合型およびO-結合型オリゴ糖の脱グリコシル化後に観察された分子量（P_7）、酸性単糖類の含有百分率（P_8）、単糖類含有量（P_9）、シアル酸含有量（P_{10}）、硫酸塩およびリン酸塩含有量（P_{11}）、セリン／スレオニン：GalNAc比（P_{12}）、中性N-結合型オリゴ糖の含有百分率（P_{13}）、酸性N-結合型オリゴ糖の含有百分率（P_{14}）、中性O-結合型オリゴ糖の含有百分率（P_{15}）、酸性O-結合型オリゴ糖の含有百分率（P_{16}）、N-結合型オリゴ糖比（P_{17}）、O-結合型オリゴ糖比（P_{18}）、N-結合型オリゴ糖分画の構造（P_{19}）、O-結合型オリゴ糖分画の構造（P_{20}）、N-結合型オリゴ糖の位置および構成（P_{21}）、O-結合型オリゴ糖の位置および構成（P_{22}）、翻訳時修飾（P_{23}）、翻訳後修飾（P_{24}）、アシル化（P_{25}）、アセチル化（P_{26}）、アミド化（P_{27}）、脱アミド化（P_{28}）、ビオチニル化（P_{29}）、カルバミル化またはカルバモイル化（P_{30}）、カルボキシル化（P_{31}）、脱カルボキシル化（P_{32}）、ジスルフィド結合形成（P_{33}）、脂肪酸のアシル化（P_{34}）、ミリストイル化（P_{35}）、パルミトイル化（P_{36}）、ステアロイル化（P_{37}）、ホルミル化（P_{38}）、糖化（P_{39}）、グリコシル化（P_{40}）、グリコホスファチジルイノシトールアンカー（P_{41}）、ヒドロキシル化（P_{42}）、セレノシステインの取り込み（P_{43}）、脂質化（P_{44}）、リポ酸付加（P_{45}）、メチル化（P_{46}）、N末端またはC末端ブロッキング（P_{47}）、N末端またはC末端除去（P_{48}）、ニトロ化（P_{49}）、メチオニンの酸化（P_{50}）、リン酸化（P_{51}）、タンパク質分解切断（P_{52}）、プレニル化（P_{53}）、ファルネシル化（P_{54}）、ゲラニルゲラニル化（P_{55}）、ピリドキサルリン酸付加（P_{56}）、シアリル化（P_{57}）、脱シアリル化（P_{58}）、硫酸化（P_{59}）、ユビキチニル化またはユビキチン化（P_{60}）、ユビキチン様分子の付加（P_{61}）、一次構造（P_{62}）、二次構造（P_{63}）、三次構造（P_{64}）、四次構造（P_{65}）、化学的安定性（P_{66}）、熱安定性（P_{67}）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。これらのパラメータの要約を表2に提供する。

【００７３】

「特有の薬理学的特質」という用語に、本発明のタンパク質またはキメラ分子の任意の

薬理学的または臨床的に関連する特性が含まれることは、当業者によって容易に理解されると思われる。本発明を決して制限しない例としての「薬理学的特質」には、治療効力（T_1）、有効治療量（$TCID_{50}$）（T_2）、生物学的利用率（T_3）、治療レベルを維持するための投与間隔（T_4）、吸収速度（T_5）、排泄速度（T_6）、特異的活性（T_7）、熱安定性（T_8）、凍結乾燥安定性（T_9）、血清／血漿安定性（T_{10}）、血清半減期（T_{11}）、血流での溶解度（T_{12}）、免疫反応性プロフィール（T_{13}）、免疫原性（T_{14}）、中和抗体による阻害（T_{14A}）、副作用（T_{15}）、受容体／リガンド結合親和性（T_{16}）、受容体／リガンド活性化（T_{17}）、組織または細胞タイプ特異性（T_{18}）、生体膜または障壁（すなわち、腸管、肺、血液脳関門、皮膚等）の通過能（T_{19}）、血管新生能（T_{19A}）、組織取り込み（T_{20}）、分解に対する安定性（T_{21}）、凍結融解に対する安定性（T_{22}）、プロテアーゼに対する安定性（T_{23}）、ユビキチン化に対する安定性（T_{24}）、投与の容易さ（T_{25}）、投与様式（T_{26}）、他の薬学的賦形剤または担体との適合性（T_{27}）、生物または環境における持続性（T_{28}）、貯蔵安定性（T_{29}）、生物および環境における毒性（T_{30}）等が含まれる。

【００７４】

さらに本発明のタンパク質またはキメラ分子は、リンパ球、赤血球、網膜細胞、肝細胞、ニューロン、ケラチノサイト、内皮細胞、内胚葉細胞、外胚葉細胞、中胚葉細胞、上皮細胞、腎細胞、肝細胞、骨細胞、骨髄細胞、リンパ節細胞、表皮細胞、線維芽細胞、T-細胞、B-細胞、プラズマ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、顆粒球、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、好酸球、好塩基球、乳腺細胞、小葉細胞、前立腺細胞、肺細胞、食道細胞、膵細胞、ベータ細胞（インスリン分泌細胞）、血管芽細胞、筋細胞、楕円細胞（肝細胞）、間葉細胞、脳微小血管内皮細胞、星状細胞、グリア細胞、成人および胎児幹細胞を含む様々な幹細胞、様々な前駆細胞のようなヒト初代培養細胞、および他のヒトの不死化、形質転換、または癌細胞株が含まれるがこれらに限定されるわけではない、異なる細胞タイプに対して変更された生物学的効果（T_{31}）を有してもよい。細胞に及ぼす生物学的効果には、増殖（T_{32}）、分化（T_{33}）、アポトーシス（T_{34}）、細胞の大きさの成長（T_{35}）、サイトカイン接着（T_{36}）、細胞接着（T_{37}）、細胞の伸展（T_{38}）、細胞の運動性（T_{39}）、遊走および浸潤（T_{40}）、走化性（T_{41}）、細胞の包み込み（T_{42}）、シグナル伝達（T_{43}）、受容体／リガンドに対するタンパク質の動員（T_{44}）、JAK/STAT経路の活性化（T_{45}）、Ras-erk経路の活性化（T_{46}）、AKT経路の活性化（T_{47}）、PKC経路の活性化（T_{48}）、PKA経路の活性化（T_{49}）、srcの活性化（T_{50}）、fasの活性化（T_{51}）、TNFRの活性化（T_{52}）、NFkBの活性化（T_{53}）、p38MAPKの活性化（T_{54}）、c-fosの活性化（T_{55}）、分泌（T_{56}）、受容体のインターナリゼーション（T_{57}）、受容体のクロストーク（T_{58}）、表面マーカーのアップまたはダウンレギュレーション（T_{59}）、FACS前方／側方散乱プロフィールの変更（T_{60}）、サブグループ比の変更（T_{61}）、示差的遺伝子発現（T_{62}）、細胞の壊死（T_{63}）、細胞の塊形成（T_{64}）、細胞の反発（T_{65}）、ヘパリン硫酸に対する結合（T_{66}）、グリコシル化構造に対する結合（T_{67}）、コンドロイチン硫酸に対する結合（T_{68}）、細胞外マトリクス（コラーゲン、フィブロネクチンのような）に対する結合（T_{69}）、人工材料（足場のような）に対する結合（T_{70}）、担体に対する結合（T_{71}）、共因子に対する結合（T_{72}）に対する効果、幹細胞の増殖、分化、および／または自己再生に及ぼす単独または他のタンパク質との併用効果（T_{73}）等が含まれる。これらの特質の要約を表3に提供する。

【００７５】

本明細書において用いられるように、本発明のタンパク質またはキメラ分子の薬理学的特質に関して「特有の」という用語は、特定の生理化学的プロフィールに関して特有であるタンパク質またはそのキメラ分子の一つまたは複数の薬理学的特質を指す。特定の態様において、単離されたタンパク質またはそのキメラ分子の一つまたは複数の薬理学的特質は、原核細胞もしくは下級真核細胞、または高等非ヒト真核細胞において産生された同じタンパク質またはキメラ分子の型と比較して、異なる、または特有である。特定の態様において、対象単離タンパク質またはそのキメラ分子の薬理学的特質は、天然に存在するタンパク質と実質的に類似または機能的に同等である。

【００７６】
本明細書において用いられるように、「原核細胞」という用語は、任意の原核細胞を指し、これには任意の細菌細胞（アクチノバクテリア細胞を含む）または古細菌細胞が含まれる。本明細書において用いられるように、「非哺乳動物真核細胞」という用語の意味は自明である。しかし、明確にするために、この用語には、具体的に、酵母菌（Saccharomyces）種、ピチア（Pichea）種のような酵母；他の真菌；ショウジョウバエ（Drosophila）種を含む昆虫、および昆虫細胞培養；ダニオ（Danio）種を含む魚類；ツメガエル（Xenopus）種を含む両生類；植物および植物細胞培養を含む、任意の非哺乳動物真核細胞が含まれる。
【００７７】
「幹細胞」という言及には、胎児および成人幹細胞が含まれ、表6に記載される幹細胞が含まれる。本発明のタンパク質またはキメラ分子は、一つまたは複数の幹細胞増殖、分化、または自己再生を誘導するために、単独またはタンパク質のカクテルにおいて用いてもよい。
【００７８】
タンパク質またはそのキメラ分子の一次構造は、アミノ酸配列として測定してもよい。二次構造は、α-ヘリックス、平行β-シート、逆平行β-シートまたはターンのような一つまたは複数のタンパク質二次構造の数および／または相対的位置として測定してもよい。三次構造は、異なる二次構造要素を特定の配置で構築するためのポリペプチド鎖のフォールディングを記述する。ヘリックスおよびシートが二次構造の単位である場合、ドメインは三次構造の単位である。マルチドメインタンパク質において、三次構造には、互いに対するドメインの配置が含まれる。従って、三次構造は、一つまたは複数のタンパク質「ドメイン」の存在、非存在、数、および／または相対的位置として測定してもよい。本発明を決して制限しない例としてのドメインには、孤立ヘリックス、ヘリックス-ターン-ヘリックスドメイン、4本ヘリックスバンドル、DNA結合ドメイン、3本ヘリックスバンドル、ギリシャキーヘリックスバンドル、ヘリックス-ヘリックスパッキングドメイン、β-サンドイッチ、整列したβサンドイッチ、直交βサンドイッチ、βバレル、上下逆平行βシート、ギリシャキートポロジードメイン、ゼリーロールトポロジードメイン、βプロペラ、βトレホイル、βヘリックス、ロスマンフォールド、α／βホースシュー、α／βバレル、α＋βトポロジー、ジスルフィドリッチフォールド、セリンプロテアーゼ阻害剤ドメイン、イソギンチャク毒素ドメイン、EGF-様ドメイン、補体C-モジュールドメイン、コムギ植物毒素タンパク質、コブラ（コブラ）神経毒ドメイン、グリーンマンバ抗コリンエステラーゼドメイン、クリングルドメイン、ムチン様領域、球状ドメイン、スペーサー領域が含まれる。四次構造は、タンパク質構造内の異なるポリペプチド鎖の配置として記述され、それぞれの鎖は、個々の一次、二次、および三次構造要素を保有する。例には、ホモまたはヘテロオリゴマー重合化（例えば、二量体形成または三量体形成）のいずれかが含まれる。
【００７９】
一次構造に関して、本発明は、SEQ ID NO：27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93からなる一覧より選択されるヌクレオチド配列、または前述の一覧の配列のいずれか一つと少なくとも約60％の同一性を有するヌクレオチド配列、または上記の配列もしくはその相補型の任意の一つと低ストリンジェンシー条件でハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列によってコードされる単離タンパク質、そのキメラ分子、または断片を提供する。
【００８０】
本発明のもう一つの局面は、細胞プロセスによってそのそれぞれのmRNAのスプライシング後に、SEQ ID NO：95からなるヌクレオチド配列によってコードされる単離ポリペプチドを提供する。
【００８１】

本発明のなおもう一つの局面は、SEQ ID NO：27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93からなる一覧より選択される少なくとも60％の類似性を有するヌクレオチド配列、または最適に整列させた後、SEQ ID NO：27、29、31、33、37、39、41、43、45、47、49、51、53、57、59、61、63、65、67、69、71、73、77、79、81、83、85、87、89、91、93またはその相補型の一つまたは複数と低ストリンジェンシー条件でハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を含むタンパク質、そのキメラ分子、またはその機能的部分をコードする単離核酸分子を提供する。

【００８２】

特定の態様において、本発明は、タンパク質、そのキメラ分子、その断片、SEQ ID NO：28、30、32、34、38、40、42、44、46、48、50、52、54、58、60、62、64、66、68、70、72、74、78、80、82、84、86、88、90、92、94の一つまたは複数において実質的に記載された通りのアミノ酸配列、または最適に整列させた後に、SEQ ID NO：28、30、32、34、38、40、42、44、46、48、50、52、54、58、60、62、64、66、68、70、72、74、78、80、82、84、86、88、90、92、94の一つまたは複数に対して少なくとも約60％の類似性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子に向けられる。

【００８３】

もう一つの局面において、本発明は、SEQ ID NO：1、3、5、7、9、11、13、15、17 または19の一つまたは複数において実質的に記述された通りのヒト免疫グロブリンの定常領域（Fc）またはフレームワーク領域をコードするヌクレオチド配列に直接に連結した、または当技術分野において公知のタンパク質リンカーをコードする一つもしくは複数のヌクレオチド配列によって連結した、SEQ ID NO：29、31、39、41、59、61、79、81からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、タンパク質分子、またはその断片をコードする単離核酸分子を提供する。

【００８４】

もう一つの局面において、本発明は、SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14、16、18または20の一つまたは複数に実質的に記載通りのヒト免疫グロブリンの定常領域（Fc）またはフレームワーク領域に直接連結した、または当技術分野で公知の一つまたは複数のタンパク質リンカーを通して連結した、SEQ ID NO：30、32、40、42、60、62、80、82からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離タンパク質分子またはその断片を提供する。

【００８５】

本発明のもう一つの局面は、SEQ ID NO：28、30、32、34、38、40、42、44、46、48、50、52、54、58、60、62、64、66、68、70、72、74、78、80、82、84、86、88、90、92、94からなる一覧より選択されるアミノ酸配列、または上記の配列の一つもしくは複数と少なくとも約65％の類似性を有するアミノ酸配列を含む、単離タンパク質、そのキメラ分子、またはその断片を提供する。

【００８６】

特定の態様において、アミノ酸類似性（％）またはヌクレオチド同一性レベルには、少なくとも約61％、少なくとも約62％、少なくとも約63％、少なくとも約64％、少なくとも約65％、少なくとも約66％、少なくとも約67％、少なくとも約68％、少なくとも約69％、少なくとも約70％、少なくとも約71％、少なくとも約72％、少なくとも約73％、少なくとも約74％、少なくとも約75％、少なくとも約76％、少なくとも約77％、少なくとも約78％、少なくとも約79％、少なくとも約80％、少なくとも約81％、少なくとも約82％、少なくとも約83％、少なくとも約84％、少なくとも約85％、少なくとも約86％、少なくとも約87％、少なくとも約88％、少なくとも約89％、少なくとも約90％、少なくとも約91％、少なくとも約92％、少なくとも約93％、少なくとも約94％、少なくとも約95％、少なくとも約96％、少なくとも約97％、少なくとも約98％、少なくとも約99％類似性または同一性が含まれる。

【００８７】

本発明のポリペプチドの「誘導体」はまた、親ポリペプチドの部分的転写活性を保持す

る完全長の親ポリペプチドの一部または部分を含み、これには変種が含まれる。そのような「生物活性断片」には、欠失変異体および低分子ペプチドが含まれ、例えば必須の活性を示す少なくとも10、特定の態様においては少なくとも20、およびさらなる態様においては少なくとも30の隣接アミノ酸が含まれる。このタイプのペプチドは、標準的な組換え核酸技術の適用によって得てもよく、または通常の液相もしくは固相合成技術を用いて合成してもよい。例えば、Blackwell Scientific Publicationsによって刊行されたNicholson編集の「Synthetic Vaccines」と題する刊行物に含まれるAtherton and Shephardによる「Peptide Synthesis」と題する第9章に記述される溶液合成または固相合成を参照してもよい。または、endoLys-C，endoArg-C，endoGlu-Cおよびブドウ球菌（staphylococcus）V8プロテアーゼのようなプロテナーゼによって本発明のアミノ酸配列を消化することによってペプチドを産生することができる。消化された断片は、例えば高速液体クロマトグラフィー（HPLC）技術によって精製することができる。任意のそのような断片は、その生成手段によらず、本明細書において用いられる「誘導体」という用語に含まれると理解される。

【００８８】

従って、「変種」という用語は、本明細書において後に定義されるストリンジェンシー条件下で参照配列とハイブリダイズする参照ヌクレオチド配列またはポリヌクレオチドと実質的な配列同一性を示すヌクレオチド配列を指す。「ヌクレオチド配列」、「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」という用語は、本明細書において互換的に用いられる可能性があり、一つまたは複数のヌクレオチドが付加、欠失、または異なるヌクレオチドに置換されているポリヌクレオチドを含む。この点において、変異、付加、欠失、および置換を含む特定の変更を参照ヌクレオチド配列に作成することができ、それによって、変更されたポリヌクレオチドは、参照ポリヌクレオチドまたはコードされたポリペプチドの生物機能または活性を保持する。「変種」という用語にはまた、天然に存在する対立遺伝子変種が含まれる。

【００８９】

本発明の核酸分子は、ベクターまたは他の核酸構築物の形であってもよい。

【００９０】

一つの態様において、ベクターはDNAであって、任意で選択マーカーを含んでもよい。

【００９１】

選択マーカーの例には、抗生物質のような化合物に対する耐性を付与する遺伝子、選択された基質上での増殖能を付与する遺伝子、発光のような検出可能なシグナルを産生するタンパク質をコードする遺伝子が含まれる。例えばネオマイシン耐性遺伝子（neo）およびヒグロマイシン耐性遺伝子（hyg）のような抗生物質耐性遺伝子を含む、多様なそのようなマーカーが公知であって利用可能である。選択マーカーにはまた、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン）での増殖能を付与するtk遺伝子（チミジンキナーゼ）またはhprt遺伝子（ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ）のような、特定の培地基質での増殖能を付与する遺伝子、およびMAX培地（ミコフェノール酸、アデニン、およびキサンチン）での増殖を可能にする細菌gpt遺伝子（グアニン／キサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ）が含まれる。哺乳動物細胞において用いるための他の選択マーカーおよび多様な選択マーカーを有するプラスミドは、Sambrook et al. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour, New York, USA, 1990において記述される。

【００９２】

選択マーカーは、発現のためにその自身のプロモーターに依存してもよく、マーカー遺伝子は、標的とされる生物とは非常に異なる生物に由来してもよい（例えば、標的哺乳動物細胞において用いられる原核細胞マーカー遺伝子）。しかし、当初のプロモーターを、レシピエント細胞において機能することが公知である転写機構に置換することが好ましい。例えば、メタロチオネインプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、β-アクチンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、SV40プロモーター、およびヒトサイトメ

ガロウイルスプロモーターを含む、多数の転写開始領域がそのような目的のために利用可能である。広く用いられる例は、SV40初期プロモーターの制御下で細菌ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を有し、G418（ネオマイシンに関連する抗生物質）に対する耐性を哺乳動物細胞において付与するpSV2-neoプラスミドである。ポリ(A)配列の付加、および合成翻訳開始配列の付加のような、多数の他の変化を用いて動物細胞における選択マーカーの発現を増強してもよい。構成的および誘導型プロモーターの双方を用いてもよい。

【００９３】

本発明の遺伝子構築物はまた、3'非翻訳配列を含んでもよい。3'非翻訳配列は、ポリアデニル化シグナルおよびmRNAプロセシングまたは遺伝子発現に影響を及ぼすことができる任意の他の調節シグナルを含むDNAセグメントを含む遺伝子のその部分を指す。ポリアデニル化シグナルは、mRNA前駆体の3'末端に対するポリアデニル酸管の付加に影響を及ぼすことを特徴とする。ポリアデニル化シグナルは一般的に、標準形5' AATAAA-3' に対する相同性の存在によって認識されるが変化形はまれではない。

【００９４】

従って、プロモーターに機能的に連結した本発明の核酸分子を含む遺伝子構築物は、適当な調節を矯正および／または提供するために、調節が不完全である、機能不良である、または存在しない細胞または組織に送達するための適したベクターにおいてクローニングしてもよい。適当な遺伝子構築物を含むベクターを、分子生物学の当業者に周知の多くの異なる手段によって標的真核細胞に送達してもよい。

【００９５】

本明細書において用いられるように、「類似性」という用語には、ヌクレオチドまたはアミノ酸レベルで比較した配列間の正確な同一性が含まれる。ヌクレオチドレベルで非同一性が存在する場合、「類似性」には、それにもかかわらず構造、機能、生化学、および／またはコンフォメーションレベルで互いに関連する異なるアミノ酸が得られる配列間の差が含まれる。アミノ酸レベルで非同一性が存在する場合、「類似性」には、それにもかかわらず構造、機能、生化学、および／またはコンフォメーションレベルで互いに関連するアミノ酸が含まれる。特定の態様において、ヌクレオチドおよび配列比較は、類似性よりむしろ同一性レベルで行われる。

【００９６】

二つまたはそれより多いポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の配列関係を記述するために用いられる用語には、「参照配列」、「比較ウインドウ」、「配列類似性」、「配列同一性」、「配列類似性百分率」、「配列同一性百分率」、「実質的に類似」および「実質的な同一性」が含まれる。「参照配列」は、ヌクレオチドおよびアミノ酸残基を含む、長さが少なくとも12、往々にして15～18、および多くの場合少なくとも25もしくは30モノマー単位のようなそれより多い単位である。二つのポリヌクレオチドはそれぞれ、（1）二つのポリヌクレオチド間で類似である配列（すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部のみ）、および（2）二つのポリヌクレオチド間で互いに異なる配列を含む可能性があることから、二つ（またはそれより多い）ポリヌクレオチド間の配列比較は典型的に、配列類似性の局所領域を同定して比較するために、二つのポリヌクレオチドの配列を「比較ウインドウ」に対して比較することによって行われる。「比較ウインドウ」は、参照配列と比較される典型的に12隣接残基の概念的セグメントを指す。比較ウインドウは、二つの配列の最適なアラインメントのために参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して約20％またはそれ未満の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。比較ウインドウを整列させるための配列の最適なアラインメントは、アルゴリズム（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USAのGAP3、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）のコンピューターによる実行によって、または検分および選択された様々な任意の方法によって生成された最善のアラインメント（すなわち、比較ウインドウに対する最高の相同性（％）が得られる）によって行ってもよい。例えば、Altschul et al.（Nucl Acids Res 25:389, 1997）によ

って開示されたBLASTプログラムファミリーに対して参照を行ってもよい。配列分析の詳細な考察は、Ausubel et al.のUnit 19.3 （In: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc. 1994-1998）において見出されうる。

【００９７】

本明細書において用いられるように、「配列類似性」および「配列同一性」という用語は、比較ウィンドウに対してヌクレオチド対ヌクレオチドに基づいて、またはアミノ酸対アミノ酸に基づいて同一である、または機能的もしくは構造的に類似である程度を指す。このように、「配列同一性の百分率」は、例えば、二つの最適に整列された配列を比較ウインドウに対して比較する段階、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）が双方の配列に起こって、マッチした位置の数を生じる位置の数を決定する段階、マッチした位置の数を比較ウインドウにおける位置の総数（すなわち、ウインドウの大きさ）によって除する段階、および結果に100を乗じて配列同一性の百分率を生じる段階によって計算される。本発明の目的に関して、「配列同一性」は、ソフトウェアに添付された参照マニュアルにおいて用いられる標準的なデフォルトを用いて、DNASISコンピュータープログラム（ウィンドウズ版バージョン2.5、Hitachi Software Engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USAから入手可能）によって計算された「マッチ百分率」を意味すると理解されると思われる。類似の注釈は配列類似性に関して当てはまる。

【００９８】

本明細書における低ストリンジェンシーという言及には、ハイブリダイゼーションに関して少なくとも約0～少なくとも約15% v/vホルムアミド、および少なくとも約1 M～少なくとも約2 M塩、ならびに洗浄条件に関して少なくとも約1 M～少なくとも約2 M塩を含むおよび包含する。一般的に、低ストリンジェンシーは、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41および42℃など、約25～30℃～約42℃である。温度は、変更されてもよく、ホルムアミドを置換するためにおよび／または代わりのストリンジェンシー条件を生じるためにより高い温度を用いてもよい。必要であれば、ハイブリダイゼーションに関して16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29および30%など、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0.5、0.6、0.7、0.8もしくは0.9 Mなど、少なくとも約0.5 M～少なくとも約0.9 M塩、ならびに洗浄条件に関して0.5、0.6、0.7、0.8もしくは0.9 Mなど、少なくとも約0.5 M～少なくとも約0.9 M塩を含むおよびこれらを包含する中等度ストリンジェンシー条件、またはハイブリダイゼーションに関して、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50%など、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0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14および0.15 Mなど、少なくとも約0.01 M～少なくとも約0.15 M塩、ならびに洗浄条件に関して0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14および0.15 Mなど、少なくとも約0.01 M～少なくとも約0.15 M塩を含むおよびこれらを包含する高ストリンジェンシー条件のような、代わりのストリンジェンシー条件を適用してもよい。一般的に、洗浄は、T_m = 69.3 + 0.41 (G+C)% （Marmur and Doty, J Mol Biol 5:109, 1962）で行われる。しかし、二本鎖DNAのT_mは、ミスマッチ塩基対の数が1%増加する毎に1℃減少する（Bonner and Laskey, Eur J Biochem 46:83, 1974）。ホルムアミドはこれらのハイブリダイゼーション条件において任意である。従って、特定の態様において、ストリンジェンシーのレベルは、以下のように定義される：低ストリンジェンシー条件は6×SSC緩衝液、0.1% w/v SDSで25～42℃；中等度ストリンジェンシーは、2×SSC緩衝液、0.1% w/v SDSで温度範囲20～65℃；高ストリンジェンシー条件は、0.1×SSC緩衝液、0.1% w/v SDSで温度少なくとも65℃である。

【００９９】

本明細書において用いられるように、「翻訳時または翻訳後修飾」という用語は、ペプチド鎖の翻訳の際にまたは翻訳後に起こる共有結合修飾を指す。例としての翻訳時または

翻訳後修飾には、アシル化（アセチル化を含む）、アミド化もしくは脱アミド化、ビオチニル化、カルバミル化（またはカルバモイル化）、カルボキシル化もしくは脱カルボキシル化、ジスルフィド結合形成、脂肪酸のアシル化（ミリストイル化、パルミトイル化、およびステアロイル化を含む）、ホルミル化、糖化、グリコシル化、ヒドロキシル化、セレノシステインの取り込み、脂質化、リポ酸付加、メチル化、N末端もしくはC末端ブロッキング、N末端もしくはC末端除去、メチオニンの酸化、リン酸化、タンパク質分解切断、プレニル化（ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化を含む）、ピリドキサルリン酸付加、シアリル化もしくは脱シアリル化、硫酸化、ユビキチニル化（またはユビキチン化）、またはユビキチン様タンパク質の付加が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【０１００】

アシル化は、N末端開始メチオニンの加水分解および新しいN末端アミノ酸へのアセチル基の付加を必然的に伴う。アセチルCo-Aはアシル化のためのアセチル供与体である。

【０１０１】

アミド化は、ペプチドのカルボキシ末端に対するアミド基の共有結合であり、これはタンパク質の生物活性および安定性にとって多くの場合必要である。脱アミド化は、アミド基の加水分解による除去である。アミノ酸残基を含むアミドの脱アミド化はまれな修飾であり、これは3D構造を再配列させるためおよび電荷比／piを変更させるために生物によって行われる。

【０１０２】

ビオチニル化は、それによってビオチニル基が分子に組み入れられる技術であり、酵素の生合成の際にハロカルボキシラーゼシンテターゼによって触媒されるか、または特異的基質を、生化学アッセイに対して感受性がある多様な任意の基質に連結しているビオチン標識プローブおよびアビジンまたはストレプトアビジンと共にインキュベートすることによって、それらを可視化するためにインビトロで行われる技術である。

【０１０３】

カルバミル化（またはカルバモイル化）は、カルバモイル含有分子（例えば、カルバモイルリン酸）からのカルバモイルの、アミノ基のようなアクセプター部分への転移である。

【０１０４】

グルタミン酸残基のカルボキシル化は、それによってγカルボキシグルタミン酸（Gla残基）が形成されるビタミンK依存的反応である。血液凝固カスケードのいくつかのタンパク質におけるGla残基は、タンパク質の生理的機能にとって必要である。カルボキシル化はまた、アスパラギン酸残基にも起こり得る。

【０１０５】

ジスルフィド結合は、二つのシステイン残基のチオール基がジスルフィドに酸化される場合に形成する共有結合である。多くの哺乳動物タンパク質がジスルフィド結合を含み、これらはタンパク質の三次構造、およびこのように生物活性を作製および維持するためにきわめて重要である。

【０１０６】

細菌におけるタンパク質合成は、N末端メチオニンのホルミル化および脱ホルミル化を必然的に伴う。このホルミル化／脱ホルミル化サイクルは真核細胞の細胞質では起こらず、細菌細胞の独自の特徴である。アミド化プロセスの一部としてグリシン残基において起こるヒドロキシル化のほかに、ヒドロキシル化はまた、プロリルおよびリジリルヒドロキシラーゼによって触媒されるプロリンおよびリジン残基において起こり得る（Kivirikko et al. FASEB Journal 3:1609-1617, 1989）。

【０１０７】

糖化は、タンパク質のアミノ骨格へのグルコースまたは他の糖の制御されない非酵素的な付加である。

【０１０８】

グリコシル化は、ポリペプチド骨格への糖単位の付加であり、本明細書において後に詳

しく記述する。

【０１０９】

ヒドロキシル化は、共因子としてのビタミンCに依存的な反応である。翻訳後修飾としてヒドロキシル化の重要性を増すものは、ヒドロキシ-リジンがグリコシル化のための付着部位として作用する点である。

【０１１０】

セレノプロテインは、翻訳の際に独自のアミノ酸であるセレノシステインを組み入れることによって微量元素としてセレンを含むタンパク質である。セレノシステインのtRNAは、セリンによる電荷を有し、次に酵素的にセレニル化されてセレノシステイニル-tRNAを産生する。セレノシステイニル-tRNAのアンチコドンは、セリンコドンの代わりにmRNAにおける終始コドン（UGA）と相互作用する。セレノプロテインmRNAの3'-非翻訳領域（UTR）における要素は、UGAが終始コドンまたはセレノシステインコドンとして読み取られるか否かを決定する。

【０１１１】

脂質化は、タンパク質に対する脂質の共有結合による付着を含む一般用語であり、これには脂肪酸のアシル化およびプレニル化が含まれる。

【０１１２】

脂肪酸のアシル化は、炭素14個のミリスチン酸（ミリストイル化）、炭素16個のパルミチン酸（パルミトイル化）および炭素18個のステアリン酸（ステアロイル化）のような脂肪酸の共有結合による付着を必然的に伴う。脂肪酸は、プレゴルジ区画におけるタンパク質に連結して、膜へのタンパク質のターゲティングを調節する可能性がある（Blenis and Resh Curr Opin Cell Biol 5(6):984-9, 1993）。従って、脂肪酸のアシル化は、タンパク質の機能的活性において重要である（Bernstein Methods Mol Biol 237:195-204, 2004）。

【０１１３】

プレニル化は、プレニル基、すなわち炭素15個のファルネシルまたは炭素20個のゲラニルゲラニル基の、アクセプタータンパク質への付加を必然的に伴う。ファルネシル二リン酸またはゲラニルゲラニル二リン酸を含むイソプレノイド化合物は、コレステロール生合成経路に由来する。イソプレノイド基は、チオエーテル連結によって、タンパク質のカルボキシ末端に存在するコンセンサス配列CAAX（Aは、アラニンを除く任意の脂肪族アミノ酸）内のシステイン残基に付着する。プレニル化は、タンパク質の脂質膜会合能を増強して、公知の全てのGTP-結合およびヒドロキシル化タンパク質（Gタンパク質）は、このようにして修飾され、そのため、プレニル化はシグナル伝達にとって非常に重要である（Rando Biochim Biophys Acta 1300(l):5-l6, 1996; Gelb et al. Curr Opin Chem Biol 2(1):40-8, 1998）。

【０１１４】

リポ酸はフリーラジカルスキャベンジャーとして作用するビタミン様の抗酸化剤である。リポエートタンパク質リガーゼによるアミド結合を通してのリポ酸のリジンへの付着によって、リポイル-リジンが形成される。

【０１１５】

タンパク質のメチル化は、タンパク質の活性を調節することができる、または新しいタイプのアミノ酸を作製することができる一般的な修飾である。タンパク質メチルトランスフェラーゼは、S-アデノシル-L-メチオニンからのメチル基をタンパク質上の求核性酸素、窒素、または硫黄原子に転移する。メチル化の効果は二つの一般的な分類に分けられる。第一に、メチルトランスフェラーゼおよびメチルエステラーゼの相対的レベルは、特定のカルボキシル基でのメチル化の程度を制御することができ、次にこれはタンパク質の活性を調節する。このタイプのメチル化は可逆的である。第二の群のタンパク質メチル化反応は、タンパク質における硫黄または窒素原子の非可逆的な修飾を必然的に伴う。これらの反応は、タンパク質の活性を変更させる変更された生化学特性を有する新しいアミノ酸を生成する（Clarke Curr Opin Cell Biol 5:977 983, 1993）。

【０１１６】
タンパク質の硝酸化は有意な翻訳後修飾であり、これは酸化窒素シグナル伝達物質として作動する。タンパク質の硝酸化は触媒活性、細胞シグナル伝達、および細胞骨格構築を調節する。
【０１１７】
リン酸化は、タンパク質キナーゼによるリン酸基の付加を指す。セリン、スレオニン、およびチロシン残基は、リン酸化を受けるアミノ酸である。リン酸化はタンパク質の生物活性を調節する非常に重要なメカニズムである。
【０１１８】
多数のタンパク質が同様にタンパク質分解切断によって修飾される。これは単純に、開始メチオニンの除去を必然的に伴う可能性がある。他のタンパク質は、限定的または特異的タンパク質分解によって活性化される不活性な前駆体（プロタンパク質）として合成される。主に疎水性のアミノ酸12～36個のシグナル配列を有する、分泌される運命を有するまたは膜に会合したタンパク質（プレタンパク質）が合成され、これはER膜を通過後に切断される。
【０１１９】
ピリドキサルリン酸はビタミンB6の補酵素誘導体であり、アミノ酸側鎖のトランスアミノ化、脱カルボキシル化、ラセミ化、および様々な修飾に関与する。ピリドキサルリン酸を必要とする酵素は全て、アミノ酸と補酵素との間のシッフ塩基の形成を通して作用する。ピリドキサルリン酸基のリジン残基への付着に関わるほとんどの酵素は、自己活性化型である。
【０１２０】
シアリル化は、様々なシアリルトランスフェラーゼ酵素を通しての糖タンパク質の末端部分へのシアル酸の付着を指し、脱シアリル化はシアル酸の除去を指す。シアル酸には、N-アセチルノイラミン酸（NeuAc）およびN-グリコリルノイラミン酸（NeuGc）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。糖タンパク質のシアリル化に起因するシアリル構造には、シアリルルイス構造、例えばシアリルルイスaおよびシアリルルイスx、ならびにシアリルT構造、例えばシアリル-TFおよびシアリルTnが含まれる。
【０１２１】
硫酸化は、チロシン残基で起こり、トランスゴルジネットワークにおいて起こる酵素チロシルタンパク質スルホトランスフェラーゼによって触媒される。HepG2細胞によって分泌されるタンパク質の20個中1個、および線維芽細胞によって分泌されるタンパク質の3個中1個が少なくとも一つのチロシンスルフェート残基を含むことが決定されている。硫酸化は、タンパク質の生物活性に影響を及ぼすことが示されている。特に重要であるのは、主要なHIV共受容体であるCCR5が、チロシン硫酸化されることが示された点、ならびにCCR5のN末端細胞外ドメインにおける一つまたは複数のチロシン残基の硫酸化が、MIP-Iα/CCL3、MIP-1β/CCL4、およびRANTES/CCL5の最適な結合にとって必要であり、および最適なHIV共受容体機能にとって必要である（Moore J Biol Chem 278(27) /24243-24246, 2003）点である。硫酸化はまた、糖においても起こり得る。さらに、糖タンパク質の炭水化物部分の硫酸化は、GalNAc(β1-4)GlcNAc(β1-2)Manα4スルホトランスフェラーゼのようなグリコスルホトランスフェラーゼの作用によって起こり得る。
【０１２２】
翻訳後修飾はタンパク質-タンパク質連結を含み得る。ユビキチンは、自己会合して哺乳動物細胞における他のタンパク質に共有的に付着するアミノ酸76個のタンパク質である。付着はユビキチンのC-末端と他のタンパク質におけるリジン残基のアミノ基との間のペプチド結合によって起こる。ユビキチン分子の鎖のタンパク質標的への付着によって、タンパク質はプロテアソームによるタンパク質分解の標的となり、これは、調節タンパク質の定常状態レベルを調節するために重要な、例えば細胞周期に関して重要なメカニズムである（Wilkinson Annu Rev Nutr 15:161-89, 1995）。対照的に、モノ-ユビキチン化は、タンパク質機能の直接調節において役割を果たしうる。その機能および代謝回転に影響を

及ぼすためにタンパク質に共有的に付着させることができるユビキチン様タンパク質には、NEDD-8、SUMO-1、およびApg12が含まれる。

【０１２３】

グリコシル化はポリペプチド骨格における糖残基の付加である。単糖類、二糖類、およびオリゴ糖のような糖残基には、フコース（Fuc）、ガラクトース（Glc）、グルコース（Glc）、ガラクトサミン（CalNAC）、グルコサミン（GlcNAc）、マンノース（Man）、N-アセチル-ラクトサミン（lacNAc）、N,N'-ジアセチルラクトースジアミン（lacdiNAc）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。これらの糖単位は、以下の少なくとも7個の方法でポリペプチドに付着させることができる、すなわち

（1）コンセンサス配列 Asn-X-Ser；Asn-X-Thr；またはAsn-X-Cysにおけるアスパラギン残基のR-基とのN-グリコシド結合によって（N-グリコシル化）。

（2）セリン、スレオニン、ヒドロキシプロリン、チロシン、またはヒドロキシリジンのR-基に対するO-グリコシド結合によって（O-グリコシル化）。

（3）C-結合型マンノースにおけるチロシンのR-基によって。

（4）いくつかのタンパク質を細胞膜に固定するために用いられるグリコホスファチジルイノシトールアンカーとして。

（5）セリンまたはスレオニンのR-基に対するGlcNAcの一つの単糖類付着として。この連結はしばしば無機リン酸塩の付着に可逆的に関連する（Yin-o-Yang）。

（6）セリン、スレオニン、またはアスパラギンに対する直線状多糖類の付着（プロテオグリカン）。

（7）システインのR-基とのS-グリコシド結合によって。

【０１２４】

グリコシル化構造は、表7における以下の炭水化物抗原性決定基の一つまたは複数を含み得る。

【０１２５】

（表７）炭水化物抗原性決定基の一覧

抗原の名称	抗原性グリカン構造
血液群H(O)、1型	Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GlcNAc-R
血液群H(O)、2型	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)GlcNAc-R
血液群A、1型	GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-3)GlcNAc-R
血液群A、2型	GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-4)GlcNAc-R
血液群B、1型	Gal(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-3)GlcNAc-R
血液群B、2型	Gal(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-4)GlcNAc-R
血液型i	$[Gal(\beta1\text{-}4)GlcNAc(\beta1\text{-}3)]_nGal(\beta1\text{-}R$
血液型I	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)[Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)]Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-R
ルイスa (Le^a)	Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc-R
シアリルルイスa (sLe^a)	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc-R
ルイスb (Le^b)	Fuc(α1-2)Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc-R
ルイスx (Le^x)	Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc-R
シアリルルイスx (sLe^x)	NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc-R
ルイスy (Le^y)	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc-R
フォルスマン	GalNAc(α1-3)GalNAc(β1-3)Gal-R
トムゼン-フリーデンライヒ (TFまたはT)	Gal(β1-3)GalNAc(α1-O)-Ser/Thr
シアリルTF（sTF）またはシアリルT（sT）	Gal(β1-3)[NeuAc(α2-6)]GalNAc(α1-O)-Ser/Thr
Tn	GalNAc(α1-O)-Ser/Thr
シアリルTn(sTn)	NeuAc(α2-6)GalNAc(α1-O)-Ser/Thr

【０１２６】

炭水化物はまた、モノ、ジ、トリ、およびテトラ外構造を含むいくつかのアンテナ構造を含むと考えられる。

【０１２７】

グリコシル化は、N-結合型グリコシル化、O-結合型グリコシル化、C-結合型マンノース構造、およびグリコホスファチジルイノシトールアンカー、炭水化物の重量百分率、Ser/Thr - GalNAc比、単糖、二糖、三糖、および四糖構造の比率、またはレクチンもしくは抗体結合、の有無またはパターンによって測定してもよい。

【０１２８】

タンパク質のシアリル化は、特定のシアリル構造に向けられる抗体とタンパク質との免疫反応性によって測定してもよい。例えば、ルイスx特異的抗体は、顆粒球から発現された CEACAM1と反応するが、293細胞において発現された組換え型ヒト CEACAM1とは反応しない（Lucka et al Glycobiology 15(1):87-100, 2005）。または、タンパク質上のシアリル構造の存在は、グリコシダーゼ処置後に質量分析（MS）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、またはグリコマスフィンガープリンティング（GMF）のような適した測定技法の組み合わせによって検出してもよい。

【０１２９】

タンパク質の見かけの分子量には、タンパク質複合体の全ての要素（共因子および非共有結合ドメイン）、および全ての翻訳時または翻訳後修飾（共有結合した基のタンパク質への付加およびタンパク質からの除去）が含まれる。見かけの分子量は多くの場合、翻訳時または翻訳後修飾によって影響を受ける。タンパク質の見かけの分子量は、SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動）によって決定してもよく、これはまた、その二次元相対物、2D-PAGE（二次元ポリアクリルアミド電気泳動）における第二の次元でもある。しかし、これはより正確には、荷電分子イオンを産生するマトリクス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型（MALDI-TOF）MS、または多数の荷電ピークを産生する比較的感度の高いエレクトロスプレーイオン化（ESI）MSのいずれかによる質量分析（MS）によってより正確に決定される可能性がある。タンパク質またはそのキメラ分子の見かけの分子量は、1～1000 kDaの範囲内であってもよい。従って、本発明の単離タンパク質またはそのキメラ分子は、

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,
25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48,
49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72,
73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,
97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115,
116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133,
134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151,
152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169,
170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187,
188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205,

206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223,
224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241,
242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259,
260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277,
278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295,
296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313,
314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331,
332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349,
350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367,
368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385,
386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403,
404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421,
422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439,
440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457,
458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475,
476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493,
494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511,
512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529,
530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547,
548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565,
566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583,
584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601,
602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619,
620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637,
638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655,
656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673,
674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691,
692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709,
710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727,
728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745,
746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763,
764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781,

782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000 kDa

の見かけの分子量を有する。タンパク質の分子量または分子質量は、電気泳動、質量分析、勾配超遠心のような任意の通常の手段によって決定してもよい。

【０１３０】

タンパク質の等電点（またはpI）は、タンパク質が真の電荷を有しないpHである。この属性は等電点電気泳動（IEF）によって決定してもよく、これはまた2D-PAGEの第一の次元でもある。実験的に決定されたpI値は、一連の翻訳時または翻訳後修飾によって影響を受け、従って実験的pIと理論的pIとの差は、5単位もの高さであってもよい。従って、本発明の単離タンパク質またはキメラ分子は、0、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9、12.0、12.1、12.2、12.3、12.4、12.5、12.6、12.7、12.8、12.9、13.0、13.1、13.2、13.3、13.4、13.5、13.6、13.7、13.8、13.9、または14.0のpIを有してもよい。

【０１３１】

本明細書において用いられるように、「イソ型」という用語は、所定のタンパク質の多数の分子型を意味し、これには（1）一次構造（選択的スプライシングまたは多型）；（2）二次構造（異なる翻訳時または翻訳後修飾によるような）；および／または（3）三次もしくは四次構造（異なるサブユニット相互作用、ホモまたはヘテロオリゴマー重合化によるような）のレベルが異なるタンパク質が含まれる。特に、「イソ型」という用語には、一定の一次構造を有するが、異なるグリコシル化型のような、二次もしくは三次構造のレベル、または翻訳時もしくは翻訳後修飾レベルで異なるタンパク質またはそのキメラ分子を含む糖型が含まれる。

【０１３２】

タンパク質の化学的安定性は、特定の溶媒または環境におけるタンパク質の「半減期」として測定されてもよい。典型的に、分子量50 kDa未満のタンパク質は、半減期約5～20分を有する。本発明のタンパク質またはキメラ分子は、半減期1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、2

9、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100時間を有すると企図される。もう一つの特に簡便な化学安定性の測定は、トリプシンまたはキモトリプシン消化のようなプロテアーゼ消化に対するタンパク質またはそのキメラ分子の抵抗性である。

【０１３３】

タンパク質またはそのキメラ分子の、そのリガンドまたは受容体に対する結合親和性は、平衡解離定数（Kd）または機能的に同等の測定として測定されてもよい。

【０１３４】

タンパク質の溶解度は、所定の溶媒に溶解するタンパク質の量として、またはタンパク質が溶解する速度として測定されてもよい。さらに、極性、pH、温度等のような異なる特性の溶媒におけるタンパク質またはキメラ分子の溶解速度および／または溶解レベルも同様に、タンパク質またはそのキメラ分子の測定可能な生理化学的特徴を提供する可能性がある。

【０１３５】

任意の「測定可能な生理化学的パラメータ」は、当業者に公知の任意の方法を用いて決定、測定、定量、または定性してもよい。以下に、単離タンパク質またはそのキメラ分子の一つまたは複数の測定可能な生理化学的パラメータを決定、測定、定量、または定性するために有用となる可能性がある一連の方法論を記述する。しかし、本発明は、記述の特定の方法またはこれらの方法を用いて測定可能な測定可能な生理化学的パラメータに決して限定されないことを理解すべきである。

【０１３６】

糖タンパク質は、分子全体を作製するために互いに相互作用する二つの基本成分、すなわちアミノ酸配列と、炭水化物または糖側鎖を有すると言うことができる。分子の炭水化物成分は、アミノ酸骨格のAsnのアミン側鎖またはSer/Thr残基のヒドロキシル側鎖にそれぞれ、N-またはO-連結によって付着した単糖またはオリゴ糖側鎖の形で存在する。単糖は、糖であると見なされ、基本式（CH_2O）$_n$を有し、最も多くの場合原子5または6個の環状構造を形成する（それぞれ、５炭糖および六炭糖）炭水化物の最小単位に対して与えられる用語である。オリゴ糖は、直線または分岐であってもよいが、一般的に縦列反復単位の長鎖を有しない（多糖類の場合のように）多様な複雑さの構造を形成する単糖類の組み合わせである。オリゴヌクレオチドが含む分岐のレベルと共に末端および分岐置換のレベルは、全体として糖タンパク質の特性に劇的に影響を及ぼし、分子の生物機能において重要な役割を果たす。オリゴ糖は、細胞の小胞体（ER）およびゴルジ体において製造され、アミノ酸骨格に付着される。異なる生物および細胞タイプは、異なる比のグリコトランスフェラーゼ、エンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを有し、従って異なるオリゴ糖構造を産生する。体の基本的な防御メカニズムの一つは、異常なイソ型の検出および破壊であり、そのため有効性を増加させるのみならず、中和抗体による検出を減少させるために、生物学的治療物質が正確なグリコシル化を有することは重要である。

【０１３７】

グリカン鎖は多くの場合分岐状で発現され、それらが直線状である場合であっても、そのような鎖は多くの場合様々な修飾を受ける。このように、オリゴ糖の完全なシークエンシングは一つの方法で行うことは難しく、従って、試験中の構造の詳細を最終的に生じる物理的および化学的アプローチの反復的組み合わせが必要である。

【０１３８】

タンパク質のグリコシル化パターンの決定は、異なる多数の系、例えばSDS-PAGEを用いて行うことができる。この技術は、グリコシル化タンパク質がしばしば、SDS-PAGEによって広がったバンドとして移動するという事実による。異なるイソ型の識別は、タンパク質を一連の物質によって処置することによって行われる。例えば、ペプチド-N4-(N-アセチル-β-D-グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼ（PNGアーゼ）による消化後のバンド幅

の顕著な減少および移動位置の変化は、N-結合型グリコシル化の診断と見なされる。

【０１３９】

N-結合型グリコシル化の組成を決定するために、N-結合型オリゴ糖を、髄膜敗血症黄色菌（Flavobacterium meningosepticum）からクローニングしたPNGアーゼによってタンパク質から除去して、大腸菌（E. coli）において発現させる。除去されたN-結合型オリゴ糖を、Packer et al. Glycoconj J 5(8):737-47, 1998によって記述されるように、Alltech Carbograph SPE Carbonカラム（Deerfield, Illinois, USA）から回収してもよい。次に、GP50ポンプED50パルスアンペロメトリックまたは伝導度検出器および多様なpH陰イオン交換カラムを備えたDionexシステムにおいて、単糖類分析、シアル酸分析、または硫酸塩分析のために、試料を採取することができる。

【０１４０】

O-結合型グリコシル化の程度は、β消失によって標的タンパク質からO-結合型オリゴ糖を最初に除去することによって決定してもよい。除去されたO-結合型オリゴ糖は、Packer et al（1998、前記）によって記述されるようにAlltech Carbograph SPE Carbonカラム（Deerfield, Illinois, USA）から回収してもよい。次に、GP50ポンプED50パルスアンペロメトリックまたは伝導度検出器および多様なpH陰イオン交換カラムを備えたDionexシステムにおいて、単糖類分析、シアル酸分析、または硫酸塩分析のために、試料を採取することができる。

【０１４１】

オリゴ糖の単糖サブユニットは、酸に対して多様な感受性を有し、このように軽度のトリフルオロ酢酸（TFA）条件、中等度のTFA条件、および強い塩酸（HCl）条件によって標的タンパク質から放出されうる。次に、単糖混合物を、多様なカラム媒体を用いて高pH陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAEC）によって分離して、パルスアンペロメトリック電気化学的検出（PAD）を用いて検出する。

【０１４２】

パルスアンペロメトリック検出（HPAEC-PAD）による高pH陰イオン交換クロマトグラフィーは、単糖類の組成を決定するために広く用いられている。蛍光体に基づく標識法が導入されており、多くはキットの形で利用可能である。蛍光法の明確な長所は感度の増加（約50倍）である。可能性がある一つの短所は、異なる単糖類が、加水分解物または外部標準物質混合物のいずれかにおけるカップリング反応の際に、蛍光体に対して異なる選択性を示す可能性がある点である。しかし、感度の増加および利用可能な糖タンパク質の全量のうち少量からどの単糖類が存在するかを同定できることと共に、レーザー誘導蛍光を用いてより感受性が高くなる可能性があることから、このアプローチは魅力的である。さらに、伝導度検出器を用いて硫酸塩およびリン酸塩組成を決定してもよい。標準物質を用いることによって、存在するそれぞれの単糖の全量に対するピーク面積を計算することができる。これらのデータは、N-およびO-結合型グリコシル化レベル、シアリル化の程度、およびアミノ酸組成と併用したグリコシル化の重量％、酸性糖タンパク質の重量％を示すことができる。

【０１４３】

タンパク質の少量の単糖組成分析は、エレクトロブロッティング後のPVDF（PSQ）メンブレンによって、またはより少量を分析する場合には、ドットブロットにおいて最善に行われる。PVDFは、単糖もオリゴ糖も、一度酸または酵素加水分解によって放出されるとメンブレンに結合しないことから、炭水化物分析にとって理想的なマトリクスである。

【０１４４】

標的分子のオリゴ糖含有量の決定は、多くの技術によって行われる。糖は最初に、酵素的（PNGアーゼによる消化のような）または化学的（ヒドロキシドによるβ消失のような）手段によって、アミノ酸骨格から除去される。糖は、還元によって安定化されてもよく、または検出を容易にするために蛍光体によって標識してもよい。次に、得られた遊離のオリゴ糖を、公知の標準物質と共に用いて様々な構造の比およびシアリル化レベルを決定することができる、パルスアンペロメトリック電気化学的検出を行う高pH陰イオン交換ク

ロマトグラフィー（HPAEC-PAD）、またはタンパク質のSDS-PAGE分離と類似のプロセスである蛍光体支援炭水化物電気泳動（FACE）のいずれかによって分離する。このプロセスにおいて、オリゴ糖は電気泳動移動度を与える蛍光体によって標識される。それらは高い百分率のポリアクリルアミドゲルにおいて分離され、得られたバンドパターンは標的分子のオリゴ糖含有量のプロフィールを提供する。標準物質を用いることによって、存在する実際の構造に関する何らかの情報を得ることが可能であり、またはバンドを切り出して質量分析を用いて分析して、その構造のそれぞれを決定することができる。

【０１４５】

蛍光体支援炭水化物電気泳動（FACE）は、糖結合体から放出された個々のオリゴ糖を分離するように設計されたポリアクリルアミド電気泳動システムである。オリゴ糖は、還元末端を保持するような方法で、試料タンパク質から化学的または酵素的手段によって除去される。次に、オリゴ糖を単糖に消化する、または無傷のままで蛍光体（荷電または非荷電のいずれか）によって標識する。高百分率ポリアクリルアミドゲルおよび様々な緩衝液系を用いて、タンパク質と全く同じ方法でその大きさ／組成に対して移動するオリゴ糖／単糖を移動させる。糖を、密度測定によって可視化して、相対量の糖を蛍光体検出によって決定することができる。このプロセスは、MALDI-TOF MSと適合性であり、従って方法は実際の構造を解明するために用いることができる。

【０１４６】

水晶振動子マイクロバランスおよび表面プラズモン共鳴（それぞれ、QCMおよびSPR）は、分子の生理化学的特性を通して生物学的情報を得る二つの方法である。両者は、あらかじめ作製されたチップの物理的特徴において相互作用が引き起こす変化を通してタンパク質-タンパク質相互作用を間接的に測定する。QCMにおいて、単結晶水晶ウェーハを、対象リガンドと相互作用する受容体／抗体等によって処置する。このチップをマイクロバランスによって発振させて、チップの周波数を記録する。対象タンパク質をチップ上に通過させて、結合した分子との相互作用がウェーハの周波数を変化させる。リガンドがチップと相互作用する条件を変化させることによって、標的分子の結合特徴を決定することが可能である。

【０１４７】

見かけの分子量はまた、本発明のタンパク質またはキメラ分子と、代用手段を用いて産生されたタンパク質またはキメラ分子の間の類似性特性を決定するために用いることができる生理化学的特性でもある。

【０１４８】

本明細書において用いられるように、「分子量」という用語は、分子における構成原子の原子量の総和として定義され、時に「分子質量」（Mr）と呼ばれる。分子量は、分子における構成原子の原子質量を合計することによって理論的に決定されうる。「見かけの分子量」という用語は、SDS pageまたは超遠心のような一つまたは複数の分析技術によって決定された分子量として定義され、分子と検出系との関係に依存する。タンパク質またはそのキメラ分子の見かけの分子量は、一連の実験法の任意の一つを用いて決定することができる。タンパク質の分子量を決定するための分析法には、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ゲル電気泳動、レイリー光散乱、分析的超遠心、およびある程度、飛行時間型質量分析が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【０１４９】

ゲル電気泳動は、タンパク質の生理化学的特性（特に見かけの分子量およびpI）のいくつかを決定するプロセスであり、分子をイソ型に分離するための二次元電気泳動の場合、それによってタンパク質産物の翻訳後修飾に関する情報を提供する。具体的には、電気泳動は、そのゲルマトリクス全体に電位を適用することによって、荷電分子（タンパク質またはDNAのような）をゲルマトリクス（最も一般的にポリアクリルアミドまたはアガロース）を通して移動させるプロセスである。タンパク質に関して用いられる電気泳動の最も一般的な型は等電点電気泳動、非変性、およびSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動である。等電点電気泳動において、タンパク質を、その長さ全体に及ぶpH勾配を有するポリア

クリルアミドゲルの中に入れる。タンパク質は、ゲルの中を真の電荷ゼロを有する点まで移動して、それによってその等電点を与えると考えられる。

【０１５０】

グリコマスフィンガープリンティング（GMF）は、それによってタンパク質またはそのイソ型の一つのオリゴ糖プロフィールが、電気泳動の後の特異的質量分析技術によって同定されるプロセスである。試料タンパク質を、総プロフィールを決定するための1D SDS-PAGEまたは特異的イソ型特徴付けのための2Dゲル電気泳動のいずれかによって精製する。タンパク質のバンド／スポットをゲルから切り出して、脱染色して混入物を除去した。化学または酵素的手段によって糖を放出して、ナノフローLCシステムおよびグラファイト化炭素カラムを用いて脱塩／分離する。LC流をエレクトロスプレー質量分析計に直接注入して、これを用いて質量を決定し、その後試料に存在するオリゴ糖の同一性を決定する。これは、それぞれのイソ型のプロフィールまたはフィンガープリントを提供し、これを、試験される分子の総組成を決定するためにDionex分析のような定量的技術と組み合わせることができる。

【０１５１】

一次構造は、本発明のタンパク質またはキメラ分子の生理化学的特性を決定する場合に評価されうる。

【０１５２】

タンパク質またはそのキメラ分子の一次構造は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０１５３】

タンパク質またはそのキメラ分子の一次構造に関する情報は、質量分析（MS）、DNAシークエンシング、アミノ酸組成、タンパク質シークエンシング、およびペプチドマスフィンガープリンティングの組み合わせを用いて決定することができる。

【０１５４】

アミノ酸骨格の配列を決定するために、N-末端化学シークエンシング、タンデム質量分析シークエンシング、または双方の組み合わせを用いる。N-末端化学シークエンシングは、Edman化学（Edman P. "Sequence determination" Mol Biol Biochem Biophys 8:211-55, 1970）を利用し、これはタンパク質のN-末端アミノ酸と2位のアミノ酸との間のペプチド結合が、配列における他の全てのペプチド結合より弱いことを述べている。中等度の酸性条件を用いることによって、N-末端アミノ酸を除去して、蛍光体（FITC）によって誘導体化して、逆相HPLCカラム上での保持時間を決定して、標準物質と比較して、アミノ酸が何であるかを同定する。この方法は、分子の実際の一次構造を決定すると考えられるが、定量的ではない。またはナノフロー液体クロマトグラフィーと共にタンデム質量分析を用いてもよい（LC-MS/MS）。このプロセスにおいて、タンパク質を、特異的エンドプロテアーゼを用いてペプチドに消化して、ペプチドの分子量を決定する。窒素またはアルゴンのような高エネルギー衝突ガスを用いて、ペプチド結合を切断し、得られたペプチドの質量を測定する。ペプチドの質量の変化を計算することによって、ペプチドのそれぞれの配列を決定することが可能である（それぞれのアミノ酸は独自の質量を有する）。異なるプロテアーゼを用いることによって、ペプチドを重ね合わせて、その順序を決定し、このようにタンパク質の全配列を決定してもよい。

【０１５５】

明らかに、酵素消化、化学誘導体化、液体クロマトグラフィー（LC）/MSおよびタンデムMSの組み合わせは、AA配列分析にとってきわめて強力なツールを提供する。例えば、組換え型可溶性CD4受容体の詳細な構造は、方法の組み合わせによって特徴付けられ、これはこのアミノ酸369個の糖タンパク質の一次配列の95％より多くが確認し、N-およびC-末端の双方の全性質、グリカンの付着位置、グリカンの構造およびジスルフィド架橋の正確な割付を示す（Carr et al. J Biol Chem 264(35):21286-21295, 1989）。

【０１５６】

質量分析（MS）は、真空下の荷電環境におけるその挙動の外挿を通して分子の質量を測

定するプロセスである。MSは、安定性試験および品質管理において非常に有用である。本方法は最初に、タンパク質分解酵素（トリプシン、V8プロテアーゼ、キモトリプシン、サブチリシンおよびクロストリペイン）による試料の消化を必要とし（Franks et al. Characterization of proteins, Humana Press, Clifton, NJ, 1988; Hearn et al. Methods in Enzymol 104:190-212, 1984）、次に逆相クロマトグラフィー（RPC）による消化された試料の分離を必要とする。LC-MSと組み合わせてトリプシン消化を行うと、ペプチドマップを用いて、発酵、精製、投与剤形の製造および保存の際の遺伝子の安定性、産生ロットの均一性、およびタンパク質安定性をモニターすることができる。

【０１５７】

質量分析の前に、いくつかの方法を用いてHPLCを質量分析計にインターフェースで連結する：1）直接液体注入；2）表層部液体；3）移動ベルトシステム；4）サーモスプレー。Caprioliの研究において用いられたHPLC/MSインターフェースは、カラムから質量分析計のイオン化チャンバーにおける試料プローブの先端まで溶出液を輸送するために融合シリカキャピラリーカラムを用いた。プローブの先端は、エネルギーを有するXe原子によって連続的に衝撃を与えられ、これがキャピラリーの先端から現れると試料溶液のスパッタリングを引き起こす。次に、機器によって質量を分析する（Caprioli et al. Biochem Biophys Res Commun 146:291-299, 1987）。

【０１５８】

MS/MSおよびLC/MSインターフェースは、MSの可能性がある応用を拡大する。MS/MSによって、アミノ酸25個までのペプチドに関して部分配列から完全な配列を直接同定することができ、脱アミド化および異性体化部位を同定することができる（Carr et al. Anal Chem 63 :2802-2824, 1991）。RPCまたはキャピラリー電気泳動（CE）と共役させると、MSは非常に感度の高いタンパク質の分析を行うことができる（Figeys and Aebersold, Electrophoresis 19:885-892, 1998; Nguyen et al. J Chromatogr A 705:21-45, 1995）。LC/MSによって、LC方法論は、ミクロボアHPLCにインターフェースで接続した連続流FABのように、MSに入る前にペプチドを分離することができる（Caprioli et al. 1987、前記）。後者の「インターフェース」によって、複雑な混合物から個々のペプチドをシークエンシングすることが可能となる：第一のMSによって選択されたペプチドの断片化の後に、衝突セル：CID（衝突誘導解離）におけるイオンの雲の中を通過させる。衝突は、特徴的な組の断片を生成し、cDNA配列のような他の情報が不明であっても、そこから配列を推定してもよい。1回のMS実験において、分画されていないペプチド混合物（例えば、酵素消化物からの）を注入して、主要なイオンの質量を、cDNA配列から予測された質量と比較する。組換え型ヒトインターロイキン-2の配列を、CNBrおよびタンパク質分解消化物の高速原子衝突（FAB）-MS分析によって確認した（Fukuhara et al. J Biol Chem 260:10487-10494, 1985）。

【０１５９】

エレクトロスプレーイオン化MS（ESI-MS）は、溶液タンパク質のエアロゾルを用いて高圧下で針に導入して、様々な荷電を有する同じ分子の一連の荷電ピークを生成する。異なる荷電種から生成されたそれぞれのピークは、分子量の推定を生成することから、これらの推定値を組み合わせて、分子量推定の全体的な精度を増加させることができる。マトリクス支援レーザー脱離イオン化MS（MALDI-MS）は、高濃度の発色団を用いる。より高い強度のレーザーパルスがマトリクスによって吸収されて、吸収されたエネルギーがマトリクスの一部を蒸発させ、タンパク質試料をそれと共にほぼ完全に蒸気相へと運ぶ。次に、得られたイオンを飛行時間型MSで分析する。軽度のイオン化は、方法が四次構造情報を提供する許容量を増加させる可能性がある。MALDI-MSは、15分未満で迅速に実施することができる。これは分子を断片化する必要がなく、結果は、質量範囲100 kDaまでのSDS-PAGEゲルの密度測定スキャンとして解釈が容易である。

【０１６０】

アミノ酸配列は、タンパク質またはそのキメラ分子をコードするDNAをシークエンシングすることによって予測することができる。しかし、時に、実際のタンパク質配列は異な

る可能性がある。従来、DNAシークエンシング反応は複製しつつあるDNA（DNA変性、複製）に関するPCR反応にまさに類似している。DNAクローニング技術によって、遺伝子がクローニングされて、ヌクレオチド配列が決定される。

【０１６１】

タンパク質またはそのキメラ分子のアミノ酸配列は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０１６２】

タンパク質またはそのキメラ分子の完全長の配列記述は、通常、産物を記述する必要がある。アミノ酸シークエンシングには、ゲルのトリプシン消化、消化されたペプチドのRP C-HPLCによる分画、MALDI-TOF MSによる最も対称的な吸光度プロフィールを有するペプチドピークのスクリーニング、および最初のペプチド（N-末端）のエドマン分解によるスクリーニングが含まれる。エドマン分解の化学的に由来する一次配列データは、分子レベルでタンパク質を同定するための古典的な方法である。MALDI-TOF MSを、N-末端配列分析のために用いることができる。しかし、HPLCおよびペプチドシークエンシングに関する全ての酵素消化物は、時間とコストを減少させるために、最初にMSまたはMS/MSタンパク質同定に供されることが推奨される。SDS-PAGE分離タンパク質の内部アミノ酸配列は、ゲルマトリクスにおいてインサイチューでトリプシンまたはリジリルエンドペプチダーゼ消化後のHPLC分離によるペプチドの溶出によって得られる。

【０１６３】

標準的なペプチドの内部シークエンシングは、機器をピークでの性能に維持するように、分析試料について行われることが推奨される。高等真核細胞タンパク質の80％より多くが、直接のアミノ酸シークエンシングを妨害するブロックされたアミノ末端を有すると報告される。ブロックされた真核細胞タンパク質に遭遇すれば、内部標準物質の配列の存在は、機器が正確に作動していることを証明する。

【０１６４】

エドマン分解は、N-末端アミノ酸を誘導体化してアミノ酸を放出し、次のアミノ酸のアミノ末端を露出する、化学技法による直接N-末端シークエンシングのために用いることができる。エドマンシークエンシングには：1）マイクロボアHPLCによって、N-末端配列分析をエドマン化学サイクルによって繰り返す。エドマン化学のサイクル毎に、一つのアミノ酸を同定することができる。2）ゲル内またはPVDF結合タンパク質の消化後に得られたペプチドのHPLC分離を行った後、内部タンパク質配列分析をエドマン分解化学によって行う。

【０１６５】

マイクロボアHPLCおよびキャピラリーHPLCは、RPC-HPLCを用いてペプチド混合物を分析および精製するために用いられる。ゲル内試料およびPVDF試料を、異なるカラムを用いて精製する。MALDI-TOF MS分析は、HPLC分画後のN-末端分析のために用いることができる。選択基準は、1）HPLC分画の見かけの純度、2）ペプチドの質量およびこのように推定された長さ、である。ペプチド質量情報は、エドマンシークエンシングアミノ酸割付を確認するために有用であり、同様に翻訳時または翻訳後修飾の可能性がある検出においても有用である。

【０１６６】

ゲル内消化物は、より感度の高いHPLCシステムでの精製にとって適している。内部配列分析は最初に、SDS-PAGEによって酵素的に消化される。SDS-PAGEミニゲルにおけるタンパク質は、トリプシンに限って信頼可能にゲル内で消化されうる。ペプチド断片は、RPC-HPLCによって精製され、次にMALDI-TOF MSによって分析され、エドマン配列分析にとって適したペプチドに関してスクリーニングされる。ゲル中のタンパク質は、内部シークエンシング分析によってのみ分析されうるが、非常に正確なペプチド質量を得ることができ、これはアミノ酸の割付およびデータベース検索の双方において有用なさらなる情報を提供する。

【０１６７】

PVDF結合タンパク質は、N-末端および内部エドマンシークエンシング分析の双方にとって適している。PVDF結合タンパク質は、適切な酵素（トリプシン、エンドプロテナーゼLys-C、エンドプロテナーゼGlu-C、クロストリペイン、エンドプロテナーゼAsp-N、サーモリシン）および水素化トライントンX-100のような非イオン性洗浄剤によって消化される。PVDF結合タンパク質において、膜から消化されたペプチドを放出するために用いられる洗浄剤は、MALDI-TOF MS分析を干渉し得る。酵素を加える前に、CysをDTTによって還元して、ヨードアセタミドによってアルキル化してカルボキシアミドメチルCysを生成、これをN-末端配列分析の際に同定することができる。

【０１６８】

タンパク質またはそのキメラ分子のアミノ酸組成を決定するために、試料を、ガス相においてフェノール触媒強塩酸（HCl）の酸性条件を用いて加水分解する。加水分解を行った後、発生したアミノ酸を、複合分子に特異的な逆相特徴を付与する蛍光化合物によって誘導体化する。誘導体化アミノ酸を逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）を用いて分離して、蛍光検出器によって検出する。外部および内部標準を用いることによって、観察されたピーク領域から試料中に存在するそれぞれのアミノ酸の量を計算することが可能である。この情報を用いて試料の同一性を決定してもよく、および試料中に存在するタンパク質の量を定量してもよい。例えば、理論的結果と実際の結果との間の相違を用いて、脱アミド化部位の可能性を最初に同定することができる。単糖分析と組み合わせて、組成物グリコシル化の重量％および酸性糖タンパク質の重量％を決定してもよい。この方法は、骨格の実際の配列に提供することができる情報に限られるが、環境的混入物およびおよび時にアミノ酸の破壊により固有の変動が存在する。例えば、この方法では、配列における点突然変異を検出することは不可能である。

【０１６９】

ペプチドマスフィンガープリンティング（PMF）は、タンパク質またはそのキメラ分子の同一性が決定される可能性があるもう一つの方法である。技法は、電気泳動手段（一次元または二次元）による試料の最初の分離、ゲルからのスポット／バンドの切り出し、および特異的エンドプロテアーゼ（典型的にブタトリプシン）による消化を必然的に伴う。ペプチドをゲル断片から溶出させて、質量分析によって分析して、存在するペプチド質量を決定する。次に、得られたペプチド質量を、報告された全てのタンパク質に関する理論的質量断片のデータベースと比較する（または構築物の場合、設計された配列の理論的ペプチド質量に関して）。技術は、タンパク質の「フィンガープリント」（すなわちペプチド質量のその組み合わせ）が独自であるという事実による。同一性は4ペプチドもの少なさで30％配列範囲でも信頼できるように決定することができる（90％より高い精度）。脂質部分および脱アミド化のような修飾は、分析のPMF段階の際に同定されうる。同定されたタンパク質のピークに対応しないピークを、タンデム質量分析（MS-MS）によってさらに分析するが、この技術はPTMのより弱い結合を切断するために衝突ガスの影響によって作製されたエネルギーを利用する。新たに遊離された分子および当初のペプチドを質量に関して再分析して、翻訳後修飾およびそれが付着するペプチド断片を同定する。

【０１７０】

HPLCは、大きさ、荷電、疎水性、機能、または標的生体分子の特異的含有量に応じて異なる様式に分類される。一般的に、二つまたはそれより多いクロマトグラフィー法を用いてタンパク質を精製する。クロマトグラフィーの様式を選択する場合には、タンパク質および試料溶媒の特徴の双方を検討することが最も重要である。

【０１７１】

本発明のタンパク質またはキメラ分子の二次構造はまた、その特性の特徴を調べる際にも評価することができる。

【０１７２】

タンパク質またはそのキメラ分子の二次構造は、以下のシステムの一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０１７３】

タンパク質の二次構造を調べるために、最も一般的にいくつかの分光法を適用して比較すべきである。電磁エネルギーは、波動の大きさおよび形状に応じて、放射線の連続的な波形として定義されうる。異なる分光法は異なる電磁エネルギーを用いる。

【０１７４】

波長は放射線の一つの波動の程度である（波動の連続する二つの最大値間の距離）。放射エネルギーが増加すると、波長は短くなる。周波数と波数の関係は以下の通りである。

波数（cm^{-1}）＝振動数（s^{-1}）／光の速度（cm/s）

【０１７５】

分子による電磁放射の吸収には、振動および回転遷移、電子遷移が含まれる。赤外線（IR）およびラマン分光法は、二次構造を決定するための分子の振動エネルギーを測定するために最も一般的に用いられる。しかし、それらは分子の吸光度を決定するためのそのアプローチが異なる。

【０１７６】

散乱した放射線のエネルギーは、ストークス線に関する入射放射より少ない。散乱放射のエネルギーは、抗ストークス線に関する入射放射より大きい。励起からのエネルギーの増加または減少は、分子の基底電子状態における振動エネルギー空間に関連する。従って、ストークスおよび抗ストークス線の波数は分子の振動エネルギーの直接測定である。

【０１７７】

ラマンスペクトルではストークスシフトのみが観察される。ストークス線は励起光より小さい波数（または大きい波長）である。レーザーのようなハイパワー励起源を用いてラマン分散効率を増強しなければならない。本発明者らは励起とストークス線の間にエネルギー（波数）の差に関心があることから、励起源は単色でなければならない。

【０１７８】

振動運動がIR活性であるためには、分子の双極子モーメントが変化しなければならない。従って、二酸化炭素における対称な枝は、双極子モーメントにおいて変化がないことからIR活性ではない。非対称の枝は、双極子モーメントにおける変化によりIR活性である。振動がラマン活性であるためには、分子の極性は、振動運動によって変化しなければならない。二酸化炭素における対称な枝は、分子の極性が変化することからラマン活性である。このように、ラマン分光法は、IR分光法を補足する（Herzberg et al. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules, Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 1945）。例えば、IRは双極子モーメントの欠如により等核二原子分子を検出することができないが、ラマン分光法は、結合の伸縮によって分子の極性が変化して、さらに電子と核との間の相互作用が変化することから、これを検出することができる。

【０１７９】

対称心を有する高度に対称な多原子分子に関して（ベンゼンのような）、IRスペクトルにおける活性なバンドは、ラマンスペクトルでは活性ではなく、またはその逆である可能性が高い。対称性がほとんどまたは全くない分子では、赤外およびラマン分光法の双方においてモードは活性である可能性がある。

【０１８０】

IR分光法は、試料による赤外光吸収の波長および強度を測定する。赤外光は非常にエネルギーが高く、より高いエネルギーレベルで分子の振動を励起させることができる。赤外およびラマン分光法はいずれも結合の長さおよび角度の振動を測定する。

【０１８１】

IRはv＝0～v＝1（またはそれより高い）状態の分子の振動励起に対応する特定のエネルギーの光の吸収を測定することによって分子における振動の特徴付けを行う。分子が赤外線分光法によって検出されうるか否かを支配する選択法則があり、正常な振動モードの必ずしも全てが赤外線放射によって励起され得ない（Herzberg et al. 1945、前記）。

【０１８２】

IRスペクトルは、αヘリックス、βシート、βターンおよび無秩序な構造のような、タンパク質の二次構造の定性的および定量的情報を提供することができる。タンパク質分析

に関する最も情報の多いIRバンドは、アミドI（1620-1700 cm^{-1}）、アミド II （1520-1580 cm^{-1}）、およびアミドIII （1220-1350 cm^{-1}）である。アミドIは、タンパク質における最も強い吸収バンドである。これはC=O（70～85％）およびC-N基（10～20％）の収縮振動からなる。正確なバンドの位置は骨格のコンフォメーションおよび水素結合パターンによって指示される。アミドIIは、アミドIより複雑である。アミドIIは、平面内N-H変角振動（40-60%）、C-N（18-40%）およびC-C（10%）の伸縮振動によって支配される。アミドIIバンドはあまり有用ではない（Krimm and Bandekar, Adv Protein Chem 35:181-364, 1986）。FTIRアミドIバンドのβ-シート構造のほとんどは通常、約1629 cm^{-1}に存在し、最小値は1615 cm^{-1}であり、最大値は1637 cm^{-1}である；軽微な成分が1696 cm^{-1}（最低値1685 cm^{-1}）周囲のピークを示す可能性があり、α-ヘリックスは主に1652 cm^{-1}に見出される。1680 cm^{-1}付近の吸収は、現在ではβターンに割付される。

【０１８３】

ラマン散乱の原理は、赤外吸収の原理とは異なる。ラマン分光法は、分子からの非弾性的に散乱された光の波長および強度を測定する。ラマン散乱光は、分子振動のエネルギーによって入射光からシフトした波長で起こる。

【０１８４】

非弾性的に散乱される振動がラマン活性であるためには、振動間の極性の変化が必須である。対照的な枝において、電子結合の強さは、最小または最大の核間距離の間で異なる。従って、振動の際に極性が変化して、この振動モードはラマン光を散乱させ、振動はラマン活性である。非対称の枝では、電子は拡大する結合ではより容易に分極するが、圧縮する結合ではあまり容易に分極しなくなる。極性の全体的な変化はなく、非対称の枝はラマン不活性である（Herzberg et al. 1945、前記）。

【０１８５】

円二色性は、タンパク質のような任意の非対称の構造を検出するために用いることができる。光学活性の発色団は異なる量の左右偏光を吸収して、この吸光度の差によって、正または負の吸収スペクトルが起こる（通常、右偏光スペクトルは左偏光スペクトルから差し引かれる）。一般的に遠UVまたはアミド領域（190-250 nm）は、主にペプチド結合から寄与され、アミド結合のカルボニル基の環境、その後タンパク質の二次構造に対する情報を提供する。αヘリックスは通常、208、222 nmで二つの負のピークを示し（Holzwarth et al J Am Chem Soc 178:350, 1965）、βシートは218 nmで一つの負のピークを示し、ランダムコイルは196 nmで負のピークを有する。近UV領域のピーク（250-350 nm）は、芳香族発色団（Phe、Tyr、Trp）の環境から寄与される。ジスルフィド結合は250 nm周辺に軽微なCDバンドを生じる。

【０１８６】

強い二色性は一般的に、高度に折りたたまれた三次元構造において堅固に維持された側鎖構造に関連する。タンパク質の変性はほとんど立体妨害を解放して、変性の程度の増加と共により弱いCDスペクトルが得られる。例えば、hGHの側鎖のCDスペクトルは、変性剤を加えることによる部分的変性に対してかなり感受性である。ジスルフィド結合の還元またはアルカリ滴定のような、分子のいくつかの可逆的化学的変更は、側鎖のCDスペクトルを変化させると思われる。hGHに関してこれらのスペクトルの差は、発色団を完全に除去することによって、または部分的な発色団のCD反応の変化に影響を及ぼすことによって引き起こされうるが、著しい変性またはコンフォメーションの変化では引き起こされない（Aloj et al. J Biol Chem 247:1146-1151, 1971）。

【０１８７】

UV吸収分光法は、タンパク質特性を決定するための最も重要な方法の一つである。これはタンパク質濃度および発色団のすぐ周囲の環境に関する情報を提供することができる。アミノ、アルコール（またはフェノール）、ヒドロキシル、カルボニル、カルボキシル、またはチオールのようなタンパク質官能基を、強い発色団に変換させることができる。可視および近UV分光法を用いて二つのタイプの発色団：メタロプロテイン（400 nmより大きい）およびPhe、Trp、Tyr残基を含むタンパク質（260-280 nm）をモニターする。UVまた

は蛍光シグナルの変化は、タンパク質配列および溶液特性に応じて負または正となり得る。

【０１８８】

蛍光は、分子が励起状態へと照射された後の放射エネルギーを測定する。多くのタンパク質が、250～300 nmで励起された場合、その芳香族アミノ酸から300～400 nmの範囲の蛍光を放射する。Phe、Trp、Tyr残基を有するタンパク質のみが強度の順序Trp＞＞Tyr＞＞Pheで測定されうる。蛍光スペクトルはタンパク質のフォールディングによって影響を受ける微小環境情報を反映し得る。例えば、埋もれたTrpは通常、疎水性の環境に存在し、最大で325～330 nmの範囲で蛍光を発するが、露出した残基または遊離のアミノ酸は約350～355 nmで蛍光を発する。タンパク質のアンフォールディングを探るためにしばしば用いられる物質は、ビス-ANSである。ビス-ANSの蛍光は、pH依存的である。そのシグナルがたとえ水中で弱くとも、タンパク質におけるアンフォールディングによって曝露された疎水性部位に結合することによって、そのシグナルを有意に増加させることができる（James and Bottomley Arch Biochem Biophy 356:296-300, 1998）。

【０１８９】

折りたたまれたタンパク質におけるTyrおよびTrpの有効な消光は、アンフォールディングの際に有意なシグナルの増加を引き起こす。単純な溶質も同様に変化を引き起こす可能性がある。検出感度を最大限にするために。シグナル比を用いることができる。例えば、rFXIIIアンフォールディングの試験において、330 nmに対する350 nmでの蛍光強度の比を用いた（Kurochkin et al. J Mol Biol 248:414-430, 1995）。転移効率は二つの発色団の間の距離に依存することから（Honroe et al. Biochem J 258: 199-204, 1989）、コンフォメーションの変化は、蛍光ドナーと吸収アクセプターの間の励起エネルギー転移によって調べてもよい。蛍光を用いてα-アンチトリプシンのコンフォメーションを探り（Kwon and Yu, Biophim Biophys Acta 1335:265-212, 1997）、HSAのTmを決定して（Farruggia et al. Int J Biol Macromol 20:43-51, 1997）、およびMerPアンフォールディング相互作用を検出した（Aronsson et al. FEBS Lett. 411:359-364, 1997）。

【０１９０】

中性pHでは、蛍光放射スペクトルの強度はTrp＞Tyrの順である。酸性pHでは、エネルギー転移を破壊するコンフォメーションの変化により、Tyrからの蛍光はTypより優勢である。蛍光試験はまた、グアニジン誘導アンフォールディング転移における中間体の存在を確認する。

【０１９１】

本発明のタンパク質またはそのキメラ分子の生理化学型の三次および四次構造も同様にその機能を確認するために重要である。

【０１９２】

本発明のタンパク質またはキメラ分子の生理化学的型の三次および四次構造は、以下のシステムの一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０１９３】

NMRおよびX線結晶学は、タンパク質の三次元構造を調べるために、最も多くの場合用いられる技術である。タンパク質の三次構造を探るための他のあまり詳述されていない方法には、近UV領域でのCD、UV分光法の二次派生物（Ackland et al. J Chromatogr 540:187-198, 1991）、および蛍光が含まれる。

【０１９４】

NMRは、構造生物学における分子構造および分子間相互作用に関する主な実験法の一つである。タンパク質の構造を調べるほかに、NMRはまた、本発明のタンパク質またはキメラ分子の炭水化物構造を調べるために利用することができる。NMR分光法は、単純な一次元技術を用いて化学構造を調べるために、化学者によって日常的に用いられている。より複雑な分子の構造も同様に、二次元技術によって決定することができる。時間ドメインNMRは、溶液中の分子動態を探るために用いられる。固体状態NMRは、固体の分子構造を決定するために用いられる。NMRは、タンパク質、核酸、生物学的、薬理学的、および医学的

対象の多様な低分子量化合物を調べるために用いることができる。しかし、必ずしも全ての核が、NMRによって読み取られるために正確な特性を保有するわけではなく、すなわち必ずしも全ての核がNMRにとって必要なスピンを保有するわけではない。スピンは、核にNMRシグナルを産生させ、小さい磁場として機能する。

【０１９５】

タンパク質またはそのキメラ分子の結晶構造は、以下のシステムの一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０１９６】

X線結晶学は、結晶によってX線が回折するという事実を適用する実験技術である。X線は、比較可能な大きさの原子の電子の雲によって散乱される適当な波長（オングストローム範囲、～10-8 cm）を有する。電子密度は結晶における分子または原子の周期的なアセンブリを散乱させるX線から得られた回折パターンに基づいて再構築されうる。再構築を完全にするために、回折データからまたは回折実験の補足からさらなる相情報を得るべきである。次に、モデルを実験的電子密度に進行的に構築して、データに対して精密にすると、その結果、非常に正確な分子構造が得られる。

【０１９７】

X線回折は、対象の原子または分子間構造の距離と類似の波長を有する任意のビーム、例えば、イオン、電子、中性子、および陽子によって、物質の全ての状態の構造を調べるために、開発されている。

【０１９８】

光散乱分光法は、より大きい粒子はより小さい粒子より多くの光を散乱するという単純な原理に基づいている。310-400 nm領域における勾配基準線は、凝集体のような大きい粒子が溶液中に存在する場合の光の散乱に由来する（Schmid et al. Protein structure, a practical approach, Creighton Ed., IRI Press, Oxford, England, 1989）。

【０１９９】

光散乱分光法は、タンパク質の分子量を推定するために用いることができ、タンパク質の四次構造またはタンパク質凝集をモニターするための単純なツールである。タンパク質凝集の程度は、単純な混濁度測定によって示されうる。ほとんどの凝集タンパク質は曇りまたは乳光として存在することから、最終産物の薬学的溶液を、明度に関する検分に供する。時に光子相関分光法（PCS）と呼ばれる擬似弾性光散乱分光法（QELSS）、または動的光散乱（DLS）は、高分子（タンパク質、多糖類、合成ポリマー、ミセル、コロイド状粒子、および凝集物）に関する複雑な液体における拡散を非浸潤的に調べる方法である。ほとんどの場合、光散乱分光法は、散乱種の相互の拡散係数を直接生じる。単分散溶液を希釈するために適用する場合、QELSSによって得られた拡散係数は、大きさを推定することができる。多分散系の場合、これは分子量分布の幅を推定する。正確な測定のためには、200～500 mWのレーザーパワーが必須であり、通常のAr+/Kr+ガスレーザーが広く用いられている（Phillies Anal Chem 62:1049A- 1057 A, 1990）。タンパク質凝集はヒトリラキシンによって検出された（Li et al. Biochemistry 34:5762-5772, 1995）。

【０２００】

タンパク質またはそのキメラ分子の安定性はまた、機能の重要な決定因子でもある。そのような特徴を分析するための方法には、DSC、TGA、およびフリーズドライ冷却ステージ顕微鏡、凍結融解抵抗性の分析、およびプロテアーゼ抵抗性が含まれる。

【０２０１】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、凍結乾燥（フリーズドライ）に対してより安定である可能性がある。凍結乾燥は、液体型ではなくて粉末で保存されることから、産物の安定性および／または有効期限を増強するために用いられる。プロセスは、試料を最初に凍結した後、真空下での蒸発による液体の除去を必然的に伴う。最終的な結果は、タンパク質および賦形剤（処方において用いられる他の物質）の乾燥した「ケーク（cake）」である。得られたケークの硬度は、溶解が成功するためにきわめて重要である。凍結乾燥プロセスによって、タンパク質に変化が起こり得て、特にクロスリンク、脱アミド化およ

び他の修飾を通して凝集物の形成が起こり得る。これらは喪失、活性の低減、または凝集物に対する免疫反応の誘導によって、効力を低減させうる。凍結乾燥安定性を試験するために、タンパク質は、標準的な安定化剤（例えば、マンニトール、トレハロース、Tween80、ヒト血清アルブミン等）を用いて凍結乾燥のために処方することができる。凍結乾燥後、回収されたタンパク質の量を、ELISAによってアッセイすることができ、その活性を適したバイオアッセイによってアッセイすることができる。タンパク質の凝集は、HPLCまたはウェスタンブロット分析によって検出することができる。

【０２０２】

凍結乾燥の前に、初回乾燥時の産物の最大許容可能温度を設定するために、処方のTgまたはTe（TgまたはTeを定義する）を決定すべきである。同様に、処方の結晶性または非晶質性に関する情報は、より合理的に凍結乾燥サイクルを設計するために役立つ。これらの熱パラメータに関する産物情報は、示差走査熱量測定（DSC）、熱重量測定分析（TGA）、またはフリーズドライ冷却ステージ顕微鏡を用いることによって得ることができる。

【０２０３】

示差走査熱量測定（DSC）は、材料の熱特性を測定、特徴付け、および分析するための、ならびにそれに従って熱容量、融解エンタルピーおよび遷移点を決定するための物理的熱分析法である。DSCは、線形速度で温度範囲を走査する。機器内部の個々のヒーターが、「入力補償ゼロバランス」原理に基づいて試料および参照パンに熱を個別に提供する。物理的遷移の際の、エネルギーの吸収または発生が、試料ホルダーに提供されるエネルギー量の不均衡を引き起こす。試料の様々な熱挙動に応じて、エネルギーは、試料から得られるまたは拡散され、温度差は、コンピューターに対する電気シグナルとして感知される。その結果、ヒーターの自動調節によって、試料ホルダーの温度は参照ホルダーと同一となる。補償のために必要な電気力は、熱量測定効果と同等である。

【０２０４】

有機物質の純度は、DSC融解吸熱の形状および温度に基づいてDSCによって推定されうる。入力補償型DSCは、同一の条件で熱流束型DSCと比較して非常に高い分解能を提供する。より分解能の低い熱流束型DSCの場合、部分的融解領域は、狭い温度間隔で「不鮮明となる」ことがないことから、より十分に定義されたおよびより正確な部分的融解領域は、入力補償型DSCから生成されうる。入力補償型DSCは、固有のよりよい部分的融解領域を生じ、従ってより良好な純度分析を生じる。段階状DSCの助けを借りて、入力補償型DSCは、正弦波振幅のデコンボリューションまたは抽出の必要なく、従来の時間証明手段を用いて直接の熱容量測定を提供することができる。

【０２０５】

熱重量測定分析（TGA）は、温度または時間の関数として試料の質量喪失および重量減少速度を測定する。

【０２０６】

DSCとして、フリーズドライ冷却ステージは、広い温度範囲に急速に到達することができる。現在、処方前および処方試験ツールとして、フリーズドライ冷却ステージにおいて凍結乾燥サイクルを模倣することは、縮小スケールにおいてタンパク質処方の熱パラメータを試験するための最善のプラットフォームを提供する。フリーズドライ顕微鏡は、凍結および乾燥に及ぼす処方およびプロセス要因の影響を予測することができる。冷却ステージ試験では試料2～3 mLを必要とするに過ぎず、このためこの技術は、少量の得ることが難しい薬物を試験するための貴重なツールとなる。これは、凍結乾燥サイクルに及ぼす凍結速度、乾燥速度、融解速度の影響を調べるための良好なツールである。アニーリング研究は、フリーズドライ冷却ステージ顕微鏡からの試験によって進歩する可能性がある。凍結乾燥技術の広範な適用、およびきわめて高価な薬物（タンパク質および遺伝子治療薬のような）を安定化させるためのより大きい需要のために、インプロセス顕微鏡モニターは製薬業界においていずれ実現されるはずである。

【０２０７】

タンパク質またはそのキメラ分子の凍結融解抵抗性は、以下のシステムの一つまたは複

数を用いてアッセイすることができる。

【０２０８】

グリコシル化のような翻訳時または翻訳後修飾は、繰り返し凍結／融解サイクルからタンパク質を保護する可能性がある。これを決定するために、本発明のタンパク質またはキメラ分子を無担体大腸菌酸性相対物と比較することができる。タンパク質またはそのキメラ分子を適した培地（例えば、細胞増殖培地、PBS等）に希釈した後、様々な方法によって、例えば液体窒素中での瞬間凍結、-70℃に置くことによるゆっくりとした凍結、またはドライアイスによる急速凍結によって凍結する。次に、試料を室温で急速に融解する、または4℃で徐々に融解する。いくつかの試料を再凍結して、プロセスを多くのサイクル繰り返す。存在するタンパク質の量をELISAによって測定して、活性を当業者によって選択される適したバイオアッセイにおいて測定することができる。残っている活性／タンパク質の量を開始材料と比較して、多くの凍結／融解サイクルに対する抵抗性を決定する。

【０２０９】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、溶液中で変化した熱安定性を有してもよい。本発明の熱安定性は以下のようにインビトロで決定してもよい。

【０２１０】

本発明のタンパク質またはキメラ分子を、緩衝液、例えば担体タンパク質、例えばヒト血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩液において混合して、特定の温度で特定の時間（例えば、37℃で7日間）インキュベートすることができる。この処置後に残っているタンパク質またはそのキメラ分子の量をELISAによって決定して、-70℃で保存した材料と比較することができる。残っているタンパク質またはそのキメラ分子の生物活性は、当業者によって選択される適したバイオアッセイを行うことによって決定される。

【０２１１】

タンパク質またはそのキメラ分子のプロテアーゼ抵抗性は、以下のシステムの一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２１２】

プロテアーゼ抵抗性を比較するために、本発明のタンパク質またはキメラ分子を含む溶液、ならびに大腸菌発現相当物を含む溶液を、選択したプロテアーゼ（例えば、非精製血清プロテアーゼ、精製プロテアーゼ、組換え型プロテアーゼ）と共に異なる期間インキュベートすることができる。残っているタンパク質の量を適当なELISA（例えば、捕獲および検出抗体によって認識されるエピトープがプロテアーゼ切断部位によって離れているELISA）によって測定し、残りのタンパク質またはそのキメラ分子の活性を当業者によって選択される適したバイオアッセイによって決定する。

【０２１３】

タンパク質またはそのキメラ分子の生物学的利用率は、以下のシステムの一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２１４】

生物学的利用率は、薬物または他の物質が投与後に標的組織に対して利用可能となる程度である。生物学的利用率は、薬物の半減期、または標的組織に到達する能力に依存する可能性がある。

【０２１５】

本発明のタンパク質またはキメラ分子を含む組成物を皮下または筋肉内に注射する。タンパク質またはそのキメラ分子のレベルを、ELISAまたは放射活性計数によって血液中で測定することができる。または、血液試料を、当業者によって選択される適したバイオアッセイ、例えば特定の標的細胞集団の増殖刺激によってタンパク質の活性に関してアッセイすることができる。試料が血漿または血清に由来する場合、出力活性の原因となり得る多くの他の分子が存在する可能性がある。これは、試験されるタンパク質に対する中和抗体を用いることによって制御されうる。従って、残りの生物活性は他の血清成分による。

【０２１６】

タンパク質またはそのキメラ分子の安定性または半減期は以下のシステムの一つまたは

複数を用いてアッセイすることができる。

【０２１７】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、血清または血漿中で変更された半減期を有してもよい。本発明の半減期はインビトロで以下のように決定してもよい、本発明のタンパク質またはキメラ分子を含む組成物を、ヒト血清／血漿と混合して、特定の温度で特定の時間（例えば、37℃で4時間、12時間等）インキュベートすることができる。この処置後に残っているタンパク質またはそのキメラ分子の量をELISAによって決定することができる。残っているタンパク質またはそのキメラ分子の生物活性は、当業者によって選択される適したバイオアッセイを行うことによって決定される。選択された血清は、多様なヒト血清群（例えば、A、B、AB、O等）に由来してもよい。

【０２１８】

タンパク質またはそのキメラ分子の半減期はまた、インビボで決定することができる。放射活性トレーサーまたは他の手段によって標識される可能性があるタンパク質またはそのキメラ分子を含む組成物を、試験のために選択した種、例えばマウス、ラット、ブタ、霊長類、ヒトの静脈内、皮下、後眼窩、尾静脈、筋肉内、または腹腔内に注射することができる。血液試料を注射後様々な時点で採取して、タンパク質またはそのキメラ分子の存在に関してアッセイする（ELISAまたはTCA沈殿放射活性計数のいずれかによって）。大腸菌またはCHO産生タンパク質またはそのキメラ分子からなる比較組成物を対照としてアッセイすることができる。

【０２１９】

本発明のタンパク質またはキメラ分子の半減期をインビボで決定するために、雄性Wag/Rijラットまたは他の適した動物に、タンパク質またはそのキメラ分子を静脈内注射することができる。

【０２２０】

基質に投与する直前に、EDTA血液200 μｌを陰性対照として採取する。注射後様々な時点でEDTA血液200 μｌを同じ技術を用いて動物から採取することができる。最後の血液採取の後、動物を屠殺する。採取30分以内に標本をRTで15分間遠心する。血漿試料を特異的ELISAにおいて試験して、それぞれの試料における本発明のタンパク質またはキメラ分子の濃度を決定する。

【０２２１】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は血液脳関門を通過する可能性がある。

【０２２２】

本発明のタンパク質またはキメラ分子がヒト脳内皮細胞に結合するか否かを決定するためのインビトロアッセイは、以下のアッセイを用いて試験することができる。

【０２２３】

本発明の放射標識タンパク質またはキメラ分子は、ヒト脳毛細管内皮細胞に対する結合能に関して試験することができる。本発明の単離タンパク質またはキメラ分子は、当技術分野で公知の方法を用いて、例えばクロラミンT法によって^{125}Iによって、^{3}Hによって比活性まで放射標識に注文で結合させることができる。

【０２２４】

ヒト脳内皮細胞の初代培養を、平底96ウェルプレートにおいてコンフルエンシー後5日まで増殖させることができ、その後アセトンを用いて軽く固定する。細胞を溶解して、ガラス線維メンブレンに移す。本発明の放射標識タンパク質またはキメラ分子は、液体シンチレーションカウンターを用いて検出することができる。

【０２２５】

本発明のタンパク質またはキメラ分子のヒト脳内皮細胞への結合を決定するためのインビボアッセイは、以下のアッセイを用いて試験することができる。

【０２２６】

本発明のヒト特異的タンパク質またはキメラ分子を、新しく凍結した（固定せずに）ヒト脳組織の切片を用いてヒト脳毛細管に対する結合に関して試験して、低温槽において切

片にしてスライドガラスに載せて、アセトンにおいて固定する。本発明の^{3}H-タンパク質またはキメラ分子の結合を、定量的オートラジオグラフィーを用いて脳切片において調べる。

【０２２７】

インビボアッセイを用いて、霊長類系における本発明のヒト特異的タンパク質またはキメラ分子の組織分布および血液クリアランスを測定することができる。

【０２２８】

本発明のタンパク質またはキメラ分子を用いて、雄性カニクイザル2匹または他の適した霊長類における本発明の^{14}C-標識タンパク質またはキメラ分子の組織分布および血液クリアランスを決定する。本発明のタンパク質またはキメラ分子を、静脈内カテーテルによって^{3}H-標識対照タンパク質と同時に動物に投与する。試験の間、血液試料を採取してタンパク質の循環中からのクリアランスを決定する。注射後24時間で、動物を安楽死させて、選択された臓器および代表的な組織を同位体分布および燃焼によるクリアランスの決定のために採取する。さらに、Triguero, et al. J of Neurochemistry 54:1882-1888, 1990に従って脳の異なる領域からの試料に毛細管枯渇実験を行う。この方法は、脳ホモジネートから90％より多くの血管を除去する（Triguero et al、前記引用）。

【０２２９】

本発明の放射標識タンパク質またはキメラ分子の毛細管分画から実質分画への時間依存型再分布は、血液脳関門を超えて本発明のタンパク質またはキメラ分子の時間依存型移動と一致する。

【０２３０】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、血管新生を促進または阻害する可能性がある。

【０２３１】

本発明のタンパク質またはキメラ分子の血管新生能は、当技術分野で公知の方法により評価してもよい。例えば、血管新生の程度は、血管新生モデルにおける微小血管発芽によって測定してもよい。このアッセイにおいて、ラット脂肪微小血管断片（RFMF）をShepherd et al. Arterioscler Thromb Vase Biol 24:898-904, 2004に記述されるように単離する。安楽死させた動物から精巣上体脂肪床を採取して、細切し、コラゲナーゼにおいて消化する。RFMFおよび単細胞を脂質および脂肪細胞から遠心によって分離して、0.1％BSAのPBS溶液に浮遊させる。RFMF浮遊液を連続的に濾過して組織片、単細胞、および赤血球を断片から除去する。RFMFを冷pH-中性ラット尾1型コラーゲンにおいて15,000 RFMF/mlで浮遊させて、48ウェル培養プレートのウェルに播種する（例えば、0.25 ml/ウェル）。コラーゲンの重合化後、10％FBSを含む等量のDMEMを各ゲルに加える。ゲルが形成された後、血管新生発芽の特徴である血管伸長が培養4日目までに出現する。これらの発芽は、ぎざぎざの平滑筋関連外観がないことによって、親血管断片と容易に区別される。RFMF 3D培養物を本発明のタンパク質またはキメラ分子によって処置して、血管発芽の長さを培養5および6日目に測定することができる。

【０２３２】

本発明のタンパク質またはキメラ分子の血管新生能はまた、Guedez et al, Am J Pathol 162:1431-1439, 2003において記述されるインビボ血管新生アッセイによって評価してもよい。このアッセイは、半閉鎖シリコンシリンダー（アンギオリアクター）をヌードマウスの皮下に埋め込むことからなる。アンギオリアクターに、本発明のタンパク質またはキメラ分子をあらかじめ混合したまたは混合していない細胞外マトリクスを充填する。アンギオリアクター内での脈管形成を、回収前にフルオレセインイソチオシアネート（FITC）-デキストランの静脈内注射によって定量した後、蛍光分光法によって定量する。免疫蛍光によって調べたアンギオリアクターは、異なる発達段階の細胞および浸潤血管新生血管を示すことができる。

【０２３３】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、分子に対して向けられる一つまたは複数の抗

体と分子との相互作用を必然的に伴う免疫アッセイ技術によって決定される明確な免疫反応性プロフィールを有してもよい。イムノアッセイ技術の例には、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）、ドットブロット、および側流試験または小片試験のような免疫クロマトグラフィーアッセイが含まれる。

【０２３４】

タンパク質またはそのキメラ分子のレベルは、イムノアッセイ技法、例えば市販のELISAキットを用いて測定してもよい。本発明のタンパク質またはキメラ分子は、イムノアッセイキットにおいて提供された抗体の特異性により、非ヒト細胞発現タンパク質またはそのキメラ分子に対して異なる免疫反応性プロフィールを有する。例えば、イムノアッセイの捕獲および／または検出抗体は、非ヒト細胞発現ヒトタンパク質またはそのキメラ分子に対して特異的に向けられる抗体であってもよい。

【０２３５】

さらに、非ヒト細胞発現ヒトタンパク質またはそのキメラ分子の不正確なフォールディングによって、正確に折りたたまれたヒト細胞発現ヒトタンパク質またはそのキメラ分子において露出されない抗原性エピトープの露出が起こる可能性がある。不正確なフォールディングは、例えば非ヒト細胞、例えば大腸菌の細胞質における異種タンパク質の過剰産生を通して生じる可能性がある（Baneyx Current Opinion in Biotechnology, 10:411-421, 1999）。さらに、非ヒト細胞発現ヒトタンパク質またはそのキメラ分子は、本発明のタンパク質またはキメラ分子のパターンとは異なる翻訳後修飾パターンを有してもよい。例えば、非ヒト細胞発現ヒトタンパク質またはそのキメラ分子は、炭水化物構造、リン酸塩、硫酸塩、脂質、または他の残基の異常な量および／またはタイプを示してもよい。これによって、本発明のタンパク質またはキメラ分子上では露出されない抗原性エピトープの露出が起こってもよい。逆に、翻訳後修飾の変更されたパターンによって、非ヒト細胞発現ヒトタンパク質またはそのキメラ分子において露出される本発明のタンパク質またはキメラ分子上に抗原性エピトープが存在しなくなってもよい。

【０２３６】

前述の要因の任意の一つまたは組み合わせによって、

（a）実験試料もしくはヒト組織に天然に存在するヒトタンパク質、または

（b）実験試料、ヒト組織、もしくはヒト胚性幹細胞（hES）培養培地におけるヒト細胞発現組換え型ヒトタンパク質またはそのキメラ分子

が不正確に測定される可能性がある。

【０２３７】

適したイムノアッセイを利用して決定されたヒト細胞発現ヒトタンパク質またはそのキメラ分子の免疫反応性プロフィールは、本明細書において以降記述されるように、ヒトにおけるタンパク質の免疫原性の指標を提供する可能性がある。

【０２３８】

ほとんどの生物学的産物は、それらに対して特定のレベルの抗体反応を誘発する。抗体反応によって、場合によっては、おそらく重篤な副作用および／または効力の喪失が起こり得る。例えば、非ヒト細胞から発現された組換え型タンパク質またはそのキメラ分子によって処置した何人かの患者は、特に長期治療的使用の間に中和抗体を生成して、それによってタンパク質の効力を低減させおよび／または副作用に寄与する可能性がある。ヒト細胞から発現されたタンパク質またはキメラタンパク質分子は、中和抗体を生成する可能性が低く、従って非ヒト細胞発現タンパク質またはそのキメラ分子と比較して、治療効力を増加させる。

【０２３９】

タンパク質またはそのキメラ分子の免疫原性は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２４０】

ほとんどの生物学的産物は、それらに対して特定レベルの抗体反応を誘発する。抗体反応によって、場合によっては、おそらく重篤な副作用および／または効力の喪失が起こり

得る。例えば、組換え型EPOによって処置した何人かの患者は、患者自身のEPOと交叉反応する中和抗体を生成すると思われる。この場合、患者は純赤血球無形成症を発症して、EPO処置に対して抵抗性となり、それによってた絶えず透析を必要とするようになる。

【０２４１】

免疫原性は、生物において免疫応答を誘発することができる特性である。免疫原性は部分的に、問題の物質の大きさに依存し、部分的にそれが宿主分子にどれほど似ていないかに依存する。タンパク質またはそのキメラ分子は、その新規生理化学的特徴のために、変更された免疫原性を有する可能性がある。例えば、タンパク質またはそのキメラ分子のグリコシル化構造は、抗体によって認識されるエピトープを隠すまたは曖昧にする可能性があり、従って、タンパク質またはそのキメラ分子に対する抗体の結合を防止または低減させる可能性がある。または、いくつかの抗体は、タンパク質の非グリコシル化型では存在しない糖ペプチドエピトープを認識する可能性がある。

【０２４２】

患者の試料が特有の生理化学的形状を有するタンパク質またはそのキメラ分子を認識する能力は、本明細書において記述されるように様々なイムノアッセイによって決定することができる。適切に設計されたイムノアッセイは、抗体反応の適当な検出、定量、および特徴付けに対する検討を必然的に伴う。イムノアッセイの設計および最適化に関する多数の推奨は、参照により本発明に組み入れられる、Mire- Sluis et al. J Immunol Methods 289(1-2):1-16, 2004において概説される。

【０２４３】

治療的インプラントに対するタンパク質またはそのキメラ分子の使用は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２４４】

本発明は、幹細胞を操作するためにタンパク質またはそのキメラ分子を用いることに拡大される。幹細胞の主な治療的使用は、組織、軟骨、または骨の再生である。一つの態様において、細胞は生体適合性の３次元マトリクスにおいて体に導入される可能性がある。インプラントは、生体分解性ポリマー、プロテオグリカン等のような細胞の混合物、足場、増殖因子および付属成分からなると考えられる。その構築の際に、これらのマトリクスにタンパク質またはそのキメラ分子を組み入れることは、細胞の挙動を調節すると提唱される。そのようなインプラントは、骨の形成、前駆細胞からのニューロンの成長、軟骨置換のための軟骨細胞の移植、および他の適用のために用いてもよい。ヒト細胞由来タンパク質は、幹細胞培養条件からの異種タンパク質の量および／または多様性を低減させて、それによって非ヒト病原体による感染症のリスクを低減させる可能性がある。

【０２４５】

本発明のタンパク質、またはキメラ分子は、インプラントの形成のために用いられるマトリクスと異なるように相互作用すると共に、インプラント内に組み入れられた細胞を調節する可能性がある。本発明のタンパク質またはキメラ分子とインプラント成分との組み合わせによって、より高い増殖、増強された分化、所望の分化状態の維持、より大きい分化系列特異性、マトリクス成分の増強された分泌、より良好な三次元構造の形成、増強されたシグナル伝達、より良好な構造性能、低減された毒性、低減された副作用、低減された炎症、低減された免疫細胞浸潤物、低減された拒絶、インプラントのより長い持続、インプラントのより長期の機能、インプラント周囲のより良好な細胞刺激、より良好な組織再生、より良好な臓器機能、またはより良好な組織リモデリングのような、以下の薬理学的特質の一つまたは複数が得られるであろうと予想される。

【０２４６】

示差遺伝子発現に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２４７】

遺伝子発現における差は、タンパク質またはそのキメラ分子に曝露された細胞において分析することができる。

【０２４８】
マイクロアレイ技術は、生物のゲノムにおけるほぼ全ての遺伝子のmRNA発現の同時決定を可能にする。この方法は、異なる遺伝子の配列に対応するオリゴヌクレオチドが固相支持体に付着している遺伝子「チップ」を利用する。対象細胞または組織から単離されたmRNAに由来する標識cDNAを、付着した相補的配列とcDNAとをハイブリダイズさせるためにチップと共にインキュベートする。対照も同様に用いられ、ハイブリダイゼーションおよび洗浄後に双方からのシグナルを比較する。専用のソフトウェアを用いてどの遺伝子がアップもしくはダウンレギュレートされたか、またはどの遺伝子の発現が変化していないかを決定する。何千個もの遺伝子をそれぞれのチップにおいて分析することができる。例えば、Affymetrixの技術を用いて、二つのGeneChip（登録商標）アレイからなるヒトゲノムU133（HG-U133）セットは、十分に実証されたヒト遺伝子約33,000個に由来する39,000個より多い転写物を表すほぼ45,000個のプローブセットを含む。GeneChip（登録商標）マウスゲノム430 2.0は、一つのアレイ上に39,000個より多い転写物を含む。
【０２４９】
このタイプの分析は、全体的なmRNA発現パターンの変化を明らかにし、従って特定の刺激によって制御されることが分かっていない遺伝子発現の差が解明される可能性がある。従ってこの技術は、本発明のタンパク質またはキメラ分子に関連した誘導遺伝子発現を分析するために適している。
【０２５０】
特定の刺激によって調節される公知および新規遺伝子の定義は、本発明の特定のタンパク質またはキメラ分子の生物活性において重要である生化学経路の同定に役立つと考えられる。この情報は、新規治療標的の同定において有用となると思われる。
【０２５１】
系はまた、市販の産物と比較して、本発明のタンパク質またはキメラ分子によって誘導された遺伝子発現の差を調べるためにも用いることができると考えられる。
【０２５２】
結合能に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。
【０２５３】
本発明のタンパク質またはキメラ分子の、細胞外マトリクス、人工材料、ヘパリン硫酸、担体、または共因子を含む様々な物質に対する結合能を調べることができる。
【０２５４】
特定のタンパク質の細胞外マトリクスに対する結合能に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下のアッセイを用いて決定することができる。
【０２５５】
表面を、適当な緩衝液におけるコラーゲン、ビトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニンが含まれるがこれらに限定されるわけではない細胞外マトリクスタンパク質によってコーティングする。非結合部位は、当技術分野で公知の方法、例えばBSA溶液とのインキュベーションによってブロックすることができる。表面を例えばPBS溶液によって洗浄した後、試験されるタンパク質、例えば本発明のタンパク質またはキメラ分子を含む溶液を表面に加える。コーティングの後、表面を洗浄して、タンパク質またはそのキメラ分子を認識する抗体と共にインキュベートする。次に、結合した抗体を、例えば一次抗体を認識する酵素結合二次抗体によって検出する。結合抗体を、適当な基質と共にインキュベートすること、および色の変化の反応を観察することによって可視化する。グリコシル化タンパク質は、非グリコシル化タンパク質より細胞外マトリクスタンパク質に強く接着する可能性がある。
【０２５６】
または、本発明のタンパク質もしくはキメラ分子、または非ヒト細胞によって発現された相対物タンパク質もしくはそのキメラ分子の同等量（ELISA濃度またはバイオアッセイ活性単位によって明記される）を、マトリクスコーティングウェルと共にインキュベート

した後、ウェルを洗浄後、結合量をELISAによって決定する。決定量は、コーティングされた表面と共に試料をインキュベートした後のELISA反応性の低下によって間接的に測定することができる。

【０２５７】

人工材料に対するタンパク質またはそのキメラ分子の結合能は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２５８】

人工材料に対するタンパク質またはそのキメラ分子の結合能を決定するために、適当な緩衝液における金属、足場が含まれるがこれらに限定されるわけではない人工材料によって、表面をコーティングする。表面を例えばPBS溶液によって洗浄した後、試験されるタンパク質、例えば本発明のタンパク質またはキメラ分子を含む溶液を表面に加える。コーティングの後、表面を洗浄して、タンパク質またはそのキメラ分子を認識する抗体と共にインキュベートする。次に結合した抗体を、例えば、一次抗体を認識する酵素結合二次抗体によって検出する。結合抗体は、適当な基質と共にインキュベートして、色の変化の反応を観察することによって可視化される。

【０２５９】

または、本発明のタンパク質またはキメラ分子、および非ヒト細胞によって発現された相対物タンパク質またはそのキメラ分子の同等量（ELISA濃度またはバイオアッセイ活性単位によって明記される）を、人工材料によってコーティングされたウェルと共にインキュベートした後、ウェルを洗浄して、結合量をELISAによって決定する。結合量は、コーティングされた表面と共に試料をインキュベートした後のELISA反応性の低下によって間接的に測定することができる。

【０２６０】

人工表面に対する結合能は、例えばステントのコーティングにおいて生物学的結末を有する可能性がある。または、本発明のタンパク質またはキメラ運指によってコーティングした足場を用いてその上に細胞を播種する。次に、細胞増殖および分化をモニターして、非コーティングまたは異なるようにコーティングされた足場と比較する。

【０２６１】

タンパク質またはそのキメラ分子の硫酸ヘパリンに対する結合能は、以下の系の一つまたは複数によってアッセイすることができる。

【０２６２】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、その生理化学的型のために硫酸ヘパリンに異なるように相互作用すると予想される。これらの差は、細胞増殖、分化、遊走等の実験モデルにおいて明らかであると予想される。タンパク質またはそのキメラ分子と硫酸ヘパリンとの組み合わせは、所定の処置に関して特有の薬理学的特質を有すると予想される。これは、血清半減期の増加、生物学的利用率、低減された免疫関連クリアランス、より大きい効力、低減された用量、より少ない副作用、および関連長所であってもよい。

【０２６３】

タンパク質またはそのキメラ分子の担体または共因子に対する結合能は、以下の系の一つまたは複数によってアッセイすることができる。

【０２６４】

タンパク質またはそのキメラ分子はそれらが血漿中に存在する場合、他の分子に結合すると思われる。これらの分子は「担体」または「共因子」と呼ばれ、生物学的半減期または血清半減期のような要因に影響を及ぼすと考えられる。

【０２６５】

血漿中のタンパク質の精製型をインキュベートする段階および得られた溶液をサイズ排除クロマトグラフィーによって分析する段階は、本発明のタンパク質またはキメラ分子とその結合パートナーとの相互作用を決定することができる。タンパク質またはそのキメラ分子が共因子に結合する場合、得られた複合体はより大きい分子量を有し、それによって溶出時間が変化すると考えられる。複合体を、生物活性、インビトロまたはインビボ半減

期および生物学的利用率に関して比較することができる。

【０２６６】

バイオアッセイに及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２６７】

細胞増殖、細胞分化、細胞アポトーシス、細胞の大きさ、サイトカイン／サイトカイン受容体接着、細胞接着、細胞の伸展、細胞運動性、遊走および浸潤、走化性、リガンド-受容体結合、受容体活性化、シグナル伝達、およびサブグループ比の変化に関するアッセイを含む、様々なバイオアッセイを、本発明のタンパク質またはキメラ分子の活性を試験するために行うことができる。

【０２６８】

細胞増殖に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２６９】

細胞、特定の態様において指数増殖細胞は、増殖培地において本発明のタンパク質またはキメラ分子の存在下でインキュベートされる。これはフラスコまたは96ウェルプレートにおいて行うことができる。細胞を一定期間成長させた後、細胞数を、直接法（例えば細胞計数）または間接法（MTT、MTS、トリチウム化チミジン）のいずれかによって決定する。増殖の増加または減少は、培地のみの対照アッセイと比較することによって決定される。タンパク質またはそのキメラ分子の異なる濃度を、用量反応プロフィールを得るために、平行なシリーズの実験において用いることができる。これは、ED50およびED100（半最大および最大反応を有効に生成するために必要な用量）を決定するために用いることができる。

【０２７０】

細胞分化または細胞の未分化状態での維持に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２７１】

細胞を、本発明のタンパク質またはキメラ分子の存在下で増殖培地においてインキュベートする。適した期間の後、細胞を分化の指標に関してアッセイする。これは細胞表面上の特定のマーカー、細胞質マーカーの発現、細胞の寸法の変更、形状または細胞質特徴であってもよい。マーカーには、タンパク質、糖構造（例えば、硫酸ヘパリン、コンドロイチン硫酸等のようなグリコサミノグリカン）、脂質（グリコスフィンゴリピッド、または脂質二重層成分）が含まれてもよい。これらの変化は、顕微鏡、ウェスタンブロット、FACS染色または前方／側方散乱プロフィールを含む多くの技術によってアッセイすることができる。

【０２７２】

細胞のアポトーシスに及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２７３】

アポトーシスは、プログラムされた細胞死であると定義され、壊死のような細胞死の他の方法とは異なる。これは、それによってカスパーゼとして知られるプロテアーゼのサブセットの活性化が起こるシグナル伝達経路（例えば、Fas、TNFR）の活性化のような、細胞における定義された変化を特徴とする。イニシエータカスパーゼの活性化によって、多様な細胞タンパク質を切断する実行カスパーゼの活性化が起こり、それによって核の断片化、核層の切断、細胞質の水疱形成および細胞の破壊が起こる。アポトーシスは、FasL、TNFaおよびリンフォトキシンのようなタンパク質リガンドによって、またはUV光およびDNA損傷を引き起こす物質のようなシグナルによって誘発されうる。

【０２７４】

細胞は、タンパク質またはそのキメラ分子、および／またはアッセイにとって適した他の物質の存在下で増殖培地においてインキュベートされる。例えば、転写（アクチノマイ

シンD）または翻訳（シクロヘキシミド）を阻害することができる物質の存在が必要である可能性がある。適当な期間インキュベートした後、細胞数を適した方法によって決定する。細胞数が減少すればアポトーシスを示す可能性がある。アポトーシスの他の指標は、細胞の染色、例えばアネキシン染色、またはDNAの特徴的なラダー形成パターンを観察することによって得てもよい。アポトーシスを確認するためのさらなる証拠は、細胞透過性カスパーゼ阻害剤（例えば、z-VAD FMK）と共にインキュベートすることによってアポトーシスマーカーの発現を防止した後に、アポトーシスマーカーに関してアッセイすることによって得られる可能性がある。

【０２７５】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、Bcl2またはAkt経路のような細胞生存経路を通して生存シグナルを提供することによって、アポトーシスを防止する可能性がある。これらの経路の活性化は、細胞内Bcl2発現の増加に関して、またはAktに対するホスホ特異的抗体を用いてAktの活性化（リン酸化）型の増加に関して、ウェスタンブロッティングによって確認することができる。

【０２７６】

このアッセイに関して、細胞を生存因子（例えば、IL-3および特定の免疫細胞）の存在下または非存在下でインキュベートする。生存因子の非存在下でインキュベートした細胞の比率は、長期間の培養によりアポトーシスによって死滅するが、十分量の生存因子においてインキュベートした細胞は生存または増殖すると思われる。これらの効果の原因となる細胞経路の活性化は、ウェスタンブロッティング、免疫細胞化学およびFACS分析によって決定することができる。

【０２７７】

アポトーシスの阻害に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２７８】

本発明のタンパク質またはキメラ分子を、ラット、マウス、およびヒト皮質神経細胞を低酸素状態およびグルコース枯渇による細胞死から保護するために、インビトロ活性に関して試験する。このため、神経細胞培養物をラット胚から調製する。本発明のタンパク質またはキメラ分子の効果を評価するために、細胞を水で覆ったインキュベーターにおけるモジュラーインキュベーターチャンバーにおいて、30 mMグルコースを有する無血清培地において湿潤95％空気／5％CO_2（正常酸素）において、またはグルコースを含まない無血清培地において湿潤95％N_2／5％CO_2（低酸素状態およびグルコース枯渇）において、本発明のタンパク質またはキメラ分子の非存在下または存在下で37℃で48時間まで維持する。細胞培養物を低酸素状態およびグルコース枯渇に24時間未満曝露した後、残りの24時間正常酸素状態に戻す。細胞生存率を代謝活性の関数として報告するAlamar blueの蛍光によって、細胞障害性を分析する。

【０２７９】

もう一つの方法において、神経細胞培養物を1 mM L-グルタメートまたはa-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチルイソキサゾール-4-プロピオン酸（AMPA）に、様々な濃度の本発明のタンパク質またはキメラ分子の非存在下または存在下で正常酸素状態で24時間曝露する。細胞生存率を代謝活性の関数として報告するAlamar blueの蛍光によって、細胞障害性を分析する。

【０２８０】

タンパク質またはそのキメラ分子は、多様な細胞の増殖、アポトーシス、発達、または分化に影響を及ぼす可能性がある。これらの変化は、他の測定可能なパラメータの中でも、細胞の大きさの変化、および細胞内オルガネラ発達による細胞質の複雑さの変化によって反映されうる。例えば、浮遊培養によって分化誘導されたケラチノサイトは、β1インテグリンのような表面マーカーのダウンレギュレーション、細胞の大きさおよび細胞複雑度の増加を示す。タンパク質またはそのキメラ分子が細胞の大きさまたは細胞質複雑度に及ぼす効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２８１】
FACSは、レーザー光線がそれに入射した場合の細胞によって散乱された光の量を測定する。波長488 nmの光を提供するアルゴンレーザーがしばしば用いられる。細胞の大きさが大きくなれば、前方方向における光線の破壊がより大きくなり、従って前方散乱レベルは細胞の大きさに対応する。細胞の大きさの変化を測定するために、本発明のタンパク質またはキメラ分子によって処置された細胞を鞘液において希釈して、フローサイトメーター（FACSVantage SE, Becton Dickinson）に注入する。無処置細胞を対照とする。細胞は光線の中を通過して、光の前方散乱量は細胞の大きさに対応する。
【０２８２】
細胞内オルガネラ成長および発達（細胞質複雑度）の変化も同様に、FACSによって測定することができる。細胞の細胞内オルガネラは光を側方に散乱する。従って、細胞質複雑度の変化は、上記の方法によって細胞による光の側方散乱量によって測定することができ、細胞内オルガネラの複雑さのレベルおよび細胞の顆粒性レベルは、細胞によって与えられた光の側方散乱レベルを測定することによって推定することができる。
【０２８３】
細胞の大きさまたは細胞質複雑度に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、処置細胞20,000個によって与えられたプロフィールを同一数の無処置細胞によって放射されたシグナルと比較するために、FACSを用いることによって評価することができる。細胞の異なる処置集団からのシグナルを比較することによって、細胞の大きさおよび細胞質複雑度における相対的変化を決定することができる。
【０２８４】
タンパク質またはそのキメラ分子の、細胞成長、アポトーシス、発達、または分化に及ぼす効果を、以下の系の一つまたは複数を用いて評価することができる。
【０２８５】
タンパク質誘導アポトーシスおよび細胞成長またはサイクルにおける変化は、488 nmの範囲の励起波長および620 nmでの放射波長を有するヨウ化プロピジウムのような色素によって処置細胞のDNAを標識することによって評価することができる。アポトーシスを受ける細胞は、濃縮されたDNAを有すると共に異なる大きさおよび顆粒性を有する。これらの要因は、特異的前方およびサイズ散乱プロフィールと共に蛍光シグナルを与え、従ってアポトーシスを受ける細胞集団を正常な細胞と区別することができる。細胞におけるDNAの量はまた、細胞が入る細胞周期の状態を反映する。例えば、G_2期における細胞は、G_0期の細胞の2倍量のDNAを有すると思われる。これはG_2期における細胞によって与えられる蛍光シグナルが倍加することによって反映されると考えられる。タンパク質またはそのキメラ分子の効果は、例えば処置細胞20,000個によって与えられた蛍光シグナルを、同数の無処置細胞によって放射されたシグナルと比較するために、FACSを用いて評価することができる。
【０２８６】
本発明のタンパク質またはそのキメラ分子はまた、様々なタンパク質の発現を変更させる可能性がある。細胞によるタンパク質発現に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。
【０２８７】
細胞全体におけるタンパク質発現の増加および減少を評価するために、細胞を固定して透過性にした後、対象タンパク質のエピトープを標的とする蛍光結合抗体と共にインキュベートする。アルゴンレーザーシステムによって、非常に多様な蛍光標識を用いることができる。FITC、Alexa Fluor 488、シアニン2、シアニン3のような蛍光分子が、この実験のために一般的に用いられる。この方法はまた、細胞表面上に露出されたエピトープのみを抗体によって標識することができる非透過性細胞を標識することによって、表面マーカーおよびタンパク質の発現の変化を推定するために用いることができる。タンパク質またはそのキメラ分子の効果は、例えば処置細胞20,000個によって与えられた蛍光シグナルを、同数の無処置細胞によって放射されたシグナルと比較するために、FACSを用いて評価す

ることができる。

【０２８８】

リガンド／受容体接着に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２８９】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、既に公知の生理化学型と比較して基質に対してより接着性であってもなくてもよい。相互作用は、糖構造の場合タンパク質受容体との相互作用であってもよく（例えば、L-セレクチンおよびP-セレクチンのようなセレクチン）、フィブロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン、およびラミニンのような細胞外マトリクス成分との、または糖分子のような非タンパク質成分（ヘパリン硫酸、他のグリコサミノグリカン）との相互作用であってもよい。

【０２９０】

タンパク質またはそのキメラ分子はまた、組織培養プラスチック、医療機器成分（例えば、ステントまたは他のインプラント）、または歯科材料のような非生物起源材料と異なるように相互作用する可能性がある。医療機器の場合、これは、定着率、すなわち特定のクラスの細胞タイプまたは体内で形成された連結のタイプとインプラントとの相互作用を変更させる可能性がある。

【０２９１】

タンパク質接着に関して任意の適したアッセイを用いることができる。例えば、本発明のタンパク質またはキメラ分子を含む溶液を、特定の態様において固定表面上の結合パートナーと共にインキュベートする。インキュベーション後、溶液中に存在するタンパク質またはキメラ分子の量をELISAによってアッセイして、残っている材料と開始材料の量の差が、結合パートナーに結合した量である。例えば、タンパク質またはキメラ分子と細胞外マトリクスタンパク質との相互作用は、第一に、96ウェルプレートのウェルをECMタンパク質（例えば、フィブロネクチン）によってコーティングすることによって決定することができると思われる。次に、BSA溶液と共にインキュベートすることによって非特異的結合をブロックする。洗浄後、公知の濃度のタンパク質またはそのキメラ分子溶液を一定期間加える。次に、溶液を除去して、溶液中に残っているタンパク質またはそのキメラ分子の量に関してアッセイする。ECMタンパク質に結合した量は、ウェルをタンパク質またはそのキメラ分子に対する抗体と共にインキュベートする段階の後に、適当な系（標識二次抗体によって、またはELISAに関して用いられるようなビオチン-アビジン酵素複合体によって）によって検出する段階によって決定することができる。

【０２９２】

他の表面に結合した量を決定するための方法は、不活性なインプラント表面からタンパク質またはそのキメラ分子を加水分解する段階の後に、溶液中に存在するアミノ酸を測定する段階を必然的に伴う。

【０２９３】

細胞接着に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２９４】

マトリクス（例えば、フィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲン、ラミニン等のような細胞外マトリクス成分）に対する細胞接着は少なくとも部分的にインテグリン分子によって媒介される。インテグリン分子はαおよびβサブユニットからなり、αおよびβサブユニットの特定の組み合わせが特定のリガンドに対する結合特異性を生じる（例えば、a2b1インテグリンはコラーゲンに結合し、a5b1はフィブロネクチンに結合する等）。インテグリンサブユニットは、リガンド結合の原因である大きい細胞外ドメイン、および細胞骨格との相互作用の原因であるより短い細胞質ドメインを有する。リガンドの存在下では、細胞質ドメインは、シグナル伝達事象の誘導の原因である（「シグナル伝達の外側から内側」）。そのリガンドに対するインテグリンの親和性は、細胞外シグナル伝達事象によって調節され、次にこれがインテグリンの細胞質のテールを変化させる（「シグナル伝

達の内側から外側」）。

【０２９５】

本発明のタンパク質またはキメラ分子とのインキュベーションによって、おそらく多くの方法で細胞接着を変更させることができる。第一に、これは、特定のインテグリンサブユニットの発現を定性的に変更させることができ、それによって結合能の変化が起こる。第二に、発現される特定のインテグリンの量が変更して、その標的マトリクスに対する細胞結合を変更させる可能性がある。第三に、特定のインテグリンの親和性は、その表面発現を変化させることなく変更される可能性がある（内側から外側へのシグナル伝達）。これらの変化は全て、一連のリガンドに対する細胞の結合を変更させる、または特定のリガンドに対する結合を変更させる可能性がある。

【０２９６】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、一般的に96ウェルプレートにおいて行われるCell-ECM接着アッセイにおいて試験することができる。ウェルをマトリクスによってコーティングした後、ウェル内の未結合部位をBSAによってブロックする。既定数の細胞をコーティングウェルと共にインキュベートした後未結合の細胞を洗浄して除去し、結合した細胞をタンパク質またはそのキメラ分子の存在下または非存在下でインキュベートする。細胞数は、MTT/MTSのような間接法によって決定する。または、細胞を放射活性標識（例えば、^{51}Cr）および公知の量の放射活性（すなわち、細胞）を各ウェルに加える。結合した放射活性の量を決定して、負荷した量の百分率として計算する。

【０２９７】

細胞はまた、他の細胞にも接着し、例えば一つの細胞集団はもう一つのタイプの細胞の単層に接着する。これに関してアッセイするために、単層細胞に加えた浮遊細胞を放射活性によって標識する。次に、細胞をタンパク質またはそのキメラ分子の存在下または非存在下でインキュベートする。非結合細胞を洗浄して、残っている混合細胞集団を溶解して、存在する放射活性量に関してアッセイすることができる。

【０２９８】

細胞の伸展に対するタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０２９９】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、細胞の伸展に対して変更された効果を有する可能性がある。細胞の伸展の開始は、細胞運動性および浸潤挙動の重要な段階である。細胞の伸展は多数の方法でインビトロで開始させることができる。細胞浮遊液をECM成分に播種すると、接着およびインテグリン受容体によるリガンドの結合が起こる。これはシグナル伝達事象を開始させて、それによってCdc42、RacおよびRho低分子GTPアーゼファミリーの活性化が起こる。これらのタンパク質の活性化によって、アクチンの重合化および膜状仮足の伸長が起こり、それによって細胞は次第に平坦化して、より多くのインテグリンがその受容体と接触する。最終的に、細胞は完全に平坦化して、巣状接着物を形成する（インテグリンおよびシグナル伝達タンパク質を含む大きい構造）。細胞の伸展はまた、接着細胞の増殖因子による刺激によっても開始させることができ、この場合もCdc42/Rac/Rhoタンパク質の活性化および膜状仮足形成が起こる。

【０３００】

細胞の伸展は、タンパク質またはそのキメラ分子による刺激後の異なる時点で多数の細胞を調べることによって定量することができる。画像分析プログラムを用いて各細胞の面積を決定して、細胞伸展の百分率と共に細胞伸展の程度を経時的に比較することができる。より急速な伸展は、Cdc42/Rac/Rho経路のより高い活性化によって開始される可能性があり、またはそれらの活性化の時間的、定性的、および定量的な差は本発明のタンパク質またはキメラ分子によって観察される可能性がある。これは次に、本発明のタンパク質またはキメラ分子によって誘導されるシグナル伝達事象の差を反映する可能性がある。

【０３０１】

細胞運動性、遊走、および浸潤に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以

下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０３０２】

組織培養皿に接着する細胞は、一つの点に接着して静止していることはなく、むしろその細胞体の部分を絶えず伸長および収縮している。低速度撮影写真において観察すると、細胞は、単離された単細胞としてまたは細胞コロニーとして皿の周囲を移動することが観察されうる。この運動は「ランダム歩行」（すなわち特定の方向に向かわない）または方向性歩行のいずれであってもよい。いずれのタイプの運動も増殖因子を加えることによって増加することができる。低速度撮影写真を用いて、所定の期間における、細胞によって覆われる全体的な距離および全体的な方向性を定量することができる。

【０３０３】

方向性移動の場合、細胞は化学勾配を感知してその移動機構をその方向に向けることによって、化学誘引物質源に向かって移動すると考えられる。多くの場合において、化学誘引物質は増殖因子である。方向性移動は化学誘引物質源を提供する段階（例えば細いピペットによって）の後に、それに向かって移動する細胞を低速度写真撮影する段階によって定量することができる。

【０３０４】

方向性移動を決定するためのもう一つの系は、ボイデンチャンバーアッセイである。このアッセイにおいて、分配膜における小さい穴によって下部チャンバーに接続された上部チャンバーに、細胞を入れる。増殖培地を双方のチャンバーに入れて、化学誘引物質は下部チャンバーのみに加えると、二つのチャンバー間で拡散勾配を生じる。細胞は増殖因子源に誘引されて、分離膜の中の穴を通って、膜の下面まで移動する。十分な時間後、膜を取り出して、膜の下面に移動した細胞数を決定する。

【０３０５】

細胞浸潤プロセスは、遊走と同じ成分の多くを利用する。細胞浸潤は、細胞が浸潤する細胞外マトリクスの層を用いてモデルを作製することができる。例えば、Matrigelは、4℃では液体であるが、37℃では急速に固化してゲルを形成する基底膜成分（ECM成分、増殖因子等）の混合物である。これを用いてボイデンチャンバーの上表面をコーティングして、化学誘引物質を下層に加えることができる。細胞が膜の下面まで通過するためには、それらはコラゲナーゼおよびマトリクスメタロプロテナーゼ（MMP）のような酵素を用いてマトリゲルを分解すると共に、化学誘引物質に向かって方向性に移動しなければならない。このアッセイは細胞浸潤にとって必要な様々なプロセスを模倣する。

【０３０６】

タンパク質またはそのキメラ分子の走化性に及ぼす効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０３０７】

化学誘引物質に対する細胞の遊走は、インビトロでボイデンチャンバーにおいて測定することができる。本発明のタンパク質またはキメラ分子を下部チャンバーに入れて、適当な標的細胞集団を上部チャンバーに入れる。血液から炎症部位まで移動する免疫細胞のインビトロプロセスを模倣するために、細胞の層を通しての遊走を測定してもよい。ボイデンチャンバーのウェルの上表面を、細胞、例えば上皮細胞、内皮細胞、または線維芽細胞のコンフルエントシートによってコーティングすると、ウェルの穴を通しての免疫細胞の直接遊走を防止すると思われる。その代わりに、細胞は単層に接着して、試験されるタンパク質に向かって遊走する必要があると思われる。ボイデンチャンバーの下表面に細胞が存在すれば、またはタンパク質もしくはそのキメラ分子によって処置したウェルに限り下のウェルの培地中に細胞が存在すれば、タンパク質またはキメラ分子の走化性能を示している。この効果がタンパク質またはそのキメラ分子に対して特異的であることを示すために、中和抗体を下部チャンバーにおいてタンパク質と共にインキュベートすることができる。

【０３０８】

または、基質（化学物質、タンパク質、糖）の走化性防止能を試験するために、物質を

、公知の走化性能（これは特異的ケモカイン、細胞起源からの条件培地、または一連のケモカインを分泌する細胞）を含む溶液と共にボイデンチャンバーの下部チャンバーに含める。感受性のある標的細胞集団を上部チャンバーに加えて、上記のようにアッセイを行う。

【０３０９】

リガンド受容体結合に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０３１０】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、異なるリガンド-受容体結合能を有する可能性がある。リガンド-受容体結合は様々なパラメータ、例えば解離定数（Kd）、解離速度定数（off rate）（k^-）、結合速度定数（on rate）（k^+）によって測定されうる。リガンド受容体結合における差は、様々なタイミングおよびシグナル伝達の活性化と相関して、異なる生物学的転帰に至る可能性がある。

【０３１１】

リガンド受容体結合は、スキャッチャードプロットまたはBiacoreのような他の手段によって測定および分析することができる。

【０３１２】

スキャッチャード分析の場合、例えば放射活性標識（例えば、^{125}I）によって標識されたタンパク質またはそのキメラ分子を、タンパク質またはそのキメラ分子のコールドの競合分子の異なる量の存在下で、対応するリガンドまたは受容体を発現する細胞またはその抽出物と共にインキュベートする。特異的に結合した標識タンパク質またはそのキメラ分子の量を決定して、結合パラメータを計算する。

【０３１３】

Biacoreの場合、タンパク質またはそのキメラ分子の対応する組換え型リガンドまたは受容体を、検出ユニットに共役させる。タンパク質またはそのキメラ分子を含む溶液を検出セルの上に通過させて、検出ユニットの特性における変化によって結合を決定する。結合速度定数は、固定された読みが記録されるまで（利用可能な部位が全て占有される）、タンパク質またはキメラ分子を含む溶液を検出セルユニットの上に通過させることによって決定することができる。タンパク質またはキメラ分子を含まない溶液を細胞の上に通過させて、対応するリガンドまたは受容体からタンパク質を解離させて、解離速度定数を得る。

【０３１４】

受容体活性化に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０３１５】

タンパク質またはそのキメラ分子とその対応するリガンドまたは受容体との相互作用は、細胞の内因性のタンパク質から誘導されたシグナル伝達事象の差に匹敵する可能性がある。相互作用の時期は、明確に結合／解離速度定数または解離定数としてタンパク質またはそのキメラ分子に特徴的となる可能性がある。

【０３１６】

活性化受容体はしばしば、細胞によってインターナライズされる。次に、受容体／リガンド受容体複合体を解離させて（例えば、細胞小胞内のpHを低下させて、リガンドを脱離させることによって）、受容体を細胞表面に再循環させることができる。または、複合体を破壊の標的としてもよい。この場合、受容体は、有効にダウンレギュレートされて、より多くのシグナルを生成することができないが、それらが再循環されると、それらはシグナル伝達プロセスを繰り返すことができる。示差的な受容体結合または活性化によって、受容体の破壊から再循環経路への切り替えが起こる可能性があり、それによってより強い生物反応が起こる可能性がある。

【０３１７】

シグナル伝達に及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまた

は複数を用いてアッセイすることができる。

【０３１８】

タンパク質またはそのキメラ分子に対するリガンドまたは受容体の結合は、シグナル伝達を開始する可能性があり、これには、様々な細胞質タンパク質を通しての逆シグナル伝達が含まれてもよい。逆シグナル伝達は、リガンドの膜結合型が、その受容体の可溶性型または膜結合型による結合後にシグナルを伝達する場合に起こる。逆シグナル伝達はまた、抗体による膜結合リガンドの結合後にも起こり得る。これらのシグナル伝達事象（逆シグナル伝達事象を含む）によって遺伝子またはタンパク質発現の変化が起こる。従って、本発明のタンパク質またはキメラ分子は、JAK/STAT経路、Ras-erk経路、AKT経路の活性化、PKC、PKA、Src、Fas、TNFR、NFkB、p38MAPK、c-Fosの活性化、タンパク質の受容体への動員、受容体リン酸化、受容体インターナリゼーション、受容体クロストークまたは分泌のような、様々な経路または他のシグナル伝達事象において異なるシグナル伝達を誘導または阻害することができる。

【０３１９】

タンパク質またはそのキメラ分子に動員されたリガンドまたは受容体は、誘導されるリガンドまたは受容体のコンフォメーションが異なることにより、本発明のタンパク質またはキメラ分子に対して独自である可能性がある。これらの差をアッセイする一つの方法は、セファロースビーズにクロスリンクした抗体を用いてリガンドまたは受容体を免疫沈殿させることである。免疫沈殿および洗浄後、タンパク質を2Dゲルにローディングして、同等のスポットパターンを分析する。異なるスポットを切り出して、質量分析計によって同定することができる。

【０３２０】

表面マーカーのアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションに及ぼすタンパク質またはそのキメラ分子の効果は、以下の系の一つまたは複数を用いてアッセイすることができる。

【０３２１】

細胞は、本発明のタンパク質またはキメラ分子に対して多様な反応を有する可能性がある。細胞と細胞外環境との連絡の原因である細胞表面上に一連のタンパク質が存在する。エンドサイトーシスおよびエキソサイトーシスのプロセスの調節を通して、様々なタンパク質が細胞表面におよび細胞表面から輸送される。細胞表面上で見出される典型的なタンパク質には、受容体、結合タンパク質、調節タンパク質、およびシグナル伝達分子が含まれる。タンパク質の発現および分解速度の変化はまた、細胞表面上のタンパク質レベルを変化させる。いくつかのタンパク質はまた、特異的シグナルがこの貯蔵および細胞膜の間のタンパク質の交通を誘導することができる細胞内リザーバーに貯蔵される。

【０３２２】

細胞を、本発明のタンパク質またはキメラ分子を含む培地において適当な時間インキュベートして、その反応を本発明のタンパク質またはキメラ分子を含まない同じ培地に曝露した細胞と比較することができる。細胞膜上のタンパク質を溶解して、遠心によって細胞から分離する。特異的タンパク質の発現レベルはウェスタンブロッティングによって測定することができる。細胞はまた、蛍光共役抗体によって標識して、共焦点顕微鏡システムによって可視化するか、または蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）によって計数することができる。これは、細胞におけるタンパク質の発現および分布におけるいかなる変化も検出すると考えられる。多数の抗体を用いることによって、タンパク質相互作用の変化も同様に共焦点顕微鏡および免疫沈殿によって調べることができる。同様に、これらの実験はインビボ動物モデルに拡大することができる。本発明のタンパク質またはキメラ分子によって処置した動物の特異的部分からの細胞を抽出して、同一の方法論によって調べてもよい。

【０３２３】

本発明のタンパク質またはキメラ分子を加えることによって、インビトロまたはインビボで分化誘導した細胞は、それらを無処置細胞と区別する分化細胞を発現する。いくつか

の細胞、例えば前駆細胞または幹細胞は、その表面マーカーによって区別することができる多くの亜集団に分化することができる。本発明のタンパク質またはキメラ分子は、特定の比率で亜群に分化するように前駆細胞を刺激する可能性がある。

【０３２４】

本発明のタンパク質およびそのキメラ分子は細胞の反発に対して効果を有する可能性がある。

【０３２５】

タンパク質またはそのキメラ分子が、細胞およびニューロンの成長および誘導の調節に及ぼす効果は細胞反発に関する簡便なアッセイである。

【０３２６】

タンパク質のサブユニットと他の成分との相互作用の破壊によって、タンパク質またはそのキメラ分子の生物学的効果を阻害するための方法が得られる。そのような生物学的効果を阻害する化合物は多くの方法で同定される。

【０３２７】

ハイスループットスクリーニングプログラムは、臨床開発のためのリード化合物を生成するために、低分子化学実体（化学物質またはペプチド）を用いる。多くのアッセイを用いてライブラリー化合物を、生物学的に関連するエンドポイントに影響を及ぼすか否かに関してスクリーニングする。ライブラリーにおけるそれぞれの可能性がある化合物を、一つのウェルにおいて特定のアッセイによって処置して、化合物がアッセイに影響を及ぼすか否かを決定する。アッセイのいくつかの例を以下に提供する。

【０３２８】

このアッセイに関して、細胞をマイクロタイタープレート（96プレート、384プレート等）に播種する。細胞はタンパク質またはそのキメラ分子の活性化のための読み取りメカニズムを有すると考えられる。これは細胞成長に関するアッセイ、特定の経路の刺激に関するアッセイ（例えば、FRETに基づく技術）、レポーター遺伝子の誘導に関するアッセイ（例えば、CAT、β-ガラクトシダーゼ、蛍光タンパク質）、アポトーシスに関するアッセイおよび分化に関するアッセイを必然的に伴う可能性がある。次に、細胞を、特定の低分子の存在下または非存在下で本発明のタンパク質またはキメラ分子に曝露する。薬物はタンパク質またはそのキメラ分子を加える前、後、またはその間に加えることができる。適当な期間の後、個々のウェルを適当な方法（例えば、FRETに関する蛍光、蛍光タンパク質の誘導、MTTによる細胞数、β-ガラクトシダーゼ活性等）を用いて読み取る。いかなる薬物またはサイトカインも加えていない対照ウェルは比較として役立つ。受容体／サイトカイン複合体を阻害することができるいかなる分子も対照ウェルに異なる読み取りを生じると考えられる。阻害の特異性を示すためにはさらなる実験が必要であると考えられる。または、薬物は、非サイトカイン非受容体メカニズムによって、検出法（擬陽性）に影響を及ぼすことができると考えられる。

【０３２９】

本発明のタンパク質またはキメラ分子のリガンドまたは受容体を、固体表面に固定する。次に、タンパク質またはそのキメラ分子、および試験される化合物を加える。これはタンパク質またはそのキメラ分子の次に化合物を加えることによって；化合物を最初に、次にタンパク質もしくはそのキメラ分子を加えることによって行うことができ；または化合物とタンパク質もしくはそのキメラ分子を同時に加えることができる。結合したタンパク質またはそのキメラ分子を適当な検出抗体によって検出する。検出抗体は酵素（例えば、比色検出のためのアルカリホスファターゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼ）によって標識することができ、または蛍光検出のために蛍光タグによって標識することができる。または、タンパク質またはそのキメラ分子を標識し（例えば、ビオチン標識、放射標識）、適当な技術（例えば、ビオチン標識の場合ストレプトアビジンを比色検出系に連結させる、放射標識の場合、複合体を可溶化して計数する）によって検出することができる。タンパク質結合の阻害は対照ウェルと比較した読み取り値の低下によって測定される。

【０３３０】

タンパク質またはそのキメラ分子の可溶性リガンドまたは受容体をビーズに結合させる。この結合反応は、吸着プロセスとなり得る、またはそれらをプレートに化学的に連結させることを必然的に伴い得る。ビーズをタンパク質またはキメラ分子および候補化合物と共に適当なウェルにおいてインキュベートする。これは、タンパク質もしくはキメラ分子を最初に加えてから化合物を加えて；化合物を最初に加えた後タンパク質もしくはキメラ分子を加えて；または化合物とタンパク質もしくはキメラ分子を同時に加えて行うことができる。タンパク質またはそのキメラ分子を認識する蛍光標識検出抗体を次に加える。未結合の抗体を除去して、ビーズをFACSの中に通過させる。化合物がタンパク質またはそのキメラ分子とその受容体との相互作用を阻害すれば、検出される蛍光量は減少すると思われる。

【０３３１】

タンパク質と、一つの阻害化合物に対するその対応するリガンド／受容体との多数の相互作用のスクリーニングを可能にするために、FACS機器が散乱プロフィールを分析する能力を用いる。直径がより大きいビーズはより小さいビーズとは異なる散乱プロフィールを有し、これを分析に関して分離することができる（「ゲート設定」）。

【０３３２】

その一つが本発明のタンパク質またはキメラ分子である多くの異なるタンパク質をそれぞれ、特定の直径のビーズに連鎖させる。次に、一つの候補化合物の存在下で、前記のタンパク質に対するリガンド／受容体の混合物をビーズ混合物に加える。結合したリガンド／受容体を、蛍光標識されている特異的二次抗体を用いて検出する。抗体は全て、同じ検出蛍光体によって標識することができる。次に、FACS機器の中に試料を通過させて、各公知のビーズの大きさに関してゲートを設定することによって、タンパク質のそのリガンド／受容体に対する結合を化合物が防止する能力を決定する。個々の結合結果を個別に分析する。この分析法の主要な恩恵は、各化合物のスクリーニングを多数のタンパク質について同時に試験でき、それに比例してスクリーニングに要する時間が減少する点である。

【０３３３】

タンパク質またはそのキメラ分子はまた、その結晶構造を特徴としてもよい。タンパク質またはそのキメラ分子の生理化学的形状は独自の3D結晶構造を提供してもよい。さらに、タンパク質-リガンド／受容体複合体の結晶構造はまた、本発明のタンパク質またはキメラ分子を用いて作製してもよい。本発明は、ヒトの天然に存在する型と実質的に類似のタンパク質またはそのキメラ分子を提供することから、複合体は天然に存在するタンパク質-リガンド／受容体複合体のインビボ構造をより反映した代表である可能性がある。結晶構造が得られた後、タンパク質またはそのキメラ分子と、そのような相互作用を阻害する可能性がある化合物との相互作用を同定することができる。

【０３３４】

可能性がある化合物が、ハイスループットスクリーニングによってまたはタンパク質-リガンド／受容体複合体の結晶構造から同定されると、合理的ドラッグデザインのプロセスを開始することができる。

【０３３５】

所定の所望の特性を有する化合物からの模倣体のデザインにおいて一般的に行われるいくつかの段階が存在する。第一に、所望の特性を決定するためにきわめて肝要なおよび／または重要な化合物の特定の部分を決定する。ペプチドの場合、これは、ペプチドにおけるアミノ酸残基を系統的に変化させることによって、例えば各残基を順に置換することによって行うことができる。ペプチドのアラニンスキャンはそのようなペプチドモチーフを精錬するために一般的に用いられる。化合物の活性領域を構成するこれらの部分または残基は、「ファーマコフォア」として知られる。

【０３３６】

ファーマコフォアを見つけた後、その物理的特性、例えば立体化学、結合、大きさおよび／または電荷に従って、一連の起源からのデータ、例えば分光光度技術、x-線回折データ、およびNMRからのデータを用いて、その構造をモデルにする。コンピューター分析、

類似性マッピング（原子間結合よりむしろファーマコフォアの電荷および／または容積をモデルとする）および他の技術をこのモデリングプロセスにおいて用いることができる。

【０３３７】

このアプローチの変法において、リガンドおよびその結合パートナーの三次元構造をモデルとする。これは、リガンドおよび／または結合パートナーが結合時にコンフォメーションを変化させる場合に特に有用であり、モデルは模倣体の設計においてこれを考慮する。モデリングは、直線状配列または三次元立体配置と相互作用する阻害剤を生成するために用いることができる。

【０３３８】

次に、その上でファーマコフォアを模倣する化学基を移植することができる鋳型モデルを選択する。鋳型分子およびその上に移植した化学基は、模倣体を容易に合成できるように、模倣体が薬理学的に許容されるように、およびリード化合物の生物活性を保持しながらインビボで分解しないように、簡便に選択することができる。または、模倣体がペプチドに基づく場合、ペプチドを環状化すること、その硬度を増加させることによって、さらなる安定性を得ることができる。次に、このアプローチによって見出される模倣体または複数の模倣体を、それらが標的特性を有するか否かを調べるために、またはそれらが標的特性を示す程度を調べるためにスクリーニングすることができる。次に、さらなる最適化または改変を行って、インビボまたは臨床での試験のために一つまたは複数の最終的な模倣体に達することができる。

【０３３９】

合理的なドラッグデザインの目的は、例えばポリペプチドのより活性なまたはより安定な型である薬物を形成するために、またはインビボでポリペプチドの機能を例えば増強もしくは妨害する薬物を形成するために、対象の生物学的活性ポリペプチドの、またはそれらが相互作用する低分子（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤、または増強剤）の構造類似体を産生することである。例えば、Hodgson（Bio/Technology 9:19-21, 1991）を参照されたい。一つのアプローチにおいて、最初に対象タンパク質の三次元構造をX線結晶学によって、コンピューターモデリングによって、または最も典型的にアプローチの組み合わせによって決定する。ポリペプチドの構造に関する有用な情報はまた、相同なタンパク質の構造に基づくモデリングによって獲得してもよい。合理的ドラッグデザインの例は、HIVプロテアーゼ阻害剤の開発である（Erickson et al. Science 249:521-533, 1990）。さらに、標的分子をアラニンスキャン（Wells, Methods Enzymol 202:2699-2705, 1991）によって分析してもよい。この技術において、アミノ酸残基をアラニンに置換して、ペプチドの活性に及ぼすその効果を決定する。ペプチドのアミノ酸残基のそれぞれをこのようにして分析して、ペプチドの重要な領域を決定する。

【０３４０】

同様に、機能的アッセイによって選択された標的特異的抗体を単離すること、次にその結晶構造を解明することが可能である。原則的に、このアプローチはその後のドラッグデザインがそれに基づくことができるファーマコアを生じる。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗イディオタイプ抗体（抗ids）を作製することによって、タンパク質の結晶学を完全に迂回することが可能である。鏡像の鏡像として、抗idsの結合部位は、当初の受容体の類似体であると予想されるであろう。次に、抗idを用いて、ペプチドの化学的または生物学的に産生されたバンクからペプチドを同定および単離され得る。選択されたペプチドはファーマコアとして作用すると考えられる。

【０３４１】

一つの局面において、本発明のタンパク質またはキメラ分子は抗体を生成するための免疫原として用いられる。本発明のタンパク質またはキメラ分子の生理化学的型は、タンパク質もしくはキメラ分子；本発明のタンパク質もしくはキメラ分子に対して特異的な糖ペプチド；またはタンパク質もしくはそのキメラ分子内でのもう一つの翻訳時または翻訳後修飾ペプチドに対する抗体を生成すると思われる。

【０３４２】

本発明のタンパク質またはキメラ分子の生理化学的型は、インビボで通常近づくことができない（しかしおそらく存在する）エピトープを表す可能性がある。例えば、受容体ドメイン内にはヘテロ重合受容体のもう一つの成分と通常接触する領域が存在する可能性がある。これらのエピトープは、内因性の受容体と交叉反応するモノクローナル抗体を産生するために用いられる可能性がある。そのような抗体は、一つの受容体成分ともう一つの受容体成分との相互作用を遮断して、従ってシグナル伝達を防止する可能性がある。これはサイトカインまたは受容体の過剰発現の場合において治療的に有用となる可能性がある。抗体はまた、受容体が過剰発現されてリガンドを必要とすることなくシグナルを伝達する疾患において治療的に有用となる可能性がある。

【０３４３】

抗体はまた、疾患の処置の間にタンパク質またはそのキメラ分子のレベル（例えば、半減期決定のための血清レベル）を検出するために有用である。さらに、抗体は特定の試料における本発明のタンパク質またはキメラ分子の存在を決定するための診断薬として有用である。

【０３４４】

「抗体」または「複数の抗体」という言及には、例えばモノクローナル抗体を含む完全な抗体（例えば無傷のFc領域を有する）；例えば、Fv、Fab、Fab'および$F(ab')_2$を含む抗原結合抗体断片；ヒト化抗体；ヒト抗体（例えば、トランスジェニック動物において、またはファージディスプレイを通して産生される）；および遺伝子操作技術を通して産生された免疫グロブリン由来ポリペプチドが含まれるがこれらに限定されるわけではない、全ての様々な型の抗体に対する言及が含まれる。特に明記していなければ「抗体」または「複数の抗体」という用語は、本明細書において用いられるように完全な抗体およびその抗原結合断片の双方を含む。

【０３４５】

特に明記していなければ、本発明の抗体に関する特異性は、抗体が無関係なタンパク質に対して認識可能に結合することなく、その標的抗原に限って実質的に結合することを意味すると意図される。しかし、抗体は二つまたはそれより多い関連タンパク質に対して結合するように設計または選択されることが可能である。関連タンパク質には、同じタンパク質の異なるスプライス変種もしくは断片または異なる種からの相同なタンパク質が含まれる。そのような抗体はなおも、それらのタンパク質に対して特異性を有すると見なされ、本発明に含まれる。「実質的に」という用語は、この文脈において基底レベル、すなわち非特異的レベルを超えて非標的抗原に対して検出可能な結合がないことを意味する。

【０３４６】

本発明の抗体は、周知の技法によって調製してもよい。例えば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); およびAntibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)を参照されたい。

【０３４７】

本発明の抗体を産生するための一つの方法は、マウスまたはトランスジェニックマウスのような非ヒト動物を、本発明のタンパク質もしくはキメラ分子、または例えば受容体結合ドメインを含むペプチドのようなその免疫原性部分によって免疫する段階を含み、それによってタンパク質もしくはそのキメラ分子、またはその免疫原性部分のポリペプチドに対する抗体が動物において産生される。それに対する抗体反応が望ましい抗原ともう一つの成分とを含む、アジュバントまたは共役抗原を投与することのような、特定のタンパク質またはそのキメラ分子の抗原性を増加させる様々な手段が当業者に周知であり、利用してもよい。免疫は典型的に、初回免疫の後に一連の追加免疫を必然的に伴う。動物から採血して、血清を抗体力価に関してアッセイする。動物は、力価が平衡に達するまで追加免疫してもよい。共役体は、タンパク質融合体として組換え型細胞培養において作製してもよい。同様に、ミョウバンのような凝集剤も免疫応答を増強するために用いることが適し

ている。

【０３４８】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の双方をこの方法によって産生することができる。双方のタイプの抗体を得るための方法は、当技術分野で周知である。ポリクローナル抗体はあまり好ましくないが、本発明のタンパク質もしくはキメラ分子、またはその免疫原性部分の有効量を適した動物に注射すること、動物から血清を採取して、公知の任意の免疫吸着技術によってタンパク質またはそのキメラ分子に対する特異的抗体を単離する段階によって比較的容易に調製される。この技術によって産生された抗体は産物が不均一である可能性があることから、一般的にあまり好ましくない。

【０３４９】

モノクローナル抗体を用いることは、それらを大量に産生できること、および産物が均一であることから特に都合がよい。モノクローナル抗体は、通常の技法によって産生してもよい。

【０３５０】

本明細書において用いられるように、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得た抗体、すなわち集団を含む個々の抗体が、微量存在する可能性がある起こり得る天然に存在する変異を除き、同一であることを指す。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原性部位に対して向けられる。さらに、典型的に異なる決定因子（エピトープ）に対する異なる抗体が含まれるポリクローナル調製物とは対照的に、それぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の抗原決定基に対して向けられる。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られているという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は、Kohler et al. Nature 256:495 (1975)によって初めて記述されたハイブリドーマ法によって作製してもよく、または組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）によって作製してもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えばClackson et al. Nature 352:624-628, 1991およびMarks et al. J Mol Biol 222:581-597, 1991において記述される技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。

【０３５１】

本発明は、マウスまたはトランスジェニックマウスのような非ヒト動物を本発明のタンパク質またはキメラ分子によって免疫する段階、免疫した動物から脾細胞を採取する段階；採取した脾細胞を骨髄腫細胞株と融合させてハイブリドーマ細胞を生成する段階；およびタンパク質またはそのキメラ分子に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定する段階を含む、ハイブリドーマ細胞株を産生するための方法を企図する。

【０３５２】

そのようなハイブリドーマ細胞株およびそれらによって産生されたモノクローナル抗体は、本発明に含まれる。ハイブリドーマ細胞株によって分泌されたモノクローナル抗体は、通常の技術によって精製される。ハイブリドーマまたはそれらによって産生されたモノクローナル抗体は、その受容体を通してのサイトカインシグナル伝達の阻害能のような、特に望ましい特性を有するモノクローナル抗体を同定するためにさらにスクリーニングしてもよい。

【０３５３】

本発明の抗体産生の初期段階において動物を免疫するために用いてもよいタンパク質もしくはそのキメラ分子、またはその免疫原性部分は、ヒト発現起源でなければならない。

【０３５４】

本発明の抗体の抗原結合断片は、通常の技術によって産生してもよい。そのような断片の例には、Fab、Fab、$F(ab')_2$、および一本鎖Fv断片（sFvまたはscFvと命名される）を含むFv断片が含まれるがこれらに限定されるわけではない。ジスルフィド安定化Fv断片（dsFv）、一本鎖可変領域ドメイン（Abs）分子、ミニボディ、およびディアボディのような

、遺伝子操作技術によって産生された抗体断片および誘導体も同様に、本発明に従って用いるために企図される。

【０３５５】

タンパク質またはそのキメラ分子に対するモノクローナル抗体のそのような断片および誘導体は、本明細書において記述されたアッセイを含む公知の技術によって調製して、望ましい特性に関してスクリーニングしてもよい。アッセイは、タンパク質またはそのキメラ分子に結合する本発明の抗体の断片および誘導体を同定するための手段と共に、タンパク質またはそのキメラ分子によるシグナル伝達を阻害する活性を保持する断片および誘導体を同定するための手段を提供する。特定の技術は、対象mAbのポリペプチド鎖（またはその一部）をコードするDNAを単離する段階、および組換えDNA技術を通してDNAを操作する段階を必然的に伴う。DNAを、もう一つの対象DNAに融合させてもよく、または一つもしくは複数のアミノ酸残基を（例えば、変異誘発または他の通常の技術によって）付加、欠失、または置換するように変更されてもよい。

【０３５６】

抗体ポリペプチド（例えば、重鎖または軽鎖、可変領域のみまたは完全長）をコードするDNAは、本発明のタンパク質またはキメラ分子によって免疫されているマウスのB-細胞から単離してもよい。DNAは、通常の技法を用いて単離してもよい。ファージディスプレイは、それによって抗体の誘導体が調製される可能性がある公知の技術のもう一つの例である。一つのアプローチにおいて、対象抗体の成分であるポリペプチドは、任意の適した組換え発現系において発現され、発現されたポリペプチドを構築させて、抗体分子を形成させる。

【０３５７】

一本鎖抗体は、アミノ酸架橋（短いペプチドリンカー）を通して重鎖および軽鎖可変領域（Fv領域）断片を連結して、それによって一本鎖ポリペプチドが得られることによって形成してもよい。そのような一本鎖抗体Fvs（scFv）は、二つの可変領域ポリペプチド（VLおよびVH）をコードするDNAの間にペプチドリンカーをコードするDNAを融合することによって調製されている。得られた抗体断片は、二つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーの長さに応じて二量体または三量体を形成し得る（Kortt et al. Protein Engineering 10: 423, 1997）。一本鎖抗体の産生のために開発された技術には、米国特許第4,946,778号；Bird（Science 242:423, 1988）、Huston et al.（Proc Natl Acad Sci USA 85:5879, 1988）およびWard et al（Nature 334:544, 1989）において記述されている技術が含まれる。本明細書において提供された抗体に由来する一本鎖抗体は本発明に含まれる。

【０３５８】

一つの態様において、本発明は、本発明のタンパク質またはキメラ分子に結合して、タンパク質またはそのキメラ分子によるシグナル伝達を阻害する抗体の抗体断片、キメラ、組換え型または合成型を提供する。

【０３５９】

対象抗体からの異なるサブクラスまたはアイソタイプの抗体を誘導するための技術、すなわちサブクラススイッチングが公知である。このように、IgG1またはIgG4モノクローナル抗体は、IgMモノクローナル抗体に由来してもよく、その逆であってもよい。そのような技術によって、所定の抗体（親抗体）の抗原結合特性を保有するが、親抗体とは異なる抗体アイソタイプまたはサブクラスに関連した生物学的特性を示す新規抗体を調製することができる。組換えDNA技術を用いてもよい。特定の抗体ポリペプチドをコードするクローニングされたDNA、例えば、所望のアイソタイプの抗体の定常領域をコードするDNAをそのような技法において用いてもよい。

【０３６０】

前述のモノクローナル抗体産生プロセスは、モノクローナル抗体を産生するために、動物、例えばマウスにおいて用いてもよい。そのような動物に由来する通常の抗体、例えばマウス抗体は、一般的にそれらが免疫応答を引き起こす可能性があることからヒトに投与するために適していないことが公知である。従って、そのような抗体はヒトへの投与に適

した抗体を提供するために修飾する必要がある可能性がある。キメラおよび／またはヒト化抗体を調製するためのプロセスは当技術分野で周知であり、以下にさらに詳細に記述する。

【０３６１】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、望ましい生物活性を示す限り、重鎖および／または軽鎖の可変ドメインが非ヒト種（例えば、マウス）に由来する抗体における対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残りの部分はヒトに由来する抗体における対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体と共に、そのような抗体の断片が含まれる（米国特許第4,816,567号およびMorrison et al. Proc Natl Acad Sci USA 81:6851-6855, 1984）。

【０３６２】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）が、所望の特性、例えば特性および親和性を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）の対応するCDRによって置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域残基が対応する非ヒト残基に置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精密にするためになされる。一般的に、ヒト化抗体は、全てのまたは実質的に全ての相補性決定領域が非ヒト免疫グロブリンの領域に対応して、全てまたは実質的に全てのフレームワーク領域残基がヒト免疫グロブリン配列の領域に対応する、少なくとも一つ、および典型的に二つの可変ドメインの実質的に全てを含むと思われる。ヒト化抗体は、任意でまた免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含むと思われる。さらなる詳細に関しては、Jones et al. Nature 321:522-525, 1986; Reichmann et al. Nature 332:323-329, 1988; Presta, Curr Op Struct Biol 2:593-596, 1992; Liu et al. Proc Natl Acad Sci USA 84:3439, 1987; Larrick et al. Bio/Technology 7:934, 1989;およびWinter and Harris, TIPS 14:139, 1993を参照されたい。

【０３６３】

さらなる態様において、本発明は、天然に存在するヒトタンパク質を含む生物学的調製物を含む、生物学的調製物に存在するヒト細胞において発現されたヒトタンパク質レベルのアッセイ能を有するイムノアッセイキットを提供する。

【０３６４】

本発明のイムノアッセイキットを用いてアッセイすることができる生物学的調製物には、実験試料、細胞、組織、血液、血清、血漿、尿、便、唾液および喀痰が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【０３６５】

本発明のイムノアッセイキットは、膜、ディップスティック、ビーズ、ゲル、チューブ、またはマルチウェル、平底、丸底、またはv-底マイクロプレート、例えば96ウェルマイクロプレートが含まれるがこれらに限定されるわけではない固相支持体マトリクス；対象ヒトタンパク質に対する抗体（捕獲抗体）の調製物；ブロッキング溶液の調製物（例えば、BSAまたはカゼイン）；同様に対象ヒトタンパク質に対する、適した検出分子（例えば、アルカリホスファターゼ）に共役された二次抗体調製物（検出抗体）；色素産生性基質溶液（例えば、ニトロブルーテトラゾリウム）；さらなる基質（例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート）；基質緩衝液の保存溶液（例えば、0.1M Tris-HCL（pH 7.5）および0.1M NaCl、50 mM $MgCl_2$）；公知の濃度の本発明のタンパク質またはキメラ分子の調製物（標準物質）；および使用説明書を含む。

【０３６６】

酵素、色素、蛍光分子、化学発光、同位体、またはブドウ球菌（staphylococcal）プロテインAもしくはブドウ球菌プロテインGが含まれるがこれらに限定されるわけではない分

子に共役させた金コロイドのような物質からなる一覧から適した検出分子を選択してもよい。

【０３６７】

特定の態様において、捕獲および検出抗体はモノクローナル抗体であり、その産生は、マウスまたはトランスジェニックマウスのような非ヒト動物を、本発明のタンパク質またはキメラ分子によって免疫する段階の後に本明細書において前述の標準的な方法を行う段階を含む。モノクローナル抗体はまたは、本明細書において前述の組換え法によって産生してもよく、ヒトまたはキメラ抗体部分またはドメインを含んでもよい。

【０３６８】

もう一つの態様において、捕獲および検出抗体はポリクローナル抗体であり、その産生は、マウス、ウサギ、ヤギ、またはウマのような非ヒト動物を、本発明のタンパク質またはキメラ分子によって免疫する段階の後に本明細書において前述の標準的な方法を行う段階を含む。

【０３６９】

イムノアッセイキットの成分は、既定の比率で提供され、様々な試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最大限にする試薬の溶液中での濃度を提供するために適切に変化する。特に、試薬は、乾燥粉末、通常、溶解されると、試験される生物学的調製物と組み合わせるための適当な濃度を有するそれぞれの試薬溶液を提供する、賦形剤を含む乾燥粉末、通常凍結乾燥粉末として提供されてもよい。

【０３７０】

使用説明書は本発明のイムノアッセイキットを用いる方法を詳述すると思われる。例えば、使用説明書は、適した条件で、例えば4℃で終夜、調製された捕獲抗体溶液によって固相支持体マトリクスをコーティングするための方法を記述してもよい。使用説明書はさらに、調製されたブロッキング溶液による非特異的タンパク質結合部位のブロッキング；本発明のタンパク質またはキメラタンパク質を含む連続希釈試料を加えて、適した条件で、例えば37℃で1時間、または室温で2時間インキュベートする段階の後に、当技術分野で公知の適した緩衝液、例えば、0.05％Tween 20の0.1 M PBS（pH 7.2）溶液を用いて一連の洗浄を行う段階を詳しく記述すると思われる。さらに、説明書は、インキュベーションの後に検出抗体の調製物を適した条件、例えば37℃で1時間、または室温で2時間適用した後に、さらに一連の洗浄を行う段階を提供してもよい。検出緩衝液の作業溶液を、供給された検出基質および基質緩衝液から調製した後、各ウェルに室温で5分～37℃で1時間までの適した条件で加える。1N NaOHまたは2N H_2SO_4を加えることによって、色素形成反応を停止してもよい。

【０３７１】

もう一つの態様において、使用説明書は、既定の比率で加えられる上記の成分の任意または全ての任意の組み合わせを同時に加えることを提供してもよく、様々な試薬の相対量は複合体の形成から測定可能なシグナルの形成を実質的に最大限にする試薬溶液中の濃度を提供するために適切に変化する。

【０３７２】

結合、共役検出試薬によって生成された、着色産物、または蛍光、化学発光、放射活性、もしくは他のシグナルのレベルは、ELISAプレートリーダーもしくは分光光度計を用いて、適当な光学密度（OD）で測定することができ、適当な波長で分光光度計、蛍光計、もしくはフローサイトメーターを用いて放射光として測定することができ、放射活性カウンターを用いて適当なエネルギースペクトルで測定することができ、密度測定計によって、またはチャートもしくはガイドと比較することによって肉眼で測定することができる。標準調製物の連続希釈液を上記の試料と同時にアッセイする。標準曲線またはチャートを作製して、試料内の本発明のタンパク質またはキメラ分子のレベルを標準曲線またはチャートから内挿することができる。

【０３７３】

本発明はまた、イムノアッセイにおける標準タンパク質として用いるためのヒト由来タ

ンパク質またはそのキメラ分子を提供する。本発明はさらに、（a）ヒトタンパク質またはそのキメラ分子に対する一つまたは複数の抗体と生物学的調製物とを混合する段階、（b）生物学的調製物におけるヒトタンパク質またはキメラ分子に対する各抗体の結合レベルを決定する段階、（c）標準的なヒトタンパク質試料またはキメラ分子試料を、ヒトタンパク質またはキメラ分子に対する一つまたは複数の抗体と混合する段階、（d）標準的なヒトタンパク質試料またはキメラ分子試料に対するそれぞれの抗体の結合レベルを決定する段階、（e）生物学的調製物におけるヒトタンパク質またはキメラ分子に結合したそれぞれの抗体のレベルを、標準的なヒトタンパク質試料またはキメラ分子試料に結合した各抗体のレベルと比較する段階を含む、ヒトタンパク質またはキメラ分子を測定するための適したアッセイを含む、生物学的調製物におけるヒト細胞発現ヒトタンパク質またはそのキメラ分子のレベルを決定するための方法にも及ぶ。

【０３７４】

特に、標準的なヒトタンパク質試料またはキメラ分子試料は、本発明のタンパク質またはキメラ分子を含む調製物である。

【０３７５】

生物学的調製物には、研究室試料、細胞、組織、血液、血清、血漿、尿、便、唾液、および喀痰が含まれるがこれらに限定されるわけではない。生物学的調製物は、本明細書において前記のように、または当技術分野で公知の方法によって一つまたは複数の捕獲抗体に結合する。例えば、固相支持体マトリクスをまず、適した条件（例えば、4℃で終夜）で捕獲抗体の調製液によってコーティングした後、調製したブロッキング溶液によって非特異的タンパク質結合部位をブロックした後、本発明のタンパク質またはキメラ分子を含む連続希釈試料を加えて、適した条件（例えば、37℃で1時間または室温で2時間）でインキュベートする段階の後に、当技術分野で公知の適した緩衝液（例えば、0.05％Tween 20の0.1 M PBS（pH 7.2）溶液）を用いて一連の洗浄を行う。

【０３７６】

生物学的調製物を、本明細書において記述の適した検出分子に共役させた一つまたは複数の検出抗体と混合する。例えば、検出抗体調製物を適用した後に適した条件（例えば、37℃で1時間または室温で2時間）でインキュベートした後、さらに一連の洗浄を行う。

【０３７７】

結合レベルの決定は、本明細書において既に記述したように、または当技術分野で公知の方法によって行ってもよい。例えば、検出緩衝液の作業溶液を検出基質および基質緩衝液から調製して、各ウェルに、室温で5分から37℃で1時間までの適した条件で加える。色素形成反応は、1N NaOHまたは2N H_2SO_4を加えることによって停止させてもよい。

【０３７８】

特定の態様において、本発明は、本明細書において既に記述されているように、単離タンパク質またはキメラ分子を企図する。

【０３７９】

特定の態様において、本発明のIL-2は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 kDaなどの1～100 kDa、特定の態様においては13～36 kDaの見かけの分子量(P_1)を含む生理化学的パラメータ(P_x)および薬理学的特質(T_x)のプロフィールを特徴とする。本発明のIL-2のpI(P_2)は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12などの2～12であり、特定の態様においては5～9であり、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45個など約2～45個のイソ型、特定の態様においては5～40個のイソ型(P_3)を有する。本発明のIL-2の糖質重量百分率(P_5)は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20

、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80%など0～80%であり、特定の態様においては0～58%である。N-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2の分子量(P_6)は、13～36 kDaである。N-結合型およびO-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2の分子量(P_7)は、13～25 kDaである。本発明のIL-2の単糖類含有量(P_9)およびシアル酸含有量(P_{10})は、GalNAcに対して標準化した場合、1対0～2フコース、1対0～8 GlcNAc、1対0.1～5ガラクトース、および1対0～8 NeuNAcであり、特定の態様においては、1対0～1フコース、1対2～5 GlcNAc、1対1～4ガラクトース、および1対0.3～6 NeuNAcである。本発明のIL-2の単糖類含有量の割合として表したシアル酸含有量(P_{10})は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50%など0～50%であり、特定の態様においては0～25%である。本発明のIL-2の硫酸含有量(P_{11})は、GalNAcに対して標準化した場合、1～1-105硫酸であり、特定の態様においては1～1-70硫酸である。本発明のIL-2の単糖類含有量の割合として表した硫酸化(P_{59})は10～100%であり、特定の態様においては20～100%である。本発明のIL-2には、N-結合型グリカン構造(P_{21})は存在しない。本発明のIL-2の熱安定性(T_8)は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2の熱安定性とは異なり、詳細には、37℃での7日間のインキュベーション後にELISAアッセイ法によって決定される本発明のIL-2のタンパク質濃度は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2のタンパク質濃度よりも高い。本発明のIL-2の免疫反応性プロフィール（T_{13}）は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2のプロフィールとは別個であり、特に、本発明のIL-2のタンパク質濃度は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2を含むELISAキットを用いてアッセイした場合に過小評価される。本発明のIL-2の増殖能（T_{32}）は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2の増殖能とは別個であり、特にCTLL-2細胞に対する本発明のIL-2の増殖能（T_{32}）は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2の増殖能より大きい。

【０３８０】

特定の態様において、本発明のIL-2Ra-Fcは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250 kDaなどの、1～250 kDa、および特定の態様においては40～110 kDaの見かけの分子量（P_1）を含む生理化学的パラメータ（P_x）および薬理学的特質（T_x）のプロフィールを特徴とする。本発明のIL-2Ra-FcのpI（P_2）は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14など、2～14であり、特定の態様においては3.5～8であり、イソ型は2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個など、約2～50個、特定の態様においてはイソ型（P_3）は5～80個である。本発明のIL-2Ra-Fcの炭水化物重量百分率（P_5）は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%など、0～99%であり、特定の態様においては0～54%である。N

-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2Ra-Fcの分子量(P_6)は51～90 kDaであり、特定の態様においては51～85 kDaである。N-結合型およびO-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2Ra-Fcの分子量(P_7)は51～85 kDaであり、特定の態様においては51～80 kDaである。本発明のIL-2Ra-FcのN-グリコシル化部位(P_{21})には、N-328(シグナル配列の開始点からの番号付け)が含まれる。本発明のIL-2Ra-Fcの免疫反応性プロフィール(T_{13})は、非ヒト細胞系において発現されたヒトIL-2Ra-Fcの免疫反応性プロフィールとは異なり、詳細には、本発明のIL-2Ra-Fcのタンパク質濃度は、非ヒト細胞系において発現された可溶性ヒトIL-2Raを用いて標準化するELISAキットでアッセイした場合に過剰評価される。

【０３８１】

特定の態様において、本発明のIL-2Rb-Fcは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250 kDaなどの1～250 kDaの見かけの分子量(P_1)を含む生理化学的パラメータ(P_x)および薬理学的特質(T_x)のプロフィールを特徴とする。IL-2Rb-FcのpI(P_2)は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14などの2～14であり、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個など約2～50個のイソ型(P_3)を有する。本発明のIL-2Rb-Fcの糖質重量百分率(P_5)は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%など0～99%である。

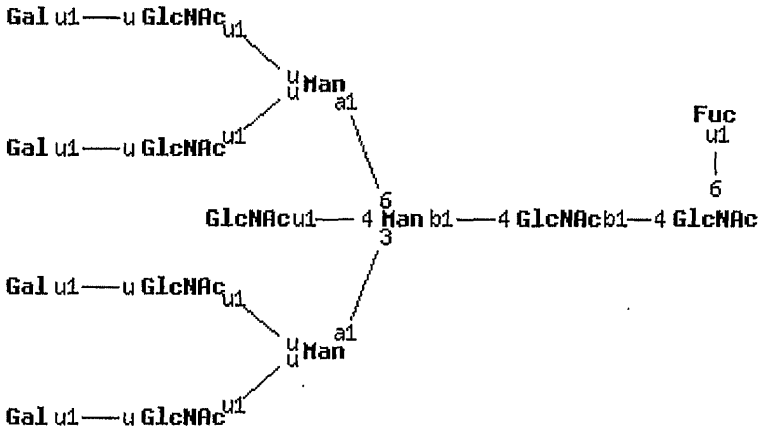
【０３８２】

特定の態様において、本発明のIL-2Rg-Fcは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250 kDaなどの1～250 kDa、特定の態様においては60～125 kDaの見かけの分子量(P_1)を含む生理化学的パラメータ(P_x)および薬理学的特質(T_x)のプロフィールを特徴とする。本発明のIL-2Rg-FcのpI(P_2)は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14などの2～14であり、特定の態様においては4～8.5であり、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個など約2～50個のイソ型、特定の態様においては5～30個のイソ型(P_3)を有する。本発明のIL-2Rg-Fcの糖質重量百分率(P_5)は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%など0～99%であり、特定の態様においては8～56%である。N-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される本発明のIL-2Rg-Fcの分子量(P_6)は、55～100 kDaである。N-結合型およびO-結合型オリゴ糖を除去した場合に観察される

本発明のIL-2Rg-Fcの分子量(P_7)は、55～95 kDaである。本発明のIL-2Rg-FcのN-グリコシル化部位(P_{21})には、N-159およびN-249(シグナル配列の開始点からの番号付け)が含まれる。

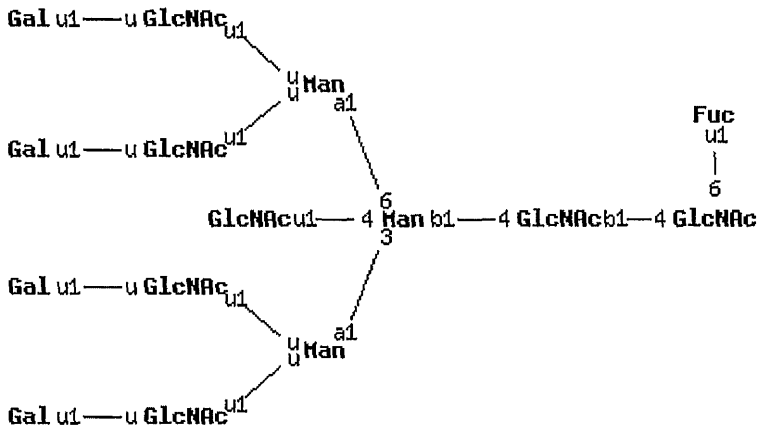
【０３８３】

一つの態様において、本発明のタンパク質またはキメラ分子は、N-結合型分画（P_{19}）において以下の構造の少なくとも一つを含む。これらの表記において、「u」または「?」は、アノマー立体配置がaまたはbであり、および／または連結の位置が2、3、4および／または6であることを表す。



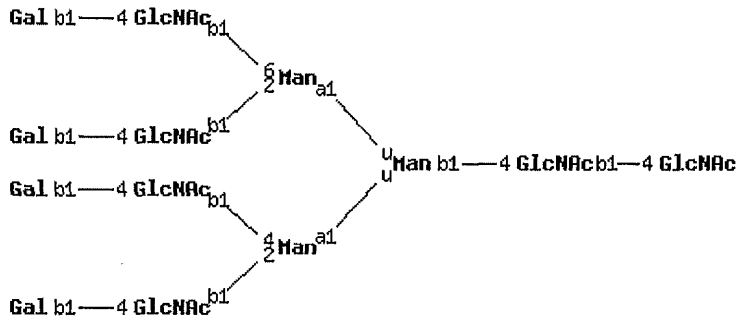
+ 3 x Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)

グリカン構造　Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)][GlcNAc(?1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc+"+ 3 x Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)"



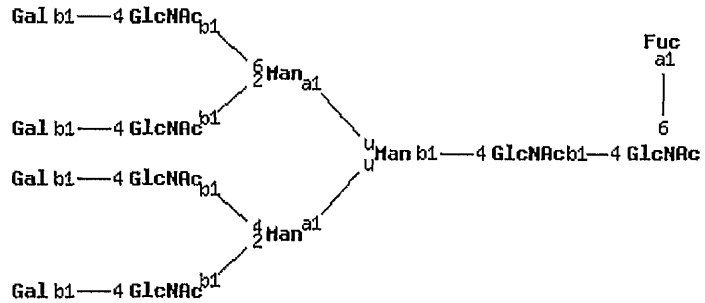
+ 3 x Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?) + Fuc(?1-?)

グリカン構造　Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)][GlcNAc(?1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc+"+ 3 x Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?) + Fuc(?1-?)"



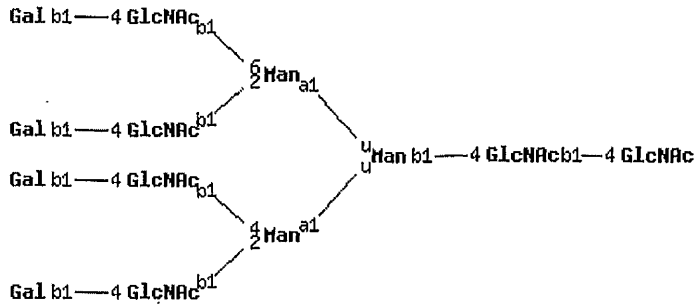
+ 3 x Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)

グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 3 x Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)"

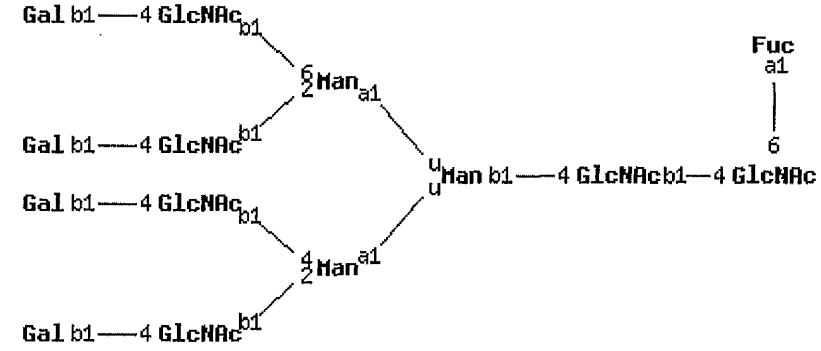


+ 3 x Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)

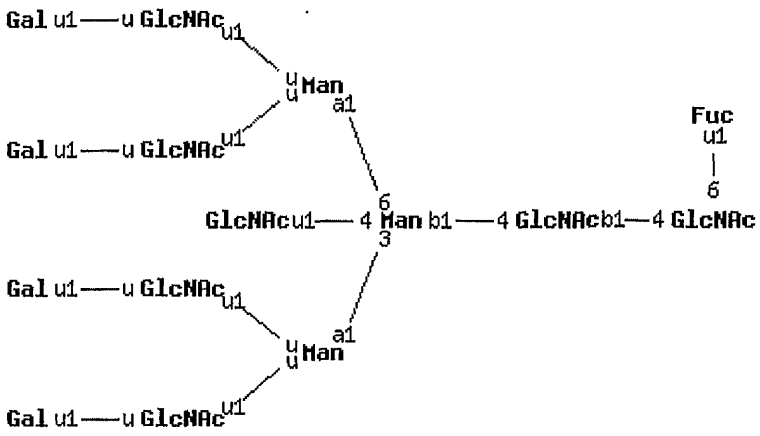
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ 3 x Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)"



グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-?)[Gal (b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 3 x Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3) + Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)"

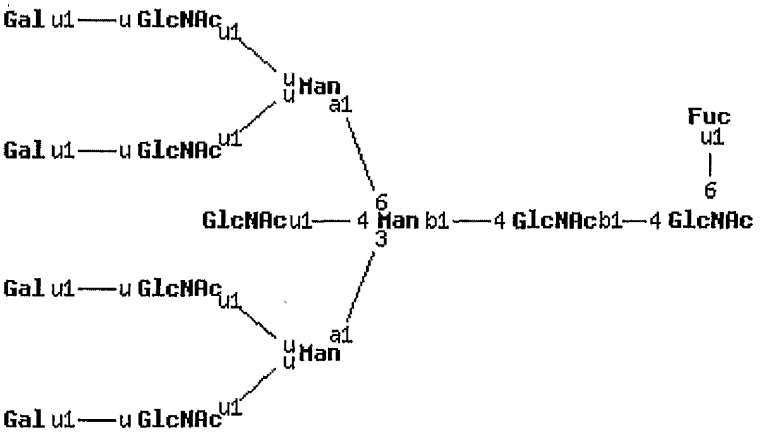


グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-?)[Gal (b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ 3 x Gal(b1-4)GlcNAc (b1-3) + Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)"



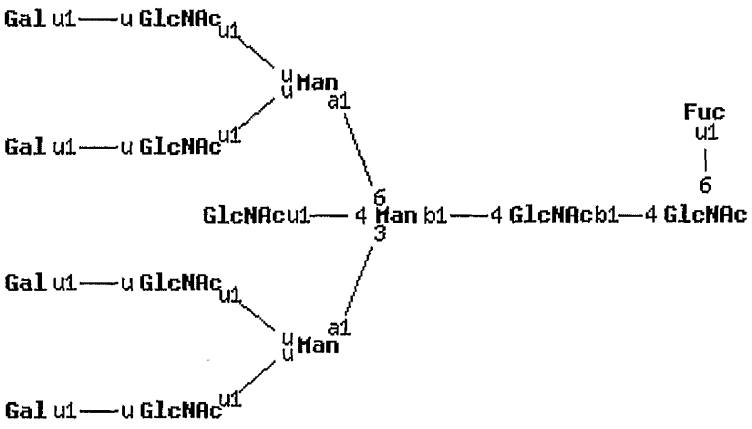
+ 4 x Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)

グリカン構造 Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)][GlcNAc(?1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc+"+ 4 x Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)"

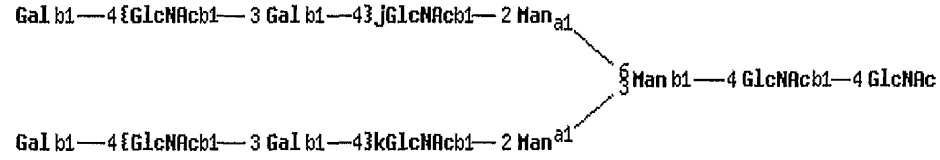


+ 4 x Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?) + Fuc(?1-?)

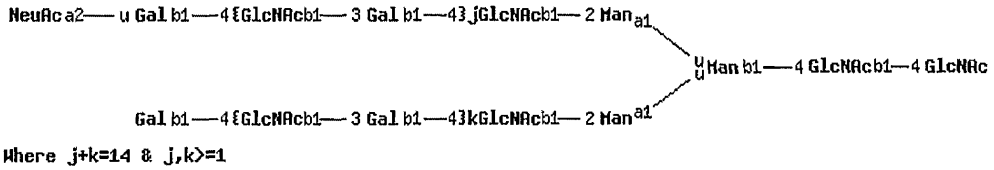
グリカン構造 Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)][GlcNAc(?1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc+"+ 4 x Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?) + Fuc(?1-?)"



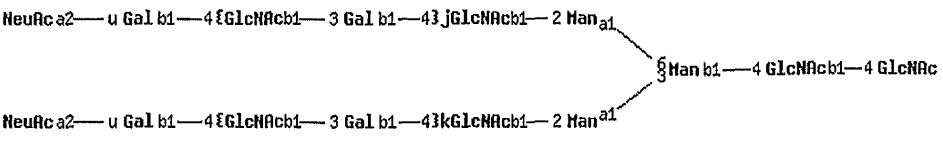
グリカン構造 Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)][GlcNAc(?1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc+"+ 5 x Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)"



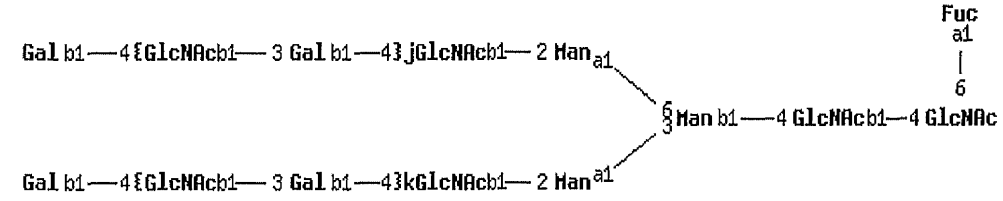
グリカン構造 Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"



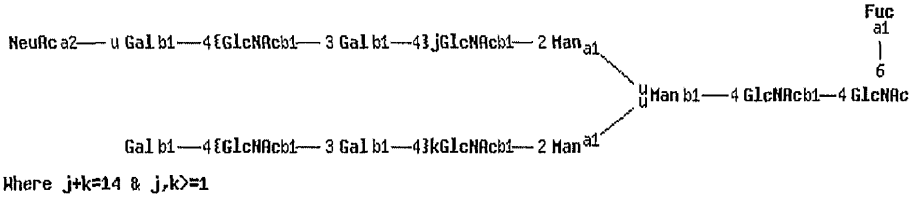
グリカン構造 NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-?)[Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"



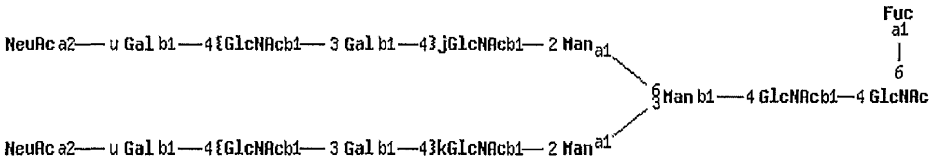
グリカン構造 NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"Where j+k=14 & k,j>=1"



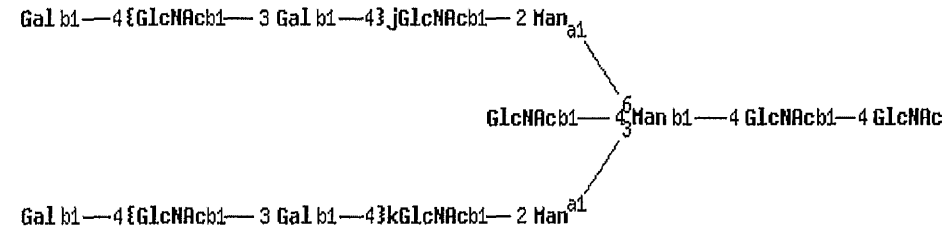
グリカン構造 Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"



グリカン構造 NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-?)[Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"

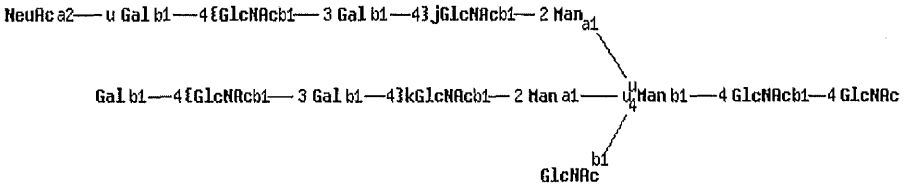


グリカン構造 NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"



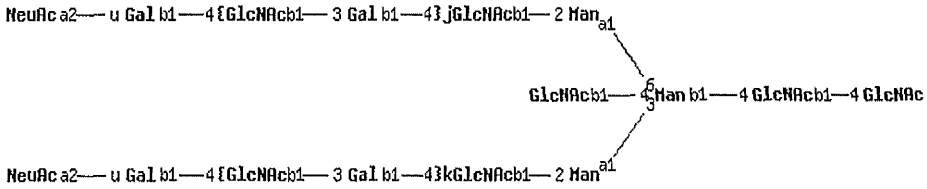
Where j+k=14 & j,k>=1

グリカン構造 Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"



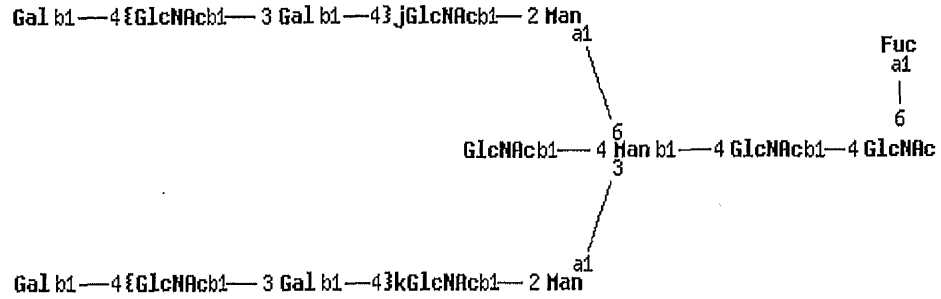
Where j+k=14 & j,k>=1

グリカン構造 NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-?)[Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-?)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"

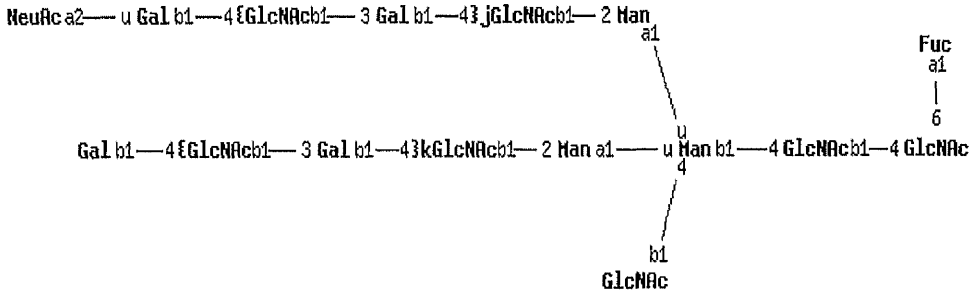


Where j+k=14 & j,k>=1

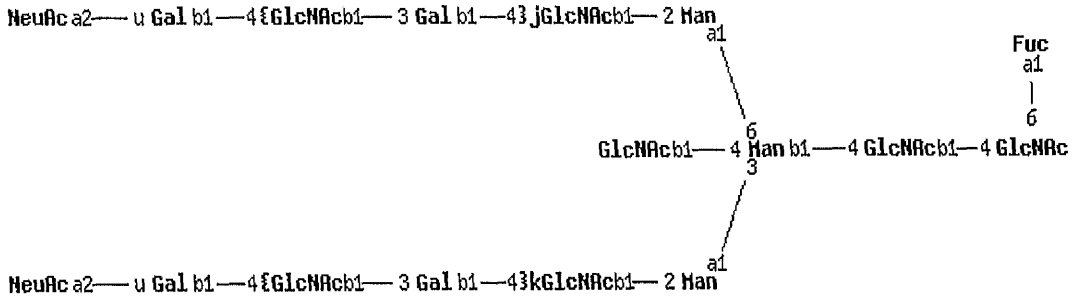
グリカン構造 NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"



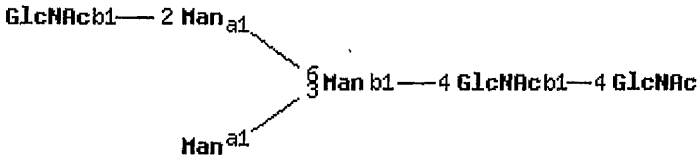
グリカン構造　Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"



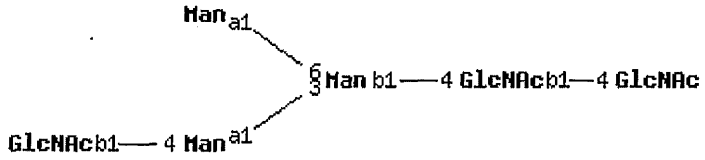
グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-?)[Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-?)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"



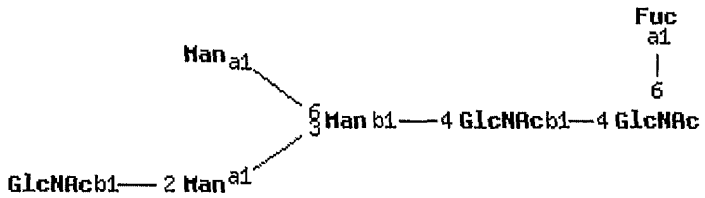
グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}kGlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4){GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)}jGlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"Where j+k=14 & j,k>=1"



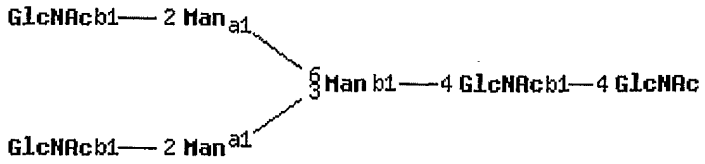
グリカン構造　GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



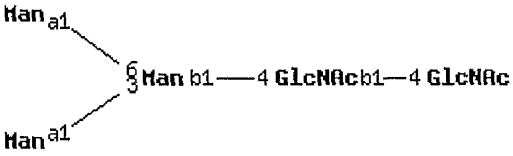
グリカン構造　GlcNAc(b1-4)Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



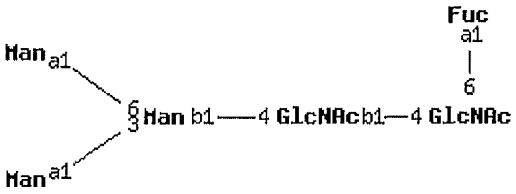
グリカン構造　GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



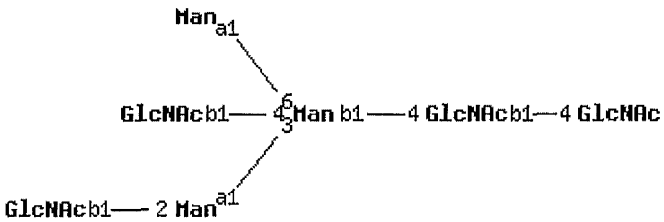
グリカン構造　GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc
(b1-4)GlcNAc



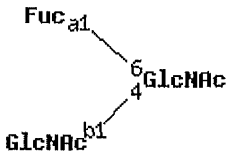
グリカン構造　Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



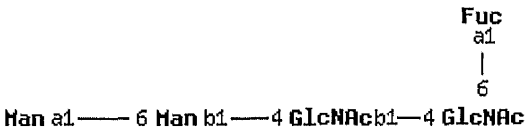
グリカン構造　Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



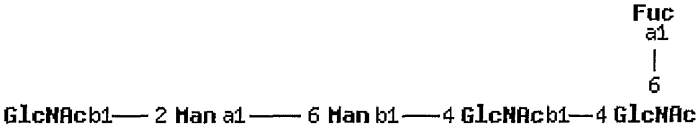
グリカン構造　GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-4)][Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



グリカン構造　Fuc(a1-6)[GlcNAc(b1-4)]GlcNAc

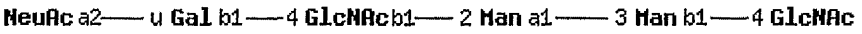


グリカン構造　Man(a1-6)Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc

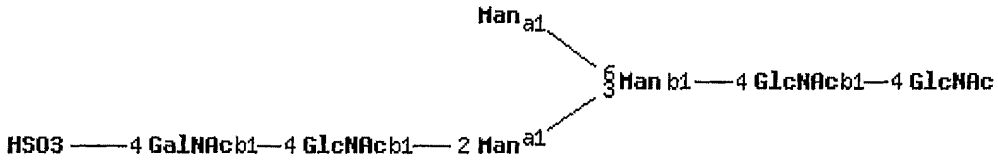


グリカン構造　GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc

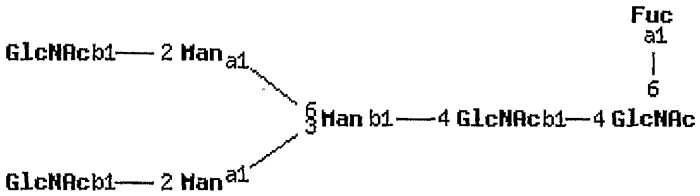
グリカン構造　Man(a1-3)Man(a1-6)Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



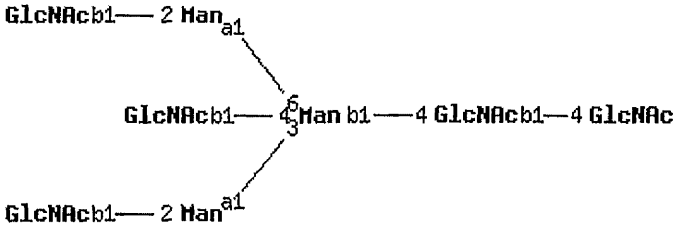
グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)Man(b1-4)GlcNAc



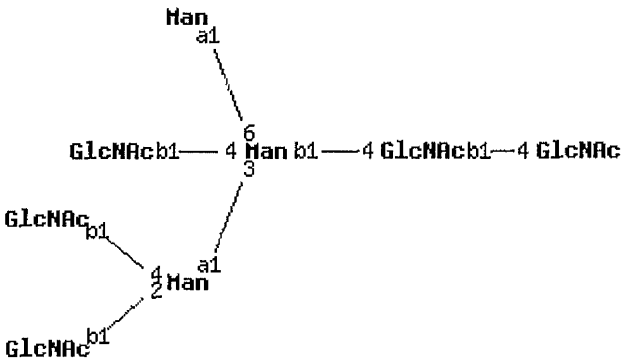
グリカン構造　HSO3(-4)GalNAc(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



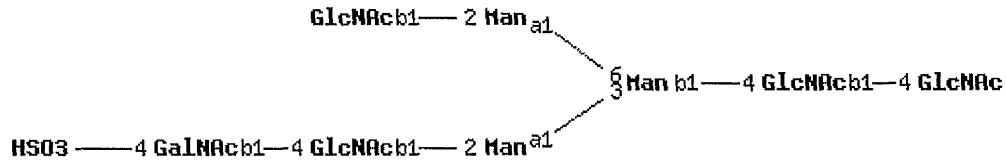
グリカン構造　GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc
(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc

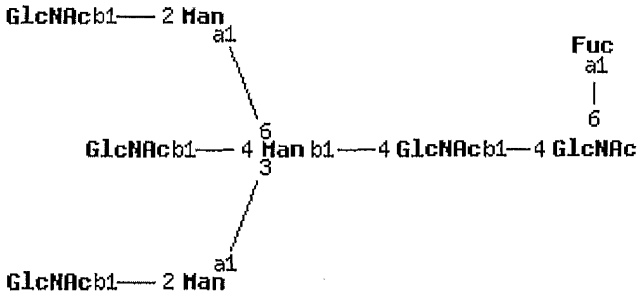


グリカン構造　GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc

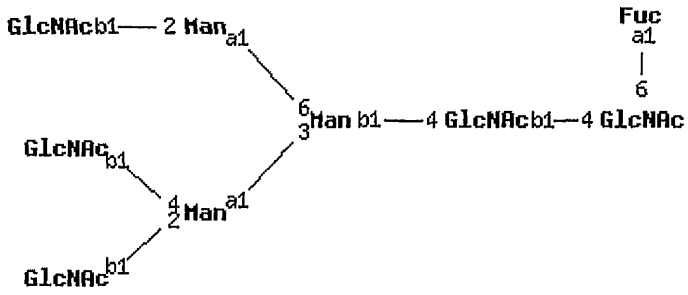


グリカン構造　GlcNAc(b1-2)[GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[GlcNAc(b1-4)][Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc

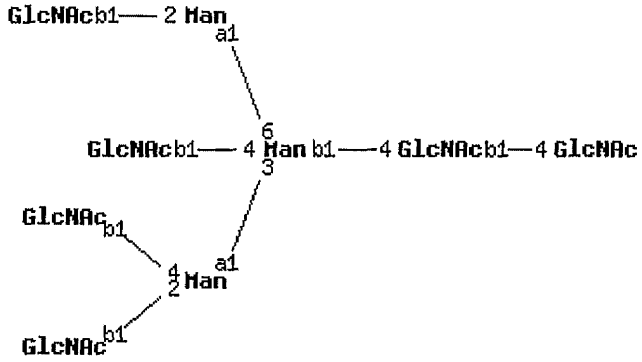




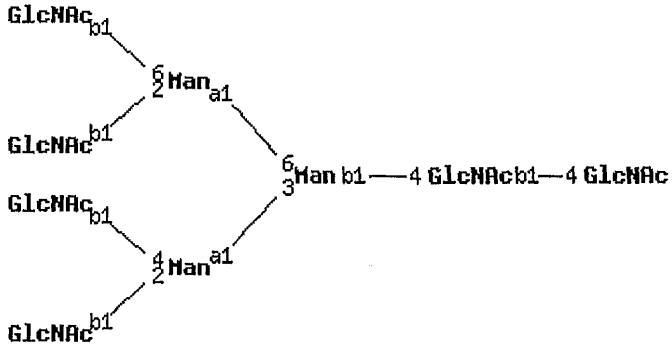
グリカン構造　GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



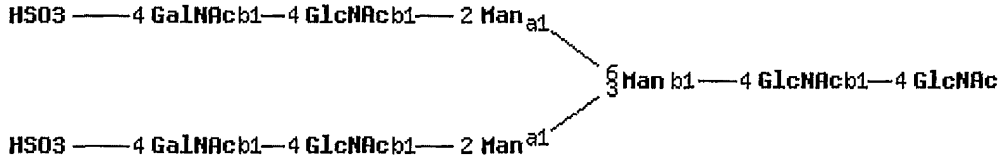
グリカン構造　GlcNAc(b1-2)[GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



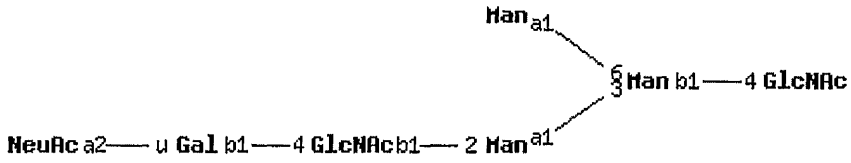
グリカン構造　GlcNAc(b1-2)[GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



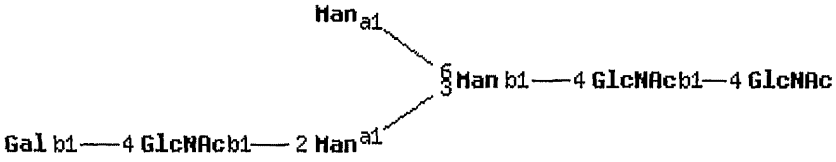
グリカン構造　GlcNAc(b1-2)[GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)[GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



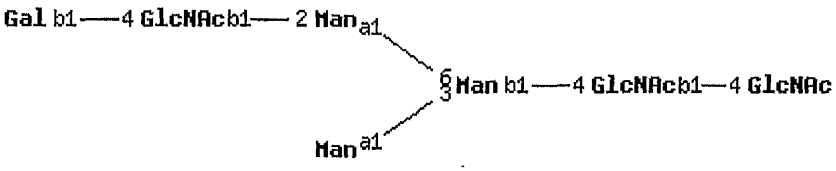
グリカン構造　HSO3(-4)GalNAc(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[HSO3(-4)GalNAc(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



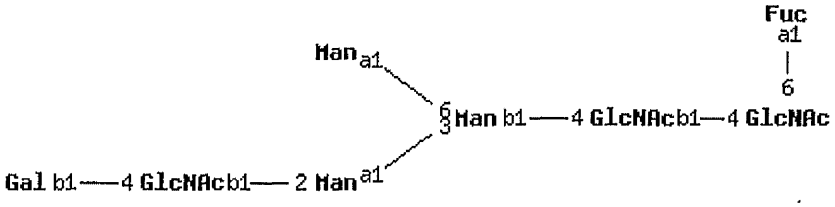
グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc



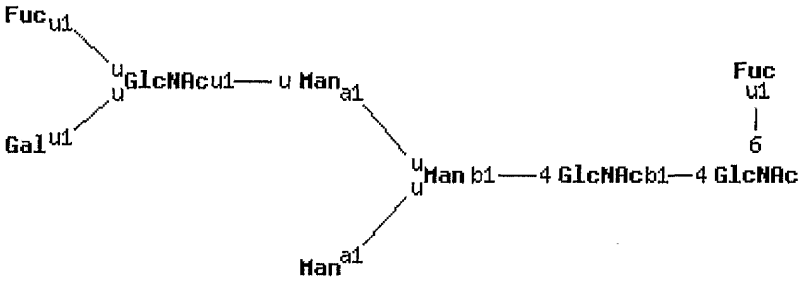
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



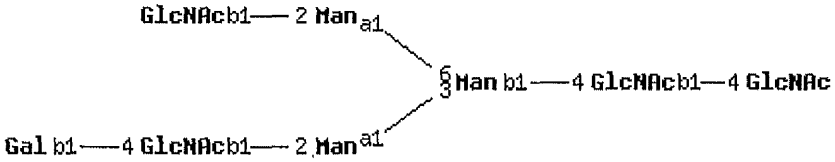
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



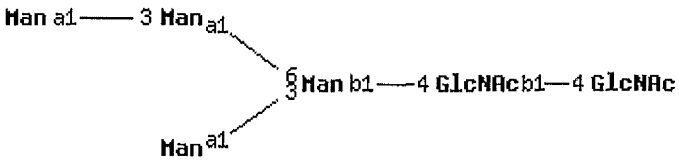
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



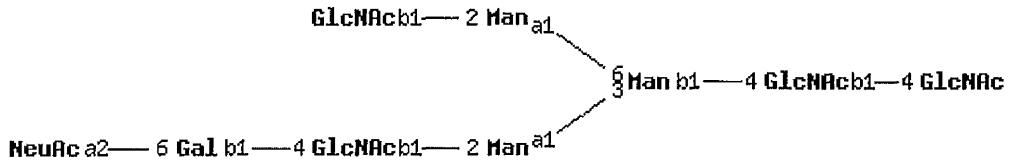
グリカン構造　Fuc(?1-?)[Gal(?1-?)]GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)[Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc



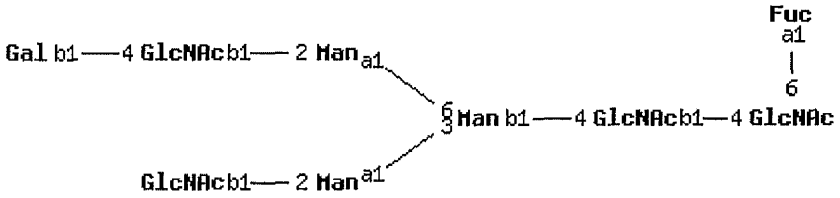
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



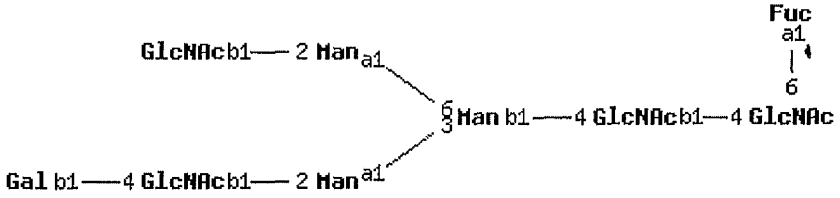
グリカン構造　Man(a1-3)Man(a1-6)[Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



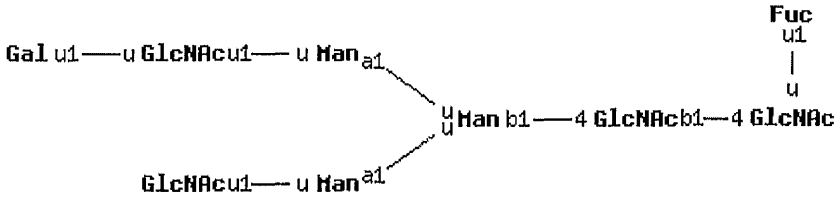
グリカン構造　NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



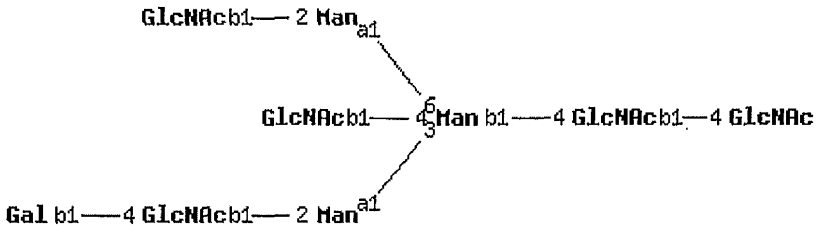
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



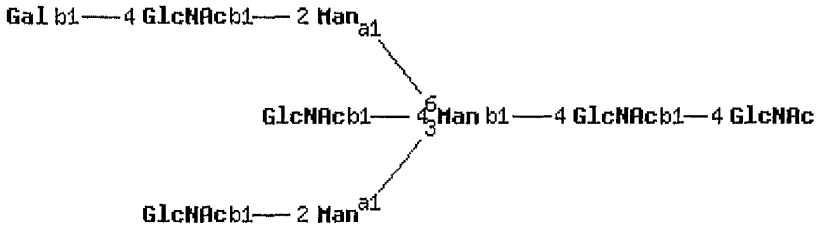
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



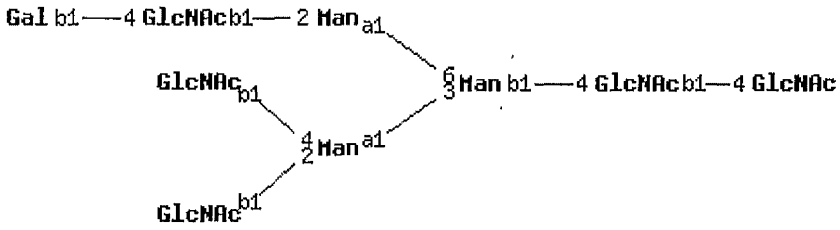
グリカン構造　Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)[GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-?)]GlcNAc



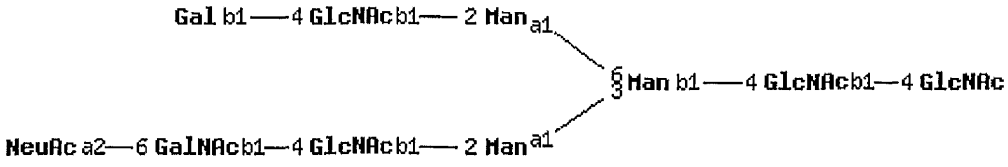
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



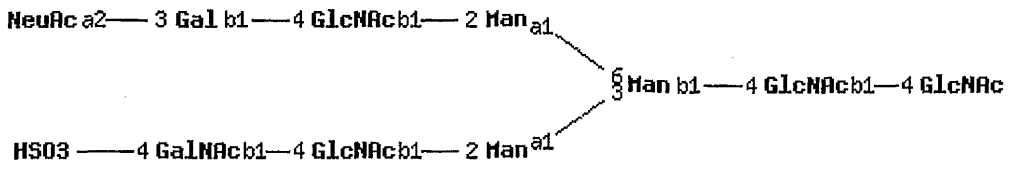
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



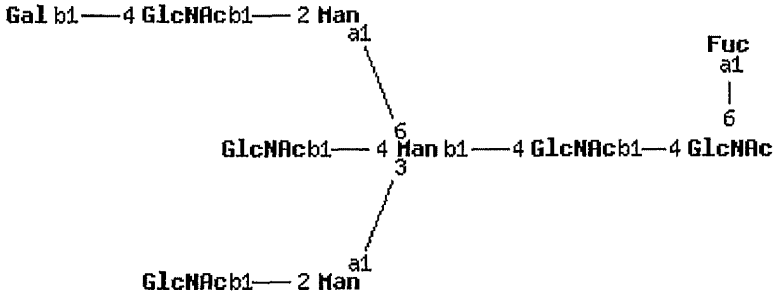
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[GlcNAc(b1-2)[GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



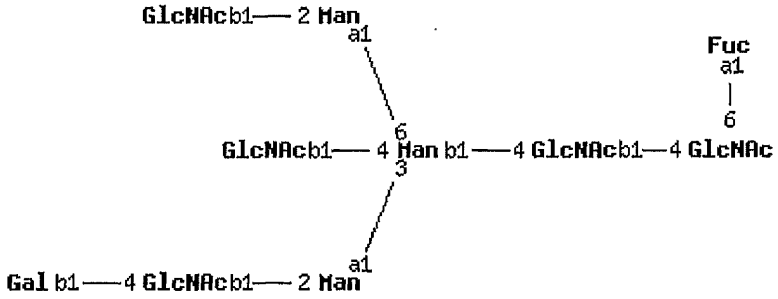
グリカン構造　NeuAc(a2-6)GalNAc(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



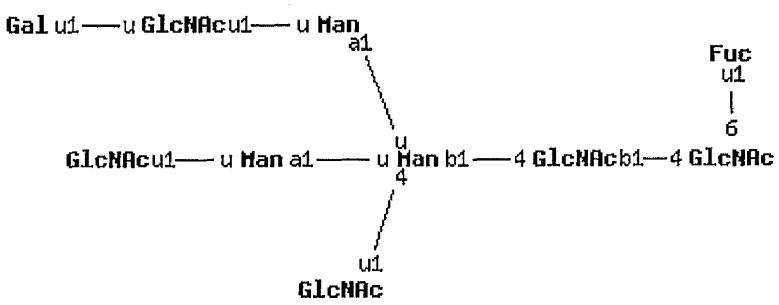
グリカン構造　HSO3(-4)GalNAc(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



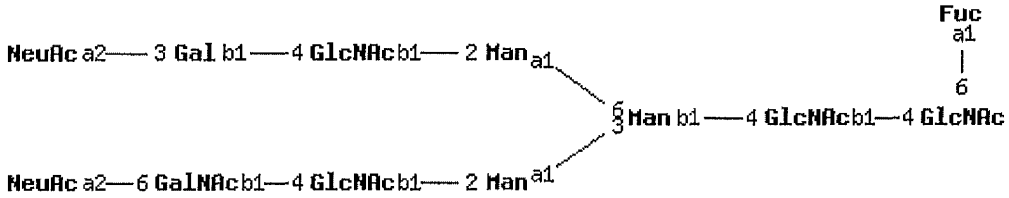
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



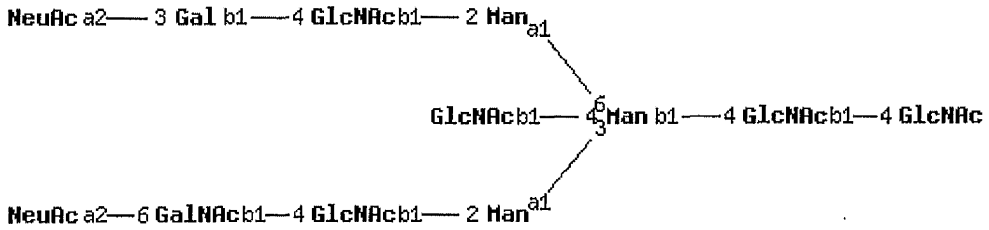
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



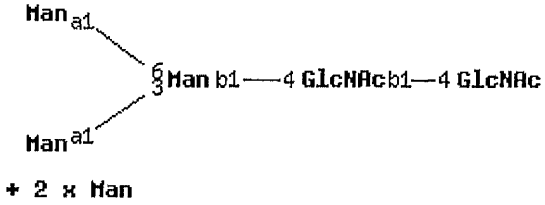
グリカン構造　Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)[GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)][GlcNAc(?1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc



グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[NeuAc(a2-6)GalNAc(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc

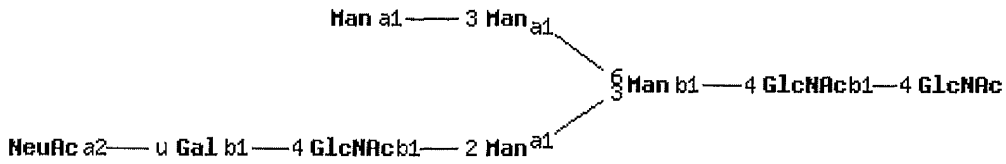


グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[NeuAc(a2-6)GalNAc(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc

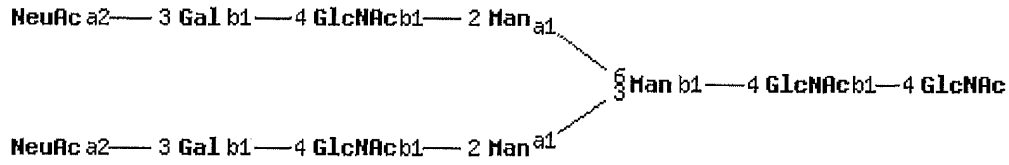


+ 2 x Man

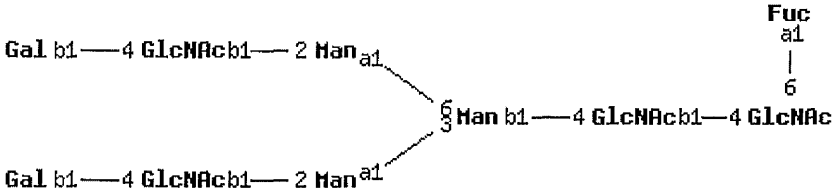
グリカン構造 Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 2 x Man"



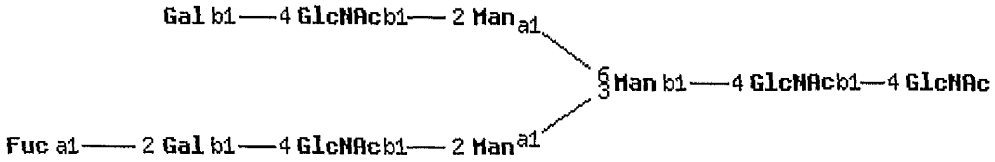
グリカン構造 NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Man(a1-3)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



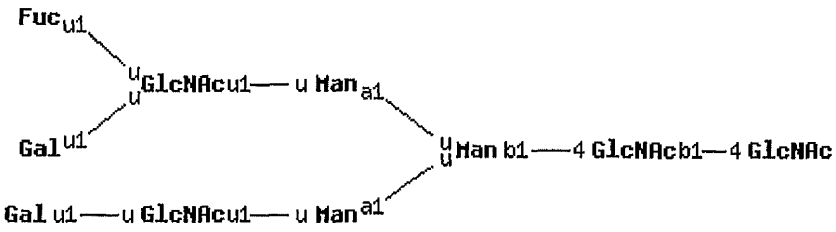
グリカン構造 NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



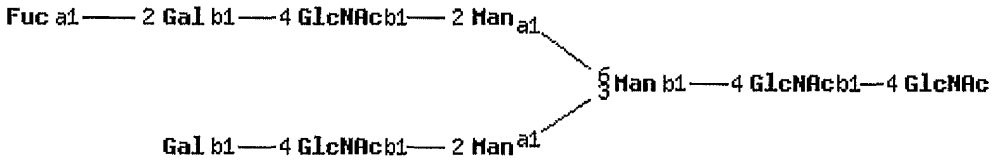
グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



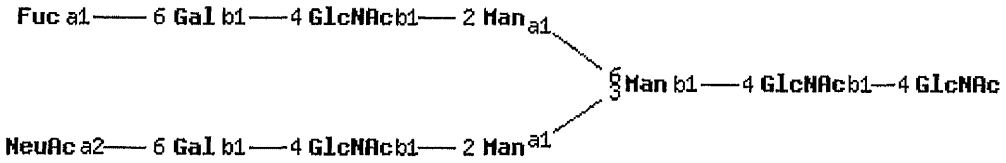
グリカン構造 Fuc(a1-2)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



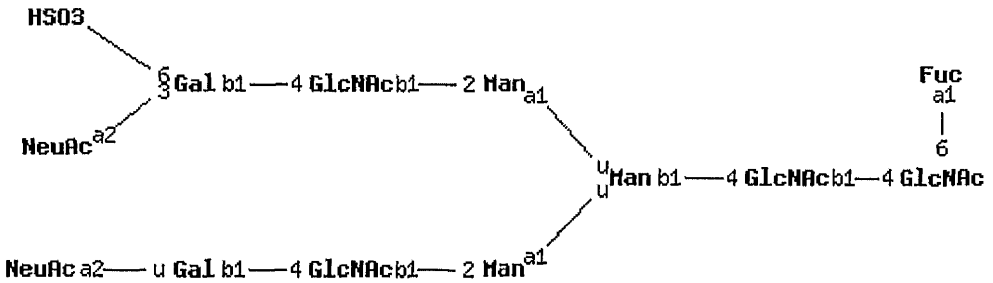
グリカン構造 Fuc(?1-?)[Gal(?1-?)]GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



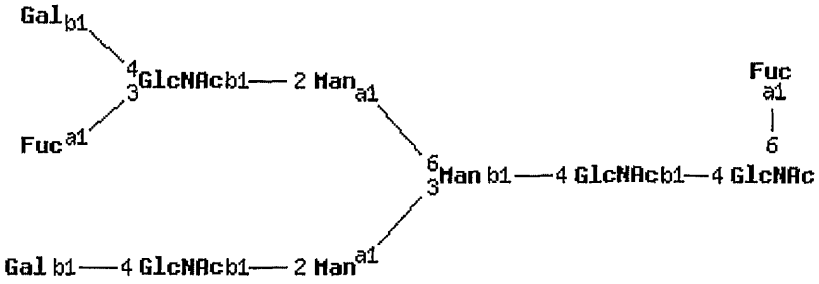
グリカン構造 Fuc(a1-2)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



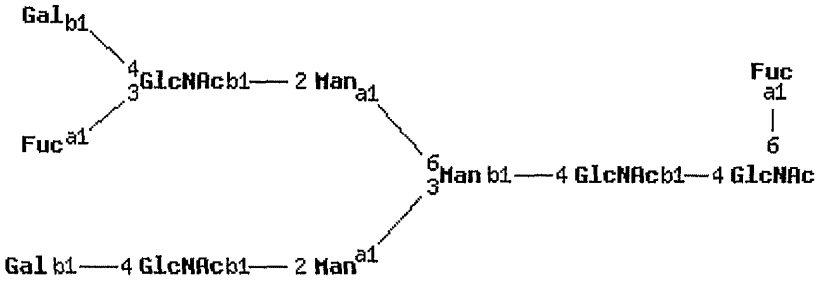
グリカン構造 Fuc(a1-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



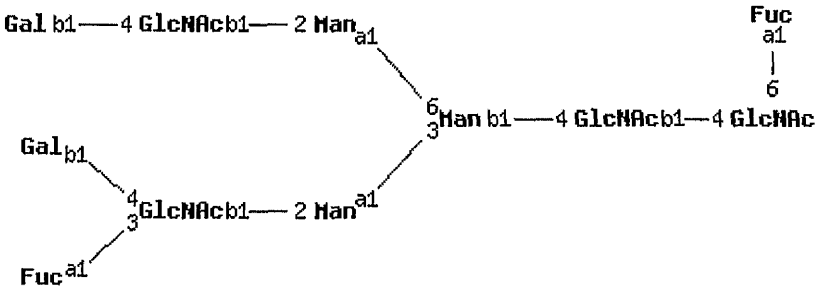
グリカン構造 HSO3(-6)[NeuAc(a2-3)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-?)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



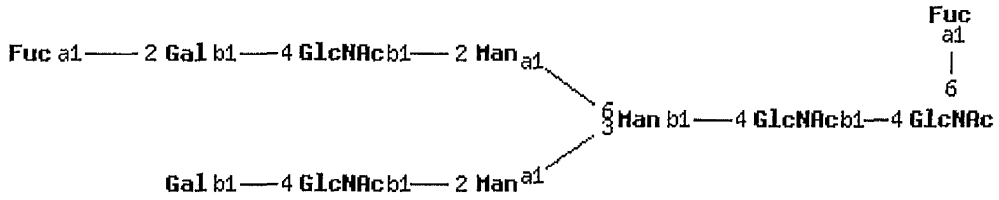
グリカン構造 Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc (b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



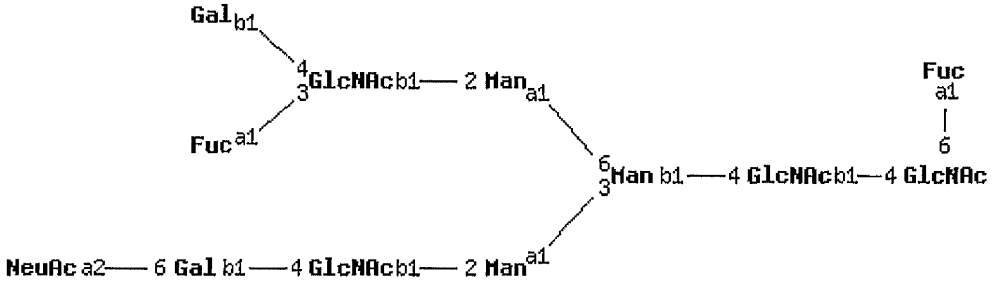
グリカン構造 Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc (b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



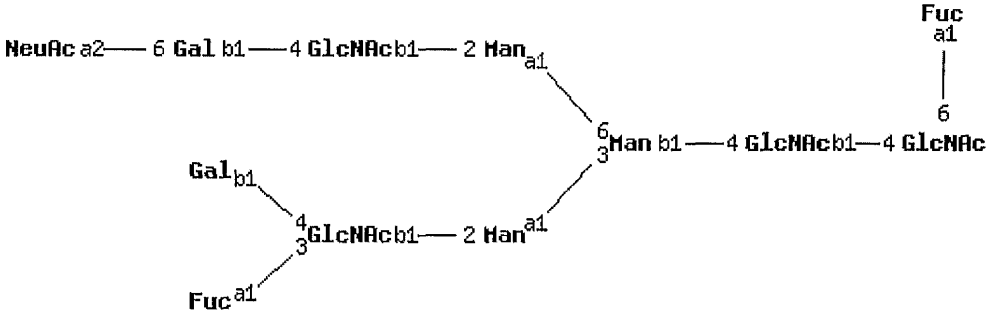
グリカン構造 Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc (b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



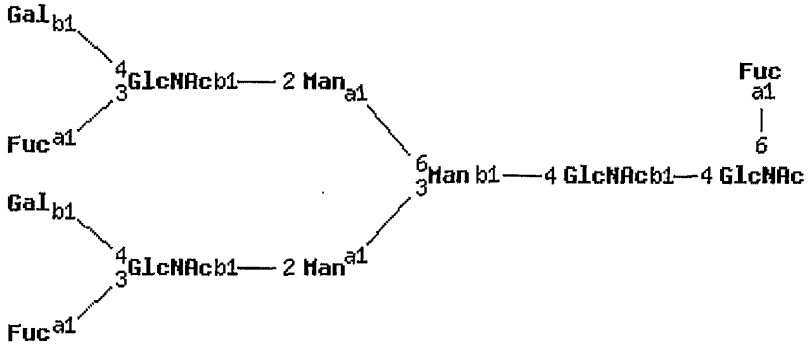
グリカン構造 Fuc(a1-2)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



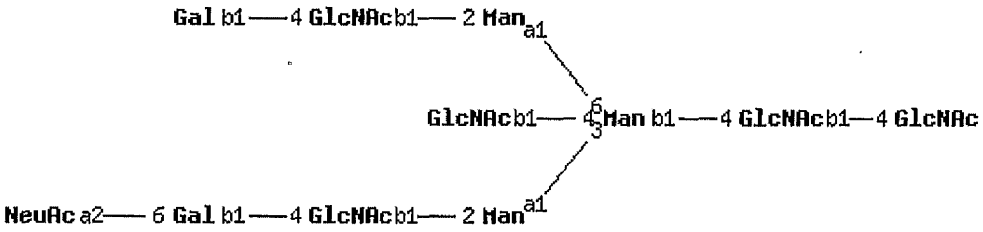
グリカン構造 NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



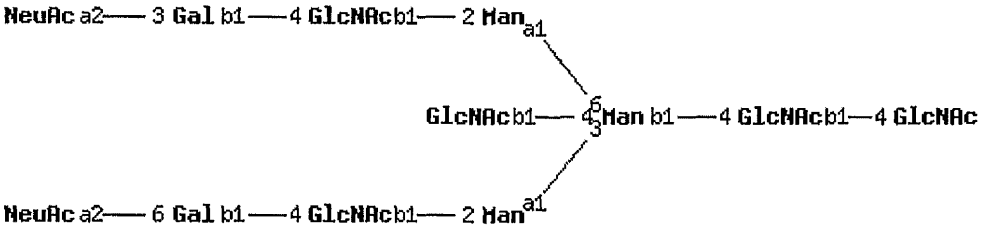
グリカン構造 NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



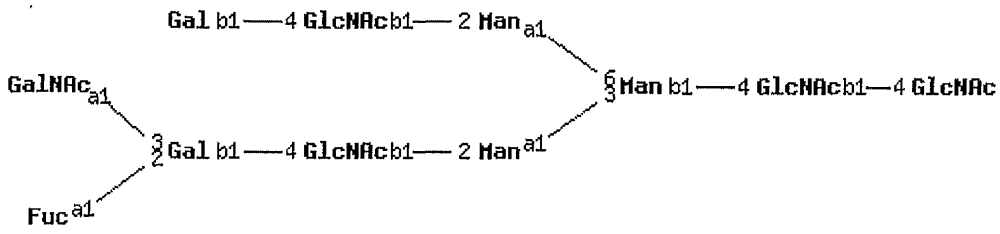
グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



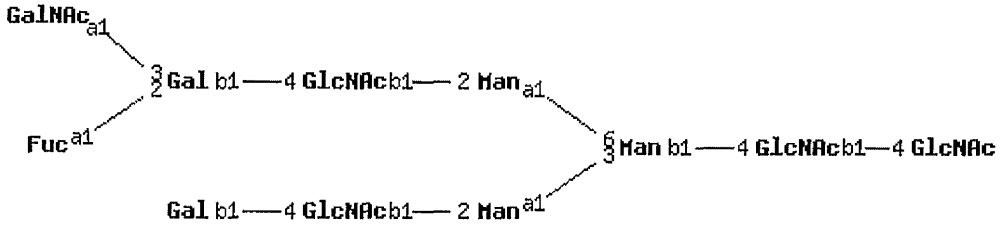
グリカン構造　NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc
(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



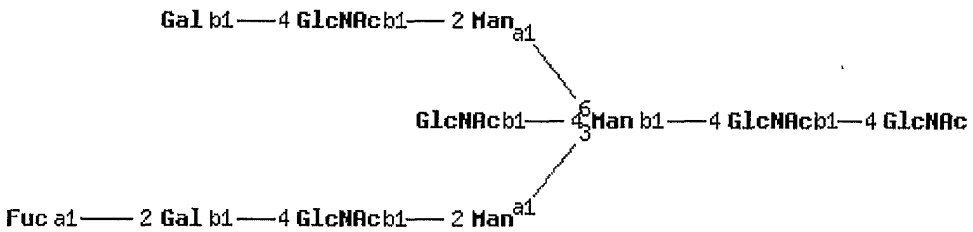
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[NeuAc(a2-6)Gal
(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc
(b1-4)GlcNAc



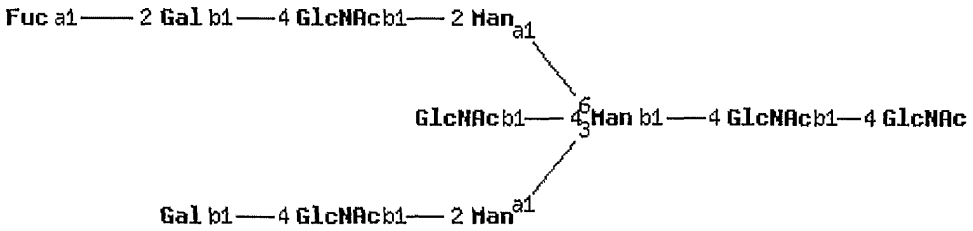
グリカン構造　Fuc(a1-2)[GalNAc(a1-3)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



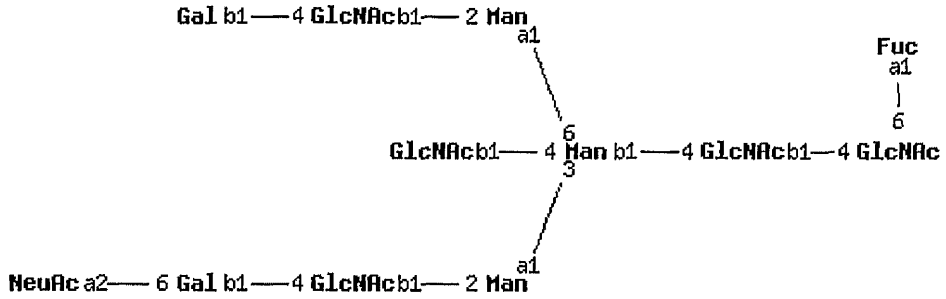
グリカン構造　Fuc(a1-2)[GalNAc(a1-3)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



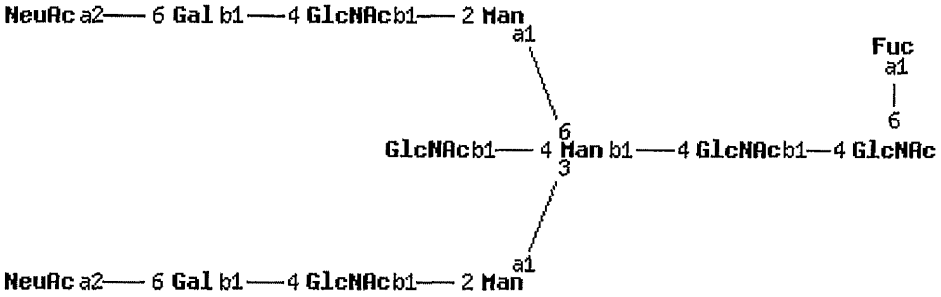
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



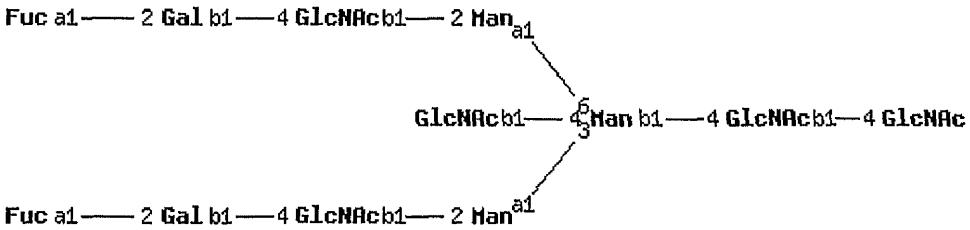
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



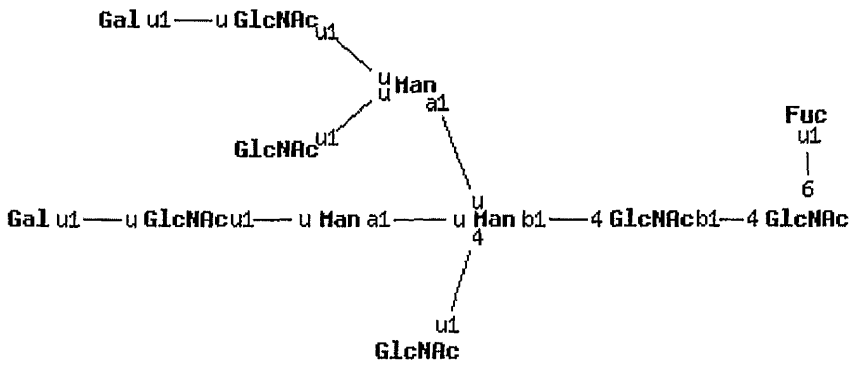
グリカン構造　NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc
(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



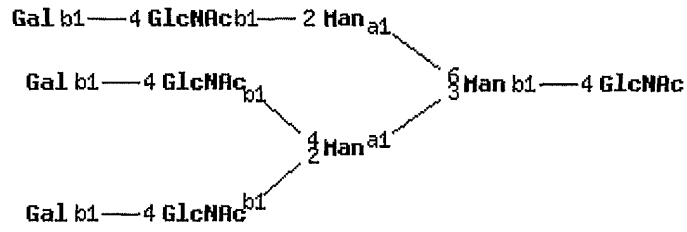
グリカン構造　NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[NeuAc(a2-6)Gal
(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc
(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Fuc(a1-2)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)][GlcNAc(b1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(
b1-4)GlcNAc

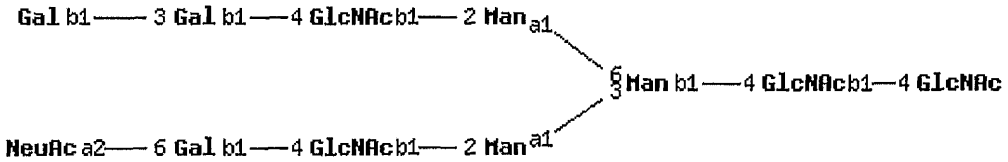


グリカン構造　Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[GlcNAc(?1-?)]Man(a1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)][GlcNAc(?1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc

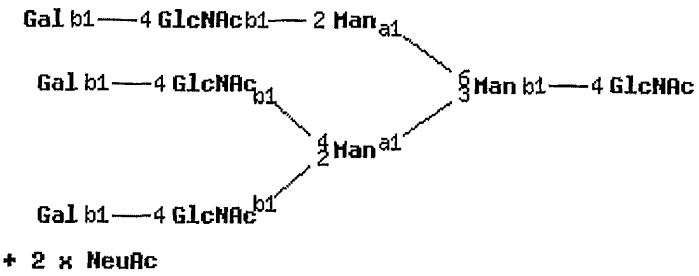


+ NeuAc

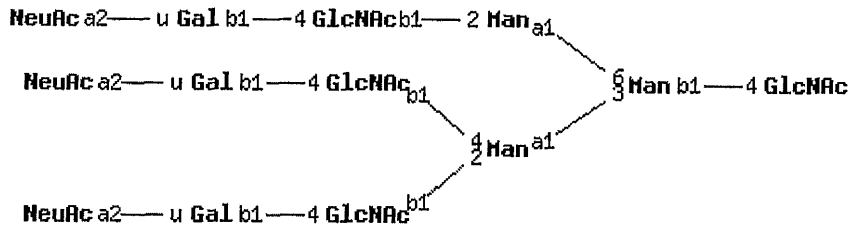
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc+"+NeuAc"



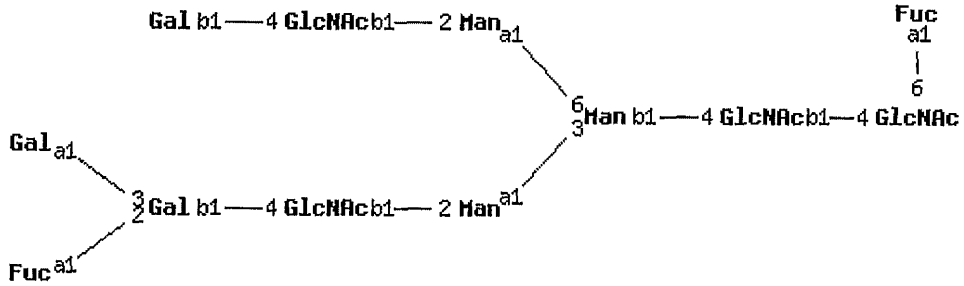
グリカン構造　Gal(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



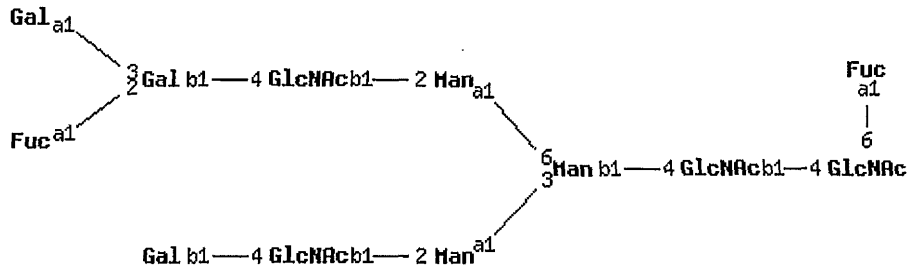
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc+"+ 2 x NeuAc
"



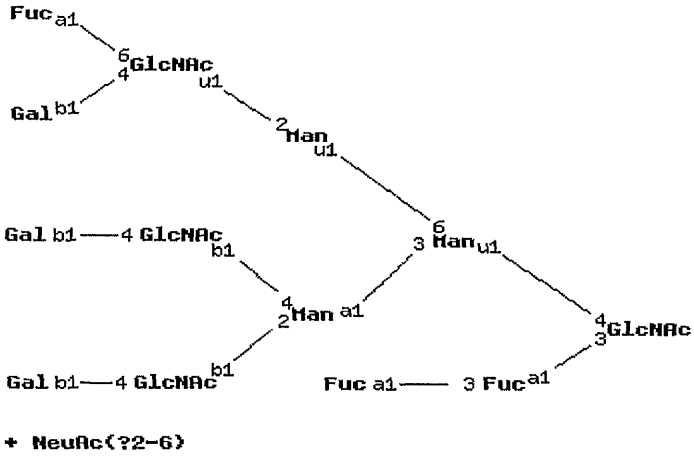
グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc



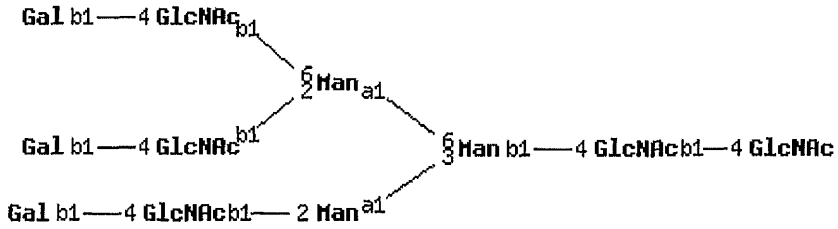
グリカン構造　Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



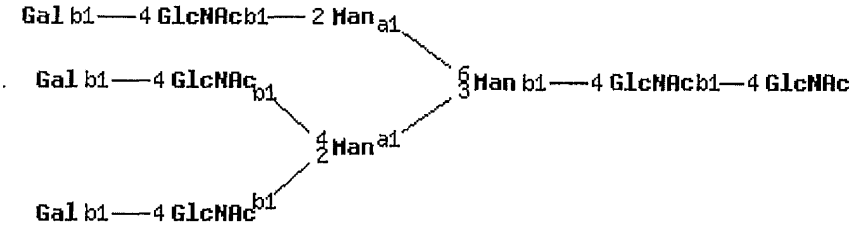
グリカン構造　Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



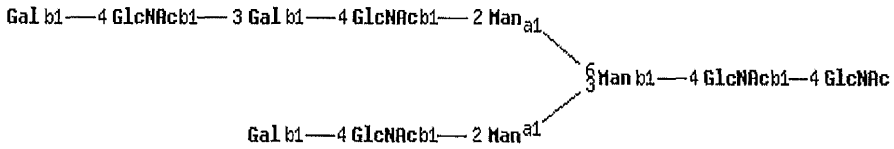
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Fuc(a1-6)[Gal(b1-4)]GlcNAc(?1-2)Man(?1-6)]Man(?1-4)[Fuc(a1-3)Fuc(a1-3)]GlcNAc+"+ NeuAc(?2-6)"



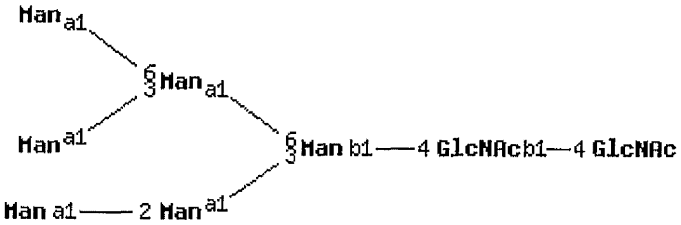
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



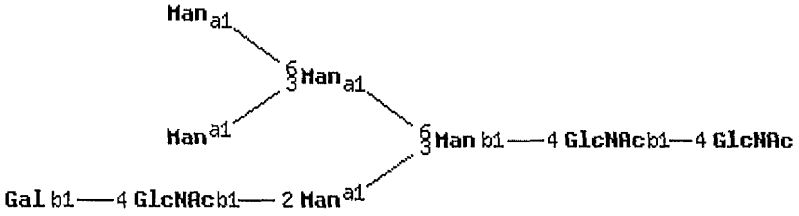
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



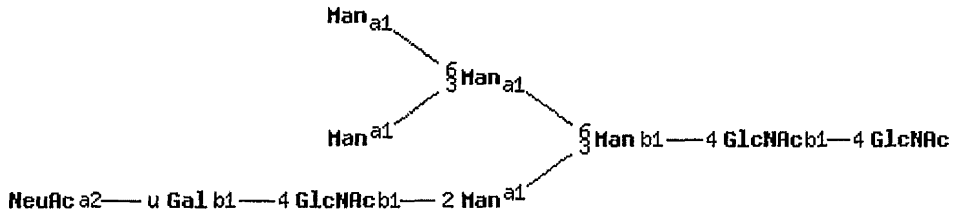
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



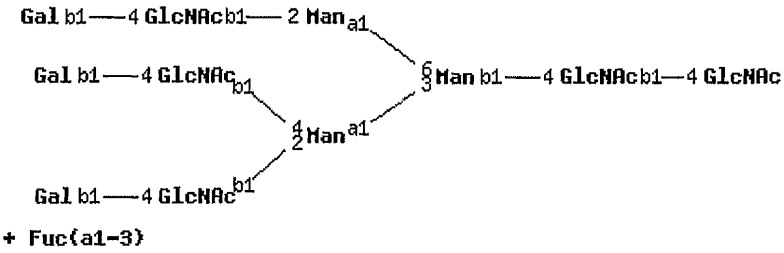
グリカン構造　Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(a1-6)[Man(a1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc

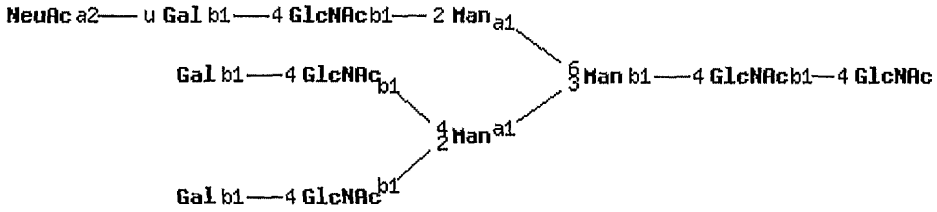


グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Man(a1-3)[Man(a1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc

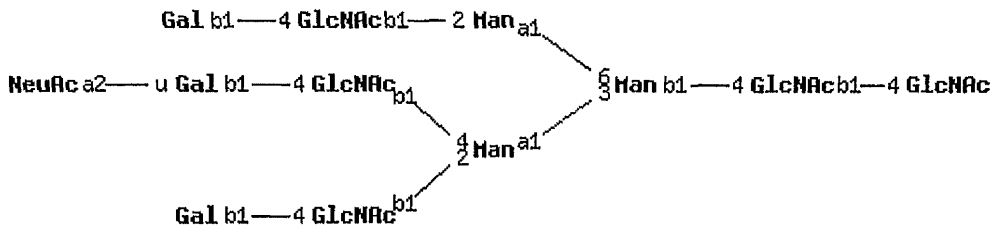


+ Fuc(a1-3)

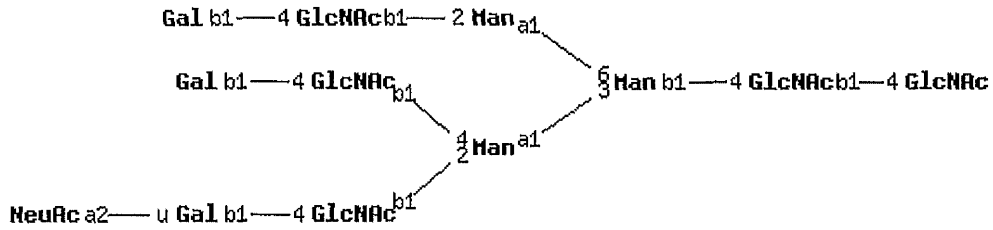
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ Fuc(a1-3)"



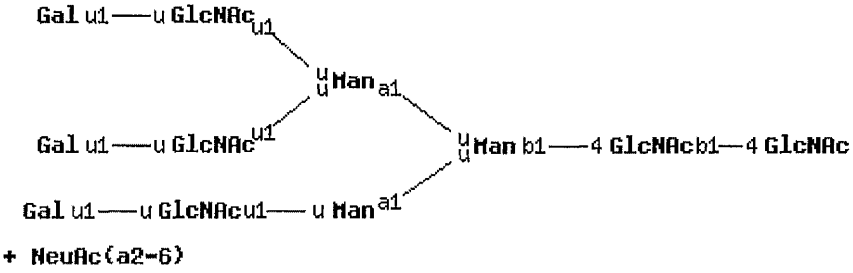
グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



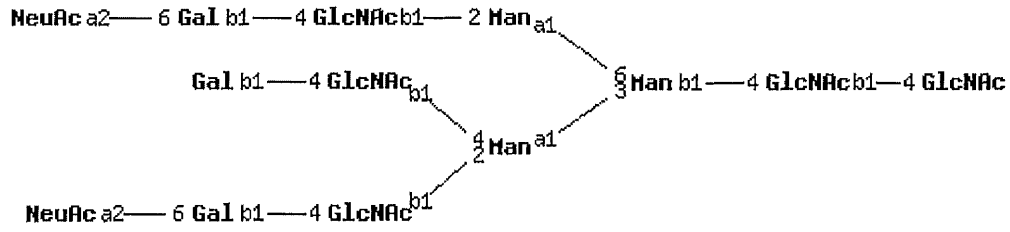
グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



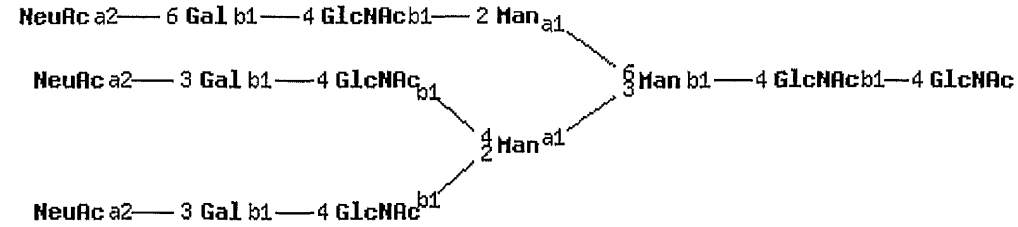
グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



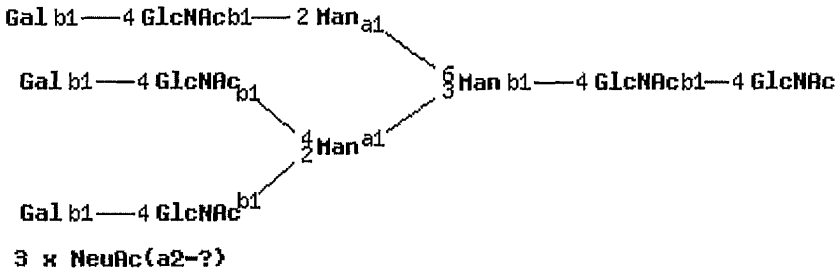
グリカン構造　Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ NeuAc(a2-6)"



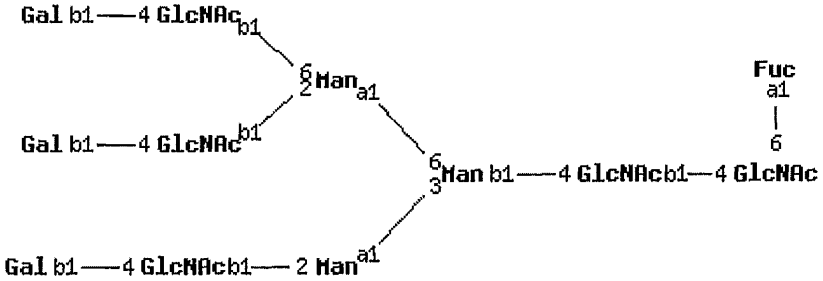
グリカン構造　NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



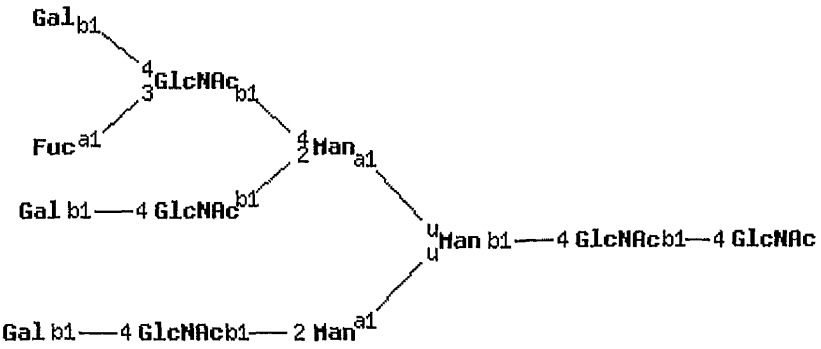
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



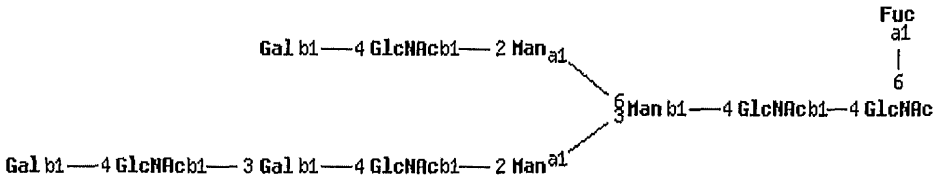
グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal (b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc +"+ 3 x NeuAc(a2-?)"



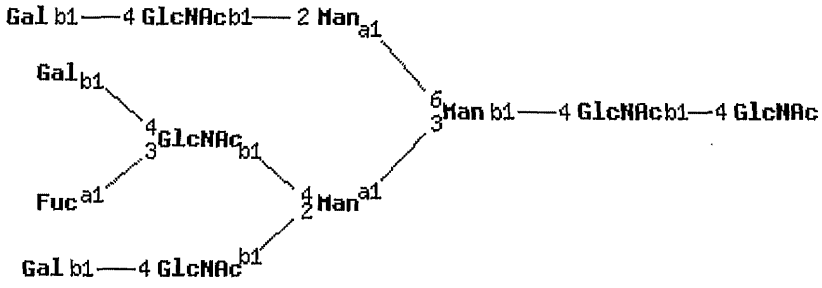
グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)[Gal (b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1 -6)]GlcNAc



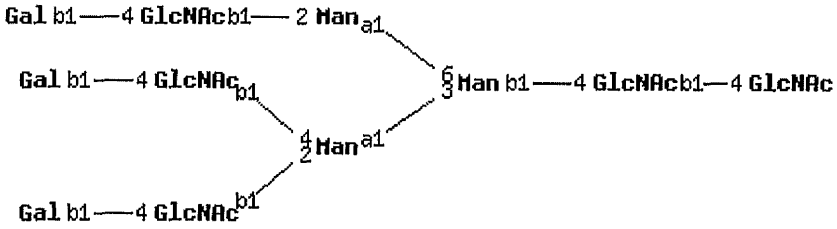
グリカン構造 Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)] Man(a1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc (b1-4)GlcNAc



グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc

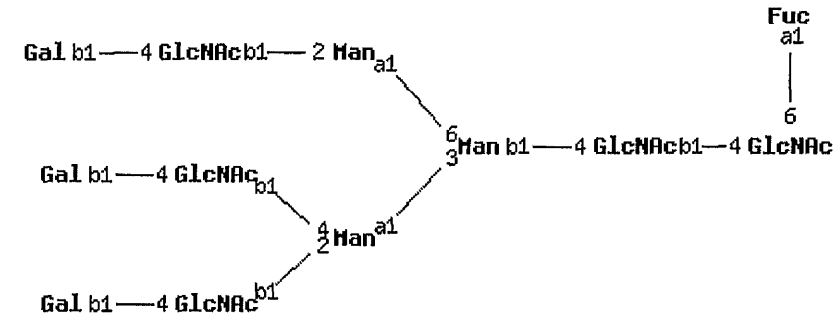


グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc

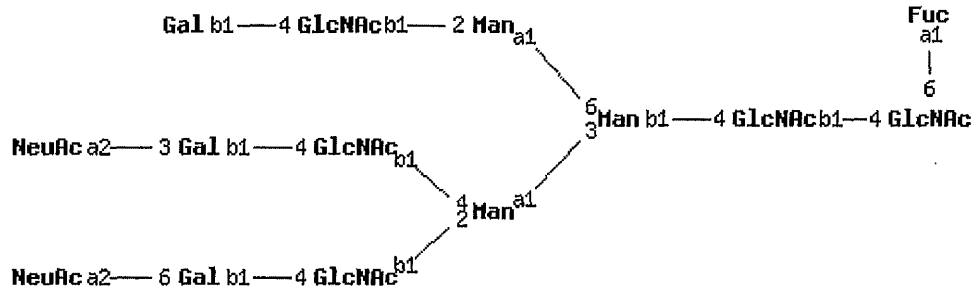


+ Fuc(a1-2)

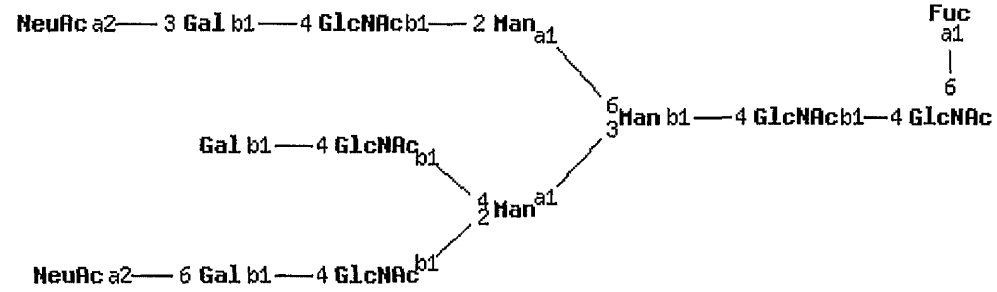
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ Fuc(a1-2)"



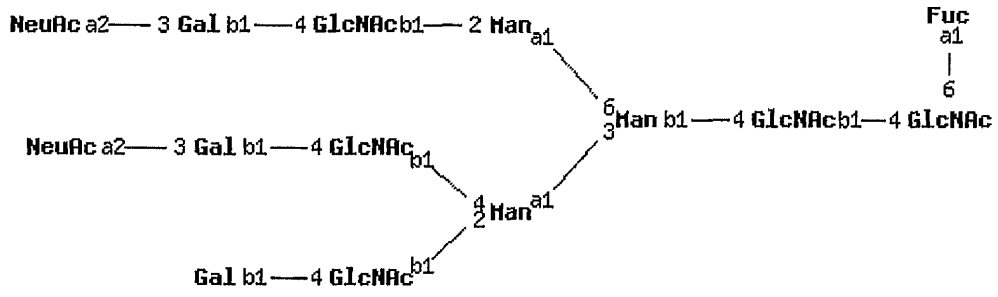
グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ Fuc(a1-3)"



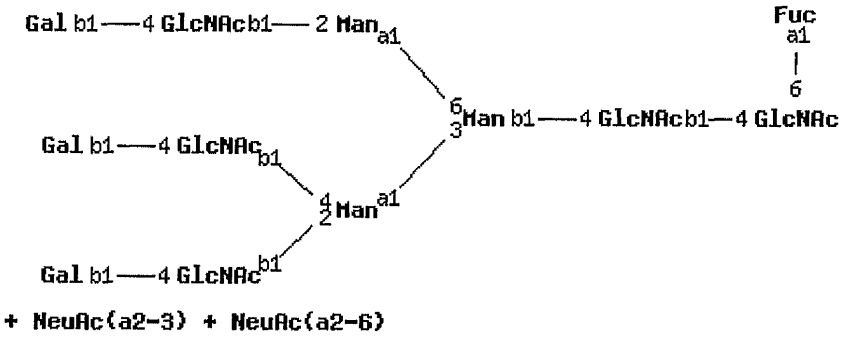
グリカン構造 NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



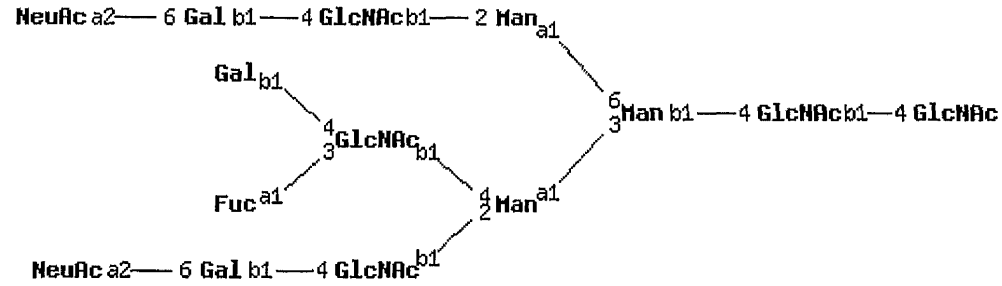
グリカン構造 NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



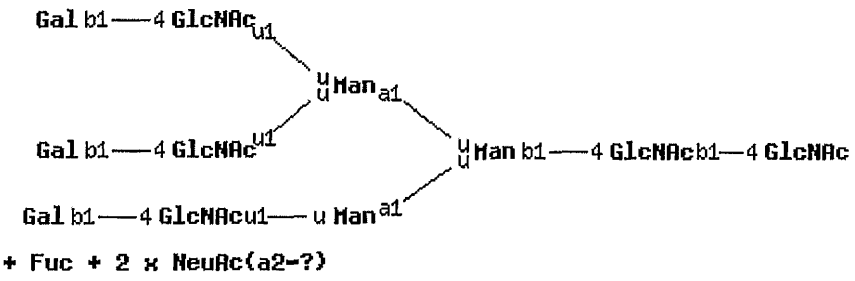
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



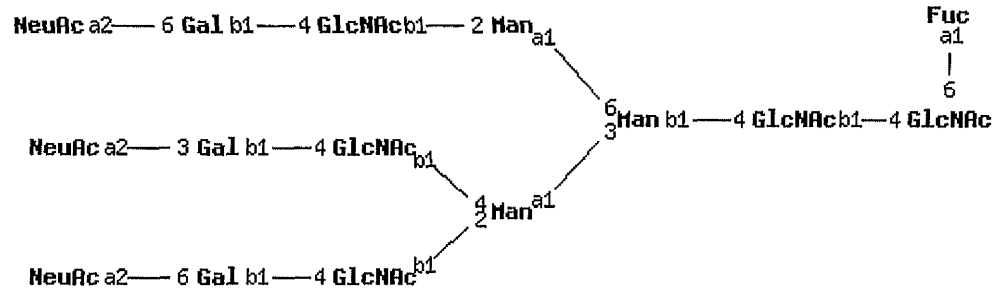
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ NeuAc(a2-3) + NeuAc(a2-6)"



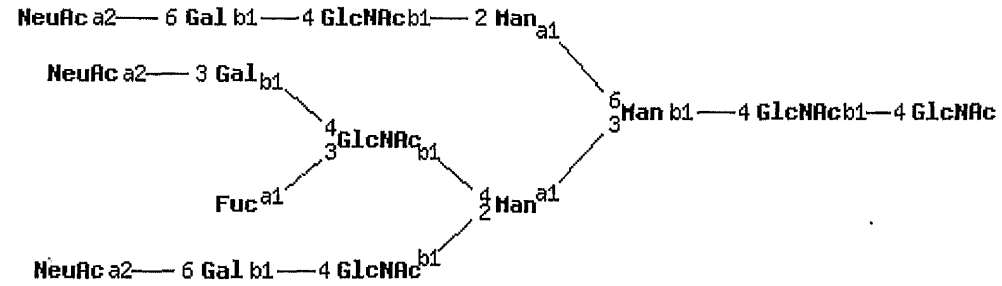
グリカン構造　NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



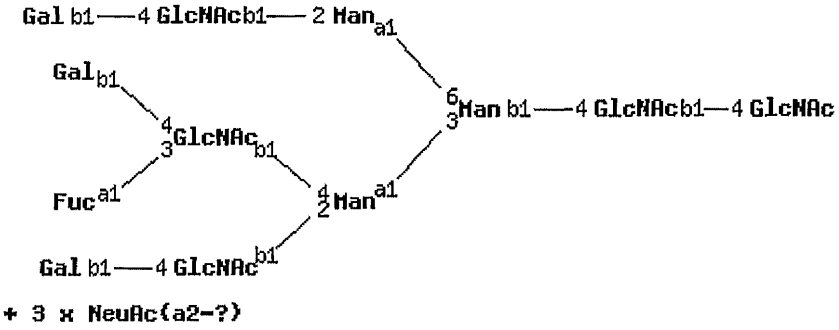
グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-?)[Gal (b1-4)GlcNAc(?1-?)Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc +"+ Fuc + 2 x NeuAc(a2-?)"



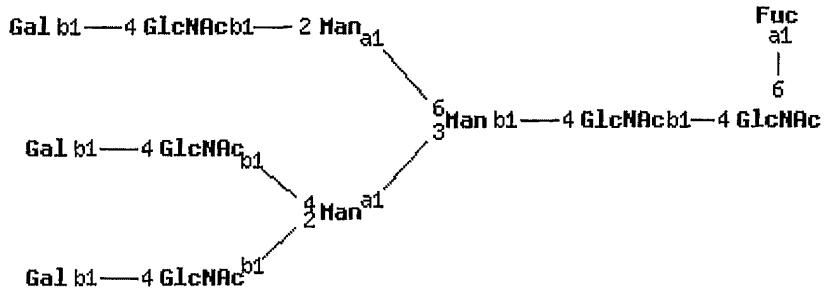
グリカン構造 NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc (b1-2)]Man(a1-3)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1 -6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



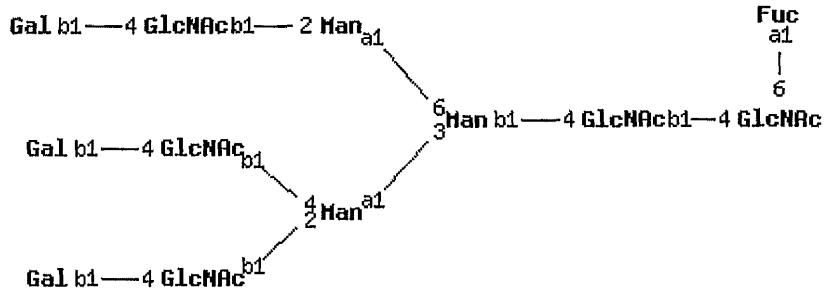
グリカン構造 NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-4)[NeuAc(a2-6) Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc (b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



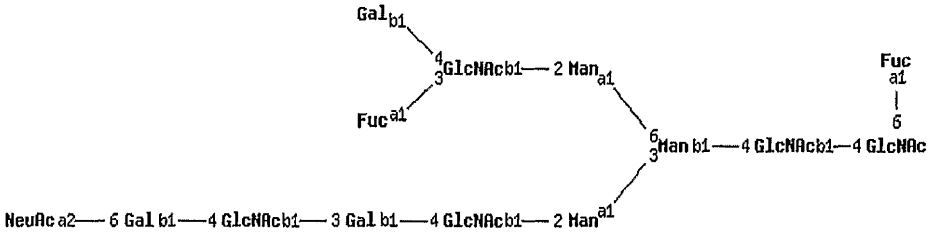
グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 3 x NeuAc(a2-?)"



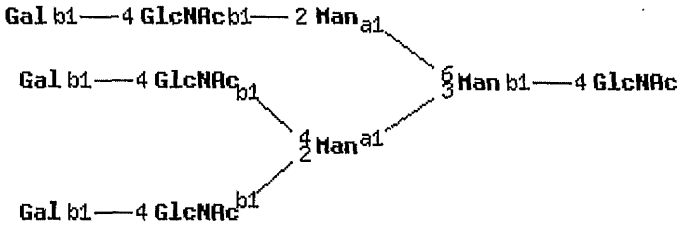
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ HSO3(-6) + 2 x NeuAc(a2-3) + NeuAc(a2-6)"



グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ 2 x HSO3(-6) + 2 x NeuAc(a2-3) + NeuAc(a2-6)"

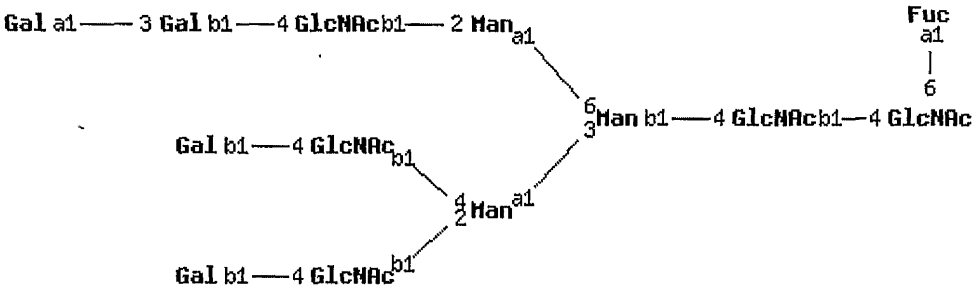


グリカン構造 NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-3)[Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



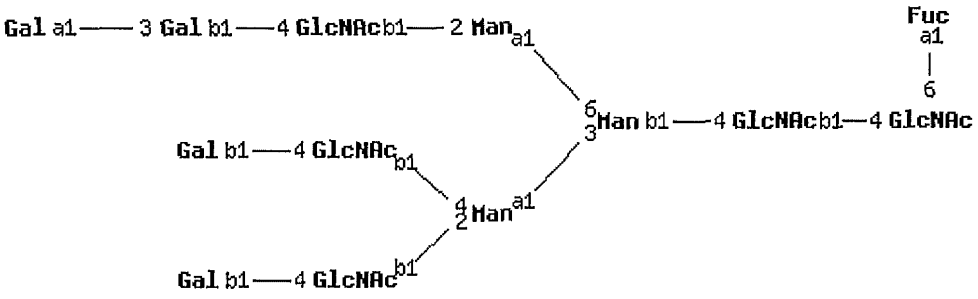
+ Gal(b1-2)GlcNAc(b1-3) + 3 x NeuAc

グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc+"+ Gal(b1-2)GlcNAc(b1-3) + 3 x NeuAc"



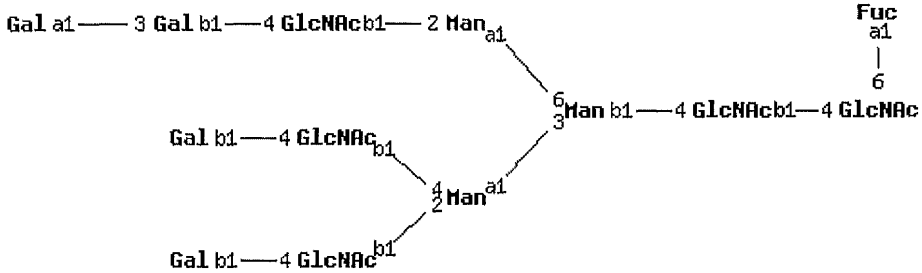
+ NeuAc(a2-?)

グリカン構造 Gal(a1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ NeuAc(a2-?)"



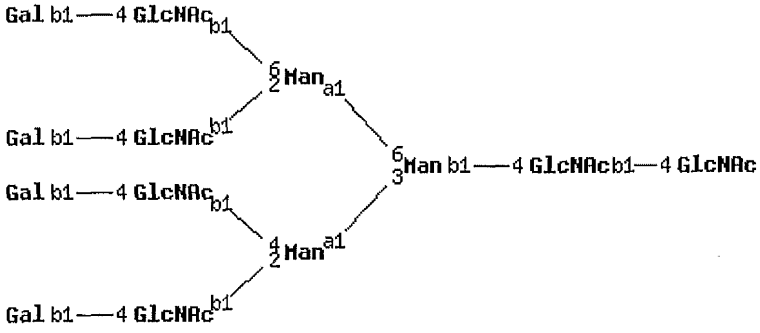
+ NeuAc(a2-3) + NeuAc(a2-6)

グリカン構造　Gal(a1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ NeuAc(a2-3) + NeuAc(a2-6)"

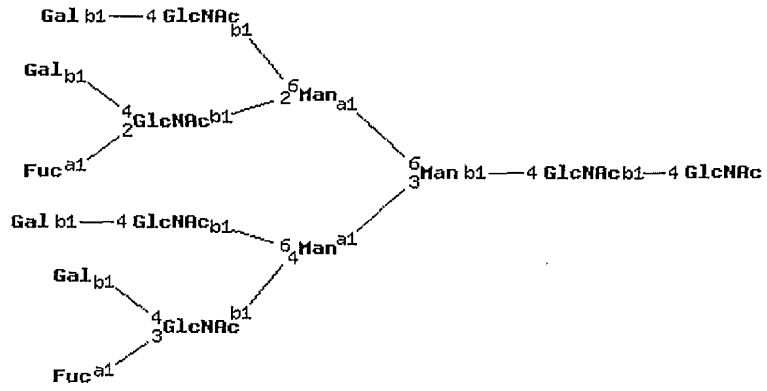


+ HSO3(-6) + 2 x NeuAc(a2-?)

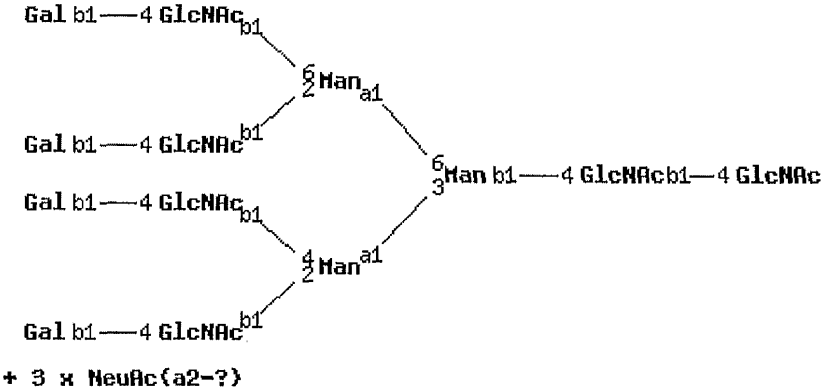
グリカン構造　Gal(a1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ HSO3(-6) + 2 x NeuAc(a2-?)"



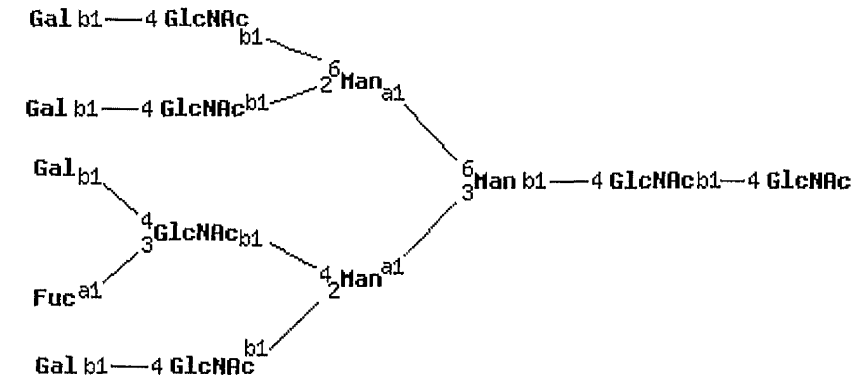
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



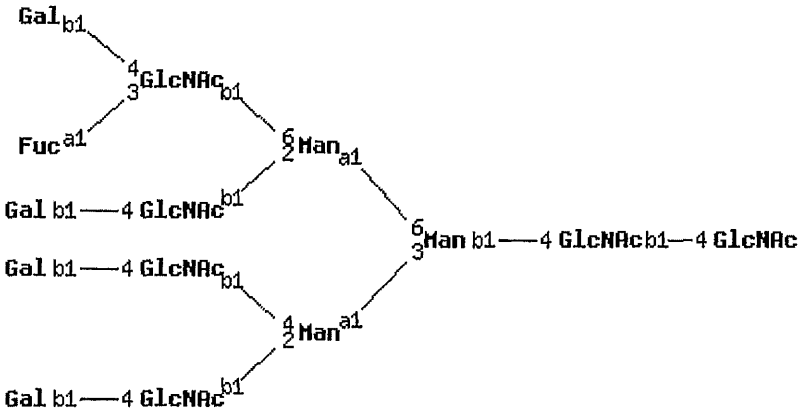
グリカン構造 Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-3)[Fuc(a1-2)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



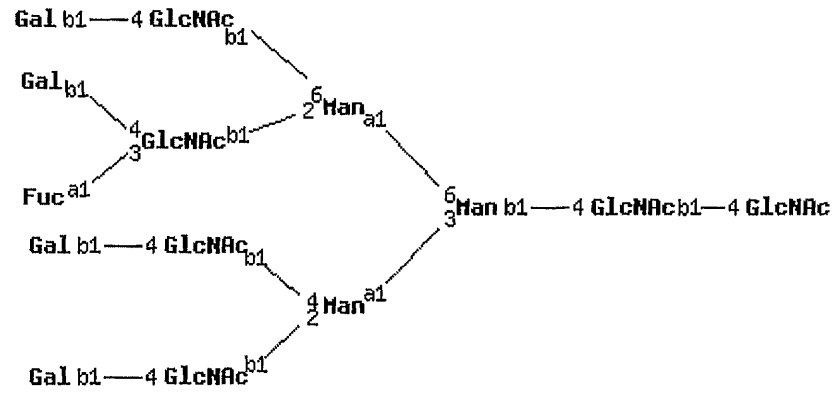
グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 3 x NeuAc(a2-?)"



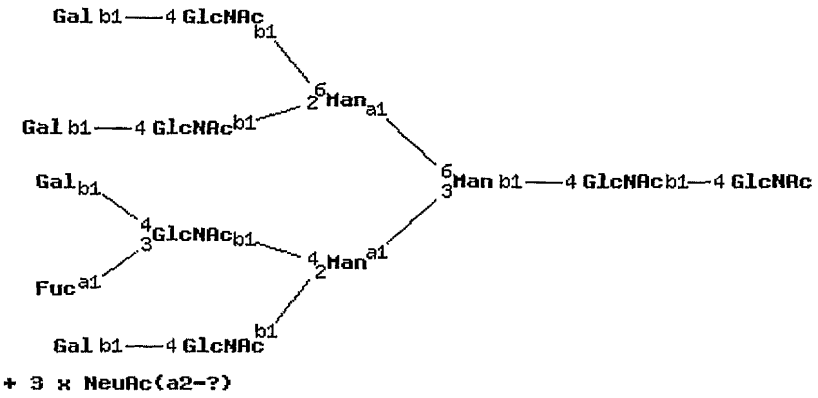
グリカン構造 Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man
(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



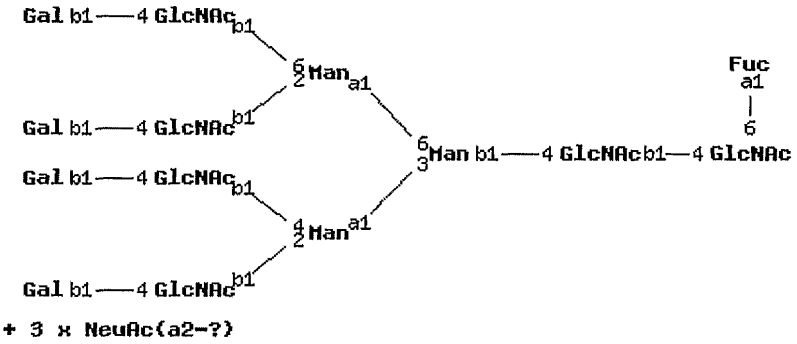
グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



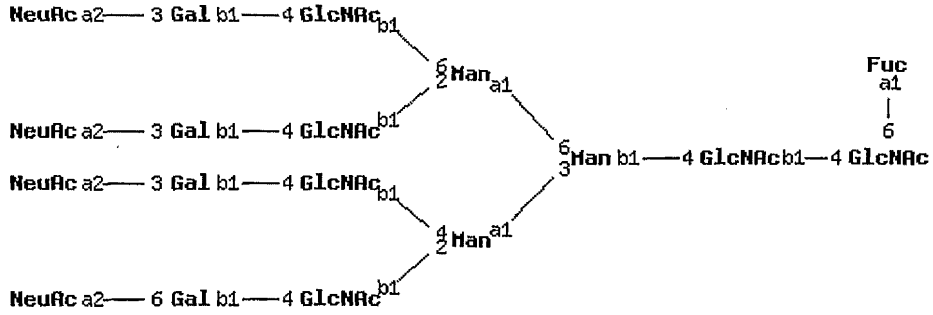
グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



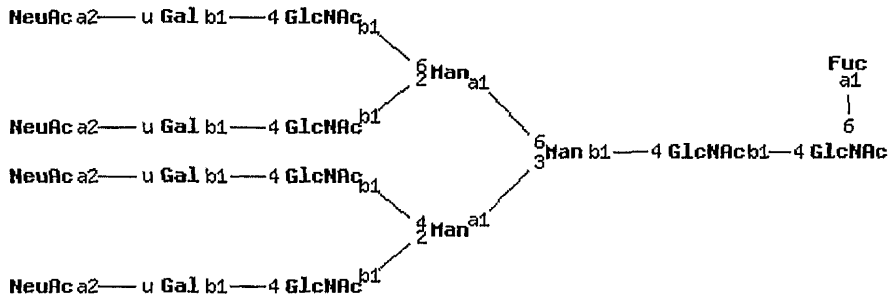
グリカン構造 Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 3 x NeuAc(a2-?)"



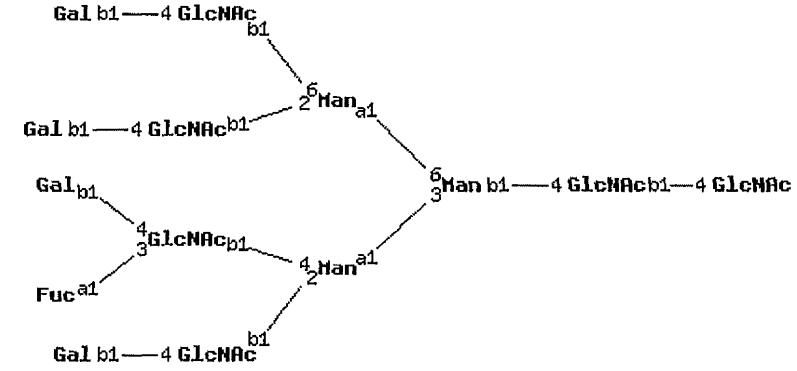
グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ 3 x NeuAc(a2-?)"



グリカン構造 NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)[NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc

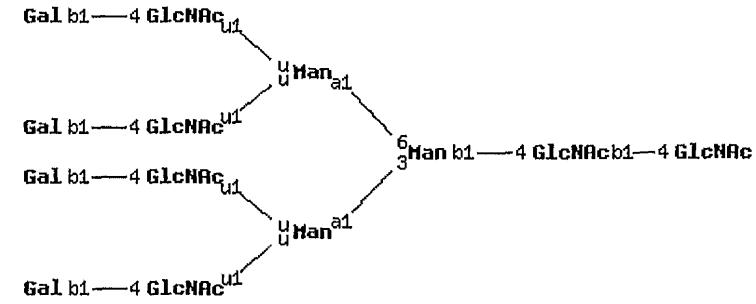


グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)][NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-3)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



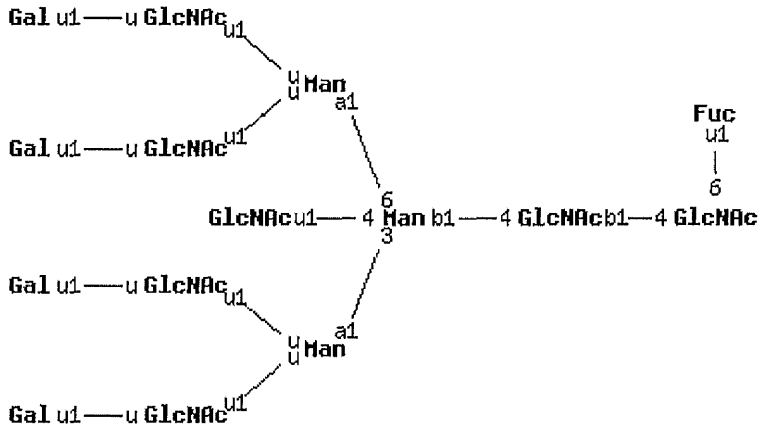
+ 4 x NeuAc(a2-?)

グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 4 x NeuAc(a2-?)"

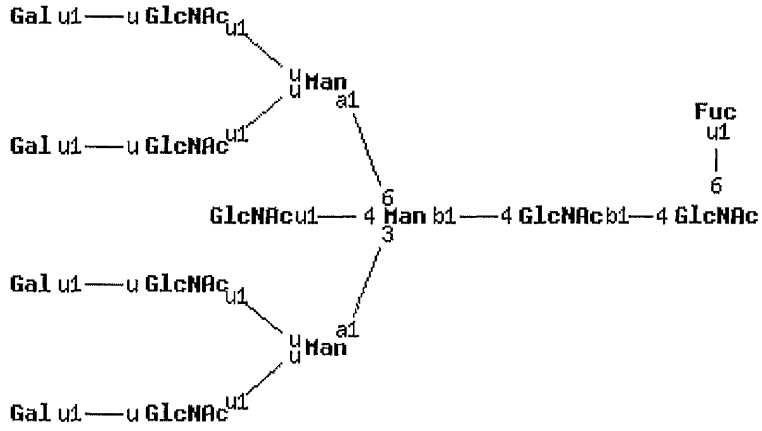


+ 2 x Fuc

グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 2 x Fuc"

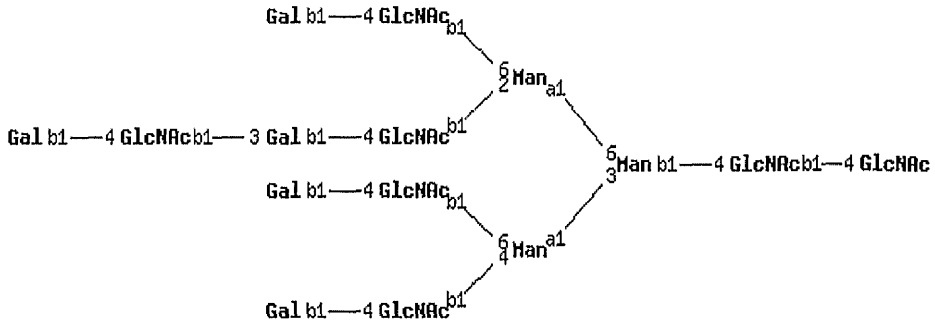


グリカン構造　Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)][GlcNAc(?1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc

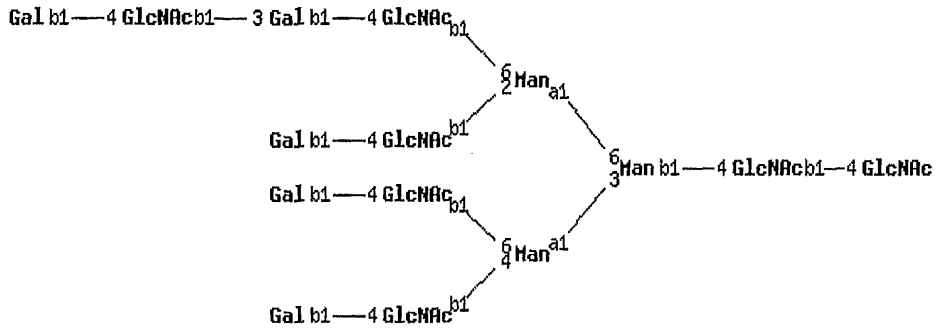


+ Fuc

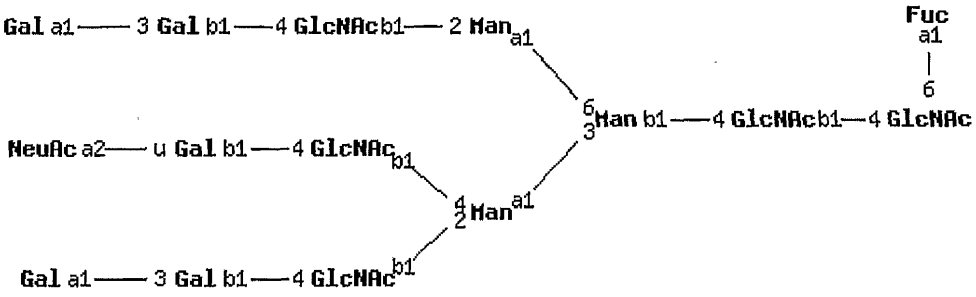
グリカン構造　Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)][GlcNAc(?1-4)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(?1-6)]GlcNAc+"+ Fuc"



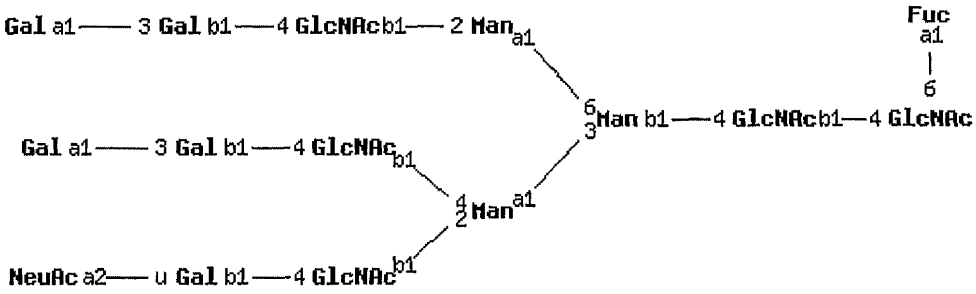
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



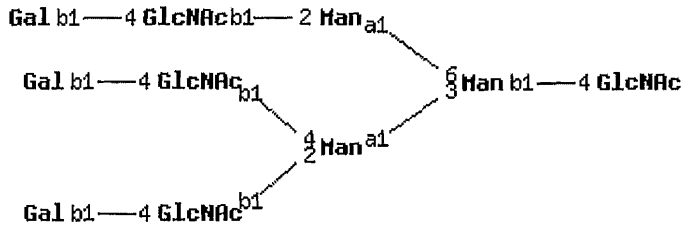
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc



グリカン構造 Gal(a1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(a1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc

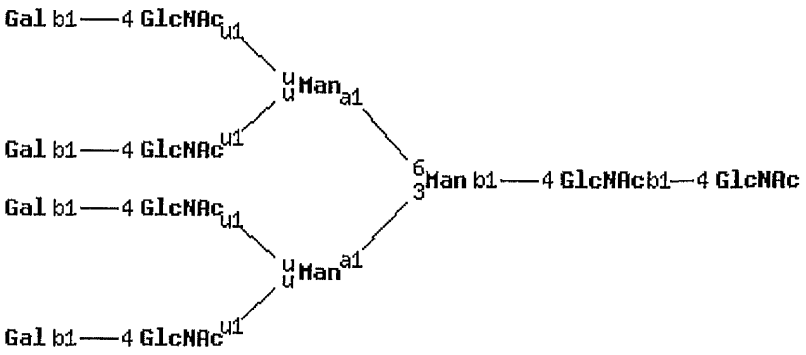


グリカン構造 Gal(a1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)[NeuAc(a2-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-3)[Gal(a1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc



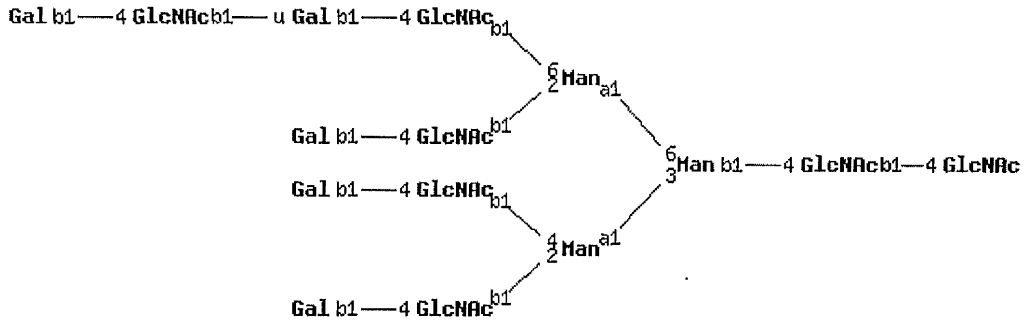
+ 2 x Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3) + 2 x NeuAc

グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc+"+ 2 x Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3) + 2 x NeuAc"



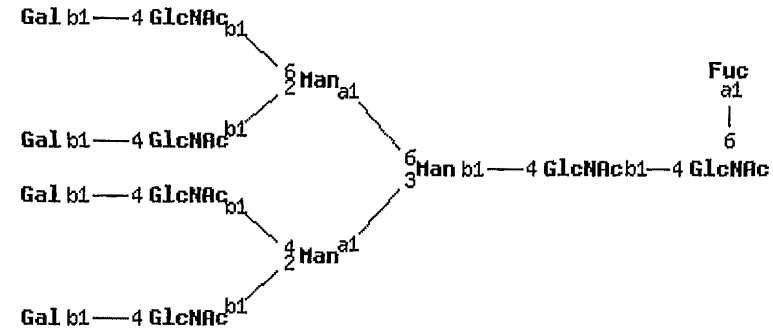
+ Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?) + 4 x NeuAc(a2-?)

グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?) + 4 x NeuAc(a2-?)"



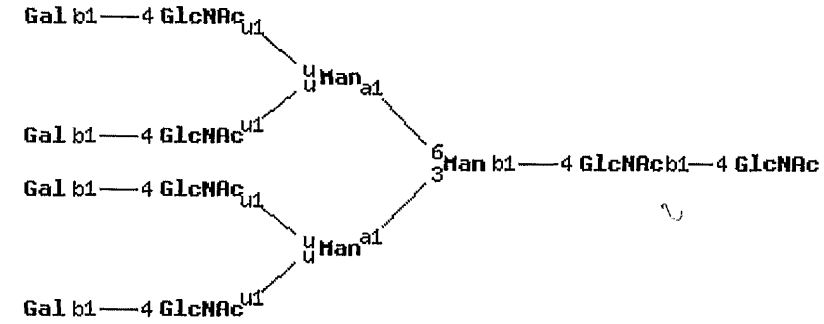
+ 5 x NeuAc(a2-?)

グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)]Man(a1-6)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 5 x NeuAc(a2-?)"



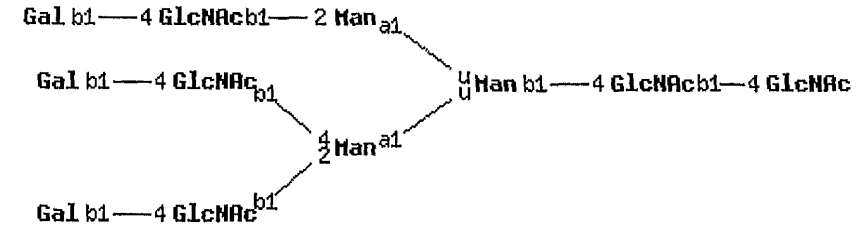
+ Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)

グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)[Fuc(a1-6)]GlcNAc+"+ Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)"



+ 2 x Fuc + Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)

グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)]Man(a1-6)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 2 x Fuc + Gal(b1-4)GlcNAc(?1-?)"



+ 2 x Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3) + Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)

グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-4)]Man(a1-?)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-2)Man(a1-?)]Man(b1-4)GlcNAc(b1-4)GlcNAc+"+ 2 x Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3) + Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)"

【０３８４】

一つの態様において、本発明のタンパク質またはキメラ分子は、O-結合型分画（P_{20}）において少なくとも一つの以下の構造を含む。これらの表記において、「u」または「?」は、アノマー立体配置がaまたはbであり、および／または連結の位置が2、3、4および／または6であることを表す。

Fuc

グリカン構造 Fuc

Glc u1——u Fuc

グリカン構造 Glc(?1-?)Fuc

GlcNAc

グリカン構造 GlcNAc

GalNAc

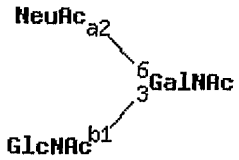
グリカン構造 GalNAc

NeuAc a2—6 GalNAc

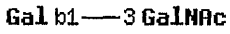
グリカン構造 NeuAc(a2-6)GalNAc

GlcNAcb1—3 GalNAc

グリカン構造 GlcNAc(b1-3)GalNAc

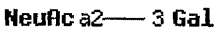


グリカン構造　GlcNAc(b1-3)[NeuAc(a2-6)]GalNAc



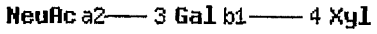
グリカン構造　Gal(b1-3)GalNAc

グリカン構造　Gal



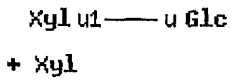
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal

グリカン構造　Xyl(?1-?)Glc



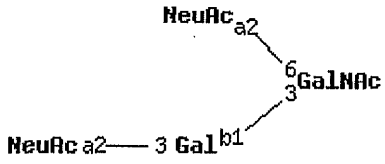
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)Xyl

グリカン構造　Xyl(?1-?)Glc

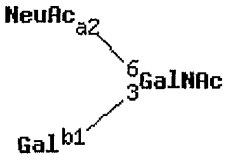


グリカン構造　Xyl(?1-?)Glc+"+ Xyl"

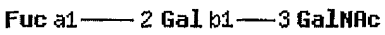
グリカン構造　　NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)GalNAc



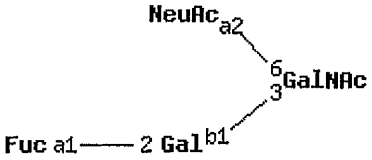
グリカン構造　　NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)[NeuAc(a2-6)]GalNAc



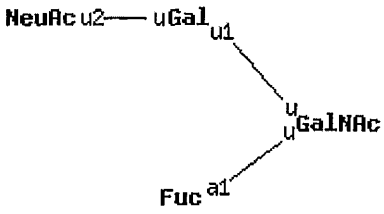
グリカン構造　　Gal(b1-3)[NeuAc(a2-6)]GalNAc



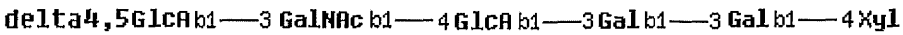
グリカン構造　　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)GalNAc



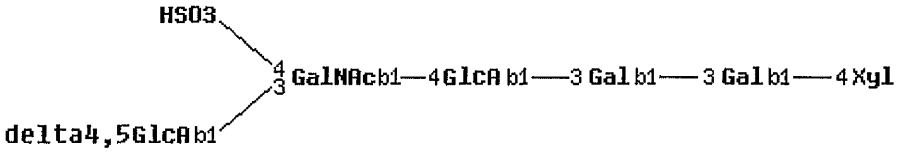
グリカン構造　　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)[NeuAc(a2-6)]GalNAc



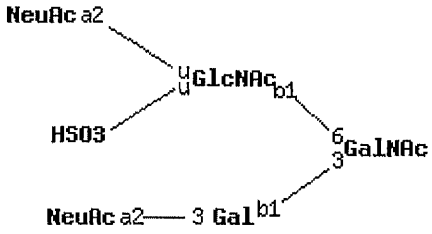
グリカン構造　　NeuAc(?2-?)Gal(?1-?)[Fuc(a1-?)]GalNAc



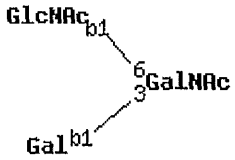
グリカン構造　delta4,5GlcA(b1-3)GalNAc(b1-4)GlcA(b1-3)Gal(b1-3)Gal(b1-4)Xyl



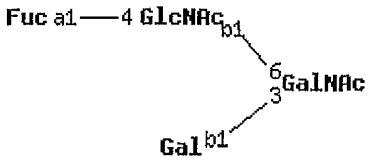
グリカン構造　delta4,5GlcA(b1-3)[HSO3(-4)]GalNAc(b1-4)GlcA(b1-3)Gal(b1-3)Gal(b1-4)Xyl



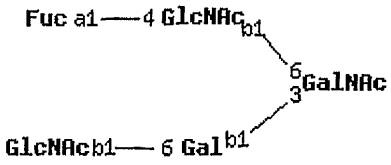
グリカン構造　HSO3(-?)[NeuAc(a2-?)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



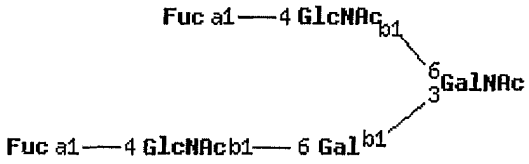
グリカン構造　Gal(b1-3)[GlcNAc(b1-6)]GalNAc



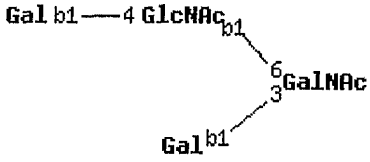
グリカン構造　Fuc(a1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



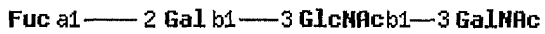
グリカン構造　　Fuc(a1-4)GlcNAc(b1-6)[GlcNAc(b1-6)Gal(b1-3)]GalNAc



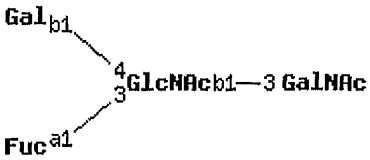
グリカン構造　　Fuc(a1-4)GlcNAc(b1-6)Gal(b1-3)[Fuc(a1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



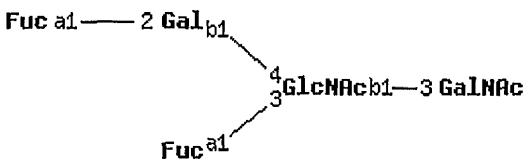
グリカン構造　　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



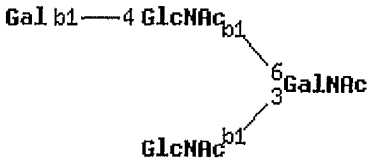
グリカン構造　　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)GalNAc



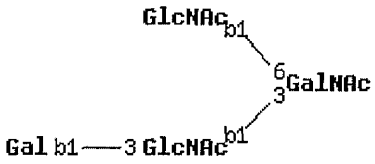
グリカン構造　　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-3)GalNAc



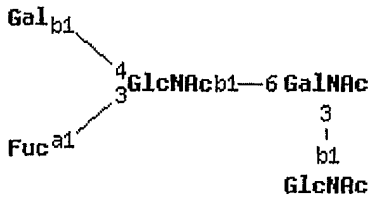
グリカン構造　　Fuc(a1-2)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-3)GalNAc



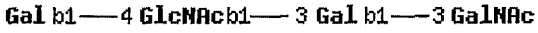
グリカン構造　　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[GlcNAc(b1-3)]GalNAc



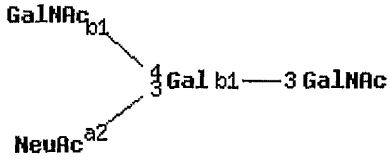
グリカン構造　　Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)[GlcNAc(b1-6)]GalNAc



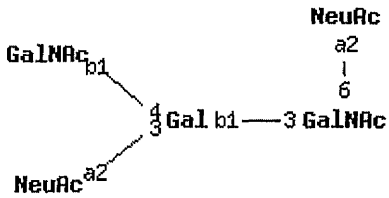
グリカン構造　　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-6)[GlcNAc(b1-3)]GalNAc



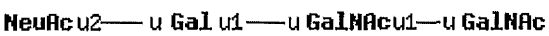
グリカン構造　　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-3)GalNAc



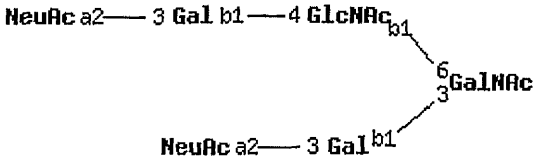
グリカン構造　　GalNAc(b1-4)[NeuAc(a2-3)]Gal(b1-3)GalNAc



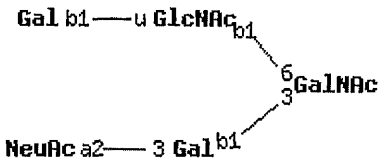
グリカン構造　　GalNAc(b1-4)[NeuAc(a2-3)]Gal(b1-3)[NeuAc(a2-6)]GalNAc



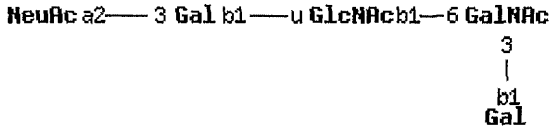
グリカン構造　　NeuAc(?2-?)Gal(?1-?)GalNAc(?1-?)GalNAc



グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc

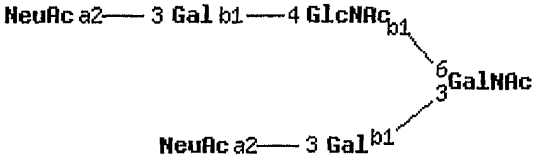


グリカン構造　Gal(b1-?)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc

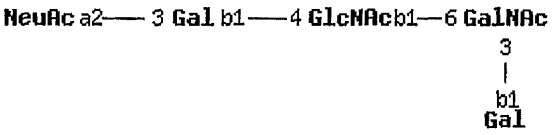


グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-?)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc

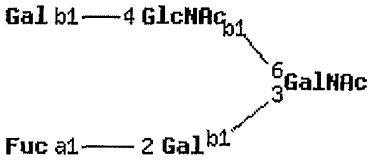
グリカン構造　NeuAc(a2-?)Gal(b1-?)GlcNAc(b1-?)Gal(?1-?)GalNAc



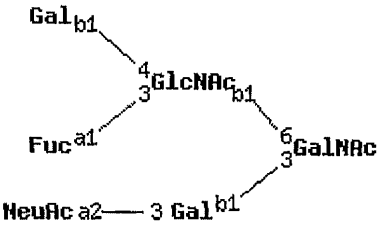
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



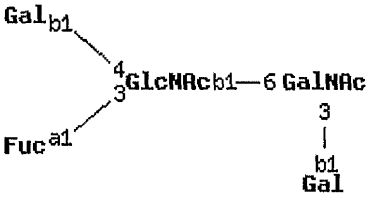
グリカン構造　　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



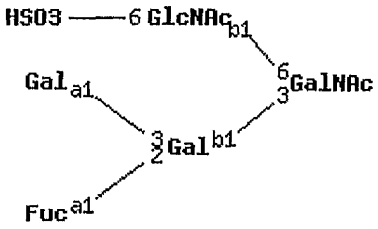
グリカン構造　　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



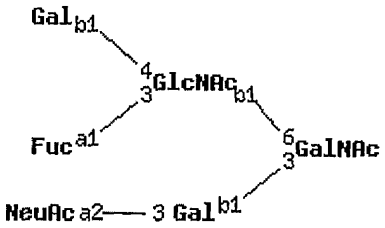
グリカン構造　　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



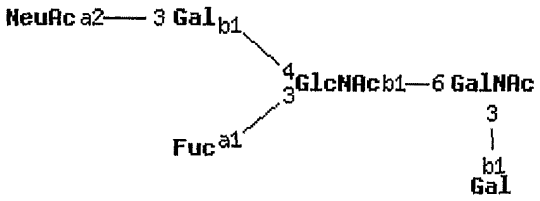
グリカン構造　　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



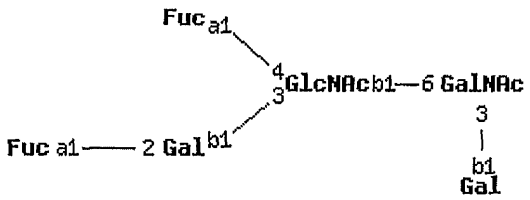
グリカン構造　　Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-3)[HSO3(-6)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



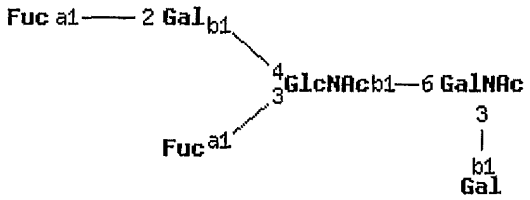
グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



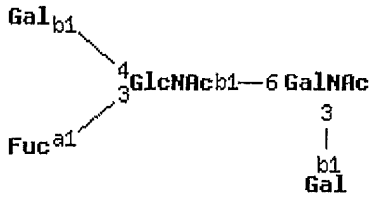
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)[Fuc(a1-4)]GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc

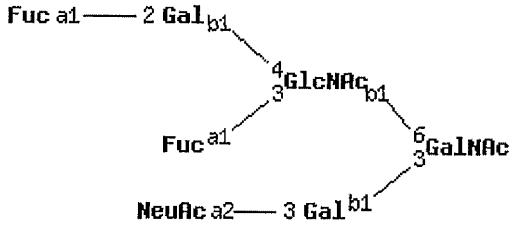


グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc

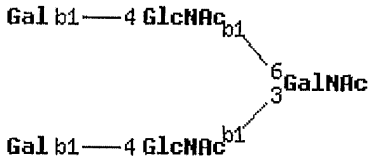


+Fuc(a1-2)

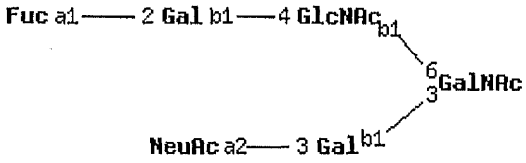
グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc+"+Fuc(a1-2)"



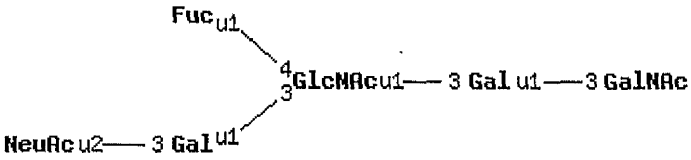
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



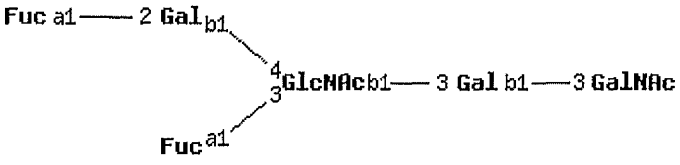
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



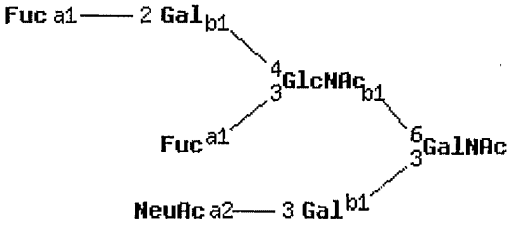
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



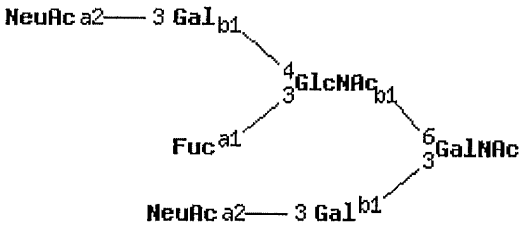
グリカン構造　NeuAc(?2-3)Gal(?1-3)[Fuc(?1-4)]GlcNAc(?1-3)Gal(?1-3)GalNAc



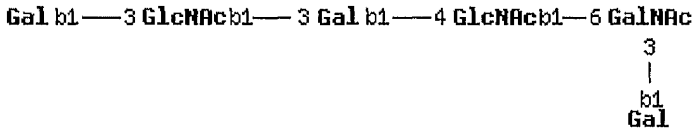
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-3)Gal(b1-3)GalNAc



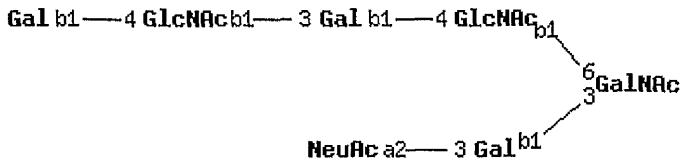
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



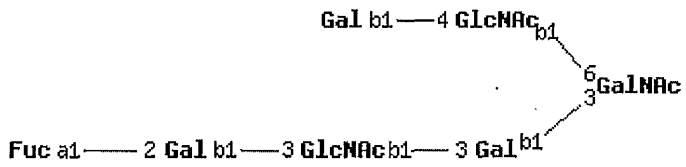
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



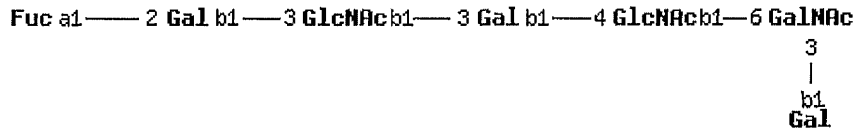
グリカン構造　Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



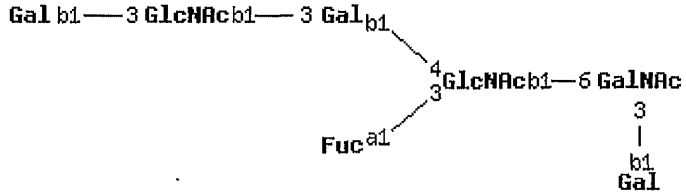
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



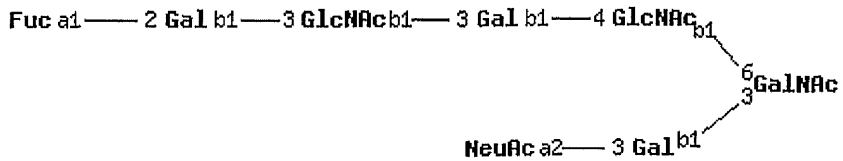
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



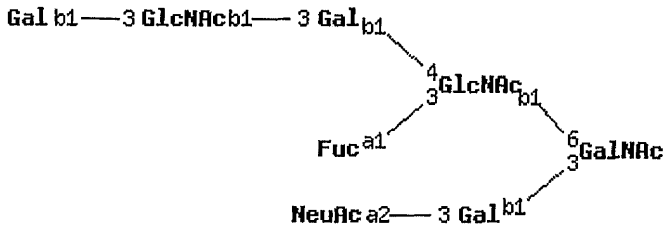
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



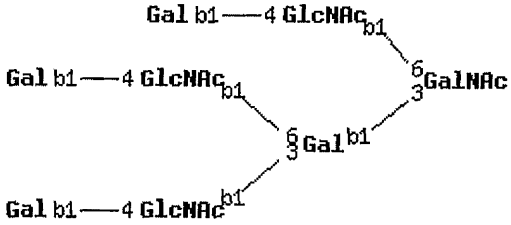
グリカン構造　Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



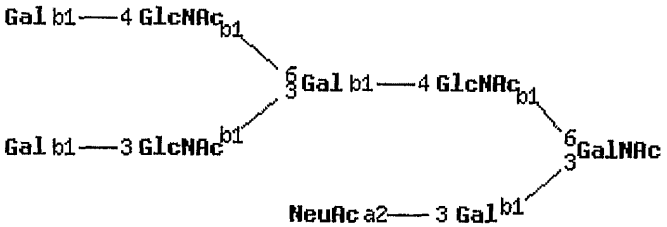
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



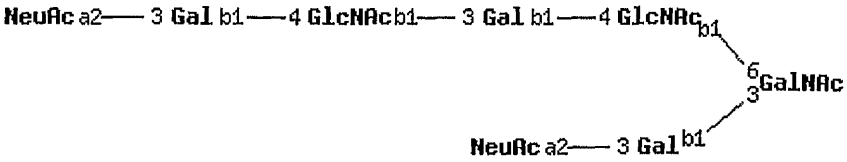
グリカン構造　Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc (a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



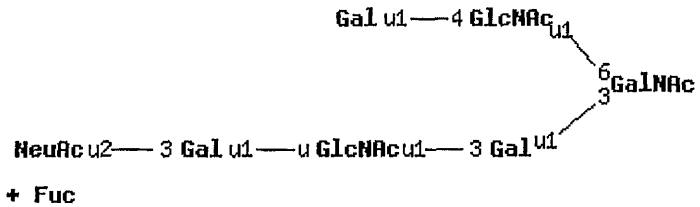
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Gal(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



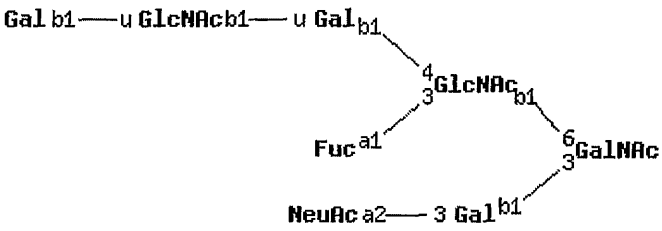
グリカン構造　Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Gal(b1-4)GlcNAc (b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



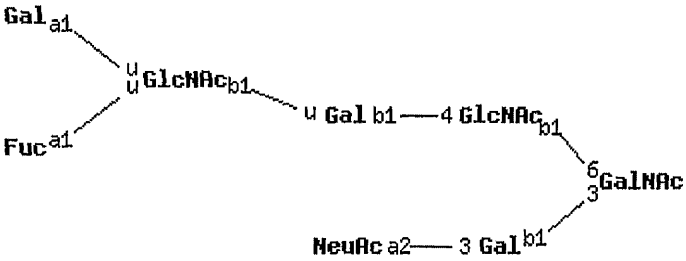
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc (a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



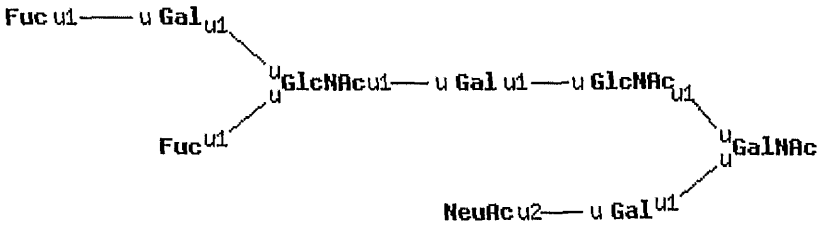
グリカン構造　NeuAc(?2-3)Gal(?1-?)GlcNAc(?1-3)Gal(?1-3)[Gal(?1-4)GlcNAc(?1-6)]GalNAc+"+ Fuc"



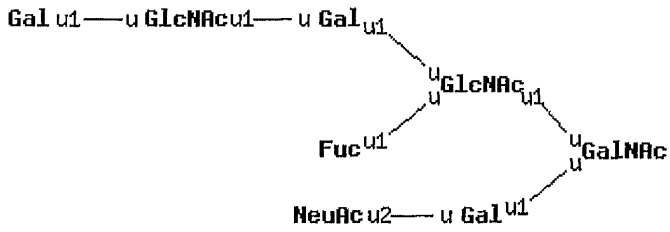
グリカン構造　Gal(b1-?)GlcNAc(b1-?)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



グリカン構造　Fuc(a1-?)[Gal(b1-?)]GlcNAc(b1-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc

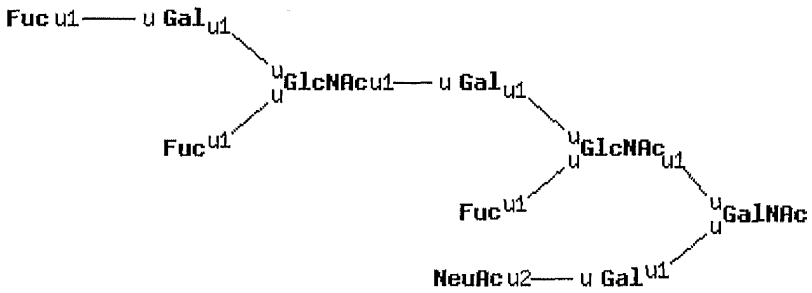


グリカン構造　Fuc(?1-?)Gal(?1-?)[Fuc(?1-?)]GlcNAc(?1-?)Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[NeuAc(?2-?)Gal(?1-?)]GalNAc

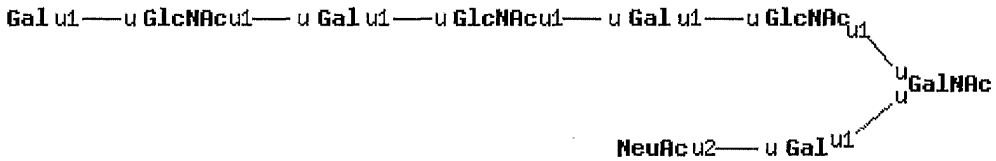


+Fuc

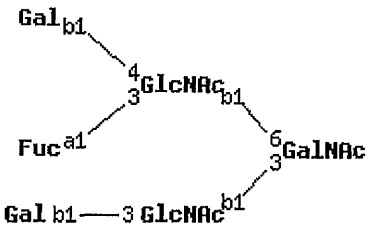
グリカン構造 Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)Gal(?1-?)[Fuc(?1-?)]GlcNAc(?1-?)[NeuAc(?2-?)Gal(?1-?)]GalNAc+"+ Fuc"



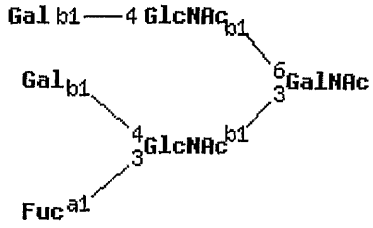
グリカン構造 Fuc(?1-?)Gal(?1-?)[Fuc(?1-?)]GlcNAc(?1-?)Gal(?1-?)[Fuc(?1-?)]GlcNAc(?1-?)[NeuAc(?2-?)Gal(?1-?)]GalNAc



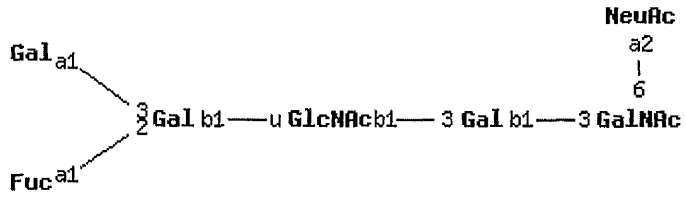
グリカン構造 Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)Gal(?1-?)GlcNAc(?1-?)[NeuAc(?2-?)Gal(?1-?)]GalNAc



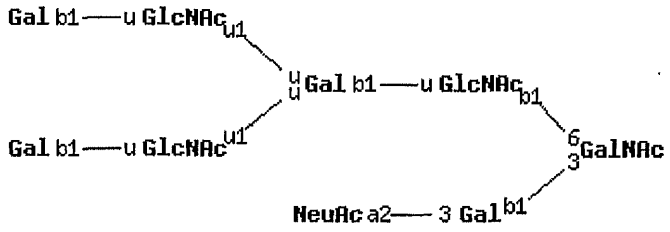
グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)]GalNAc



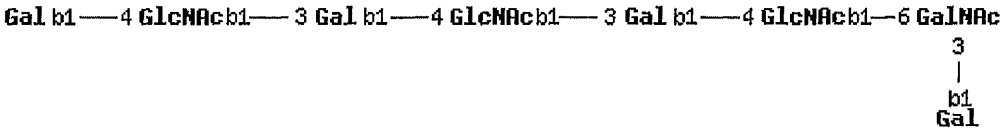
グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



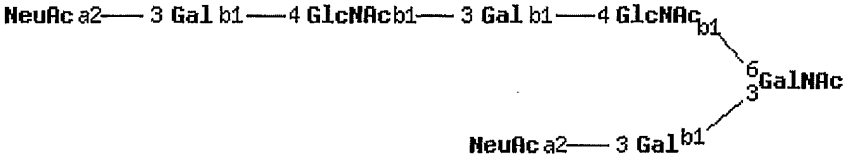
グリカン構造　Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-?)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-3)[NeuAc(a2-6)]GalNAc



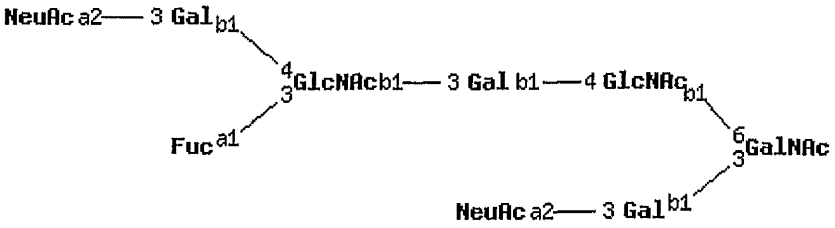
グリカン構造　Gal(b1-?)GlcNAc(?1-?)[Gal(b1-?)GlcNAc(?1-?)]Gal(b1-?)GlcNAc
(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



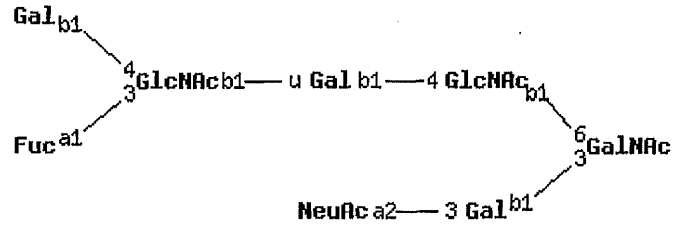
グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc
(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



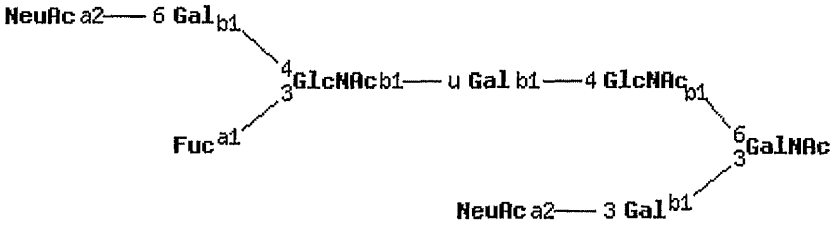
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc
(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



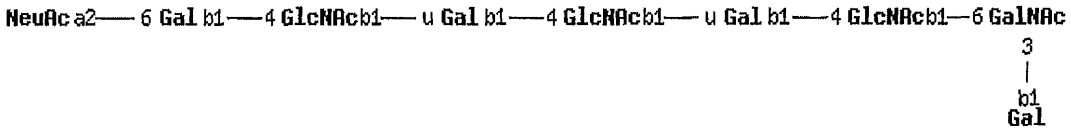
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc
(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



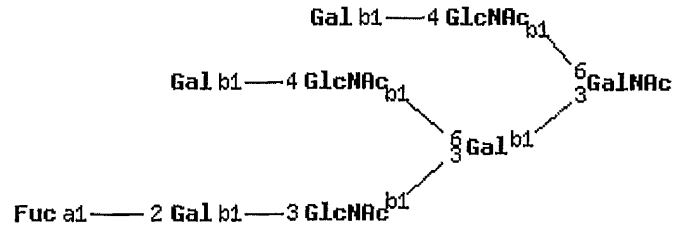
グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



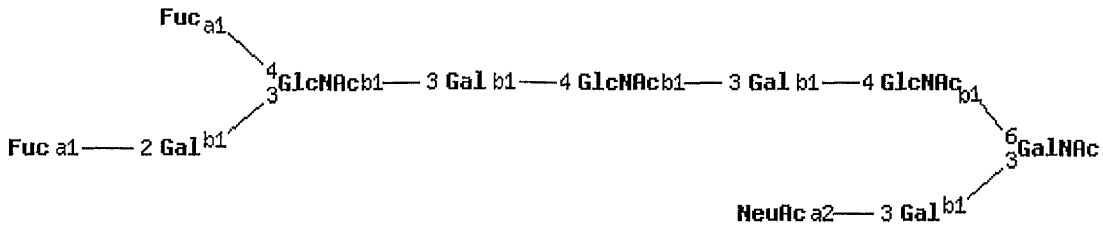
グリカン構造　NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



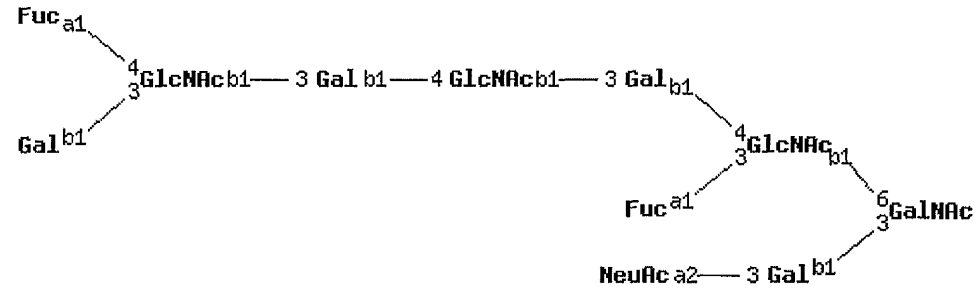
グリカン構造　NeuAc(a2-6)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



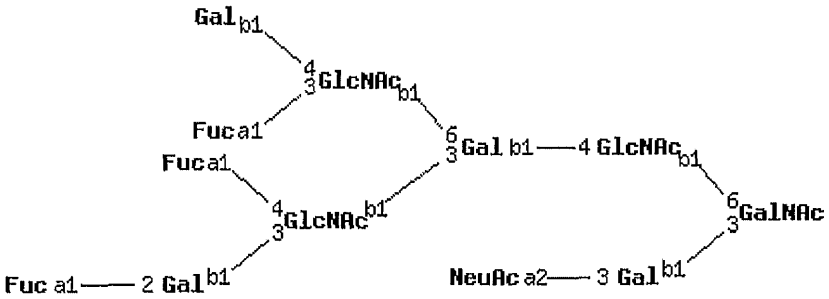
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)GlcNAc(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Gal(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



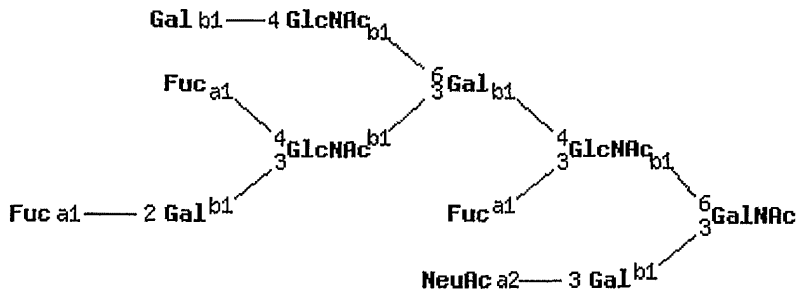
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)[Fuc(a1-4)]GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



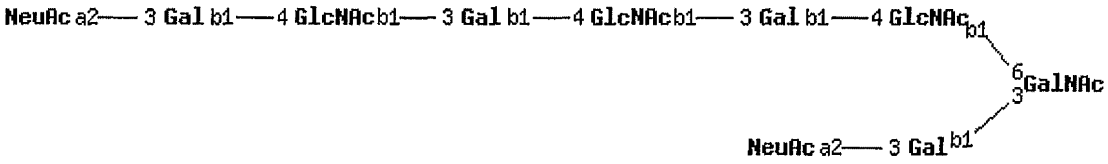
グリカン構造　Fuc(a1-4)[Gal(b1-3)]GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



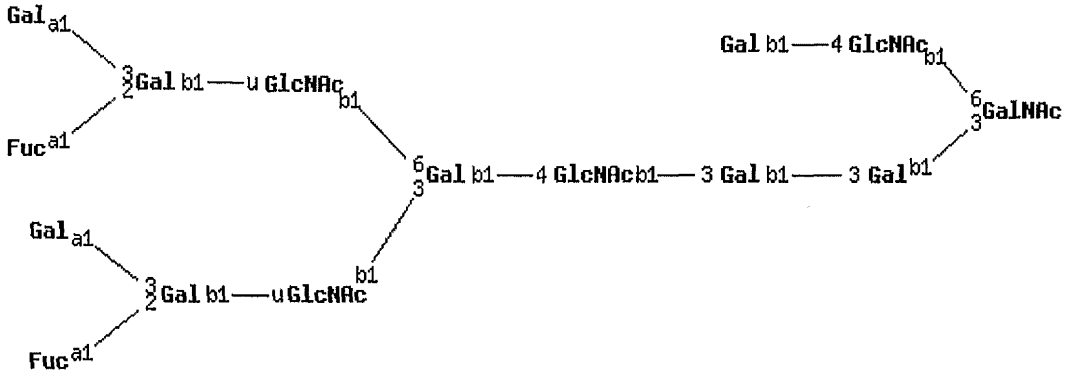
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)[Fuc(a1-4)]GlcNAc(b1-3)[Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-6)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



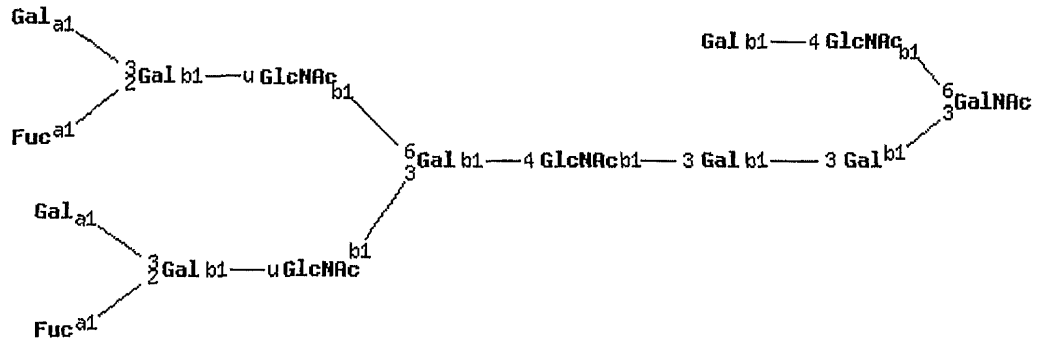
グリカン構造　Fuc(a1-2)Gal(b1-3)[Fuc(a1-4)]GlcNAc(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



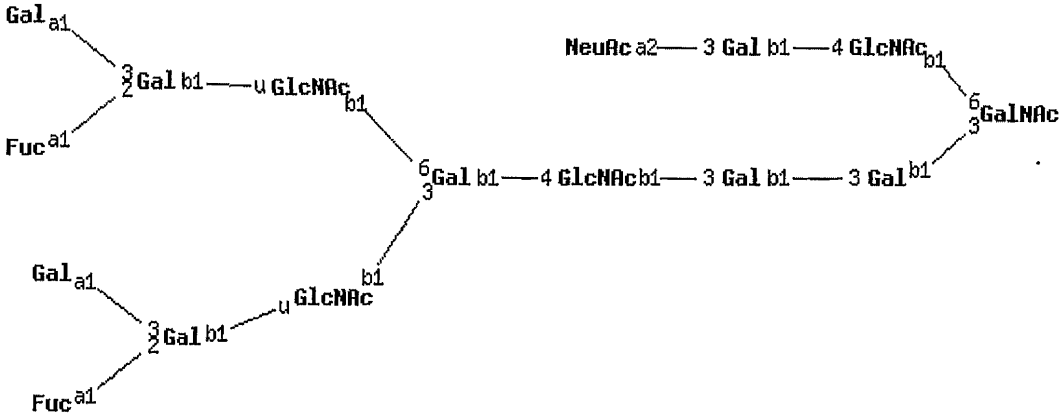
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



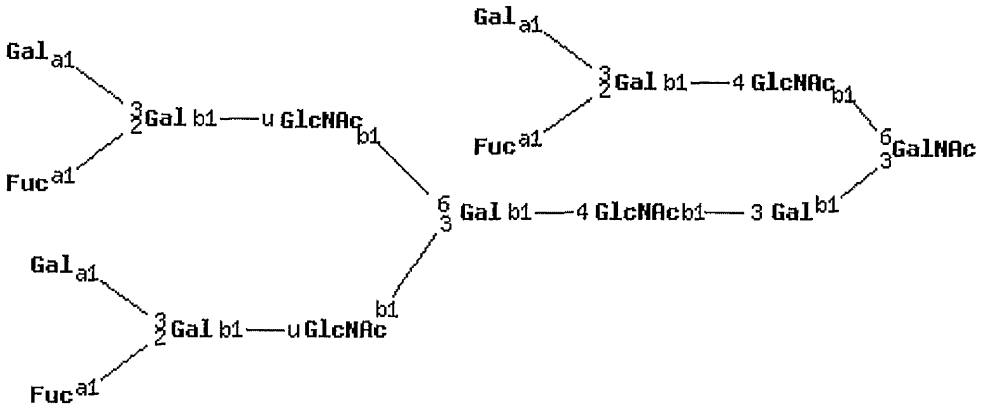
グリカン構造　Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-?)GlcNAc(b1-3)[Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-?)GlcNAc(b1-6)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-3)Gal(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



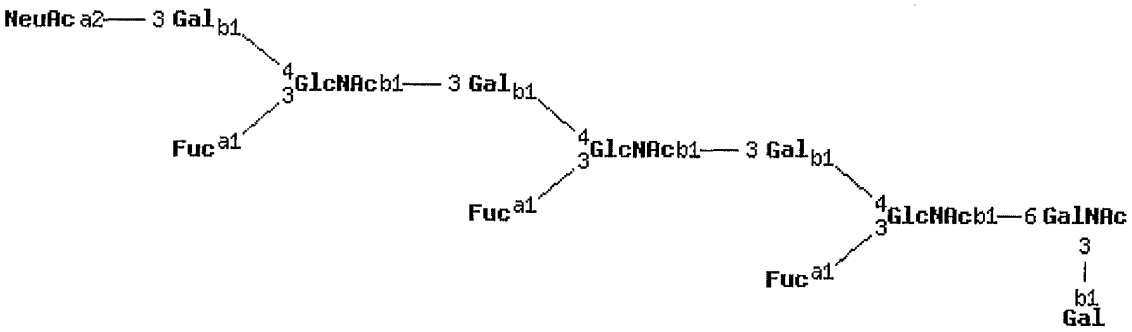
グリカン構造　Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-?)GlcNAc(b1-3)[Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-?)GlcNAc(b1-6)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-3)Gal(b1-3)[Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



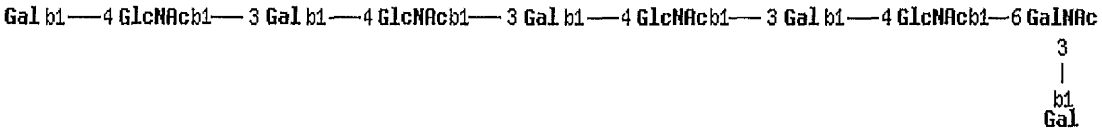
グリカン構造　Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-?)GlcNAc(b1-3)[Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-?)GlcNAc(b1-6)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-3)Gal(b1-3)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



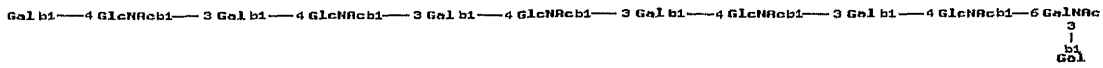
グリカン構造　Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-?)GlcNAc(b1-3)[Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-?)GlcNAc(b1-6)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-3)[Fuc(a1-2)[Gal(a1-3)]Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)]GalNAc



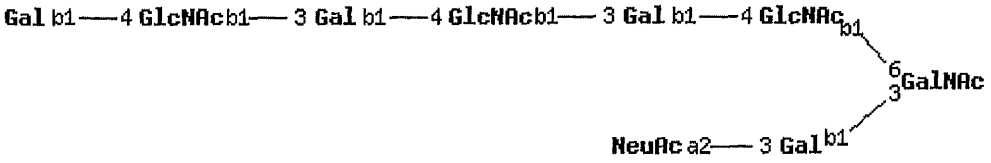
グリカン構造　NeuAc(a2-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



グリカン構造　Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc

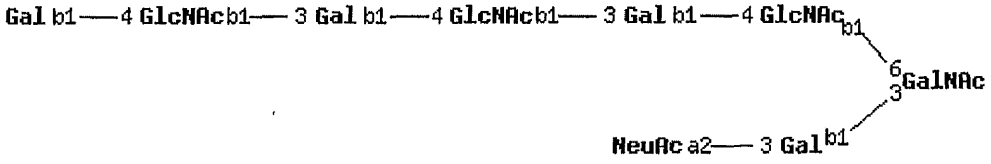


グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



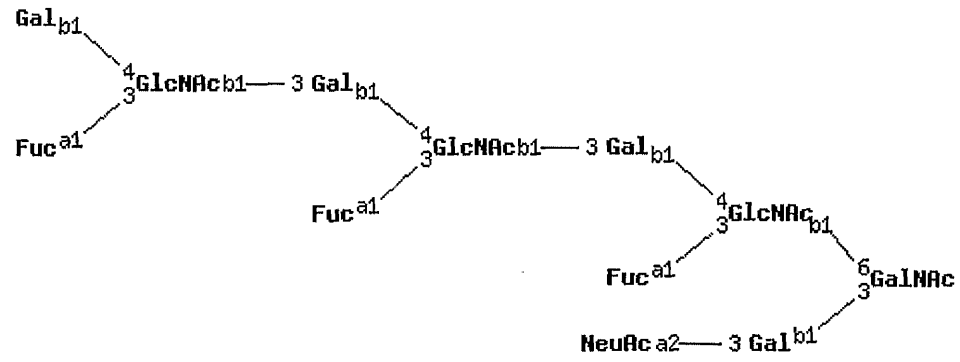
+ Fuc(a1-3)

グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc+"+ Fuc(a1-3)"

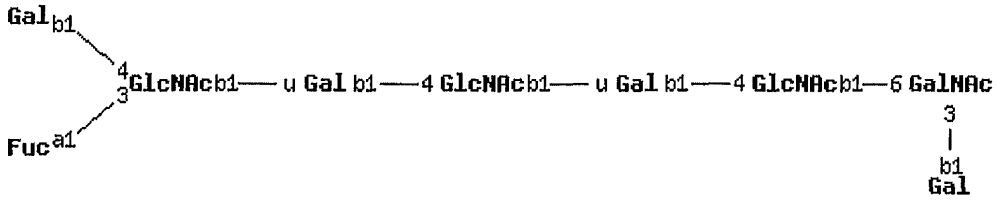


+ 2 x Fuc(a1-3)

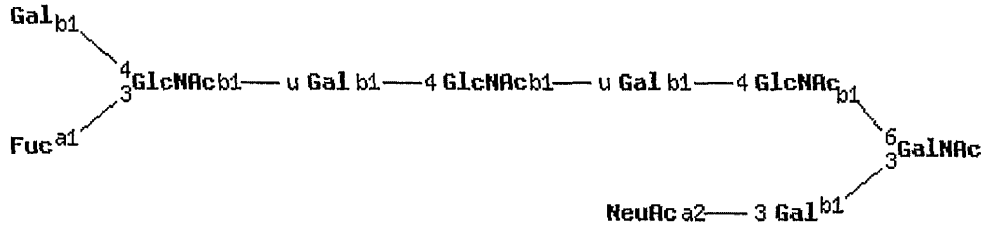
グリカン構造 Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc+"+ 2 x Fuc(a1-3)"



グリカン構造 Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-3)Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc



グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-?)Gal
(b1-4)GlcNAc(b1-6)[Gal(b1-3)]GalNAc



グリカン構造　Fuc(a1-3)[Gal(b1-4)]GlcNAc(b1-?)Gal(b1-4)GlcNAc(b1-?)Gal
(b1-4)GlcNAc(b1-6)[NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)]GalNAc

【０３８５】

本発明のタンパク質またはキメラ分子の生理化学的型は、所望の生理化学的型を産生するであろう酵素または複数の酵素をコードする一つまたは複数のトランスジーンを宿主細胞に導入することが含まれるがこれらに限定されるわけではない、当技術分野で公知の多様な方法によって宿主細胞を改変することによって得てもよい。そのようなトランスジーンには、ST3Gal1、ST3Gal2、ST3Gal3、ST3Gal4、ST3Gal5、ST3Gal6、ST6Gal1、ST6Gal2、ST6GalNAc1、ST6GalNAc2、ST6GalNAc3、ST6GalNAc4、ST6GalNAc5、ST8Sia1、ST8Sia2、ST8Sia3、ST8Sia4、ST8Sia5、ST8Sia6のような様々なタイプのシアリルトランスフェラーゼ；GalT1、GalT2のようなガラクトシルトランスフェラーゼ；FUT1、FUT2、FUT3、FUT4、FUT5、FUT6、FUT7、FUT8、FUT9、FUT10、FUT11のようなフコシルトランスフェラーゼ；スルホトランスフェラーゼ；GNT1、GNT2、GNT3、GNT4、GNT5のようなGlcNAcトランスフェラーゼ；アンテナ切断酵素およびエンドグリコシダーゼが含まれる。

【０３８６】

例えば、組換え型ヒトAchEのような発現されたタンパク質の血清半減期の低減が起こるN-グリカン構造の不十分な末端のシアリル化は、ラットβガラクトシドα2,6-シアリルトランスフェラーゼトランスジーンをHEK 293細胞に加えることによって改善されうる（J Biochem 336:647-658, 1998; J Biochem 363:619-631, 2002）。

【０３８７】

同様に、組換え型ヒトPSGL-1のような発現されたタンパク質のリガンド結合の低減が起こる、N-グリカン構造におけるシアリルルイスx構造のような特定のルイスx基の不十分な形成は、フコシルトランスフェラーゼトランスジーンをHEK293細胞に加えることによって改善することができる（Fritz et al. PNAS 95:12283-12288, 1998）。

【０３８８】

一つの態様において、タンパク質またはそのキメラ分子は、α-2,3-もしくはα-2,6-シアリルトランスフェラーゼのいずれかによって、またはα-2,3-シアリルトランスフェラーゼとα-2,6-シアリルトランスフェラーゼとの双方によって形質転換されたヒト細胞株を用いて産生される（「シアリル化タンパク質」）。シアリル化タンパク質の例には、シ

アリル化-IL-2、シアリル化-IL-2-Fc、シアリル化-IL-2Ra、シアリル化-IL-2Ra-Fc、シアリル化-IL-2Rb、シアリル化-IL-2Rb-Fc、シアリル化-IL-2Rg、シアリル化-IL-2Rg-Fcが含まれる。

【０３８９】

特に、シアリル化タンパク質は、GalNAcに対して標準化した場合に1対0.1～100 NeuNAc、および3倍量のマンノースに対して標準化した場合に、3対0.1～100 NeuNAcの単糖類（P_9）およびシアル酸含有量（P_{10}）を含む生理化学的パラメータ（P_x）のプロフィールを特徴とする。シアリル化タンパク質の中性N-結合型オリゴ糖の百分率（P_{13}）は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または99％など、0～99％である。シアリル化タンパク質の酸性N-結合型オリゴ糖の百分率（P_{14}）は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100％など、1～100％である。シアリル化タンパク質の中性O-結合型オリゴ糖の百分率（P_{15}）は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または99％など、0～99％である。シアリル化タンパク質の酸性O-結合型オリゴ糖の百分率（P_{16}）は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100％など、1～100％である。

【０３９０】

シアリル化タンパク質のインビボ半減期（T_{11}）は、トランスジーンを含まずに発現された本発明のタンパク質またはキメラ分子の半減期と比較して増加する。

【０３９１】

一つの態様において、シアリル化タンパク質は、本明細書に記述の構造式の少なくとも一つ、または一つもしくは複数のNeuNAc連結がN-結合型分画においてα-2,6-連結である本明細書に記述の構造式の少なくとも一つを含む。

【０３９２】

一つの態様において、シアリル化タンパク質は、本明細書に記述の構造式の少なくとも一つ、または一つもしくは複数のNeuNAc連結がO-結合型分画においてα-2,6-連結である本明細書に記述の構造式の少なくとも一つを含む。

【０３９３】

一つの態様において、本発明のタンパク質またはそのキメラ分子は、FUT3によって形質転換したヒト細胞株を用いて産生される（「フコシル化タンパク質」）。フコシル化タンパク質の例には、フコシル化-IL-2、フコシル化-IL-2-Fc、フコシル化-IL-2Ra、フコシル化-IL-2Ra-Fc、フコシル化-IL-2Rb、フコシル化-IL-2Rb-Fc、フコシル化-IL-2Rgおよびフコシル化-IL-2Rg-Fcが含まれる。

【０３９４】

特に、フコシル化タンパク質は、GalNAcに対して標準化した場合に1対0.1～100 NeuNAc、および3倍量のマンノースに対して標準化した場合に、3対0.1～100 NeuNAcの単糖類（P_9）およびシアル酸含有量（P_{10}）を含む生理化学的パラメータ（P_x）のプロフィールを特徴とする。

【０３９５】

一つの態様において、フコシル化タンパク質は、ルイス構造（ルイスa、ルイスb、ルイスxまたはルイスy）またはシアリルルイス構造（シアリルルイスaまたはシアリルルイスxのような）を含む、より高い比率の構造を有する。

【０３９６】

一つの態様において、フコシル化タンパク質は、トランスジーンなしで発現された本発明のタンパク質またはキメラ分子の結合親和性と比較してリガンドに対して変更された結合親和性を有する。

【０３９７】

IL-2、IL-2Ra、IL-2Rb、IL-2Rgから選択されるタンパク質分子に関するそれぞれのフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いて、関連タンパク質をコードするDNAを、当技術分野で公知の方法によってポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、InvitrogenのPCR Super Mix High Fidelity（カタログ番号：10790-020）の方法に従ってESTから増幅した。アンプリコンを消化して、適当なベクター、例えばpIRESbleo3、pCMV-SPORT6、pUMCV3、pORF、pORF9、pcDNA3.1/GS、pCEP4、pIRESpuro3、pIRESpuro4、pcDNA3.1/Hygro(+)、pcDNA3.1/Hygro(-)、pEF6/V5-Hisの対応する制限酵素部位にライゲーションする。ライゲーションしたベクターを適当な大腸菌宿主細胞、例えば、XLGold、超コンピテント細胞（Strategene）、XL-Blue、DH5α、DH10B等に形質転換する。

【０３９８】

キメラ分子を産生するために、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgGA1、IgGA2、IgGM、IgGE、IgGDのような免疫グロブリンのFcドメインのDNA配列を、適当なフォワードおよびリバースプライマーを用いてPCRによってESTから増幅する。アンプリコンを適当なベクター、例えばpIRESbleo3、pCMV-SPORT6、pUMCV3、pORF、pORF9、pcDNA3.1/GS、pCEP4、pIRESpuro3、pIRESpuro4、pcDNA3.1/Hygro(+)、pcDNA3.1/Hygro(-)、pEF6/V5-Hisの対応する制限酵素部位にクローニングする。関連するタンパク質のDNA配列を増幅して、Fcとインフレームでそれぞれの Fcベクターの対応する制限酵素部位にクローニングする。

【０３９９】

特定の態様において、Fc受容体結合領域またはFc領域の補体活性化領域は、組換えによって、Fc領域のアミノ酸配列と比較して一つまたは複数のアミノ酸挿入、欠失、または置換を含むように修飾してもよい。さらに、Fc領域の受容体結合領域または補体活性化領域は、そのグリコシル化パターンに対する変化、炭水化物部分の付加または除去、多価不飽和脂肪酸部分または他の脂質に基づく部分のアミノ酸骨格または任意の関連する翻訳時または翻訳後の実体への付加によって化学的に修飾されてもよい。Fc領域はまた、パパイン、ペプシン、または他の任意の部位特異的プロテアーゼを含む酵素による切断に起因する切断型であってもよい。Fc領域は、その対応するリガンドまたは受容体に対してより良好に結合することができる二量体、三量体、または高次多量体のキメラタンパク質による自然発生形成を促進する可能性がある。

【０４００】

正確な遺伝子を有するベクターを含む細菌コロニーを同定／単離するために、適当な制限酵素を用いる診断的消化を行ってもよい。陽性コロニーを単離して、グリセロール保存液として-70℃で保存する。次に、クローンを、アンピシリン（100μg/ml）を含む滅菌LBブロス750 mlに、37℃で16時間振とうさせながら拡大する。プラスミドを当技術分野で公知の方法に従って、好ましくは Qiagen Endofree Plasmid Mega Kit（Qiagen Mega Prep Kit #12381）に従って調製する。

【０４０１】

本発明のタンパク質またはキメラ分子を含むクローニングされたDNA配列の導入にとっ

て適したヒト宿主細胞には、HEK 293およびその任意の誘導体、HEK 293 c 18、HEK 293-T、HEK 293 CEN4、HEK 293F、HEK 293FT、HEK 293E、AD-293 (Stratagene)、293A (Invitrogen)、HeLa cells細胞およびその任意の誘導体、HepG2、PA-1 Jurkat、THP-1、HL-60、H9、HuT 78、Hep-2、Hep G2、MRC-5、PER.C6、SKO-007、U266、Y2 (Apollo)、WI-38、WI-L2が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【０４０２】

本発明のタンパク質またはキメラ分子の生理化学的型は、所望の生理化学型を生じる酵素または複数の酵素をコードするトランスジーンを宿主細胞に導入することが含まれるがこれらに限定されるわけではない、当技術分野で公知の多様な方法によって、宿主細胞を改変することによって行ってもよい。特異的DNA配列の導入を用いて、クローニングされたDNA配列の宿主細胞ゲノムへの組み込みを最適にすることができ、様々なタイプの組み込みには部位特異的、標的化、直接または酵素媒介組み込みが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【０４０３】

タンパク質またはそのキメラ分子のDNAは、当技術分野で公知の様々なトランスフェクション法によって、例えばDEAE-デキストラン、リン酸カルシウム、人工リポソームのような化学試薬を用いて、または直接マイクロインジェクション、電気穿孔、バイオリスティック粒子送達、または以下に記述されるウイルス構築物による感染もしくはトランスフェクションによって、適した宿主細胞に導入することができる。

【０４０４】

DEAE-デキストランは、陰性荷電核酸と会合する陽イオンポリマーである。DNA／ポリマー複合体におけるポリマーによって寄与される過剰な陽電荷によって、複合体は陰性荷電細胞膜と、より厳密に会合するようになる。複合体の取り込みはおそらくエンドサイトーシスによって起こる。ポリブレン、ポリエチレンイミン、およびデンドリマーを含む他の合成陽イオンポリマーも同様にトランスフェクションのために用いられる。

【０４０５】

リン酸カルシウム共沈殿は、様々なタイプの細胞の一過性および安定なトランスフェクションのために用いることができる。DNAを制御された方法でリン酸カルシウムと混合して、緩衝生理食塩液／リン酸塩溶液に加え、混合物を室温でインキュベートする。沈殿物が生成され、これはエンドサイトーシスまたは貪食によって細胞に取り込まれる。

【０４０６】

リポソーム媒介遺伝子送達に関してリポソームの最も一般的に用いられる合成脂質成分は、生理的pHで全体として真の陽電荷を有する成分である。しばしば、陽イオン脂質は、L-ジオレイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）のような中性脂質と混合される。脂質分子の陽イオン部分は、陰性荷電核酸と会合して、それによって、リポソーム／核酸複合体における核酸の圧縮が起こる。複合体の取り込みはエンドサイトーシスによって起こる。

【０４０７】

培養細胞または核酸へのDNAの直接マイクロインジェクションは、面倒な技法であるものの有効であるが、多数のトランスフェクト細胞が必要な場合には適当ではない。

【０４０８】

電気穿孔は電気的パルスを利用して、核酸を細胞の中に通過させる孔を生成する。この技術は、用いるそれぞれのタイプの細胞に関して、パルスの持続および強度に関する微調整および最適化を必要する。市販の電気穿孔装置には、Amaxa Biosystems' Nucleofector Kits（Amaxa Biosystems, Germany）が含まれる。

【０４０９】

この方法は、微小発射物上の核酸のレシピエント細胞への高速送達に依存する。

【０４１０】

ウイルスまたはレトロウイルス構築物による感染またはトランスフェクションには、レンチウイルスのようなレトロウイルス、またはアデノウイルスのようなDNAウイルスを用

いることが含まれる。プロセスは、宿主細胞に外来遺伝子を移入するためにウイルスまたはレトロウイルスベクターを用いることを含む。

【０４１１】

いくつかの態様において、タンパク質またはそのキメラ分子は、一過性の方法によって、または安定にトランスフェクトされた細胞株から産生される。一過性のトランスフェクションは、接着または浮遊細胞株のいずれかを用いて行われる。接着細胞株の場合、細胞を血清含有培地において（2～10％血清）、およびDMEM、DMEM/F12（JRH）のような培地において成長させる。用いる血清はウシ胎児血清（FCS）、ドナー仔ウシ血清（DCS）、新生ウシ血清（NBCS）等となり得る。プラスミドベクターを、当技術分野で公知の標準的な方法によって細胞に導入する。特定の態様において、タンパク質またはそのキメラ分子のDNAをDEAEデキストランまたはリン酸カルシウム沈殿を用いてトランスフェクトさせる。トランスフェクションの後、発現されたタンパク質またはそのキメラ分子を回収するために、細胞を適当な回収培地（例えば、無血清DMEM/F12）に切り替える。

【０４１２】

浮遊細胞からのタンパク質またはそのキメラ分子の一過性の発現は、先に概要した方法を用いてプラスミドベクターを導入することによって行うことができる。浮遊細胞を血清含有培地、または無血清培地（例えば、Freestyle培地（Invitrogen）、CD293培地（Invitrogen）、Excell培地（JRH）等）のいずれかにおいて成長させることができる。トランスフェクションは、適したトランスフェクション法、適したトランスフェクション法、例えばOptiMEM培地におけるリポフェクタミンを用いて適当な培地にトランスフェクトすることによって血清の非存在下で行うことができる。

【０４１３】

一過性の発現によって通常、トランスフェクション後2～3日目に発現のピークが得られる。エピソームベクターは、細胞内で複製して、持続的な発現を生じる。従って、大量の産物を得るために、エピソーム発現ベクターを細胞にトランスフェクトして、細胞を拡大させる。タンパク質またはそのキメラ分子を培地に発現させて、細胞を数週間拡大させてこれを回収する。発現培地は、血清を含むまたは含まない培地となり得て、細胞は接着または浮遊のいずれかに適合させることができる。

【０４１４】

発現ベクターの細胞へのトランスフェクションによって安定なクローンを得た後、適当な物質、例えばフレオマイシン、ヒグロマイシン、ピューロマイシン、ネオマイシンG418、メソトレキセート等によって選択する。プラスミドはタンパク質またはキメラ分子をコードする遺伝子のほかに耐性遺伝子を含むことから、安定なクローンは選択を生き延びると考えられる。遺伝子の導入後1～2日目に、全細胞集団（安定なプール）またはクローン密度で播種した細胞のいずれかに対して選択を開始する。非トランスフェクト細胞集団はまた、選択物質による殺細胞効力を決定するために選択される。接着細胞の場合、目に見える個別のクローンが得られるまで、細胞を組織培養プレートにおいて増殖させる。次にそれらをトリプシン処置によって、または物理的除去によってプレートから採取して、組織培養ウェルに入れる（例えば、96ウェルプレートのウェルあたりクローン1個）。浮遊細胞の場合、選択の後に限界希釈クローニングを行う。次にクローンを拡大させた後、特徴付けを行う、および／または限界希釈分析のさらなるラウンドに供する。

【０４１５】

血清含有培地において成長する安定なクローンは、血清レベルの徐々の低減に適応した後、剥離して、低血清下では浮遊液で成長する。無血清状態が得られるまで血清レベルをさらに低減させる。いくつかの増殖培地はより急速な適合を許容して（例えば、血清含有接着条件から無血清浮遊成長への直接の交換）、その例はInvitrogenのCD293培地である。

【０４１６】

無血清培地における成長後、クローンは培地の最適化を開始することができる。産生特徴、例えば最適な処方または複数の処方が得られるまで多くの異なる成長培地において、

クローンを積分生存細胞数に関して試験する。これは産物の産生法に依存する可能性がある。例えば、細胞を一つの培地において拡大させて、次に発現を増強する添加物を産物の回収の前に加えてもよい。

【０４１７】

過剰発現されたタンパク質またはキメラ分子は、宿主細胞内に蓄積する可能性がある。細胞内タンパク質の回収は、NP40、TritonX-100、TritonX-114、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、CHAPS、CHAPSO、Brij-35、Brij-58、Tween-20、Tween-80、オクチルグルコシド、およびオクチルチオグルコシドを含む緩衝液が含まれるがこれらに限定されるわけではない溶解緩衝液によって宿主細胞を処置する段階を必然的に伴う。宿主細胞溶解のもう一つの方法には、超音波処理、ホモジナイゼーション、フレンチプレス処置、繰り返し凍結融解サイクル、および低張溶液による細胞の処置が含まれてもよい。

【０４１８】

最終産物は、非制限的な例として撹拌タンク、エアリフト、充填床潅流、微小担体、中空線維、バッグ技術、細胞工場を含む異なる多くの種類のバイオリアクターにおいて産生することができる。方法は連続的な培養、バッチ、フェドバッチ、または誘導であってもよい。容積測定タンパク質産生の増加を得るために、低血清培養物にペプトンを加えてもよい。

【０４１９】

本発明のタンパク質またはキメラ分子は、本発明のタンパク質またはキメラ分子のために特異的に調整された精製戦略を用いて精製する。精製法には、接線流濾過（TFF）、硫酸アンモニウム沈殿、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ゲル濾過クロマトグラフィー（GFC）、アフィニティクロマトグラフィー（AFC）、プロテインAアフィニティ精製、受容体媒介リガンドクロマトグラフィー（RMLC）、色素リガンドクロマトグラフィー（DLC）、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー（AECまたはCEC）を含むイオン交換クロマトグラフィー（IEC）、逆相クロマトグラフィー（RPC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、金属キレート化クロマトグラフィー（MCC）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【０４２０】

TFFは、生体分子を分離するための迅速かつ効率的な方法であり、試料の濃縮、脱塩、または分画のために用いられる。TFFは数百リットルもの多い試料から10 mlもの少ない試料を濃縮することができる。適した分子量カットオフメンブレンと共に、TFFは異なる大きさおよび分子量の（名目分子量カットオフ（NMWC）5 KDa、10 KDa、30 KDa、100 KDa）の生体分子を分離および単離することができる。試料の希釈の後に再濃縮を必然的に伴うダイアフィルトレーションプロセスを用いて、試料緩衝液を脱塩または交換することができる。

【０４２１】

塩析または硫酸アンモニウム沈殿は、タンパク質の希釈溶液を濃縮するために有用である。これはまた、タンパク質の混合物を分画するためにも有用である。タンパク質を含む溶液のイオン強度が増加すれば、タンパク質分子間の類似の電荷の反発効果の低減を引き起こす。同様に、タンパク質分子周囲の溶媒和の殻を保持する力を低減させる。これらの力が十分に低減すれば、タンパク質は沈殿すると思われる；疎水性タンパク質は、親水性タンパク質より低い塩濃度で沈殿する。イオン強度の段階的増加の後に遠心によるタンパク質混合物の分画は、タンパク質を部分的に精製する非常に有効な方法となり得る。

【０４２２】

SECは、多孔性マトリクス内の試料の流れに基づいて、タンパク質を大きさによって分離する。SECは水溶液システムにおいて分子を分離するために用いる場合、GFCと同じ原理を有する。SECにおいて、充填孔より大きい分子は、最初に溶媒先端と共に溶出して、完全に除外される。完全に排除される分子と保持される分子の間の中間の大きさの分子は、その大きさに従ってマトリクスの孔を通過する。孔の中を自由に出入りする小さい分子は

保持される。従って、異なる大きさのタンパク質は異なる溶出容積および保持時間を有する。構造的に類似の分子に関して、分子の大きさがより大きければそれらはより早期に溶出する。いかなる試料も溶出させる前に、標準曲線を確立して、作業限界および参照保持時間を決定しなければならない。

【０４２３】

タンパク質の形状が同じである場合、分子量は、カラムにおける様々な孔の大きさの充填材料に従って、UV吸収、蛍光、または光の散乱によってカラムからの溶出液において急速にスクリーニングすることができる。光子相関分光法（PCS）は通常、静的な試料について行われ、液体クロマトグラフィー検出のために行われる。低角度レーザー光散乱も同様に、クロマトグラフィー検出と共役させて、タンパク質の形状とは無関係に分子量を直接検出する（Carr et al. Anal Biochem 175:492-499, 1988）。SEC-HPLCを用いてhGH分解および凝集を検出した（Pikal et al. Pharm Res 8:427-436, 1991）。これは同様に、β-ガラクトシダーゼを試験する場合の混入物の推定のために用いられた（Yoshioka et al. Pharm Res 10:103-108, 1993）。

【０４２４】

AFCは、その化学構造と適したアフィニティリガンドとの間の特異的相互作用に従って生体分子を精製する。標的分子は、相補的に固定されたリガンドによって特異的にかつ可逆的に吸着する。リガンドは阻害剤、基質、類似体、もしくは共因子となり得て、または標的分子を特異的に認識することができる抗体となり得る。その後、吸着された分子を競合的置換によって、またはpHもしくはイオン強度のシフトによるコンフォメーションの変化によって溶出する。

【０４２５】

プロテインAアフィニティ精製は、抗原に対する抗体の特異性にかかわらず、一般的に抗体に結合する特定の細菌タンパク質の親和性を利用するアフィニティ精製の例である。プロテインA、プロテインGおよびプロテインLは、十分に特徴が示された抗体結合特性を有する三つのタンパク質である。これらのタンパク質は、組換えによって産生され、様々な種からの重要な抗体タイプのアフィニティ精製のために日常的に用いられている。プロテインA/Gと呼ばれる、プロテインAおよびGの遺伝子工学による組換え型も同様に利用可能である。これらの抗体結合タンパク質は、マトリクスを支持するために固定されている。この方法は、抗体のプロテインA結合領域（Fc領域）が標的タンパク質に連結した組換え型タンパク質を精製するように修飾されている。固定されたプロテインA分子に対する結合は生理的条件で行われ、pHまたはイオン強度の変化によって溶出される。

【０４２６】

RMLCは、その同源の標的分子に関する受容体の固有の親和性を利用する特殊な種類のAFCである。受容体分子を、反応性アミン、反応性水素、カルボニル、カルボキシル、またはスルフヒドリル基を通して、適したクロマトグラフィー支持マトリクス上に固定する。RMLCの一つの例において、受容体-Fcキメラ分子は、プロテインAセファロースビーズ上に、プロテインAに対する受容体のFc部分の親和性を通して固定される。この方法は、その同源のサイトカインに対してそのリガンド結合部位を露出する方向に受容体を固定するという長所を有する。受容体に対する標的分子の吸着は、生理的条件下で行われ、溶出はpHまたはイオン強度の変化によって行われる。

【０４２７】

DLCはタンパク質に対する反応性色素の選択的および可逆的結合能を利用するある種のALCである。色素は一般的にモノクロロトリアジン化合物である。反応性クロロ基によって、セファロースまたはアガロースのような支持体マトリクスに、およびより最近ではナイロンメンブレンにトリアジン色素を容易に固定することができる。

【０４２８】

これらの色素がタンパク質に結合できることの最初の発見は、ゲル濾過カラムのボイド容積マーカーとして用いられるブルーデキストラン（シバクロンブルーFG-3 Aの共役体）が、特定のタンパク質の溶出を遅らせることができるという観察に由来した。特定のタン

パク質に関する色素の特異性に関して多くの研究が行われており、そのほとんどが原型のシバクロンブルー色素を用いている。色素は、キナーゼおよびデヒドロゲナーゼのようなヌクレオチド共因子を利用するタンパク質および酵素の結合において最も有効であるように思われるが、血清アルブミンのような他のタンパク質も同様に堅固に結合する。芳香族トリアジン色素構造は、ニコチンアミドアデノシンジヌクレオチド（NAD）のヌクレオチド構造に類似すること、および色素がこれらのタンパク質においてジヌクレオチドの襞と相互作用することが提唱されている。多くの場合、結合タンパク質は基質またはヌクレオチド共因子によって競合的にカラムから溶出させることができ、色素は遊離の溶液において基質-結合部位と競合することが示されている。同様に、これらの色素は、静電気的および疎水性相互作用によって、ならびにリガンド結合部位とのより特異的な「疑似親和性」相互作用によって、タンパク質に結合することができる可能性があるように思われる。修飾によってさらにリガンドに類似する（生体模倣色素）ように色素リガンドの特異性を増強することは、多くのデヒドロゲナーゼおよびプロテアーゼの精製において成功している（McGettrick et al. Methods Mol Biol 244:151-7, 2004）。

【０４２９】

イオン交換クロマトグラフィー（IEC）は、イオン交換カラムマトリクスとタンパク質との静電気的相互作用に起因するカラム上でのタンパク質保持を用いてタンパク質を精製する。移動相のpHが、標的タンパク質のpIより上である場合、タンパク質は負に帯電して陰イオン交換カラム（AEC）と相互作用すると思われる。移動相のpHが標的タンパク質のpIより低い場合、タンパク質は正に帯電することから陽イオン交換カラム（CEC）を用いるべきである。標的タンパク質は、標的分子と同じ電荷を有する対イオンの濃度を増加させることによって溶出される。

【０４３０】

RPCは、分子とクロマトグラフィー支持体マトリクスとの疎水性相互作用に従って生体分子を分離する。イオン化可能な化合物は、分離のpHを制御することによって、その中性型で最もよく分析される。トリフルオロ酢酸のような移動相の添加物は、静止相に強く吸着するイオン対を形成することによって、タンパク質の疎水性を増加させる。移動相の極性を変化させることによって、生体分子がクロマトグラフィー支持体から溶出される。

【０４３１】

HICは、RPCと類似であるが、名目上の孔径がより大きい。HICでは、溶出溶媒は、RPCにおいて用いられる水性または有機性移動相の代わりに水溶性の塩溶液を用いる。同様に、試料の溶出順序は、RPCによって得られる順序とは逆である。タンパク質の表面は、親水性の残基と、通常タンパク質を安定化させるために折りたたまれたタンパク質の内部に存在する疎水性の「斑状部分」とからなる。疎水性の斑状部分が水性環境に露出されると、それらはタンパク質の正常な溶媒和特性を破壊し、これな熱力学的に不都合である。水性の移動相において、無機塩濃度がより高ければ（例えば、硫酸アンモニウム）、表面張力はより高くなり、それによってHIC樹脂の疎水性基とタンパク質との疎水性相互作用の強度は増加して、吸着される。しかし、塩濃度勾配が低下する間に、水性移動相の表面張力は減少し、このように疎水性相互作用が低減して、それによってカラムの疎水性基からタンパク質の脱着が起こる。

【０４３２】

MCCは、タンパク質が、キレート形成金属イオンに関するその親和性に基づいて分離される技術である。Cu^{2+}、Co^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}、Mg^{2+}、またはNi^{2+}が含まれるがこれらに限定されるわけではない様々な金属イオンが、共有結合したキレート形成リガンド（例えば、イミノ二酢酸）によってクロマトグラフィー支持体の静止相に固定される。金属イオンの遊離の配意結合部位は、異なるタンパク質およびペプチドに結合するために用いられる。溶出は、タンパク質を競合的分子に置換すること、またはpHを変化させることによって起こり得る。例えば、緩衝液のpHを低下させると、タンパク質金属イオン錯体の結合親和性の低減およびタンパク質の脱着が起こる。または、結合タンパク質を、段階的勾配の形でまたは直線勾配として下降pH勾配を用いてカラムから溶出することができる。

【０４３３】
本発明のタンパク質またはキメラ分子の生理化学型は、当技術分野で公知の多様な方法で発現された分子に対する化学的および／または酵素的修飾によって得てもよい。
【０４３４】
本発明は、タンパク質またはキメラ分子が発現されて精製した後の、タンパク質またはキメラ分子のペプチド鎖に対する炭水化物の化学的または酵素的カップリングを企図する。化学および／または酵素的カップリング技法は、炭水化物置換基の数またはプロフィールを改変、増加、または減少させるために用いてもよい。用いるカップリング様式に応じて、糖（複数）を（a）アルギニンのアミド基、（b）遊離のカルボキシル基、（c）システイン基のようなスルフヒドリル基、（d）セリン、スレオニン、ヒドロキシルリジン、もしくはヒドロキシプロリンのようなヒドロキシル基、（e）フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンの残基のような芳香族残基、（f）グルタミンのアミド基、または（g）ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンの基のようなアミノ基に付着させてもよい。付加は、化学的または酵素的に行うことができる。例えば、糖単位のタンパク質またはそのキメラ分子への連続的な付加は、適当な組換え型グリコシルトランスフェラーゼを用いて行うことができる。グリコシルトランスフェラーゼはまた、共有的に付着した置換基を有する糖を付加するために用いることができる。例えば、ポリエチレングリコール（PEG）に共有結合したシアル酸を、シアリルトランスフェラーゼによって末端のガラクトシル基に転移させて、分子の大きさおよび血清半減期を増加させることができる。
【０４３５】
タンパク質またはキメラ分子の炭水化物側鎖をまた、化学的または酵素的に修飾して、ホスフェート、スルフェート、ヒドロキシル、カルボキシレート、O-スルフェートおよびN-アセチル基を含む多様な官能基を組み入れることができる。
【０４３６】
タンパク質またはそのキメラ分子上に存在する炭水化物はまた、化学的または酵素的に除去されてもよい。トリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物を化学的脱グリコシル化のために用いることができる。この処置によって、連結糖を除くほとんどまたは全ての糖の切断が起こり得るがポリペプチドは無傷のままである。個々の糖または鎖全体も同様に、多様なエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼによってタンパク質またはそのキメラ分子から除去することができる。
【０４３７】
タンパク質またはキメラ分子のグリカン成分は、シアリダーゼによる処置、または任意の残留シアル酸を除去するための軽度の酸処置、N-結合型オリゴ糖のアンテナを短く刈り込むため、またはO-結合型オリゴ糖を短くするためのエキソまたはエンドグリコシダーゼによる処置によって合成的に修飾してもよい。同様に、フコースおよびスルフェートのような側鎖を除去するために、フコシダーゼまたはスルファターゼによって処置してもよい。ポリエチレングリコールまたはデキストランのような疑似グリカン構造をアミノ酸骨格に化学的に付加してもよく、またはグリコトランスフェラーゼカクテルを糖-dUDP前駆体と共に用いて、糖サブユニットをグリカンに合成的に付加してもよい。
【０４３８】
本発明は、放射性核種に化学的または酵素的にカップリングさせたタンパク質またはそのキメラ分子を企図する。そのようなタンパク質またはキメラ分子は、IL-2、IL-2-Fc、IL-2Ra、IL-2Ra-Fc、IL-2Rb、IL-2Rb-Fc、IL-2Rg、IL-2Rg-Fcを含む一覧から選択してもよい。
【０４３９】
ヨウ素化技法を用いて、ヨウ素同位元素（例えば、^{123}I）をタンパク質またはそのキメラ分子のペプチド鎖に付着させてもよい。特に、同位元素を（a）チロシンのフェノール環、または（b）タンパク質もしくはそのキメラ分子のペプチド鎖上のヒスチジンのイミダゾール環に付着させてもよい。ヨウ素化は、クロラミン-T、一塩化ヨウ素、三ヨウ化物、電解質、酵素、共役、脱金属、ヨードゲン、またはヨードビーズ法を用いて行ってもよ

い。

【０４４０】

テクネチウム標識技法を、当技術分野で公知の方法を用いて、例えば$^{99m}TcO_4^-$を還元物質（例えば、塩化第一スズ）によって還元した後、二官能性キレート物質、例えばジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）によってタンパク質またはキメラ分子の^{99m}Tc標識を行うことによって、本発明のタンパク質またはキメラ分子に^{99m}Tcを付着させるために用いてもよい。

【０４４１】

本発明は、化学療法剤に化学的または酵素的にカップリングさせたタンパク質またはそのキメラ分子を企図する。適した物質（例えば、ゾレドロン酸）を当技術分野で公知の方法を用いて、例えばN-ヒドロキシスルホスクシニミド増強カルシウムカルボジイミド媒介カップリング反応によって、タンパク質またはそのキメラ分子に共役させてもよい。

【０４４２】

本発明は、毒素に化学的または酵素的にカップリングさせたタンパク質またはそのキメラ分子を企図する。メリチン、ヘビ毒、切断型シュードモナス（pseudomonas）内毒素、リシン、ゲロニン、およびジフテリア毒素を含む適した毒素を、当技術分野で公知の方法を用いて、例えばマレイミドまたはカルボジイミドカップリング化学を用いて、タンパク質またはそのキメラ分子に共役させてもよい。

【０４４３】

本明細書に記述の単離タンパク質またはそのキメラ分子は、被験体における標的受容体またはリガンドと単離タンパク質またはキメラ分子との接触を生じる任意の手段によって被験体に送達してもよい。特定の態様において、タンパク質またはそのキメラ分子は、「薬学的組成物」として被験体に送達される。

【０４４４】

もう一つの局面において、本発明は、前述の一つまたは複数の単離タンパク質またはキメラタンパク質分子を、薬学的に許容される担体または希釈剤と共に含む薬学的組成物を企図する。

【０４４５】

注射での使用に適した組成物の型には、滅菌水溶液（水溶性の場合）および滅菌注射液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。これは製造および保存条件において安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、ポリエチレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、その適した混合物、および植物油を含む溶媒または希釈培地となり得る。例えば界面活性剤を用いることによって、適切な流動性を維持することができる。微生物の作用の予防は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらされうる。多くの場合、等張剤、例えば糖または塩化ナトリウムを含めることが好都合であると思われる。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収遅延剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム、およびゼラチンを組成物において用いることによってもたらされうる。

【０４４６】

適した注射液は、適当な溶媒において必要な量の活性化合物を、活性成分および必要に応じて任意の他の活性成分と共に組み入れた後、濾過滅菌または他の適当な滅菌手段を行うことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、適した調製法には、活性成分プラス任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥およびフリーズドライ技術が含まれる。

【０４４７】

活性成分が適切に保護される場合、これは例えば不活性希釈剤または同化可能な食用担体と共に経口投与してもよく、硬ゼラチンもしくは軟ゼラチンカプセルに封入してもよく、錠剤に圧縮してもよく、日常食の食物によって直接組み入れられてもよく、または母乳

を通して投与してもよい。経口治療的投与の場合、活性成分は賦形剤と共に組み入れられ、摂取可能な錠剤、口腔内錠剤、トローチ剤、カプセル、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、ウェーハ等の形で用いてもよい。そのような組成物および調製物は、活性成分を重量で少なくとも1％含まなければならない。組成物および調製物の百分率は、当然、簡便に単位重量の約5～約80％であってもよい。そのような治療的に有用な組成物の活性成分の量は、適した用量が得られるような量である。特定の態様において、本発明に従う組成物または調製物は、経口投与単位剤形が調節物質約0.1μg～200 mgを含むように調製される。もう一つの投与量には、約1μg～約1000 mgおよび約10 μg～約500 mgが含まれる。これらの用量は個体あたりであってもよく、またはkg体重あたりであってもよい。投与は1時間、1日、1週間、1ヶ月、または1年毎であってもよい。

【０４４８】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセル剤等はまた、本明細書において以降記述される成分を含んでもよい。ゴム、アカシア、コーンスターチ、またはゼラチンのような結合剤；リン酸カルシウムのような賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸等のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；および蔗糖、乳糖、もしくはサッカリンのような甘味料を加えてもよく、またはペパーミント、冬緑油、もしくはサクランボ着香料のような着香料を加えてもよい。単位投与剤形がカプセル剤である場合、これは上記のタイプの材料のほかに、液体担体を含んでもよい。様々な他の材料がコーティングとして、またはそうでなければ投与単位の物理的形状を改変するために存在してもよい。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセル剤は、シェラック、糖または双方によってコーティングしてもよい。シロップまたはエリキシル剤は、活性化合物を含んでもよく、甘味料としての蔗糖、保存剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、色素ならびにサクランボまたはオレンジ香料のような着香料を含んでもよい。当然、任意の単位投与剤形を調製するために用いられるいかなる材料も薬学的に純粋でなければならず、用いる量において実質的に非毒性でなければならない。さらに、活性化合物を徐放性調製物および処方に組み入れてもよい。

【０４４９】

本発明はまた、局所処方を企図する。局所処方において、クリーム、ローション、ロウ、または液体溶液の局所適用によって、活性成分が被験体の生体表面に導入されるように、活性物質をクリーム、ローション、ロウ、または他の液体溶液に懸濁してもよい。本明細書において用いられるように「生体表面」という用語は、生物上または生物内の任意の表面を企図する。それに対して本発明の局所組成物を適用してもよい「生体表面」には、皮膚、呼吸器官、消化管および泌尿器管のような任意の上皮表面が含まれる。

【０４５０】

従来のクリーム、乳剤、パッチ、またはスプレー処方のほかに、本発明の物質はまた、イオン泳動または穿孔に基づく方法論を用いて局所および／または経皮送達されてもよい。

【０４５１】

「イオン泳動」は、荷電粒子を移動させる電流の能力に基づく。皮膚に配置された隣接する電極対が、皮膚とその下の毛細管との間の電位を引き起こす。陽極では、陽性荷電薬物分子が皮膚表面から毛細管へと駆動される。逆に、陰性荷電薬物分子は皮膚から陰極へと移動させられると思われる。電流のスイッチを全く入れたり切ったりでき、および電流を改変することができることから、イオン泳動送達は、急速な開始および中止を可能にし、薬物送達は高度に制御可能でプログラム可能である。

【０４５２】

穿孔技術は、多くの薬物分子の血流への通過を停止させる皮膚の層である角質層を一時的に破壊するために多様な型の高周波パルス（高周波放射線、レーザー、熱、または音のような）のエネルギーを用いる。イオン泳動とは異なり、穿孔技術において用いられるエネルギーは、皮膚を超えて薬物を輸送するために用いられるのではなく、その移動を促進することに注意することが重要である。穿孔は、その中を薬物物質が、通常の場合より容

易にしかも急速に通過できる「ウィンドウ」を提供する。

【０４５３】

薬学的に許容される担体および／または希釈剤には、任意のおよび全ての溶媒、分散培地、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等が含まれる。薬学的活性物質のためにそのような培地および物質を用いることは、当技術分野で周知であり、任意の通常の培地または物質が調節物質と不適合である場合を除き、薬学的組成物におけるその使用が企図される。補助活性化合物も同様に組成物に組み入れることができる。

【０４５４】

一つの態様において、本発明の薬学的組成物は、A-β-リポタンパク血症、A-V、A-β-2-ミクログロブリンアミロイドーシス、A-T、A1AD、A1AT、アーゲナエス、アールスコグ症候群、アールスコグ-スコット症候群、アーセ-スミス症候群、アーセ症候群、AAT、アブデルハルデン-カウフマン-リグナック症候群、腹筋欠損症候群、腹壁欠損、腹部てんかん、腹性片頭痛、外転筋痙性発声障害、アバクロンビー症候群、眼瞼-大口症候群、ABS、HPRT欠損、シンツェル型脳梁欠損、四肢頭皮頭蓋欠損、初経欠損、HGPRT欠損、吸収性高シュウ酸尿、アブト-レトラー-ジーヴェ病、ACADL、ACADM欠損、ACADM、ACADS、有棘赤血球増加症-神経障害、有棘赤血球増加症、水疱性棘融解、黒色表皮症、水疱性アカントーシス、A型インスリン抵抗性を有する黒色表皮症、B型インスリン抵抗性を有する黒色表皮症、表皮肥厚性母斑、無カタラーゼ血症、無カタラーゼ血症、ACC、副房室経路、副房室経路、無脳症、心欠損を伴うACF、アカラシア、アシャール-ティエール症候群、ACHARD（マルファン変異型）、アシャール病、無胆汁尿性黄疸、軟骨無発生、IV型軟骨無発生、III型軟骨無発生、軟骨無形成不全、晩発性軟骨形成不全、軟骨形成不全性小人症、アチュー症候群、色盲、アクロマトープ（Achromatope）、全色盲（Achromatopic）、全色盲（Achromatopsia）、無色素性母斑、酸性セラミダーゼ欠損、酸性マルターゼ欠損、酸性β-グルコシダーゼ欠損、メチルンマロン酸血症、プロピオン酸血症、挿間的運動失調および衰弱を伴う酸血症、アシドーシス、足根骨端病的組織結合、ACM、聴神経鞘腫、聴神経腫、脚形成不全を伴うACPS、ACPS II、ACPS IV、ACPS III、痙攣障害を伴う後天性失語症、後天性ブラウン症候群、後天性てんかん性失語症、後天性第XIII因子欠損、後天性型ACC（子宮内での感染によって引き起こされた）、後天性高シュウ酸尿症、後天性低γグロブリン血症、後天性免疫不全症候群（AIDS）、後天性鉄過剰、後天性脂肪異栄養、後天性部分的脂肪異栄養、後天性遊走脾、ACR、顔および性器異常を伴う先端骨形成不全、空気腎、シンツェル型先端脳梁症候群、尖頭合指症、I型尖頭合指症、I型サブタイプI型尖頭合指症、II型尖頭多合指症、III型尖頭多合指症、IV型尖頭多合指症、尖頭合指症V（ACS5またはACS V）サブタイプI、尖頭頭蓋非対称および軽度合指症、尖頭症、先端軟骨過形成、腸性肢端皮膚炎、先端骨形成不全、先端異骨症、アクロジストロフィーニューロパシー、ナジャー型四肢顔面骨形成不全、軸後型四肢顔面骨形成不全、ジニー-ウィーデプ（Genee-Wiedep）型四肢顔面骨形成不全、家族性先端早老症、先端巨大症、遺伝性先端疼痛症、中間肢短縮性異形成、遠位中間肢短縮性小人症、小先端骨格異形成、骨粗鬆症および頭蓋下顎の変化を伴う先端骨溶解症、先端骨溶解症、先端異常感覚、ACS I、II型ACS、III型ACS、ACS3、ACTH欠損、ミオクローヌス作用、急性上腕神経炎症候群、急性上腕神経根炎症候群、急性脳ゴーシェ病、急性胆管炎、急性播種性脳脊髄神経根障害、急性播種性組織球増殖症-X、急性出血性灰白脳炎、急性特発性多発神経炎、急性免疫性多発神経炎、急性乳児性ペリツェーウス・メルツバッヒャー脳硬化症、急性間欠性ポルフィリン症、急性ポルフィリン症、急性サルコイドーシス、急性肩神経炎、急性中毒性表皮剥離、長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損、短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損、アシル-CoAジヒドロキシアセトンアシルトランスフェラーゼ、アシル補酵素Aオキシダーゼ欠損、ADA、ADA欠損、アダム複合体、エナメル質ベーチェット症候群、アダマンチノーム、アダムス-オリバー症候群、適応性大腸炎、複合型ADD、ADD、脳硬化症を伴うアジソン病、アジソン貧血、アジソン病、アジソン-ビールメル貧血、アジソン-シルダー病、アジソン悪性貧血、母指内転-精神遅滞、内転筋痙性発声障害、内転筋痙攣性発声障害、高齢女性の線腫関連男性化、結腸直腸線腫症、大腸線腫性ポリポーシス、家族性線腫性ポリポーシス、アデノシンデ

アミナーゼ欠損、アデニルスクシナーゼ欠損、主に多動-衝動型ADHD、主に不注意型ADHD、ADHD、癒着性クモ膜炎、アディー症候群、アディー症候群、アディー緊張性瞳孔、アディー瞳孔、脂肪性器性色素性網膜炎多指症、脂肪性器性色素性網膜炎症候群、有痛性脂肪、有痛性脂肪症、脂肪性器性ジストロフィー、青年期シスチン蓄積症、ADPKD、副腎皮質線腫、副腎疾患、下垂体ACTH過剰に起因する副腎機能亢進、副腎形成不全、副腎不全、副腎新生物、副腎性男性化、副腎-色素性網膜炎-多指症候群、副腎皮質不全、副腎皮質機能低下、孤立性副腎皮質刺激ホルモン欠損、副腎性器症候群、副腎脳白質ジストロフィー、副腎脊髄神経障害、副腎-色素性網膜炎-多指症候群、成人型シスチン蓄積症、成人型皮膚筋炎、成人型低ホスファターゼ血症、成人型黄斑網膜変性、成人発症型ALD、成人発症型セロイドーシス、成人発症型腎髄質性嚢胞症、成人発症型悪性貧血、成人発症型シンドラー病、成人発症型亜急性壊死性脳脊髄障害、成人型多発性嚢胞腎、成人発症型腎髄質性嚢胞症、アジニロスクシネート（Adynlosuccinate）リアーゼ欠損、AE、AEC症候群、AFD、無フィブリノーゲン血症、アフリカシデローシス、AGA、神経節細胞欠損性巨大結腸、加齢関連黄斑変性、大脳交連無発生、脳梁無発生、脳梁無発生-乳児性痙縮-眼異常、脳梁無発生脈絡網膜異常、脳梁無発生-脈絡網膜異常、攻撃性肥満細胞症、原発性失認、AGR三徴、AGU、無脳回、無脳回-脳回肥厚-バンドスペクトル、AHC、AHD、AHDS、AHF欠損、AHG欠損、AHO、アフマンダ・デル・カスティロ（Ahumada Del Castillo）、エカルディ症候群、AIED、AIMP、AIP、AIS、無動発作、ALA-Dポルフィリン症、乳糖分解酵素欠損症、アラジル症候群、オーランド島眼疾患（X-連鎖）、アラニン尿症、アルベルス-シェーンベルク病、白皮症、白子、アルビノイディズム（Albinoidism）、オールブライト遺伝性骨形成異常、アルカプトン尿症、アルコール関連出生時欠損、アルコール性胎児障害、アルコール性肝硬変、Ald、ALD、ALD、アルドステロン、正常血圧を伴うアルドステロン症、オールドリッチ症候群、アレキサンダー病、アレキサンダー病、疼痛ジストロフィー、疼痛神経ジストロフィー、アルカプトン尿症、アルカプトン尿症性組織褐変症、アルキルDHAPシンターゼ欠損、アラン-ヘルンドン-ダッドレー症候群、アラン-ヘルンドン症候群、アラン-ヘルンドン-ダッドレー精神遅滞、アレルギー肉芽腫性アンティティス（Antitis）、クロンカイト-カナダアレルギー肉芽腫様血管炎、無葉全前脳症、円形脱毛症、ケルス脱毛症、瘢痕性脱毛症、限局性脱毛症、脱毛-白毛-ブドウ膜炎-白斑-難聴-皮膚-ブドウ膜-O、半全身性脱毛、完全脱毛症、全身性脱毛、アルパーズ病、肝硬変を伴うアルパーズびまん性脳灰白質変性、アルパーズ進行性乳児ポリオジストロフィー、α-1-アンチトリプシン欠損、α-1,4-グルコシダーゼ欠損、α-ガラクトシダーゼA欠損、α-ガラクトシダーゼB欠損、α高密度リポタンパク質欠損、α-L-フコシダーゼ欠損3型フコシドーシス、シンドラー型α-GalNAc欠損、αリポタンパク血症、αマンノシドーシス、シンドラー型α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ欠損、シンドラー型α-NAGA欠損、α-ノイラミニダーゼ欠損、非欠失型α-サラセミア／精神遅滞症候群、αリポタンパク質血症、アルポート症候群、ALS、アルストレーム症候群、アルストレーム、アルストレーム症候群、交代性片麻痺症候群、小児交代性片麻痺、アルツハイマー病、家族性黒内障性白痴、成人型家族性黒内障性白痴、乳児性家族性黒内障性白痴、外陰異形成、AMC、AMD、エナメル上皮腫、エナメル質形成不全、非産褥性無月経-乳汁漏出、無月経-乳汁漏出-FSH病症候群、無月経、アミノ酸障害、アミノ酸尿症-骨軟化症-高リン酸塩尿症候群、AMN、羊水穿刺、羊膜帯、羊膜帯症候群、羊膜帯破壊複合体、羊膜帯続発症、羊膜破裂続発症、先天性切断、AMS、ドランゲアムステルダム小人症候群、アミロ-1 6-グルコシダーゼ欠損、慢性血液透析のアミロイド関節症、アミロイド角膜ジストロフィー、アミロイド多発神経障害、アミロイドーシス、家族性地中海熱アミロイドーシス、アミロペクチン症、先天性筋形成不全、筋萎縮性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症-ポリグルコサン体、AN、AN 1、AN 2、肛門閉鎖、肛門膜、肛門直腸先天異常、肛門狭窄、アナリン60アミロイドーシス、無αリポタンパク血症、肛門直腸、肛門直腸、未分化星状細胞腫、アンダーセン病、アンダーソン-ファブリー病、アンダーセン糖原病、アンダーソン-ワールブルク症候群、アンドレ症候群、II型アンドレ症候群、男性ホルモン不応性、部分的男性ホルモン不応症候群、部分的男性ホルモン不応症候群、男性ホルモンステロイド、自己免疫性溶血性

貧血、ブラックファン-ダイアモンド貧血、先天性貧血、母指三指節症候群、溶血性寒冷抗体貧血、PGK欠損を伴う溶血性貧血、悪性貧血、無脳症、アンゲルマン症候群、血管-骨肥厚症候群、脈管濾胞性リンパ節増殖、血管性血友病、被角血管腫体、びまん性角化血管腫体、びまん性角化血管腫、網膜血管腫症、血管腫様リンパ様、遺伝性血管神経性浮腫、無汗性外胚葉性形成異常、無汗性X-連鎖外胚葉形成異常、無光彩症、無光彩-外陰異形成-精神遅滞、精神遅滞に関連した無光彩症、無光彩症-小脳性運動失調-精神薄弱、部分的無光彩-小脳性運動失調-精神遅滞、部分的無光彩-小脳性運動失調-精神薄弱、I型無光彩症、II型無光彩症、無光彩-ウィルムス腫瘍関連、無光彩-ウィルムス腫瘍-性腺芽腫、眼瞼癒着-外胚葉欠損-口唇／口蓋裂、強直性脊椎炎、輪状溝、無歯症、完全無歯症（Anodontia vera）、異常三色型色、歯の形成異常、冠状象牙質形成異常、名詞失語症、無眼球症、肛門直腸、肛門直腸先天異常、無嗅覚症、小人症を伴う脚の前方弯曲、前膜角膜ジストロフィー、抗痙攣薬症候群、抗エプスタイン-バーウイルス核抗原（EBNA）抗体欠損、抗体欠損、ほぼ正常な免疫グロブリンを有する抗体欠損、抗血友病因子欠損、抗血友病グロブリン欠損、抗リン脂質症候群、抗リン脂質抗体症候群、アンチトロンビンIII欠損、古典的（I型）アンチトロンビンIII欠損、アンチトリプシン欠損、アントレー-ビクスラー症候群、アントニ麻痺、脛骨不安、大動脈弓症候群、左心室形成不全候群を伴う大動脈僧帽弁閉鎖、大動脈狭窄、アパロシシス（Aparoschisis）、APC、APECED症候群、アペール症候群、アペール、失語症、先天性軸性頭蓋外形成不全、先天性皮膚形成不全、四肢横行脚欠損を伴う先天性皮膚形成不全、再生不良性貧血、先天性異常を伴う再生不良性貧血、APLS、無呼吸、アパラチア型アミロイドーシス、アップルピール症候群、失行、頬顔面失行、構成失行、観念的失行、観念運動失行、観念運動失行、運動失行、眼球運動失行、APS、クモ膜炎、拘縮ビールス型クモ指、クモ指、クモ膜嚢胞、骨化性クモ膜炎、クモ膜炎、アラン-デュシェーヌ、アラン-デュシェーヌ筋萎縮、再生不良性貧血、アルギナーゼ欠損、アルギニン血症、アルギノスクシナーゼ欠損、アルギノスクシナーゼ欠損、アルギノスクシネートリアーゼ欠損、アルギノコハク酸リアーゼ-ASL、アルギノコハク酸シンターゼ欠損、アルギノコハク酸尿症、アルゴンツ-デルカスティロ症候群、無嗅脳症、アルメニア症候群、アルノルト-キアーリ奇形、アルノルト-キアーリ症候群、ARPKD、不整脈ミオクローヌス、不整脈惹起性右心室形成異常、動脈肝形成異常、動静脈奇形、脳の動静脈奇形、巨細胞動脈炎、関節炎、関節炎尿道炎、関節-歯-骨形成異常、関節-眼障害、先天性多発関節弛緩、先天性多発性関節拘縮、遠位IIA型先天性多発性関節拘縮、ARVD、アリールスルファターゼ-B欠損、AS、ASA欠損、上行性麻痺、ASD、心房中隔欠損、ASH、アッシェルマン症候群、アシュケナージ型アミロイドーシス、ASL欠損、アスパルチルグルコサミン尿症、アスパルチルグルコサミン尿症、アスペルガー症候群、アスペルガー型自閉症、窒息性胸郭形成異常、無脾症候群、ASS欠損、喘息、I期星状細胞腫（良性）、II期星状細胞腫（良性）、心欠損を伴う非対称泣き顔、非対称中隔肥大、無症候性脳梁無発生、AT、AT III欠損、ATIII変異型IA、AT III変異型Ib、AT 3、運動失調、毛細血管拡張性運動失調、II型乳酸アシドーシスを伴う運動失調、運動失調脳
性麻痺、運動失調無力症、失調性失発語症、ATD、アテトーシス様脳性麻痺、アトピー性湿疹、気管食道フィステルを伴うまたは伴わない食道閉鎖、心房中隔欠損、第一心房中隔欠損、心房中隔小心室中隔欠損、心房粗動、心房細動、心耳形成異常、心房中隔欠損、房室ブロック、房室管欠損、房室中隔欠損、遺伝性延髄萎縮、萎縮性脚気、オリーブ橋小脳萎縮、注意欠陥障害、注意欠陥多動障害、減弱性大腸線腫性ポリポーシス、異型性アミロイドーシス、異型性高フェニルアラニン血症、外耳道閉鎖、耳介側頭症候群、自閉症、アスペルガー型自閉症、自閉症痴呆運動失調および意図的に手を使用することができない、乳児自閉症自閉症、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性多発性内分泌腺症-カンジダ症、自己免疫性I型多腺病、常染色体優性白皮症、常染色体優性コンペリング・ヘリオオフタルミック・アウトバースト（Compelling Helioophthalmic Outburst）症候群、晩発型常染色体優性デスミン遠位ミオパシー、常染色体優性EDS、常染色体優性エメリー-ドライフス筋ジストロフィー、常染色体優性円錐角膜、常染色体優性ペリツェーウス-メルツバッヒャー脳硬化症、常染色体優性多嚢胞腎、常染色

体優性脊髄小脳変性、常染色体劣性無γグロブリン血症、常染色体劣性中心核ミオパシー、常染色体劣性コンラーディ-ヒュネルマン症候群、常染色体劣性EDS、常染色体劣性エメリー-ドライフス筋ジストロフィー、常染色体劣性型眼白子症、常染色体劣性遺伝性脳梁無形成、常染色体劣性円錐角膜、常染色体劣性多嚢胞腎、常染色体劣性重度複合免疫欠損、AV、AVM、AVSD、AWTA、腋窩膿瘍、巨大軸索ニューロパシー、アゾレア神経病、B-Kモル症候群、バビンスキー-フレーリッヒ症候群、BADS、バイヤルジェ症候群、バルカン病、バラー-ジェロルド症候群、気球状僧帽弁、バロー病同心性硬化症、バルティックミオクローヌスてんかん、バンナヤン-ゾナナ症候群（BZS）、バンナヤン-ライリー-ルバルカバ症候群、バンティ症候群、バルデー-ビードル症候群、不全リンパ球症候群、バーロー症候群、バラケル-シモンズ病、バレット食道、バレット潰瘍、バルト症候群、バーター症候群、基底細胞母斑症候群、バセドウ病、バッセン-コルンツヴァイク症候群、バッテン病、バッテン-メーオー症候群、バッテン-シュピールマイアー-フォークト症候群、バッテンターナー症候群、バッテンターナー型先天性ミオパシー、バッテン-フォークト症候群、BBB症候群、BBB症候群（オピッツ）、BBB症候群、BBBG症候群、BCKD欠損、BD、BDLS、BE、ビールス症候群、ビールス-ヘヒト症候群、ビーン症候群、BEB、ベヒテレフ症候群、ベッカー病、ベッカー筋ジストロフィー、ベッカー母斑、ベックウィズ-ヴィーデマン症候群、ベックウィズ症候群、ベゲス-セサル症候群、ベーチェット症候群、ベーチェット病、ベール1、ベール2、ベル麻痺、良性黒色表皮症、良性星状細胞腫、良性頭蓋神経腫瘍、良性シスチン蓄積症、良性本態性眼瞼痙攣、良性本態性振せん、良性家族性血尿、良性病巣筋萎縮、ALSの良性病巣筋萎縮、良性水頭症、良性過剰運動症候群、良性黒色角化症、良性発作性腹膜炎、良性再発性血尿、良性再発性肝臓内胆汁うっ滞、カルヴェの肥大を伴う良性棘筋萎縮、良性対称性脂肪腫症、中枢神経系良性腫瘍、ベラルディネリ-セイプ症候群、ベルガー病、脚気、バーマン症候群、ベルナール-ホルネル症候群、ベルナール-スーリエ症候群、ベスニエ痒疹、ベスト病、β-アラニンピルビン酸アミノトランスフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ欠損、モルキオ症候群、β-グルクロニダーゼ欠損、β酸化欠陥、βサラセミアメジャー、βサラセミアマイナー、βリポタンパク質欠損、ベスレム（Bethlem）ミオパシー、ビューレン症候群、BH4欠損、バイバー-ハーブ-ディマー（Biber-Haab-Dimmer）角膜ジストロフィー、二弁形成大動脈弁、ビードル-バルデー、二裂頭蓋、二官能性酵素欠損、両側聴神経線維腫症、両側性聴神経腫、両側性右側続発症、両側性腎無形成、両側性側頭葉障害、胆汁性発作、I型ビリルビングルクロノシルトランスフェラーゼ欠損、ビンダー（Binder）症候群、ビンスヴァンガー病、ビンスヴァンガー脳症、ビオチニダーゼ欠損、セッケル型鳥状頭蓋小人症、出生時欠損、母斑、両側頭鉗子マーク症候群、両心室性線維症、ブヨルンスタッド症候群、B-Kモル症候群、知覚神経型ブラックロックス-白子-聴覚障害（BADS）、ブラックファン-ダイアモンド貧血、膿漏特発性関節炎、関節炎、眼瞼縮小、下垂、逆内眼角ぜい皮症候群、眼瞼痙攣、良性本態性眼瞼痙攣、眼瞼痙攣口下顎失調、ブレッシヒ嚢胞、BLFS、盲、ブロッホ-ジーメンス色素失調黒色芽細胞症キュティス・リネアリス（Cutis Linearis）、ブロッホ-ジーメンス-サルズバーガー症候群、ブロッホ-サルズバーガー症候群、血液型、A型血液、B型血液、AB型血液、O型血液、ブルーム症候群、ブルーム-トレ-マカセク（Mackacek）症候群、青色ゴムまり様母斑、青色児、ブルーダイアパー症候群、BMD、BOD、BOFS、骨腫瘍-類上皮嚢胞-多発ポリープ、ワイバーン-メーソン症候群、ボネビー-ウルリッヒ症候群、ブック症候群、BOR症候群、BORJ、ベルエソン症候群、ベルエソン-フォルスマン-レーマン症候群、ボーエン症候群、ボーエン-コンラーディ症候群、ボーエン-コンラーディヒュッテライト、ボーエン-コンラーディ型ヒュッテライト症候群、ボーマン層、BPEI、BPES、上腕神経炎、上腕神経炎症候群、腕神経叢神経炎、上腕叢神経障害、腕頭虚血、ブラクマン（Brachmann）-ドランゲ症候群、短頭、先天性短形型、徐脈、周産期仮死による脳損傷、脳腫瘍、良性脳腫瘍、悪性脳腫瘍、分枝鎖α-ケト酸デヒドロゲナーゼ欠損、I型分枝鎖ケトン尿症、分枝欠損、鰓性眼顔症候群、鰓性耳腎形成異常、鰓性耳腎症候群、鰓性眼顔症候群、鰓性耳症候群、ブラント症候群、ブランディワイン型象牙質形成不全、ブランディワイン型象牙質形成不全、乳癌、BRIC症候群、脆弱骨病、III型家族性高リポタンパク質血症、広母

指症候群、広母指足母指特徴的顔面精神遅滞、広母指-足母指、ブロカ失語症、ブロック-デューリング病、青銅色糖尿病、青銅色シルダー病、ブラウン白皮症、遺伝性褐色エナメル質、ブラウン-セカール（Sequard）症候群、ブラウン症候群、BRRS、ブルーゲル（Brueghel）症候群、ブルトン総無γグロブリン血症、BS、BSS、ブキャナン症候群、バッド症候群、バッド-キアーリ症候群、バーガー-グルーツ（Gruetz）症候群、X-連鎖延髄脊髄筋萎縮、ブルドッグ症候群、遺伝性水疱、水疱様CIE、先天性水疱様魚鱗癬紅皮症、水疱性魚鱗癬、水疱性類天疱瘡、バーキットリンパ腫、アフリカ型バーキットリンパ腫、非アフリカ型バーキットリンパ腫、BWS、バイラー病、C症候群、C1エステラーゼ阻害剤機能障害II型血管浮腫、C1-INH、C1エステラーゼ阻害剤欠損I型血管浮腫、C1NH、カッチ-リッチ病、CAD、CADASIL、CAH、踵骨外反、外反踵足、ピロリン酸カルシウム二水和物沈着、脳梁無発生および眼球異常、棘筋萎縮のカルヴェ肥大、屈肢形成異常、屈肢性小人症、屈肢症候群、屈指-口蓋裂-内反足、屈指-制限顎可動域、屈指小人症、屈指症候群、長指型屈指症候群、カムラチ-エンゲルマン病、カナダ-クロンカイト病、キャナヴァン病、キャナヴァン病を含む、キャナヴァン白質ジストロフィー、癌、リンチ型癌家族性症候群、キャントレル症候群、キャントレル-ハラー-ラビッチ症候群、キャントレル五徴、カルバミルホスフェートシンテターゼ欠損、炭水化物欠損糖タンパク質症候群、Ia型炭水化物欠損糖タンパク質症候群、炭水化物誘導高脂血症、グルコースガラクトース炭水化物不耐性、二酸化炭素アシドーシス、多発性カルボキシラーゼ欠損、心-四肢症候群、心聴覚症候群、ジェルヴェルおよびランゲ-ニールセンの心聴覚症候群、心皮膚症候群、心-顔-皮膚症候群、ケイラー型心顔症候群、びまん性糖原性心臓肥大、心筋症性黒子症、心ミオパシー、デスミン貯蔵ミオパシーに関連した心ミオパシー、デスミン欠損による心ミオパシー、心ミオパシー-好中球減少症候群、心ミオパシー-好中球減少症候群、致死性乳児心ミオパシー、心障害性アミロイドーシス、噴門痙攣、カルドカーディアック（Cardocardiac）症候群、クレアチニン-アシルカルニチントランスロカーゼ欠損、カルニチン欠損および障害、原発性カルニチン欠損、二次性カルニチン欠損、MCADに対して副次的なカルニチン欠損、カルニチン欠損症候群、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼI＆II（CPT I＆II）、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損、1型カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損、2型カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損、良性古典的筋型を含み、重度乳児型を含む、カルニチン輸送欠損（原発性カルニチン欠損）、カルノシナーゼ欠損、カルノシン血症、カロリ病、カーペンター症候群、カーペンターズ、軟骨-毛髪形成不全、キャッスルマン病、ヒアリン血管型キャッスルマン病、プラズマ細胞型キャッスルマン病、キャッスルマン腫瘍、ネコ眼症候群、ネコ鳴き症候群、カタラーゼ欠損、白内障-歯症候群、ハッチンソン歯にX-連鎖した白内障、カテコールアミンホルモン、カテル-マンツケ（Catel-Manzke）症候群、カテル-マンツケ型口蓋指症候群、尾形成異常、尾形成異常続発症、尾後退症候群、メジャーカウサルギー症候群、海面腫、海綿状血管腫、海綿状血管腫、海綿状リンパ管腫、海綿状奇形、ケイラー症候群、カゼナフ（Cazenave）白斑、CBGD、CBPS、CCA、CCD、CCHS、CCM症候群、CCMS、CCO、CD、CDG1a、CDG1A、Ia型CDGS、CDGS、CDI、CdLS、セリアック病、セリアックスプルー、セリアックスプルー-皮膚炎、プリンヌクレオシドレオシドホスホリラーゼ欠損を有する細胞性免疫欠損、ケルス白斑、中枢性無呼吸、中心コア病、中枢性尿崩症、中枢型神経線維腫症、中枢性換気過少、中枢性睡眠時無呼吸、遠心性脂肪異栄養、中心核ミオパシー、CEP、頭瘤、頭胸部脂肪異栄養、セラミドトリヘキソシダーゼ欠損、小脳無発生、小脳形成不全、小脳片側無発生、小脳形成不全、小脳虫部形成不全、小脳虫部無発生-ハイパーネア（hypernea）-挿間的眼球運動-運動失調-遅滞、小脳症候群、小脳実質障害IV、小脳延髄奇形症候群、小脳-眼皮膚毛細血管拡張症、家族性小脳実質障害IV、小脳橋角腫瘍、大脳クモ膜炎、皮質下梗塞および白質ジストロフィーを伴う常染色体優性脳性動脈症、脳性脚気、脳性両麻痺、脳性巨人症、脳虚血、脳血管奇形、脳性麻痺、脳-眼腎ジストロフィー、脳-眼-顔-骨格症候群、脳-肋骨-下顎骨症候群、脳肝腎症候群、大脳黄斑変性、フクヤマ型脳筋ジストロフィー、脳眼発育不全、脳眼形成異常-筋ジストロフィー症候群、脳眼顔骨格症候群、脳網膜動静脈瘤、セレブロシドリピドーシス、脳腱黄色腫症、脳血管鉄カルシウム沈着症、成人

型セロイドリポフスチン症、頚部ジストニー、頚部ジストニー、頚部眼聴覚症候群、頸髄狭窄、頸椎癒合、CES、CF、CFC症候群、CFIDS、CFND、CGD、CGF、全身性弛緩性皮膚、チャナリン-ドーフマン病、チャナリン-ドーフマン症候群、チャナリン-ドーフマン魚鱗癬症候群、チャンドラー症候群、シャルコー病、シャルコー-マリー-ツース、シャルコー-マリー-ツース病、変異型シャルコー-マリー-ツース病、シャルコー-マリー-ツース-ルシー-レヴィ病、CHARGE連合、チャージ症候群、CHARGE症候群、ショーン（Chaund）外胚葉形成異常、チェディアック-東症候群、チェディアック-シュタインブリンク-東症候群、肉芽腫性口唇炎、口唇裂、ケムケ（Chemke）症候群、チェネー症候群、サクランボ赤色斑ミオクローヌス症候群、CHF、CHH、キアーリ病、キアーリ奇形I、キアーリ奇形、I型キアーリ（キアーリ奇形I）、II型キアーリ（キアーリ奇形II）、キアーリI症候群、キアーリ-バッド症候群、キアーリ-フロンメル症候群、キアーリ奇形II、CHILD症候群、CHILD魚鱗癬症候群、CHILD症候群魚鱗癬、小児副腎脳白質ジストロフィー、小児皮膚筋炎、小児発祥型ジストニー、小児周期性嘔吐、小児巨大軸索ニューロパシー、小児低ホスファターゼ血症、小児筋ジストロフィー、CHN、胆汁うっ滞、ノルウェー型遺伝性胆汁うっ滞、肝臓内胆汁うっ滞、新生児胆汁うっ滞、経口避妊薬使用者の胆汁うっ滞、末梢肺動脈狭窄を伴う胆汁うっ滞、妊娠時胆汁うっ滞、コレステロールデス
モラーゼ欠損、点状軟骨異形成、先天性軟骨形成異常カルシウム沈着、胎児性軟骨形成異常、軟骨形成異常性ミオトニー、軟骨形成異常、内反足を伴う軟骨形成異常、骨端軟骨形成異常、過形成型軟骨形成異常、軟骨外胚葉形成異常、軟骨形成不全、コンドロヒストロフィア（Chondrodystrophia）、骨軟骨ジストロフィー、舞踏病-有棘赤血球増加症、絨毛膜絨毛採取、脈絡網膜異常、ACCを伴う脈絡網膜異常、脈絡網膜コロボーム-ジュベール症候群、クリスト-ジーメンス-トウレン症候群、クリスマス病、クリスマスツリー症候群、第3染色体遠位3p欠失、第3染色体遠位3pモノソミー、第3染色体遠位3q2重複、第3染色体遠位3q2トリソミー、第3染色体モノソミー3p2、染色体3q部分的重複症候群、染色体3q、部分的トリソミー症候群、第3染色体-トリソミー3q2、第4染色体欠失4q31-qter症候群、第4染色体欠失4q32-qter症候群、第4染色体欠失4q33-qter症候群、第4染色体長腕欠失、第4染色体長腕欠失、第4染色体モノソミー4q、第4染色体-モノソミー4q、第4染色体モノソミー遠位4q、第4染色体部分的欠失4p、第4染色体、短腕の部分的欠失、第4染色体遠位4qの部分的モノソミー、第4染色体部分的モノソミー4p、第4染色体部分的トリソミー4（q25-qter）、第4染色体部分的トリソミー（q26またはq27-qter）、第4染色体部分的トリソミー4（q31または32-qter）、第4染色体部分的トリソミー4p、第4染色体部分的トリソミー4q2および4q3、第4染色体部分的トリソミー遠位4、第4染色体環状、第4染色体4q末端欠失症候群、染色体4q-症候群、染色体4q-症候群、第4染色体トリソミー4、第4染色体トリソミー4p、第4染色体XY/47 XXY（モザイク）、第5染色体モノソミー5p、第5染色体、短腕部分的欠失症候群、第5染色体トリソミー5p、第5染色体トリソミー5p完全（5p11-pter）、第5染色体トリソミー5p部分的（5p13または14-pter）、染色体5p-症候群、第6染色体部分的トリソミー6q、第6染色体環状、第6染色体トリソミー6q2、第7染色体7p2、第7染色体短腕部分的欠失（7p2-）、第7染色体末端7p欠失[del(7)(p21-p22)]、第8染色体モノソミー8p2、第8染色体モノソミー8p21-pter、第8染色体部分的欠失（短腕）、第8染色体部分的モノソミー8p2、第9染色体完全トリソミー9P、第9染色体短腕の部分的欠失、第9染色体部分的モノソミー9p、第9染色体部分的モノソミー9p22、第9染色体部分的モノソミー9p22-pter、第9染色体部分的トリソミー9Pを含む、第9染色体環状、第9染色体テトラソミー9p、第9染色体テトラソミー9Pモザイク現象、第9染色体トリソミー9p（多発性変異型）、第9染色体トリソミー9（pter-p21またはq32）を含む、第9染色体トリソミーモザイク、第9染色体トリソミーモザイク、第10染色体遠位トリソミー10q、第10染色体モノソミー、第10染色体モノソミー10p、第10染色体、部分的欠失（短腕）、第10染色体10p-部分的、第10染色体部分的トリソミー10q24-qter、第10染色体トリソミー10q2、第11染色体長腕の部分的モノソミー、第11染色体部分的モノソミー11q、第11染色体部分的トリソミー、第11染色体部分的トリソミー11q13-qter、第11染色体部分的トリソミー11q21-qter、第11染色体部分的トリソミー11q23-qter、染色体11q、部分的トリソミー、第12染色体同腕染色体12p

モザイク、第13染色体部分的モノソミー13q、第13染色体、長腕の部分的モノソミー、第14染色体環状、第14染色体トリソミー、第15染色体遠位トリソミー15q、染色体r15、第15染色体環状、第15染色体トリソミー15q2、染色体15q、部分的重複症候群、第17染色体間質性欠失17p、第18染色体長腕欠失症候群、第18染色体モノソミー18p、第18染色体モノソミー18Q、第18染色体環状、第18染色体テトラソミー18p、染色体18q-症候群、第21染色体モザイク21症候群、第21染色体環状、第21染色体転座21症候群、第22染色体逆重複（22pter-22q11）、第22染色体部分的トリソミー、第22染色体環状、第22染色体トリソミーモザイク、第48染色体XXYY、第48染色体XXXY、染色体r15、染色体三重複、染色体三重複、染色体三倍体症候群、X染色体、XXY染色体、慢性無胆汁尿性黄疸、慢性癒着性クモ膜炎、慢性副腎皮質不全、慢性海綿体炎、慢性先天性再生不良性貧血、慢性食菌作用不全、慢性家族性肉芽腫症、慢性家族性黄疸、慢性疲労性免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性肉芽腫症、慢性ギヤン-バレー症候群、慢性特発性黄疸、慢性特発性多発神経炎（CIP）、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、慢性炎症性脱髄性多発根神経障害、慢性運動性チック、慢性粘膜皮膚カンジダ症、慢性多発性チック、慢性非特異性潰瘍性大腸炎、慢性閉塞性胆管炎、慢性消化性潰瘍食道炎症候群、慢性進行性舞踏病、慢性進行性外眼筋麻痺症候群、慢性進行性外眼筋麻痺およびミオパシー、赤筋線維興奮を伴う慢性進行性外眼筋麻痺、慢性再発性多発神経障害、慢性サルコイドーシス、慢性痙性発声障害、小児慢性嘔吐、CHS、チャーグ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、CIP、先天性色素性肝硬変、肝硬変、シスチン尿症、シトルリン血症、CJD、古典的シンドラー病、古典型プファイファー症候群、古典的カエデシロップ尿病、古典的血友病、古典型I型コケーン症候群（A型）、古典的リー病、古典的フェニルケトン尿症、古典的X-連鎖ペリツェーウス・メルツバッヒャー脳硬化症、CLE、口唇／口蓋裂粘液嚢腫下唇PP遠位性器異常、口唇-口蓋裂眼瞼縮小兎眼隔離症、異常母指および小頭症を伴う口唇／口蓋裂、口蓋裂-関節拘縮-ダンディ・ウォーカー奇形、口蓋裂口唇裂、小顎症を伴う鎖骨頭蓋形成不全、母指欠損＆遠位無指、鎖骨頭蓋形成不全、鎖骨頭蓋骨形成異常、クリック雑音症候群、CLN1、慢性痙性クロウストン症候群、内反足、CMDI、CMM、CMT、CMTC、CMTX、COA症候群、大動脈縮窄、コーツ病、敷石状形成異常、コーチ・ユダヤ障害、コケーン症候群、COD-MD症候群、COD、コフィン-ローリー症候群、コフィン症候群、コフィン・サイリズ症候群、COFS症候群、コーガン角膜ジストロフィー、コーガン・リース症候群、コーエン症候群、寒冷凝集素病、寒冷抗体病、寒冷抗体溶血性貧血、潰瘍性大腸炎、重症大腸炎、潰瘍性大腸炎慢性非特異的潰瘍性大腸炎、コロジオン児、コロボーム心欠損後鼻孔閉鎖成長性器発達遅滞尿異常耳異常、コロボーム、結腸神経症、色盲、色盲、コルポセファリー（Colpocephaly）、円柱様食道、複合錐体かん体変性、免疫グロブリンを伴う複合免疫欠損、複合中間外胚葉形成異常、分類不能型低γグロブリン血症、分類不能型免疫不全、単心室、交通性水頭症、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼの完全欠損、完全房室中隔欠損、補体成分1阻害剤欠損、補体成分C1調節成分欠損、完全心ブロック、複合炭水化物不耐性、複合局所疼痛症候群、複合V ATPシンターゼ欠損、複合体I、複合体I NADHデヒドロゲナーゼ欠損、複合体II、複合体IIコハク酸デヒドロゲナーゼ欠損、複合体III、複合体IIIユビキノン-チトクロームcオキシドレダクターゼ欠損、複合体IV、複合体IVチトクロームcオキシダーゼ欠損、複合体IV欠損、複合体V、震盪性脳損傷、錐体-かん体変性、進行性錐体-かん体変性、かん体ジストロフィー、錐体-かん体ジストロフィー、融合性細網乳頭腫症、低PK運動性を伴う先天性、先天性腹筋欠損、先天性胸腺副甲状腺欠損、先天性色素脱失、先天性アジソン病、先天性副腎過形成、先天性副腎過形成、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性肺胞換気過少、先天性新生児貧血、先天性両側性ペルシルビア（Persylvian）症候群、先天性ブラウン症候群、先天性新血管欠損、先天性中枢性換気過少症候群、先天性脳性麻痺、先天性頚部骨癒合症、精神遅滞を伴う先天性鉤状母指、先天性拘縮性クモ指、クモ指を伴う先天性多発拘縮、先天性チアノーゼ、先天性頭蓋頭皮欠損、先天性肝臓内胆管拡張、先天性脱髄性神経障害、先天性食菌作用不全、先天性形成異常性血管拡張、先天性造血性ポルフィリン症、先天性第XIII因子欠損、先天性自律神経呼吸制御不全、I型先天性家族性非溶血性黄疸、先天性家族性遅延性下痢、II型先天性コケーン症候群（B型）、先天性

全身性線維腫症、先天性風疹、先天性巨大軸索神経障害、先天性心ブロック、先天性心欠損、紅皮性魚鱗癬および四肢欠損を伴う先天性半側形成異常、先天性溶血性黄疸、先天性溶血性貧血、先天性肝線維症、先天性遺伝性角膜ジストロフィー、先天性遺伝性リンパ浮腫、先天性軟骨形成過剰、先天性ミエリン形成減少性多発神経障害、先天性ミエリン形成減少神経障害、先天性ミエリン形成減少、先天性ミエリン形成減少（鱗茎）多発神経障害、先天性魚鱗癬様紅皮症、先天性円錐角膜、先天性乳酸アシドーシス、先天性乳糖不耐性、先天性脂肪異栄養、先天性肝硬変、先天性大葉性肺気腫、先天性限局性肺気腫、先天性巨舌症、先天性髄質狭窄、先天性巨大結腸、先天性褐色細胞腫母斑、先天性中胚葉異形態ジストロフィー、先天性中胚葉ジストロフィー、先天性微絨毛萎縮、先天性多発関節拘縮、先天性筋緊張性ジストロフィー、ミエリン形成減少によって引き起こされた先天性神経障害、先天性汎血球減少症、先天性悪性貧血、内因性因子の欠損による先天性悪性貧血、内因性因子の欠損による先天性悪性貧血、先天性色素性肝硬変、先天性ポルフィリン症、デスミン貯蔵ミオパシーに関連した先天性近位ミオパシー、先天性肺気腫、先天性赤芽球ろう、先天性赤芽球ろう、先天性網膜性盲、先天性網膜嚢胞、先天性色素性網膜炎、先天性網膜分離、先天性かん体病、先天性風疹症候群、遠位四肢減少異常を伴う先天性頭皮欠損、先天性知覚神経障害、関節拘縮を伴う先天性SMA、先天性球状赤血球性貧血、先天性脊柱骨端異形成、先天性係留脊髄症候群、先天性チロシン症、先天性水痘症候群、先天性血管海綿状奇形、先天性網膜血管被膜、先天性文字盲、先天性遊走脾（小児）、先天性心筋障害、円錐角膜、抱合型高ビリルビン血症、結膜炎、木質性結膜炎、結膜炎-尿道-滑膜症候群、コン症候群、結合組織病、コンラーディ病、コンラーディ-ヒュネルマン症候群、体質性再生不良性貧血、体質性赤血球形成不全、体質性湿疹、体質性肝機能障害、体質性血小板障害、先天性絞窄輪、小人症を伴う梗塞性心外膜炎、連続筋線維活動症候群、拘縮性クモ指、足筋萎縮拘縮眼運動失行、痙攣、クーリー貧血、銅輸送病、肝コプロポルフィリンポルフィリン症、三房心、左側三房心、三腔二房心、二腔心、コーリ病、角膜ジストロフィー、角膜アミロイドーシス、角膜混濁-弛緩性皮膚-精神遅滞、角膜ジストロフィー、コルネリア・ドランゲ症候群、角膜象牙質形成異常、角膜動脈病、冠血管心疾患、脳梁無発生、皮質-基底神経節変性（CBGD）、皮質変形、I型コルチコステロンメチルオキシダーゼ欠損、II型コルチコステロンメチルオキシダーゼ欠損、コルチソル、コステロ症候群、コット死、COVESDEM症候群、COX、COX欠損、COX欠損、フランス-カナダ型COX欠損、COX欠損乳児ミトコンドリアミオパシーデトーニ-ファンコーニ-ドプレーを含む、良性乳児性ミトコンドリアミオパシー型COX欠損、CP、CPEO、ミオパシーを伴うCPEO、赤筋繊維興奮を伴うCPEO、家族性型CPPD、CPT欠損、CPTD、頭側動脈炎、頭蓋髄膜脳瘤、頭蓋-口-指症候群、頭蓋手根骨ジストロフィー、頭蓋瘤、スコット型頭蓋指症候群-精神遅滞、頭蓋顔面骨形成不全、頭蓋顔面骨形成不全-PD動脈-多毛-唇形成不全、頭蓋顔面鼻形成異常、頭蓋骨幹端形成異常、頭蓋口指症候群、II型頭蓋口指症候群、クルゾン型狭頭症、狭頭症、頭蓋骨癒合-後鼻孔閉鎖-橈骨上腕骨癒合、頭蓋骨癒合-多毛-顔面その他の異常、頭蓋骨癒合顔中央部形成不全足異常、原発性頭蓋骨癒合、頭蓋骨癒合-橈骨形成不全症候群、橈骨欠損を伴う頭蓋骨癒合、二分頭蓋、CREST症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、ネコ鳴き症候群、寝台死、I型クリグラー・ナジャー症候群、クローン病、クロンカイト-カナダ症候群、クロス症候群、クロス症候群、クロス-マクジック-ブリーン症候群、クルゾン、クルゾン症候群、クルゾン頭蓋顔面骨形成不全、本態性混合クリオグロブリン血症、潜在眼球-合指症候群、潜在精巣-小人-正常下精神、シュナイダー結晶角膜ジストロフィー、CS、CSD、CSID、CSO、CST症候群、縮毛-眼瞼癒着-爪形成異常、クッシュマン-バッテン-シュタイネルト症候群、カース・マックリン型ヤマアラシ状魚鱗癬、カース・マックリン型、ガッシング、ガッシング症候群、ガッシングIII、遺伝性皮膚悪性黒色腫、皮膚ポルフィリン症、弛緩性皮膚-成長欠損症候群、先天性大理石様皮膚毛細血管拡張症、CVI、CVID、CVS、周期的嘔吐症候群、腎髄質嚢胞疾患、嚢胞性滑液嚢水腫、嚢胞性線維症、嚢胞性リンパ管腫、システイン-リジン-アルギニン-オルニチン尿症、シスチン蓄積症、シスチン蓄積症、シスチン尿症、二塩基性アミノ酸尿症を伴うシスチン尿症、I型シスチン尿症、II型シスチン尿症、III型シスチン尿症、

先天性腎髄質嚢胞、チトクロームCオキシダーゼ欠損、D.C.、涙液唾液アデノパシー、涙液唾液腺症、ダルプロ（Dalpro）、ダルトン、先天性色盲、ダンボルト-クロス症候群、舞踏眼-舞踏足症候群、ダンディ-ウォーカー症候群、ダンディ-ウォーカー嚢胞、ダンディ-ウォーカー変形、ダンディ-ウォーカー奇形、ダニッシュ（Danish）心臓型アミロイドーシス（III型）、ダリエ病、デーヴィッドソン病、デーヴィス病、DBA、DBS、DC、DD、ドバルシ（De Barsy）症候群、ドバルシ-モエンズ(Moens)-ディエルク（Dierck）症候群、ドランゲ症候群、ドモルシエ症候群、ドサンクティス-カッキオーネ症候群、ドトーニ-ファンコーニ症候群、先天性難聴-機能的心疾患、難聴-小人症-網膜萎縮、難聴-機能的心疾患、難聴爪ジストロフィー骨形成異常および精神遅滞、難聴および捻転毛ブヨルンスタッド型、肛門閉鎖および形成不全母指を伴う知覚神経難聴、脱分枝酵素欠損、脱落皮膚、腸細胞内因性因子受容体欠損、ナチュラルキラーリンパ球欠損、カルニチン腎再吸収欠損、糖タンパク質ノイラミニダーゼ欠損、ミトコンドリア呼吸鎖複合体IV欠損、血小板糖タンパク質Ib欠損、フォンヴィレブランド因子受容体欠損、短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ（ACADS）、中割球小人症を伴う変形、変性性舞踏病、変性性腰椎狭窄、ドゴー病、ドゴー-コールマイアー病、ドゴー症候群、DEH、デジェリーヌ-ルシー症候群、デジェリーヌ-ソッタ病、部分的欠失9p症候群、部分的欠失11q症候群、部分的欠失13q症候群、デルマン-オーサイス（Delleman-Oorthuys）症候群、デルマン症候群、葉萎縮および神経細胞質封入体を伴う痴呆、脱髄疾患、ドマイアー（DeMyer）症候群、冠状象牙質形成異常、歯根象牙質形成異常、I型象牙質形成異常、II型象牙質形成異常、ブランデーワイン型象牙質形成不全、シールズ型象牙質形成不全、III型象牙質形成不全、象牙質-眼-骨形成異常、象牙質眼皮膚症候群、ドニー・ドラッシュ症候群、デパケン、デパケン（商標）曝露、デパコテ、デパコテの噴霧、色素脱失-歯肉線維腫症-小眼球症、ダーカム病、アトピー性皮膚炎、表皮剥離性皮膚炎、疱疹状皮膚炎、多形性皮膚炎、全身性皮膚弛緩症、全身性皮膚弛緩、皮膚巨大症、皮膚筋炎サイン（sine）筋炎、皮膚筋炎、皮膚脆弱、スティーブンスジョンソン型皮膚口内炎、デスブコイス（Desbuquois）症候群、デスミン蓄積ミオパシー、新生児落屑、第二色弱、発達性失読症、発達性ゲルストマン症候群、デバルジー（Devergie）病、ドヴィック病、ドヴィック症候群、右胸心-気管支拡張-静脈洞炎、内臓逆位随伴性右胸心、DGS、DGSXゴラビ-ローゼン（Golabi-Rosen）症候群を含む、DH、DHAPアルキルトランスフェラーゼ欠損、DHBS欠損、DHOF、DHPR欠損、尿崩症、尿崩症真性糖尿病眼萎縮および難聴、神経下垂体尿崩症、インスリン依存型糖尿病、真性糖尿病、真性糖尿病アジソン粘液水腫、糖尿病性アシドーシス、糖尿病性ひげ女性症候群、糖尿病性神経障害、ダイアモンド-ブラックファン貧血、横隔膜無呼吸、骨幹病的組織結合、変形性小人症、褶曲性骨形成異常、褶曲性小人症候群、ジカルボン酸アミノ酸尿症、脂肪酸β酸化欠損によって引き起こされたジカルボン酸カルシウム尿症、脂肪酸β酸化欠損によるジカルボン酸カルシウム尿症、MCADH欠損によるジカルボン酸尿症、二色型色盲、ディッカー-オピッツ、DIDMOAD、間脳症候群、小児間脳症候群、るいそう間脳症候群、ジエノイル-CoAレダクターゼ欠損、乳児汎発性脳変性、汎発性脳変性疾患、汎発性特発性骨増殖症、びまん性グリコペプチド尿症、ディジョージ症候群、指口頭蓋症候群、指耳口蓋症候群、I型指耳口蓋症候群、II型指耳口蓋症候群、ジヒドロビオプテリンシンテターゼ欠損、ジヒドロプテリジン還元酵素欠損、ジヒドロキシアセトンリン酸シンターゼ、拡張型（うっ血性）心ミオパシー、ディミトリ（Dimitri）病、両側脳性麻痺、二倍体Y症候群、ダイサッカリダーゼ欠損、二糖類不耐性I、円板状狼瘡、円板状紅斑性狼瘡、DISH、角化障害、I型角化障害、角化障害4、角化障害6、角化障害8、ネザートン型角化障害9、フィタン酸型角化障害11、角化障害12（中性脂肪蓄積型）、角化障害13、角化障害14、裂毛症型角化障害14、角化障害15（角膜炎難聴型）、角化障害16、変異型紅斑角皮症型角化障害18、角化障害19、角化障害20、角化障害24、脾臓偏位、播種性紅斑性狼瘡、播種性神経皮膚炎、播種性硬化症、遠位11qモノソミー、遠位11q-症候群、IIA型先天性遠位多発関節拘縮、IIA型先天性遠位多発関節拘縮、IIA型遠位関節拘縮、2A型遠位関節拘縮、遠位重複6q、遠位重複10q、重複（10q）症候群、遠位重複15q、遠位モノソミー9p、遠位トリソミー6q、遠位トリソミー10q症候群、遠位トリソミー11q、ジバルプロ酸、DJS、DKC、DLE、DLPIII、DM、DMC症

候群、DMC病、DMD、遺伝性DNS、DOC 1、DOC 2、DOC 4、DOC 6（ハーレクイン型）、カース・マックリン型DOC 8、フィタン酸型DOC 11、DOC 12（中性脂肪貯蔵型）、DOC 13、DOC 14、裂毛症型DOC 14、DOC 15（角膜炎難聴型）、DOC 16、一側性半側形成異常型DOC 16、DOC 18、DOC 19、DOC 20、DOC 24、デーレ小体ミエロパシー、長脊椎形成異常、クモ肢、クモ肢症候群、優性型ケニー-キャッフェ症候群、優性型先天性ミオトニー、ドナヒュー症候群、ドーナト・ラントシュタイナー溶血性貧血、ドーナト・ラントシュタイナー症候群、DOOR症候群、DOORS症候群、ドーパ反応性失調（DRD）、ドーフマン・チャナリン症候群、ダウリング・メアラ症候群、ダウン症候群、DR症候群、ドラッシュ症候群、DRD、拘縮を伴うドライフス-エメリー型筋ジストロフィー、ドレスラー症候群、遊走脾、薬剤誘発性黒色表皮症、薬剤誘発性紅斑性狼瘡、薬物関連副腎不全、ドラマンド症候群、乾性脚気、ドライアイ、DTD、デュエーン退縮症候群、デュエーン症候群、1A、1Bおよび1C型デュエーン症候群、2A、2Bおよび2C型デュエーン退縮症候群、3A、3Bおよび3C型デュエーン症候群、デュービン・ジョンソン症候群、デュボヴィッツ症候群、デュシェーヌ、デュシェーヌ筋ジストロフィー、デュシェーヌ麻痺、デューリング病、ダンカン病、ダンカン病、十二指腸閉鎖、十二指腸狭窄、十二指腸炎、重複4p症候群、部分的重複6q、デュピュイ症候群、デュピュイトラン拘縮、ダッチ-ケネディ症候群、小人症、前屈性小人症、管状骨の皮質肥厚および一過性の低カルシウム血症を伴う小人症、レーヴィ型小人症、遡及性小人症、小人症爪形成異常、小人症心膜炎、腎萎縮および難聴を伴う小人症、くる病を伴う小人症、DWM、ディグヴ・メルキオー・クローセン症候群、家族性自律神経障害、家族性異βリポタンパク血症、血管腫を伴う軟骨形成異常、異軟骨骨症、遺伝性普遍性色素異常症、内臓嚢胞脳奇形、先天性異常角化、常染色体劣性異常角化、スコギンス（Scoggins）型先天性異常角化、先天性異常角化症候群、栄養性小胞性異常角化、失読症、異常骨髄性白質ジストロフィー、異常骨髄性白質ジストロフィー-巨赤芽球、痙攣性発声困難、斑点状骨端形成異常、一側性骨端形成異常、歯数不足を伴う爪形成異常、鎖骨頭蓋形成異常、線維性形成異常、X-連鎖異常形成巨人症候群、骨様象牙質形成異常、異形成性母斑症候群、母斑型形成異常、小脳性ミオクローヌス共同運動障害、食道共同運動障害、失調、眼角異所症、脂肪性性器ジストロフィー、内皮角膜ジストロフィー、中胚葉ジストロフィー、表皮水疱ジストロフィー、ジストロフィー、窒息性胸部、筋緊張性ジストロフィー、E-D症候群、イーグル-バレット症候群、イールズ網膜症、イールズ病、後側側弯を伴う耳異常-拘縮-骨形成異常、耳口蓋短身長症候群、初期拘束欠損、小妖精顔を伴う初期高カルシウム血症症候群、早期発生失調、イートン・ランバート症候群、EB、エブスタイン異常、EBV感受性（EBVS）、EBVS、ECD、ECPSG、外胚葉形成異常、口唇裂および口蓋裂を伴う無汗性外胚葉形成異常、外胚葉形成異常-外分泌膵不全、ラップ-ホジキン型外胚葉形成異常、先天性外胚葉中胚葉形成異常、骨関与を伴う外胚葉中胚葉形成異常、多開口部びらん性外胚葉症、水晶体転位、膀胱外反、異所性ACTH症候群、異所性副腎皮質刺激ホルモン症候群、異所性肛門、手の欠指、欠指、欠指-外胚葉形成異常裂形成症候群、欠指外胚葉形成異常裂形成症候群、欠指外胚葉形成異常口唇裂／口蓋裂、湿疹、湿疹-血小板減少症-免疫不全症候群、EDA、EDMD、EDS、動脈斑状出血型EDS、EDS関節弛緩、古典的重度型EDS、異フィブロネクチン血症性EDS、グラヴィス型EDS、EDS多動、EDS後側弯、EDS後側弯、穏和型EDS、EDS眼-側弯、EDS早老症、EDS歯周症、血管EDS、EEC症候群、EFE、EHBA、EHK、エーラース・ダンロス症候群、エーラース・ダンロス症候群、エーラース・ダンロスIX、アイゼンメンガー複合体、アイゼンメンガー複合体、アイゼンメンガー病、アイゼンメンガー反応、アイゼンメンガー症候群、エクボーム症候群、エクマン-ロープシュタイン病、手のエクトロダクチリー（Ektrodactyly）、EKV、エラスチン線維障害、全身性弾性線維破裂、弾性線維ジストロフィー症候群、選択的無言症（廃語）、選択的無言症、心電図（ECGまたはEKG）、電子転移フラビンタンパク質（ETF）デヒドロゲナーゼ欠損（GAII&MADD）、電気生理研究（EPS）、出生時ゾウ爪、先天性血管腫性象皮症、血管拡張性肥大、高カルシウム血症を伴う小妖精顔、エリス-ファンクレフェルト症候群、エリス-ファンクレフェルト症候群、腎胚芽腫、腎胚腺筋肉腫、腎胚癌肉腫、腎胚混合腫瘍、EMC、エメリー-ドライフス筋ジストロフィー、エメリー-ドライフス筋ジストロフィー、エメリー-ド

ライフス症候群、EMF、EMG症候群、トルコ鞍空虚症候群、びまん性軸周囲性脳炎、同心円性軸索周囲性脳炎、脳ヘルニア、脳顔面血管腫症、脳症、脳三叉神経血管腫症、多発性海綿状血管腫を伴う内軟骨腫症、風土病多発神経炎、心臓内隆起欠損、心臓内隆起欠損、心内膜形成異常、心内膜線維弾性症（EFE）、内因性高トリグリセリド血症、内リンパ水症、子宮内膜増殖、子宮内膜症、心内膜心筋線維症、先天性内皮角膜ジストロフィー、内皮上皮角膜ジストロフィー、内皮、エンゲルマン病、肥大舌、腸炎、腸細胞コバラミン吸収不良症、好酸球症候群、好酸球性蜂巣炎、好酸球性筋膜炎、好酸球性肉芽腫、好酸球症候群、表皮母斑症候群、表皮水疱症、後天性表皮水疱症、遺伝性表皮水疱症、致死性表皮水疱症、遺伝性晩発性表皮剥離、表皮剥離性角化症、表皮剥離性角化症（水疱性CIE）、前走性てんかん、てんかん、エピネフリン、骨端変化および強度近視、良性骨端骨軟骨腫、骨端半肢性形成異常、挿間的異常眼球運動、上皮基底膜角膜ジストロフィー、若年性ミースマン上皮角膜ジストロフィー、母斑を伴う多発上皮腫、上皮、エピバル（Epival）、EPS、男性のエプスタイン-バーウイルス誘発性リンパ増殖病、エルプ-ゴルドフラム症候群、エールトハイム胸部疾患、滲出性多形性紅斑、スティーヴンス・ジョンソン型多形性紅斑、胎児性赤芽球ろう、胎児赤芽球症、新生児赤芽球症、小児赤芽球性貧血、赤血球ホスホグリセレートキナーゼ欠損、赤血球形成不全症、対称性進行性紅斑角皮症、対称性進行性紅斑角皮症魚鱗癬、変異性紅斑角皮症、変異型紅斑角皮症、冬季紅斑性表皮剥離、造血性ポルフィリン症、造血性ポルフィリン症、エスコバー（Escobar）症候群、食道閉鎖、食道無蠕動、食道炎-消化性潰瘍、食道閉鎖および／または気管食道フィステル、本態性家族性高脂血症、本態性果糖尿、本態性血尿、本態性出血性血小板血症、本態性混合クリオグロブリン血症、本態性モスコヴィッツ病、本態性血小板血症、本態性血小板減少症、本態性血小板増加症、本態性振せん、エステラーゼ阻害剤欠損、ファンコーニ貧血のエストレン-ダメシェク（Estren-Dameshek）変異型、エストロゲン関連胆汁うっ滞、ET、ETF、エチルマロン酸アジピン酸尿症、オイレン
ブルク病、pc、EVCS、誇張驚愕反応、脳ヘルニア、外因性高トリグリセリド血症、出臍-巨舌-巨人症候群、眼球突出性甲状腺腫、拡大風疹症候群、膀胱外反、EXT、外軟骨腫症候群、肝臓外胆管閉鎖、髄外プラスマ細胞腫、滲出性網膜炎、眼球退縮症候群、FA1、FAA、ファブリー病、FAC、FACB、FACD、FACE、FACF、FACG、FACH、顔面神経麻痺、顔面神経麻痺、顔面外胚葉形成異常、顔面外胚葉形成異常、顔-肩甲骨-上腕骨ジストロフィー、顔-耳-椎骨スペクトル、顔-心-皮膚症候群、顔-前方-鼻形成異常、顔皮膚骨格症候群、顔指性器症候群、顔性器形成異常、顔性器膝窩症候群、顔口蓋骨症候群、II型顔口蓋骨症候群、顔面肩甲上腕骨筋ジストロフィー、人為的低血糖症、第VIII因子欠損、第IX因子欠損、第XI因子欠損、第XII因子欠損、第XIII因子欠損、ファール病、ファール病、胃内因性因子分泌不全、フェアバンク病、ファロー四徴、家族性先端早老症、家族性小先端症、家族性線腫性大腸ポリポーシス、腸管外症状発現を伴う家族性線腫性ポリポーシス、家族性無葉性全前脳症、家族性α-リポタンパク質欠損、有棘赤血球増加を伴う家族性筋萎縮性舞踏病、家族性不整脈ミオクローヌス、家族性関節軟骨石灰化、家族性異型モル-悪性黒色腫症候群、III型家族性高リポタンパク質血症、家族性石灰痛風、家族性ピロリン酸カルシウム関節症、家族性慢性閉塞性肺疾患、家族性連続性皮膚剥離、家族性皮膚アミロイドーシス、家族性異常タンパク質血症、家族性気腫、家族性微絨毛腸症、家族性中心窩網膜分離症、家族性冬眠症候群、家族性高コレステロール、家族性ヘモクロマトーシス、家族性血中高コレステロール、家族性高密度リポタンパク質欠損、家族性血清中高コレステロール、家族性高脂血症、リンパ管拡張性腸症を伴う家族性低タンパク血症、家族性黄疸、家族性若年性腎ろう関連眼異常、家族性苔癬性アミロイドーシス（IX型）、家族性腰椎狭窄、家族性原発性リンパ水腫、家族性地中海熱、家族性多発性ポリポーシス、家族性項部水疱、家族性発作性多漿膜炎、家族性大腸ポリポーシス、家族性原発性肺高血圧症、家族性腎糖尿、家族性脾性貧血、家族性驚愕病、家族性内臓アミロイドーシス（VIII型）、FAMMM、FANCA、FANCB、FANCC、FANCD、FANCE、ファンコーニ汎骨髄ろう、ファンコーニ汎血球減少、ファンコーニII、ファンコーニ貧血、I型ファンコーニ貧血、ファンコーニ貧血相補群、ファンコーニ貧血相補群A、ファンコーニ貧血相補群B、ファンコーニ貧血相補群

C、ファンコーニ貧血相補群D、ファンコーニ貧血相補群E、ファンコーニ貧血相補群F、ファンコーニ貧血相補群G、ファンコーニ貧血相補群H、エストレン-ダメシェク変異型ファンコーニ貧血、FANF、FANG、FANH、FAP、FAPG、ファーバー病、ファーバー脂肪肉芽腫症、FAS、絶食時低血糖、脂肪誘発性高脂血症、小児致死性肉芽腫病、脂肪酸化障害、脳症を伴う脂肪肝、FAV、FCH、FCMD、FCS症候群、FD、FDH、スティーブンス・ジョンソン型発熱性粘膜皮膚症候群、急性発熱性好中球性皮膚病、発熱性発作、ファインベルク（Feinberg）症候群、フェイシンガー（Feissinger）-ルロイ-ライター症候群、女性疑似ターナー症候群、両側性大腿発育不全-ロビン異常、両側性大腿発育不全、大腿顔面症候群、大腿発育不全-異常顔面症候群、胎児アルコール症候群、胎児抗痙攣剤症候群、胎児水滑液嚢腫、アルコールの胎児効果、水痘の胎児効果、サリドマイドの胎児効果、水痘-帯状疱疹ウイルスの胎児効果、胎児心内膜心筋線維症、胎児顔面症候群、胎児光彩炎性症候群、胎児輸血症候群、胎児バルプロエート症候群、胎児バルプロ酸曝露症候群、胎児水痘感染症、胎児水痘-帯状疱疹症候群、II型FFDD、FG症候群、FGDY、FHS、フィブリン安定化因子欠損、フィブリナーゼ欠損、星状細胞のフィブリン様変性、フィブリン様白質ジストロフィー、フィブリノリガーゼ欠損、神経周囲フィブリン芽細胞腫、膵臓線維嚢胞病、進行性骨化性線維形成異常、線維弾性心内膜炎、線維筋痛症、線維筋痛症-線維筋炎、線維筋炎、線維形成胆管炎、結合組織炎、多発性関節線維様強直、線維様海綿体炎、線維様形成異常、陰茎線維様斑、陰茎線維様硬化症、フィックラー-ウィンクラー型、フィードラー病、第五指症候群、フィリピ（Filippi）症候群、フィンランド型アミロイドーシス（V型）、第一度先天性心ブロック、第一および第二鰓弓症候群、フィッシャー症候群、魚臭症候群、亀裂舌、扁平線腫症候群、フラタウ-シルダー病、フラビン含有モノオキシゲナーゼ2、浮遊β病、浮遊港症候群、遊走脾、筋緊張低下児症候群、締まりのない弁症候群、流暢失語、FMD、FMF、成人肝臓型FMO、FMO2、FND、巣状脳虚血、巣状皮膚形成異常症候群、巣状皮膚低形成、巣状皮膚指節骨形成異常、巣状失調、巣状てんかん、II型巣状顔面皮膚形成異常、巣状神経筋緊張、FODH、箔症候群、フォン（Fong）病、FOP、フォーブス病、フォーブス-オールブライト症候群、フォレスティール病、フォルシウス-エリクソン症候群（X-連鎖）、フォザーギル病、噴水症候群、進行性中心窩ジストロフィー、II型FPO症候群、FPO、フラッカーロ型軟骨無発生症（IB型）、脆弱X症候群、フランスシェッティ-ザーレン-クレーン症候群、フランソワ頭蓋顔面奇形症候群、フランソワ-ニーテンス斑点状ジストロフィー、斑点状角膜ジストロフィー、フレーザー症候群、FRAXA、FRDA、フレドリクソンI型高リポタンパク質血症、フリーマン-シェルドン症候群、フレール（Freire）-マイア症候群、フライ症候群、フリードライヒ運動失調、フリードライヒ病、フリードライヒろう、FRNS、フレーリッヒ症候群、フロンメル-キアーリ症候群、フロンメル-キアーリ症候群授乳子宮萎縮、前指症候群、前顔面鼻骨形成不全、前顔鼻形成異常、前鼻形成異常、冠状頭蓋骨癒合を伴う前鼻形成異常、果糖-1-リン酸アルドラーゼ欠損、果糖血症、果糖尿症、フリンズ（Fryns）症候群、FSH、FSHD、FSS、フックスジストロフィー、1型フコース蓄積症、2型フコース蓄積症、3型フコース蓄積症、フクハラ症候群、フクヤマ病、フクヤマ型筋ジストロフィー、フマリルアセトアセターゼ欠損、溝状舌、G症候群、G6PD欠損、G6PD、GA I、GA IIB、GA IIA、GA II、GAII＆MADD、非産褥性乳汁漏出-無月経症候群、非妊娠性乳汁漏出-無月経症候群、ガラクトサミン-6-スルファターゼ欠損、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ欠損、ガラクトース血症、GALB欠損、ギャロウェー-モワット症候群、ギャロウェー症候群、GALT欠損、γグロブリン欠損、GAN、ガングリオシドノイラミニダーゼ欠損、ガングリオシドシアリダーゼ欠損、1型ガングリオシドーシスGM1、2型ガングリオシドーシスGM2、ガングリオシドーシスβヘキソサミニダーゼB欠損、ガードナー症候群、多発性骨形成不全症、ガリエス（Garies）-メーソン症候群、ガッサー症候群、胃内因性分泌因子不全、腸細胞コバラミン、ガストリノーマ、胃炎、胃食道裂傷-出血、胃腸ポリープ症外胚葉変化、消化管潰瘍、胃壁破裂、ゴーシェ病、ゴーシェ-シュラーゲンハウファー、ガエト（Gayet）-ヴェルニッケ症候群、GBS、GCA、GCM症候群、GCPS、ジー-ハーター（Gee-Herter）病、ジー-タイセン（Gee-Thaysen）病、ゲーリック病、ジェリノー症候群、ジニー-ヴィーデマン症候群、全身性失調、全身性家族

性神経筋緊張、全身性線維腫症、全身性屈曲てんかん、全身性糖原病、全身性多汗症、全身性リポフスチン症、全身性重症筋無力症、全身性筋緊張、全身性散発性神経筋緊張、遺伝病、性器欠損、性器尿管欠損、ゲルストマン症候群、ゲルストマン四徴、GHBP、GHD、GHR、巨大軸索病、巨大軸索神経障害、巨大良性リンパ腫、巨細胞神経膠芽腫、星状細胞腫、巨細胞動脈炎、肝臓巨細胞病、巨細胞肝炎、新生児巨細胞肝硬変、網膜巨大嚢胞、巨大リンパ節過形成、遺伝性巨大血小板症候群、巨大舌、gic黄斑ジストロフィー、ジルベール病、ジルベール症候群、ジルベール-ドライフス症候群、ジルベール-レレボーレ（Lereboullet）症候群、ギルフォード症候群、ジル・ド・ラ・トゥーレット症候群、ギレスピー症候群、歯肉線維腫-異常指爪鼻耳巨脾腫、GLA欠損、GLA、GLB1、緑内障、網膜神経膠腫、完全失語、球様細胞白質ジストロフィー、舌下垂小顎症口蓋裂、グルコセレブロシダーゼ欠損、グルコセレブロシドーシス、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損、グルコース-6-リン酸輸送欠損、グルコース-6-リン酸トランスロカーゼ欠損、グルコース-G-ホスファターゼ欠損、グルコース-ガラクトース吸収不良、グルコシルセラミドリピドーシス、グルタル酸尿症I、グルタル酸血症I、グルタル酸血症II、グルタル酸尿症II、II型グルタル酸尿症、III型グルタル酸尿症、グルタル酸血症I、グルタル酸血症II、グルタル酸尿症I、グルタル酸尿症II、IIA型グルタル酸尿症、IIB型グルタル酸尿症、グルタリル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損、グルタレート-アスパルテート輸送欠損、グルテン感受性腸症、VII型筋グリコーゲン病、グリコーゲン貯蔵病I、グリコーゲン貯蔵病III、グリコーゲン貯蔵病IV、V型グリコーゲン貯蔵病、グリコーゲン貯蔵病VI、グリコーゲン貯蔵病VII、グリコーゲン貯蔵病VIII、II型グリコーゲン貯蔵病、II型グリコーゲン貯蔵病、糖原病、I型糖原病、IA型糖原病、IB型糖原病、II型糖原病、II型糖原病、III型糖原病、IV型糖原病、V型糖原病、VI型糖原病、VII型糖原病、VIII型糖原病、グリコール酸尿症、糖脂質リピドーシス、1型GM2ガングリオシドーシス、1型GM2ガングリオシドーシス、GNPTA、甲状腺腫様自己免疫性甲状腺炎、ゴルドナール症候群、ゴルドナール-ゴーリン症候群、ゴルトシャイダー病、ゴルツ症候群、ゴルツ-ゴーリン症候群、性腺発育不全45X、性腺発育不全XO、隅角発生不全-歯数不足、グッドマン症候群、グッドマン、グッドパスチャー症候群、ゴードン症候群、ゴーリン症候群、ゴーリン-ショードリー-モス症候群、先天性進行性対称性ゴットロン（Gottron）紅斑角皮症、ゴットロン症候群、グジュロー-カルトー症候群、てんかん大発作、顆粒型角膜ジストロフィー、肉芽腫性動脈炎、肉芽腫性大腸炎、好酸球増加症を伴う肉芽腫性皮膚炎、肉芽腫性回腸炎、グレーヴス病、グレーヴス甲状腺機能亢進症、グレーヴス病、グレーグ頭蓋多合指症候群、グレーノーI型角膜ジストロフィー、グレーノーII型角膜ジストロフィー、グレンブラッド-ストランドベリー症候群、グロットン症候群、成長ホルモン受容体欠損、成長ホルモン結合タンパク質欠損、成長ホルモン欠損、マイアー（Myhre）成長-精神欠損症候群、成長遅延-リーガー（Rieger）異常、GRS、グルバー（Gruber）症候群、GS、GSD6、GSD8、GTS、グアノシン三リン酸-シクロヒドロラーゼ欠損、グアノシン三リン酸-シクロヒドロラーゼ欠損、ギュエンター（Guenther）ポルフィリン症、ゲラン-スターン症候群、ギヤン-バレー、ギヤン-バレー症候群、グンター病、H病、H.グロットン症候群、習慣性痙縮、HAE、ハーゲマン因子欠損、ハーゲマン因子、ハイム-ムンク（Haim-Munk）症候群、ハジュ（Hajdu）-チェネー症候群、ハジュ-チェネー、HAL欠損、ホール-パリスター（Hall-Pallister）症候群、ハレルマン-ストライフ-フランソワ症候群、ハレルマン-ストライフ症候群、ハレルフォルデン-シュパッツ病、ハレルフォルデン-シュパッツ症候群、アロポー-シーメンス病、母指重複軸後多合指症脳梁欠損、ハルーシ-ベーチェット症候群、リンパ過誤腫、ハンド-シュラー-クリスチャン症候群、HANE、ハンハルト症候群、幸福な人形症候群、原田病、HARD +/-E症候群、HARD症候群、野ウサギ唇、ハーレクイン胎児、ハーレクイン型DOC 6、ハーレクイン型魚鱗癬、ハーレー症候群、ハリングトン症候群、ハート症候群、ハートナップ病、ハートナップ障害、ハートナップ症候群、橋本病、橋本-プリツカー（Pritzker）症候群、橋本症候群、橋本甲状腺炎、橋本-プリツカー症候群、ヘイ-ウェルズ症候群、外胚葉形成異常のヘイ-ウェルズ症候群、HCMM、HCP、HCTD、HD、心臓-手症候群（ホールト-オーラム型）、心疾患、ヘヒト症候群、HED、ヘールフォルト-ヴァルデンストレーム-ロフグレン症

候群、ヘグリン病、ハインリヒスバウアー症候群、血管腫、家族性血管腫、血管腫-血小板減少症候群、血管腫症軟骨形成異常、鰓血管腫口唇裂偽裂症候群、半側顔面小人症、半側巨大脳、片側不全脳性麻痺、半側脳性麻痺、脊髄半側
切除、ヘモクロマトーシス、ヘモクロマトーシス症候群、血液透析関連アミロイドーシス、ヘモグロビンレポアー症候群、新生児溶血性貧血、溶血性寒冷抗体貧血、新生児溶血性疾患、溶血-尿毒症症候群、血友病、血友病A、血友病B、血友病B第IX因子、血友病C、出血性異栄養性血小板減少症、出血性無白血症、ヘモジデリン沈着、肝フルクトキナーゼ欠損、肝ホスホリラーゼキナーゼ欠損、肝ポルフィリン症、肝ポルフィリン症、肝静脈-閉塞病、C型肝炎、肝腎症候群、肝レンズ核変性、肝ホスホリラーゼ欠損、肝腎糖原病、肝腎症候群、肝腎チロシン血症、遺伝性先端疼痛症、遺伝性アルカプトン尿症、遺伝性アミロイドーシス、遺伝性血管浮腫、遺伝性無反射性起立困難、遺伝性多発神経炎性失調、遺伝性運動失調、フリードライヒ型遺伝性運動失調、遺伝性良性黒色表皮腫、遺伝性小脳運動失調、遺伝性舞踏病、遺伝性慢性進行性舞踏病、遺伝性結合組織障害、遺伝性コプロポルフィリン症、遺伝性コプロポルフィリン性ポルフィリン症、遺伝性皮膚悪性黒色腫、遺伝性難聴-色素性網膜炎、遺伝性亜鉛欠損障害、遺伝性DNS、遺伝性異所性リピドーシス、遺伝性気腫、遺伝性果糖不耐性、遺伝性出血性毛細血管拡張、I型遺伝性出血性毛細血管拡張、II型遺伝性出血性毛細血管拡張、III型遺伝性出血性毛細血管拡張、遺伝性尿酸過剰血および舞踏病アテトーシス症候群、遺伝性メジャー非薄赤血球症、遺伝性マイナー非薄赤血球症、遺伝性リンパ浮腫、遺伝性晩発性リンパ浮腫、I型遺伝性リンパ浮腫、II型遺伝性リンパ浮腫、遺伝性運動知覚神経障害、遺伝性運動知覚神経障害I、遺伝性運動知覚神経障害III、遺伝性腎炎、遺伝性腎炎および神経性難聴、遺伝性腎症アミロイドーシス、遺伝性腎症および難聴、遺伝性非ポリープ性結腸直腸癌、遺伝性非ポリープ性結腸直腸癌、遺伝性非球状細胞溶血性貧血、遺伝性爪骨形成異常、遺伝性視神経網膜症、遺伝性大腸ポリポーシス、I型遺伝性知覚自律神経障害、II型遺伝性知覚自律神経障害、III型遺伝性知覚自律神経障害、遺伝性知覚運動神経障害、I型遺伝性知覚神経障害、I型遺伝性知覚神経障害、II型遺伝性知覚神経障害、III型遺伝性知覚神経障害、I型遺伝性知覚神経根性神経障害、I型遺伝性知覚神経根性神経障害、II型遺伝性知覚神経根性神経障害、遺伝性部位特異的癌、遺伝性球状細胞溶血性貧血、遺伝性球状赤血球症、1型遺伝性チロシン血症、遺伝性結合組織障害、ヘルリッツ症候群、ハーマンス-ヘルツバーグ母斑症、ヘルマンスキー-パドラック症候群、半陰陽、帯状疱疹、スティーブンス-ジョンソン型虹彩ヘルペス、エール病、ヘテロ接合βサラセミア、ヘキソアミニダーゼαサブユニット欠損（変異型B）、ヘキソアミニダーゼαサブユニット欠損（変異型B）、HFA、HFM、HGPS、HH、HHHO、HHRH、HHT、ギャロウェー型裂孔ヘルニア-小頭-ネフローゼ、汗腺膿瘍、腋窩汗腺炎、汗腺膿瘍、多汗性外胚葉形成異常、HIE症候群、高度肛門閉塞、高カリウム、高肩甲骨、HIM、ヒルシュスプルング病、後天性ヒルシュスプルング病、ヒルシュスプルング病尺骨足母指の多合指およびVSD、D型短指を伴うヒルシュスプルング病、多毛症、HIS欠損、ヒスチジンアンモニアリアーゼ（HAL）欠損、ヒスチダーゼ欠損、ヒスチジン血症、組織球増殖症、組織球増殖症X、HLHS、II型HLP、HMG、HMI、HMSN I、HNHA、HOCM、ホジキン病、ホジキン病、ホジキンリンパ腫、ホランダー-ジーモンス病、ホームズ-アーディ症候群、ホロカルボキシラーゼシンテターゼ欠損、全前脳症、全前脳奇形複合体、全前脳続発症、ホールト-オーラム症候群、ホールト-オーラム型心臓-手症候群、ホモシスチン血症、ホモシスチン尿症、ホモゲンチシン酸オキシダーゼ欠損、ホモゲンチシン酸尿、ホモ接合α-1アンチトリプシン欠損、HOOD、ホルネル症候群、ホートン病、HOS、HOS1、ハウストン-ハリス型軟骨無発生（IA型）、HPS、HRS、HS、I型HSAN、II型HSAN、HSAN-III、HSMN、III型HSMN、HSN I、HSN-III、ヒューブナー-ハーター病、ハナー小片、ハナー潰瘍、ハンター症候群、ハンター-トンプソン型遠位中間肢短縮性形成異常、ハンチントン舞踏病、ハンチントン病、フルラー病、フルラー症候群、フルラー-シャイエ症候群、HUS、ハッチンソン-ギルフォード早老症候群、ハッチンソン-ギルフォード症候群、ハッチンソン-ウェーバー-ポイツ症候群、ボーエン-コンラーディ型フッテライト症候群、ヒアリン汎神経障害、水無脳症、水頭症、無脳回水頭症網膜形成異常、内部ダンディ-ウォーカー型水

頭症、非交通性ダンディ-ウォーカー型水頭症、水頭症、特異な顔の表現を伴う水腎症、ヒドロキシラーゼ欠損、頚部ヒグローマ、高IgE症候群、高IgM症候群、高アルドステロン症、低カリウムアルカトーシスを伴う高アルドステロン症、高血圧症を伴わない高アルドステロン症、高アンモニア血症、カルバミルホスファターゼシンテターゼ欠損による高アンモニア血症、オルニチントランスカルバミダーゼ欠損による高アンモニア血症、II型高アンモニア血症、高-βカルノシン血症、高ビリルビン血症I、高ビリルビン血症II、腎石灰症およびインジカン尿症を伴う家族性高カルシウム血症、高カルシウム血症-弁上大動脈狭窄、高カルシウム尿症性くる病、呼吸性アシドーシス、異化亢進タンパク喪失性腸症、高塩素血症性アシドーシス、高コレステロール血症、IV型高コレステロール血症、高乳状脂粒血症、高シスチン尿症、驚愕過剰症、過伸展関節、高グロブリン血症性紫斑病、ケトアシドーシスおよびプロピオン酸型乳酸アシドーシスを伴う高グリシン血症、非ケトン性高グリシン血症、高ゴナドトロピン性性腺機能低下症、高免疫グロブリンE症候群、高免疫グロブリンE-再発性感染症候群、高免疫グロブリン血症E-ブドウ球菌、高カリウム血症、運動過剰症候群、高脂血症網膜炎、高脂血症I、高脂血症IV、I型高リポタンパク血症、III型高リポタンパク血症、IV型高リポタンパク血症、高シュウ酸尿症、ピエール-ロビン症候群を伴う人差し指の指節骨過剰-弯指、高フェニルアラニン血症、過形成型表皮水疱症、過呼吸、高カリウム血症、高プレβリポタンパク血症、I型高プロリン血症、II型高プロリン血症、脾機能亢進症、食道異常および尿道下裂を伴う隔離症、隔離症-尿道下裂症候群、肥大性心筋症、肥大性間質性神経障害、肥大性間質性神経炎、肥大性間質性神経根神経障害、レフサム肥大性神経障害、肥大性閉塞性心筋症、高尿酸血症舞踏病アテトーシス自己マルチレーション症候群、高尿酸血症-精神薄弱、高バリン血症、低石灰化（低鉱化）型、低軟骨形成症、低軟骨形成不全、低γグロブリン血症、乳児一過性低γグロブリン血症、糖尿病傾向を伴う性器発育不全ジストロフィー、舌下-指欠損症候群、低血糖症、外因性低血糖症、巨舌症を伴う低血糖症、1a型低グリコシル化症候群、1a型低グリコシル化症候群、無嗅覚を伴う性腺機能低下症、下垂体性機能不全性性腺機能低下症および無嗅覚、無汗性外胚葉形成異常症、常染色体優性型無汗性外胚葉形成異常症、常染色体劣性型無汗性外胚葉形成異常症、低カリウム血症、高カルシウム尿症を伴う低カリウム血症性アルカローシス、低カリウム血症症候群、ハイポラクタシア（Hypolactasia）、低成熟型（雪帽子様歯）、伊藤のメラニン減少症、肢形成不全-貧毛-顔面血管腫症候群、ミエリン形成減少性神経障害、副甲状腺機能低下症、低ホスファターゼ血症、高カルシウム血症を伴う低リン酸血症性くる病、色素脱失、色素脱失性黄斑病変、心欠損を伴う口角下制筋形成不全、形成不全性貧血、先天性形成不全性貧血、形成不全性軟骨形成異常症、形成不全性エナメル質-爪離床症-発汗減少症、形成不全（形成不全-エクスプラスチック）型、形成不全性左心室症候群、形成不全性-母指三指節症、低カリウム血症症候群、尿道下裂-嚥下困難症候群、嗅覚減退、視床下部過誤芽腫下垂体機能低下肛門閉塞多合指症、視床下部幼稚症-肥満、甲状腺機能低下症、低血圧-知能低下-性腺機能低下-肥満症候群、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（完全欠損）、I-細胞病、医原性低血糖症、IBGC、IBIDS症候群、IBM、IBS、IC、I-細胞病、ICD、コーガン-リース型ICE症候群、アイスランド型アミロイドーシス（VI型）、I-細胞病、魚鱗癬様紅皮症角膜関連難聴、魚鱗癬様紅皮症毛髪異常増殖および男性、白血球空胞化を伴う魚鱗癬様紅皮症、魚鱗癬、先天性魚鱗癬、裂毛症を伴う先天性魚鱗癬、ヤマアラシ状魚鱗癬、妊娠性ヤマアラシ状魚鱗癬、回旋性線状魚鱗癬、単純性魚鱗癬、魚鱗癬-テイ症候群、尋常性魚鱗癬、魚鱗癬性中性脂肪蓄積症、黄疸性レプトスピラ病、黄疸出血熱レプトスピラ病、黄疸（慢性家族性）、新生児妊娠性黄疸、若年性間欠性黄疸、特発性肺胞換気過少、特発性アミロイドーシス、特発性高安動脈炎、特発性基底核石灰化（IBGC）、特発性腕神経叢神経障害、特発性頚部失調、特発性肺動脈拡張症、特発性顔面麻痺、特発性家族性高脂血症、特発性肥大性大動脈下狭窄、特発性低タンパク血症、特発性免疫グロブリン欠損、特発性新生児肝炎、特発性非特異的潰瘍性大腸炎、特発性末梢静脈周囲炎、特発性肺線維症、特発性難治性鉄芽球性貧血、特発性腎性血尿、特発性脂肪便、特発性血小板血症、特発性血小板減少性紫斑病、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IDPA、IgA腎症、IHSS、回腸炎

、回結腸炎、イリノイ型アミロイドーシス、ILS、IM、IMD2、IMD5、胸腺欠如による免疫不全、発作性寒冷免疫溶血性貧血、毛細血管拡張性運動失調を伴う免疫不全、異常な免疫グロブリン合成を伴う細胞性免疫不全、分類不能型変異型免疫不全、高IgMを伴う免疫不全、白血球減少症を伴う免疫不全、免疫不全-2、免疫不全-5（IMD5）、免疫グロブリン欠損、肛門閉塞、手足耳の異常を伴う肛門閉塞、鼻涙管閉塞未成熟加齢症候群、無能力好中球症候群、口を完全に開けることができない短指屈筋、INAD、アルギナーゼ型先天性尿素合成異常、アルギノコハク酸型先天性尿素合成異常、カルバミルホスフェート型先天性尿素合成異常、シトルリン血症型先天性尿素合成異常、グルタメートシンテターゼ型先天性尿素合成異常、INCL、封入体筋炎、不完全房室中隔欠損、不完全精巣女性化、色素失調、色素失調色素脱失、ピエール-ロバン症候群を伴う人差し指異常、インジアナ型アミロイドーシス（II型）、無痛性全身性肥満細胞腫、乳児性後天性失語、常染色体劣性多嚢胞腎病、幼児性脚気、乳児性脳ガングリオシド、乳児性脳性麻痺、乳児性シスチン蓄積症、乳児性てんかん、シスチン蓄積症を伴う乳児性ファンコーニ症候群、乳児性フィンランド型神経セロイドリポフスチン症、乳児性ゴーシェ病、乳児性低血糖症、乳児性低ホスファターゼ症、乳児性大葉性気腫、乳児性ミオクローヌス脳症、乳児性ミオクローヌス脳症多発性筋間代性痙攣、乳児筋線維腫症、乳児性壊死性脳症、乳児性神経セロイドリポフスチン症、乳児性神経軸索ジストロフィー、乳児発症型シンドラー病、乳児フィタン酸蓄積病、乳児レフサム病（IRD）、乳児性シポイドーシスGM-2ガングリオシドーシス（S型）、乳児睡眠時無呼吸、点頭痙攣、乳児脊髄性筋萎縮（全ての型）、乳児脊髄性筋萎縮ALS、I型乳児脊髄性筋萎縮、乳児型神経セロイドリポフスチン症、感染性黄疸、炎症性腸疾患、炎症性乳癌、炎症性線状母斑脂肪症候群、後頭孔脳脱出症、インスリン抵抗性黒色表皮症、インスリン性脂肪異栄養、インスリン依存性糖尿病、意図的ミオクローヌス、中間型シスチン蓄積症、中間型カエデシロップ尿病、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ欠損を伴う中間型運動失調、間欠性カエデシロップ尿病、内水頭症、間質性膀胱炎、4qの間質性欠失を含む、腸管脂肪異栄養、腸管脂肪貪食性肉芽腫症、腸管リンパ管拡張症、腸管ポリポーシスI、腸管ポリポーシスII、腸管ポリポーシスIII、腸管ポリポーシス-皮膚色素沈着症候群、外眼筋麻痺を伴う腸管疑似閉塞、頭蓋内新生物、頭蓋内腫瘍、頭蓋内血管奇形、子宮内小人症、子宮内シネキア、逆微笑不顕性神経障害性膀胱、アイオワ型アミロイドーシス（IV型）、IP、IPA、虹彩角膜内皮症候群、コーガン-リース型虹彩角膜内皮（ICE）症候群、体の異常を伴う虹彩隅角発生不全、角膜浮腫緑内障を伴う虹彩萎縮、虹彩母斑症候群、鉄過剰性貧血、鉄過剰病、刺激性腸症候群、刺激性結腸症候群、アイザック症候群、アイザック-メルテン（Merten）症候群、虚血性心ミオパ
シー、孤立性脳回欠損続発症、イソロイシン33アミロイドーシス、イソ吉草酸CoAデヒドロゲナーゼ欠損、イソ吉草酸血症、イソ吉草酸血症、イソバレリルCoAカルボキシラーゼ欠損、ITOメラニン減少症、ITO、ITP、IVA、イヴェマルク症候群、イワノフ嚢胞、ジャックナイフ痙攣、ジャクソン-ヴァイス頭蓋骨癒合、ジャクソン-ヴァイス症候群、ジャクソンてんかん、ヤコブセン症候群、ヤーダッソーン-レワンドフスキー症候群、ヤッフェ-リヒテンシュタイン病、ヤコブ病、ヤコブ-クロイツフェルト病、ジェーンウェーI、ジェーンウェー低γグロブリン血症、ヤンゼン骨幹端性骨形成不全、ヤンゼン型骨幹端性軟骨形成不全、ジャーチョ-レビン症候群、ジョーウィンキング、JBS、JDMS、ジェガーズ症候群、空腸閉鎖、空腸炎、空回腸炎、ジェルヴェル-ランゲ-ニールセン症候群、ジュヌ症候群、JMS、ヨブ症候群、ヨブ-バックレー症候群、ヨハンソン-ブリザード症候群、ジョン-ダルトン、ジョンソン-スティーヴンス症候群、ジョンストン脱毛、ヨーゼフ病、I型ヨーゼフ病、II型ヨーゼフ病、III型ヨーゼフ病、ジュベール症候群、ジュベール-ボルトハウザー（Bolthauser）症候群、JRA、ユベルク（Juberg）-ヘイワード症候群、ユベルク-マルシディ症候群、ユベルク-マルシディ精神遅滞症候群、ジャンピングフランス人、メインのジャンピングフランス人、若年性関節炎、若年性常染色体劣性多嚢胞腎、若年性シスチン蓄積症、若年性（小児）皮膚筋炎（JDMS）、若年性糖尿病、若年性ゴーシェ病、若年性痛風舞踏病アテトーシス精神遅滞症候群、若年性ビタミンB12腸管吸収不良、若年性ビタミンB12腸管吸収不良、若年性黄斑変性、若年性悪性貧血、若年性網膜分離、若年性リウ

マチ性関節炎、若年性脊髄性筋萎縮を含む、若年性脊髄性筋萎縮ALSを含む、III型若年性脊髄性筋萎縮、傍関節有痛脂肪症、傍糸球体過形成、歌舞伎メーキャップ症候群、ケーラー（Kahler）病、カルマン症候群、カンナー症候群、カンザキ病、カポジ病（カポジ肉腫ではない）、カッパ軽鎖欠損、カーシュ-ノイゲバウアー（Karsch-Neugebauer）症候群、カルタゲナー症候群-慢性副鼻腔気管支病および右胸心、カルタゲナー三徴、カサバッハ-メリット症候群、カスト症候群、川崎病、川崎症候群、KBG症候群KD、キーンズ-セイアー病、キーンズ-セイアー症候群、ケネディ病、ケネディ症候群、ケネディ型脊髄延髄筋萎縮、ケネディ-ステファニス病、ケニー病、ケニー症候群、ケニー型尿細管狭窄、ケニー-キャフェ症候群、先天性掌しょ角皮症扁平足爪鉤弯歯周症症クモ指、角膜炎魚鱗癬難聴症候群、円錐角膜、円形後部円錐角膜、角質溶解、先天性剥脱性表皮剥離、角質溶解性冬季紅斑、角膜軟化症、毛包性角化症、棘状脱毛性毛包性角化症、棘状脱毛性毛包性角化症魚鱗癬、黒色角化症、歯周症爪鉤弯症を伴う掌しょ角皮症、先天性掌しょ角皮症扁平足爪鉤弯歯周症クモ指、先天性掌しょ角皮症、扁平足、爪鉤弯、歯周症、クモ指、先端骨溶解症、角化症、ルブラ・フィギュラタ（Rubra Figurata）、脂漏性角化症、ケト酸デカルボキシラーゼ欠損、ケト酸尿症、ケトン性グリシン血症、KFS、KID症候群、腎無発生、嚢胞腎-網膜形成不全ジュベール症候群、キリアン症候群、キリアン／テクスラー-ニコラ症候群、キロー-ネビン症候群III、縮毛病、キンスボーン（Kinsbourne）症候群、クローバー葉型頭蓋変形、クライネ-レビン症候群、クライネ-レビン冬眠症候群、クラインフェルター、クリペル-フェーユ症候群、I型クリペル-フェーユ症候群、II型クリペル-フェーユ症候群、III型クリペル-フェーユ症候群、クリペル-トルノネー症候群、クリペル-トルノネー-ウェーバー症候群、クリューヴァー-ビューシー症候群、KMS、クニースト形成異常、クニースト症候群、ケブナー病、ケバリング-ダニガン（Koebberling-Dunnigan）症候群、コールマイアー-ドゴー症候群、コック病、コルサコフ精神病、コルサコフ症候群、クラッベ病を含む、クラッベ白質ジストロフィー、クレーマー症候群、KSS、KTS、KTW症候群、クッフス病、クーゲルベルク-ヴェランデル病、クーゲルベルク-ヴェランデル症候群、クシュマール-ランドリー麻痺、KWS、L-3-ヒドロキシ-アシル-CoAデヒドロゲナーゼ（LCHAD）欠損、レーバンド症候群、ラブハルト-ウィリ（Labhart- Willi）症候群、迷路症候群、迷路水症、涙骨-耳介-歯-指症候群、ラクターゼ孤立性不耐性、ラクターゼ欠損、乳汁-子宮萎縮、乳酸アシドーシスレーバー遺伝性視神経障害、炭水化物感受性を伴う乳酸およびピルビン酸血症、挿間的運動失調および虚弱を伴う乳酸およびピルビン酸血症、乳酸およびピルビン酸、乳酸アシドーシス、成人の乳糖不耐性、乳糖不耐性、小児の乳糖不耐性、LADD症候群、LADD、ラフォラ病を含む、ラフォラ体病、レーキ-ローランド因子欠損、LAM、ランバート型魚鱗癬、ランバート-イートン症候群、ランバート-イートン筋無力症候群、葉状劣性魚鱗癬、葉状魚鱗癬、ランセリュー（Lancereaux）-マチュー-ヴァイルスピロヘータ症、ランダウ-クレフナー症候群、ランドジー-デジェリーヌ筋ジストロフィー、ランドリー上行性麻痺、ランゲル-サリジノ型軟骨無形成（II型）、ランガー-ギージオン症候群、ランゲルハンス細胞肉芽腫症、ランゲルハンス細胞組織球増殖症（LCH）、大心房心室欠損、ラロン小人症、ラロン型下垂体小人症、ラーセン症候群、咽頭失調、ラーター（マレーシアにおいて観察される）、晩発性乳児神経軸索ジストロフィー、晩発性乳児型神経軸索ジストロフィー、III型晩発性コケーン症候群（C型）、晩発型失調、晩発型免疫グロブリン欠損、晩発型ペリツェーウス-メルツバッヒャー脳硬化症、格子状角膜ジストロフィー、格子状ジストロフィー、ロノワ-バンソード、ロノワ-クレレー症候群、ローレンス症候群、ローレンス-ムーン症候群、ローレンス-ムーン／バルデー-ビードル、ローレンス-セイプ症候群、LCA、LCAD欠損、LCAD、LCAD、LCADH欠損、LCH、LCHAD、LCPD、レジュヌ症候群、レバンド（Leband）症候群、レーバー黒内障、レーバー先天性黒内障、錐体かん体の先天性欠失、レーバー先天性壁板網膜変性、レーバー先天性壁板網膜形成異常、レーバー病、レーバー視神経萎縮、レーバー視神経障害、左心室線維症、脚潰瘍、レッグ-カルヴェ-ペルテス病、リー病、リー症候群、リー症候群（亜急性壊死性脳脊髄障害）、リー壊死性脳脊髄障害、レノックス-ガストー症候群、黒子-多飲-消化症候群、レンシ形成不全症候群、レンシ形成異常、レンシ小眼球症、レンシ症候群、LEOPARD症

候群、妖精症、軟膜血管腫症、レプトスピラ黄疸、ルリー-ヴェル病、ルリー-ヴェル軟骨骨形成異常、ルリー-ヴェル症候群、レルモワイエ症候群、ルロワ病、レッシュ-ナイハン症候群、致死性乳児心筋症、致死性新生児小人症、致死性骨軟骨異形成症、レテラー-ジーヴェ病、白血球異常性白皮症、血小板異常を伴う白血球封入体、白質ジストロフィー、ローゼンタール線維を伴う白質ジストロフィー、同心円性軸性白質脳炎、レヴァイン-クリッチェリー症候群、果糖尿、レヴィ-ホリスター症候群、LGMD、LGS、LHON、LIC、尖形紅色苔癬、尖形苔癬、苔癬アミロイドーシス、扁平苔癬、乾癬状苔癬、リグナック-ドプレー-ファンコーニ症候群、リグナック-ファンコーニ症候群、木質性結膜炎、肢帯筋ジストロフィー、四肢奇形-歯-指症候群、終極デキストリン形成、線状母斑メラニン減少症、線状母斑脂腺症候群、線状強皮症、線状皮脂母斑続発症、線状皮脂母斑症候群、舌裂、ひだ舌、陰嚢舌、舌顔ジスキネジー、唇偽裂-血管腫様鰓溝嚢胞症候群、脂質肉芽腫症、脂質組織球症、ケラシン型脂質、脂質貯蔵病、SCAD欠損に関連した脂質貯蔵ミオパシー、乳児性ガングリオシドリピドーシス、脂肪萎縮性真性糖尿病、脂肪異栄養、リポイド角膜ジストロフィー、リポイド過形成-男性偽半陰陽、先天性膵脂肪腫症、I型リポムコ多糖沈着症、脂肪髄膜脊髄瘤、家族性リポタンパク質リパーゼ欠損、LIS、LIS1、脳回欠損1、I型脳回欠損、脳梁無発生小脳形成不全または他の異常を伴う脳回欠損変異型、リトル病、肝ホスホリラーゼ欠損、LKS、LM症候群、葉萎縮、脳葉萎縮、大葉性全前脳症、幼児葉緊張性気腫、ロープシュタイン病（I型）、ロブスター鉤爪変形、限局性表皮水疱症、限局性脂肪異栄養、肩帯の限局性神経炎、レフラー病、好酸球増加症を伴うレフラー心内膜心筋線維症、レフラー線維形成性壁心内膜炎、ローケン（Loken）症候群、ローケン-シニア症候群、長鎖3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ（LCHAD）、長鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ欠損、長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ（ACADL）、長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損、難聴を伴わないQT延長症候群、ルー・ゲーリック病、ルー・ゲーリック病を含む、ルイ-バール症候群、低血糖、低密度βリポタンパク質欠損、肛門閉塞不全、低カリウム症候群、ロウ症候群、ロウ症候群、ロウ-ビッケル症候群、ロウ-テリー-マクラクラン症候群、下位背部痛、LS、LTD、ラブス（Lubs）症候群、ラフト病、腰椎管狭窄、腰椎狭窄、腰仙椎狭窄、ルンドベルグ-ウンフェルリヒト病、ルンドベルグ-ウンフェルリヒト病を含む、狼瘡、狼瘡、紅斑性狼瘡、ルシュカ-マジャンディ孔閉鎖、ライエル症候群、ライエル症候群、リンパ節様甲状腺腫、リンパ管拡張性タンパク喪失性腸症、リンパ管平滑筋肉腫症、リンパ管平滑筋肉腫症、リンパ管腫、リンパ奇形、リンチ症候群、リンチ症候群I、リンチ症候群II、シンドラー型ライソゾームα-N-アセチルガラクトサミニダーゼ欠損、ライソゾームグリコアミノ酸貯蔵病-びまん性角化血管腫、ライソゾームグルコシダーゼ欠損、MAA、マチャド病、マチャド-ジョゼフ病、巨脳症、大頭症、大頭症半側肥大、多発性脂肪腫および血管腫を伴う大頭症、偽乳頭水腫および多発性血管腫を伴う大頭症、マクログロブリン血症、巨舌症、巨舌-臍ヘルニア-内臓巨大症候群、大口無眼瞼症候群、家族性ベルナール・スーリエ型巨大血小板減少症、黄斑変性、斑状アミロイドーシス、黄斑変性、円板状黄斑変性、老人性黄斑変性、黄斑ジストロフィー、黄斑型角膜ジストロフィー、MAD、マーデルング病、マフッチ症候群、てんかん大発作、吸収不良、吸収不良-外胚葉形成異常-鼻翼形成不全、ロジェ病、チック病、マラリア、男性の四肢および腎奇形、男性ターナー症候群、悪性表皮肥厚症、悪性黒色表皮症、悪性星状細胞腫、悪性萎縮性丘疹症、悪性発熱、悪性高フェニルアラニン血症、悪性超高熱、悪性高体温症、悪性黒色腫、中枢神経系悪性腫瘍、マロリー-ヴァイス裂傷、マロリー-ヴァイス裂傷、マロリー-ヴァイス症候群、乳腺ページェット病、下顎エナメル上皮腫、下顎顔面骨形成不全、マンノシドーシス、マップ-ドット-フィンガープリント型角膜ジストロフィー、カエデシロップ尿病、大理石様骨、マルキアファーヴァ-ミケーリ症候群、マーカス-ガンジョーウィンキング病、マーカス-ガン現象、ジョーウィンキング症候群を伴うマーカス-ガン下垂、マーカス-ガン症候群、マーカス-ガン（ジョーウィンキング）症候群、マーカス-ガン下垂（ジョーウィンキングを伴う）、マーデン（Marden）-ウォーカー型結合組織障害、マルファン無生活力、マルファン-アシャール症候群、マルファン症候群、マルファン症候群I、マルファン変異型、マルファン症候群様過剰運動性症候群、角膜辺縁ジストロフ

ィー、マリー運動失調、マリー病、マリー-サントン病、マリー-シュトルンペル病、マリー-シュトルンペル脊椎炎、マリネスコ-シェーグレン症候群、マリネスコ-シェーグレン-ゴーランド症候群、マーカーX症候群、マロトー-ラミー症候群、マロトー型肢端部中割球形成異常、視覚聴覚欠損を伴うマーシャル外胚葉形成異常、マーシャル-スミス症候群、マーシャル症候群、マーシャル型難聴-近視-白内障-鞍鼻、マーチン-オールブライト症候群、マーチン-ベル症候群、マルトレル症候群、MASA症候群、大規模間代性筋痙攣、肥満細胞白血病、肥満細胞症、関連出血障害を伴う肥満細胞症、マウメニー（Maumenee）角膜ジストロフィー、上顎エナメル上皮腫、上顎顔面骨形成不全、上顎鼻骨形成不全、バインダー型上顎鼻骨形成不全、上顎眼瞼連合運動、メイ-ヘグリン異常、MCAD欠損、MCAD、マッカードル病、マックキューン-オールブライト、MCD、マッククジック型骨幹端軟骨形成不全、MCR、MCTD、メッケル症候群、メッケル-グルーバー（Gruber）症候群、正中裂顔症候群、地中海貧血、中鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ（ACADM）、中鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ（MCAD）欠損、中鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損、髄質嚢胞疾患、髄質海綿腎、MEF、巨大食道、巨脳症、ヒアリン封入体を伴う巨脳症、ヒアリン汎神経障害を伴う巨脳症、巨赤芽球性貧血、妊娠性巨赤芽球性貧血、巨大角膜-精神遅滞症候群、マイアー-ゴーリン症候群、メージュリンパ浮腫、メージュ症候群、黒色皮膚白質ジストロフィー、黒斑症-腸ポリポーシス、黒斑症-腸ポリポーシス、MELAS症候群、MELAS、メルカーソン症候群、メルニック-フレーザー症候群、メルニック-ニドルズ骨異形成症、メルニック-ニドルズ症候群、膜性脂肪異栄養、メンデスダコスタ症候群、メニエール病、メニエール病、髄膜毛細管血管腫症、メンケズ病、メンケズ症I、精神遅滞失語引きずり歩行母指内転（MASA）、精神遅滞-難聴-骨格異常-完全な唇を伴う粗雑な顔、第5指足指爪形成不全を伴う精神遅滞、骨軟骨異常を伴う精神遅滞、成長遅延-難聴-小性器症とX-連鎖した精神遅滞、メンツェル型OPCA、マーメイド症候群、MERRF、MERRF症候群、メルテン-シングルトン症候群、MES、メサンギウムIGA腎症、腸間膜脂肪異栄養、正中歯-白内障症候群、中胚葉形成不全ジストロフィー、中割球小人症-マーデルング変形、代謝性アシドーシス、異洗性白質ジストロフィー、中足内反、遡及性小人症候群、遡及性形成異常、遡及性形成異常I、遡及性形成異常II、メチルマロン酸血症、メチルマロン酸尿症、モイレングラハト病、MFD1、MG、MH、MHA、小脳症、小頭性始原小人症I、小頭症、小頭症-裂孔ヘルニア-ギャロウェー型ネフローゼ、小頭症-裂孔ヘルニア-ネフローゼ症候群、小嚢胞角膜ジストロフィー、小赤血球症、小脳回欠損、小眼球症、関連異常を伴う小眼球症または無眼球症、筋ジストロフィーを伴う小脳回過剰、小耳症膝蓋骨欠損小顎症候群、微絨毛封入体病、MID、収縮中期-クリック-後期収縮期雑音症候群、ミーシャーI型症候群、ミクリッチ症候群、ミクリッチ-ラデッキー症候群、ミクリッチ-シェーグレン症候群、軽度常染色体劣性、軽度中間型カエデシロップ尿病、軽度カエデシロップ尿病、ミラー症候群、ミラー-ディーカー症候群、ミラー-フィッシャー症候群、ミルロイ病、ミンコウスキ-ショファール症候群、てんかん小発作、ミノー-フォンヴィレブランド病、鏡像右胸心、ミトコンドリアβ酸化障害、ミトコンドリアおよびサイトゾル、ミトコンドリア細胞障害、ミトコンドリア細胞障害、キーンズ-セイアー型、ミトコンドリア脳症、ミトコンドリア脳ミオパシー乳酸アシドーシスおよび発作様エピソード、ミトコンドリアPEPCK欠損、僧帽弁脱、混合無呼吸、混合型結合組織病、混合肝ポルフィリン症、混合非癒着性失語、混合睡眠時無呼吸、混合強直性間代性斜頚、MJD、MKS、ML I、ML II、ML III、ML IV、I型ML障害、II型ML障害、III型ML障害、IV型ML障害、MLNS、MMR症候群、MND、MNGIE、MNS、モービッツI、モービッツII、モービッツ症候群、メビウス症候群、メルシュ-ヴォルトマン症候群、モール症候群、連珠毛、単相性視覚健忘、多発単神経炎、末梢単神経炎、末梢性モノニューロパシー、モノソミー3p2、部分的モノソミー9p、部分的モノソミー11q、部分的モノソミー13q、モノソミー18q症候群、モノソミーX、単発性線維性形成異常、モルガニー-ターナー-オールブライト症候群、限局性強皮症、モルキオ病、モルキオ症候群、モルキオ症候群A、モルキオ症候群B、モルキオ-ブレールスフォード症候群、モルヴァン病、モザイクテトラソミー9p、運動ニューロン病、運動ニューロン症候群、運動ニューロン病、運動ニューロン病（局所および遅い）、

もやもや病、もやもや病、MPS、MPS I、MPS I H、MPS 1 H/S ハーラー／シャイエ症候群、MPS I Sシャイエ症候群、MPS II、MPS IIA、MPS IIB、MPS II-AR常染色体劣性ハンター症候群、MPS II-XR、重度常染色体劣性MPS II-XR、MPS III、MPS III A B CおよびDサンフィロッポA、MPS IV、MPS IV AおよびBモルキオA、MPS V、MPS VI、MPS VI重度中間型軽度マロトー-ラミー、MPS VII、MPS VIIスライ症候群、MPS VIII、MPS障害 MPS障害I、MPS障害II、MPS障害III、MPS障害VI、VII型MPS障害、MRS、MS、MSA、MSD、MSL、MSS、MSUD、MSUD、Ib型MSUD、II型MSUD、粘膜皮膚リンパ節症候群、ムコリピドーシスI、ムコリピドーシスII、ムコリピドーシスIII、ムコリピドーシスIV、ムコ多糖症、ムコ多糖症I-H、ムコ多糖症I-S、ムコ多糖症II、ムコ多糖症III、ムコ多糖症IV、ムコ多糖症VI、ムコ多糖症VII、I型ムコ多糖症、II型ムコ多糖症、III型ムコ多糖症、VII型ムコ多糖症、ムコーシス、ムコスルファチドーシス、粘液性大腸炎、ムコビシドーシス、筋肝脳眼欠損性小人症、筋肝脳眼欠損性小人症、ミュラー管形成不全-腎発育不全-頚胸体節形成異常、ミュラー管-腎-頚胸-上肢欠損、上肢および肋骨異常を伴うミュラー管腎無発生、ミュラー管-腎-頚胸体節異常、ビンスヴァンガー型多発梗塞性痴呆、多中心キャッスルマン病、多病巣性好酸球肉芽腫、多発性アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損、多発性アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損／II型グルタル酸尿症、多発性血管腫および内軟骨腫、多発性カルボキシラーゼ欠損、多発性軟骨性内軟骨症、多発性軟骨性外骨症、多発性内軟骨腫症、II型多発性内分泌欠損症候群、多発性骨端形成異常、多発性外骨症、多発性外骨症候群、多発性家族性ポリポーシス、多発性黒子症候群、多発性骨髄腫、肩帯の多発神経炎、多発性骨軟骨腫症、多発性末梢神経炎、多発性結腸ポリポーシス、多発性翼状片症候群、多発性硬化症、多発性スルファターゼ欠損、多発性対称性脂肪腫症、多系統萎縮、多発性骨癒合性骨発育不全、長骨骨折を伴う多発性骨癒合性骨発育不全、マルビヒル（Mulvihill）-スミス症候群、MURCS関連、マーク（Murk）-ヤンゼン型骨幹端軟骨形成不全、筋カルニチン欠損、筋コア病、筋ホスホフルクトキナーゼ欠損、筋中心コア病、筋ジストロフィー、古典的X-連鎖劣性筋ジストロフィー、中枢神経系の関与を伴う先天性筋ジストロフィー、精神遅滞を伴う先天性進行性筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕筋ジストロフィー、筋リウマチ、筋硬直-進行性痙縮、筋骨格疼痛症候群、多発性肢端部疾患、無言症、mvp、MVP、MWS、重症筋無力症、重症筋無力症偽対麻痺、ランバート-イートン筋無力症候群、ミエリン破壊性びまん性硬化症、骨髄腫症、マイア（Myhre）症候群、ミオクローヌス性起立不能てんかん小発作、ミオクローヌス失調、乳児ミオクローヌス脳症、ミオクローヌスてんかん、ハーツング（Hartung）型ミオクローヌスてんかん、赤筋線維興奮に関連したミオクローヌスてんかん、ミオクローヌスてんかんおよび赤筋線維病、筋間代性進行性家族性てんかん、筋間代性進行性家族性てんかん、筋間代性発作、ミオクローヌス、ミオクローヌスてんかん、筋脳症赤筋線維興奮病、筋線維腫症、先天性筋線維腫症、筋原性顔-肩甲-腓骨症候群、筋神経胃腸障害および脳症、多発性先天性ミオパシー性関節拘縮、ミオパシー性カルニチン欠損、中心筋原線維ミオパシー、先天性非進行性ミオパシー、中心軸を伴う先天性非進行性ミオパシー、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損を伴うミオパシー、ミオパシー-マリネスコ-シェーグレン症候群、ミオパシー-代謝性カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損、ミオパシーミトコンドリア-脳症-乳酸アシドーシス-発作、筋形質体および中間フィラメントを伴うミオパシー、ミオホスホリラーゼ欠損、進行性骨化性筋炎、萎縮性筋緊張、先天性筋緊張、先天性間欠性筋緊張、筋緊張性ジストロフィー、筋緊張性ミオパシー小人症軟骨形成異常眼顔異常、筋細管ミオパシー、X-連鎖筋細管ミオパシー、マイプロ酸（Myproic Acid）、ミリーアチット（シベリアにおいて観察される）、粘液水腫、N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ欠損、N-アセチルグルタメートシンターゼ欠損、NADH-CoQレダクターゼ欠損、ネーゲリ外胚葉形成異常、ナージャー症候群、ナージャー先端顔面骨形成不全、ナージャー症候群、NAGS欠損、爪ジストロフィー-難聴症候群、爪発育不全歯数不足、爪-膝蓋骨症候群、ナンス-ホーラン症候群、小頭性小人症、小頭症、小眼球症、ナルコレプシー、ナルコレプシー症候群、NARP、鼻-前頭-顔形成異常、鼻翼発育不全甲状腺機能低下症膵酵素分泌欠乏先天性難聴、鼻上顎発育不全、鼻脂肪異栄養、NBIAl、ND、NDI、NDP、リーの壊死性脳脊髄障害、壊死性呼吸性

肉芽腫症、爪-ディングウォール（Dingwall）症候群、ネルソン症候群、ネマリンミオパシー、新生児副腎脳白質ジストロフィー、新生児副腎脳白質ジストロフィー（NALD）、新生児副腎脳白質ジストロフィー（ALD）、新生児常染色体劣性多嚢胞腎病、新生児小人症、新生児肝炎、新生児低血糖症、新生児乳糖不耐性、滲出性腸症による新生児リンパ浮腫、新生児壊死性腸炎、新生児早老症候群、ヴィーデマン-ラウテンストラウシュの新生児偽-水頭性早老症候群、新生物クモ膜炎、腎芽細胞腫、腎形成性尿崩症、家族性若年性ネフロノフテシス（Nephronophthesis）、腎症性シスチン蓄積症、腎症-偽半陰陽-ウィルムス腫瘍、ネフローゼ-小頭症候群、ネフローゼ-神経迷走症候群、ネフローゼ-糖尿-小人症-くる病-低ホスファターゼ血症候群症候群、ネザートン病、ネザートン症候群、ネザートン症候群魚鱗癬、ネトルシップ-フォールズ症候群（X-連鎖）、ニュー・ラキソバ（Neu-Laxova）症候群、ノイハウゼル症候群、神経管欠損、神経痛性筋萎縮、ノイラミニダーゼ欠損、神経皮膚黒色症、前庭神経鞘腫、神経鞘腫、神経有棘赤血球増加、シンドラー型神経軸索ジストロフィー、1型脳鉄蓄積を伴う神経変性（NBIA1）、聴神経神経線維腫、多発性先天性神経原性関節拘縮、視神経脊髄炎、神経筋緊張、巣状神経筋緊張、全身性家族性神経筋緊張、全身性散在性神経筋緊張、シンドラー型神経軸索ジストロフィー、成人型神経セロイドリポフスチン症、若年型神経セロイドリポフスチン症、1型神経セロイドリポフスチン症、神経細胞障害性急性ゴーシェ病、神経障害性アミロイドーシス、神経障害性脚気、神経障害運動失調色素性網膜炎、腕神経叢神経障害症候群、I型遺伝性知覚神経障害、II型遺伝性知覚神経障害、神経精神医学ポルフィリン症、神経脂肪貯蔵病、母斑、母斑様基底細胞癌症候群、母斑、海綿様母斑、コメド母斑、色素喪失母斑、ヤーダッソーン皮脂性母斑、ネゼロフ症候群、ネゼロフ胸腺無発生、ネゼロフ型重度複合免疫不全、NF、NFl、NF2、NF-1、NF-2、NHS、ニーマン・ピック病、A型ニーマン・ピック病（急性神経障害型）、B型ニーマン・ピック病、C型ニーマン・ピック病（慢性神経障害型）、D型ニーマン・ピック病（ノバ・スコチア変異型）、E型ニーマン・ピック病、F型ニーマン・ピック病（藍青組織球病）、夜盲、黒色脊椎歯変性、ニイカワクロキ症候群、NLS、NM、I型ノアック症候群、夜行性ミオクローヌス遺伝性本態性ミオクローヌス、結節性角膜変性、非水疱性CIE、非水疱性先天性魚鱗癬様紅皮症、非交通性水頭症、非欠失型α-サラセミア／精神遅滞症候群、I型非ケトン性高グリシン血症（NKHI）、非ケトン性高グリシン血症、非脂質細網内皮細胞症、非神経障害性慢性成人ゴーシェ病、非瘢痕性表皮水疱症、非動脈硬化性脳カルシウム沈着、非関節性リウマチ、非脳性若年性ゴーシェ病、非糖尿病性糖尿、非虚血性心筋症、非ケトン性低血糖およびMCAD欠損によるカルニチン欠損、アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損によって引き起こされた非ケトン性低血糖、非ケトン性グリシン血症、ノンネ症候群、ノンネ-ミルロイ-メージュ症候群、非乳光性乳光象牙質、非産褥性乳汁漏出-無月経、非分泌性骨髄腫、非球状赤血球性溶血性貧血、非熱帯性スプルー、ヌーナン症候群、ノルエピネフリン、正常血圧水頭症、ノーマン-ロバーツ症候群、ノルボットニアン（Norrbottnian）ゴーシェ病、ノリエ病、ノルウェー型遺伝性胆汁うっ滞、NPD、NPS、NS、NSA、項部失調痴呆症候群、栄養性神経障害、ナイハン病、OAVスペクトル、閉塞性無呼吸、閉塞性水頭症、閉塞性睡眠時無呼吸、OCC症候群、閉塞性血栓大動脈症、OCCS、不顕性頭蓋内血管奇形、不顕性脊髄癒合不全続発症、オチョア症候群、組織褐変症、組織褐変性関節炎、OCR、OCRL、オクトセファリー（Octocephaly）、眼白化症、眼ヘルペス、眼重症筋無力症、眼-耳-脊椎形成異常、眼-耳-脊椎スペクトル、眼-頬-性器症候群、色素脱失を伴う眼脳症候群、眼脳皮膚症候群、眼-脳-腎、眼脳腎ジストロフィー、眼脳腎症候群、眼頭蓋体症候群（廃語）、眼皮膚白化症候群、眼皮膚白化症、チェディアック-東型眼皮膚白化症、眼-歯-指形成異常、眼歯指症候群、眼-歯-骨形成異常、眼-胃腸管筋ジストロフィー、眼胃腸管筋ジストロフィー、貧毛を伴う眼下顎頭蓋異常症、眼下顎顔面症候群、先天性拘縮および筋萎縮を伴う眼球運動、眼交感神経麻痺、ODD症候群、ODOD、歯原性腫瘍、歯毛症候群、OFD、OFD症候群、オハイオ型アミロイドーシス（VII型）、OI、先天性OI、晩発性OI、オールドフィールド症候群、羊水過少続発症、精神薄弱小眼球症、形成不全性ポリジストロフィー、オリーブ橋小脳萎縮、痴呆および錐体外路徴候を伴うオリーブ橋小脳萎縮、網膜変性を伴うオリーブ

橋小脳萎縮、オリーブ橋小脳萎縮I、オリーブ橋小脳萎縮II、オリーブ橋小脳萎縮III、オリーブ橋小脳萎縮IV、オリーブ橋小脳萎縮V、オリエ病、オリエ骨軟骨腫症、臍ヘルニア-内臓巨大-巨舌症候群、オンディーヌののろい、葱球神経障害、葱球多発神経障害、爪骨形成異常、好中球減少症を伴う爪毛形成異常、OPCA、OPCA I、OPCA II、OPCA III、OPCA IV、OPCA V、OPD症候群、I型OPD症候群、II型OPD症候群、OPD I症候群、OPD II症候群、眼関節症、眼筋麻痺-腸管偽閉塞、眼筋麻痺、網膜色素性変性および心ミオパシー、眼筋麻痺プラス症候群、眼筋麻痺症候群、オピッツBBB症候群、オピッツ-フリアス（Frias）症候群、オピッツG症候群、オピッツG/BBB化合物症候群、オピッツ隔離症-尿道下裂症候群、オピッツ-カベッギア（Kaveggia）症候群、オピッツ眼性器咽頭症候群、オピッツ三角頭蓋症候群、オピッツ症候群、眼球クローヌス、眼球クローヌス-ミオクローヌス、眼神経脊髄炎、視神経萎縮多発神経障害および難聴、視神経脳脊髄障害、視神経脊髄炎、視神経脊髄炎、視交叉クモ膜炎、口顔裂、口顔ジスキネジー、口顔失調、口-顔-指症候群、I型口-顔-指症候群、口-顔-指症候群I、口-顔-指症候群II、口-顔-指症候群III、口-顔-指症候群IV、脳および巣状皮膚奇形を伴う眼窩嚢胞、オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ欠損、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損、口頭蓋指症候群、口顔指症候群、口下顎失調、起立性低血圧、オースラー-ウェーバー-ランデュ病、骨眼歯形成異常、骨眼歯形成異常、変形性骨炎、変形性骨軟骨ジストロフィー、骨軟骨形成症、メルニック＆ニドルズ骨異形成、骨形成不全、骨形成不全、先天性骨形成不全、晩発性骨形成不全、骨肥大性火炎状母斑、多発性乳児性骨化過剰硬化性骨障害、多発性乳児性骨化過剰硬化性骨障害、オステオパシローシス（Osteopathyrosis）、大理石骨病、常染色体優性成人型大理石骨病、常染色体劣性悪性乳児型大理石骨病、軽度常染色体劣性中間型大理石骨病、脆弱性全身性骨硬化症、骨硬化性骨髄腫、一次口欠損（心臓内隆起欠損を含む）、二次口欠損、OTC欠損、耳口蓋指症候群、I型耳-口蓋-指症候群、II型耳-口蓋-指症候群、耳歯形成異常、耳口蓋指症候群、II型耳口蓋指症候群、オーツホーン皮膚、ターナー型卵巣小人症、ターナー型卵巣形成不全、OWR、シュウ酸症、オキシダーゼ欠損、尖頭症、尖頭症-尖頭症、P-V、PA、PAC、魚鱗癬様爪肥厚、出産歯を有する先天性爪肥厚、先天性爪肥厚、先天性爪肥厚、播種性限局性（毛包性）角化症、ヤーダッソーン-レワンドフスキー（Lewandowsky）型先天性爪肥厚、MSAを伴うPAF、パジェット病、骨パジェット病、乳房パジェット病、乳頭パジェット病、乳頭乳輪パジェット病、ペーゴン（Pagon）症候群、有痛性眼筋麻痺、PAIS、口蓋ミオクローヌス、口蓋-耳-指症候群、I型口蓋-耳-指症候群、II型口蓋-耳-指症候群、パリスター症候群、パリスター-ホール症候群、パリスター-キリアンモザイク症候群、パリスターモザイク異数性、パリスター-モザイク症候群、パリスターモザイク症候群テトラソミー12p、パリスター-W症候群、掌しょ角質増殖症および脱毛、麻痺、膵線維症、膵不全骨髄機能障害、膵潰瘍発生性腫瘍症候群、汎骨髄ろう、汎骨髄症、パントテン酸キナーゼ関連神経変性（PKAN）、パピヨン-ルフェーヴル症候群、外皮緊張性偽性脊髄ろう、筋緊張性周期性麻痺、麻痺性脚気、麻痺性上腕神経炎、正中傍下口唇症窩-膝窩ピエリジウム（Pyerygium）症候群、正中傍間脳症候群、傍骨髄組織過形成、多発性パラミオクローヌス、先天性パラミオトニア、フォンオイレンブルクの先天性パラミオトニア、パーキンソン病、発作性心房性頻拍、発作性寒冷血色素尿症、発作性失調胆汁アテトーシス、発作性運動原性失調、発作性夜間血色素症、発作性正常血色素尿症、発作性睡眠、パロー症候群、パリー病、パリー-ロンベルク症候群、パーソニッジ-ターナー症候群、部分的アンドロゲン非感受性症候群、第4染色体短腕部分的欠失、第5染色体短腕部分的欠失、第9染色体短腕部分的欠失、部分的重複3q症候群、部分的15q症候群、尿異常を伴う部分的顔面麻痺、手足部分的巨人症-母斑-片側肥大-大頭症、部分的脂肪異栄養、第11染色体長腕部分的モノソミー、第13染色体長腕部分的モノソミー、部分的脊髄知覚症候群、部分的トリソミー11q、パーティントン症候群、PAT、動脈管開存、病的ミオクローヌス、少関節性若年発症型関節炎、パウリティス（Paulitis）、PBC、PBS、PC欠損、A群PC欠損、B群PC欠損、PC、オイレンブルク病、PCC欠損、PCH、PCLD、PCT、PD、PDA、PDH欠損、ポワソン症候群ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損、小児閉塞性睡眠時無呼吸、皮膚剥離症候群、ペリツェーウス-メルツバッヒャー脳硬化症、ペラグラ-小脳性運動失調-腎性アミノ

酸尿症症候群、骨盤痛症候群、尋常性天疱瘡、ペナショキールII症候群、ペナショキールII症候群、陰茎線維腫症、陰茎線維症、陰茎硬化、ペンタX症候群、カントレル五徴、五徴症候群、ペンタソミーX、PEPCK欠損、ペッパー症候群、ペルヒーンツパ（Perheentupa）症候群、関節周囲線維症、成長不全を伴う心膜拘縮、コラーゲン周囲アミロイドーシス、周産期多嚢胞腎病、会陰肛門、周期性アミロイド症候群、周期性腹膜炎症候群、周期性傾眠および病的空腹、周期性症候群、網膜の末梢類嚢胞変性、末梢骨形成不全-鼻形成不全-精神遅滞、末梢性神経炎、末梢性神経障害、腹膜心膜横隔膜ヘルニア、悪性貧血、小顎症を伴う奇肢症、腓骨筋萎縮、腓骨神経麻痺、ペロウトカ（Peroutka）くしゃみ、ペルオキシソームアシル-CoAオキシダーゼ、ペルオキシソームβ酸化障害、ペルオキシソーム二官能性酵素、ペルオキシソームチオラーゼ、ペルオキシソームチオラーゼ欠損、動脈管遺残、ペルテス病、てんかん小発作、小発作変異型、ポイツ-ジェガース症候群、ポイツ-トゥーレーヌ症候群、ペーロニー病、プファイファー、I型プファイファー症候群、PGA I、PGA II、PGA III、PGK、I型PH、I型PH、咽頭嚢症候群、PHD短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ欠損、フェニルアラニン血症、フェニルケトン尿症、フェニルピルビン酸精神薄弱、アザラシ肢症、アザラシ肢症症候群、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ欠損、ホスホフルクトキナーゼ欠損、ホスホグリセレートキナーゼ欠損、ホスホグリセロキナーゼ、ホスホリラーゼ6キナーゼ欠損、ホスホリラーゼ欠損グリコーゲン貯蔵病、肝ホスホリラーゼキナーゼ欠損、光性くしゃみ反射、光性くしゃみ、光治療的角膜切除、PHS、物理学者ジョン・ダルトン、フィタン酸貯蔵病、Pi表現型ZZ、PI、脳のピック病、ピック病、ピックウィック症候群、ピエール-ロバン異常、ピエール-ロバン複合体、ピエール-ロバン続発症、ピエール-ロバン症候群、指関節過剰および弯指を伴うピエール-ロバン症候群、ピエール-マリー病、痰瘡球黒質赤核色素性変性、捻転毛および神経難聴、捻転毛-感覚神経性聴力喪失、下垂体小人症II、副腎摘出後の下垂体腫瘍、毛孔性ひこう疹、毛孔性紅色ひこう疹、PJS、PKAN、PKD、PKDl、PKD2、PKD3、PKU、PKUl、斜頭症、プラズマ細胞骨髄腫、プラズマ細胞白血病、血漿中トロンボプラスチン成分欠損、血漿トランスグルタミナーゼ欠損、海綿体形成性硬化、陰茎の形成性硬化、PLD、襞状舌、PLS、PMD、肺腎症候群、PNH、PNM、PNP欠損、POD、POH、多形皮膚萎縮と白内障、先天性多形皮膚萎縮、ポーランド異常、ポーランド続発症、ポーランド合指症、ポーランド症候群、脳性進行性ポリオジストロフィー、腸性多発関節炎、結節性多発動脈炎、I型多関節発症型若年性関節炎、II型多関節発症型若年性関節炎、IおよびII型多関節発症型若年性関節炎、多発性軟骨炎、多嚢胞腎病、髄質性多嚢胞腎、多嚢胞肝、多嚢胞卵巣病、多嚢胞腎病、多指-ジュベール症候群、多発形成異常性表皮水疱症、精神薄弱ポリジストロフィー、ポリジストロフィー小人症、III型多腺性自己免疫症候群、II型多腺性自己免疫症候群、I型多腺性自己免疫症候群、II型多腺性自己免疫症候群、II型多腺欠損症候群、多腺症候群、多形性黄斑変性、多形性黄斑変性、血小板糖タンパク質Ibの多形、遺伝性多形性角膜ジストロフィー、リウマチ性多発性筋痛、多発筋炎および皮膚筋炎、原発性無γグロブリン血症、末梢性多発神経炎、多発神経障害-難聴-視神経萎縮、末梢性多発神経障害、多発神経障害多発神経根神経障害、多骨性線維様形成異常、多骨性硬化性組織球増殖症、家族性ポリポーシス、ガードナー型ポリポーシス、過誤腫腸管ポリポーシス、ポリポーシス-骨腫-類表皮嚢胞症候群、色素沈着性ポリポーシス脱毛指爪変化、ポリープおよび斑症候群、再発性多発性漿膜炎、ポリソミーY、特異な頭蓋形状を有する多合指症、多合指症-グレーグ型顔面頭蓋異形症、ポーンプ病、ポーンプ病、膝窩翼状片症候群、ヤマアラシ男、脳空洞症、脳空洞症、ポルホビリノーゲンデアミナーゼ（PBG-D）、ポルフィリン症、急性間欠性ポルフィリン症、ポルフィリン症ALA-D、晩発性皮膚ポルフィリン症、遺伝性晩発性皮膚ポルフィリン症、症候性晩発性皮膚ポルフィリン症、肝性異型ポルフィリア、スウェーデン型ポルフィリン症、異型ポルフィリン症、急性間欠性ポルフィリン症、ポルフィリン、脱毛性頭瘡、ポートワイン変色、ポルトガル型アミロイドーシス、感染後多発神経炎、低酸素後意図的ミオクローヌス、軸後四肢顔面骨形成不全、軸後多指症、脳炎後意図的ミオクローヌス、遺伝性角膜後部ジストロフィー、視床後部症候群、脊髄造影後クモ膜炎、生後脳性麻痺、術後胆汁うっ滞、分娩後乳汁漏出-無

月経症候群、分娩後下垂体低下症、分娩後汎下垂体低下症候群、分娩後汎下垂体機能低下症、分娩後下垂体壊死、体位性低血圧、カリウム喪失性腎炎、カリウム喪失症候群、ポッターI型乳児性多嚢胞腎病、ポッターIII型多嚢胞腎病、PPH、PPS、プラーダー-ヴィリ症候群、プラーダー-ラブハルト-ヴィリファンコーン症候群、プレアルブミンTyr-77アミロイドーシス、異常早期興奮症候群、プレグネノロン欠損、心房性期外収縮、早発性早老症候群、上室性期外収縮、期外収縮心室波形、生後または先天性神経軸索ジストロフィー、早老性痴呆、早老性黄斑変性、原発性副腎不全、原発性無γグロブリン血症、原発性アルドステロン症、原発性肺胞換気過少、原発性アミロイドーシス、原発性貧血、原発性脚気、原発性胆汁、原発性胆汁性肝硬変、原発性ブラウン症候群、原発性カルニチン欠損、原発性中心換気減少症候群、カルタゲナー型原発性線毛ジスキネジー、原発性皮膚アミロイドーシス、原発性失調、原発性副腎皮質機能不全、上顎骨原発性家族性形成不全、原発性ヘモクロマトーシス、原発性多汗症、原発性高シュウ酸尿症[I型]、1型原発性高シュウ酸尿症（PH1）、I型原発性高シュウ酸尿症、II型原発性高シュウ酸尿症、III型原発性高シュウ酸尿症、原発性性腺機能低下症、原発性腸管リンパ管拡張症、原発性側索硬化症、原発性非遺伝性アミロイドーシス、原発性閉塞性肺血管疾患、原発性進行性多発性硬化症、原発性肺高血圧症、原発性失読症、原発性腎性糖尿、原発性硬化性胆管炎、原発性血小板血症、原発性中枢神経系腫瘍、原発性視覚失認、特発性直腸結腸炎、特発性直腸結腸炎、成人早老症、小児早老症候群、早老性小人症、色素性母斑を伴う早老性低身長、ドバルジ早老症候群、多系統萎縮を伴う進行性自律神経不
全、進行性延髄麻痺、進行性延髄麻痺を含む、進行性心筋症性黒子症、進行性家族性小脳運動失調、進行性脳性ポリオジストロフィー、進行性脈絡膜萎縮、進行性骨幹形成異常、進行性片側顔面萎縮、進行性家族性ミオクローヌスてんかん、進行性片側顔面萎縮、進行性ハイポエリセミア（Hypoerythemia）、進行性乳児ポリジストロフィー、進行性レンズ変性、進行性脂肪異栄養、小児進行性筋ジストロフィー、進行性ミオクローヌスてんかん、進行性骨異形成、進行性痰瘡球変性症候群、進行性脊髄延髄筋萎縮、進行性核上麻痺、進行性全身硬化症、進行性壁板絨毛膜ジストロフィー、プロリンオキシダーゼ欠損、プロピオン酸血症、I型プロピオン酸血症（PCCA欠損）、II型プロピオン酸血症（PCCB欠損）、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ欠損、第一色弱、第一色盲、タンパク質喪失腸症、うっ血性心不全に二次的なタンパク質喪失性腸症、プロテウス症候群、4q近位欠失を含む、PRP、PRS、プルーンベリー症候群、PS、偽性-フルラーポリジストロフィー、偽性-ポリジストロフィー、偽性黒色表皮症、偽性軟骨形成不全、偽性コリンエステラーゼ欠損、家族性偽性痛風、偽性血友病、偽半陰陽、偽半陰陽-ネフロン障害-ウィルムス腫瘍、偽性肥大性筋ジストロフィー、偽性上皮小体機能低下症、偽性低ホスファターゼ症、偽性ポリジストロフィー、偽性サリドマイド症候群、偽性弾性線維黄色腫、乾癬プソロスペルマ性毛嚢増殖症、PSP、PSS、精神運動痙攣、精神運動性痙攣、精神運動等価性てんかん、PTC欠損、翼状片、翼状頚症候群、普遍的翼状片、翼状リンパ管拡張、肺動脈弁閉鎖、肺動脈リンパ管筋腫、肺動脈狭窄、肺動脈狭窄-心室中隔欠損、歯髄結石、歯髄形成異常、無脈拍病、純性無リンパ球症、純性皮膚組織球症、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠損、出血性紫斑病、プルチロ（Purtilo）症候群、PXE、優性型PXE、劣性型PXE、濃化異骨症、濃化異骨症、ピクノてんかん、ピログルタミン酸尿症、ピログルタミン酸カルシウム尿症、ピロリンカルボキシラーゼデヒドロゲナーゼ欠損、ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損、A群ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損、B群ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損、ピルビン酸デカルボキシラーゼ欠損、ピルビン酸キナーゼ欠損、q25-qter、q26、q27-qter、q31または32-qter、細胞外低カルシウム血症を伴うQT延長、先天性難聴を伴わないQT延長、先天性難聴を伴うQT延長、脳性四肢不全麻痺、脳性四肢麻痺、量子散乱（Quantal Squander）、Quantal Squander、r4、r6、rl4、r 18、r21、r22、後二分脊椎、橈骨形成不全-無巨核球性血小板減少症、橈骨形成不全-血小板減少症、橈骨神経麻痺、知覚神経根神経障害、劣性知覚神経根神経障害、歯根形成異常、急速発症性失調-振せん麻痺、ラップ-ホジキン症候群、ラップ-ホジキン（発汗減少性）外胚葉形成異常症候群、ラップ-ホジキン発汗減少性外胚葉形成異常、フィタン酸ヒドロキシラーゼ酵素欠損によって引き起こされた多発

神経炎変化および難聴を伴うまれな遺伝性運動失調、ラウテンストラウヒ（Rautenstrauch）-ヴィーデマン症候群、ラウテンストラウヒ-ヴィーデマン型新生児早老症、レーノー現象、RDP、反応性機能的低血糖症、軽度糖尿病に副次的な反応性低血糖症、劣性型ケニー-キャフェ症候群、レックリン劣性型先天性ミオトニー、レックリンハウゼン病、直腸会陰フィステル、再発性嘔吐、反射性神経血管ジストロフィー、反射性交感神経ジストロフィー症候群、屈折過誤、難治性貧血、冷蔵麻痺、レフサム病、レフサム病、限局性腸炎、リード-バーロー症候群、ライフェンスタイン症候群、リーガー異常-精神遅滞、リーガー症候群、ライマン周期的病、ライマン症候群、ライス-ビュックラース角膜ジストロフィー、ライター症候群、再発性ギヤン-バレ症候群、再発性-寛解性多発性硬化症、腎無発生、遺伝性腎形成異常-盲目、ロークン-シニア（Loken-Senior）型腎形成異常-腎形成不全、腎性糖尿、A型腎性糖尿、B型腎性糖尿、O型腎性糖尿、腎-眼脳ジストロフィー、髄質性嚢胞病を伴う腎-網膜形成異常、家族性腎-網膜ジストロフィー、腎-網膜症候群、ランデュ-オースラー-ウェーバー症候群、呼吸性アシドーシス、呼吸鎖障害、呼吸性ミオクローヌス、不穏下肢症候群、限局性心筋症、停滞性高脂血症、レトール（Rethore）症候群（廃語）、細網発育不全、網膜形成不全-嚢胞性腎-ジュベール症候群、網膜錐体変性、網膜錐体ジストロフィー、網膜錐体-かん体ジストロフィー、色素性網膜炎、色素性網膜炎先天性難聴、網膜芽腫、レチノール欠損、網膜分離、若年性網膜分離、退縮症候群、眼球後神経障害、水晶体後症候群、レット症候群、大動脈逆縮窄、ライ症候群、ライ症候群、RGS、Rh血液因子、Rh病、Rh因子不適合、Rh不適合、Rh因子不適合、リウマチ熱、リウマチ性関節炎、リウマチ性筋炎、鼻副鼻腔原性脳性クモ膜炎、四肢根部点状軟骨異形成（RCDP）、無カタラーゼ症、古典的レフサム病、RHS、律動的ミオクローヌス、小顎症を伴う肋骨間隙欠損、リビング（Ribbing）病（廃語）、リビング病、リヒナー（Richner）-ハンハルト症、リーガー症候群、リーター（Rieter）症候群、右心室線維症、ライリー-デイ症候群、ライリー-スミス症候群、環状染色体14、環状染色体18、環状4、環状第4染色体、環状6、環状第6染色体、環状9、環状第9染色体R9、環状14、環状15、環状第15染色体（モザイクパターン）、環状18、環状染色体18、環状21、環状第21染色体、環状22、環状第22染色体、リッター病、リッター-ライエル症候群、RLS、RMSS、ロバーツSC-アザラシ肢症症候群、ロバーツ症候群、ロバーツ四肢アザラシ肢症症候群、ロバートソン外胚葉形成異常、ロバン奇形症候群、ロバン続発症、ロバン症候群、ロビノー小人症、ロビノー症候群、優性型ロビノー症候群、劣性型ロビノー症候群、かん体ミオパシー、ロジェ病、ロビタンスキー病、ロマノ-ウォード症候群、ロンベルク症候群、無歯根歯、ローゼンバーグ-チュートリアン（Rosenberg-Chutorian）症候群、ローズウォーター症候群、ロゼッリ-グリエナッティ（Rosselli-Gulienatti）症候群、ロートムント-トムソン症候群、ルシー-レヴィ症候群、RP、RS X-連鎖、RS、RSDS、RSH症候群、RSS、RSTS、RTS、先天性風疹、ルービンスタイン症候群、ルービンスタイン-テービ症候群、ルービンスタイン-テービ広母指-足母指症候群、赤色小人症、ルール症候群、ラッセル間脳悪液質、ラッセル症候群、ラッセル症候群、ラッセル-シルヴァー小人症、ラッセル-シルヴァー症候群、X-連鎖ラッセル-シルヴァー症候群、ルバルカバ-マイア（Ruvalcaba-Myhre）-スミス症候群（RMSS）、ルバルカバ症候群、精神遅滞を伴うルバルカバ型骨形成異常、仙骨後退、先天性仙骨無発生、SAE、セスレ症候群、サカチ（Sakati）、サカチ症候群、サカチ-ナイハン症候群、点頭痙攣、唾液汗腺経産症候群、ザルツマン結節状角膜ジストロフィー、ザントホフ病、サンフィリポ症候群、A型サンフィリポ、B型サンフィリポ、サンタヴオリ（Santavuori）病、サンタヴオリ-ハルチア（Haltia）病、ベックサルコイド、サルコイドーシス、セスレ、土曜夜の麻痺、SBMA、SCアザラシ肢症症候群、SC症候群、SCA 3、SCAD欠損、成人発症型局所型SCAD欠損、先天性全身性SCAD欠損、SCAD、SCADH欠損、熱傷様皮膚症候群、先天性頭皮欠損、船状頭蓋、高位肩甲骨、肩甲腓骨ミオパシー、肩甲腓骨筋ジストロフィー、ミオパシー型肩甲腓骨症候群、癩痕性水疱、SCHAD、シャウマン病、シャイエ症候群、シェレシェフキー（Schereshevkii）-ターナー症候群、シルダー病、シルダー脳炎、シルダー病、I型シンドラー病（乳児発症型）、乳児発症型シンドラー病、シンドラー病、II型シンドラー病（成人発症型）、シンツェル症候群、シンツェル-ギージオン症候群

、シンツェル先端脳梁症候群、シンツェル-ギージオン顔面中部退縮症候群、チツェンセファリー（Schizencephaly）、統合失調症、シュミット型骨幹端軟骨形成異常、シュミット骨幹端骨形成不全、シュミット-フラッカーロ症候群、シュミット症候群、ショプフ（Schopf）-シュルツ-パサージ（Passarge）症候群、シュラー-クリスチャン病、シュット-ヘイメイカー（Schut-Haymaker）型、シュヴァルツ-ジャンペル-アーバーフェルト症候群、1Aおよび1B型シュヴァルツ-ジャンペル症候群、シュヴァルツ-ジャンペル症候群、2型シュヴァルツ-ジャンペル症候群、SCID、強皮症、家族性進行性全身性硬化症、びまん性家族性脳硬化症、座骨神経挫傷、精神遅滞を伴うスコット頭蓋指症候群、陰嚢舌、SCS、SD、SDS、SDYS、季節性結膜炎、皮脂性母斑症候群、皮脂性母斑、脂漏性角化症、脂漏性いぼ、ゼッケル症候群、ゼッケル型小人症、第二度先天性心ブロック、続発性アミロイドーシス、二次性眼瞼痙攣、二次性非熱帯性スプルー、二次性ブラウン症候群、二次性脚気、二次性全身性アミロイドーシス、二次性失調、分泌成分欠損、分泌性IgA欠損、晩発性SED、先天性SED、SEDC、分節性線状無色母斑、分節性失調、分節性ミオクローヌス、セイプ症候群、ザイテルバーガー病、発作、IgGサブクラスの選択的欠損、選択的無言、IgGサブクラスの選択的欠損、選択的IgM欠損、選択的無言、選択的IgA欠損、自己治癒性組織球症、半葉全前脳症、輸精管発育不全、老人性網膜分離、老人性いぼ、シニア-ローケン症候群、I型遺伝性知覚神経障害、II型遺伝性知覚神経障害、I型遺伝性知覚神経障害、知覚神経根神経障害、劣性知覚神経根神経障害、敗血性進行性肉芽腫症、中隔-眼形成異常、漿液限局性髄膜炎、血清プロテアーゼ阻害剤欠損、血清カルノシナーゼ欠損、セトライス（Setleis）症候群、重度複合型免疫不全、アデノシンデアミナーゼ欠損を伴う重度複合型免疫欠損、重度複合型免疫不全（SCID）、性逆転、性的幼稚症、SGB症候群、シーハン症候群、シールズ型象牙質形成不全、帯状ヘルペス、水痘-帯状疱疹ウイルス、水夫脚気、SHORT症候群、短腕18欠失症候群、短鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ欠損、短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ（SCAD）欠損、低身長および顔面毛細血管拡張、低身長顔／骨格異常-遅滞-巨大歯、低身長-過伸展-リーガー異常-生歯遅延、低身長-爪形成異常、低身長顔の毛細血管拡張性紅斑、SHORT症候群、ショシン（Shoshin）脚気、上肢帯症候群、シュプリンツェン-ゴールドバーグ症候群、シャルマン症候群、シュバッハマン-ボディアン症候群、シュバッハマン-ダイアモンド症候群、シュバッハマン症候群、シュバッハマン-ダイアモンド-オスキ症候群、シュバッハマン症候群、シャイ-ドレーガー症候群、シャイ-マギー症候群、SI欠損、シアリダーゼ欠損、I型若年性シアリドーシス、II型乳児性シアリドーシス、シアリドーシス、シアロリピドーシス、洞不全症候群、鎌状赤血球貧血、鎌状赤血球病、鎌状赤血球-ヘモグロビンC病、鎌状赤血球-ヘモグロビンD病、鎌状赤血球-サラセミア病、鎌状赤血球形成傾向、鉄芽球性貧血、鉄芽球性貧血、鉄芽球症候群、SIDS、シーゲル-カタン-マモウ（Siegel-Cattan-Mamou）症候群、ジーメンス-ブロッホ型色素性皮膚炎、ジーメンス症候群、ジーウェリング（Siewerling）-クロイツフェルト病、ジーウェルト（Siewert）症候群、シルバー症候群、シルバー-ラッセル小人症、シルバー-ラッセル症候群、シモンズ病、シモンズ症候群、単純性表皮水疱症、シンプソン異形症候群、シンプソン-ゴーラビ-ベーメル症候群、シンディング-ラルセン-ヨハンソン症候群、単胎児-メルテン症候群、洞性不整脈、静脈洞、洞性頻拍、人魚体奇形続発症、人魚体奇形、逆位気管支拡張症および洞炎、SJA症候群、シェーグレン-ラーソン症候群魚鱗癬、シェーグレン症候群、シェーグレン症候群、SJS、骨格形成異常、ヴァイスマン-ネッター-スツール（Stuhl）型骨格形成異常、皮膚剥離症候群、皮膚新生物、頭蓋非対称および軽度遅滞、頭蓋非対称および軽度合指症、SLE、睡眠時てんかん、睡眠時無呼吸、SLO、スライ症候群、SMA、乳児性急性型SMA、SMA I、SMA III、I型SMA、II型SMA、III型SMA、SMA3、SMA X1、SMCR、スミス-レムリ-オピッツ症候群、スミス-マゲニス（Magenis）症候群、スミス-マゲニス染色体領域、スミス-マクコルト（McCort）小人症、スミス-オピッツ先天性症候群、スミス病、スモルダリング（Smoldering）骨髄腫、SMS、SNE、光の曝露によるくしゃみ、バルプロエートナトリウム、骨孤立性プラスマ細胞腫、
ソーズビー病、ソトス症候群、ソルケ（Souques）-シャルコー症候群、南アフリカ遺伝性ポルフィリン症、痙性発声障害、痙性斜頚、痙性斜頚、痙攣性脳性麻痺、痙攣性結腸、痙

攣性発声障害、痙攣性対麻痺、SPD石灰沈着症、正常免疫グロブリンを伴う特異的抗体欠損、特異的読書障害、SPH2、球状赤血球性貧血、球状赤血球症、球状水晶体-短形症候群、スフィンゴミエリンリピドーシス、スフィンゴミエリナーゼ欠損、クモ指、シュピールマイアー-フォークト病、シュピールマイアー-フォークト-バッテン症候群、二分脊椎、二分脊椎、脊髄クモ膜炎、脊髄動静脈奇形、遺伝性家族性脊髄性運動失調、脊髄延髄筋ジストロフィー、脊髄挫傷、脊髄びまん性特発性骨格過骨症、脊髄DISH、脊髄性筋萎縮、全ての型の脊髄性筋萎縮、ALS型脊髄性筋萎縮、カルヴェの脊髄性筋萎縮-過栄養、I型脊髄性筋萎縮、III型脊髄性筋萎縮、3型脊髄性筋萎縮、カルヴェの脊髄筋萎縮-過栄養、脊髄骨化クモ膜炎、脊髄狭窄、脊髄小脳性運動失調、I型脊髄小脳萎縮、I型脊髄小脳性運動失調（SCA1）、II型脊髄小脳運動失調（SCAII）、III型脊髄小脳運動失調（SCAIII）、III型脊髄小脳性運動失調（SCA 3）、IV型脊髄小脳性運動失調（SCAIV）、V型脊髄小脳性運動失調（SCA V）、VI型脊髄小脳性運動失調（SCA VI）、VII型脊髄小脳運動失調（SCAVII）、スピロヘータ黄疸、脾臓無発生症候群、脾臓下垂、脾下垂、裂手変形-下顎顔面骨形成不全、裂手奇形、脊椎関節炎、脊椎肋骨形成異常-I型、晩発性脊椎骨端形成異常、脊椎胸郭形成異常、脊椎尾側神経根障害、海綿状腎、多形性海綿芽細胞腫、自然発症型低血糖症、シュプレンゲル変形、春季カタル、SRS、ST、魚腐敗臭症候群、ブドウ球菌熱傷皮膚症候群、シュタルガルト病、驚愕病、てんかん状態、スティール-リチャードソン-オルスゼフスキー症候群、剛毛病、スタイン-リーヴェンサール症候群、シュタイネルト病、ステンゲル（Stengel）症候群、ステンゲル-バッテン-メーオー-シュピールマイアー-フォークト病、狭窄性胆管炎、腰椎管狭窄、狭窄、ステロイドスルファターゼ欠損、ステヴァノヴィッチ（Stevanovic）外胚葉形成異常、スティーブンス-ジョンソン症候群、STGD、スティックラー症候群、スティッフ-マン症候群、スティッフパーソン症候群、スティル病、シュティリング-チュルク-デュエーン症候群、スティリス（Stillis）病、刺激感受性ミオクローヌス、ストーン-マン症候群、ストーンマン、ストリーター異常、常染色体優性型線条体黒質変性、線条体痰瘡球象牙質石灰沈着症、間質、デスメー膜、間質性角膜ジストロフィー、リンパ腫性甲状腺腫、スタージ-カーリシャー-ウェーバー症候群、スタージ-ウェーバー症候群、スタージ-ウェーバー母斑症、亜急性壊死性脳脊髄障害、亜急性海綿状脳症、亜急性壊死性脳症、亜急性サルコイドーシス、亜急性神経障害性大動脈下狭窄、皮質下動脈硬化性脳症、心内膜下硬化症、スクシニルコリン感受性、先天性スクラーゼ-イソマルターゼ欠損、先天性蔗糖-イソマルトース吸収不良、先天性蔗糖不耐性、スダン好性白質ジストロフィーADL、ペリツェーウス-メルツバッヒャー型スダン好性白質ジストロフィー、スダン好性白質ジストロフィーを含む、乳児突然死症候群、ズーデック萎縮、スギオ-カジイ症候群、サマースキル（Summerskill）症候群、シュミット（Summitt）尖頭合指症、シュミット尖頭合指症、シュミット症候群、上斜筋腱鞘症候群、腎上体腺、弁上大動脈狭窄、上室性頻拍、ろう-心症候群、ろう-心症候群、SVT、汗腺膿瘍、汗腺味覚症候群、スウィート症候群、スイスチーズ軟骨症候群、合指性尖頭症、小頭症および精神遅滞を伴うI型合指症、症候群性肝小管形成不全、脊髄空洞症、全身性無白血性細網内皮症、全身性アミロイドーシス、全身性カルニチン欠損、全身性弾性線維破裂、全身性紅斑性狼瘡、全身性肥満細胞病、全身性肥満細胞症、全身発症型若年性関節炎、全身性硬化症、シストーピック（Systopic）脾臓、T-リンパ球欠損、急速栄養性低血糖症、頻拍、高原症候群、高安病、高安動脈炎、踵足、内転尖足、尖足、内転足、内反足、縦列脊髄狭窄、タンジアー病、壁板網膜変性、TAR症候群、晩発性失調、晩発性筋ジストロフィー、晩発性ジスキネジー、晩発性口腔ジスキネジー、晩発性失調、遅発性尺骨神経麻痺、標的細胞貧血、足根骨肥大、タルイ病、TAS正中欠損を含む、TAS正中欠損、テイサックススフィンゴリピドーシス、テイサックス病、テイ症候群魚鱗癬、テイサックススフィンゴリピドーシス、テイ症候群魚鱗癬、I型テービ症候群、テービ症候群、TCD、TCOF1、TCS、TD、TDO症候群、TDO-I、TDO-II、TDO-III、毛細血管拡張症、関連異常を伴う眼角隔離症、眼角隔離-尿道下裂症候群、側頭葉てんかん、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、側頭動脈炎、TEN、上斜筋腱鞘癒着、緊張性筋肉痛、4q末端欠失を含む、テリエン角膜ジストロフィー、テスクラー（Teschler）-ニコラ-キリアン症候群、係留脊髄症候群、係留脊髄奇形続発症、係

留脊髄症候群、係留頚脊髄症候群、テトラヒドロビオプテリン欠損、テトラヒドロビオプテリン欠損、ファロー四徴、四肢アザラシ肢症-血小板減少症症候群、第9染色体短腕テトラソミー、テトラソミー9p、第18染色体短腕テトラソミー、視床症候群、視床疼痛症候群、視床知覚過敏知覚消失、中間型サラセミア、サラセミアマイナー、サラセミアメジャー、チアミン欠損、チアミン反応性カエデシロップ尿病、薄基底膜神経障害、チオラーゼ欠損、RCDP、アシル-CoAジヒドロキシアセトンリン酸アシルトランスフェラーゼ、第三および第四咽頭嚢症候群、第三度先天性（完全）心ブロック、トムセン病、胸部骨盤-指節骨ジストロフィー、胸部脊髄管、胸腹症候群、胸腹転位心症候群、スリーエム症候群、スリーエム細骨小人症、グランツマンおよびネーゲリの血小板無力症、本態性血小板血症、血小板減少症-橈骨欠損症候群、血小板減少症-血管腫症候群、血小板減少症-橈骨欠損症候群、AT IIIによる遺伝性血栓形成傾向、血栓性血小板減少性紫斑病、血栓潰瘍性大腸炎、正常免疫グロブリンを伴う胸腺形成異常、胸腺無発生、ディジョージ型胸腺形成不全、胸腺発育不全原発性無γグロブリン血症を含む、ディジョージ型胸腺形成不全、先天性胸腺形成不全、疼痛性チック、チック、ティネル症候群、トロサ-ハント症候群、強直性痙性斜頚、緊張性瞳孔症候群、歯爪症候群、トーチ感染症、TORCH症候群、ねじれ失調症、斜頚、総脂肪異栄養、肺静脈連結総異常、トゥーレーヌアフタ症、トゥーレット症候群、トゥーレット障害、タウンズ-ブロックス症候群、タウンズ症候群、中毒性麻痺性貧血、中毒性表皮壊死症、骨幹脛骨-腓骨中毒性肥厚骨化症、中毒性肥厚骨化症、他の物質風疹サイトメガロウイルス単純ヘルペスウイルスによるトキソプラズマ症、食道閉鎖を伴うまたは伴わない気管食道フィステル、気管食道フィステル、一過性新生児重症筋無力症、一過性房室中隔欠損、大動脈逆位、トランステレフォニックモニタリング、トランスサイレチンメチオニン-30アミロイドーシス（I型）、小菱形骨脳症-多発性骨癒合症候群、トレチャー-コリンズ症候群、トレチャー-コリンズ-フランスシェッティ症候群1、トレボール病、三房心、毛歯骨症候群、毛歯骨症候群、白髪ジストロフィー、毛髪鼻指節骨症候群、毛髪鼻指節骨症候群、三尖弁閉鎖、三官能性タンパク質欠損、三叉神経痛、トリグリセリド貯蔵病長鎖脂肪酸酸化障害、三角炎、三角頭蓋症、三角頭蓋症候群、三角頭蓋「C」症候群、トリメチルアミン尿症、母指三指節症-発育不全遠位指節骨-爪ジストロフィー、母指三指節症候群、ベーチェット三症状症候群、トリプルX症候群、トリプロX症候群、三倍体症候群、三倍体、三倍体症候群、開口障害-偽屈指症候群、トリソミー、トリソミーG症候群、トリソミーX、部分的トリソミー6q、部分的トリソミー6q症候群、トリソミー9モザイク、トリソミー9P症候群（部分的）を含む、部分的トリソミー11q、トリソミー14モザイク、トリソミー14モザイク現象症候群、トリソミー21症候群、トリソミー22モザイク、トリソミー22モザイク現象症候群、TRPS、TRPS1、TRPS2、TRPS3、真の半陰陽、総動脈幹、トリプトファン吸収不良、トリプトファンピロラーゼ欠損、TS、TTP、TTTS、結節状硬化症、尿細管拡張症、ターコット症候群、ターナー症候群、ターナー-キーザー（Kieser）症候群、正常染色体（核型）を伴うターナー表現型、ターナー-バーニー症候群、塔状頭蓋、双生児間輸血症候群、双生児間輸血症候群、A型、B型、AB型、O型、I型糖尿病、I型家族性不完全男性、I型家族性不完全男性偽半陰陽、I型ゴーシェ病、I型（PCCA欠損）、I型チロシン血症、II型ゴーシェ病、II型組織球症候群、II型（PCCB欠損）、II型チロシン血症、多発性先天性IIA型遠位関節拘縮、III型ゴーシェ病、III型チロシン血症、III型象牙質形成不全、典型的網膜分離症、チロシナーゼ陰性白皮症（I型）、チロシナーゼ陽性白皮症候群（II型）、1型急性型チロシン血症、1型慢性型チロシン血症、チロシン症、UCE、潰瘍性大腸炎、慢性非特異性潰瘍性大腸炎、尺骨-乳腺症候群、パリスター尺骨-乳腺症候群、尺骨神経麻痺、UMS、非分類型FOD、非結合型良性ビリルビン血症、副甲状腺反応低下、同側の脚奇形を伴う片側魚鱗癬様紅皮症、片側軟骨腫症、胸筋の片側欠損および手の合指症、片側型半側形成異常、片側巨頭症、片側部分的脂肪異栄養、片側腎無発生、不安定結腸、ウンフェルリヒト病、ウンフェルリヒト-ルンドボルグ病、ウンフェルリヒト-ルンドボルグ-ラフ病、ウンフェルリヒト症候群、上肢-心血管症候群（ホールト-オーラム型）、上位運動ニューロン病、上気道無呼吸、尿素サイクル欠損または障害、アルギナーゼ型尿素サイクル障害、アルギノスクシナーゼ型尿素サイクル障害、カルバミルホスフ

ェートシンテターゼ型尿素サイクル障害、シトルリン血症型尿素サイクル障害、N-アセチルグルタメートシンテターゼ型尿素サイクル障害、OTC型尿素サイクル障害、尿道症候群、尿道-眼-関節症候群、重度分化型Iウリジン二リン酸グルクロノシルトランスフェラーゼ、尿路欠損、尿顔面症候群、ウロポルフィリノーゲンIIIコシンターゼ、色素性じんま疹、アッシャー症候群、I型アッシャー、II型アッシャー、III型アッシャー、IV型アッシャー、子宮癒着、ウロポルフィリノーゲンI-シンターゼ、ブドウ膜炎、ブドウ膜髄膜炎症候群、V-CJD、VACTEL関連、VACTERL関連、VACTERL症候群、踵骨外反、バリントランスアミナーゼ欠損、バリン血症、バルプロ酸曝露、バルプロ酸曝露、バルプロ酸、ヴァン・ビューレン病、ファン・デル・フヴェ-ハバーツマ（Habertsma）-ワールデンブルヒ-ゴールディ（Gauldi）症候群、変異型免疫グロブリン欠損低γグロブリン血症、変異型クロイツフェルト-ヤコブ病（V-CJD）、水痘胚障害、異型ポルフィリン症、ビンスヴァンガー型血管性痴呆、血管拡張性腫瘍、血管性血友病、血管奇形、脳の血管奇形、脈管炎、血管運動運動失調、バソプレシン抵抗性尿崩症、バソプレシン感受性尿崩症、VATER関連、Vcf症候群、Vcf、口蓋心顔面症候群、口蓋心顔面症候群、性病性関節炎、静脈奇形、心室細動、心室中隔欠損、先天性心室欠損、心室中隔欠損、心室性頻拍、細静脈奇形、VEOHD、虫部発育不全、小脳虫部無発生、春季カタル、ゆうぜい、椎骨肛門気管食道食道橈骨、椎骨強直性骨増殖症、早初期ハンチントン病、超長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ（VLCAD）欠損、前庭神経鞘腫、前庭神経鞘腫神経線維腫症、前庭小脳性、フィルヒョー尖頭症、内臓性黄色肉芽腫症、内臓性黄色肉芽腫症、内臓性ミオパシー-外眼筋麻痺、内臓巨大症-臍ヘルニア-巨舌症候群、視覚健忘症、ビタミンA欠乏症候群、ビタミンB-1欠乏症、卵黄巣黄斑ジストロフィー、白斑、頭部白斑、硝子体網膜ジストロフィー、VKC、VKH症候群、VLCAD、フォークト症候群、フォークト脳合指症、フォークト-小柳原田症候群、フォン・ベヒテレフ-シュトリュンペル症候群、先天性フォン・オイレンブルクパラミオトニア、フォン・フライ症候群、フォン・ギールケ病、フォン・ヒッペル-リンダウ症候群、フォンミクリッチ症候群、フォン・レックリングハウゼン病、フォン・ヴィレブランド病、VP、フロリク病（II型）、VSD、尋常性型角化障害、尋常性型魚鱗癬、W症候群、ワールデンブルヒ症候群、ワールデンブルヒ-クレーン症候群、I型ワールデンブルヒ症候群（WS1）、II型ワールデンブルヒ症候群（WS2）、IIA型ワールデンブルヒ症候群（WS2A）、IIB型ワールデンブルヒ症候群（WS2B）、III型ワールデンブルヒ症候群（WS3）、IV型ワールデンブルヒ症候群（WS4）、ウェルシュ（Waelsch）症候群、WAGR複合体、WAGR症候群、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ヴァルデンストレーム紫斑病、ヴァルデンストレーム症候群、ワルドマン（Waldman）病、ウォーカー-ヴァルブルク症候群、遊走脾、ヴァルブルク症候群、温暖抗体溶血性貧血、温暖反応抗体病、ヴァルテンベルク症候群、WAS、脳水、ワトソン症候群、ワトソン-アラジル症候群、ウォーターハウス-フリデリックセン症候群、ロウ状変性病、WBS、ウィーバー症候群、ウィーバー-スミス症候群、ウェーバー-コケーン症候群、ヴェーゲナー肉芽腫症、ヴァイル病、ヴァイル症候群、ヴァイル-マルケサーニ、ヴァイル-マルケサーニ症候群、ヴァイル-ライ症候群、ヴァイスマン-ネッター-スツール症候群、ヴァイセンバッヒャー-ツヴェイミュラー（Weissenbacher-Zweymuller）症候群、ウェルズ症候群、ウェンケバッハ、ヴェルドニッヒ-ホフマン病、ヴェルドニッヒ-ホフマン麻痺、ヴェルルホフ病、ヴェルナー症候群、ヴェルニッケ(C)I症候群、ヴェルニッケ失語症、ヴェルニッケ-コルサコフ症候群、ウェスト症候群、湿性脚気、WHCR、ホウィップル病、ホウィップル病、口笛顔貌症候群、口笛顔貌-風車の羽手症候群、ホワイト-ダリエ病、ホイットナル-ノルマン症候群、螺旋状母斑様高メラニン症、WHS、ヴィーアカー（Wieacker）症候群、ヴィーアカー症候群、ヴィーアカー-ヴォルフ症候群、ヴィードマン-ベックウィズ症候群、ヴィーデマン-ラウテンシュトラウヒ（Rautenstrauch）症候群、ウィルデルヴァンク症候群、ヴィレブランド-ユルゲンス（Juergens）病、ヴィリ-プラーダー症候群、ウィリアムス症候群、ウィリアムス-ビューレン症候群、ウィルムス腫瘍、ウィルムス腫瘍-無虹彩-性腺芽腫-精神遅滞症候群、ウィルムス腫瘍無虹彩尿性器異常-精神遅滞、ウィルムス腫瘍-無虹彩-性腺芽腫-精神遅滞症候群、ウィルムス腫瘍偽半陰陽-腎症、ウィルムス腫瘍および偽半陰陽、ウ

ィルムス腫瘍-偽半陰陽-糸球体症、ウィルソン病、ウィンチェスター症候群、ウィンチェスター-グロスマン症候群、ヴィスコット-オールドリッチ症候群、ヴィスコット-オールドリッチ型免疫不全、白頭症外胚葉形成異常、白頭症歯爪症候群、ウィットマーク-エクボム症候群、WM症候群、WMS、WNS、ヴォールファルト病、ヴォールファルト-クーゲルベルク-ヴェランデル病、ヴォルフ症候群、ヴォルフ-ヒルシュホルン（Hirschhorn）染色体領域（WHCR）、ヴォルフ-ヒルシュホルン症候群、ヴォルフ-パーキンソン-ホワイト症候群、ウォルフラム症候群、ウォルマン病（ライソゾーム酸リパーゼ欠損症）、ウッディーガスリー病、WPW症候群、書痙、WS、WSS、WWS、ワイバーン-メーソン症候群、X-連鎖アジソン病、X-連鎖副腎脳白質ジストロフィー（X-ALD）、X-連鎖成人脊髄延髄性筋萎縮、X-連鎖成人脊髄性筋萎縮、成長ホルモン欠乏を伴うX-連鎖無γグロブリン血症、X-連鎖無γグロブリン血症、リンパ増殖性X-連鎖症候群、X-連鎖心筋症および好中球減少症、X-連鎖中心核ミオパシー、X-連鎖銅欠損、X-連鎖銅吸収不良、X-連鎖優性コンラーディ-ヒュネルマン症候群、X-連鎖優性遺伝性脳梁無発生、X-連鎖失調-振せん麻痺、X-連鎖魚鱗癬、X-連鎖乳児無γグロブリン血症、X-連鎖乳児壊死性脳症、X-連鎖若年性網膜分離、X-連鎖脳回欠損、X-連鎖リンパ増殖症候群、X-連鎖精神遅滞-鉤状母指症候群、低血圧を伴うX-連鎖精神遅滞、X-連鎖精神遅滞および巨睾丸症、X-連鎖進行性複合変異型免疫不全、X-連鎖劣性コンラーディ-ヒュネルマン症候群、X-連鎖劣性重度複合免疫不全、X-連鎖網膜分離、X-連鎖脊柱骨端形成異常、キサンチンオキシダーゼ欠損（遺伝性キサンチン尿症欠損）、遺伝性キサンチン尿欠損（キサンチンオキシダーゼ欠損）、全身性黄色肉芽腫症、結節状黄色腫、色素性乾皮症、優性型色素性乾皮症、ＡＩ XPA古典型色素性乾皮症、Ｂ II XPB型色素性乾皮症、Ｅ V XPE型色素性乾皮症、Ｃ III XPC型色素性乾皮症、Ｄ IV XPD型色素性乾皮症、Ｆ VI XPF型色素性乾皮症、Ｇ VII XPG型色素性乾皮症、XP-V変異型色素性乾皮症、乾皮症-内反足およびエナメル欠損、乾皮症白痴、眼球乾燥症、乾燥性角膜炎、XLP、XO症候群、XP、XX男性症候群、性逆転、XXXXX症候群、XXY症候群、XYY症候群、XYY染色体パターン、黄色変異型白皮症、黄色爪白皮症、YKL、若い女性の動脈炎、ユニス-ヴァロン（Yunis-Varon）症候群、YY症候群、Z-E症候群、Z-およびプロテアーゼ阻害剤欠損、ツェルヴェーガー症候群、ツェルヴェーガー脳肝腎症候群、ZES、チーエン-オッペンハイム病（ねじれ失調症）、チンメルマン-レーバント症候群、先天性亜鉛欠乏、ジンサー-コール-エングマン（Engman）症候群、ZLS、ゾリンジャー-エリソン症候群を含む状態に関して単独で、またはもう一つの薬物と併用して処置するために、大腸菌、酵母、またはCHOによって発現されたタンパク質またはキメラ分子のような、非ヒト細胞株によって発現されたタンパク質またはそのキメラ分子と同じように、単独または他の薬物もしくは治療と併用して用いることができる。

【０４５５】

別の態様において、単離IL-2またはそのキメラ分子を含む薬学的組成物は、以下のものの処置において、単独でまたは他の生物製剤、薬物、もしくは治療と併用して用いることができる：HIV感染、進行癌、転移性癌、または切除不能癌を含む多くの癌(例えば、腎癌、黒色腫、神経芽細胞腫、星状細胞腫または乏突起膠腫、および神経膠腫を含む脳腫瘍、慢性リンパ性白血病(CLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、口唇および口腔の扁平上皮癌、急性骨髄性白血病(AML)、菌状息肉腫、結腸直腸癌、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、卵巣癌、様々な形態の非ホジキンリンパ腫、肺癌(lung carcinoma)、肉腫、肝癌、頭頸部癌、肺癌(lung cancer)、非小細胞肺癌、リンパ腫、小児肉腫(pediatric sarcoma)、結腸癌、膵癌、甲状腺癌、異型慢性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病、骨髄異形成および骨髄増殖性疾患、ならびに骨髄異形成症候群、分類不能型免疫不全症、潰瘍性大腸炎、ならびにB型肝炎およびC型肝炎、ならびに狼瘡。

【０４５６】

別の態様において、単離IL-2Ra-Fc、IL-2Rb-Fc、IL-2Rg-Fcを含む薬学的組成物は、同種移植片拒絶、リンパ性腫瘍、骨髄異形成症候群の血球減少症、無顆粒球症、赤芽球癆；T細胞白血病、ヘアリーセル白血病、血小板減少症、再生不良性貧血、血小板減少性紫斑病、多発性硬化症(MS)、ブドウ膜炎、潰瘍性大腸炎、胃腸疾患、炎症性腸疾患、乾癬、移

植片対宿主病(GVHD)、骨髄性白血病、骨髄単球性、慢性リンパ性白血病、リンパ腫、およびHIV関連疾患を含む、IL-2シグナル伝達の調節解除を伴う多くの疾患の処置において、単独で、または相互に組み合わせて、および/または他の生物製剤、薬物、もしくは治療と併用して用いることができる。

【０４５７】

別の態様において、単離IL-2Rg-Fcを含む薬学的組成物は、リウマチ性関節炎、クローン病および大腸炎などの炎症性腸疾患、乾癬、アトピー、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、ならびにアレルギー性喘息などの炎症性疾患；慢性閉塞性肺疾患、例えば肺気腫または慢性気管支炎、潰瘍性大腸炎、強皮症、および組織線維症(tissue fibrosis)の処置において；HIV、ヘルペスなどのウイルス感染、および結核菌(Mycobacterium tuberculosis)などの非ウイルス性病原体の処置のために；ならびにIL-4またはIL-13が自己分泌増殖因子または傍分泌(paracrine)増殖因子として作用する腫瘍、例えば、ホジキンリンパ腫、神経膠腫、頭頸部癌、膵癌、前立腺癌、甲状腺癌、およびカポジ肉腫の処置のために、IL-4の単離されたリガンド特異的受容体サブユニットを含む薬学的組成物と併用して、および/または他の生物製剤、薬物、もしくは治療と併用して用いることができる。

【０４５８】

さらに別の態様において、単離IL-2Rg-Fcを含む薬学的組成物は、カンジダ症、リステリア症、およびリーシュマニア症に対する防御免疫を促進するために；ならびに皮膚移植手術後の熱傷患者の感染を予防するために、IL-4の単離されたリガンド特異的受容体サブユニットを含む薬学的組成物と併用して、および/または他の生物製剤、薬物、もしくは治療と併用して用いることができる。

【０４５９】

別の態様において、単離IL-2Rg-Fcを含む薬学的組成物は、白血病(例えば、B前駆細胞性白血病)およびリンパ腫(例えば、急性リンパ芽球性白血病)などの血液悪性腫瘍に関連した疾患、子宮頸癌、黒色腫、卵巣摘出による骨量減少、骨粗鬆症、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、多発性硬化症、乾癬、類天疱瘡、骨髄移植に関連したT細胞除去、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患および潰瘍性大腸炎などの慢性腸炎、アテローム発生、冠動脈疾患の処置において、IL-7の単離されたリガンド特異的受容体サブユニットを含む薬学的組成物と併用して、および/または他の生物製剤、薬物、もしくは治療と併用して用いることができる。

【０４６０】

別の態様において、単離IL-2Rg-Fcを含む薬学的組成物は、アレルギー性炎症、気道炎症、喘息、および脳性麻痺の処置において、IL-9の単離されたリガンド特異的受容体サブユニットを含む薬学的組成物と併用して、および/または他の生物製剤、薬物、もしくは治療と併用して用いることができる。

【０４６１】

別の態様において、単離IL-2Rg-Fcを含む薬学的組成物は、皮膚疾患、類天疱瘡、紅斑性天疱瘡、乾癬、全身性エリテマトーデス(systemic erythematosus)、アトピー性湿疹、リウマチ性関節炎、全身性紅斑性狼瘡(systemic lupus erythematosus)、多発性硬化症、セリアック病、炎症性腸疾患、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、慢性活動性肝炎、クローン病などの自己免疫疾患および炎症；T細胞白血病、B細胞慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病を含む血液悪性腫瘍の処置において、IL-15の単離されたリガンド特異的受容体サブユニットを含む薬学的組成物と併用して、および/または他の生物製剤、薬物、もしくは治療と併用して用いることができる。

【０４６２】

しかし、本発明の薬学的組成物は、非ヒト細胞株において発現されたタンパク質またはそのキメラ分子と比較して、より高い薬学的有効性、増加した熱安定性、増加した血清中半減期、または血流でのより高い溶解度を有する。本発明はまた、免疫関連クリアランスまたは関連副作用のリスクの低減を示す。これらの改善された特性のために、本発明の組

成物は、非ヒト細胞株において発現されたタンパク質またはキメラ分子より少ない回数で投与することができる。投与回数の減少は、患者のコンプライアンスを増強してそれによって治療転帰の改善に至ると予想される。患者の生活の質も同様に上昇する。

【０４６３】

従って、一つの態様において、本発明の薬学的組成物は、非ヒト細胞株において発現されたタンパク質またはキメラ分子が投与される方法と同じ方法で患者に治療的有効量で投与されうる。治療的な量は、所望のインビボ活性にとって必要な組成物の量である。投与される組成物の正確な量は、処置される状態の正確なタイプ、処置される患者の状態および組成物における他の成分のような要因の影響を受ける選択性の問題である。本発明のタンパク質のイソ型またはキメラ分子を含む薬学的組成物は、上記の疾患状態の一つまたは複数を経験するヒト患者に対して様々な手段によって投与するために有効な効力で処方されてもよい。組成物の平均的な治療的有効量は変化する可能性がある。有効量は0.1 ng/kg体重～20μg/kg体重の範囲であると予想され、または資格のある医師の推奨および処方に基づく。

【０４６４】

本発明はさらに、タンパク質またはそのキメラ分子の少なくとも一部を含む単離タンパク質またはキメラ分子、およびこれらを含む組成物を、多様な治療的および／または診断的適用において用いることに及ぶ。

【０４６５】

より詳しくは、本発明は、単離タンパク質、タンパク質、その断片、もしくは細胞外ドメインを含むそのキメラ分子、または単離タンパク質もしくはキメラ分子を含む組成物の有効量を哺乳動物被験体に投与する段階を含む、本発明のタンパク質またはキメラ分子の量または活性を増加させることによって改善されうる、哺乳動物被験体における状態を処置または予防する方法に及ぶ。

【０４６６】

本発明はさらに以下の非制限的な実施例によって説明する。

【０４６７】

実施例

実施例1

(a) ベクター-Fc構築物の作製

ヒトIgG1のFcドメインをコードするDNA配列を、それぞれ制限酵素部位BamH1およびBstX1を組み入れたフォワードプライマー(SEQ ID NO:21)およびリバースプライマー(SEQ ID NO:22)を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法)によりEST cDNAライブラリー(クローンID 6277773、Invitrogen)から増幅した。この単位複製配列をpIRESbleo3(カタログ番号6989-1、BD Biosciences)の対応する酵素部位にクローニングして、構築物pIRESbleo3-Fcを作製した。pIRESbleo3-FcをBamH1およびBstX1で消化すると、ゲル電気泳動によって決定される780 bpという予測されるサイズの挿入物が放出された。

【０４６８】

(b) タンパク質またはタンパク質-Fcを発現するDNA構築物の作製

タンパク質またはその細胞外ドメインをコードするDNA配列を、表8記載の制限酵素部位を組み入れたフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いて、PCRによりEST cDNAライブラリーから増幅した。増幅後、単位複製配列を適切な制限酵素で消化し、表8記載の発現ベクターにクローニングして、ベクター-タンパク質構築物またはベクター-タンパク質-Fc構築物を作製した。タンパク質-Fcをコードする構築物を作製する場合には、二つの配列がインフレームで融合されて、タンパク質が発現された場合にこれが直接またはリンカーによりFcドメインに融合されるように、タンパク質をコードするDNA配列をFcヌクレオチド配列の上流にクローニングした。適切な制限酵素を用いて、タンパク質またはタンパク質-FcをコードするDNA配列を含むベクターを消化したところ、表8に示す予測されるサイズの断片が放出された。ベクター-タンパク質構築物またはベクター-タンパク質-Fc構築物の配列を決定し、本明細書に記載したクローニング手順の完全性を確認した。

【０４６９】

(c) Megaprepベクター-タンパク質またはベクター-タンパク質-Fcの調製

アンピシリン(100μg/ml)を含む滅菌LBブロス750 mlに、ベクター-タンパク質またはベクター-タンパク質-Fcを形質転換した大腸菌の一晩培養物750μlを接種した。培養物を、浸透しながら37℃で16時間インキュベートした。Qiagen Endofree Plasmid Mega Kit(Qiagen Mega Prep Kit #12381)に従ってプラスミドを調製した。

【０４７０】

（表８）タンパク質-Fcおよび関連するクローニング情報

タンパク質	cDNA供給源	フォワードプライマー	リバースプライマー	制限酵素部位	ベクター	サイズ(bp)
IL-2	pUMCV3-IL-2 Aldevron	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	EcoRV, BamHI	pIRESbleo3 (カタログ番号6989-1, BD Biosciences)	440
IL-2Ra	クローンID 4689508, Invitrogen	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36	BamHI, BamHI	pIRESbleo3-Fc	736
IL-2Rb	クローンID 5207833, Invitrogen	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:56	EcoRV, BamHI	pIRESbleo3-Fc	675
IL-2Rg	クローンID 4878734, Open Biosystems	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:76	NotI, BamHI	pIRESbleo3-Fc	798

【０４７１】

または、タンパク質とFcのヌクレオチド配列が直接またはリンカーによりインフレームで融合されるように、タンパク質をコードするDNA配列をベクター-Fc(pIRESbleo3-FcまたはpCEP4-Fcなど)中のFcヌクレオチド配列の上流にクローニングすることを可能にする制限部位を組み入れたプライマーを用いて、ベクター(pIRESbleo3またはpCEP4など)にクローニングされたタンパク質をコードするヌクレオチド配列を増幅することもできる。

【０４７２】

実施例2

(a) 本発明のIL-2の産生および精製

(i) 本発明のIL-2の産生

0日目に、500 cm^2組織培養皿(Corning) 5枚に、形質転換ヒト胚性腎臓細胞株、例えばHEK 293、HEK 293 c18、HEK 293T、293 CEN4、HEK 293F、HEK 293FT、HEK 293E、AD-293(Stratagene)、または293A(Invitrogen)由来の3×10^7個細胞を播種した。プレート当たり90 mlの、10%(v/v)ドナー仔ウシ血清(DCS、JRH Biosciences)、10 mM HEPES(Sigma)、4 mM L-グルタミン(Amresco)、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン(ペニシリンG 5000 U/ml、硫酸ストレプトマイシン5000μg/ml)(JRH Biosciences)を添加したダルベッコ変法イーグル培地/ハム栄養混合液F12(DMEM/F12)(JRH Biosciences)に、細胞を播種した。

【０４７３】

1日目に、リン酸カルシウムを用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションの前に、各プレート中の培地を、10%(v/v) DCS、10 mM HEPES、4 mM L-グルタミン、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した新鮮なDMEM/F12 120 mlに置換した。ヒトIL-2の遺伝子を有するpIRESbleo3(Invitrogen)プラスミドDNA 1200μgおよび$CaCl_2$ (2.5 M) 3720μlを、最終量30 mlになるように滅菌H_2O中に添加して、リン酸カルシウム/DNA沈殿物を調製した(溶液A)。10 mlピペットを用いて、溶液Aを2×HEPES緩衝生理食塩水(HBS)(溶液B) 30 mlに1滴ずつ添加した。添加中は、溶液Bに穏やかに気泡を吹き込んだ。混合液を25℃で20分間インキュベートし、ボルテックスした。混合液12 mlを

各プレートに1滴ずつ添加した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。

【０４７４】

2日目に、細胞培養上清を廃棄した。プレート内の内容物をプレート当たり50 mlのDMEM/F12培地で2回洗浄し、40 mM N-アセチル-D-マンノサミン(New Zealand Pharmaceuticals)、10 mM L-グルタミン(Amresco)、4.1 g/Lマンノース(Sigma)、15 mM HEPES、1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン、およびITS溶液(5 mg/Lウシインスリン、5 mg/L部分的鉄飽和ヒトトランスフェリン、および5μg/mlセレンを含む)(Sigma)を添加した新鮮な無血清DMEM/F12培地100 mlを各プレートに添加した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。

【０４７５】

3日目に、細胞培養上清を回収し、40 mM N-アセチル-D-マンノサミン、10 mM L-グルタミン、4.1 g/Lマンノース、15 mM HEPES、1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン、およびITS溶液を添加した新鮮な無血清DMEM/F12培地100 mlを各プレートに添加した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。回収した細胞培養上清に100 mM PMSF(1%(v/v))および500 mM EDTA(1%(v/v))を添加し、混合液を4℃で保存した。

【０４７６】

4日目に、細胞培養上清を回収した。回収した細胞培養上清に100 mM PMSF(1%(v/v))および500 mM EDTA(1%(v/v))を添加し、3日目回収物と混合した。2 M Tris-HCl pH 8(Sigma)を添加して、混合した回収物をpH 8に調整した後、0.45ミクロン低タンパク質結合フィルター(Durapore、Millipore)を用いて微粒子を除去した。混合液は-70℃で保存するか、または直ちに使用した。

【０４７７】

(ii) 本発明のIL-2の精製

色素リガンドクロマトグラフィー(DLC)の工程を、IL-2の精製における第一段階として使用した。バッチ精製マイクロタイター形式において、固定化反応性色素のライブラリーを用いて、効率的な結合および放出についてIL-2をスクリーニングした。次いで、適切な色素-タンパク質の組み合わせを少量カラム形式で試験した。

【０４７８】

少量精製では、融解した細胞培養上清試料5 mlをpH 6で0.5 ml色素リガンドカラムに通した。この最適化段階では、大量DLCへの拡大のために、最適な色素ビーズ-サイトカインおよびpHの組み合わせを画分中の最大回収に関して選択した。

【０４７９】

大量DLCには、反応性色素8号High(Zymatrix)を、IL-2の最良の結合および溶出特性を有する反応性色素として選択した。50 mM MES/5 mM $MgCl_2$でpH 6にあらかじめ平衡化したDLC樹脂をそれぞれ3 mlまたは6 ml有する4.0 mlまたは8.0 mlカラム本体(Alltech、Extract Clean Filterカラム)に、濾過した細胞培養上清を重力流下で通した。大量フロースルー試料は、ELISAの結果から精製が成功したことが確認されるまで4℃で保存した。画分が透明に見えるまで、カラムを緩衝液A(20 mM MES/5 mM $MgCl_2$ pH 6)で洗浄した。3種の溶出緩衝液を以下の順で用いて、IL-2を溶出した：

溶出1：緩衝液C(50 mM Tris-Cl/10 mM EDTA pH 8)
溶出2　EN1.0(50 mM Tris-Cl/10 mM EDTA/1.0 M NaCl pH 8)
溶出3　EN2.0(50 mM Tris-Cl/10 mM EDTA/2.0 M NaCl pH 8)。

【０４８０】

溶出された画分を、NuPAGE MES SDS泳動緩衝液を使用する4～12% NuPAGE Bis-Trisゲル(Invitrogen)を用いたSDS PAGEの銀染色によりアッセイし、IL-2 ELISA(R&D Systems Duoset)により定量した。IL-2はEN1.0中に溶出されることが判明した。混入タンパク質の90%がこの第一精製段階で除去されることが、SDS PAGE解析から推定された。IL-2を含むDLC画分を、サイズ排除クロマトグラフィー用にプールした。

【０４８１】

Superdex 75-分取等級16/70(Pharmacia、ウプサラ、スウェーデン)カラムを用いて、混合したDLC画分のサイズ排除クロマトグラフィーを行った。50 mM MES緩衝液(pH 5.6)の均一濃度流を、流速1.5 ml/分で使用した。全実行時間は120分であり、20～100分にピークが溶出された。溶出された画分を、NuPAGE MES SDS泳動緩衝液を使用する4～12% NuPAGE Bis-Trisゲルを用いたSDS PAGEの銀染色によりアッセイし、IL-2 ELISA(R&D Systems Duoset)により定量した。約60分の時点で溶出されるピークがIL-2を含むことが判明した。

【０４８２】

SECカラムから選択された画分を、50 mM MESでpH 5.6にあらかじめ平衡化した陽イオン交換カラム(Bio-Rad Laboratories、Uno S12)に通して、さらなる精製を達成した。次いで、50 mM MES pH 5.6から1 M NaClを含む50 mM MES pH 5.6までの直線勾配により、結合したIL-2をカラムから溶出した。得られた画分を、ELISA法、およびNuPAGE MES SDS泳動緩衝液を使用する4～12% NuPAGE Bis-Trisゲルを用いた1D SDS PAGEにより見かけの分子量および純度レベルについて解析し、IL-2 ELISA(R&D Systems Duoset)により定量した。

【０４８３】

IL-2を含む画分を、pH 7.4で0.5 ml色素リガンドカラム(反応性色素8号high)に通すことにより濃縮した。画分が透明に見えるまで、カラムを緩衝液A(20 mM MES/5 mM $MgCl_2$ pH 6)で洗浄し、その後緩衝液C(50 mM Tris-Cl/10 mM EDTA pH 8)で洗浄した。IL-2はEN2.0(50 mM Tris-Cl/10 mM EDTA/2.0 M NaCl pH 8)中に溶出されることが判明した。

【０４８４】

溶出された画分を、NuPAGE MES SDS泳動緩衝液を使用する4～12% NuPAGE Bis-Trisゲル(Invitrogen)を用いたSDS PAGEの銀染色によりアッセイし、IL-2 ELISA(R&D Systems Duoset)により定量した。IL-2はEN2.0中に溶出されることが判明した。

【０４８５】

NuPAGE MES SDS泳動緩衝液を使用する4～12% NuPAGE Bis-Trisゲルを用いたSDS PAGEの銀染色により、精製されたIL-2は16～20 KDaの見かけのMWを有し、少なくとも95%純粋であることが判明した。IL-2の最終濃度は、IL-2 ELISA(R&D Systems Duoset)より推定して1300μg/mlであることが分かった。

【０４８６】

(b) 本発明のIL-2Ra-Fcの産生および精製

(i) 本発明のIL-2Ra-Fcの産生

0日目に、500 cm^2組織培養皿(Corning) 5枚に、3×10^7個細胞の形質転換ヒト胚性腎臓細胞株、例えばHEK 293、HEK 293 c18、HEK 293T、293 CEN4、HEK 293F、HEK 293FT、HEK 293E、AD-293(Stratagene)、または293A(Invitrogen)を播種した。プレート当たり90 mlの、10%(v/v)ウシ胎児血清(FCS、JRH Biosciences)、4 mM L-グルタミン(Amresco)、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン(ペニシリンG 5000 U/ml、硫酸ストレプトマイシン5000μg/ml)(JRH Biosciences)を添加したダルベッコ変法イーグル培地/ハム栄養混合液F12(DMEM/F12)(JRH Biosciences)に、細胞を播種した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。

【０４８７】

1日目に、リン酸カルシウムを用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションの前に、各プレート中の培地を、10%(v/v) FCS、4 mM L-グルタミン、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した新鮮なDMEM/F12 120 mlに置換した。ヒトIL-2Ra-Fcの遺伝子を有するプラスミドDNA 1200μgおよび2.5 M $CaCl_2$ 3000μlを、最終量30 mlになるように滅菌1×TE中に添加して、リン酸カルシウム/DNA沈殿物を調製した(溶液A)。10 mlピペットを用いて、溶液Aを2×HEPES緩衝食塩水(HBS)(溶液B) 30 mlに1滴ずつ添加した。添加中は、溶液Bに穏やかに気泡を吹き込んだ。混合液を25℃で20分間インキュベートした。混合液12 mlを各プレートに1滴ずつ添加した。4時間後、トランスフェクション混合液を含む培地を除去し、10%(v/v) FCS、4 mM L-グルタミン、1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン、および最終濃度4.0 mMのHClを添加した、最終pH 7を有するDMEM/F12 100 mlを各プレートに添加した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベー

トした。

【０４８８】

2日目に、細胞培養上清を廃棄した。プレート内の内容物をプレート当たり50 mlのDMEM/F12培地で2回洗浄し、40 mM N-アセチル-D-マンノサミン(New Zealand Pharmaceuticals)、7 mM L-グルタミン(Amresco)、0.5 g/Lマンノース(Sigma)、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した新鮮な無血清DMEM/F12培地100 mlを各プレートに添加した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。

【０４８９】

3日目に、細胞培養上清を回収し、40 mM N-アセチル-D-マンノサミン、7 mM L-グルタミン、0.5 g/Lマンノース、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した新鮮な無血清DMEM/F12培地100 mlを各プレートに添加した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。回収した細胞培養上清に100 mM PMSF(1%(v/v))および500 mM EDTA(1%(v/v))を添加し、混合液を4℃で保存した。

【０４９０】

4日目に、細胞培養上清を回収した。回収した細胞培養上清に100 mM PMSF(1%(v/v))および500 mM EDTA(1%(v/v))を添加し、3日目回収物と混合した。その後、0.45ミクロン低タンパク質結合フィルター(Durapore、Millipore)を用いて微粒子を除去する前に、混合された回収物を2M Tris-HCl pH8(シグマ)の添加により、pH8、最終濃度16mMに調整した。混合液は-70℃で保存するか、または直ちに使用した。

【０４９１】

(ii) 本発明のIL-2Ra-Fcの精製

IL-2Ra-Fcを含むpH調整した培地1リットルを、100 mM Tris-HCl pH 8(Sigma)でpH 8にあらかじめ平衡化した総容積1 mlを有するプロテインA Sepharoseカラム(Pharmacia)に重力流下で通した。20カラム量のカラム緩衝液(100 mM Tris-HCl pH 8)で洗浄した後、0.1Mクエン酸(Sigma) pH 4でIL-2Ra-Fcを1 ml画分中に溶出し、適量の2 M Tris-HCl pH 9を各画分に添加することにより直ちにpH 8に中和した。画分を、4～20%勾配Tris-グリシンゲル(Invitrogen)を用いたSDS PAGEの銀染色により解析し、ウシ血清アルブミン標準物質(New England Biolabs)を用いて、280 nmの吸光度を測定することによって分光光度法により定量した。

【０４９２】

4～20%勾配Tris-グリシンゲルを用いたSDS PAGEの銀染色から判断して、精製されたIL-2Ra-Fcは64～98 kDaの見かけのMWを有することが判明した。

【０４９３】

(c) 本発明のIL-2Rb-Fcの産生および精製

(i) 本発明のIL-2Rb-Fcの産生

0日目に、500 cm^2組織培養皿(Corning) 5枚に、3×10^7個細胞の形質転換ヒト胚性腎臓細胞株、例えばHEK 293、HEK 293 c18、HEK 293T、293 CEN4、HEK 293F、HEK 293FT、HEK 293E、AD-293(Stratagene)、または293A(Invitrogen)を播種する。プレート当たり90 mlの適切な培地、例えば10%(v/v)ウシ胎仔血清(FCS、JRH Biosciences)、4 mM L-グルタミン(Amresco)、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン(ペニシリンG 5000 U/ml、硫酸ストレプトマイシン5000μg/ml)(JRH Biosciences)を添加したダルベッコ変法イーグル培地/ハム栄養混合液F12(DMEM/F12)(JRH Biosciences)に、細胞を播種する。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートする。

【０４９４】

1日目に、リン酸カルシウムを用いてトランスフェクションを行う。トランスフェクションの前に、各プレート中の培地を新鮮な培地、例えば10%(v/v) FCS、4 mM L-グルタミン、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したDMEM/F12 120 mlに置換する。ヒトIL-2Rb-Fcの遺伝子を有するプラスミドDNA 1200μgおよび2.5 M $CaCl_2$ 3000μlを、最終量30 mlになるように滅菌1×TE中に添加して、リン酸カルシウム/DNA沈殿物を調製する(溶液A)。10 mlピペットを用いて、溶液Aを2×HEPES緩衝生理食塩水(HBS)(溶液B)

30 mlに1滴ずつ添加する。添加中は、溶液Bに穏やかに気泡を吹き込む。混合液を25℃で20分間インキュベートする。混合液12 mlを各プレートに1滴ずつ添加する。4時間後、トランスフェクション混合液を含む培地を除去し、例えば10%(v/v) FCS、4 mM L-グルタミン、1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン、および最終濃度4.0 mMのHClを添加した、最終pH 7を有するDMEM/F12などの培地100 mlを各プレートに添加する。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートする。

【０４９５】

2日目に、細胞培養上清を廃棄する。プレート内の内容物を適切な培地、例えばプレート当たり50 mlのDMEM/F12培地で2回洗浄し、例えば40 mM N-アセチル-D-マンノサミン(New Zealand Pharmaceuticals)、7 mM L-グルタミン(Amresco)、0.5 g/Lマンノース(Sigma)、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した新鮮な無血清DMEM/F12培地などの適切な培地100 mlを各プレートに添加する。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートする。

【０４９６】

3日目に、細胞培養上清を回収し、例えば40 mM N-アセチル-D-マンノサミン、7 mM L-グルタミン、0.5 g/Lマンノース、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した新鮮な無血清DMEM/F12培地などの適切な培地100 mlを各プレートに添加する。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートする。回収した細胞培養上清に100 mM PMSF(1%(v/v))および500 mM EDTA(1%(v/v))を添加し、混合液を4℃で保存する。

【０４９７】

4日目に、細胞培養上清を回収する。回収した細胞培養上清に100 mM PMSF(1%(v/v))および500 mM EDTA(1%(v/v))を添加し、3日目回収物と混合する。2 M Tris-HCl pH 8(Sigma)を添加して、混合した回収物をpH 8に調整した後、0.45ミクロン低タンパク質結合フィルター(Durapore、Millipore)を用いて微粒子を除去する。混合液は4℃で保存するか、または直ちに使用する。長期保存する場合には、上清を-70℃に置く。

【０４９８】

(ii) 本発明のIL-2Rb-Fcの精製

IL-2Rb-Fcを含むpH調整した培地1リットルを、100 mM Tris-HCl pH 8(Sigma)でpH 8にあらかじめ平衡化した総容積1 mlを有するプロテインA Sepharoseカラム(Pharmacia)に重力流下で通す。20カラム量のカラム緩衝液(100 mM Tris-HCl pH 8)で洗浄した後、0.1 Mクエン酸(Sigma) pH 4でIL-2Rb-Fcを1 ml画分中に溶出し、適量の適切な緩衝液、例えば2 M Tris-HCl pH 9を各画分に添加することにより直ちにpH 8に中和する。画分を、4～20%勾配Tris-グリシンゲル(Invitrogen)を用いたSDS PAGEの銀染色により解析し、ウシ血清アルブミン標準物質(New England Biolabs)を用いて、280 nmの吸光度を測定することによって分光光度法により定量する。SDS PAGEゲルの銀染色から、精製されたIL-2Rb-Fcの見かけのMWが決定される。

【０４９９】

(d) 本発明のIL-2Rg-Fcの産生および精製

(i) 本発明のIL-2Rg-Fcの産生

0日目に、500 cm^2組織培養皿(Corning) 5枚に、3×10^7個細胞の形質転換ヒト胚性腎臓細胞株、例えばHEK 293、HEK 293 c18、HEK 293T、293 CEN4、HEK 293F、HEK 293FT、HEK 293E、AD-293(Stratagene)、または293A(Invitrogen)を播種した。プレート当たり90 mlの、10%(v/v)熱不活性ウシ胎児血清(FCS、JRH Biosciences)、4 mM L-グルタミン(Amresco)、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン(ペニシリンG 5000 U/ml、硫酸ストレプトマイシン5 mg/ml)(JRH Biosciences)を添加したダルベッコ変法イーグル培地/ハム栄養混合液F12(DMEM/F12)(JRH Biosciences)に、細胞を播種した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。

【０５００】

1日目に、リン酸カルシウムを用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションの前に、各プレート中の培地を、10%(v/v) 熱不活性FCS、4 mM L-グルタミン、お

および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した新鮮なDMEM/F12 120 mlに置換した。本発明のヒトIL-2Rg-Fcの遺伝子を有するpIRESbleo3(Invitrogen)プラスミドDNA 1200μgおよび2.5 Mの$CaCl_2$ 3720μlを、最終量30 mlになるように滅菌H_2O中に添加して、リン酸カルシウム/DNA沈殿物を調製した(溶液A)。10 mlピペットを用いて、溶液Aを2×HEPES緩衝食塩水(HBS)(溶液B) 30 mlに1滴ずつ添加した。添加中は、溶液Bに穏やかに気泡を吹き込んだ。混合液を25℃で20分間インキュベートし、ボルテックスした。混合液12 mlを各プレートに1滴ずつ添加した。4時間後、トランスフェクション混合液を含む培地を除去し、10%(v/v)熱不活性FCS、4 mM L-グルタミン、1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン、および最終濃度4.0 mMのHClを添加した、最終pH 7を有するDMEM/F12 100 mlを各プレートに添加した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。

【０５０１】

2日目に、細胞培養上清を廃棄した。プレート内の内容物をプレート当たり50 mlのDMEM/F12培地で2回洗浄し、40 mM N-アセチル-D-マンノサミン(New Zealand Pharmaceuticals)、7 mM L-グルタミン、0.5 g/Lマンノース(Sigma)、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した新鮮な無血清DMEM/F12培地100 mlを各プレートに添加した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。

【０５０２】

3日目に、細胞培養上清を回収し、40 mM N-アセチル-D-マンノサミン、7 mM L-グルタミン、0.5 g/Lマンノース、および1%(v/v)ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した新鮮な無血清DMEM/F12培地100 mlを各プレートに添加した。プレートを37℃および5% CO_2で一晩インキュベートした。回収した細胞培養上清に100 mM PMSF(1%(v/v))および500 mM EDTA(1%(v/v))を添加し、混合液を4℃で保存した。

【０５０３】

4日目に、細胞培養上清を回収した。回収した細胞培養上清に100 mM PMSF(1%(v/v))および500 mM EDTA(1%(v/v))を添加し、3日目回収物と混合した。 混合した回収物に2M Tris-HCl pH8(Sigma) を添加することにより、pH8、最終濃度16mMに調整した後、0.45ミクロン低タンパク質結合フィルター(Durapore、Millipore)を用いて微粒子を除去した。混合液は-70℃で保存するか、または直ちに使用した。

【０５０４】

(ii) 本発明のIL-2Rg-Fcの精製

IL-2Rg-Fcを含むpH調整した培地1リットルを、100 mM Tris-HCl pH 8(Sigma)でpH 8にあらかじめ平衡化した総容積1 mlを有するプロテインA Sepharoseカラム(Pharmacia)に重力流下で通した。20カラム量のカラム緩衝液(100 mM Tris-HCl pH 8)で洗浄した後、0.1Mクエン酸(Sigma) pH 4でIL-2Rg-Fcを1 ml画分中に溶出し、適量の2 M Tris-HCl pH 9を各画分に添加することにより直ちにpH 8に中和した。画分を、4～20%勾配Tris-グリシンゲル(Invitrogen)を用いたSDS PAGEの銀染色により解析し、ウシ血清アルブミン標準物質(New England Biolabs)を用いて、280 nmの吸光度を測定することによって分光光度法により定量した。

【０５０５】

4～20%勾配Tris-グリシンゲルを用いたSDS PAGEの銀染色から判断して、精製されたIL-2Rg-Fcは70～110 kDaの見かけのMWを有することが判明した。

【０５０６】

実施例3

(a) 本発明のIL-2の特徴付け

(i) 二次元ポリアクリルアミド電気泳動

実施例2(a)から回収した試料を透析または脱塩カラム(Pharmacia HR 10/10 Fast Desalting Column)により再精製(18 MOhm)水に緩衝液交換し、SpeedVac濃縮器を用いて乾燥させた。次いで、試料をMSD緩衝液(5 M尿素、2 Mチオ尿素、65 mM DTT、2%(w/v) CHAPS、2%(w/v)スルホベタイン3-10、0.2%(v/v)両性担体、40 mM Tris、0.002%(w/v)ブロモフェノールブルー、水) 240μlに再溶解し、15000 gで8分間遠心分離した。

【０５０７】
プレキャスト11 cmまたはプレキャスト17 cmゲルpH 3～10固定化pH勾配IEFストリップ(BioRad)を用いて、等電点電気泳動(IEF)を行った。密閉したチューブ内で、IEFストリップを試料中で室温にて少なくとも6時間再水和させた。IEFストリップを電気泳動チャンバー内に設置し、パラフィンオイルで覆った。IEFを、11 cmストリップの場合には100 Vで1時間、200 Vで1時間、600 Vで2時間、1000 Vで2時間、2000 Vで2時間、3500 Vで12時間、および100 Vで最長12時間、または17 cmストリップの場合には(同じV増加手順を用いて)85 kV時間行った。

【０５０８】
等電点電気泳動後、二次元目のゲルに供する前に、ストリップを還元およびアルキル化した。ストリップを1×Tris/HCl pH 8.8、6 M尿素、2%(w/v) SDS、2%(v/v)グリセロール、5 mMトリブチルホスフィン(TBP)、2.5%(v/v)アクリルアミド溶液中で少なくとも20分間インキュベートした。

【０５０９】
Criterion事前分注(11×8 cm; 1 mm厚) 10～20% Trisグリシン勾配ゲル(BioRad)により、11 cmストリップを二次元目に分離した。17 cmストリップは、17×17 cm、1.5 mm厚、自己分注10～20% Trisグリシン勾配ゲルで分離した。ゲルには、PrecisionまたはKaleidoscope分子量マーカー(BioRad)も供した。追跡用色素としてのブロモフェノールブルーを含む0.5% アガロースを用いて、ストリップを所定の位置に配置した。

【０５１０】
CriterionまたはProtean II電気泳動システム(BioRad)を用いて、SDS-PAGEを行った(11 cmゲルの場合には200 Vで1時間(緩衝液の前方がゲル端から流出する寸前まで)、および17 cmゲルの場合にはゲル当たり15 mA定電流で21時間)。使用した緩衝液は、pH 8.3の192 mMグリシン、0.1%(w/v) SDS、24.8 mM Tris塩基であった。

【０５１１】
完了した二次元目のゲルを、10% メタノール(MeOH)および7%酢酸(HAc)中で30分～一晩固定した。次いで、Sypro Rubyゲル染色液(BioRad)を用いてゲルを少なくとも3時間染色し、10% MeOHおよび7% HAc中で少なくとも30分間脱染した。または、固定後、Deep Purple蛍光染色液を用いてゲルを染色した。ゲルを300 mM Na_2CO_3、35 mM $NaHCO_3$中で30分間2回インキュベートし、次いで1:200希釈Deep Purple染色液中で暗下で少なくとも1時間インキュベートした。次に、10% MeOH、7% HAc中で15分間2回インキュベートすることにより、ゲルを脱染した。いずれの場合にも、FXレーザーデンシトメーター(BioRad)および適切なフィルターを用いてゲルを画像化した。

【０５１２】
ソフトウェアImageJ(http://rsb.info.nih.gov/ij/)を用いて、ゲル上のタンパク質スポットの相対強度を解析した。ゲルの選択した領域内のスポットについて濃度測定を行い、タンパク質スポットを欠くゲルの適切な領域を用いてバックグラウンド減算を行った。関心対象の各タンパク質スポットについて体積積分を行い、そこからスポットの質量中心を算出した。各タンパク質スポットについて相対強度率を算出し、全スポットの強度を合算した値を100%に標準化することにより、ゲル中の他のスポットに対する各タンパク質スポットの強度を決定した。

【０５１３】
それぞれのスポットの分子量は、ゲルの基線からのスポットのそれぞれの距離を測定し、同様にゲルに供したPrecisionまたはKaleidoscope分子量マーカーによって示される距離と比較することにより決定した。四次多項式を有する指数関数を精密なマーカーに適合させて、タンパク質スポットの位置をそれぞれ内挿した。

【０５１４】
このような方法で、それぞれのスポットの分子量を正確に決定することができた。イソ型の電荷(pKa値)は、ImageJを用いて、ゲルの左側からのスポットのそれぞれの距離を測定することにより決定した。ストリップのpI値とゲルの物理的距離との関係は直線的であ

るため、イソ型スポットの種々のpKa値に相当するpI値は、容易に決定された。

【０５１５】

各タンパク質スポットは、IL-2の独特のイソ型と一致する。表9に、これらイソ型の見かけの分子量、pI値、および相対強度を示す。列挙した値は、スポットを含むゲルの選択された領域内の強度重心に相当し、よってタンパク質のpIおよび分子量を最も反映している。

【０５１６】

（表９）IL-2のイソ型の分子量およびpI値

スポット番号	見かけの等電点(pI)	見かけの分子量(kDa)	相対強度(%)(標準化値)
2	6.397	29.495	0.835
3	6.601	29.450	1.797
4	6.706	29.478	1.233
5	6.795	29.415	5.554
6	6.872	29.385	4.533
7	6.935	29.411	2.483
8	6.989	29.417	1.375
9	7.044	29.478	0.993
10	7.107	29.489	0.856
11	7.175	29.497	0.456
12	7.330	29.521	0.823
13	5.978	13.122	1.110
14	6.067	13.239	0.699
15	6.185	13.202	1.757
16	6.268	13.167	1.273
17	6.310	13.154	1.614
18	6.351	13.101	2.038
19	6.392	13.102	3.578
20	6.436	13.063	3.925
21	6.486	13.042	4.379
22	6.542	13.096	2.343
23	6.597	13.033	4.186
24	6.641	13.093	3.712
25	6.692	13.070	5.662
26	6.752	13.051	6.520
27	6.819	13.037	7.640
28	6.876	13.015	4.275
29	6.930	12.993	6.003
30	6.991	13.039	4.968
31	7.050	13.037	4.171
32	7.108	13.010	2.044
33	7.150	13.065	0.907
34	7.194	13.083	1.795
35	7.269	13.035	2.337
36	7.381	13.006	2.125

【０５１７】

(ii) 一次元ポリアクリルアミド電気泳動

実施例2(a)から回収した試料を乾燥させた後、1D試料緩衝液(10%グリセロール、0.1% SDS、10 mM DTT、63 mM tris-HCl) 60μlに再可溶化し、100℃で5分間加熱した。PNGaseFで処理するには、試料の30μL分割量を採取し、NP40を最終濃度0.5%になるように添加し

た。PNGaseF 5μLを添加し、試料を37℃で3時間インキュベートした。試料をグリコシダーゼ混合液で処理するには、一定分量を採取した後、NP40を最終濃度0.5%になるように添加した。PNGase F 1μL、ならびにシアリダーゼA(ノイラミダーゼ)、O-グリカナーゼ、β(1-4)-ガラクトシダーゼ、およびβ-N-アセチルグルコサミニダーゼそれぞれ1μLを添加した。処理および未処理試料を37℃で3時間インキュベートした。処理および未処理試料を、プレキャストTrisゲル、例えばTris 4～20%勾配ゲル(BioRad)またはTris HCl勾配ゲル(Invitrogen)で泳動した。ゲルには、Precision分子量マーカー(BioRadカタログ番号161-0363)も供した。1D SDS-PAGEには、Criterion 4～20%または18%ゲルを使用した(BioRadカタログ番号：345-0033または345-0024)。

【０５１８】

SDS-PAGEは、Criterion電気泳動システム(BioRad)を用いて200 Vで、緩衝液の前方がゲル端から流出する寸前まで泳動した。使用した緩衝液は、pH 8.3の192 mMグリシン、0.1%(w/v) SDS、24.8 mM Tris塩基であった。

【０５１９】

完了したゲルを、10%メタノール(MeOH)および7.5%酢酸(HAc)中で一晩固定した後、200 mM Na_2CO_3で塩基性化した(15分の洗浄を2回)。次いで、製造業者の指示に従ってDeep Purple(Fluorotechnics製品番号RPN6306V)を用いて、ゲルを少なくとも1時間染色し、10% MeOHおよび7.5% HAcで少なくとも30分間脱染した。Typhoon Trio Variable Mode Imager(Amersham Biosciences)および適切なフィルターを用いて、ゲルを画像化した。

【０５２０】

IL-2の見かけの分子量は13～22 kDaであることが判明した。

【０５２１】

(PNGase処理により)N-結合型オリゴ糖を遊離させた後の(SDS-PAGEによって認められる)IL-2の見かけの分子量は、13～22 kDaであった。(PNGase処理により)N-結合型オリゴ糖および(グリコシダーゼ処理により)O-結合型オリゴ糖を遊離させた後の(SDS-PAGEによって認められる)IL-2の見かけの分子量は、13～20 kDaであった。

【０５２２】

(iii) N末端配列決定

タンパク質バンドを上記のように準備されたゲル（二次元ゲルまたは一次元ゲルのいずれか）より切り出し、0.5 mlチューブに入れ、抽出緩衝液100 mlを添加する(100 mM酢酸ナトリウム、0.1% SDS、50 mM DTT pH 5.5)。ゲル切片を、浸透しながら37℃で16時間インキュベートする。製造業者の指示に従って上清をProSorb膜(ABI)に供し、製造業者の指示に従って自動化494 Protein Sequencer(Applied Biosystems)を用いて配列決定をする。得られた配列を用いて、タンパク質の同一性を確認する。

【０５２３】

(iv) ペプチド質量フィンガープリンティング

上記のように調製したゲルより(二次元ゲルまたは一次元ゲルのいずれかより)タンパク質バンドを切り出し、洗浄緩衝液(50 mM NH_4HCO_3中の50%アセトニトリル) 25μlで洗浄した。ゲル断片を室温に少なくとも1時間置き、真空遠心により30分間乾燥させた。ゲル断片およびトリプシン溶液(トリプシン20μg、NH_4HCO_3 1200μl) 12μlを各試料ウェルに入れ、4℃で1時間インキュベートした。残ったトリプシン溶液を除去し、50 mM NH_4HCO_3 20μlを添加した。混合物を、穏やかに浸透しながら37℃で一晩インキュベートした。C18 Zip-Tip(Millipore、マサチューセッツ州、ベッドフォード)またはPoros R2(Perseptive Biosystems、マサチューセッツ州、フラミンガム)クロマトグラフィー樹脂を含む作製済みマイクロカラムを用いて、ペプチド試料を濃縮および脱塩した。結合したペプチドを、マトリクス溶液(70%アセトニトリル/1%ギ酸中のα-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(Sigma)、8 mg/ml) 0.8μlで標的プレート上に直接溶出した。Perseptive Biosystems Voyager DE-STRを用いてマトリクス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)により、トリプシンペプチドのペプチド質量フィンガープリントを作成した。20 kVの加速電圧を用いて、リフレクトロンモードでスペクトルを取得した。トリプシン自己分解ピー

ク、2211.11 Daおよび842.51 Daを内部標準として用いて、質量較正を行った。ペプチド質量フィンガープリンティング(PMF)から作成されたデータを用いて、タンパク質の同一性を確認した。

【０５２４】

プログラムPeptIdent(www.expasy.ch/tools/peptident.html)により、SWISS-PROTおよびTrEMBLのようなデータベースで(主としてヒト(Homo sapien)(ヒト(Human))および哺乳動物エントリーの)検索を行った。同定パラメータには、0.1 Daのペプチド質量許容度、ペプチド当たり最大1カ所のトリプシン切断の見逃し、ならびにメチオニンスルホキシドおよびシステイン-アクリルアミド修飾を含めた。同定は、他のデータベースエントリーと比較した、一致するペプチド質量の数およびそのようなペプチドがカバーするアミノ酸配列の全割合に基づいた。一般的には、少なくとも30%の全配列カバー率を有するペプチド一致が同定における信頼に必要とされるが、非常に低質量および高質量のタンパク質、ならびにタンパク質断片化によるそのようなタンパク質は、必ずしもこの基準を満たさなくてもよく、従ってさらなる同定を必要とする。

【０５２５】

MALDI-TOF PMFから不確定なタンパク質同定が得られるかまたはタンパク質同定が得られなかった場合には、残りのペプチド混合物または複製ゲルから切り出した同一のスポットをトリプシン消化に供し、エレクトロスプレーイオン化タンデムMS(ESI-MS/MS)により解析した。ESI-MS/MSでは、ペプチドをPoros R2マイクロカラムから、1～2μlの70%アセトニトリル、1%ギ酸でホウケイ酸ナノエレクトロスプレー針(Micromass、英国、マンチェスター)中に直接溶出した。Q-Tofハイブリッド四重極/直行加速TOF質量分析計(Micromass)を用いて、タンデムMSを行った。試料を含むナノエレクトロスプレー針を供給源に取り付け、900～1200 Vのキャピラリー電圧により安定した流れを得た。プリカーサーイオンスキャンを行い、混合物内のペプチドの質量電荷比(m/z)値を検出した。個々のプリカーサーイオンのm/zを断片化に関して選択し、18～30 eVの衝突エネルギーを用いてアルゴンガスと衝突させた。断片イオン(プリカーサーペプチドからのアミノ酸の喪失に相当する)を記録し、MassLynx Version 3.4(Micromass)を用いて処理した。プログラムMassSeq(Micromass)を用いてy-イオンまたはb-イオン「ラダー」系における質量差よりアミノ酸配列を推定し、手動解釈により確認した。次いで、ペプチド配列を用いて、プログラムBLASTP「短いほぼ完全な一致(short nearly exact matches)」を使用してNCBIおよびTrEMBLデータベースを検索した。所与の同定において信頼を提供するには、最低限二つの一致ペプチドを必要とした。ゲルスポットの同一性はIL-2であると確認された。

【０５２６】

(b) 本発明のIL-2Ra-Fcの特徴付け

(i) 二次元ポリアクリルアミド電気泳動

実施例2(b)から回収した試料を乾燥させた後、2D試料緩衝液(7 M尿素、2 Mチオ尿素、65 mM DTT、4%(w/v) CHAPS、0.2%(v/v)両性担体、40 mM Tris、0.002%(w/v)ブロモフェノールブルー) 200μlに再溶解した。試料を5 mMトリブチルホスフィンおよび15 mMアクリルアミドで1.5時間還元およびアルキル化した後、20000×gで10分間遠心分離した。

【０５２７】

プレキャスト11 cm pH 3～10固定化pH勾配IPGストリップ(BioRad、カタログ番号:163-2014)を用いて、等電点電気泳動(IEF)を行った。密閉したチューブ内で、IPGストリップを試料200μLで室温にて少なくとも6時間再水和させた。IPGストリップを電気泳動チャンバー内に設置し、パラフィンオイルで覆った。IEFを、100 Vで3時間、300 Vで3時間、1000 Vで2時間、25000 Vで1時間、5000 Vで12時間行った。

【０５２８】

ストリップを、1×Tris/HCl pH 8.8、6 M尿素、2%(w/v) SDS、20%(v/v)グリセロール、5 mMトリブチルホスフィン(TBP)、2.5%(v/v)アクリルアミド溶液中で20分間平衡化した。プレキャスト(11×8 cm×1 mm厚) 4～20% Tris勾配ゲル、例えばTrisグリシン勾配ゲル(BioRad)またはTris HCl勾配ゲル(Invitrogen)を用いて、タンパク質を二次元目に分離した

。ゲルには、Precision分子量マーカー(BioRad カタログ番号:161-0363)も供した。追跡用色素としてのブロモフェノールブルーを含む0.5%アガロースを用いて、ストリップを所定の位置に配置した。

【０５２９】

Criterion電気泳動システム(BioRad)を用いて、緩衝液の前方がゲル端から流出する寸前まで、200 VでSDS-PAGEを行った。使用した緩衝液は、pH 8.3の192 mMグリシン、0.1%(w/v) SDS、24.8 mM Tris塩基であった。

【０５３０】

完了した二次元目のゲルを、実施例3(a)(i)に上記した通りに処理し解析した。各タンパク質スポットは、IL-2Ra-Fcの独特のイソ型と一致する。表10に、同定されたイソ型のpI値を示す。列挙した値は、スポットを含むゲルの選択された領域内の強度重心に相当し、よってタンパク質のpIを最も反映している。

【０５３１】

（表１０）IL-2Ra-Fcのイソ型の分子量およびpI値

スポット番号	見かけの等電点(pI)	見かけの分子量(kDa)	相対強度(%)(標準化値)
2	5.65	93.00	0.41
3	5.74	92.36	0.31
4	4.74	86.82	0.16
5	4.80	86.20	0.34
6	4.85	85.95	0.47
7	4.91	85.34	0.85
8	4.96	84.55	0.89
9	5.01	84.08	0.92
10	5.06	84.17	1.50
11	5.13	83.13	1.42
12	5.18	82.05	1.73
13	5.24	81.37	1.91
14	5.30	81.15	1.83
15	5.35	80.22	2.07
16	5.41	79.70	2.24
17	5.47	78.70	3.85
18	5.55	77.52	5.13
19	5.63	76.65	4.70
20	5.69	76.20	4.34
21	5.76	75.66	3.32
22	5.82	75.16	2.31
23	5.86	75.15	1.97
24	5.91	74.50	4.07
25	5.97	74.10	3.92
26	6.04	73.68	3.69
27	6.12	73.15	3.85
28	6.20	72.80	3.41
29	6.28	72.24	3.21
30	6.37	71.64	2.58
31	6.46	70.82	2.29
32	6.57	69.75	1.83
33	6.67	69.73	1.48
34	6.76	68.23	1.27
35	6.83	67.29	0.72
36	6.90	66.91	0.47

37	6.97	65.23	0.45
38	7.03	64.71	0.33
39	5.98	64.31	0.40
40	6.04	63.68	0.28
41	6.12	63.28	0.32
42	6.20	63.11	0.28
43	6.28	63.06	0.30
44	6.37	63.04	0.25
45	6.46	63.02	0.29
46	6.56	61.83	0.16
47	6.66	62.25	0.33
48	6.75	62.26	0.29
49	6.83	62.01	0.26
50	5.42	59.67	0.21
51	5.49	59.49	0.26
52	5.56	59.00	0.40
53	5.63	58.81	0.52
54	5.70	58.48	0.59
55	5.77	58.33	0.56
56	5.84	58.06	0.52
57	5.91	57.90	0.51
58	5.98	57.68	0.52
59	6.06	57.28	0.42
60	6.15	57.25	0.38
61	6.25	56.97	0.23
62	6.36	56.90	0.12
63	6.45	56.90	0.08
64	4.87	50.04	0.09
65	4.93	49.86	0.22
66	5.00	49.57	0.20
67	5.08	49.57	0.19
68	5.18	48.16	0.74
69	5.26	47.98	0.83
70	5.34	47.59	0.94
71	5.43	47.36	1.23
72	5.54	47.18	1.24
73	5.63	46.79	1.06
74	5.72	46.62	1.17
75	5.82	46.54	0.34
76	5.97	45.47	0.22

【０５３２】

(ii) 一次元ポリアクリルアミド電気泳動

実施例2(b)から回収した試料を、実施例3(a)(ii)に上記した通りに処理した。

【０５３３】

IL-2Ra-Fcの見かけの分子量は51～110 kDaであることが判明した。

【０５３４】

(PNGase処理により)N-結合型オリゴ糖を遊離させた後の(SDS-PAGEによって認められる)IL-2Ra-Fcの見かけの分子量は、51～85 kDaであった。(PNGase処理により)N-結合型オリゴ糖および(グリコシダーゼ処理により)O-結合型オリゴ糖を遊離させた後の(SDS-PAGEによって認められる)IL-2Ra-Fcの見かけの分子量は、51～80 kDaであった。

【０５３５】

(iii) N末端配列決定

タンパク質バンドを、実施例3(a)(iii)に上記した通りに配列決定する。得られた配列を用いて、IL-2Ra-Fcの同一性を確認する。

【０５３６】

(iv) ペプチド質量フィンガープリンティング

上記のように調製した一次元ゲルからタンパク質バンドを切り出し、洗浄緩衝液(50 mM NH_4HCO_3中の50%アセトニトリル) 25μlで洗浄した。ゲル断片を室温に少なくとも1時間置き、真空遠心により30分間乾燥させた。ゲル断片およびトリプシン溶液(NH_4HCO_3中の12 ng/μl配列決定等級ブタトリプシン) 10μlを各試料ウェルに入れ、4℃で1時間インキュベートした。残ったトリプシン溶液を除去し、50 mM NH_4HCO_3 10μlを添加した。混合物を、穏やかに振盪しながら37℃で一晩インキュベートした。C18 Zip-Tip(Millipore、マサチューセッツ州、ベッドフォード)を用いて、ペプチド試料を濃縮および脱塩した。結合したペプチドを、マトリクス溶液(70%アセトニトリル/1%ギ酸中のα-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(Sigma)、8 mg/ml) 0.8μlで標的プレート上に直接溶出した。Perseptive Biosystems Voyager DE-STRまたはApplied Biosystems 4700 Proteomics Analyserを用いてマトリクス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)により、トリプシンペプチドのペプチド質量フィンガープリントを作成した。実施例3(a)(iv)に上記した通りに、スペクトルを取得しデータを解析した。

【０５３７】

バンドの同一性はIL-2Ra-Fcであると確認された。

【０５３８】

さらに、二つのトリプシンペプチドの質量において1 Daの移行が認められたことから、付随しているN-結合型オリゴ糖の除去に際してPNGase FがN残基からD残基への修飾を誘導する公知の能力と一致して、ヒトIL-2Ra-Fcの理論的アミノ酸配列中に見出される一つのNX(S/T/C)モチーフのアスパラギン残基(N)がアスパラギン酸(D)に修飾されていることが示された。従って、本発明のIL-2Ra-Fcの確認されたN-グリコシル化部位は、N-328(シグナル配列の開始点から番号付けした場合)である。ヒトIL-2Ra-Fcアミノ酸配列上にさらに確認される部位がないことにより、そのような部位が存在する可能性が排除されるわけではないことに留意されたい。

【０５３９】

(c) 本発明のIL-2Rb-Fcの特徴付け

(i) 二次元ポリアクリルアミド電気泳動

実施例2(c)から回収した試料を、実施例3(b)(i)に上記した通りに処理し解析する。

【０５４０】

(ii) 一次元ポリアクリルアミド電気泳動

実施例2(c)から回収した試料を、実施例3(b)(ii)に上記した通りに処理し解析する。本発明の完全にグリコシル化されたIL-2Rb-Fc、N-結合型オリゴ糖の遊離後の本発明のIL-2Rb-Fc、ならびにN-結合型オリゴ糖およびO-結合型オリゴ糖の遊離後の本発明のIL-2Rb-Fcの見かけの分子量を決定する。

【０５４１】

(iii) N末端配列決定

本発明のIL-2Rb-FcのN末端配列決定を、実施例3(a)(iii)に上記した通りに行う。

【０５４２】

(iv) ペプチド質量フィンガープリンティング

本発明のIL-2Rb-Fcのペプチド質量フィンガープリンティングを、実施例3(a)(iv)に上記した通りに行う。ゲルスポットの同一性はIL-2Rb-Fcであると確認される。

【０５４３】

(d) 本発明のIL-2Rg-Fcの特徴付け

(i) 二次元ポリアクリルアミド電気泳動

実施例2(d)から回収した試料を、実施例3(b)(i)に上記した通りに処理し解析した。各

タンパク質スポットは、IL-2Rg-Fcの独特のイソ型と一致する。表11に、同定されたイソ型のpI値を示す。列挙した値は、スポットを含むゲルの選択された領域内の強度重心に相当し、よってタンパク質のpIを最も反映している。

【０５４４】

（表１１）IL-2Rg-Fcのイソ型の分子量およびpI値

スポット番号	見かけの等電点(pI)	見かけの分子量(kDa)	相対強度(%)(標準化値)
2	4.86	100.15	2.72
3	5.00	97.79	6.95
4	5.12	96.44	7.41
5	5.23	95.43	6.14
6	5.31	94.69	5.03
7	5.38	94.20	5.82
8	5.46	93.29	7.88
9	5.54	92.38	6.79
10	5.62	91.71	9.04
11	5.71	91.46	6.36
12	5.80	91.24	6.29
13	5.89	91.15	5.70
14	5.97	90.84	4.72
15	6.07	90.75	3.73
16	6.15	90.93	2.25
17	6.24	90.64	1.74
18	6.32	90.03	1.72
19	6.46	88.63	2.42
20	6.59	85.28	1.80
21	6.71	83.38	1.13
22	6.81	81.49	1.17
23	6.92	79.94	1.12
24	7.04	78.92	1.16
25	7.17	78.36	0.92

【０５４５】

(ii) 一次元ポリアクリルアミド電気泳動

実施例2(d)から回収した試料を、実施例3(b)(ii)に上記した通りに処理し解析した。IL-2Rg-Fcの見かけの分子量は60～125 kDaであることが判明した。

【０５４６】

(PNGase処理により)N-結合型オリゴ糖を遊離させた後の(SDS-PAGEによって認められる)IL-2Rg-Fcの見かけの分子量は、55～100 kDaであった。(PNGase処理により)N-結合型オリゴ糖および(グリコシダーゼ処理により)O-結合型オリゴ糖を遊離させた後の(SDS-PAGEによって認められる)IL-2Rg-Fcの見かけの分子量は、55～100 kDaであった。

【０５４７】

(iii) タンパク質のN末端配列決定

タンパク質バンドを、実施例3(a)(iii)に上記した通りに配列決定する。得られた配列を用いて、IL-2Rg-Fcの同一性を確認する。

【０５４８】

(iv) ペプチド質量フィンガープリンティング

本発明のIL-2Rg-Fcのペプチド質量フィンガープリンティングを、実施例3(a)(iv)に上記した通りに実施した。バンドの同一性はIL-2Rg-Fcであると確認された。

【０５４９】

さらに、トリプシンペプチドの質量において1 Daの移行が認められたことから、付随しているN-結合型オリゴ糖の除去に際してPNGase FがN残基からD残基への修飾を誘導する公知の能力と一致して、ヒトIL-2Rg-Fcの理論的アミノ酸配列中に見出される二つのNX(S/T/C)モチーフのアスパラギン残基(N)がアスパラギン酸(D)に修飾されていることが示された。従って、本発明のIL-2Rg-Fcの確認されたN-グリコシル化部位は、N-159およびN-249(シグナル配列の開始点から番号付けした場合)である。ヒトIL-2Rg-Fcアミノ酸配列上にさらに確認される部位がないことにより、そのような部位が存在する可能性が排除されるわけではないことに留意されたい。

【０５５０】

実施例4

(a) 本発明のIL-2のアミノ酸、単糖、オリゴ糖、リン酸、硫酸、およびイソ型組成の解析

(i) アミノ酸、単糖、オリゴ糖、リン酸、硫酸、およびイソ型解析のための試料の調製

単糖およびオリゴ糖グリコシル化ならびにリン酸および硫酸翻訳後修飾の特徴付けのため、加水分解または酵素手段によって、ポリペプチド骨格から最初に糖類を除去した。解析を開始する前に、加水分解および酵素反応の阻害を回避するため、試料緩衝液成分もまた除去し、水に置換した。PBS中の精製IL-2の溶液を、公称5 KDaの分子量カットオフ(NMWC)を有する再生セルロース透析膜(Spectrapore)を用いて、脱イオン限外濾過水(18 MOhm) 4リットルに対して1日に2回交換しながら4日間にわたって徹底的に透析した。透析後、Savant Speed Vac(米国、ニューヨーク)を用いて溶液を乾燥させた。次いで、乾燥した試料を脱イオン限外濾過水(18 MOhm) 2 mlに再懸濁し、種々の解析のために一定分量に分割した。

【０５５１】

(ii) 気相加水分解法によるアミノ酸組成の解析

試料中のアミノ酸を、6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート(AQC)によるプレカラム誘導体化を用いて解析した。逆相(C18) HPLCにより、安定した蛍光アミノ酸誘導体を分離し、定量した。使用した手順は、Waters AccQTagアミノ酸解析法に基づいた。

【０５５２】

IL-2調製物試料100 μlを3部採取し、Speed Vacで乾燥させた。次いで、乾燥した試料を110℃で24時間加水分解した。加水分解後、試料を再度乾燥させてから、以下の通りに誘導体化した。乾燥した試料を内部アミノ酸標準物質(α-アミノ酪酸、AABA) 10μlに再懸濁し、ホウ酸緩衝液35μlを、次にAQC誘導体化試薬15μlを添加した。反応混合液を加熱ブロック中で、50℃で12分間加熱した。誘導体化アミノ酸試料を、順にWaters Alliance 2695 Separation Module、Waters 474 Fluorescence Detector、およびWaters 2487 Dual λ Absorbance DetectorからなるHPLCシステムのオートサンプラーに移した。制御および解析ソフトウェアは、Waters Empower Pro Module(Waters Corporation、米国、マサチューセッツ州、ミルフォード)であった。当技術分野で公知のクロマトグラフィーパラメータ(すなわち、適切な溶離液および勾配流)を用いて、試料をWaters AccQTagカラム(15 cm×3.9 mm ID)に通した。

【０５５３】

(iii) 中性およびアミノ単糖組成の解析

IL-2調製物試料100μlを2部採取し、単糖類を遊離させるために二つの異なる方法で処理した。各処理は三つ組で行った。

1. 100℃に加熱した2 Mトリフルオロ酢酸(TFA)で4時間加水分解し、中性糖類(ガラクトース、グルコース、フコース、およびマンノース)を遊離させる。

2. 100℃に加熱した4 M HClで4時間加水分解し、アミノ糖類(N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン)を遊離させる。

【０５５４】

Speed Vacシステムを用いて加水分解産物を全て凍結乾燥させ、内部標準0.8 nmolを含む水200μlに再溶解した。中性およびアミノ糖類の内部標準は2-デオキシ-グルコースで

あった。次いで、試料を10,000 gで30分間遠心分離して、タンパク質残屑を除去した。上清を新しいチューブに移し、GP50ポンプおよびED50パルスアンペロメトリック検出器を備えたDionex LC 50システム(Dionex Ltd)を用いて、高pH陰イオン交換クロマトグラフィーにより解析した。中性およびアミノ糖類の解析は、Dionex CarboPac PA-20カラムを用いて行った。溶出は、10 mMの均一水酸化物濃度で20分間行った。これは、Dionex EG50溶離液生成システムにより達成した。

【０５５５】

(iv) 酸性単糖組成の解析

IL-2調製物試料100μlを採取し、シアル酸単糖類を遊離させるために以下の方法で処理した。処理は三つ組で行った。

【０５５６】

試料を80℃の0.1 M TFAで40分間加水分解し、N-アセチルおよびN-グリコシルノイラミン酸を遊離させた。Speed Vacを用いて加水分解産物を凍結乾燥させ、内部標準0.8 nmolを含む水200μlに再溶解した。シアル酸解析の内部標準はラクトビオン酸であった。次いで、試料を10,000 gで30分間遠心分離して、タンパク質残屑を除去した。上清を新しいチューブに移し、GP50ポンプおよびED50パルスアンペロメトリック検出器を備えたDionex LC 50システムを用いて、高pH陰イオン交換クロマトグラフィーにより解析した。シアル酸の解析は、当技術分野で公知のクロマトグラフィーパラメータ(すなわち、適切な溶離液および勾配流)を用いてDionex CarboPac PA1により行った。

【０５５７】

(v) オリゴ糖組成の解析

オリゴ糖組成を解析するため、IL-2調整物試料300μlを2部、三つ組で採取し、以下の方法の一つで処理した。

【０５５８】

N-結合型オリゴ糖類の遊離は、酵素ペプチド-N4-(N-アセチル-β-D-グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼ(PNGase)により達成する。1/5量の変性溶液(2% SDS(Sigma)/1 M β-メルカプトエタノール(Sigma))を試料に添加する。試料を100℃で5分間加熱する。1/10量の15% Triton X-100(Sigma)を試料に添加する。試料を穏やかに混合し、室温まで冷却する。PNGase(Sigma) 25単位を添加し、37℃でインキュベートする。

【０５５９】

O-結合型オリゴ糖類の遊離は、β脱離の工程により達成する。1/2量の4 M水素化ホウ素(要時調製)(Sigma)溶液を試料に添加する。1/2量の0.4 M NaOH(BDH、HPLC等級)を試料に添加する。試料を50℃で16時間インキュベートする。試料を氷上で冷却し、1/2量の0.4 M酢酸(Sigma)を試料に添加する。

【０５６０】

N-結合型試料およびO-結合型試料のいずれも、Carbo Pac黒鉛化炭素SPEカラムを用いてさらに処理して緩衝液成分を除去する。カラムの平衡化および溶出の条件は以下の通りである。カラムは1カラム量の80% v/vアセトニトリル(Sigma)、次いで2カラム量のH_2Oであらかじめ平衡化する。試料を重力流下で添加し、2カラム量のH_2Oでカラムを洗浄する。中性オリゴ糖を溶出するには、50% v/vアセトニトリル 2 mlをカラムに供す。酸性オリゴ糖を溶出するには、50% v/vアセトニトリル/0.1%ギ酸 2 mlをカラムに供す。残存したオリゴ糖は、80% v/vアセトニトリル/0.1%ギ酸 2 mlを添加することにより溶出される。

【０５６１】

中性または酸性N-結合型オリゴ糖類および中性または酸性O-結合型オリゴ糖類を含むSPEカラムからの個々の分画を、Speed Vacを用いて完全に乾燥させる。試料を水200μlに再溶解し、GP50ポンプおよびED50パルスアンペロメトリック検出器を備えたDionex LC 20システムを用いて、高pH陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより解析する。中性および酸性オリゴ糖類の解析は、CarboPac PA100カラムおよび当技術分野において公知のパラメータ(すなわち、適切な溶離液および勾配流)を用いて行う。

【０５６２】

(vi) 硫酸およびリン酸組成の解析

硫酸/リン酸解析は、本質的にHarrisonおよびPacker(Harrison and Packer Methods Mol Biol 125:211-216, 2000)によって記載されている方法により実施する。

【０５６３】

硫酸およびリン酸解析用にIL-2調製物試料100μlを採取し、4 M HCl中で100℃にて4時間加水分解する。Speed Vacシステムで試料を乾燥させることにより、HClを除去する。次いで、試料をH_2O 200μlに再溶解する。試料24μlを、GP50ポンプおよびED50伝導度検出器を備えたDionex LC 50システムに注入する。分離は、当技術分野で公知のクロマトグラフィーパラメータ(すなわち、適切な溶離液および勾配流)を用いて、Dionex IonPac AS11陰イオン交換カラムにより実施する。

【０５６４】

Dionex Self Regenerating Anion Micromembrane Suppressor(SRMS-1)を用いて水酸化イオンを中和し、伝導度検出器を用いてSO_4イオンおよびPO_4イオンを検出する。

【０５６５】

(vii) IL-2イソ型のさらなる分離

IL-2イソ型のさらなる分離は、薄膜陰イオン交換カラムを用いて行う。適切量、例えば24μlの試料を、UV-Vis検出器を備えたDionex SUMMITシステム(Dionex Ltd)を用いて、ProPac SAX-10カラム(Dionex Ltd)により分離する。分離は、当技術分野で公知の適切な溶離液および勾配流を用いて行う。IL-2イソ型は、異なるピークのパターンで溶出されることが認められる。

【０５６６】

(viii) 結果

アミノ酸組成

記載したようにIL-2を加水分解し、誘導体化し、逆相高速液体クロマトグラフィーにより解析して、以下のアミノ酸組成が得られた(表12)。結果は、配列中の各アミノ酸の重量による量および出現率(標準偏差(SD)を含む)として表す。グリシンは、アミノ酸組成を人為的に変化させ得るアミノ酸解析における公知の混入物である。このことを考慮すると、結果は理論値に匹敵する。

【０５６７】

（表１２）

アミノ酸組成					
AA	実行1	実行2	実行3	平均	SD
D	9.16	12.22	11.24	10.87	1.56
S	16.68	6.68	8.94	10.77	5.25
E	16.14	12.67	12.35	13.72	2.10
G	17.75	7.31	6.20	10.42	6.37
H	1.23	1.75	3.17	2.05	1.00
R	3.07	4.16	3.95	3.73	0.58
T	4.50	7.08	6.78	6.12	1.41
A	7.02	6.11	2.78	5.30	2.23
P	3.05	4.29	8.22	5.19	2.70
Y	2.14	2.13	3.23	2.50	0.63
V	3.32	4.02	8.65	5.33	2.90
M	0.24	0.31	0.65	0.40	0.22
K	4.60	9.79	9.99	8.13	3.06
I	3.09	4.86	2.47	3.47	1.24
L	6.03	13.09	8.49	9.20	3.58
F	1.98	3.53	2.89	2.80	0.78
合計	100.00	100	100	100.00	

【０５６８】

単糖類および硫酸

記載したようにIL-2のアミノ酸骨格から個々の単糖類および硫酸を加水分解し、高pH陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC)により解析して、以下の組成解析を得た。試料による結果をGalNAcに対して標準化した(表13～15)。表16は、三つの試料による結果の要約である。

【０５６９】

（表１３）

単糖類組成 実行1	
単糖類	GalNAc標準化
フコース	0.00
GalNAc	1.00
GlcNAc	3.67
ガラクトース	2.93
グルコース	202.20
マンノース	0.00
NeuNAc	4.67
NeuGly	0.00
SO_4	46.72

【０５７０】
（表１４）

単糖類組成 実行2	
単糖類	GalNAc標準化
フコース	0.00
GalNAc	1.00
GlcNAc	4.04
ガラクトース	1.34
グルコース	79.05
マンノース	0.00
NeuNAc	1.11
NeuGly	0.00
SO_4	66.89

【０５７１】
（表１５）

単糖類組成 実行3	
単糖類	GalNAc標準化
フコース	0.00
GalNAc	1.00
GlcNAc	2.93
ガラクトース	1.28
グルコース	60.27
マンノース	0.00
NeuNAc	0.54
NeuGly	0.00
SO_4	59.99

【０５７２】
（表１６）

単糖類組成		
単糖類	GalNAc標準化	
	最小	最大
フコース	0.00	0.00
GalNAc	1.00	1.00
GlcNAc	2.93	4.04
ガラクトース	1.28	2.93
グルコース	60.27	202.20
マンノース	0.00	0.00
NeuNAc	0.54	4.67
NeuGly	0.00	0.00
SO_4	46.72	66.89

注記：グルコースは一般的な混入物であり、通常はN-結合型またはO-結合型オリゴ糖中に存在しない。

【０５７３】
IL-2に関して、アミノ酸組成データを単糖類および硫酸データと組み合わせて、様々な種の含有量を得た(表17)。

【０５７４】
（表１７）

算出された含有量	
糖質（重量%）	
単糖類含有量の割合としての硫酸化	87.3

【０５７５】
(b) IL-2Ra-Fcのアミノ酸、単糖類、オリゴ糖、リン酸、硫酸、およびイソ型組成の解析
(i) アミノ酸、単糖類、オリゴ糖、リン酸、硫酸、およびイソ型解析のための試料の調製
PBS中の精製IL-2Ra-Fcの溶液を、実施例4(a)(i)に上記した通りに処理する。
【０５７６】
(ii) 気相加水分解法によるアミノ酸組成の解析
IL-2Ra-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(ii)に上記した通りに処理する。
【０５７７】
(iii) 中性およびアミノ単糖類組成の解析
IL-2Ra-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(iii)に上記した通りに処理する。
【０５７８】
(iv) 酸性単糖類組成の解析
IL-2Ra-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(iv)に上記した通りに処理する。
【０５７９】
(v) オリゴ糖組成の解析
IL-2Ra-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(v)に上記した通りに処理する。
【０５８０】
(vi) 硫酸およびリン酸組成の解析
IL-2Ra-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(vi)に上記した通りに処理する。
【０５８１】
(vii) タンパク質イソ型のさらなる分離
IL-2Ra-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(vii)に上記した通りに処理する。IL-2Ra-Fcイソ型は、異なるピークのパターンで溶出されることが認められる。
【０５８２】
(c) IL-2Rb-Fcのアミノ酸、単糖類、オリゴ糖、リン酸、硫酸、およびイソ型組成の解析
(i) アミノ酸、単糖類、オリゴ糖、リン酸、硫酸、およびイソ型解析のための試料の調製
PBS中の精製IL-2Rb-Fcの溶液を、実施例4(a)(i)に上記した通りに処理する。
【０５８３】
(ii) 気相加水分解法によるアミノ酸組成の解析
IL-2Rb-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(ii)に上記した通りに処理する。
【０５８４】
(iii) 中性およびアミノ単糖類組成の解析
IL-2Rb-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(iii)に上記した通りに処理する。
【０５８５】
(iv) 酸性単糖類組成の解析
IL-2Rb-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(iv)に上記した通りに処理する。
【０５８６】
(v) オリゴ糖組成の解析
IL-2Rb-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(v)に上記した通りに処理する。
【０５８７】
(vi) 硫酸およびリン酸組成の解析
IL-2Rb-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(vi)に上記した通りに処理する。
【０５８８】
(vii) タンパク質イソ型のさらなる分離
IL-2Rb-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(vii)に上記した通りに処理する。IL-2Rb-Fcイソ型は、異なるピークのパターンで溶出されることが認められる。
【０５８９】
(d) IL-2Rg-Fcのアミノ酸、単糖類、オリゴ糖、リン酸、および硫酸組成の解析
(i) アミノ酸、単糖類、オリゴ糖、リン酸、および硫酸解析のための試料の調製
PBS中の精製IL-2Rg-Fcの溶液を、実施例4(a)(i)に上記した通りに処理する。

【０５９０】
(ii) 気相加水分解法によるアミノ酸組成の解析
IL-2Rg-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(ii)に上記した通りに処理する。
【０５９１】
(iii) 中性およびアミノ単糖類組成の解析
IL-2Rg-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(iii)に上記した通りに処理する。
【０５９２】
(iv) 酸性単糖類組成の解析
IL-2Rg-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(iv)に上記した通りに処理する。
【０５９３】
(v) オリゴ糖組成の解析
IL-2Rg-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(v)に上記した通りに処理する。
【０５９４】
(vi) 硫酸およびリン酸組成の解析
IL-2Rg-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(vi)に上記した通りに処理する。
【０５９５】
(vii) タンパク質イソ型のさらなる分離
IL-2Rg-Fc調製物の試料を、実施例4(a)(vii)に上記した通りに処理する。IL-2Rg-Fcイソ型は、異なるピークのパターンで溶出されることが認められる。
【０５９６】
実施例5
糖質量フィンガープリンティング
本発明のタンパク質を実施例3と同様に2Dゲル電気泳動技法を用いて分離し、ポリビニルジフルオロエタン(PVDF)膜にブロットする。標準的な一連のタンパク質染色液(コロイドクマシーブルー、Sypro Ruby、またはDeep Purple)の一つを用いてスポットを染色し、デンシトメトリーアルゴリズムを用いてイソ型相対量を定量する。個々のスポットを切り出し、一連の脱グリコシル化酵素および/または化学的手段で適宜処理し、本文書中に記載した方法に従って存在するオリゴ糖を除去する。オリゴ糖が除去されたならば、黒鉛化炭素カラムおよび有機溶媒(MeCN)勾配溶出系を用いて、液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレー質量分析システム(LC-MS)で分離および解析する。作成されたピークプロフィールは、イソ型に存在するオリゴ糖の「フィンガープリント」である。さらに、質量分析システムにより、試料中に存在する糖それぞれの質量に関する情報が同時に得られ、これを用いてGlycoSuiteデータベースとのパターン一致によりそれらの構造が同定される。さらに、個々の質量ピークを複数回断片化して、MS^nスペクトルを得ることができる。これらの断片により、当技術分野で公知の方法を用いて、例えばGlycosidIQソフトウェアパッケージに使用により構造予測が可能になる。
【０５９７】
上記の分離、脱グリコシル化および分析工程は例えば、大腸菌、酵母またはCHO細胞のような非ヒト細胞系中で発現する対応するタンパク質を使用して繰り返され、さらにそれぞれのグリコマスフィンガープリンティングは有意に異なることが見出された。構造レベルでは、このような結果は本発明のタンパク質上に存在するグリカン構造と、対応する非ヒト細胞発現タンパク質のパターンが異なることを示している。
【０５９８】
実施例6
フルオロフォア支援糖質電気泳動
フルオロフォア支援糖質電気泳動手順(FACE手順)を用いて、標的分子のオリゴ糖プロフィールを導出する。水酸化アンモニウムを用いて標的サイトカイン由来のオリゴ糖をアミノ酸骨格から加水分解し、続いてフルオロフォア8-アミノナフタレン-1,3,6-トリスルホン酸(ANTS)を用いて標識する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて、種、および標的分子に典型的なオリゴ糖プロフィールを同定するために使用する標準物質を分離する。

さらに、フルオロフォアおよび各糖をイオン化するための特定のマトリクスに依存して、マトリクス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF)によりオリゴ糖を同定する。各糖の質量を決定し、GlycoSuiteデータベースを用いて可能な構造を同定する。可能な糖構造をタンデム質量分析技法によりさらに特徴付け、存在するオリゴ糖およびそれらの相対量の部分的または完全な特徴付けを可能にする。さらに、2Dゲル電気泳動によって同定されたイソ型を用いてこの工程を繰り返し、単離されたイソ型それぞれに存在するオリゴ糖のプロフィールを作成する。

【０５９９】

実施例7

QCMおよびSPR

標的分子の結合特性および活性を、水晶振動子マイクロバランス法(QCM)または表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いて決定する。いずれの場合にも、分子の適切な受容体を、製造業者によって記載されている化学を用いてウエハーに結合させる。標的分子を適切な生物学的緩衝液に溶解し、チップ上の受容体に緩衝液を通すことによって標的分子をこれと相互作用させる。ウエハー表面上の全タンパク質質量の変化を、発振周波数の変化(QCMの場合)またはチップの光散乱性質の変化(SPRの場合)により測定する。次いで、チップを生物学的緩衝液のみで処理して、標的分子の溶液中への遊離を観察する。次に、受容体が飽和および完全な分離に到達する速度を用いて、標的分子の結合曲線を算出する。

【０６００】

実施例8

トランスジェニック宿主細胞株の作製

(a) α-2,6-シアリルトランスフェラーゼを有するトランスジェニック宿主細胞株

α-2,6-シアリルトランスフェラーゼ(α 2,6ST)をコードするcDNAを、ポリ(A)プライミングcDNAからPCRにより増幅する。PCR産物を適切なベクター、例えばpIRESpuro4またはpCEP4に連結して、α 2,6STプラスミドを作製する。クローニングしたcDNAを配列決定し、公表されているα-2,6ST cDNA配列と比較することによりその同一性を確認する。DNA配列決定は公知の方法を用いて行う。

【０６０１】

高レベルの標的分子を発現する同じ系統の細胞クローン(細胞株-標的分子)を含む哺乳動物宿主細胞に、抗生物質耐性マーカーもまた有するα 2,6STプラスミドをトランスフェクションする。安定にトランスフェクションされた細胞の選択は、抗生物質の存在下で細胞をインキュベートすることにより行う；トランスフェクション後に出現する抗生物質耐性細胞のコロニーをプールし、細胞内α 2,6ST活性について試験する。α 2,6STを発現する個々の細胞クローンを単離するため、Kronman(Gene 121:295-304, 1992)によって記載されている通りに、細胞プールを限界希釈工程によりクローニングする。個々の細胞クローンをランダムに選択し、細胞を拡大して、クローンをα 2,6ST活性について試験する。

【０６０２】

細胞ペレットを洗浄し、溶解緩衝液に再懸濁し、氷上に置いてから超音波処理する。細胞溶解液を遠心分離し、透明な上清をタンパク質濃度(公知の方法による)およびシアリルトランスフェラーゼ活性に関してアッセイする。シアリルトランスフェラーゼ活性は、公知の方法、例えばDatta et al.(J Biol Chem 270:1497-1500, 1995)によって詳述されている方法によりアッセイする。

【０６０３】

高発現α 2,6ST細胞株-標的分子細胞から、発現された標的分子を精製し、インビトロおよび/またはインビボ半減期バイオアッセイ(実施例10を参照されたい)に供する。高発現α 2,6ST細胞由来の標的分子は、その後の導入遺伝子操作をしていない同じ親細胞株に由来する標的分子または他の細胞株に由来する標的分子と比較して、インビトロおよび/またはインビボ半減期の延長を示す。

【０６０４】

(b) フコシルトランスフェラーゼを有するトランスジェニック宿主細胞株

FUT1、FUT2、FUT3、FUT4、FUT5、FUT6、FUT7、FUT8、FUT9、FUT10、FUT11などのフコシルトランスフェラーゼ(FT)をコードするcDNAを、ポリ(A)プライミングcDNAからPCRにより増幅する。PCR産物を適切なベクター、例えばpIRESpuro4またはpCEP4に連結して、α 2,6 STプラスミドを作製する。クローニングしたcDNAを配列決定し、公表されているFT cDNA配列と比較することによりその同一性を確認する。DNA配列決定は公知の方法を用いて行う。

【０６０５】

高レベルの標的分子を発現する同じ系統の細胞クローン(細胞株-標的分子)を含むヒト宿主細胞に、抗生物質耐性マーカーもまた有するFTプラスミドをトランスフェクションする。安定にトランスフェクションされた細胞の選択は、抗生物質の存在下で細胞をインキュベートすることにより行う；トランスフェクション後に出現する抗生物質耐性細胞のコロニーをプールし、細胞内FT活性について試験する。FTを発現する個々の細胞クローンを単離するため、Kronman(Gene 121:295-304, 1992)によって記載されている通りに、細胞プールを限界希釈工程によりクローニングする；個々の細胞クローンをランダムに選択し、細胞を拡大して、クローンをFT活性について試験する。

【０６０６】

細胞ペレットを洗浄し、溶解緩衝液に再懸濁し、氷上に置いてから超音波処理する。細胞溶解液を遠心分離し、透明な上清をタンパク質濃度(公知の方法による)およびFT活性に関してアッセイする。FT活性は、公知の方法、例えばMas et al.(Glycobiology 8(6):605-13, 1998)によって詳述されている方法によりアッセイする。

【０６０７】

高発現FT細胞株-標的分子細胞から、発現された標的分子を精製する。例えばLucka et al.(Glycobiology 15(1):87, 2005)に詳述されているような当技術分野で公知の方法に従って、L5などのルイスx特異的抗体およびKM93、HECA493、2H5、またはCSLEXなどのシアリルルイスx特異的抗体を用いて、ルイスx構造またはシアリルルイスx構造の存在について試験する。または、ルイスx構造またはシアリルルイスx構造の存在は、試料を適切なグリコシダーゼで処理し、MSを用いて質量などの、またはHPLCを用いて保持時間などのパラメータに及ぼすグリコシダーゼの効果を検出することにより決定することもできる。実施例5に記載したような糖質量フィンガープリンティングを使用して、ルイスx構造またはシアリルルイスx構造の存在を予測することも可能である。

【０６０８】

実施例9

差次的遺伝子発現

標的分子の標的細胞株を用いて、遺伝子発現の差を解析することができる。標的細胞を適切な密度まで培養し、一連の濃度の標的分子または緩衝液対照で例えば72時間といった時間処理する。

【０６０９】

様々な時点でRNAを回収し、精製し、Affymetrix手順に従って逆転写する。次いで、標識cRNA(例えば、ビオチン標識)を調製し、例えばU133 GeneChipなどの発現アレイに対してハイブリダイズさせる。洗浄およびシグナル増幅の後、GeneChipスキャナー(Affymetrix)を用いてGeneChipをスキャンし、GeneChipソフトウェア(Affymetrix)を用いて様々な時点におけるハイブリダイゼーション強度および倍率変化情報を得る。

【０６１０】

標的分子は独特の遺伝子発現を誘導し、例えば大腸菌、酵母、またCHO細胞などの種々の供給源から産生されたサイトカインまたは受容体によって誘導されるプロフィールと比較して異なるmRNAプロフィールを生じる。

【０６１１】

実施例10

本発明の標的分子の半減期の決定

標的分子の半減期をインビトロ系で決定する。標的分子を含む組成物をヒト血清/血漿

に混合し、特定の温度で特定の時間(例えば、37℃で4時間、12時間など)インキュベートする。この処理後に残存する標的分子の量を、当技術分野において公知のELISA法またはドットブロット法により決定する。残存する標的分子の生物活性は、当業者によって選択される適切なバイオアッセイを行うことにより決定する。選択される血清は、種々のヒト血液型(例えば、A型、B型、AB型、O型など)から選択され得る。

【０６１２】

標的分子の半減期は、インビボ系でも決定される。標的分子を含む組成物を放射性トレーサー(または他の手段)により標識し、試験に適した種、例えばマウス、ラット、ブタ、霊長動物、またはヒトの静脈内、皮下、眼窩後、筋肉内、または腹腔内に注射する。血液試料を注射後の時点で採取し、(ELISA法、ドットブロット法により、またはトリクロロ酢酸(TCA)沈殿可能な標識、例えば放射性カウントのいずれかにより)標的分子の存在に関してアッセイする。例えば大腸菌、酵母、またはCHO細胞などの他の供給源から産生された標的分子からなる比較組成物を、対照として実行することができる。

【０６１３】

実施例12

(a) 本発明のIL-2と非ヒト系を用いて発現されたIL-2の活性の比較

IL-2は、CTLL-2マウス細胞傷害性T細胞株において増殖を誘導することが報告されている。96ウェルプレートにおいて、30000個のCTLL-2細胞/ウェルを0～20 ng/ml IL-2で37℃にて3日間処理した。次いで、MTSアッセイ法を用いて細胞数を測定した。

【０６１４】

MTSアッセイには、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega)を使用した。このアッセイでは、テトラゾリウム化合物MTS(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム)が電子カップリング試薬(フェナジンメトサルフェート)の存在下において、細胞によりホルマザン産物に生物還元される。ホルマザンの濃度は、得られた溶液の490 nmの吸光度を分光光度計(E Max精密マイクロプレートリーダー、Molecular Devices)で読み取ることにより決定した。

【０６１５】

4パラメータ方程式を用いて吸光度値およびIL-2濃度値をカーブフィットした後に、ED50を算出した。

【０６１６】

上記のアッセイを、大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2(カタログ番号202-IL)を用いて繰り返した。

【０６１７】

3日間インキュベートした後(図2)、R&D IL-2のED50(約0.15 ng/ml)と比較して、本発明のIL-2のED50は約0.1 ng/mlであった。従って、本発明のIL-2(四角)は、3日間の培養後に、大腸菌で発現されたR&D SystemsヒトIL-2(ダイヤモンド)よりも50%高い増殖活性を示した。

【０６１８】

(b) 本発明のIL-2と非ヒト系を用いて発現されたIL-2の熱安定性の比較

本発明のIL-2および大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2(カタログ番号202-IL)の熱安定性を、-70℃、4℃、および37℃で7日間インキュベートし、その後IL-2濃度を測定することにより試験した。

【０６１９】

IL-2濃度は、市販のキット(R&D SystemsヒトIL-2 DuoSet(登録商標) ELISAキット；カタログ番号DY202)を製造業者の指示に従って使用して、ELISAアッセイ法により測定した。両供給源によるIL-2は、0.1%アルブミンと共にPBS中で保存した。

【０６２０】

37℃で7日間インキュベートした後、本発明のIL-2には濃度の損失は認められなかったが、大腸菌で発現されたIL-2は約25%の濃度の損失を示した(図3)。

【０６２１】
(c) 本発明のIL-2と非ヒト系を用いて発現されたIL-2の熱安定性の比較
本発明のIL-2および非ヒト系で発現されたIL-2、例えば大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2(カタログ番号202-IL)の熱安定性を、例えば-70℃、4℃、および37℃といった種々の温度で例えば4日、7日、および10日間といった種々の期間インキュベートし、その後IL-2の生物活性を測定することにより試験する。
【０６２２】
IL-2の生物活性は、実施例12(a)に上記した通りに測定する。
【０６２３】
本発明のIL-2は、特定の温度で所定の期間インキュベートした後、大腸菌で発現されたIL-2よりも低いED50を示すことが予測される。従って、本発明のIL-2の増殖活性は、非ヒト系で発現されたIL-2よりも熱安定性が高いことが判明する。
【０６２４】
(d) 本発明のIL-2Ra-Fcの、本発明のIL-2と非ヒト系を用いて発現されたIL-2に対する結合特性の比較
IL-2は、CTLL-2マウス細胞傷害性T細胞株において増殖を誘導することが報告されている。IL-2Ra-FcはIL-2と結合し、よって細胞IL-2受容体部位に対するIL-2の結合を競合的に阻害して、IL-2を生物学的に不活性化する。IL-2をIL-2Ra-Fcと共にインキュベートすると、IL-2促進性CTLL-2細胞増殖が阻害される。
【０６２５】
48ウェルプレートにおいて、0～2500 ng/mlの本発明のIL-2Ra-Fcを本発明の2 ng/ml IL-2と共に37℃で1時間インキュベートして、結合を生じさせた。0.9 ml中の40000個のCTLL-2細胞を各ウェルに添加し、37℃で2～7日間インキュベートした。次いで、実施例12(a)に上記した通りに、フローサイトメトリー解析を用いて細胞数を測定した。
【０６２６】
4パラメータ方程式を用いて吸光度値およびIL-2Ra-Fc濃度値をカーブフィットした後に、それぞれのND50を算出する。
【０６２７】
上記のアッセイを、大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2(カタログ番号202-IL)を用いて繰り返した。
【０６２８】
7日間インキュベートした後、本発明のIL-2Ra-FcがR&D IL-2によって誘導されるCTLL-2増殖を中和できないことと比較して、本発明のIL-2Ra-Fcの本発明のIL-2に対するND50は約60 ng/mlであった(図4)。
【０６２９】
結果から、本発明のIL-2Ra-Fcは、非ヒト細胞で発現されたIL-2と比較して、ヒト細胞で発現されたIL-2と選択的に結合することが示唆される。
【０６３０】
(e) 本発明のIL-2Ra-Fcと非ヒト系を用いて発現されたIL-2Ra-Fcの生物活性の比較
IL-2Ra-Fcは、CTLL-2細胞株のIL-2誘導性増殖を阻害することが報告されている。IL-2Ra-FcはIL-2と結合し、よって細胞IL-2受容体部位に対するIL-2の結合を競合的に阻害して、IL-2を生物学的に不活性化し得る。
【０６３１】
CTLL-2細胞を48ウェル組織培養プレートのウェルに、培地0.9 ml中の40000個細胞の濃度でプレーティングする。細胞を種々の濃度のプレインキュベートした本発明の2 ng/ml IL-2‐0～2500 ng/ml IL-2Ra-Fc混合液で処理して、37℃で2～7日間インキュベートする。次いで、MTSアッセイ法またはフローサイトメトリー解析を用いて細胞数を測定する。
【０６３２】
MTSアッセイには、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega)を使用する。このアッセイでは、テトラゾリウム化合物MTS(3-(4,5-ジメチルチア

ゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム)が電子カップリング試薬(フェナジンメトサルフェート)の存在下において、細胞によりホルマザン産物に生物還元される。ホルマザンの濃度は、得られた溶液の490 nmの吸光度を分光光度計(E Max精密マイクロプレートリーダー、Molecular Devices)で読み取ることにより決定する。

【０６３３】

フローサイトメトリー解析では、公表されている方法(Dedov et al. Apoptosis 8:399-406, 2003)によりFACScanフローサイトメーター(Becton Dickinson Immunocytometry Systems、カリフォルニア州、サンノゼ)を用いて計数する。データ解析は、CellQuestソフトウェアを用いて行う。

【０６３４】

4パラメータフィット方程式を用いて吸光度値およびIL-2Ra-Fc濃度値をカーブフィットした後に、それぞれのND50を算出する。

【０６３５】

上記のアッセイを非ヒト細胞系、例えば大腸菌、酵母、またはCHO細胞で発現されたヒトIL-2Ra-Fcを用いて繰り返し、それぞれのED50が顕著に異なることを明らかにする。

【０６３６】

(f) 本発明のIL-2Rb-Fcの、本発明のIL-2と非ヒト系を用いて発現されたIL-2に対する結合特性の比較

実施例12(a)に上記したように、IL-2は、CTLL-2マウス細胞傷害性T細胞株において増殖を誘導することが報告されている。

【０６３７】

48ウェルプレートにおいて、0～2500 ng/mlの本発明のIL-2Rb-Fcを本発明の2 ng/ml IL-2と共に37℃で1時間インキュベートして、結合を生じさせた。0.9 ml中の40000個のCTLL-2細胞を各ウェルに添加し、37℃で2～7日間インキュベートした。次いで、実施例12(a)に上記した通りに、フローサイトメトリー解析を用いて細胞数を測定した。

【０６３８】

4パラメータ方程式を用いて吸光度値およびIL-2Rb-Fc濃度値をカーブフィットした後に、それぞれのND50を算出する。

【０６３９】

上記のアッセイを、大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2(カタログ番号202-IL)を用いて繰り返した。

【０６４０】

7日間インキュベートした後、本発明のIL-2Rb-FcがR&D IL-2によって誘導されるCTLL-2増殖を中和できないことと比較して、本発明のIL-2Rb-Fcの本発明のIL-2に対するND50は約80 ng/mlであった(図5)。

【０６４１】

結果から、本発明のIL-2Rb-Fcは、非ヒト細胞で発現されたIL-2と比較して、ヒト細胞で発現されたIL-2と選択的に結合することが示唆される。

【０６４２】

(g) 本発明のIL-2Rg-Fcと非ヒト系を用いて発現されたIL-2Rg-Fcの生物活性の比較

IL-2Rg-Fcは、IL-2Rb-Fcの存在下において巨核芽球性白血病MO7e細胞株のIL-2誘導性増殖を阻害することが報告されている。IL-2Rg-FcはIL-2Rb-Fcと協調して可溶性IL-2と結合し、よって細胞IL-2受容体部位に対するIL-2の結合を競合的に阻害して、IL-2を生物学的に不活性化し得る。

【０６４３】

MO7e細胞を組織培養プレートのウェルに適切な濃度でプレーティングする(Avanzi et al. Br J Haematol 69:359, 1988)。本発明のIL-2Rg-Fc、本発明のIL-2Rb-Fc、およびhIL-2を、例えば0～5000 ng/ml IL-2Rg-Fcと30μg/ml IL-2Rb-Fcおよび30 ng/ml hIL-2といった様々な比率で混合し、例えば37℃で1時間といった適切な条件下でインキュベートする

。細胞を種々の濃度のプレインキュベートしたIL-2Rg-Fc/IL-2Rb-Fc/hIL-2混合液で処理して、37℃で2～7日間インキュベートする。次いで、実施例12(e)に上記した通りに、MTSアッセイ法またはフローサイトメトリー解析を用いて細胞数を測定する。

【０６４４】

4パラメータフィット方程式を用いて吸光度値およびIL-2Rg-Fc濃度値をカーブフィットした後に、それぞれのND50を算出する。

【０６４５】

上記のアッセイを非ヒト細胞系、例えば大腸菌、酵母、またはCHO細胞で発現されたヒトIL-2Rg-FcおよびヒトIL-2Rb-Fcを用いて繰り返し、それぞれのND50が顕著に異なることを明らかにする。

【０６４６】

実施例13

(a) 本発明のIL-2と非ヒト系を用いて発現されたヒトIL-2の免疫反応性プロフィールのインビトロ比較

本発明のIL-2のタンパク質量推定値を、280 nmの吸光度(A_{280})を用いて決定した。

【０６４７】

280 nmの吸光度(A_{280})、IL-2ポリペプチド骨格の公知の分子量、および導出された吸光係数を用いて標準化した本発明のIL-2を希釈し、製造業者の指示に従ってR&D SystemsヒトIL-2 DuoSet(登録商標) ELISAキット(カタログ番号DY202)で試験した。上記のELISAキットでは、標準物質として大腸菌で発現されたヒトIL-2を使用する。

【０６４８】

R&D SystemsヒトIL-2 DuoSet(登録商標) ELISAキットの結果により、大腸菌発現ヒトIL-2検量線から推定した場合に、OD450 nmが約0.515で約125 pg/mlという本発明のIL-2の濃度推定値が得られた(図6)。一方、本発明のIL-2の実際の補間濃度は、同様のOD450 nm値で約1286 pg/mlであった(図6)。

【０６４９】

これらの結果から、実験試料およびヒト患者試料中の天然ヒト発現IL-2のレベルを評価するために用いられる、大腸菌で発現されたヒトIL-2標準物質および大腸菌発現ヒトIL-2に対する抗体を使用する市販のキットの一つであるR&D SystemsヒトIL-2 DuoSet(登録商標) ELISAキットにより、本発明のIL-2濃度が約10倍過小評価されることが示される。

【０６５０】

この結果から、本発明のIL-2と非ヒト細胞発現ヒトIL-2分子の異なる免疫反応性プロフィールが示される。

【０６５１】

(b) 本発明のIL-2Ra-Fcと非ヒト系を用いて発現された可溶性ヒトIL-2Raの免疫反応性プロフィールのインビトロ比較

本発明のIL-2Ra-Fcのタンパク質量推定値を、ヒトIgGを標準物質として使用してタンパク質量推定のLowry法により決定した。

【０６５２】

Lowryタンパク質推定値を用いて標準化した本発明のIL-2Ra-Fcを希釈し、製造業者の指示に従ってR&D SystemsヒトIL-2 sRa DuoSet(登録商標) ELISAキット(カタログ番号DY223)で試験した。上記のELISAキットでは、標準物質として、マウスNSO細胞で発現された可溶性ヒトIL-2Raに対して較正されたたタンパク質を使用する。

【０６５３】

R&D SystemsヒトIL-2 sRa DuoSet(登録商標) ELISAキットの結果により、マウスNSO細胞で発現された可溶性ヒトIL-2Raに対して標準化されたタンパク質を用いて作成した検量線から内挿した場合に、OD450 nmが約0.25で約374 pg/mlという本発明のIL-2Ra-Fcの濃度推定値が得られた(図7)。一方、約2000 pg/mlの本発明のIL-2Ra-Fcの実際のOD 450 nmは0.89であった(図7)。本発明のIL-2Ra-Fcはホモ二量体として発現されることに留意されたい。

【０６５４】
これらの結果から、マウスNSO細胞で発現された可溶性ヒトIL-2Raを用いて標準化される市販のキットであるR&D SystemsヒトIL-2 sRa DuoSet(登録商標) ELISAキットにより、本発明のIL-2Ra-Fcが(ホモ二量体として)約5倍過剰評価され、従って本発明のIL-2Ra-Fc濃度が(単量体として)約2.5倍の評価をされることが示される。
【０６５５】
この結果から、本発明のIL-2Ra-Fcと非ヒト細胞発現可溶性ヒトIL-2Ra分子の異なる免疫反応性プロフィールが示される。
【０６５６】
(c) 本発明のIL-2Rb-Fcと非ヒト系を用いて発現されたヒトIL-2RbまたはキメラIL-2Rb分子の免疫反応性プロフィールのインビトロ比較
本発明のIL-2Rb-Fcのタンパク質量推定値を、標準的なタンパク質アッセイ技法、例えばBradfordタンパク質アッセイ法(Bradford Anal Biochem 72:248-254, 1976)を用いて決定する。
【０６５７】
標準的なタンパク質アッセイの結果を用いて標準化した本発明のIL-2Rb-Fcを希釈し、非ヒト細胞発現IL-2RbまたはキメラIL-2Rbタンパク質標準物質を同梱している適切な市販のIL-2RbまたはキメラIL-2Rb定量免疫測定手順、例えば抗IL-2Rb ELISAキットを製造業者の指示に従って使用して試験する。または、市販の供給源から入手できる成分を使用して開発した定量免疫測定手順を用いて、本発明のIL-2Rb-Fcのレベルを決定する。例えば、捕獲抗体としてのヒトIL-2Rb Mab(R&D Systems カタログ番号MAB224)、検出抗体としてのビオチン化ヒトIL-2Rb Pab(R&D Systems カタログ番号BAF224)、およびタンパク質標準物質としてのSf-21昆虫細胞で発現された組換えヒトIL-2Rb(R&D Systems カタログ番号224-2B-025/CF)を用いて、抗IL-2Rb ELISAを開発する。標準的なタンパク質アッセイの結果を用いて標準化した本発明のIL-2Rb-Fcのタンパク質濃度を、当技術分野において公知のELISA法を用いて上記試薬でアッセイする。
【０６５８】
市販のELISAキットにより、または供給された成分を用いて開発した定量免疫測定法により決定される本発明のIL-2Rb-Fcのタンパク質濃度は、市販のELISAキットまたは免疫測定手順で使用される捕獲抗体および/または検出抗体が非ヒト細胞発現ヒトIL-2RbまたはキメラIL-2Rbタンパク質に対して産生されているため、標準的なタンパク質アッセイ法で決定されるタンパク質濃度と異なることになる。
【０６５９】
構造的レベルにおいて、このような結果から、本発明のIL-2Rb-Fcと非ヒト細胞発現ヒトIL-2RbまたはキメラIL-2Rb分子の異なる免疫反応性プロフィールが示される。
【０６６０】
(d) 本発明のIL-2Rg-Fcと非ヒト系を用いて発現されたヒトIL-2RgまたはキメラIL-2Rg分子の免疫反応性プロフィールのインビトロ比較
本発明のIL-2Rg-Fcのタンパク質量推定値を、標準的なタンパク質アッセイ技法、例えばBradfordタンパク質アッセイ法(Bradford 1976 前記)を用いて決定する。
【０６６１】
標準的なタンパク質アッセイの結果を用いて標準化した本発明のIL-2Rg-Fcを希釈し、非ヒト細胞発現IL-2RgまたはキメラIL-2Rgタンパク質標準物質を同梱している適切な市販のIL-2Rg定量免疫測定手順、例えば抗IL-2Rg ELISAキットを製造業者の指示に従って使用して試験する。または、市販の供給源から入手できる成分を使用して開発した定量免疫測定手順を用いて、本発明のIL-2Rg-Fcのレベルを決定する。例えば、捕獲抗体としてのヒトIL-2Rg Mab(R&D Systems カタログ番号MAB284)、検出抗体としてのビオチン化ヒトIL-2Rg Pab(R&D Systems カタログ番号BAF284)、およびタンパク質標準物質としてのSf-21昆虫細胞で発現された組換えヒトIL-2Rg(R&D Systems カタログ番号384-RG-050/CF)を用いて、抗IL-2Rg ELISAを開発する。標準的なタンパク質アッセイの結果を用いて標準化した

本発明のIL-2Rg-Fcのタンパク質濃度を、当技術分野において公知のELISA法を用いて上記試薬でアッセイする。

【０６６２】

市販のELISAキットにより、または供給された成分を用いて開発した定量免疫測定法により決定される本発明のIL-2Rg-Fcのタンパク質濃度は、市販のELISAキットまたは免疫測定手順で使用される捕獲抗体および/または検出抗体が非ヒト細胞発現ヒトIL-2Rgまたはキメラ IL-2Rgタンパク質に対して産生されているため、標準的なタンパク質アッセイ法で決定されるタンパク質濃度と異なることになる。

【０６６３】

構造的レベルにおいて、このような結果から、本発明のIL-2Rg-Fcと非ヒト細胞発現ヒトIL-2RgまたはキメラIL-2Rg分子の異なる免疫反応性プロフィールが示される。

【０６６４】

実施例14

本発明の標的分子のさらなる精製およびESI-MS/MSによるペプチド質量フィンガープリンティング

実施例2に記載した精製手順に加えて、本発明の標的分子の精製を市販のカラムを用いてRP-HPLCにより行う。溶出されるタンパク質を215 nmまたは280 nmの吸光度によりモニターし、フローセルと回収ポートの間のチューブ量による遅延について補正して回収する。

【０６６５】

実施例3に記載する通りに、1Dまたは2Dゲルによるタンパク質試料を含むゲル断片をトリプシン溶液中で消化する。または、タンパク質試料を含む溶液を、重炭酸アンモニウム緩衝液(10～25 mM、pH 7.5～9)中のトリプシンで消化する。溶液を37℃で一晩インキュベートする。次いで、pHが4～5の範囲になるまで酢酸を添加して、反応を停止させる。実施例3に記載する通りに、C18 Zip-Tip(Millipore、マサチューセッツ州、ベッドフォード)またはPoros R2クロマトグラフィー樹脂(Perspetive Biosystems、マサチューセッツ州、フラミンガム)を含む作製済みマイクロカラムを用いて、ペプチド試料を濃縮および脱塩する。

【０６６６】

タンパク質試料(2～5μl)をマイクロC18プレカラムに注入し、30μl/分にて0.1%ギ酸で洗浄して濃縮および脱塩する。3分間洗浄した後、プレカラムを、C18 RPシリカを含む分析カラム(Atlantis、75μm×100 mm、Waters Corporation)のラインに切り替える。H_2O:CH_3CN(95:5；＋0.1%ギ酸)からH_2O:CH_3CN(20:80；＋0.1%ギ酸)という段階の直線溶媒勾配を用いて、200 nl/分で40分間かけてペプチドをカラムから溶出させる。LC溶離液を、Micromass QTOF Ultima質量分析計(Micromass、英国、マンチェスター)において陽イオンナノフローエレクトロスプレー解析に供する。

【０６６７】

Q-Tofハイブリッド四重極/直行加速TOF質量分析計(Micromass)を用いて、タンデムMSを行う。QTOFはデータ依存収集モード(DDA)で操作する。TOFMS検索スキャンを収集し(m/z 400～2000、1.0 s)、検索スキャン中の最も大きな三つの多価イオン(カウント＞15)を順次MS/MS解析に供した。MS/MSスペクトルは8秒間蓄積させた(m/z 50～2000)。

【０６６８】

Mascot(Matrix Science、英国、ロンドン)およびProtein Lynx Global Server(「PLGS」)(Micromass)を用いて、LC/MS/MSデータを検索する。タンパク質試料は標的分子であることが予測される。

【０６６９】

実施例15

(a) 非ヒト動物における免疫原性

(i)標的タンパク質による動物の免疫化

例えばマウスなどの非ヒト動物の個々の群の皮下、筋肉内、または腹腔内(IP)に、それ

ぞれ1～100 ugの本発明のタンパク質および非ヒト細胞で発現されたタンパク質を免疫化する。免疫化から1ヶ月後に、動物に二次免疫化を行う。免疫化の前には、タンパク質をアジュバント中で、例えば一次免疫化用には完全フロイントアジュバントおよび二次免疫化用には不完全フロイントアジュバント中で乳化する。

【０６７０】

(ii) 標的タンパク質に対する抗体の検出

抗体応答を検出するため、各群の動物の尾部から採血し、血清をプールする。50 ng/ウェルの本発明のタンパク質を用いて、固相ELISAによりタンパク質特異的抗体を検出する。IgG1、IgG2、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgDに対して産生された標識検出抗体を用いて、種々の免疫グロブリンアイソタイプを検出する。または、ドットブロットまたはウェスタンブロットとして膜上にブロットされた本発明のタンパク質に対して、抗体応答を測定する。種々の免疫グロブリンアイソタイプの検出は、上記の通りに検出する。本発明のタンパク質が、非ヒト細胞で発現されたタンパク質の抗体とは異なる抗体応答を誘発することが予測される。

【０６７１】

(iii) T細胞増殖アッセイ

免疫化した動物を安楽死させ、脾臓細胞を調製する。本発明のタンパク質を免疫化した動物に由来する適切な数の脾臓細胞、例えば5×10^5個細胞を、種々の濃度の本発明のタンパク質と共に培養すると同時に、非ヒト細胞で発現されたタンパク質を免疫化した動物に由来する同等数の脾臓細胞を、種々の濃度の非ヒト細胞で発現されたタンパク質と共に培養する。T細胞増殖アッセイを行うには、脾臓細胞を96時間培養し、最後の16時間は1μCi [^{3}H]チミジン(6～7μCi/umol)で処理する。細胞をフィルターストリップ上に回収し、標準的な方法を用いて[^{3}H]チミジンの取り込みを測定する。本発明のタンパク質が、非ヒト細胞で発現されたタンパク質と比較して異なる増殖応答を誘発することが予測される。

【０６７２】

(iv) IFNγアッセイ

IFNγアッセイを行うには、本発明のタンパク質または非ヒト細胞で発現されたタンパク質と共にインキュベートした脾臓細胞の培養上清を96時間目に回収し、サンドイッチELISA、例えばR&D Systems抗IFNγ Quantikine(登録商標) ELISAキット(カタログ番号DIF50)により製造業者の指示に従って検出する。本発明のタンパク質と共にインキュベートした細胞に由来する培養上清のIFNγ産生が、非ヒト細胞で発現されたタンパク質と共にインキュベートした細胞に由来する培養上清と比較して異なることが予測される。

【０６７３】

(b) インビトロヒト免疫原性アッセイ

(i) ヒトT細胞応答アッセイ

Stickler et al. Toxicological Sciences 77:280-289, 2004に記載されている通りに、ヒト血液からヒト樹状細胞および$CD4^+$ T細胞を調製する。2×10^4個の樹状細胞および2×10^5個の$CD4^+$ T細胞を含む樹状細胞および$CD4^+$ T細胞の共培養物を、96ウェルプレートにプレーティングする。本発明のタンパク質および非ヒト細胞で発現されたタンパク質を、切断部位予測ソフトウェア、例えばPeptide Cutter(http://au.expasy.org/tools/peptidecutter)により決定された適切な酵素を用いて、ペプチド断片になるよう酵素消化する。得られたペプチド断片を例えば液体クロマトグラフィーなどの適切な技法により精製し、最終濃度5 ug/mlになるよう共培養物に添加する。培養物を5日間インキュベートし、次いで0.5 uCi ^{3}Hチミジンを各培養物に添加する。細胞をフィルターストリップ上に回収し、[^{3}H]チミジンの取り込みにより細胞増殖を測定する。

【０６７４】

本発明のタンパク質に由来するペプチドは、非ヒト細胞で発現されたタンパク質に由来するペプチドと比較してより弱い増殖応答を誘発することが予測される。

【０６７５】

(ii) ヒト抗体応答アッセイ

非ヒト細胞で発現されたタンパク質による処置を受けているヒトドナーから採血し、血清を調製する。タンパク質特異的抗体を、50 ng/ウェルの本発明のタンパク質および非ヒト細胞で発現されたタンパク質に対して固相ELISAにより検出する。ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgDに対して産生された標識検出抗体を用いて、種々の免疫グロブリンアイソタイプを検出する。

【０６７６】

または、ドットブロットまたはウェスタンブロットとして膜上にブロットされた本発明のタンパク質および非ヒト細胞中で発現されたタンパク質に対して、抗体応答を測定する。種々の免疫グロブリンアイソタイプの検出は、上記の通りに検出する。

【０６７７】

非ヒト細胞で発現されたタンパク質で処置した人の血清中に存在する免疫グロブリンは、非ヒト細胞で発現されたタンパク質には結合するが、本発明のタンパク質とは弱く結合するかまたは結合しないことが予測される。

【０６７８】

実施例16

組換えゲノム構築物からの本発明のタンパク質の調製

本発明のIL-2をコードするゲノム配列(SEQ ID NO:95)をPCRにより増幅し、適切な発現ベクター、例えばpIRESbleo3、pCMV-SPORT6、pUMCV3、pORF、pORF9、pcDNA3.1/GS、pCEP4、pIRESpuro3、pIRESpuro4、pcDNA3.1/Hygro(+)、pcDNA3.1/Hygro(-)、pEF6/V5-Hisにクローニングする。次いで、この組換え構築物を、実施例1(c)に上記した通りにヒト細胞形質転換用に調製する。組換えDNA構築物からの本発明のIL-2の産生および精製は、実施例2に上記した通りに行う。

【０６７９】

実施例17

受容体-Fc結合能の決定

(a) IL-2Ra-Fc

IL-2Ra-Fcセファロースを調製し、発現培養上清からIL-2を精製するためにこれを使用することによって、IL-2Ra-FcがIL-2と結合する能力を決定した。

【０６８０】

IL-2Ra-Fc-セファロースを以下のように調製した：実施例2に上記したIL-2Ra-Fc 2～3 ugを洗浄緩衝液(50 mM TRIS-HCl 150 mM NaCl 0.1% Triton X100 pH 7.5)で500 ulにし、プロテインAセファロースビーズ(Amersham Biosciences；4 Fast Flow；#17.5280.02) 40 ulに添加し、回転させながら室温で1～2時間インキュベートした。次いで、ビーズを13.2K rpmで1分間ペレット化し、洗浄緩衝液で3回洗浄して未結合のIL-2Ra-Fcを除去した。

【０６８１】

以下の試料をIL-2Ra-Fc-セファロースビーズと共にインキュベートした

1．IL-2馴化培地(実施例2に上記)および

2．精製IL-2(実施例2に上記)。

【０６８２】

ビーズおよび試料を、回転させながら室温で1時間インキュベートした。次いで、ビーズを2500 rpmで5分間ペレット化し、洗浄緩衝液で3回洗浄して未結合の試料を除去した。DTTを含む2×SDS試料緩衝液25 ulを添加して混合し、チューブを100℃で5分間加熱して、結合したタンパク質を検出した。次に、試料を4～20% TRISグリシンゲルで泳動し、銀染色、または抗IL-2抗体によって検出するウェスタン解析に供した。

【０６８３】

結果から、IL-2Ra-Fcが馴化培地および精製IL-2試料の両方に由来するIL-2に結合することが示された。

【０６８４】

(b) IL-2Rb-Fc

セファロースに結合した本発明の受容体-Fcタンパク質を調製し、発現培養上清または

精製溶液からリガンドを精製するためにこの調製物を使用することによって、本発明のIL-2Rb-Fcタンパク質がリガンドと結合する能力を決定する。

【０６８５】

IL-2Rb-Fc-セファロースを適切な方法を用いて調製する。例えば、実施例2(c)に上記したIL-2Rb-Fc 2～3 ugを適切な洗浄緩衝液、例えば50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.1% Triton X100 (pH 7.5)で500 ulにし、次いでプロテインAセファロースビーズ40 ulに添加し、回転させながら室温で1～2時間インキュベートする。次に、ビーズを13.2K rpmで1分間ペレット化し、洗浄緩衝液で3回洗浄して未結合のIL-2Rb-Fcを除去する。

【０６８６】

一つまたは複数の以下の試料をIL-2Rb-Fc-セファロースビーズと共にインキュベートする：実施例2(a)(i)に上記したrh IL-2を含む馴化培地；実施例2(a)(ii)に上記した精製rh IL-2の調製物；IL-2Rb-Fcへの結合特性が報告されていない適切な対照タンパク質の調製物。

【０６８７】

ビーズおよび試料を回転させながら室温で1時間インキュベートする。次いで、ビーズを2500 rpmで5分間ペレット化し、洗浄緩衝液で3回洗浄して未結合の試料を除去する。DTTを含む2×SDS試料緩衝液25 ulを添加して混合し、チューブを100℃で5分間加熱して、結合したタンパク質を検出する。次に、試料を4～20% TRISグリシンゲルで泳動し、銀染色、または抗IL-2抗体によって検出するウェスタン解析に供す。ウェスタン解析はまた、対照タンパク質に対する抗体を用いて行い得る。

【０６８８】

結果から、IL-2Rb-Fcが馴化培地および/または精製IL-2試料に由来するIL-2に結合することが示される。本発明のIL-2Rb-Fcによる対照タンパク質の特異的結合は認められない。

【０６８９】

当業者は、本明細書に記載した本発明が、具体的に記載した以外の変更および修正を受け得ることを理解すると考えられる。本発明はそのような変更および修正を全て含むと理解されるべきである。本発明はまた、本明細書に引用するまたは示す段階、特徴、組成物、および化合物の全てを個別にまたはまとめて含み、さらにそのような段階または特徴の任意の二つまたはそれ以上のありとあらゆる組み合わせを含む。

【０６９０】

参考文献

Ackland *et al. Chromatogr 540*:187-198, 1991

Aloj *et al. J BiolChem* 247:1146-1151, 1971

Altschul *et al. Nucl Acids Res 25:*389, 1997

Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Aronsson *et al. FEBS Lett 411*:359-364, 1997

Atherton and Shephard *Synthetic Vaccines 9:* Blackwell Scientific Publications

Ausubel *et al. In: Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons Inc. 1994-1998)

Avanzi *et al. Br J Haematol 69*:359, 1988

Baneyx *Current Opinion in Biotechnology, 10*:411–421, 1999

Bernstein *Methods Mol Biol 237*:195-204, 2004

Bird *Science 242:*423, 1988

Blenis and Resh *Curr Opin Cell Biol 5(6):*984-9, 1993

Bonner and Laskey *Eur J Biochem 46:*83, 1974

Bradford *Anal Biochem 72:*248-254, 1976

Caprioli *et al. Biochem Biophys Res Commun 146*:291-299, 1987

Carr *et al. Anal Biochem 175:* 492-499, 1988

Carr *et al. Anal Chem 63*:2802-2824, 1991

Carr *et al. J Biol Chem 264(35)*:21286-21295, 1989

Clackson *et al. Nature 352*:624-628, 1991

Clarke *Curr Opin Cell Biol 5*:977 983, 1993

Datta *et al. J Biol Chem 270:*1497–1500, 1995

Dedov *et al. Apoptosis 8*:399-406, 2003

Domzig *et al. J Immunol 130:*1970-1973, 1983

Edman *Mol Biol Biochem Biophys 8:*211-55, 1970

Erickson *et al. Science 249:*527-533, 1990

Farruggia *et al. Int J Biol Macromol 20:*43-51, 1997

Figeys and Aebersold, *Electrophoresis 19*:885-892, 1998

Franks *et al. Characterization of proteins*, Humana Press, Clifton, NJ, 1988

Fritz *et al. PNAS 95*:12283-12288, 1998

Fukuhara *et al. J Biol Chem 260*:10487-10494, 1985

Gelb *et al. Curr Opin Chem Biol 2(1)*:40-8, 1998

Gramer *et al. Biotechnology 13(7):*692-8, 1995

Guedez *et al. Am J Pathol 162:*1431–1439, 2003

Harel-bellan *et al. J Immunol 136:*2463-2469, 1986

Harrison and Packer *Methods Mol Biol 125:*211-216, 2000

Hearn *et al. Methods in Enzymol 104*:190-212, 1984

Herscovics *et al. FASEB J 7:*540-550, 1993

Herzberg *et al. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*, Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 1945

Hodgson *Bio/Technology 9:*19-21, 1991

Holzwarth *et al. J Am Chem.Soc 178*:350, 1965

Honroe *et al. Biochem J 258*:99-204, 1989

Huston *et al. Proc Natl Acad Sci USA 85:*5879, 1988

J Biochem 336:647-658, 1998

J Biochem 363:619-631, 2002

James and Bottomley *Arch Biochem Biophy 356*:296-300, 1998

Jones *et al. Nature 321*:522-525, 1986

Kennet *et al. Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York, 1980

Kivirikko *et al. FASEB Journal 3:*1609-1617, 1989

Kohler *et al. Nature 256*:495, 1975

Kortt *et al. Protein Engineering 10:*423, 1997

Krimm and Bandekar *Adv Protein Chem 38:*181-364, 1986

Kronman *Gene 121:*295–304, 1992

Kurochkin *et al. J Mol Biol 248*:414-430, 1995

Kwon and Yu *Biophim Biophys Acta 1335*:265-272, 1997

Larrick *et al. Bio/Technology 7:*934, 1989

Larsen *et al. J Biol Chem 265:*7055-7061, 1990

Li *et al. Biochemistry 34*:5762-5772, 1995

Liu *et al. J Immunol 158:*604-613, 1994

Lucka *et al. Glycobiology 15(1)*:87-100, 2005

Malkovsky *et al. Nature 325:*262-265, 1987

Marks *et al. J Mol Biol 222*:581-597, 1991

Marmur and Doty *J Mol Biol 5:*109, 1962

Martin *et al. Nature Medicine 11(2):*228-232, 2005

Mas *et al. Glycobiology 8(6)*:605-13, 1998

McGettrick *et al. Methods Mol Biol 244*:151-7 2004

Mire-Sluis *et al. J Immunol Methods 289(1-2)*:1-16, 2004

Moore *J Biol Chem 278(27):*24243-24246, 2003

Morgan *et al. Science 993(4257):*1007-8, 1976

Morris *et al. Ann Rheum Dis 59:*109, 2000

Morrison *et al. Proc Natl Acad Sci USA 81*:6851-6855, 1984

Musso *et al. J Exp Med 181:*1425-1431, 1995

Nguyen *et al. J Chromatogr A. 705*:21-45, 1995

Packer *et al. Glycoconj J 5(8)*:737-47, 1998

Pahwa *et al. AIDS Patient Care STDS 12:*187, 1998

Phillies *Anal Chem 62:*1049A-1057A, 1990

Pikal *et al. Pharm Res 8*:427-436, 1991

Presta, *Curr Op Struct Biol 2*:593-596, 1992

Rando *Biochim Biophys Acta 1300(1)*:5-16, 1996

Reichmann *et al. Nature 332*:323-329, 1988

Sambrook *et al. Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour, New York, USA, 1990

Schmid *et al. Protein structure, a practical approach*, Creighton Ed., IRI Press, Oxford, England, 1989

Shepherd *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:*898-904, 2004

Stickler *et al. Toxicological Sciences 77:*280-289, 2004

Triguero *et al. J of Neurochemistry 54*:1882-1888 1990

Waldmann *et al. J Exp Med 160:*1450-1466, 1984

Ward *et al. Nature 334:*544, 1989

Wells *Methods Enzymol 202:*2699-2705, 1991

Wilkinson *Annu Rev Nutr 15*:161-89, 1995

Willerford *et al. Immunity 3:*521, 1995

Winter and Harris *TIPS 14:*139, 1993

Yoshioka *et al. Pharm Res 10*:103-108, 1993

【図面の簡単な説明】

【０６９１】

【図１】本発明のタンパク質をコードするcDNAをpIRESbleo3またはpIRESbleo3-Fcベクターに挿入するクローニング過程の図表示である。

【図２】培養3日後の、IL-2のCTLL-2細胞に対する増殖活性を示すグラフ表示である。本発明のIL-2の増殖活性(四角)は、0.01～2.0 ng/ml濃度の範囲にわたり、大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2(丸)の対応する活性よりも高かった。

【図３】-70℃または37℃で保存した後のIL-2濃度を示すグラフ表示である。ELISA法により測定したところ、本発明のIL-2の濃度(白)は37℃での7日間の保存によって影響を受けないが、大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2の濃度(黒)は約25%減少したことが判明した。

【図４】7日間培養した後のCTLL-2細胞のrh IL-2誘導性増殖の中和によって評価した、本発明のIL-2Ra-Fcのリガンド結合能を示すグラフ表示である。本発明のIL-2Ra-Fcは、本発明のIL-2の阻害において効果的であったが(ダイヤモンド；ND50は約60 ng/ml)、大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2の阻害においては効果的ではなかった(小さい四角)。本発明のIL-2のみ(大きい四角)、大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2のみ(白丸)、および本発明のIL-2Ra-Fcのみ(三角)によるCTLL-2の増殖も同様に示す。細胞のみ(十字)。

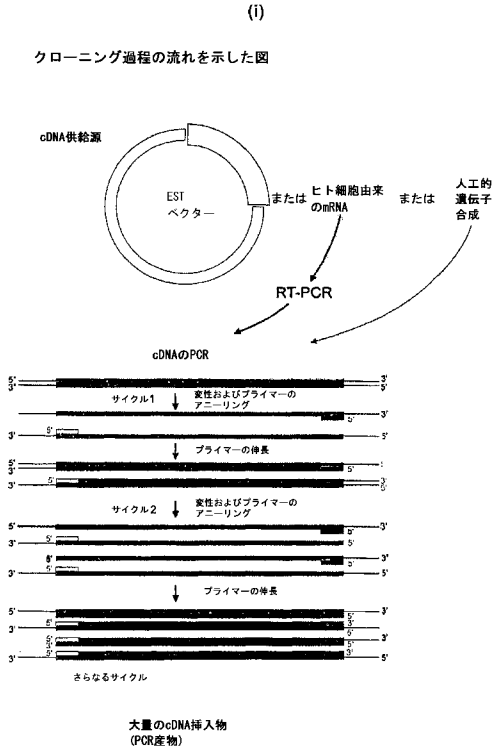
【図５】7日間培養した後のCTLL-2細胞のrh IL-2誘導性増殖の中和によって評価した、本発明のIL-2Rb-Fcのリガンド結合能を示すグラフ表示である。本発明のIL-2Rb-Fcは、本発明のIL-2の阻害において効果的であったが(ダイヤモンド；ND50は約80 ng/ml)、大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2の阻害においては効果的ではなかった(小さい四角)。本発明のIL-2のみ(大きい四角)、大腸菌で発現されたR&D Systems IL-2のみ(白丸)、および本発明のIL-2Ra-Fcのみ(三角)によるCTLL-2の増殖も同様に示す。細胞のみ(十字)。

【図６】本発明のIL-2および非ヒト系を用いて発現されたIL-2の免疫反応性プロフィール

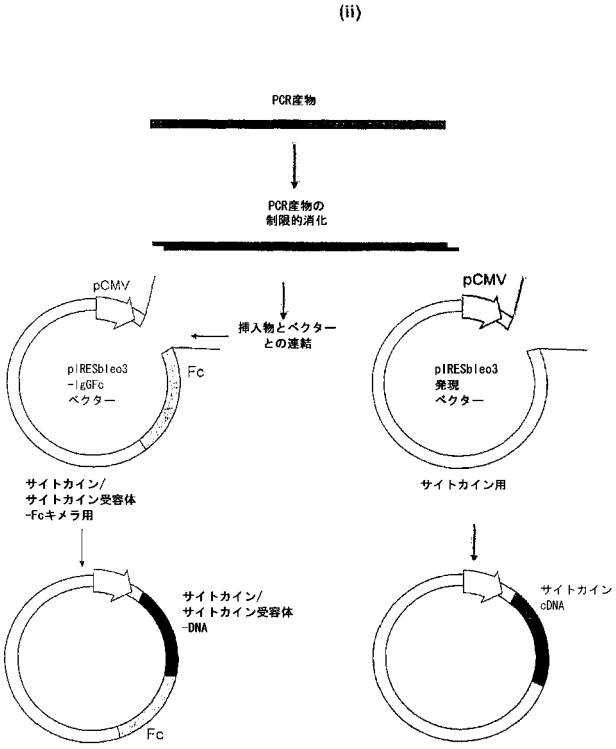
のインビトロ比較を示すグラフ表示である。R&D SystemsヒトIL-2 DuoSet(登録商標) ELISAキットを用いた、本発明のIL-2(四角)およびR&D Systems大腸菌発現ヒトIL-2標準物質(ダイヤモンド)の吸光度－濃度プロットを示す。本発明のIL-2の濃度値は、A_{280}吸光度結果から導出した。

【図７】(ホモ二量体としての)本発明のIL-2Ra-Fcおよび非ヒト発現系を用いて標準化された可溶性ヒトIL-2Ra分子の免疫反応性プロフィールのインビトロ比較を示すグラフ表示である。R&D Systems可溶性ヒトIL-2Ra DuoSet(登録商標) ELISAキットを用いた、本発明のIL-2Ra-Fc(四角)およびマウスNSO細胞で発現された可溶性ヒトIL-2Raを用いて標準化されたR&D Systems標準物質(ダイヤモンド)の吸光度－濃度プロットを示す。(ホモ二量体としての)本発明のIL-2Ra-Fcの濃度値は、Lowryタンパク質量推定結果から導出した。

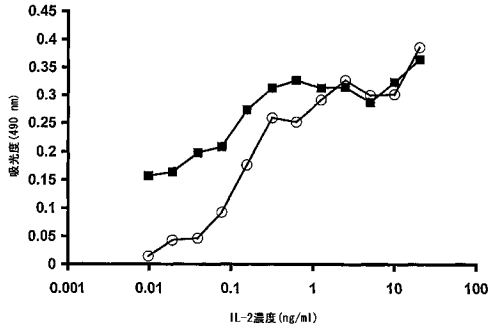
【図１－１】



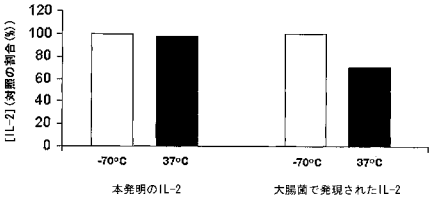
【図１－２】



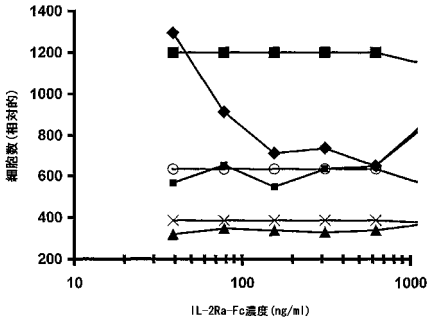
【図２】



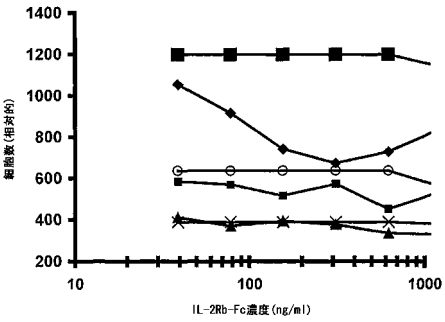
【図３】



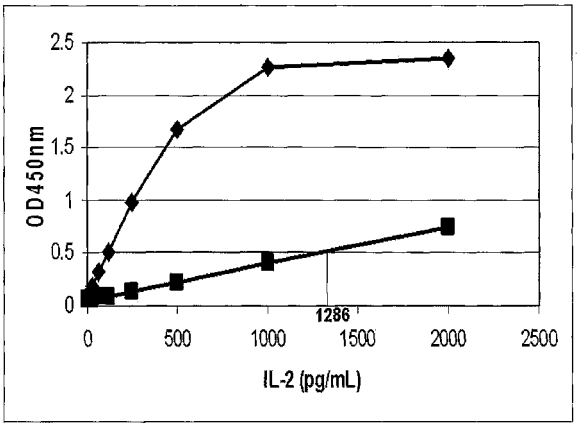
【図４】



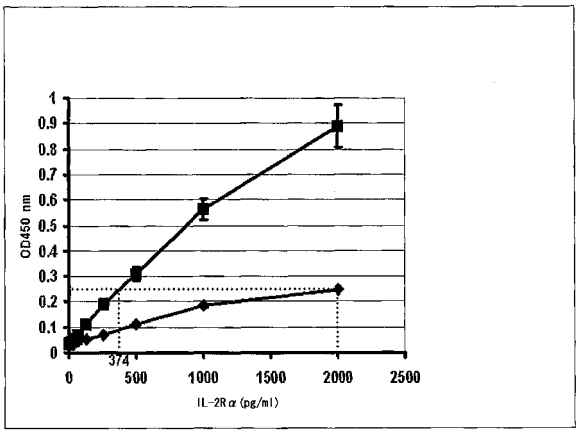
【図５】



【図６】



【図７】



【配列表】
2008529505000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2005/001780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.

C07K 14/55 (2006.01) ***C07K 16/06*** (2006.01) ***C07K 14/715*** (2006.01) ***C07K 19/00*** (2006.01) ***A61K 38/20*** (2006.01) ***C07H 21/04*** (2006.01) ***C07H 21/02*** (2006.01) ***A61P 31/20*** (2006.01)

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)
See electronic database consulted below

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
STN File MEDLINE, WPIDS, CA, BIOSIS, and keywords; # IL-2, Interleukin-2, human embryo? kidney, HEK 293, Glycosyl?, Deglyscosyl?

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHO M. S. et al., "Establishment of a human somatic hybrid cell line for recombinant protein production", J Biomed Sci, 2002 Nov-Dec; 9 (6 Pt 2): 631-8 See whole document	1, 3, 7
X	ZHENG X. X. et al.; "IL-2 receptor-targeted cytolytic IL-2/Fc fusion protein treatment blocks diabetogenic autoimmunity in nonobese diabetic mice", J. Immunol. 1999 Oct 1; 163 (7): 4041-8 See whole document	1, 3, 7

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] 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 another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 February 2006	21 FEB 2006
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer S. R. IDRUS Telephone No : (02) 6283 2659

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2005/001780

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG W. Y. et al., "Rapid purification of a new humanized single-chain Fv antibody/human interleukin-2 fusion protein reactive against HER2 receptor", Acta Biochim Biophys Sinica (Shanghai) 2004 Oct; 36 (10) 707-712 See whole document	1, 3, 7
X	Derwent Abstract Accession No: 86-110375/17, Class S03, JP 6 1053300 A (TAKEDA CHEMICAL IND KK) 17 March 1986 See whole abstract	1, 3
P, X	WO 2005/021592 A2 (MERCK PATENT GMBH) 10 March 2005 See particularly page 2 line 10 to page 5 line 27, page 8 lines 7-10, page 14 lines 5-19, and Example 2	1, 3, 13-16
X	WO 2005/007121 A2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 27 January 2005 See particularly page 2 line 2 to page 5 line 30, page 12 line 13 to page 13 line 24, page 18 line 5 to page 19 line 29	1, 3, 13-16
X	Derwent Abstract Accession No: 2003-449162/42 Class A96, B04, D16 (B05) WO 2003/031464 A2 (NEOSE TECHNOLOGIES INC.) 17 April 2003 See whole abstract	1, 3
X	WO 2002/066514 A2 (MERCK PATENT GMBH) 29 August 2002 See particularly page 2 lines 1-16, page 10 line 1 to page 11 line 20, page 28 line 11	1, 3
X	SUTTMANN H. et al., "Stimulation of neutrophil granulocytes with *Mycobaterium bovis* bacillus Calmete-Guerin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis", Infection and Immunity (2003 Aug) 71 (8) 4647-56 See whole document	1, 3
X	KREITMAN R. J., "Toxin-labeled monoclonal antibodies", Current Pharmaceutical Biotechnology (2001 Dec) 2 (4) 313-25 See whole document	1, 3
X	TERAMOTO H. et al., "Tyrosine phosphorylation of the *vav* proto-oncogene product links FcepsilonRI to the Rac1-JNK pathway", Journal of Biological Chemistry (1997 Apr 18) 272 (16) 10751-5 See whole document	1, 3
X	US 5824330 A (MERTELSMANN et al.) 20 October 1998 See col. 1 lines 25-31; col. 5 lines 14-17; col. 7 line 55 et. seq.	1, 3
X	US 4908434 A (MERTELSMANN et al.) 13 March 1990 See col. 1 lines 18-21; col. 5 lines 30-34; col. 8 line 8 et. seq.; claims	1, 3
X	US 4925919 A (MERTELSMANN et al.) 15 May 1990 See col. 1 lines 17-20; col. 5 lines 28-32; col. 8 line 32 et. seq.; claims	1, 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2005/001780

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4751183 A (SONNEBRON et al.) 14 June 1988 See col. 1 lines 55-59; col. 2 lines 9-11; col. 3 lines 59-62; and Claim 11	1, 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2005/001780

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1, 2
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 separate 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:
Multiple inventions are covered by claims 1-16. In response to an Invitation to Pay Additional Fees, the applicants elected to pay 2 additional search fees and specifically requested that Interleukin-2 (IL-2), IL-2Rα-Fc and IL-2Rγ-Fc as defined by Tables 1, 2, and 3 be searched.

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:
1-20 (in parts) for Interleukin-2 (IL-2), IL-2Rα-Fc and IL-2Rγ-Fc as defined by Tables 1, 2, and 3

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/AU2005/001780

Supplemental Box
(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: II.2

Present claims 1 and 2 relate to an extremely large number of possible proteins as the physiochemical parameters place no limitation on the claims. Support within the meaning of Article 6 of the PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 of the PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the proteins claimed.

For this reason, a meaningful search over the whole breadth of claims 1 and 2 is impossible.

In response to an Invitation to Pay Additional Fees, the applicants elected to pay 2 additional search fees and specifically requested that Interleukin-2 (IL-2), IL-2Rα-Fc and IL-2Rγ-Fc as defined by Tables 1, 2, and 3 be searched. Accordingly, the search had been so restricted.

The applicants' attention is drawn to the fact that claims, or part of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/AU2005/001780

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
JP	3653300	JP	8217501				
WO	2005/021592	US	2005069521				
WO	2005/007121	US	2005142106				
WO	2003/031464	AU	2002351197	AU	2002351199	AU	2003287035
		AU	2004236174	BR	0315178	CA	2462930
		CA	2468230	CA	2468295	CA	2501832
		CA	2506646	CA	2522345	CN	1635901
		EP	1461444	EP	1461445	EP	1578771
		EP	1581622	EP	1615945	US	2004043446
		US	2004063911	US	2004077836	US	2004082026
		US	2004115168	US	2004126838	US	2004132640
		US	2004137557	US	2004142856	US	2005031584
		US	2005064540	US	2005100982	US	2005106658
		US	2005118672	WO	2003/045980	WO	2003/046150
		WO	2004/033651	WO	2004/099231		
WO	2002/066514	BR	0207267	CA	2438628	CN	1492768
		EP	1361891	HU	0303171	MX	PA03007323
		PL	362324	RU	2003127387	US	2004082039
		ZA	200307323				
US	5824330, 4908434, 4925919	EP	0092163	JP	58190397	US	4778879
		US	4908433	US	4908434	US	4925919
US	4751183	DE	3329449	EP	0133551	JP	60110288

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 38/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02	
Ａ６１Ｋ 39/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00 Ｈ	
Ａ６１Ｐ 37/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04	
Ｇ０１Ｎ 33/531	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/531 Ｂ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53 Ｐ	

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

(72)発明者 プリースト ジョン ディー.
オーストラリア連邦 ニューサウスウェールズ州 バルメーン グラフトン ストリート １２ビー
(72)発明者 ワッツ アラン ディー.
オーストラリア連邦 ニューサウスウェールズ州 ディー ホワイ アンダークリフ ストリート ３１
(72)発明者 ホイッタカー ジェイソン エス.
オーストラリア連邦 ニューサウスウェールズ州 レッドフェーン イースト マディソン ストリート ２４
(72)発明者 ピルキントン グレン アール.
オーストラリア連邦 ビクトリア州 ライ アラーラ ストリート ６
(72)発明者 リデル キャサリン エイ.
オーストラリア連邦 ニューサウスウェールズ州 キングスグローブ キャロライン ストリート ６

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA27 BA44 BA63 CA07 DA03 HA17
4C084 AA02 AA07 BA41 BA44 CA53 DA14 NA03 NA05 NA06 ZB022 ZB092
4C085 AA03 BB17 BB42 DD62 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA04 DA50 DA75 EA28 FA74 GA22

专利名称(译)	分子及其嵌合分子		
公开(公告)号	JP2008529505A	公开(公告)日	2008-08-07
申请号	JP2007554384	申请日	2005-11-24
申请(专利权)人(译)	阿波罗生命科学有限公司		
[标]发明人	プリーストジョンディー ワッツアランディー ホイッタカージェイソンエス ピルキントングレンアール リデルキャサリンエイ		
发明人	プリースト ジョン ディー. ワッツ アラン ディー. ホイッタカー ジェイソン エス. ピルキントン グレン アール. リデル キャサリン エイ.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/55 C07K16/18 C07K19/00 C07K14/715 A61K38/00 A61K39/00 A61P37/04 G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P31/20 A61P37/04 C07K14/55 C07K14/7155 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/55 C07K16/18 C07K19/00 C07K14/715 A61K37/02 A61K39/00.H A61P37/04 G01N33/531.B G01N33/53.P		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA27 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA07 4B024/DA03 4B024/HA17 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DA14 4C084/NA03 4C084/NA05 4C084/NA06 4C084/ZB022 4C084/ZB092 4C085/AA03 4C085/BB17 4C085/BB42 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA04 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/FA74 4H045/GA22		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/653323 2005-02-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般涉及蛋白质，诊断，治疗和营养领域。 更具体地，本发明提供了在IL-2蛋白家族中或与之相关的分离的蛋白质分子，例如IL-2，IL-2Ra，IL-2Rb，IL-2Rg或其嵌合分子，例如IL-2-Fc ； IL-2Ra-Fc，IL-2Rb-Fc和IL2Rg-Fc，包含至少一部分蛋白质分子； 其中所述蛋白质或其嵌合分子具有可测量的理化参数的概况，其中所述概况指示一种或多种药理性状，与之相关或形成其基础。 本发明进一步考虑了分离的蛋白质或其嵌合分子在一系列诊断，预防，治疗，营养和/或研究应用中的用途。

配列識別子	配列
SEQ ID NO:1	ヒトIgG1 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:2	ヒトIgG1 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:3	ヒトIgG1 Fcヌクレオチド配列（変種）
SEQ ID NO:4	ヒトIgG1 Fcアミノ酸配列（変種）
SEQ ID NO:5	ヒトIgG2 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:6	ヒトIgG2 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:7	ヒトIgG3 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:8	ヒトIgG3 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:9	ヒトIgG4 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:10	ヒトIgG4 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:11	ヒトIgA1 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:12	ヒトIgA1 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:13	ヒトIgA2 Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:14	ヒトIgA2 Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:15	ヒトIgM Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:16	ヒトIgM Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:17	ヒトIgE Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:18	ヒトIgE Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:19	ヒトIgD Fcヌクレオチド配列
SEQ ID NO:20	ヒトIgD Fcアミノ酸配列
SEQ ID NO:21	ヒトIgG1 Fcフォワードプライマー（pIRESbleo IPクローニング用）（ヌクレオチド配列）
SEQ ID NO:22	ヒトIgG1 Fcリバースプライマー（pIRESbleo IPクローニング用）（ヌクレオチド配列）
SEQ ID NO:23	ヒトIgG1 Fcフォワードプライマー（pIRESbleo GSSNTクローニング用）（ヌクレオチド配列）
SEQ ID NO:24	ヒトIgG1 Fcリバースプライマー（pIRESbleo GSSNTクローニング用）（ヌクレオチド配列）