(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5991963号
(P5991963)

(45)発行日　平成28年9月14日(2016.9.14)　(24)登録日　平成28年8月26日(2016.8.26)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/00	(2006.01)	C07K	14/00	
C12N 9/00	(2006.01)	C12N	9/00	
C07K 16/40	(2006.01)	C07K	16/40	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	

請求項の数 33　(全 232 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-508290 (P2013-508290)
(86)(22)出願日　平成23年4月29日(2011.4.29)
(65)公表番号　特表2013-531974 (P2013-531974A)
(43)公表日　平成25年8月15日(2013.8.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/034626
(87)国際公開番号　WO2011/139907
(87)国際公開日　平成23年11月10日(2011.11.10)
審査請求日　平成26年4月7日(2014.4.7)
(31)優先権主張番号　61/330,783
(32)優先日　平成22年5月3日(2010.5.3)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/329,470
(32)優先日　平成22年4月29日(2010.4.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　512264080
エータイアー　ファーマ，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２１２１，　サンディエゴ，　ジョン　ホプキンス　コート　３５４５，　スイート　ナンバー２５０
(73)特許権者　511225594
パング　バイオファーマ　リミテッド
中華人民共和国　香港　クイーンズ　ロード　セントラル　１５，　ザ　ランドマーク，　エジンバラ　タワー，　１８／エフ
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バリルｔＲＮＡ合成酵素のタンパク質フラグメントに関連した治療用、診断用および抗体組成物の革新的発見

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
治療用組成物であって、
前記治療用組成物は、配列番号７６、１４、７４、または７８、あるいは、配列番号７６、１４、７４、または７８の２００個以上の連続するアミノ酸であるそのフラグメントと少なくとも９０％同一である配列からなる単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチドを含み、
前記ＡＡＲＳポリペプチドは、細胞外シグナル伝達活性を有し、かつ少なくとも５ｍｇ／ｍＬの溶解度を有し、
前記組成物の純度がタンパク質ベースで少なくとも９５％であり、エンドトキシンが１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満である、
治療用組成物。
【請求項２】
前記ＡＡＲＳポリペプチドが、配列番号７６、１４、７４、または７８からなるか、あるいは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１個のアミノ酸の置換、削除、および/または付加によって配列番号７６、１４、７４、または７８とは異なる、請求項１に記載の治療用組成物。
【請求項３】
前記ＡＡＲＳポリペプチドが、異種ポリペプチドとポリペプチドと融合する、請求項１または２に記載の治療用組成物。

【請求項４】
前記異種ポリペプチドが、精製タグ、エピトープタグ、標的化配列、シグナルペプチド、膜転位配列およびＰＫ調節物質からなる群より選択される、請求項３に記載の治療用組成物。
【請求項５】
配列番号７６、１４、７４、または７８、あるいは、配列番号７６、１４、７４、または７８の２００個以上の連続するアミノ酸であるそのフラグメントと少なくとも９０％同一である配列からなり、細胞外シグナル伝達活性を有する、単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチド。
【請求項６】
前記ＡＡＲＳポリペプチドが、配列番号７６、１４、７４、または７８からなるか、あるいは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１個のアミノ酸の置換、削除、および/または付加によって配列番号７６、１４、７４、または７８とは異なる、請求項５に記載の単離ＡＡＲＳポリペプチド。
【請求項７】
異種ポリペプチドとポリペプチドと融合する、請求項５または６に記載の単離ＡＡＲＳポリペプチド。
【請求項８】
前記異種ポリペプチドが、精製タグ、エピトープタグ、標的化配列、シグナルペプチド、膜転位配列およびＰＫ調節物質からなる群より選択される、請求項７に記載のＡＡＲＳポリペプチド。
【請求項９】
前記ポリペプチドが、少なくとも５ｍｇ／ｍＬの溶解度を有し、組成物の純度がタンパク質ベースで少なくとも９５％であり、エンドトキシンが１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満である、請求項５～８のいずれか一項に記載の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチドを含む、組成物。
【請求項１０】
少なくとも１つの部分が、前記ポリペプチドと共有結合または非共有結合しているか、あるいは、固体基質が前記ポリペプチドに付着している、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
請求項５または６に記載の単離ＡＡＲＳポリペプチドに対する結合特異性を示す、単離された抗体。
【請求項１２】
請求項１１に記載の抗体を含む治療用組成物であって、ここで前記抗体は、前記ポリペプチドに対して少なくとも１ｎＭの親和性を有する、治療用組成物。
【請求項１３】
細胞組成物または増殖装置であって、
前記細胞組成物または増殖装置は、請求項５～８のいずれか一項に記載のアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチド、およびエレメントを含み、
前記エレメントは、
（ｉ）操作された細胞集団であって、少なくとも１個の細胞が前記ＡＡＲＳポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、前記細胞は無血清培地で増殖することができる、操作された細胞集団、ならびに、
（ｉｉ）操作された細胞集団であって、少なくとも１個の細胞が前記ＡＡＲＳポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む操作された細胞集団と、少なくとも１０リットルの無血清細胞培地と、無菌容器
からなる群より選択される、
細胞組成物または増殖装置。
【請求項１４】
単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリヌクレオチドまたは発現ベクター

であって、請求項５～８のいずれか一項に記載のＡＡＲＳポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリヌクレオチド。

【請求項１５】

試料中のＡＡＲＳポリペプチドの存在またはレベルを決定するためのキットの製造における、１つ以上の請求項１１に記載の単離された抗体の使用。

【請求項１６】

請求項５または６に記載のアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定する方法であって、

前記方法は、

ａ）適当な条件下で、前記ＡＡＲＳポリペプチドと少なくとも１つの試験化合物とを混合すること、および

ｂ）前記ＡＡＲＳポリペプチドと前記試験化合物との結合を検出して、それにより前記ＡＡＲＳポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定すること、

を含む、方法。

【請求項１７】

請求項１４に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは発現ベクター、および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項１８】

細胞の細胞活性またはタンパク質を調節するための医薬またはキットの製造における、請求項５～８のいずれか一項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、請求項１１に記載の抗体、または請求項１４に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは発現ベクター、または請求項１７に記載の医薬組成物の使用。

【請求項１９】

請求項５または６に記載のＡＡＲＳポリペプチドのタンパク質分解生成を可能にする異種性タンパク質分解部位を含む、操作された完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質。

【請求項２０】

慢性肉芽腫性疾患（ＣＧＤ）または顆粒球の酸化バーストが損なわれた状態を治療するための医薬の製造における、請求項１～４のいずれか一項に記載の治療用組成物、請求項５～８のいずれか一項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、あるいは請求項１４に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは発現ベクターの使用。

【請求項２１】

前記抗体の前記ＡＡＲＳポリペプチドに対する親和性は、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドに対するその親和性よりも１０倍以上強い、請求項１２に記載の治療用組成物。

【請求項２２】

前記抗体は、前記ＡＡＲＳポリペプチドの細胞外シグナル伝達活性に拮抗する、請求項１２に記載の治療用組成物。

【請求項２３】

神経学的疾患を治療するための医薬の製造における、請求項１～４のいずれか一項に記載の治療用組成物、請求項５～８のいずれか一項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、あるいは請求項１４に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは発現ベクターの使用。

【請求項２４】

請求項１１に記載の１つ以上の抗体を含む、試料におけるＡＡＲＳポリペプチドの存在またはレベルを決定するためのキット。

【請求項２５】

前記神経学的疾患が神経炎症、神経変性、または、脳の虚血である、請求項２３に記載の使用。

【請求項２６】

炎症性疾患を治療するための医薬の製造における、請求項１～４のいずれか一項に記載の

治療用組成物、請求項５～８のいずれか一項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、あるいは請求項１４に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは発現ベクターの使用。
【請求項２７】
前記炎症性疾患が、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、自己免疫および肺高血圧症から選択される、請求項２６に記載の使用。
【請求項２８】
細胞の細胞活性またはタンパク質を調節するための医薬またはキットであって、請求項５～８のいずれか一項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、請求項１１に記載の単離された抗体、請求項１４に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは発現ベクター、あるいは請求項１７に記載の医薬組成物を含む、医薬またはキット。
【請求項２９】
慢性肉芽腫性疾患（ＣＧＤ）または顆粒球の酸化バーストが損なわれた状態を治療するための医薬であって、請求項１～４のいずれか一項に記載の治療用組成物、請求項５～８のいずれか一項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、あるいは請求項１４に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含む、医薬。
【請求項３０】
神経学的疾患を治療するための医薬であって、請求項１～４のいずれか一項に記載の治療用組成物、請求項５～８のいずれか一項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、あるいは請求項１４に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含む、医薬。
【請求項３１】
前記神経学的疾患が神経炎症、神経変性、または、脳の虚血である、請求項３０に記載の医薬。
【請求項３２】
炎症性疾患を治療するための医薬であって、請求項１～４のいずれか一項に記載の治療用組成物、請求項５～８のいずれか一項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、あるいは請求項１４に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは発現ベクターを含む、医薬。
【請求項３３】
前記炎症性疾患が、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、自己免疫および肺高血圧症から選択される、請求項３２に記載の医薬。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、米国特許法第１１９条（ｅ）の下、２０１０年４月２９日に出願された米国特許仮出願第６１／３２９，４７０号および２０１０年５月３日に出願された米国特許仮出願第６１／３３０，７８３号の利益を主張するものであり、上記各明細書の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表に関する記述
本願に関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキストフォーマットで提供され、ここにおいて参照により本明細書に組み込まれる。配列表を掲載しているテキストファイル名は１２０１６１＿４９２ＰＣ＿ＳＥＱＵＥＮＣＥ＿ＬＩＳＴＩＮＧ．ｔｘｔである。このテキストファイルは約４２３ＫＢであり、２０１１年４月２５日に作成され、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子的に提出されている。
【０００３】
本発明は概略的には、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素およびその他のタンパク質の新規に同定されたタンパク質フラグメント、それをコードするポリヌクレオチドおよびその相補体を含む組成物、関連薬剤、ならびに診断、創薬、研究および治療への応用におけるその使用法に関する。
【背景技術】

【０００４】
４０年以上の間、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳｓ）は、タンパク質翻訳過程における遺伝情報解読の一部であるｔＲＮＡ分子のアミノアシル化を触媒する、不可欠なハウスキーピングタンパク質であると考えられていた。この点においてＡＡＲＳは広く研究され、その完全長配列の多くが、配列解析のために、また豊富な生化学実験の入手源を提供するためにクローニングされた。しかし、ＡＡＲＳおよびその他のタンパク質の一部のフラグメントは、タンパク質翻訳以外の経路を調節する細胞外シグナル伝達活性を含めた、アミノアシル化とは関係のない予想外の活性を有する。一般にこのような予想外の活性は、完全長または親タンパク質配列との関連においては見られず、代わりに、その親配列からＡＡＲＳタンパク質フラグメントを除去または切除するか、またはフラグメントのＡＡＲＳ配列を発現させて十分に精製してから、合成酵素と無関係な新規な活性に関して試験することにより見られる。
【０００５】
ＡＡＲＳの完全長配列は以前から知られていたが、このようなＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたは関連タンパク質のタンパク質フラグメントを解明するための、または完全長ＡＡＲＳタンパク質のアミノ酸合成関連以外の新規な生物活性の潜在的役割を評価するための体系的な実験的解析は行われてこなかった。本明細書の一部では、このようなＡＡＲＳタンパク質フラグメント、ＡＡＲＳドメインまたはＡＡＲＳの選択的スプライスバリアントを、本明細書では「リセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）」と呼ぶ。「リセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）」という用語は、その最も広い文脈において、その新規な生物活性を覆い隠す場合が多い、その天然の完全長または親タンパク質配列との関連から切り取られたまたは限定された（タンパク質分解、選択的スプライシング、変異誘発または組換え遺伝子工学のいずれかの手段により）タンパク質の一部分を指す。同様に、種々の医学的状態の治療におけるこのようなリセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）のバイオセラピューティック剤、診断剤または薬物標的としての使用、またはそのヒト疾患との潜在的な関連性を探るための体系的な実験的解析は行われていない。哺乳動物において生命に重要な既知の機能を有する不可欠なハウスキーピング遺伝子として、ＡＡＲＳは、哺乳動物における薬物標的として考えられたことはなく、また非合成酵素活性を有するリセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）を同定するために、標準的なゲノム配列決定、バイオインフォマティクスまたはそれと同様の努力よって解析されることもなかった。同様に、標準的な生化学研究の努力は、ＡＡＲＳリセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）の生物学的特性およびその治療および診断との潜在的な関連性を特徴付けることとは異なる方向に向けられてきたが、それは主として、その対応する完全長親ＡＡＲＳの役割が既に理解されているからである。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本発明の実施形態は概略的には、細胞外シグナル伝達活性のような非カノニカルな生物活性ならびに／または治療および診断関連のその他の特徴を有するアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）のタンパク質フラグメントの発見に関する。ＡＡＲＳは、あらゆる生物体で見られるタンパク質合成機構の普遍的かつ不可欠な要素であるが、ヒトＡＡＲＳおよびその関連タンパク質は、ヒトの正常な機能に寄与する強力な細胞シグナル伝達活性を有する、天然の切除されたバリアントを有する。これらのタンパク質フラグメントの活性は、ＡＡＲＳに関して一般に知られているタンパク質合成活性とは異なるものであり、本発明は、新規なバイオセラピューティック剤、新規な発見研究用試薬としての、また多種多様なヒト疾患、例えば炎症性、血液性、神経変性性、自己免疫性、造血性、心血管性および代謝性の疾患または障害などに対する可能性のある治療または診断に使用し得る指向性の生物製剤および診断剤のための新規な抗原／標的としての、これらの切除されたタンパク質の発見および開発を含む。
【０００７】
したがって、本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメント（１つまたは複数）を「リセク

チン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）」または代わりに「アペンダクリン（ａｐｐｅｎｄａｃｒｉｎｅ）」と呼ぶ場合がある。上述のように、「リセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）」という用語は、所与のＡＡＲＳタンパク質フラグメントを、通常はその非カノニカルな活性を覆い隠しているその完全長親ＡＡＲＳ配列との関連から切り取るまたは切除する過程に由来する。ある場合には、本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメントおよびポリヌクレオチドは、天然に存在するもの（例えば、タンパク質分解性のスプライスバリアント）、人工的に誘導されたものまたは予測されたものを問わず、この切除過程が生じることにより同定された。「アペンダクリン（ａｐｐｅｎｄａｃｒｉｎｅ）」という用語は、「ａｐｐｅｎｄ（付加する）」（ラテン語「ａｐｐｅｎｄｅｒ」に由来）と「ｓｅｐａｒａｔｅ（分離する）」または「ｄｉｓｃｅｒｎ（識別する）」こと（ギリシャ語「ｃｒｉｎｅｓ」に由来）とを組み合わせたものに由来し、これもＡＡＲＳタンパク質フラグメントの１つ以上の付加ドメインをその対応する完全長または親ＡＡＲＳ配列から分離することを表している。

【０００８】

少数のＡＡＲＳフラグメントが非合成酵素活性を有することが既に示されているが、このようなフラグメントのバイオセラピューティック、発見または診断での使用のための発現、単離、精製および特徴付けは限られており、このような活性がＡＡＲＳの全ファミリーの各メンバーまたは別のフラグメントと関連があるということを、当業者は容易に理解しなかったであろう。ここでは系統的アプローチを用いて、バイオセラピューティック発見および診断での使用に関して２０のミトコンドリアＡＡＲＳおよび２０の細胞質ＡＡＲＳ（および関連タンパク質）のＡＡＲＳタンパク質フラグメントを発見し、検証した。例えば、本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメント（１つまたは複数）およびそれをコードするポリヌクレオチドの特定のものは、主としてタンパク質分解フラグメントを同定する質量分析を用いて生物試料から同定され、他のものは、主としてスプライスバリアントを同定するディープシークエンシング技術により同定された。他のＡＡＲＳタンパク質フラグメント（１つまたは複数）は、例えばヒトおよび下等生物由来の合成酵素を鍵となる境界（例えば、プロテアーゼ部位）とともにコンピュータで比較するなどして、アミノ酸配列のコンピュータ予測を用いて同定される；このアプローチでは、非カノニカルな生物活性を有するタンパク質分解フラグメントおよび機能ドメインを識別する特定の基準に基づく完全長ＡＡＲＳの配列解析を用いた。

【０００９】

ＡＡＲＳの新規なリセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）は予想外であり、その差次的発現も予想外である。特定の切除は通常、異なる処理下で（例えば、有血清または無血清培地で増殖した細胞から）、異なる成長段階（例えば、成体脳対胎児脳）において、異なる組織タイプ（例えば、膵臓対肝臓）で見られる。すべてのアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素にカノニカルな機能が同じ細胞部位において、比較的均整のとれた量で必要とされるにもかかわらず、発現パターンがすべてのアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素で同じというわけではない。同時に他のアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素活性の量が増加することなく、１つのアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素活性のレベルが増加するとは考えられないであろう。質量分析法およびディープシークエンシングのデータは、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素リセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）は、確かにレベルが様々であり、また異なる部位で、異なる段階で生じるということを示している。

【００１０】

さらに、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントを発現させ、その生物学的特性を識別するのに十分な純度にまで精製することができる。これまでフラグメントは、非合成酵素活性の適切な生物学的特徴付けができるほど純度、フォールディングおよび安定性が十分ではないことが多かった。例えば、細胞ベースのアッセイを純度、安定性、可溶性およびフォールディングが十分なリセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）とともに用いて、その重要なバイオセラピューティック、発見または診断の活性を明らかにする。

【００１１】

具体的には、本発明の実施形態は、バリルｔＲＮＡ合成酵素のタンパク質フラグメント、関連する薬剤、およびバイオセラピューティック、発見または診断での使用のための組成物、ならびにその使用法に関する。本発明の組成物は、本明細書に記載されているような各種診断、創薬および治療応用において有用である。好ましくは、ＡＡＲＳタンパク質およびフラグメントを精製し、このようなバイオセラピューティック、発見または診断での使用で必要とされるまで適当な条件下で保管する。

【００１２】

特定の実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含み、かつ溶解度が少なくとも約５ｍｇ／ｍｌである、少なくとも約１００、９０、８０、７０、６０、５０または４０アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントを含む組成物を含み、組成物の純度はタンパク質ベースで少なくとも約９５％、組成物のエンドトキシンは約１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満である。一態様では、組成物は治療用組成物である。特定の実施形態では、組成物は実質的に無血清である。いくつかの実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントは非カノニカルな活性を含む。いくつかの実施形態では、非カノニカルな生物活性は、細胞外シグナル伝達の調節、細胞増殖の調節、細胞分化の調節、遺伝子転写の調節、サイトカイン産生もしくは活性の調節、サイトカイン受容体活性の調節および炎症の調節から選択される。いくつかの実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントは、細胞ベースの非カノニカルな生物活性に関して、EC_{50}が約１ｎＭ、約５ｎＭ、約１０ｎＭ、約５０ｎＭ、約１００ｎＭ未満または約２００ｎＭ未満である。

【００１３】

特定の実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントは異種ポリペプチドと融合している。いくつかの実施形態では、ＡＡＲＳ融合タンパク質は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性を実質的に保持している。いくつかの実施形態では、ＡＡＲＳ融合タンパク質は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性を抑制する。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドはＡＡＲＳタンパク質フラグメントのＮ末端に結合している。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドはＡＡＲＳタンパク質フラグメントのＣ末端に結合している。上記いずれかの実施形態の一態様では、異種ポリペプチドは、精製タグ、エピトープタグ、標的化配列、シグナルペプチド、膜転位配列およびＰＫ調節物質からなる群より選択される。

【００１４】

特定の実施形態では、組成物は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントを少なくとも約１０ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。特定の実施形態では、組成物は、少なくとも９０％の単分散であるＡＡＲＳタンパク質フラグメントを含む。特定の実施形態では、組成物は、約３％未満の高分子量凝集タンパク質を含む。特定の実施形態では、組成物は、４℃で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管された場合、３％未満の凝集を示す。特定の実施形態では、組成物は、室温で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管された場合、３％未満の凝集を示す。

【００１５】

リセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）のこのような特性を測定するための各種アッセイが本明細書に記載され、本発明の態様を定義するために使用され得る。特定の態様では、これらの特性は、本明細書に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントのバイオセラピューティックでの使用に好ましいものである。

【００１６】

特定の実施形態は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０個のアミノ酸の置換、削除および／または付加により表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列とは異なる、少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントを含

む組成物を含み、改変タンパク質フラグメントは、実質的に未改変タンパク質の非カノニカルな活性を保持しているか、または非カノニカルな活性に関してドミナントネガティブ表現型を有し、タンパク質フラグメントの溶解度は少なくとも約５ｍｇ／ｍｌであり、組成物の純度はタンパク質ベースで少なくとも約９５％、組成物のエンドトキシンは約１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満である。特定の実施形態では、組成物は実質的に無血清である。

【００１７】

他の実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されている単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと特異的に結合する単離抗体を含む組成物を含み、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントに対する抗体の親和性は、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドに対するその親和性よりも約１０倍強い。本発明の驚くべき態様の１つは、抗体またはその他の指向性生物製剤が接近しやすい「新規な」表面を有する特定のリセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）を含むが、これに対し完全長ＡＡＲＳは、他の配列または近接するドメインでこれらの表面を「隠している」か、または覆っている。また切除過程により、これまでに未同定の生物活性を明らかにするための水への露出度も高まり得る。いくつかの実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されている単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと特異的に結合する単離抗体を含む組成物を含み、抗体は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントに対する少なくとも約１０ｎＭの親和性および対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドに対する少なくとも約１００ｎＭの親和性を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載されているＡＡＲＳポリペプチドに固有のスプライスジャンクション内にあるエピトープ、あるいはこのスプライス部位のアミノ酸配列Ｃ末端と結合する。特定の実施形態では、抗体は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性に拮抗する。このようなアンタゴニストは、対応する親または完全長ＡＡＲＳと任意に結合し得る。

【００１８】

他の態様は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の実質的に純粋なアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと結合する結合パートナーとを含むバイオアッセイ系に関する。一態様では、結合パートナーは、細胞表面受容体タンパク質、核酸、脂質膜、細胞調節タンパク質、酵素および転写因子からなる群より選択される。任意に、このような受容体は細胞、好ましくは、明らかになったリセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）の生物学に関連した細胞の一部であり得る。

【００１９】

特定の実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、少なくとも１個の細胞が前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む操作された細胞集団とを含む、細胞組成物を含む。一態様では、細胞は無血清培地で増殖することができる。

【００２０】

また、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも５０または１００アミノ酸の実質的に純粋なアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、タンパク質フラグメントと結合する細胞表面受容体またはその細胞外部分を含む細胞と、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと細胞外受容体の間の結合または相互作用を調節する約２０００ダルトン未満の分子または第二のポリペプチドとを含む、検出系も含ま

れる。

【００２１】

特定の実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の実質的に純粋なアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと結合する細胞表面受容体またはその細胞外部分を含む細胞とを含む診断系を含み、系または細胞は、細胞表面受容体またはその細胞外部分のレベルまたは活性の変化の検出を可能にする指示分子を含む。

【００２２】

特定の実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、少なくとも１個の細胞が前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む操作された細胞集団と、少なくとも約１０リットルの無血清細胞培地と、無菌容器とを含む、細胞増殖装置を含む。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法または組成物のいずれかで使用する細胞は、任意に抗生物質と誘導物質とを含む無血清培地中で増殖することができる。

【００２３】

いくつかの実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数に）に記載されているＡＡＲＳスプライスバリアントの固有のスプライスジャンクションを標的とする配列を含む、アンチセンスまたはＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）剤に関する。

【００２４】

また、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントを含む治療用組成物も含まれ、タンパク質フラグメントは結合パートナーと特異的に結合し、かつ少なくとも約５ｍｇ／ｍｌの溶解度を有し、組成物の純度は、タンパク質ベースで少なくとも約９５％である。いくつかの態様では、組成物のエンドトキシンは１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満である。

【００２５】

また、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一である少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントを含む組成物も含まれ、タンパク質フラグメントの溶解度は少なくとも約５ｍｇ／ｍｌであり、組成物の純度はタンパク質ベースで少なくとも約９５％、組成物のエンドトキシンは１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満である。任意の上記実施形態では、組成物は、自身の見かけの分子質量に対して少なくとも約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％または約９５％の単分散であるＡＡＲＳタンパク質フラグメントを含み得る。任意の上記実施形態の別の態様では、組成物は、約１０％未満（タンパク質ベース）の高分子量凝集タンパク質、または約５％未満の高分子量凝集タンパク質、または約４％未満の高分子量凝集タンパク質、または約３％未満の高分子量凝集タンパク質、または２％未満の高分子量凝集タンパク質、または約１％未満の高分子量凝集タンパク質を含む。

【００２６】

任意の上記実施形態の別の態様では、組成物は、４℃で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管された場合、約１０％未満の凝集、または４℃で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管された場合、約５％未満の凝集、または４℃で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管された場合、約３％未満の凝集、または４℃で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管され

た場合、約２％未満の凝集、または４℃で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管された場合、約１％未満の凝集を示す。

【００２７】

特定の実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の実質的に純粋なアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、それと共有結合または非共有結合している少なくとも１つの部分とを含む、組成物を含む。いくつかの実施形態では、部分は検出可能な標識である。いくつかの実施形態では、部分は水溶性ポリマーである。いくつかの実施形態では、部分はＰＥＧである。任意の上記実施形態の一態様では、部分はタンパク質フラグメントのＮ末端と結合している。任意の上記実施形態の一態様では、部分はタンパク質フラグメントのＣ末端と結合している。

【００２８】

特定の実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントあるいはその生物学的に活性なフラグメントまたはバリアントと結合した固体基質を含む組成物を含み、タンパク質フラグメントの溶解度は少なくとも約５ｍｇ／ｍｌであり、組成物の純度はタンパク質ベースで少なくとも約９５％である。

【００２９】

また、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されている単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと特異的に結合する結合物質を含む組成物も含まれ、結合物質剤は、タンパク質フラグメントに対して少なくとも約１ｎＭの親和性を有する。一態様では、結合物質は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載されているＡＡＲＳポリペプチドに固有のスプライスジャンクション内にあるエピトープ、あるいはこのスプライス部位のアミノ酸配列Ｃ末端と結合する。いくつかの実施形態では、結合物質は、ＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性に拮抗する。

【００３０】

特定の実施形態は、本明細書に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントのアミノ酸配列、本明細書に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列、またはそのバリアントもしくはフラグメントを含む、単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチドを含む。特定のＡＡＲＳポリペプチドは、表１～３（１つもしくは複数）もしくは表４～６（１つもしくは複数）もしくは表７～９（１つもしくは複数）または表Ｅ２に開示されているＡＡＲＳ参照配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一である、アミノ酸配列を含む。特定のＡＡＲＳポリペプチドは、表１～３（１つもしくは複数）もしくは表４～６（１つもしくは複数）もしくは表７～９（１つもしくは複数）または表Ｅ２に開示されているＡＡＲＳ参照配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一であるアミノ酸配列から実質的になる。特定の実施形態では、ポリペプチドは非カノニカルな生物活性を含む。特定の実施形態では、非カノニカルな生物活性は、細胞シグナル伝達（例えば、細胞外シグナル伝達）の調節、細胞増殖の調節、細胞遊走の調節、細胞分化の調節、アポトーシスもしくは細胞死の調節、血管新生の調節、細胞結合の調節、細胞代謝の調節、細胞内取込みの調節、遺伝子転写の調節、または分泌、サイトカイン産生もしくは活性の調節、サイトカイン受容体活性の調節および炎症の調節から選択される。

【００３１】

他の態様は、本明細書に記載の単離ＡＡＲＳポリペプチド、ＡＡＲＳポリペプチドの結合パートナーまたは両者の複合体に対する結合特性を示す、抗体およびその他の結合物質を含む。いくつかの実施形態では、ＡＡＲＳポリペプチドに対する抗体または結合物質の

親和性は、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドに対するその親和性よりも約１０倍強い。特定の実施形態では、結合物質は、ペプチド、ペプチド模倣物、アドネクチン、アプタマーおよび小分子から選択される。特定の実施形態では、抗体または結合物質は、ＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性に拮抗する。他の実施形態では、抗体または結合物質は、ＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性を刺激する。

【００３２】

特定の実施形態は、本明細書に記載のＡＡＲＳポリポリヌクレオチドのヌクレオチド配列、本明細書に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントをコードするヌクレオチド配列、またはそのバリアント、フラグメントもしくは相補体を含む、単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリヌクレオチドを含む。特定のＡＡＲＳポリヌクレオチドは、表１～３（１つもしくは複数）もしくは表４～６（１つもしくは複数）もしくは表７～９（１つもしくは複数）または表Ｅ２に開示されているＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチドと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一であるヌクレオチド配列またはその相補体を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、細菌での発現に対してコドン最適化されている。一態様では、ヌクレオチド配列は、表Ｅ２に開示されているポリヌクレオチド配列と少なくとも８０％同一である。

【００３３】

特定のＡＡＲＳポリヌクレオチドは、表１～３（１つもしくは複数）もしくは表４～６（１つもしくは複数）もしくは表７～９（１つもしくは複数）または表Ｅ２に開示されているＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチドと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一であるヌクレオチド配列またはその相補体から実質的になる。他のＡＡＲＳポリヌクレオチドは、表１～３（１つもしくは複数）もしくは表４～６（１つもしくは複数）もしくは表７～９（１つもしくは複数）または表Ｅ２に開示されているＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか、またはそのようなヌクレオチド配列から実質的になる。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、プライマー、プローブおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される。特定の実施形態では、プライマー、プローブまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＡＡＲＳポリヌクレオチド内の特定のもしくは固有のスプライスジャンクションおよび／またはこのスプライス部位の配列３’に対して標的化されている。

【００３４】

特定の実施形態は、試料中のＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルを決定する方法を含み、この方法は、試料を本明細書に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントと特異的に結合する１つ以上の結合物質と接触させることと、結合物質の有無を検出することと、これによりＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルを決定することとを含む。他の実施形態は、試料中のＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルを決定する方法を含み、この方法は、本明細書に記載のタンパク質フラグメントを特異的に同定することができる検出器で試料を解析することと、これによりＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルを決定することとを含む。特定の実施形態では、検出器は、質量分析器（ＭＳ）、フローサイトメータ、タンパク質イメージング装置、酵素結合免疫吸着測定（ＥＬＩＳＡ）またはタンパク質マイクロアレイである。特定の実施形態は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルを対照試料または所定の値と比較することを含む。特定の実施形態は、試料の状態を特徴付けて、それを対照と区別することを含む。特定の実施形態では、試料および対照は細胞または組織を含み、その方法は、異なる種間の細胞もしくは組織、異なる組織もしくは器官の細胞、異なる細胞発生段階の細胞、異なる細胞分化段階の細胞、異なる生理状態の細胞、または健常細胞と疾患細胞を区別することを含む。例えば、選択されたリセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）は、ストレスまたは傷害のような条件下でより大量に存在し得る。

【００３５】

特定の実施形態は、本明細書に記載のアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチドまたはその１つ以上の細胞結合パートナーと特異的に結合する化合物を同定する

発見方法およびそのような化合物を同定するための関連組成物を含み、これらは、ａ）ＡＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーまたはその両方を適当な条件下で少なくとも１つの試験化合物と結合させることと、ｂ）ＡＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーまたはその両方と試験化合物との結合を検出することにより、ＡＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーまたはその両方と特異的に結合する化合物を同定することとを含む。特定の実施形態では、試験化合物は、ポリペプチドもしくはペプチド、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、ペプチド模倣物または小分子である。特定の実施形態では、試験化合物は、ＡＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーの非カノニカルな生物活性を刺激する。他の実施形態では、試験化合物は、ＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーの非カノニカルな生物活性に拮抗する。特定の実施形態は、上記方法により同定されるアゴニスト（例えば、小分子、ペプチド）のような化合物を含む。

【００３６】

特定の実施形態は、試料中のＡＡＲＳスプライスバリアントのポリヌクレオチド配列の存在またはレベルを決定する方法を含み、この方法は、試料を本明細書に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする１つ以上のオリゴヌクレオチドと接触させることと、試料中のオリゴヌクレオチドの有無を検出することと、これによりＡＡＲＳスプライスバリアントのポリヌクレオチド配列の存在またはレベルを決定することとを含む。他の実施形態は、試料中のＡＡＲＳスプライスバリアントのポリヌクレオチド配列の存在またはレベルを決定する方法を含み、この方法は、試料を、本明細書に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドを特異的に増幅させる少なくとも２つのオリゴヌクレオチドと接触させることと、増幅反応を行うことと、増幅産物の有無を検出することと、これによりＡＡＲＳスプライスバリアントのポリヌクレオチド配列の存在またはレベルを決定することとを含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド（１つまたは複数）は、ＡＡＲＳスプライスバリアントに固有のスプライスジャンクションと特異的にハイブリダイズするか、またはこれを特異的に増幅させる。特定の実施形態は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたはスプライスバリアントの存在またはレベルを対照試料または所定の値と比較することを含む。特定の実施形態は、試料の状態を特徴付けて、それを対照と区別することを含む。特定の実施形態では、試料および対照は細胞または組織を含み、その方法は、異なる種間の細胞もしくは組織、異なる組織もしくは器官の細胞、異なる細胞発生段階の細胞、異なる細胞分化段階の細胞、または健常細胞と疾患細胞を区別することを含む。

【００３７】

いくつかの実施形態は、本明細書に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチド、本明細書に記載のＡＡＲＳポリペプチド、本明細書に記載の結合物質、または上記方法により同定されるもしくは本明細書に記載されている化合物と、薬学的に許容される添加剤もしくは担体とを含む、医薬組成物を含む。

【００３８】

特定の実施形態は、細胞の細胞活性を調節する方法を含み、この方法は、細胞を、本明細書に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチド、本明細書に記載のＡＡＲＳポリペプチド、本明細書に記載の結合物質、上記方法によるもしくは本明細書に記載の化合物、または本明細書に記載の医薬組成物と接触させることを含む。特定の実施形態では、細胞活性は、細胞増殖、細胞遊走、細胞分化、アポトーシスまたは細胞死、細胞シグナル伝達、血管新生、細胞結合、細胞内取込み、細胞分泌、代謝、サイトカイン産生または活性、サイトカイン受容体活性、遺伝子転写および炎症から選択される。一態様では、細胞は、脂肪前駆細胞、骨髄、好中球、血液細胞、肝細胞、アストロサイト、間葉系幹細胞および骨格筋細胞からなる群より選択される。

【００３９】

特定の実施形態では、細胞は対象中に存在する。特定の実施形態は、対象の治療を含み、対象は、腫瘍性疾患に関連した状態、免疫系の疾患もしくは状態、感染症、代謝性疾患、炎症性障害、神経細胞／神経疾患、筋／心血管疾患、造血異常に関連した疾患、血管新

生異常に関連した疾患または異常な細胞生存に関連した疾患を有する。

【００４０】

また医薬化合物を製造する工程も含まれ、この工程は、ａ）表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸のＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在下で、１つ以上の候補化合物のｉｎ　ｖｉｔｒｏスクリーニングを行って、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと特異的に結合する化合物を同定すること；ｂ）段階ａ）で同定された化合物に関して細胞ベースアッセイまたは生化学アッセイまたは受容体アッセイを行って、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの１つ以上の非カノニカルな活性を調節する化合物を同定すること；ｃ）任意に、段階ｂ）で同定された化合物の構造活性相関（ＳＡＲ）を評価してその構造を非カノニカルな活性の調節と関連付け、任意に、化合物を誘導して非カノニカルな活性を調節するその能力を改変すること；およびｄ）ヒトでの使用に十分な量の段階ｂ）で同定された化合物または段階ｃ）で誘導体化された化合物を生産することにより、医薬化合物を製造することを含む。

【００４１】

他の実施形態は医薬化合物を製造する工程を含み、この工程は、ａ）表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のＡＡＲＳタンパク質フラグメントと特異的に結合する細胞表面受容体またはその細胞外部分の存在下で、１つ以上の候補化合物のｉｎ　ｖｉｔｒｏスクリーニングを行って、細胞表面受容体またはその細胞外部分と特異的に結合する化合物を同定すること；ｂ）段階ａ）で同定された化合物に関して細胞ベースアッセイまたは生化学アッセイまたは受容体アッセイを行って、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの１つ以上の非カノニカルな活性を調節する化合物を同定すること；ｃ）任意に、段階ｂ）で同定された化合物の構造活性相関（ＳＡＲ）を評価してその構造を非カノニカルな活性の調節と関連付け、任意に、化合物を誘導して非カノニカルな活性を調節するその能力を改変すること；およびｄ）ヒトでの使用に十分な量の段階ｂ）で同定された化合物または段階ｃ）で誘導体化された化合物を生産することにより、医薬化合物を製造することを含む。

【００４２】

いくつかの実施形態は、少なくとも１個の細胞が、異種性完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、操作された細胞集団を含む細胞組成物を含み、細胞は無血清培地中で増殖することができる。一態様では、完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの精製を容易にする異種性の精製タグまたはエピトープタグを含む。別の態様では、完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質は、切断時のＡＡＲＳタンパク質フラグメントの生成を可能にする異種性タンパク質分解部位を含む。

【００４３】

いくつかの実施形態は、細胞内で表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つもしくは複数）または表Ｅ２に記載されているＡＡＲＳポリペプチドをｉｎ　ｓｉｔｕで作製する方法を含み、この方法は、ｉ）異種性完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質を細胞内で発現させることを含み、細胞は、異種性完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質を切断してＡＡＲＳポリペプチドを生成することができるプロテアーゼを含む。

【００４４】

いくつかの実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）または表Ｅ２に記載されているＡＡＲＳポリペプチドを作製する方法を含み、この方法は、単離完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質を、完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質を切断してＡＡＲＳポリペプチドを生成することができるプロテアーゼと接触させることを含む。

【００４５】

いくつかの実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）または表Ｅ２のいずれかに記載されているＡＡＲＳタンパク質フラグメントのタンパク質分解生成を可能にする異種性タンパク質分解部位を含む、操作された完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質を含む。

【００４６】

いくつかの実施形態は、単離完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素タンパク質を含む組成物を含み、組成物は、純度がタンパク質ベースで少なくとも約９５％であり、エンドトキシンが約１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満であり、かつ実質的に無血清である。一態様では、完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素タンパク質は、少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在し、かつ少なくとも９０％の単分散である。

【００４７】

さらなる実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）または表Ｅ２に記載されているＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたはＡＲＲＳタンパク質フラグメントをコードする核酸の投与による、ｔＲＮＡ合成酵素の発現、活性または時空間的位置の調節不全により仲介される疾患または障害の治療法を含む。本実施形態の一態様では、疾患は、癌、神経障害、糖尿病および炎症性障害から選択される。

一実施形態において、例えば、以下の項目が提供される。

（項目１）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントを含み、前記タンパク質フラグメントの溶解度が少なくとも約５ｍｇ／ｍＬである組成物であって、純度がタンパク質ベースで少なくとも約９５％、エンドトキシンが約１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満であり、かつ実質的に無血清である、組成物。

（項目２）

前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが、配列番号１４、配列番号７４、配列番号７６、配列番号７８、配列番号１１３および配列番号１７６からなる群より選択される配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む、項目１に記載の組成物。

（項目３）

前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが非カノニカルな生物活性を含む、項目１～２のいずれかに記載の組成物。

（項目４）

前記非カノニカルな生物活性が、細胞外シグナル伝達の調節、好中球の活性化の調節、細胞接着または走化性の調節、転写の調節、サイトカイン産生または活性の調節、炎症の調節およびサイトカイン受容体活性の調節から選択される、項目３に記載の組成物。

（項目５）

前記非カノニカルな生物活性が遺伝子転写の調節である、項目４に記載の組成物。

（項目６）

前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが異種ポリペプチドと融合している、項目１～５のいずれかに記載の組成物。

（項目７）

前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性を実質的に保持している、項目６に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。

（項目８）

前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性を抑制する、項目６に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。

（項目９）

前記異種ポリペプチドが、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントのＮ末端に結合している、項目６に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。

（項目１０）
前記異種ポリペプチドが、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントのＣ末端に結合している、項目６に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。
（項目１１）
前記異種ポリペプチドが、精製タグ、エピトープタグ、標的化配列、シグナルペプチド、膜転位配列およびＰＫ調節物質からなる群より選択される、項目６に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。
（項目１２）
ＡＡＲＳタンパク質フラグメントを少なくとも約１０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む、項目１～５のいずれかに記載の組成物。
（項目１３）
前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが少なくとも９０％の単分散である、項目１２に記載の組成物。
（項目１４）
約３％未満の高分子量凝集タンパク質を含む、項目１２または１３に記載の組成物。
（項目１５）
４℃で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管された場合に３％未満の凝集を示す、項目１２～１４のいずれかに記載の組成物。
（項目１６）
約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１個のアミノ酸の置換、削除および／または付加により、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列とは異なる少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントを含み、前記改変タンパク質フラグメントが未改変の前記タンパク質の非カノニカルな活性を実質的に保持し、溶解度が少なくとも約１０ｍｇ／ｍＬである組成物であって、純度がタンパク質ベースで少なくとも約９５％、エンドトキシンが約１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満であり、かつ実質的に血清が混入していない、組成物。
（項目１７）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと特異的に結合する単離抗体を含む組成物であって、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントに対する前記抗体の親和性が、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドに対するその親和性よりも約１０倍強く、前記抗体が、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性に拮抗する、組成物。
（項目１８）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと特異的に結合する単離抗体を含む組成物であって、前記抗体が、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントに対する少なくとも約１０ｎＭの親和性と、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドに対する少なくとも約１００ｎＭの親和性とを有する、組成物。
（項目１９）
前記抗体が、表１～３（１つもしくは複数）もしくは表４～６（１つもしくは複数）もしくは表７～９（１つもしくは複数）のいずれかに記載のＡＡＲＳポリペプチド固有のスプライスジャンクション内にあるエピトープまたはこのスプライス部位のアミノ酸配列Ｃ末端と結合する、項目１７または１８のいずれかに記載の組成物。
（項目２０）
前記抗体が、配列番号５５、配列番号５７、配列番号５９、配列番号６１、配列番号６３、配列番号６５、配列番号６７、配列番号６９、配列番号７１、配列番号７３、配列番号１８０、配列番号１８２、配列番号１８４、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番

号１９１、配列番号１９４、配列番号１９６、配列番号１９９および配列番号２０２からなる群より選択される少なくとも５個の連続するアミノ酸を含むエピトープと結合する、項目１７または１８のいずれかに記載の組成物。

（項目２１）

前記ＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性に拮抗する、項目１７または１８のいずれかに記載の組成物。

（項目２２）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の実質的に純粋なアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと結合する結合パートナーとを含む、バイオアッセイ系。

（項目２３）

前記結合パートナーが、細胞表面受容体タンパク質、核酸、脂質膜、細胞調節タンパク質、酵素および転写因子からなる群より選択される、項目２２に記載のバイオアッセイ系。

（項目２４）

前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが、配列番号１４、配列番号７４、配列番号７６、配列番号７８、配列番号１１３および配列番号１７６からなる群より選択される配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む、項目２２に記載の組成物。

（項目２５）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、少なくとも１個の細胞が前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む操作された細胞集団とを含み、前記細胞が無血清培地で増殖することができる、細胞組成物。

（項目２６）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の実質的に純粋なアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、前記タンパク質フラグメントと結合する細胞表面受容体またはその細胞外部分を含む細胞と、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと前記細胞外受容体との結合または相互作用を調節する約２０００ダルトン未満の分子または第二のポリペプチドとを含む、検出系。

（項目２７）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の実質的に純粋なアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、前記タンパク質フラグメントと特異的に結合する細胞表面受容体またはその細胞外部分を含む細胞とを含み、前記細胞が、前記細胞表面受容体またはその細胞外部分のレベルまたは活性の変化の検出を可能にする指示分子を含む、診断系。

（項目２８）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、少なくとも１個の細胞が前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む操作された細胞集団と、少なくとも約１０リットルの無血清増殖培地と、無菌容器とを含む、細胞増殖装置。

（項目２９）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数に）に記載のＡＡＲＳスプライスバリアント固有のスプライスジャンクションを標的とする配列を含む、アンチセンスまたはＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）剤。

（項目３０）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントを含み、前記タンパク質フラグメントが、結合パートナー特異的と結合して生理作用を及ぼし、かつ少なくとも約５ｍｇ／ｍＬの溶解度を有する治療用組成物であって、純度がタンパク質ベースで少なくとも約９５％、エンドトキシンが約１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満である、治療用組成物。
（項目３１）
前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが、配列番号１４、配列番号７４、配列番号７６、配列番号７８、配列番号１１３および配列番号１７６からなる群より選択される配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む、項目２９に記載の治療用組成物。
（項目３２）
前記結合パートナーが、細胞表面受容体、核酸、脂質膜、調節タンパク質、酵素および転写因子からなる群より選択される、項目２９または３０に記載の治療用組成物。
（項目３３）
前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが異種ポリペプチドと融合している、項目２９または３０に記載の治療用組成物。
（項目３４）
前記ＡＡＲＳ融合タンパク質が、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性を実質的に保持している、項目３２に記載の治療用組成物。
（項目３５）
前記ＡＡＲＳ融合タンパク質が、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性を抑制する、項目３２に記載の治療用組成物。
（項目３６）
前記異種ポリペプチドが、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントのＮ末端に結合している、項目３２に記載の治療用組成物。
（項目３７）
前記異種ポリペプチドが、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントのＣ末端に結合している、項目３２に記載の治療用組成物。
（項目３８）
前記異種ポリペプチドが、精製タグ、エピトープタグ、標的化配列、シグナルペプチド、膜転位配列およびＰＫ調節物質からなる群より選択される、項目３２に記載の治療用組成物。
（項目３９）
ＡＡＲＳタンパク質フラグメントを少なくとも約１０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む、項目２９～３０のいずれかに記載の治療用組成物。
（項目４０）
前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが少なくとも９０％の単分散である、項目２９～３０のいずれかに記載の治療用組成物。
（項目４１）
約３％未満の高分子量凝集タンパク質を含む、項目３９に記載の治療用組成物。
（項目４２）
４℃で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管された場合に３％未満の凝集を示す、項目３９に記載の治療用組成物。
（項目４３）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一である少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントを含み、前記タンパク質フラグメン

トの溶解度が少なくとも約５ｍｇ／ｍＬである組成物であって、純度がタンパク質ベースで少なくとも約９５、エンドトキシンが約１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満である、組成物。

（項目４４）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の実質的に純粋なアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと、それと共有結合または非共有結合している少なくとも１つの部分とを含む、組成物。

（項目４５）

前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが、配列番号１４、配列番号７４、配列番号７６、配列番号７８、配列番号１１３および配列番号１７６からなる群より選択される配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む、項目４２に記載の組成物。

（項目４６）

前記部分が検出可能な標識である、項目４２または４３に記載の組成物。

（項目４７）

前記部分が水溶性ポリマーである、項目４２または４３に記載の組成物。

（項目４８）

前記水溶性ポリマーがＰＥＧである、項目４２または４３に記載の組成物。

（項目４９）

前記部分が前記タンパク質フラグメントのＮ末端に結合している、項目４２または４３に記載の組成物。

（項目５０）

前記部分が前記タンパク質フラグメントのＣ末端に結合している、項目４２または４３に記載の組成物。

（項目５１）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと結合した固体基質を含み、前記タンパク質フラグメントの溶解度が少なくとも約５ｍｇ／ｍＬである組成物であって、純度がタンパク質ベースで少なくとも約９５％である、組成物。

（項目５２）

表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質フラグメントと特異的に結合する結合物質を含み、前記結合物質が、前記タンパク質フラグメントに対して少なくとも約１ｎＭの親和性を有する、組成物。

（項目５３）

前記結合物質が、表１～３（１つもしくは複数）もしくは表４～６（１つもしくは複数）もしくは表７～９（１つもしくは複数）のいずれかに記載のＡＡＲＳポリペプチド固有のスプライスジャンクション内にあるエピトープまたはこのスプライス部位のアミノ酸配列Ｃ末端と結合する、項目５２に記載の組成物。

（項目５４）

前記結合物質が、配列番号５５、配列番号５７、配列番号５９、配列番号６１、配列番号６３、配列番号６５、配列番号６７、配列番号６９、配列番号７１、配列番号７３、配列番号１８０、配列番号１８２、配列番号１８４、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９１、配列番号１９４、配列番号１９６、配列番号１９９および配列番号２０２からなる群より選択される少なくとも５個の連続するアミノ酸を含むエピトープと結合する、項目５２に記載の組成物。

（項目５５）

前記ＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性に拮抗する、項目５２に記載の組成物。

（項目５６）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントのアミノ酸配列を含む、単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチド。
（項目５７）
前記ＡＡＲＳポリペプチドが、配列番号１４、配列番号７４、配列番号７６、配列番号７８、配列番号１１３および配列番号１７６からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目５６に記載の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチド。
（項目５８）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかの配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一であるアミノ酸配列を含む、単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチド。
（項目５９）
前記ＡＡＲＳポリペプチドが、配列番号１４、配列番号７４、配列番号７６、配列番号７８７、配列番号１１３および配列番号１７６からなる群より選択される、項目５８に記載の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチド。
（項目６０）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかの配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一であるアミノ酸配列から実質的になる、単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチド。
（項目６１）
前記ＡＡＲＳポリペプチドが、配列番号１４、配列番号７４、配列番号７６、配列番号７８、配列番号１１３および配列番号１７６からなる群より選択される、項目６０に記載の単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチド。
（項目６２）
非カノニカルな生物活性を含む、項目６１に記載のポリペプチド。
（項目６３）
前記非カノニカルな生物活性が、細胞外シグナル伝達の調節、好中球の活性化の調節、細胞接着および走化性の調節、遺伝子転写の調節、サイトカイン産生または活性の調節、炎症の調節およびサイトカイン受容体活性の調節から選択される、項目６２に記載のポリペプチド。
（項目６４）
前記非カノニカルな生物活性が転写の調節である、項目６３に記載のポリペプチド。
（項目６５）
前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントが異種ポリペプチドと融合している、項目６２に記載のポリペプチド。
（項目６６）
前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性を実質的に保持している、項目６５に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。
（項目６７）
前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性を抑制する、項目６５に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。
（項目６８）
前記異種ポリペプチドが、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントのＮ末端に結合している、項目６５に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。
（項目６９）
前記異種ポリペプチドが、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントのＣ末端に結合している、項目６５に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。

（項目７０）
前記異種ポリペプチドが、精製タグ、エピトープタグ、標的化配列、シグナルペプチド、膜転位配列およびＰＫ調節物質からなる群より選択される、項目６５に記載のＡＡＲＳ融合タンパク質。
（項目７１）
ＡＡＲＳタンパク質フラグメントを少なくとも約１０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む、項目６２に記載の組成物。
（項目７２）
少なくとも９０％の単分散であるＡＡＲＳタンパク質フラグメントを含む、項目６２に記載の組成物。
（項目７３）
約３％未満の高分子量凝集タンパク質を含む、項目６２に記載の組成物。
（項目７４）
４℃で１週間、ＰＢＳ中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で保管された場合に３％未満の凝集を示す、項目６２に記載の組成物。
（項目７５）
項目６０に記載の単離ＡＡＲＳポリペプチド、前記ＡＡＲＳポリペプチドの結合パートナーまたはその両方に対する結合特異性を示し、前記ＡＡＲＳポリペプチドに対する親和性が、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドに対するその親和性よりも約１０倍強い、抗体。
（項目７６）
表１～３（１つもしくは複数）もしくは表４～６（１つもしくは複数）もしくは表７～９（１つもしくは複数）のいずれかに記載のＡＡＲＳポリペプチド固有のスプライスジャンクション内にあるエピトープまたはこのスプライス部位のアミノ酸配列Ｃ末端と結合する、項目７５に記載の抗体。
（項目７７）
配列番号５５、配列番号５７、配列番号５９、配列番号６１、配列番号６３、配列番号６５、配列番号６７、配列番号６９、配列番号７１、配列番号７３、配列番号１８０、配列番号１８２、配列番号１８４、配列番号１８６、配列番号１８９、配列番号１９１、配列番号１９４、配列番号１９６、配列番号１９９および配列番号２０２からなる群より選択される少なくとも５個の連続するアミノ酸を含むエピトープと結合する、項目７５または７６のいずれかに記載の抗体。
（項目７８）
単離ＡＡＲＳポリペプチドとの結合に関して、項目７５～７７のいずれかに記載の抗体と競合する抗体。
（項目７９）
項目６２に記載の単離ＡＡＲＳポリペプチドまたは前記ＡＡＲＳポリペプチドの結合パートナーに対して結合特異性を示す結合物質。
（項目８０）
ペプチド、可溶性受容体、アドネクチン、小分子およびアプタマーから選択される、項目７９に記載の結合物質。
（項目８１）
前記ＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性に拮抗する、項目７５～８０のいずれか１項に記載の抗体または結合物質。
（項目８２）
前記ＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性を刺激する、項目７５～８０のいずれか１項に記載の抗体または結合物質。
（項目８３）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントをコードするヌクレオ

チド配列、少なくとも８０％の配列同一性を有するそのバリアント、そのフラグメントまたは相補体を含む、単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリヌクレオチド。

（項目８４）

前記ヌクレオチド配列が、配列番号１５、配列番号７５、配列番号７７、配列番号７９、配列番号１１４および配列番号１７７からなる群より選択される配列と少なくとも８０％同一である、項目８３に記載のポリヌクレオチド。

（項目８５）

前記ヌクレオチド配列が細菌発現に対してコドン最適化されている、項目８３に記載のポリヌクレオチド。

（項目８６）

配列番号９８、配列番号９９、配列番号１０３、配列番号１０４、配列番号２２４および配列番号２３０から選択される配列と少なくとも８０％同一である、項目８５に記載のポリヌクレオチド。

（項目８７）

項目８３に記載のポリヌクレオチドと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一であるヌクレオチド配列またはその相補体を含む、項目８３に記載のポリヌクレオチド。

（項目８８）

項目８３に記載のポリヌクレオチドと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または１００％同一であるヌクレオチド配列またはその相補体から実質的になる、項目８３に記載のポリヌクレオチド。

（項目８９）

項目８３に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、単離アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリヌクレオチド。

（項目９０）

プライマー、プローブおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される、項目８９に記載のポリヌクレオチド。

（項目９１）

前記ＡＡＲＳポリヌクレオチドの固有のスプライスジャンクションと特異的にハイブリダイズする、項目９０に記載のポリヌクレオチド。

（項目９２）

試料中のＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルを決定する方法であって、前記試料を、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントと特異的に結合する１つ以上の結合物質と接触させることと、前記結合物質の有無を検出することと、これにより前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルを決定することとを含む、方法。

（項目９３）

試料中のＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルを決定する方法であって、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のタンパク質フラグメントを特異的に同定することができる検出器で前記試料を解析することと、これにより前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルを決定することとを含む、方法。

（項目９４）

前記検出器が、質量分析器（ＭＳ）、フローサイトメータ、タンパク質イメージング装置、酵素結合免疫吸着測定（ＥＬＩＳＡ）またはタンパク質マイクロアレイである、項目９３に記載の方法。

（項目９５）

試料中のＡＡＲＳスプライスバリアントのポリヌクレオチド配列の存在またはレベルを決定する方法であって、前記試料を、項目８３に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドと特異

的にハイブリダイズする１つ以上のオリゴヌクレオチドと接触させることと、前記試料中の前記オリゴヌクレオチドの有無を検出することと、これにより前記ＡＡＲＳスプライスバリアントのポリヌクレオチド配列の存在またはレベルを決定することとを含む、方法。

（項目９６）

試料中のＡＡＲＳスプライスバリアントのポリヌクレオチド配列の存在またはレベルを決定する方法であって、前記試料を、項目８３に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドを特異的に増幅する少なくとも２つのオリゴヌクレオチドと接触させることと、増幅反応を行うことと、増幅産物の有無を検出することと、これにより前記ＡＡＲＳスプライスバリアントのポリヌクレオチド配列の存在または有無を決定することとを含む、方法。

（項目９７）

前記オリゴヌクレオチド（１つまたは複数）が、ＡＡＲＳスプライスバリアントに固有のスプライスジャンクションと特異的にハイブリダイズするか、またはこれを特異的に増幅する、項目９５または９６に記載の方法。

（項目９８）

前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたはスプライスバリアントの存在またはレベルを、対照試料または所与の値と比較することをさらに含む、項目９５～９７のいずれか１項に記載の方法。

（項目９９）

前記試料の状態を特徴付けて、それを前記対照と区別することをさらに含む、項目９８に記載の方法。

（項目１００）

前記試料および対照が細胞または組織を含む項目９８に記載の方法であって、異なる種間の細胞もしくは組織、異なる組織もしくは器官の細胞、異なる細胞発生段階の細胞、異なる細胞分化段階の細胞、異なる生理状態の細胞、または健常細胞と疾患細胞を区別することを含む、方法。

（項目１０１）

表１～３（１つもしくは複数）もしくは表４～６（１つもしくは複数）もしくは表７～９（１つもしくは複数）のいずれかに記載のアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）ポリペプチドまたはその１つ以上の細胞結合パートナーと特異的に結合する化合物を同定する方法であって、ａ）前記ＡＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーまたはその両方を適当な条件下で少なくとも１つの試験化合物と結合させることと、ｂ）前記ＡＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーまたはその両方と前記試験化合物との結合を検出することにより、前記ＡＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーまたはその両方と特異的に結合する化合物を同定することとを含む、方法。

（項目１０２）

前記試験化合物が、ポリペプチドもしくはペプチド、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、ペプチド模倣物または小分子である、項目１０１に記載の方法。

（項目１０３）

前記試験化合物が、前記ＡＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーの非カノニカルな生物活性を完全にまたは部分的に刺激する、項目１０１に記載の方法。

（項目１０４）

前記試験化合物が、前記ＡＡＲＳポリペプチドまたはその細胞結合パートナーの非カノニカルな生物活性に完全にまたは部分的に拮抗する、項目１０１に記載の方法。

（項目１０５）

項目１０１～１０４のいずれか１項に記載の方法により同定される化合物。

（項目１０６）

項目５６～７４のいずれか１項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、項目７５～８２のいずれか１項に記載の抗体もしくは結合物質、項目８３～９１のいずれか１項に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは項目１０５に記載の化合物と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

（項目１０７）
対象における免疫応答で刺激を引き起こさない、項目１０６に記載の医薬組成物。
（項目１０８）
対象における免疫応答を刺激する少なくとも１つのアジュバントを含む、項目１０６に記載の医薬組成物。
（項目１０９）
細胞の細胞活性またはタンパク質を調節する方法であって、前記細胞またはタンパク質を、項目５６～７４のいずれか１項に記載のＡＡＲＳポリペプチド、項目７５～８２のいずれか１項に記載の抗体または結合物質、項目８３～９１のいずれか１項に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチド、項目１０５に記載の化合物または項目１０８に記載の医薬組成物と接触させることを含む、方法。
（項目１１０）
前記細胞活性が、細胞増殖、細胞分化、細胞シグナル伝達、遺伝子転写、血管新生、細胞結合、代謝、サイトカイン産生または活性、サイトカイン受容体活性および炎症から選択される、項目１０９に記載の方法。
（項目１１１）
前記細胞の型が、脂肪前駆細胞、骨髄、好中球、血液細胞、肝細胞、アストロサイト、間葉系幹細胞および骨格筋細胞からなる群より選択される、項目１１０に記載の方法。
（項目１１２）
前記細胞が対象中に存在する、項目１１１に記載の方法。
（項目１１３）
前記対象の治療を含み、前記対象が、腫瘍性疾患に関連した状態、炎症性疾患、免疫系の疾患もしくは状態、感染症、代謝性疾患、神経細胞／神経疾患、筋／心血管疾患、造血異常に関連した疾患、血管新生異常に関連した疾患または異常な細胞生存に関連した疾患を有する、項目１１２に記載の方法。
（項目１１４）
医薬化合物を製造する工程であって、
ａ）表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む少なくとも１００アミノ酸のＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在下で、１つ以上の候補化合物のｉｎ　ｖｉｔｒｏスクリーニングを行って、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと特異的に結合する化合物を同定することと、
ｂ）段階ａ）で同定された化合物に関して細胞ベースのアッセイを行って、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの１つ以上の非カノニカルな活性を調節する化合物を同定することと、
ｃ）任意に、段階ｂ）で同定された化合物の構造活性相関（ＳＡＲ）を評価してその構造を前記非カノニカルな活性の調節と関連付け、任意に、前記化合物を誘導して前記非カノニカルな活性を調節するその能力を改変することと、
ｄ）ヒトでの使用に十分な量の段階ｂ）で同定された化合物または段階ｃ）で誘導体化された化合物を生産することにより、医薬化合物を製造することと
を含む、方法。
（項目１１５）
医薬化合物を製造する工程であって、
ａ）表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかのＡＡＲＳタンパク質フラグメントと特異的に結合する細胞表面受容体またはその細胞外部分の存在下で、１つ以上の候補化合物のｉｎ　ｖｉｔｒｏスクリーニングを行って、前記細胞表面受容体またはその細胞外部分と特異的に結合する化合物を同定することと、
ｂ）段階ａ）で同定された化合物に関して細胞ベースのアッセイを行って、前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの１つ以上の非カノニカルな活性を調節する化合物を同定する

こと、
ｃ）任意に、段階ｂ）で同定された化合物の構造活性相関（ＳＡＲ）を評価してその構造を前記非カノニカルな活性の調節と関連付け、任意に、前記化合物を誘導して前記非カノニカルな活性を調節するその能力を改変することと、
ｄ）ヒトでの使用に十分な量の段階ｂ）で同定された化合物または段階ｃ）で誘導体化された化合物を生産することにより、医薬化合物を製造することと
を含む、方法。
（項目１１６）
少なくとも１個の細胞が、異種性完全長バリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、操作された細胞集団を含み、前記細胞が無血清培地中で増殖することができる、細胞組成物。
（項目１１７）
前記完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質が、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの精製を容易にする異種性の精製タグまたはエピトープタグを含む、項目１１６に記載の細胞組成物。
（項目１１８）
前記完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質が、切断時の前記ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの生成を可能にする異種性タンパク質分解部位を含む、項目１１６または１１７に記載の細胞組成物。
（項目１１９）
細胞内で項目５６～７４に記載のＡＡＲＳポリペプチドをｉｎ　ｓｉｔｕで作製する方法であって、ｉ）異種性完全長バリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質を細胞内で発現させることを含み、前記細胞が、前記異種性完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質を切断して前記ＡＡＲＳポリペプチドを生成することができるプロテアーゼを含む、方法。
（項目１２０）
項目５６～７４に記載のＡＡＲＳポリペプチドを作製する方法であって、単離完全長バリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質を、前記完全長アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質を切断してＡＡＲＳポリペプチドを生成することができるプロテアーゼと接触させることを含む、方法。
（項目１２１）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のいずれかに記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントのタンパク質分解生成を可能にする異種性タンパク質分解部位を含む、操作された完全長バリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）タンパク質。
（項目１２２）
単離完全長バリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素を含み、純度がタンパク質ベースで少なくとも約９５％、エンドトキシンが約１０ＥＵ／ｍｇタンパク質未満であり、かつ実質的に無血清である、組成物。
（項目１２３）
前記完全長バリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素が、少なくとも１０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在し、かつ少なくとも９０％の単分散である、項目１２２に記載の組成物。
（項目１２４）
表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）または表Ｅ２に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたは前記ＡＲＲＳタンパク質フラグメントをコードする核酸の投与による、ｔＲＮＡ合成酵素の発現、活性または時空間的位置の調節不全により仲介される疾患または障害の治療法。
（項目１２５）
前記疾患が、癌、神経障害、糖尿病および炎症性障害から選択される、項目１２４に記載の方法。

【図面の簡単な説明】
【００４８】
【図１Ａ】同定されたＮ末端ＡＡＲＳポリペプチドの相対的な位置およびサイズと重ね合わせたバリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素のドメイン構造を模式的に示した図である。図１Ａは質量分析から同定されたフラグメントを表し、図１Ｂはトランスクリプトームのディープシークエンシングから同定されたフラグメントを表し、図１Ｃはバイオインフォマティクス解析から同定されたフラグメントを表している。
【図１Ｂ】同定されたＮ末端ＡＡＲＳポリペプチドの相対的な位置およびサイズと重ね合わせたバリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素のドメイン構造を模式的に示した図である。図１Ａは質量分析から同定されたフラグメントを表し、図１Ｂはトランスクリプトームのディープシークエンシングから同定されたフラグメントを表し、図１Ｃはバイオインフォマティクス解析から同定されたフラグメントを表している。
【図１Ｃ】同定されたＮ末端ＡＡＲＳポリペプチドの相対的な位置およびサイズと重ね合わせたバリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素のドメイン構造を模式的に示した図である。図１Ａは質量分析から同定されたフラグメントを表し、図１Ｂはトランスクリプトームのディープシークエンシングから同定されたフラグメントを表し、図１Ｃはバイオインフォマティクス解析から同定されたフラグメントを表している。
【図２Ａ】Ｃ末端ＡＡＲＳポリペプチドの相対的な位置およびサイズと重ね合わせたバリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素のドメイン構造を模式的に示した図である。図２Ａは質量分析から同定されたフラグメントを表し、図２Ｂはトランスクリプトームのディープシークエンシングから同定されたフラグメントを表している。
【図２Ｂ】Ｃ末端ＡＡＲＳポリペプチドの相対的な位置およびサイズと重ね合わせたバリルアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素のドメイン構造を模式的に示した図である。図２Ａは質量分析から同定されたフラグメントを表し、図２Ｂはトランスクリプトームのディープシークエンシングから同定されたフラグメントを表している。
【発明を実施するための形態】
【００４９】
目次
Ｉ．概要　［００５０］
ＩＩ．定義　［００５５］
ＩＩＩ．ＡＡＲＳタンパク質フラグメントおよびバリアント　［００９８］
ＩＶ．ＡＡＲＳポリヌクレオチド　［０１７７］
Ｖ．抗体　［０２２２］
ＶＩ．抗体代替物およびその他の結合物質　［０２３７］
ＶＩＩ．バイオアッセイならびに解析アッセイ　［０２５２］
ＶＩＩＩ．発現系および精製系　［０２５９］
ＩＸ．診断法および診断用組成物　［０２９７］
Ｘ．アンチセンス剤およびＲＮＡｉ剤　［０３５１］
Ａ．アンチセンス剤　［０３５４］
Ｂ．ＲＮＡ干渉剤　［０３８２］
ＸＩ．創薬　［０４０８］
ＸＩＩ．使用法　［０４３９］
ＸＩＩＩ．医薬製剤、投与およびキット　［０４５４］
ＸＩＶ．実施例　［０４８９］
【００５０】
Ｉ．概要
本発明は、少なくとも部分的には、新規ＡＡＲＳポリペプチドの発見、ならびに天然の野生型タンパク質を天然の完全長バリルｔＲＮＡ合成酵素遺伝子と比べて著しく異なる特性を示す新たな形態へ形質転換することを意味するその調製法および使用法に関する。このようなＡＡＲＳポリペプチドは、様々な組織で発現されるバリルｔＲＮＡ合成酵素の広

範な配列解析および質量スペクトル解析を行い、次いで、潜在的な各ＡＡＲＳポリペプチドを体系的に作製および試験し、新規な生物活性および治療薬として好ましい特性を示す安定な可溶性タンパク質ドメインを表すタンパク質配列を同定することにより同定された。

【００５１】

この解析に基づき、バリルｔＲＮＡ合成酵素に由来するＡＡＲＳポリペプチドの少なくとも２つの新しい新規ファミリーが同定された。

【００５２】

一態様では、上記のバリルｔＲＮＡ合成酵素由来ＡＡＲＳポリペプチドは、バリルｔＲＮＡ合成酵素のアミノ酸１～３００前後を含むポリペプチド配列を含む。

【００５３】

第二の態様では、上記のバリルｔＲＮＡ合成酵素由来ＡＡＲＳポリペプチドは、バリルｔＲＮＡ合成酵素のアミノ酸９４０～１２６４前後を含むポリペプチド配列を含む。

【００５４】

これらの新規ＡＡＲＳポリペプチドファミリーは、特にｉ）新規な生物活性、ｉｉ）好ましいタンパク質安定性および凝集性、ならびにｉｉｉ）原核発現系において高レベルで発現および産生される能力を示す、これまで未知であった新規なタンパク質産物であり、上記の特性はインタクトな野生型タンパク質では見られない著しく異なったものである。

【００５５】

ＩＩ．定義

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術・科学用語は、本発明の属する分野の当業者により一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様のまたは同等の任意の方法および材料を本発明の実施また試験に用いることができるが、好適な方法および材料を記載する。本発明の目的のために、次の用語を以下で定義する。

【００５６】

冠詞「ａ」および「ａｎ」（１つの）は、冠詞の１つまたは２つ以上（すなわち、少なくとも１つ）の文法上の目的語を指すために本明細書で使用される。例として、「１つの要素（ａｎ　ｅｌｅｍｅｎｔ）」は、１つの要素または２つ以上の要素を意味する。

【００５７】

「約」は、基準となる量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、大きさ、量、重量または長さと３０、２５、２０、２５、１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１％だけ異なる量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、大きさ、量、重量または長さを意味する。

【００５８】

「アゴニスト」は、活性を増大させるまたは模倣する分子を指す。例えば、ＡＡＲＳまたは別のタンパク質の非カノニカルな生物活性。アゴニストは、ＡＡＲＳもしくはその結合パートナーと直接相互作用することにより、またはＡＡＲＳが関与する生物学的経路の成分に作用することによりＡＡＲＳの活性を調節する、タンパク質、核酸、炭水化物、小分子または他の任意の化合物もしくは組成物を包含し得る。部分アゴニストおよび完全アゴニストが包含される。

【００５９】

本明細書で使用される「アミノ酸」という用語は、天然および非天然アミノ酸だけでなく、アミノ酸の類似体および模倣物も意味するものとする。天然アミノ酸としては、タンパク質の生合成時に利用される２０種類の（Ｌ）－アミノ酸のほか、例えば４－ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、デスモシン、イソデスモシン、ホモシステイン、シトルリンおよびオルニチンなどの他のアミノ酸が挙げられる。非天然アミノ酸としては、例えば、（Ｄ）－アミノ酸、ノルロイシン、ノルバリン、ｐ－フルオロフェニルアラニン、エチオニンなどが挙げられ、これらは当業者には公知である。アミノ酸類似体としては、改変型の天然および非天然アミノ酸が挙げられる。このような改変としては、例えば、アミ

ノ酸の化学基および化学部分の置換すなわち置き換え、またはアミノ酸の誘導体化によるものを挙げることができる。アミノ酸模倣物としては、例えば、参照アミノ酸に特有の電荷および電荷間隔のような機能的に類似した特性を示す有機構造体が挙げられる。例えば、アルギニン（ＡｒｇまたはＲ）を模倣する有機構造体は、天然Ａｒｇアミノ酸側鎖のｅ－アミノ基と類似した分子空間に位置し同じ移動度を有する正電荷部分を有し得る。また模倣物は、アミノ酸またはアミノ酸官能基の最適な間隔および電荷相互作用を維持するように拘束された構造も含み得る。当業者は、機能的に等価なアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物を構成する構造を知っているか、または決定することができる。

【００６０】

特定の態様では、非天然アミノ酸の使用を利用して、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの選択された非カノニカルな活性を改変する（例えば、増大させる）、またはタンパク質のｉｎ ｖｉｖｏもしくはｉｎ ｖｉｔｒｏ半減期を変化させることができる。また非天然アミノ酸を用いて、ＡＡＲＳタンパク質の（選択的）化学修飾（例えば、ＰＥＧ化）を容易にする（選択的）ことができる。例えば、特定の非天然アミノ酸により、所与のタンパク質にＰＥＧのようなポリマーを選択的に付加してその薬物動態特性を向上させることが可能である。

【００６１】

アミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物の具体例は、例えば、ＲｏｂｅｒｔｓおよびＶｅｌｌａｃｃｉｏ，Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｂｉｏｌｏｇｙ，ＧｒｏｓｓおよびＭｅｉｎｈｏｆｅｒ編，第５巻，ｐ．３４１，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９８３）に記載されており、この巻全体が参照により本明細書に組み込まれる。その他の例としては、ペルアルキル化アミノ酸、特にペルメチル化アミノ酸が挙げられる。例えば、Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，ＷｉｌｓｏｎおよびＣｚａｒｎｉｋ編，第１１章，ｐ．２３５，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９９７）（この書物全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。さらに他の例としては、アミド部分（したがって、得られるペプチドのアミド骨格）が例えば糖環、ステロイド、ベンゾジアゼピンまた炭素環式化合物に置き換わっているアミノ酸が挙げられる。例えば、Ｂｕｒｇｅｒ’ｓ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，Ｍａｎｆｒｅｄ Ｅ．Ｗｏｌｆｆ編，第１５章，ｐｐ．６１９－６２０，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９９５）（この書物全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物およびタンパク質を合成する方法は当該技術分野で公知である（例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，４２０，１０９号；Ｍ．Ｂｏｄａｎｚｓｋｙ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（第１版および改訂第２版），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９８４ ＆ １９９３），第７章を参照；ＳｔｅｗａｒｔおよびＹｏｕｎｇ，Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，（第２版），Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌ．（１９８４）を参照されたい）。したがって、本発明のＡＡＲＳポリペプチドは、天然および非天然アミノ酸、ならびにアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物から構成され得る。

【００６２】

「アンタゴニスト」という用語は、活性を低下させるまたは弱める分子を指す。例えば、ＡＡＲＳまたは別のタンパク質の非カノニカルな生物活性。アンタゴニストは、ＡＡＲＳもしくはその結合パートナーと直接相互作用することにより、またはＡＡＲＳが関与する生物学的経路の成分に作用することによりＡＡＲＳまたはその結合パートナーの活性を調節する、抗体のようなタンパク質、核酸、炭水化物、小分子または他の任意の化合物もしくは組成物を包含し得る。部分アンタゴニストおよび完全アンタゴニストが包含される。

【００６３】
「アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素」（ＡＡＲＳ）という用語は一般に、その天然型または野生型で特定のアミノ酸またはその前駆体をすべてのその適合性のある同族の１つにエステル化してアミノアシルｔＲＮＡを形成することを触媒することができる酵素を指す。この「カノニカルな」活性において、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素は２段階の反応を触媒する。すなわち、まずアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素が、アミノアシルアデニル酸を形成することによりそれぞれのアミノ酸を活性化し、ここではアミノ酸のカルボキシルがピロリン酸と置き換わってＡＴＰのα－リン酸と結合する。次いで、正しいｔＲＮＡが結合すると、アミノアシルアデニル酸のアミノアシル基がｔＲＮＡの２’または３’末端のＯＨに転移される。

【００６４】
クラスＩアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素は一般に、２つの高度に保存された配列モチーフを有する。この酵素はアデノシンヌクレオチドの２’－ＯＨにおいてアミノアシル化し、通常は単量体または二量体である。クラスＩＩアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素は一般に、３つの高度に保存された配列モチーフを有する。この酵素は同じアデノシンの３’－ＯＨにおいてアミノアシル化し、通常は二量体または四量体である。クラスＩＩ酵素の活性部位は主に、αヘリックスが隣接した７本鎖の逆平行βシートで構成されている。フェニルアラニン－ｔＲＮＡ合成酵素はクラスＩＩであるが、２’－ＯＨにおいてアミノアシル化する。

【００６５】
ＡＡＲＳポリペプチドは、ミトコンドリア型および細胞質型のチロシルｔＲＮＡ合成酵素（ＴｙｒＲＳ）、トリプトファニルｔＲＮＡ合成酵素（ＴｒｐＲＳ）、グルタミニルｔＲＮＡ合成酵素（ＧｌｎＲＳ）、グリシルｔＲＮＡ合成酵素（ＧｌｙＲＳ）、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）、セリルｔＲＮＡ合成酵素（ＳｅｒＲＳ）、フェニルアラニルｔＲＮＡ合成酵素（ＰｈｅＲＳ）、アラニルｔＲＮＡ合成酵素（ＡｌａＲＳ）、アスパラギニルｔＲＮＡ合成酵素（ＡｓｎＲＳ）、アスパルチルｔＲＮＡ合成酵素（ＡｓｐＲＳ）、システイニルｔＲＮＡ合成酵素（ＣｙｓＲＳ）、グルタミルｔＲＮＡ合成酵素（ＧｌｕＲＳ）、プロリルｔＲＮＡ合成酵素（ＰｒｏＲＳ）、アルギニルｔＲＮＡ合成酵素（ＡｒｇＲＳ）、イソロイシルｔＲＮＡ合成酵素（ＩｌｅＲＳ）、ロイシルｔＲＮＡ合成酵素（ＬｅｕＲＳ）、リジルｔＲＮＡ合成酵素（ＬｙｓＲＳ）、スレオニルｔＲＮＡ合成酵素（ＴｈｒＲＳ）、メチオニルｔＲＮＡ合成酵素ｓ（ＭｅｔＲＳ）またはバリルｔＲＮＡ合成酵素（ＶａｌＲＳ）の源を含む。これらのＡＡＲＳポリペプチドの野生型または親配列は当該技術分野で公知である。

【００６６】
「コード配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに寄与する任意の核酸配列を意味する。これに対し、「非コード配列」という用語は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに寄与しない任意の核酸配列を指す。

【００６７】
本明細書全体を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む」（「ｃｏｍｐｒｉｓｅ」、「ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ」および「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」）という語は、記載されている段階もしくは要素または段階群もしくは要素群を包含し、また他のいかなる段階もしくは要素または段階群もしくは要素群も除外しないことを意味するものと理解される。

【００６８】
「～からなる」は、語句「～からなる」の後に続くすべてのものを含み、かつそれに限定されることを意味する。したがって、「～からなる」という語句は、列挙された要素が必要または必須であり、また他の要素は一切存在し得ないことを表す。「～から実質的になる」は、この語句の後に列挙されたどの要素も含み、かつ列挙された要素に関して本開示で明示される活性または作用に干渉しないまたはそれに寄与する他の要素に限定されることを意味する。したがって、「～から実質的になる」という語句は、列挙された要素が

必要または必須であるが、列挙された要素の活性または作用に著しい影響を与えるか否かによって、任意に他の要素が存在してもしなくてもよい。

【００６９】

「無エンドトキシン」または「実質的に無エンドトキシン」という記述は、一般的には、多くても痕跡量（例えば、対象に対して臨床的に有害な生理作用を有さない量）のエンドトキシン、好ましくは検出不可能な量のエンドトキシンを含む組成物、溶媒および／または容器に関するものである。エンドトキシンとは、特定の細菌、通常はグラム陰性細菌に関連する毒素のことであるが、リステリア菌（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）のようなグラム陽性細菌でもエンドトキシンが見られる場合がある。最もよく見られるエンドトキシンは、各種グラム陰性細菌の外膜で見られるリポ多糖（ＬＰＳ）またはリポオリゴ糖（ＬＯＳ）であり、これらは上記細菌が疾患を引き起こす能力において中心的な病原性を表す。ヒトでは少量のエンドトキシンが、有害な生理作用の中でも特に、発熱、血圧低下、ならびに炎症および凝固の活性化を引き起こし得る。

【００７０】

したがって、ヒトでは少量でも有害な作用が生じ得るため、ＡＡＲＳポリペプチドの医薬製品では多くの場合、製剤および／または薬品容器からエンドトキシンの大部分またはすべての痕跡を除去することが望ましい。大部分のエンドトキシンを分解するためには一般に３００℃を超える温度が必要であるため、発熱物質除去オーブン（ｄｅｐｙｒｏｇｅｎａｔｉｏｎ ｏｖｅｎ）をこの目的に使用し得る。例えば、シリンジまたはバイアルのような一次包装材料に基づき、エンドトキシンレベルを３ｌｏｇ減少させるためには、多くの場合、２５０℃のガラス温度と３０分間の保持時間を組み合わせたもので十分である。本明細書に記載のまたは当該技術分野で公知の、例えばクロマトグラフィー法およびろ過法を含めた、エンドトキシンを除去するための他の方法が企図される。また、本発明の組成物中にエンドトキシンが存在する危険性を取り除かないまでも、低減するために、ＡＡＲＳポリペプチドを哺乳動物細胞のような真核細胞内で産生させて、そこから単離するという方法も含まれる。ＡＡＲＳポリペプチドを無血清細胞中で産生させて、そこから単離するという方法が好ましい。ＡＡＲＳポリペプチドを含むこのような組成物は、ＡＡＲＳポリペプチドと結合してその新規な生物学的特性を変化させる可能性のある血清またはエンドトキシンが混入したＡＡＲＳポリペプチド組成物では見られない、新規で新しい生物学的および治療的特性を示す新しい製剤である。

【００７１】

エンドトキシンを、当該技術分野で公知の日常的な技術を用いて検出することができる。例えば、カブトガニ由来の血液を用いるリムルス試験（Ｌｉｍｕｌｕｓ Ａｍｅｏｂｏｃｙｔｅ ＬｙｓａｔｅＬｉｍｕｌｕｓ ａｓｓａｙ）は、エンドトキシンの存在を検出するための非常に高感度な試験であり、この試験に基づくエンドトキシン検出のための試薬、キットおよび器具類を、例えばＬｏｎｚａ Ｇｒｏｕｐから購入することができる。この試験では、この反応を増幅する強力な酵素カスケードにより、検出可能なこのリムルスライセートの凝固が極めて低レベルのＬＰＳで起こり得る。また、エンドトキシンを酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）により定量化することもできる。実質的に無エンドトキシンであるためには、エンドトキシンレベルが、タンパク質１ｍｇ当たり約０．００１ＥＵ、０．００５ＥＵ、０．０１ＥＵ、０．０２ＥＵ、０．０３ＥＵ、０．０４ＥＵ、０．０５ＥＵ、０．０６ＥＵ、０．０８ＥＵ、０．０９ＥＵ、０．１ＥＵ、０．５ＥＵ、１．０ＥＵ、１．５ＥＵ、２ＥＵ、２．５ＥＵ、３ＥＵ、４ＥＵ、５ＥＵ、６ＥＵ、７ＥＵ、８ＥＵ、９ＥＵ未満または１０ＥＵ未満であり得る。通常、１ｎｇのリポ多糖（ＬＰＳ）は約１～１０ＥＵに相当する。

【００７２】

特定の実施形態では、組成物中の任意の所定の薬剤（例えば、ＡＡＲＳタンパク質フラグメント）の「純度」を具体的に定め得る。例えば、特定の組成物は、限定されるわけではないが、例えば、生化学および分析化学において化合物を分離、同定および定量化するために頻繁に使用される、よく知られた形態のカラムクロマトグラフィーである高圧液体

クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）による測定で、間の少数をすべて含めた少なくとも８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％純粋な薬剤を含み得る。

【００７３】

本明細書で使用される「機能」および「機能的」などの用語は、生物学的機能、酵素機能または治療的機能を指す。

【００７４】

「遺伝子」は、染色体上の特定の遺伝子座を占め、転写制御配列および／または翻訳制御配列および／またはコード領域および／または非翻訳配列（例えば、イントロン、５’および３’非翻訳配列）からなる遺伝の単位を意味する。

【００７５】

「相同性」は、同一である、または保存的置換を構成するアミノ酸のパーセンテージ数を指す。同一性は、参照により本明細書に組み込まれるＧＡＰ（Ｄｅｖｅｒａｕｘら、１９８４，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １２，３８７－３９５）のような配列比較プログラムを用いて決定され得る。この方法では、本明細書に挙げられている配列と同じ長さまたは実質的に異なる長さの配列を、アライメントへのギャップ挿入により比較し得るが、このようなギャップは、例えばＧＡＰで使用する比較アルゴリズムにより決定される。

【００７６】

「宿主細胞」という用語は、本発明の任意の組換えベクター（１つまたは複数）、単離ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを受容し得るまたは受容した、個々の細胞または細胞培養物を包含する。宿主細胞は単一の宿主細胞の子孫を包含し、その子孫は、自然な、偶発的なまたは意図的な突然変異および／または変化により、元の親細胞と必ずしも（形態または総ＤＮＡ量が）完全に一致していなくてもよい。宿主細胞は、ｉｎ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｔｒｏで本発明の組換えベクターまたはポリヌクレオチドによりトランスフェクトされた、またはこれに感染した細胞を包含する。本発明の組換えベクターを含む宿主細胞は組換え宿主細胞である。

【００７７】

「単離（された）」は、天然の状態で通常は付随している成分を、実質的にまたは本質的に含まない物質を意味する。例えば、本明細書で使用される「単離ポリヌクレオチド」は、その天然の状態では隣接する配列から精製されたポリヌクレオチド、例えば、通常はそのフラグメントと隣接する配列から切り取られたＤＮＡフラグメントを包含する。あるいは、本明細書で使用される「単離ペプチド」または「単離ポリペプチド」などは、ペプチドまたはポリペプチド分子をその天然の細胞環境から、およびその細胞の他の成分との関係からｉｎ ｖｉｔｒｏで単離および／または精製することを包含する；すなわち、それはｉｎ ｖｉｖｏの物質がほとんど付随していない。

【００７８】

本明細書で使用される「ｍＲＮＡ」または時に「ｍＲＮＡ転写産物」と呼ばれる用語は、特に限定されないが、１つもしくは複数の遺伝子のプレｍＲＮＡ転写産物（１つもしくは複数）、転写プロセシング中間体、翻訳の準備ができた成熟ｍＲＮＡ（１つもしくは複数）および転写産物、またはｍＲＮＡ転写産物（１つもしくは複数）に由来する核酸を包含する。転写プロセシングは、スプライシング、編集および分解を含み得る。本明細書で使用される場合、ｍＲＮＡ転写産物由来の核酸は、ｍＲＮＡ転写産物またはその配列が最終的に鋳型として働いて合成された核酸を指す。ｍＲＮＡから逆転写されるｃＤＮＡ、そのｃＤＮＡから転写されるＲＮＡ、そのｃＤＮＡから増幅されるＤＮＡ、その増幅されたＤＮＡから転写されるＲＮＡなどはすべて、ｍＲＮＡ転写産物に由来するものであり、このような由来産物の検出は、試料中に元の転写産物が存在することおよび／または多量に存在することを示すものとなる。したがって、ｍＲＮＡ由来の試料としては、１つまたは複数の遺伝子のｍＲＮＡ転写産物、そのｍＲＮＡから逆転写されるｃＤＮＡ、そのｃＤＮＡから転写されるｃＲＮＡ、遺伝子から増幅されるＤＮＡ、その増幅された遺伝子から転

写されるＲＮＡなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７９】

本明細書で使用される「非カノニカルな」活性は一般に、ｉ）インタクトな天然の完全長親タンパク質が有さず、本発明のＡＡＲＳポリペプチドが有する新規な活性、またはｉｉ）インタクトな天然の完全長親タンパク質が有していた活性で、ＡＡＲＳポリペプチドがインタクトな天然の完全長親タンパク質に比べて有意に高い（すなわち、少なくとも２０％高い）比活性を示す、もしくは新たな関連において活性を示す（例えば、インタクトな天然の完全長親タンパク質が有する他の活性から分離することにより）ような活性を指す。ＡＡＲＳポリペプチドの場合、非カノニカルな活性の非限定的な例としては、細胞外シグナル伝達、ＲＮＡ結合、アミノ酸結合、細胞増殖の調節、細胞遊走の調節、細胞分化の調節（例えば、造血、ニューロン新生、筋形成、骨形成および脂肪生成）、遺伝子転写の調節、アポトーシスまたはその他の形態の細胞死の調節、細胞シグナル伝達の調節、細胞の取込みまたは分泌の調節、血管新生の調節、細胞結合の調節、細胞代謝の調節、サイトカイン産生または活性の調節、サイトカイン受容体活性の調節、炎症の調節などが挙げられる。

【００８０】

「半最大有効濃度」または「EC_{50}」という用語は、定められた曝露時間後にベースラインと最大の中間の反応を誘発する、本明細書に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメント、抗体または他の薬剤の濃度を指し、したがって、段階的な用量反応曲線のEC_{50}は、その最大効果の５０％が見られる化合物の濃度を表す。特定の実施形態では、本明細書に記載の薬剤のEC_{50}は、上述の「非カノニカルな」活性に関して示される。またEC_{50}は、ｉｎ　ｖｉｖｏで最大効果の５０％を得るために必要な血漿中濃度も表す。同様に「EC_{90}」は、その最大効果の９０％が見られる薬剤または組成物の濃度を指す。「EC_{90}」は、「EC_{50}」とＨｉｌｌスロープから算出するか、または当該技術分野の日常的な知識を用いてデータから直接決定することができる。いくつかの実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメント、抗体または他の薬剤のEC_{50}は、約０．０１ｎＭ、０．０５ｎＭ、０．１ｎＭ、０．２ｎＭ、０．３ｎＭ、０．４ｎＭ、０．５ｎＭ、０．６ｎＭ、０．７ｎＭ、０．８ｎＭ、０．９ｎＭ、１ｎＭ、２ｎＭ、３ｎＭ、４ｎＭ、５ｎＭ、６ｎＭ、７ｎＭ、８ｎＭ、９ｎＭ、１０ｎＭ、１１ｎＭ、１２ｎＭ、１３ｎＭ、１４ｎＭ、１５ｎＭ、１６ｎＭ、１７ｎＭ、１８ｎＭ、１９ｎＭ、２０ｎＭ、２５ｎＭ、３０ｎＭ、４０ｎＭ、５０ｎＭ、６０ｎＭ、７０ｎＭ、８０ｎＭ、９０ｎＭ未満または１００ｎＭ未満である。好ましくは、バイオセラピューティック組成物のEC_{50}値は約１ｎＭ未満である。

【００８１】

「調節」という用語は、通常、対照と比べて統計的に有意なまたは生理学的に有意な量で「増加」または「刺激」、および「減少」または「低減」を包含する。したがって、「調節物質」は、使用する条件に応じてアゴニスト、アンタゴニストまたはその任意の混合物であり得る。「増加した」または「増強された」量とは通常、「統計的に有意な」量のことであり、組成物なしで（薬剤または化合物が存在しない）または対照組成物により生じる量の１．１、１．２、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、３０倍以上（例えば、５００倍、１０００倍）（１までの間または１を超えるすべての整数および小数点、例えば、１．５、１．６、１．７．１．８などを含む）の増加を包含し得る。「減少した」または低減された量とは通常、「統計的に有意な」のことであり、組成物なしで（薬剤または化合物が存在しない）または対照組成物により生じる量が１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または１００％（間の整数をすべて含む）減少したことを包含し得る。非限定的な例として、カノニカルな活性と非カノニカルな活性との比較における対照は、その対応する完全長ＡＡＲＳと比較される目的ＡＡＲＳタンパク質フラグメント、またはその対応

する完全長ＡＡＲＳに匹敵するカノニカルな活性を有するフラグメントＡＡＲＳを含み得る。「統計的に有意な」量の他の例が本明細書に記載されている。

【００８２】

「～から得られた」は、試料、例えばポリヌクレオチド抽出物またはポリペプチド抽出物などが、対象の特定の入手源から単離されるまたはそれに由来することを意味する。例えば、抽出物を、対象から直接分離した組織または生体液から得ることができる。また「～に由来する」または「～から得られた」は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の入手源を指す場合がある。例えば、本発明のＡＡＲＳ配列は、天然に存在するか人工的に生成されたかに関係なく、ＡＡＲＳタンパク質分解フラグメントまたはＡＡＲＳスプライスバリアントまたはその一部分の配列情報に「由来」し得る、したがって、その配列を含む、その配列から実質的になる、またはその配列からなるものであり得る。

【００８３】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書では、アミノ酸残基ポリマー、そのバリアントならびに合成および天然の類似体を表すために互換的に使用される。したがって、これらの用語は、１つ以上のアミノ酸残基が天然のアミノ酸に対応する化学的類似体のような非天然の合成アミノ酸であるアミノ酸のポリマー、ならびに天然のアミノ酸ポリマーおよびその天然の化学的誘導体などに適用される。このような誘導体は、例えば、ＡＡＲＳ参照フラグメントのピログルタミル、ｉｓｏ－アスパルチル、タンパク質分解、リン酸化、グリコシル化、酸化、異性化および脱アミノ化バリアントを含めた翻訳後修飾および分解産物を包含し得る。

【００８４】

本明細書で使用される「配列同一性」という記述または例えば、「～と５０％同一の配列」を含む記述は、比較ウインドウにおける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配列が同一である程度を指す。したがって、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウインドウにおいて最適に整列された２つの配列を比較し、両配列において同一の核酸塩基（例えば、Ａ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、Ｉ）または同一アミノ酸残基（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）が存在する位置の数を決定して一致する位置の数を出し、その一致する位置の数を比較ウインドウ内の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）で割り、その結果に１００を掛けることにより、配列同一性のパーセンテージを出す。

【００８５】

２つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列の関係を記述するために使用される用語には、「参照配列」、「比較ウインドウ」、「配列同一性」「配列同一性のパーセンテージ」および「実質的な同一性」がある。「参照配列」は、長さがヌクレオチドおよびアミノ酸残基を含めた少なくとも１２個、多くは１５～１８個、および多くの場合少なくとも２５個のモノマー単位である。２つの各ポリヌクレオチドは、（１）２つのポリヌクレオチドの間で同じである配列（すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部分）および（２）２つのポリヌクレオチド間で異なる配列を含み得るため、２つ（３つ以上）のポリヌクレオチド間の配列比較は通常、「比較ウインドウ」において２つのポリヌクレオチドの配列を比較し、配列類似性の局所領域を同定および比較することにより行われる。「比較ウインドウ」は、２つの配列を最適に整列させた後、配列を同じ数の連続する位置の参照配列と比較するための、少なくとも６個、一般的には約５０～約１００個、より一般的には約１００～約１５０個の連続する位置からなる概念上のセグメントを指す。比較ウインドウは、２つの配列の最適アライメントの参照配列（追加または削除を含まない）と比較して、約２０％以下の追加または削除（すなわち、ギャップ）を含み得る。比較ウインドウを整列させるために最適な配列アライメントは、アルゴリズム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ Ｒｅｌｅａｓｅ ７．０、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ、ＵＳＡのＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡおよびＴ

ＦＡＳＴＡ）のコンピュータ処理の実行により、または閲覧、および選択された各種方法のいずれかで得られた最良のアライメント（すなわち、比較ウインドウにおいて最も高いパーセンテージが得られる）により行い得る。また、例えばＡｌｔｓｃｈｕｌら（１９９７，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５：３３８９）により開示されているような、ＢＬＡＳＴファミリーのプログラムを参照してもよい。配列解析の詳細な記述は、Ａｕｓｕｂｅｌら，“Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，”　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ　Ｉｎｃ，１９９４－１９９８，Ｃｈａｐｔｅｒ１５のＵｎｉｔ１９．３に見ることができる。

【００８６】

配列間の配列類似性または配列同一性（本明細書では２つの用語は互換的に使用される）の計算は、次のように行う。２つのアミノ酸配列または２つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、最適比較目的で配列を整列させる（例えば、最適アライメントのために第一および第二のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方にギャップを挿入してもよく、また比較目的で非相同配列を無視してもよい）。特定の実施形態では、比較目的で整列させた参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも３０％、好ましくは少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも５０％、６０％、さらにより好ましくは、少なくとも７０％、８０％、９０％、１００％である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第一の配列内のある位置が、第二の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められていれば、その分子はその位置において同一である。

【００８７】

２つの配列間のパーセント同一性は、２つの配列の最適アライメントのために挿入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、その配列に共通する同一位置の数の関数である。

【００８８】

２つの配列の比較およびパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。好適な実施形態では、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで入手可能）のＧＡＰプログラムに導入されているＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ（１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４－４５３）のアルゴリズムを使用し、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２マトリックスまたはＰＡＭ２５０マトリックスのどちらか、および１６、１４、１２、１０、８、６または４のギャップ重み付け、および１、２、３、４、５または６の長さ重み付けを用いて、２つのアミノ酸配列間のパーセント同一性を決定する。さらに別の好適な実施形態では、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで入手可能）のＧＡＰプログラムを使用し、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰマトリックス、および４０、５０、６０、７０または８０のギャップ重み付け、および１、２、３、４、５または６の長さ重み付けを用いて、２つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性を決定する。特に好適なパラメータのセット（および特に明示されない限り使用するべきパラメータのセット）は、ギャップペナルティが１２、ギャップ伸長ペナルティが４およびフレームシフトギャップペナルティが５のＢｌｏｓｓｕｍ６２スコア行列である。

【００８９】

ＡＬＩＧＮプログラム（ｖｅｒｓｉｏｎ　２．０）に導入されたＥ．ＭｅｙｅｒｓおよびＷ．Ｍｉｌｌｅｒ（１９８９，Ｃａｂｉｏｓ，４：１１－１７）のアルゴリズムを使用し、ＰＡＭ１２０重み付け残基表、ギャップ長さペナルティ１２およびギャップペナルティ４を用いて、２つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性を決定することができる。

【００９０】

本明細書に記載の核酸およびタンパク質の配列を「クエリ配列」として用いて公的データベースの検索を行い、例えば、他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定することができる。このような検索は、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，

２１５：４０３－１０）のＮＢＬＡＳＴおよびＸＢＬＡＳＴプログラム（ｖｅｒｓｉｏｎ２．０）を用いて行うことができる。ＮＢＬＡＳＴプログラムでｓｃｏｒｅ＝１００、ｗｏｒｄｌｅｎｇｔｈ＝１２としてＢＬＡＳＴヌクレオチド検索を行って、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を入手することができる。ＸＢＬＡＳＴプログラムでｓｃｏｒｅ＝５０、ｗｏｒｄｌｅｎｇｔｈ＝３としてＢＬＡＳＴタンパク質検索を行って、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を入手することができる。比較目的でギャップアライメントを得るためには、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９７，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ，２５：３３８９－３４０２）により記載されているようにギャップＢＬＡＳＴを用いることができる。ＢＬＡＳＴおよびギャップＢＬＡＳＴプログラムを用いる場合、各プログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトのパラメータを使用することができる。

【００９１】

「溶解度」という用語は、本明細書に記載の薬剤が液体溶媒に溶解して均質溶液を形成する特性を指す。溶解度は通常、溶媒の単位体積あたりの溶質の質量（溶媒１ｋｇ当たりの溶質のグラム、ｇ／ｄＬ（１００ｍＬ）、ｍｇ／ｍｌなど）、モル濃度、質量モル濃度、モル分率またはその他の同様の濃度表現法による濃度で表される。溶媒量当たりに溶解し得る溶質の最大平衡量が、温度、圧力、ｐＨおよび溶媒の性質を含めた特定の条件下でのその溶媒における溶質の溶解度である。特定の実施形態では、生理的ｐＨで溶解度を測定する。特定の実施形態では、水またはＰＢＳのような生理緩衝液中で溶解度を測定する。特定の実施形態では、血液または血清のような生体液（溶媒）中で溶解度を測定する。特定の実施形態では、温度はほぼ室温（例えば、約２０、２１、２２、２３、２４、２５℃）またはほぼ体温（３７℃）である。特定の実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントのような薬剤の溶解度は、室温または３７℃で、少なくとも約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５または３０ｍｇ／ｍｌである。

【００９２】

本明細書で使用される「スプライスジャンクション」は、第一のエクソンの３’末端が第二のエクソンの５’末端と結合する、成熟ｍＲＮＡ転写産物またはコードされたポリペプチド内の領域を包含する。領域の大きさは様々であり得、１つのエクソンの３’末端が別のエクソンの５’末端と結合する正にその残基の両側に、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００以上（間にあるすべての整数を含む）のヌクレオチドまたはアミノ酸残基を含み得る。「エクソン」は、シススプライシングにより前駆体ＲＮＡの両側部分が除去されるか、またはトランススプライシングにより２つ以上の前駆体ＲＮＡ分子が連結した後の成熟型のＲＮＡｉ分子で表される核酸配列を指す。成熟ＲＮＡ分子は、メッセンジャーＲＮＡ、またはｒＲＮＡもしくはｔＲＮＡのような機能型の非コードＲＮＡであり得る。文脈によっては、エクソンはＤＮＡまたはそのＲＮＡ転写産物中の配列を指す場合がある。「イントロン」は、タンパク質へ翻訳されない、遺伝子内の非コード核酸領域を指す。非コードのイントロン部分は、前駆体ｍＲＮＡ（プレｍＲＮＡ）およびいくつかの他のＲＮＡ（長い非コードＲＮＡなど）に転写され、次いで、成熟ＲＮＡへプロセシングされる際に、スプライシングにより除去される。

【００９３】

「スプライスバリアント」は、ＲＮＡスプライシングの際にＲＮＡのエクソン（一次遺伝子転写産物またはプレｍＲＮＡ）が複数の方法で再結合される過程である選択的スプライシングにより生成される、成熟ｍＲＮＡおよびそれによりコードされたタンパク質を指す。生じた様々なｍＲＮＡは様々なタンパク質アイソフォームに翻訳され、これにより、単一の遺伝子が複数のタンパク質をコードすることが可能となる。

【００９４】

本明細書で使用される「対象」は、本発明のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドにより治療または診断が可能な症状を呈する、または症状を示す危険性のある、任意の動物を包含する。また、診断またはその他の目的で、本発明のＡＡＲＳポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドのレベルをプロファイルすることが望ましい対象も包含される。適当な対象（患者）としては、実験動物（例えばマウス，ラット，ウサギまたはモルモットなど）、家畜、および飼育動物すなわちペット（例えばネコまたはイヌなど）が挙げられる。非ヒト霊長類、好ましくはヒト患者が包含される。

【００９５】

本明細書で使用される「治療」は、本明細書に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチドの非カノニカルな活性によりもたらされ得る、疾患または状態の症状または病状に対する任意の所望の効果を包含し、また治療する疾患または状態の１つ以上の測定可能なマーカーにおけるわずかな変化または改善も包含し得る。また、本明細書に記載のＡＡＲＳ配列により治療の臨床マーカーが提供される非ＡＡＲＳ療法に関連する治療も包含される。「治療」は、疾患もしくは状態またはそれに関連した症状の完全な根絶または治癒を必ずしも表すわけではない。本治療を受ける対象は、それを必要とする任意の対象である。臨床改善のマーカーの例は当業者に明らかであろう。

【００９６】

本発明の実施においては、そうでないことが特に明示されない限り、当該分野の技術の範囲内である従来の分子生物学および組換えＤＮＡ技術の方法を用いるが、その多くを例示の目的で以下に記載する。このような技術は文献中で十分に説明されている。例えば、以下のものを参照されたい：Ｓａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第３版，２０００）；ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ｖｏｌ．Ｉ ＆ ＩＩ（Ｄ．Ｇｌｏｖｅｒ編）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｎ．Ｇａｉｔら，１９８４）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｐ．Ｈｅｒｄｅｗｉｊｎら，２００４）；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ（Ｂ．ＨａｍｅｓおよびＳ．Ｈｉｇｇｉｎｓ編，１９８５）；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ：Ｍｏｄｅｒｎ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（ＢｕｚｄｉｎおよびＬｕｋｙａｎｏｖ編，２００９）；Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ（Ｂ．ＨａｍｅｓおよびＳ．Ｈｉｇｇｉｎｓ編，１９８４）；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ編，１９８６）；Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ｒ．Ｉ．（２００５）Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ，ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，第５版．Ｈｏｂｏｋｅｎ ＮＪ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ；Ｂ．Ｐｅｒｂａｌ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（第３版，２０１０）；Ｆａｒｒｅｌｌ，Ｒ．，ＲＮＡ Ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ（第３版，２００５），Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ：ＤＮＡ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ Ｐａｒｔ Ａ：Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｈｙｓｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ＤＮＡ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ：Ｐｏｒ表Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ＮＯ．Ｉ ｂｙ Ｅｄｗａｒｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ（１９９９，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，ＩＳＢＮ ０－８７９６９－５４４－７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ｂｙ Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ（Ｅｄｉｔｏｒ），Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ（Ｅｄｉｔｏｒ）（１９８８，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，ＩＳＢＮ ０－８７９６９－３，４－２），１８５５．Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ，Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａ Ｓｅｅｔｈａｌａ，Ｐｒａｂｈａｖａｔｈｉ Ｂ．Ｆｅｒｎａｎｄｅｓ編（２００１，

New York, N. Y., Marcel Dekker, ISBN 0－8247－0562－9）；ならびにLab Ref：A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, Jane RoskamsおよびLinda Rodgers編（2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0－87969－630－3）。

【００９７】

本明細書に引用されているすべての刊行物、特許および特許出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００９８】

ＩＩＩ．治療剤およびその他の適用のための精製ＡＡＲＳタンパク質フラグメントおよびバリアント

驚くべきことに、アミノアシル化活性しか知られていないその完全長親配列とは異なり、ＡＡＲＳフラグメントがバイオセラピューティック、発見および診断への適用に重要な生物活性を有するということがわかった。したがって、本発明の実施形態は、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）の生物学的に活性なバリアントおよびフラグメントに加え、その完全長タンパク質、成熟タンパク質アイソフォームおよびタンパク質フラグメントを含む。特定の実施形態では、タンパク質およびフラグメントは、種々の機序の中でも特に内因性のタンパク質分解、ｉｎ ｖｉｔｒｏでのタンパク質分解、スプライス変異またはコンピュータ予測により生じ得る。

【００９９】

本明細書に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントおよびそのバリアントは、少なくとも１つの「非カノニカルな」生物活性を有し得る。また本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメント（１つまたは複数）は、本明細書では「ＡＡＲＳポリペプチド」または「ＡＡＲＳ参照ポリペプチド」とも呼ばれる。特定の実施形態では、本明細書に記載のＡＡＲＳポリペプチドは、バリルｔＲＮＡ合成酵素の各種フラグメントのアミノ酸配列（１つまたは複数）を表す下の表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているＡＡＲＳポリペプチド「参照配列（１つまたは複数）」の全部または一部を含むか、またはそれらから実質的になる。マウスとヒトのＡＡＲＳタンパク質配列は関連性が高く、通常、配列全体、特定のドメインまたは特定のタンパク質フラグメント内において数個以下のアミノ酸しか異ならない。

【０１００】

Ｎ末端ＡＡＲＳポリペプチド：（表１、２および３）

【表１Ａ－１】

表 1A
質量分析により同定されたＡＡＲＳポリペプチド

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
$ValRS1^{N1}$	タンパク質／ヒト／1-637	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLP IVFDEFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIM DSRGALINVPPPFLGLPRFEAR	配列番号.12
$ValRS1^{N1}$	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA	配列番号.13

【表１Ａ－２】

表 1A
質量分析により同定されたＡＡＲＳポリペプチド

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AGCTGTGCACCCCAAAGATACCAGATACCAGCACCTGAAGG GGAAGAACGTGATCCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCC ATTGTCTTCGATGAATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGG TGCTGTGAAGATCACCCCCGCACATGACCAAAATGACTATG AAGTTGGGCAGCGGCACGGGCTGGAGGCCATCAGCATCATG GACTCCCGGGGGGCCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCT GGGCCTGCCCAGGTTTGAGGCCAGG	
ValRS1^{N2}	タンパク質／ヒト／1-230	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKT	配列番号.14
ValRS1^{N2}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACA	配列番号.15

【０１０１】

【表１Ｂ】

表 1B
$ValRS1^{N1}$
検出された質量分析ペプチドおよび推測される連結ペプチド

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	GPGQDPQAALGALGK	配列番号.16
タンパク質／マウス	ALNPLEDWLRLHTYLAGDAPTLADLAAVTALLLPFRYVLDPSARRIWGNVTRWFNTCVRQPEFRAVLGEVALYSGAR	配列番号.17
タンパク質／マウス	SVTQQPGSEVIAPQK	配列番号.18
タンパク質／マウス	TPAQLKKEAKKREKLEKFQQKQKTQQQPPHGEKKPKPEKKEKRDPGVITYDLPTPPGEKKDVSGAMPDSYSPQYVEAAWYPWWERQGFFKPEYGRPSVSAPNPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHRMRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWKERGLNRHQLGREAFLEEVWKWKAEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPK	配列番号.19
タンパク質／マウス	LSATVTEAFVR	配列番号.20
タンパク質／マウス	IETMLGDVAVAVHPKDPRYQHLKGKCVVHPFLSRSLPIVFDDFVDMEFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQR	配列番号.21
タンパク質／マウス	HRLEAISIMDSKGALINVPPP	配列番号.22

【０１０２】

【表１Ｃ】

表 1C
$ValRS1^{N1}$
検出された質量分析ペプチドに基づき連結した配列

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	GPGQDPQAALGALGKALNPLEDWLRLHTYLAGDAPTLADLAAVTALLLPFRYVLDPSARRIWGNVTRWFNTCVRQPEFRAVLGEVALYSGARSVTQQPGSEVIAPQKTPAQLKKEAKKREKLEKFQQKQKTQQQPPHGEKKPKPEKKEKRDPGVITYDLPTPPGEKKDVSGAMPDSYSPQYVEAAWYPWWERQGFFKPEYGRPSVSAPNPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHRMRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWKERGLNRHQLGREAFLEEVWKWKAEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKLSATVTEAFVRLHEEGVIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDKKELTGRTLLPVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVVATTRIETMLGDVAVAVHPKDPRYQHLKGKCVVHPFLSRSLPIVFDDFVDMEFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHRLEAISIMDSKGALINVPPP	配列番号.23

【０１０３】

【表１Ｄ】

表 1D
ValRS1^{N2}
検出された質量分析ペプチドおよび推測される連結ペプチド

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	YGEAGDGPGWGGPHPR	配列番号.24
タンパク質／マウス	ICLQPPPSSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGAPAVAQLLWPAGLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLR	配列番号.25
タンパク質／マウス	GPGQDPQAALGALGK	配列番号.26
タンパク質／マウス	ALNPLEDWLR	配列番号.27
タンパク質／マウス	LHTYLAGDAPTLADLA	配列番号.28
タンパク質／マウス	AVTALLLPFR	配列番号.29
タンパク質／マウス	YVLDPSARRIWGNVTRWFNTCVRQPEFR	配列番号.30
タンパク質／マウス	AVLGEVALYSGAR	配列番号.31
タンパク質／マウス	SVTQQPGSEVIAPQK	配列番号.32

【０１０４】
【表１Ｅ】

表 1E
ValRS1^{N2}
検出された質量分析ペプチドに基づき連結した配列

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	YGEAGDGPGWGGPHPRICLQPPPSSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGAPAVAQLLWPAGLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRGPGQDPQAALGALGKALNPLEDWLRLHTYLAGDAPTLADLAAVTALLLPFRYVLDPSARRIWGNVTRWFNTCVRQPEFRAVLGEVALYSGARSVTQQPGSEVIAPQK	配列番号.33

【０１０５】

【表２－１】

表２
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
ValRS1^{N4}	タンパク質／ヒト/1-129 + 21 aa	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQIATRRWWWQQLGSRQCWEMWL	配列番号.34
ValRS1^{N4}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AG	配列番号.35
ValRS1^{N5}	タンパク質／ヒト/1-221 + 24 aa	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPPQPAAEQQPGSQRGGEGQRRAES	配列番号.36
ValRS1^{N5}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGGCCTCCACAACCAGCTGCTGAACAGCAACCTGGAT CCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGGCAGAAAGCTGA	配列番号.37
ValRS1^{N6}	タンパク	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC	配列番

【表２－２】

表２
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
	質／ヒト/1-629 + 32 aa	LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLP IVFDEFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIM DSRGALINVPPPFLPVEGRGRASAAAAVVRSLRGDGPGCQR RCDSG	号.38
ValRS1^{N6}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA	配列番号.39

【表２－３】

表 2
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AGCTGTGCACCCCAAAGATACCAGATACCAGCACCTGAAGG GGAAGAACGTGATCCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCC ATTGTCTTCGATGAATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGG TGCTGTGAAGATCACCCCCGCACATGACCAAAATGACTATG AAGTTGGGCAGCGGCACGGGCTGGAGGCCATCAGCATCATG GACTCCCGGGGGGCCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCT GCCGGTCGAAGGACGTGGTAGAGCCTCTGCTGCGGCCGCAG TGGTACGTTCGCTGCGGGGAGATGGCCCAGGCTGCCAGCGC CGCTGTGACTCGGGGTGA	
ValRS1^{N7}	タンパク質／ヒト/1-588 + 37 aa	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLP IVFDEFVDMDFGTGSGAFPGSCGGAIASQPTLSLSVTQRCP LGRTLMGGTG	配列番号.40
ValRS1^{N7}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT	配列番号.41

【表２－４】

表 2
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AGCTGTGCACCCCAAAGATACCAGATACCAGCACCTGAAGG GGAAGAACGTGATCCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCC ATTGTCTTCGATGAATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGG GAGTGGTGCATTTCCAGGCAGCTGTGGTGGGGCCATCGCAT CCCAGCCTACTTTGTCACTGTCAGTGACCCAGCGGTGCCCC CTGGGGAGGACCCTGATGGGCGGTACTGGGTGA	
ValRS1^{N8}	タンパク質／ヒト/1-782 + 60 aa	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG	配列番号.42

【表２－５】

表 2
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLP IVFDEFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIM DSRGALINVPPPFLGLPRFEARKAVLVALKERGLFRGIEDN PMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGD LRILPEAHQRTWHAWMDNIREWCISRQLWWGHRIPAYFVTV SDPAVPPGEDPDGRYWVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPDKIS LQQGLPPCHRARCSRPEDEQVSRQCHRSPGRHLWNLPAGPP QPAAEQQPGSQRGGEGQRRAES	
$ValRS1^{N8}$	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA	配列番号.43

【表２－６】

表２
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AGCTGTGCACCCCAAAGATACCAGATACCAGCACCTGAAGG GGAAGAACGTGATCCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCC ATTGTCTTCGATGAATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGG TGCTGTGAAGATCACCCCCGCACATGACCAAAATGACTATG AAGTTGGGCAGCGGCACGGGCTGGAGGCCATCAGCATCATG GACTCCCGGGGGGCCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCT GGGCCTGCCCAGGTTTGAGGCCAGGAAAGCGGTGCTGGTGG CGCTGAAGGAGCGGGGACTGTTCCGTGGCATTGAGGACAAC CCCATGGTGGTGCCACTTTGCAACCGGTCGAAGGACGTGGT AGAGCCTCTGCTGCGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCGGGG AGATGGCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGAC CTCCGCATCCTGCCTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCATGC CTGGATGGACAACATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGC TGTGGTGGGGCCATCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACTGTC AGTGACCCAGCGGTGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGGGCG GTACTGGGTGAGTGGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGGAGA AGGCAGCCAAGGAGTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATCAGT CTCCAGCAAGGTCTACCTCCATGCCATCGTGCGAGATGCTC ACGGCCGGAAGATGAGCAAGTCTCTAGGCAATGTCATCGAT CCCCTGGACGTCATCTATGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCCA CAACCAGCTGCTGAACAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGG AGAAGGCCAAAGAAGGGCAGAAAGCTGA	
ValRS1^{N9}	タンパク質／ヒト/1-782 + 17 aa	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE	配列番号.44

【表２－７】

表 2
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLP IVFDEFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIM DSRGALINVPPPFLGLPRFEARKAVLVALKERGLFRGIEDN PMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGD LRILPEAHQRTWHAWMDNIREWCISRQLWWGHRIPAYFVTV SDPAVPPGEDPDGRYWVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPDKIS LQQVRRPECVLPRDTAGDRS	
$ValRS1^{N9}$	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC	配列番号.45

【表２－８】

表 2
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AGCTGTGCACCCCAAAGATACCAGATACCAGCACCTGAAGG GGAAGAACGTGATCCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCC ATTGTCTTCGATGAATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGG TGCTGTGAAGATCACCCCCGCACATGACCAAAATGACTATG AAGTTGGGCAGCGGCACGGGCTGGAGGCCATCAGCATCATG GACTCCCGGGGGGCCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCT GGGCCTGCCCAGGTTTGAGGCCAGGAAAGCGGTGCTGGTGG CGCTGAAGGAGCGGGGACTGTTCCGTGGCATTGAGGACAAC CCCATGGTGGTGCCACTTTGCAACCGGTCGAAGGACGTGGT AGAGCCTCTGCTGCGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCGGGG AGATGGCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGAC CTCCGCATCCTGCCTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCATGC CTGGATGGACAACATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGC TGTGGTGGGGCCATCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACTGTC AGTGACCCAGCGGTGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGGGCG GTACTGGGTGAGTGGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGGAGA AGGCAGCCAAGGAGTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATCAGT CTCCAGCAAGTCAGAAGACCTGAGTGTGTTCTACCCCGGGA CACTGCTGGAGACCGGTCATGA	配列番号.46
$ValRS1^{N10}$	タンパク質／ヒト／1-525 + 25 aa	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSGPPQPAAE QQPGSQRGGEGQRRAES	配列番号.47
$ValRS1^{N10}$	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC	配列番号.47

【表２－９】

表 2
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGGGCCTCCACAACCAGCTGCTGAA CAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAGAAG GGCAGAAAGCTGA	
$ValRS1^{N13}$	タンパク質／ヒト/1-129 + 32 aa	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQPVEGRGRASAAAAVVRSLRGDGPGCQRRCDSG	配列番号.48
$ValRS1^{N13}$	DNA /	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC	配列番

【表２－１０】

表 2
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
	ヒト /	CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGCCGGTCGAAGGACGTGGTAGAGC CTCTGCTGCGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCGGGGAGATG GCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGA	号.49
ValRS1^{N14}	タンパク質 / ヒト /1-557 + 2 aa	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQVL	配列番号.50
ValRS1^{N14}	DNA / ヒト /	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC	配列番号.51

【表２－１１】

表 2
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AGCTGTGCACCCCAAAGATACCAGATACCAGGTGCTGTGA	
ValRS1^{N15}	タンパク質／ヒト／1-906 + 7 aa	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLP IVFDEFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIM DSRGALINVPPPFLGLPRFEARKAVLVALKERGLFRGIEDN PMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGD LRILPEAHQRTWHAWMDNIREWCISRQLWWGHRIPAYFVTV SDPAVPPGEDPDGRYWVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPDKIS LQQDEDVLDTWFSSGLFPLSILGWPNQSEDLSVFYPGTLLE TGHDILFFWVARMVMLGLKLTGRLPFREVYLHAIVRDAHGR KMSKSLGNVIDPLDVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKA	配列番号.52

【表２－１２】

表 2
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		KEGQVVTSTWM	
ValRS1^{N15}	DNA / ヒト /	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AGCTGTGCACCCCAAAGATACCAGATACCAGCACCTGAAGG GGAAGAACGTGATCCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCC ATTGTCTTCGATGAATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGG	配列番号.53

【表２－１３】

表 2 ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物			
名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		TGCTGTGAAGATCACCCCCGCACATGACCAAAATGACTATG AAGTTGGGCAGCGGCACGGGCTGGAGGCCATCAGCATCATG GACTCCCGGGGGGCCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCT GGGCCTGCCCAGGTTTGAGGCCAGGAAAGCGGTGCTGGTGG CGCTGAAGGAGCGGGGACTGTTCCGTGGCATTGAGGACAAC CCCATGGTGGTGCCACTTTGCAACCGGTCGAAGGACGTGGT AGAGCCTCTGCTGCGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCGGGG AGATGGCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGAC CTCCGCATCCTGCCTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCATGC CTGGATGGACAACATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGC TGTGGTGGGGCCATCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACTGTC AGTGACCCAGCGGTGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGGGCG GTACTGGGTGAGTGGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGGAGA AGGCAGCCAAGGAGTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATCAGT CTCCAGCAAGATGAGGATGTATTGGATACCTGGTTCTCCTC TGGCCTCTTCCCCTTATCCATTTTGGGCTGGCCCAACCAGT CAGAAGACCTGAGTGTGTTCTACCCCGGGACACTGCTGGAG ACCGGTCATGACATCCTCTTCTTCTGGGTGGCCCGGATGGT CATGCTGGGCCTGAAGCTCACGGGCAGGCTGCCCTTTAGAG AGGTCTACCTCCATGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGCCGG AAGATGAGCAAGTCTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCTGGA CGTCATCTATGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACCAGC TGCTGAACAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGGCC AAAGAAGGGCAGGTCGTGACATCAACCTGGATGTGA	

【０１０６】

【表２Ｂ－１】

表 2B ＡＡＲＳポリペプチドに固有のスプライスジャンクション			
名称	タイプ／種	固有のスプライスジャンクションに近接するアミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
V1-AS01	DNA／ヒト／	CCGAAGCTCGGCCCAGGACCCCCAG|ATAGCGACGAGGAGG TGGTGGTGGC	配列番号.54
	タンパク質／ヒト	RSSAQDPQIATRRWWW	配列番号.55
V1-AS08	DNA／ヒト／	GCCAGGCCTCTCTCTCATCAGCCAG|GGCCTCCACAACCAG CTGCTGAACA	配列番号.56
	タンパク質／ヒト	ARPLSHQPGPPQPAAE	配列番号.57
V1-AS04	DNA／ヒト／	CATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCTG|CCGGTCGAAGGACGT GGTAGAGCCT	配列番号.58
	タンパク質／	INVPPPFLPVEGRGRA	配列番号.59

【表２Ｂ－２】

表 2B
ＡＡＲＳポリペプチドに固有のスプライスジャンクション

名称	タイプ／種	固有のスプライスジャンクションに近接するアミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
	ヒト		
V1-AS06	DNA／ヒト／	TTTGTGGACATGGACTTTGGCACAG|GGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGCTG	配列番号.60
	タンパク質／ヒト	FVDMDFGTGSGAFPGS	配列番号.61
V1-AS07	DNA／ヒト／	CCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAG|GTCTACCTCCATGCCATCGTGCGAG	配列番号.62
	タンパク質／ヒト	PDKISLQQGLPPCHRA	配列番号.63
V1-SV07	DNA／ヒト／	CCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAG|TCAGAAGACCTGAGTGTGTTCTACC	配列番号.64
	タンパク質／ヒト	PDKISLQQVRRPECVL	配列番号.65
V1-AS09	DNA／ヒト／	TTTGCCTATAAGGTCCAAGGCTCAG|GGCCTCCACAACCAGCTGCTGAACA	配列番号.66
	タンパク質／ヒト	FAYKVQGSGPPQPAAE	配列番号.67
V1-AS12	DNA／ヒト／	CCGAAGCTCGGCCCAGGACCCCCAG|CCGGTCGAAGGACGTGGTAGAGCCT	配列番号.68
	タンパク質／ヒト	RSSAQDPQPVEGRGRA	配列番号.69
V1-AS14	DNA／ヒト／	GCACCCCAAAGATACCAGATACCAG|GTGCTGTGAAGATCACCCCCGCACA	配列番号.70
	タンパク質／ヒト	HPKDTRYQVL	配列番号.71
V1-AS16	DNA／ヒト／	GGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGGCAG|GTCGTGACATCAACCTGGATGTGAA	配列番号.72
	タンパク質／ヒト	VEKAKEGQVVTSTWM	配列番号.73

【０１０７】

【表３－１】

表 3
バイオインフォマティクスにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび核酸

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
$ValRS1^{N3}$	タンパク質／ヒト／	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRICLQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPAGLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS	配列番号.74

【表３－２】

表 3
バイオインフォマティクスにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび核酸

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
	1-300	SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSY	
ValRS1^{N3}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTAC	配列番号.75
ValRS1^{N11}	タンパク質／ヒト／1-214	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGAR	配列番号.76
ValRS1^{N11}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG	配列番号.77

【表３－３】

表 3
バイオインフォマティクスにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび核酸

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGG	
$ValRS1^{N12}$	タンパク質／ ヒト／ 1-229	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPK	配列番号.78
$ValRS1^{N12}$	DNA／ ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAG	配列番号.79

【０１０８】

Ｃ末端ＡＡＲＳポリペプチド：（表４、５および６）

【表４Ａ－１】

表 4A
質量分析により同定されたＡＡＲＳポリペプチド

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
$ValRS1^{C1}$	タンパク質／ ヒト /875-1264	DVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKAKEGQKADFPAGIP ECGTDALRFGLCAYMSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNA TKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVRL SNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVD QVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRM PQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRS LRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAG VVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCSIHLQLQGLVDPARELG	配列番号.107

【表４Ａ－２】

表 4A
質量分析により同定されたＡＡＲＳポリペプチド

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		KLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGYPVKVPLEVQEADEAKL QQTEAELRKVDEAIALFQKML	
ValRS1^{C1}	DNA / ヒト /	GACGTCATCTATGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACCA GCTGCTGAACAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGG CCAAAGAAGGGCAGAAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCCT GAATGTGGCACCGATGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCTA CATGTCCCAGGGTCGTGACATCAACCTGGATGTGAACCGGA TACTGGGTTACCGCCACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCC ACCAAGTTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCC CTCACCCACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGG ACCGCTGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTC AGCAATCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCAC CACTGCCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATG TCTACTTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGAC CAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTG CCTGGACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCT TCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATG CCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGA GCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCG CCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCC CTGCGGGCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTG TTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCAT CGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGT GTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGG TTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACC TGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGC AAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCA GCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCA AGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTC CAACAGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCAT CGCCCTATTCCAGAAGATGCTGTGA	配列番号.108
ValRS1^{C2}	タンパク質 / ヒト /896-1264	PSEVEKAKEGQKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYMSQGRDI NLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSPTSQPG GHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFW LYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRL LSPFMPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWK DPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADE ATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALAS DRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRA ASGYPVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	配列番号.109
ValRS1^{C2}	DNA / ヒト /	CCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGGCAGAAAGCTGA CTTCCCAGCGGGGATTCCTGAATGTGGCACCGATGCTCTCC	配列番号.110

【表４Ａ－３】

表 4A
質量分析により同定されたＡＡＲＳポリペプチド

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		GGTTTGGATTATGTGCCTACATGTCCCAGGGTCGTGACATC AACCTGGATGTGAACCGGATACTGGGTTACCGCCACTTCTG CAACAAGCTCTGGAATGCCACCAAGTTTGCCCTTCGTGGCC TTGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCACCCACCTCCCAGCCCGGA GGCCATGAGAGCCTGGTGGACCGCTGGATCCGCAGCCGCCT GACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAATCAAGGCTTCCAGGCCT ACGACTTCCCGGCCGTCACCACTGCCCAGTACAGCTTCTGG CTCTATGAGCTCTGTGATGTCTACTTGGAGTGCCTGAAACC TGTACTGAATGGGGTGGACCAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCC GCCAGACCCTGTACACTTGCCTGGACGTTGGCCTGCGGCTG CTCTCACCCTTCATGCCCTTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCA GAGGCTGCCCCGGAGGATGCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCT GTGTTACCCCCTACCCGGAGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAG GACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCAT CACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCGGGCCGACTACAACCTCA CCCGGATCCGGCCTGACTGTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAG GCCACGGGCGCCCTGGCATCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCA GGCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGG GGGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCT GATCGCTGCTCCATCCACCTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGA CCCTGCACGGGAGCTGGGCAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTG AGGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCT GCCTCGGGCTATCCTGTCAAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGA GGCAGATGAAGCCAAGCTCCAACAGACAGAAGCAGAGCTCA GGAAGGTGGATGAGGCCATCGCCCTATTCCAGAAGATGCTG TGA	
ValRS1^{C3}	タンパク質／ヒト/572-1264	SLPIVFDEFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAI SIMDSRGALINVPPPFLGLPRFEARKAVLVALKERGLFRGI EDNPMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVT RGDLRILPEAHQRTWHAWMDNIREWCISRQLWWGHRIPAYF VTVSDPAVPPGEDPDGRYWVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPD KISLQQDEDVLDTWFSSGLFPLSILGWPNQSEDLSVFYPGT LLETGHDILFFWVARMVMLGLKLTGRLPFREVYLHAIVRDA HGRKMSKSLGNVIDPLDVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEV EKAKEGQKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYMSQGRDINLDV NRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHES LVDRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYEL CDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPF MPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEA EAALELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGA LASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCS IHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGY PVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	配列番号.111

【表４Ａ－４】

表 4A
質量分析により同定されたＡＡＲＳポリペプチド

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
$ValRS1^{C3}$	DNA / ヒト /	AGCCTTCCCATTGTCTTCGATGAATTTGTGGACATGGACTT TGGCACAGGTGCTGTGAAGATCACCCCCGCACATGACCAAA ATGACTATGAAGTTGGGCAGCGGCACGGGCTGGAGGCCATC AGCATCATGGACTCCCGGGGGGCCCTCATCAATGTGCCTCC GCCTTTCCTGGGCCTGCCCAGGTTTGAGGCCAGGAAAGCGG TGCTGGTGGCGCTGAAGGAGCGGGGACTGTTCCGTGGCATT GAGGACAACCCCATGGTGGTGCCACTTTGCAACCGGTCGAA GGACGTGGTAGAGCCTCTGCTGCGGCCGCAGTGGTACGTTC GCTGCGGGGAGATGGCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACT CGGGGTGACCTCCGCATCCTGCCTGAGGCCCATCAGCGCAC ATGGCATGCCTGGATGGACAACATCCGGGAGTGGTGCATTT CCAGGCAGCTGTGGTGGGGCCATCGCATCCCAGCCTACTTT GTCACTGTCAGTGACCCAGCGGTGCCCCCTGGGGAGGACCC TGATGGGCGGTACTGGGTGAGTGGACGCAATGAGGCGGAGG CCCGGGAGAAGGCAGCCAAGGAGTTCGGAGTGTCCCCTGAC AAGATCAGTCTCCAGCAAGATGAGGATGTATTGGATACCTG GTTCTCCTCTGGCCTCTTCCCCTTATCCATTTTGGGCTGGC CCAACCAGTCAGAAGACCTGAGTGTGTTCTACCCCGGGACA CTGCTGGAGACCGGTCATGACATCCTCTTCTTCTGGGTGGC CCGGATGGTCATGCTGGGCCTGAAGCTCACGGGCAGGCTGC CCTTTAGAGAGGTCTACCTCCATGCCATCGTGCGAGATGCT CACGGCCGGAAGATGAGCAAGTCTCTAGGCAATGTCATCGA TCCCCTGGACGTCATCTATGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCC ACAACCAGCTGCTGAACAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTG GAGAAGGCCAAAGAAGGGCAGAAAGCTGACTTCCCAGCGGG GATTCCTGAATGTGGCACCGATGCTCTCCGGTTTGGATTAT GTGCCTACATGTCCCAGGGTCGTGACATCAACCTGGATGTG AACCGGATACTGGGTTACCGCCACTTCTGCAACAAGCTCTG GAATGCCACCAAGTTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTT TTGTGCCCTCACCCACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGC CTGGTGGACCGCTGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGT GAGGCTCAGCAATCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGG CCGTCACCACTGCCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTC TGTGATGTCTACTTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGG GGTGGACCAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGT ACACTTGCCTGGACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTC ATGCCCTTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCG GAGGATGCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCT ACCCGGAGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCA GAAGCCGCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGT GCGCTCCCTGCGGGCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGC CTGACTGTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCC CTGGCATCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAG CGCAGGTGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCC CCCAGGGTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCC	配列番号. 112

【表４Ａ－５】

表 4A
質量分析により同定されたＡＡＲＳポリペプチド

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		ATCCACCTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGA GCTGGGCAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGC AGGCCCAGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTAT CCTGTCAAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGC CAAGCTCCAACAGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATG AGGCCATCGCCCTATTCCAGAAGATGCTGTGA	
$ValRS1^{C4}$	タンパク質／ヒト／940-1264	VNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHE SLVDRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYE LCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSP FMPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPE AEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATG ALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRC SIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASG YPVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	配列番号.113
$ValRS1^{C4}$	DNA／ヒト／	GTGAACCGGATACTGGGTTACCGCCACTTCTGCAACAAGCT CTGGAATGCCACCAAGTTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGG GTTTTGTGCCCTCACCCACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAG AGCCTGGTGGACCGCTGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGC TGTGAGGCTCAGCAATCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCC CGGCCGTCACCACTGCCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAG CTCTGTGATGTCTACTTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAA TGGGGTGGACCAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCC TGTACACTTGCCTGGACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCC TTCATGCCCTTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCC CCGGAGGATGCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCC CCTACCCGGAGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAG GCAGAAGCCGCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGC CGTGCGCTCCCTGCGGGCCGACTACAACCTCACCCGGATCC GGCCTGACTGTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGC GCCCTGGCATCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGC CAGCGCAGGTGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCG CCCCCCAGGGTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGC TCCATCCACCTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACG GGAGCTGGGCAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGC GGCAGGCCCAGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGC TATCCTGTCAAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGA AGCCAAGCTCCAACAGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGG ATGAGGCCATCGCCCTATTCCAGAAGATGCTGTGA	配列番号.114

【０１０９】

【表４Ｂ】

表 4B
ValRS1^{C1}
検出された質量分析ペプチドおよび推測される連結ペプチド

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	FGLCAYTSQGR	配列番号.115
タンパク質／マウス	DINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSATSKPEGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNEGFQAYDFPAITTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRTPKAPASLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRTRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVL	配列番号.116
タンパク質／マウス	ALGAPAPQGCAVAVASDR	配列番号.117
タンパク質／マウス	CSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRSEAQRQAQRLQERRAASSYSAK	配列番号.118
タンパク質／マウス	VPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQK	配列番号.119

【０１１０】
【表４Ｃ】

表 4C
ValRS1^{C1}
検出された質量分析ペプチドに基づき連結した配列

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	FGLCAYTSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSATSKPEGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNEGFQAYDFPAITTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRTPKAPASLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRTRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVAVASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRSEAQRQAQRLQERRAASSYSAKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQK	配列番号.120

【０１１１】
【表４Ｄ－１】

表 4D
ValRS1^{C2}
検出された質量分析ペプチドおよび推測される連結ペプチド

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	ADFPAGIPECGTDALR	配列番号.121
タンパク質／マウス	FGLCAYTSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSATSKPEGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNEGFQAYDFPAITTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRTPKAPAS	配列番号.122

【表４Ｄ－２】

表 4D
ValRS1^{C2}
検出された質量分析ペプチドおよび推測される連結ペプチド

タイプ／種	配列	配列番号.
	LCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRTRPDCFLEVA DEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVAVASDRCSIHLQLQG LVDPARELGKLQAKRSEAQRQAQRLQERRAASSYSAKVPLEVQEADEAKLQQTE AELR	
タンパク質／マウス	KVDEAIALFQK	配列番号.123

【０１１２】

【表４Ｅ】

表 4E
ValRS1^{C2}
検出された質量分析ペプチドに基づき連結した配列

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	ADFPAGIPECGTDALRFGLCAYTSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFAL RGLGKGFVPSATSKPEGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNEGFQAYDFPAITTAQY SFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTE ELFQRLPRRTPKAPASLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRA DYNLTRTRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCA VAVASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRSEAQRQAQRLQERRAASSYSAKV PLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQK	配列番号.124

【０１１３】

【表４Ｆ－１】

表 4F
ValRS1^{C3}
検出された質量分析ペプチドおよび推測される連結ペプチド

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	SLPIVFDDFVDMEFGTGAVK	配列番号.125
タンパク質／マウス	ITPAHDQNDYEVGQRHRLEAISIMDSKGALINVPPPFLGLPRFEARKAVLAALK ERGLFRGVKDNPMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGDLR ILPEAHQRTWHSWMDNIRDWCISRQLWWGHR	配列番号.126
タンパク質／マウス	IPAYFITVHDPAVPPGEDPDGR	配列番号.127
タンパク質／マウス	YWVSGRTEAEAREKAAREFGVSPDKISLQQDEDVLDTWFSSGLFPFSIFGWPNQ SEDLSVFYPGTLLETGHDILFFWVARMVMLGLKLTGKLPFREVYLHAIVRDAHG RKMSK	配列番号.128
タンパク質／マウス	SLGNVIDPLDVIHGVSLQ	配列番号.129
タンパ	GLYDQLLNSNLDPSEVEKAKEGQKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYTSQGRDIN	配列番

【表４Ｆ－２】

表 4F
ValRS1^{C3}
検出された質量分析ペプチドおよび推測される連結ペプチド

タイプ／種	配列	配列番号.
クエン酸／マウス	LDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSATSKPEGHESLVDRWIRSRL TEAVRLSNEGFQAYDFPAITTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECA RQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRTPKAPASLCVTPYPEPSECSW KDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRTRPDCFLEVADEATGALASAVSGY VQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVAVASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAK RSEAQRQAQRLQERRAASSYSAKVPLEVQEADEAKLQQTEAELR	配列番号.130
タンパク質／マウス	KVDEAIALFQK	配列番号.131
タンパク質／マウス	SLPIVFDDFVDMEFGTGAVK	配列番号.132
タンパク質／マウス	ITPAHDQNDYEVGQR	配列番号.133
タンパク質／マウス	HRLEAISIMDSKGALINVPPPFLGLPRFEARKAVLAALKERGLFRGVKDNPMVV PLCNRSKDVVEPLLRPQWYVR	配列番号.134
タンパク質／マウス	CGEMAQAASAAVTR	配列番号.135
タンパク質／マウス	GDLRILPEAHQRTWHSWMDNIRDWCISRQLWWGHRIPAYFITVHDPAVPPGEDP DGRYWVSGRTEAEAREKAAREFGVSPDKISLQQDEDVLDTWFSSGLFPFSIFGW PNQSEDLSVFYPGTLLETGHDILFFWVARMVMLGLKLTGKLPFREVYLHAIVRD AHGRKMSKSLGNVIDPLDVIHGVSLQGLYDQLLNSNLDPSEVEKAKEGQKADFP AGIPECGTDALR	配列番号.136
タンパク質／マウス	FGLCAYTSQGR	配列番号.137
タンパク質／マウス	DINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSATSKPEGHESLVDRWIR SRLTEAVRLSNEGFQAYDFPAITTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAA ECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRTPKAPASLCVTPYPEPSE CSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRTRPDCFLEVADEATGALASAV SGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVAVASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKL QAKRSEAQRQAQRLQERRAASSYSAK	配列番号.138
タンパク質／マウス	VPLEVQEADEAK	配列番号.139

【０１１４】

【表４Ｇ】

表 4G
ValRS1^{C3}
検出された質量分析ペプチドに基づき連結した配列

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	SLPIVFDDFVDMEFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHRLEAISIMDSKGALINVP PPFLGLPRFEARKAVLAALKERGLFRGVKDNPMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWY VRCGEMAQAASAAVTRGDLRILPEAHQRTWHSWMDNIRDWCISRQLWWGHRIPA YFITVHDPAVPPGEDPDGRYWVSGRTEAEAREKAAREFGVSPDKISLQQDEDVL DTWFSSGLFPFSIFGWPNQSEDLSVFYPGTLLETGHDILFFWVARMVMLGLKLT GKLPFREVYLHAIVRDAHGRKMSKSLGNVIDPLDVIHGVSLQGLYDQLLNSNLD PSEVEKAKEGQKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYTSQGRDINLDVNRILGYRHF CNKLWNATKFALRGLGKGFVPSATSKPEGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNEGFQ AYDFPAITTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGL RLLSPFMPFVTEELFQRLPRRTPKAPASLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELA LSITRAVRSLRADYNLTRTRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAV LALGAPAPQGCAVAVASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRSEAQRQAQRLQ ERRAASSYSAKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQK	配列番号.140
タンパク質／マウス	SLPIVFDDFVDMEFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHRLEAISIMDSKGALINVP PPFLGLPRFEARKAVLAALKERGLFRGVKDNPMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWY VRCGEMAQAASAAVTRGDLRILPEAHQRTWHSWMDNIRDWCISRQLWWGHRIPA YFITVHDPAVPPGEDPDGRYWVSGRTEAEAREKAAREFGVSPDKISLQQDEDVL DTWFSSGLFPFSIFGWPNQSEDLSVFYPGTLLETGHDILFFWVARMVMLGLKLT GKLPFREVYLHAIVRDAHGRKMSKSLGNVIDPLDVIHGVSLQGLYDQLLNSNLD PSEVEKAKEGQKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYTSQGRDINLDVNRILGYRHF CNKLWNATKFALRGLGKGFVPSATSKPEGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNEGFQ AYDFPAITTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGL RLLSPFMPFVTEELFQRLPRRTPKAPASLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELA LSITRAVRSLRADYNLTRTRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAV LALGAPAPQGCAVAVASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRSEAQRQAQRLQ ERRAASSYSAKVPLEVQEADEAK	配列番号.141

【０１１５】
【表４Ｈ】

表 4H
ValRS1^{C4}
検出された質量分析ペプチドおよび推測される連結ペプチド

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	GVDQVAAECAR	配列番号.142
タンパク質／マウス	QTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRTPKAPASLCVTPYPEPSECSWK DPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTR	配列番号.143
タンパク質／マウス	TRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQ	配列番号.144

【０１１６】

【表４Ｉ】

表 4I
ValRS1^{C4}
検出された質量分析ペプチドに基づき連結した配列

タイプ／種	配列	配列番号.
タンパク質／マウス	GVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRTPKAPASLCVT PYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRTRPDCFLEVADEAT GALASAVSGYVQ	配列番号.145

【０１１７】

【表５－１】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
ValRS1^{C5}	タンパク質／ヒト／930-1264	MSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVP SPTSQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVT TAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTC LDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPE PSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDC FLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQG CAVALASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQ RLRERRAASGYPVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAI ALFQKML	配列番号.146
ValRS1^{C5}	DNA／ヒト／	ATGTCCCAGGGTCGTGACATCAACCTGGATGTGAACCGGAT ACTGGGTTACCGCCACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCCA CCAAGTTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCCC TCACCCACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGGA CCGCTGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTCA GCAATCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCACC ACTGCCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATGT CTACTTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGACC AGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTGC CTGGACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCTT CGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATGC CGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGAG CCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCGC CCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCCC TGCGGGCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTGT TTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCATC GGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGTG TGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGGT TGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACCT GCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGCA AGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCAG CGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCAA GGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTCC AACAGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCATC	配列番号.147

【表５－２】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		GCCCTATTCCAGAAGATGCTGTGA	
ValRS1^{C6}	タンパク質／ヒト／1-262 + 907-1264	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYMS QGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSP TSQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTA QYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLD VGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPS ECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFL EVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCA VALASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRL RERRAASGYPVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIAL FQKML	配列番号.148
ValRS1^{C6}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCCTGAATGTG GCACCGATGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCTACATGTCC CAGGGTCGTGACATCAACCTGGATGTGAACCGGATACTGGG TTACCGCCACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCCACCAAGT TTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCACCC ACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGGACCGCTG GATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAATC	配列番号.149

【表５－３】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		AAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCACCACTGCC CAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATGTCTACTT GGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGACCAGGTGG CAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTGCCTGGAC GTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCTTCGTGAC GGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATGCCGCAAG CTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGAGCCCTCA GAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTTGA GCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCGGG CCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTGTTTCCTG GAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCATCGGCGGT GTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGTGG CTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCGCT GTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACCTGCAGCT TCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGCAAGCTGC AAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTCTG CGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCAAGGTGCC GCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTCCAACAGA CAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCATCGCCCTA TTCCAGAAGATGCTGTGA	
ValRS1^{C7}	タンパク質／ヒト／1-129 + 976-1264	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAV TTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYT CLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYP EPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPD CFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQ GCAVALASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQA QRLRERRAASGYPVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEA IALFQKML	配列番号. 150
ValRS1^{C7}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGT GGACCGCTGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGC TCAGCAATCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTC	配列番号. 151

【表５－４】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		ACCACTGCCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGA TGTCTACTTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGG ACCAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACT TGCCTGGACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCC CTTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGA TGCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCG GAGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGC CGCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCT CCCTGCGGGCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGAC TGTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGC ATCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAG GTGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAG GGTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCA CCTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGG GCAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCC CAGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGT CAAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGC TCCAACAGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCC ATCGCCCTATTCCAGAAGATGCTGTGA	
ValRS1^{C8}	タンパク質／ヒト／34 aa + 665-1264	MTKMTMKLGSGTGWRPSASWTPGGPSSMCLRLSCRSKDVVE PLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGDLRILPEAHQRTWHAW MDNIREWCISRQLWWGHRIPAYFVTVSDPAVPPGEDPDGRY WVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPDKISLQQDEDVLDTWFSSG LFPLSILGWPNQSEDLSVFYPGTLLETGHDILFFWVARMVM LGLKLTGRLPFREVYLHAIVRDAHGRKMSKSLGNVIDPLDV IYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKAKEGQKADFPAGIPEC GTDALRFGLCAYMSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATK FALRGLGKGFVPSPTSQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSN QGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQV AAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRMPQ APPSLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLR ADYNLTRIRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVV AVLALGAPAPQGCAVALASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKL QAKRVEAQRQAQRLRERRAASGYPVKVPLEVQEADEAKLQQ TEAELRKVDEAIALFQKML	配列番号.152
ValRS1^{C8}	DNA／ヒト／	ATGACCAAAATGACTATGAAGTTGGGCAGCGGCACGGGCTG GAGGCCATCAGCATCATGGACTCCCGGGGGGCCCTCATCAA TGTGCCTCCGCCTTTCCTGCCGGTCGAAGGACGTGGTAGAG CCTCTGCTGCGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCGGGGAGAT GGCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGACCTCC GCATCCTGCCTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCATGCCTGG ATGGACAACATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGCTGTG	配列番号.153

【表５－５】

表５
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		GTGGGGCCATCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACTGTCAGTG ACCCAGCGGTGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGGGCGGTAC TGGGTGAGTGGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGGAGAAGGC AGCCAAGGAGTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATCAGTCTCC AGCAAGATGAGGATGTATTGGATACCTGGTTCTCCTCTGGC CTCTTCCCCTTATCCATTTTGGGCTGGCCCAACCAGTCAGA AGACCTGAGTGTGTTCTACCCCGGGACACTGCTGGAGACCG GTCATGACATCCTCTTCTTCTGGGTGGCCCGGATGGTCATG CTGGGCCTGAAGCTCACGGGCAGGCTGCCCTTTAGAGAGGT CTACCTCCATGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGCCGGAAGA TGAGCAAGTCTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCTGGACGTC ATCTATGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACCAGCTGCT GAACAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAG AAGGGCAGAAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCCTGAATGT GGCACCGATGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCTACATGTC CCAGGGTCGTGACATCAACCTGGATGTGAACCGGATACTGG GTTACCGCCACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCCACCAAG TTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCACC CACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGGACCGCT GGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAAT CAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCACCACTGC CCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATGTCTACT TGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGACCAGGTG GCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTGCCTGGA CGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCTTCGTGA CGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATGCCGCAA GCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGAGCCCTC AGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTTG AGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCGG GCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTGTTTCCT GGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCATCGGCGG TGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGTG GCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCGC TGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACCTGCAGC TTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGCAAGCTG CAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTCT GCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCAAGGTGC CGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTCCAACAG ACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCATCGCCCT ATTCCAGAAGATGCTGTGA	
ValRS1^{C9}	タンパク質／ヒト／1-806 +	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA	配列番号.154

【表５－６】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
	849-1264	VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLP IVFDEFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIM DSRGALINVPPPFLGLPRFEARKAVLVALKERGLFRGIEDN PMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGD LRILPEAHQRTWHAWMDNIREWCISRQLWWGHRIPAYFVTV SDPAVPPGEDPDGRYWVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPDKIS LQQDEDVLDTWFSSGLFPLSILGWPNQVYLHAIVRDAHGRK MSKSLGNVIDPLDVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKAK EGQKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYMSQGRDINLDVNRIL GYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHESLVDR WIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYELCDVY LECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFV TEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAAL ELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGALASA VSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCSIHLQ LQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGYPVKV PLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	
$ValRS1^{C9}$	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC	配列番号.155

【表５－７】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AGCTGTGCACCCCAAAGATACCAGATACCAGCACCTGAAGG GGAAGAACGTGATCCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCC ATTGTCTTCGATGAATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGG TGCTGTGAAGATCACCCCCGCACATGACCAAAATGACTATG AAGTTGGGCAGCGGCACGGGCTGGAGGCCATCAGCATCATG GACTCCCGGGGGGCCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCT GGGCCTGCCCAGGTTTGAGGCCAGGAAAGCGGTGCTGGTGG CGCTGAAGGAGCGGGGACTGTTCCGTGGCATTGAGGACAAC CCCATGGTGGTGCCACTTTGCAACCGGTCGAAGGACGTGGT AGAGCCTCTGCTGCGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCGGGG AGATGGCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGAC CTCCGCATCCTGCCTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCATGC CTGGATGGACAACATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGC TGTGGTGGGGCCATCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACTGTC AGTGACCCAGCGGTGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGGGCG GTACTGGGTGAGTGGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGGAGA AGGCAGCCAAGGAGTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATCAGT CTCCAGCAAGATGAGGATGTATTGGATACCTGGTTCTCCTC TGGCCTCTTCCCCTTATCCATTTTGGGCTGGCCCAACCAGG TCTACCTCCATGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGCCGGAAG ATGAGCAAGTCTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCTGGACGT	

【表５－８】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CATCTATGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACCAGCTGC TGAACAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAA GAAGGGCAGAAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCCTGAATG TGGCACCGATGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCTACATGT CCCAGGGTCGTGACATCAACCTGGATGTGAACCGGATACTG GGTTACCGCCACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCCACCAA GTTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCAC CCACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGGACCGC TGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAA TCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCACCACTG CCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATGTCTAC TTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGACCAGGT GGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTGCCTGG ACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCTTCGTG ACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATGCCGCA AGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGAGCCCT CAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTT GAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCG GGCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTGTTTCC TGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCATCGGCG GTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGT GGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCG CTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACCTGCAG CTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGCAAGCT GCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTC TGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCAAGGTG CCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTCCAACA GACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCATCGCCC TATTCCAGAAGATGCTGTGA	
$ValRS1^{C10}$	タンパク質／ヒト／833-1264	MVMLGLKLTGRLPFREVYLHAIVRDAHGRKMSKSLGNVIDP LDVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKAKEGQKADFPAGI PECGTDALRFGLCAYMSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWN ATKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVR LSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGV DQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRR MPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVR SLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASA GVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCSIHLQLQGLVDPAREL GKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGYPVKVPLEVQEADEAK LQQTEAELRKVDEAIALFQKML	配列番号.156
$ValRS1^{C10}$	DNA／ヒト／	ATGGTCATGCTGGGCCTGAAGCTCACGGGCAGGCTGCCCTT TAGAGAGGTCTACCTCCATGCCATCGTGCGAGATGCTCACG GCCGGAAGATGAGCAAGTCTCTAGGCAATGTCATCGATCCC	配列番号.157

【表５－９】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CTGGACGTCATCTATGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAA CCAGCTGCTGAACAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGA AGGCCAAAGAAGGGCAGAAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATT CCTGAATGTGGCACCGATGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGC CTACATGTCCCAGGGTCGTGACATCAACCTGGATGTGAACC GGATACTGGGTTACCGCCACTTCTGCAACAAGCTCTGGAAT GCCACCAAGTTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGT GCCCTCACCCACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGG TGGACCGCTGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGG CTCAGCAATCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGT CACCACTGCCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTG ATGTCTACTTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTG GACCAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACAC TTGCCTGGACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGC CCTTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGG ATGCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCC GGAGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAG CCGCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGC TCCCTGCGGGCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGA CTGTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGG CATCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCA GGTGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCA GGGTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCC ACCTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTG GGCAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGC CCAGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTG TCAAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAG CTCCAACAGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGC CATCGCCCTATTCCAGAAGATGCTGTGA	
$ValRS1^{C11}$	タンパク質／ヒト／24 aa + 849-1264	MRRRPGRRQPRSSECPLTRSVSSKVYLHAIVRDAHGRKMSK SLGNVIDPLDVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKAKEGQ KADFPAGIPECGTDALRFGLCAYMSQGRDINLDVNRILGYR HFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHESLVDRWIR SRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYELCDVYLEC LKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEE LFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELA LSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGALASAVSG YVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCSIHLQLQG LVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGYPVKVPLE VQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	配列番号.158
$ValRS1^{C11}$	DNA／ヒト／	ATGAGGCGGAGGCCCGGGAGAAGGCAGCCAAGGAGTTCGGA GTGTCCCCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAGGTCTACCTCC	配列番号.159

【表５－１０】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		ATGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGCCGGAAGATGAGCAAG TCTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCTGGACGTCATCTATGG AATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACCAGCTGCTGAACAGCA ACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGGCAG AAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCCTGAATGTGGCACCGA TGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCTACATGTCCCAGGGTC GTGACATCAACCTGGATGTGAACCGGATACTGGGTTACCGC CACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCCACCAAGTTTGCCCT TCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCACCCACCTCCC AGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGGACCGCTGGATCCGC AGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAATCAAGGCTT CCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCACCACTGCCCAGTACA GCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATGTCTACTTGGAGTGC CTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGACCAGGTGGCAGCTGA GTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTGCCTGGACGTTGGCC TGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCTTCGTGACGGAGGAG CTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATGCCGCAAGCTCCCCC TAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGAGCCCTCAGAGTGCT CCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTTGAGCTGGCG CTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCGGGCCGACTA CAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTGTTTCCTGGAAGTGG CGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCATCGGCGGTGTCGGGC TACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGTGGCTGTTCT GGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCGCTGTGGCTC TGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACCTGCAGCTTCAGGGG CTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGCAAGCTGCAAGCCAA GCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTCTGCGGGAAC GCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCAAGGTGCCGCTCGAA GTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTCCAACAGACAGAAGC AGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCATCGCCCTATTCCAGA AGATGCTGTGA	
ValRS1^{C12}	タンパク質／ヒト／24 aa + 807-1264	MRRRPGRRQPRSSECPLTRSVSSKSEDLSVFYPGTLLETGH DILFFWVARMVMLGLKLTGRLPFREVYLHAIVRDAHGRKMS KSLGNVIDPLDVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKAKEG QKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYMSQGRDINLDVNRILGY RHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHESLVDRWI RSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYELCDVYLE CLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTE ELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALEL ALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGALASAVS GYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCSIHLQLQ GLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGYPVKVPL EVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	配列番号.160

【表５－１１】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
ValRS1^{C12}	DNA／ヒト／	ATGAGGCGGAGGCCCGGGAGAAGGCAGCCAAGGAGTTCGGA GTGTCCCCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAGTCAGAAGACC TGAGTGTGTTCTACCCCGGGACACTGCTGGAGACCGGTCAT GACATCCTCTTCTTCTGGGTGGCCCGGATGGTCATGCTGGG CCTGAAGCTCACGGGCAGGCTGCCCTTTAGAGAGGTCTACC TCCATGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGCCGGAAGATGAGC AAGTCTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCTGGACGTCATCTA TGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACCAGCTGCTGAACA GCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGG CAGAAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCCTGAATGTGGCAC CGATGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCTACATGTCCCAGG GTCGTGACATCAACCTGGATGTGAACCGGATACTGGGTTAC CGCCACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCCACCAAGTTTGC CCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCACCCACCT CCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGGACCGCTGGATC CGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAATCAAGG CTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCACCACTGCCCAGT ACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATGTCTACTTGGAG TGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGACCAGGTGGCAGC TGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTGCCTGGACGTTG GCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCTTCGTGACGGAG GAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATGCCGCAAGCTCC CCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGAGCCCTCAGAGT GCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTTGAGCTG GCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCGGGCCGA CTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTGTTTCCTGGAAG TGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCATCGGCGGTGTCG GGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGTGGCTGT TCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCGCTGTGG CTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACCTGCAGCTTCAG GGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGCAAGCTGCAAGC CAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTCTGCGGG AACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCAAGGTGCCGCTC GAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTCCAACAGACAGA AGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCATCGCCCTATTCC AGAAGATGCTGTGA	配列番号.161
ValRS1^{C13}	タンパク質／ヒト／541-1264	MLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLPIVFDEFV DMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIMDSRGALI NVPPPFLGLPRFEARKAVLVALKERGLFRGIEDNPMVVPLC NRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGDLRILPEA HQRTWHAWMDNIREWCISRQLWWGHRIPAYFVTVSDPAVPP GEDPDGRYWVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPDKISLQQDEDV LDTWFSSGLFPLSILGWPNQSEDLSVFYPGTLLETGHDILF FWVARMVMLGLKLTGRLPFREVYLHAIVRDAHGRKMSKSLG	配列番号.162

【表５－１２】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		NVIDPLDVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKAKEGQKAD FPAGIPECGTDALRFGLCAYMSQGRDINLDVNRILGYRHFC NKLWNATKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHESLVDRWIRSRL TEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYELCDVYLECLKP VLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQ RLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSI TRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQ ALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCSIHLQLQGLVD PARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGYPVKVPLEVQE ADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	
$ValRS1^{C13}$	DNA／ヒト／	ATGCTGGGAGATGTGGCTGTAGCTGTGCACCCCAAAGATAC CAGATACCAGCACCTGAAGGGGAAGAACGTGATCCACCCAT TCCTGTCTCGGAGCCTTCCCATTGTCTTCGATGAATTTGTG GACATGGACTTTGGCACAGGTGCTGTGAAGATCACCCCCGC ACATGACCAAAATGACTATGAAGTTGGGCAGCGGCACGGGC TGGAGGCCATCAGCATCATGGACTCCCGGGGGGCCCTCATC AATGTGCCTCCGCCTTTCCTGGGCCTGCCCAGGTTTGAGGC CAGGAAAGCGGTGCTGGTGGCGCTGAAGGAGCGGGGACTGT TCCGTGGCATTGAGGACAACCCCATGGTGGTGCCACTTTGC AACCGGTCGAAGGACGTGGTAGAGCCTCTGCTGCGGCCGCA GTGGTACGTTCGCTGCGGGGAGATGGCCCAGGCTGCCAGCG CCGCTGTGACTCGGGGTGACCTCCGCATCCTGCCTGAGGCC CATCAGCGCACATGGCATGCCTGGATGGACAACATCCGGGA GTGGTGCATTTCCAGGCAGCTGTGGTGGGGCCATCGCATCC CAGCCTACTTTGTCACTGTCAGTGACCCAGCGGTGCCCCCT GGGGAGGACCCTGATGGGCGGTACTGGGTGAGTGGACGCAA TGAGGCGGAGGCCCGGGAGAAGGCAGCCAAGGAGTTCGGAG TGTCCCCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAGATGAGGATGTA TTGGATACCTGGTTCTCCTCTGGCCTCTTCCCCTTATCCAT TTTGGGCTGGCCCAACCAGTCAGAAGACCTGAGTGTGTTCT ACCCCGGGACACTGCTGGAGACCGGTCATGACATCCTCTTC TTCTGGGTGGCCCGGATGGTCATGCTGGGCCTGAAGCTCAC GGGCAGGCTGCCCTTTAGAGAGGTCTACCTCCATGCCATCG TGCGAGATGCTCACGGCCGGAAGATGAGCAAGTCTCTAGGC AATGTCATCGATCCCCTGGACGTCATCTATGGAATCTCCCT GCAGGGCCTCCACAACCAGCTGCTGAACAGCAACCTGGATC CCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGGCAGAAAGCTGAC TTCCCAGCGGGGATTCCTGAATGTGGCACCGATGCTCTCCG GTTTGGATTATGTGCCTACATGTCCCAGGGTCGTGACATCA ACCTGGATGTGAACCGGATACTGGGTTACCGCCACTTCTGC AACAAGCTCTGGAATGCCACCAAGTTTGCCCTTCGTGGCCT TGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCACCCACCTCCCAGCCCGGAG GCCATGAGAGCCTGGTGGACCGCTGGATCCGCAGCCGCCTG	配列番号.163

【表５－１３】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		ACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAATCAAGGCTTCCAGGCCTA CGACTTCCCGGCCGTCACCACTGCCCAGTACAGCTTCTGGC TCTATGAGCTCTGTGATGTCTACTTGGAGTGCCTGAAACCT GTACTGAATGGGGTGGACCAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCG CCAGACCCTGTACACTTGCCTGGACGTTGGCCTGCGGCTGC TCTCACCCTTCATGCCCTTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAG AGGCTGCCCCGGAGGATGCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTG TGTTACCCCCTACCCGGAGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGG ACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATC ACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCGGGCCGACTACAACCTCAC CCGGATCCGGCCTGACTGTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGG CCACGGGCGCCCTGGCATCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAG GCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGG GGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTG ATCGCTGCTCCATCCACCTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGAC CCTGCACGGGAGCTGGGCAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGA GGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTG CCTCGGGCTATCCTGTCAAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAG GCAGATGAAGCCAAGCTCCAACAGACAGAAGCAGAGCTCAG GAAGGTGGATGAGGCCATCGCCCTATTCCAGAAGATGCTGT GA	
ValRS1^{C14}	タンパク質／ヒト／1-129 + 558-1264	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQHLKGKNVIHPFLSRSLPIVFDEFVDMDFGTGAVKI TPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIMDSRGALINVPPPFLGLPR FEARKAVLVALKERGLFRGIEDNPMVVPLCNRSKDVVEPLL RPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGDLRILPEAHQRTWHAWMDN IREWCISRQLWWGHRIPAYFVTVSDPAVPPGEDPDGRYWVS GRNEAEAREKAAKEFGVSPDKISLQQDEDVLDTWFSSGLFP LSILGWPNQSEDLSVFYPGTLLETGHDILFFWVARMVMLGL KLTGRLPFREVYLHAIVRDAHGRKMSKSLGNVIDPLDVIYG ISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKAKEGQKADFPAGIPECGTD ALRFGLCAYMSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFAL RGLGKGFVPSPTSQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNQGF QAYDFPAVTTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAE CARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRMPQAPP SLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADY NLTRIRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVL ALGAPAPQGCAVALASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAK RVEAQRQAQRLRERRAASGYPVKVPLEVQEADEAKLQQTEA ELRKVDEAIALFQKML	配列番号.164
ValRS1^{C14}	DNA /	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC	配列番

【表５－１４】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
	ヒト /	CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGCACCTGAAGGGGAAGAACGTGAT CCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCCATTGTCTTCGATG AATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGGTGCTGTGAAGATC ACCCCCGCACATGACCAAAATGACTATGAAGTTGGGCAGCG GCACGGGCTGGAGGCCATCAGCATCATGGACTCCCGGGGGG CCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCTGGGCCTGCCCAGG TTTGAGGCCAGGAAAGCGGTGCTGGTGGCGCTGAAGGAGCG GGGACTGTTCCGTGGCATTGAGGACAACCCCATGGTGGTGC CACTTTGCAACCGGTCGAAGGACGTGGTAGAGCCTCTGCTG CGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCGGGGAGATGGCCCAGGC TGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGACCTCCGCATCCTGC CTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCATGCCTGGATGGACAAC ATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGCTGTGGTGGGGCCA TCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACTGTCAGTGACCCAGCGG TGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGGGCGGTACTGGGTGAGT GGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGGAGAAGGCAGCCAAGGA GTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAGATG AGGATGTATTGGATACCTGGTTCTCCTCTGGCCTCTTCCCC TTATCCATTTTGGGCTGGCCCAACCAGTCAGAAGACCTGAG TGTGTTCTACCCCGGGACACTGCTGGAGACCGGTCATGACA TCCTCTTCTTCTGGGTGGCCCGGATGGTCATGCTGGGCCTG AAGCTCACGGGCAGGCTGCCCTTTAGAGAGGTCTACCTCCA TGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGCCGGAAGATGAGCAAGT CTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCTGGACGTCATCTATGGA ATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACCAGCTGCTGAACAGCAA CCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGGCAGA AAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCCTGAATGTGGCACCGAT GCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCTACATGTCCCAGGGTCG TGACATCAACCTGGATGTGAACCGGATACTGGGTTACCGCC ACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCCACCAAGTTTGCCCTT CGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCACCCACCTCCCA GCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGGACCGCTGGATCCGCA GCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAATCAAGGCTTC CAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCACCACTGCCCAGTACAG CTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATGTCTACTTGGAGTGCC TGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGACCAGGTGGCAGCTGAG	号. 165

【表５－１５】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		TGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTGCCTGGACGTTGGCCT GCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCTTCGTGACGGAGGAGC TGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATGCCGCAAGCTCCCCCT AGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGAGCCCTCAGAGTGCTC CTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTTGAGCTGGCGC TAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCGGGCCGACTAC AACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTGTTTCCTGGAAGTGGC GGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCATCGGCGGTGTCGGGCT ACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGTGGCTGTTCTG GCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCGCTGTGGCTCT GGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACCTGCAGCTTCAGGGGC TGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGCAAGCTGCAAGCCAAG CGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTCTGCGGGAACG CCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCAAGGTGCCGCTCGAAG TCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTCCAACAGACAGAAGCA GAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCATCGCCCTATTCCAGAA GATGCTGTGA	
ValRS1^{C15}	タンパク質／ヒト／1-129 + 175-1264	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLGEVVL YSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEKFQQK QKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPGEKKD VSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNVSAAN PRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHRMRGE TTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGREAFLQ EVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKLSAAV TEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDKKELT GRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVVATTR IETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLPIVFD EFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIMDSRG ALINVPPPFLGLPRFEARKAVLVALKERGLFRGIEDNPMVV PLCNRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGDLRIL PEAHQRTWHAWMDNIREWCISRQLWWGHRIPAYFVTVSDPA VPPGEDPDGRYWVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPDKISLQQD EDVLDTWFSSGLFPLSILGWPNQSEDLSVFYPGTLLETGHD ILFFWVARMVMLGLKLTGRLPFREVYLHAIVRDAHGRKMSK SLGNVIDPLDVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEKAKEGQ KADFPAGIPECGTDALRFGLCAYMSQGRDINLDVNRILGYR HFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHESLVDRWIR SRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYELCDVYLEC LKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEE LFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEAEAALELA LSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGALASAVSG	配列番号.166

【表５－１６】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		YVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCSIHLQLQG LVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGYPVKVPLE VQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	
ValRS1^{C15}	DNA / ヒト /	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGTCCTAGACCCACCTGCCCGCCG GATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTGTCACGTGTGTCC GGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGAGAAGTGGTTCTA TACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCAGCCAGGCCCCGA GGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTCAGCTCAAGAAAG AGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAATTCCAACAGAAG CAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCCAGGGGAGAAGAA ACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGGATCCTGGGGTCA TTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGGGAAAAGAAAGAT GTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAGCCCTCGGTATGT GGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGCAGCAGGGCTTCT TCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTGTCAGCAGCAAAT CCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCCACCCCCCAATGT GACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCACTCACCAACGCCA TCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGCATGCGTGGGGAG ACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCATGCAGGTATTGC CACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTATGGCGTGAGCAGG GACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAGGCCTTTCTACAG GAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGGTGACCGGATTTA CCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCTTGGACTGGGATC GAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTCTCAGCAGCTGTG ACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGAAGGCATCATCTA TCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCTGCACCCTCAACT CCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAGAAGGAGCTGACA GGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTACAAGGAGAAGGT GGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCTATAAGGTCCAAG GCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTGGCAACAACTCGG ATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGTAGCTGTGCACCC CAAAGATACCAGATACCAGCACCTGAAGGGGAAGAACGTGA TCCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCCATTGTCTTCGAT GAATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGGTGCTGTGAAGAT	配列番号.167

【表５－１７】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CACCCCCGCACATGACCAAAATGACTATGAAGTTGGGCAGC GGCACGGGCTGGAGGCCATCAGCATCATGGACTCCCGGGGG GCCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCTGGGCCTGCCCAG GTTTGAGGCCAGGAAAGCGGTGCTGGTGGCGCTGAAGGAGC GGGGACTGTTCCGTGGCATTGAGGACAACCCCATGGTGGTG CCACTTTGCAACCGGTCGAAGGACGTGGTAGAGCCTCTGCT GCGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCGGGGAGATGGCCCAGG CTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGACCTCCGCATCCTG CCTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCATGCCTGGATGGACAA CATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGCTGTGGTGGGGCC ATCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACTGTCAGTGACCCAGCG GTGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGGGCGGTACTGGGTGAG TGGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGGAGAAGGCAGCCAAGG AGTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAGAT GAGGATGTATTGGATACCTGGTTCTCCTCTGGCCTCTTCCC CTTATCCATTTTGGGCTGGCCCAACCAGTCAGAAGACCTGA GTGTGTTCTACCCCGGGACACTGCTGGAGACCGGTCATGAC ATCCTCTTCTTCTGGGTGGCCCGGATGGTCATGCTGGGCCT GAAGCTCACGGGCAGGCTGCCCTTTAGAGAGGTCTACCTCC ATGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGCCGGAAGATGAGCAAG TCTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCTGGACGTCATCTATGG AATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACCAGCTGCTGAACAGCA ACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGGCAG AAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCCTGAATGTGGCACCGA TGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCTACATGTCCCAGGGTC GTGACATCAACCTGGATGTGAACCGGATACTGGGTTACCGC CACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCCACCAAGTTTGCCCT TCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCACCCACCTCCC AGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGGACCGCTGGATCCGC AGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAATCAAGGCTT CCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCACCACTGCCCAGTACA GCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATGTCTACTTGGAGTGC CTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGACCAGGTGGCAGCTGA GTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTGCCTGGACGTTGGCC TGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCTTCGTGACGGAGGAG CTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATGCCGCAAGCTCCCCC TAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGAGCCCTCAGAGTGCT CCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTTGAGCTGGCG CTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCGGGCCGACTA CAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTGTTTCCTGGAAGTGG CGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCATCGGCGGTGTCGGGC TACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGTGGCTGTTCT GGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCGCTGTGGCTC TGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACCTGCAGCTTCAGGGG	

【表５－１８】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGCAAGCTGCAAGCCAA GCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTCTGCGGGAAC GCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCAAGGTGCCGCTCGAA GTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTCCAACAGACAGAAGC AGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCATCGCCCTATTCCAGA AGATGCTGTGA	
ValRS1^{C16}	タンパク質／ヒト／685-1264	MAQAASAAVTRGDLRILPEAHQRTWHAWMDNIREWCISRQL WWGHRIPAYFVTVSDPAVPPGEDPDGRYWVSGRNEAEAREK AAKEFGVSPDKISLQQDEDVLDTWFSSGLFPLSILGWPNQS EDLSVFYPGTLLETGHDILFFWVARMVMLGLKLTGRLPFRE VYLHAIVRDAHGRKMSKSLGNVIDPLDVIYGISLQGLHNQL LNSNLDPSEVEKAKEGQKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYM SQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPS PTSQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTT AQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCL DVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEP SECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCF LEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGC AVALASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQR LRERRAASGYPVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIA LFQKML	配列番号.168
ValRS1^{C16}	DNA／ヒト／	ATGGCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGACCT CCGCATCCTGCCTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCATGCCT GGATGGACAACATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGCTG TGGTGGGGCCATCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACTGTCAG TGACCCAGCGGTGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGGGCGGT ACTGGGTGAGTGGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGGAGAAG GCAGCCAAGGAGTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATCAGTCT CCAGCAAGATGAGGATGTATTGGATACCTGGTTCTCCTCTG GCCTCTTCCCCTTATCCATTTTGGGCTGGCCCAACCAGTCA GAAGACCTGAGTGTGTTCTACCCCGGGACACTGCTGGAGAC CGGTCATGACATCCTCTTCTTCTGGGTGGCCCGGATGGTCA TGCTGGGCCTGAAGCTCACGGGCAGGCTGCCCTTTAGAGAG GTCTACCTCCATGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGCCGGAA GATGAGCAAGTCTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCTGGACG TCATCTATGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACCAGCTG CTGAACAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAGGCCAA AGAAGGGCAGAAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCCTGAAT GTGGCACCGATGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCTACATG TCCCAGGGTCGTGACATCAACCTGGATGTGAACCGGATACT GGGTTACCGCCACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGCCACCA AGTTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGCCCTCA CCCACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTGGACCG	配列番号.169

10 20 30 40

【表５－１９】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CTGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCTCAGCA ATCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCACCACT GCCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGATGTCTA CTTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGACCAGG TGGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTTGCCTG GACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCCTTCGT GACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGATGCCGC AAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGGAGCCC TCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCCGCCCT TGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTCCCTGC GGGCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACTGTTTC CTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCATCGGC GGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGGTGTGG TGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGGGTTGC GCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCACCTGCA GCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGGCAAGC TGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCCAGCGT CTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTCAAGGT GCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCTCCAAC AGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCATCGCC CTATTCCAGAAGATGCTGTGA	
ValRS1^{C17}	タンパク質／ヒト／1-525 + 588-1264	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSGAVKITPA HDQNDYEVGQRHGLEAISIMDSRGALINVPPPFLGLPRFEA RKAVLVALKERGLFRGIEDNPMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQ WYVRCGEMAQAASAAVTRGDLRILPEAHQRTWHAWMDNIRE WCISRQLWWGHRIPAYFVTVSDPAVPPGEDPDGRYWVSGRN EAEAREKAAKEFGVSPDKISLQQDEDVLDTWFSSGLFPLSI LGWPNQSEDLSVFYPGTLLETGHDILFFWVARMVMLGLKLT GRLPFREVYLHAIVRDAHGRKMSKSLGNVIDPLDVIYGISL QGLHNQLLNSNLDPSEVEKAKEGQKADFPAGIPECGTDALR FGLCAYMSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGL GKGFVPSPTSQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAY	配列番号.170

【表５－２０】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		DFPAVTTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECAR QTLYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLC VTPYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLT RIRPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALG APAPQGCAVALASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVE AQRQAQRLRERRAASGYPVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELR KVDEAIALFQKML	
ValRS1^{C17}	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG	配列番号.171

【表５－２１】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGGTGCTGTGAAGATCACCCCCGCA CATGACCAAAATGACTATGAAGTTGGGCAGCGGCACGGGCT GGAGGCCATCAGCATCATGGACTCCCGGGGGGCCCTCATCA ATGTGCCTCCGCCTTTCCTGGGCCTGCCCAGGTTTGAGGCC AGGAAAGCGGTGCTGGTGGCGCTGAAGGAGCGGGGACTGTT CCGTGGCATTGAGGACAACCCCATGGTGGTGCCACTTTGCA ACCGGTCGAAGGACGTGGTAGAGCCTCTGCTGCGGCCGCAG TGGTACGTTCGCTGCGGGGAGATGGCCCAGGCTGCCAGCGC CGCTGTGACTCGGGGTGACCTCCGCATCCTGCCTGAGGCCC ATCAGCGCACATGGCATGCCTGGATGGACAACATCCGGGAG TGGTGCATTTCCAGGCAGCTGTGGTGGGGCCATCGCATCCC AGCCTACTTTGTCACTGTCAGTGACCCAGCGGTGCCCCCTG GGGAGGACCCTGATGGGCGGTACTGGGTGAGTGGACGCAAT GAGGCGGAGGCCCGGGAGAAGGCAGCCAAGGAGTTCGGAGT GTCCCCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAGATGAGGATGTAT TGGATACCTGGTTCTCCTCTGGCCTCTTCCCCTTATCCATT TTGGGCTGGCCCAACCAGTCAGAAGACCTGAGTGTGTTCTA CCCCGGGACACTGCTGGAGACCGGTCATGACATCCTCTTCT TCTGGGTGGCCCGGATGGTCATGCTGGGCCTGAAGCTCACG GGCAGGCTGCCCTTTAGAGAGGTCTACCTCCATGCCATCGT GCGAGATGCTCACGGCCGGAAGATGAGCAAGTCTCTAGGCA ATGTCATCGATCCCCTGGACGTCATCTATGGAATCTCCCTG CAGGGCCTCCACAACCAGCTGCTGAACAGCAACCTGGATCC CAGCGAGGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGGCAGAAAGCTGACT TCCCAGCGGGGATTCCTGAATGTGGCACCGATGCTCTCCGG TTTGGATTATGTGCCTACATGTCCCAGGGTCGTGACATCAA CCTGGATGTGAACCGGATACTGGGTTACCGCCACTTCTGCA ACAAGCTCTGGAATGCCACCAAGTTTGCCCTTCGTGGCCTT GGGAAGGGTTTTGTGCCCTCACCCACCTCCCAGCCCGGAGG CCATGAGAGCCTGGTGGACCGCTGGATCCGCAGCCGCCTGA CAGAGGCTGTGAGGCTCAGCAATCAAGGCTTCCAGGCCTAC GACTTCCCGGCCGTCACCACTGCCCAGTACAGCTTCTGGCT CTATGAGCTCTGTGATGTCTACTTGGAGTGCCTGAAACCTG TACTGAATGGGGTGGACCAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCGC CAGACCCTGTACACTTGCCTGGACGTTGGCCTGCGGCTGCT CTCACCCTTCATGCCCTTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGA GGCTGCCCCGGAGGATGCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGT GTTACCCCCTACCCGGAGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGA CCCCGAGGCAGAAGCCGCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCA CGCGAGCCGTGCGCTCCCTGCGGGCCGACTACAACCTCACC CGGATCCGGCCTGACTGTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGC CACGGGCGCCCTGGCATCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGG	

10 20 30 40

【表５－２２】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CCCTGGCCAGCGCAGGTGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGG GCTCCCGCCCCCCAGGGTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGA TCGCTGCTCCATCCACCTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACC CTGCACGGGAGCTGGGCAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAG GCCCAGCGGCAGGCCCAGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGC CTCGGGCTATCCTGTCAAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGG CAGATGAAGCCAAGCTCCAACAGACAGAAGCAGAGCTCAGG AAGGTGGATGAGGCCATCGCCCTATTCCAGAAGATGCTGTG A	
ValRS1^{C18}	タンパク質／ヒト／615-1264	MDSRGALINVPPPPFLGLPRFEARKAVLVALKERGLFRGIED NPMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRG DLRILPEAHQRTWHAWMDNIREWCISRQLWWGHRIPAYFVT VSDPAVPPGEDPDGRYWVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPDKI SLQQDEDVLDTWFSSGLFPLSILGWPNQSEDLSVFYPGTLL ETGHDILFFWVARMVMLGLKLTGRLPFREVYLHAIVRDAHG RKMSKSLGNVIDPLDVIYGISLQGLHNQLLNSNLDPSEVEK AKEGQKADFPAGIPECGTDALRFGLCAYMSQGRDINLDVNR ILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGKGFVPSPTSQPGGHESLV DRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDFPAVTTAQYSFWLYELCD VYLECLKPVLNGVDQVAAECARQTLYTCLDVGLRLLSPFMP FVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEAEA ALELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGALA SAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCSIH LQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGYPV KVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	配列番号.172
ValRS1^{C18}	DNA／ヒト／	ATGGACTCCCGGGGGGCCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTT CCTGGGCCTGCCCAGGTTTGAGGCCAGGAAAGCGGTGCTGG TGGCGCTGAAGGAGCGGGGACTGTTCCGTGGCATTGAGGAC AACCCCATGGTGGTGCCACTTTGCAACCGGTCGAAGGACGT GGTAGAGCCTCTGCTGCGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCG GGGAGATGGCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGT GACCTCCGCATCCTGCCTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCA TGCCTGGATGGACAACATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGC AGCTGTGGTGGGGCCATCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACT GTCAGTGACCCAGCGGTGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGG GCGGTACTGGGTGAGTGGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGG AGAAGGCAGCCAAGGAGTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATC AGTCTCCAGCAAGATGAGGATGTATTGGATACCTGGTTCTC CTCTGGCCTCTTCCCCTTATCCATTTTGGGCTGGCCCAACC AGTCAGAAGACCTGAGTGTGTTCTACCCCGGGACACTGCTG GAGACCGGTCATGACATCCTCTTCTTCTGGGTGGCCCGGAT GGTCATGCTGGGCCTGAAGCTCACGGGCAGGCTGCCCTTTA GAGAGGTCTACCTCCATGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGC	配列番号.173

【表５－２３】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CGGAAGATGAGCAAGTCTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCT GGACGTCATCTATGGAATCTCCCTGCAGGGCCTCCACAACC AGCTGCTGAACAGCAACCTGGATCCCAGCGAGGTGGAGAAG GCCAAAGAAGGGCAGAAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTCC TGAATGTGGCACCGATGCTCTCCGGTTTGGATTATGTGCCT ACATGTCCCAGGGTCGTGACATCAACCTGGATGTGAACCGG ATACTGGGTTACCGCCACTTCTGCAACAAGCTCTGGAATGC CACCAAGTTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAGGGTTTTGTGC CCTCACCCACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGAGAGCCTGGTG GACCGCTGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGGCTGTGAGGCT CAGCAATCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTCCCGGCCGTCA CCACTGCCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGAGCTCTGTGAT GTCTACTTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGAATGGGGTGGA CCAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACCCTGTACACTT GCCTGGACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACCCTTCATGCCC TTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCGGAGGAT GCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCTACCCGG AGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCAGAAGCC GCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGTGCGCTC CCTGCGGGCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGCCTGACT GTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCCCTGGCA TCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAGCGCAGG TGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCCCCCAGG GTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCCATCCAC CTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGAGCTGGG CAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGCAGGCCC AGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTATCCTGTC AAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGCCAAGCT CCAACAGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATGAGGCCA TCGCCCTATTCCAGAAGATGCTGTGA	
$ValRS1^{C19}$	タンパク質／ヒト／1-883 + 907-1264	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPALEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGRALSPLEEWLRLHTYLAGEAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKIQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKKDVSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTEAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLP	配列番号.174

【表５－２４】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		IVFDEFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIM DSRGALINVPPPFLGLPRFEARKAVLVALKERGLFRGIEDN PMVVPLCNRSKDVVEPLLRPQWYVRCGEMAQAASAAVTRGD LRILPEAHQRTWHAWMDNIREWCISRQLWWGHRIPAYFVTV SDPAVPPGEDPDGRYWVSGRNEAEAREKAAKEFGVSPDKIS LQQDEDVLDTWFSSGLFPLSILGWPNQSEDLSVFYPGTLLE TGHDILFFWVARMVMLGLKLTGRLPFREVYLHAIVRDAHGR KMSKSLGNVIDPLDVIYGISLQKADFPAGIPECGTDALRFG LCAYMSQGRDINLDVNRILGYRHFCNKLWNATKFALRGLGK GFVPSPTSQPGGHESLVDRWIRSRLTEAVRLSNQGFQAYDF PAVTTAQYSFWLYELCDVYLECLKPVLNGVDQVAAECARQT LYTCLDVGLRLLSPFMPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVT PYPEPSECSWKDPEAEAALELALSITRAVRSLRADYNLTRI RPDCFLEVADEATGALASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAP APQGCAVALASDRCSIHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQ RQAQRLRERRAASGYPVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKV DEAIALFQKML	
$ValRS1^{C19}$	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGGCCCGGTGGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC	配列番号.175

【表５－２５】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA TGCAGGTATTGCCACCCAGGTGGTGGTGGAGAAGAAGCTAT GGCGTGAGCAGGGACTGAGCCGGCACCAGCTGGGCCGCGAG GCCTTTCTACAGGAAGTCTGGAAGTGGAAGGAGGAGAAAGG TGACCGGATTTACCACCAGTTGAAGAAGCTTGGCAGCTCCT TGGACTGGGATCGAGCCTGTTTCACCATGGACCCTAAACTC TCAGCAGCTGTGACAGAGGCCTTTGTCCGGCTTCACGAGGA AGGCATCATCTATCGCAGTACCCGCCTTGTTAACTGGTCCT GCACCCTCAACTCCGCCATCTCTGACATTGAGGTGGATAAG AAGGAGCTGACAGGTCGCACCCTGCTCTCCGTGCCTGGCTA CAAGGAGAAGGTGGAGTTCGGGGTCCTCGTGTCCTTTGCCT ATAAGGTCCAAGGCTCAGATAGCGACGAGGAGGTGGTGGTG GCAACAACTCGGATCGAGACAATGCTGGGAGATGTGGCTGT AGCTGTGCACCCCAAAGATACCAGATACCAGCACCTGAAGG GGAAGAACGTGATCCACCCATTCCTGTCTCGGAGCCTTCCC ATTGTCTTCGATGAATTTGTGGACATGGACTTTGGCACAGG TGCTGTGAAGATCACCCCCGCACATGACCAAAATGACTATG AAGTTGGGCAGCGGCACGGGCTGGAGGCCATCAGCATCATG GACTCCCGGGGGGCCCTCATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCT GGGCCTGCCCAGGTTTGAGGCCAGGAAAGCGGTGCTGGTGG CGCTGAAGGAGCGGGGACTGTTCCGTGGCATTGAGGACAAC CCCATGGTGGTGCCACTTTGCAACCGGTCGAAGGACGTGGT AGAGCCTCTGCTGCGGCCGCAGTGGTACGTTCGCTGCGGGG AGATGGCCCAGGCTGCCAGCGCCGCTGTGACTCGGGGTGAC CTCCGCATCCTGCCTGAGGCCCATCAGCGCACATGGCATGC CTGGATGGACAACATCCGGGAGTGGTGCATTTCCAGGCAGC TGTGGTGGGGCCATCGCATCCCAGCCTACTTTGTCACTGTC AGTGACCCAGCGGTGCCCCCTGGGGAGGACCCTGATGGGCG GTACTGGGTGAGTGGACGCAATGAGGCGGAGGCCCGGGAGA AGGCAGCCAAGGAGTTCGGAGTGTCCCCTGACAAGATCAGT CTCCAGCAAGATGAGGATGTATTGGATACCTGGTTCTCCTC TGGCCTCTTCCCCTTATCCATTTTGGGCTGGCCCAACCAGT CAGAAGACCTGAGTGTGTTCTACCCCGGGACACTGCTGGAG ACCGGTCATGACATCCTCTTCTTCTGGGTGGCCCGGATGGT CATGCTGGGCCTGAAGCTCACGGGCAGGCTGCCCTTTAGAG AGGTCTACCTCCATGCCATCGTGCGAGATGCTCACGGCCGG AAGATGAGCAAGTCTCTAGGCAATGTCATCGATCCCCTGGA CGTCATCTATGGAATCTCCCTGCAGAAAGCTGACTTCCCAG CGGGGATTCCTGAATGTGGCACCGATGCTCTCCGGTTTGGA TTATGTGCCTACATGTCCCAGGGTCGTGACATCAACCTGGA TGTGAACCGGATACTGGGTTACCGCCACTTCTGCAACAAGC TCTGGAATGCCACCAAGTTTGCCCTTCGTGGCCTTGGGAAG GGTTTTGTGCCCTCACCCACCTCCCAGCCCGGAGGCCATGA GAGCCTGGTGGACCGCTGGATCCGCAGCCGCCTGACAGAGG	

【表５－２６】

表 5
ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
		CTGTGAGGCTCAGCAATCAAGGCTTCCAGGCCTACGACTTC CCGGCCGTCACCACTGCCCAGTACAGCTTCTGGCTCTATGA GCTCTGTGATGTCTACTTGGAGTGCCTGAAACCTGTACTGA ATGGGGTGGACCAGGTGGCAGCTGAGTGTGCCCGCCAGACC CTGTACACTTGCCTGGACGTTGGCCTGCGGCTGCTCTCACC CTTCATGCCCTTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGC CCCGGAGGATGCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACC CCCTACCCGGAGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGA GGCAGAAGCCGCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAG CCGTGCGCTCCCTGCGGGCCGACTACAACCTCACCCGGATC CGGCCTGACTGTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGG CGCCCTGGCATCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGG CCAGCGCAGGTGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCC GCCCCCCAGGGTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTG CTCCATCCACCTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCAC GGGAGCTGGGCAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAG CGGCAGGCCCAGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGG CTATCCTGTCAAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATG AAGCCAAGCTCCAACAGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTG GATGAGGCCATCGCCCTATTCCAGAAGATGCTGTGA	
$ValRS1^{C20}$	タンパク質／ヒト／1064-1264	MPFVTEELFQRLPRRMPQAPPSLCVTPYPEPSECSWKDPEA EAALELALSITRAVRSLRADYNLTRIRPDCFLEVADEATGA LASAVSGYVQALASAGVVAVLALGAPAPQGCAVALASDRCS IHLQLQGLVDPARELGKLQAKRVEAQRQAQRLRERRAASGY PVKVPLEVQEADEAKLQQTEAELRKVDEAIALFQKML	配列番号.176
$ValRS1^{C20}$	DNA／ヒト／	ATGCCCTTCGTGACGGAGGAGCTGTTCCAGAGGCTGCCCCG GAGGATGCCGCAAGCTCCCCCTAGCCTCTGTGTTACCCCCT ACCCGGAGCCCTCAGAGTGCTCCTGGAAGGACCCCGAGGCA GAAGCCGCCCTTGAGCTGGCGCTAAGCATCACGCGAGCCGT GCGCTCCCTGCGGGCCGACTACAACCTCACCCGGATCCGGC CTGACTGTTTCCTGGAAGTGGCGGATGAGGCCACGGGCGCC CTGGCATCGGCGGTGTCGGGCTACGTGCAGGCCCTGGCCAG CGCAGGTGTGGTGGCTGTTCTGGCCCTGGGGGCTCCCGCCC CCCAGGGTTGCGCTGTGGCTCTGGCTTCTGATCGCTGCTCC ATCCACCTGCAGCTTCAGGGGCTGGTGGACCCTGCACGGGA GCTGGGCAAGCTGCAAGCCAAGCGAGTTGAGGCCCAGCGGC AGGCCCAGCGTCTGCGGGAACGCCGTGCTGCCTCGGGCTAT CCTGTCAAGGTGCCGCTCGAAGTCCAGGAGGCAGATGAAGC CAAGCTCCAACAGACAGAAGCAGAGCTCAGGAAGGTGGATG AGGCCATCGCCCTATTCCAGAAGATGCTGTGA	配列番号.177

【０１１８】

【表５Ｂ－１】

	表 5B ＡＡＲＳポリペプチドに固有のスプライスジャンクション		
名称	タイプ／種	固有のスプライスジャンクションに近接するアミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
V1-AS08	DNA / ヒト /	GCCAGGCCTCTCTCTCATCAGCCAG|GGCCTCCACAACCAG CTGCTGAACA	配列番号.178
	タンパク質 / ヒト	N/A	
V1-AS10	DNA / ヒト /	ACAGCAGCAGCCACCTCCAGGGGAG|AAAGCTGACTTCCCA GCGGGGATTC	配列番号.179
	タンパク質 / ヒト	QQQPPPGEKADFPAGI	配列番号.180
V1-AS11	DNA / ヒト /	CCGAAGCTCGGCCCAGGACCCCCAG|CCCGGAGGCCATGAG AGCCTGGTGG	配列番号.181
	タンパク質 / ヒト	RSSAQDPQPGGHESLV	配列番号.182
V1-AS04	DNA / ヒト /	CATCAATGTGCCTCCGCCTTTCCTG|CCGGTCGAAGGACGT GGTAGAGCCT	配列番号.183
	タンパク質 / ヒト	INVPPPFLPVEGRGRA	配列番号.184
V1-SV05	DNA / ヒト /	ATCCATTTTGGGCTGGCCCAACCAG|GTCTACCTCCATGCC ATCGTGCGAG	配列番号.185
	タンパク質 / ヒト	SILGWPNQVYLHAIVR	配列番号.186
V1-AS06	DNA / ヒト /	TTTGTGGACATGGACTTTGGCACAG|GGAGTGGTGCATTTC CAGGCAGCTG	配列番号.187
	タンパク質 / ヒト	N/A	
V1-AS07	DNA / ヒト /	CCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAG|GTCTACCTCCATGCC ATCGTGCGAG	配列番号.188
	タンパク質 / ヒト	LTRSVSSKVYLHAIVR	配列番号.189
V1-SV07	DNA / ヒト /	CCTGACAAGATCAGTCTCCAGCAAG|TCAGAAGACCTGAGT GTGTTCTACC	配列番号.190
	タンパク質 / ヒト	LTRSVSSKSEDLSVFY	配列番号.191
V1-AS01	DNA / ヒト /	CCGAAGCTCGGCCCAGGACCCCCAG|ATAGCGACGAGGAGG TGGTGGTGGC	配列番号.192
	タンパク質 / ヒト	N/A	

【表５Ｂ－２】

	表 5B ＡＡＲＳポリペプチドに固有のスプライスジャンクション		
名称	タイプ／種	固有のスプライスジャンクションに近接するアミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
V1-AS02	DNA / ヒト /	CCGAAGCTCGGCCCAGGACCCCCAG|CACCTGAAGGGGAAGAACGTGATCC	配列番号.193
	タンパク質 / ヒト	RSSAQDPQHLKGKNVI	配列番号.194
V1-SV02	DNA / ヒト /	CCGAAGCTCGGCCCAGGACCCCCAG|GTCCTAGACCCACCTGCCCGCCGGA	配列番号.195
	タンパク質 / ヒト	RSSAQDPQVLDPPARR	配列番号.196
V1-AS12	DNA / ヒト /	CCGAAGCTCGGCCCAGGACCCCCAG|CCGGTCGAAGGACGTGGTAGAGCCT	配列番号.197
	タンパク質 / ヒト	N/A	
V1-AS13	DNA / ヒト /	TTTGCCTATAAGGTCCAAGGCTCAG|GTGCTGTGAAGATCACCCCCGCACA	配列番号.198
	タンパク質 / ヒト	FAYKVQGSGAVKITPA	配列番号.199
V1-AS14	DNA / ヒト /	GCACCCCAAAGATACCAGATACCAG|GTGCTGTGAAGATCACCCCCGCACA	配列番号.200
	タンパク質 / ヒト	N/A	
V1-AS15	DNA / ヒト /	CGTCATCTATGGAATCTCCCTGCAG|AAAGCTGACTTCCCAGCGGGGATTC	配列番号.201
	タンパク質 / ヒト	VIYGISLQKADFPAGI	配列番号.202
V1-AS16	DNA / ヒト /	GGTGGAGAAGGCCAAAGAAGGGCAG|GTCGTGACATCAACCTGGATGTGAA	配列番号.203
	タンパク質 / ヒト	N/A	

【０１１９】

【表６】

表６ バイオインフォマティクスにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび核酸			
名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号

【０１２０】

内部ＡＡＲＳポリペプチド：（表７、８および９）

【表７Ａ】

表 7A 質量分析により同定されたＡＡＲＳポリペプチド			
名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.

【０１２１】

【表７Ｂ】

表 7B ValRS1^{N1} 検出された質量分析ペプチドおよび推測される連結ペプチド		
タイプ／種	配列	配列番号.

【０１２２】

【表７Ｃ】

表 7C ValRS1^{N1} 検出された質量分析ペプチドに基づき連結した配列		
タイプ／種	配列	配列番号.

【０１２３】

【表８】

表８ ディープシークエンシングにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび選択的転写産物			
名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号

【０１２４】

【表８Ｂ】

	表８Ｂ ＡＡＲＳポリペプチドに固有のスプライスジャンクション		
名称	タイプ／種	固有のスプライスジャンクションに近接するアミノ酸配列および核酸配列	配列番号

【０１２５】

【表９】

表 9
バイオインフォマティクスにより同定されたＡＡＲＳポリペプチドおよび核酸

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.

【０１２６】
タンパク質分解フラグメントもしくはスプライスバリアントフラグメントのような「タンパク質フラグメント」またはタンパク質フラグメントのアミノ酸配列を、各種技術により特徴付ける、同定するまたは誘導することができる。例えば、スプライスバリアントをディープシークエンシングのような技術により同定することができる（例えば、Ｘｉｎｇら，ＲＮＡ．１４：１４７０－１４７９，２００８；およびＺｈａｎｇら，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ．１７：５０３－５０９，２００７を参照されたい）。さらなる例として、完全長または他のＡＡＲＳポリペプチドを選択されたプロテアーゼとインキュベートするなどして、タンパク質分解フラグメントのようなタンパク質フラグメントをｉｎ ｖｉｔｒｏで同定することが可能であり、またはこれらを生体内（例えば、ｉｎ ｖｉｖｏ）で同定することが可能である。特定の実施形態では、例えば、選択されたプロテアーゼを１つ以上含むように改変されているか、または選択されたＡＡＲＳポリペプチドに作用することができるプロテアーゼを生来的に１つ以上含む、選択された微生物または真核細胞内で、完全長または他のＡＡＲＳポリペプチドを組換えにより発現させ、そこから内生的に産生されたタンパク質フラグメントを単離および特徴付けすることにより、内因性タンパク質分解フラグメントのようなタンパク質フラグメントを生成し同定することができる。

【０１２７】
特定の実施形態では、例えば、様々な細胞画分（例えば、細胞質、膜、核の画分）および／または例えば、免疫細胞、例えば単球、樹状細胞、マクロファージ（例えば、ＲＡＷ２６４．７マクロファージ）、好中球、好酸球、好塩基球およびリンパ球（例えば、一次Ｔ細胞およびＪｕｒｋａｔＴ細胞のようなＴ細胞系含めたＢ細胞およびＴ細胞（例えば、ＣＤ４＋ヘルパー細胞およびＣＤ８＋キラー細胞）、ならびにナチュラルキラー（ＮＫ）細胞など）などを含めた様々な細胞型の増殖培地から、内因性（例えば、天然の）タンパク質分解フラグメントのようなタンパク質フラグメントを生成し同定することができる。

【０１２８】
特定の実施形態では、内因性タンパク質分解フラグメントのようなタンパク質フラグメントを、生成方法に関係なく、質量分析のような技術またはそれと同等の技術より同定することができる。ｉｎ ｖｉｔｒｏまたは生体内で同定されるタンパク質フラグメントが一度生成または同定されれば、それをマッピングして配列決定し、例えば、組換え産生用の発現ベクター中にクローニングするか、または合成により作製することができる。

【０１２９】
タンパク質分解フラグメントのようなＡＡＲＳタンパク質フラグメントの配列の作製、同定、誘導または特徴付けを行うために、多種多様なプロテアーゼを使用することができる。一般にプロテアーゼは、通常、構造から明らかになる３つの主な基準：（ｉ）触媒する反応、（ｉｉ）触媒部位の化学的性質および（ｉｉｉ）進化的関係に従って分類される。触媒の機序により分類されるプロテアーゼまたはプロテイナーゼの一般的な例としては、アスパラギン酸プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼが挙げられる。

【０１３０】
アスパラギン酸プロテアーゼの多くはペプシンファミリーに属する。このファミリーには、消化酵素、例えばペプシンおよびキモシン、ならびにリソソームカテプシンＤおよび

レニンのようなプロセシング酵素など、ならびに特定の真菌プロテアーゼ（例えば、ペニシロペプシン、リゾプスペプシン、エンドチアペプシン）が含まれる。アスパラギン酸プロテアーゼの第二のファミリーには、レトロペプシンとも呼ばれるＡＩＤＳウイルス（ＨＩＶ）由来のプロテアーゼのようなウイルスプロテイナーゼが含まれる。

【０１３１】

セリンプロテアーゼには２つの異なるファミリーがある。１つ目は、哺乳動物酵素、例えばキモトリプシン、トリプシン、エラスターゼおよびカリクレインなどが含まれるキモトリプシンファミリー、２つ目は、スブチリシンのような細菌酵素が含まれるスブチリシンファミリーである。これら２つのファミリー間での全体的な３Ｄ構造は異なっているが、両ファミリーの活性部位は同じ幾何学配置であり、同じ機序を介して触媒反応が進行する。セリンプロテアーゼは、異なる基質特異性、主に様々な酵素サブサイト（基質と残基が相互作用する部位）でのアミノ酸置換に関する違いを示す。セリンプロテアーゼには、広範囲な基質との相互作用部位を有するものもあれば、Ｐ１基質残基に限定された特異性を有するものもある。

【０１３２】

システインプロテアーゼファミリーには、パパイン、アクチニジンおよびブロメラインのような植物プロテアーゼ、いくつかの哺乳動物リソソームカテプシン、細胞質カルパイン（カルシウム活性化）、ならびにいくつかの寄生虫プロテアーゼ（例えば、トリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ）、住血吸虫（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ））が含まれる。パパインはこのファミリーメンバーの原型であり、かつ最も研究されている。最近解明されたインターロイキン－１－ベータ変換酵素のＸ線構造から、システインプロテイナーゼの新規なタイプのフォールドが明らかになった。

【０１３３】

メタロプロテアーゼはプロテアーゼの古いクラスの１つであり、細菌、真菌および高等生物で見られる。メタロプロテアーゼはその配列および３Ｄ構造が多種多様であるが、酵素の大部分が触媒活性のある亜鉛原子を含んでいる。いくつかの場合には、タンパク質分解活性が失われることなく、亜鉛がコバルトまたはニッケルのような別の金属に置き換わっていることがある。細菌サーモリシンがよく特徴付けられており、その結晶構造は、亜鉛に２つのヒスチジンと１つのグルタミン酸が結合していることを示している。多くのメタロプロテアーゼが配列モチーフＨＥＸＸＨを含んでおり、このモチーフが亜鉛に対する２つのヒスチジンリガンドを与えている。第三のリガンドは、グルタミン酸（サーモリシン、ネプリライシン、アラニルアミノペプチダーゼ）またはヒスチジン（アスタシン、セラリシン）である。

【０１３４】

例示的なプロテアーゼとしては、例えば、アクロモペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、アンクロッド、アンジオテンシン変換酵素、ブロメライン、カルパイン、カルパインＩ、カルパインＩＩ、カルボキシペプチダーゼＡ、カルボキシペプチダーゼＢ、カルボキシペプチダーゼＧ、カルボキシペプチダーゼＰ、カルボキシペプチダーゼＷ、カルボキシペプチダーゼＹ、カスパーゼ１、カスパーゼ２、カスパーゼ３、カスパーゼ４、カスパーゼ５、カスパーゼ６、カスパーゼ７、カスパーゼ８、カスパーゼ９、カスパーゼ１０、カスパーゼ１１、カスパーゼ１２、カスパーゼ１３、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＧ、カテプシンＨ、カテプシンＬ、キモパパイン、キマーゼ、キモトリプシン、クロストリパイン、コラゲナーゼ、補体Ｃ１ｒ、補体Ｃ１ｓ、補体因子Ｄ、補体因子Ｉ、ククミシン、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ、エラスターゼ（白血球）、エラスターゼ（膵臓）、エンドプロテアーゼＡｒｇ－Ｃ、エンドプロテアーゼＡｓｐ－Ｎ、エンドプロテアーゼＧｌｕ－Ｃ、エンドプロテアーゼＬｙｓ－Ｃ、エンテロキナーゼ、因子Ｘａ、フィシン、フューリン、グランザイムＡ、グランザイムＢ、ＨＩＶプロテアーゼ、ＩＧアーゼ、カリクレイン組織、ロイシンアミノペプチダーゼ（全身性）、ロイシンアミノペプチダーゼ（細胞質性）、ロイシンアミノペプチダーゼ（ミクロソーム性）、マトリックスメタロプロテアーゼ、メチオニンアミノペプチダーゼ、ニュートラー

ゼ、パパイン、ペプシン、プラスミン、プロリダーゼ、プロナーゼＥ、前立腺特異的抗原、好アルカリ性ストレプトマイセス・グリセウス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｇｒｉｓｅｕｓ）由来のプロテアーゼ、　アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）由来のプロテアーゼ、アスペルギルス・サイトイ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｓａｉｔｏｉ）由来のプロテアーゼ、アスペルギルス・ソーヤ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｓｏｊａｅ）由来のプロテアーゼ、プロテアーゼ（バチルス・リケニフォルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ））（アルカリ性またはアルカラーゼ）、バチルス・ポリミキサ（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｏｌｙｍｙｘａ）由来のプロテアーゼ、バチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．）由来のプロテアーゼ、リゾプス属（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ　ｓｐ．）由来のプロテアーゼ、プロテアーゼＳ、プロテアソーム、コウジカビ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅ）由来のプロテイナーゼ、プロテイナーゼ３、プロテイナーゼＡ、プロテイナーゼＫ、タンパク質Ｃ、ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ、レンニン、レンニン、ストレプトキナーゼ、スブチリシン、サーモリシン、トロンビン、組織プラスミノーゲン活性化因子、トリプシン、トリプターゼおよびウロキナーゼが挙げられる。

【０１３５】

特定の実施形態は、内因性の天然のＡＡＲＳポリペプチドフラグメントに由来するアミノ酸配列を含むか、それから実質的になるか、またはそれからなる単離ＡＡＲＳポリペプチド、および前記フラグメントを含む医薬組成物、およびその使用法に関する。これらのおよび関連する実施形態は、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで生成または同定することができる。特定の好適なｉｎ　ｖｉｔｒｏの実施形態では、完全長ＡＡＲＳポリペプチドのようなＡＡＲＳポリペプチドを、１つ以上の単離ヒトプロテアーゼ、主にヒトに内因性または天然である、例えばエラスターゼおよび本明細書に記載のまたは当該技術分野で公知の他のプロテアーゼなどとインキュベートすることにより、ＡＡＲＳタンパク質分解フラグメントを生成または同定する。他の実施形態は、内因性の天然のＡＡＲＳスプライスバリアントに由来するアミノ酸配列を含むか、それから実質的になるか、またはそれからなる単離ＡＡＲＳポリペプチド、および前記フラグメントを含む医薬組成物、およびその使用法に関する。基本的には、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントを、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏに関係なくプロテアーゼと接触させた試料から単離することができる。

【０１３６】

特定の実施形態では、質量分析のような技術またはそれと同等の技術によりＡＡＲＳタンパク質フラグメントを同定することができる。単なる例であり、限定するものではないが、特定の実施形態では、様々な生理状態（例えば、低酸素、食事、年齢、疾患）の様々な細胞型、組織または体液またはその画分由来のプロテオームを１Ｄ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、バンドを一定の間隔で切った後、任意にバンドをトリプシンのような適当なプロテアーゼで消化してペプチドを解離させ、次いでこれを１Ｄ逆相ＬＣ－ＭＳ／ＭＳにより分析し得る。得られたプロテオームデータをいわゆるペプトグラフ（ｐｅｐｔｏｇｒａｐｈ）にまとめ得る。ペプトグラフ（ｐｅｐｔｏｇｒａｐｈ）では、左側のパネルに、縦寸法で表したＳＤＳ－ＰＡＧＥの移動（上から下に向かって高分子量から低分子量）に対して所与のタンパク質の配列範囲を水平寸法で（左から右に向かってＮ末端からＣ末端で）プロットする。次いで、特定のペプチドフラグメントを配列決定し、マッピングすることができる。特定の実施形態では、ＡＡＲＳ参照フラグメントを、例えば対応する完全長ＡＡＲＳの分子量と比較した、その固有の分子量により特徴付け得る。

【０１３７】

上述のように、本発明の実施形態は、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているＡＡＲＳポリペプチドを含む。また、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの「バリアント」も含まれる。ポリペプチド「バリアント」という記述は、少なくとも１つのアミノ酸残基の付加、削除および／または置換により参照ＡＡＲＳポリペプチドから区別され、かつ通常は参照ＡＡＲＳポリペプチドの１つ以上の非カノニカルな活性を保持している（例えば、模倣する）または調節す

る（例えば、拮抗する）、ポリペプチドを指す。

【０１３８】

さらに、ヒトバリルｔＲＮＡ合成酵素は、数百の極めて関連性の高い多形型を含み、これらは少なくとも一部が機能的に互換可能であることが当該技術分野で公知である。したがって、例えば表Ａに挙げられている単一ヌクレオチドの多形型を含めたバリルｔＲＮＡ合成酵素の天然のバリアントを選択し、バリルｔＲＮＡ合成酵素のヒトおよびその他の種のホモログ、オルソログおよび天然のアイソフォームのいずれかの配列に基づく１つ以上のアミノ酸変化を含むＡＡＲＳポリペプチドを作出することは日常的な事柄である。

【０１３９】

【表Ａ－１】

表 A ヒトバリル tRNA 合成酵素 SNP			
遺伝子バンクアクセション番号	ヌクレオチド変化	遺伝子バンクアクセション番号	ヌクレオチド変化
rs118175711	C/T	rs11540639	G/T
rs117959618	A/G	rs11540637	C/T
rs117794566	A/G	rs9469054	A/G
rs117678546	A/G	rs9469053	A/G
rs117569284	A/G	rs9461725	C/G
rs117497713	C/T	rs9405087	C/T
rs117478735	G/T	rs9405086	C/T
rs117375424	A/G	rs9391852	A/C
rs117302488	A/G	rs9391643	A/C
rs117222297	A/C	rs9378201	A/C
rs117133761	G/T	rs9368697	A/G
rs116896966	C/T	rs9281579	-/A/AA
rs116790364	C/T	rs9281578	-/T
rs116714595	C/G	rs9279421	-/A
rs116651944	A/C	rs9279420	-/A
rs116477800	A/G	rs9279419	-/A/AA
rs116307571	C/T	rs9279418	-/A
rs116227756	A/G	rs9279417	-/A
rs116226406	C/G	rs9267563	A/G
rs116178770	C/T	rs6899983	A/C
rs116163386	A/C	rs5030798	A/G
rs116099232	C/T	rs5030797	C/G
rs116088886	C/T	rs5030796	C/G
rs116047950	A/G	rs4959081	A/C
rs115858944	C/G	rs4959019	A/C
rs115827875	C/T	rs4713488	C/T
rs115668100	A/G	rs3130491	A/G
rs115635569	A/G	rs3115670	A/G
rs115585784	A/G	rs2753961	A/G
rs115392083	A/G	rs2736426	A/G
rs115352514	C/T	rs2607015	C/G
rs115320814	C/T	rs2607014	A/G
rs115217128	C/G	rs2607012	C/T
rs115200193	A/G	rs2273613	A/G
rs115108341	G/T	rs1150750	A/G
rs115050884	A/T	rs1150749	A/C
rs114916735	C/T	rs1076827	A/G
rs114892888	A/G	rs55975002	A/G
rs114800725	C/T	rs55829912	C/T
rs114778939	A/T	rs55787436	A/G
rs114714835	A/G	rs55786236	A/G
rs114593686	A/G	rs55761205	C/T
rs114593439	C/T	rs55636017	A/G

【表Ａ－２】

表 A ヒトバリル tRNA 合成酵素 SNP			
遺伝子バンクアクセション番号	ヌクレオチド変化	遺伝子バンクアクセション番号	ヌクレオチド変化
rs114524182	A/G	rs36065281	-/A
rs114514104	A/G	rs35756329	C/T
rs114496807	G/T	rs35505767	-/C
rs114400440	A/G	rs35441734	-/G
rs114138670	A/C	rs35414496	-/C
rs114065960	C/T	rs35276432	-/T
rs113840487	-/T	rs35196751	A/G
rs113683625	C/T	rs34669719	-/G
rs113670969	A/T	rs34585796	C/T
rs113591472	A/G	rs34577192	-/C
rs113513228	C/G	rs34573573	A/G
rs113160275	A/G	rs34486667	-/A
rs113040835	A/C	rs34481769	-/G
rs113020176	C/T	rs34442639	-/G
rs112884598	A/G	rs34384907	-/C
rs112783854	G/T	rs34120100	C/T
rs112667566	C/G	rs34100838	-/G
rs112414809	C/G	rs33960246	-/A
rs112119371	C/T	rs33952492	-/A
rs112103383	C/G	rs28732160	C/T
rs111778263	C/T	rs17850964	A/G
rs111682977	C/G	rs17207552	C/G
rs111402617	C/T	rs17207545	C/T
rs111359007	A/T	rs12529130	A/C
rs79835368	A/T	rs12526606	A/G
rs78361546	G/T	rs12215409	G/T
rs78309060	A/G	rs12213415	A/G
rs77783231	C/T	rs12207158	A/T
rs77295762	A/T	rs12191348	A/T
rs76622544	A/C	rs12110369	C/T
rs75755502	A/C	rs11968755	G/T
rs75654562	A/C	rs11759353	A/G
rs75518884	A/G	rs11751198	A/G
rs75509494	-/CAA	rs915652	C/T
rs75210739	C/G	rs915651	C/T
rs75155700	A/G	rs909267	A/G
rs74558757	A/C	rs743399	A/G
rs73400268	A/G	rs707927	C/T
rs72842403	A/T	rs707926	A/G
rs72416199	-/A	rs707925	C/G
rs72334400	-/A	rs707924	A/G
rs72224485	-/A	rs707923	G/T
rs72131662	-/AA	rs534892	C/G

【表Ａ－３】

表 A ヒトバリル tRNA 合成酵素 SNP			
遺伝子バンクアクセション番号	ヌクレオチド変化	遺伝子バンクアクセション番号	ヌクレオチド変化
rs71941653	-/AA	rs480092	A/G
rs71563368	A/G	rs11531	C/T
rs71552084	-/AA	rs2753960	A/AG/C/CC
rs71552083	-/A	rs71820061	(LARGEDELETION)/-
rs71552082	-/A	rs71815784	(LARGEDELETION)/-
rs70990278	-/AA	rs71750265	(LARGEDELETION)/-
rs70990277	-/A	rs915652	C/T
rs70990276	-/A	rs11555256	A/T
rs70990275	-/A		
rs70990274	-/G		
rs70990273	-/G		
rs67600122	CT/GG		
rs61730576	A/G		
rs61730575	A/G		
rs60798461	C/T		
rs56372644	C/T		
rs56307175	A/G		
rs56291059	A/C		
rs56265112	-/A		
rs56229298	A/C		
rs56222037	C/T		
rs56214984	C/T		
rs56212520	C/T		
rs56192709	A/G		
rs56111301	C/T		
rs56074627	A/G		
rs56070791	A/G		
rs56013959	C/T		
rs55982881	C/T		

【０１４０】

特定の実施形態では、ポリペプチドバリアントは、本明細書に記載されているようにまたは当該技術分野で公知のように、保存的または非保存的であり得る１つ以上の置換によって参照ポリペプチドから区別される。特定の実施形態では、ポリペプチドバリアントは保存的置換を含み、この点に関して、ポリペプチドの活性の性質を変化させずに、一部のアミノ酸をほぼ同様の特性を有する他のアミノ酸に変化させ得ることが、当該技術分野において十分に理解されている。

【０１４１】

特定の実施形態では、バリアントポリペプチドは、本明細書に記載のＡＡＲＳ参照ポリペプチドの対応する配列と少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％以上の配列同一性または類似性を有するアミノ酸配列を含み、かつその参照ポリペプチドの非カノニカルな活性を実質的に保持している。また、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０個以上のアミノ酸の付加、削除または置換により参照ＡＡＲＳ配列とは異なる

が、参照ＡＡＲＳポリペプチドの特性は保持している配列も含まれる。特定の実施形態では、アミノ酸の付加または削除は、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドのＣ末端および／またはＮ末端で生じる。特定の実施形態では、アミノ酸付加は、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドのＣ末端および／またはＮ末端に近位の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０個以上の野生型（すなわち、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチド由来の）残基を含む。

【０１４２】

特定の実施形態では、バリアントポリペプチドは、対応するＡＡＲＳ参照配列と少なくとも１％で２０％、１５％、１０％または５％未満の残基分だけ異なる。（この比較にアライメントが必要であれば、最大の類似性になるように配列を整列させるべきである。削除もしくは挿入またはミスマッチにより「ループアウトした」配列が相違部分であると考えられる。）相違は、非必須残基における相違もしくは変化、または保存的置換であることが適切である。特定の実施形態では、バリアントＡＡＲＳポリペプチドの分子量は、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの分子量と約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％以上異なる。

【０１４３】

また、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの生物学的に活性な「フラグメント」、すなわち、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの生物学的に活性なフラグメントも含まれる。代表的な生物学的に活性なフラグメントは一般に、相互作用、例えば分子内または分子間相互作用に関与する。分子間相互作用は、特定の結合相互作用または酵素的相互作用であり得る。分子間相互作用は、ＡＡＲＳポリペプチドと細胞結合パートナー（ＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性に関与する細胞受容体またはその他の宿主分子など）との間のものであり得る。いくつかの実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質、バリアントおよびその生物学的に活性なフラグメントは、１つ以上の細胞結合パートナーと少なくとも約０．０１、０．０５、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、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、４０または５０ｎＭの親和性で結合する。選択された結合パートナー、特に非カノニカルな活性に関与する結合パートナーに対するＡＡＲＳタンパク質フラグメントの結合親和性は通常、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドの結合親和性よりも、少なくとも約１．５倍、２倍、２．５倍、３倍、３．５倍、４倍、４．５倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、２００倍、３００倍、４００倍、５００倍、６００倍、７００倍、８００倍、９００倍、１０００倍以上（間にあるすべての整数を含む）強い。ＡＡＲＳの少なくとも１つのカノニカルな活性に関与する結合パートナーに対するＡＡＲＳタンパク質フラグメントの結合親和性は通常、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドの結合親和性よりも、少なくとも約１．５倍、２倍、２．５倍、３倍、３．５倍、４倍、４．５倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、２００倍、３００倍、４００倍、５００倍、６００倍、７００倍、８００倍、９００倍、１０００倍以上弱い。

【０１４４】

通常は、生物学的に活性なフラグメントは、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの活性を少なくとも１つ有するドメインまたはモチーフを含み、また種々の活性なドメインを１つ以上（場合によってはすべて）含むこともあり、また非カノニカルな活性を有するフラグメントを含む。いくつかの場合には、ＡＡＲＳポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントが特定の短縮されたフラグメントに固有の生物活性を有するため、完全長ＡＡＲＳポリペプチドがその活性を有さないことがある。特定の場合には、生物学的に活性なＡＡＲＳポリペプチドフラグメントを他の完全長ＡＡＲＳポリペプチド配列から分離することにより、

または生物学的に活性なドメインを覆い隠している完全長ＡＡＲＳ野生型ポリペプチド配列の特定の残基を変化させることにより、生物活性が示され得る。

【０１４５】

ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントは、本明細書に記載のＡＡＲＳ参照ポリペプチドのいずれか１つに記載されているアミノ酸配列の、例えば、間にあるすべての整数（例えば、１０１、１０２、１０３）および範囲（例えば、５０～１００、５０～１５０、５０～２００）を含めた１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２４０、２６０、２８０、３００、３２０、３４０、３６０、３８０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０個以上の連続するまたは連続しないアミノ酸であるポリペプチドフラグメントであり得るが、通常は完全長ＡＡＲＳを除外し得る。特定の実施形態では、生物学的に活性なフラグメントは、非カノニカルな活性に関連した配列、ドメインまたはモチーフを含む。特定の実施形態では、任意のＡＡＲＳ参照ポリペプチドのＣ末端またはＮ末端領域は、短縮されたＡＡＲＳポリペプチドが参照ポリペプチドの非カノニカルな活性を保持している限り、間にあるすべての整数および範囲（例えば、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５）を含めた約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０または７００個以上のアミノ酸だけ、または約１０～５０、２０～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～２５０、２５０～３００、３００～３５０、３５０～４００、４００～４５０、４５０～５００、５００～５５０、５５０～６００、６００～６５０、６５０～７００個分以上のアミノ酸が短縮されていてよい。通常、生物学的に活性なフラグメントは、それが由来する生物学的に活性（すなわち、非カノニカルな活性）なＡＡＲＳ参照ポリペプチドの約１％、約５％、約１０％、約２５％または約５０％以上の活性を有する。このような非カノニカルな活性を測定する方法の例を実施例に記載する。

【０１４６】

上述のように、アミノ酸の置換、削除、短縮および挿入を含めた様々な方法でＡＡＲＳポリペプチドを改変し得る。このような操作の方法は、当該技術分野で一般に公知である。例えば、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドのアミノ酸配列バリアントを、ＤＮＡの変異により調製することができる。変異誘発およびヌクレオチド配列改変の方法は当該技術分野で公知である。例えば、Ｋｕｎｋｅｌ（１９８５，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８２：４８８－４９２）、Ｋｕｎｋｅｌら（１９８７，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ，１５４：３６７－３８２）、米国特許第４，８７３，１９２号、Ｗａｔｓｏｎ，Ｊ．Ｄ．ら（“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅ”，第４版，Ｂｅｎｊａｍｉｎ／Ｃｕｍｍｉｎｇｓ，Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ，Ｃａｌｉｆ．，１９８７）およびそこに引用されている参考文献を参照されたい。目的タンパク質の生物活性に影響を及ぼさない適当なアミノ酸置換に関する手引きは、Ｄａｙｈｏｆｆら（１９７８）（Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｎａｔｌ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｒｅｓ．Ｆｏｕｎｄ．，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．））のモデルに見ることができる。

【０１４７】

同様に、ＡＡＲＳポリペプチドの使用で免疫原性の懸念が生じる場合に、例えば、潜在的なＴ細胞エピトープを同定するための自動コンピュータ認識プログラムおよび免疫原性の低い形態を同定するための指向進化法の使用によりこれに対処するおよび／またはこれを軽減することは、当該分野の技術の範囲内である。

【０１４８】

点突然変異または短縮により作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物のスクリーニング、および選択された特性を有する遺伝子産物に関するｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングの方法は、当該技術分野で公知である。このような方法は、コンビナトリアルな変異誘発法により生成されたＡＡＲＳポリペプチドの遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適用できる。ライブラリー内の機能的な変異体の頻度を増加させる技術である帰納的集団変異誘発（ｒｅｃｕｒｓｉｖｅ ｅｎｓｅｍｂｌｅ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）（ＲＥＭ）をスクリーニングアッセイと組み合わせて使用し、ＡＡＲＳポリペプチドバリアントを同定することができる（ＡｒｋｉｎおよびＹｏｕｒｖａｎ（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：７８１１－７８１５；Ｄｅｌｇｒａｖｅら（１９９３）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，６：３２７－３３１）。以下でより詳細に述べるように、１つのアミノ酸を同様の特性を有する別のアミノ酸に置き換えるような保存的置換が望ましい場合がある。

【０１４９】

生物学的に活性な短縮されたおよび／またはバリアントのＡＡＲＳポリペプチドは、参照ＡＡＲＳアミノ酸残基と比較したその配列の様々な位置に、保存的アミノ酸置換を含み得る。さらに、ＡＡＲＳタンパク質の天然バリアントの配列が決定されており、少なくとも一部が機能的に互換性であることが当該技術分野で公知である。したがって、ＡＡＲＳタンパク質のヒトおよびその他の種の既知のＡＡＲＳタンパク質ホモログ、オルソログおよび天然アイソフォームの天然の配列バリエーションに基づき、アミノ酸位置を選択して、保存的または非保存的な変異をＡＡＲＳポリペプチド内に導入することは日常的な事柄である。

【０１５０】

「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基を類似した側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えるアミノ酸置換のことである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野において明らかにされており、一般に次のように下位分類されている。

【０１５１】

酸性：生理的ｐＨでは、残基はＨイオンを失うため負電荷を有し、またペプチドが生理的ｐＨの水性媒体中にある場合、残基は、それが含まれるペプチドのコンホメーション表面の位置を求めて水溶液の方に引き付けられる。酸性側鎖を有するアミノ酸には、グルタミン酸およびアスパラギン酸がある。

【０１５２】

塩基性：生理的ｐＨまたはその１ｐＨもしくは２ｐＨ単位以内（例えば、ヒスチジン）では、残基はＨイオンと結合するため正電荷を有し、またペプチドが生理的ｐＨの水性媒体中にある場合、残基は、それが含まれるペプチドのコンホメーション表面の位置を求めて水溶液の方に引き付けられる。塩基性側鎖を有するアミノ酸には、アルギニン、リジンおよびヒスチジンがある。

【０１５３】

荷電：生理的ｐＨで残基は荷電しており、したがって、酸性または塩基性側鎖を有するアミノ酸（すなわち、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、リジンおよびヒスチジン）が含まれる。

【０１５４】

疎水性：生理的ｐＨでは残基は荷電せず、またペプチドが水性媒体中にある場合、残基は、それが含まれるペプチドのコンホメーション内部の位置を求めて水溶液から遠ざかる。疎水性側鎖を有するアミノ酸には、チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニンおよびトリプトファンがある。

【０１５５】

中性／極性：生理的ｐＨでは残基は荷電しないが、ペプチドが水性媒体中にある場合、残基は、それが含まれるペプチドのコンホメーション内部の位置を求めて水溶液からあまり遠ざからない。中性／極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、システイン、ヒスチジン、セリンおよびスレオニンがある。

【０１５６】
またこの記載では、特定のアミノ酸のことを、極性基がなく疎水性が付与されていても側鎖が十分な大きさでないため、「小型」と特徴付ける。プロリンを除けば、「小型」アミノ酸とは、側鎖に少なくとも１つの極性基がある場合は４個以下の炭素を有するアミノ酸、また極性基がない場合は３個以下の炭素を有するアミノ酸のことである。小型の側鎖を有するアミノ酸には、グリシン、セリン、アラニンおよびスレオニンがある。遺伝子にコードされる第二級アミノ酸のプロリンは、ペプチド鎖の二次構造に対するその既知の作用により特殊な場合となる。プロリンの構造は、側鎖がα－炭素だけでなくα－アミノ基の窒素とも結合しているという点で、他のすべての天然アミノ酸とは異なる。いくつかのアミノ酸類似性マトリックスが当該技術分野で公知である（例えば、Ｄａｙｈｏｆｆら，１９７８，Ａ ｍｏｄｅｌ ｏｆ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ ｃｈａｎｇｅ ｉｎ ｐｒｏｔｅｉｎｓにより開示されているＰＡＭ１２０マトリックスおよびＰＡＭ２５０マトリックスを参照されたい）。しかし、Ｍ．Ｏ．Ｄａｙｈｏｆｆ（編），Ａｔｌａｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｖｏｌ．５，ｐｐ．３４５－３５８，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ ＤＣ；およびＧｏｎｎｅｔら（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５６：１４４３０－１４４５，１９９２）により記載されている距離関係を決定するためのマトリックスでは、プロリンがグリシン、セリン、アラニンおよびスレオニンと同じグループに含まれている。したがって、本発明の目的のために、プロリンを「小さい」アミノ酸に分類する。

【０１５７】
極性または非極性に分類するために必要な引力または反発力の程度は任意のものであり、したがって、本発明で具体的に企図されるアミノ酸は、どちらか一方に分類される。具体的に指定されないほとんどのアミノ酸は、既知の挙動に基づいて分類される。

【０１５８】
さらにアミノ酸残基を、残基の側鎖置換基に関する文字通りの分類として、環状または非環状および芳香族または非芳香族、ならびに小型または大型に下位分類することができる。残基の含む炭素が、カルボキシル炭素を含めて、追加の極性置換基が存在する場合は合計４個以下、追加の極性置換基が存在しない場合は３個以下であれば、その残基は小型であると見なされる。当然のことながら、小型の残基は必ず非芳香族である。アミノ酸残基は、その構造的特性によっては２つ以上のクラスに入る場合がある。このスキームによる天然のタンパク質アミノ酸の下位分類を表Ｂに示す。

【０１５９】
【表Ｂ－１】
表Ｂ：アミノ酸の下位分類

サブクラス	アミノ酸
酸性	アスパラギン酸、グルタミン酸
塩基性	非環状：アルギニン、リジン；環状：ヒスチジン
荷電	アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン
小型	グリシン、セリン、アラニン、スレオニン、プロリン
極性／中性	アスパラギン、ヒスチジン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン
極性／大型	アスパラギン、グルタミン
疎水性	チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン
芳香族	トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン

【表Ｂ－２】

サブクラス	アミノ酸
鎖の配向に影響を与える残基	グリシンおよびプロリン

【０１６０】

また保存的アミノ酸置換は、側鎖に基づく分類を含む。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸のグループは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン；脂肪族－ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸のグループは、セリンおよびスレオニン；アミド含有側鎖を有するアミノ酸のグループは、アスパラギンおよびグルタミン；芳香族側鎖を有するアミノ酸のグループは、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；塩基性側鎖を有するアミノ酸のグループは、リジン、アルギニンおよびヒスチジン；ならびに硫黄含有側鎖を有するアミノ酸のグループは、システインおよびメチオニンである。例えば、イソロイシンもしくはバリンによるロイシンの置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸の置換、セリンによるスレオニンの置換、または構造的に関連のあるアミノ酸によるアミノ酸の同様の置き換えは、得られるバリアントポリペプチドの特性に大きな影響を与えないと予想するのが妥当である。アミノ酸変化が機能的な短縮されたおよび／またバリアントのＡＡＲＳポリペプチドを生じるか否かは、本明細書に記載されているようにその非カノニカルな活性をアッセイするにより容易に決定することができる。保存的置換をアミノ酸置換の例という見出しで表Ｃに示す。本発明の範囲内にあるアミノ酸置換は一般に、（ａ）置換領域のペプチド骨格の構造、（ｂ）標的部位での分子の電荷または疎水性、（ｃ）側鎖のかさ高さ、または（ｄ）生物学的機能の維持に対するその作用があまり異ならない置換を選択することにより達成される。置換を導入した後に、そのバリアントの生物活性をスクリーニングする。

【０１６１】

【表Ｃ－１】

表Ｃ：アミノ酸置換の例

元の残基	置換の例	好適な置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu , Ile , Val , Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu

【表Ｃ－２】

元の残基	置換の例	好適な置換
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

【０１６２】

あるいは、保存的置換を行うための同様のアミノ酸を、側鎖の同一性に基づき３つのカテゴリーに分類することができる。Ｚｕｂａｙ、Ｇ．、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第３版、Ｗｍ．Ｃ．Ｂｒｏｗｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ（１９９３）に記載されているように、１つ目のグループには、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジンが含まれ、これらはすべて荷電した側鎖を有し；２つ目のグループには、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、グルタミン、アスパラギンが含まれ；３つ目のグループには、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンが含まれる。

【０１６３】

したがって、短縮されたおよび／またはバリアントのＡＡＲＳポリペプチドの予測される非必須アミノ酸残基は通常、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基に置き換えられる。あるいは、飽和変異誘発などによりＡＡＲＳコード配列の全体または一部にランダムに変異を導入し、得られた変異体の親ポリペプチドの活性をスクリーニングして、その活性を保持している変異体を同定することができる。コード配列の変異誘発の後に、コードされているペプチドを組換え発現させ、そのペプチドの活性を決定することができる。「非必須」アミノ酸残基とは、その１つ以上の活性を消失または実質的に変化させることなく、実施形態のポリペプチドの参照配列から変化させることができる残基のことである。変化がこれらの活性の１つを実質的に消失させないことが適切であり、例えば、活性は、参照ＡＡＲＳ配列の少なくとも２０％、４０％、６０％、７０％または８０％、１００％、５００％、１０００％以上である。「必須」アミノ酸残基とは、ＡＡＲＳポリペプチドの参照配列から変化させたとき、親分子の活性が消失して、参照活性の２０％未満が存在する残基のことである。例えば、このような必須アミノ酸残基としては、様々な入手源由来のＡＡＲＳポリペプチドの活性な結合部位（１つまたは複数）またはモチーフ（１つまたは複数）において保存されている配列を含めた、異なる種間でＡＡＲＳポリペプチドにおいて保存されているアミノ酸残基が挙げられる。

【０１６４】

一般に、ポリペプチドおよび融合ポリペプチド（およびそれをコードするポリヌクレオチド）は単離されている。「単離」ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとは、その元の環境から取り出されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドのことである。例えば、天然のタンパク質が、天然の系で共存する物質の一部またはすべてから分離されていれば、その天然のタンパク質は単離されている。好ましくは、このようなポリペプチドは、少なくとも約９０％純粋、より好ましくは少なくとも約９５％純粋、最も好ましくは少なくとも約９９％純粋である。ポリヌクレオチドが、天然の環境の一部ではないベクター中にクローニングされていれば、そのポリヌクレオチドは単離されていると見なされる。

【０１６５】

特定の実施形態は、ＡＡＲＳポリペプチドの二量体も包含する。二量体は、例えば、２つの同一のＡＡＲＳポリペプチド間でのホモ二量体、２つの異なるＡＡＲＳポリペプチド間でのヘテロ二量体（例えば、完全長ＹＲＳポリペプチドと短縮されたＹＲＳポリペプチド；短縮されたＹＲＳポリペプチドと短縮されたＷＲＳポリペプチド）および／またはＡＡＲＳポリペプチドと異種ポリペプチド間でのヘテロ二量体を含み得る。ＡＡＲＳポリペプチドと異種ポリペプチド間でのヘテロ二量体のような特定のヘテロ二量体は、本明細書に記載されているように二機能性であり得る。

【０１６６】

また、１つ以上の置換、短縮、削除、付加、化学修飾またはこれらの改変の組合せのいずれによるものであるかに関係なく、第二のＡＡＲＳポリペプチドと実質的に二量体化しない単離ＡＡＲＳポリペプチドモノマーを含めた、ＡＡＲＳポリペプチドのモノマーも含まれる。特定の実施形態では、単量体ＡＡＲＳポリペプチドは、二量体または多量体のＡＡＲＳポリペプチド複合体が有さない、非カノニカルな活性を含めた生物活性を有する。

【０１６７】

本発明の特定の実施形態は、本明細書に記載されている、ＡＡＲＳポリペプチドの所望の特徴を向上させた改変を含めた、改変ＡＡＲＳポリペプチドの使用も企図する。本発明のＡＡＲＳポリペプチドの改変は、アセチル化、ヒドロキシル化、メチル化、アミド化および炭水化物または脂質部分、補助因子の付加などを含む側鎖改変、骨格改変ならびにＮ末端およびＣ末端改変を含めた、１つ以上の構成アミノ酸における化学的なおよび／または酵素による誘導体化を含む。また改変の例として、ＡＡＲＳポリペプチドのＰＥＧ化も挙げられる（例えば、ともに参照により本明細書に組み込まれる、ＶｅｒｏｎｅｓｅおよびＨａｒｒｉｓ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ５４：４５３－４５６，２００２：４５３－４５６，２００２；ならびにＰａｓｕｔら，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ．Ｔｈｅｒ．Ｐａｔｅｎｔｓ １４（６）８５９－８９４ ２００４を参照されたい）。

【０１６８】

ＰＥＧはよく知られたポリマーであり、水や多くの有機溶媒に溶解する、毒性がない、免疫原性がないという特性を有する。またＰＥＧは、無色透明、無臭で化学的に安定でもある。こうした理由などにより、ＰＥＧは付加するのに好適なポリマーとして選択されてきたが、それは限定するのではなく単に例示する目的で用いられてきただけである。同様の生成物が他の水溶性ポリマーでも得られ、このようなものとしては、ポリビニルアルコール、ポリ（プロピレングリコール）などのような他のポリ（アルキレンオキシド）、ポリ（ポリオキシエチル化グリセロール）などのようなポリ（ポリオキシエチル化ポリオール）、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルプロリドン（ｐｏｌｙｖｉｎｙｌ ｐｕｒｒｏｌｉｄｏｎｅ）、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－ｌ，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸およびポリアミノ酸が非限定的に挙げられる。当業者は、所望の投与、循環時間、タンパク質分解に対する耐性またはその他の考慮事項に基づいて、所望のポリマーを選択することができる。

【０１６９】

具体的には、多種多様なＰＥＧ誘導体が入手可能であり、かつＰＥＧコンジュゲートの調製での使用に適している。例えば、ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ（登録商標）シリーズの商標で販売されているＮＯＦ社のＰＥＧ試薬は、様々な方法によるＡＡＲＳポリペプチドのＮ末端、Ｃ末端または任意の内部アミノ酸へのカップリングのためのメトキシポリエチレングリコールおよび活性化ＰＥＧ誘導体、例えばメトキシ－ＰＥＧアミン、マレイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルおよびカルボン酸などを含めた数多くのＰＥＧ誘導体を提供している。またＮｅｋｔａｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ社のＡｄｖａｎｃｅｄ ＰＥＧｙｌａｔｉｏｎ技術も、ＡＡＲＳポリペプチドベースの治療剤の安全性および有効性を向上させる可能性のある多様なＰＥＧカップリング技術を提供している。

【０１７０】

また本開示を読む当業者は、特許、公開特許出願および関連する刊行物を検索しても、

重要かつ可能なＰＥＧ－カップリング技術およびＰＥＧ－誘導体が得られるであろう。例えば、その内容全体が参照により組み込まれる、米国特許第６，４３６，３８６号；同第５，９３２，４６２号；同第５，９００，４６１号；同第５，８２４，７８４号；および同第４，９０４，５８４号には、このような技術および誘導体とその製造方法が記載されている。

【０１７１】

特定の態様では、化学選択的連結技術を用いて、例えば制御された方法で特定部位にポリマーを付加することなどにより、本発明のＡＡＲＳポリペプチドを改変し得る。このような技術は通常、化学選択的アンカーを化学的手段または組換え手段によりタンパク質骨格内に組み込み、次いで相補的なリンカーを有するポリマーで修飾することによるものである。その結果、得られたタンパク質－ポリマーコンジュゲートの組立ておよび共有結合構造を制御して、有効性および薬物動態特性のような薬物特性の合理的な最適化を可能にし得る（例えば、Ｋｏｃｈｅｎｄｏｅｒｆｅｒ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ９：５５５－５６０，２００５を参照されたい）。

【０１７２】

他の実施形態では、ＡＡＲＳポリペプチドと他のタンパク質との融合タンパク質も含まれ、これらの融合タンパク質は、ＡＡＲＳポリペプチドの生物活性、分泌、標的化、生物学的寿命、細胞膜もしくは血液脳関門を透過する能力、または薬物動態特性を増強し得る。薬物動態特性を向上させる融合タンパク質（「ＰＫ調節物質」）の例としては、ヒトアルブミン（Ｏｓｂｏｒｎら：Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４５６（１－３）：１４９－１５８，（２００２））、抗体Ｆｃドメイン、ポリＧｌｕまたはポリＡｓｐ配列およびトランスフェリンとの融合物が非限定的に挙げられる。さらに、アミノ酸Ｐｒｏ、ＡｌａおよびＳｅｒ（「ＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ」）またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳＹＬＡＴＩＯＮ（登録商標）の商標で販売されている）からなる構造的に無秩序なポリペプチド配列との融合は、ＡＡＲＳポリペプチドの流体力学的体積を増加させる簡単な方法である。この付加された延長物は、かさ高いランダムな構造をしており、得られた融合タンパク質の大きさを著しく増大させる。これにより、腎臓ろ過による小型ＡＡＲＳポリペプチドの通常の迅速除去が数桁遅延される。さらに、ＩｇＧ融合タンパク質の使用により、いくつかの融合タンパク質が血液脳関門を透過することが可能になることも示されている（Ｆｕら（２０１０）Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．１３５２：２０８－１３）。

【０１７３】

細胞膜透過を向上させる融合タンパク質の例としては、膜転位配列との融合物が挙げられる。この文脈において、「膜転位配列」という用語は、細胞膜を横切る膜転位を可能にする天然または合成のアミノ酸配列を指す。代表的な膜転位配列としては、Ｔａｔタンパク質およびホメオティック転写タンパク質アンテナペディアに由来する天然の膜転位配列に基づく配列、ならびに全部または一部がポリアルギニンおよびリジン残基に基づく合成の膜転位配列が挙げられる。代表的な膜転位配列としては、例えば、以下の特許に開示されている配列が挙げられる：米国特許第５，６５２，１２２号；同第５，６７０，６１７号；同第５，６７４，９８０号；同第５，７４７，６４１号；同第５，８０４，６０４号；同第６，３１６，００３号；同第７，５８５，８３４号；同第７，３１２，２４４号；同第７，２７９，５０２号；同第７，２２９，９６１号；同第７，１６９，８１４号；同第７，４５３，０１１号；同第７，２３５，６９５号；同第６，９８２，３５１号；同第６，６０５，１１５号；同第７，３０６，７８４号；同第７，３０６，７８３号；同第６，５８９，５０３号；同第６，３４８，１８５号；同第６，８８１，８２５号；同第７，４３１，９１５号；国際公開第００７４７０１Ａ２号；同第２００７１１１９９３Ａ２号；同第２００７１０６５５４Ａ２号；同第０２０６９９３０Ａ１号；同第０３０４９７７２Ａ２号；同第０３１０６４９１Ａ２号；および同第２００８０６３１１３Ａ１号。

【０１７４】

任意に、本明細書に開示されるＡＡＲＳポリペプチドと融合タンパク質の間に可動性分

子のリンカー（またはスペーサー）を挿入し、共有結合させ得るということが理解されるであろう。

【０１７５】

さらに、いくつかの実施形態では、ＡＡＲＳポリペプチドは、よく特徴付けられた他の分泌タンパク質に由来する合成または天然の分泌シグナル配列を含み得る。いくつかの実施形態では、このようなタンパク質は、ｉｎ　ｓｉｔｕでタンパク質分解性の切断によりプロセシングされてＡＡＲＳポリペプチドを形成し得る。このような融合タンパク質は、例えば、新たなＮ末端アミノ酸が生じるＡＡＲＳポリペプチドとユビキチンの融合物、または細胞外培地へのＡＡＲＳポリペプチドの高レベルの分泌を仲介する分泌シグナルの使用、または精製もしくは検出を向上させるＮ末端もしくはＣ末端エピトープタグを含む。

【０１７６】

本明細書に記載のＡＡＲＳポリペプチドを、組換え技術のような当業者に公知の任意の適当な方法により調製し得る。組換え作製法に加え、固相技術を用いた直接ペプチド合成により、本発明のポリペプチドを作製することができる（Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９－２１５４（１９６３））。タンパク質合成を手作業による技術を用いて、または自動化により行い得る。例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　４３１Ａ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて自動合成を行い得る。あるいは、様々なフラグメントを別々に化学合成し、化学的方法により結合させて所望の分子を作製し得る。

【０１７７】

ＩＶ．ＡＡＲＳポリヌクレオチド

本発明の実施形態は、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）の１つ以上の新規に同定されたタンパク質フラグメントをコードするポリヌクレオチド、ならびにその相補体、バリアントおよびフラグメントを含む。特定の実施形態では、ＡＡＲＳポリヌクレオチドは、バリルｔＲＮＡ合成酵素のスプライスバリアント、タンパク質分解フラグメントまたはその他のタイプのフラグメントを表す、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）に記載されているＡＡＲＳポリペプチド参照配列（１つまたは複数）のすべてまたは一部をコードする。特定の実施形態は、これらのスプライスバリアントの１つ以上のスプライスジャンクションの配列を含むポリペプチドまたはタンパク質をコードするポリヌクレオチド、ならびにその相補体、バリアントおよびフラグメントを含む。特定の実施形態では、通常は、新規なまたは例外的な方法でエクソンを結合させる選択されたＡＡＲＳスプライスバリアントの特異な性質により、ＡＡＲＳポリヌクレオチド参照配列は、固有のまたは例外的なスプライスジャンクションを含む。特定の実施形態は、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドを含まない。

【０１７８】

また本明細書に記載されているように、上記参照ポリヌクレオチドのすべてまたは一部を含む、上記参照ポリヌクレオチドのすべてまたは一部に相補的な、または上記参照ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするプライマー、プローブ、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびＲＮＡ干渉剤も本発明のＡＡＲＳポリヌクレオチドの範囲に含まれる。

【０１７９】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、ｍＲＮＡ、ＲＮＡ、ｃＲＮＡ、ｃＤＮＡまたはＤＮＡを指す。この用語は通常、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチド、またはいずれかのタイプの改変型ヌクレオチドで、長さが少なくとも１０塩基のポリマー形態のヌクレオチドを指す。この用語は、一本鎖および二本鎖型のＤＮＡを包含する。「ＤＮＡ」および「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、特定の種の全ゲノムＤＮＡから単離されたＤＮＡ分子を指す。したがって、ポリペプチドをコードする単離ＤＮＡセグメントは、１つ以上のコード配列を含むが、そのＤＮＡセグメントが得られた種の全ゲノムＤＮＡから実質的に単離または精製されているＤＮＡセグメントを指す。また、ＡＡＲＳポリペプチドをコードしない非コードポリヌク

レオチド（例えば、プライマー、プローブ、オリゴヌクレオチド）も包含される。用語「ＤＮＡセグメント」および「ポリヌクレオチド」には、ＤＮＡセグメントおよびそのセグメントの小型のフラグメント、ならびに、例えばプラスミド、コスミド、ファージミド、ファージ、ウイルスなどを含めた組換えベクターも包含される。

【０１８０】

本発明のポリヌクレオチド内にさらなるコードまたは非コード配列が存在してもよいが、存在している必要はなく、またポリヌクレオチドは他の分子および／または支持体材料と結合していてもよいが、結合している必要はない。したがって、本発明のポリヌクレオチドを、コード配列自体の長さに関係なく他のＤＮＡ配列、例えばプロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコードセグメントなどと結合させ得るため、その全体の長さはかなり多様であり得る。

【０１８１】

したがって、ほとんどあらゆる長さのポリヌクレオチドフラグメントが使用され得ることが企図され、その全長は、対象とする組換えＤＮＡプロトコルでの調製および使用の容易さにより限定されることが好ましい。ＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチド（例えば、塩基数がＸ～Ｙで、式中、Ｘは約１～３０００以上、Ｙは約１０～３０００以上である）の任意の部分またはフラグメント（例えば、長さが約６、７、８、９または１０ヌクレオチドよりも長い）またはその相補体を含めた、長さが約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４１、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２４０、２６０、２７０、２８０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、２５００、２６００、２７００、２８００、２９００、３０００以上（間にあるすべての整数を含む）の塩基のポリヌクレオチドが含まれる。

【０１８２】

また本発明の実施形態は、ＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチド配列の「バリアント」も含む。ポリヌクレオチド「バリアント」は、参照ポリヌクレオチドに関して１つ以上の置換、付加、削除および／または挿入を含み得る。一般にＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチド配列のバリアントは、本明細書の他の箇所に記載されている配列アライメントプログラムによりデフォルトパラメータを用いて決定される、その特定ヌクレオチド配列との配列同一性が、少なくとも約３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、一般には少なくとも約７５％、８０％、８５％、望ましくは約９０％～９５％以上、より適切には約９８％以上であり得る。特定の実施形態では、バリアントは、約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、４１、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、６０、７０、８０、９０、１００個（間にあるすべての整数を含む）以上の塩基だけ参照配列と異なり得る。特定の実施形態では、例えばポリヌクレオチドバリアントが非カノニカルな活性を有するＡＡＲＳポリペプチドをコードする場合などでは、コードされるＡＡＲＳポリペプチドの所望の活性は、未改変のポリペプチドに比べて実質的に低下していない。コードされるポリペプチドの活性に対する効果は一般に、本明細書に記載の通りに評価され得る。

【０１８３】

特定の実施形態は、以下に記載するストリンジェンシー条件下で参照ＡＡＲＳポリヌクレオチド配列またはその相補体とハイブリダイズする、ポリヌクレオチドを含む。本明細書で使用される「低ストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー、高ストリンジェ

ンシーまたは非常に高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を述べたものである。ハイブリダイゼーション反応を行うための手引きは、Ａｕｓｕｂｅｌら（１９９８，上記），第６．３．１－６．３．６節に見ることができる。この参考文献には水性および非水性の方法が記載されており、どちらを用いてもよい。

【０１８４】

本明細書における低ストリンジェンシー条件という表現は、４２℃でのハイブリダイゼーション用に少なくとも約１％ｖ／ｖ～少なくとも約１５％ｖ／ｖのホルムアミドと、少なくとも約１Ｍ～少なくとも約２Ｍの塩、および４２℃での洗浄用に少なくとも約１Ｍ～少なくとも約２Ｍの塩を含み、包含する。また低ストリンジェンシー条件は、６５℃でのハイブリダイゼーション用に１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５Ｍ　$NaHPO_4$（ｐＨ７．２）、７％ＳＤＳ、および室温での洗浄用に（ｉ）２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ；または（ｉｉ）０．５％ＢＳＡ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、４０ｍＭ　$NaHPO_4$（ｐＨ７．２）、５％ＳＤＳも含み得る。低ストリンジェンシー条件の一実施形態は、６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中、約４５℃でのハイブリダイゼーションと、それに続く０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中、少なくとも５０℃での２回の洗浄（低ストリンジェンシー条件では、洗浄の温度を５５℃まで上げてもよい）を含む。

【０１８５】

中程度のストリンジェンシー条件は、４２℃でのハイブリダイゼーション用に少なくとも約１６％ｖ／ｖ～少なくとも約３０％ｖ／ｖのホルムアミドと、少なくとも約０．５Ｍ～少なくとも約０．９Ｍの塩、および５５℃での洗浄用に少なくとも約０．１Ｍ～少なくとも約０．２Ｍの塩を含み、包含する。また中程度のストリンジェンシー条件は、６５℃でのハイブリダイゼーション用に１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５Ｍ　$NaHPO_4$（ｐＨ７．２）、７％ＳＤＳ、および６０～６５℃での洗浄用に、（ｉ）２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ；または（ｉｉ）０．５％ＢＳＡ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、４０ｍＭ　$NaHPO_4$（ｐＨ７．２）、５％ＳＤＳも含む。中程度のストリンジェンシー条件の一実施形態は、６×ＳＳＣ中、約４５℃でのハイブリッド形成と、それに続く０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中、６０℃での１回以上の洗浄を含む。高ストリンジェンシー条件は、４２℃でのハイブリダイゼーション用に少なくとも約３１％ｖ／ｖ～少なくとも約５０％ｖ／ｖのホルムアミドと約０．０１Ｍ～約０．１５Ｍの塩、および５５℃での洗浄用に約０．０１Ｍ～約０．０２Ｍの塩を含み、包含する。

【０１８６】

また高ストリンジェンシー条件は、６５℃でのハイブリダイゼーション用に１％ＢＳＡ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５Ｍ　$NaHPO_4$（ｐＨ７．２）、７％ＳＤＳ、および６５℃を超える温度での洗浄用に、（ｉ）０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ；または（ｉｉ）０．５％ＢＳＡ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、４０ｍＭ　$NaHPO_4$（ｐＨ７．２）、１％ＳＤＳも含み得る。高ストリンジェンシー条件の一実施形態は、６×ＳＳＣ中、約４５℃でのハイブリッド形成と、それに続く０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中、６５℃での１回以上の洗浄を含む。非常に高いストリンジェンシー条件の一実施形態は、０．５Ｍリン酸ナトリウム、７％ＳＤＳ中、６５℃でのハイブリッド形成と、それに続く０．２×ＳＳＣ、１％ＳＤＳ中、６５℃での１回以上の洗浄を含む。

【０１８７】

他のストリンジェンシー条件は当該技術分野で公知であり、当業者は、様々な因子を操作してハイブリダイゼーションの特異性を最適化することができることを理解するであろう。最後の洗浄のストリンジェンシーの最適化は、高度のハイブリダイゼーションを確実に行うのに役立ち得る。詳細な例に関しては、Ａｕｓｕｂｅｌら（上記）の２．１０．１～２．１０．１６ページおよびＳａｍｂｒｏｏｋら（１９８９，上記）の第１．１０１～１．１０４節を参照されたい。

【０１８８】

ストリンジェントな洗浄は通常、約４２℃～６８℃の温度で行うが、当業者は、他の温度がストリンジェントな条件に適する場合もあることを理解するであろう。最大ハイブリダイゼーション速度は通常、ＤＮＡ－ＤＮＡハイブリッド形成のＴｍよりも低い約２０℃～２５℃で生じる。Ｔｍは融解温度、すなわち２つの相補的なポリヌクレオチド配列が解離する温度であることは当該技術分野で公知である。Ｔｍを推定する方法は当該技術分野で公知である（Ａｕｓｕｂｅｌら（上記）２．１０．８ページを参照されたい）。

【０１８９】

一般に、完全にマッチしたＤＮＡの二本鎖のＴｍは、次式による近似値として予測され得る：Ｔｍ＝８１．５＋１６．６（ｌｏｇ$_{10}$Ｍ）＋０．４１（％Ｇ＋Ｃ）－０．６３（％ホルムアミド）－（６００／長さ）、式中：ＭはＮａ＋の濃度であり、０．０１モル濃度～０．４モル濃度の範囲が好ましい；％Ｇ＋Ｃは、塩基総数のパーセンテージで表したグアノシン塩基とシトシン塩基の合計であり、３０％～７５％Ｇ＋Ｃの範囲内にある；％ホルムアミドは、体積パーセントでのホルムアミド濃度である；長さは、ＤＮＡ二本鎖中の塩基対の数である。二本鎖ＤＮＡのＴｍは、ランダムにミスマッチした塩基対の数が１％増加するごとに約１℃ずつ低下する。洗浄は一般に、高ストリンジェンシーではＴｍ－１５℃、中程度のストリンジェンシーではＴｍ－３０℃で行う。

【０１９０】

ハイブリダイゼーション手順の一例では、固定化したＤＮＡを含んだ膜（例えば、ニトロセルロース膜またはナイロン膜）を、標識したプローブを含有するハイブリダイゼーション緩衝液（５０％の脱イオン化ホルムアミド、５×ＳＳＣ、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ溶液（０．１％フィコール、０．１％ポリビニルピロリドンおよび０．１％ウシ血清アルブミン）、０．１％ＳＤＳおよび２００ｍｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡ）中、４２℃で一晩ハイブリダイズさせる。次いで、膜に中程度のストリンジェンシーでの洗浄（すなわち、２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、４５℃で１５分間、次いで、２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、５０℃で１５分間）を２回連続で行った後、高ストリンジェンシーでの洗浄（すなわち、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、５５℃で１２分間、次いで、０．２×ＳＳＣと０．１％ＳＤＳの溶液、６５～６８℃で１２分間）を２回連続で行う。

【０１９１】

上述のように、特定の実施形態は、ＡＡＲＳポリペプチドをコードするＡＡＲＳポリヌクレオチドに関する。種々の使用の中でも特に、これらの実施形態を用いて、組換えにより所望のＡＡＲＳポリペプチドまたはそのバリアントを作製するか、または選択された細胞もしくは対象内でＡＡＲＳポリペプチドを発現させる。遺伝暗号の縮重の結果、本明細書に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が多数存在し得るということを、当業者は理解するであろう。これらのポリヌクレオチドの一部は、任意の天然遺伝子のヌクレオチド配列と最小限の相同性を有し得る。それでも、コドン使用頻度の違いにより異なるポリヌクレオチド、例えば、ヒトおよび／または霊長類のコドン選択に最適化されたポリヌクレオチドが本発明により具体的に企図される。

【０１９２】

したがって、複数のポリヌクレオチドが本発明のＡＡＲＳポリペプチドをコードし得る。さらに、ポリヌクレオチド配列を様々な理由で操作し得る。例としては、特に限定されないが、好適なコドンを組み込んで、様々な生物内でのポリヌクレオチドの発現を増強することが挙げられる（一般的には、Ｎａｋａｍｕｒａら，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ．Ｒｅｓ．（２０００）２８（１）：２９２を参照されたい）。さらに、制限部位を導入もしくは除去する、ＣｐＧジヌクレオチドモチーフの密度を減少させる（例えば、Ｋａｍｅｄａら，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．（２００６）３４９（４）：１２６９－１２７７）、または一本鎖配列がステムループ構造を形成する能力を低下させる：（例えば、Ｚｕｋｅｒ Ｍ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．（２００３）；３１（１３）：３４０６－３４１５を参照されたい）ために、サイレント突然変異を組み込むことができる。加えて、開始コドンにＫｏｚａｋコンセンサス配列［すなわち、（ａ／ｇ）ｃｃ（ａ／ｇ）ｃｃＡＴＧｇ］を含ませることにより、哺乳動物での発現をさらに最適化す

ることができる。この目的に有用なＫｏｚａｋコンセンサス配列は当該技術分野で公知である（Ｍａｎｔｙｈら，ＰＮＡＳ　９２：２６６２－２６６６（１９９５）；Ｍａｎｔｙｈら，Ｐｒｏｔ．Ｅｘｐ．＆　Ｐｕｒｉｆ．６，１２４（１９９５））。

【０１９３】

本発明のポリヌクレオチドを、コード配列自体の長さに関係なく他のＤＮＡ配列、例えばプロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコードセグメントなどと結合させ得る。したがって、ほとんどあらゆる長さのポリヌクレオチドフラグメントが使用され得ることが企図され、その全長は、対象とする組換えＤＮＡプロトコルでの調製および使用の容易さにより限定されることが好ましい。

【０１９４】

当該技術分野において既知で利用可能な各種の十分に確立された任意の技術を用いて、ポリヌクレオチドおよびその融合物を調製、操作および／または発現し得る。例えば、本発明のポリペプチドまたはその融合タンパク質もしくは等価物をコードするポリヌクレオチド配列を組換えＤＮＡ分子中で用いて、適当な宿主細胞内でＡＡＲＳポリペプチドを発現させ得る。遺伝暗号が生来的に縮重していることから、実質的に同じまたは機能的に同等なアミノ酸配列をコードする他のＤＮＡ配列を作製し、これらの配列を用いて所与のポリペプチドをクローニングして発現させ得る。

【０１９５】

当業者に理解されるように、非天然のコドンを有するポリペプチドコードヌクレオチド配列を作製することが有利な場合がある。例えば、特定の原核宿主または真核宿主に好まれるコドンを選択して、タンパク質発現の速度を増加させるか、または天然の配列から生じる転写産物よりも半減期が長いなどの望ましい特性を有する組換えＲＮＡ転写産物を産生させることができる。一般に、このようなポリヌクレオチドを「コドン最適化されている」という。本明細書に記載の任意のポリヌクレオチドをコドン最適化された形態で使用し得る。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドを、特定の細菌、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）または出芽酵母（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のような酵母などで使用するためにコドン最適化することができる（例えば、Ｂｕｒｇｅｓｓ－Ｂｒｏｗｎら，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒ　Ｐｕｒｉｆ．５９：９４－１０２，２００８；Ｅｒｍｏｌａｅｖａ　ＭＤ（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｉｓｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３（４）９１－７；Ｗｅｌｃｈら，ＰＬｏＳ　ＯＮＥ　４（９）：ｅ７００７　ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．０００７００２を参照されたい）。

【０１９６】

さらに、様々な理由で、配列をコードするポリペプチドに対して、特に限定されないが、遺伝子産物のクローニング、プロセシング、発現および／または活性を修正する改変を含めた改変を行うために、当該技術分野で一般に公知の方法を用いて本発明のポリヌクレオチド配列を操作することができる。

【０１９７】

本発明の別の態様では、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、例えば遺伝子治療技術を用いて、対象にｉｎ　ｖｉｖｏで送達することができる。遺伝子治療は一般に、このような治療法が求められる疾患または状態を有する哺乳動物、特にヒトの特定細胞、標的細胞に異種核酸を転移させることを指す。核酸は、異種ＤＮＡが発現され、それにコードされている治療用産物が産生されるように、選択された標的細胞内に導入される。

【０１９８】

本明細書で教示される遺伝子治療に使用し得る様々なウイルスベクターとしては、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、または好ましくは、レトロウイルスのようなＲＮＡウイルスが挙げられる。レトロウイルスベクターは、マウスまたはトリレトロウイルスの派生物であるか、またはレンチウイルスベクターであることが好ましい。好適なレトロウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。単一の外来遺伝子を挿入することができるレトロウイルスベクターの例とし

ては、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭｕＬＶ）、ハーベイマウス肉腫ウイルス（ＨａＭｕＳＶ）、マウス乳腺腫瘍ウイルス（ＭｕＭＴＶ）、ＳＩＶ、ＢＩＶ、ＨＩＶおよびラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）が挙げられるが、これらに限定されない。数多くのさらなるレトロウイルスベクターが複数の遺伝子を組み込むことができる。これらのベクターはすべて、形質導入された細胞を特定し作製することができるように、選択マーカーの遺伝子を転移させるまたは組み込むことができる。例えば、目的とするジンクフィンガー由来ＤＮＡ結合ポリペプチド配列を、特定の標的細胞上の受容体に対するリガンドをコードする別の遺伝子とともにウイルスベクターに挿入することにより、ベクターを標的特異的にし得る。例えばタンパク質（二量体）をコードするポリヌクレオチドを挿入することにより、レトロウイルスベクターを標的特異的にすることができる。例示的な標的化は、レトロウイルスベクターを標的とする抗体を用いて行い得る。当業者は、レトロウイルスゲノム内に挿入して、ジンクフィンガーヌクレオチド結合タンパク質ポリヌクレオチドを含むレトロウイルスベクターの標的特異的送達を可能にすることができる特定のポリヌクレオチド配列を知っているか、または必要以上の実験を行わずに容易に確認することができる。

【０１９９】

組換えレトロウイルスは不完全であるため、感染性ベクター粒子を産生するためには補助が必要である。この補助は、例えば、ＬＴＲ内において制御配列の制御下でレトロウイルスの全構造遺伝子をコードするプラスミドを含むヘルパー細胞系用いることにより与えられる。これらのプラスミドには、パッケージング機構が封入のためのＲＮＡ転写産物を認識することを可能にするヌクレオチド配列がない。パッケージングシグナルが削除されているヘルパー細胞系としては、例えばＰＳＩ．２、ＰＡ３１７およびＰＡ１２が挙げられるが、これらに限定されない。これらの細胞系はゲノムがパッケージされていないため、空のビリオンを産生する。パッケージングシグナルはインタクトであるが、構造遺伝子が他の目的遺伝子に置き換わっているこのような細胞にレトロウイルスベクターを導入すると、ベクターがパッケージされてベクタービリオンが産生され得る。次いで、この方法により作製されたベクタービリオンを用いてＮＩＨ３Ｔ３細胞のような組織細胞系に感染させ、大量のキメラレトロウイルスビリオンを作製することができる。

【０２００】

また、例えばＤＮＡ－リガンド複合体、アデノウイルス－リガンド－ＤＮＡ複合体、ＤＮＡの直接注入、$CaPO_4$沈殿法、遺伝子銃技術、エレクトロポレーション、リポソーム、リポフェクションなどを含めた、遺伝子治療のための「非ウイルス」送達技術も使用することができる。これらの方法はいずれも当業者に広く利用可能であり、本発明での使用に適するであろう。他の適当な方法が当業者に利用可能であり、任意の利用可能なトランスフェクションの方法を用いて本発明を遂行することができることを理解するべきである。リポフェクションは、単離ＤＮＡ分子をリポソーム粒子内に封入して、このリポソーム粒子を標的細胞の細胞膜と接触させることにより行うことができる。リポソームは自己集合性のコロイド粒子であり、粒子内ではホスファチジルセリンまたはホスファチジルコリンのような両親媒性分子からなる脂質二重層が、周囲媒質の一部を封入して親水性の内側を取り囲んでいる。所望の化学物質、薬物または本発明のような単離ＤＮＡ分子が内側に含まれるように、単層膜または多層膜リポソームを構築することができる。

【０２０１】

別の態様では、細胞療法でＡＡＲＳポリペプチドを発現させ送達するために、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用し得る。したがって別の態様では、本発明は、ＡＡＲＳポリペプチドを発現するまたは発現することができる宿主細胞の投与を含む、疾患または障害を治療するための細胞療法を含む。

【０２０２】

細胞療法は、体外で選択して増殖させ、薬理学的処理または改変（すなわち、遺伝子改変）を施した細胞の投与を含む（Ｂｏｒｄｉｇｎｏｎ，Ｃ．ら，Ｃｅｌｌ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａｃｈｉｅｖｅｍｅｎｔｓ ａｎｄ Ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅｓ（１９９９），Ｈａ

ｅｍａｔｏｌｏｇｉｃａ，８４，ｐｐ．１１１０－１１４９）。このような宿主細胞としては、例えば、ＡＡＲＳポリペプチドを発現するように遺伝子改変された、マクロファージを含めた初代細胞および幹細胞が挙げられる。細胞療法の目的は、損傷を受けた組織または器官の生物学的機能を代替する、修復するまたは増強することである。

【０２０３】

移植細胞の使用は、数多くの内分泌障害、例えば貧血および小人症、血液疾患、腎不全および肝不全、下垂体欠損およびＣＮＳ欠損、ならびに糖尿病などの治療のために研究されてきた（Ｕｌｕｄａｇら，Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｉｏｎ（２０００），Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，４２，ｐｐ．２９－６４）。移植細胞は、もたらされた系において、本発明のＡＡＲＳポリペプチドのような生物活性化合物を放出し、存在しないまたは十分な量が産生されない内因性のＡＡＲＳポリペプチドを代替することにより機能し得る。

【０２０４】

また本発明の実施形態は、検出、増幅、アンチセンス療法または他の目的のためのオリゴヌクレオチドも含む。これらのおよび関連する目的のために、「オリゴヌクレオチド」または「オリゴ」または「オリゴマー」という用語は、単数の「オリゴヌクレオチド」だけでなく複数の「オリゴヌクレオチド」も包含するものとし、またこの用語は、本発明の増幅方法、およびそれに続く検出方法において試薬として使用される、２個以上のヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基または関連化合物からなる任意のポリマーを指す。オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡおよび／またはその類似体であり得る。

【０２０５】

オリゴヌクレオチドという用語は、必ずしも試薬に対して任意の特定の機能を表すわけではなく、むしろ、本明細書に記載のこのような試薬すべてを含めるために一般的に使用されるものである。オリゴヌクレオチドは様々な異なる機能を果たし得る。例えば、相補鎖とハイブリダイズが可能で、さらに核酸ポリメラーゼの存在下で伸長可能であれば、オリゴヌクレオチドはプライマーとして機能し、またＲＮＡポリメラーゼにより認識される配列を含み、かつ転写を可能にするのであれば、オリゴヌクレオチドはプロモーターを提供し、また適切に位置しかつ／または改変されていれば、オリゴヌクレオチドはハイブリダイゼーションまたはプライマー伸長を妨げる機能を果たし得る。またオリゴヌクレオチドは、プローブまたはアンチセンス剤としても機能し得る。オリゴヌクレオチドの長さは実質的に任意であり、例えば、増幅反応、増幅反応の増幅産物の検出またはアンチセンスもしくはＲＮＡ干渉適用におけるその特定の機能によってのみ限定される。本明細書に記載のいずれのオリゴヌクレオチドも、プライマー、プローブ、アンチセンスオリゴマーまたはＲＮＡ干渉剤として使用することができる。

【０２０６】

本明細書で使用される「プライマー」という用語は、例えば緩衝液および温度によって定められる適当な条件下、４つの異なるヌクレオシド三リン酸、およびＤＮＡもしくはＲＮＡポリメラーゼまたは逆転写酵素のような重合のための薬剤の存在下で、鋳型によるＤＮＡ合成の開始点として働くことができる一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。プライマーの長さは、任意の場合において、例えば意図されるプライマーの使用によって決まり、一般に約１５～３０ヌクレオチドの範囲であるが、これよりも短いまたは長いプライマーも使用し得る。短いプライマー分子は一般に、鋳型と十分に安定なハイブリッド複合体を形成するためには低い温度を必要とする。プライマーは鋳型の正確な配列を反映する必要はないが、その鋳型とハイブリダイズするのに十分なだけ相補的でなければならない。プライマー部位とは、プライマーがハイブリダイズする鋳型の領域のことである。プライマーペアとは、増幅する配列の５’末端とハイブリダイズする５’上流プライマーと、増幅する配列の３’末端の相補体とハイブリダイズする３’下流プライマーとを含む、プライマーのセットのことである。

【０２０７】

本明細書で使用される「プローブ」という用語は、特定の標的により認識され得る、表面に固定化された分子または可溶性であるが固定化可能な分子を包含する。例えば、１０個、１２個およびそれを超える塩基のプローブの可能なすべての組合せを有するアレイの例に関しては、米国特許第６，５８２，９０８号を参照されたい。本明細書で使用されるプローブおよびプライマーは一般に、既知の配列の少なくとも１０～１５個の連続するヌクレオチドを含む。特異性を増強するために、もっと長いプローブおよびプライマー、例えば、ＡＡＲＳ参照配列またはその相補体の少なくとも２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００個または少なくとも１５０個のヌクレオチドを含むプローブおよびプライマーなどを用いてもよい。プローブおよびプライマーはこの例よりも大幅に長くてもよく、当該技術分野の知識ならびに表、図および配列表を含めた本明細書により裏付けられる任意の長さを使用し得ることが理解される。

【０２０８】

プローブおよびプライマーを調製および使用するための方法は、参照文献、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ら（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第2版，ｖｏｌ．１－３，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ Ｎ．Ｙ．；Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら（１９８７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌ．Ａｓｓｏｃ．＆ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ｎ．Ｙ．；Ｉｎｎｉｓ，Ｍ．ら（１９９０）ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ Ｃａｌｉｆに記載されている。ＰＣＲプライマーペアは、それを目的としたＰｒｉｍｅｒ（Ｖｅｒｓｉｏｎ ０．５，１９９１，Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｍａｓｓ．）のようなコンピュータプログラムを使用することにより、既知の配列から導くことができる。

【０２０９】

プライマーまたはプローブとして使用するためのオリゴヌクレオチドを、当該技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択し得る。例えば、ＯＬＩＧＯ４．０６ソフトウェアは、３２キロベース以下の入力ポリヌクレオチド配列から、それぞれが１００ヌクレオチド以下であるＰＣＲプライマーペアを選択する、ならびにオリゴヌクレオチドおよび５，０００ヌクレオチドまでの大型のポリヌクレオチドを解析するのに有用である。同様のプライマー選択プログラムには、能力拡張のためにさらなる機能が組み込まれている。例えば、ＰｒｉｍＯＵプライマー選択プログラム（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｔｅｘａｓ Ｓｏｕｔｈ Ｗｅｓｔ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｄａｌｌａｓ Ｔｅｘ．のＧｅｎｏｍｅ Ｃｅｎｔｅｒから一般に入手可能である）は、メガベースの配列から特定のプライマーを選択することができるため、ゲノム全域にわたる範囲でのプライマーの設計に有用である。

【０２１０】

Ｐｒｉｍｅｒ３プライマー選択プログラム（Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ／ＭＩＴ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｍａｓｓ．から一般に入手可能である）では、ユーザーは、プライマー結合部位として避けるべき配列がユーザー指定になっている「ミスプライミングライブラリー」を入力することができる。Ｐｒｉｍｅｒ３は、マイクロアレイ用のオリゴヌクレオチドの選択に特に有用である（後の２つのプライマー選択プログラムのソースコードをそれぞれの入手源から入手し、ユーザーの特定の必要に合わせて改変し得る）。ＰｒｉｍｅＧｅｎプログラム（ＵＫ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｍａｐｐｉｎｇ Ｐｒｏｊｅｃｔ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ Ｃｅｎｔｒｅ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ ＵＫから一般に入手可能である）は、複数の配列アライメントに基づいてプライマーを設計することにより、整列させた核酸配列の最も保存性の高い領域または最も保存性の低い領域とハイブリダイズするプライマーの選択が可能である。したがって、このプログラムは、固有のおよび保存されたオリゴヌクレ

オチドおよびポリヌクレオチドフラグメントの同定に有用である。上記選択方法のいずれかにより同定されたオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドフラグメントは、例えば、ＰＣＲもしくは配列決定プライマー、マイクロアレイの構成要素、または核酸試料中の完全にもしくは部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定するための特異的プローブとして、ハイブリダイゼーション技術において有用である。オリゴヌクレオチド選択の方法は、本明細書に記載されている方法に限定されない。

【０２１１】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドを、混合物または非荷電および陽イオン性の骨格結合を有するオリゴヌクレオチドの合成に関して上記参考文献および以下で詳述されている方法を用いて、段階的固相合成法により調製することができる。いくつかの場合には、例えば、薬物動態を増強するまたは化合物の捕捉もしくは検出を容易にするために、オリゴヌクレオチドに追加の化学的部分を付加することが望ましいことがある。このような部分は、標準的な合成法に従って、通常はオリゴマーの末端と共有結合させ得る。例えば、ポリエチレングリコール部分またはその他の親水性ポリマー、例えば１０～１００個の単量体サブユニットを有するものを付加することは、溶解度の増大に有用であり得る。１つ以上の荷電基、例えば有機酸のような陰イオン荷電基は細胞内取込みを増大させる。

【０２１２】

各種の検出可能な分子、例えば放射性同位元素、蛍光色素、色素、酵素、ナノ粒子、化学発光マーカー、ビオチン、または直接的に（例えば、光放射により）または間接的に（例えば、蛍光標識した抗体により）検出され得る当該技術分野で公知のその他のモノマーなどを用いて、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質を検出可能にし得る。

【０２１３】

放射性同位元素は、本発明の特定の実施形態で使用することができる検出可能な分子の例である。例えば^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈおよび^{125}Ｉを含めたいくつかの放射性同位元素を、ヌクレオチドまたはタンパク質を標識するための検出可能な分子として使用することができる。これらの放射性同位元素は半減期、崩壊のタイプおよびエネルギーのレベルが異なっており、特定のプロトコルでの必要に応じて合わせることができる。例えば、^{3}Ｈはエネルギー放射が低く、これにより低いバックグラウンドレベルが得られるが、またこの低いエネルギーによりオートラジオグラフィーの時間が長くもなる。放射性標識されたリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドおよびアミノ酸は市販されている。１番目すなわちαのリン酸基または３番目すなわちγのリン酸基において放射性標識されたヌクレオチドが入手可能である。例えば、［α－^{32}Ｐ］ｄＡＴＰおよび［γ－^{32}Ｐ］ｄＡＴＰがともに市販されている。さらに、様々な比活性で放射性標識されたヌクレオチドも市販されており、様々なプロトコルに合わせることができる。

【０２１４】

オリゴヌクレオチドの検出に用いることができる検出可能な分子の他の例としては、フルオロフォアが挙げられる。例えばフルオレセイン、テトラメチルローダミン、テキサスレッドおよびその他多数のものを含めたいくつかのフルオロフォアを、ヌクレオチド標識のために使用することができる（例えば、Ｈａｕｇｌａｎｄ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ－第９版，２００２，Ｍｏｌｅｃ．Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｅｕｇｅｎｅ ＯＲ；Ｈａｕｇｌａｎｄ，Ｔｈｅ Ｈａｎｄｂｏｏｋ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ－第１０版，２００５，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）。

【０２１５】

一例として、ヌクレオチド合成時のアミンまたはチオールの組込みによりフルオロフォアの付加が可能であるため、オリゴヌクレオチドを化学合成の際に蛍光標識し得る。蛍光標識されたヌクレオチドは市販されている。例えば、スペクトルをカバーする１０種の異なるフルオロフォアと結合したウリジンおよびデオキシウリジン三リン酸が入手可能である。ヌクレオチドと直接結合することができる蛍光色素も検出可能な分子として用いるこ

とができる。例えば、ＦＡＭ、ＪＯＥ、ＴＡＭＲＡおよびＲＯＸは、ヌクレオチドと結合させて、自動化されたＤＮＡ配列決定で使用するアミン反応性蛍光色素である。これらの蛍光標識されたヌクレオチド、例えば、ＲＯＸ－ｄｄＡＴＰ、ＲＯＸ－ｄｄＣＴＰ、ＲＯＸ－ｄｄＧＴＰおよびＲＯＸ－ｄｄＵＴＰが市販されている。

【０２１６】

非放射性および非蛍光性の検出可能な分子も利用可能である。上述のように、ビオチンをヌクレオチドと直接結合させて、比色反応を触媒する酵素（例えばホスファターゼ、ルシフェラーゼまたはペルオキシダーゼなど）と化学的にカップリングしたアビジンまたはストレプトアビジンとの特異的かつ高親和性の結合により検出することができる。ジゴキシゲニン標識ヌクレオチドも同様に、核酸の非同位体検出に使用することができる。ビオチン化ヌクレオチドおよびジゴキシゲニン標識ヌクレオチドは市販されている。

【０２１７】

ナノ粒子と呼ばれる微小な粒子もオリゴヌクレオチドプローブを標識するために使用することができる。ナノ粒子は１～１０００ｎｍの範囲の大きさであり、多様な金および銀粒子ならびに量子ドットのような化学構造体がこれに含まれる。４０～１２０ｎｍの範囲の銀または金ナノ粒子は、斜めの入射白色光が当たると高強度の単色光を散乱する。散乱光の波長は粒子の大きさによって決まる。近接した４～５個の異なる大きさの粒子がそれぞれ単色光を散乱し、それらが重ね合わさると特定の固有の色が生じる。粒子はＧｅｎｉｃｏｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）のような会社により製造されている。誘導体化された銀または金粒子をタンパク質、抗体、小分子、受容体リガンドおよび核酸を含めた広範囲の分子に付加することができる。例えば、粒子の表面を化学的に誘導体化して、ヌクレオチドに付加することができる。

【０２１８】

検出可能な分子の検出に使用することができる他のタイプのナノ粒子としては、量子ドットが挙げられる。量子ドットは、広範囲の波長の光により励起される、直径１～５ｎｍの蛍光性の結晶である。これらの結晶は、適当な波長の光により励起されると単色光のような光を発し、その波長は結晶の化学組成および大きさによって決まる。ＣｄＳｅ、ＺｎＳｅ、ＩｎＰまたはＩｎＡｓのような量子ドットは固有の光学的特性を有し、これらのおよびそれと同様の量子ドットは多数の商業的供給源から入手可能である（例えば、ＮＮ－Ｌａｂｓ，Ｆａｙｅｔｔｅｖｉｌｌｅ，ＡＲ；Ｏｃｅａｎ　Ｎａｎｏｔｅｃｈ，Ｆａｙｅｔｔｅｖｉｌｌｅ，ＡＲ；Ｎａｎｏｃｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｍａｎｃｈｅｓｔｅｒ，ＵＫ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）。

【０２１９】

量子ドット結晶の大きさの種類の数に従って、数多くの種類の粒子を作出することができる。結晶の大きさの種類は、１）結晶形成パラメータを厳密に制御して、所望の各種類の大きさの粒子を作出する、または２）緩く制御された結晶形成パラメータの下で多数の結晶を作出した後、所望の大きさおよび／または放射波長に従って分別することにより作出される。半導体発光／光検出装置に本来備わっているシリコンエピタキシャル層内に量子ドットを埋め込む参考文献の２つの例は、Ｃｈａｐｐｌｅ　Ｓｏｋｏｌらに対する米国特許第５，２９３，０５０号および同第５，３５４，７０７号である。

【０２２０】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブを１つ以上の発光するまたはその他の検出可能な色素で標識し得る。色素が発する光は、紫外線または赤外光のような可視光または不可視光であり得る。例示的な実施形態では、色素は以下に挙げるものであり得る：蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）色素；フルオレセインおよびローダミンのようなキサンテン色素；アルファまたはベータの位置にアミノ基を有する色素（例えばナフチルアミン色素、１－ジメチルアミノナフチル－５－スルホナート色素、１－アニリノ－８－ナフタレンデ（ｎａｐｈｔｈａｌｅｎｄｅ）スルホナートおよび２－ｐ－トウイジニル（ｔｏｕｉｄｉｎｙｌ）－６－ナフタレンスルホナートなど；３－フェニル－７－イソシアナートクマリンを有する色素；９－イソチオシアナートクマリンおよび

アクリジンオレンジのようなアクリジン；ピレン、ベンゾオキサジアゾール（ｂｅｎｓｏｘａｄｉａｚｏｌｅ）およびスチルベン；３－（ε－カルボキシペンチル）－３’－エチル－５，５’－ジメチルオキサカルボシアニン（ＣＹＡ）を有する色素；６－カルボキシフルオレセイン（ＦＡＭ）；５＆６－カルボキシローダミン－１１０（Ｒ１１０）；６－カルボキシローダミン－６Ｇ（Ｒ６Ｇ）；Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－６－カルボキシローダミン（ＴＡＭＲＡ）；６－カルボキシ－Ｘ－ローダミン（ＲＯＸ）；６－カルボキシ－４’，５’－ジクロロ－２’，７’－ジメトキシフルオレセイン（ＪＯＥ）；ＡＬＥＸＡ　ＦＬＵＯＲ（商標）；Ｃｙ２；テキサスレッドおよびローダミンレッド；６－カルボキシ－２’，４，７，７’－テトラクロロフルオレセイン（ＴＥＴ）；６－カルボキシ－２’，４，４’，５’，７，７’－ヘキサクロロフルオレセイン（ヘキサ）；５－カルボキシ－２’，４’，５’，７’－テトラクロロフルオレセイン（ＺＯＥ）；ＮＡＮ；ＮＥＤ；Ｃｙ３；Ｃｙ３．５；Ｃｙ５；Ｃｙ５．５；Ｃｙ７；およびＣｙ７．５；ＩＲ８００ＣＷ，ＩＣＧ，Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ３５０；Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８；Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５３２；Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５４６；Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５６８；Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５９４；Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６４７；Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ６８０またはＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ７５０。

【０２２１】

本発明のＡＡＲＳポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを、本明細書に記載の治療、診断、研究または創薬のための組成物および方法のいずれにおいても使用することができる。

【０２２２】

Ｖ．抗体

別の態様では、本発明は、ＡＡＲＳポリペプチドまたはその天然の細胞結合パートナー（すなわち、細胞受容体、脂質、炭水化物、タンパク質または核酸結合パートナー）またはその複合体に対して結合特異性を示す抗体、およびその使用法をさらに提供する。抗体という用語は、抗体の様々な変化物、例えば、本明細書に記載されているおよび当該技術分野で公知のＦＡＢ、ヒト抗体、改変ヒト抗体、一本鎖、非ヒト抗体および抗原に対する免疫系リガンドの基礎となる免疫グロブリンフォールドの他の誘導体を包含する。抗体を、本明細書で提供される治療、診断、創薬またはタンパク質発現／精製のための方法および組成物のいずれにおいても使用することができる。

【０２２３】

本発明の特定の抗体は、通常、対応する完全長ＡＡＲＳよりも高い親和性でＡＡＲＳタンパク質フラグメントと結合することにより、表１～３（１つまたは複数）または表４～６（１つまたは複数）または表７～９（１つまたは複数）のＡＡＲＳタンパク質フラグメントとその対応する完全長ＡＡＲＳを識別することができるため、これまでに作製された特定の抗体とは異なる。一般に、このような抗体は、スプライス変異、タンパク質分解または本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメントを生じるその他の細胞過程（例えば、特に限定されないがタンパク質構造を変化させるリン酸化およびその他の修飾を含めた、翻訳後プロセシング）により生じるまたは現れる、固有の配列または構造と結合し得る。いくつかの態様では、抗体は、固有のスプライスジャンクション付近の配列（例えば、表２Ｂ、５Ｂまたは８Ｂに挙げられているスプライスジャンクション配列から選択される少なくとも５個の連続するアミノ酸の１つ以上の領域、または代わりに、例えば、表２Ｂ、５Ｂまたは８Ｂに挙げられている、このスプライス部位の任意のアミノ酸配列Ｃ末端）と結合し得る。例えば、このような抗体は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントでは露出しているが完全長ＡＡＲＳでは露出していない、１つ以上の非溶媒露出面、または完全長ＡＡＲＳにおいては見られないまたは接触できない配列に対する結合特異性を有し得る。また抗体は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと完全長ＡＡＲＳの間でのフォールディングに違いにより生じる固有の三次元構造とも結合し得る。このようなフォールディングの違いは、局所的に（例えば、特定のドメインまたは領域に）または広範囲に存在し得る。一例として、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントのフォールディングは、対応するＡＡＲＳすなわち

親ＡＡＲＳでは見られない固有の連続または不連続エピトープを生じ得る。また例として、スプライス変異、タンパク質分解またはその他の細胞過程により生じたＮ末端またはＣ末端と特異的に結合する抗体も挙げられ、このような末端は、完全長ＡＡＲＳに比べて固有のものである得るか、または完全長型では大きなＡＡＲＳ親分子の全体構造の中にその末端が完全にまたは部分的に埋もれているため、抗体結合に曝され得ない。

【０２２４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、凝集体を形成せず、所望の溶解度を有し、かつ／または本明細書に記載され当該技術分野で公知であるヒトでの使用に適した、免疫原性プロファイルを有する。また、本明細書に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメントの精製のような作製作業に適した抗体も含まれる。好ましくは、活性な抗体を少なくとも約１０ｍｇ／ｍｌに濃縮し、任意にバイオセラピューティックでの使用のために製剤化することができる。

【０２２５】

特定の実施形態では、抗体は、本発明のＡＡＲＳポリペプチドにより仲介される１つ以上の非カノニカルな活性を調節するのに有効である。特定の実施形態では、例えば、抗体は、ＡＡＲＳポリペプチドおよび／またはその結合パートナーと結合し、互いに相互作用するその能力を阻害し、かつ／またはＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性に拮抗する抗体である。特定の実施形態では、例えば、抗体はＡＡＲＳポリペプチドの細胞結合パートナーと結合し、ＡＡＲＳポリペプチドにより仲介される非カノニカルな活性を増加させるまたは刺激することなどによりＡＡＲＳポリペプチド活性を模倣する。したがって、抗体を用いて、部分的にまたは完全に本発明のＡＡＲＳポリペプチドの活性に拮抗するかまたはそれを刺激することにより、本発明のＡＡＲＳポリペプチドにより仲介される疾患、障害またはその他の状態を、診断、治療または予防し得る。

【０２２６】

抗体またはその抗原結合フラグメントは、それが検出可能なレベルで（例えば、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて）本発明のポリペプチドと反応し、かつ同様の条件下で、無関係のポリペプチドとの統計的に有意な検出可能な反応が見られない場合、本発明のポリペプチドに対して「特異的に結合する」、「免疫学的に結合する」および／または「免疫学的に反応性である」という。特定の場合には、結合物質は完全長型のＡＡＲＳポリペプチドと有意に相互作用しない。

【０２２７】

この文脈で使用される免疫学的結合は一般に、免疫グロブリン分子と、免疫グロブリンが特異性を有する抗原との間に生じるタイプの非共有相互作用を指す。免疫学的結合相互作用のような結合の強さ、すなわち親和性は、相互作用の解離定数（K_d）で表すことができ、この場合、小さなK_dほど大きな親和性を表す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性を、当該技術分野で公知の方法を用いて定量化することができる。例えば、Ｄａｖｉｅｓら（１９９０）Ａｎｎｕａｌ　Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５９：４３９－４７３を参照されたい。特定の例示的な実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントに対する抗体の親和性は、少なくとも約０．０１、０．０５、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、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、４０または５０ｎＭである。特定の実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントに対する抗体の親和性は、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドに対するその親和性よりも通常、約１．５倍、２倍、２．５倍、３倍、３．５倍、４倍、４．５倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、２００倍、３００倍、４００倍、５００倍、６００倍、７００倍、８００倍、９００倍、１０００倍以上（間にあるすべての整数を含む）強い。特定の実施形態では、対応する完全長ＡＡＲＳタンパク質に対する抗体の親和性は、少なくとも約０．０５、０．１、０．２５、０．５、０．７５、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３

、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０μＭである。特定の実施形態では、抗体と完全長ＡＡＲＳタンパク質との結合は、弱いかまたは実質的に検出不可能である。

【０２２８】

抗体の「抗原結合部位」または「結合部分」は、免疫グロブリン分子内の抗原結合に関与する部分を指す。抗原結合部位は、重（「Ｈ」）鎖および軽（「Ｌ」）鎖のＮ末端可変（「Ｖ」）領域のアミノ酸残基により形成される。重鎖および軽鎖のＶ領域内にある３つの非常に多岐にわたる区間は「超可変領域」と呼ばれ、「フレームワーク領域（ｆｒａｍｅｗｏｒｋ　ｒｅｇｉｏｎ）」すなわち「ＦＲ」として知られる、隣接する保存性の高い区間の間に挟まれている。したがって、「ＦＲ」という用語は、免疫グロブリンの超可変領域に本来挟まれているまたは隣接しているアミノ酸配列を指す。抗体分子中では、軽鎖の３つの超可変領域と重鎖の３つの超可変領域が、抗原結合表面を形成するように三次元空間内で互いに対して配置されている。抗原結合表面は、結合抗原の三次元表面に対して相補的であり、各重鎖および軽鎖の３つの超可変領域は、「相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ－ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ）」すなわち「ＣＤＲ」と呼ばれる。

【０２２９】

当業者に公知の任意の各種技術により抗体を調製し得る。例えば、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８８を参照されたい。目的とするポリペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体を、例えば、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５１１－５１９，１９７６の技術およびそれを改良したものを用いて調製し得る。また、トランスジェニックマウスのようなトランスジェニック動物を用いてヒト抗体を発現させる方法も挙げられる。例えば、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１４：８２６，１９９６；Ｌｏｎｂｅｒｇら，Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　１１３：４９－１０１，１９９４；およびＬｏｎｂｅｒｇら，Ｉｎｔｅｒｎａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１３：６５－９３，１９９５を参照されたい。具体例としては、ＲＥＧＥＲＮＥＲＥＸ（登録商標）によるＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（登録商標）プラットフォームが挙げられる（例えば、米国特許第６，５９６，５４１号を参照されたい）。また、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイライブラリーの使用により抗体を作製または同定することもできる（例えば、米国特許第７，２４４，５９２号；Ｃｈａｏら，Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．１：７５５－７６８，２００６を参照されたい）。利用可能なライブラリーの非限定的な例としては、ヒト抗体レパートリーの構造的多様性が７つの重鎖および７つの軽鎖可変領域遺伝子により表されるヒトコンビナトリアル抗体ライブラリー（ＨｕＣＡＬ）のような、クローンライブラリーまたは合成ライブラリーが挙げられる。これらの遺伝子の組合せにより、マスターライブラリー内に４９のフレームワークが生じる。これらのフレームワークに可変性の高い遺伝子カセット（ＣＤＲ＝相補性決定領域）を重ね合わせることにより、莫大なヒト抗体レパートリーを作製することができる。また、軽鎖可変領域、重鎖ＣＤＲ－３をコードするヒトドナー起源のフラグメントと、重鎖ＣＤＲ－１の多様性をコードする合成ＤＮＡと、重鎖ＣＤＲ－２の多様性をコードする合成ＤＮＡとを用いて設計されたヒトライブラリーも挙げられる。使用に適した他のライブラリーは、当業者に明らかであろう。本発明のポリペプチドを精製工程、例えばアフィニティークロマトグラフィー段階で使用し得る。

【０２３０】

「Ｆｖ」フラグメントは、選択的なタンパク質分解によるＩｇＭ免疫グロブリン分子、およびまれにＩｇＧまたはＩｇＡ免疫グロブリン分子の切断により作製され得る。しかし、当該技術分野で公知の組換え技術を用いてＦｖフラグメントを得る方が一般的である。Ｆｖフラグメントは、天然の抗体分子の抗原認識および抗原結合能の大部分を保持している抗原結合部位を含む、非共有結合$V_H::V_L$ヘテロ二量体を含む。例えば、Ｉｎｂａ

ｒら（１９７２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ６９：２６５９－２６６２；Ｈｏｃｈｍａｎら（１９７６）Ｂｉｏｃｈｅｍ １５：２７０６－２７１０；およびＥｈｒｌｉｃｈら（１９８０）Ｂｉｏｃｈｅｍ １９：４０９１－４０９６を参照されたい。

【０２３１】

一本鎖Ｆｖ（「ｓＦｖ」）ポリペプチドは、ペプチドコードリンカーにより連結されたV_HおよびV_Lをコードする遺伝子を含む遺伝子融合体から発現される、非共有結合V_H::V_Lヘテロ二量体である。Ｈｕｓｔｏｎら（１９８８）ＰＮＡＳ ＵＳＡ．８５（１６）：５８７９－５８８３。本来は凝集しているが化学的に分離された、抗体Ｖ領域由来の軽ポリペプチド鎖および重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造と実質的に同様の三次元構造にフォールディングするｓＦｖ分子に変換するための化学構造を識別する方法が多数記載されている。例えば、Ｈｕｓｔｏｎらに対する米国特許第５，０９１，５１３号および同第５，１３２，４０５号ならびにＬａｄｎｅｒらに対する米国特許第４，９４６，７７８号を参照されたい。

【０２３２】

上記各分子は重鎖ＣＤＲセットおよび軽鎖ＣＤＲセットを含み、ＣＤＲセットは、ＣＤＲを支えてＣＤＲの互いに対する空間的関係を定めている、それぞれ重鎖ＦＲセットおよび軽鎖ＦＲセットの間に挟まれている。本明細書で使用される「ＣＤＲセット」という用語は、重鎖または軽鎖Ｖ領域の３つの超可変領域を指す。この３つの領域は、重鎖または軽鎖のＮ末端から順にそれぞれ「ＣＤＲ１」、「ＣＤＲ２」および「ＣＤＲ３」と呼ばれる。したがって、抗原結合部位には、重鎖および軽鎖Ｖ領域由来のＣＤＲセットを含む６つのＣＤＲが含まれる。単一のＣＤＲ（例えば、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２またはＣＤＲ３）を含むポリペプチドは、本明細書では「分子認識単位」と呼ぶ。ＣＤＲのアミノ酸残基が結合抗原との広範囲にわたる接触を形成し、広範囲の抗原接触のほとんどが重鎖ＣＤＲ３によるものであることが、数多くの抗原－抗体複合体の結晶学的解析により示されている。したがって、分子認識単位は主に抗原結合部位の特異性に関与する。

【０２３３】

本明細書で使用される「ＦＲセット」という用語は、重鎖または軽鎖Ｖ領域のＣＤＲセットのＣＤＲを形作る、４つの隣接するアミノ酸配列を指す。一部のＦＲ残基は結合抗原と接触し得るが、ＦＲ、特にＣＤＲに直接隣接するＦＲ残基は、主にＶ領域を抗原結合部位にフォールディングすることに関与する。ＦＲ内では、特定のアミノ残基および特定の構造的特徴が極めて高度に保存されている。この点に関して、すべてのＶ領域配列は、約９０アミノ酸残基の内部ジスルフィドループを含んでいる。Ｖ領域が結合部位にフォールドすると、抗原結合表面を形成する突出したループモチーフとしてＣＤＲが提示される。特定の「カノニカルな」構造にフォールドされたＣＤＲの形状に影響を与える保存されたＦＲの構造領域が、正確なＣＤＲアミノ酸配列に関係なく存在するということが一般に認められている。さらに、特定のＦＲ残基が、抗体の重鎖と軽鎖の相互作用を安定させる非共有結合によるドメイン間の接触に関与することが知られている。

【０２３４】

特定の実施形態は、単一の単量体可変抗体ドメインからなる抗体フラグメントを指す単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂまたは「ナノボディ」）（例えば、米国特許第５，８４０，５２６号；同第５，８７４，５４１号；同第６，００５，０７９号；同第６，７６５，０８７号；同第５，８００，９８８号；同第５，８７４，５４１号；および同第６，０１５，６９５号を参照されたい）を含む。このようなｓｄＡＢは通常、分子量が約１２～１５ｋＤａである。特定の態様では、ｓｄＡＢおよびその他の抗体分子を、免疫化したラクダおよびラマ（ラクダ類と呼ぶことが多い）に固有の重鎖抗体から得るまたは単離することができる。例えば、Ｃｏｎｒａｔｈら，ＪＢＣ．２７６：７３４６－７３５０，２００１を参照されたい。

【０２３５】

非ヒト免疫グロブリン由来の抗原結合部位を含む「ヒト化」抗体分子が多数記載されて

おり、ヒト定常ドメインと融合したげっ歯類Ｖ領域およびそれに付随するＣＤＲ（Ｗｉｎｔｅｒら（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ　３４９：２９３－２９９；Ｌｏｂｕｇｌｉｏら（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：４２２０－４２２４；Ｓｈａｗら（１９８７）Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３８：４５３４－４５３８；およびＢｒｏｗｎら（１９８７）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４７：３５７７－３５８３）、適当なヒト抗体定常ドメインとの融合前にヒト支持ＦＲ内に移植されたげっ歯類ＣＤＲ（Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２７；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４－１５３６；およびＪｏｎｅｓら（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５２２－５２５）ならびに組換えにより化粧張りした（ｖｅｎｅｅｒｅｄ）げっ歯類ＦＲにより支持されたげっ歯類ＣＤＲ（１９９２年１２月２３日に公開された欧州特許公開第５１９，５９６号）を有するキメラ抗体がこれに含まれる。これらの「ヒト化」分子は、これらの部分のヒト被投与者における治療適用の持続時間および有効性を制限する、げっ歯類抗ヒト抗体分子に対する望ましくない免疫応答を最小化するように設計されている。例えば、米国特許第５，５３０，１０１号；同第５，５８５，０８９号；同第５，６９３，７６２号；同第６，１８０，３７０号；および同第７，０２２，５００号を参照されたい。

【０２３６】

本発明の抗体は、本明細書に記載の治療、診断、創薬、タンパク質精製および分析のための方法および組成物のいずれにおいても使用することができる。

【０２３７】

ＶＩ．抗体代替物およびその他の結合物質

別の態様では、本発明は、本明細書に開示されるＡＡＲＳポリペプチドもしくはその細胞結合パートナーまたはその一部分、バリアントもしくは誘導体に対して結合特異性を示す抗体代替物またはその他の結合物質、例えば可溶性受容体、アドネクチン、ペプチド、ペプチド模倣物、小分子、アプタマーなど、ならびにその組成物および使用法をさらに提供する。結合物質を、本明細書に記載の治療、診断、創薬またはタンパク質発現／精製および分析のための方法および組成物のいずれかで使用することができる。アドネクチン、可溶性受容体、アビマーおよびトリネクチンのような生物製剤ベースの結合物質が特に有用である。

【０２３８】

特定の実施形態では、このような結合物質は、本発明のＡＡＲＳポリペプチドにより仲介される１つ以上の非カノニカルな活性を調節するのに有効である。いくつかの実施形態では、例えば、結合物質は、ＡＡＲＳポリペプチドおよび／またはその結合パートナーと結合し、互いに相互作用するその能力を阻害し、かつ／またはＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性に拮抗するものである。特定の実施形態では、例えば、結合物質はＡＡＲＳポリペプチドの細胞結合パートナーと結合し、ＡＡＲＳポリペプチドにより仲介される非カノニカルな活性を増加させるまたは刺激することなどによりＡＡＲＳポリペプチド活性を模倣する。したがって、このような結合物質を用いて、部分的にまたは完全に本発明のＡＡＲＳポリペプチドの活性に拮抗するかまたはそれを刺激することにより、本発明のＡＡＲＳポリペプチドにより仲介される疾患、障害またはその他の状態を、診断、治療または予防し得る。

【０２３９】

結合物質は、それが検出可能なレベルで（例えば、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて）本発明のポリペプチドまたはその細胞結合パートナーと反応し、かつ同様の条件下で、無関係のポリペプチドとの統計的に有意な検出可能な反応が見られない場合、本発明のポリペプチドまたはその細胞結合パートナーと「特異的に結合する」という。特定の場合には、結合物質は完全長型のＡＡＲＳポリペプチドと有意に相互作用しない。特定の例示的な実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたはその細胞結合パートナーに対する結合物質の親和性は、少なくとも約０．０１、０．０５、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、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、４０または５０ｎＭである。特定の実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントに対する結合物質の親和性は、対応する完全長ＡＡＲＳポリペプチドに対するその親和性よりも通常、約１．５倍、２倍、２．５倍、３倍、３．５倍、４倍、４．５倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、２００倍、３００倍、４００倍、５００倍、６００倍、７００倍、８００倍、９００倍、１０００倍以上（間にあるすべての整数を含む）強い。特定の実施形態では、対応する完全長ＡＡＲＳタンパク質に対する結合物質の親和性は、少なくとも約０．５、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０μＭである。

【０２４０】

上述のように、結合物質として「ペプチド」が含まれる。ペプチドという用語は通常、アミノ酸残基のポリマーならびにそのバリアントおよび合成類似体を指す。特定の実施形態では、用語「ペプチド」は比較的短いポリペプチドを指し、間にあるすべての整数および範囲（例えば、５～１０、８～１２、１０～１５）を含めた約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５または５０個のアミノ酸からなり、かつＡＡＲＳポリペプチド、その細胞結合パートナーまたはその両方と相互作用するペプチドがこれに包含される。ペプチドは、本明細書に記載されているように、天然のアミノ酸および／または非天然のアミノ酸から構成され得る。

【０２４１】

天然のアミノ酸のみからなるペプチドに加え、ペプチド模倣物またはペプチド類似体も提供される。ペプチド類似体は、鋳型ペプチドと類似した特性を有する非ペプチド薬として、製薬業界では一般的に用いられている。このようなタイプの非ペプチド化合物は「ペプチド模倣物」と呼ばれる（Ｌｕｔｈｍａｎら，Ａ Ｔｅｘｔｂｏｏｋ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，１４：３８６－４０６，第２版，Ｈａｒｗｏｏｄ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ（１９９６）；Ｊｏａｃｈｉｍ Ｇｒａｎｔｅ，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．，３３：１６９９－１７２０（１９９４）；Ｆａｕｃｈｅｒｅ，Ｊ．，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｒｅｓ．，１５：２９（１９８６）；ＶｅｂｅｒおよびＦｒｅｉｄｉｎｇｅｒ ＴＩＮＳ，ｐ．３９２（１９８５）；ならびにＥｖａｎｓら，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３０：２２９（１９８７））。ペプチド模倣物は、ペプチドの生物活性を模倣するが、化学的性質においてはもうペプチドではない分子である。ペプチド模倣物の化合物は当該技術分野で公知であり、例えば米国特許第６，２４５，８８６号に記載されている。

【０２４２】

また本発明はペプトイドも含む。ペプチドのペプトイド誘導体は別の形態の改変ペプチドであり、生物活性に重要な構造決定因子を保持しているがペプチド結合は含まないため、タンパク質分解に対して耐性が付与されている（Ｓｉｍｏｎら，ＰＮＡＳ ＵＳＡ．８９：９３６７－９３７１，１９９２）。ペプトイドはＮ－置換グリシンのオリゴマーである。アルキル基が多数記載されており、それぞれが天然アミノ酸の側鎖に対応する。本発明のペプチド模倣物は、少なくとも１つのアミノ酸、数個のアミノ酸またはすべてのアミノ酸残基が、対応するＮ－置換グリシンに置き換わっている化合物を含む。例えば米国特許第５，８１１，３８７号には、ペプトイドライブラリーが記載されている。

【０２４３】

また結合物質は、１つ以上の小分子も包む。「小分子」は、合成または生物起源（生体分子）であるが、通常、ポリマーではない有機化合物を指す。有機化合物は、分子が炭素を含む化合物の大きなクラスを指し、通常、炭酸エステル、単純な炭素の酸化物またはシアン化物のみを含むものは除外される。「生体分子」は一般に、生物により産生される有機分子を指し、ペプチド、多糖および核酸のような大型のポリマー分子（生体高分子）、

ならびに小分子、例えば主要な二次代謝産物、脂質、リン脂質、糖脂質、ステロール、グリセロ脂質、ビタミンおよびホルモンなどがこれに包含される。「ポリマー」は一般に、反復構造単位からなる巨大分子または高分子を指し、反復構造単位は通常、共有化学結合に連結されている。

【０２４４】

特定の実施形態では、小分子の分子量は、約５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、５００、６５０、６００、７５０、７００、８５０、８００、９５０、１０００または２０００ダルトンを含めた、１０００～２０００ダルトン未満、通常約３００～７００ダルトンの間である。小分子ライブラリーを本明細書の他の箇所に記載する。

【０２４５】

また結合物質としてアプタマーも含まれる（例えば、Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎら，Ｎａｔｕｒｅ．３４６，８１８－２２，１９９０；およびＴｕｅｒｋら，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２４９，５０５－１０，１９９０を参照されたい）。アプタマーの例としては、核酸アプタマー（例えば、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー）およびペプチドアプタマーが挙げられる。核酸アプタマーは一般に、ＳＥＬＥＸ（ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ｌｉｇａｎｄｓ ｂｙ ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ）法のようなｉｎ ｖｉｔｒｏ選択法またはそれと同等の方法のラウンドを反復して、小分子、タンパク質、核酸のような様々な分子標的、さらには細胞、組織および生物体と結合するように操作された核酸種を指す。例えば、米国特許第６，３７６，１９０号；および同第６，３８７，６２０号を参照されたい。したがって、本明細書に記載のＡＡＲＳポリペプチドおよび／またはその細胞結合パートナーと結合する核酸アプタマーが含まれる。

【０２４６】

ペプチドアプタマーは通常、タンパク質足場の両側に結合した可変ペプチドループを含み、この二重の構造的制約が通常、ペプチドアプタマーの結合親和性を抗体に匹敵するレベルまで増大させる（例えば、ナノモル濃度範囲で）。特定の実施形態では、可変ループの長さは約１０～２０個（間にあるすべての整数を含む）のアミノ酸からなり、また足場は、優れた溶解性および緻密性を有する任意のタンパク質を含み得る。特定の実施形態の例では、足場タンパク質として細菌タンパク質チオレドキシンＡを使用し、可変ループを還元活性部位内（野生型タンパク質の－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｃｙｓ－ループ）に挿入してもよく、２つのシステイン側鎖はジスルフィド架橋を形成することができる。ペプチドアプタマーを同定する方法は、例えば米国特許出願第２００３／０１０８５３２号に記載されている。したがって、本明細書に記載のＡＡＲＳポリペプチドおよび／またはその細胞結合パートナーと結合するペプチドアプタマーが含まれる。ペプチドアプタマーの選択は、酵母ツーハイブリッド法を含めた当該技術分野で公知の様々な系を用いて行うことができる。

【０２４７】

また、本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメントと特異的に結合するＡＤＮＥＣＴＩＮＳ（商標）、ＡＶＩＭＥＲＳ（商標）、アナフォン（ａｎａｐｈｏｎｅｓ）およびアンチカリンも含まれる。ＡＤＮＥＣＴＩＮＳ（商標）は、生来的に他のタンパク質と結合する豊富な細胞外タンパク質であるヒトフィブロネクチン由来の標的化生物製剤の種類を指す。例えば、米国特許出願公開第２００７／００８２３６５号；同第２００８／０１３９７９１号；および同第２００８／０２２００４９号を参照されたい。ＡＤＮＥＣＴＩＮＳ（商標）は通常、天然のフィブロネクチン骨格と、ヒトフィブロネクチンの特定部分の複数の標的化ドメインとからなる。標的化ドメインを操作して、ＡＤＮＥＣＴＩＮ（商標）が本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメントのような目的とする治療標的を特異的に認識できるようにすることができる。

【０２４８】

ＡＶＩＭＥＲＳ（商標）は、ｉｎ ｖｉｔｒｏエクソンシャッフリングおよびファージディスプレイを用いて操作された多量体の結合タンパク質またはペプチドを指す。複数の

結合ドメインが結合しているため、単一エピトープ免疫グロブリンドメインに比べて親和性および特異性が高い。例えば、Ｓｉｌｖｅｒｍａｎら，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．２３：１５５６－１５６１，２００５；米国特許第７，１６６，６９７号；ならびに米国特許出願公開第２００４／０１７５７５６号、同第２００５／００４８５１２号、同第２００５／００５３９７３号、同第２００５／００８９９３２号および同第２００５／０２２１３８４号を参照されたい。

【０２４９】

また、設計されたアンキリン反復タンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）も含まれ、創薬および薬物開発での標的結合において抗体を上回る利点をもたらし得る非免疫グロブリンタンパク質のクラスがこれに含まれる。各種用途の中でも、ＤＡＲＰｉｎは小さなサイズおよび高い安定性を含めたその好ましい分子特性により、ｉｎ ｖｉｖｏイメージングまたは毒素もしくはその他の治療ペイロード送達に理想的に適している。細菌での低コスト生産および多数の標的特異的ＤＡＲＰｉｎの迅速な生成により、ＤＡＲＰｉｎは創薬に有用なアプローチとなっている。さらに、ＤＡＲＰｉｎを多重特異性の形態で容易に作製することができるため、エフェクターＤＡＲＰｉｎを特定の器官に対して標的化する、または複数のＤＡＲＰｉｎからなる１つの分子で複数の受容体を標的とする可能性がもたらされる。例えば、Ｓｔｕｍｐｐら，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｄｅｖｅｌ．１０：１５３－１５９，２００７；米国特許出願第２００９／００８２２７４号；および国際出願ＰＣＴ／ＥＰ２００１／１０４５４号を参照されたい。

【０２５０】

特定の実施形態は「モノボディ」を含み、モノボディは通常、足場としてヒトフィブロネクチン（ＦＮｆｎ１０）の第１０フィブロネクチンＩＩＩ型ドメインが用いられ、標的結合のための複数の表面ループを提示する。ＦＮｆｎ１０は、免疫グロブリンフォールドと同様のβサンドイッチ構造を有する小型の（９４残基）タンパク質である。ＦＮｆｎ１０はジスルフィド結合または金属イオンがなくても非常に安定であり、細菌内で正確にフォールドされた形態で、高レベルで発現させることができる。ＦＮｆｎ１０足場は実質的にあらゆるディスプレイ技術に適合する。例えば、Ｂａｔｏｒｉら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．１５：１０１５－２０，２００２；およびＷｏｊｃｉｋら，Ｎａｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．，２０１０；および米国特許第６，６７３，９０１号を参照されたい。

【０２５１】

アンチカリンは抗体模倣物の１クラスを指し、通常、強固な構造のフレームワークに支持された超可変ループ領域を有する結合タンパク質のファミリーであるヒトリポカリンから合成される。例えば、米国特許出願第２００６／００５８５１０号を参照されたい。アンチカリンの大きさは通常、約２０ｋＤａである。アンチカリンは、４つのペプチドループおよび結合したαヘリックスにより対で連結された８つの逆平行β鎖により形成されるバレル構造（安定なβバレル足場）により特徴付けることができる。特定の態様では、特異的結合を得るために超可変ループ領域（１つまたは複数）に構造上の偏りを生じさせる。例えば、参照により本明細書に組み込まれるＳｋｅｒｒａ，ＦＥＢＳ Ｊ．２７５：２６７７－８３，２００８を参照されたい。

【０２５２】

ＶＩＩ．薬物放出試験および製品規格、診断法ならびに試薬に関するバイオアッセイならびに解析アッセイ

また、治療および診断試薬としてのＡＡＲＳタンパク質フラグメントおよび関連薬剤に関連したバイオアッセイも含まれる。例としては、特に純度、生物活性、親和性、溶解度、ｐＨ、エンドトキシンレベルを測定するバイオアッセイおよび解析アッセイが挙げられ、これらは本明細書に多数記載されている。また、用量反応曲線を確立し、かつ／または様々なバッチの薬剤を比較するための１つ以上の基礎を提供するアッセイも含まれる。バッチ比較は、化学的特徴付け、生物学的特徴付けおよび臨床的特徴付けのいずれか１つ以上に基づくものであり得る。タンパク質剤に関しては、選択された薬剤の効力、安定性、

薬物動態および免疫原性を評価する方法も含まれる。各種用途の中でも特に、これらおよびその他の方法を、本明細書に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメント、抗体、結合物質、ポリヌクレオチド（アンチセンス剤およびベクターなど）およびその他のものを含めた、生物学的または化学的薬剤のロット放出試験のために使用することができる。

【０２５３】

特定の実施形態は、バイオアフィニティーアッセイの使用を含む。このようなアッセイを用いて、例えば、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと細胞結合パートナーとの間、またはＡＡＲＳタンパク質フラグメントと抗体との間の結合親和性を評価することができる。また、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと候補試験化合物またはリード試験化合物のような別の結合物質（例えば、ＡＡＲＳの小分子調節物質）との間、またはＡＡＲＳ細胞結合パートナーと候補試験化合物またはリード試験化合物との間の結合親和性を測定することもできる。特定の結合親和性アッセイの例では、本明細書に記載され当該技術分野で公知であるＥＬＩＳＡアッセイを使用し得る。特定のアッセイでは、高速受容体結合クロマトグラフィーを用いる（例えば、Ｒｏｓｗａｌｌら，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ．２４：２５－３９，１９９６を参照されたい）。その他の結合親和性アッセイの例では、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）に基づく技術を使用し得る。例としてはＢＩＡＣｏｒｅ技術が挙げられ、このうちのあるものでは、ＳＰＲ技術とマイクロ流体系を合体させて、ｐＭ～ｍＭの範囲の濃度での分子相互作用をリアルタイムでモニターする。また、結合特異性、結合親和性および結合キネティクス／速度定数を正確に測定できるＫＩＮＥＸＡ（商標）アッセイも含まれる。

【０２５４】

特定の実施形態は、タンパク質剤の免疫原性を評価または最適化するイムノアッセイに関する。例としては、治療用タンパク質の潜在的な免疫原性に関する有用な情報が得られるｅｘ　ｖｉｖｏヒト細胞アッセイおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫酵素アッセイが挙げられる　。ｅｘ　ｖｉｖｏ細胞応答アッセイを用いて、例えば、抗原提示細胞（ＡＰＣ）とＴ細胞の間での細胞間共同作用を再現することにより、目的タンパク質との接触後のＴ細胞活性化を測定することができる。特定のｉｎ　ｖｉｔｒｏ酵素アッセイでは、関連するヒト集団の大部分をカバーする組換えＨＬＡ－ＤＲ分子の収集物を使用し、またペプチド（治療用タンパク質の断片化により生じたもの）とＨＬＡ－ＤＲ分子との結合を試験するための自動化された免疫酵素アッセイを含み得る。また、これらのおよび関連する方法を用いて、タンパク質剤由来の１つ以上のＴ細胞エピトープを同定しこれを除去または改変するなどして、選択されたタンパク質の免疫原性を低下させる方法も含まれる。

【０２５５】

また、非カノニカルな生物活性および細胞毒性を含めた特定の生物活性のようなパラメータを測定する生物学的放出アッセイ（例えば、細胞ベースのアッセイ）も含まれる。特定の具体的な生物学的アッセイとしては、例えば、本明細書に記載されているような、非カノニカルな生物活性の蛍光または発光指標のような読取り物質と機能的に結合した、選択されたＡＡＲＳタンパク質フラグメントの細胞結合パートナー（例えば、細胞表面受容体）を用いる細胞ベースのアッセイが挙げられる。例えば、特定の実施形態は、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと結合する細胞表面受容体またはその細胞外部分を含む細胞を含み、ここでは細胞は、検出物質または読取り物質を含む。また、ＡＡＲＳポリペプチドまたは抗体のような薬剤の薬物動態を特徴付けるための、操作されたマウスまたはその他の哺乳動物を通常用いたｉｎ　ｖｉｖｏ生物学的アッセイも挙げられる（例えば、Ｌｅｅら，Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ．２８１：１４３１－１４３９，１９９７を参照されたい）。細胞毒性ベースの生物学的アッセイの例としては、特に用量反応曲線、バッチ試験、または米国食品医薬品局（ＦＤＡ）のような様々な規制当局による認可に関連したその他の特性を確立するためにＡＡＲＳタンパク質フラグメントの細胞毒性を評価することができる、放出アッセイ（例えば、アポトーシスを測定するクロムまたはユウロピウム放出アッセイ；例えば、ｖｏｎ　Ｚｏｎｓら，Ｃｌｉｎ　Ｄｉａｇｎ　Ｌａｂ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：２０２～２０７，１９９７を参照されたい）が挙げ

られる。

【０２５６】

このようなアッセイを用いて、例えば、選択されたＡＡＲＳタンパク質フラグメントもしくはその他の薬剤の用量反応曲線を作成し、かつ／または異なるバッチのタンパク質もしくはその他の薬剤の用量反応曲線を比較することができる。用量反応曲線は、ストレッサーの程度と受容体の反応との関係を表すＸ－Ｙ軸グラフであり、反応は生理的また生化学的反応、例えばｉｎ　ｖｉｔｒｏの細胞またはｉｎ　ｖｉｖｏの細胞もしくは組織における非カノニカルな生物活性、ｉｎ　ｖｉｖｏで測定される治療有効量（例えば、EC_{50}により測定される）、あるいはｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで測定される死（例えば、細胞死、生物死）などであり得る。死は通常、統計的に導かれたモデル化母集団の５０％致死量であるLD_{50}で表されるが、LC_{01}（試験動物母集団の１％致死量）、LC_{100}（試験動物母集団の１００％致死量）またはLC_{LO}（致死性となる最小量）で表されることもある。ほぼあらゆる所望の効果またはエンドポイントをこのようにして特徴付けることができる。

【０２５７】

通常、反応曲線では測定された用量がＸ軸上にされ、反応がＹ軸上にプロットされる。より一般的には用量の対数がＸ軸上にプロットされ、急勾配の部分が中央にくるＳ字状曲線となる場合が最も多い。無影響量（ＮＯＥＬ）は測定可能な作用が見られない実験上の最小量を指し、閾値量は反応がゼロを超えたことを示す、グラフ上の最初の点を指す。一般的な法則として、強い薬物ほど急勾配の用量反応曲線が得られる。多くの薬物では、閾値量よりもわずかに多い量で所望の効果が見られるが、これは多くの場合、これより低い用量では比較的効果が少なく、また高い用量では望ましくない副作用を生じるからである。ｉｎ　ｖｉｖｏで作成した用量反応曲線では、必要に応じて、体重当たりのμｇ／ｋｇ、ｍｇ／ｋｇまたはｇ／ｋｇのような値により曲線を特徴付けることができる。

【０２５８】

バッチ比較では、異なるバッチの異なる用量反応曲線の間（例えば、異なるバッチのＡＡＲＳタンパク質フラグメント、抗体、またはその他の薬剤の間）の変動係数（ＣＶ）を算出することが有用であり得るが、これは一部、異なる単位または異なる平均値のデータのセットの比較がＣＶにより可能になるという理由による。例えば、特定の実施形態の例では、２つまたは３つ以上の異なるバッチのＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたはその他の薬剤の間のＣＶは、４、５、６、７または８ポイントの用量曲線で約１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％または１％未満である。特定の実施形態では、用量反応曲線を細胞ベースのアッセイで測定し、その読取りは、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの選択された非カノニカルな活性の増加または減少に関するものである。特定の実施形態では、用量反応曲線を細胞放出アッセイまたは動物モデル（例えば、マウスモデル）で測定し、その読取りは細胞死または動物死に関するものである。その他のバリエーションは当業者に明らかであろう。

【０２５９】

ＶＩＩＩ．発現系および精製系

本発明の実施形態は、本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたはその他のポリペプチド系薬剤の発現および精製のための方法および関連組成物を含む。このような組換えＡＡＲＳポリペプチドは、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９，上記）、特に第１６節および１７節；Ａｕｓｕｂｅｌら（１９９４，上記）、特に第１０章および１６章；ならびにＣｏｌｉｇａｎら，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．１９９５－１９９７）、特に第１章、５章および６章に記載されているような標準的なプロトコルを用いて調製することが好都合であろう。１つの一般的な例として、ＡＡＲＳポリペプチドを次に挙げる段階の１つ以上を含む手順で調製し得る：（ａ）ＡＡＲＳポリペプチドをコードし調節エレメントと作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列を含む構築物を調製する段階；（ｂ）構築物を宿主細胞に導入する段階；（ｃ）宿主細胞にＡＡＲＳポリペプチドを発

現させる段階；および（ｄ）宿主細胞からＡＡＲＳポリペプチドを単離する段階。
【０２６０】
ＡＡＲＳポリヌクレオチドは本明細書の他の箇所に記載されている。所望のポリペプチドを発現させるために、そのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはその機能的同等物を適当な発現ベクター、すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクター内に挿入する。当業者に公知の方法を用いて、目的ポリペプチドをコードする配列と、適当な転写および翻訳制御エレメントとを含む発現ベクターを構築し得る。そのような方法としては、ｉｎ ｖｉｔｒｏ組換えＤＮＡ技術、合成技術およびｉｎ ｖｉｖｏ遺伝子組換えが挙げられる。このような技術は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８９）およびＡｕｓｕｂｅｌら，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９８９）に記載されている。
【０２６１】
各種発現ベクター／宿主系が知られており、これらを用いてポリヌクレオチド配列を含ませ発現させ得る。このような系としては、組換えバクテリオファージＤＮＡ発現ベクター、プラスミＤＮＡ発現ベクタードまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換された細菌のような微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）または細菌発現ベクター（例えば、ＴｉまたはｐＢＲ３２２プラスミド）で形質転換させた植物細胞系；あるいは哺乳動物細胞系、より具体的にはヒト細胞系を含めた動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。
【０２６２】
発現ベクター中に存在する「制御エレメント」または「制御配列」とは、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写および翻訳を行うベクターの非翻訳領域、すなわちエンハンサー、プロモーター、５’および３’非翻訳領域のことである。このようなエレメントはその強さおよび特異性が異なり得る。使用するベクター系および宿主に応じて、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターを含めた任意の数の適当な転写エレメントおよび翻訳エレメントを使用し得る。例えば、細菌系でクローニングを行う場合、ＰＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴファージミド（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆ．）またはＰＳＰＯＲＴ１プラスミド（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、Ｍｄ．）のハイブリッドｌａｃＺプロモーターなどのような誘導性プロモーターを使用し得る。哺乳動物細胞系では、一般に哺乳動物遺伝子由来または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。ポリペプチドをコードする配列の複数のコピーを含む細胞系を作製する必要がある場合は、ＳＶ４０またはＥＢＶベースのベクターを適当な選択マーカーとともに使用するのが有利であろう。
【０２６３】
細菌系では、発現させるポリペプチドに対して意図する使用に応じて、数多くの発現ベクターを選択し得る。例えば、大量に必要とする場合、精製が容易な融合タンパク質の高レベルの発現を指令するベクターを使用し得る。このようはベクターとしては、ハイブリッドタンパク質が産生されるように、目的ポリペプチドをコードする配列をβ－ガラクトシダーゼのアミノ末端Ｍｅｔとそれに続く７残基の配列とインフレームでベクター内に連結し得る、ＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のような多機能性大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）クローニングベクターおよび発現ベクター；ｐＩＮベクター（Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ ＆ Ｓｃｈｕｓｔｅｒ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：５５０３－５５０９（１９８９））などが挙げられるが、これらに限定されない。またｐＧＥＸベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．）を用いて、外来ポリペプチドをグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質として発現させてもよい。一般にこのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン－アガロースビーズへの吸着、次いで、遊離グルタチオン存在下での溶離により溶解細胞から容易に精製することができ

る。このような系で作製されたタンパク質をヘパリン、トロンビンまたは因子ＸＡプロテアーゼ切断部位を含むように設計して、クローニングされた目的ポリペプチドをＧＳＴ部分から随意に遊離できるようにしてもよい。

【０２６４】

特定の実施形態では、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ベースの発現系を使用し得る（例えば、Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍら，Ｎａｔｕｒｅ Ｎａｔｕｒｅ．５：１３５－１４６，２００８を参照されたい）。これらのおよび関連する実施形態は、適当な発現ベクターを作製するのに一部または全部をライゲーションによるクローニング（ＬＩＣ）に依存し得る。特定の実施形態では、タンパク質発現をＴ７ ＲＮＡポリメラーゼにより制御し得る（例えば、ｐＥＴベクターシリーズ）。これらのおよび関連する実施形態では、Ｔ７仲介性の発現を支持し、かつ標的タンパク質の安定性の向上のためにｌｏｎプロテアーゼおよびｏｍｐＴプロテアーゼを欠くＢＬ２１のλＤＥ３溶原菌である、発現宿主株ＢＬ２１（ＤＥ３）を使用し得る。また、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ではほとんど使用されないｔＲＮＡをコードするプラスミドを保有する発現宿主株、例えばＲＯＳＥＴＴＡ（商標）（ＤＥ３）およびＲｏｓｅｔｔａ２（ＤＥ３）株も含まれる。また、ＢＥＮＺＯＮＡＳＥ（登録商標）ヌクレアーゼおよびＢＵＧＢＵＳＴＥＲ（登録商標）タンパク質抽出試薬の商標で販売されている試薬を用いて、細胞溶解および試料処理も向上させ得る。細胞培養では、自動誘導培地によりハイスループットな発現系を含めた多くの発現系の効率を上げることができる。このタイプの培地（例えば、ＯＶＥＲＮＩＧＨＴ ＥＸＰＲＥＳＳ（商標）Ａｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ）は、代謝変化により、ＩＰＴＧのような人工の誘導剤の添加なしでタンパク質発現を徐々に誘導する。特定の実施形態では、ヘキサヒスチジンタグ（ＨＩＳ・ＴＡＧ（登録商標）融合物の商標で販売されているものなど）、次いで固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）精製または関連する技術を用いる。しかし、特定の態様では、アフィニティータグを使用してまたは使用せずに臨床グレードのタンパク質を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）封入体から単離することができる（例えば、Ｓｈｉｍｐら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ Ｐｕｒｉｆ．５０：５８－６７，２００６を参照されたい）。さらなる例として、特定の実施形態では、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）における低温でのタンパク質の過剰発現がタンパク質の溶解度および安定性を向上させることから、低温ショック誘導性の大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）高収率産生系を使用し得る（例えば、Ｑｉｎｇら，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．２２：８７７－８８２，２００４）を参照されたい。

【０２６５】

また高密度細菌発酵系も含まれる。例えば、ラルストニア・ユートロファ（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｅｕｔｒｏｐｈａ）の高細胞密度培養により、１５０ｇ／Ｌを上回る細胞密度でのタンパク質産生および１０ｇ／Ｌを上回る力価での組換えタンパク質発現が可能である。

【０２６６】

酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）では、アルファ因子のような構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、アルコールオキシダーゼおよびＰＧＨを含む数多くのベクターを使用し得る。総説として、Ａｕｓｕｂｅｌら（上記ｓｕｐｒａ）およびＧｒａｎｔら，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６－５４４（１９８７）を参照されたい。またピキア・パンドリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｎｄｏｒｉｓ）発現系も含まれる（例えば、Ｌｉら，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．２４，２１０－２１５，２００６；およびＨａｍｉｌｔｏｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，３０１：１２４４，２００３を参照されたい）。特定の実施形態は、特にヒト化Ｎ－グリコシル化経路を有する酵母を含めた、選択的にタンパク質をグリコシル化するように操作された酵母系を含む（例えば、Ｈａｍｉｌｔｏｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ．３１３：１４４１－１４４３，２００６；Ｗｉｌｄｔら，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３：１１９－２８，２００５；およびＧｅｒｎｇｒｏｓｓら，Ｎａｔｕｒｅ－Ｂｉｏｔｅｃ

ｈｎｏｌｏｇｙ．２２：１４０９－１４１４，２００４；米国特許第７，６２９，１６３号；同第７，３２６，６８１号；および同第７，０２９，８７２号を参照されたい）。単なる例に過ぎないが、特にＦｅｒｎｂａｃｈフラスコまたは１５Ｌ、５０Ｌ、１００Ｌおよび２００Ｌの発酵槽内で、組換え酵母培養物を増殖させることができる。

【０２６７】

植物発現ベクターを使用する場合、多数あるプロモーターのいずれかによりポリペプチドをコードする配列の発現を駆動させ得る。例えば、ＣａＭＶの３５Ｓおよび１９Ｓプロモーターのようなウイルスプロモーターを単独で、またはＴＭＶ由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用し得る（Ｔａｋａｍａｔｓｕ，ＥＭＢＯ Ｊ．６：３０７－３１１（１９８７））。あるいは、ＲＵＢＩＳＣＯの小サブユニットのような植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを使用し得る（Ｃｏｒｕｚｚｉら，ＥＭＢＯ Ｊ．３：１６７１－１６８０（１９８４）；Ｂｒｏｇｌｉｅら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２４：８３８－８４３（１９８４）；およびＷｉｎｔｅｒら，Ｒｅｓｕｌｔｓ Ｐｒｏｂｌ．Ｃｅｌｌ Ｄｉｆｆｅｒ．１７：８５－１０５（１９９１））。これらの構築物を、直接ＤＮＡ形質転換または病原体を仲介によるトランスフェクションにより植物細胞内に導入することができる。このような技術は一般的に入手可能な数多くの総説に記載されている（例えば、Ｈｏｂｂｓ ｉｎ ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ，Ｙｅａｒｂｏｏｋ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ｐｐ．１９１－１９６（１９９２）を参照されたい）。

【０２６８】

また、昆虫系を用いて目的ポリペプチドを発現させることもできる。例えば、１つのこのような系では、オートグラファ・カリフォルニカ（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）核多角体病ウイルス（ＡｃＮＰＶ）をベクターとして使用し、ヨウトガ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞またはトリコプラシア（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ）幼生内で外来遺伝子を発現させる。ポリペプチドをコードする配列をウイルスのポリヘドリン遺伝子のような非必須領域内にクローニングして、ポリヘドリンプロモーターの制御下に配置し得る。ポリペプチドコード配列の挿入が成功すれば、ポリヘドリン遺伝子が不活性化されて、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが産生される。次いで、この組換えウイルスを用いて、例えばヨウトガ（Ｓ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞またはトリコプラシア（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ）幼生に感染させ、細胞内で目的ポリペプチドを発現させ得る（Ｅｎｇｅｌｈａｒｄら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９１：３２２４－３２２７（１９９４））。また、ＳＦ９、ＳＦ２１およびＴｎｉ細胞を用いるものを含めたバキュロウイルス発現系も含まれる（例えば、ＭｕｒｐｈｙおよびＰｉｗｎｉｃａ‐Ｗｏｒｍｓ，Ｃｕｒｒ Ｐｒｏｔｏｃ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．Ｃｈａｐｔｅｒ ５：Ｕｎｉｔ５．４，２００１を参照されたい）。昆虫系では、哺乳動物系と同様の翻訳後修飾が得られる。

【０２６９】

哺乳動物宿主細胞では、数多くのウイルスベースの発現系が一般に利用可能である。例えば、発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、目的ポリペプチドをコードする配列を、後期プロモーターと三部のリーダー配列とからなるアデノウイルス転写／翻訳複合体内に連結し得る。ウイルスゲノムの非必須であるＥ１またはＥ３領域への挿入を用いて、感染宿主細胞内でポリペプチドの発現が可能な生存ウイルスを入手し得る（ＬｏｇａｎおよびＳｈｅｎｋ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８１：３６５５－３６５９（１９８４））。さらに、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）エンハンサーのような転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞内での発現を増加させ得る。

【０２７０】

有用な哺乳動物宿主細胞系の例としては、以下のものが挙げられる：ＳＶ４０により形質転換されたサル腎臓ＣＶ１系（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）；懸濁培養での増殖用にサブクローニングしたヒト胎児腎臓系（２９３または２９３細胞、Ｇｒａｈａｍら，Ｊ．Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．３６：５９（１９７７））；ベビーハムスター腎細胞

（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１０）；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１（１９８０））；サル腎細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）；アフリカミドリザル腎細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）；イヌ腎細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　３４）；バッファローラット肝細胞（ＢＲＬ　３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨＢ８０６５）；マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）；ＴＲ１細胞（Ｍａｔｈｅｒら，Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４－６８（１９８２））；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；およびヒト肝細胞癌系（Ｈｅｐ　Ｇ２）。その他の有用な哺乳動物宿主細胞系としては、ＤＨＦＲ－ＣＨＯ細胞を含めたチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（Ｕｒｌａｕｂら，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　７７：４２１６（１９８０））；ならびにＮＳＯおよびＳｐ２／０のような骨髄腫細胞系が挙げられる。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞系の総説としては、例えば、ＹａｚａｋｉおよびＷｕ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４８（Ｂ．Ｋ．Ｃ　Ｌｏ編，Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，Ｎ．Ｊ．，２００３），ｐｐ．２５５－２６８を参照されたい。特定の好ましい哺乳動物細胞発現系としては、ＣＨＯ細胞およびＨＥＫ２９３細胞ベースの発現系が挙げられる。哺乳動物発現系では、当該技術分野で公知のものの中でも特に、例えばＴ－フラスコ、ローラーボトルまたはセルファクトリー中での付着細胞系、あるいは例えば１Ｌおよび５Ｌのスピナー、５Ｌ、１４Ｌ、４０Ｌ、１００Ｌおよび２００Ｌの攪拌タンクバイオリアクターまたは２０／５０Ｌおよび１００／２００ＬのＷＡＶＥバイオリアクター中での懸濁培養を用いることができる。

【０２７１】

またタンパク質の無細胞発現も含まれる。これらのおよび関連する実施形態では通常、精製されたＲＮＡポリメラーゼ、リボソーム、ｔＲＮＡおよびリボヌクレオチドを用いるが、これらの試薬は、細胞または細胞ベースの発現系からの抽出により作製し得る。

【０２７２】

また特定の開始シグナルを用いて、目的ポリペプチドをコードする配列のより効率的な翻訳を達成し得る。このようなシグナルとしては、ＡＴＧ開始コドンおよび隣接する配列が挙げられる。ポリペプチドをコード配列、その開始コドンおよび上流配列を適当な発現ベクターに挿入する場合、追加の転写または翻訳制御シグナルは必要ないであろう。しかし、コード配列またはその一部分のみを挿入する場合、ＡＴＧ開始コドンを含めた外来性の翻訳制御シグナルを加えるべきである。さらに開始コドンは、挿入物全体が確実に翻訳されるように正確なリーディングフレーム内にあるべきである。外来性の翻訳エレメントおよび開始コドンは、天然および合成の両方の様々な起源であり得る。文献に記載されているような、使用する特定の細胞系に適したエンハンサーを含ませることにより、発現効率を増強させ得る（Ｓｃｈａｒｆら，Ｒｅｓｕｌｔｓ　Ｐｒｏｂｌ．Ｃｅｌｌ　Ｄｉｆｆｅｒ．２０：１２５－１６２（１９９４））．

【０２７３】

さらに、挿入配列の発現の調節または発現タンパク質のプロセシングを所望の方式で行うその能力によって、宿主細胞株を選択し得る。このようなポリペプチドの修飾としては、翻訳後修飾、例えばアセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化などが挙げられるが、これらに限定されない。また、「プレプロ」形態のタンパク質を切断する翻訳後プロセシングを用いて、正確な挿入、フォールディングおよび／または機能を促進し得る。細菌細胞に加えて、このような翻訳後活性のための特定の細胞機構および特有の機序を有するまたは欠く様々な宿主細胞、例えば酵母、ＣＨＯ、ＨｅＬａ、ＭＤＣＫ、ＨＥＫ２９３およびＷ１３８などを選択して、外来タンパク質の正確な修飾およびプロセシングを確実に行わせ得る。

【０２７４】

長期間にわたる高収率での組換えタンパク質産生のためには、安定な発現が一般的に好

ましい。例えば、ウイルスの複製起点および／または外来性の発現エレメントおよび選択マーカー遺伝子を同じまたは別のベクター上に含み得る発現ベクターを用いて、目的ポリヌクレオチドを安定に発現する細胞系を形質転換させ得る。ベクターの導入後、細胞を強化培地で約１～２日間増殖させてから選択培地に切り替え得る。選択マーカーの目的は選択に対する耐性を付与することであり、それが存在することにより、導入配列を良好に発現する細胞の増殖および回収が可能となる。細胞型に適した組織培養技術を用いて、安定に形質転換された細胞の耐性クローンを増殖させ得る。また、トランスフェクションまたは感染などによる一過性の産生を用いることもできる。一過性の産生に適した哺乳動物発現系の例としては、ＨＥＫ２９３およびＣＨＯベースの系が挙げられる。

【０２７５】

形質転換または形質導入された細胞系を回収するために、任意の数の選択系を使用し得る。このような系としては、それぞれｔｋ細胞およびａｐｒｔ細胞で使用することができる、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒら，Ｃｅｌｌ　１１：２２３－２３２（１９７７））およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙら，Ｃｅｌｌ　２２：８１７－８２３（１９９０））遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。また代謝拮抗剤、抗生物質または除草剤に対する耐性を選択基準として使用することも可能であり、このようなものして、例えば、メトトレキサートに対する耐性を付与するｄｈｆｒ（Ｗｉｇｌｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７７：３５６７－７０（１９８０））；アミノグリコシド、ネオマイシンおよびＧ－４１８に対する耐性を付与するｎｐｔ（Ｃｏｌｂｅｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１－１４（１９８１））；ならびにクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性をそれぞれ付与するａｌｓまたはｐａｔ（Ｍｕｒｒｙ，上記）がある。さらなる選択遺伝子、例えば、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用できるようにするｔｒｐＢ、または細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノール（ｈｉｓｔｉｎｏｌ）を利用できるようにするｈｉｓＤが記載されている（ＨａｒｔｍａｎおよびＭｕｌｌｉｇａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８５：８０４７－５１（１９８８））。緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）およびその他の蛍光タンパク質（例えば、ＲＦＰ、ＹＦＰ）、アントシアニン、β－グルクロニダーゼとその基質ＧＵＳ、ならびにルシフェラーゼとその基質ルシフェリンのような可視マーカーの使用が普及してきており、これらは形質転換細胞の同定だけでなく、特定のベクター系による一過性のまたは安定なタンパク質発現量の定量化にも広く用いられている（例えば、Ｒｈｏｄｅｓら，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５５：１２１－１３１（１９９５）を参照されたい）。

【０２７６】

また本発明の実施形態は、ハイスループットなタンパク質産生系または微小産生系も含む。特定の態様では、例えば、金属キレートで修飾したスライド表面またはＭａｇｎｅＨｉｓ　Ｎｉ－Ｐａｒｔｉｃｌｅ上でのタンパク質発現および精製のためのヘキサ－ヒスチジン融合タグを使用し得る（例えば、Ｋｗｏｎら，ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９：７２，２００９；およびＬｉｎら，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．４９８：１２９－４１，２００９を参照されたい）。またハイスループットな無細胞タンパク質発現系も含まれる（例えば、Ｓｉｔａｒａｍａｎら，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．４９８：２２９－４４，２００９を参照されたい）。これらのおよび関連する実施形態を用いて、例えば、ＡＡＲＳタンパク質フラグメント（１つまたは複数）のマイクロアレイを作製することができ、次いでこれをスクリーニングライブラリーに使用して、ＡＡＲＳタンパク質フラグメント（１つまたは複数）と相互作用する薬剤を同定することができる。

【０２７７】

ポリヌクレオチドコード産物の発現を、その産物に特異的な結合物質またはポリクローナルもしくはモノクローナル抗体のような抗体を用いて検出および測定するための各種プロトコルが、当該技術分野で公知である。例としては、酵素結合免疫吸着測定（ＥＬＩＳＡ）、ウエスタン免疫ブロット、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）および蛍光標示式細胞

分取（ＦＡＣＳ）が挙げられる。これらおよびその他のアッセイは、特にＨａｍｐｔｏｎら，Ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９９０）およびＭａｄｄｏｘら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１５８：１２１１－１２１６（１９８３）に記載されている。

【０２７８】

多種多様な標識およびコンジュゲーション技術が当業者に公知であり、これらを様々な核酸およびアミノ酸のアッセイに使用し得る。ポリヌクレオチドに関連した配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションプローブまたはＰＣＲプローブを作製する手段としては、標識ヌクレオチドを使用したオリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識またはＰＣＲ増幅が挙げられる。あるいは、配列またはその任意の一部分をｍＲＮＡプローブ産生用のベクター中にクローニングし得る。このようなベクターは当該技術分野において公知で、市販されており、Ｔ７、Ｔ３またはＳＰ６のような適当なＲＮＡポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドを加えてｉｎ ｖｉｔｒｏでＲＮＡプローブを合成するために使用し得る。市販の各種キットを用いてこれらの方法を実施してもよい。使用し得る適当なレポーター分子または標識としては、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤または発色剤、および基質、補助因子、阻害剤、磁性粒子などが挙げられる。

【０２７９】

目的のポリヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞を、細胞培養物からのタンパク質の発現および回収に適した条件下で培養し得る。特定の具体的な実施形態では、無血清細胞発現系を用いる。例としては、無血清培地で増殖可能なＨＥＫ２９３細胞およびＣＨＯ細胞が挙げられる（例えば、Ｒｏｓｓｅｒら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ．４０：２３７－４３，２００５；および米国特許第６，２１０，９２２号を参照されたい）。

【０２８０】

組換え細胞により産生されたタンパク質は、使用する配列および／またはベクターに応じて、分泌される場合もあれば、細胞内に含まれている場合もある。本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、コードされたポリペプチドが原核または真核細胞膜を通って分泌されるよう指令するシグナル配列を含むように設計し得ることも、当業者は同様に理解するであろう。他の組換え構築物を用いて、目的ポリペプチドをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製および／または検出を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列と連結してもよい。このようなドメインの例としては、切断可能なおよび切断不可能なアフィニティー精製タグおよびエピトープタグ、例えばアビジン、ＦＬＡＧタグ、ポリヒスチジンタグ（例えば、６×Ｈｉｓ）、ｃＭｙｃタグ、Ｖ５－タグ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグなどが挙げられる。

【０２８１】

組換え細胞により産生されたタンパク質を、当該技術分野で公知の各種技術に従って精製し特徴付けることができる。タンパク質精製およびタンパク質純度の解析を行うためのシステムの例としては、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）（例えば、ＡＫＴＡ社およびＢｉｏ－Ｒａｄ社のＦＰＬＣシステム）、高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）（例えば、Ｂｅｃｋｍａｎ社およびＷａｔｅｒｓ社のＨＰＬＣ）が挙げられる。精製のための化学の例としては、当該技術分野で公知のものの中でも特に、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Ｑ、Ｓ）、サイズ排除クロマトグラフィー、塩勾配、アフィニティー精製（例えば、Ｎｉ、Ｃｏ、ＦＬＡＧ、マルトース、グルタチオン、プロテインＡ／Ｇ）、ゲルろ過、逆相、セラミックＨＹＰＥＲＤ（登録商標）イオン交換クロマトグラフィーおよび疎水性相互作用カラム（ＨＩＣ）が挙げられる。またＳＤＳ－ＰＡＧＥ（例えば、クーマシー染色、銀染色）、免疫ブロット、Ｂｒａｄｆｏｒｄ法およびＥＬＩＳＡのような解析方法も挙げられ、これらは通常、タンパク質組成物の純度を測定するために、産生または精製工程の任意の段階において使用され得る。

【０２８２】

また、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの濃縮方法および濃縮された可溶性タンパク質

を含む組成物も含まれる。様々な態様において、このようなＡＡＲＳポリペプチドの濃縮溶液は、タンパク質を約５ｍｇ／ｍｌ；または約８ｍｇ／ｍｌ；または約１０ｍｇ／ｍｌ；約１５ｍｇ／ｍｌ；または約２０ｍｇ／ｍｌの濃度で含み得る。

【０２８３】

一態様では、このような組成物は実質的に単分散であり得る、すなわち、例えばサイズ排除クロマトグラフィー、動的光散乱法または分析用超遠心法により評価したとき、ＡＡＲＳポリペプチド組成物が主として（すなわち、少なくとも約９０％以上が）１つの見かけの分子量の形態で存在する。

【０２８４】

別の態様では、このような組成物は、少なくとも約９０％の純度（タンパク質ベース）、またいくつかの態様では少なくとも約９５％の純度、またいくつかの実施形態では少なくとも９８％の純度である。純度は、当該技術分野で公知の任意の日常的な分析方法により決定され得る。

【０２８５】

別の態様では、このような組成物は、存在する全タンパク質に対する高分子量凝集体含有量が約１０％未満であり、またいくつかの実施形態では、このような組成物は高分子量凝集体含有量が約５％未満であり、またいくつかの態様では、このような組成物は高分子量凝集体含有量が約３％未満であり、またいくつかの実施形態では、高分子量凝集体含有量が約１％未満である。高分子量凝集体含有量は、例えばサイズ排除クロマトグラフィー、動的光散乱法または分析用超遠心法を含めた、各種分析技術により決定され得る。

【０２８６】

特定の実施形態では、本明細書に記載されているように、ＡＡＲＳポリペプチド組成物は、エンドトキシン含有量が約１０ＥＵ／ｍｇＡＡＲＳポリペプチド未満、または約５ＥＵ／ｍｇＡＡＲＳポリペプチド未満、約３ＥＵ／ｍｇＡＡＲＳポリペプチド未満、または約１ＥＵ／ｍｇＡＡＲＳポリペプチド未満である。

【０２８７】

本明細書で企図される濃縮方法の例としては凍結乾燥が挙げられ、これは通常、溶液が目的タンパク質以外の可溶性成分をほとんど含有しない場合に用いられる。凍結乾燥はＨＰＬＣ実行後に行われることが多く、揮発性物質成分の大部分またはすべてを混合物から除去することができる。また限外ろ過技術も挙げられ、この技術では通常、タンパク質溶液を濃縮するために１つ以上の選択的透過性の膜を用いる。この膜は水および小分子は通過させてタンパク質を保持するもので、各種技術の中でも特に、機械的ポンプ、ガス圧力または遠心分離により、溶液を膜に押し付ける。

【０２８８】

特定の実施形態では、試薬、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたは関連薬剤（例えば、抗体）は、当該技術分野の日常的な技術による測定で、純度が少なくとも約９０％である。診断用組成物または特定の治療用組成物のような特定の実施形態では、本発明のＡＡＲＳ組成物は、純度が少なくとも約９５％である。治療用組成物または医薬組成物のような特定の実施形態では、本発明のＡＡＲＳ組成物は、純度が少なくとも約９７％または９８％または９９％である。参照用または研究用試薬として使用する場合のような他の実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの純度はもっと低くてよく、少なくとも約５０％、６０％、７０％または８０％の純度であってよい。全体での純度または他のタンパク質のような選択された成分に対する純度、例えばタンパク質ベースの純度を測定してもよい。

【０２８９】

また精製ＡＡＲＳタンパク質フラグメントを、その生物学的特性に従って特徴付けることもできる。例としては、本明細書に記載されているような、選択されたリガンド（例えば、細胞表面受容体またはその細胞外ドメインのようなＡＡＲＳタンパク質フラグメントの細胞結合パートナー）に対する結合親和性または結合キネティクス、および１つ以上のカノニカルまたは非カノニカルな生物活性の存在またはレベルが挙げられる。結合親和性

および結合キネティクスは、当該技術分野で公知の各種技術、例えば表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を利用したＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）および関連技術、未標識の反応体のリアルタイムでの検出が可能な光学現象などにより測定することができる。ＳＰＲ－ベースのバイオセンサーは、親和性およびキネティクスの両方に関する活動濃度の決定、スクリーニングおよび特徴付けに使用することができる。１つ以上のカノニカルまたは非カノニカルな生物活性の存在またはレベルは、本明細書に記載されているように、非カノニカルな生物活性の蛍光指標物質または発光指標物質のような読取り物質または指標物質と機能的に結合した、選択されたＡＡＲＳタンパク質フラグメントの細胞結合パートナー（例えば、細胞表面受容体）を用いるものを含めた、細胞ベースのアッセイにより測定することができる。

【０２９０】

特定の実施形態では、上述のように、ＡＡＲＳポリペプチド組成物は、例えば約９５％無エンドトキシン、好ましくは約９９％無エンドトキシン、より好ましくは約９９．９９％無エンドトキシンを含めた、ほぼ実質的に無エンドトキシンである。エンドトキシンの存在は、本明細書に記載されているような、当該技術分野の日常的な技術により検出することができる。特定の実施形態では、ＡＡＲＳ組成物を、実質的に無血清の培地で哺乳動物細胞またはヒト細胞のような真核細胞から作製する。

【０２９１】

特定の実施形態では、ＡＡＲＳポリペプチド組成物は、約１０％ｗｔ／ｗｔ未満の高分子量凝集体、または約５％ｗｔ／ｗｔ未満の高分子量凝集体、または約２％ｗｔ／ｗｔ未満の高分子量凝集体、または約１％ｗｔ／ｗｔ未満の高分子量凝集体を含む。

【０２９２】

またタンパク質ベースの解析アッセイおよび解析方法も含まれ、これらを用いて、各種特性の中でも特に、例えばタンパク質の純度、大きさ、溶解度および凝集度を評価することができる。タンパク質純度は数多くの方法で評価することができる。例えば、一次構造、高次構造、大きさ、電荷、疎水性およびグリコシル化に基づいて純度を評価することができる。一次構造を評価する方法の例としては、Ｎ末端およびＣ末端配列決定法およびペプチドマッピング（例えば、Ａｌｌｅｎら，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ．２４：２５５－２７５，１９９６を参照されたい）が挙げられる。高次の構造を評価する方法の例としては、円二色性（例えば、Ｋｅｌｌｙら，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ．１７５１：１１９－１３９，２００５を参照されたい）、蛍光分光測定法（例えば、Ｍｅａｇｈｅｒら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３：２３２８３－８９，１９９８を参照されたい）、ＦＴ－ＩＲ、アミド水素－重水素交換キネティクス、示差走査熱量測定法、ＮＭＲ分光測定法、構造的に高感度な抗体による免疫反応性が挙げられる。また、ｐＨ、温度または添加塩のような各種パラメータの関数として高次構造を評価することもできる。タンパク質の大きさのような特性を評価する方法の例としては、分析用超遠心法およびサイズ排除ＨＰＬＣ（ＳＥＣ－ＨＰＬＣ）が挙げられ、また電荷を測定する方法の例としては、イオン交換クロマトグラフィーおよび等電点電気泳動が挙げられる。疎水性は、例えば、逆相ＨＰＬＣおよび疎水性相互作用クロマトグラフィーＨＰＬＣにより評価することができる。グリコシル化は薬物動態（例えば、クリアランス）、コンホメーションまたは安定性、受容体結合およびタンパク質機能に影響を及ぼすことがあり、例えば、質量分析法および核磁気共鳴（ＮＭＲ）分光測定法により評価することができる。

【０２９３】

上述のように、特定の実施形態は、各種用途の中でも特に、タンパク質の純度、大きさ（例えば、大きさの均一性）または凝集のような特性を評価するために、および／またはタンパク質を精製するためにＳＥＣ－ＨＰＬＣを使用することを含む。ゲルろ過クロマトグラフィー（ＧＦＣ）およびゲル浸透クロマトグラフィー（ＧＰＣ）も含めたＳＥＣは、溶液中の分子がその大きさ、より具体的にはその流体力学的体積、拡散係数および／または表面特性に基づき多孔性物質内で分離されるクロマトグラフ法を指す。この工程は一般に、生体分子を分離するため、ならびにポリマーの分子量および分子量分布を決定するた

めに使用される。通常、生体試料またはタンパク質試料（本明細書に記載のおよび当該技術分野で公知のタンパク質発現法により作製されたタンパク質抽出物など）を、定められた固定相（多孔性物質）、好ましくは試料中のタンパク質と相互作用しない相を含む、選択されたサイズ排除カラムに負荷する。特定の態様では、固定相は、ガラスまたはスチール製のカラム内の高密度三次元マトリックス内に詰め込まれた不活性な粒子からなる。移動相は純粋、水性緩衝液、有機溶媒またはその混合物であり得る。固定相の粒子は通常、特定の大きさ以下の分子のみが入ることのできる小孔および／またはチャネルを有する。したがって、大型の粒子はこれらの小孔およびチャネルから排除され、固相との相互作用が制限されるため、実験開始時の「完全に排除された」ピークとして溶出する。小型の分子は小孔に収まることができるため、流れる移動相から外れ、固定相の小孔内で分子が固定化されている時間の長さは、部分的にはそれが小孔内に侵入する深さによって決まる。小型の分子は移動相の流れから外れるため、カラムから溶出するまでの時間が長く、その結果、粒子の大きさの違いに基づいた粒子間での分離が生じる。所与のサイズ排除カラムには、分離可能な分子量の範囲がある。一般的に、上限よりも大きい分子は固定相に引っ掛からず、下限よりも小さい分子は固相内に完全に入り込んで単一のバンドとして溶出し、範囲内の分子は、その流体力学的体積のような特性によって決まる様々な速度で溶出する。医薬タンパク質で実施されるこれらの方法の例としては、Ｂｒｕｎｅｒら，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ．１５：１９２９－１９３５，１９９７を参照されたい。

【０２９４】

臨床応用のためのタンパク質純度も、例えばＡｎｉｃｅｔｔｉら（Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．７：３４２－３４９，１９８９）により考察されている。タンパク質純度を解析するための比較的最近の技術としては、特に限定されないが、タンパク質および核酸の迅速な解析用の自動化プラットフォームであるＬａｂＣｈｉｐ ＧＸＩＩが挙げられ、これはハイスループットなタンパク質の力価解析、サイズ決定および純度解析を提供するものである。特定の非限定的な実施形態では、各種方法の中でも特に、少なくとも２つの互いに独立した段階でクロマトグラフィー材料を組み合わせて用いることにより、臨床グレードのタンパク質フラグメントおよび抗体のようなタンパク質を得ることができる（例えば、Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．Ｖｏｌ．３０８，ＳｍａｌｅｓおよびＪａｍｅｓ編，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．，２００５を参照されたい）。通常、タンパク質剤（例えば、ＡＡＲＳタンパク質フラグメント、抗体、結合物質）およびその他の薬剤（例えば、アンチセンス、ＲＮＡｉ、小分子）は、当該技術分野で公知のおよび本明細書に記載の技術による測定で、実質的に無エンドトキシンである。

【０２９５】

またタンパク質の溶解度アッセイも含まれる。このようなアッセイを用いて、例えば、組換え産生に最適な増殖および精製条件を決定する、緩衝液（１つまたは複数）の選択を最適化する、およびＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたはそのバリアントの選択を最適化することができる。溶解度または凝集は、温度、ｐＨ、塩および他の添加物質の有無のような各種パラメータによって評価することができる。溶解度スクリーニングアッセイの例としては、特に限定されないが、エンドポイントとして濁度またはその他の尺度を用いてタンパク質の溶解度を測定し、精製組換えタンパク質の溶解度解析のためのハイスループットなアッセイである、マイクロプレートベースの方法（例えば、Ｓｔｅｎｖａｌｌら，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ．１７５２：６－１０，２００５を参照されたい）、遺伝マーカータンパク質の構造的相補性用いて、タンパク質のフォールディングおよび溶解度をｉｎ ｖｉｖｏでモニターおよび測定するアッセイ（例えば、Ｗｉｇｌｅｙら，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．１９：１３１－１３６，２００１を参照されたい）、ならびに走査型電気化学顕微鏡（ＳＥＣＭ）を用いた、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）における組換えタンパク質の溶解度の電気化学的スクリーニング（例えば、Ｎａｇａｍｉｎｅら，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏ

ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．９６：１００８－１０１３，２００６を参照されたい）が特に挙げられる。溶解度の増加した（または凝集の減少した）ＡＡＲＳタンパク質フラグメントは、単純なｉｎ　ｖｉｖｏでのタンパク質溶解度のアッセイを含めた当該技術分野の日常的な技術により、同定または選択することができる（例えば、Ｍａｘｗｅｌｌら，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．８：１９０８－１１，１９９９を参照されたい）。

【０２９６】

またタンパク質の溶解度および凝集を、動的光散乱技術により測定することもできる。凝集は、可溶性／不溶性、共有結合性／非共有結合性、可逆性／不可逆性および天然／変性の相互作用および特性を含めたいくつかのタイプの相互作用または特性を包含する一般用語である。タンパク質治療剤では、凝集は免疫原性の反応を引き起こし得る（例えば、小さな凝集体）、または投与の際に有害事象を引き起こし得る（例えば、微粒子）という懸念から、その存在は通常、望ましくないと考えられている。動的光散乱法は、懸濁液中の小粒子または溶液中のタンパク質のようなポリマーのサイズ分布プロファイルを決定するために使用することができる技術を指す。光子相関分光法（ＰＣＳ）または準弾性光散乱法（ＱＥＬＳ）とも呼ばれるこの技術は、散乱光を用いてタンパク粒子の拡散速度を測定するものである。溶液中の分子および粒子のブラウン運動による散乱強度の変動を観察することができる。この運動のデータを従来通りに処理して試料のサイズ分布を導出し、ここでは、サイズはタンパク質粒子のストークス半径または流体力学的半径で与えられる。流体力学的サイズは質量と形状（コンホメーション）の両方によって決まる。動的散乱法では、広範囲の質量を含む試料中においても、極めて少量の凝集タンパク質（０．０１重量％未満）の存在を検出することができる。また動的散乱法を用いて、例えば、温度上昇時の変化のリアルタイムの監視による適用を含めた、異なる製剤の安定性の比較を行うこともできる。したがって、特定の実施形態は、動的光散乱法を用いて、本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメント、抗体またはその他の薬剤を含有する試料中の溶解度および／または凝集体の存在を解析することを含む。

【０２９７】

ＩＸ．診断法および診断用組成物

本明細書に記載のＡＡＲＳタンパク質フラグメント、ＡＡＲＳポリヌクレオチドならびに抗体およびその他の結合物質のようなＡＡＲＳ剤を、診断検査および診断用組成物に使用することができる。特に生化学的、組織学的および細胞ベースの方法および組成物が含まれる。

【０２９８】

これらのおよび関連する実施形態は、１つ以上の新規に同定されたＡＡＲＳポリペプチドとも呼ばれるＡＡＲＳタンパク質フラグメントの、ＡＡＲＳポリヌクレオチド配列（１つまたは複数）もしくは対応するＡＡＲＳポリペプチド配列（１つまたは複数）またはその一部分の検出を含む。例えば、特定の態様は、１つ以上の新規に同定されたＡＡＲＳスプライスバリアントおよび／またはこれらのスプライスバリアントの１つ以上のスプライスジャンクションの、ＡＡＲＳポリヌクレオチド配列（１つまたは複数）もしくは対応するポリペプチド配列（１つまたは複数）またはその一部分の検出を含む。特定の実施形態では、少なくとも１つのスプライスジャンクションのポリヌクレオチドまたは対応するポリペプチド配列（１つまたは複数）は、その特定のＡＡＲＳスプライスバリアントに固有のものである。

【０２９９】

また、スプライスバリアント、タンパク質分解フラグメントなどを含めたＡＡＲＳタンパク質フラグメントの直接検出も含まれる。特定の実施形態では、１つ以上の新規に同定されたＡＡＲＳタンパク質フラグメントの存在またはレベルは、１つ以上の細胞のタイプまたは細胞の状態に関連する。したがって、ＡＡＲＳポリペプチドまたはポリヌクレオチドの存在またはレベルを用いて、異なる細胞のタイプまたは異なる細胞の状態を区別することができる。ＡＡＲＳタンパク質フラグメントまたはその関連ポリヌクレオチドの存在またはレベルは、本明細書に記載のおよび当該技術分野で公知のポリヌクレオチドおよび

／またはポリペプチドベースの診断技術により検出することができる。

【０３００】

特定の態様では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメント、抗体またはＡＡＲＳポリヌクレオチドを、典型的には対象または対象集団が特定の医学的処置に良好に応答するか否かを評価するための併用診断法の一部として使用することができる。例えば、対象（１つまたは複数）が所与の疾患または状態に対する１つ以上の選択されたバイオマーカーを有するか否かに基づき、所与のＡＡＲＳ治療剤（例えば、タンパク質フラグメント、アンチセンス、ＲＮＡｉ、抗体、結合物質）が対象または特定の対象集団に適することを確認し得る。バイオマーカーの例としては、血清／組織マーカーおよび医用画像工学により同定可能なマーカーが挙げられる。特定の実施形態では、天然のＡＡＲＳタンパク質フラグメント（またはその対応するポリヌクレオチド）自体が、薬物効果を測定するまたは特定の対象もしくは特定の対象集団での薬物使用が望ましいか否かを評価するために使用することができる、血清および／または組織バイオマーカーになり得る。特定の態様では、ＡＡＲＳポリペプチドまたはポリヌクレオチド参照配列の同定は、本明細書に記載のおよび当該技術分野で公知のように、選択された対象、選択された組織またはその他におけるその配列の差次的発現を特徴付けることを含み得る。

【０３０１】

本明細書に記載の特定の方法では、ＡＡＲＳポリペプチドまたはポリヌクレオチドの差次的発現によって、細胞、組織または対象の健康状態または状態を特徴付け、それを別の細胞、組織または対象と区別する。非限定的な例としては、生物試料中のＡＡＲＳポリペプチドまたはポリヌクレオチド存在またはレベル検出して、異なる種の細胞または組織、異なる組織または器官の細胞、新生児および成人などの細胞発達の状態、細胞分化の状態、健常、疾患および治療済みのような状態、細胞内および細胞外画分、ならびに不死化細胞培養物のような初代細胞培養物およびその他の細胞培養物を区別する方法が挙げられる。

【０３０２】

差次的発現は、ＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列の１つ以上の遺伝子発現レベルと、適当な対照における同じ配列の発現レベルとの比較における統計的有意差を含む。統計的有意差は、ＲＮＡレベル、タンパク質レベル、タンパク質機能または本明細書に記載のようなその他の任意の関連する遺伝子発現の尺度による測定での発現レベルの増加または減少のいずれかに関連し得る。また、本発明のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチドと、通常は同じまたは対応するタイプの完全長または野生型の細胞質ＡＡＲＳ配列またはミトコンドリアＡＡＲＳ配列との間の比較も含まれる。差次的発現は、リアルタイムＰＣＲ、サブトラクティブハイブリダイゼーション、ポリヌクレオチドアレイおよびポリペプチドアレイなどのようなポリヌクレオチドベースおよびポリペプチドベースの技術を含めた、当該技術分野のおよび本明細書に記載の各種技術により検出することができる。

【０３０３】

ある結果が、偶然生じた可能性の低いものであれば、通常、それは統計的に有意であるという。試験または結果の有意性のレベルは、伝統的には頻度派の統計的仮説検定の概念に関するものである。単純な場合には、統計的有意性は、帰無仮説が実際には真であるのに帰無仮説を棄却する判断を下す（第一種過誤または「偽陽性判定」として知られる判断）確率であると定義され得る。この判断はｐ値を用いて行われる場合が多く、ｐ値が有意なレベル未満であれば帰無仮説は棄却される。ｐ値が小さいほど結果の有意性は高い。また、統計的有意性を判定するためにベイズ因子が用いられる場合もある（例えば、Ｇｏｏｄｍａｎ　Ｓ．，Ａｎｎ　Ｉｎｔｅｒｎ　Ｍｅｄ　１３０：１００５－１３，１９９９を参照されたい）。

【０３０４】

より複雑ではあるが実用上重要な場合では、試験または結果の有意性のレベルは、帰無仮説が実際には真であるのに帰無仮説を棄却する判断を下す確率が、定められた確率以下

である解析を反映し得る。このタイプの解析は、棄却する判断を下す確率が、帰無仮説内に含まれる何組かの仮説の有意性のレベルを大きく下回るような適用が可能である。

【０３０５】

特定の実施形態の例では、統計的に有意な差次的発現は、被検生物試料における所与のＡＡＲＳ配列の発現レベルが、適当な対照と比べて、間にあるすべての整数および小数（例えば、１．２４倍、１．２５倍、２．１倍、２．５倍、６０．０倍、７５．０倍など）を含めた少なくとも約１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．９倍、２．０倍、２．２倍、２．４倍、２．６倍、２．８倍、３．０倍、４．０倍、５．０倍、６．０倍、７．０倍、８．０倍、９．０倍、１０．０倍、１５．０倍、２０．０倍、５０．０倍、１００．０倍以上の発現の差（すなわち、より高いまたは低い発現であり得る差次的発現）を示す状態を含み得る。特定の実施形態では、統計的に有意な差次的発現は、被検生物試料における所与のＡＡＲＳ配列の発現レベルが、適当な対照と比べて、間にあるすべての整数および小数を含めた少なくとも約４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００パーセント（％）以上の発現の差（すなわち、より高いまたは低い発現であり得る差次的発現）を示す状態を含み得る。

【０３０６】

さらなる例として、本明細書に記載のおよび当該技術分野で公知のように、Ｚ検定、すなわちＺの絶対値を計算することにより差次的発現を決定し得る（実施例１を参照されたい）。Ｚ検定は通常、標本平均と母集団平均の間の有意差を確認するために用いられる。例えば、９５％信頼区間（すなわち、５％の有意性レベル）で標準正規表（例えば、対照組織）と比較し、Ｚスコアの絶対値が１．９６よりも大きければ、それは非ランダム性であることを示している。９９％信頼区間でＺの絶対値が２．５８よりも大きければ、それはｐ＜０．０１であることを意味し、その差の有意性はさらに高い、すなわち、帰無仮説をより高い信頼度で棄却できる。これらのおよび関連する実施形態では、間にあるすべての小数（例えば、１０．１、１０．６、１１．２など）を含めた１．９６、２、２．５８、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０以上の絶対Ｚスコアは、統計的有意性の有力な尺度となり得る。特定の実施形態では、６より大きい絶対Ｚスコアは、非常に高い統計的有意性を示し得る。

【０３０７】

実質的な類似性は一般に、生物試料と参照対照の間に発現レベルの統計的有意差がないことに関するものである。実質的に類似した発現レベルの例としては、被検生物試料における所与のＳＳＣＩＧＳの発現レベルが、参照試料と比べて、間にあるすべての小数（例えば、１５倍、０．２５倍、０．３５倍など）を含めた約０．０５倍、０．１倍、０．２倍、０．３倍、０．４倍、０．５倍、０．６倍、０．７倍、０．８倍、０．９倍、１．０倍、１．１倍、１．２倍、１．３倍または１．４倍未満の発現の差（すなわち、より高いまたは低い発現であり得る差次的発現）を示す状態を挙げ得る。特定の実施形態では、差次的発現は、被検生物試料における所与のＡＡＲＳの発現レベルが、参照試料と比べて、間にあるすべての小数を含めた約０．２５．０．５、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０パーセント（％）未満の発現の差（すなわち、より高いまたは低い発現であり得る差次的発現）を示す状態を含み得る。

【０３０８】

特定の実施形態では、例えばＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙを用いてＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列の発現レベルを測定するような場合、通常１０００のスケールの平均発現値を用いた、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ　Ｓｕｉｔｅ５ソフトウェア（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ、Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ、ＣＡ）または他の同様のソフトウェアでまとめた平均発現値により、差次的発現を決定

することもできる。

【０３０９】

本発明の実施形態は、ＡＡＲＳポリヌクレオチドもしくはポリペプチド参照配列またはその一部分の存在またはレベルを検出して、異なる生物体または種の細胞または組織などの生物試料を区別する方法を含み、ここでは、その配列の存在またはレベルが選択された生物体または種に関連する。一般的な例としては、細菌、真菌、植物およびその他の非ヒト動物の任意の組合せと、ヒトとを区別する方法が挙げられる。脊椎動物、例えば魚類、両生類、爬虫類、鳥類および非ヒト哺乳動物などならびに無脊椎動物、例えば昆虫、軟体動物、甲殻類およびサンゴなどを含めた脊椎動物および無脊椎動物の任意の組合せと、ヒトとを区別する方法が動物に含まれる。アフリカトガリネズミ目、ハネジネズミ目、管歯目、イワダヌキ目、長鼻目、海牛目、被甲目、有毛目、ツパイ目、皮翼目、霊長目、げっ歯目、ウサギ目、ハリネズミ目、トガリネズミ目、翼手目、有鱗目、クジラ目、食肉目、奇蹄目または偶蹄目の非ヒト動物の任意の組合せと、ヒトとの区別の方法が非ヒト動物に含まれる。霊長目に含まれるのは、当該技術分野で公知のものの中でも特に、有尾猿、無尾猿、ゴリラおよびチンパンジーである。したがって、本明細書に記載されているＡＡＲＳポリヌクレオチドもしくはポリペプチド参照配列またはバリアントの存在またはレベルを用いて、これらの生物の任意の組合せを区別することにより、または生物のパネルのようなこれらの生物のいずれか１つ以上と、ヒトとを区別することにより、細胞、組織または器官のような所与の生物試料の入手源を同定し得る。特定の実施形態では、ＡＡＲＳ配列またはその一部分の存在またはレベルを、予め決定されている値と比較することにより、所与の生物試料の入手源を決定してもよい。

【０３１０】

本発明の実施形態は、ＡＡＲＳポリヌクレオチドもしくはポリペプチド参照配列またはその一部分の存在またはレベルを検出して、異なる組織または器官に由来する細胞またはその他の生物試料を区別する方法を含む。非限定的な例としては、皮膚（例えば、真皮、表皮、皮下層）、毛包、神経系（例えば、脳、脊髄、末梢神経）、聴覚系または平衡器官（例えば、内耳、中耳、外耳）、呼吸器系（例えば、鼻、気管、肺）、胃食道組織、胃腸管系（例えば、口、食道、胃、小腸、大腸、直腸）、脈管系（例えば、心臓、血管および動脈）、肝臓、胆嚢、リンパ／免疫系（例えば、リンパ節、リンパ濾胞、脾臓、胸腺、骨髄）、泌尿生殖器系（例えば、腎臓、尿管、膀胱、尿道、子宮頸部、卵管、卵巣、子宮、外陰部、前立腺、尿道球腺、精巣上体、前立腺、精嚢、精巣）、筋骨格系（例えば、骨格筋、平滑筋、骨、軟骨、腱、靭帯）、脂肪組織、乳房および内分泌系（例えば、視床下部、下垂体、甲状腺、膵臓、副腎）の任意の組合せに由来する細胞またはその他の生物試料を区別する方法が挙げられる。したがって、本明細書に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の関連に基づき、これらの方法を用いて、細胞またはその他の生物試料が由来する組織または器官の同定または特徴付けを行い得る。

【０３１１】

本発明の実施形態は、ＡＡＲＳポリヌクレオチドもしくはポリペプチド参照配列またはその一部分の存在またはレベルを検出して、細胞の発達または分化の状態を区別するまたは特徴付けることができる。また、生殖細胞、幹細胞および体細胞を識別する方法も含まれる。発達状態の例としては、新生児および成人が挙げられる。細胞分化の状態の例としては、全能性細胞、万能性細胞、多能性前駆体幹細胞および成熟し完全に分化した細胞の間での目立たない同定可能なすべての段階が挙げられる。

【０３１２】

全能性細胞は全潜在能力を有し、通常、有性および無性生殖時に生じ、胞子および接合体がこれに含まれるが、特定の場合には、細胞が脱分化して全能性を取り戻すことがある。万能性細胞には、内胚葉（胃内膜、消化管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、泌尿生殖器）および外胚葉（上皮組織および神経系）を含めた３つの胚葉のいずれにも分化する潜在能力を有する幹細胞がある。多能性前駆細胞は通常、限られた数のタイプの組織に分化することができる。多能性細胞の例としては、赤血球、白血球および血小板のような免疫

細胞が生じる骨髄由来の造血幹細胞（成体幹細胞）、間質細胞、脂肪細胞および各種タイプの骨細胞が生じる骨髄由来の間葉系幹細胞（成体幹細胞）、各種タイプの皮膚細胞が生じる上皮幹細胞（前駆細胞）、ならびに分化した筋肉組織に寄与する筋サテライト細胞（前駆細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、特定のＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列（例えば、ＡＡＲＳスプライスバリアントのスプライスジャンクション、ＡＡＲＳタンパク質分解フラグメント）の存在またはレベルを用いて、対照または所定のレベルとの比較により上記細胞分化の状態を区別する、または特徴付けることができる。

【０３１３】

本発明の実施形態は、ＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列の存在またはレベルを検出して、状態または細胞、組織、器官もしくは対象を特徴付けるまたは診断する方法を含み、ここでは、状態を健常、罹患、罹患の危険性または治療済みで特徴付け得る。このような診断目的では、「診断」または「診断された」という用語は、病的状態の存在または性質の同定、そのような状態が発達する危険性の特徴付け、および／または治療に応答した病的状態の変化（または不変）の測定を包含する。診断方法の感度および特異性は異なり得る。特定の実施形態では、診断検査の「感度」は、検査結果が陽性の罹患した細胞、組織または対象のパーセンテージ（「真陽性」のパーセンテージ）を指す。検査で検出されない罹患した細胞、組織または対象を通常、「偽陰性」と呼ぶ。罹患しておらず検査で陰性と出る細胞、組織または対象を「真の陰性」と呼ぶことがある。特定の実施形態では、診断検査の「特異性」は、（１）から偽陽性率を引いたものと定義され得るが、ここで「偽陽性」率は、疾患を有さず検査結果が陽性の試料または対象の割合と定義される。特定の診断方法では状態の確定診断が下されない場合があるが、診断に役立つ陽性の表示がその方法から得られれば十分である。

【０３１４】

特定の場合には、病的状態と関連する１つ以上の選択されたＡＡＲＳポリヌクレオチドもしくはポリペプチド参照配列またはその一部分の存在またはレベルを、適当な対照と比較したレベルの増加または減少で比較することにより、その病的状態の存在または発達の危険性を診断することができる。「適当な対照」は、組織または生物の細胞またはその他の生物試料、例えば状態が存在しないなどの正常な形質を示す対照または正常の細胞、組織または生物において決定される値、レベル、特徴、特性または性質を包む。特定の実施形態では、「適当な対照」は、予め定められた値、レベル、特徴、特性または性質である。他の適当な対照は当業者には明らかであろう。疾患および状態の例を本明細書の他所に記載する。

【０３１５】

本発明の実施形態は、検出感度による特定の利点があるＡＡＲＳポリヌクレオチドまたは核酸ベースの検出技術を含む。したがって、特定の実施形態は、診断の方法またはアッセイの一部としてのＡＡＲＳポリヌクレオチドの使用または検出に関する。ＡＡＲＳポリヌクレオチドの存在および／またはレベルは、特に、ノーザンブロットのようなハイブリダイゼーションアッセイ、定量的もしくは定性的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、定量的もしくは定性的逆転写酵素ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、マイクロアレイ、ドットブロットもしくはスロットブロット、または蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）のようなｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションを含めた当該技術分野で公知の任意の方法により測定し得る。これらの特定の方法を以下でさらに詳細に記載する。

【０３１６】

ＡＡＲＳのＤＮＡおよびＲＮＡのようなポリヌクレオチドは、Ｋｉｎｇｓｔｏｎ（２００２ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌ．Ａｓｓｏｃ．Ｉｎｃ．＆ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ，ＮＹ（例えば、Ｎｅｌｓｏｎら，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，９９：１１８９０－１１８９５，２００２による記載を参照されたい）およびその他に記載されているような当該技術分野で公知の技術を用いて、血液、生

体液、組織、器官、細胞系またはその他の関連する試料から採取および／または作製することができる。さらに、各種の市販のＲＮＡ構築用キットが本発明で使用するＲＮＡの作製に有用である。正常な健常対象から得られた器官／組織／細胞からＲＮＡを構築してもよいが、本発明は罹患対象からのＲＮＡ構築も企図する。特定の実施形態は、任意のタイプの対照または動物由来の任意のタイプの器官の使用を企図する。試験試料用に、目に見える疾患を有するまたは有さない個体（例えば、哺乳動物を含めた任意の動物）から、および組織試料、生体液（例えば、全血）などからＲＮＡを得てもよい。

【０３１７】

特定の実施形態では、ｃＤＮＡ配列の増幅または構築が検出能力を増強するのに役立ち得る。当該技術分野のみならず本開示でも、このような作業を行うために必要な詳細を記載する。実施形態の一例では、全血をＲＮＡの入手源として使用し、したがって、例えばＴｈａｃｈら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｄｅｃ ２８３（１－２）：２６９－２７９，２００３およびＣｈａｉら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｌａｂ Ａｎａｌ．１９（５）：１８２－１８８，２００５（ともに参照により組み込まれる）に記載されているＰＡＸチューブのような、ＲＮＡ安定化試薬を任意に使用する。Ａｕｓｕｂｅｌら（２００１ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌ．Ａｓｓｏｃ．Ｉｎｃ．＆ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ，ＮＹ）；Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，第２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ，ＮＹ）；Ｍａｎｉａｔｉｓら（１９８２ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ，ＮＹ）およびその他に記載されているような当該技術分野で公知の技術を用いて、相補的なＤＮＡ（ｃＤＮＡ）ライブラリーを作製することができる。さらに、各種市販のｃＤＮＡライブラリー構築用のキットが本発明のｃＤＮＡライブラリー作製に有用である。正常な健常対象から得られた器官／組織／細胞からライブラリーを構築することができる。

【０３１８】

特定の実施形態では、ＡＡＲＳポリヌクレオチド配列を検出するためにハイブリダイゼーション法を使用し得る。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイを行うための方法は、当該技術分野において十分に開発されている。ハイブリダイゼーションアッセイの手順および条件は適用によって異なり、Ｍａｎｉａｔｉｓら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９）；ＢｅｒｇｅｒおよびＫｉｍｍｅｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１５２，Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．，１９８７）；ＹｏｕｎｇおよびＤａｖｉｓ，ＰＮＡＳ．８０：１１９４（１９８３）で言及されているものを含めた既知の一般的な結合方法に基づいて選択する。ハイブリダイゼーション反応を反復し制御して行うための方法および装置は、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，８７１，９２８号、同第５，８７４，２１９、同第６，０４５，９９６号および同第６，３８６，７４９号、同第６，３９１，６２３号に記載されている。

【０３１９】

特定の実施形態では、ＡＡＲＳポリヌクレオチド配列を検出するために核酸増幅法を使用し得る。「増幅」または「核酸増幅」という用語は、対象とする特定の標的核酸配列の少なくとも一部分を含む標的核酸の複数コピーの作製を指す。複数コピーをアンプリコンまたは増幅産物と呼ぶこともある。特定の実施形態では、増幅される標的が含む部分は、完全な標的遺伝子配列（イントロンおよびエクソン）または発現された標的遺伝子配列（エクソンと隣接非翻訳配列からなるスプライス転写産物）よりも少ない。例えば、標的ポリヌクレオチドの内部の位置とハイブリダイズ、そこから重合を開始する増幅プライマーを用いて、標的ポリヌクレオチドの一部分を増幅することにより、特定のアンプリコンを

作製し得る。好ましくは、増幅された部分は、各種公知の方法のいずれかを用いて検出され得る検出可能な標的配列を含む。

【０３２０】

本明細書で使用される「選択的増幅」または「特異的増幅」は、本発明による標的核酸配列の増幅を指し、ここでは、標的配列の検出可能な増幅は、試験する目的核酸試料が関与する標的配列の増幅に実質的に限定され、かつ他のいくつかの試料入手源、例えば増幅反応の際に使用する試薬中または増幅反応を行う環境中に存在する夾雑物が関与する標的核酸配列はこれに関与しない。

【０３２１】

「増幅条件」という用語は、本発明の核酸増幅が可能な条件を指す。増幅条件は、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」よりも低ストリンジェンシーであり得る。本発明の増幅反応で使用するオリゴヌクレオチドは、増幅条件下でその対象とする標的とハイブリダイズするが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下ではハイブリダイズしてもよいし、しなくてもよい。これに対し、本発明の検出プローブは通常、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。本発明の核酸増幅を行うのに許容される条件は、使用する特定の増幅方法に応じて、当業者により容易に確認され得る。

【０３２２】

核酸増幅の多くの公知の方法では、二本鎖核酸の変性とプライマーとのハイブリッド形成を交互に行うための温度サイクリングが必要であるが、他の公知の核酸増幅法は等温型である。ポリメラーゼ連鎖反応（米国特許第４，６８３，１９５号；同第４，６８３，２０２号；同第４，８００，１５９号；同第４，９６５，１８８号）は一般にＰＣＲと呼ばれ、変性、プライマーペアと反対鎖のアニーリングおよびプライマー伸長からなる複数のサイクルを用いて、標的配列のコピー数を指数関数的に増加させる。ＲＴ－ＰＣＲと呼ばれるバリエーションでは、逆転写酵素（ＲＴ）を用いてｍＲＮＡから相補的なＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を生成させ、次いでこのｃＤＮＡをＰＣＲにより増幅してＤＮＡの複数コピーを作製する。

【０３２３】

上述のように、「ＰＣＲ」という用語は、標的核酸種を選択的に増幅する複数の増幅サイクルを指す。定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）、リアルタイムＰＣＲ、逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）がこれに含まれ、当該技術分野では定量的逆転写ＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）がよく記載されている。「ｐＰＣＲ」という用語は定量的ポリメラーゼ連鎖反応を指し、「ｑＲＴ－ＰＣＲ」という用語は定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を指す。ｑＰＣＲおよびｑＲＴ－ＰＣＲを用いて、標的ｃＤＮＡ分子を増幅すると同時に定量化し得る。これによりｃＤＮＡプール内の特定の配列、例えば選択されたＡＡＲＳの遺伝子または転写産物などの検出および定量化の両方が可能となる。

【０３２４】

用語「リアルタイムＰＣＲ」では、ＰＣＲ中のすべての二本鎖（ｄｓ）ＤＮＡと結合するＤＮＡ結合色素を用いて、色素の蛍光を生じさせ得る。したがって、ＰＣＲにおけるＤＮＡ産物の増加は蛍光強度を増大させ、これが各サイクルにおいて測定されるため、ＤＮＡ濃度の定量化が可能となる。しかし、ＳＹＢＲ　ＧｒｅｅｎのようなｄｓＤＮＡ色素はすべてのｄｓＤＮＡ　ＰＣＲ産物と結合する。蛍光はリアルタイムＰＣＲサーモサイクラー内で検出および測定され、産物の指数関数的増加に対応するその幾何学的増加を用いて、各反応の（「Ｃｔ」）閾値サイクルが決定される。

【０３２５】

「Ｃｔスコア」という用語は閾値サイクル数を指し、これはＰＣＲ増幅が閾値レベルを上回ったときのサイクルである。試料中に特定の遺伝子に対するｍＲＮＡが多量に存在すれば、増幅される開始ＲＮＡがそれだけ多量に存在するため、低発現遺伝子よりも早く閾値を越える。したがって、低いＣｔスコアは試料中での高い遺伝子発現を示し、高いＣｔスコアは低い遺伝子発現を示す。

【０３２６】
特定の実施形態では、一般にＬＣＲと呼ばれるリガーゼ連鎖反応（Ｗｅｉｓｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２５４：１２９２，１９９１）を使用し得るが、この反応では、標的核酸の近接領域とハイブリダイズする相補的なＤＮＡオリゴヌクレオチドのセットを２つ用いる。温度変性、ハイブリダイゼーションおよび連結のサイクルを繰り返す間にＤＮＡオリゴヌクレオチドがＤＮＡリガーゼにより共有結合し、検出可能な連結された二本鎖のオリゴヌクレオチド産物が生成される。
【０３２７】
もう１つの方法が、一般にＳＤＡと呼ばれる鎖置換増幅法（Ｗａｌｋｅｒ，Ｇ．ら，１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：３９２－３９６；米国特許第５，２７０，１８４号および同第５，４５５，１６６号）であり、この方法では、プライマー配列のペアと標的配列の反対鎖とのアニーリング、ｄＮＴＰαＳの存在下でのプライマー伸長による二本鎖の半ホスホチオアート化されたプライマー伸長産物の生成、エンドヌクレアーゼーによる半修飾制限酵素認識部位のニック形成、ならびにポリメラーゼによるニックの３’末端からのプライマー伸長により、存在する鎖を置換して、次のプライマーアニーリング、ニック形成および鎖置換のラウンドのための鎖を生成することからなるサイクルを用いて、産物の幾何学的増幅を生じる。好熱性のＳＤＡ（ｔＳＤＡ）では、基本的には同じ方法で、より高い温度で好熱性のエンドヌクレアーゼおよびポリメラーゼを用いる（欧州特許第０６８４３１５号）。
【０３２８】
その他の増幅法としては、例えば、一般にＮＡＳＢＡと呼ばれる核酸配列ベースの増幅（米国特許第５，１３０，２３８号）；一般にＱβレプリカーゼと呼ばれるＲＮＡレプリカーゼを用いてプローブ分子自体を増幅する方法（Ｌｉｚａｒｄｉ，Ｐ．ら，１９８８，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌ．６：１１９７－１２０２）；転写ベースの増幅法（Ｋｗｏｈ，Ｄ．ら，１９８９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１１７３－１１７７）；自家持続配列複製法（Ｇｕａｔｅｌｌｉ，Ｊ．ら，１９９０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：１８７４－１８７８）；および一般にＴＭＡと呼ばれる転写増幅法（米国特許第５，４８０，７８４号および同第５，３９９，４９１号）が挙げられる。既知の増幅法に関するさらなる考察に関しては、Ｐｅｒｓｉｎｇ，Ｄａｖｉｄ Ｈ．，１９９３，“Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ” ｉｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（Ｐｅｒｓｉｎｇら編．），ｐｐ．５１－８７（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ、ＤＣ）を参照されたい。
【０３２９】
本発明の例示的な転写ベースの増幅系としては、ＲＮＡポリメラーゼを用いて標的領域のＲＮＡ転写産物を多数生成させるＴＭＡが挙げられる（米国特許第５，４８０，７８４号および同第５，３９９，４９１号）。ＴＭＡでは、逆転写酵素とＲＮＡポリメラーゼの存在下で標的核酸とハイブリダイズして二本鎖プロモーターを形成する「プロモータープライマー」を使用し、形成された二本鎖プロモーターからＲＮＡポリメラーゼがＲＮＡ転写産物を生成する。これらの転写産物は、そのＲＮＡ転写産物とハイブリダイズすることができる第二のプライマーの存在下で、ＴＭＡのさらなるラウンドのための鋳型となり得る。熱変性を必要とするＰＣＲ、ＬＣＲまたはその他の方法とは異なり、ＴＭＡは等温型の方法であり、ＲＮアーゼＨ活性を用いてＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッドのＲＮＡ鎖を消化することにより、プライマーまたはプロモータープライマーとのハイブリダイゼーションに利用されるＤＮＡ鎖を生成する。全般的に、増幅用に加えられた逆転写酵素のＲＮアーゼＨ活性を利用する。
【０３３０】
例示的なＴＭＡ法では、１本の増幅プライマーは、標的結合配列の５’側に位置し二本

鎖のときに機能するプロモーター配列を含む、オリゴヌクレオチドプロモータープライマーであり、増幅する配列の３’の位置で標的ＲＮＡの結合部位とハイブリダイズすることができる。プロモータープライマーは、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼの認識に特異的である場合、「Ｔ７プライマー」と呼ばれることがある。特定の状況下では、プロモータープライマーまたはそのようなプロモータープライマーの亜集団の３’末端を修飾して、プライマー伸長をブロックまたは低減し得る。未修飾のプロモータープライマーから逆転写酵素が標的ＲＮＡのｃＤＮＡコピーを生成する一方で、ＲＮアーゼＨ活性により標的ＲＮＡが分解される。次いで、第二の増幅プライマーがｃＤＮＡと結合する。「Ｔ７プライマー」と区別するために、このプライマーを「非Ｔ７プライマー」と呼ぶことがある。この第二の増幅プライマーから逆転写酵素が別のＤＮＡ鎖を生成し、一端に機能的なプロモーターを有する二本鎖ＤＮＡが生じる。プロモーター配列は、二本鎖のときにＲＮＡポリメラーゼと結合し、プロモータープライマーがハイブリダイズした標的配列の転写を開始させることができる。ＲＮＡポリメラーゼはこのプロモーター配列を用いて、一般に約１００～１，０００コピーの多数のＲＮＡ転写産物（すなわち、アンプリコン）を生成する。新たに合成された各アンプリコンは第二の増幅プライマーとアニールすることができる。次いで、逆転写酵素はＤＮＡコピーを生成することができ、その一方でＲＮアーゼＨ活性によりこのＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖のＲＮＡが分解される。次いで、プロモータープライマーは新たに合成されたＤＮＡと結合することができるため、逆転写酵素は二本鎖ＤＮＡを生成することができ、この二本鎖ＤＮＡからＲＮＡポリメラーゼが多数のアンプリコンを生成する。したがって、２つの増幅プライマーを用いて１０億倍の等温増幅を行うことができる。

【０３３１】

特定の実施形態では、マイクロアレイ解析（Ｈａｎ，Ｍ．ら，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，１９：６３１－６３５，２００１；Ｂａｏ，Ｐ．ら，Ａｎａｌ　Ｃｈｅｍ，７４：１７９２－１７９７，２００２；Ｓｃｈｅｎａら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１０６１４－１９，１９９６；およびＨｅｌｌｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４：２１５０－５５，１９９７）およびＳＡＧＥ（遺伝子発現連続解析）を含めた他の技術を用いて、特定のｃＤＮＡライブラリー由来の転写産物のＲＮＡ転写産物を評価し得る。ＳＡＧＥはＭＰＳＳと同様にデジタル式であり、ＭＰＳＳのような技術から入手できるものに比べると桁数が少ないが、多数のサイン配列を生成することができる（例えば、Ｖｅｌｃｕｌｅｓｃｕ，Ｖ．Ｅ．ら，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｇｅｎｅｔ，１６：４２３－４２５．，２０００；Ｔｕｔｅｊａ　Ｒ．およびＴｕｔｅｊａ　Ｎ．，Ｂｉｏｅｓｓａｙｓ．２００４　Ａｕｇ；２６（８）：９１６－２２を参照されたい）。

【０３３２】

特定の実施形態では、「マイクロアレイ」という用語は、複数の核酸が基質に結合し、その複数の結合した核酸とのハイブリダイゼーションがそれぞれ個別に検出可能である「核酸マイクロアレイ」を包含する。基質は、固体または多孔質、平面状または非平面状、単一型または分散型であり得る。核酸マイクロアレイは、Ｓｃｈｅｎａ（編），ＤＮＡ　Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙｓ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ　Ｓｅｒｉｅｓ），Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９９９）；Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔ．２１（１）（ｓｕｐｐｌ．）：１－６０（１９９９）；Ｓｃｈｅｎａ（編），Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ　Ｂｉｏｃｈｉｐ：Ｔｏｏｌｓ　ａｎｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｅａｔｏｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ／ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　Ｂｏｏｋｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ（２０００）においてそのように称されるすべての装置を包含する。核酸マイクロアレイは、基質と結合した複数の核酸であって、例えばＢｒｅｎｎｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７（４）：１６６５－１６７０（２０００）に記載されているように、単一の平面基質上よりもむしろ複数のビーズ上に配置されている複数の核酸を含み得る。核酸マイクロアレイの例は、その開示が参照により組み込まれる、米国特許第６，３９１，６

２３号、同第６，３８３，７５４号、同第６，３８３，７４９号、同第６，３８０，３７７号、同第６，３７９，８９７号、同第６，３７６，１９１号、同第６，３７２，４３１号、同第６，３５１，７１２号、同第６，３４４，３１６号、同第６，３１６，１９３号、同第６，３１２，９０６号、同第６，３０９，８２８号、同第６，３０９，８２４号、同第６，３０６，６４３号、同第６，３００，０６３号、同第６，２８７，８５０号、同第６，２８４，４９７号、同第６，２８４，４６５号、同第６，２８０，９５４号、同第６，２６２，２１６号、同第６，２５１，６０１号、同第６，２４５，５１８号、同第６，２６３，２８７号、同第６，２５１，６０１号、同第６，２３８，８６６号、同第６，２２８，５７５号、同第６，２１４，５８７号、同第６，２０３，９８９号、同第６，１７１，７９７号、同第６，１０３，４７４号、同第６，０８３，７２６号、同第６，０５４，２７４号、同第６，０４０，１３８号、同第６，０８３，７２６号、同第６，００４，７５５号、同第６，００１，３０９号、同第５，９５８，３４２号、同第５，９５２，１８０号、同第５，９３６，７３１号、同第５，８４３，６５５号、同第５，８１４，４５４号、同第５，８３７，１９６号、同第５，４３６，３２７号、同第５，４１２，０８７号および同第５，４０５，７８３号に見ることができる。

【０３３３】

さらなる例としては、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ社（Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ、Ｃａｌｉｆ．）からＧＥＮＥＣＨＩＰ（商標）の商標名で購入できる核酸アレイが挙げられる。アレイの作製法および使用法のさらなる例は、例えば、米国特許第７，０２８，６２９号；同第７，０１１，９４９号；同第７，０１１，９４５号；同第６，９３６，４１９号；同第６，９２７，０３２号；同第６，９２４，１０３号；同第６，９２１，６４２；および同第６，８１８，３９４号に記載されている。

【０３３４】

アレイおよびマイクロアレイに関連する本発明は、固体基質に付着したポリマーの数多くの用途も企図する。このような用途としては、遺伝子発現モニタリング、プロファイリング、ライブラリースクリーニング、遺伝子型同定および診断が挙げられる。遺伝子発現モニタリングおよびプロファイリングの方法、ならびに遺伝子モニタリングおよびプロファイリングに有用な方法は、米国特許第５，８００，９９２号、同第６，０１３，４４９号、同第６，０２０，１３５号、同第６，０３３，８６０号、同第６，０４０，１３８号、同第６，１７７，２４８号および同第６，３０９，８２２号に記載されている。遺伝子型同定およびその用途は、米国特許出願第１０／４４２，０２１号、同第１０／０１３，５９８号（米国特許出願第２００３／００３６０６９号）ならびに米国特許第５，９２５，５２５号、同第６，２６８，１４１号、同第５，８５６，０９２号、同第６，２６７，１５２号、同第６，３００，０６３号、同第６，５２５，１８５号、同第６，６３２，６１１号、同第５，８５８，６５９号、同第６，２８４，４６０号、同第６，３６１，９４７号、同第６，３６８，７９９号、同第６，６７３，５７９号および同第６，３３３，１７９号に記載されている。本明細書に開示される方法と組み合わせて使用し得る、核酸の増幅、標識および解析のその他の方法は、米国特許第５，８７１，９２８号、同第５，９０２，７２３号、同第６，０４５，９９６号、同第５，５４１，０６１号および同第６，１９７，５０６号に具体的に記載されている。

【０３３５】

当業者には明らかであるように、特定の実施形態は、本明細書に記載のように、増幅または検出にプライマーまたはプローブのようなオリゴヌクレオチドを使用し得る。定められた配列および化学構造のオリゴヌクレオチドを、当業者に公知の技術、例えば化学的または生化学的合成など、および組換え核酸分子、例えば細菌またはウイルスベクターからのｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏ発現などにより作製し得る。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、野生型染色体ＤＮＡまたはそのｉｎ　ｖｉｖｏ転写産物だけで構成されるわけではない。

【０３３６】

所与の改変が所与のオリゴヌクレオチドの所望の機能に適合する限り、任意の方法でオ

リゴヌクレオチドまたはプライマーを改変してもよい。当業者は、所与の改変が本発明の任意のオリゴヌクレオチドに適するまたは望ましいか否かを容易に決定することができる。関連するＡＡＲＳオリゴヌクレオチドは本明細書の他の箇所で詳細に記載されている。

【０３３７】

オリゴヌクレオチドの設計および配列は、本明細書に記載のその機能によって決まるが、いくつかの変数が一般に考慮される。最も関連するものには、長さ、融解温度（Ｔｍ）、特異性、系の他のオリゴヌクレオチドとの相補性、Ｇ／Ｃ含有量、ポリピリミジン（Ｔ、Ｃ）またはポリプリン（Ａ、Ｇ）ストレッチ、および３’末端配列が含まれる。これらのおよびその他の変数の制御は、オリゴヌクレオチド設計の標準的でよく知られた側面であり、最適なオリゴヌクレオチドに関して可能性のある多数のオリゴヌクレオチドをスクリーニングするための様々なコンピュータプログラムを容易に入手することができる。

【０３３８】

したがって、特定の実施形態は、試料中の標的ＡＡＲＳポリヌクレオチドを検出する方法であって、このポリヌクレオチドが本明細書に記載の参照ＡＡＲＳポリヌクレオチドの配列を含み、ａ）試料を、試料中の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を含むプローブとハイブリダイズさせる段階であって、このプローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはそのフラグメントとの間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする段階と、ｂ）前記ハイブリダイズ複合体の有無を検出し、存在すれば任意にその量を検出する段階とを含む、方法を含む。また、試料中の標的ＡＡＲＳポリヌクレオチドを検出する方法であって、このポリヌクレオチドが本明細書に記載の参照ＡＡＲＳポリヌクレオチドの配列を含み、ａ）標的ポリヌクレオチドまたはそのフラグメントを増幅する段階と、ｂ）増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはそのフラグメントの有無を検出し、存在すれば任意にその量を検出する段階とを含む、方法も含まれる。特定の実施形態は、ハイブリダイゼーション、増幅またはその他の検出方法によるＡＡＲＳスプライスバリアントに固有のスプライスジャンクションの検出などにより、ＡＡＲＳスプライスバリアントを検出することに関する。

【０３３９】

本発明の実施形態は、抗体ベースの検出技術を含めた各種のＡＡＲＳポリペプチドベースの検出技術を含む。これらの実施形態には、ＡＡＲＳポリペプチドを使用して抗体またはその他の結合物質を作製することが含まれ、次いで、その抗体またはその他の結合物質を診断方法および診断用組成物に使用して、通常は対象に由来する細胞またはその他の生物試料中の選択されたＡＡＲＳポリペプチドを検出または定量化し得る。

【０３４０】

特定の実施形態では、標準的な方法論および検出法、例えばウエスタンブロット法および免疫沈降法、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、フローサイトメトリー、および画像装置を用いた免疫蛍光アッセイ（ＩＦＡ）などを使用し得る。これらの公知の方法では通常、本発明の選択されたＡＡＲＳポリペプチドまたはそのＡＡＲＳポリペプチドの固有の領域と特異的に結合し、かつ一般的には完全長ＡＡＲＳポリペプチドのような他のＡＡＲＳポリペプチドとほとんど結合しない、本明細書に記載の１つ以上のモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いる。特定の実施形態では、ＡＡＲＳポリペプチドの固有の領域は、ＡＡＲＳの新規に同定されたタンパク質フラグメントが有する固有の三次元構造を示し得る。

【０３４１】

また特定の実施形態では、「マイクロアレイ」のような「アレイ」を使用し得る。特定の実施形態では、「マイクロアレイ」は、基質に結合した一群のまたは複数のポリペプチドを有し、その複数の結合した各ポリペプチドとの結合が個別に検出可能である、「ペプチドマイクロアレイ」または「タンパク質マイクロアレイ」を指すこともある。あるいは、ペプチドマイクロアレイは、本明細書に記載のＡＡＲＳポリペプチドの結合を特異的に検出することができる、特に限定されないがモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、

ファージディスプレイ結合物質、酵母ツーハイブリッド結合物質およびアプタマーを含めた複数の結合物質を有し得る。アレイは、例えばＲｏｂｉｎｓｏｎら，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ８（３）：２９５－３０１（２００２）に記載されているような、これらのＡＡＲＳポリペプチドの自己抗体検出に基づくものであり得る。ペプチドアレイの例は、それぞれ参照により組み込まれる、国際公開第０２／３１４６３号、同第０２／２５２８８号、同第０１／９４９４６号、同第０１／８８１６２号、同第０１／６８６７１号、同第０１／５７２５９号、同第００／６１８０６号、同第００／５４０４６号、同第００／４７７７４号、同第９９／４０４３４号、同第９９／３９２１０号および同第９７／４２５０７号、ならびに米国特許第６，２６８，２１０号、同第５，７６６，９６０号および同第５，１４３，８５４号に見ることができる。

【０３４２】

特定の実施形態では、ＡＡＲＳポリペプチド配列を診断用に検出するために、ＭＳまたはその他の分子量ベースの方法を使用し得る。質量分析法（ＭＳ）は一般に、試料または分子の元素組成を決定するための分析技術を指す。また、ＭＳをペプチドおよびその他の化合物のような分子の化学構造決定に使用することもある。

【０３４３】

一般にＭＳの原理は、化合物をイオン化して荷電分子または荷電分子フラグメントを生成し、次いで、その質量電荷比を測定することからなる。例示的なＭＳ手順では、試料をＭＳ機器にかけて気化させ、試料の成分を各種方法の１つにより（例えば、試料の成分に電子ビームを衝突させることにより）イオン化すると正荷電粒子が形成され、次いで、陽イオンを磁場により加速させ、イオンが磁場を通過する際の詳細な運動に基づいて粒子の質量電荷比（ｍ／ｚ）を計算し、前段階でｍ／ｚに従って選別されたイオンを検出する。

【０３４４】

例示的なＭＳ機器には３つの基本単位、すなわち、気相の試料分子をイオンに変換する（またはエレクトロスプレーイオン化の場合、溶液中に存在するイオンを気相中に移動させる）イオン源；電磁気場を加えてイオンをその質量により選別する質量分析部；および指標量の値を測定して、存在する各イオンの量を計算するためのデータを得る検出部がある。

【０３４５】

ＭＳ技術には、未知化合物の同定、分子中の元素の同位体組成の決定および断片化の観測による化合物の構造決定を含めた、定性的用途と定量的用途の両方がある。他の用途としては、試料中の化合物量の定量化または気相イオン化学（真空中でのイオンおよび中性物質の化学）の基礎の研究が挙げられる。ガスクロマトグラフィー質量分析（ＧＣ／ＭＳまたはＧＣ－ＭＳ）、液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ／ＭＳまたはＬＣ－ＭＳ）およびイオン移動度分光分析／質量分析（ＩＭＳ／ＭＳまたはＩＭＭＳ）が挙げられる。したがって、ＭＳ技術を本明細書に記載のいずれかの方法に従って使用し、生物試料中の本発明のＡＡＲＳポリペプチドの存在またはレベルを測定し、対照試料または予め定められた値と比較し得る。

【０３４６】

特定の実施形態では、細胞分取または細胞視覚化もしくは画像化の装置／技術を用いて、ＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチドの存在またはレベルを検出または定量化し得る。例としては、フローサイトメトリーまたはＦＡＣＳ、免疫蛍光解析（ＩＦＡ）、および蛍光ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）のようなｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション技術が挙げられる。

【０３４７】

特定の実施形態では、診断目的で従来の生物学的方法、ソフトウェアおよびシステムを使用し得る。本発明のコンピュータソフトウェア製品は通常、本発明の方法の論理的段階を行うためのコンピュータ実行命令を有するコンピュータ読取り可能媒体を含む。適当なコンピュータ読取り可能媒体としては、フロッピー（登録商標）ディスク、ＣＤ－ＲＯＭ／ＤＶＤ／ＤＶＤ－ＲＯＭ、ハードディスクドライブ、フラッシュメモリ、ＲＯＭ／ＲＡ

M、磁気テープなどが挙げられる。コンピュータ実行命令は、適当なコンピュータ言語または複数の言語の組合せで書かれていてよい。基礎的な計算生物学は、例えば、SetubalおよびMeidanisら, Introduction to Computational Biology Methods（PWS Publishing Company, Boston, 1997）；Salzberg, Searles, Kasif（編）, Computational Methods in Molecular Biology,（Elsevier, Amsterdam, 1998）；RashidiおよびBuehler, Bioinformatics Basics：Application in Biological Science and Medicine（CRC Press, London, 2000）ならびにOuelette and Bzevanis Bioinformatics：A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins（Wiley & Sons, Inc., 2nd ed., 2001）に記載されている。米国特許第6,420,108号を参照されたい。

【0348】

特定の実施形態では、プローブ設計、データ管理、解析および機器操作のような各種目的で様々なコンピュータプログラム製品およびソフトウェアを使用し得る。米国特許第5,593,839号、同第5,795,716号、同第5,733,729号、同第5,974,164号、同第6,066,454号、同第6,090,555号、同第6,185,561号、同第6,188,783号、同第6,223,127号、同第6,229,911号および同第6,308,170号を参照されたい。

【0349】

全ゲノムサンプリングアッセイ（WGSA）が、例えば、Kennedyら, Nat. Biotech. 21, 1233－1237（2003）、Matsuzakiら, Gen. Res. 14：414－425,（2004）およびMatsuzakiら, Nature Methods 1：109－111（2004）に記載されている。マッピングアッセイで用いるアルゴリズムが、例えば、Liuら, Bioinformatics, 19：2397－2403（2003）およびDiら, Bioinformatics. 21：1958（2005）に記載されている。WGSAおよびWGSAの適用に有用な、WGSAおよびアレイに関連したさらなる方法が、例えば、2005年4月29日に出願された米国特許出願第60／676,058号、2004年10月5日に出願された同第60／616,273号、同第10／912,445号、同第11／044,831号、同第10／442,021号、同第10／650,332号および同第10／463,991号に開示されている。マッピングアッセイを用いた全ゲノム関連研究が、例えば、Huら, Cancer Res.；65（7）：2542－6（2005）、Mitraら, Cancer Res., 64（21）：8116－25（2004）、Butcherら, Hum Mol Genet., 14（10）：1315－25（2005）およびKleinら, Science. 308（5720）：385－9（2005）に記載されている。

【0350】

さらに特定の実施形態は、例えば、米国特許出願第10／197,621号、同第10／063,559号（米国特許出願公開第2002／0183936号）、同第10／065,856号、同第10／065,868号、同第10／328,818号、同第10／328,872号、同第10／423,403号および同第60／482,389号に示される、インターネットのようなネットワーク上の遺伝情報を入手するための方法を含み得る。

【0351】

X．アンチセンス剤およびRNAi剤

また本発明の実施形態は、AARSポリヌクレオチド配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびRNAi剤、ならびに選択されたAARS転写産物および／また

はタンパク質フラグメントの発現を減少させるためのその使用法も含む。特定の実施形態は、本発明のＡＡＲＳタンパク質フラグメントであるスプライスバリアントを生じる１つ以上のスプライスジャンクション（多くの場合は固有である）の標的化に関連する。また、特定のスプライス型を標的として、選択されたタンパク質フラグメントのスプライシングを促進または抑制する、アンチセンスまたはＲＮＡｉ阻害の方法も含まれる。特定の好適な実施形態では、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントを生じるスプライスジャンクションは特定の組織で過剰発現され、そのスプライスバリアントに固有のものである。これらのおよび関連する実施形態では、このようなスプライスバリアントは、標的細胞型における細胞質ＡＡＲＳ活性の唯一の源ではない。例えば、標的となる特定のスプライスバリアントは、所与の細胞または組織中のＡＡＲＳ　ＲＮＡスプライスバリアントの全コピー数の約１０％～５０％、好ましくは、所与の細胞または組織中のＡＡＲＳ　ＲＮＡスプライスバリアントの約１～１０％であり得る。所与の細胞または組織中のＡＡＲＳ　ＲＮＡスプライスバリアントの全コピー数の約１％未満のスプライスバリアントバリアントも標的になり得る。

【０３５２】

特定の実施形態では、完全長タンパク質が、タンパク質合成において鍵となる段階に関与するため、アンチセンス剤またはＲＮＡｉ剤はこのような完全長タンパク質を標的とせず、野生型ＡＡＲＳノックアウトによりしばしば生じる致死性が回避される。したがって、本明細書に記載の特定の方法を用いて、慢性および急性両方の治療における毒性のような望ましくない作用を回避し、かつＡＡＲＳタンパク質フラグメントの非カノニカルな活性を選択的に調節することができる。しかし、特定の実施形態では、標的細胞または組織を殺す、またはその細胞生理を乱すために、完全長ＡＡＲＳ配列を含めたＡＡＲＳ配列を全般的に標的とし得る。

【０３５３】

特定の実施形態では、標的となるＡＡＲＳスプライスバリアントは、非カノニカルな生物活性を有する。いくつかの実施形態では、ＡＡＲＳスプライスバリアントは減少したまたは検出不可能なカノニカルなＡＡＲＳ活性を有し、アンチセンスまたはＲＮＡｉ関連の方法が、より特異的にその非カノニカルな活性を調節する。特定の実施形態では、アンチセンスまたはＲＮＡｉ関連の薬剤を標的化または局所送達のアプローチと組み合わせて、非標的細胞または組織に対する全身性の望ましくない作用を低減することができる。本明細書に記載されている中でも特に、この方法で標的化し得る細胞または組織の例としては、癌細胞、および局所適用による腫瘍または上皮のような局所標的化に適する組織に対する細胞が挙げられる。

【０３５４】

Ａ．アンチセンス剤

「アンチセンスオリゴマー」または「アンチセンス化合物」またはアンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、それぞれが塩基対形成部分を有する環状サブユニットの配列を指す。これらのサブユニットを結合するサブユニット間結合により、塩基対形成部分はＷａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ塩基対形成により核酸（通常はＲＮＡ）内の標的配列とハイブリダイズして、標的配列内で核酸：オリゴマーのヘテロ二本鎖を形成し、通常そのＲＮＡの翻訳を阻害することができる。また、スプライスバリアントまたはタンパク質分解フラグメントおよび／またはその対応するポリペプチドのような選択されたＡＡＲＳ転写産物の発現を調節するためのその使用法も含まれる。

【０３５５】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約８～４０個の間のサブユニット、通常約８～２５個のサブユニット、好ましくは約１２～２５個のサブユニットを含み得る。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、以下で定義されるように、標的配列に対して正確に配列相補的またはほぼ相補的であり得る。特定の実施形態では、標的とアンチセンス標的化配列との間の相補性の程度は、安定な二本鎖を形成するのに十分である。アンチセンスオリゴマーの標的ＲＮＡ配列との相補性の領域は、短くて８～１１塩基でもよいが、好まし

くは１２～１５塩基以上、例えば、１２～２０塩基または１２～２５塩基である（これらの範囲の間にあるすべての整数を含む）。選択されたＡＡＲＳ遺伝子の標的化において、固有の相補的な配列を有するには、一般に約１４～１５塩基のアンチセンスオリゴマーが十分な長さである。特定の実施形態では、本明細書で述べられているように、必要な結合Ｔｍを達成するために、最小の長さの相補的な塩基が必要とされ得る。

【０３５６】

特定の実施形態では、４０塩基の長さのアンチセンスオリゴマーが適することもあり、この場合、少なくとも最小数の塩基、例えば１０～１２塩基が標的配列に相補的である。しかし一般的には、細胞の取込みの促進または活性化が最適化されるのは、オリゴマーの長さが約３０未満のときである。以下で詳細に記載される特定のオリゴマーでは、結合安定性と取込みの最適なバランスは一般に、１８～２５塩基の長さで得られる。約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０個の塩基からなり、このうち少なくとも約６、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０個の連続するまたは不連続の塩基がＡＡＲＳ標的配列またはそのバリアントに相補的である、アンチセンスオリゴマー（例えば、ＰＮＡ、ＬＮＡ、２’－ＯＭｅ、ＭＯＥ）が挙げられる。

【０３５７】

特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ＡＡＲＳ核酸標的配列に１００％相補的であり得るか、または、オリゴマーとＡＡＲＳ核酸標的配列との間で形成されるヘテロ二本鎖が、細胞ヌクレアーゼの作用またはｉｎ　ｖｉｖｏで起こり得る他の様式の分解に抵抗するのに十分に安定である限り、例えばバリアントに適合させるために、ミスマッチを含み得る。「標的配列」という用語は、オリゴヌクレオチドが指向する標的ＲＮＡの一部分、すなわち、オリゴヌクレオチドが、相補的な配列のＷａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ塩基対形成によりハイブリダイズする配列を指す。特定の実施形態では、標的配列は、ＡＡＲＳ　ｍＲＮＡの連続する領域（例えば、ＡＡＲＳ　ｍＲＮＡの固有のスプライスジャンクション）であり得るか、またはｍＲＮＡの不連続領域から構成され得る。

【０３５８】

ヌクレアーゼによる切断に対して比較的感受性の低いオリゴマー骨格を以下に述べる。ミスマッチが存在すれば、それはハイブリッド二本鎖の中央部よりも末端領域に向かうほど不安定化作用が低い。許容されるミスマッチ数は、よく理解されている二本鎖安定性の原理によれば、オリゴマーの長さ、二本鎖中のＧ：Ｃ塩基対のパーセンテージおよび二本鎖中でのミスマッチ（１つまたは複数）の位置によって決まる。このようなアンチセンスオリゴマーは、ＡＡＲＳ核酸標的配列に必ずしも１００％相補的である必要はないが、核酸標的の生物活性、例えばＡＡＲＳタンパク質（１つまたは複数）の発現を調節するためには、標的配列と安定的かつ特異的に結合するのが効率的である。

【０３５９】

オリゴマーと標的配列との間で形成される二本鎖の安定性は、結合Ｔｍと、細胞酵素による切断に対する二本鎖の感受性によって決まる。相補的配列のＲＮＡに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのＴｍは、Ｈａｍｅｓら，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ，ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ，１９８５，ｐｐ．１０７－１０８またはＭｉｙａｄａ　Ｃ．Ｇ．に記載されているような従来の方法により、またＷａｌｌａｃｅ　Ｒ．Ｂ．，１９８７，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．Ｖｏｌ．１５４　ｐｐ．９４－１０７に記載されている通りに測定し得る。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、相補的配列のＲＮＡに対して、体温よりも高い、好ましくは５０℃よりも高い結合Ｔｍを有し得る。６０～８０℃またはそれより高い範囲のＴｍが好ましい。公知の原理によれば、相補性に基づくＲＮＡハイブリッドに関するオリゴマー化合物のＴｍは、二本鎖

中のＣ：Ｇ対塩基の比を増加させることにより、および／またはヘテロ二本鎖の（塩基対の）長さを増加させることにより、増大させることができる。同時に、細胞内取込みを最適化させるためには、アンチセンスオリゴマーの大きさを制限することが有利である。このような理由で、高いＴｍ値を得るのに２５塩基よりも多く必要とする化合物よりも、２５塩基以下の長さで高いＴｍ（５０℃以上）示す化合物の方が一般に好ましい。

【０３６０】

アンチセンスオリゴマーは、ｍＲＮＡの翻訳をブロックまたは阻害するように、または天然のプレｍＲＮＡスプライス過程を阻害するように、または標的ｍＲＮＡの分解を誘導するに設計することが可能であり、ハイブリダイズする標的配列を「指向する」または「標的とする」と呼ばれることがある。特定の実施形態では、標的配列は、ＡＡＲＳ　ｍＲＮＡ転写産物の任意のコード配列または非コード配列を含んでよく、したがって、エクソン内またはイントロン内にあってよい。特定の実施形態では、標的配列はＡＡＲＳ（例えば、完全長ＡＡＲＳ）の中では比較的固有または例外的であり、選択されたＡＡＲＳタンパク質フラグメント（例えばタンパク質分解フラグメントまたはスプライスバリアントなど）の発現の減少に関して選択的である。特定の実施形態では、標的部位は、プレプロセシングされたｍＲＮＡの３’もしくは５’スプライス部位、または分岐点を含む。スプライス部位の標的配列は、プレプロセシングされたｍＲＮＡのスプライスアクセプタージャンクションの下流またはスプライスドナージャンクションの上流１～約２５～約５０塩基対の５’末端を有するｍＲＮＡ配列を含み得る。特定の実施形態では、標的配列は選択的スプライスＡＡＲＳ　ｍＲＮＡのスプライスジャンクション、例えば完全長ＡＡＲＳでは生じない、または他のＡＡＲＳスプライスバリアントでは生じないか、もしくはごく稀にしか生じないという点でその転写産物に固有または例外的であるスプライスジャンクションなどを含み得る。オリゴマーが標的の核酸に対して本明細書に記載の様式で標的化されている場合、より一般的にはそれを、参照ＡＡＲＳポリヌクレオチドのような生物学的に関連する標的「に対して標的化されている」と呼ぶ。

【０３６１】

オリゴヌクレオチドは通常、標的ＤＮＡまたはＲＮＡのような標的配列に相補的である。「相補的」および「相補性」という用語は、塩基対形成の法則により関係しているポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）を指す。例えば、配列「Ａ－Ｇ－Ｔ」は配列「Ｔ－Ｃ－Ａ」に相補的である。相補性は「部分的」なこともあり、その場合、核酸塩基の一部のみが塩基対形成の法則に従ってマッチしている。あるいは、核酸の間に「完全な」相補性（１００％）が存在し得る。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に大きな影響を与える。多くの場合、完全な相補性が望まれるが、いくつかの実施形態は、標的配列に対して１つ以上、好ましくは２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１個のミスマッチ含み得る。オリゴマー内での任意の位置での変化が含まれる。特定の実施形態では、オリゴマーの末端付近での配列の変化は、一般に内部での変化よりも好ましく、それが存在する場合、通常、５’および／または３’末端から約１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１ヌクレオチド以内である。

【０３６２】

「標的化配列」または特定の実施形態では「アンチセンス標的化配列」という用語は、ＤＮＡまたはＲＮＡ標的分子内の標的配列に相補的な（実質的に相補的という意味でもある）、オリゴヌクレオチド内の配列を指す。アンチセンス化合物の全配列またはその一部分が標的配列に相補的であり得る。例えば、２０～３０塩基のオリゴヌクレオチドでは、約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８または２９個の塩基が、標的領域に相補的な標的化配列であり得る。通常、標的化配列は連続する塩基から形成されるが、代わりに、例えばオリゴヌクレオチドの正反対から合わせると標的配列に及ぶ配列となる、不連続の配列から形成されていてもよい。

【０３６３】

標的と標的化配列は、逆平行の配置でハイブリダイゼーションが生じれば、互いに「相補的」であると呼ばれる。標的化配列は、標的配列に対して「ほぼ」または「実質的に」相補的であり、かつ依然として本発明の目的のために機能し得る、すなわち、依然として機能的に「相補的」であり得る。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的配列に対して最大で１０ヌクレオチド中１個、好ましくは最大で２０ヌクレオチド中１個のミスマッチを有し得る。あるいは、オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載のＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチド配列またはその相補体に対して、少なくとも約８０％、８５％、９０％の配列相同性、好ましくは少なくとも９５％配列相同性を有し得る。

【０３６４】

オリゴマーが、生理的条件下で標的（例えば、ＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチドまたはその相補体）とハイブリダイズし、Ｔｍが実質的に４５℃より大きい、好ましくは少なくとも５０℃、通常は６０℃～８０℃以上である場合、オリゴヌクレオチドは標的ポリヌクレオチドと「特異的にハイブリダイズする」ことになる。このようなハイブリダイゼーションは、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に相当する。所与のイオン強度およびｐＨにおいて、Ｔｍとは、標的配列の５０％が相補的なポリヌクレオチドとハイブリダイズする温度のことである。繰り返すが、このようなハイブリダイゼーションは、アンチセンスオリゴマーが標的配列に対して正確に相補的である場合だけでなく、「ほぼ」または「実質的に」相補的である場合でも生じ得る。

【０３６５】

特異的に結合するまたは特異的にハイブリダイズするという用語は一般に、選択されたハイブリダイゼーション条件下で対象とする標的試料中の遺伝子配列と結合するだけでなく、試料中の他の標的配列とほとんど結合しないため、標的プール中の対象とする標的と他のすべての標的とを識別する、オリゴヌクレオチドプローブまたはポリヌクレオチド配列を指す。また、対象とする標的配列と特異的にハイブリダイズするプローブは、本明細書に記載のように、選択されたハイブリダイゼーション条件下での濃度の差も検出し得る。

【０３６６】

「ヌクレアーゼ耐性」オリゴマー分子（オリゴマー）は、非ハイブリダイズ形態またはハイブリダイズ形態において、その骨格が体内の通常の細胞外および細胞内ヌクレアーゼによるヌクレアーゼ切断に対して実質的に耐性であるオリゴマー分子を指す、すなわち、体内で曝される通常のヌクレアーゼ条件下で、そのオリゴマーがヌクレアーゼ切断をほとんどまたは全く示さないということである。

【０３６７】

「ヘテロ二本鎖」は、オリゴヌクレオチドと、標的ＤＮＡまたはＲＮＡのような標的ポリヌクレオチドの相補的部分との間の二本鎖を指す。「ヌクレアーゼ耐性ヘテロ二本鎖」は、二本鎖のＲＮＡ／ＲＮＡまたはＲＮＡ／ＤＮＡ複合体を切断することができる、ＲＮアーゼＨのような細胞内および細胞外ヌクレアーゼによるｉｎ　ｖｉｖｏ分解に対してヘテロ二本鎖が実質的に耐性となるように、オリゴマーがその相補的な標的と結合することにより形成されたヘテロ二本鎖を指す。

【０３６８】

オリゴヌクレオチドの「サブユニット」は、１つのヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）単位を指す。この用語は、サブユニット間結合を有するまたは有さないヌクレオチド単位を指し得るが、「荷電サブユニット」というときは、電荷は通常、サブユニット間結合（例えば、リン酸もしくはホスホロチオアート結合または陽イオン結合）内に存在する。

【０３６９】

オリゴヌクレオチドの環状サブユニットは、リボースもしくは別のペントース糖、または特定の実施形態では、別のもしくは修飾された基に基づくものであり得る。修飾オリゴヌクレオチド骨格の例としては、ホスホロチオアート、キラルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３’－ア

ルキレンホスホナートおよびキラルホスホナートを含めたメチルおよびその他のアルキルホスホナート、ホスフィナート、３’－アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダートを含めたホスホルアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびに通常の３’－５’結合を有するボラノリン酸、これらの２’－５’結合類似体、ならびに隣接するヌクレオシド単位のペアが３’－５’と５’－３’または２’－５’と５’－２’で結合し極性の反転したものが挙げられるが、これらに限定されない。また、当該技術分野で公知のヌクレオチドの中でも特に、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックト核酸（ＬＮＡ）、２’－Ｏ－メチルオリゴヌクレオチド（２’－ＯＭｅ）、２’－メトキシエトキシオリゴヌクレオチド（ＭＯＥ）オリゴも企図される。

【０３７０】

プリンまたはピリミジン塩基対形成部分は通常、アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、チミンまたはイノシンである。また、ピリジン－４－オン、ピリジン－２－オン、フェニル、プソイドウラシル、２，４，６－トリメトキシベンゼン、３－メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、５－アルキルシチジン（例えば、５－メチルシチジン）、５－アルキルウリジン（例えば、リボチミジン）、５－ハロウリジン（例えば、５－ブロモウリジン）または６－アザピリミジンまたは６－アルキルピリミジン（例えば、６－メチルウリジン）、プロピン、キューソシン（ｑｕｅｓｏｓｉｎｅ）、２－チオウリジン、４－チオウリジン、ワイブトシン、ワイブトキソシン、４－アセチルチジン（ａｃｅｔｙｌｔｉｄｉｎｅ）、５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、５’－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン、β－Ｄ－ガラクトシルキュエオシン、１－メチルアデノシン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアノシン、３－メチルシチジン、２－メチルアデノシン、２－メチルグアノシン、Ｎ６－メチルアデノシン、７－メチルグアノシン、５－メトキシアミノメチル－２－チオウリジン、５－メチルアミノメチルウリジン、５－メチルカルボニルネチルウリジン（ｍｅｔｈｙｌｃａｒｂｏｎｙｈｎｅｔｈｙｌｕｒｉｄｉｎｅ）、５－メチルオキシウリジン、５－メチル－２－チオウリジン、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデノシン、β－Ｄ－マンノシルキュエオシン、ウリジン－５－オキシ酢酸、２－チオシチジン、スレオニン誘導体など（Ｂｕｒｇｉｎら，１９９６，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３５，１４０９０；Ｕｈｌｍａｎ　＆　Ｐｅｙｍａｎ，上記）のような塩基も含まれる。本態様における「修飾塩基」は、上に例示したようなアデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、チミン（Ｔ）およびウラシル（Ｕ）以外のヌクレオチド塩基を意味し、このような塩基をアンチセンス分子の任意の位置で使用することができる。オリゴマーの用途に応じて、ＴとＵは互換性があることを当業者は理解するであろう。例えば、ＲＮＡの方に類似した２’－Ｏ－メチルアンチセンスオリゴヌクレオチドのような他のアンチセンス化合物では、Ｔ塩基をＵと表すことがある。

【０３７１】

上述のように、本明細書に記載の特定のオリゴヌクレオチドはペプチド核酸（ＰＮＡ）を含む。ペプチド核酸（ＰＮＡ）とは、骨格が構造的にデオキシリボース骨格と同形で、ピリミジンまたはプリン塩基が結合したＮ－（２－アミノエチル）グリシン単位からなる、ＤＮＡの類似体のことである。天然のピリミジンおよびプリン塩基を含むＰＮＡは、Ｗａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ塩基対形成の法則に従って相補的なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、塩基対認識という点でＤＮＡを模倣する（Ｅｇｈｏｌｍ，Ｂｕｃｈａｒｄｔら，１９９３）。ＰＮＡの骨格はホスホジエステル結合ではなくペプチド結合により形成されているため、ＰＮＡはアンチセンス適用によく適している（以下の構造を参照されたい）。骨格が非荷電であるため、通常よりも高い熱安定性を示すＰＮＡ／ＤＮＡまたはＰＮＡ／ＲＮＡ二本鎖が生じる。ＰＮＡはヌクレアーゼまたはプロテアーゼによって認識されない。

【０３７２】

当該技術分野で公知の任意の技術を用いて、ＰＮＡを合成により作製し得る。ＰＮＡは

、ＤＮＡの従来のリン酸リボース環がポリアミド骨格に置き換わったＤＮＡ類似体である。ＰＮＡは、天然の構造を根本的に変化させたものであるにもかかわらず、ＤＮＡまたはＲＮＡとヘリックス形態で配列特異的に結合することができる。ＰＮＡの特徴としては、相補的なＤＮＡまたはＲＮＡに対する高い結合親和性、単一塩基ミスマッチにより生じる不安定化作用、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼに対する耐性、塩濃度と無関係なＤＮＡまたはＲＮＡとのハイブリダイゼーション、ならびにホモプリンＤＮＡとの三重鎖形成が挙げられる。Ｐａｎａｇｅｎｅ（商標）社は、特許登録されたＢｔｓ　ＰＮＡモノマー（Ｂｔｓ；ベンゾチアゾール－２－スルホニル基）および特許登録されたオリゴマー形成工程を開発した。Ｂｔｓ　ＰＮＡモノマーを用いたＰＮＡオリゴマー形成は、脱保護、カップリングおよびキャップ形成の反復サイクルからなる。Ｐａｎａｇｅｎｅ社のこの技術に対する特許としては、米国特許第６９６９７６６号、同第７２１１６６８号、同第７０２２８５１号、同第７１２５９９４号、同第７１４５００６号および同第７１７９８９６号が挙げられる。ＰＮＡ化合物の調製を教示する代表的な米国特許としては、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，５３９，０８２号；同第５，７１４，３３１号；および同第５，７１９，２６２号が挙げられるが、これらに限定されない。ＰＮＡ化合物のさらなる教示は、Ｎｉｅｌｓｅｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９１，２５４，１４９７に見ることができる。

【０３７３】

また「ロックト核酸」サブユニット（ＬＮＡ）も含まれる。ＬＮＡの構造は当該技術分野で公知である（例えば、Ｗｅｎｇｅｌら，Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ（１９９８）４５５；Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ（１９９８）５４，３６０７およびＡｃｃｏｕｎｔｓ　ｏｆ　Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓｅａｒｃｈ（１９９９）３２，３０１）；Ｏｂｉｋａら，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔｅｒｓ（１９９７）３８，８７３５；（１９９８）３９，５４０１およびＢｉｏｏｒｇａｎｉｃ　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（２００８）１６，９２３０）。

【０３７４】

オリゴヌクレオチドは１つ以上のＬＮＡを組み込み得るが、いくつかの場合には、化合物は完全にＬＮＡで構成され得る。個々のＬＮＡヌクレオシドサブユニットの合成およびオリゴヌクレオチドへのその組込みの方法は当該技術分野で公知である（米国特許第７，５７２，５８２号、同第７，５６９，５７５号、同第７，０８４，１２５号、同第７，０６０，８０９号、同第７，０５３，２０７号、同第７，０３４，１３３号、同第６，７９４，４９９号；および同第６，６７０，４６１号）。典型的なサブユニット間リンカーとしては、ホスホジエステルおよびホスホロチオアート部分が挙げられるが、リンを含まないリンカーを代わりに使用してもよい。好適な実施形態は、各ＬＮＡサブユニットがＤＮＡサブユニット（すなわち、デオキシリボースヌクレオチド）により分離されているＬＮＡ含有化合物である。さらに好適な化合物は、交互に存在するＬＮＡおよびＤＮＡのサブユニットからなり、サブユニット間のリンカーがホスホロチオアートである。

【０３７５】

特定のオリゴヌクレオチドは、非荷電または実質的に非荷電である結合により結合した、塩基対形成部分を有するモルホリノベースのサブユニットを含み得る。「モルホリノオリゴマー」または「ＰＭＯ」（ホスホルアミダートまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー）という用語は、モルホリノサブユニット構造からなり、（ｉ）その構造がリン含有結合により結合しており、リン含有結合は、原子１～３個の長さ、好ましくは原子２個の長さで、好ましくは非荷電または陽イオン性であり、リン含有結合１つのサブユニットのモルホリノ窒素と、隣接するサブユニットの５’環外炭素とを結合させている結合であり、かつ（ｉｉ）各モルホリノ環は、塩基特異的水素結合によりポリペプチド中の塩基と結合するのに有効な、プリンもしくはピリミジンまたはそれに相当する塩基対形成部分を有する、オリゴヌクレオチド類似体を指す。

【０３７６】

結合または活性に干渉しない限り、この結合を変化させることができる。例えば、リン

と結合した酸素を硫黄で置換し得る（チオホスホロジアミダート）。５’酸素をアミノまたは低級アルキル置換アミノで置換し得る。リンと結合しているペンダント窒素は、未置換、または（任意に置換された）低級アルキルによる一置換もしくは二置換であり得る。プリンまたはピリミジン塩基対形成部分は通常、アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、チミンまたはイノシンである。モルホリノオリゴマーの合成、構造および結合特性は、米国特許第５，６９８，６８５号、同第５，２１７，８６６号、同第５，１４２，０４７号、同第５，０３４，５０６号、同第５，１６６，３１５号、同第５，５２１，０６３および同第５，５０６，３３７号、ならびに国際出願ＰＣＴ／ＵＳ０７／１１４３５号（陽イオン結合）および同ＵＳ０８／０１２８０４号（改良された合成）（すべて参照により本明細書に組み込まれる）に詳述されている。

【０３７７】

またモルホリノサブユニットは、以下で詳細に記載されているように、非リンベースのサブユニット間結合により結合していてもよく、ここでは少なくとも１つの結合が上記ペンダント陽イオン基で修飾されている。未修飾の状態では非荷電であるが、ペンダントアミン置換基も有し得る、その他のオリゴヌクレオチド類似体結合を使用することができる。例えば、スルファミド結合または尿素結合（リンがそれぞれ炭素または硫黄に置き換わっている）において、モルホリノ環状の５’窒素原子が使用され、上の構造（ｂ３）の５’－窒素原子に類似した様式で修飾され得る。

【０３７８】

特定の実施形態は、実質的に非荷電のホスホロジアミダート結合したモルホリノオリゴマーのような、実質的に非荷電のモルホリノオリゴマーを含む。オリゴヌクレオチド類似体の実質的に非荷電のリン含有骨格は、サブユニット結合の大部分、例えばその結合の５０～１００％の間、通常、少なくとも６０％～１００％または７５％または８０％が生理的ｐＨにおいて非荷電であり、かつ単一のリン原子を含む。リン含有骨格を有するモルホリノオリゴヌクレオチドの例としては、ホスホロアミダート結合したおよびホスホロジアミダート結合したモルホリノオリゴヌクレオチドが挙げられる。特定の実施形態は、好ましくはその骨格結合の約１０％～５０％が正荷電基を含み得る。

【０３７９】

モルホリノベースのサブユニットの特性としては、例えば、安定な非荷電または正荷電骨格結合によりオリゴマー形態で結合する能力、形成されるポリマーが相補的塩基の標的核酸（標的ＲＮＡを含む）とハイブリダイズし得るようにヌクレオチド塩基（例えば、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン、ウラシルおよびヒポキサンチン）を支持する能力、比較的短いオリゴヌクレオチド（例えば、１０～１５塩基）で約４５℃を上回るＴｍ値、オリゴヌクレオチドが能動的または受動的に哺乳動物細胞内へ輸送される能力、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド：ＲＮＡヘテロ二本鎖がそれぞれ、ＲＮアーゼおよびＲＮアーゼＨによる分解に抵抗する能力が挙げられる。

【０３８０】

特定の実施形態では、実質的に非荷電のオリゴヌクレオチドを、例えば、非荷電結合２～５個当たり約１個以下、例えば非荷電結合１０個当たり約４～５個などの荷電結合を含むように修飾し得る。特定の実施形態では、骨格結合の約２５％が陽イオン性である場合に、アンチセンス活性の最適な向上が見られ得る。特定の実施形態では、少数の、例えば１０～２０％の陽イオン結合で、または陽イオン結合の数が５０～８０％の範囲、例えば約６０％などである場合に、増強が見られ得る。特定の実施形態では、電荷の大部分をアンチセンスオリゴヌクレオチドの「中心領域」の骨格結合付近に分布させる、例えば、８個の陽イオン骨格結合を有する２０量体オリゴヌクレオチドにおいて、これらの荷電結合の少なくとも７０％を中央の１０個の結合に局在させることにより、陽イオン骨格電荷をさらに増大させ得る。

【０３８１】

ＡＡＲＳポリヌクレオチド参照配列またはその相補体の１つ以上の部分を標的とするオリゴヌクレオチドを、本明細書に記載のおよび当業者に明らかな治療、診断または薬剤ス

クリーニングの方法のいずれにおいても使用し得る。

【０３８２】

Ｂ．ＲＮＡ干渉剤

特定の実施形態は、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）参照ポリヌクレオチドの１つ以上のｍＲＮＡ転写産物（そのフラグメントおよびスプライスバリアントを含む）を標的とするＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）剤に関する。また、例えばＡＡＲＳスプライスバリアントまたは内因性タンパク質分解フラグメントのような選択されたＡＡＲＳ転写産物を調節するためのその使用法も含まれる。

【０３８３】

「二本鎖の」という用語は、鎖の少なくとも一部分が、水素結合して二本鎖構造を形成する程度に相補的である領域を含む、２つの別々の核酸鎖を意味する。「二本鎖」または「二本鎖構造」という用語は、２つの別々の鎖が実質的に相補的で互いにハイブリダイズしている、二本鎖分子の領域を指す。「ｄｓＲＮＡ」は、２つの相補的で逆平行の核酸鎖（すなわち、センス鎖とアンチセンス鎖）を含む二本鎖構造を有する、リボ核酸分子を指す。ｄｓＲＮＡのすべてのヌクレオチドがＷａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ塩基対を示す必要はなく、２つのＲＮＡ鎖が実質的に相補的であってもよい。２つのＲＮＡ鎖は、ヌクレオチドの数が同じであっても異なっていてもよい。

【０３８４】

特定の実施形態では、ｄｓＲＮＡは、標的ＲＮＡに対して少なくとも部分的に相補的である領域であるか、またはこれを含む。特定の実施形態では、ｄｓＲＮＡは標的ＲＮＡに対して完全に相補的である。ｄｓＲＮＡと標的が完全に相補的である必要はないが、ｄｓＲＮＡまたはその切断産物が標的ＲＮＡのＲＮＡｉ切断などによる配列特異的サイレンシングを指令できる程度には一致していなければならない。標的鎖との相補性または相同性の程度は通常、アンチセンス鎖において最も重要である。特にアンチセンス鎖においては完全な相補性が望まれる場合が多いが、いくつかの実施形態は、標的ＲＮＡに対して１つ以上、好ましくは６、５、４、３、２個以下のミスマッチを含み得る。ミスマッチは末端領域で最も許容され、これが存在する場合、末端領域または５’および／または３’末端の例えば６、５、４もしくは３ヌクレオチド以内の領域に存在することが好ましい。センス鎖は、アンチセンス鎖に対して、分子の全体的な二本鎖性を維持する程度に実質的に相補的であればよい。

【０３８５】

本明細書で使用される「修飾ｄｓＲＮＡ」は、同じ標的ＲＮＡを認識する同一のｄｓＲＮＡ分子よりもヌクレアーゼ（例えば、タンパク質キナーゼ）に対する耐性を高める少なくとも１つの修飾を含む、ｄｓＲＮＡ分子を指す。修飾ｄｓＲＮＡｓは、一本鎖ヌクレオチドオーバーハングおよび／または少なくとも１つの置換ヌクレオチドを含む。

【０３８６】

本明細書で使用される「ヌクレオチドオーバーハング」は、一方のＲＮＡ鎖の３’末端が他方の鎖の５’末端よりもはみ出しているまたはその逆の場合に二本鎖構造から突出している、対形成しない１つまたは複数のヌクレオチドを指す。「平滑」または「平滑末端」は、ｄｓＲＮＡの末端部分に対形成しないヌクレオチドが存在しない、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングが存在しないことを意味する。「平滑末端」ｄｓＲＮＡとは、その全長にわたって二本鎖である、すなわち、分子のどちらの端にもヌクレオチドオーバーハングが存在しないｄｓＲＮＡのことである。

【０３８７】

本明細書で使用される「末端塩基対」という用語は、二本鎖分子の二本鎖領域の一端にある最後のヌクレオチド塩基対を指す。例えば、ｄｓＲＮＡなどの分子が平滑末端である（すなわち、ヌクレオチドオーバーハングがない）場合、分子両端の最後のヌクレオチド塩基対が末端塩基対となる。ｄｓＲＮＡなどの分子が二本鎖構造の一端または両端にヌクレオチドオーバーハングを有する場合、ヌクレオチドオーバーハング（１つまたは複数）のすぐ隣にある最後のヌクレオチド塩基対（１つまたは複数）が、分子のその末端（１つ

または複数）の末端塩基対となる。

【０３８８】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、選択されたフラグメントまたはスプライスバリアントのようなＡＡＲＳ転写産物の発現を減少させるための調節物質として、二本鎖リボ核酸（ｄｓＲＮＡ）分子を用いる。ｄｓＲＮＡｓは一般に、２つの一本鎖を含む。ｄｓＲＮＡの一方の鎖は、標的遺伝子または標的領域の一部分と実質的に同一のヌクレオチド配列を含み（「センス」鎖）、他方の鎖（「相補的」鎖または「アンチセンス」鎖）は、標的領域の一部分と実質的に相補的な配列を含む。２つの鎖は、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成する程度に相補的である。特定の実施形態では、相補的なＲＮＡ鎖は、長さが３０ヌクレオチド未満、２５ヌクレオチド未満、または長さが１９～２４ヌクレオチドであり得る。特定の態様では、相補的なヌクレオチド配列は、２０～２３ヌクレオチドの長さまたは２２ヌクレオチドの長さであり得る。

【０３８９】

特定の実施形態では、少なくとも一方のＲＮＡ鎖が、１～４ヌクレオチドの長さのヌクレオチドオーバーハングを含む。他の実施形態では、ｄｓＲＮＡは、少なくとも１つの化学的に修飾されたヌクレオチドをさらに含み得る。特定の態様では、１～４ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを含むｄｓＲＮＡは、末端ヌクレオチド対と直接隣り合う一本鎖オーバーハングの対形成しないヌクレオチドがプリン塩基を含む分子を含み得る。他の態様では、ｄｓＲＮＡ両端の最後の相補的クレオチド対がＧ－Ｃ対であるか、または最後の４つの末端ヌクレオチド対の少なくとも２つがＧ－Ｃ対である。

【０３９０】

本発明の特定の実施形態は、マイクロＲＮＡを含み得る。マイクロＲＮＡは、生物内で自然に産生される低分子ＲＮＡの１つの大きなグループであり、その一部のものは標的遺伝子の発現を調節する。マイクロＲＮＡは、約７０ヌクレオチドの一本鎖ヘアピン前駆体転写産物からダイサーにより形成される（Ｖ．Ａｍｂｒｏｓら，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１３：８０７，２００３）。特定のマイクロＲＮＡは、ヘアピンＲＮＡ前駆体として転写された後、ダイサー酵素によりプロセシングされて成熟型となる。

【０３９１】

特定の実施形態では、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）も使用し得る。特定の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの第一の鎖が、ヌクレオシド残基を第二の鎖よりも２個多く含む。他の実施形態では、第一の鎖と第二の鎖が同じ数のヌクレオシドを有するが、第一と第二の鎖は、第一と第二の鎖の２つの末端ヌクレオシドが相補鎖上の残基と対形成しないように相殺的であり得る。特定の場合には、対形成しない２つのヌクレオシドはチミジン残基である。

【０３９２】

また、短鎖ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡｓ）およびマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）も含まれる。ｓｈＲＮＡの二本鎖構造は、単一の自己相補的なＲＮＡ鎖により形成され、ＲＮＡ二本鎖形成は、細胞内または細胞外のいずれでも開始され得る。マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）は、２０～２２ヌクレオチドの非コード低分子ＲＮＡであり、通常、プレｍｉＲＮＡとして知られる約７０ヌクレオチドの折り返したＲＮＡ前駆体から切り出される。

【０３９３】

調節物質がｓｉＲＮＡを含む場合、その物質は、ｓｉＲＮＡ剤またはそのフラグメントが標的ＲＮＡの下方調節を仲介できるように、標的領域と十分に相同な領域を含み、かつヌクレオチドの長さが十分であるべきである。「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語は、修飾ＲＮＡまたはヌクレオチド代替物の場合、１つ以上の位置にある修飾ヌクレオチドまたは代替置換部分も表し得ることが理解されるであろう。したがってｓｉＲＮＡ剤は、本明細書に記載のように、標的ＲＮＡに対して少なくとも部分的に相補的な領域であるか、またはそれを含む。

【０３９４】

さらにｓｉＲＮＡ調節物質は、修飾されているか、またはヌクレオシド代替物を含んで

いてもよい。ｓｉＲＮＡ剤の一本鎖領域が修飾されているか、またはヌクレオシド代替物を含んでいてもよく、例えば、対形成していない領域またはヘアピン構造の領域、例えば２つの相補的な領域を結ぶ領域が、修飾されているか、またはヌクレオシド代替物を有していてもよい。ｓｉＲＮＡ剤の１つ以上の３’または５’－末端を、例えばエキソヌクレアーゼに対して安定化させる、またはアンチセンスｓｉＲＮＡ剤がＲＩＳＣ内に入るのを補助するための修飾も有効である。修飾は、Ｃ３（またはＣ６、Ｃ７、Ｃ１２）アミノリンカー、チオールリンカー、カルボキシルリンカー、非ヌクレオチドスペーサー（Ｃ３、Ｃ６、Ｃ９、Ｃ１２、脱塩基、トリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール）、およびホスホラミダイトを生じ、また別のＤＭＴ保護ヒドロキシル基を有しＲＮＡ合成の際に複数のカップリングを可能にする、特殊なビオチンまたはフルオレセイン試薬を含み得る。

【０３９５】

ｓｉＲＮＡ剤は、例えば、インターフェロン応答を誘発する程度の長さの分子（ダイサーにより切断されて（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎら，２００１．Ｎａｔｕｒｅ，４０９：３６３－３６６）、ＲＩＳＣ（ＲＮＡｉ誘導型サイレンシング複合体）に入ることができる）、およびインターフェロン応答を誘発しない程度に十分に短い分子（この分子もダイサーにより切断され、かつ／またはＲＩＳＣに入ることができる）、例えばＲＩＳＣ内に入ることが可能な大きさの分子、例えばダイサー切断産物に類似している分子を含み得る。ｓｉＲＮＡ調節物質またはその切断産物は、例えば、標的ＲＮＡ、好ましくは選択されたスプライスバリアントのようなＡＡＲＳ標的に対してＲＮＡｉを誘導することにより、標的遺伝子を下方制御することができる。

【０３９６】

ｓｉＲＮＡ剤の各鎖は、３５、３０、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６または１５ヌクレオチド以下の長さであり得る。鎖は、好ましくは少なくとも１９ヌクレオチドの長さである。例えば、各鎖は２１～２５ヌクレオチドの間の長さであり得る。好適なｓｉＲＮＡ剤は、１７、１８、１９、２９、２１、２２、２３、２４または２５ヌクレオチド対の二本鎖領域と、１つ以上のオーバーハング、好ましくは２～３ヌクレオチドの１つまたは２つの３’オーバーハングとを有する。

【０３９７】

標的ＲＮＡとの相同性および標的遺伝子を下方制御する能力に加えて、ｓｉＲＮＡ剤は、以下の特性を１つ以上有し得る：非常に多くのまたはすべてのヌクレオシドに対する修飾にもかかわらず、正確な塩基対を形成し、例えば標的ＲＮＡの切断による標的の下方制御が可能な程度に十分な、相同な標的ＲＮＡとの二本鎖を形成することができるように、適切な三次元フレームワークで塩基（または修飾塩基）を提示することができるアンチセンス鎖を有し得る；非常に多くのまたはすべてのヌクレオシドに対する修飾にもかかわらず、依然として「ＲＮＡ様の」特性を有し得る、例えば、リボヌクレオチドベースの含有物だけまたはその一部であっても、ＲＮＡ分子の全体的な構造、化学的特性および物理的特性を有し得る。例えば、ｓｉＲＮＡ剤は、例えば、すべてのヌクレオチド糖が、例えば２’ヒドロキシルの代わりに２’フルオロを含むセンスおよび／またはアンチセン鎖を含み得る。このデオキシリボヌクレオチド含有物質は依然として、ＲＮＡ様の特性を示すことが予想され得る。理論に拘束されることを望むものではないが、負の電荷を有するフッ素は、リボースＣ２’位置に結合した場合、軸方向の配向を好む。そして、フッ素のこの空間的選択性が糖にＣ３’エンドパッカー構造をとらせ得る。これはＲＮＡ分子で見られるものと同じパッカリング様式であり、ＲＮＡに特徴的なＡファミリー形のヘリックスを生じる。さらに、フッ素は優れた水素結合アクセプターであるため、ＲＮＡ構造を安定化させることが知られている、水分子と同じ水素結合相互作用に関与することができる。一般に、２’糖位置の修飾部分が、デオキシリボヌクレオチドのＨ部分よりもリボヌクレオチドのＯＨ部分に特徴的なＨ結合内に入ることが可能であるのが好ましい。

【０３９８】

本明細書で使用される「一本鎖ＲＮＡｉ剤」とは、単一分子からなるＲＮＡｉ剤のこと

である。一本鎖ＲＮＡｉ剤は、鎖間対形成により形成される二本鎖領域を含んでいてもよく、例えば、一本鎖ＲＮＡｉ剤は、ヘアピン型もしくはフライパンの柄型の構造であるか、またはそれを含み得る。一本鎖ＲＮＡｉ調節物質は、好ましくは標的分子に対してアンチセンスである。一本鎖ＲＮＡｉ調節物質は、ＲＩＳＣに入り、ＲＩＳＣの仲介による標的ｍＲＮＡ切断に関与することが可能な長さであるべきである。一本鎖ＲＮＡｉ剤は、少なくとも１４ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも１５、２０、２５、２９、３５、４０または５０ヌクレオチドの長さである。一本鎖ＲＮＡｉ剤は、２００、１００または６０ヌクレオチド未満の長さであることが好ましい。

【０３９９】

ヘアピン型ＲＮＡｉ調節物質は、少なくとも１７、１８、１９、２９、２１、２２、２３、２４または２５ヌクレオチド対またはこれに等しい二本鎖領域を有し得る。二本鎖領域は、好ましくは２００、１００または５０以下の長さであり得る。二本鎖領域の特定の長さの範囲は、１５～３０、１７～２３、１９～２３および１９～２１ヌクレオチド対である。ヘアピンは、好ましくはヘアピン側のアンチセンスの好ましくは３’側に、一本鎖オーバーハングまたは末端の対形成していない領域を有し得る。特定の実施形態では、オーバーハングは２～３ヌクレオチドの長さである。

【０４００】

本明細書に記載の方法に従って使用する特定の調節物質はキメラオリゴヌクレオチド、つまり、それぞれ少なくとも１つのモノマー単位（すなわち、オリゴヌクレオチド化合物の場合はヌクレオチド）からなる２つ以上の化学的に異なる領域を含む「キメラ」のようなＲＮＡｉオリゴヌクレオチドを含み得る。これらのオリゴヌクレオチドは通常、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ分解に対する耐性、細胞内取込みおよび／または標的核酸に対する結合親和性を増大させるようにオリゴヌクレオチドが修飾されている、少なくとも１つの領域を含む。その結果、キメラオリゴヌクレオチドを用いると、ホスホロチオアートオリゴデオキシヌクレオチドよりも短いオリゴヌクレオチドでそれに匹敵する結果が得られる場合が多い。キメラオリゴヌクレオチドは、上記のような２つ以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチド模倣物の複合構造として形成され得る。このようなオリゴヌクレオチドは、当該技術分野ではハイブリッドまたはギャップマーとも呼ばれている。このようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許としては、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，０１３，８３０号；同第５，１４９，７９７号；同第５，２２０，００７号；同第５，２５６，７７５号；同第５，３６６，８７８号；同第５，４０３，７１１号；同第５，４９１，１３３号；同第５，５６５，３５０号；同第５，６２３，０６５号；同第５，６５２，３５５号；同第５，６５２，３５６号；同第５，７００，９２２号；および同第５，９５５，５８９号が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、キメラオリゴヌクレオチドはＲＮＡ－ＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡ、ＲＮＡ－ＤＮＡ－ＲＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡ－ＤＮＡまたはＲＮＡ－ＤＮＡ－ＲＮＡ－ＤＮＡであり、オリゴヌクレオチドが５～６０ヌクレオチドの間の長さである。

【０４０１】

本発明の一態様では、ＲＮＡｉ剤は、改変または非天然核酸塩基に係留された少なくとも１つのリガンを含むオリゴヌクレオチドに関する。多数の化合物が改変塩基として機能し得る。改変塩基の構造は、改変塩基がオリゴヌクレオチドとその標的、例えばｍＲＮＡとの結合を実質的に妨げない限り重要である。特定の実施形態では、改変塩基は、ジフルオロトリル、ニトロピロリル、ニトロイミダゾリル、ニトロインドリル、ナフタレニル、アントランセニル（ａｎｔｈｒａｎｃｅｎｙｌ）、ピリジニル、キノリニル、ピレニルまたは本明細書に記載の非天然核酸塩基のいずれか１つの二価ラジカルである。特定の実施形態では、非天然核酸塩基は、ジフルオロトリル、ニトロピロリルまたはニトロイミダゾリルである。特定の実施形態では、非天然核酸塩基はジフルオロトリルである。多種多様なリガンドが当該技術分野において公知であり、本発明に適する。例えば、リガンドは、ステロイド、胆汁酸、脂質、葉酸、ピリドキサール、Ｂ１２、リボフラビン、ビオチン、

芳香族、多環式化合物、クラウンエーテル、インターカレーター、切断分子、タンパク質結合物質または炭水化物であり得る。特定の実施形態では、リガンドはステロイドまたは芳香族化合物である。特定の場合には、リガンドはコレステリルである。

【０４０２】

他の実施形態では、ＲＮＡｉ剤は、細胞標的化および細胞内取込みを向上させる目的でリガンドに係留させたオリゴヌクレオチドである。例えば、ＲＮＡｉ剤を抗体またはその抗原結合フラグメントに係留させ得る。さらなる例として、ＲＮＡｉ剤を、特定の細胞表面受容体と特異的に結合するポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントのような特定のリガンド結合分子に係留させ得る。

【０４０３】

他の実施形態では、調節物質は、本明細書に記載の非天然核酸塩基を含む。特定の場合には、ヌクレオシド中に天然に存在するリボース糖部分がヘキソース糖に置き換わっている。特定の態様では、ヘキソース糖は、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロースまたはそれらの誘導体である。好適な実施形態では、ヘキソースはＤ－ヘキソースである。特定の場合には、ヌクレオシド中に天然に存在するリボース糖部分が、多環式ヘテロアルキル環またはシクロヘキセニル基に置き換わっている。特定の場合には、多環式ヘテロアルキル基は、環内に１個の酸素原子を含む二環式環である。特定の場合には、多環式ヘテロアルキル基は、ビシクロ［２．２．１］ヘプタン、ビシクロ［３．２．１］オクタンまたはビシクロ［３．３．１］ノナンである。また修飾ＲＮＡｉ剤の例として、本明細書に記載のように修飾骨格または非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドも挙げられる。

【０４０４】

本発明はさらに、リボザイムを用いたオリゴヌクレオチドを包含する。高度に特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を触媒する合成ＲＮＡ分子およびその誘導体は、リボザイムとして知られている（例えば、Ｈａｓｅｌｏｆｆらに対する米国特許第５，５４３，５０８号およびＧｏｏｄｃｈｉｌｄらに対する米国特許第５，５４５，７２９号を参照されたい）。切断反応はＲＮＡ分子自体によって触媒される。天然のＲＮＡ分子では、自己触媒切断部位は、ＲＮＡ二次構造の高度に保存された領域にある（Ｂｕｚａｙａｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，１９８６，８３，８８５９；Ｆｏｒｓｔｅｒら，Ｃｅｌｌ，１９８７，５０，９）。天然の自己触媒ＲＮＡ分子を改変して、特定の細胞または病原性ＲＮＡ分子に対して高い特異性で標的化することができるリボザイムが生成されている。したがって、リボザイムは、アンチセンスオリゴヌクレオチド同じ一般的な目的（すなわち、特定遺伝子の発現の調節）を果たし、またオリゴヌクレオチドと同様に、大部分の一本鎖性を有する核酸である。

【０４０５】

特定の場合には、本明細書に記載の方法に使用するＲＮＡｉ剤またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを、非リガンド基により修飾し得る。オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、細胞標的化または細胞内取込みを増強するために、多数の非リガンド分子がオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされており、またこのようなコンジュゲーションを調製するための手順が科学文献で入手可能である。このような非リガンド部分は、コレステロールのような脂質部分（Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８９，８６：６５５３）、アルギニンリッチペプチド、コール酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎら，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，１９９４，４：１０５３）、チオエーテル、例えばヘキシル－５－トリチルチオール（Ｍａｎｏｈａｒａｎら，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，１９９２，６６０：３０６；Ｍａｎｏｈａｒａｎら，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ．，１９９３，３：２７６５）、チオコレステロール（Ｏｂｅｒｈａｕｓｅｒら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１９９２，２０：５３３）、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基（Ｓａｉｓｏｎ－Ｂｅｈｍｏａｒａｓら，ＥＭＢＯ Ｊ．，１９９１，１０：１１１；Ｋａｂａｎｏｖら，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，１９９０，２５９：３２７；Ｓｖｉｎａｒｃｈｕｋら，Ｂｉｏｃｈ

ｉｍｉｅ，１９９３，７５：４９）、リン脂質、例えばジ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールまたは１，２－ｄｉ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－３－Ｈ－ホスホン酸トリエチルアンモニウム（Ｍａｎｏｈａｒａｎら，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，１９９５，３６：３６５１；Ｓｈｅａら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１９９０，１８：３７７７）、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖（Ｍａｎｏｈａｒａｎら，Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ＆ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ，１９９５，１４：９６９）、またはアダマンタン酢酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎら，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，１９９５，３６：３６５１）、パルミチル部分（Ｍｉｓｈｒａら，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１９９５，１２６４：２２９）、オクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分（Ｃｒｏｏｋｅら，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．，１９９６，２７７：９２３）を含んでいる。このようなオリゴヌクレオチドコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許は上に挙げた通りである。典型的なコンジュゲーションのプロトコルでは、配列の１つ以上の位置にアミノリンカーを有するオリゴヌクレオチドを合成する。次いで、適当なカップリング試薬または活性化試薬を用いて、コンジュゲートする分子とアミノ基を反応させる。コンジュゲーション反応は、オリゴヌクレオチドを固体支持体に結合させたままで行っても、オリゴヌクレオチドを液相中へ切断した後に行ってもよい。通常、ＨＰＬＣによりオリゴヌクレオチドコンジュゲートを精製して、純粋なコンジュゲートを得る。

【０４０６】

ＲＮＡｉ剤のさらなる例は、参照により組み込まれる、米国特許出願公開第２００７／０２７５４６５号、同第２００７／００５４２７９号、同第２００６／０２８７２６０号、同第２００６／００３５２５４号、同第２００６／０００８８２２号に見ることができる。また、本明細書に記載のＡＡＲＳ標的化配列を発現することができるベクター送達システムも含まれる。ｓｉＲＮＡまたはその他の二本鎖形成ＲＮＡ干渉分子を発現するベクターが含まれる。

【０４０７】

ベクター系または核酸構築物系は、ともに宿主細胞のゲノムに導入する全ＤＮＡを含む単一のベクターもしくはプラスミド、２つ以上のベクターもしくはプラスミド、またはトランスポゾンを含み得る。ベクターの選択は通常、ベクターと、ベクターを導入する宿主細胞との適合性によって決まる。本発明の場合には、ベクターまたは核酸構築物は、筋細胞のような哺乳動物細胞内で作動可能に機能的なベクターであることが好ましい。またベクターは、適当な形質転換体またはトランスフェクタントの選択または同定に使用することができる、抗生物質耐性もしくは薬物耐性遺伝子またはレポーター遺伝子（すなわち、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）のような選択マーカーも含み得る。送達システムの例としては、当該技術分野で公知のものの中でも特にウイルスベクター系（例えば、ウイルスによる形質導入）が挙げられ、特に限定されるわけではないが、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターおよびヘルペスウイルスベクターがこれに含まれる。

【０４０８】

ＸＩ．創薬

特定の実施形態は、通常は参照ＡＡＲＳポリペプチド、例えばＡＡＲＳタンパク質フラグメントの１つ以上の非カノニカルな活性を調節する薬剤を同定するための、創薬におけるＡＡＲＳポリペプチド、抗体またはポリヌクレオチドの使用に関する。例えば、特定の実施形態は、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの１つ以上の「細胞結合パートナー」、例えばＡＡＲＳポリペプチドと直接的にまたは物理的に相互作用する細胞タンパク質、脂質、核酸またはその他の宿主分子などの同定方法を含む。具体例としては、例えば、ＧＰＣＲのような細胞表面受容体、タンパク質－タンパク質相互作用ドメイン、およびそれらの細胞外または細胞内ドメインが挙げられる。

【０４０９】

また、細胞結合パートナーと直接的または間接的に相互作用して、非カノニカルな活性

におけるその役割を調節するか、または結合パートナーにより調節される分子を含めた、ＡＡＲＳポリペプチドの１つ以上の非カノニカルな活性に関与する宿主分子の同定方法も含まれる。このような宿主分子には、細胞結合パートナー／ＡＡＲＳタンパク質相互作用に関連した、通常は経路の約１、２、３、４、５個以上の同定可能な段階に関連する、非カノニカルな経路の上流および下流両方の成分が含まれる。

【０４１０】

特定の態様は、ＡＡＲＳポリペプチドおよび／または１つ以上のその細胞結合パートナーと相互作用することなどにより、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドまたはその活性なバリアントの非カノニカルな活性を刺激するまたはこれに拮抗する化合物（例えば、ポリペプチド）またはその他の薬剤の同定方法を含む。また、ＡＡＲＳスプライスバリアントの発現（例えば、スプライシング）を調節する、または別の方法で内因性ＡＡＲＳタンパク質フラグメント（リセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ））の産生をタンパク質レベルで制御するプロテアーゼの活性を調節する薬剤の同定方法も含まれる。

【０４１１】

したがって、特定の実施形態は、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの結合パートナーの同定方法を含み、この方法は、ａ）適当な条件下でＡＡＲＳポリペプチドと生物試料とを混合すること、およびｂ）ＡＡＲＳポリペプチドと結合パートナーとの特異的結合を検出して、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドと特異的に結合する結合パートナーを同定することを含む。また、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドまたはＡＡＲＳポリペプチドの結合パートナーと特異的に結合する化合物のスクリーニング方法も含まれ、この方法は、ａ）適当な条件下で、ポリペプチドまたは結合パートナーと少なくとも１つの試験化合物とを混合すること、およびｂ）ポリペプチドまたは結合パートナーと試験化合物との結合を検出して、ポリペプチドまたはその結合パートナーと特異的に結合する化合物を同定することを含む。特定の実施形態では、化合物はポリペプチドまたはペプチドである。特定の実施形態では、化合物は小分子またはその他の（例えば、非生物学的）化合物である。特定の実施形態では、化合物はペプチド模倣物である。

【０４１２】

ＡＡＲＳ参照ポリペプチド、１つ以上のその細胞結合パートナーまたはその両方と相互作用する細胞タンパク質を同定するために、タンパク質－タンパク質相互作用の検出に適した任意の方法を使用し得る。使用し得る従来の方法の例としては、主にＡＡＲＳポリペプチドと相互作用する溶解物中のタンパク質を同定するための、細胞溶解物または細胞溶解物から得られたタンパク質の共免疫沈降、架橋、および勾配またはクロマトグラフ用カラムを用いた共精製が挙げられる。

【０４１３】

これらのおよび関連する実施形態では、ＡＡＲＳポリペプチドまたはその結合パートナーと相互作用するタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部分を、Ｅｄｍａｎ分解法のような当業者に公知の技術を用いて確認することができる。例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　＆　Ｃｏ．，Ｎ．Ｙ．，ｐｐ．３４　４９，１９８３を参照されたい。得られたアミノ酸配列を、このようなタンパク質をコードする遺伝子配列のスクリーニングに使用できるオリゴヌクレオチド混合物の作製の指針として使用し得る。スクリーニングは、本明細書に記載のおよび当該技術分野で公知の、例えば標準的なハイブリダイゼーションまたはＰＣＲ技術により行い得る。オリゴヌクレオチド混合物の作製およびスクリーニングのための技術は公知である。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｇｒｅｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　ａｎｄ　Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎ．Ｙ．，１９８９；およびＩｎｎｉｓら編，ＰＣＲ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９９０を参照されたい。

【０４１４】
さらに、結合パートナーまたはその他のポリペプチドをコードする遺伝子の同時同定に方法を使用し得る。これらの方法としては、例えば、公知の技術であるラムダ－ｇｔ１１ライブラリーの抗体探索と同様の方法で、標識ＡＡＲＳタンパク質または別のポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質、例えばマーカー（例えば、酵素、蛍光、発光タンパク質または色素）またはＩｇ－Ｆｃドメインと融合したバリアントＡＡＲＳポリペプチドまたはＡＡＲＳドメインを用いた発現ライブラリーの探索が挙げられる。
【０４１５】
単なる例示であって限定するためのものではないが、ｉｎ　ｖｉｖｏでのタンパク質相互作用を検出する方法の１つであるツーハイブリッド法を詳細に記載する。この系の１つの例が記載されており（Ｃｈｉｅｎら，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　８８：９５７８　９５８２，１９９１）、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ（Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、Ｃａｌｉｆ．）から購入できる。
【０４１６】
簡潔に述べれば、このような系を用いて、２つのハイブリッドタンパク質をコードするプラスミドを構築し得る：一方のプラスミドは、ＡＡＲＳ参照ヌクレオチド配列（または、特定の実施形態では、その結合パートナー）と融合した転写アクチベータータンパク質のＤＮＡ結合ドメインをコードするヌクレオチドまたはそのバリアントからなり、他方のプラスミドは、ｃＤＮＡライブラリーの一部としてプラスミド内に組換えにより組み込まれた未知のタンパク質（１つまたは複数）をコードするｃＤＮＡ（またはｃＤＮＡの集団）と融合した、転写アクチベータータンパク質の活性化ドメインをコードするヌクレオチドからなる。ＤＮＡ結合ドメイン融合プラスミドとアクチベーターｃＤＮＡライブラリーを、レポーター遺伝子（例えば、ＨＢＳまたはｌａｃＺ）を含み、そのレポーター遺伝子の調節領域が転写アクチベーターの結合部位を含む酵母株（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）内に形質転換する。ＤＮＡ結合ドメインハイブリッドはその活性化機能を発揮しないため、また活性化ドメインハイブリッドはアクチベーターの結合部位に局在できないため、いずれのハイブリッドタンパク質も単独ではレポーター遺伝子の転写を活性化することができない。２つのハイブリッドタンパク質の相互作用により、機能的なアクチベータータンパク質が再構築されてレポーター遺伝子の発現が起こり、これがレポーター遺伝子産物のアッセイにより検出される。
【０４１７】
ツーハイブリッド法およびその他のこのような方法論を用いて、「おとり」遺伝子産物と相互作用するタンパク質に関して活性化ドメインライブラリーをスクリーニングすることができる。限定するわけではないが、例として、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドまたはバリアントをおとり遺伝子産物として使用し得る。またＡＡＲＳ結合パートナーも「おとり」遺伝子産物として使用し得る。全ゲノムまたはｃＤＮＡ配列を、活性化ドメインをコードするＤＮＡと融合させる。このライブラリー、およびＤＮＡ結合ドメインと融合したおとりＡＡＲＳ遺伝子産物をコードするプラスミドをレポーター酵母内に同時形質転換し、得られた形質転換体を、レポーター遺伝子を発現するものに関してスクリーニングする。
【０４１８】
おとりＡＡＲＳ遺伝子産物と相互作用するタンパク質を検出する細胞系のｃＤＮＡライブラリーを、当該技術分野において日常的に実施されている方法を用いて作製することができる。例えば、ｃＤＮＡフラグメントを、それがＧＡＬ４の転写活性化ドメインと翻訳融合されるようにベクターに挿入することができる。このライブラリーを、ＧＡＬ４活性化配列を含むプロモーターにより駆動されるｌａｃＺ遺伝子を含む酵母株内に、おとり遺伝子－ＧＡＬ４融合プラスミドとともに同時形質転換することができる。ＧＡＬ４転写活性化ドメインと融合したｃＤＮＡコードタンパク質で、おとり遺伝子産物と相互作用するものは、活性なＧＡＬ４タンパク質を再構築してＨＩＳ３遺伝子の発現を駆動する。ＨＩＳ３を発現するコロニーは、ヒスチジンを欠く半固体寒天ベースの培地を含むペトリ皿でそれが増殖することにより検出することができる。次いで、ｃＤＮＡをこれらの菌株から精製し、当該技術分野において日常的に実施されている技術を用いて、おとりＡＡＲＳ遺

伝子と相互作用するタンパク質を産生および単離するために、これを使用することができる。

【０４１９】

また、酵母内でのＲＮＡ－タンパク質相互作用の検出が可能なスリーハイブリッド系も含まれる。例えば、Ｈｏｏｋら，ＲＮＡ．１１：２２７－２３３，２００５を参照されたい。したがって、これらのおよび関連する方法を用いて、ＡＡＲＳポリペプチドの細胞結合パートナーを同定し、またＡＡＲＳポリペプチド、細胞結合パートナーまたはその両方と相互作用するその他のタンパク質または核酸を同定することができる。

【０４２０】

特定の実施形態は、インタラクトームスクリーニング法の使用に関する。具体例としては、タンパク質ドメインベースのスクリーニングが挙げられる（例えば、Ｂｏｘｅｍら，Ｃｅｌｌ．１３４：５３４－５４５，２００８；およびＹｕら，Ｓｃｉｅｎｃｅ．３２２：１０－１１０，２００８を参照されたい）。

【０４２１】

上述のように、結合パートナーが一度単離されると、それを同定し、今度は標準的な技術とともに用いて、それが相互作用するタンパク質またはその他の化合物を同定することができる。したがって、特定の実施形態は、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの結合パートナーと特異的に結合する化合物スクリーニングする方法に関するものであり、この方法は、ａ）適当な条件下で、結合パートナーと、少なくとも１つの試験化合物とを混合すること、およびｂ）結合パートナーと試験化合物との結合を検出して、結合パートナーと特異的に結合する化合物を同定することを含む。特定の実施形態では、試験化合物はポリペプチドである。特定の実施形態では、試験化合物は、小分子またはペプチド模倣物のような化合物である。

【０４２２】

特定の実施形態は、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を含み、この方法は、ａ）ポリペプチドの活性が可能な条件下で、ポリペプチドと、少なくとも１つの試験化合物とを混合すること、ｂ）試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を評価すること、およびｃ）試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性と、試験化合物の非存在下でのポリペプチドの活性とを比較することを含み、ここでは、試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性の変化が、ポリペプチドの活性を調節する化合物を示す。特定の実施形態は、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの結合パートナーの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を含み、この方法は、ａ）結合パートナーの活性が可能な条件下で、ポリペプチドと、少なくとも１つの試験化合物とを混合すること、ｂ）試験化合物の存在下での結合パートナーの活性を評価すること、およびｃ）試験化合物の存在下での結合パートナーの活性と、試験化合物の非存在下での結合パートナーの活性とを比較することを含み、ここでは、試験化合物の存在下での結合パートナーの活性の変化が、結合パートナーの活性を調節する化合物を示す。通常、これらのおよび関連する実施形態は、ＡＡＲＳポリペプチドまたはその結合パートナーに関連する、選択された非カノニカルな活性を評価することを含む。細胞培養条件のようなｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏの条件が含まれる。

【０４２３】

特定の実施形態は、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドまたはその活性なフラグメントもしくはバリアントの完全アゴニストまたは部分アゴニストとして有効な化合物をスクリーニングする方法を含み、この方法は、ａ）ポリペプチドを含む試料を化合物に曝すこと、およびｂ）通常はＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性の増加を測定することにより、試料中のアゴニスト活性を検出することを含む。特定の方法は、ａ）ＡＡＲＳポリペプチドの結合パートナーを含む試料を化合物に曝すこと、およびｂ）通常はＡＡＲＳポリペプチドの選択された非カノニカルな活性の増加を測定することにより、試料中のアゴニスト活性を検出することを含む。特定の実施形態は、この方法により同定されたアゴニストと、薬学的に許容される担体または添加剤とを含む組成物を含む。

【０４２４】
また、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの完全アンタゴニストまたは部分アンタゴニストとして有効な化合物をスクリーニングする方法も含まれ、この方法は、ａ）ポリペプチドを含む試料を化合物に曝すこと、およびｂ）通常はＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな活性の増加を測定することにより、試料中のアンタゴニスト活性を検出することを含む。特定の方法は、ａ）ＡＡＲＳポリペプチドの結合パートナーを含む試料を化合物に曝すこと、およびｂ）通常はＡＡＲＳポリペプチドの選択された非カノニカルな活性の減少を測定することにより、試料中のアンタゴニスト活性を検出することを含む。特定の実施形態は、この方法により同定されたアンタゴニストと、薬学的に許容される担体または添加剤とを含む組成物を含む。

【０４２５】
特定の実施形態では、ＡＡＲＳ参照配列またはその結合パートナーと相互作用するかまたはそれを調節することができる化合物を同定するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ系を設計し得る。このような系により同定された特定の化合物は、経路の活性を調節すること、および経路の成分自体を変化させることに有用であり得る。またこれらを、経路の成分間の相互作用を崩壊させる、またはこのような相互作用を直接崩壊させ得る化合物を同定するためのスクリーニングに使用し得る。アプローチの１つの例では、ＡＡＲＳポリペプチドと試験化合物が相互作用し結合するのに十分な条件および時間の下で、この２つの反応混合物を調製することにより複合体を形成させ、この複合体を反応混合物から取り出す、および／または反応混合物中で検出することができる。

【０４２６】
ｉｎ　ｖｉｖｏスクリーニングアッセイを各種の方法で行うことができる。例えば、ＡＡＲＳポリペプチド、細胞結合パートナーまたは試験化合物（１つまたは複数）を固相に固定し得る。これらのおよび関連する実施形態では、反応終了時に、得られた複合体を固相上で捕捉し検出し得る。このような方法の１つの例では、ＡＡＲＳポリペプチドおよび／またはその結合パートナーを固体表面に固定し、また試験化合物（１つまたは複数）は固定せずに直接的または間接的に標識して、固体表面の成分によるその捕捉を検出することができる。他の例では、試験化合物（１つまたは複数）を固体表面に固定し、またＡＡＲＳポリペプチドおよび／またはその結合パートナーは固定せず、標識するか、あるいは何らかの方法で検出可能にする。特定の実施形態では、マイクロタイタープレートを固相として使用することが好都合であり得る。固定された成分（または試験化合物）を非共有結合または共有結合により固定化し得る。非共有結合は単純に、タンパク質の溶液で固体表面をコーティングし乾燥させることで達成し得る。あるいは、固定化するタンパク質に特異的な固定化抗体、好ましくはモノクローナル抗体を用いて、タンパク質を固体表面に固定し得る。この表面を予め調製して保管し得る。

【０４２７】
アッセイの一例を行うために、通常、固定された成分を含むコーティングされた表面に非固定化成分を加える。反応終了後に、形成された任意の特定の複合体が固体表面に固定化されて保たれる条件下で、未反応成分を除去する（例えば、洗浄により）。固体表面に固定された複合体の検出は、数多くの方法で行うことができる。例えば、これまでに固定化されなかった成分を予め標識する場合、表面に固定化された標識の検出が複合体の形成を示す。これまでに固定化されなかった成分を予め標識しない場合、間接的な標識を用いて、例えば、これまでに固定化されなかった成分に特異的な標識抗体を用いて（そして、標識した抗Ｉｇ抗体でこの抗体を直接的または間接的に標識し得る）、表面に固定された複合体を検出することができる。

【０４２８】
あるいは、例えば表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）および指標としての共鳴角の変化を用いて、試験化合物の結合の有無を判定することができ、この場合、ＡＡＲＳポリペプチドまたは細胞結合パートナーを従来の方法に従って市販のセンサーチップ（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）社により製造されている）の表面に固定化し、これと試験化合物とを接

触させ、センサーチップを特定の角度から特定の波長の光で照射する。また、ＡＡＲＳポリペプチドまたは細胞結合パートナーを質量分析器に適応可能なタンパク質チップの表面に固定化し、これと試験化合物とを接触させ、ＭＡＬＤＩ－ＭＳ、ＥＳＩ－ＭＳ、ＦＡＢ－ＭＳなどのようなイオン化法を質量分析器（例えば、二重収束質量分析器、四極子質量分析器、飛行時間型質量分析器、フーリエ変換質量分析器、イオンサイクロトロン質量分析器など）と組み合わせる方法で、試験化合物に対応するピークの出現を検出することにより、試験化合物の結合を測定することもできる。

【０４２９】

特定の実施形態では、細胞ベースのアッセイ、膜小胞ベースのアッセイまたは膜画分ベースのアッセイを用いて、選択されたＡＡＲＳポリペプチドの非カノニカルな経路における相互作用を調節する化合物を同定することができる。この目的のために、ＡＡＲＳポリペプチドおよび／もしくは結合パートナーまたはこのようなタンパク質のドメインもしくはフラグメントを含む融合タンパク質（またはそれらの組合せ）を発現する細胞系、あるいはこのようなタンパク質（１つまたは複数）または融合タンパク質（１つまたは複数）を発現するように遺伝子操作された細胞系（例えば、ＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、Ｈｅｌａ細胞など）を使用することができる。非カノニカルな活性に影響を与える試験化合物（１つまたは複数）を、対照または所定の量と比較したその活性の変化（例えば、統計的に有意な変化）をモニターすることにより、同定することができる。

【０４３０】

アンチセンスおよびＲＮＡｉ剤に関連する実施形態では、例えば、ＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチドの発現を変化させることに有効な化合物のスクリーニング方法も含まれ、この方法は、ａ）ＡＡＲＳ参照ポリヌクレオチドを含む試料と、潜在的なアンチセンスオリゴヌクレオチドのような化合物とを接触させること、およびｂ）ＡＡＲＳポリヌクレオチドの発現の変化を検出することを含む。特定の非限定的な例では、これらのおよび関連する実施形態を、当該技術分野において日常的な技術に従って、細胞ベースのアッセイまたは無細胞翻訳アッセイで用いることができる。また、このような方法により同定されたアンチセンスおよびＲＮＡｉ剤も含まれる。

【０４３１】

また、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントに対する抗体を、例えばＡＡＲＳと特異的に結合する薬剤を同定するため、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントと結合する薬剤の特異性もしくは親和性を確認するため、または薬剤とＡＡＲＳタンパク質フラグメントの間での相互作用の部位を特定するためなどのスクリーニングアッセイで使用することもできる。抗体を薬剤の競合阻害剤として使用するアッセイが含まれる。例えば、既知の親和性でＡＡＲＳタンパク質フラグメントと特異的に結合する抗体は、選択された薬剤の競合阻害剤として働き、これをＡＡＲＳタンパク質フラグメントに対する薬剤の親和性を計算するために用いることができる。また、ＡＡＲＳタンパク質フラグメントの既知のエピトープまたは部位と特異的に結合する１つ以上の抗体を競合阻害剤として用いて、薬剤がその同じ部位で結合するか否かを確認することができる。他のバリエーションは当業者に明らかであろう。

【０４３２】

またハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）に適した、任意の上記方法または当該技術分野で公知のその他のスクリーニング方法も含まれる。ＨＴＳでは通常、候補化合物ライブラリーのアッセイ、例えば、本明細書に記載のような非カノニカルな活性の増加または減少を測定するアッセイのスクリーニングを実行するために、自動化を用いる。

【０４３３】

本明細書に記載のいずれのスクリーニング方法でも、小分子ライブラリーまたはコンビナトリアル化学により作製されたライブラリーを使用し得る。真菌、細菌または藻類の抽出物のような化学的および／または生物学的混合物のライブラリーが当該技術分野で公知であり、本発明のアッセイのいずれでもスクリーニングすることができる。分子ライブラリーの合成方法の例は、Ｃａｒｅｌｌら，１９９４ａ；Ｃａｒｅｌｌら，１９９４ｂ；Ｃ

ｈｏら，１９９３；ＤｅＷｉｔｔら，１９９３；Ｇａｌｌｏｐら，１９９４；Ｚｕｃｋｅｒｍａｎｎら，１９９４に見ることができる。

【０４３４】

化合物のライブラリーは、溶液中（Ｈｏｕｇｈｔｅｎら，１９９２）またはビーズ上（Ｌａｍら，１９９１）、チップ（Ｆｏｄｏｒら，１９９３）、細菌、胞子（Ｌａｄｎｅｒら，米国特許第５，２２３，４０９号，１９９３）、プラスミド（Ｃｕｌｌら，１９９２）またはファージ（Ｃｗｉｒｌａら，１９９０；Ｄｅｖｌｉｎら，１９９０；Ｆｅｌｉｃｉら，１９９１；Ｌａｄｎｅｒら，米国特許第５，２２３，４０９号，１９９３；ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ，１９９０）上に提供され得る。本発明の実施形態は、１つ以上のＡＡＲＳタンパク質フラグメント、その細胞結合パートナーおよび／またはそれに関連する非カノニカルな活性の小分子調節物質を同定するための様々なライブラリーの使用を包含する。本発明の目的に有用なライブラリーとしては、（１）化学ライブラリー、（２）天然産物ライブラリーおよび（３）ランダムなペプチド、オリゴヌクレオチドおよび／または有機分子からなるコンビナトリアルライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３５】

化学ライブラリーは、既知の化合物または天然産物スクリーニングにより「ヒット」もしくは「リード」として同定された化合物の構造類似体からなる。天然産物ライブラリーは、スクリーニングのための混合物を作製するために使用する微生物、動物、植物または海洋生物の収集物から、（１）土壌、植物もしくは海洋微生物由来の培養液の発酵および抽出、または（２）植物もしくは海洋微生物の抽出により得られたものである。天然産物ライブラリーは、ポリケチド、非リボソームペプチドおよびそれらのバリアント（非天然）を含む。例えば、Ｃａｎｅら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８２：６３－６８，１９９８を参照されたい。コンビナトリアルライブラリーは、混合物としての多数のペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機化合物で構成され得る。これらは、従来の自動化された合成方法、ＰＣＲ、クローニングまたは特許登録された方法により調製することが比較的容易である。

【０４３６】

より具体的には、コンビナトリアル化学ライブラリーは、化学合成または生合成により、試薬のような多数の化学的「ビルディングブロック」を組み合わせて生成された、多様な化合物の集まりである。例えば、ポリペプチドライブラリーのような線形コンビナトリアル化学ライブラリーは、一組の化学的ビルディングブロック（アミノ酸）を、所与の化合物の長さ（すなわち、ポリペプチド化合物中のアミノ酸数）で可能なあらゆる方法で組み合わせることにより形成される。このような化学的ビルディングブロックのコンビナトリアルな混合により、無数の化合物を合成することができる。

【０４３７】

コンビナトリアル化学およびそこから作製されるライブラリーの概説に関しては、例えば、Ｈｕｃ，Ｉ．およびＮｇｕｙｅｎ，Ｒ．（２００１）Ｃｏｍｂ．Ｃｈｅｍ．Ｈｉｇｈ Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ Ｓｃｒｅｅｎ ４：５３－７４；Ｌｅｐｒｅ，Ｃ Ａ．（２００１）Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．Ｔｏｄａｙ ６：１３３－１４０；Ｐｅｎｇ，Ｓ．Ｘ．（２０００）Ｂｉｏｍｅｄ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．１４：４３０－４４１；Ｂｏｈｍ，Ｈ．Ｊ．およびＳｔａｈｌ，Ｍ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．４：２８３－２８６；Ｂａｒｎｅｓ，ＣおよびＢａｌａｓｕｂｒａｍａｎｉａｎ，Ｓ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．４：３４６－３５０；Ｌｅｐｒｅ，Ｅｎｊａｌｂａｌ，Ｃ．ら，（２０００）Ｍａｓｓ Ｓｅｐｔｒｏｍ Ｒｅｖ．１９：１３９－１６１；Ｈａｌｌ，Ｄ．Ｇ．，（２０００）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１８：２６２－２６２；Ｌａｚｏ，Ｊ．Ｓ．およびＷｉｐｆ，Ｐ．（２０００）Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．２９３：７０５－７０９；Ｈｏｕｇｈｔｅｎ，Ｒ．Ａ．，（２０００）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．４０：２７３－２８２；Ｋｏｂａｙａｓｈｉ，Ｓ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂ

ｉｏｌ．（２０００）４：３３８－３４５；Ｋｏｐｙｌｏｖ，Ａ．Ｍ．およびＳｐｉｒｉｄｏｎｏｖａ，Ｖ．Ａ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（Ｍｏｓｋ）３４：１０９７－１１１３；Ｗｅｂｅｒ，Ｌ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．４：２９５－３０２；Ｄｏｌｌｅ，Ｒ．Ｅ．（２０００）Ｊ．Ｃｏｍｂ．Ｃｈｅｍ．２：３８３－４３３；Ｆｌｏｙｄ，Ｃ Ｄ．ら，（１９９９）Ｐｒｏｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３６：９１－１６８；Ｋｕｎｄｕ，Ｂ．ら，（１９９９）Ｐｒｏｇ．Ｄｒｕｇ Ｒｅｓ．５３：８９－１５６；Ｃａｂｉｌｌｙ，Ｓ．（１９９９）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２：１４３－１４８；Ｌｏｗｅ，Ｇ．（１９９９）Ｎａｔ．Ｐｒｏｄ．Ｒｅｐ．１６：６４１－６５１；Ｄｏｌｌｅ，Ｒ．Ｅ．およびＮｅｌｓｏｎ，Ｋ．Ｈ．（１９９９）Ｊ．Ｃｏｍｂ．Ｃｈｅｍ．１：２３５－２８２；Ｃｚａｒｎｉｃｋ，Ａ．Ｗ．およびＫｅｅｎｅ，Ｊ．Ｄ．（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．８：Ｒ７０５－Ｒ７０７；Ｄｏｌｌｅ，Ｒ．Ｅ．（１９９８）Ｍｏｌ．Ｄｉｖｅｒｓ．４：２３３－２５６；Ｍｙｅｒｓ，Ｐ．Ｌ．，（１９９７）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８：７０１－７０７；ならびにＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．およびＣｏｒｔｅｓｅ，Ｒ．（１９９７）Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．３７８：４４３を参照されたい。

【０４３８】

コンビナトリアルライブラリーを調製するための装置が市販されている（例えば、３５７ＭＰＳ、３９０ＭＰＳ、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｃｈｅｍ Ｔｅｃｈ、Ｌｏｕｉｓｖｉｌｌｅ Ｋｙ．、Ｓｙｍｐｈｏｎｙ、Ｒａｉｎｉｎ、Ｗｏｂｕｒｎ、Ｍａｓｓ．、４３３Ａ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、Ｃａｌｉｆ．、９０５０Ｐｌｕｓ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、Ｍａｓｓ．を参照されたい）。さらに、コンビナトリアルライブラリー自体が多数市販されている（例えば、ＣｏｍＧｅｎｅｘ、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ、Ｎ．Ｊ．、Ａｓｉｎｅｘ、Ｍｏｓｃｏｗ、Ｒｕ、Ｔｒｉｐｏｓ，Ｉｎｃ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、Ｍｏ．、ＣｈｅｍＳｔａｒ，Ｌｔｄ．、Ｍｏｓｃｏｗ、ＲＵ、３Ｄ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｅｘｔｏｎ、Ｐａ．、Ｍａｒｔｅｋ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｃｏｌｕｍｂｉａ、Ｍｄ．などを参照されたい）。

【０４３９】

ＸＩＩ．使用法

本発明の実施形態は、治療法を含む。したがって、ＡＡＲＳポリペプチド、ＡＡＲＳポリヌクレオチド、ＡＡＲＳポリヌクレオチドベースのベクター、ＡＡＲＳ発現宿主細胞、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＲＮＡｉ剤ならびに結合物質、例えばペプチド、抗体および抗原結合フラグメントなど、ペプチド模倣物ならびにその他の小分子を含めた本明細書に記載のＡＡＲＳ剤を用いて、参照ＡＡＲＳの非カノニカルな活性に関連した各種の非限定的な疾患または状態を治療することができる。このような非カノニカルな活性の例としては、細胞外シグナル伝達の調節、細胞増殖の調節、細胞遊走の調節、細胞分化の調節（例えば、造血、ニューロン新生、筋形成、骨形成および脂肪生成）、アポトーシスまたはその他の形態の細胞死の調節、血管新生の調節、細胞結合の調節、細胞代謝の調節、サイトカイン産生または活性の調節、サイトカイン受容体活性の調節、細胞内取込みまたは分泌の調節、免疫調節、炎症の調節、グルコース制御のような代謝過程の調節などが挙げられる。

【０４４０】

アンチセンス療法およびＲＮＡｉ干渉療法のようなポリヌクレオチドベースの治療法が含まれ、これらは通常、非カノニカルな活性の一因となる内因性のＡＡＲＳフラグメントまたはＡＡＲＳポリペプチドの細胞結合パートナーのような標的分子の発現減少に関連する。アンチセンスまたはＲＮＡｉ療法は通常、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの発現を減少させることなどにより、非カノニカルな活性に拮抗する。また、ポリペプチドもしくはペプチドベース、抗体もしくは抗原結合フラグメントベース、ペプチド模倣物ベースまたはその他の小分子ベースの治療法も含まれ、これらの治療法は、ＡＡＲＳポリペプチド、その細胞結合パートナー（１つまたは複数）またはその両方と直接相互作用することなどにより、ＡＡＲＳ参照ポリペプチドの非カノニカルな活性を刺激するまたはそれに拮抗する。

【０４４１】
これらのおよび関連する実施形態は、細胞、組織または対象を治療するために本発明のＡＡＲＳ剤または組成物を使用する方法を含む。本発明により治療または調節される細胞または組織は、好ましくは哺乳動物の細胞または組織、より好ましくはヒトの細胞または組織である。このような細胞または組織は、健常状態または疾患状態のものであり得る。
【０４４２】
特定の実施形態では、例えば、特に限定されないが細胞代謝、細胞分化、細胞増殖、細胞内取込み、細胞分泌、細胞死、細胞動員、細胞遊走、遺伝子転写、ｍＲＮＡ翻訳、細胞インピーダンス、免疫応答、炎症性応答などを含めた、治療に関連する細胞活性を調節する方法が提供され、この方法は、細胞と、本明細書に記載のＡＡＲＳ剤または組成物とを接触させることを含む。特定の実施形態では、細胞は対象中にある。したがって、１つ以上のこのような活性の調節が有効であり得る実質的に任意の細胞または組織または対象の治療にＡＡＲＳ組成物を使用し得る。
【０４４３】
またＡＡＲＳ剤および組成物を、例えば、腫瘍性疾患、免疫系疾患または状態（例えば、自己免疫疾患および炎症）、感染症、代謝疾患、神経細胞／神経疾患、筋／心血管疾患、造血異常に関連した疾患、筋形成異常に関連した疾患、ニューロン新生異常に関連した疾患、脂肪生成異常に関連した疾患、骨形成異常に関連した疾患、血管新生異常に関連した疾患、細胞生存の異常に関連した疾患、脂質取込み異常に関連した疾患、加齢に関連した疾患（例えば、聴力損失、末梢神経または自律神経障害、老人性認知症、網膜症）などの治療または予防と関連するものを含めた、任意の数多くの治療状況でも使用し得る。
【０４４４】
例えば、特定の例示的な実施形態では、本発明のＡＡＲＳ組成物を用いて、例えば内皮細胞の増殖および／またはシグナル伝達の調節により、血管新生を調節し得る。内皮細胞の増殖および／またはシグナル伝達は、適当な細胞系（例えば、ヒト微小血管内皮肺細胞（ＨＭＶＥＣ－Ｌ）およびヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ））を用いて、および適当なアッセイ（例えば、内皮細胞移動アッセイ、内皮細胞増殖アッセイ、管形成アッセイ、マトリゲルプラグアッセイなど）を用いてモニターされ得るが、これらの多くは、当該技術分野において公知で利用可能である。
【０４４５】
したがって、関連する実施形態では、血管新生の調節が有効であり得る実質的に任意の細胞または組織または対象の治療に本発明の組成物を使用し得る。例えば、いくつかの実施形態では、血管新生（例えば、血管新生状態）を経験しているまたは起こしやすい細胞または組織または対象と、適当な本発明の組成物とを接触させて、血管新生状態を抑制し得る。他の実施形態では、抗血管新生活性に干渉するおよび／または血管新生を促進するために、不十分な血管新生（例えば、抗血管新生状態）を経験しているまたは起こしやすい細胞または組織と、適当な本発明の組成物とを接触させ得る。
【０４４６】
また、造血およびこれに関連する状態を調節する方法も含まれる。本発明のＡＡＲＳポリペプチドにより調節され得る造血過程の例としては、骨髄性細胞（例えば、赤血球細胞、マスト細胞、単球／マクロファージ、骨髄性樹状細胞、顆粒球（例えば好塩基球、好中球および好酸球、巨核球、血小板など）およびリンパ性細胞（例えば、ナチュラルキラー細胞、リンパ性樹状細胞、Ｂ細胞およびＴ細胞）の形成が挙げられるが、これらに限定されない。特定の造血過程としては、赤血球生成、顆粒球生成、リンパ球生成、巨核球生成、　血小板生成などが挙げられる。また、造血幹細胞、前駆細胞、赤血球、顆粒球、リンパ球、巨核球および血小板を含めた造血細胞の輸送または動員を調節する方法も含まれる。
【０４４７】
造血を調節する方法を、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはそれらの任意の組合せで実施し得る。これらの方法を、造血幹細胞、造血前駆細胞、または

造血系統に沿って分化することが可能な他の幹細胞もしくは前駆細胞（例えば、脂肪組織由来の幹細胞）を含有する任意の生物試料、細胞培養または組織に対して実施することができる。ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｅｘ ｖｉｖｏの方法では、本明細書に記載のおよび当該技術分野で公知の技術および特徴に従って、造血系起源か否かに関係なく、幹細胞および前駆細胞を単離および／または同定することができる。

【０４４８】

また本発明の組成物は、自己免疫性および／または炎症性の疾患、状態および障害を直接的または間接的に仲介する細胞を調節することによる抗炎症性または炎症誘発性の適応症の治療のための免疫調節剤としても有効であり得る。本発明の組成物の免疫調節剤または炎症調節剤としての有用性は、例えば、移動アッセイ（例えば、白血球またはリンパ球を用いるもの）または細胞生存アッセイ（例えば、Ｂ細胞、Ｔ細胞、単球またはＮＫ細胞を用いるもの）を含めた、当該技術分野において公知で利用可能な多数の技術のいずれかを用いてモニターすることができる。

【０４４９】

「炎症」は一般に、病原体、損傷細胞（例えば、創傷）および刺激物質のような有害刺激に対する組織の生物学的応答を指す。「炎症性応答」という用語は、炎症が生じ調節される特定の機序を指し、単なる例として、本明細書に記載のおよび当該技術分野で公知のものの中で特に、キニン放出、線維素溶解および凝固を含めた免疫細胞の活性化または移動、サイトカイン産生、血管拡張がこれに含まれる。

【０４５０】

慢性炎症の臨床兆候は、疾病の持続期間、炎症性病変、原因および罹患している解剖学的領域によって決まる（例えば、Ｋｕｍａｒら，Ｒｏｂｂｉｎｓ Ｂａｓｉｃ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ－第８版，２００９ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｌｏｎｄｏｎ；Ｍｉｌｌｅｒ，ＬＭ，Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ Ｌｅｃｔｕｒｅ Ｎｏｔｅｓ，Ａｔｌａｎｔｉｃ Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｃｏｌｌｅｇｅ，Ｃｈａｒｌｏｔｔｅｔｏｗｎ，ＰＥＩ，Ｃａｎａｄａを参照されたい）。慢性炎症は、例えば、本明細書に記載のおよび当該技術分野で公知のものの中でも特にアレルギー、アルツハイマー病、貧血、大動脈弁狭窄症、関節炎（例えば関節リウマチおよび変形性関節症など）、癌、うっ血性心不全、線維筋痛症、線維症、心臓発作、腎不全、狼瘡、膵炎、脳卒中、外科合併症、炎症性肺疾患、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、神経障害、糖尿病、代謝障害、肥満症および乾癬を含めた各種病的状態または疾患に関連する。したがって、慢性炎症を治療もしくは管理する、任意の１つ以上の個々の慢性炎症性応答を調節する、または慢性炎症に関連した任意の１つ以上の疾患もしくは状態を治療するためにＡＡＲＳ組成物を使用し得る。

【０４５１】

例えば認められている臨床基準に従って改善を判定することにより、鑑別診断を行う、また監視治療を行う、例えば治療過程において治療有効量が投与されたか否かを決定するなどの目的を含めた、炎症性およびその他の状態の兆候および症状を評価するための基準は当業者に明らかであり、例えば、Ｂｅｒｋｏｗら編，Ｔｈｅ Ｍｅｒｃｋ Ｍａｎｕａｌ，第１６版，Ｍｅｒｃｋ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｒａｈｗａｙ，Ｎ．Ｊ．，１９９２；Ｇｏｏｄｍａｎら編，Ｇｏｏｄｍａｎ ａｎｄ Ｇｉｌｍａｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，第１０版，Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｅｌｍｓｆｏｒｄ，Ｎ．Ｙ．，（２００１）；Ａｖｅｒｙ’ｓ Ｄｒｕｇ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，第３版，ＡＤＩＳ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｔｄ．，ＷｉｌｌｉａｍｓおよびＷｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ．（１９８７）；Ｅｂａｄｉ，Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，Ｌｉｔｔｌｅ，Ｂｒｏｗｎ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｂｏｓｔｏｎ，（１９８５）；Ｏｓｏｌｃｉら編，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ，第１８版，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ（１９９０）；Ｋａｔｚｕｎｇ，Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ，Ａｐｐｌ

ｅｔｏｎ ａｎｄ Ｌａｎｇｅ，Ｎｏｒｗａｌｋ，ＣＴ（１９９２）の教示により例示されている。

【０４５２】

他の実施形態では、細胞の増殖および／または生存を調節するために、したがって、細胞の増殖および／または生存の異常を特徴とする疾患、障害または状態を治療するために本発明のＡＡＲＳ組成物を使用し得る。例えば、特定の実施形態では、アポトーシスを調節する、および／または異常なアポトーシスに関連した疾患または状態を治療するためにＡＡＲＳ組成物を使用し得る。アポトーシスを、例えばＤＮＡ断片化、膜非対称性の変化、アポトーシス性カスパーゼの活性化および／またはシトクロームＣおよびＡＩＦの放出を測定するアッセイを含めた、当該技術分野において公知で利用可能な数多くの利用可能な技術によりモニターすることができる。

【０４５３】

これらのおよびその他の治療法（例えば、ｅｘ ｖｉｖｏ療法）の進行を、従来の方法およびアッセイにより、または医師もしくは当業者に公知の基準に基づいてモニターすることができる。

【０４５４】

ＸＩＩＩ．医薬製剤、投与およびキット

本発明の実施形態は、単独でまたは１つ以上の他の様式の治療法と組み合わせて細胞または動物に投与するために、薬学的に許容されるまたは生理的に許容される溶液中で製剤化された、本明細書に記載のＡＡＲＳポリヌクレオチド、ＡＡＲＳポリペプチド、ＡＡＲＳポリペプチドを発現する宿主細胞、結合物質、調節物質またはその他の化合物を含む。また、必要に応じて、本発明の組成物を他の薬剤、例えば、他のタンパク質もしくはポリペプチドまたは様々な薬学的に活性な薬剤と併用して投与し得ることも理解されるであろう。組成物中に同様に含まれ得る他の成分は、達成が望まれる調節その他の作用に追加の薬剤が悪影響を及ぼさない限り、実質的に限定されない。

【０４５５】

本発明の医薬組成物では、薬学的に許容される添加剤および担体溶液の製剤は当業者に公知であり、また、例えば経口、非経口、静脈内、鼻腔内、皮下および筋肉内投与ならびに製剤化を含めた各種治療レジメンにおける本明細書に記載の特定の組成物の使用に適した用量および治療レジメンの開発も同様である。

【０４５６】

特定の適用では、本発明の医薬組成物または治療用組成物は、免疫反応を刺激しない。他の実施形態では、通常１つ以上のＡＡＲＳポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含む本発明の医薬組成物または治療用組成物は、ワクチンもしくは関連組成物中でアジュバントとして働くこと、または免疫応答を刺激する別個のアジュバントもしくは薬剤とともに組成物中に存在することなどにより、免疫反応を刺激する。

【０４５７】

特定の実施形態では、ＡＡＲＳポリペプチド、ＡＡＲＳポリヌクレオチドおよび抗体のようなＡＡＲＳ剤は、静脈内投与のような特定の投与様式に望ましい溶解度を有する。望ましい溶解度の例としては、少なくとも約１ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約１０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも約２５ｍｇ／ｍｌおよび少なくとも約５０ｍｇ／ｍｌが挙げられる。

【０４５８】

特定の適用では、本明細書に開示される医薬組成物を経口投与により対象に送達し得る。したがって、これらの組成物を不活性希釈剤または吸収可能な食用担体で製剤化しても、硬殻ゼラチンまたは軟殻ゼラチンカプセルに封入しても、圧縮して錠剤にしても、食事療法の食物に直接組み込んでもよい。

【０４５９】

特定の状況では、本明細書に開示される医薬組成物を、例えば、米国特許第５，５４３，１５８号；同第５，６４１，５１５号および同第５，３９９，３６３号（それぞれ具体的にその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、非経

口的に、皮下に、静脈内に、筋肉内に、動脈内に、髄腔内に、実質内に、脳室内に、尿道内に、胸骨内に、頭蓋内に、滑液嚢内にまたは腹腔内に送達することが望ましいであろう。非経口投与に適した装置としては、有針（顕微針を含む）注射器、無針注射器および注入技術が挙げられる。

【０４６０】

遊離の塩基または薬学的に許容される塩としての活性化合物の液剤を、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適当に混合して水で調製し得る。また、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびそれらの混合物ならびに油で分散液剤も調製し得る。通常の保管および使用条件下において、これらの製剤は微生物の増殖を防ぐための保存剤を含有する。

【０４６１】

注射用途に適した医薬形態としては、無菌注射用液剤または分散液剤の即時調製のための無菌液剤または分散液剤および無菌粉末剤が挙げられる（具体的にその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，４６６，４６８号）。あらゆる場合において、医薬形態は、無菌であるべきであり、かつ容易に注射可能である程度に流動性であるべきである。医薬形態は、製造および保管条件下で安定であるべきであり、かつ細菌および真菌のような微生物の汚染活動から保護されるべきである。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、適当なそれらの混合物および／または植物油を含有する、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング剤の使用、分散液剤の場合は必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用により維持され得る。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、チメロサールなどにより、微生物の活動の防止を容易にすることができる。多くの場合、等張剤、例えば糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅延させる物質を組成物中に使用することによりもたらすことができる。

【０４６２】

水溶液での非経口投与では、例えば、溶液を必要に応じて適切に緩衝するべきであり、また液体希釈剤を最初に十分な生理食塩水およびグルコースで等張にするべきである。これらの特定の水溶液は、特に静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内への投与に適している。これに関連して、使用可能な無菌水性媒体は、当業者が本開示を踏まえればわかるであろう。例えば、１用量を１ｍｌの等張ＮａＣｌ溶液に溶かし、１０００ｍｌの皮下注入液に加えるか、または意図する注入部位に注射し得る（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ，第１５版，ｐｐ．１０３５－１０３８および１５７０－１５８０を参照されたい）。治療する対象の状態に応じて、多少の用量の変動が必然的に生じるであろう。いずれにせよ、投与に関与する者が個々の対象に適した用量を決定することになる。さらに、ヒトへの投与に関しては、製剤は、ＦＤＡ生物系審査部の基準により必要とされる無菌性、発熱原性ならびに一般的な安全性および純度の基準を満たすべきである。

【０４６３】

無菌注射用液剤は、必要量の活性化合物を、必要に応じて上で列挙した他の様々な成分と共に適当な溶媒中に組み入れ、次いでろ過滅菌することにより調製することができる。一般に分散液剤は、滅菌した様々な有効成分を、基礎分散媒と上で列挙した成分のうち必要な他の成分とを含有する無菌溶剤中に組み入れることにより調製することができる。無菌注射用液剤の調製のための無菌粉末剤の場合、特定の望ましい調製法は真空乾燥および凍結乾燥技術であり、これらの技術では、予め滅菌ろ過した任意の追加の所望成分の溶液に由来するその成分が有効成分に加わった粉末が得られる。

【０４６４】

本明細書に開示される組成物を、中性または塩の形態で製剤化し得る。薬学的に許容される塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ酸基で形成されている）、および無

機酸（例えば、塩酸またはリン酸）または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸で形成されている塩が挙げられる。またカルボキシル基で形成されている塩を、無機塩基、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化鉄から、またイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基から得ることもできる。製剤では、液剤を製剤に適合する様式で、治療的に有効な量で投与する。製剤は、注射用液剤、薬物放出カプセル剤などの各種剤形で容易に投与される。

【０４６５】

本明細書で使用される「担体」は、あらゆる溶媒、分散媒、溶剤、コーティング剤、希釈剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁剤、コロイドなどを包含する。薬学的に活性な物質に対するこのような媒質および薬剤の使用は、当該技術分野で公知である。任意の従来の媒質または薬剤が有効成分に適合しない場合を除き、その治療用組成物での使用が企図される。また補助的な有効成分も組成物中に組み入れることができる。

【０４６６】

「薬学的に許容される」という語句は、ヒトに投与した場合にアレルギー反応または同様の有害な反応を生じない分子的実体および組成物を指す。有効成分としてタンパク質を含有する水性組成物の調製は、当該技術分野において十分に理解されている。通常このような組成物は、液体の溶液または懸濁液の注射溶剤として調製されるが、注射前に液体となる液剤または懸濁剤も調製することができる。また製剤を乳化することもできる。

【０４６７】

特定の実施形態では、医薬組成物を鼻腔内スプレー、吸入および／またはその他のエアロゾル送達媒体により送達し得る。遺伝子、ポリヌクレオチドおよびペプチド組成物を経鼻エアロゾルスプレーにより肺に直接送達する方法が、例えば、米国特許第５，７５６，３５３号および同第５，８０４，２１２号（それぞれ、具体的にその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂（Ｔａｋｅｎａｇａら，１９９８）およびリゾホスファチジルグリセロール化合物（具体的にその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，７２５，８７１号）を用いた薬物の送達も製薬業界において公知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックス形態での経粘膜薬物送達が米国特許第５，７８０，０４５号（具体的にその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０４６８】

医薬組成物を即放性および／または徐放性になるように製剤化し得る。徐放組成物は、遅延された、修正された、パルス状の、制御された、標的化された、およびプログラムされた放出を含む。したがって、組成物を、ＡＡＲＳポリヌクレオチド、ＡＡＲＳポリペプチド、結合物質、調節物質およびその他の活性薬剤の徐放をもたらす埋込みデポ剤として投与するための、懸濁液としてまたは固体、半固体もしくはチキソトロピック液として製剤化し得る。このような製剤の例としては、薬物充填ポリ（ＤＬ－乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＧＬＡ）、ポリ（ＤＬ－ラクチド－ｃｏ－グリコリド）（ＰＬＧ）またはポリ（ラクチド）（ＰＬＡ）ラメラ小胞または微粒子を含む薬物コーティングステントならびに半固体剤および懸濁剤、ヒドロゲル（Ｈｏｆｆｍａｎ　ＡＳ：Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９４４：６２－７３（２００１））、Ｆｌａｍｅｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社により開発されＭＥＤＵＳＡ（登録商標）の商標名で販売されているポリアミノ酸ナノ粒子システム、Ａｔｒｉｘ社により開発されＡＴＲＩＧＥＬ（登録商標）の商標名で販売されている非水性ゲルシステム、Ｄｕｒｅｃｔ社により開発されＳＡＢＥＲ（登録商標）の商標名で販売されているショ糖酢酸イソ酪酸エステル徐放製剤、ならびにＳｋｙｅ　Ｐｈａｒｍａ社により開発されＤＥＰＯＦＯＡＭ（登録商標）の商標名で販売されている脂質ベースのシステムが非限定的に挙げられる。

【０４６９】

所望の用量の医薬組成物を長時間にわたり送達することができる徐放装置が当該技術分

野で公知である。例えば、米国特許第５，０３４，２２９号；同第５，５５７，３１８号；同第５，１１０，５９６号；同第５，７２８，３９６号；同第５，９８５，３０５号；同第６，１１３，９３８号；同第６，１５６，３３１号；同第６，３７５，９７８号；および同第６，３９５，２９２号は、所望の速度で長時間（すなわち、２週間から１年以上までの範囲の期間）にわたり液剤または懸濁剤のような活性薬剤の製剤を送達することができる、浸透圧駆動型の装置を教示している。他の徐放装置の例としては、有効物質の製剤の一定流量、調節可能な流量またはプログラム可能な流量が得られる、Ｍｅｄｔｒｏｎｉｃ社から入手可能なＳＹＮＣＨＲＯＭＥＤ　ＩＮＦＵＳＩＯＮ　ＳＹＳＴＥＭ（登録商標）の商標名で販売されている髄腔内ポンプを含めた調節型のポンプ、ＣＯＤＭＡＮ（登録商標）ｄｉｖｉｓｉｏｎ　ｐｕｍｐの商標名で販売されているＪｏｈｎｓｏｎ　ａｎｄ　Ｊｏｈｎｓｏｎ社のシステム、およびＩＮＳＥＴ（登録商標）ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓポンプが挙げられる。装置のさらなる例が米国特許第６，２８３，９４９号；同第５，９７６，１０９号；同第５，８３６，９３５号；および同第５，５１１，３５５号に記載されている。

【０４７０】

特定の実施形態では、本発明の組成物を適当な宿主細胞に導入するためのリポソーム、ナノカプセル、微粒子、マイクロスフィア、脂質粒子、小胞などの使用により送達が生じ得る。特に、本発明の組成物を、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、ナノ粒子などに封入して送達用に製剤化し得る。このような送達媒体の製剤化および使用は、既知の従来の技術を用いて行うことができる。

【０４７１】

特定の実施形態では、本明細書に記載の薬剤を、ポリマーおよびマトリックスのような生体適合性生分解性基質を含めた薬学的に許容される固体基質に結合させ得る。このような固体基質の例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸とγ－エチル－Ｌ－グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー（例えばポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）およびＬＵＰＲＯＮ　ＤＥＰＯＴ（商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドとからなる注射用マイクロスフィア）など）、ポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸、コラーゲン、金属、ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミン酸、バイオセラミック材料および精製タンパク質が非限定的に挙げられる。

【０４７２】

１つの特定の実施形態では、固体基質は、ＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＱＬＴ，Ｉｎｃ．、Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ、Ｂ．Ｃ．）の商標名で販売されている生分解性ポリマーを含む。ＡＴＲＩＧＥＬ（登録商標）薬物送達システムは、生体適合性の担体に溶解させた生分解性ポリマーからなる。この液体送達システムに医薬品を製造時に混ぜ合わせるか、製品によっては、後で医師が使用時に医薬品を加えることができる。液体の製品を小ゲージの針で皮下の間隙に注入するか、または到達可能な組織部位にカニューレで注入する場合、組織液中の水がポリマーを沈殿させて、固体埋植物中に薬物を捕捉させる。次いで、時間とともにポリマーマトリックスが分解されるにつれて、埋植物内に封入されている薬物が制御されて放出される。

【０４７３】

また本発明で使用する医薬組成物を、皮膚または粘膜へ局所的に、皮膚（皮内）にまたは経皮的に投与し得る。この目的のための典型的な製剤としては、ゲル剤、ヒドロゲル剤、ローション剤、液剤、クリーム剤、軟膏剤、粉剤、包帯剤、泡状剤、フィルム剤、皮膚パッチ、カシェ剤、埋植剤、スポンジ剤、ファイバー剤、包帯およびマイクロエマルション剤が挙げられる。またリポソームも使用し得る。典型的な担体としては、アルコール、水、鉱油、液体ワセリン、白ワセリン、グリセリン、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコールが挙げられる。浸透促進剤も加え得る。例えば、ＦｉｎｎｉｎおよびＭ

ｏｒｇａｎ：Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．８８（１０）：９５５－９５８，（１９９９）を参照されたい。局所投与のその他の手段としては、エレクトロポレーション、イオントフォレシス、フォノフォレシス、ソノフォレシスおよびマイクロニードルまたは、例えばＰＯＷＤＥＲＪＥＣＴ（商標）およびＢＩＯＪＥＣＴ（商標）の商標名で販売されているシステムを用いた無針注射による送達が挙げられる。

【０４７４】

製剤化の方法は当該技術分野において公知であり、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，第２０版，ＩＳＢＮ：０６８３３０６４７２（２０００）に開示されている。本明細書に記載の組成物および薬剤を、任意の治療上有効な投与レジメンで、本発明の方法に従って投与し得る。投与の量および頻度を選択して、有害作用を伴わない薬剤の有効レベルを設定する。本発明の化合物の有効量は、投与経路、治療する温血動物の種類および考慮する特定の温血動物の身体的特性によって決まる。これらの因子およびその有効量決定との関係は、医療分野の当業者に公知である。有効量および投与方法は、最適な効果を得るために調整することができるが、体重、食事、併用する薬剤および医療分野の当業者が認めるその他の因子によって決まる。

【０４７５】

特定の実施形態では、投与する組成物または薬剤の量は一般に、約０．１～約１００ｍｇ／（ｋｇ・日）の範囲であり、経口投与または静脈内投与の場合は通常、約０．１～１０ｍｇ／ｋｇである。特定の実施形態では、用量は５ｍｇ／ｋｇまたは７．５ｍｇ／ｋｇである。様々な実施形態において、用量は、１日当たり約５０～２５００ｍｇ、１００～２５００ｍｇ／日、３００～１８００ｍｇ／日または５００～１８００ｍｇ／日である。一実施形態では、用量は約１００～６００ｍｇ／日の間である。別の実施形態では、用量は約３００～１２００ｍｇ／日の間である。特定の実施形態では、組成物または薬剤の投与を、１００ｍｇ／日、２４０ｍｇ／日、３００ｍｇ／日、６００ｍｇ／日、１０００ｍｇ／日、１２００ｍｇ／日または１８００ｍｇ／日の用量で、１日当たり１回以上の投与で行う（すなわち、用量の合計が所望の１日用量に達する場合）。関連する実施形態では、用量は、１００ｍｇを１日２回、１５０ｍｇを１日２回、２４０ｍｇを１日２回、３００ｍｇを１日２回、５００ｍｇを１日２回または６００ｍｇを１日２回である。様々な実施形態において、組成物または薬剤を単回投与または反復投与で投与する。初回用量とそれに続く用量は同じであっても異なっていてもよい。

【０４７６】

特定の実施形態では、組成物または薬剤を、０．１～１０ｍｇ／ｋｇまたは０．５～５ｍｇ／ｋｇの１回用量で投与する。他の実施形態では、組成物または薬剤を、０．１～５０ｍｇ／（ｋｇ・日）、０．５～２０ｍｇ／（ｋｇ・日）または５～２０ｍｇ／（ｋｇ・日）の用量で投与する。

【０４７７】

特定の実施形態では、組成物または薬剤を、例えば約１０分～９０分の時間にわたる注入により、例えば経口または静脈内投与する。他の関連する実施形態では、組成物または薬剤を、例えば、約０．１～約１０ｍｇ／（ｋｇ・時）の用量で一定の時間にわたり、持続注入により投与する。時間の長さは様々であり得るが、特定の実施形態では、時間の長さは約１０分～約２４時間の間、または約１０分～約３日間の間であり得る。

【０４７８】

特定の実施形態では、有効量または治療有効量は、対象の血漿中の組成物または薬剤の総濃度が、約０．１μｇ／ｍｌ～約２０μｇ／ｍｌの間または約０．３μｇ／ｍｌ～約２０μｇ／ｍｌの間のC_{max}に達するのに十分な量である。特定の実施形態では、経口用量は、約０．１μｇ／ｍｌ～約５μｇ／ｍｌの間または約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間の血漿中濃度（C_{max}）に達するのに十分な量である。特定の実施形態では、静脈内用量は、約１μｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間または約２μｇ／ｍｌ～約６μｇ

／ｍｌの間の血漿中濃度（C_{max}）に達するのに十分な量である。関連する実施形態では、対象の血漿中の薬剤の総濃度は、平均トラフ濃度が約２０μｇ／ｍｌ未満および／または定常状態濃度が約２０μｇ／ｍｌ未満である。さらなる実施形態では、対象の血漿中の薬剤の総濃度は、平均トラフ濃度が約１０μｇ／ｍｌ未満および／または定常状態濃度が約１０μｇ／ｍｌ未満である。

【０４７９】

さらに別の実施形態では、対象の血漿中の薬剤の総濃度は、平均トラフ濃度が約１ｎｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間および／または定常状態濃度が約１ｎｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間である。一実施形態では、対象の血漿中の薬剤の総濃度は、平均トラフ濃度が約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間および／または定常状態濃度が約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間である。

【０４８０】

特定の実施形態では、哺乳動物において、平均トラフ濃度が約１ｎｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間および／または定常状態濃度が約１ｎｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間である血漿中濃度を達成するのに十分な量で、組成物または薬剤を投与する。関連する実施形態では、哺乳動物の血漿中の薬剤の総濃度は、平均トラフ濃度が約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間および／または定常状態濃度が約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間である。

【０４８１】

本発明の特定の実施形態では、組成物もしくは薬剤の有効量、または組成物もしくは薬剤の血漿中濃度が、例えば、少なくとも１５分、少なくとも３０分、少なくとも４５分、少なくとも６０分、少なくとも９０分、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも８時間、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも４８時間、少なくとも３日、少なくとも４日、少なくとも５日、少なくとも６日、少なくとも１週間、少なくとも２週間、少なくとも１か月、少なくとも２か月、少なくとも４か月、少なくとも６か月、少なくとも１年、少なくとも２年、または２年超で達成されるか、またはこの間維持される。

【０４８２】

特定のポリペプチドベースの実施形態では、投与するポリペプチドの量は通常、患者の体重当たりで約０．１μｇ／ｋｇ～約０．１ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇの範囲である。疾患のタイプおよび重症度によっては、例えば１回以上の分割投与であっても、持続注入であっても、体重あたりで約０．１μｇ／ｋｇ～約０．１ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ（例えば、約０．１～１５ｍｇ／（ｋｇ・用量））のポリペプチドが患者への初回投与量の候補となり得る。例えば、投与レジメンは、約４ｍｇ／ｋｇ初回負荷量、次いで約２ｍｇ／ｋｇすなわち負荷量の約半分の週１回維持量のポリペプチドの投与を含み得る。しかし、他の投与レジメンも有効であり得る。典型的な１日用量は、上記因子に応じて、約０．１μｇ／ｋｇ～約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲であり得る。数日以上にわたる反復投与では、状況に応じて、疾患症状の所望の抑制が見られるまで治療を持続する。

【０４８３】

特定の実施形態では、効果的な用量により、本明細書に記載の組成物または薬剤の血漿レベルまたは平均トラフ濃度が達成される。これらは日常的な手順を用いて容易に決定され得る。

【０４８４】

他の態様では、本発明の実施形態は、本明細書に記載されている本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、多ユニットの複合体、その組成物などを１つ以上充填した容器を１つ以上含むキットを提供する。キットは、このような組成物の使用方法（例えば、細胞シグナル伝達，血管新生，癌，炎症性状態、診断を調節するための）に関する取扱説明書を含み得る。

【０４８５】

また本明細書のキットは、治療する適応症または所望の診断的適用に適するもしくは望まれる、１つ以上の追加の治療剤またはその他の成分も含み得る。追加の治療剤は、必要に応じて第二の容器に収納され得る。追加の治療剤の例としては、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、血管新生剤などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４８６】

また本明細書のキットは、意図する様式の送達（例えば、ステント、埋植用デポ剤など）を容易にするために必要なまたは望まれるシリンジまたはその他の構成要素を１つ以上含み得る。

【０４８７】

本明細書で引用される刊行物、特許出願および発行済み特許はすべて、個々の刊行物、特許出願または発行済み特許が、それぞれ具体的かつ個別に参照により組み込まれることが明示されたものとして、参照により本明細書に組み込まれる。

【０４８８】

明確な理解を目的として、説明および例示により上記発明がいくらか詳細に記載されているが、本発明の教示を踏まえた当業者には、添付の特許請求の範囲の趣旨または範囲を逸脱することなく、特定の変更および修正をこれに施し得ることが容易わかるであろう。以下の実施例は、限定するためではなく、単に説明するために記載されるものである。当業者は、変更または修正を加えても実質的に同様の結果が得られる各種の重要ではないパラメータを容易に認識するであろう。

【実施例】

【０４８９】

ＸＩＶ．実施例

一般的方法

下の実施例において別途明記されない限り、下の実施例に記載されているＡＡＲＳポリペプチドの作製および特徴付けを行うために、以下の遺伝子最適化、小規模および大規模なタンパク質発現、タンパク質精製、転写プロファイリングおよびスクリーニングの一般的な方法を用いた。

【０４９０】

遺伝子の合成および発現ベクター中へのクローニング

エピトープタグ化した型のＡＡＲＳポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、以下に挙げる方法を用いてコドン最適化し、細菌発現ベクター中にクローニングした。

【０４９１】

方法（１）では、各ＡＡＲＳポリペプチドをコードする大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）コドン最適化したＤＮＡ（Ｗｅｌｃｈら，ＰＬｏＳ　ＯＮＥ　４（９）：ｅ７００７　ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．０００７００２）をＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ、ＣＡ）により合成し、ヒスチジンタグ６個とＶ５エピトープタグの両方を含むエピトープタグと結合したＮ末端またはＣ末端を含む、２つの型の各ＡＡＲＳポリペプチドを合成する。

【０４９２】

５’から３’に向かってリボソーム結合部位（ｒｂｓ（以下の下線部））、ＮｄｅＩ制限部位、６個のヒスチジンタグおよびＶ５エピトープタグをコードする５’伸長（ＡＧＧＡＧＧＴＡＡＡＡＣＡＴＡＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＴＣＡＴＣＡＴＣＡＣＧＧＴＡＡＧＣＣＴＡＴＣＣＣＴＡＡＣＣＣＴＴＴＧＣＴＣＧＧＴＣＴＣＧＡＴＴＣＴＡＣＧ）（配列番号１）を、予測されるＡＡＲＳポリペプチドオープンリーディングフレームとインフレームで融合して、Ｎ末端タグ化ＡＡＲＳポリペプチドをコードするＤＮＡを合成する。予測される天然の開始メチオニン（ＡＴＧ）残基をＡＡＲＳポリペプチドが含む場合、または予測されるＡＡＲＳポリペプチドの最初のアミノ酸残基がＭｅｔである場合は、これを削除した。予測されるＡＡＲＳポリペプチドオープンリーディングフレームの最後の部分に、２つの停止コドンおよび１つのＸｈｏＩ部位（ＴＡＡＴＧＡＣＴＣＧＡＧ）（配列番号２）を付加する。

【０４９３】
ｒｂｓ（以下の下線部）およびＮｄｅＩ制限部位をコードし、予測されるＡＡＲＳポリペプチドの天然の開始コドンを繰り返すか、または予測されるＡＡＲＳポリペプチドオープンリーディングフレームとインフレームでＡＴＧが挿入されている５’伸長（ＡＧＧＡＧＡＴＡＡＡＡＣＡＴＡＴＧ）（配列番号３）を用いて、Ｃ末端タグ化ＡＡＲＳポリペプチドをコードするＤＮＡを合成する。異なる実施形態では、リボソーム結合部位は配列「ＡＧＧＡＧＧＴＡＡＡＡＣＡＴ」（配列番号４）、「ＡＧＧＡＧＡＴＡＡＡＡＣＡＴ」（配列番号５）またはＧＡＡＧＧＡＧＡＴＡＴＡＣＡＴ（配列番号６）を含み得る。予測されるＡＡＲＳポリペプチドオープンリーディングフレームの３’末端において、５’から３’へ向かって順番にＶ５エピトープタグ、６個のヒスチジンタグ、２つの停止コドンおよび１つのＸｈｏＩ部位をコードする３’伸長（ＧＧＴＡＡＧＣＣＴＡＴＣＣＣＴＡＡＣＣＣＴＣＴＣＣＴＣＧＧＴＣＴＣＧＡＴＴＣＴＡＣＧＣＡＣＣＡＣＣＡＴＣＡＴＣＡＣＣＡＴＴＡＡＴＧＡＣＴＣＧＡＧ）（配列番号７）を合成し、予測されるＡＡＲＳポリペプチドオープンリーディングフレームとインフレームで融合する。ＡＡＲＳポリペプチドが予測される天然の停止コドンを含む場合は、これを削除した。

【０４９４】
ＡＡＲＳポリペプチドをコードする合成ＤＮＡ配列をｐＪＥｘｐｒｅｓｓ４１１ベクター（ＤＮＡ２．０）中にサブクローニングする。配列決定して正確な生成物の合成を確認した後、発現ベクターを、以下でより詳細に記載するように、タンパク質合成用の細菌中に形質転換する。

【０４９５】
方法（２）では、各ＡＡＲＳポリペプチドをコードする大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）コドン最適化ＤＮＡ（Ｅｒｍｏｌａｅｖａ　ＭＤ（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｉｓｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３（４）９１－７）を、ＧＥＮＥＷＩＺ（Ｓｏｕｔｈ　Ｐｌａｉｎｆｉｅｌｄ、ＮＪ）により合成する。次のクローニングのために、固有の制限部位を含む短い５’および３’伸長により、ＡＡＲＳポリペプチドをコードする各ポリヌクレオチド配列を合成した。

【０４９６】
具体的には、予測されるオープンリーディングフレームの５’末端にＢａｍＨＩ制限部位を挿入した。予測される天然の開始メチオニン残基（ＡＴＧ）をＡＡＲＳポリペプチドが含む場合、または予測されるＡＡＲＳポリペプチドの最初のアミノ酸残基がＭｅｔである場合には、これを削除した。さらに、予測されるオープンリーディングフレームの３’末端にＸｈｏＩ制限部位を挿入した。ＡＡＲＳポリペプチドが予測される天然の停止コドンを含む場合は、これを削除した。

【０４９７】
制限消化後、得られたＤＮＡ配列を、ヒスチジン６個とＶ５エピトープタグとを含むエピトープタグと結合したＮ末端（ｐＥＴ２４ｂ＿Ｎ－６×Ｈｉｓ／Ｖ５）またはＣ末端（ｐＥＴ２４ｂ＿Ｃ－Ｖ５／６×Ｈｉｓ）を含む改変ｐＥＴ－２４ｂベクター（ＥＭＤ、Ｇｉｂｂｓｔｏｗｎ、ＮＪ）中にサブクローニングする（ＧＥＮＥＷＩＺ（Ｓｏｕｔｈ　Ｐｌａｉｎｆｉｅｌｄ、ＮＪ）によるベクター改変）。

【０４９８】
制限消化とクローニングの後、Ｎ－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドをコードするＤＮＡは、ヒスチジン６個とＶ５エピトープタグとをコードする５’ＤＮＡ配列（ＣＡＴＡＴＧＣＡＴＣＡＴＣＡＴＣＡＴＣＡＣＧＧＴＡＡＧＣＣＴＡＴＣＣＣＴＡＡＣＣＣＴＣＴＣＣＴＣＧＧＴＣＴＣＧＡＴＴＣＴＡＣＧＧＧＡＴＣＣ）（配列番号８）を含むＮ－タグ化ベクター（ｐＥＴ２４ｂ＿Ｎ－６×Ｈｉｓ／Ｖ５）中に、ＮｄｅＩ制限部位内に組み込まれた開始コドン（ＡＴＧ）とインフレームでクローニングされる。この５’伸長は、短い２アミノ酸リンカー（ＧＳ）を介して、予測されるＡＡＲＳポリペプチドオープンリーディングフレームと融合する。

【０４９９】

Ｎ－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドをコードするＤＮＡは、予測されるオープンリーディングフレームの３’末端に、２アミノ酸伸長（ＬＥ）とそれに続く２つの終止コドンをコードするＤＮＡ配列（ＣＴＣＧＡＧＴＡＡＴＧＡ）（配列番号９）を含む。

【０５００】

制限消化とクローニングの後、Ｃ－タグ化ベクター（ｐＥＴ２４ｂ＿Ｃ－Ｖ５／６×Ｈｉｓ）中にクローニングされた、Ｃ－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドをコードするＤＮＡは、ＮｄｅＩ制限部位内に組み込まれた開始コドン（ＡＴＧ）をコードする５’配列（ＣＡＴＡＴＧＧＧＡＴＣＣ）（配列番号１０）を含み、この配列は、短い２アミノ酸リンカー（ＧＳ）を介して、予測されるＡＡＲＳポリペプチドオープンリーディングフレームと融合している。

【０５０１】

Ｃ－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドをコードするＤＮＡは、予測されるオープンリーディングフレームの３’末端に、短いリンカー２アミノ酸リンカー（ＬＥ）、次いでＶ５エピトープタグ、次いで６個のヒスチジンおよび２つの停止コドンをコードする３’ＤＮＡ配列（ＣＴＣＧＡＧＧＧＴＡＡＧＣＣＴＡＴＣＣＣＴＡＡＣＣＣＴＣＴＣＣＴＣＧＧＴＣＴＣＧＡＴＴＣＴＡＣＧＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＴＡＡＴＧＡ）（配列番号１１）を含む。

【０５０２】

ＡＡＲＳポリペプチドの発現、精製および生物物理学的特徴付け

必要なタンパク質の量に応じて、６×Ｈｉｓタグ化ＡＡＲＳポリペプチドを中程度のスループットの形式で細菌内で、および／またはより大規模のフラスコ培養で発現させる。以下に記載のように、また特定の実験に関して明記されているように、アフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーを用いてＡＡＲＳポリペプチドを精製する。

【０５０３】

細菌培養：各ＡＡＲＳポリペプチド（上記）をコードするコドン最適化ＤＮＡを含む１００ｎｇの発現ベクターを、ＰＣＲプレートでＢＬ２１（ＤＥ３）（ＥＭＤ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号６９４５０）コンピテント大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中に４２℃で３０秒間、形質転換する。またＣ４１（ＤＥ３）（Ｌｕｃｉｇｅｎ、カタログ番号６０４４２）、ＨＭＳ１７４（ＤＥ３）（ＥＭＤ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号６９４５３）および　ａｎｄ　Ｏｒｉｇａｍｉ２（ＤＥ３）（ＥＭＤ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号７１３４５）菌株も評価する。プレートを氷上に２分間置き、１００μＬのＳＯＣ培地を加え、次いで３７℃で１時間インキュベートする。カナマイシン（１００μｇ／ｍＬ）を添加した５ｍＬの自己誘導培地（ＥＭＤ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号７１４９１）を、２４ウェルブロック（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号１９５８３）の各ウェルに加える。形質転換反応物を個々のウェルに加え、ブロックを粘着フィルム（ＶＷＲ、カタログ番号６０９４１－０７８）で密閉し、３７℃の振盪器中、２５０ｒｐｍで一晩インキュベートする。低温（２５℃）条件を用いる場合、代わりにインキュベーションを４８時間行う。

【０５０４】

より大きな規模での発現では、カナマイシン（１００μｇ／ｍＬ）を添加した２００ｍＬの自己誘導培地を、ベントキャップ付きの５００ｍＬのＥｒｌｅｎｍｅｙｅｒフラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、カタログ番号４３１４０１）に加える。形質転換反応物を個々のフラスコに加え、３７℃の振盪器中、２５０ｒｐｍで３０時間インキュベートする。

【０５０５】

タンパク質単離：培養物が定常期（典型的な３～６のOD_{600}）に達した後、ブロックを３６００×ｇで１０分間、遠心分離する。培地を慎重に吸引し、ブロックを－８０℃または－２０℃で１０分間、凍結させる。次いで、ブロックを室温で解凍し、１ｍＬの溶解緩衝液（２００μＬのｌｙｓｏｎａｓｅ（ＥＭＤ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号７１３７０）を加えたＢｕｇｂｕｓｔｅｒ１００ｍＬおよびプロテアーゼ阻害剤「ｃｏｍ

ｐｌｅｔｅ ｍｉｎｉ ＥＤＴＡ－ｆｒｅｅ」（Ｒｏｃｈｅ、カタログ番号１１ ８３６ １７０ ００１））を各ウェルに加える。塊が見えなくなるまでピペッティングを繰り返してペレットを再懸濁させ、エッペンドルフチューブに移し、次いで、振盪器で１０～２０分間、室温でインキュベートする。４℃、１６，０００ｇで１０分間遠心分離した後、溶解物をＮｉ－ＮＴＡ Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ ９６ ＢｉｏＲｏｂｏｔ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号９６９２６１）に備えられたＴｕｒｂｏＦｉｌｔｅｒ９６プレートに加え、５００ｇで５～１０分間遠心分離する。

【０５０６】

より大きな規模での発現では、定常期の培養物を５００ｍＬのボトルに移し、６，０００ｇで１０分間、遠心分離する。培地をデカントし、さらなる処理までペレットを－８０℃または－２０℃で保管する。次いで、ペレットを室温で解凍し、２０ｍＬの溶解緩衝液を各ボトルに加える。塊が見えなくなるまでピペッティングを繰り返してペレットを再懸濁させ、次いで、振盪器で２０分間、室温でインキュベートする。４℃、１０，０００ｇで３０分間遠心分離した後、溶解物をきれいなチューブまたはボトルに移す。移す際に微量の残渣が混入した場合、試料を再び遠心分離するか、または０．４５μｍ酢酸セルロース膜（Ｃｏｒｎｉｎｇ、カタログ番号４３０３１４）に通してさらに清澄化する。

【０５０７】

アフィニティー精製：Ｎｉ－ＮＴＡ Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ ９６ ＢｉｏＲｏｂｏｔ Ｋｉｔに備えられたＱＩＡＦｉｌｔｅｒ９６プレートに２００μＬのＮｉ－ＮＴＡ Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗスラリーを入れ、６００μＬの結合緩衝液（２０ｍＭリン酸ナトリウム、５００ｍＭ塩化ナトリウムおよび１０ｍＭイミダゾール、ｐＨ７．５）を加えてレジンを平衡化する。緩衝液がすべてレジンを通過するまで－１５ｉｎ．Ｈｇ（約－５．１×10^4Ｐａ）の真空をかける。次いで、前段階の清澄化した細胞溶解物をＱＩＡＦｉｌｔｅｒ（登録商標）９６プレートに加え、５分間結合させる。試料がすべてレジンを通過するまで、約５分間、－３ｉｎ．Ｈｇ（約－１．０×10^4Ｐａ）の真空をかける。次いで、レジンを１ｍＬの結合緩衝液で洗浄した後、０．１％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含有する１ｍＬの結合緩衝液で２回洗浄する。次いで、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含まない１ｍＬの結合緩衝液でレジンを１０回洗浄する。結合した６×Ｈｉｓ－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドを４５０μＬの溶出緩衝液（２０ｍＭリン酸ナトリウム、５００ｍＭ塩化ナトリウムおよび５００ｍＭイミダゾール、ｐＨ７．５）で溶出させ、４℃で保管する。

【０５０８】

より大きな規模での発現では、空の使い捨てカラム「ポリ－Ｐｒｅｐ」（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号７３１－１５５０）に１ｍＬのＮｉ－ＮＴＡ Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗスラリー（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号３０４５０）を加え、５ｍＬの結合緩衝液の添加によりレジン０．５ｍＬを平衡化する。次いで、前段階の清澄化した細胞溶解物をカラムに負荷し、重力により通過させる。最初にレジンを、０．１％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００を加えた結合緩衝液５０ｍＬで洗浄し、次いでＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含まない結合緩衝液５０ｍＬで洗浄する。結合した６×Ｈｉｓ－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドを２ｍＬの溶出緩衝液で溶出させ、４℃で保管する。

【０５０９】

脱塩および仕上げ段階：分子質量が１０ｋＤａを超えるＡＡＲＳポリペプチドでは、ＡｃｒｏＰｒｅｐ９６フィルタープレート（Ｐａｌｌ、カタログ番号５０３４）のＯｍｅｇａ １０Ｋ膜を２０μＬの１×ＰＢＳで洗浄し、液体がすべて通過するまでプレートを真空マニホールド（＞１０ｉｎ Ｈｇ（約３．４×10^4Ｐａ））に置く。前段階の溶出液（Ｎｉ－ＮＴＡ）を各ウェルに分配し、液体がすべて通過するまで真空をかける。溶出液の全体積（４５０μＬ）が処理されるまで、これらの段階を繰り返す。各ウェルに１８０μＬの１×ＰＢＳ（ｐＨ７．４）を加え、慎重に１０回上下にピペッティングしてＡＡＲＳポリペプチドを回収してから、きれいなブロックに移す。１ウェル当たり総体積が３６０μＬになるまでこの段階を繰り返し、ブロックを４℃で保管する。分子質量が１０ｋＤａ未満のＡＡＲＳポリペプチドでは、Ｎｉ－ＮＴＡの溶出物をＵｌｔｒａｃｅｌ－３膜を

備えたＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＵＦＣ９００３０８）に入れ、次いで１０ｍＬの１×ＰＢＳを加えて、体積が３６０μＬ未満になるまで３，６００ｇで１０～３０分間遠心分離する。試料を回収し、最終体積３６０μＬになるまで１×ＰＢＳを加える。

【０５１０】

エンドトキシンを除去するために、Ｍｕｓｔａｎｇ　Ｑ膜を備えたＡｃｒｏＰｒｅｐ　Ａｄｖａｎｃｅフィルタープレート（Ｐａｌｌ、カタログ番号８１７１）を３００μＬの１×ＰＢＳで洗浄し、１，０００ｇで５分間遠心分離して緩衝液を除去する。脱塩されたＡＡＲＳポリペプチド（３６０μＬ／ウェル）をフィルタープレートに加え、振盪器で５～１０分間インキュベートする。次いで、プレートを１，０００ｇで５～１０分間遠心分離し、ＡＡＲＳポリペプチドを含有する通過画分を収集して４℃で保管する。

【０５１１】

これより規模の大きな発現では、Ｎｉ－ＮＴＡの溶出物を、ＡＡＲＳポリペプチドの分子量に応じてＵｌｔｒａｃｅｌ－３またはＵｌｔｒａｃｅｌ－１０膜を備えたＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＵＦＣ９００３０８またはＵＦＣ９０１００８）に入れて、体積が２５０μＬに減少するまで３，６００ｇで１０～３０分間遠心分離する。試料を１０ｍＬの１×ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中で混合し、３，６００ｇで１０～３０分間、体積が約２５０μＬになるまで再び遠心分離する。この段階をもう一度繰り返し、上清を回収して、最終体積１．５ｍＬになるまで１×ＰＢＳを加える。

【０５１２】

エンドトキシンを除去するために、Ｓａｒｔｏｂｉｎｄ　Ｑ５強陰イオンイオン交換体膜（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、カタログ番号Ｑ５Ｆ）に１ｍＬの１×ＰＢＳを流し、プラスチックシリンジを用いてＡＡＲＳポリペプチドに徐々に膜を通過させる。ＡＡＲＳポリペプチドを含有する通過画分を９６－ディープウェルブロックに収集して密閉し、４℃で保管する。

【０５１３】

細菌内で発現されて封入体に存在する６×Ｈｉｓ－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドを、以下に記載のように、アフィニティークロマトグラフィーおよび一連のリフォールディング段階を用いて精製する。

【０５１４】

細菌培養：各ＡＡＲＳポリペプチドをコードする１００ｎｇのプラスミドを、ＰＣＲプレートでＢＬ２１（ＤＥ３）（ＥＭＤ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号６９４５０）またはＣ４１（ＤＥ３）（Ｌｕｃｉｇｅｎ、カタログ番号６０４４２）コンピテント大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中に４２℃で３０秒間、形質転換する。プレートを氷上に２分間置き、１００μＬのＳＯＣ培地を加え、次いで３７℃で１時間インキュベートする。カナマイシン（１００μｇ／ｍＬ）を添加した５ｍＬの自己誘導培地（ＥＭＤ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号７１４９１）を、２４ウェルブロック（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号１９５８３）の各ウェルに加える。形質転換反応物を個々のウェルに加え、ブロックを粘着フィルム（ＶＷＲ、カタログ番号６０９４１－０７８）で密閉し、３７℃の振盪器中、２５０ｒｐｍで一晩インキュベートする。

【０５１５】

より大きな規模での発現では、カナマイシン（１００μｇ／ｍＬ）を添加した２００ｍＬの自己誘導培地を、ベントキャップ付きの５００ｍＬのＥｒｌｅｎｍｅｙｅｒフラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、カタログ番号４３１４０１）に加える。形質転換反応物を個々のフラスコに加え、３７℃の振盪器中、２５０ｒｐｍで３０時間インキュベートする。

【０５１６】

単離：培養物が定常期（典型的な３～６のOD_{600}）に達した後、ブロックを３６００×ｇで１０分間、遠心分離する。培地を慎重に吸引し、ブロックを－８０℃または－２０℃で１０分間、凍結させる。次いで、ブロックを室温で解凍し、１ｍＬの溶解緩衝液（

２００μＬのｌｙｓｏｎａｓｅ（ＥＭＤ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号７１３７０）を加えたＢｕｇｂｕｓｔｅｒ１００ｍＬおよびプロテアーゼ阻害剤「ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ｍｉｎｉ　ＥＤＴＡ－ｆｒｅｅ」（Ｒｏｃｈｅ、カタログ番号１１８３６１７０００１））を各ウェルに加える。塊が見えなくなるまでピペッティングを繰り返してペレットを再懸濁させ、エッペンドルフチューブに移し、次いで、振盪器で１０～２０分間、室温でインキュベートする。４℃、１６，０００ｇで１０分間遠心分離した後、可溶性の溶解物を棄て、封入体を変性結合緩衝液（２０ｍＭリン酸ナトリウム、５００ｍＭ塩化ナトリウム、６Ｍ塩酸グアニジン、１０ｍＭイミダゾール、ｐＨ７．５）中で十分に再懸濁させる。試料を１６，０００ｇで１０分間遠心分離し、上清をＮｉ－ＮＴＡ　Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ　９６　ＢｉｏＲｏｂｏｔ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号９６９２６１）に備えられたＴｕｒｂｏＦｉｌｔｅｒ９６プレートに加えてから、５００ｇで５～１０分間遠心分離する。ろ液をきれいな９６ウェルブロック（Ｇｒｅｉｎｅｒ、カタログ番号７８０２８６）に収集する。

【０５１７】

より大きな規模での発現では、定常期の培養物を５００ｍＬのボトルに移し、６，０００ｇで１０分間、遠心分離する。培地をデカントし、さらなる処理までペレットを－８０℃または－２０℃で保管する。次いで、ペレットを室温で解凍し、２０ｍＬの溶解緩衝液を各ボトルに加える。塊が見えなくなるまでピペッティングを繰り返してペレットを再懸濁させ、次いで、振盪器で２０分間、室温でインキュベートする。４℃、１０，０００ｇで３０分間遠心分離した後、可溶性の溶解物を棄て、不溶性の封入体を変性結合緩衝液中で十分に再懸濁させる。

【０５１８】

アフィニティー精製：Ｎｉ－ＮＴＡ　Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ　９６　ＢｉｏＲｏｂｏｔ　Ｋｉｔに備えられたＱＩＡＦｉｌｔｅｒ９６プレートに２００μＬのＮｉ－ＮＴＡ　Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗスラリーを入れ、６００μＬの変性結合緩衝液（上記参照）を加えてレジンを平衡化する。緩衝液がすべてレジンを通過するまで－１５ｉｎ．Ｈｇ（約－５．１×10^4Ｐａ）の真空をかける。次いで、前段階の清澄化した細胞溶解物をＱＩＡＦｉｌｔｅｒ（登録商標）９６プレートに加え、５分間結合させる。試料がすべてレジンを通過するまで、約５分間、３インチ水銀（約１．０×10^4Ｐａ）の真空をかける。次いで、レジンを１ｍＬの変性結合緩衝液で洗浄した後、０．１％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含有する１ｍＬの変性結合緩衝液で５回洗浄する。次いで、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含まない１ｍＬの変性結合緩衝液でレジンを１５回洗浄する。結合した６×Ｈｉｓ－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドを４５０μＬの変性溶出緩衝液（２０ｍＭリン酸ナトリウム、５００ｍＭ塩化ナトリウム、６Ｍ塩酸グアニジンおよび５００ｍＭイミダゾール、ｐＨ７．５）で溶出させ、４℃で保管する。

【０５１９】

より大きな規模での発現では、空の使い捨てカラム「ポリ－Ｐｒｅｐ」（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号７３１－１５５０）に１ｍＬのＮｉ－ＮＴＡ　Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗスラリー（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号３０４５０）を加え、５ｍＬの変性結合緩衝液（上記参照）の添加によりレジン０．５ｍＬを平衡化する。次いで、前段階の変性封入体をカラムに負荷し、重力により通過させる。最初にレジンを、０．１％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００を加えた変性結合緩衝液５０ｍＬで洗浄し、次いでＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含まない変性結合緩衝液５０ｍＬで洗浄する。結合した６×Ｈｉｓ－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドを２ｍＬの変性溶出緩衝液で溶出させ、４℃で保管する。

【０５２０】

リフォールディング：１０ｋＤａを超えるＡＡＲＳポリペプチドでは、ＡｃｒｏＰｒｅｐ９６フィルタープレート（Ｐａｌｌ、カタログ番号５０３４）のＯｍｅｇａ　１０Ｋ膜を２０μＬの１×ＰＢＳで洗浄し、液体がすべて通過するまでプレートを真空マニホールド（＞１０ｉｎ．Ｈｇ（約３．４×10^4Ｐａ））に置く。前段階の溶出液（Ｎｉ－ＮＴＡ）を各ウェルに分配し、液体がすべて通過するまで真空をかける。溶出液の全体積（４

５０μＬ）が処理されるまで、これらの段階を繰り返す。各ウェルに２００μＬのリフォールディング緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２５０ｍＭ塩化ナトリウム、１０ｍＭ塩化カリウム、２ｍＭ塩化マグネシウム、２ｍＭ塩化カルシウム、４００ｍＭスクロース、５００ｍＭアルギニン、１ｍＭ　ＤＴＴおよび０．０１％ポリソルベート８０を含有、ｐＨ７．４）を加え、慎重に１０回上下にピペッティングしてＡＡＲＳポリペプチドを回収してから、きれいなブロックに移す。１ウェル当たり総体積が４００μＬになるまでこの段階を繰り返し、ブロックを４℃で一晩、振盪器に置く。１０ｋＤａ未満のＡＡＲＳポリペプチドでは、Ｎｉ－ＮＴＡの溶出物をＵｌｔｒａｃｅｌ－３膜を備えたＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＵＦＣ９００３０８）に入れ、次いで１０ｍＬのリフォールディング緩衝液を加えて、体積が４００μＬ未満になるまで３，６００ｇで１０～３０分間遠心分離する。試料を回収し、最終体積４００μＬになるまでさらにリフォールディング緩衝液を加える。試料を９６ウェルブロックに移し、フィルムで密閉し、４℃で一晩、振盪器に置く。

【０５２１】

より大きな規模での発現では、Ｎｉ－ＮＴＡの溶出物を、Ｕｌｔｒａｃｅｌ－３またはＵｌｔｒａｃｅｌ－１０膜を備えたＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、ＡＡＲＳポリペプチドの分子量に応じてカタログ番号ＵＦＣ９００３０８またはＵＦＣ９０１００８）に入れて、体積が約５００μＬに減少するまで３，６００ｇで１０～３０分間遠心分離する。ｐＩが７を超えるＡＡＲＳポリペプチドでは、試料を以下の緩衝液で２０倍に希釈する：５０ｍＭ酢酸ナトリウム、１０ｍＭ塩化ナトリウム、０．４ｍＭ塩化カリウム、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、４００ｍＭスクロース、５００ｍＭアルギニン、１ｍＭ　ＤＴＴおよび０．０１％ポリソルベート８０、ｐＨ６．０。ｐＩが７未満のＡＡＲＳポリペプチドでは、試料を以下の緩衝液で２０倍に希釈する：５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２５０ｍＭ塩化ナトリウム、１０ｍＭ塩化カリウム、２ｍＭ塩化マグネシウム、２ｍＭ塩化カルシウム、４００ｍＭスクロース、５００ｍＭアルギニン、１ｍＭ　ＤＴＴおよび０．０１％ポリソルベート８０、ｐＨ８．０。試料を４℃で一晩、振盪器でインキュベートする。

【０５２２】

脱塩および仕上げ段階：一晩のインキュベーション後、９６ウェルブロックを３，６００ｇで遠心分離して、可能性のあるあらゆる凝集物を除去する。次いで、上清に対して１×ＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１００１０）による緩衝液交換を行う。１０ｋＤａを超えるＡＡＲＳポリペプチドでは、ＡｃｒｏＰｒｅｐ９６フィルタープレートのＯｍｅｇａ　１０Ｋ膜を２０μＬの１×ＰＢＳで洗浄し、液体がすべて通過するまでプレートを真空マニホールド（＞１０ｉｎ．Ｈｇ（約３．４×10^4Ｐａ））に置く。リフォールディング緩衝液中の試料を各ウェルに分配し、液体がすべて通過するまで真空をかける。溶出液の全体積（４００μＬ）が処理されるまで、これらの段階を繰り返す。各ウェルに１８０μＬの１×ＰＢＳ（ｐＨ７．４）を加え、慎重に１０回上下にピペッティングしてＡＡＲＳポリペプチドを回収してから、きれいなブロックに移す。１ウェル当たり総体積が３６０μＬになるまでこの段階を繰り返し、ブロックを４℃で保管する。１０ｋＤａ未満のＡＡＲＳポリペプチドでは、リフォールディング試料を、Ｕｌｔｒａｃｅｌ－３膜を備えたＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＵＦＣ９００３０８）に入れ、次いで１０ｍＬの１×ＰＢＳを加えて、体積が３６０μＬ未満になるまで３，６００ｇで１０～３０分間遠心分離する。試料を回収し、最終体積３６０μＬになるまで１×ＰＢＳを加える。

【０５２３】

エンドトキシンを除去するために、Ｍｕｓｔａｎｇ　Ｑ膜を備えたＡｃｒｏＰｒｅｐ　Ａｄｖａｎｃｅフィルタープレート（Ｐａｌｌ、カタログ番号８１７１）を３００μＬの１×ＰＢＳで洗浄し、１，０００ｇで５分間遠心分離して緩衝液を除去する。ＡＡＲＳポ

リペプチド（３６０μＬ／ウェル）をフィルタープレートに加え、振盪器で５～１０分間インキュベートする。次いでプレートを１，０００ｇで５～１０分間遠心分離し、ＡＡＲＳポリペプチドを含有する通過画分を収集して、４℃で保管する。

【０５２４】

より大きな規模での培養では、一晩のインキュベーション後に、リフォールディング試料を１０，０００ｇで１０分間遠心分離して、あらゆる不溶性凝集体を除去する。上清をＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔに入れ、体積が２５０μＬに減少するまで３，６００ｇで遠心分離する。試料を１０ｍＬの１×ＰＢＳ中で混合し、体積が約２５０μＬになるまで１０～３０分間、３，６００ｇで再び遠心分離する。１×ＰＢＳのｐＨを、リフォールディング緩衝液のｐＨに合わせてｐＨ６．０またはｐＨ８．０に調整するということに留意する。この段階をもう一度繰り返し、上清を回収して、最終体積１．５ｍＬになるまで１×ＰＢＳを加える。

【０５２５】

エンドトキシンを除去するために、Ｓａｒｔｏｂｉｎｄ　Ｑ５強陰イオンイオン交換体膜（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、カタログ番号Ｑ５Ｆ）に１ｍＬの１×ＰＢＳを流し、プラスチックシリンジを用いてＡＡＲＳポリペプチドに徐々に膜を通過させる。ＡＡＲＳポリペプチドを含有する通過画分を９６－ディープウェルブロックに収集して密閉し、４℃で保管する。

【０５２６】

生物物理学的特徴付け：すべての精製ＡＡＲＳポリペプチドをＳＤＳ－ＰＡＧＥにより解析し、その濃度をA_{280}および算出吸光係数（ＥｘＰＡＳｙサーバ上のＰｒｏｔＰａｒａｍ）に基づいて決定する。製造者の使用説明書に従って、ＱＣＬ－１０００　Ｅｎｄｐｏｉｎｔ　Ｃｈｒｏｍｏｇｅｎｉｃ　ＬＡＬアッセイ（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号５０－６４８Ｕ）によりエンドトキシンレベルを測定する。

【０５２７】

動的光散乱法：Ｗｙａｔｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ＤｙｎａＰｒｏ９９機器および温度調節器（２０℃）を実験前に１５分間温めた後、Ｄｙｎａｍｉｃｓソフトウェアを機器に接続する。複数の収集に対して収集時間を１０秒間に設定し、レーザー出力を１００％に設定する。石英セルを脱イオン水とメタノールで十分に洗浄した後、タンパク質試料（ＰＢＳ中約１ｍｇ／ｍＬ濃度で１５μＬ）を加える。セルを軽くたたいて気泡を除去してから、セルを曇った側を左にしてホルダに挿入する。強度が高すぎる場合（スクリーン上に警告メッセージが表示される）、強度が正常範囲に減少するまで試料をＰＢＳでさらに希釈する。収集されるデータには、流体力学的半径、多分散度、予測平均分子量、強度の百分率および質量の百分率が含まれる。

【０５２８】

サイズ排除クロマトグラフィー：タンパク質試料を約５～１０ｍｇ／ｍＬの濃度までＰＢＳで希釈してから、Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｅｌｅｃｔｒｉｃ　ＡＫＴＡ　ＦＰＬＣの１００μＬのサンプルループに添加する。分離にはＳｕｐｅｒｄｅｘ２００　１０／３００　ＧＬサイズ排除カラム（Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｅｌｅｃｔｒｉｃ、カタログ番号１７－５１７５－０１）を使用する。最初にカラムを１．５カラム体積（ＣＶ）の１×ＰＢＳ緩衝液で平衡化した後、試料を注入する。２８０ｎｍでの吸光度をモニターしながら、カラムに１ＣＶの１×ＰＢＳ緩衝液（定組成流）を流す。ピーク面積の総和を出し、ソフトウェアにより百分率を計算する。溶出体積を用いて、ゲルろ過校正キット（Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｅｌｅｃｔｒｉｃ、カタログ番号２８－４０３８－４１および２８－４０３８－４２）による比較に基づく分子量を推定する。

【０５２９】

高濃度保管時のタンパク質回収率：Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５フィルターユニット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、分子量に応じてカタログ番号ＵＦＣ９０１０２４またはＵＦＣ９００３２４）を用いて１０ｍｇ／ｍＬ以上に濃縮したＡＡＲＳポリペプチド１０μＬを、きれいな微小遠心管に移す。試料を室温で１週間保管した後、１６，０００ｇで１０分

間遠心分離して、あらゆる沈殿物をペレット化する。Ｂｒａｄｆｏｒｄタンパク質アッセイにより上清の濃度を決定して、室温に１週間曝す前に測定した濃度と比較する。回収率を開始濃度の百分率で表す。

【０５３０】

ＬＣ－ＭＳによるＡＡＲＳポリペプチドの特徴付け：精製ＡＡＲＳポリペプチド（１ｍｇ／ｍＬ）を０．１％ギ酸で１：１０に希釈し、０．６μｇのタンパク質をＤｉｏｎｅｘオートサンプラーを用いてＣ４キャピラリーカラムに負荷する。１５０ｍｍの溶融シリカチュービング（ＯＤ：０．３６ｍｍ、ＩＤ：０．１ｍｍ、Ｐｏｌｙｍｉｃｒｏ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号２０００２３）を切断してキャピラリーカラムを調製する。キャピラリーの一端をＳｕｔｅｒ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ Ｌａｓｅｒ Ｆｉｂｅｒ Ｐｕｌｌｅｒで引っ張り、溶融シリカカッターで切って５μｍの先端部を作る。圧力ボンベを用いて、キャピラリーに７５ｍｍの長さまでＣ４レジンを詰める（５μｍ、３００Å、Ｍｉｃｈｒｏｍ、カタログ番号ＰＭ５／６４３００／００）。Ｄｉｏｎｅｘ Ｕｌｔｉｍａｔｅ３０００ ＨＰＬＣシステムと接続したＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ ＬＴＱイオントラップ質量分析器でＬＣ－ＭＳ解析を行う。０．９μＬ／分の流速で、０．１％ギ酸中５～７０％のアセトニトリルの勾配を３５分間用いて、分析物をカラムから溶出させる。スプレー電圧２．５ｋＶのＭＳフルスキャンモード（３００～２，０００ｍ／ｚ）でＬＴＱを作動させる。

【０５３１】

データの収集および解析：ＬＴＱ ＸＬ質量分析器で稼動するＸＣａｌｉｂｕｒにより作成されたＲＡＷファイルに、生の質量分析データを保存する。クロマトグラフ上の主要ピークのＭＳスペクトルをＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒデコンボリューションアルゴリズムＰｒｏＭａｓｓによりさらに解析して、ＡＡＲＳポリペプチド分子量を得る。

【０５３２】

ＡＡＲＳポリペプチドの機能解析

転写プロファイリング

背景および治療的関連：従来の標的同定技術に加え、ＡＡＲＳポリペプチドの作用機序の解明に役立つ重要なアプローチとしてゲノムツールが近年見られるようになり、創薬の初期において治療的関連の直接的な洞察を得ることができる。潜在的な治療的有用性の理解を容易にするために、初代ヒト細胞型をＡＡＲＳポリペプチドとともに培養し、ＡＡＲＳポリペプチドとのインキュベーション後の２つの異なる時点で、転写プリファイリングを評価する。

【０５３３】

転写プロファイリング用に選択された細胞型は、対象となる細胞の万能性および直接的な治療効果のあるＡＡＲＳポリペプチドの同定の可能性に基づくものである。例えば、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）は、特定の刺激に曝されると、骨形成系列、脂肪生成系列、軟骨形成系列、心筋系列また神経系列へ分化することができるため、ＡＡＲＳポリペプチドの広範囲の細胞型および疾患との潜在的関連性を理解する上で魅力的である。

【０５３４】

骨髄間質細胞は、造血細胞を支持することに加え、骨、軟骨および脂肪のような異なる結合組織系列の細胞へ分化するよう誘導され得る。ヒト間葉系幹細胞（ｈＭＳＣｓ）が多分化能を維持しｉｎ ｖｉｔｒｏで大量に増殖する潜在能力は、損傷組織または患部組織の修復における細胞ベースの治療法のための新たな手段をもたらす。また近年の報告では、ＨＭＳＣが胚葉の境界を越えた細胞運命の能力を有することも示されている。これらの細胞は、中胚葉の多系列への分化に加え、外胚葉起源のニューロンおよび内胚葉起源の肝細胞様細胞に分化することもできる。これらの細胞は、分化の過程で特定の系列に特異的な転写産物の発現パターンを修正し得る。

【０５３５】

したがって、特定のＡＡＲＳポリペプチドがＨＭＳＣにおいて遺伝子の特定のパターンを時間依存的に調節する能力は、このタンパク質が広範囲の分化経路だけでなく、機能不

全またはこれらの過程もしくは対応する細胞型の悪化に起因する疾患および障害において重要な役割を果す可能性を示している。さらに、ＭＳＣにおいて遺伝子転写を調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、造血、ニューロン新生、筋形成、骨形成および脂肪生成だけでなく、例えば炎症性応答、自己免疫、癌、ニューロン変性、筋ジストロフィー、骨粗鬆症およびリポジストロフィーを含めた広範な障害および疾患のｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでの調節を可能にする、重要な治療的有用性を有する。

【０５３６】

ヒト骨格筋細胞（ＨＳｋＭＣ）は、分化を経てアクチンおよびミオシン筋フィラメントを示すことができ、悪性高熱症１のような遺伝性筋疾患の研究に使用されてきた。またＨＳｋＭＣは、心臓への損傷を修復する心移植片として働く可能性も有する。最近では、ヒト骨格筋に対する低重力環境の影響を研究する微小重力実験で、培養ヒト骨格筋細胞が使用されている。

【０５３７】

したがって、特定のＡＡＲＳポリペプチドが、ＨＳｋＭＣにおける遺伝子の特定のパターンを時間依存的に調節する能力は、このタンパク質が筋形成の過程だけでなく、機能不全またはこれらの過程および筋細胞の発達もしくは代謝の悪化に起因する疾患および障害においても重要な役割を果たす可能性を示している。したがって、筋細胞における遺伝子転写を調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、例えば代謝性疾患、悪液質、様々な筋萎縮状態および筋骨格疾患の治療を含めた、広範な疾患における治療的有用性を有する。

【０５３８】

方法：ハイスループットなマイクロ流体リアルタイム定量的ＰＣＲ（ＲＴ－ｑＰＣＲ）法（Ｆｌｕｉｄｉｇｍ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）（Ｐｅｔｒｉｖら，（２０１０）ＰＮＡＳ（ｄｏｉ／１０．１０７３／ｐｎａｓ．１００９３２０１０７）を参照されたい）をヒト骨髄間質細胞（ＨＭＳＣ）およびヒト骨格筋細胞（ＨＳｋＭＣ）に用いて、ＡＡＲＳポリペプチドが遺伝子発現を調節する能力を評価する。ここで報告する実験では、ヒトＨＳｋＭＣ（カタログ番号１５０－０５ｆ）およびＨＭＳＣ（カタログ番号４９２－０５ｆ）をＣｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ社から購入した。ＨＭＳＣ細胞を二代目で凍結保存し、培養して１０集団倍加数まで増殖させることができる。ここでは、６代目のＨＭＳＣを使用する。ヒト骨格筋細胞（ＨＳｋＭＣ）を二代目で凍結保存し、培養して少なくとも１５集団倍加数まで増殖させることができる。ここで報告する実験では、正常ヒトドナーから採取後６代目のＨＳｋＭＣを使用する。

【０５３９】

いずれの場合にも、細胞を１００μＬ体積の増殖培地に５００００細胞／ｍＬで播き、２４時間および７２時間、２５０ｎＭの濃度または下に別途明記される別の濃度でＡＡＲＳポリペプチドに曝す。対照には、（１）脂肪生成、（２）骨形成、（３）軟骨形成および（４）骨格筋筋管形成を促進する標準的なカクテルを含む分化培地が含まれる。さらなる対照には、増殖培地のみを含む未処置のウェルが含まれる。各分化対照を２つのウェルで進めた。対照：すべての培地を基本培地としてＤＭＥＭを用いて作成した。標準的な文献に従い、分化培地をＣｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ社から購入した。販売業者において、分化培地に以下の添加剤を含ませた：骨格筋分化カクテル：ＦＢＳ、インスリン、グルタミン、ＦＧＦ、ＥＧＦ；脂肪生成カクテル：インスリン、デキサメタゾンおよびＩＢＭＸ；骨形成カクテル：ＦＢＳ、デキサメタゾン、アスコルビン酸－２－リン酸、β－グリセロリン酸塩；軟骨形成カクテル：インスリン、アスコルビン酸－２－リン酸およびＴＧＦ－β１。

【０５４０】

ＡＢＩ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、商品番号ＡＭ１７２８）ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｃｅｌｌｓ－ｔｏ－ＣＴ（商標）Ｋｉｔを使用するための標準的プロトコルを用いて、細胞を溶解させ、ゲノム物質を採取する。ＡＢＩ　Ｐｒｅ－Ａｍｐ　Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、商品番号

４３９１１２８）を用いて予備増幅を開始させる。遺伝子特異的プライマーを、Ｐｒｉｍｅｒ３プログラムを用いて作製する、およびＩＤＴ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社から購入する。実際の定量的ＰＣＲには、標準的なＦｌｕｉｄｉｇｍ負荷試薬およびピペッティング装置を用いてＦｌｕｉｄｉｇｍプロファイリングアレイ（商品番号ＢＭＫ－Ｍ－９６．９６）を使用した。プロファイリングを行った遺伝子を下の表Ｅ１に挙げる。

【０５４１】

【表Ｅ１－１】

表Ｅ１
転写プロファイリングで評価した遺伝子のリスト

収集した固有のリスト	refseq_nt	フルネーム	別名
ABCA1	NM_005502	ＡＴＰ－結合カセット、サブファミリーＡ（ＡＢＣ１）、メンバー１	ABC-1|ABC1|CERP|FLJ14958|HDLDT1|MGC164864|MGC165011|TGD
ACTB	NM_001101	アクチン、ベータ	PS1TP5BP1
ACTG1	NM_001614	アクチン、ガンマ１	ACT|ACTG|DFNA20|DFNA26
ACVR2B	NM_001106	アクチビンＡ受容体、ＩＩＢ型	ACTRIIB|ActR-IIB|MGC116908
APOA1	NM_000039	アポリポタンパク質Ａ－Ｉ	MGC117399
ARNT	NM_178427	アリール炭化水素受容体核輸送体	HIF-1 ベータ|HIF1B|HIF1BETA|TANGO|bHLHe2
BAD	NM_032989	細胞死のＢＣＬ２関連アゴニスト	BBC2|BCL2L8
BCL2	NM_000657	Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫２	Bcl-2
BMP2	NM_00	骨形態形成タンパク	BMP2A

【表Ｅ１－２】

表Ｅ１
転写プロファイリングで評価した遺伝子のリスト

収集した固有のリスト	refseq_nt	フルネーム	別名
	1200	質２	
BMP4	NM_130851	骨形態形成タンパク質４	BMP2B|BMP2B1|MCOPS6|OFC11|ZYME
C3AR1	NM_004054	補体成分３ａ受容体１	AZ3B|C3AR|HNFAG09
CASP3	NM_032991	カスパーゼ３、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	CPP32|CPP32B|SCA-1
CAV1	NM_001753	カベオリン、カベオラタンパク質、２２ｋＤａ	BSCL3|CGL3|MSTP085|VIP21
CDH5	NM_001795	カドヘリン５、２型（血管内皮）	7B4|CD144|FLJ17376
CFLAR	NM_003879	ＣＡＳＰ８およびＦＡＤＤ様アポトーシス制御因子	CASH|CASP8AP1|CLARP|Casper|FLAME|FLAME-1|FLAME1|FLIP|I-FLICE|MRIT|c-FLIP|c-FLIPL|c-FLIPR|c-FLIPS
COMP	NM_000095	軟骨オリゴマー基質タンパク質	EDM1|EPD1|MED|MGC131819|MGC149768|PSACH|THBS5
CSF1	NM_172212	コロニー刺激因子１（マクロファージ）	MCSF|MGC31930
CTGF	NM_001901	結合組織増殖因子	CCN2|HCS24|IGFBP8|MGC102839|NOV2
CTNNB1	NM_001904	カテニン（カドヘリン関連タンパク質）、ベータ１、８８ｋＤａ	CTNNB|DKFZp686D02253|FLJ25606|FLJ37923
DAAM1	NM_014992	ｄｉｓｈｅｖｅｌｌｅｄ関連形態形成活性化因子１	FLJ41657|KIAA0666
ELN	NM_001081755	エラスチン	FLJ38671|FLJ43523|SVAS|WBS|WS
ENO1	NM_001428	エノラーゼ１、（アルファ）	ENO1L1|MPB1|NNE|PPH
FABP3	NM_004102	脂肪酸結合タンパク質３、筋肉および心臓（乳腺由来増殖抑制	FABP11|H-FABP|MDGI|O-FABP

【表Ｅ１－３】

表Ｅ１ 転写プロファイリングで評価した遺伝子のリスト			
収集した固有のリスト	refseq_nt	フルネーム	別名
		因子）	
FAK	NM_001199649	接着斑キナーゼ	fak1
FGF4	NM_002007	線維芽細胞増殖因子４	HBGF-4|HST|HST-1|HSTF1|K-FGF|KFGF
FIGF	NM_004469	ｃ－ｆｏｓ誘導増殖因子（血管内皮増殖因子Ｄ）	VEGF-D|VEGFD
FLT1	NM_002019	ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ１（血管内皮増殖因子／血管透過性因子受容体）	FLT|VEGFR1
FOXA1	NM_004496	フォークヘッドボックスＡ１	HNF3A|MGC33105|TCF3A
GAPDH	NM_002046	グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ	G3PD|GAPD|MGC88685
GFAP	NM_002055	グリア線維性酸性タンパク質	FLJ45472
SLC2A4	NM_001042	溶質キャリアファミリー２（促進グルコース輸送体）、メンバー４	GLUT4
HAND1	NM_004821	発現された心臓および神経堤誘導体１	Hxt|Thing1|bHLHa27|eHand
HIF1A	NM_181054	低酸素誘導因子１、アルファサブユニット（塩基性ヘリックス－ループ－ヘリックス転写因子）	HIF-1 アルファ|HIF1|HIF1-ALPHA|MOP1|PASD8|bHLHe78
HK2	NM_000189	ヘキソキナーゼ２	DKFZp686M1669|HKII|HXK2
HMGB1	NM_002128	高移動度群ボックス１	DKFZp686A04236|HMG1|HMG3|SBP-1
HNF4A	NM_178850	肝細胞核因子４、アルファ	FLJ39654|HNF4|HNF4a7|HNF4a8|HNF4a9|HNF4 アルファ|MODY|MODY1|NR2A1|NR2

【表Ｅ１－４】

表Ｅ１ 転写プロファイリングで評価した遺伝子のリスト			
収集した固有のリスト	refseq_nt	フルネーム	別名
			A21|TCF|TCF14
HPRT1	NM_000194	ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ１	HGPRT|HPRT
HSPB1	NM_001540	熱ショック２７ｋＤａタンパク質１	CMT2F|DKFZp586P1322|HMN2B|HS.76067|HSP27|HSP28|Hsp25|SRP27
ICAM1	NM_000201	細胞間接着分子１	BB2|CD54|P3.58
IFNG	NM_000619	インターフェロン、ガンマ	IFG|IFI
IGF1	NM_001111285	インスリン様成長因子１（ソマトメジンＣ）	IGF-I|IGF1A|IGFI
IGF2	NM_001127598	インスリン様成長因子２（ソマトメジンＡ）	C11orf43|FLJ22066|FLJ44734|INSIGF|pp9974
IGFBP3	NM_001013398	インスリン様成長因子結合タンパク質３	BP-53|IBP3
IGFBP5	NM_000599	インスリン様成長因子結合タンパク質５	IBP5
IKBKB	NM_001556	Ｂ細胞のカッパ軽ポリペプチド遺伝子エンハンサーの抑制因子、キナーゼベータ	FLJ33771|FLJ36218|FLJ38368|FLJ40509|IKK-beta|IKK2|IKKB|MGC131801|NFKBIKB
IL10	NM_000572	インターロイキン１０	CSIF|IL-10|IL10A|MGC126450|MGC126451|TGIF
IL1B	NM_000576	インターロイキン１、ベータ	IL-1|IL1-BETA|IL1F2
IL3	NM_000588	インターロイキン３（コロニー刺激因子、多重性）	IL-3|MCGF|MGC79398|MGC79399|MULTI-CSF
IL4	NM_172348	インターロイキン４	BCGF-1|BCGF1|BSF1|IL-4|MGC79402
IL5	NM_000879	インターロイキン５（コロニー刺激因子、好酸球）	EDF|IL-5|TRF
IL6R	NM_181359	インターロイキン６受容体	CD126|IL-6R-1|IL-6R-アルファ|IL6RA|MGC104991
IL8	NM_000584	インターロイキン８	CXCL8|GCP-1|GCP1|LECT|LUCT|LYNAP|MDNCF

【表Ｅ１－５】

表Ｅ１
転写プロファイリングで評価した遺伝子のリスト

収集した固有のリスト	refseq_nt	フルネーム	別名
			|MONAP|NAF|NAP-1|NAP1
ITGA5	NM_002205	インテグリン、アルファ５（フィブロネクチン受容体、アルファポリペプチド）	CD49e|FNRA|VLA5A
KDR	NM_002253	キナーゼ挿入ドメイン受容体（ＩＩＩ型受容体チロシンキナーゼ）	CD309|FLK1|VEGFR|VEGFR2
LEP	NM_000230	レプチン	FLJ94114|OB|OBS
LPL	NM_000237	リポタンパク質リパーゼ	HDLCQ11|LIPD
MAPK11	NM_002751	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ１１	P38B|P38BETA2|PRKM11|SAPK2|SAPK2B|p38-2|p38 ベータ
MMP1	NM_002421	マトリックスメタロペプチダーゼ１（間質コラゲナーゼ）	CLG|CLGN
MMP3	NM_002422	マトリックスメタロペプチダーゼ３（ストロメライシン１、プロゼラチナーゼ）	CHDS6|MGC126102|MGC126103|MGC126104|MMP-3|SL-1|STMY|STMY1|STR1
MYH1	NM_005963	ミオシン、重鎖１、骨格筋、成体	MGC133384|MYHSA1|MYHa|MyHC-2X/D|MyHC-2x
MYH11	NM_022844	ミオシン、重鎖１１、平滑筋	AAT4|DKFZp686D10126|DKFZp686D19237|FAA4|FLJ35232|MGC126726|MGC32963|SMHC|SMMHC
MYH7	NM_000257	ミオシン、重鎖７、心筋、ベータ	CMD1S|CMH1|DKFZp451F047|MGC138376|MGC138378|MPD1|MYHCB|SPMD|SPMM
MYOD1	NM_002478	筋原性分化１	MYF3|MYOD|PUM|bHLHc1
NFATC1	NM_172390	活性化Ｔ細胞の核因子、カルシニューリン依存性１	MGC138448|NF-ATC|NFAT2|NFATc
NFATC2	NM_173091	活性化Ｔ細胞の核因子、細胞質性、カルシニューリン依存性２	NFAT1|NFATP
NFKB1	NM_00	Ｂ細胞のカッパ軽ポ	DKFZp686C01211|EBP-1|KB

【表Ｅ１－６】

表Ｅ１
転写プロファイリングで評価した遺伝子のリスト

収集した固有のリスト	refseq_nt	フルネーム	別名
	3998	リペプチド遺伝子エンハンサーの核因子１	F1|MGC54151|NF-カッパ-B|NF-カッパB|NFKB-p105|NFKB-p50|p105|p50
NOS2	NM_000625	一酸化窒素合成酵素２、誘導性	HEP-NOS|INOS|NOS|NOS2A
NOTCH1	NM_017617	notch 1	TAN1|hN1
NR3C1	NM_001024094	核内受容体サブファミリー３、グループＣ、メンバー１（糖質コルチコイド受容体）	GCCR|GCR|GR|GRL
NRP2	NM_201279	ニューロピリン２	MGC126574|NP2|NPN2|PRO2714|VEGF165R2
PAX7	NM_013945	ペアードボックス７	FLJ37460|HUP1|PAX7B|RMS2
PDGFB	NM_033016	血小板由来増殖因子ベータポリペプチド（サル肉腫ウイルス（ｖ－ｓｉｓ）癌遺伝子ホモログ）	FLJ12858|PDGF2|SIS|SSV|c-sis
PDK4	NM_002612	ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ、アイソザイム４	FLJ40832
PLA2G1B	NM_000928	ホスホリパーゼＡ２、グループＩＢ（膵臓）	MGC119834|MGC119835|PLA2|PLA2A|PPLA2
PLIN1	NM_002666	脂肪滴関連タンパク質	ペリリピン
PPARG	NM_138712	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ	CIMT1|GLM1|NR1C3|PPARG1|PPARG2|PPAR ガンマ
QARS	NM_005051	グルタミニルｔＲＮＡ合成酵素	GLNRS|PRO2195
RHOA	NM_001664	ｒａｓホモログ遺伝子ファミリー、メンバーＡ	ARH12|ARHA|RHO12|RHOH12
RUNX1	NM_001754	ｒｕｎｔ関連転写因子１	AML1|AML1-EVI-1|AMLCR1|CBFA2|EVI-1|PEBP2aB
RXRA	NM_002957	レチノイドＸ受容体、アルファ	FLJ00280|FLJ00318|FLJ16020|FLJ16733|MGC102720|NR2B1

【表Ｅ１－７】

表Ｅ１
転写プロファイリングで評価した遺伝子のリスト

収集した固有のリスト	refseq_nt	フルネーム	別名
SERPINE1	NM_001165413	セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードＥ（ネキシン、１型プラスミノーゲン活性化因子インヒビター）、メンバー１	PAI|PAI-1|PAI1|PLANH1
SMAD2	NM_005901	ＳＭＡＤファミリーメンバー２	JV18|JV18-1|MADH2|MADR2|MGC22139|MGC34440|hMAD-2|hSMAD2
SMAD4	NM_005359	ＳＭＡＤファミリーメンバー４	DPC4|JIP|MADH4
TERT	NM_198255	テロメラーゼ逆転写酵素	EST2|TCS1|TP2|TRT|hEST2
TGFB1	NM_000660	トランスフォーミング増殖因子、ベータ１	CED|DPD1|LAP|TGFB|TGF ベータ
TGFB3	NM_003239	トランスフォーミング増殖因子、ベータ３	ARVD|FLJ16571|TGF-ベータ３
THBS4	NM_003248	トロンボスポンジン４	TSP4
TNF	NM_000594	腫瘍壊死因子	DIF|TNF-アルファ|TNFA|TNFSF2
TUBB	NM_178014	チューブリン、ベータ	M40|MGC117247|MGC16435|OK/SW-cl.56|TUBB1|TUBB5
TUBB1	NM_030773	チューブリン、ベータ１	チューブリンアイソフォームベータ（１）
TUBG1	NM_001070	チューブリン、ガンマ１	GCP-1|TUBG|TUBGCP1
VCAM1	NM_080682	血管細胞接着分子１	CD106|DKFZp779G2333|INCAM-100|MGC99561
VEGFA	NM_003376	血管内皮増殖因子Ａ	MGC70609|MVCD1|VEGF|VPF
VIM	NM_003380	ビメンチン	FLJ36605
WISP1	NM_080838	ＷＮＴ１誘導性シグナル伝達経路タンパク質１	CCN4|WISP1c|WISP1i|WISP1tc
WNT1	NM_005430	ｗｉｎｇｌｅｓｓ型ＭＭＴＶ組込み部位ファミリー、メンバー	INT1

【表Ｅ１－８】

表Ｅ１ 転写プロファイリングで評価した遺伝子のリスト			
収集した固有のリスト	refseq_nt	フルネーム	別名
		1	

【０５４２】

バイオインフォマティクス解析：Ｆｌｕｉｄｉｇｍ社のＢｉｏｍａｒｋ機から．ｃｓｖ形式で読み出したデータを、試料、ｍＲＮＡおよび複製物の情報を生の蛍光値とともに含む表形式に変換する。失敗したＰＣＲ反応は欠測として記録される。ｍＲＮＡ種の全発現に正規化した後に、複数の実験を合わせた。測定されたすべてのｍＲＮＡ発現を、試験した全生物学的複製物の少なくとも２つにおける検出の必要性に基づき、フィルター処理する。本発明者らは、データセット全体の技術的、生物学的およびセットの平均偏差を評価した。

【０５４３】

データ解析では、最初にすべての目的遺伝子のＣｔ値を、対応する試料由来のハウスキーピング遺伝子の平均Ｃｔ値に正規化して、ΔＣｔ値を得る（ΔＣｔ＝Ｃｔ（遺伝子）－Ｃｔ（平均ハウスキーピング遺伝子））。次いで、各試料由来の遺伝子を未処置対照の同じ遺伝子に正規化して、ΔΔＣｔ値（ΔΔＣｔ＝ΔＣｔ（対照試料）－ΔＣｔ（試験試料））を得る。

【０５４４】

変化倍数値を得るために、上方制御された遺伝子（すなわち、０よりも大きいΔΔＣｔ）に対して以下の計算を行う：変化倍数＝２＾ΔΔＣｔ。下方制御された遺伝子（すなわち、０未満のΔΔＣｔ）に対しては以下の計算を行う：変化倍数＝－（２＾｜ΔΔＣｔ｜）。

【０５４５】

細胞増殖アッセイ（下のデータ表のアッセイＡ１－Ａ１１）

背景および治療的関連：様々な細胞型の細胞増殖およびアポトーシスの速度を調節する能力は、数多くの治療用化合物の基本的特性を表し、広範な疾患および障害の治療および予防に直接関連する。

【０５４６】

したがって、細胞増殖および／またはアポトーシスの速度を調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、広範な疾患および障害において幹細胞の増殖因子および分化因子などとして、また例えば造血細胞、免疫調節細胞、癌を含めた目的とする特定の細胞型の増殖をｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで増大または抑制するための治療レジメンにおいて、また例えば神経変性、末梢神経障害ならびに筋肉および軟組織の緊張低下を含めた加齢に関連する疾患の治療および予防において、重要な治療的有用性を有する。

【０５４７】

方法：以下に挙げる方法の１つ以上を用いて、また以下の方法でより具体的に詳述される通りに、細胞増殖に対するＡＡＲＳポリペプチドの効果を評価する。

【０５４８】

ヘキスト３３４３２

増殖を評価するための標準的な細胞計数を、ｄｓＲＮＡと結合すると青い蛍光を発する細胞透過性の核対比染色剤であるヘキスト３３４３２を用いて行う。ヘキスト３３４３２は溶液として入手可能であり（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｈ－３５７０）、培地またはＰＢＳ中１ｕｇ／ｍＬの最終濃度で使用する。細胞型に応じて、標準的な増殖時間である４８時間またはそれより長い時間、下の実施例に記載されているように、細胞をＡＲＳポリペプチドの存在下、９６ウェルプレートで増殖させる。

【０５４９】
ＡＴＰ－ｌｉｔｅ
細胞のＡＴＰレベルは細胞の健康状態と関連し、各種市販のキットで容易に決定することができる。溶解液とＡＴＰ検出試薬の均一混合物であるＡＴＰ－ｌｉｔｅ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ、カタログ番号６０１６９４７、Ｂｏｓｔｏｎ、ＭＡ０２４８１）を使用前に予め混合し、培養細胞に対して１：１の体積比で使用する。プレートを５分間インキュベートして溶解を促進し、発光プレートリーダーを用いてプレートを測定する。細胞型に応じて、標準的な増殖時間である４８時間またはそれより長い時間、下の実施例に記載されているように、細胞をＡＡＲＳポリペプチドの存在下、９６ウェルプレートで増殖させる。

【０５５０】
ＡＬＡＭＡＲＢＬＵＥ（登録商標）（レサズリン）は、酸化還元状態の細胞に基づく細胞生存の指示薬である。活性成分のレサズリンは無毒で細胞透過性の化合物であり、青色で、その酸化型で存在するときは実質的に無蛍光である。しかし、正常な生存細胞内に入ると、レサズリンは速やかにレゾルフィンに還元されて、赤色の蛍光シグナルを発する。生存細胞が継続的にレサズリンをレゾルフィンに変換することで、生存能および細胞傷害が定量的に測定される。毒性がないため、細胞に悪影響を及ぼすことなく細胞をレサズリンに長時間曝すことが可能であり、レサズリンの存在下で増殖した細胞は、フローサイトメトリー解析による測定で対照細胞と同様の生存細胞数を示した。

【０５５１】
レサズリン／ＡＬＡＭＡＲＢＬＵＥ（登録商標）の溶液を細胞に加えて１～４時間インキュベートし、蛍光光度または吸光度を読み取ることにより測定を行う。蛍光量または吸光量は生存細胞の数に比例し、細胞代謝活性に対応する。損傷細胞および生存不能細胞は自然な代謝活性が低下しているため、これに比例して健常細胞よりも低いシグナルを発生する。ＡＬＡＭＡＲＢＬＵＥ（登録商標）とのインキュベーション後、蛍光光度計および吸光度計で試料を用意に測定することができる。蛍光光度の読取りでは、５３０ｎｍ励起および５９０ｎｍ発光フィルターの設定を用いる。

【０５５２】
細胞型に応じて、標準的な増殖時間である４８時間またはそれより長い時間、下の実施例に記載されているように、細胞をＡＡＲＳポリペプチドの存在下、９６ウェルプレートで増殖させる。

【０５５３】
ＨＥＰＧ２Ｃ３Ａヒト肝細胞におけるアセチル化ＬＤＬ取込み（下のデータ表のアッセイＢ１）
背景および治療的関連：ＬＤＬは血中コレステロールの主な担体であり、血漿中コレステロールの６０％超を占めている。ヒトでは、循環からの血漿ＬＤＬの約７０％の除去に肝ＬＤＬ受容体が関与している。内部に取り込まれたＬＤＬは、リソソーム内で分解されて遊離コレステロールとアミノ酸になる。肝臓は、ヒトでのＬＤＬ異化作用およびＬＤＬ受容体活性にとって最も重要な器官である。内部に取り込まれず循環中に残ったＬＤＬは、血管内皮細胞により血管壁内に運ばれて、アテローム性動脈硬化プラークの形成の原因となり得る。また循環するＬＤＬは、マクロファージによっても取り込まれ、これがプラーク形成の一因となることもある。肝組織内へのＬＤＬ取込みの増加はヒトに健康に有益であると考えられており、また、この過程を正に調節し得る安全かつ有効な治療剤の発見は、心血管疾患および代謝性疾患の新たな治療法をもたらすかもしれない。ＡＡＲＳポリペプチドの固有の特性がアセチル化ＬＤＬの取込みを調節することができるか否かを調べるために、アセチル化ＬＤＬ取込みを測定するための標準的なアッセイをＨｅｐＧ２Ｃ３ａ細胞で用いる。

【０５５４】
したがって、ＬＤＬ取込みを調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、広範な疾患において、例えば高コレステロール血症、高脂血症、１型および２型糖尿病、代謝症候

群ならびにアテローム性動脈硬化症を含めた血管疾患の治療での重要な治療的有用性を有する。

【０５５５】

方法：ＨＥＰＧ２Ｃ３ａ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１０７４１）を、７５ｍＬのフラスコに入れた１５ｍＬ培地中、１０％ＦＢＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ、カタログ番号ＳＨ３０９１０．０３）、５０ｕ／ｍＬのペニシリン／５０μｇ／ｍＬのストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加したＥａｇｌｅの最少必須（ＥＭＥＭ）培地で維持する。細胞を加湿環境中、３７℃、５％CO_2で増殖させ、無菌技術ならびにゴーグル、手袋および実験着を含めた適当な個人用保護具を用いて、ＢＳＬ２認定済みの組織培養フード内で使用する。ＨＥＰＧ２Ｃ３ａは、透明底のコラーゲンコートプレートで増殖させた場合、ＬＤＬ受容体を発現し、アセチル化ＬＤＬ取込み能力を有するようになる。１００μＬ体積の細胞を、完全培地（上記）中、５０，０００細胞／ｍＬの細胞密度でコラーゲンコートプレート（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ１１４２８）に一晩播く。細胞をＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１００１０）で1回洗浄し、８０μＬの無血清ＥＭＥＭを各ウェルに加える。１ウェル当たり２５０ｎＭの最終濃度のＡＡＲＳポリペプチドを、無菌ＰＢＳ中一定体積で各ウェルに加える。１６時間のインキュベーション後、上清を収集し、ＲＮＤ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社の標準的なＥＬＩＳＡキット（カタログ番号ＤＹ６４３）を用いて可溶性ＩＣＡＭを測定し、５μｇ／ｍＬのａｃ－ＬＤＬ（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８標識、カタログ番号Ｌ２３３８０、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加した無血清培地を各ウェルに加える。３７℃、５％CO_2で2時間インキュベートした後、細胞を無菌ＰＢＳで2回洗浄した後、定量化のために１００μＬのＰＢＳを各ウェルに加える。Ｖｉｃｔｏｒ　Ｘ５蛍光プレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）でボトムリードを用いて、プレートの総蛍光強度を４８５ｎｍを中心とした励起波長および５３５ｎｍを中心とした発光波長で解析した。細胞をヘキスト色素で染色し、４０５ｎｍ励起／４５０ｎＭ発光の蛍光強度を読み取って、プレート全体にわたり全細胞数が一定であることを確認する。

【０５５６】

ヒト好中球の酸化バーストおよびエラスターゼ産生の調節（下のデータ表のアッセイＣ１～Ｃ３）

好中球酸化バースト

背景および治療的関連：多形核好中球および単球による食作用は、細菌および真菌を含めた微生物による感染に対する宿主防御の重要な武器を構成している。食作用の過程は、次のようないくつかの主な段階に分けることができる：走化性（炎症部位への食細胞の移動）、食細胞の細胞表面への粒子の付着、取込み（食作用）ならびに酸素依存性（酸化バースト）および酸素非依存性の機序による細胞内殺作用。慢性肉芽腫性疾患（ＣＧＤ）のような先天的欠陥では、バースト活性の低下または欠如が見られる。ＣＧＤは遺伝性疾患の異質性のグループであり、通常、生後２年の間に発症する。この疾患は、細菌および真菌微生物により繰り返し引き起こされる致命的な感染症が特徴である。これらの感染症は通常、肺炎、リンパ節炎、またはリンパ節、肺および肝臓に影響する膿瘍からなる。ＮＡＤＰＨオキシダーゼは、過酸化水素およびヒドロキシルラジカルへ速やかに変換されるスーパーオキシド陰イオンの生成に関与する酵素系である。ＮＡＤＰＨオキシダーゼ酵素系の成分ペプチドの異常は、ＣＧＤに特徴的な機能不全を引き起こす。ＣＧＤ患者の好中球では、刺激後の重要な酸化バーストが生じない。様々な形態のＣＧＤが記載されている（古典的Ｘ関連ＣＧＤおよび常染色体劣性遺伝パターン）。移植、ＨＩＶ感染後期および高齢者では顆粒球の酸化バーストが低下して、これらの者は二次感染および炎症性疾患の増悪を引き起こしやすくなる。様々な免疫調節剤（例えば、サイトカイン（ＧＭ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、ＴＮＦ）または薬物）も酸化バーストに影響を及ぼすと思われる。治療的方法で酸化バーストを上方制御または下方制御する能力を有するタンパク質は、各種の様々な病的状態に対して有効である可能性がある。

【０５５７】

方法：このアッセイでは、酸化バースト過程のアゴニストとしてタンパク質キナーゼＣリガンドのホルボール１２－ミリスタート１３－アセタート（ＰＭＡ）を使用することができる。ヘパリン処置した全血を無菌デキストラン（０．６％の最終濃度）と１時間混合して層に分離させる。下層には好中球、単球および赤血球が含まれている。塩化アンモニウム溶解段階を用いてＲＢＣをすべて除去し、単球が約３％混入した純度９７％の好中球集団が溶解段階の後に残る。刺激時に、顆粒球および単球が、食胞内の細菌を破壊する反応性酸素代謝産物（スーパーオキシド陰イオン、過酸化水素、次亜塩素酸）を生成する。酸化バースト時の反応性オキシダントの形成は、Ａｍｐｌｅｘ　Ｒｅｄの添加および酸化によりモニターすることができる。次いで、蛍光プレートリーダーを用いて、生成された反応性酸素ラジカルを有する細胞の百分率およびその平均蛍光強度を解析する。この反応の典型的な時間経過は１０分であり、明らかなバーストは２分後までに見られ、シグナルの減少は２０分後までに見られる。このアッセイは、ＡＡＲＳポリペプチドと、EC_{50}より低い濃度のＰＭＡとを同時に投与して、ＰＭＡ非存在下のアゴニストモードで、またはアンタゴニストモードで行うことができる。

【０５５８】

ヒト好中球エステラーゼ産生の調節

背景および治療的関連：好中球エラスターゼは、肺および心血管系の炎症性障害を含めた広範なヒト疾患の発達において特定の役割を有すると考えられているセリンプロテアーゼである。その鍵となる生理的役割は生得的な宿主防御におけるものであるが、好中球エラスターゼは組織リモデリングにも関与している可能性があり、現在、局所的な炎症シグナルに重要であることが認められている分泌促進剤作用を有する。好中球エラスターゼ活性は、数十年間、肺気腫の発達に関与するとされてきたが、比較的最近になってようやく、過剰な細胞外マトリックスの沈着が生じる状況での病原性機能はこのセリンプロテアーゼが原因であるとされた。その作用が繊維症の肺修復に影響し得るその考え得る道筋の解明が、遺伝子操作された動物モデルの使用により始まっている。新たに得られた証拠により、線維形成メディエーターの生成およびコラーゲン合成に対してより直接的な作用を有する細胞経路の関与が、肺のマトリックス蓄積促進における好中球エラスターゼの作用を支持するらしいことが示唆されている。また、ヒト好中球エラスターゼはアテローム性動脈硬化プラーク内にも存在し、そこでは、動脈瘤形成とプラーク破裂の合併症に関連したマトリックス分解および血管壁の脆弱化の一因となっている。これらの作用には他の細胞外プロテアーゼも加わるが、この破壊的なプロテアーゼは、好中球脱顆粒に関連した活性と結び付く広範な基質およびこの酵素の効力ゆえに、動脈硬化性疾患における治療標的として選ばれる。

【０５５９】

方法：このアッセイでは、ＥＮＺＣＨＥＫ（登録商標）Ｅｌａｓｔａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｅ－１２０５６）を使用する。６％デキストラン溶液を用いて新鮮なヒト血液から好中球を調製し、赤血球を溶解させてから、細胞をＲＰＭＩ培地（培地は血清、抗生物質を含まない未添加であるべきである）に播く。凍結乾燥させた基質を含む３つのバイアルのうちの１つに脱イオン水（dH_2O）１．０ｍＬを直接加え、かき混ぜて溶解させることにより、１．０ｍｇ／ｍＬのＤＱエラスチン基質ストック溶液を調製する。１０×反応緩衝液６ｍＬを５４ｍＬのdH_2Oで希釈して、１×反応緩衝液を調製する。ＤＱエラスチンストック溶液を１×反応緩衝液で１０倍に希釈して、１００μｇ／ｍＬのＤＱエラスチン基質希釈標準溶液を調製する。dH_2Oで１００Ｕ／ｍＬのストック溶液を作製して、ブタ膵臓エラスターゼストック溶液を調製する。エラスターゼ活性をアッセイするために、１×反応緩衝液５０μＬを、３０μＬ体積中５００，０００好中球／ｍＬを含む各アッセイウェルにピペットで加える。１ウェル当たり８μＬの各ＡＡＲＳポリペプチドを加え、試料を３７℃で２０分間インキュベートする。１００μｇ／ｍＬのＤＱエラスチン希釈標準溶液５０μＬを各ウェルに加えてかき混ぜる。試料を光から保護しながら、室温で３０分間インキュベートする。標準的なフルオレセインフィルター（ｅｘ４８５／Ｅｍ５３５）蛍光を備えた蛍光マイクロプレートリー

ダーで蛍光強度を複数の時点にわたり測定する。

【０５６０】

Ｔｏｌｌ様受容体との結合およびＮＦκＢの活性化（下のデータ表のアッセイＤ１～Ｄ４）

背景および治療的関連：マクロファージは自然免疫系において主要な役割を果たし、免疫応答を強力に調節および制御するＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）のファミリーを含めた、幅広いレパートリーの様々なクラスのパターン認識受容体（ＰＲＲ）を発現する。

【０５６１】

微生物病原体および内因性リガンドによるＴＬＲの刺激がシグナル伝達カスケードを惹起し、下流の適応免疫応答を指令する炎症誘発性サイトカインとエフェクターサイトカインの分泌が誘発される。内因性リガンドおよび微生物成分はＴＬＲにより認識され、またこれを活性化することができるため、これらの受容体が複数の疾患に対する新たな治療法開発の重要な標的である可能性が高まる。

【０５６２】

したがって、ＴＬＲ受容体活性を調節するＡＡＲＳポリペプチドは、広範な疾患および障害における、例えば炎症性の疾患および障害、自己免疫性疾患、組織移植／臓器拒絶、癌の予防または治療、造血および感染の調節を含めた治療的有用性を有する。

【０５６３】

ＲＡＷ－ＢＬＵＥ細胞におけるＴＬＲ活性化の測定

ＲＡＷ－ＢＬＵＥ（商標）細胞（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ、カタログコード：ｒａｗ－ｓｐ）の商標名で販売されているマウスマクロファージは、ＴＬＲ５以外のすべてのＴＬＲを発現し、ＮＦ－κＢおよびＡＰ－１転写因子により誘導される分泌型胚性アルカリホスファターゼ（ＳＥＡＰ）遺伝子を含む。ＴＬＲ刺激時に、ＲＡＷ－ＢＬＵＥ（商標）細胞がＮＦ－κＢおよび／またはＡＰ－１を活性化してＳＥＡＰが分泌され、これはＳＥＡＰ検出培地を使用すれば測定可能である。

【０５６４】

方法：ＨＥＫ－ＴＬＲ２（商標）細胞をＰＢＳで２回洗浄し、トリプシン処理して、新鮮な培地（増殖培地：ＤＭＥＭ、４．５ｇ／ｌのグルコース、１０％熱不活性化ウシ胎仔血清（５６℃で３０分）、１００ｍｇ／ｍＬのＺＥＯＣＩＮ（商標）、２ｍＭのＬ－グルタミン）中で再懸濁させる。細胞を５０，０００細胞／ウェルの濃度で、９６ウェルプレートに総体積１００μＬで播き、ＡＡＲＳポリペプチド、対照またはＡＡＲＳポリペプチド（＋ＬＰＳ）を、以下で概説する実験で示される濃度で各ウェルに加える。細胞を５％CO_2インキュベーター中、３７℃で１８時間インキュベートする。実験の２日目に、ＳＥＡＰ検出培地（ＱＵＡＮＴＩ－ＢＬＵＥ（商標））（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ、カタログコード：ｒｅｐ－ｑｂ１）を説明書に従って調製し、１ウェル当たり１２０μＬを透明平底９６ウェルプレートに加え、細胞上清を加える（２０μＬ）。試料を３７℃で約３０分～２時間インキュベートする。分光光度計を用いて６５０ｎＭでの吸光度を読み取り、ＳＥＡＰレベルを決定する。

【０５６５】

ＴＬＲ活性化を特異的にブロックするＡＡＲＳポリペプチドを検出するために、このアッセイを改変して潜在的なＴＬＲアンタゴニストを同定することができる。この場合、５０ｎｇ／ｍＬのＬＰＳを加える１時間前に、ＡＡＲＳポリペプチドを１ウェル当たり約２５０ｎＭの最終濃度で（または以下の実施例で別途明記されている通りに）細胞に加える。細胞をインキュベートし、ＳＥＡＰを上記のように検出する。ＬＰＳを含まない、すなわちＡＡＲＳポリペプチドを単独で加えたＰＢＳ対照ウェルを用いて、測定時のＴＬＲ刺激の基底レベルを調べる。対照ウェルを、ＰＢＳならびに既知のＴＬＲアゴニストおよびアンタゴニストで前処理する。バックグラウンドを差し引いた［ＰＢＳ＋ＬＰＳのシグナル］と［ＡＡＲＳポリペプチド＋ＬＰＳのシグナル］の比を用いて、拮抗作用のパーセントを決定する。

【０５６６】

Ｈｅｋ２９３細胞におけるヒトＴＬＲスクリーニング

ヒトＨＥＫ２９３細胞は遺伝子が改変されており、ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ＴＬＲ細胞（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ）の商標名で販売されている。この細胞型のＴＬＲ２およびＴＬＲ４バージョンはすべてのＴＬＲ２またはＴＬＲ４を選択的に発現し、５つのＮＦ－κＢおよびＡＰ－１転写因子結合部位と融合したＩＦＮ－ベータミニマルプロモーターの制御下にある分泌型胚性アルカリホスファターゼ（ＳＥＡＰ）レポーター遺伝子を含む。特定のＴＬＲ２またはＴＬＲ４アゴニスト（それぞれ）を使用すると、Ｈｅｋ－Ｂｌｕｅ（商標）ＴＬＲ２およびＨｅｋ－Ｂｌｕｅ（商標）ＴＬＲ４細胞がＮＦ－κＢおよび／またはＡＰ－１を活性化してＳＥＡＰが分泌され、これはＳＥＡＰ検出試薬を用いれば検出可能である。Ｈｅｋ－Ｂｌｕｅ（商標）ＴＬＲ２細胞をＬＰＳ共受容体タンパク質ＣＤ１４でコトランスフェクトして、ＴＬＲ２応答性を増強しシグナルの質を向上させる。親細胞は、内因性レベルのＴＬＲ１、３、５、６およびＮＯＤ１を発現する。

【０５６７】

方法：Ｈｅｋ－Ｂｌｕｅ（商標）－ＴＬＲ２またはＨｅｋ－Ｂｌｕｅ（商標）－ＴＬＲ４細胞をＰＢＳで２回洗浄し、トリプシン処理して、新鮮な培地（増殖培地：ＤＭＥＭ、４．５ｇ／ｌのグルコース、１０％熱不活性化ウシ胎仔血清（５６℃で３０分）、１００ｍｇ／ｍＬのＺＥＯＣＩＮ（商標）、２ｍＭのＬ－グルタミン）中で再懸濁させる。細胞を５０，０００細胞／ウェルの濃度で、９６ウェルプレートに総体積１００μＬで播き、ＡＡＲＳポリペプチド、対照またはＡＡＲＳポリペプチド（＋ＬＰＳ）を、以下で概説する実験で示される濃度で各ウェルに加える。細胞を５％CO_2インキュベーター中、３７℃で１８時間インキュベートする。実験の２日目に、ＳＥＡＰ検出培地（ＱＵＡＮＴＩ－ＢＬＵＥ（商標））（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ、カタログコード：ｒｅｐ－ｑｂ１）を説明書に従って調製し、１ウェル当たり１２０μＬを透明平底９６ウェルプレートに加え、細胞上清を加える（２０μＬ）。試料を３７℃で約３０分～２時間インキュベートする。分光光度計を用いて６５０ｎＭでの吸光度を読み取り、ＳＥＡＰレベルを決定する。対照ウェルをＰＢＳおよびＵｌｔｒａＰｕｒｅ　ＬＰＳ（ＴＬＲ－４）またはＰＡＭ３ＣＳＫ４（ＴＬＲ－２）のような既知のＴＬＲアゴニストで前処理する。バックグラウンドを差し引いた［ＰＢＳ＋ＬＰＳのシグナル］と［ＡＡＲＳポリペプチド＋ＬＰＳのシグナル］の比を用いて、アゴニズムのパーセントを決定する。

【０５６８】

サイトカイン放出（下のデータ表のアッセイＥ１～Ｅ１６）

背景および治療的関連：サイトカインは、細胞間コミュニケーションに広く利用され、免疫調節および制御を含めた正常な身体ホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている、多様な小分子の細胞シグナル伝達タンパク質分子の集まりである。従って、サイトカインの放出または生物活性を調節するＡＡＲＳポリペプチドは、広範な疾患および障害における、例えば炎症性の疾患および障害、自己免疫性疾患、組織移植／臓器拒絶、癌の予防または治療、造血および感染の調節を含めた治療的有用性を有する。

【０５６９】

培養細胞からのサイトカイン放出

方法：試験細胞を、１ｍＬ増殖培地中約10^6細胞／ウェルの密度で２４ウェルプレートに播く。細胞をＡＡＲＳポリペプチド（下の実施例で示される濃度）または等体積のＰＢＳで処置し、５％CO_2、３７℃で一晩インキュベートする。細胞処置の後、試料をスイングバケット遠心機で５分間、２，０００×ｇ、４℃で遠心分離する。細胞ペレットを崩さないように培地を慎重に取り出し、新しいチューブに移す。試料を直ちにアッセイするか、または次の解析のために液体窒素中で急速凍結する。市販のキット（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ、ＭＮ、ＵＳＡ）を用いて、または開発業務受託機関（ＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓｔ．Ｐａｕｌ、ＭＮ）を通じて、サイトカイン放出（ＭＩＦ、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、セルピンＥ１、ＧＭ－ＣＳＦ、ＧＲＯ、ＩＬ－１アルファ、ＩＬ－１ベータ、ＩＬ－１ｒａ、ＩＬ－６、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１、ＲＡＮＴＥＳおよびＴＮＦ－アルファのサイトカインを含む）を判定する。

【０５７０】
ヒト全血からのサイトカイン放出
方法：ヒト全血を正常なヒトドナーから採取し、標準的な採血管にヘパリンとともに収集する。適切な細胞の健康状態を確保するために、血液を収集した同じ日にこれを使用する。血液を穏やかにかき混ぜ、１００μＬの体積で９６ウェルポリカーボネートＶ底プレートに播く。マルチチャンネルピペットセットを５０μＬで２回使用して、ＡＡＲＳポリペプチドを血液に加えてゆっくりかき混ぜる。すべての実験でフィルターチップを使用し、フルＰＰＥを装着する。すべての実験を、ヒト血液での実験に適した専用のバイオセーフティフード内で行う。血液を５％CO_2、３７℃で一晩インキュベートする。細胞処置の後、スイングバケット遠心機で試料を２，０００×ｇで５分間、遠心分離する。上清をサイトカインＥＬＩＳＡ用に収集する。ＥＬＩＳＡを既に記載の通りに行う。
【０５７１】
ＰＢＭＣからのサイトカイン放出
方法：末梢血単核球を分離するために、新たに分離したヒト全血を５０ｍＬのコニカルチューブ中、室温で、Ｓｉｇｍａ社のＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７により１：１の比で、室温で穏やかに層状にする。層状の試料を、スイングバケット臨床用遠心機で３０分間、ブレーキなしで４００×ｇで遠心分離する。次いで、血漿と密度勾配の境界にある白血球の層をピペットで取り出す。この末梢血単核球を、希釈および２５０×ｇで１０分間の遠心分離によりＲＰＭＩ－１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、番号２２４００－１０５）で２回洗浄する。洗浄したＰＢＭＣをＲＰＭＩ－１６４０＋１０％ＦＢＳ中に再懸濁させ、1×10^6細胞／ｍＬで播いた。
【０５７２】
ヒト滑膜細胞からのサイトカイン放出
背景および治療的関連：いくつかの疾患ではＩＬ－６およびＩＬ－８が過剰に産生されるため、これらが炎症性疾患の発病において基本的な役割を果たし得ることが、数多くの研究により示されている。ＩＬ－６は内皮細胞産生を活性化し、ＩＬ－８および単球化学誘引物質タンパク質の放出、接着分子の発現および炎症部位への白血球動員を引き起こす。これらのサイトカインは、全身性若年性関節炎、全身性エリテマトーデス、クローン病および関節リウマチの発病に関与する細胞を含めた、炎症性疾患に関連した細胞型で発現される。サイトカイン産生の中で最も重要な全身作用の１つは、急性期応答の誘発である。急性期タンパク質は主として肝臓により産生され、補体活性化、炎症誘発性サイトカインの誘導および好中球走化性の刺激を介して免疫応答を促進するタンパク質がこれに含まれる。あるいは、急性期応答は役に立つ場合もあり、プロテイナーゼアンタゴニスト、オプソニンおよびプロコアグラントのような急性期タンパク質は、炎症を消散させることにより組織破壊を制限するのに役立つ。特に、ＩＬ－６は滑膜細胞増殖および破骨細胞活性化を刺激して、滑膜パンヌスの形成および修復をもたらし得る。ＩＬ－６はＩＬ－１とともに作用してマトリックスメタロプロテイナーゼの産生を増加させ、これが関節および軟骨破壊の一因となり得る。しかし、ＩＬ－６を抗原誘導性関節炎のマウス関節内に注射すると、このサイトカインが組織メタロプロテアーゼ阻害物質の発現を誘導してプロテオグリカン合成を刺激するという知見により示唆されるように、ＩＬ－６は関節における保護作用も有し得る。ヒト線維芽細胞様滑膜細胞－関節リウマチ（ＨＦＬＳ－ＲＡ）は、関節リウマチ（ＲＡ）の患者から採取した滑膜組織から分離される。これを二代目で凍結保存し、培養して少なくとも５集団倍加数まで増殖させることができる。ＨＦＬＳは、軟骨分解の一因となるサイトカインおよびメタロプロテイナーゼの産生による関節破壊でのその役割で長い間知られている。
【０５７３】
したがって、線維芽細胞様滑膜細胞－関節リウマチ（ＨＦＬＳ－ＲＡ）の増殖、分化またはサイトカイン放出プロファイルを調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、広範な疾患における、例えば炎症性疾患ならびに全身性若年性関節炎、全身性エリテマトーデス、クローン病および関節リウマチを含む障害の治療を含めた治療的有用性を有する。

【０５７４】
方法：ＨＦＬＳ－ＲＡの成体細胞（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号４０８ＲＡ－０５ａ）を、使用前に１２５ｍＬフラスコ内の１５ｍＬ培地中、滑膜細胞増殖培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号４１５－５０）で一継代維持する。細胞を加湿環境中、５％CO_2、３７℃で維持し、無菌技術ならびにゴーグル、手袋および実験着を含めた適当な個人用保護具を用いて、ＢＳＬ２認定済みの組織培養フード内で使用する。８０μＬ体積の細胞を約５０，０００細胞／ｍＬの細胞密度で増殖培地に一晩播く。一晩の付着の後、ＡＡＲＳポリペプチドを無菌ＰＢＳ中、１ウェル当たり２５０ｎＭの最終濃度（または下の実施例で別途明記されている通り）で各ウェルに加える。対照ウェルは未処置細胞を含み、これを等体積のＰＢＳとともにインキュベートする。細胞を基本培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号３１０－４７０）中でタンパク質またはＰＢＳに２４時間曝露する。上清を取り出し、製造者の説明書に従ってＩＬ－８、ＩＬ－６およびＴＮＦａのＥＬＩＳＡアッセイを行う（ＲＮＤ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号ＤＹ２０６およびＤＹ－２０８、ＤＹ－２１０　Ｄｕｏ－ｓｅｔキット）。既に記載されている通りに、レサズリンを含有する新たな培地を上清除去後にプレートに加え、３７℃で３時間インキュベートすることにより、増殖をレサズリンで評価する。プレートを蛍光プレートリーダーで読み取り、ＡＡＲＳポリペプチドで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光を、ＰＢＳのみで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光で割った関数として、生存率／増殖を表す。

【０５７５】
ヒトアストロサイト増殖および炎症性サイトカイン産生
背景および治療的関連：ヒトアストロサイト（ＨＡ）はヒト大脳皮質から得られる。これを二代目で凍結保存し、培養して１０集団倍加数まで増殖させることができる。ＨＡは中枢神経系に最も豊富に存在する細胞であり、ニューロンへの機械的支持および栄養分の提供ならびにニューロンの不要物の除去のような数多くの機能を担っている。最適なニューロン機能に重要な補助的役割を果たすことに加え、ＨＡは、血液脳関門を形成している血管内皮細胞の生化学的補助も行っている。最近の研究では、アストロサイトが、幹細胞をニューロン分化に運命付け単一シナプスの機能を制御することによりニューロン新生を調節すること可能であり、脳内の情報の伝達および保存に積極的に関わっているということが示されている。神経系の機能におけるアストロサイトの重要性がますます認識されつつある。ＨＡは、アストロサイト機能の多様性を探るための有用なｉｎ　ｖｉｔｒｏモデルとして働き得る。アストロサイトは、ＩＬ６およびＴＮＦアルファに応答して増殖することが示されている。さらに、この細胞は自身のＩＬ６およびＴＮＦアルファを生成することができる。したがって、ＨＡの増殖およびサイトカイン産生を調節するＡＡＲＳポリペプチドは、神経炎症、神経変性、脳の腫瘍形成ならびに脳の虚血および修復を含めた各種神経疾患における治療的有用性を有する。

【０５７６】
方法：Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ社のヒトアストロサイト（ＨＡ）（カタログ番号８８２Ｋ－０５ｆ）を、製造者の説明書に従ってＣｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ社のＨＡ細胞増殖培地（カタログ番号８２１－５００）で維持する。細胞を加湿環境中、５％CO_2、３７℃で維持し、無菌技術ならびにゴーグル、手袋および実験着を含めた適当な個人用保護具を用いて、ＢＳＬ２認定済みの組織培養フード内で使用する。８０μＬ体積の細胞を、完全培地（上記）中、５０，０００細胞／ｍＬの細胞密度でコラーゲンコートプレートに一晩播く。細胞をＰＢＳで１回洗浄し、８０μＬの無血清増殖培地を各ウェルに加える。１ウェル当たり２５０ｎＭの最終濃度（または下の実施例で別途明示されている通り）のＡＡＲＳポリペプチドを、無菌ＰＢＳ中一定体積で各ウェルに加える。細胞をＡＡＲＳポリペプチドに４８時間曝露し、使用済みの培地をサイトカイン評価（既に記載されている通り）用に取り出す。細胞を基本培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号３１０－４７０）中でタンパク質またはＰＢＳに４８時間曝露する。上清を取り出し、製造者の説明書に従ってＩＬ－８、ＩＬ－６およびＴＮＦａのＥＬ

ＩＳＡアッセイを行う（ＲＮＤ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号ＤＹ２０６およびＤＹ－２０８、ＤＹ－２１０　Ｄｕｏ－ｓｅｔキット）。既に記載されている通りに、レサズリンを含有する新たな培地を上清除去後にプレートに加え、３７℃で３時間インキュベートすることにより、増殖をレサズリンで評価する。プレートを蛍光プレートリーダーで読み取り、ＡＡＲＳポリペプチドで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光を、ＰＢＳのみで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光で割った関数として、生存率／増殖を表す。

【０５７７】

ヒト肺微小血管内皮細胞（ＨＬＭＶＥＣ）の増殖および炎症性サイトカイン産生

背景および治療的関連：肺血管系は生理学的／病理学的に非常に重要である。肺血管系は、循環する基質および有形成分と相互作用して全身動脈血の組成を調節し、標的器官の機能に影響を及ぼし、血栓症、止血および免疫反応ならびに腫瘍転移の一因となる、代謝的に活性で機能的に応答する細胞からなる組織であることが現在認められている。ヒト肺微小血管内皮細胞（ＨＬＭＶＥＣ）は、急性肺傷害時に白血球が肺に向かって移動するための重要なキューを与える化学誘引物質サイトカインおよび細胞接着分子の高い発現を示す。この主要な細胞型は、肺微小血管系の病理学および生物学の様々な側面をｉｎ　ｖｉｔｒｏで研究するための有用なツールとなり得る。炎症性刺激に応答した微小血管系の構造および機能の変化は、臓器損傷において鍵となる因子であると考えられており、また適切な条件下では、修復のための刺激をもたらし得る。これらの血管変化の重要な原因は、白血球浸潤が関与する炎症性反応の誘導である。内皮細胞への顆粒球接着に焦点を当てた各種の研究により、白血球の動員および遊出には、よく組織化された接着カスケードが伴うことが明らかになっている。接着カスケードは、顆粒球が内皮細胞に付着し、低速度で液流の方向に転がり始めることで始まる。顆粒球は転がる間に活性化され、次いで内皮細胞にしっかりと接着し、内皮細胞を横断して血管外スペースへ移動する。これらの接着事象は、顆粒球表面のＣＡＭと内皮細胞上に存在する同族糖タンパク質との間で生じる分子相互作用により一部仲介される。内皮細胞接着分子であるＥ－セレクチンは、顆粒球リガンドであるＳＬｅｘ型グリカンと相互作用して、接着カスケードのうちの付着とローリングの段階を仲介し得るということが、各種の研究により明らかになっている。カスケードの下流段階には、内皮細胞で発現する細胞間接着分子と顆粒球で発現するＣＤ１８インテグリンとの相互作用が含まれる。

【０５７８】

したがって、ヒト肺微小血管内皮細胞の増殖および／またはサイトカイン産生を調節するＡＡＲＳポリペプチドは、例えば肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症および喘息を含む炎症性および閉塞性の肺疾患を含めた各種血管および肺疾患における治療的有用性を有する。

【０５７９】

方法：ＨＬＭＶＥＣ（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号５４０－０５）をＣｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ社の微小血管内皮細胞増殖培地（カタログ番号１１１－５００）で維持する。適切な増殖のために、細胞を播く前に、コラーゲンを含有するＡｔｔａｃｈｍｅｎｔ　Ｆａｃｔｏｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号１２３－１００）を用いてプレートおよびフラスコをコーティングする。細胞を加湿環境中、５％CO_2、３７℃で維持し、無菌技術ならびにゴーグル、手袋および実験着を含めた適当な個人用保護具を用いて、ＢＳＬ２認定済みの組織培養フード内で使用する。８０μＬ体積の細胞を、完全培地（上記）中、５０，０００細胞／ｍＬの細胞密度でコラーゲンコートプレートに一晩播く。細胞をＰＢＳで１回洗浄し、８０μＬの無血清増殖培地を各ウェルに加える。１ウェル当たり２５０ｎＭの最終濃度（または下の実施例で別途明示されている通り）のＡＡＲＳポリペプチドを、無菌ＰＢＳ中一定体積で各ウェルに加える。細胞をＡＡＲＳポリペプチドに４８時間曝露し、使用済みの培地を細胞接着分子のＥＬＩＳＡおよびサイトカイン評価（既に記載されている通り）用に取り出す。可溶性ＶＣＡＭおよび／またはＩＣＡＭを含む細胞接着分子を、ＲＮＤ

Ｓｙｓｔｅｍｓ社の標準的なＥＬＩＳＡキット（それぞれ、カタログ番号ＤＹ６４３およびＤＹ７２０）を用いて測定する。既に記載されている通りに、レサズリンを含有する新たな培地を上清除去後にプレートに加え、３７℃で３時間インキュベートすることにより、増殖をレサズリンで評価する。プレートを蛍光プレートリーダーで読み取り、ＡＡＲＳポリペプチドで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光を、ＰＢＳのみで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光で割った関数として、生存率／増殖を表す。

【０５８０】

細胞接着（下のデータ表のアッセイＦ１～Ｆ７）

背景および治療的関連：細胞接着分子（ＣＡＭ）は細胞表面に存在するタンパク質であり、細胞接着と呼ばれる過程で他の細胞または細胞外マトリックス（ＥＣＭ）との結合に関与する。これらのタンパク質は通常、膜貫通型受容体であり、３つのドメインすなわち、細胞骨格と相互作用する細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、および同じ種類の他のＣＡＭと相互作用する（ホモフィリック結合）または他のＣＡＭもしくは細胞外マトリックスと相互作用する（ヘテロフィリック結合）細胞外ドメインからなる。ＣＡＭの大部分は、Ｉｇ（免疫グロブリン）スーパーファミリー（ＩｇＳＦ　ＣＡＭ）、インテグリン、カドヘリンおよびセレクチンの４つのタンパク質ファミリーに属する。免疫グロブリンスーパーファミリー（ＩｇＳＦ）細胞接着分子はカルシウム依存性膜貫通型糖タンパク質であり、神経細胞接着分子（ＮＣＡＭ）、細胞間細胞接着分子（ＩＣＡＭ）、血管細胞接着分子（ＶＣＡＭ）、血小板内皮細胞接着分子（ＰＥＣＡＭ－１）、内皮細胞選択性接着分子（ＥＳＡＭ）、接合部接着分子（ＪＡＭ）、ネクチンおよびその他の細胞接着分子がこれに含まれる。

【０５８１】

細胞接着分子は、各種炎症性肝疾患における白血球の類洞内皮への接着および遊出および細胞傷害性に重要な細胞表面糖タンパク質である。ＩＣＡＭ－１は炎症において重要な役割を果たし、内皮細胞上でのＩＣＡＭ－１発現増加は内皮細胞の活性化に反映される。ＩＣＡＭ－１は、内皮細胞との堅固な接着を媒介し白血球遊出を促進することから、特に重要である。炎症性の肝臓状態、例えばＢ型肝炎ウイルス感染、自己免疫性肝障害、アルコール性肝炎および肝臓同種移植片拒絶などでは、類洞細胞および肝細胞の両方でＩＣＡＭ－１の上方制御が見られることが研究により示されている。

【０５８２】

したがって、細胞接着分子産生および内皮細胞への細胞接着を調節するＡＡＲＳポリペプチドは、例えば心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、自己免疫および肺高血圧症を含めた各種炎症性疾患における治療的有用性を有する。

【０５８３】

方法：ヒト臍帯静脈細胞（ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＲＬ－２８７３）（ＨＵＶＥＣ）を製造者の説明書に従って、ヒトフィブロネクチン付着溶液でコーティングした１２ウェルプレートに、推奨されるＡＴＣＣの培地および添加物中、約１．２×１０^{5}細胞／ウェルの濃度で播いて増殖させる。示される濃度のＡＡＲＳポリペプチドまたはＰＢＳ単独で細胞を刺激し、増殖培地で一晩インキュベートする。ヒト急性単球性白血病（ＴＨＰ－１（ＴＩＢ－２０２））細胞を、カルセインＡＭ（６μＬ／ｍＬ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｃ１４３０）を含む０．１％ＢＳＡ／ＲＰＭＩ無血清培地中に再懸濁させ、３０分間インキュベートする。標識された細胞を回収し、１０％ＦＢＳを含有するＲＰＭＩ培地中で再懸濁させ、密度を２×１０^{6}細胞／ｍＬに調整する。

【０５８４】

標識されたＴＨＰ－１細胞１００μＬ（２×１０^{5}個）を各ウェルの増殖培地１ｍＬ中のＨＵＶＥＣ単層に播き、１５分間インキュベートする。ウェルをＰＢＳで２回洗浄して未結合細胞を除去した後、励起波長４８８ｎｍ／発光波長５３０ｎｍの蛍光プレートリーダーで細胞を読み取る。

【０５８５】

細胞分化（下のデータ表のアッセイＧ１～Ｇ４）

初代ヒト脂肪前駆細胞における脂肪細胞の分化および増殖

背景および治療的関連：肥満症およびリポジストロフィーはともに、糖尿病および心血管疾患を含めた病態に関連することが多い。脂肪組織は多種多様な因子を分泌する内分泌器官であり、分泌の調節異常は脂肪生成だけでなく、全身のグルコース／インスリンホメオスタシスにも影響を与えるということが現在認められている。肥満症を招く過剰な脂肪組織は、周知の深刻な健康上の脅威となっている。脂肪組織の発達は、遺伝的背景、ホルモンバランス、食事および身体活動により影響され得る。トリアシルグリセロールの蓄積が高まって脂肪細胞の大きさが増加すると、脂肪組織量が増加し得る。さらに、前駆細胞の脂肪細胞への分化により生じる脂肪細胞の数が成体でも増加することがあり、これは重症のヒト肥満症および高炭水化物食または高脂肪食を摂取したげっ歯類において観察されている。脂肪細胞は特に、間葉細胞が拘束および分化の過程である脂肪生成を経て生じると考えられている。前脂肪細胞細胞系は、合成糖質コルチコイド、デキサメタゾン（ＤＥＸ）、イソブチルメチルキサンチン（ＩＢＭＸ）およびインスリンからなる脂肪生成剤による処置で脂肪細胞分化を経ることができ、これらの研究では有用であった。転写因子のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ（ＰＰＡＲγ）およびＣＣＡＡＴエンハンサー結合タンパク質（Ｃ／ＥＢＰ）ファミリーでは、脂肪細胞分化において重要な役割を果たすという十分な確証が得られている。脂肪細胞分化の初期に、Ｃ／ＥＢＰβおよびＣ／ＥＢＰδがそれぞれＤＥＸおよびＩＢＭＸより誘導され、次いでこの２つがＰＰＡＲγおよびＣ／ＥＢＰαを誘導して、脂肪細胞機能に必要な様々な脂肪細胞マーカーを活性化する。他の転写因子も脂肪生成を正または負に調節することが報告されており、また様々な増殖因子およびホルモンが、脂肪生成転写因子の発現を調節することにより脂肪細胞分化に影響を及ぼし得る。実際、脂肪組織は、トリアシルグリセロールを貯蔵し、必要時に脂肪酸を放出することにより、哺乳動物の主なエネルギー貯蔵部位となっていることに加え、免疫応答、血管機能およびエネルギー恒常性を含めた多様な生理過程に関与する広範な分子を分泌する。ＴＮＦ－αおよびＩＬ－６のようなサイトカインが脂肪細胞から分泌される。これらの因子の一部も、オートクリン／パラクリン作用により脂肪組織の増殖および発達に影響を及ぼし得る。

【０５８６】

したがって、正常なヒト脂肪前駆細胞の分化および／または増殖を調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、広範な疾患における、例えば、代謝性疾患、心血管疾患、肥満症およびリポジストロフィーならびに糖尿病の長期合併症の治療および予防を含めた治療的有用性を有する。

【０５８７】

方法：ＨＰＡｄ（ヒト脂肪前駆細胞）（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、カタログ番号８０３ｓＤ）を販売業者の説明書に従って維持する。培養のために、細胞を急速に解凍し、直ちに１５ｍＬの脂肪細胞増殖培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、カタログ番号８１１Ｍ－２５０）へ移し、標準的な無菌組織培養処置フラスコに播く。細胞の集密度が６０％を超えるまで、培地を１日置きに新鮮な脂肪細胞増殖培地と交換する。細胞を加湿環境中、５％CO_2、３７℃で増殖させ、無菌技術ならびにゴーグル、手袋および実験着を含めた適当な個人用保護具を用いて、ＢＳＬ２認定済みの組織培養フード内で使用する。分化用に、細胞を透明底黒壁９６ウェルの組織培養処理アッセイプレートに約５０，０００細胞／ｍＬの濃度で播く。１ウェル当たり２５０ｎＭの最終濃度（または下の実施例で別途明示されている通り）のＡＡＲＳポリペプチドを各ウェルに加える。脂肪生成分化培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号８１１Ｄ－２５０）で刺激する陽性対照を除くすべての細胞を、増殖培地で２日間維持する。細胞をＡＡＲＳポリペプチドに４８時間曝露する。可溶性ＶＣＡＭおよび／またはＩＣＡＭを含む細胞接着分子を、ＲＮＤ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社の標準的なＥＬＩＳＡキット（それぞれ、カタログ番号ＤＹ６４３およびＤＹ７２０）を用いて測定する。既に記載されている通りに、レサズリンを含有する新たな培地を上清除去後にプレートに加え、３７℃で３時間インキュベートすることにより、増殖をレサズリンで評価する。プレートを蛍光プレートリーダーで読

み取り、ＡＡＲＳポリペプチドで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光を、ＰＢＳのみで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光で割った関数として、生存率／増殖を表す。新鮮な培地を加え、最初の培地交換後の１６日間、細胞の健康を維持するために１日置きに新鮮な培地に交換しながら分化を維持する。１５日目に、細胞を無血清培地に播く。１６日目に、成熟脂肪細胞への分化をナイルレッド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、最終濃度３μＭ）染色により評価し、適当な波長の蛍光プレートリーダーで定量化する。このアッセイを行うために、細胞を１０％パラホルムアルデヒドで固定し、ＰＢＳで洗浄して、０．５％ＢＳＡと０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含有するＰＢＳ中で透過処理する。既に記載されているように、蛍光リーダーによる最終濃度１ｕｇ／ｍＬのヘキスト色素３３４３２での強度測定により細胞増殖を評価する。脂肪生成をナイルレッドのシグナルの強度で表す。ヘキスト染色のシグナルを用いて細胞数を評価する。

【０５８８】

ヒト骨格筋細胞の分化および増殖

背景および治療的関連：骨格筋の発生は、多能性中胚葉細胞から筋芽細胞を生じるという決定、筋芽細胞の細胞周期からの離脱および筋細胞への分化、そして最後に骨格筋線維の増殖および成熟を含む、多段階の過程である。骨格筋分化には、筋特異的な調節遺伝子および構造遺伝子の誘導とともに、筋芽細胞の整列、伸長および多核性筋管への融合が含まれる。分子レベルにおいて、筋原性への拘束および筋特異的遺伝子発現には、ＭｙｏＤ、ミオゲニン、ｍｙｆ－５およびＭＲＦ４を含めた骨格筋特異的ヘリックス－ループ－ヘリックス（ｂＨＬＨ）ＭｙｏＤファミリーのタンパク質、ならびに筋細胞エンハンサー結合因子２（ＭＥＦ２）が含まれる。ＭｙｏＤファミリータンパク質のＤＮＡ結合活性はＩｄにより弱められるが、このＩｄは、増殖中の細胞ではＥ２ａ遺伝子産物と複合体を形成し、細胞が分化するように誘導されると下方制御される。筋管への分化の決定は、複数の因子により負の影響を受ける。筋芽細胞をウシ胎仔血清、塩基性線維芽細胞増殖因子２またはトランスフォーミング増殖因子β１で処置すると、筋芽細胞の分化が抑制されることが知られている。また筋形成は、癌遺伝子、例えばｃ－ｍｙｃ、ｃ－ｊｕｎ、ｃ－ｆｏｓ、Ｈ－ｒａｓおよびＥ１ａなどによっても負の調節を受ける。血清枯渇時に筋芽細胞において誘発され、ＭｙｏＤファミリー遺伝子発現の誘導および筋肉分化を引き起こすシグナル伝達に関する情報はほとんどない。筋原性分化は、筋芽細胞の細胞膜上に存在するインテグリンの活性化に依存すると思われ、このことは、インテグリンが上流分子種である「裏返し」の生化学的経路の働きを示唆している。インスリン様成長因子（ＩＧＦ）－Ｉおよび－ＩＩとその受容体との相互作用も骨格筋分化の正の調節因子である。

【０５８９】

したがって、筋肉発生を調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、広範な疾患における、例えば代謝性疾患、悪液質、様々な筋萎縮状態、ならびに筋萎縮が発病および症状において鍵となる役割を果たす筋骨格疾患の治療を含めた、治療的有用性を有する。ヒト骨格筋細胞（ＨＳｋＭＣ）は、分化を経てアクチンおよびミオシン筋フィラメントを示す。ＨＳｋＭＣは、悪性高熱症のような遺伝性筋疾患の研究に使用されてきた。またＨＳｋＭＣは、心臓への損傷を修復する心移植片として働く可能性もあるため、筋肉発生を調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、筋形成のｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏの調節因子としても有用である。

【０５９０】

方法：この過程におけるＡＡＲＳポリペプチドの潜在的な役割を評価するために、骨格筋細胞分化の標準的なアッセイを用いた。このアッセイでは、ヒト成人骨格筋細胞（ＨＳｋＭＣ、Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、カタログ番号１５０－０５ｆ）を健常なヒトドナーの角膜縁の骨格筋から分離する。細胞をＨＳｋＭＣ増殖培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号１５１－５００）で維持する。これらの細胞を培養し、少なくとも１５集団倍加数まで増殖させることができる。分化用に、細胞を増殖培地で一継代維持し、次いで、コラーゲンで処理した９６ウェル透明底黒壁ＴＣ処理プレートに、培地１ｍＬ当たり５０，０００細胞、１ウェル当たり１００μＬで細胞を播く。細胞を

一晩付着させる。ＰＢＳ中２５０ｎＭタンパク質の最終濃度（または下の実施例で別途明示されている通り）のＡＡＲＳポリペプチドまたはＰＢＳのみを各ウェルに加える。このとき、対照ウェルには同じ体積の分化培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号１５１Ｄ－２５０）を加える。細胞をタンパク質または分化培地とともに４８時間インキュベートする。４８時間後、細胞培養上清を全ウェルから回収し、増殖培地で維持されている対照ウェルを除いたプレート全体に、体積１５０μＬの分化培地を加える。既に記載されている通りに、上清を用いて、ＩＬ６およびＩＬ８を含めたサイトカイン産生を評価する。既に記載されている通りに、レサズリンを含有する新たな培地を上清除去後にプレートに加え、３７℃で３時間インキュベートすることにより、増殖をレサズリンで評価する。顕微鏡下で細胞をモニターし、２日置きに新鮮な分化培地に交換する。１０日目に、培地を除去し、細胞を１０％パラホルムアルデヒドで３０分間固定する。０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含むＰＢＳで細胞を１５分間透過処理し、ＴＲ標識ファロイジンおよびヘキスト３３４３２（既に記載されている）で細胞を染色して、アクチンと核をそれぞれ明確にする。核の強度を用いて各ウェルでの細胞増殖を決定し、ファロイジンの強度を用いて総アクチン含有量を決定する。また、細胞をアルファアクチン骨格筋抗体（ＧｅｎＴｅｘ、カタログ番号ＧＴＸ１０１３６２）でも染色する。全ウェルに対して蛍光顕微鏡を用いたデジタル写真撮影、ならびに目視検査および採点を行う。

【０５９１】

ヒト骨髄間葉系の分化および増殖

背景および治療的関連：間葉系幹細胞（ＭＳＣ）は、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞、ベーター膵島細胞および可能性として神経細胞を含めた各種細胞型に分化することができる多能性幹細胞である。多数の経路の転写因子、補助因子およびシグナル伝達中間体の複雑なネットワークの協調を含めた多くの様々な事象が、他の系列へのＭＳＣの拘束に寄与する。ＭＳＣは、広範な急性および変性性の疾患を治療する可能性のある細胞集団であるため、強い治療学的関心がもたれている。

【０５９２】

さらに、ＭＳＣの様々な発生経路への分化を調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、造血、ニューロン新生、筋形成、骨形成および脂肪生成のｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでの調節を可能にする、ならびに例えば炎症性応答、自己免疫、癌、ニューロン変性、筋ジストロフィー、骨粗鬆症およびリポジストロフィーを含めた広範な障害および疾患における、重要な治療的有用性を有する。ヒトＭＳＣは、免疫特権をもつ、同種移植に有利な細胞型であり、移植の拒絶および合併症のリスクを減らす。最近では、自己間葉系幹細胞を使用した、軟骨および半月板、腱ならびに骨折を含めたヒト組織の再生においても著しい進歩が見られる。また数多くの研究により、ラットにおけるＭＩ後の心機能向上のために血管内皮増殖因子でトランスフェクトしたＭＳＣの移植、マウス腫瘍内へのインターフェロン－β送達媒体としてのＭＳＣ、および骨形成を促進するためのＢＭＰを発現するＭＳＣによる遺伝子治療を含めた、遺伝子治療へのＭＳＣの使用が調査されている。したがって、そのままでのおよび改変された治療剤としてのＭＳＣ、ならびにＡＡＲＳポリペプチドが治療剤として作用しｉｎ　ｖｉｖｏでＭＳＣの分化を調節する可能性への強い関心により、ＭＳＣの増殖および分化の潜在的な誘導物質としてＡＡＲＳポリペプチドを試験した。

【０５９３】

方法：ｈＭＳＣ（ヒト骨髄間質細胞）（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、カタログ番号４９２－０５ｆ）を販売業者の説明書に従って維持する。培養のために、細胞を急速に解凍し、直ちに１５ｍＬの骨髄間質細胞増殖培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、カタログ番号８１１Ｍ－２５０）へ移し、標準的な無菌組織培養処置フラスコに播く。細胞の集密度が６０％を超えるまで、培地を１日置きに新鮮な骨髄間質細胞増殖培地と交換する。細胞を加湿環境中、５％CO_2、３７℃で増殖させ、無菌技術ならびにゴーグル、手袋および実験着を含めた適当な個人用保護具を用いて、ＢＳＬ２認定済みの組織培養フード内で使用する。分化用に、細胞を透明底黒壁９６ウェルの組織培養処理アッセイプ

レートに５０，０００細胞／ｍＬの濃度で播く。１ウェル当たり２５０ｎＭの最終濃度（または下の実施例で別途明示されている通り）のｔＲＮＡ合成酵素由来タンパク質を各ウェルに加える。骨形成または軟骨形成分化培地（ＳｔｅｍＰｒｏ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、それぞれカタログ番号Ａ１００７２－０１およびＡ１００７１－０１）で刺激する陽性対照を除くすべての細胞を、増殖培地で２日間維持する。細胞をＡＡＲＳポリペプチドに４８時間曝露する。可溶性ＶＣＡＭをＲＮＤ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社の標準的なＥＬＩＳＡキット（カタログ番号ＤＹ６４３）を用いて測定する。既に記載されている通りに、レサズリンを含有する新たな培地を上清除去後にプレートに加え、３７℃で３時間インキュベートすることにより、増殖をレサズリンで評価する。プレートを蛍光プレートリーダーで読み取り、ＡＡＲＳポリペプチドで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光を、ＰＢＳのみで処置したウェルのレゾルフィンに関連する蛍光で割った関数として、生存率／増殖を表す。細胞生存率を評価した後、２回の培地交換によりレサズリンを除去し、０．５×分化培地を全ウェルに加える。培地交換後の１０日間、細胞の健康を維持するために１日置きに新鮮な培地に交換しながら、全ウェルの目視検査により分化をモニターする。最初の分化交換の１０日後に、ＥＬＦ－９７色素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｅ６６０１）を用いたアルカリホスファターゼ染色により分化を評価した（Ｙａｎｇら，Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌ（６）１８７－２１３（２０１１）　ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１０．１８９）。

【０５９４】

ヒト肺動脈平滑筋細胞（ｈＰＡＳＭＣ）の増殖および分化

背景および治療的関連：正常なヒト成人の肺血管の肺動脈平滑筋細胞（ＰＡＳＭＣ）のほとんどが静止状態かつ非遊走性であり、主として肺での収縮機能の遂行に関与している。しかし、ＰＡＳＭＣは分化を終えたわけではなく、自らの表現型を調節する能力を有し、局所的な環境的キューの変化に応答してその静止状態から脱する。この分化状態は、組織の要求の変化に応答した発生、組織損傷および血管再構築において生じ得る。肺高血圧症（ＰＨ）は、血管緊張およびＰＡＳＭＣ収縮性の増加ならびに血管再構築の結果としての末梢肺血管抵抗の増加を含めた各種の基礎状態に関連する。血管再構築には、小肺動脈（ＰＡ）壁でのＰＡＳＭＣ増殖、マトリックス物質合成ならびに細胞間および細胞－マトリックス間の相互作用の変化が含まれ、これにより血管壁の平滑筋要素の厚さの増大および通常は筋肉化されていない遠位部ＰＡの異常な筋肉化が生じる。この過程は、管腔径縮小および末梢抵抗増加の一因となる。疾患の一次的原因におけるＰＡＳＭＣの正確な役割は議論の余地のあるところだが、生じる変化が疾患の臨床的帰結において鍵となる役割を果たす。細胞分化研究の重要な段階は、細胞の分化した機能（１つまたは複数）に寄与する細胞特異的または細胞選択的な遺伝子セットの同定である。血管ＳＭＣの分化または成熟の相対的状態の有用なマーカーとして働く各種の平滑筋細胞（ＳＭＣ）遺伝子、例えばＳＭアルファ－アクチン、ＳＭ　ＭＨＣ、ｈ１－カルポニン、ＳＭ２２－アルファ、デスミン、メタビンキュリン、スムーテリンなどが同定されている。最も広く使用されているマーカーはＳＭアルファ－アクチンであるが、それは部分的には、このタンパク質に対して非常に親和性および選択性の高い多数の抗体が購入できるという理由による。ＰＡＳＭＣの変化がその本来の特性によるものなのか、またはＰＡＳＭＣ増殖を支配する分子事象の調節不全によるものなのかは依然として不明である。しかし、調節キューを決定し、潜在的な調節不全を管理することにより、肺高血圧症、血管疾患を含めた各種の血管および肺疾患の管理に対する重要な治療的洞察が得られる。

【０５９５】

したがって、正常な成人ヒト由来のヒトＰＡＳＭＣの分化および／または増殖を調節する能力を有するＡＡＲＳポリペプチドは、例えば肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症および喘息を含む炎症性および閉塞性肺疾患を含めた各種の血管および肺疾患における治療的有用性を有する。

【０５９６】

方法：ＨＰＡＳＭＣ（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号３５２－０

５ａ）を、使用前に１２５ｍＬフラスコ内の１５ｍＬ培地中、ＨＰＡＳＭＣ増殖培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号３５２－０５ａ）で一継代維持する。細胞を加湿環境中、５％CO_2、３７℃で維持し、無菌技術ならびにゴーグル、手袋および実験着を含めた適当な個人用保護具を用いて、ＢＳＬ２認定済みの組織培養フード内で使用する。８０μＬ体積の細胞を、増殖培地中、約５０，０００細胞／ｍＬの細胞密度でコラーゲンコートプレートに一晩播く。ＡＡＲＳポリペプチドを無菌ＰＢＳ中、１ウェル当たり２５０ｎＭの最終濃度（または下の実施例で別途明記されている通り）で各ウェルに加える。対照ウェルは同じ体積のＰＢＳのみを含む。陽性対照試料を販売業者提供のＨＰＡＳＭＣ分化培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号３１１Ｄ－２５０）でインキュベートする。細胞を基本培地（Ｃｅｌｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、カタログ番号３１０－４７０）中、ＡＡＲＳポリペプチドまたはＰＢＳに４８時間曝露した後、全プレートの培地を分化培地に交換する。上清を回収し、既に記載されている通りに、ＩＬ６およびＩＬ８を含めたサイトカイン産生の評価に用いる。既に記載されている通りに、レサズリンを含有する新たな培地を上清除去後にプレートに加え、３７℃で３時間インキュベートすることにより、増殖をレサズリンで評価する。１日置きに培地を交換しながら、細胞を１０日間モニターする。上記の固定、０．１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００による透過処理の後、抗ＳＭＡ－アルファ抗体（ＧｅｎｅＴｅｘ、カタログ番号ＧＴＸ１０１３６２）およびＡｌｅｘａ４０５コンジュゲート二次抗体を用いた平滑筋アクチン－アルファ染色の定量化により、分化を評価する。１０％ホルムアルデヒドで３０分間の細胞を固定した後、ヘキスト染色により増殖を評価する。励起波長（Ｅｘ）４０５ｎｍ／発光波長（Ｅｍ）４５０ｎｍのボトムリーディング蛍光プレートリーダーを用いて、ヘキスト色素を読み取る。Ａｌｅｘａ－４８８標識ファロイジン染色剤（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ１２３７９）を使用して、総アクチン染色を評価する。

【０５９７】

ＡＡＲＳポリペプチドの細胞との結合の解析（下のデータ表のアッセイＨ１～Ｈ１０）

背景および治療的関連：ＡＡＲＳポリペプチドと特定の細胞型との結合は、対象とする細胞型が、対象とするＡＡＲＳポリペプチドに対して特異的な受容体を発現することを示す。細胞結合は、対象とする細胞型に応じて、その細胞または同様の型の細胞の活性または挙動の調節におけるｉｎ　ｖｉｖｏでのＡＡＲＳポリペプチドの潜在的な役割を示唆する。このような調節的な役割の具体例としては、例えば、Ｂ細胞およびＴ細胞（免疫調節／走化性／自己免疫／炎症）；ＨｅｐＧ２細胞（代謝制御、コレステロールの取込みまたは代謝）；ＴＨＰ－１、ｊｕｒｋａｔ、Ｒａｊｉ細胞（免疫調節／走化性／自己免疫／炎症）、血小板（血小板生成）、３Ｔ３Ｌ１脂肪細胞（脂質生成／代謝）ならびにＣ２Ｃ１２マウス筋芽細胞（筋形成、骨形成）の結合および調節が挙げられる。

【０５９８】

血液細胞との結合

方法：血液を健常なドナーからＥＤＴＡチューブに採取する。２ｍＬの全血を５ｍＬのＦａｌｃｏｎ　ＦＡＣＳチューブに入れる。２ｍＬの染色緩衝液（ＰＢＳ＋２％ＦＢＳ）を加え、３～５秒間ボルテックスし、３００×ｇで５分間、遠心分離する。上清を吸引し、洗浄を繰り返し、ペレットを２ｍＬの染色緩衝液中で再懸濁させる。

【０５９９】

洗浄した血液１００μｌをきれいな５ｍＬのＦＡＣＳ試料チューブに移す。Ｈｉｓ６－またはＶ５－Ｈｉｓ６－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドを、以下で概説する具体的な実験で明記される濃度でチューブに加え、氷上で４５分間インキュベートする。インキュベーション後、様々な細胞型の表面マーカーに対する抗体（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｇｅｎ、カタログ番号５６０９１０、５５５３９８、５５５４１５、３４０９５３、５６０３６１）およびＦＩＴＣ標識抗Ｖ５タグ抗体（Ｖ５－ＦＩＴＣ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｒ９６３２５）またはＦＩＴＣ標識抗Ｈｉｓ６抗体（ＡｂＣａｍ、カタログ番号ａｂ１２０６）をチューブに加え、暗所で３０分間、氷上でインキュベートする。インキュベーション後、２ｍＬのＢＤ　ＦＡＣＳ溶解溶液（カタログ番号３４９２０２）をチューブに加

えた。試料をボルテックスし、氷上に１５分間置く。ＦＡＣＳ解析の前に、試料を２ｍＬのＰＢＳで１回洗浄し、２％ホルムアルデヒドを含むＰＢＳ２ｍＬ中で再懸濁させる。抗体だけでは有意なシグナルを発しない細胞集団の２５％を上回る細胞と結合するＡＡＲＳポリペプチドをヒットと見なす。

【０６００】

血小板結合アッセイ：洗浄した血液５０μＬをきれいな５ｍＬのＦＡＣＳ試料チューブに移し、Ｈｉｓ６－またはＶ５－Ｈｉｓ６－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドを、以下で概説する具体的な実験で明記される濃度でチューブに加え、チューブを氷上で４５分間インキュベートする。２０μＬのＣＤ６１汎用血小板抗体（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｇｅｎ、カタログ番号５５５７５４）および０．５μＬの抗Ｖ５－ＦＩＴＣ標識抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｒ９６３２５）またはＦＩＴＣ標識抗Ｈｉｓ６抗体（ＡｂＣａｍ、カタログ番号ａｂ１２０６）を各チューブに加える。チューブを３０分間、光から保護しながら氷上に置く。１％ホルムアルデヒドを含むＰＢＳで試料を総体積２ｍＬとし、２４時間以内にフローサイトメトリーで解析する。抗体だけでは有意なシグナルを発しない細胞集団の２５％を上回る細胞と結合するＡＡＲＳポリペプチドをヒットと見なす。

【０６０１】

培養中での細胞との結合：完全ＲＰＭＩ培地１００μＬ中約1×10^{6}個の細胞を５ｍＬのＦＡＣＳチューブに入れる。Ｈｉｓ６－またはＶ５－Ｈｉｓ６－タグ化ＡＡＲＳポリペプチドを、以下で概説する具体的な実験で明記される濃度でチューブに加え、チューブを４５分間、氷上に置く。細胞試料を１ｍＬの染色緩衝液（ＰＢＳ＋２％ＦＢＳ）で２回洗浄し、次いで、２００μｇ／ｍＬのヒトＩｇＧを含み、抗Ｖ５－ＦＩＴＣ抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｒ９６３２５）またはＦＩＴＣ標識抗Ｈｉｓ６抗体（ＡｂＣａｍ、カタログ番号ａｂ１２０６）を含む有染色緩衝液０．５μＬを加え、試料を３０分間、光から保護しながら氷上でインキュベートする。試料を１ｍＬの染色緩衝液で２回洗浄した後、１％ホルムアルデヒドを含むＰＢＳで総体積２ｍＬとし、２４時間以内にフローサイトメトリーで解析する。抗体だけでは有意なシグナルを発しない細胞集団の２５％を上回る細胞と結合するＡＡＲＳポリペプチドをヒットと見なす。

【０６０２】

動物実験：造血および循環サイトカインの調節

背景および治療的関連：造血（「ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｓｉｓ」；あるいは「ｈａｅｍｏｐｏｉｅｓｉｓ」または「ｈｅｍｏｐｏｉｅｓｉｓ」）とは、血液細胞成分の形成のことである。細胞性血液成分はすべて、骨の髄質（骨髄）に存在しすべての異なる成熟血液細胞タイプを生じる固有の能力を有する造血幹細胞（ＨＳＣ）から生じる。ＨＳＣは自己再生する、すなわち、ＨＳＣが増殖するとき、少なくともその一部の娘細胞がＨＳＣのままで存在するため、幹細胞のプールが枯渇することはない。しかし、それ以外のＨＳＣ娘細胞（骨髄前駆細胞およびリンパ球前駆細胞）は、１つ以上の特定のタイプの血液細胞が生じる別の分化経路のいずれかにそれぞれ従うことができるが、それ自体は自己再生することができない。したがって、ＡＡＲＳポリペプチドへの曝露に応答した血液成分の変化は、ＡＡＲＳポリペプチドが造血を調節し、造血幹細胞の発生を制御することが可能であることを示す。

【０６０３】

すべての血液細胞は３つの系列、すなわち赤血球細胞、リンパ球および骨髄細胞に分けることができる。

【０６０４】

赤血球細胞は、酸素を運搬する赤血球である。網状赤血球および赤血球はともに機能性であり、血液中に放出される。したがって、網状赤血球数から赤血球生成の速度が推定され、赤血球数の変化は、ＡＡＲＳポリペプチドが赤血球生成を調節することを示す。

【０６０５】

リンパ球は適応免疫系の土台である。リンパ球は共通のリンパ球前駆細胞から生じる。リンパ球系は主としてＴ細胞とＢ細胞（白血球のタイプ）からなる。したがって、ＡＡＲ

Ｓポリペプチドへの曝露に応答した白血球の数または組成の変化は、ＡＡＲＳポリペプチドがリンパ球生成を調節することを示す。

【０６０６】

骨髄細胞には顆粒球、巨核球およびマクロファージがあり、これらは共通の骨髄前駆細胞から生じ、自然免疫、適応免疫および血液凝固を含めた様々な役割に関与する。したがって、ＡＡＲＳポリペプチドへの曝露に応答した骨髄性細胞の数および組成の変化は、ＡＡＲＳポリペプチドが骨髄造血を調節することを示す。同じ原理を用いて、ＡＡＲＳポリペプチドへの曝露に応答した顆粒球数の変化を測定することにより、ＡＡＲＳポリペプチドが顆粒球生成を調節するか否かを確証することができる。血液中の巨核球または血小板の組成または数の変化により、巨核球形成調節におけるＡＡＲＳポリペプチドの役割を推測し得る。

【０６０７】

野生型マウスまたは炎症の各種動物モデル系におけるサイトカイン放出により、ＡＡＲＳポリペプチドが炎症性応答を調節する潜在的な能力の初期評価が得られる。例えば、急性慢性炎症過程におけるＡＡＲＳポリペプチドの役割を、食餌性肥満（ＤＩＯ）のマウスモデルを用いて容易に評価することができる。ＤＩＯモデルは、げっ歯類を高脂肪食で数か月間飼育し、肥満、インスリン抵抗性および免疫系機能不全の増大を引き起こすことを軸としたものある。この免疫系調節不全の具体的な結果として、ＤＩＯ個体における炎症誘発性サイトカインの産生が増加し、慢性全身性炎症の状態が生じる。低悪性度の炎症が、肥満症ならびにヒトでは代謝症候群と呼ばれる状態で見られるものと同じ糖尿病表現型の発達および維持の一因であることを示す証拠が増えている。したがって、ＡＡＲＳポリペプチドが、免疫系を調節し、この慢性炎症状態の分利に向けてホメオスタシスのバランスを回復する能力は、特に限定されないが、代謝性疾患、糖尿病、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満症、ならびに例えば多発性硬化症、血管障害およびアレルギー性障害を含めた様々な自己免疫性の疾患および障害の症状ならびに副次的影響の治療ならびに予防を含め、数多くの疾患および障害において特に有効であろう。

【０６０８】

方法：雄性野生型の対照マウス（Ｃ５７ＢＬ／６）または食餌性肥満マウス（Ｃ５７ＢＬ／６ＮＨｓｄ）をＨａｒｌａｎ社（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）から購入し、個別に飼育する。ＤＩＯマウスには高脂肪食（カタログ番号ＴＤ．０６４１４、カロリー（ｋｃａｌ）の６０％が脂肪）を与え、対照マウスには通常の食餌（カタログ番号２０１８Ｓ－、カロリー（ｋｃａｌ）の１８％が脂肪）を与える。ＤＩＯマウスを６週齢から始めて合計１０週間、高脂肪食で飼育する。ＤＩＯマウスおよび対照マウスはともに、食餌と水分を自由に摂取させる。１６週齢で、マウスを体重別に５個体からなる群に分けて無作為化する。２日目に、マウスの体重を量り、処置前の全血球計算（ＣＢＣ）解析用に尾静脈採血（１０μＬ）を行う。１日目に、マウスの体重を量り、溶媒（ＰＢＳ）または１０ｍｇ／ｋｇの個々のＡＡＲＳポリペプチドを尾静脈から静脈内に注射する。注射の４時間後、後のサイトカイン用にマウスの顔面静脈から採血（１５０－２００μＬ）を行う。２、３および４日目に、１日目と同じようにマウスに静脈内投与を行う。５日目に、体重測定後にマウスを屠殺し、全血球計算（ＣＢＣ解析）（血漿－ＥＤＴＡ）およびサイトカイン試験（血清）用に血液を心臓穿刺により採取する。

【０６０９】

ＣＢＣおよびサイトカイン解析：注射前（－２日目）および最後の注射の２４時間後（５日目）の採血の全血球計算を解析する。ＣＢＣ値を全白血球数および全赤血球形態について評価する。好中球、リンパ、単球、好酸球および好塩基球の全体および部分の百分率により白血球をさらに特徴付ける。赤血球分析には、ヘモグロビン（ｄＬ）、ヘマトクリット値（％）、平均血球体積（ｆＬ）、平均赤血球ヘモグロビン、平均赤血球ヘモグロビン濃度（％）および全血小板数（10^3／μＬ）の測定が含まれる。ＣＢＣ解析はＡｎｔｅｃｈ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ社（Ｆｉｓｈｅｒｓ、ＩＮ）が行う。

【０６１０】

注射の４時間後（１日目）および最後の注射の２４時間後（５日目）に循環サイトカインレベルを調べる。多分析物プロファイリングのために、血清を分離して急速凍結し、Ｒｕｌｅｓ Ｂａｓｅｄ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ社（Ａｕｓｔｉｎ、ＴＸ）に送る。血清試料を、Ａｐｏ Ａ－１、ＣＤ４０、ＣＤ４０－Ｌ、ＣＲＰ、ＥＴ－１、エオタキシン、ＥＧＦ、第ＶＩＩ因子、フィブリノーゲン、ＦＧＦ－９、塩基性ＦＧＦ、ＧＳＴ－α、ＧＣＰ－２、ＧＭ－ＣＳＦ、ＫＣ／ＧＲＯα、ハプトグロビン、ＩｇＡ、ＩＦＮγ、ＩＰ－１０、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２ｐ７０、Ｉｌ－１７Ａ、ＩＬ－１８、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＬＩＦ、リンホタクチン、Ｍ－ＣＳＦ－１、ＭＩＰ－１α、ＭＩＰ－１β、ＭＩＰ－１γ、ＭＩＰ－２、ＭＩＰ－３β、ＭＤＣ、ＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－３、ＭＣＰ－５、ＭＰＯ、ミオグロビン、ＳＡＰ、ＳＧＯＴ、ＳＣＦ、ＲＡＮＴＥＳ、ＴＰＯ、組織因子、ＴＩＭＰ－１、ＴＮＦ－α、ＶＣＡＭ－１、ＶＥＧＦ－ＡおよびｖＷＦを含めた５９の固有のバイオマーカーを含むＲｏｄｅｎｔＭａｐパネルを用いて解析する。サイトカインが、溶媒対照と比べて少なくとも２倍増加するか、または少なくとも５０％減少していれば、サイトカインレベルの変化をヒットとして数えた。

【０６１１】

実施例１

タンパク質トポグラフィーおよび泳動解析プラットフォームを用いたＡＡＲＳＳ由来のタンパク質分解フラグメントおよび選択的スプライシング産物の同定

細胞系、馴化培地および組織のＡＡＲＳフラグメントを同定するために、試料を以下の方法で調製する。

【０６１２】

マウスマクロファージ（ＲＡＷ２６４．７）、細胞質ゾルおよび馴化培地：細胞を１５×10^6細胞／フラスコの密度で無血清ＤＭＥＭ培地により処理する。４８時間後、馴化培地および細胞ペレットを回収して処理する。分泌プロテオームおよび細胞質ゾルプロテオーム画分のタンパク質２００μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、質量分析法による解析用にゲルスライスを調製する。

【０６１３】

マウス膵臓組織：３匹のマウスの膵臓を、プロテアーゼ阻害剤を加えたＰＢＳ中で、刻んで、ｄｏｕｎｃホモジナイザーでホモジナイズし、超音波処理する。細胞質ゾルプロテオームを遠心分離により分離し、タンパク質２００μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、質量分析法による解析用にゲルスライスを調製する。

【０６１４】

マウス肝臓組織：３匹のマウス肝臓を、プロテアーゼ阻害剤を加えたＰＢＳ中で、刻んで、ｄｏｕｎｃホモジナイザーでホモジナイズし、超音波処理する。細胞質ゾルプロテオームを遠心分離により分離し、タンパク質２００μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、質量分析法による解析用にゲルスライスを調製する。

【０６１５】

ｕｌｔｉｍａｔｅ ３０００ μＬＣシステム（Ｄｉｏｎｅｘ）を備えたＬＴＱ ＸＬイオントラップ質量分析器（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）でゲル内消化物を解析する。最初に、Ｄｉｏｎｅｘオートサンプラーを用いて、アセトニトリル５％を含む０．１％ギ酸とともに試料をＰｅｐＴｒａｐ（ｍｉｃｈｒｏｍ）に１０分間負荷する。次いで、１０ｃｍのＣ１８レジン（ｍｉｃｈｒｏｍ）を含んだ１００μｍ（内径）のフューズドシリカキャピラリーカラムで試料を分析する。５～３３．５％のアセトニトリルを含む０．１％ギ酸の直線勾配を１１０分以内に用いて、ペプチドを流速０．４５μｌ／分でカラムから質量分析器へ溶出させる。

【０６１６】

１つのＭＳフルスキャンの後に、最も多く存在する７つのイオンの７つのＭＳ／ＭＳスキャンが続くように、ＬＴＱをデータ依存型のスキャンモードで作動させる。動的排除を、繰り返し回数が１、繰り返し持続時間が２０秒、排除リストのサイズが３００および排

除持続時間が６０秒で有効にする。

【０６１７】

ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ解析の後、ＢｉｏＷｏｒｋｓ３．３．１（ＳＥＱＵＥＳＴ）でマウスＩＰＩデータベースの連結標的／デコイバリアントを用いて、生データを検索する。ＤＴＡＳｅｌｅｃｔでＳＥＱＵＥＳＴデータのフィルター処理および選別を行う。この方法で同定された配列を表１、４および７に示す。

【０６１８】

実施例２

ディープシーケンシングを用いたスプライスバリアントの同定

アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素転写産物に関して濃縮されたｃＤＮＡライブラリーのハイスループットシーケンシングを用いて、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素のスプライスバリアントを同定する。ヒト成人および胎児脳のような組織の全ＲＮＡ抽出物からｃＤＮＡ鋳型を調製し、すべての注釈付きヒトアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素およびその関連タンパク質のすべての注釈付きエクソンに特異的なプライマー配列を用いて、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素転写産物に関して濃縮する。

【０６１９】

ヒト全ＲＮＡをＣｌｏｎｔｅｃｈ社から入手する。細胞系およびマウス組織試料用に、ＲＮＡ　ＥｘｔｒａｃｔＩＩ　Ｋｉｔ（ＭＮ）を用いて全ＲＮＡを抽出する。全ＲＮＡ試料中のゲノムＤＮＡをＤＮＡアーゼＩで消化する。成熟メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を得るために、ｐｏｌｙＡ＋ＲＮＡの結合および５’－リン酸依存性エキソヌクレアーゼによる５’－キャップのないＲＮＡの消化により、ＲＮＡ試料を２回濃縮する。アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素遺伝子のエクソン配列とアニールするプライマーを用いて、成熟ＲＮＡから相補的なＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を合成する。アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素遺伝子に関して濃縮したトランスクリプトームを、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素エクソン特異的ｃＤＮＡおよびアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素エクソンプライマーの様々な組合せを用いた多重ＰＣＲにより増幅する。二本鎖アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素濃縮トランスクリプトームＰＣＲ産物の両端を酵素により修復した後、修復されたフラグメントの３’末端にＡ－オーバーハングを付加する。次いで、Ｉｌｌｕｍｉｎａ社のＭｕｌｔｉｐｌｅｘ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ＫｉｔによりアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素濃縮トランスクリプトームＰＣＲ産物にシーケンシングアダプターおよびインデックス配列を付加して、ディープシーケンシングのためのｃＤＮＡライブラリーを作製する。簡潔に述べれば、３’－Ａオーバーハングを有するアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素濃縮トランスクリプトームＰＣＲ産物を、キット中に含まれるＩｎＰＥアダプターオリゴヌクレオチドと連結する。ＩｎＰＥアダプターを有するＰＣＲ産物にインデックス配列を付加する。ディープシーケンシングに十分なＤＮＡフラグメントを得るために、インデックス配列を有するＰＣＲ産物をＰＣＲでさらに増幅する。様々なインデックスを有するアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素濃縮ｃＤＮＡライブラリーをプールし、Ｉｌｌｕｍｉｎ社のＤＮＡ配列決定機を用いて配列決定し、５０塩基のペアエンドリードを得る。選択的スプライシング事象の同定のために、シーケンシングリードをヒトまたはマウスゲノムにマッピングする。「Ｓｐｌｉｃｅｍａｐ」ソフトウェア（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ－ｓｔａｔ．ｓｔａｎｆｏｒｄ．ｅｄｕ／～ｋｉｎｆａｉ／ＳｐｌｉｃｅＭａｐ／の公開ダウンロードで入手）を用いて、スプライスジャンクションを同定する。

【０６２０】

これらのｃＤＮＡのディープシーケンシングを行って、約1×10^{6}個の約５０ヌクレオチド長のシーケンシングリードを作製する。アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素のエクソンに特異的な配列を注釈付きエクソンジャンクションに対して問い合わせ、新規なエクソンジャンクションを選択的スプライシング事象として同定する。

【０６２１】

表２、５および８の「５’エクソン」および「３’エクソン」が書かれた欄があれば、それはそのエクソンがｃＤＮＡ配列中でともに融合されているということを示す。表２、５

および８は、選択的スプライス事象、このようなスプライス事象を含む転写産物およびこれらの転写産物により発現されたポリペプチドに関して同定された配列を示す。ディープシーケンシングにより同定された選択的スプライスバリアントは、表２、５および８では、ヒト成人または胎児脳の「シーケンシングリード」と書かれた欄に１以上の数が記入されているものと確認される。

【０６２２】

実施例３

バイオインフォマティクスを用いたＡＡＲＳポリペプチドの同定

バイオインフォマティクスを用いてＡＡＲＳタンパク質フラグメント（リセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）またはアペンダクリン（ａｐｐｅｎｄａｃｒｉｎｅ） ペプチド）を同定する。ＦＡＳＴＡ（ウェブサイトｈｔｔｐ：／／ｆａｓｔａ．ｂｉｏｃｈ．ｖｉｒｇｉｎｉａ．ｅｄｕ／ｆａｓｔａ＿ｗｗｗ２／ｆａｓｔａ＿ｗｗｗ．ｃｇｉで入手可能）またはＮＣＢＩのＢＬＡＳＴＰプログラム（ウェブサイトｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｌａｓｔ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ？ＰＲＯＧＲＡＭ＝ｂｌａｓｔｐ＆ＢＬＡＳＴ＿ＰＲＯＧＲＡＭＳ＝ｂｌａｓｔｐ＆ＰＡＧＥ＿ＴＹＰＥ＝ＢｌａｓｔＳｅａｒｃｈ＆ＳＨＯＷ＿ＤＥＦＡＵＬＴＳ＝ｏｎ＆ＬＩＮＫ＿ＬＯＣ＝ｂｌａｓｔｈｏｍで入手可能）のようなプログラムを用いて、完全長ヒトアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素のアミノ酸配列を、細菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）由来のそのオルソログの完全長アミノ酸配列とともに整列させる。ヒトタンパク質由来のリセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）配列を、アライメント中の細菌配列にギャップが存在する領域または２種間の相同性が低い領域をカバーする配列として同定する。表３、６および９のペプチドおよび対応するＤＮＡ配列には、この方法で同定された例が含まれている。

【０６２３】

実施例４

質量分析法によるＡＡＲＳポリペプチドの差次的発現の同定

実施例１に記載されているＰＲＯＴＯＭＡＰ技術を用いて、様々な組織／細胞型におけるバリルｔＲＮＡ合成酵素の差次的発現を比較する（配列および比較に関しては、表１、４および７を参照されたい）。すなわち、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素リセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）の発現を、マウス肝臓組織とマウス膵臓組織との間で比較する。アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素リセクチン（ｒｅｓｅｃｔｉｎ）の発現を、ＲＡＷ２６４．７の細胞質ゾルと血清飢餓の４８時間後にＲＡＷ２６４．７細胞から回収した馴化培地との間で比較する。

【０６２４】

実施例５

ディープシーケンシングによるＡＡＲＳポリペプチドの差次的発現の同定

スプライス事象の差次的発現を試験するために、様々な組織から調製したｃＤＮＡに対してディープシーケンシングを行う。

【０６２５】

アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素に特異的な選択的スプライス事象の発現は予想外のことであり、かつ生物学的重要性を示している。様々なトランスクリプトーム試料のディープシーケンシングで見られるリードの相対数のばらつきは、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素の選択的スプライス事象が特異的に制御されるものであり、試料処理に起因する単なるアーチファクトではないということを示している。

【０６２６】

実施例６

抗体スクリーニング

特定のアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素フラグメントとの選択的結合（例えば、親完全長酵素と比べて親和性が１０倍以上高い）を示す抗体の発見を容易にするために、ヒト抗体ファージディスプレイライブラリーを、アフィニティー濃縮技術（パニング）を用いてＡｂＤ Ｓｅｒｏｔｅｃ社（ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ（商標）社、Ｍａｒｔｉｎｓｒｉｅｄ／Ｐ

ｌａｎｅｇｇ、Ｇｅｒｍａｎｙの一部門）でスクリーニングする。アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素フラグメントによる複数ラウンドのスクリーニング後に濃縮された抗体を、次いで、フラグメントおよび親完全長酵素に対する反応性に関してＥＬＩＳＡにより特徴付ける。アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素フラグメントとの選択的結合（例えば、１０倍以上高い親和性）を示すクローンをさらに特徴付ける。

【０６２７】

必要な特異性がこの工程の終了時に得られない場合、完全長酵素による予備吸着段階および／またはカウンタースクリーニングのようなサブトラクション法を用いて、交差反応抗体を排除し、選択工程をアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素フラグメント上の固有のエピトープ（１つまたは複数）に向けて進める。

【０６２８】

実施例７

体系的なＰＣＲを用いたスプライスバリアントの同定

組織または細胞（例えば、ヒト脳、ＩＭＲ－３２およびＨＥＫ２９３Ｔ）の全ＲＮＡ抽出物からＰＣＲ反応用のｃＤＮＡ鋳型を逆転写する。遺伝子の５’非翻訳領域または５’側半分のエクソンとアニールするように設計された順方向プライマー（ＦＰ１）と、遺伝子の３’側半分のエクソンまたは３’ＵＴＲとアニールするように設計された逆方向プライマー（ＲＰ１）とをペアにしたアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素特異的プライマーを用いて、ＰＣＲ反応を行う。増幅されたＤＮＡ産物をアガロースゲル電気泳動により解析して、カノニカルな転写産物から増幅されたフラグメントと大きさの異なるＰＣＲ産物を同定する。これらの異なるＰＣＲ産物を切り取ってゲルから単離し、標準的なＤＮＡ配列解析用のベクター内に連結する。カノニカルな転写産物とは異なる配列として選択的スプライシングバリアントを同定する。この体系的なＰＣＲ法により同定されたスプライスバリアントを、表２、５および８に示す。

【０６２９】

実施例８

選択されたＡＡＲＳポリヌクレオチドのコドン最適化

さらなる生化学的、生物物理学的および機能的特徴付けのために、典型的なＡＡＲＳポリペプチド（表Ｅ２にまとめてある）を以下の１つ以上の基準に基づいて選択する：ｉ）ＡＡＲＳポリペプチドタンパク質分解フラグメントの同定、ｉｉ）ＡＡＲＳポリペプチドスプライスバリアントの同定、ｉｉｉ）バイオインフォマティック解析によるＡＡＲＳポリペプチドの同定、ｉｖ）特定のＡＡＲＳポリペプチドの差次的発現の証拠、ｖ）ＡＡＲＳタンパク質のドメイン構造、ｖｉ）ＡＡＲＳポリペプチドの大きさ、およびｖｉｉ）同様の重複した配列の最小化。

【０６３０】

【表Ｅ２－１】

表 E2
コドン最適化および細菌発現用に選択されたＡＡＲＳポリペプチドのまとめ

ＡＡＲＳポリペプチドの名称	エピトープタグ化ＡＡＲＳポリペプチドの配列番号	ＡＡＲＳポリヌクレオチドの配列番号	ＡＡＲＳタンパク質の残基	エピトープタグの位置	使用したクローニング／合成の方法
$ValRS1^{N2}$	配列番号．80	配列番号．98	1-230	Ｎ末端	1
$ValRS1^{N2}$	配列番号．81	配列番号．98	1-230	Ｃ末端	1
$ValRS1^{N3}$	配列番号．82	配列番号．99	1-300	Ｎ末端	2
$ValRS1^{N3}$	配列番号．83	配列番号．99	1-300	Ｃ末端	2
$ValRS1^{N4}$	配列番号．84	配列番号．100	1-129 + 21 aa	Ｎ末端	1
$ValRS1^{N4}$	配列番号．85	配列番号．100	1-129 + 21 aa	Ｃ末端	1

【表Ｅ２－２】

表 E2
コドン最適化および細菌発現用に選択されたＡＡＲＳポリペプチドのまとめ

ＡＡＲＳポリペプチドの名称	エピトープタグ化ＡＡＲＳポリペプチドの配列番号	ＡＡＲＳポリヌクレオチドの配列番号	ＡＡＲＳタンパク質の残基	エピトープタグの位置	使用したクローニング／合成の方法
$ValRS1^{N5}$	配列番号．86	配列番号．101	1-221 + 24 aa	Ｎ末端	2
$ValRS1^{N5}$	配列番号．87	配列番号．101	1-221 + 24 aa	Ｃ末端	2
$ValRS1^{N10}$	配列番号．88	配列番号．102	1-525 + 25 aa	Ｎ末端	2
$ValRS1^{N10}$	配列番号．89	配列番号．102	1-525 + 25 aa	Ｃ末端	2
$ValRS1^{N11}$	配列番号．90	配列番号．103	1-214	Ｎ末端	1
$ValRS1^{N11}$	配列番号．91	配列番号．103	1-214	Ｃ末端	1
$ValRS1^{N12}$	配列番号．92	配列番号．104	1-229	Ｎ末端	1
$ValRS1^{N12}$	配列番号．93	配列番号．104	1-229	Ｃ末端	1
$ValRS1^{N13}$	配列番号．94	配列番号．105	1-129 + 32 aa	Ｎ末端	2
$ValRS1^{N13}$	配列番号．95	配列番号．105	1-129 + 32 aa	Ｃ末端	2
$ValRS1^{N12}$	配列番号．96	配列番号．106	1-229	Ｎ末端	2
$ValRS1^{N12}$	配列番号．97	配列番号．106	1-229	Ｃ末端	2
$ValRS1^{C1}$	配列番号．204	配列番号．222	875-1264	Ｎ末端	1
$ValRS1^{C1}$	配列番号．205	配列番号．222	875-1264	Ｃ末端	1
$ValRS1^{C2}$	配列番号．206	配列番号．223	896-1264	Ｎ末端	1
$ValRS1^{C2}$	配列番号．207	配列番号．223	896-1264	Ｃ末端	1
$ValRS1^{C4}$	配列番号．208	配列番号．224	940-1264	Ｎ末端	1
$ValRS1^{C4}$	配列番号．209	配列番号．224	940-1264	Ｃ末端	1
$ValRS1^{C5}$	配列番号．210	配列番号．225	930-1264	Ｎ末端	2
$ValRS1^{C5}$	配列番号．211	配列番号．225	930-1264	Ｃ末端	2
$ValRS1^{C7}$	配列番号．212	配列番号．226	1-129 + 976-1264	Ｎ末端	1
$ValRS1^{C7}$	配列番号．213	配列番号．226	1-129 + 976-1264	Ｃ末端	1
$ValRS1^{C10}$	配列番号．214	配列番号．227	833-1264	Ｎ末端	2
$ValRS1^{C10}$	配列番号．215	配列番号．227	833-1264	Ｃ末端	2
$ValRS1^{C11}$	配列番号．216	配列番号．228	24 aa + 849-1264	Ｎ末端	1
$ValRS1^{C11}$	配列番号．217	配列番号．228	24 aa + 849-1264	Ｃ末端	1
$ValRS1^{C12}$	配列番号．218	配列番号．229	24 aa + 807-1264	Ｎ末端	2

【表Ｅ２－３】

表 E2
コドン最適化および細菌発現用に選択されたＡＡＲＳポリペプチドのまとめ

ＡＡＲＳポリペプチドの名称	エピトープタグ化ＡＡＲＳポリペプチドの配列番号	ＡＡＲＳポリヌクレオチドの配列番号	ＡＡＲＳタンパク質の残基	エピトープタグの位置	使用したクローニング／合成の方法
$ValRS1^{C12}$	配列番号．219	配列番号．229	24 aa + 807-1264	Ｃ末端	2
$ValRS1^{C20}$	配列番号．220	配列番号．230	1064-1264	Ｎ末端	2
$ValRS1^{C20}$	配列番号．221	配列番号．230	1064-1264	Ｃ末端	2

【０６３１】

表Ｅ２に記載の選択されたＡＡＲＳポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、表Ｅ２に記載の遺伝子合成法を用いて、一般的な材料および方法の節に記載されている通りに、適当なＮ末端またはＣ末端エピトープタグとともに合成およびクローニングする。

【０６３２】

実施例９

小規模な細菌発現および精製

表Ｅ２に記載のＡＡＲＳポリペプチドを、一般的な材料および方法の節に記載されている通りに大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）内で発現させる。可溶性および封入体局在性のＡＡＲＳポリペプチドの相対的発現を下の表Ｅ３にまとめる。

【０６３３】

【表Ｅ３－１】

表 E3
ＡＡＲＳポリペプチドの細菌発現の特徴のまとめ

ＡＡＲＳポリペプチド	エピトープタグの位置	可溶性画分から回収されたタンパク質の量	封入体から回収されたタンパク質の量	封入体内での相対的発現
$ValRS1^{N2}$	Ｎ末端	+	+	L
$ValRS1^{N2}$	Ｃ末端	+	+	L
$ValRS1^{N3}$	Ｎ末端	+	++	M
$ValRS1^{N3}$	Ｃ末端	+	+	L
$ValRS1^{N4}$	Ｎ末端	+	+	M
$ValRS1^{N4}$	Ｃ末端	+	+	L
$ValRS1^{N5}$	Ｎ末端	+	+	ND
$ValRS1^{N5}$	Ｃ末端	+	+	ND
$ValRS1^{N10}$	Ｎ末端	+	+	H
$ValRS1^{N10}$	Ｃ末端	+	+	H
$ValRS1^{N11}$	Ｎ末端	+	+	H
$ValRS1^{N11}$	Ｃ末端	+	+	H
$ValRS1^{N12}$	Ｎ末端	+	+	ND
$ValRS1^{N12}$	Ｃ末端	++	+	ND
$ValRS1^{N13}$	Ｎ末端	+	+	ND
$ValRS1^{N13}$	Ｃ末端	+	+	ND
$ValRS1^{C1}$	Ｎ末端	+	+	ND

【表Ｅ３－２】

表 E3
ＡＡＲＳポリペプチドの細菌発現の特徴のまとめ

ＡＡＲＳポリペプチド	エピトープタグの位置	可溶性画分から回収されたタンパク質の量	封入体から回収されたタンパク質の量	封入体内での相対的発現
$ValRS1^{C1}$	Ｃ末端	＋	＋	ND
$ValRS1^{C2}$	Ｎ末端	＋	＋	Ｌ
$ValRS1^{C2}$	Ｃ末端	＋	＋	Ｌ
$ValRS1^{C4}$	Ｎ末端	＋	＋	Ｍ
$ValRS1^{C4}$	Ｃ末端	＋	＋	Ｍ
$ValRS1^{C5}$	Ｎ末端	＋	＋	ND
$ValRS1^{C5}$	Ｃ末端	＋	＋	ND
$ValRS1^{C6}$	Ｎ末端	＋	＋	ND
$ValRS1^{C6}$	Ｃ末端	＋	＋	ND
$ValRS1^{C7}$	Ｎ末端	＋	＋	ND
$ValRS1^{C7}$	Ｃ末端	＋	＋	ND
$ValRS1^{C10}$	Ｎ末端	＋	＋	Ｍ
$ValRS1^{C10}$	Ｃ末端	＋	＋	Ｍ
$ValRS1^{C11}$	Ｎ末端	＋	＋	ND
$ValRS1^{C11}$	Ｃ末端	＋	＋	ND
$ValRS1^{C12}$	Ｎ末端	＋	＋	Ｍ
$ValRS1^{C12}$	Ｃ末端	＋	＋	Ｌ
$ValRS1^{C20}$	Ｎ末端	＋	＋＋	Ｌ
$ValRS1^{C20}$	Ｃ末端	＋	＋	Ｍ
「＋」　０～１ｍｇ／ＬのＡＡＲＳポリペプチド発現を表す； 「＋＋」　１～５ｍｇ／ＬのＡＡＲＳポリペプチド発現を表す； 「＋＋＋」　５～１０ｍｇ／ＬのＡＡＲＳポリペプチド発現を表す； 「＋＋＋＋」　１０～１５ｍｇ／ＬのＡＡＲＳポリペプチド発現を表す； 「＋＋＋＋＋」　１５ｍｇ／Ｌ以上のＡＡＲＳポリペプチド発現を表す；				
ＮＤ：検出されず Ｌ：未検出～低発現レベル Ｍ：中程度の発現レベル Ｈ：高度の発現レベル				

【０６３４】

驚くべきことに、タンパク質発現データは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）での発現で可溶性タンパク質の高レベルな発現を示すタンパク質ドメインが少なくとも一つ存在することを示している。具体的には、データは、ＡＡＲＳポリペプチド$ValRS1^{N12}$（アミノ酸１～２２９）により、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で高度に発現される新規なタンパク質ドメインの境界が定められることを示している。

【０６３５】

実施例１０

大規模なＡＡＲＳポリペプチド産生

さらなる機能的および生物物理学的特徴付けを可能にするために、典型的なＡＡＲＳポリペプチドを大量に調製する。表Ｅ４に記載のＡＡＲＳポリペプチドを、一般的な材料お

よび方法の節に記載されている通りに大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）内で発現させる。発現された各可溶性タンパク質の収量および生物物理学的特性を下の表Ｅ４にまとめる。

【０６３６】

【表Ｅ４】

表 E4
典型的なＡＡＲＳポリペプチドの収量および生物物理学的特性のまとめ

ＡＡＲＳポリペプチド	エピトープタグの位置	収量[mg/L]（1）	純度[%]	エンドトキシン[EU/mg]	分子量	ワーキングストック濃度[mg/ml]	安定性［回収のパーセント］（2）	凝集[DLS]
$ValRS1^{N12}$	Ｃ末端	0.7	70	3.6	ND	2.36	ND	ND
$ValRS1^{C20}$	Ｃ末端	0.3	99	0.0	ND	2.51	ND	ND

註
（１）：最後の精製段階後のタンパク質回収量の測定により決定された収量
（２）：２５℃で１週間後の非凝集物質の回収のパーセントとして決定
（３）：最後のＡｍｉｃｏｎ濃縮段階後に測定
（４）：Ｎ末端メチオニンを含まないMWを現すと思われる
Ｃ：計算値
Ｄ：測定値

記号：
ND:検出されず

【０６３７】

これらの実験の結果から、ＡＡＲＳタンパク質のＶａｌＲＳ１^{Ｎ１２}およびＶａｌＲＳ１^{Ｃ２０}ファミリーの典型的なＡＡＲＳタンパク質が初期の妥当なタンパク質発現収量および溶解性を示すことが確証される。

【０６３８】

実施例１１

典型的なＡＡＲＳポリペプチドの転写プロファイリング

ＡＡＲＳポリペプチドが遺伝子発現を調節する能力を試験するために、選択されたＡＡＲＳポリペプチドを間葉系幹細胞またはヒト骨格筋細胞とともに、表Ｅ５に示される時間および濃度でインキュベートした。

【０６３９】

【表Ｅ５】

表 E5
間葉系幹細胞（ＭＳＣ）またはヒト骨格筋細胞（ＨＳｋＭＣ）における典型的なＡＡＲＳポリペプチドの転写プロファイリング

試験試料の種類		細胞型および曝露時間				
ＡＡＲＳポリペプチド	エピトープタグの位置	濃度 nM	MSC 24 時間	MSC 72 時間	HSkMC 24 時間	HSkMC 72 時間
$ValRS1^{N2}$	Ｎ末端	250	4	**6**	4	**10**
$ValRS1^{N11}$	Ｃ末端	250	1	2	5	7
$ValRS1^{N12}$	Ｃ末端	128	2	4	5	**9**
$ValRS1^{C4}$	Ｎ末端	250	**6**	**6**	6	1
$ValRS1^{C20}$	Ｎ末端	250	1	3	6	4
$ValRS1^{C20}$	Ｃ末端	14	**6**	4	**8**	1
対照						
スクリーニングした全ＡＡＲＳポリペプチドの平均			3	5	6	7
骨形成カクテル			17	20	11	16
軟骨形成カクテル			17	19	14	19
脂肪生成カクテル			19	15	16	18
SKMC Pos Ctrl			11	8	5	4
未処置			0	0	1	1

【０６４０】

表Ｅ５において、各カラム内の数値は、一般的方法の節に記載されているように対照遺伝子に比べて正または負に少なくとも４倍調節された試料の数を表す。試験した特定の形態のＡＡＲＳポリペプチドが、間葉系幹細胞（ＭＳＣ）および／またはヒト骨格筋細胞（ＨＳｋＭＣ）に添加すると転写を調節する驚くべき能力を有し、したがって発生運命または分化状態を調節する可能性があることをデータは示している。表中の数字が太字の網掛けセルは、ＡＡＲＳポリペプチドが、表中に示される細胞系および時間で遺伝子転写の調節に対して有意な影響を示す例を表す。

【０６４１】

$ValRS1^{N2}$、$ValRS1^{N12}$、$ValRS1^{C4}$および$ValRS1^{C20}$は、間葉系幹細胞および／またはヒト骨格筋細胞遺伝子発現の主要な調節因子であるらしいと結論付けられる。

【０６４２】

実施例１２

ＡＡＲＳポリペプチドの機能プロファイリング

ＡＡＲＳポリペプチドが表現型の過程の範囲を調節する能力を試験するために、選択されたＡＡＲＳポリペプチドを、一般的方法の節ならびに表Ｅ５およびＥ６に記載されている細胞型および条件を用いてインキュベートした。

【０６４３】

【表Ｅ６－１】

表Ｅ６

アッセイおよびヒットを示す基準の鍵

増殖アッセイ	
入手源および細胞型	アッセイ番号
ヒト巨核球性白血病細胞／Ｍｏ７ｅ	Ａ１
ヒト急性前骨髄球性白血病細胞／ＨＬ６０	Ａ２
ヒトリンパ芽球（癌細胞系列）／ＲＰＭＩ８２２６	Ａ３
ヒト間葉系幹細胞／ｈＭＳＣ	Ａ４

【表Ｅ６－２】

表Ｅ６ アッセイおよびヒットを示す基準の鍵	
ヒトアストロサイト	Ａ５
ヒト骨髄吸引細胞／骨骨髄細胞	Ａ６
ヒト骨髄吸引細胞／骨骨髄細胞（長期培養）	Ａ７
ヒト滑膜細胞／ＨＦＬＳ－ＳｙｎＲＡ	Ａ８
ヒト脂肪前駆細胞／ｈＰＡＤ	Ａ９
ヒト肺動脈平滑筋細胞／ｈＰＡＳＭＣ	Ａ１０
ヒト骨格筋細胞／ｈＳＫＭＣ	Ａ１１
アッセイウェルの数値をアッセイプレートの平均ＰＢＳ値で割ることにより、増殖アッセイのデータを解析した。ＰＢＳ値から正の方向に３ＳＤよりも離れていれば、ＡＡＲＳポリペプチドを増殖性であるとした。ＰＢＳ値から負の方向に３ＳＤよりも離れていれば、ＡＡＲＳポリペプチド由来のｔＲＮＡ合成酵素を細胞傷害性であるとした。ネガティブ対照として細胞傷害性化合物を使用し、これらの平均値は常にＰＢＳ値から３ＳＤよりも離れていた。	
細胞分化および表現型のアッセイ	
アッセイの種類	アッセイ番号
ヒト肝細胞（ＨｅｐＧ２Ｃ３ａ細胞）のアセチル化ＬＤＬ取込み	Ｂ１
アッセイウェルの数値をアッセイプレートの平均ＰＢＳ値で割ることにより、ａｃ－ＬＤＬ取込みアッセイのデータを解析した。ＰＢＳ値から正または負の方向に２ＳＤよりも離れていれば、ＡＡＲＳポリペプチドをａｃ－ＬＤＬ取込みの調節物質であるとした。蛍光顕微鏡を用いて、プレートリーダーの結果を確認するための肉眼検査を行った。	
ヒト好中球アッセイ	
アッセイの種類	アッセイ番号
好中球エラスターゼ	Ｃ１
好中球酸化バースト（アゴニスト）	Ｃ２
好中球酸化バースト（アンタゴニスト）	Ｃ３
アッセイウェルの数値をアッセイプレートの平均ＰＢＳ値で割ることにより、好中球アッセイのデータを解析した。ＰＢＳ値から正または負の方向に２ＳＤよりも離れていれば、ＡＡＲＳポリペプチドを好中球のエラスターゼ産生または酸化バースト生物学の調節物質である。	
Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）の調節	
アッセイの種類	アッセイ番号
ＲＡＷ　ＢＬＵＥ細胞におけるＴＬＲ活性化	Ｄ１
ＲＡＷ　ＢＬＵＥ細胞におけるＴＬＲ拮抗作用	Ｄ２
ｈＴＬＲ２の活性化	Ｄ３
ｈＴＬＲ４の活性化	Ｄ４
アッセイウェルの数値をアッセイプレートの平均ＰＢＳ値で割ることにより、ＴＬＲ調節アッセイのデータを解析した。ＰＢＳ値から正または負の方向に３ＳＤよりも離れていれば、ＡＡＲＳポリペプチドをＴＬＲ特異	

【表Ｅ６－３】

表Ｅ６

アッセイおよびヒットを示す基準の鍵

的生物学の調節物質であるとした。ＬＰＳおよび検出試薬を含む陽性対照は常に有意に異なっており、ＰＢＳ平均値から３ＳＤよりも離れていた。

サイトカイン放出

アッセイの種類	アッセイ番号
ヒト滑膜細胞サイトカイン産生（ＩＬ６放出）	Ｅ１
ヒト肺動脈平滑筋細胞（ｈＰＡＳＭＣ）サイトカイン産生（ＩＬ６放出）	Ｅ２
ヒト骨格筋細胞（ｈＳＫＭＣ）サイトカイン産生（ＩＬ６放出）	Ｅ３
ヒトアストロサイトサイトカイン産生（ＩＬ６放出）	Ｅ４
全血ＩＬ６放出	Ｅ５
ヒト肺動脈平滑筋細胞（ｈＰＡＳＭＣ）サイトカイン産生（ＩＬ８放出）７２時間インキュベーション	Ｅ６

ＩＬ８産生

アッセイの種類	アッセイ番号
ヒト滑膜細胞サイトカイン産生（ＩＬ８放出）	Ｅ７
ヒト肺動脈平滑筋細胞（ｈＰＡＳＭＣ）サイトカイン産生（ＩＬ８放出）	Ｅ８
ヒト骨格筋細胞（ｈＳＫＭＣ）サイトカイン産生（ＩＬ８放出）	Ｅ９
ヒトアストロサイトサイトカイン産生（ＩＬ８放出）	Ｅ１０
ヒト肝細胞（ＨｅｐＧ２Ｃ３ａ細胞）ＩＬ８放出	Ｅ１１
ヒト急性前骨髄球性白血病細胞／ＨＬ６０（ＩＬ８放出）	Ｅ１２
ヒトリンパ芽球（癌細胞系列）／ＲＰＭＩ８２２６（ＩＬ８放出）	Ｅ１３

ＴＮＦアルファ産生

ヒト滑膜細胞サイトカイン産生（ＴＮＦアルファ放出）	Ｅ１４
全血ＴＮＦアルファ放出	Ｅ１５

ＩＬ１０放出

ヒト急性前骨髄球性白血細胞／ＨＬ６０のＩＬ１０放出	Ｅ１６
ヒト初代血液単核細胞（ＩＬ１０放出）	Ｅ１７

アッセイウェルの数値をアッセイプレートの平均ＰＢＳ値で割ることにより、サイトカイン放出アッセイのデータを解析した。測定値がＰＢＳ値から正または負の方向に２ＳＤよりも離れていれば、ＡＡＲＳポリペプチドをサイトカイン生成またはサイトカイン関連生物学の調節物質であるとした。タンパク質標準品（各アッセイキットに固有）をプレートごとに実行して、良好なアッセイの質を確保した。タンパク質検量線のR^2値が０．９を上回ったアッセイのみをデータ解析用に選択した。

【表Ｅ６－４】

表Ｅ６

アッセイおよびヒットを示す基準の鍵

細胞接着および走化性

アッセイの種類	アッセイ番号
単球ＴＨＰ１／ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）の細胞接着	Ｆ１
ヒト肝細胞（ＨｅｐＧ２Ｃ３ａ細胞）（ＩＣＡＭ放出）	Ｆ２
ヒト肺微小血管内皮細胞（ＨＬＭＶＥＣ）の細胞接着調節（ＩＣＡＭ放出）	Ｆ３
ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）の細胞接着調節（ＶＣＡＭ放出）	Ｆ４
ヒト間葉系幹細胞（ｈＭＳＣ）の細胞接着調節（ＶＣＡＭ放出）	Ｆ５
ヒト骨格筋細胞（ｈＳＫＭＣ）の細胞接着調節（ＶＣＡＭ放出）	Ｆ６
ヒト肺動脈平滑筋細胞（ｈＰＡＳＭＣ）の細胞接着調節（ＶＣＡＭ放出）	Ｆ７

アッセイウェルの数値をアッセイプレートの平均ＰＢＳ値で割ることにより、細胞接着調節アッセイのデータを解析した。測定値がＰＢＳ値から正または負の方向に２ＳＤよりも離れていれば、ＡＡＲＳポリペプチドを細胞接着または細胞接着関連の生物学の調節物質であるとした。ＥＬＩＳＡアッセイの場合、タンパク質標準品（各アッセイキットに固有）をプレートごとに実行して、良好なアッセイの質を確保した。タンパク質検量線のR^2値が０．９を上回ったアッセイのみをデータ解析用に選択した。

細胞分化

アッセイの種類	アッセイ番号
ヒト前脂肪細胞（ｈＰＡＤ）細胞分化	Ｇ１
ヒト骨格筋（ｈＳＫＭＣ）細胞分化	Ｇ２
ヒト間葉系幹（ｈＭＳＣ）細胞分化	Ｇ３
ヒト肺動脈平滑筋細胞（ｈＰＡＳＭＣ）分化	Ｇ４

アッセイウェルの数値をアッセイプレートの平均ＰＢＳ値で割ることにより、細胞分化アッセイのデータを解析した。方法の節に記載されているように、分化アッセイを特異的抗体の蛍光強度に基づいて採点した。測定値がＰＢＳ値から正または負の方向に２ＳＤよりも離れていれば、ＡＡＲＳポリペプチドを細胞分化の調節物質であるとした。ｈＳＫＭＣ解析では、全ウェルのデジタル写真を撮影して、４ポイント採点方式を用いた盲検式での３人による写真の採点を行い、ここでは４が強度の骨格筋アクチン染色および明白な筋管形成を示すものとした。目視採点の平均値を使用し、平均値が３を上回るウェルのみをヒットとした。このアッセイでは通常、分化制御処置ウェルの点数は２を上回り、ＰＢＳ処置ウェルの点数は２未満であった。

【表Ｅ６－５】

表Ｅ６ アッセイおよびヒットを示す基準の鍵	
細胞結合	
アッセイの種類	アッセイ番号
ＰＢＭＣ	Ｈ１
一次Ｔ細胞	Ｈ２
一次Ｂ細胞	Ｈ３
一次単球	Ｈ４
ＨｅｐＧ２	Ｈ５
３Ｔ３Ｌ１	Ｈ６
Ｃ２Ｃ１２	Ｈ７
ＴＨＰ１	Ｈ８
Ｊｕｒｋａｔ	Ｈ９
Ｒａｊｉ	Ｈ１０
細胞結合蛍光強度の平均がその細胞系の試薬対照の平均から２ＳＤよりも離れていれば、ＡＡＲＳポリペプチドが特定の細胞型と結合するものとした。	

【０６４４】

【表Ｅ７】

表 E7 典型的なＡＡＲＳポリペプチドの機能プロファイリング実験の結果			
ＡＡＲＳポリペプチド	エピトープタグの位置	濃度[nM]	アッセイヒット
$ValRS1^{N2}$	Ｎ末端	250	C2 （好中球活性化） E4 （サイトカイン放出）
$ValRS1^{N3}$	Ｎ末端	250	C2 （好中球活性化）
$ValRS1^{N11}$	Ｃ末端	250	C2 （好中球活性化）
$ValRS1^{N12}$	Ｃ末端	128	E10 （サイトカイン放出） F5 （細胞接着および走化性）
$ValRS1^{C4}$	Ｎ末端	250	C2 （好中球活性化） F5（細胞接着および走化性）
$ValRS1^{C20}$	Ｎ末端	250	
$ValRS1^{C20}$	Ｃ末端	14	D2 （Ｔｏｌｌ様受容体の調節） E4 （サイトカイン放出） F5 （細胞接着および走化性）

【０６４５】

ＶａｌＲＳ１^{Ｎ２}、ＶａｌＲＳ１^{Ｎ３}、ＶａｌＲＳ１^{Ｎ１１}、ＶａｌＲＳ１^{Ｎ１２}、ＶａｌＲＳ１^{Ｃ４}およびＣｙｓＲＳ１^{Ｃ２０}はサイトカイン放出、好中球の活性化、細胞接着および走化性の主要な調節因子であり、またおそらくＴｏｌｌ様受容体の調節因子であろうと結論付けられる。ＶａｌＲＳ１^{ｃ２０}の場合、Ｃ末端融合タンパク質（しかし、Ｎ末端融合タンパク質ではない）は、転写プロファイリング実験および表現型スクリーニング試験の両方において、高度に活性であったことに注意されたい。このデータは、ＡＡＲＳポリペプチドが完全なｔＲＮＡ合成酵素の一部であるか、または、翻訳的にそのＮ末端において他のタンパク質に融合しているとき、新規の生物学的活性が抑制される場合、Ｖ

ａｌＲＳｌ^{c20}が、ＡＡＲＳポリペプチドの一例を表すが、この生物学的活性は、ＡＡＲＳポリペプチドが遊離アミノ末端を有するときに明らかになるという仮設に一致している。

【０６４６】

転写プロファイリング実験の文脈で見た場合、表現型スクリーニングデータは、ＡＡＲＳポリペプチドＶａｌＳｌ^{N2}（アミノ酸１～２３０）、ＶａｌＲＳｌ^{N3}（アミノ酸１～３００）、ＶａｌＲＳｌ^{N11}（アミノ酸１～２１４）、およびＶａｌＲＳｌ^{N12}（アミノ酸１～２２９）は、表現型スクリーニングアッセイの広範な配列において高度に活性であり、好中球の活性化およびサイトカイン放出に関して特に活性である、第１の新規のタンパク質ドメインの境界を画定することを実証している。

【０６４７】

従って、バリルｔＲＮＡ合成酵素のアミノ酸１～３００を含むＡＡＲＳポリペプチドは、第１の新規の高度に活性なＡＡＲＳポリペプチドドメインのおおよその境界（即ち、約＋／－５アミノ酸）を画定し、つまり、ｉ）高度に機能的に活性であり、ｉｉ）容易に作られ、且つ、大腸菌内で生成することができ、ｉｉｉ）有利なタンパク質の安定性と凝集性を示すことが結論付けられる。当業者は、バリルｔＲＮＡ合成酵素の第１の２１４アミノ酸と同じ程度に少ないアミノ酸から、バリルｔＲＮＡ合成酵素の第１の３００アミノ酸を含むポリペプチドと同じ程度に多いアミノ酸までを含む任意のＡＡＲＳポリペプチドは、所望の特定のＡＡＲＳポリペプチドの機能的等価物を表すことを理解するであろう。

【０６４８】

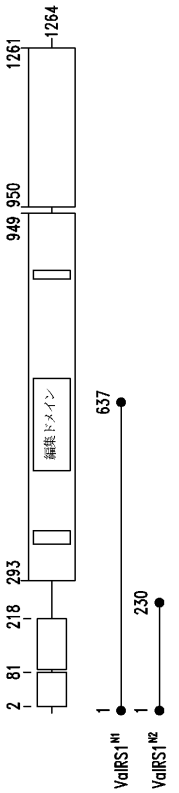
表現型スクリーニングデータはまた、ＡＡＲＳポリペプチドＶａｌＲＳｌ^{c4}（アミノ酸９４０～１２６４）、およびＶａｌＲＳｌ^{c20}（アミノ酸１０６４～１２６４）が、表現型スクリーニングアッセイの広範な配列において高度に活性である第２の新規のタンパク質ドメインの境界を画定することを実証している。従って、バリルｔＲＮＡ合成酵素のアミノ酸９４０～１２６４を含むＡＡＲＳポリペプチドは、第２の新規で高度に活性のＡＡＲＳポリペプチドドメインのおおよその境界（即ち、＋／－５アミノ酸）を画定すること、つまり、ｉ）高度に機能的に活性であり、ｉｉ）容易に作られ、且つ、大腸菌内で生成することができ、ｉｉｉ）有利なタンパク質の安定性と凝集性を示すことが結論付けられる。

【０６４９】

当業者は、バリルｔＲＮＡ合成酵素のアミノ酸１０６４～１２６４と同じ程度に少ないアミノ酸から、バリルｔＲＮＡのアミノ酸９４０～１１２６４を含むポリペプチドと同じ程度に多いアミノ酸までを含む任意のＡＡＲＳポリペプチドは、所望の特定のＡＡＲＳポリペプチドの機能的等価物を表すことを理解するであろう。

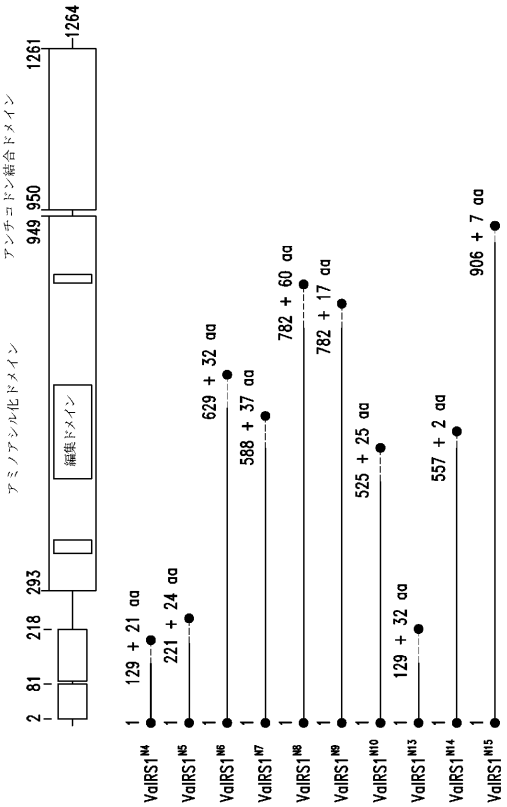
【図１Ａ】

【図１Ａ】



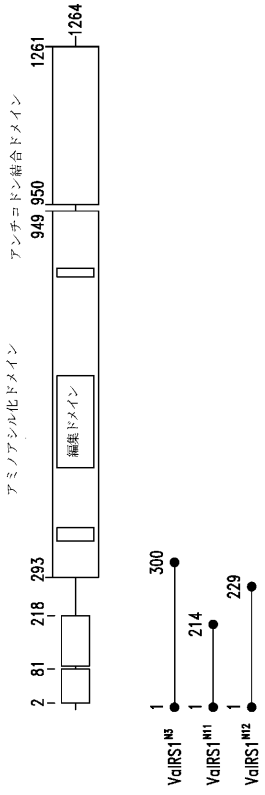
【図１Ｂ】

【図１Ｂ】



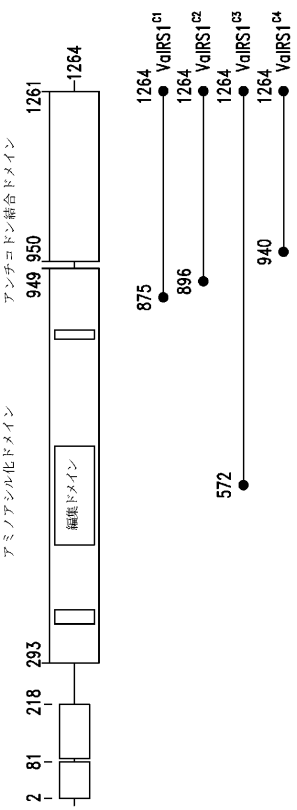
【図１Ｃ】

【図１Ｃ】

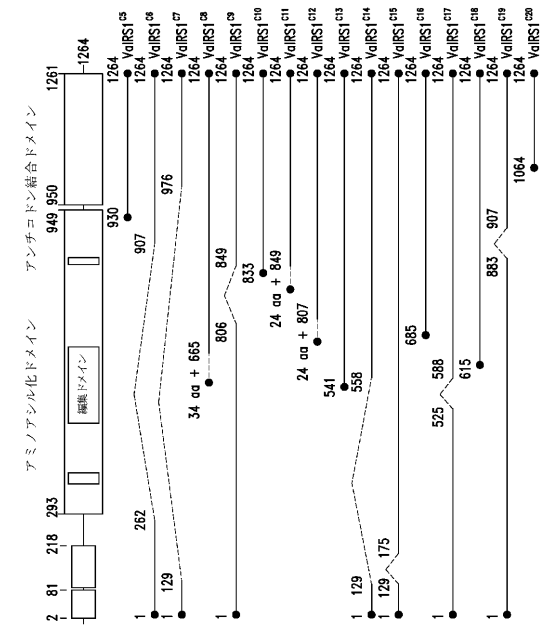


【図２Ａ】

【図２Ａ】



【図２Ｂ】



【配列表】

0005991963000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
C12Q 1/68	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A
A61K 31/711	*(2006.01)*	A61K	31/711	
A61K 38/00	*(2006.01)*	A61K	37/02	
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	N
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61K	45/00	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P	29/00	
A61P 37/06	*(2006.01)*	A61P	37/06	
A61P 31/00	*(2006.01)*	A61P	31/00	
A61P 3/00	*(2006.01)*	A61P	3/00	
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	25/00	
A61P 9/00	*(2006.01)*	A61P	9/00	
A61P 21/00	*(2006.01)*	A61P	21/00	
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K	48/00	
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61P	3/10	
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/53	D

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 グリーン, レスリー アン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２９, サンディエゴ, デイブンポート アベニュー １３９４１
(72)発明者 チャン, カイル ピー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１０３, サンディエゴ, トーランス ストリート ９４３, アパートメント ６
(72)発明者 ホン, フェイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２２, サンディエゴ, カミニート ディア ７９７９, ナンバー２
(72)発明者 バサロット, アレイン ピー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２００９, カールズバッド, ラ パロマ ストリート ６４２１
(72)発明者 ロー, ウィンーセー
中華人民共和国 香港, チャイ ワン, シュウ サイ ワン エステイト, シュウ ミン ハウス, ルーム ８１５
(72)発明者 ワトキンス, ジェフリー ディー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０２４, エンシニタス, フォーチュナ ランチ ロード ３４４２
(72)発明者 メンドレイン, ジョン ディー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０２４, エンシニタス, ネプチューン アベニュー １５５０
(72)発明者 クイン, シェリル エル.

アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２１２２，　サンディエゴ，　ルネッサンス　アベニュー　５３９２

審査官　福間　信子

(56)参考文献　特表２００８－５３２４８１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ

专利名称(译)	与缬氨酰tRNA合成酶的蛋白质片段相关的治疗，诊断和抗体组合物的创新发现		
公开(公告)号	JP5991963B2	公开(公告)日	2016-09-14
申请号	JP2013508290	申请日	2011-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	彭生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	Etaia制药公司 彭生物制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Etaia制药公司 彭生物制药有限公司		
[标]发明人	グリーンレスリーアン チャンカイルピー ホンフェイ バサロットアレインピー ローウィンセー ワトキンスジェフリーディー メンドレインジョンディー クインシェリルエル		
发明人	グリーン, レスリー アン チャン, カイル ピー. ホン, フェイ バサロット, アレイン ピー. ロー, ウィン-セー ワトキンス, ジェフリー ディー. メンドレイン, ジョン ディー. クイン, シェリル エル.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/00 C12N9/00 C07K16/40 C07K19/00 C12Q1/68 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P31/00 A61P3/00 A61P25/00 A61P9/00 A61P21/00 A61K48/00 A61P3/10 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/53 A61P3/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 C12N9/93 C12N9/96 C12Y601/01 C12Y601/01009 A61K9/0019 A61K9/19 C07K16/40 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/92 C12N5/0602 G01N33/5011 G01N33/573 G01N33/68 G01N2333/9015 G01N2500/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/00 C12N9/00 C07K16/40 C07K19/00 C12Q1/68.A A61K31/711 A61K37/02 A61K39/395.N A61K45/00 A61P35/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P31/00 A61P3/00 A61P25/00 A61P9/00 A61P21/00 A61K48/00 A61P3/10 G01N33/53.D		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/330783 2010-05-03 US 61/329470 2010-04-29 US		
其他公开文献	JP2013531974A5 JP2013531974A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了包含新鉴定的氨酰基-tRNA合成酶的蛋白质片段，编码它们的多核苷酸及其互补物的组合物，相关试剂，及其在诊断，药物发现，研究和治疗应用中的使用方法。

表 1A
質量分析により同定されたＡＡＲＳポリペプチド

名称	タイプ／種／残基	アミノ酸配列および核酸配列	配列番号.
ValRS1[N]	タンパク質／ヒト／1-687	MSTLYVSPHPDAFPSLRALIAARYGEAGEGPGWGGAHPRIC LQPPPTSRTPFPPPRLPAILEQGPGGLWVWGATAVAQLLWPA GLGGPGGSRAAVLVQQWVSYADTELIPAACGATLPALGLRS SAQDPQAVLGALGEALSPLEEWLRLHTYLAGPAPTLADLAA VTALLLPFRYVLDPPARRIWNNVTRWFVTCVRQPEFRAVLG EVVLYSGARPLSHQPGPEAPALPKTAAQLKKEAKKREKLEK FQQKQKTQQQQPPPGEKKPKPEKREKRDPGVITYDLPTPPG EKRDYSGPMPDSYSPRYVEAAWYPWWEQQGFFKPEYGRPNV SAANPRGVFMMCIPPPNVTGSLHLGHALTNAIQDSLTRWHR MRGETTLWNPGCDHAGIATQVVVEKKLWREQGLSRHQLGRE AFLQEVWKWKEEKGDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKL SAAVTRAFVRLHEEGIIYRSTRLVNWSCTLNSAISDIEVDK KELTGRTLLSVPGYKEKVEFGVLVSFAYKVQGSDSDEEVVV ATTRIETMLGDVAVAVHPKDTRYQHLKGKNVIHPFLSRSLP IVFDEFVDMDFGTGAVKITPAHDQNDYEVGQRHGLEAISIM DSRGALTNVPPPFLGLPRFEAR	配列番号. 12
ValRS1[N]	DNA／ヒト／	ATGTCCACCCTCTACGTCTCCCCTCACCCAGATGCCTTCCC CAGCCTCCGAGCCCTCATAGCCGCTCGCTATGGGGAGGCTG GGGAGGGTCCCGGATGGGGAGGAGCCCACCCCCGCATCTGT CTCCAGCCACCCCCGACTAGCAGGACTCCCTTTCCCCCACC CCGCCTGCCGGCCCTGGAGCAGGGCCCGGTGGCTCTGGG TGTGGGGGGCCACGGCTGTGGCCCAGCTGCTGTGGCCAGCA GGCCTGGGGGGCCCAGGGGGCAGCCGGGCGGCTGTCCTTGT CCAACAGTGGGTCAGTTACGCCGACACGGAGTTAATACCAG CTGCCTGTGGAGCAACGCTGCCGGCCCTGGGACTCCGAAGC TCGGCCCAGGACCCCCAGGCTGTGCTGGGGGCCCTGGGCAG GGCCCTGAGCCCCTTGGAGGAGTGGCTTCGGCTGCACACCT ACTTGGCCGGGGAGGCCCCCACTCTGGCTGACCTGGCGGCT GTCACAGCCTTGCTGCTGCCTTCCGATACGTCCTAGACCC ACCTGCCCGCCGGATCTGGAATAATGTGACTCGCTGGTTTG TCACGTGTGTCCGGCAGCCAGAATTCCGAGCCGTGCTAGGA GAAGTGGTTCTATACTCAGGAGCCAGGCCTCTCTCATCA GCCAGGCCCCGAGGCTCCTGCCCTCCCAAAGACAGCTGCTC AGCTCAAGAAAGAGGCAAAGAAACGGGAGAAGCTAGAGAAA TTCCAACAGAAGCAGAAGATCCAACAGCAGCAGCCACCTCC AGGGGAGAAGAAACCAAAACCAGAGAAGAGGGAGAAACGGG ATCCTGGGGTCATTACCTATGACCTCCCAACCCCACCCGGG GAAAAGAAAGATGTCAGTGGCCCCATGCCCGACTCCTACAG CCCTCGGTATGTGGAGGCTGCCTGGTACCCTTGGTGGGAGC AGCAGGGCTTCTTCAAGCCAGAGTATGGGCGTCCTAATGTG TCAGCAGCAAATCCCCGAGGTGTCTTCATGATGTGCATCCC ACCCCCCAATGTGACAGGCTCCCTGCACCTGGGCCATGCAC TCACCAACGCCATCCAGGACTCCCTGACTCGATGGCACCGC ATGCGTGGGGAGACCACCCTGTGGAACCCTGGCTGTGACCA	配列番号. 13