

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-516582**(P2005-516582A)**

(43) 公表日 平成17年6月9日(2005. 6. 9)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 19/08	4 B O 2 9
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 19/10	4 B O 6 3
A 6 1 P 19/10	C O 7 K 14/47	4 B O 6 4
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-500275 (P2003-500275)	(71) 出願人	391022430
(86) (22) 出願日	平成14年5月28日 (2002. 5. 28)		アムジェン インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月9日 (2004. 1. 9)		AMGEN INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/016639		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91
(87) 国際公開番号	W02002/097110		320-1799, サウザント オークス
(87) 国際公開日	平成14年12月5日 (2002. 12. 5)		, ワン アムジェン センター ドライブ
(31) 優先権主張番号	60/293, 852	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成13年5月25日 (2001. 5. 25)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍内皮マーカー7 α 分子およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍内皮マーカー7 α (TEM7 α) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、およびTEM7 α ポリペプチドを生成する方法を提供する。本発明はさらに、TEM7 α ポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態の診断、処置、改善、および／または予防のための薬学的組成物および方法を提供する。TEM7 α ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト動物はまた、本発明に含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 配列番号 1 または配列番号 3 のいずれかに示されるヌクレオチド配列；
- (b) A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 または P T A - 3 2 0 0 中の D N A インサートのヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- (d) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは
- (e) (a) ~ (d) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、を含む、核酸分子。

【請求項 2】

単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドと少なくとも約 70 % 同一なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号 1 もしくは配列番号 3 のいずれかに示されるヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 もしくは P T A - 3 2 0 0 中の D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) のヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；
- (c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1 もしくは配列番号 3 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 もしくは P T A - 3 2 0 0 中の D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) もしくは (b) のヌクレオチド配列の領域であって、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるコードされるポリペプチドの活性を有するかまたは抗原性である、領域；
- (d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1 もしくは配列番号 3 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 もしくは P T A - 3 2 0 0 中の D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) ~ (c) のヌクレオチド配列の領域；
- (e) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかのヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは
- (f) (a) ~ (e) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、を含む、核酸分子。

【請求項 3】

単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) 少なくとも1つの改変を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該改変は、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、またはN末端短縮であり、該コードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

(g) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかのヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該コードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは

(h) (a)～(g)のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、を含む、核酸分子。

【請求項4】

請求項1、2、または3のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】

請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】

真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】

原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】

TEM7αポリペプチドを生成するプロセスであって、該ポリペプチドを発現するのに適切な条件下で、請求項5に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程、を包含する、方法。

【請求項9】

請求項8に記載のプロセスにより生成される、ポリペプチド。

【請求項10】

前記核酸分子が、ネイティブTEM7αポリペプチドのプロモーターDNAではないプロモーターDNAを含み、該プロモーターDNAが、TEM7αポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結されている、請求項8に記載のプロセス。

【請求項11】

請求項2に記載の単離された核酸分子であって、パーセント同一性が、GAP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、またはSmith-Watermanアルゴリズムのコンピュータープログラムを用いて決定される、核酸分子。

【請求項12】

化合物が、TEM7αポリペプチド活性またはTEM7αポリペプチド生成を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、該化合物に、請求項5、6、または7のいずれかに記載の細胞を曝露する工程、および該細胞中のTEM7αポリペプチド活性またはTEM7αポリペプチド生成を測定する工程、を包含する、プロセス。

【請求項13】

10

20

30

40

50

単離されたポリペプチドであって、以下：

- (a) 配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列；または
- (b) A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 もしくは P T A - 3 2 0 0 中の D N A インサートによってコードされるアミノ酸配列、を含む、ポリペプチド。

【請求項 1 4】

単離されたポリペプチドであって、以下：

- (a) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのオルソログのアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 7 0 % 同一のアミノ酸配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
- (c) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、該フラグメントは、少なくとも 1 4 アミノ酸残基を含み、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するかまたは抗原性である、フラグメント；あるいは
- (d) 配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列、A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 もしくは P T A - 3 2 0 0 中の D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) もしくは (b) のいずれかのアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、を含む、ポリペプチド。

【請求項 1 5】

単離されたポリペプチドであって、以下：

- (a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
- (b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
- (c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
- (d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；あるいは
- (e) 少なくとも 1 つの改変を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該改変は、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、または N 末端短縮であり、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、を含む、ポリペプチド。

【請求項 1 6】

請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載の核酸分子によりコードされる単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ポリペプチド。

【請求項 1 7】

請求項 1 4 に記載の単離されたポリペプチドであって、パーセント同一性が、G A P、B L A S T N、F A S T A、B L A S T A、B L A S T X、B e s t F i t、または S m i t h - W a t e r m a n アルゴリズムのコンピュータプログラムを用いて決定される、ポリペプチド。

【請求項 1 8】

請求項 1 3、1 4、または 1 5 のいずれかに記載のポリペプチドに特異的に結合する、選

10

20

30

40

50

択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 19】

配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する、請求項 18 に記載の選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 20】

抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 21】

ヒト化抗体である、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 22】

ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 23】

ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 24】

モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 25】

キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 26】

C D R 移植抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 27】

抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 28】

可変領域フラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 29】

F a b フラグメントまたは F a b ' フラグメントである、請求項 28 に記載の選択的結合因子。

【請求項 30】

配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する特異性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 31】

検出可能な標識に結合されている、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 32】

T E M 7 α ポリペプチドの生物学的活性と拮抗する、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 33】

医学的疾患、状態、または障害を処置、予防、または改善する方法であって、有効量の請求項 18 に記載の選択的結合因子を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 34】

前記医学的疾患、状態、または障害が、大理石骨病または骨粗鬆症である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することにより生成される、選択的結合因子。

【請求項 36】

請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載のポリペプチドに結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。

10

20

30

40

50

【請求項 37】

請求項 18 に記載の選択的結合因子またはフラグメントを用いて、TEM7 α ポリペプチドを検出またはその量を定量する方法。

【請求項 38】

生物学的サンプル中のGPCRポリペプチドを検出またはその量を定量するためのキットであって、請求項 18 に記載の選択的結合因子を含む、キット。

【請求項 39】

請求項 13、14、または 15 のいずれかに記載のポリペプチド、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 40】

前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、可溶化剤、安定化剤、または抗酸化剤である、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 41】

請求項 13、14、または 15 のいずれかに記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項 42】

水溶性ポリマーで共有結合的に改変された、請求項 40 に記載のポリペプチド。

【請求項 43】

前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシーポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール、またはポリビニルアルコールである、請求項 42 に記載のポリペプチド。

【請求項 44】

請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載の核酸分子、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 45】

前記核酸分子がウイルスベクター中に含まれる、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 46】

請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項 47】

異種アミノ酸配列に融合された、請求項 13、14、または 15 のいずれかに記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項 48】

前記異種アミノ酸配列が、IgG 定常領域またはそのフラグメントである、請求項 47 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 49】

医学的疾患、状態、または障害を処置、予防、または改善する方法であって、有効量の請求項 13、14、もしくは 15 のいずれかに記載のポリペプチドまたは請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載の核酸によりコードされるポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 50】

前記医学的疾患、状態、または障害が、大理石骨病または骨粗鬆症である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

被験体における病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) サンプル中の、請求項 13、14、もしくは 15 のいずれかに記載のポリペプチドまたは請求項 1、2、もしくは 3 のいずれかに記載の核酸分子によりコードされるポリペプチドの存在または発現量を決定する工程；および

10

20

30

40

50

(b) 該ポリペプチドの存在または発現量に基づき、病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断する工程、
を包含する、方法。

【請求項 5 2】

デバイスであって、以下：

(a) 移植に適した膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞であって、請求項 1 3、1 4、もしくは 1 5 のいずれかに記載のタンパク質を分泌する、細胞、
を含み、該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に対して有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

10

【請求項 5 3】

T E M 7 α ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項 1 3、1 4、もしくは 1 5 のいずれかに記載のポリペプチドを化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する T E M 7 α ポリペプチドの結合の程度を決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項 5 4】

前記化合物に結合した場合に、前記ポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

動物中のポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載の核酸分子を該動物に登用する工程を包含する、方法。

20

【請求項 5 6】

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

【請求項 5 7】

化合物が、T E M 7 α ポリペプチド活性または T E M 7 α ポリペプチド生成を阻害するかどうかを決定するためのプロセスであって、該化合物に、請求項 5 6 に記載のトランスジェニック哺乳動物を曝露する工程、および該トランスジェニック哺乳動物中の T E M 7 α ポリペプチド活性または T E M 7 α ポリペプチド生成を測定する工程、を包含する、方法。

30

【請求項 5 8】

固体支持体に結合された、請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 5 9】

請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの核酸分子を含む、核酸分子のアレイ。

【請求項 6 0】

少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドであって、該保存的アミノ酸置換は、1 0 位のバリン；1 1 位のロイシン；1 2 位のバリンもしくはロイシン；1 3 位のロイシン；1 4 位のロイシン；1 6 位のグリシン；1 7 位のアラニン；1 9 位のアルギニン；2 2 位のセリン；2 8 位のグリシン；5 0 位のセリン；5 4 位のアラニン；5 6 位のグリシン；6 0 位のグリシン；6 1 位のトリプトファン；6 3 位のアルギニン；6 6 位のアルギニン；7 2 位のグリシンもしくはアラニン；7 3 位のヒスチジン；7 4 位のバリン；7 5 位のロイシン；7 6 位のグルタミン酸；7 9 位のリジン；8 2 位のロイシン；9 6 位のアラニン；9 7 位のイソロイシン；1 0 0 位のロイシン；1 0 7 位のバリン；1 1 7 位のバリン；1 2 0 位のバリン；1 2 5 位のグルタミン酸；1 3 0 位のグルタミン酸；1 3 5 位のバリンもしくはロイシン；1 4 0 位のアルギニン；1 4 2 位のヒスチジン；1 5 2 位のセリン；1 7 5 位のバリン；1 7 7 位のイソロイシン；1 8 4 位のフェニルアラニン；1 8 7 位のアスパラギン酸；1 8 9 位のイソロイシンもしくはロイシン；1 9 9 位のバリン；2 2 4 位のバリン；2 5 6 位のバリン；2 6 5 位のアラニン；2 7 2 位のセリン；2 7 3 位のグルタミン；2

40

50

78位のアラニン；286位のイソロイシン；287位のロイシン；293位のバリン；300位のセリン；302位のフェニルアラニン；307位のイソロイシン；314位のバリン；332位のグルタミン；341位のアスパラギン；342位のロイシン；365位のグルタミン酸；367位のロイシン；386位のグリシン；392位のセリン；395位のセリン；396位のアラニン；401位のセリン；402位のセリン；409位のセリン；414位のセリン；429位のロイシン；433位のアラニン；438位のロイシン；452位のバリン；454位のロイシン；461位のバリン；462位のロイシン；463位のアラニン；466位のロイシン；467位のイソロイシン；470位のイソロイシン；473位のアラニン；475位のイソロイシン；487位のロイシン；496位のヒスチジン；503位のヒスチジン；または524位のバリンであり、該ポリペプチドは、配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ポリペプチド。

10

【請求項61】

配列番号15に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本願は、米国仮特許出願第60/293,852号(2001年5月25日出願)(この開示は、明確に、本明細書中に参考として援用される)からの優先権の利益を主張する。

【0002】

20

(発明の分野)

本発明は、腫瘍内皮マーカー7α(TEM7α)ポリペプチドおよびこのポリペプチドをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、TEM7αポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および方法に関する。本発明はさらに、TEM7αポリペプチドと関連する疾患、障害、状態の診断、処置、改善、および/または予防のための薬学的組成物および方法を提供する。

【背景技術】**【0003】****(発明の背景)**

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療剤の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と合わされて、重複配列を組み合わせて、ゲノムの一部および全体に集合すること、ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および/または構造の目印に対する相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤としての使用に関して生成物に対して有利な特性を与え得る。

30

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】**【0004】**

過去10年間にわたるゲノム研究における有意な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に関する可能性は、未だほとんど実現されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド(これらは、治療分子に対して「標的」としてはたらき得る)は、未だ同定されていない。従って、診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】**【0005】**

50

(発明の要旨)

本発明は、新規の T E M 7 α 核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0006】

本発明は、以下を含む、単離された核酸分子を提供する：

(a) 配列番号 1 または配列番号 3 のいずれかに示されるヌクレオチド配列；

(b) A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 または P T A - 3 2 0 0 における D N A インサートのヌクレオチド配列；

(c) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(d) (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体に、少なくとも中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは、

(e) (a) ~ (d) のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列。

【0007】

本発明はまた、以下を含む、単離された核酸分子を提供する：

(a) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約 70% 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 1 または配列番号 3 のいずれかに示されるヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 もしくは P T A - 3 2 0 0 における D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) のヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1 もしくは配列番号 3 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 もしくは P T A - 3 2 0 0 における D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) もしくは (b) のヌクレオチド配列の領域であって、ここで、このポリペプチドフラグメントは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるコードポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；

(d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1 もしくは配列番号 3 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 もしくは P T A - 3 2 0 0 における D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) ~ (c) のヌクレオチド配列の領域；

(e) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは

(f) (a) ~ (e) のいずれかに示されるヌクレオチド配列。

【0008】

本発明は、以下を含む、単離された核酸分子をさらに提供する：

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

10

20

30

40

50

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、またはN末端短縮である1つの改変を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

(g) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは

(h) (a)～(g)のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列。 20

【0009】

本発明は、以下を含む、単離されたポリペプチドを提供する：

(a) 配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列；あるいは

(b) ATCC受託番号PTA-3199もしくはPTA-3200におけるDNAインサートによりコードされるアミノ酸。

【0010】

本発明はまた、以下を含む単離されたポリペプチドを提供する：

(a) 配列番号2または配列番号4のいずれかのオルソログのアミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチド活性を有する、アミノ酸配列； 30

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、このフラグメントは、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または、抗原性である、フラグメント；あるいは

(d) 配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列、ATCC受託番号PTA-3199もしくはPTA-3200におけるDNAインサートによりコードされるアミノ酸、または(a)もしくは(b)のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列。

【0011】

本発明は、以下を含む、単離されたポリペプチドをさらに提供する：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列； 40

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、またはN末端短縮である少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0012】

本発明は、なお、10位のバリン；11位のロイシン；12位のバリンもしくはロイシン；13位のロイシン；14位のロイシン；16位のグリシン；17位のアラニン；19位のアルギニン；22位のセリン；28位のグリシン；50位のセリン；54位のアラニン；56位のグリシン；60位のグリシン；61位のトリプトファン；63位のアルギニン；66位のアルギニン；72位のグリシンもしくはアラニン；73位のヒスチジン；74位のバリン；75位のロイシン；76位のグルタミン酸；79位のリジン；82位のロイシン；96位のアラニン；97位のイソロイシン；100位のロイシン；107位のバリン；117位のバリン；120位のバリン；125位のグルタミン酸；130位のグルタミン酸；135位のバリンもしくはロイシン；140位のアルギニン；142位のヒスチジン；152位のセリン；175位のバリン；177位のイソロイシン；184位のフェニルアラニン；187位のアスパラギン酸；189位のイソロイシンもしくはロイシン；199位のバリン；224位のバリン；256位のバリン；265位のアラニン；272位のセリン；273位のグルタミン；278位のアラニン；286位のイソロイシン；287位のロイシン；293位のバリン；300位のセリン；302位のフェニルアラニン；307位のイソロイシン；314位のバリン；332位のグルタミン；341位のアスパラギン；342位のロイシン；365位のグルタミン酸；367位のロイシン；386位のグリシン；392位のセリン；395位のセリン；396位のアラニン；401位のセリン；402位のセリン；409位のセリン；414位のセリン；429位のロイシン；433位のアラニン；438位のロイシン；452位のバリン；454位のロイシン；461位のバリン；462位のロイシン；463位のアラニン；466位のロイシン；467位のイソロイシン；470位のイソロイシン；473位のアラニン；475位のイソロイシン；487位のロイシン；496位のヒスチジン；503位のヒスチジン；または524位のバリンである、少なくとも1つの保存的置換を有する配列番号4に示されるアミノ酸を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、このポリペプチドが、配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する単離されたポリペプチドをさらに提供する。

【0013】

また、TEM7αアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドが提供される。

【0014】

本発明はまた、本明細書中に示される単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示される組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、ならびにTEM7αポリペプチドを産生する方法であって、宿主細胞を培養する工程およびこの産生されたポリペプチドを必要に応じて単離する工程を包含する方法を提供する。

【0015】

TEM7αポリペプチドをコードする核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト動物はまた、本発明に含まれる。TEM7α核酸分子は、TEM7αポリペプチドの発現および増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、TEM7α核酸分子は、内因性TEM7αポリペプチドの発現を予防する（すなわち、TEM7αポリペプチド遺伝子ノックアウトを有するトランスジェニック動物を作製する）様式で、動物中に導入される。このトランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは、哺乳動物であり、より好ましくは、げっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。

【0016】

本発明のTEM7 α ポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

【0017】

さらに、本発明のTEM7 α ポリペプチドに特異的に結合し得る抗体およびペプチドのような選択的結合因子が、提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニストまたはアンタゴニストであり得る。

【0018】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、または選択的結合因子、および1以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む、薬学的組成物はまた、本発明に含まれる。この薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、ポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

10

【0019】

本発明のTEM7 α ポリペプチドおよび核酸分子は、疾患および障害（本明細書中で引用されるものを含む）を処置、予防、改善、および／または検出するために使用され得る。

【0020】

本発明はまた、TEM7 α ポリペプチドに結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、TEM7 α ポリペプチドを試験分子と接触させて、ポリペプチドへの試験分子の結合の程度を決定する工程を包含する。この方法は、さらに、このような試験分子が、TEM7 α ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する工程を包含する。本発明は、さらに、TEM7 α ポリペプチドの発現またはTEM7 α ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

20

【0021】

TEM7 α ポリペプチドの発現を調節する方法およびレベルを調整（すなわち、増加または減少）する方法もまた、本発明に含まれる。1つの方法は、TEM7 α ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、TEM7 α ポリペプチドの発現を調節または調整するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中でさらに記載されているような、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

30

【0022】

TEM7 α ポリペプチドは、それらのリガンドを同定するために使用され得る。「発現クローニング」の種々の形態は、レセプターに対するリガンドをクローニングするために使用される（例えば、Davisら、1996、Cell、87：1161～69を参照のこと）。これらおよび他のTEM7 α リガンドクローニング実験は、本明細書中により詳細に記載される。TEM7 α リガンドの単離は、TEM7 α シグナル伝達経路の新規なアゴニストおよび／またはアンタゴニストの同定または開発を可能にする。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、TEM7 α リガンド、抗TEM7 α リガンド抗体およびその誘導体、小分子、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド（これらのいずれかは、1以上の疾患または障害（本明細書中で引用されるものを含む）を処置するために使用され得る）が挙げられる。

40

【0023】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される項は、構成目的のためであり、そして、記載される構成要件を限定するように解釈されるべきでない。本願中に引用される全ての参考文献は、明確に、本明細書中に参考として援用される。

【0024】

（定義）

用語「TEM7 α 遺伝子」もしくは「TEM7 α 核酸分子」または「TEM7 α ポリヌ

50

クレオチド」とは、配列番号 1 または配列番号 3 のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 3 1 9 9 または P T A - 3 2 0 0 の D N A インサートのヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むかまたはこれらからなる、核酸分子をいう。

【0025】

用語「T E M 7 α ポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物または生物の集団の染色体上の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替形態のうちの 1 つをいう。

【0026】

用語「T E M 7 α ポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示される T E M 7 α ポリペプチドアミノ酸配列の R N A 転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常は R N A）をいう。

【0027】

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

【0028】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、D N A または R N A 配列をいう。この用語は、D N A および R N A の公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシー-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン（p s e u d o i s o c y t o s i n e）、5-（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン（ β -D-m a n n o s y l q u e o s i n e）、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および 2, 6-ジアミノプリン。

【0029】

用語「ベクター」は、コード情報を宿主細胞へと移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）を言及するために使用される。

【0030】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切なベクターであって、そして挿入された異種核酸配列の発現を指示および／または制御する核酸配列を含む、ベクターをい

10

20

30

40

50

う。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0031】

用語「作動可能に連結された」を用いて、本明細書中では、このように記載された隣接配列が、その通常の機能を発揮するように構成または構築されている隣接配列の配置をいう。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、このコード配列の複製、転写および／または翻訳をもたらすことが可能であり得る。例えば、コード配列は、このプロモーターがこのコード配列の転写を指示し得る場合に、プロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、これが正確に機能する限り、このコード配列と連続する必要はない。したがって、例えば、翻訳されないが転写される介在配列が、このプロモーター配列とこのコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、なおこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。

10

【0032】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたか、または核酸配列で形質転換されて、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞を言及するために使用される。この用語は、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態または遺伝子構造において元々の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を包含する。

【0033】

用語「TEM7 α ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、以下が挙げられる：TEM7 α ポリペプチドフラグメント、TEM7 α ポリペプチドオルソログ、TEM7 α ポリペプチド改変体、およびTEM7 α ポリペプチド誘導体であって、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するもの。TEM7 α ポリペプチドは、本明細書中で定義されるような、成熟ポリペプチドであり得、そして調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

20

【0034】

用語「TEM7 α ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドのアミノ酸末端での短縮（リーダー配列を含むかまたは含まない）および／またはカルボキシル末端での短縮を含むポリペプチドをいう。用語「TEM7 α ポリペプチドフラグメント」はまた、TEM7 α ポリペプチドオルソログ、TEM7 α ポリペプチド誘導体、もしくはTEM7 α ポリペプチド改変体のアミノ末端短縮物および／もしくはカルボキシル末端短縮物、またはTEM7 α ポリペプチド対立遺伝子改変体もしくはTEM7 α ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端短縮物および／もしくはカルボキシル末端短縮物をいう。TEM7 α ポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシングまたはインビボでのプロテアーゼ活性からもたらされ得る。膜結合形態のTEM7 α ポリペプチドもまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態では、短縮および／または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。このようにして生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約150より多くのアミノ酸を含む。このようなTEM7 α ポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、TEM7 α ポリペプチドに対する抗体を生成するために使用され得ることが理解される。

30

40

【0035】

用語「TEM7 α ポリペプチドオルソログ」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるTEM7 α ポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのTEM7 α ポリペプチドは、互いのオルソログであるとみなされる。

50

【0036】

用語「TEM7 α ポリペプチド改変体」は、配列番号2もしくは配列番号4（リーダー配列を有するかまたは有さない）のいずれかに示されるTEM7 α ポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および／またはTEM7 α ポリペプチドフラグメント）、および／または付加（例えば、内部付加および／またはTEM7 α 融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むTEM7 α ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する（例えば、TEM7 α ポリペプチド対立遺伝子改変体、TEM7 α ポリペプチドオルソログ、およびTEM7 α ポリペプチドスプライス改変体）か、または、人工的に構築され得る。このようなTEM7 α ポリペプチド改変体は、配列番号1、または配列番号3のいずれかに示されるDNA配列から変化するDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、これらの改変体は、1～3、または1～5、または1～10、または1～15、または1～20、または1～25、または1～50、または1～75、または1～100、または100より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加および／または欠失を有し、ここで、これらの置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

【0037】

用語「TEM7 α ポリペプチド誘導体」は、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに記載されるポリペプチド、TEM7 α ポリペプチドフラグメント、TEM7 α ポリペプチドオルソログ、またはTEM7 α ポリペプチド改変体をいう。用語「TEM7 α ポリペプチド誘導体」はまた、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、TEM7 α ポリペプチド対立遺伝子改変体またはTEM7 α ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドをいう。

【0038】

用語「成熟TEM7 α ポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したTEM7 α ポリペプチドをいう。成熟TEM7 α ポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および／またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N結合型および／またはO結合型グリコシル化など）を含み得る。

【0039】

用語「TEM7 α 融合ポリペプチド」とは、本明細書中に定義されるような、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに示されるポリペプチド、TEM7 α ポリペプチドフラグメント、TEM7 α ポリペプチドオルソログ、TEM7 α ポリペプチド改変体、またはTEM7 α ポリペプチド誘導体の、アミノ末端またはカルボキシル末端での1つ以上のアミノ酸（例えば、異種タンパク質または異種ペプチド）の融合体をいう。用語「TEM7 α 融合ポリペプチド」とはまた、本明細書中に定義されるような、TEM7 α ポリペプチド対立遺伝子改変体またはTEM7 α ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端での、1つ以上のアミノ酸の融合体をいう。

【0040】

用語「生物学的に活性なTEM7 α ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を有するTEM7 α ポリペプチドをいう。さらに、TEM7 α ポリペプチドは、免疫原として活性であり得る；すなわち、TEM7 α ポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。

【0041】

用語「単離されたポリペプチド」とは、（1）供給源細胞から単離される場合に、天然と一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、糖質、または他の物質の少なくとも約50%から分離された本発明のポリペプチド、（2）「単離されたポリペプチド」が天然で連結しているポリペプチドの全てまたは一部に（共有結合的相互作用によっても非共有結合的

相互作用によっても）連結していない、本発明のポリペプチド、（３）天然では連結していないポリペプチドに（共有結合的相互作用または非共有結合的相互作用によって）作動可能に連結している、本発明のポリペプチド、または（４）天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、あらゆる他の混入ポリペプチドも、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げるその天然の環境において見出される他の混入物も、実質的に含まない。

【００４２】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、２つ以上のポリペプチド分子または２つ以上の核酸分子の、配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、２つ以上のヌクレオチド配列の鎖（s t r i n g）間または２つ以上のアミノ酸配列の鎖間の一致によって決定したときの、核酸分子間またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、２つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によってアドレス指定されるギャップアラインメント（存在する場合）との間の同一一致のパーセントを評価する。

10

【００４３】

用語「類似性」は、関連した概念であるが、「同一性」とは対照的に、「類似性」は、同一一致および保存的置換の一致の両方を含む関連性尺度をいう。２つのポリペプチド配列が、例えば１０／２０個同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、パーセント同一性および類似性は、どちらも５０％である。同じ例において、保存的置換であるさらに５つの位置が存在する場合、パーセント同一性は５０％のままであるが、パーセント類似性は７５％（１５／２０）である。したがって、保存的置換が存在する場合、２つのポリペプチド間のパーセント類似性は、これら２つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

20

【００４４】

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

30

【００４５】

用語「有効量」および「治療有効量」は、各々、本明細書中に示されるＴＥＭ７αポリペプチドの１つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるＴＥＭ７αポリペプチドまたはＴＥＭ７α核酸分子の量をいう。

【００４６】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのＴＥＭ７αポリペプチド、ＴＥＭ７α核酸分子、またはＴＥＭ７α選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な１つ以上の処方材料をいう。

【００４７】

用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得、そしてさらに動物において使用されて、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し得る、分子または分子の一部をいう。抗原は、１つ以上のエピトープを有し得る。

40

【００４８】

用語「選択的結合因子」とは、ＴＥＭ７αポリペプチドについての特異性を有する分子をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子が、ヒトＴＥＭ７αポリペプチドに結合し、かつヒト非ＴＥＭ７αポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号２または配列番号４のいずれかに記載されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間バージョン（例えば、マウスＴＥＭ７αポリペプチドおよびラットＴＥＭ７αポリペプチド））に結

50

合し得ることが、理解される。

【0049】

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

【0050】

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

10

【0051】

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

20

【0052】

(核酸分子および／またはポリペプチドの関連性)

関連した核酸分子が、配列番号1、または配列番号3の核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含むこと、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を含むことが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号4のいずれかにおけるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および／または欠失を含むかまたは本質的にこれからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。このような関連したTEM7αポリペプチドは、例えば、1以上のN結合型および／もしくはO結合型グリコシル化部位の付加および／もしくは欠失、または1以上のシステイン残基の付加および／もしくは欠失を含み得る。

30

【0053】

関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号4のいずれかのTEM7αポリペプチドのうちの少なくとも約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約150よりも多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、TEM7α核酸分子のフラグメントを包含する。

40

【0054】

さらに、関連したTEM7α核酸分子としてはまた、本明細書中で定義したような中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1、もしくは配列番号3のいずれかのTEM7α核酸分子の十分に相補的な配列、またはポリペプチド（このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む）をコードする分子の十分に相補的な配列、または本明細書中に定義したような核酸フラグメントの十分に相補的な配列、または本明細書中に定義したようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの十分に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子が挙げられる。ハイブリダイゼーションプローブは、cDNA、ゲノムDNAライブラリーま

50

たは合成DNAライブラリーを、関連した配列についてスクリーニングするために、本明細書中に提供されるTEM7α配列を用いて調製され得る。TEM7αポリペプチドのDNA配列および／またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して顕著な同一性を示す領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

【0055】

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

【0056】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度は影響を受ける。他の薬剤は、非特異的ハイブリダイゼーションおよび／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、NaDodSO₄（SDS）、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH6.8～7.4で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHにほとんど依存しない。Andersonら、Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach、第4章（IRL Press Limited）を参照のこと。

【0057】

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

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

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

【0058】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で形成され得るよりも程度が高い塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50～65℃での0.0

15 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムまたは37～50℃での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例として、0.015 Mナトリウムイオン中で50℃の、「中程度にストリンジェントな」条件は、約21%の不一致を可能にする。

【0059】

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

10

【0060】

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

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

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

【0061】

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

20

【0062】

別の実施形態において、関連した核酸分子は、配列番号1、もしくは配列番号3に示されるようなヌクレオチド配列に対して少なくとも約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに示されるようなポリペプチドに対して少なくとも約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態において、ヌクレオチド配列は、配列番号1、または配列番号3のいずれかに示されるようなヌクレオチド配列に対して約75パーセント、または約80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるか、あるいはヌクレオチド配列は、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるようなポリペプチド配列に対して約75パーセント、または約80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連した核酸分子は、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有するポリペプチドをコードする。

30

【0063】

核酸配列における差異は、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的改変および／または非保存的改変を生じ得る。

40

【0064】

配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対する対応する改変）は、TEM7αポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生成する。対照的に、TEM7αポリペプチドの機能的特徴および／または化学的特徴における実質的な改変は、以下を維持することに対するその影響が顕著に異なる、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得る：（a）例えば、シートもしくはヘリックスコンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、（b）標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖のかさ。

50

【0065】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんどまたは全く影響がないような、非ネイティブな残基によるネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンによって置換され得る。

【0066】

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるよりむしろ、化学的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態が挙げられる。 10

【0067】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、複数のクラスに分割され得る：

- 1) 疎水性：ノロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；
- 3) 酸性：Asp、Glu；
- 4) 塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- 5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro；および
- 6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0068】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーとの交換を含み得る。このような置換された残基が、非ヒトTEM7αポリペプチドオルソログと相同なヒトTEM7αポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同領域に導入され得る。 20

【0069】

このような変更を行う際に、アミノ酸のハイドロパシー指数 (hydropathic index) が考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて、ハイドロパシー指数を割り当てられている。ハイドロパシー指数は、以下である：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5)。 30

【0070】

タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能を確認する際の、ハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該分野において一般的に理解されている (Kyteら、1982、J. Mol. Biol.、157:105-132)。特定のアミノ酸が、類似のハイドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに使用され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ハイドロパシー指数に基づいて変更を行う際に、ハイドロパシー指数が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、そして±0.5以内であるものが、なおより特に好ましい。 40

【0071】

類似のアミノ酸の置換が、親水性に基づいて効果的になされ得る (特に、これによって作製された生物学的に機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合と同様に、免疫学的実施形態における使用のために意図される) 場合もまた、当該分野において理解されている。その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるような、タンパク質の最も大きな局所的な平均親水性は、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質 50

の生物学的特性に相関する。

【0072】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；およびトリプトファン（-3.4）。類似の親水性の値に基づいて変更を行う際に、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、そして±0.5以内であるものが、なおより特に好ましい。エピトープをまた、一次アミノ酸配列から、親水性に基づいて同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」と呼ばれる。

10

【0073】

所望のアミノ酸置換（保存的であれ非保存的であれ）は、当業者によって、このような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、TEM7αポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載されるTEM7αポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換を、表Iに示す。

【0074】

【表1】

20

表 I
アミノ酸置換

元の残基	例示の置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg

30

Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

当業者は、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示されるようなポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。活性を破壊することなく変更され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、生物学的活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合、当業者は、T E M 7 α ポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドに対して比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない T E M 7 α ポリペプチドの領域における変化が、T E M 7 α ポリペプチドの生物学的活性および／または構造にさほど不利に影響を与えない可能性があることが、理解される。当業者にはまた、比較的保存された領域においてさえ、天然に存在する残基を、活性を維持しながら化学的に類似のアミノ酸で置換し得ることが公知である（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、ポリペプチド構造に悪影響を与えることもなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

30

【0075】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である類似のポリペプチド中の残基を同定する、構造－機能研究を再検討し得る。このような比較の観点において、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応する、T E M 7 α ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、T E M 7 α ポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基について、化学的に類似のアミノ酸での置換を選択し得る。

40

【0076】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおいて、三次元構造および三次元構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。このような情報を考慮して、当業者は、その三次元構造に対する T E M 7 α ポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面に存在すると予測されるアミノ酸残基に急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を所望のアミノ酸残基各々に含

50

む、試験改変体を作製し得る。これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変更が、破壊された活性、望ましくない減少した活性、または適切でない活性を生じたことを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が単独でかまたは他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【0077】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。M o u l t、1996、C u r r. O p i n B i o t e c h n o l. 7: 422-427; C h o uら、1974、B i o c h e m i s t r y 13: 222-45; C h o uら、1974、B i o c h e m i s t r y、113: 211-22; C h o uら、1978、A d v. E n z y m o l. R e l a t. A r e a s M o l. B i o l. 47: 45-48; C h o uら、1978、A n n. R e v. B i o c h e m. 47: 251-276; および C h o uら、1979、B i o p h y s. J. 26: 367-84を参照のこと)。さらに、コンピュータプログラムが、二次構造の推定を補助するために、現在利用可能である。

10

【0078】

二次構造を推定する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%より大きな配列同一性または40%より大きな類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース (P D B) の近年の成長は、二次構造 (ポリペプチドまたはタンパク質の構造における可能な折り畳みの数を含む) の増強された推定性を提供してきた。H o l mら、1999、N u c l. A c i d. R e s. 27: 244-47を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質において制限された数の折り畳みが存在すること、および一旦、重要な数の構造が解明されると、構造推定は劇的により正確となることが、示唆されてきた (B r e n n e rら、1997、C u r r. O p i n. S t r u c t. B i o l. 7: 369-76)。二次構造を予測するさらなる方法としては、「スレッディング (t h r e a d i n g)」 (J o n e s、1997、C u r r. O p i n. S t r u c t. B i o l. 7: 377-87; S i p p lら、1996、S t r u c t u r e 4: 15-19)、「プロフィール分析」 (B o w i eら、1991、S c i e n c e、253: 164-70; G r i b s k o vら、1990、M e t h o d s E n z y m o l. 183: 146-59; G r i b s k o vら、1987、P r o c. N a t. A c a d. S c i. U. S. A. 84: 4355-4358)、および「進化的連鎖 (e v o l u t i o n a r y l i n k a g e)」 (H o m e、前出、および B r e n n e r、前出を参照のこと) が、挙げられる。

20

30

【0079】

好ましい T E M 7 α ポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および／または型が配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、T E M 7 α ポリペプチド改変体は、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN結合グリコシル化部位を含む。N結合グリコシル化部位は、配列 A s n - X - S e r または A s n - X - T h r によって特徴付けられ、ここで、Xとして示されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合糖質鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN結合糖質鎖を除去する。1つ以上のN結合型グリコシル化部位 (代表的に、天然に存在するグリコシル化部位) が排除され、そして1つ以上の新たなN結合部位が作製されている、N結合糖質鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましい T E M 7 α 改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸 (例えば、セリン) で置換されている、システイン改変体

40

50

が挙げられる。システイン改変体は、T E M 7 α ポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な配置にリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には偶数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【0080】

別の実施形態において、関連の核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸の挿入を有する、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはその配列からなり、そしてここで、このポリペプチドは配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するか、または、少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはその配列からなり、そしてここで、このポリペプチドは配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する。関連の核酸分子はまた、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかしくはその配列からなり、ここで、このポリペプチドはカルボキシル末端および／またはアミノ末端の短縮を有し、そしてさらにここで、このポリペプチドは配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する。関連の核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端短縮、およびアミノ末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、もしくはその配列からなり、そしてここで、このポリペプチドは配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する。

【0081】

さらに、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のT E M 7 α ポリペプチドは、相同なポリペプチドに融合されてホモダイマーを形成し得るか、または異種のポリペプチドに融合されてヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：T E M 7 α 融合ポリペプチドの検出および／または単離を可能するためのエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその一部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合するリガンドまたはその一部分；触媒活性である酵素またはその一部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加するポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはT E M 7 α ポリペプチド改変体とは異なる治療活性を有するポリペプチド。

【0082】

融合は、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のT E M 7 α ポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかでなされ得る。融合は、リンカー分子またはアダプター分子なしで直接的であり得るか、あるいはリンカー分子またはアダプター分子を使用してであり得る。リンカー分子またはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基、代表的には約20～約50個のアミノ酸残基であり得る。リンカー分子またはアダプター分子はまた、D N A制限エンドヌクレアーゼ、またはプロテアーゼの切断部位を有するように設計され得、融合部分の分離を可能にする。一旦構築されると、融合ポリペプチドは、本明細書中に記載される方法に従って誘導体化されることが理解される。

【0083】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のT E M 7 α ポリペプチドは、ヒトI g GのF c領域の1つ以上のドメインに融合される。抗体は、2つの機能的に独立した部分

(「F a b」として公知の可変ドメイン(抗原に結合する)および「F c」として公知の定常ドメイン(食細胞による攻撃および補体活性化のようなエフェクター機能に関係する)を含む。F cは、長い血清半減期を有し、一方、F a bは短寿命である(C a p o n ら、1989、Nature、337:525-31)。治療タンパク質と一緒に構築される場合、F cドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはF cレセプター結合、プロテインA結合、補体固定およびおそらく胎盤輸送のような機能を組み込み得る(同書)。表I Iは、当該分野で公知の特定のF c融合物の使用を要約する。

【0084】

【表2】

表 II
治療用タンパク質とのFc融合物

Fcの形態	融合パートナー	治療上の関連	参考文献
IgG1	CD30-LのN末端	ホジキン病; 未分化リンパ種; T-細胞白血病	米国特許第 5,480,981号
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症; 移植拒絶	Zheng ら, 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF レセプター	敗血症性ショック	Fisher ら, 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee ら, 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, または IgE (第1ドメインを除く)	TNF レセプター	炎症, 自己免疫障害	米国特許第 5,808,029号
IgG1	CD4 レセプター	AIDS	Capon ら, 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2 の N 末端	抗癌, 抗ウイルス	Harvill ら, 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPG の C 末端	変形性関節症; 骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプチンの N 末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, 1997年12月11日出願
ヒト Ig Cγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

一つの例において、ヒト I g G ヒンジ領域、C H 2 および C H 3 領域の全てまたは一部は、当業者に公知の方法を使用して T E M 7 α ポリペプチドの N 末端または C 末端のいずれかに融合され得る。別の例において、ヒト I g G ヒンジ領域、C H 2 領域および C H 3 領域は、T E M 7 α ポリペプチドフラグメント(例えば、T E M 7 α の推定細胞外部分)のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに融合され得る。

【0085】

得られる T E M 7 α 融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって精製され得る。F c 領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、融合されていない対応物よりもインビボで実質的に長い半減期を示すことが見出された。また、F c 領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化/多量体化を可能にする。F c 領域は、天然に存在する F c 領域であり得るか、または特定の質(例えば、治療的質、循環時間、凝集の減少など)を改善するために変更され得る。

【0086】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない

10

20

30

40

50

: Computational Molecular Biology, Lesk, (A. M. 編, Oxford University Press 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, (D. W. 編, Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data, (Part 1, A. M. GriffinおよびH. G. Griffin, 編, Humana Press 1994) G. von Heinje, Sequence Analysis in Molecular Biology, (Academic Press, 1987) Sequence Analysis Primer (M. GribskovおよびJ. Devereux 編, M. Stockton Press 1991); ならびに Carillo ら, SIAM J. Applied Math., 48:1073, (1988) に記載される方法。 10

【0087】

同一性および／または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間に最も大きな一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータプログラムに記載される。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: GCGプログラムパッケージ (GAP (Devereuxら, 1984, Nucl. Acid. Res., 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を含む)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschulら, 1990, J. Mol. Biol., 215:403-10)。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源 (Altschulら, BLAST Manual (NCB/NLM/NIH Bethesda, MD); Altschulら, 1990, 上記) から公に入手可能である。周知のSmith Waterman アルゴリズムもまた同一性を決定するために使用され得る。 20

【0088】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定の整列スキームは、2つの配列の短い領域のみの一致を生じ得、この小さな整列された領域は、2つの全長配列間に有意な関係がないとしても非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態においては、選択された整列方法 (GAPプログラム) は、標的ポリペプチドの少なくとも50個の連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。 30

【0089】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を使用して、配列同一性パーセントが決定される2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適の一致 (アルゴリズムによって決定される「一致したスパン (matched span) 」) について整列される。ギャップオープニングペナルティー (gap opening penalty) (これは、平均対角の3倍として計算され; 「平均対角」は、使用される比較マトリクスの対角の平均であり; 「対角」は、特定の比較マトリクスによってそれぞれの完全なアミノ酸一致に割り当てられるスコアまたは数である) およびギャップエクステンションペナルティー (これは、通常ギャップオープニングペナルティーの1/10である)、ならびにPAM250またはBLOSUM62のような比較マトリクスがこのアルゴリズムとともに使用される。標準比較マトリクスもまたこのアルゴリズムによって使用される (Dayhoffら, 5 Atlas of Protein Sequence and Structure (補遺3, 1978) (PAM250比較マトリクス); Henikoffら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-19 (BLOSUM62比較マトリクス)) 40

【0090】

ポリペプチド配列の比較に好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる：

アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53；

比較マトリクス（Comparison matrix）：BLOSUM 62（Henikoffら，上記）より；

ギャップペナルティー（Gap Penalty）：12

ギャップレングスペナルティー（Gap Length Penalty）：4

類似性の閾値：0。

GAPプログラムは、上記パラメーターを用いて有用である。上記パラメーターは、GAPアルゴリズムを使用するポリペプチド比較についてのデフォルトパラメーター（末端ギャップについてペナルティーなしで）である。 10

【0091】

核酸分子配列比較についての好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる：

アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch, 上記；

比較マトリクス：一致＝＋10、不一致＝0

ギャップペナルティー：50

ギャップレングスペナルティー：3。

GAPプログラムはまた、上記パラメーターを用いて有用である。上記パラメーターは、核酸分子比較についてのデフォルトパラメーターである。 20

【0092】

他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較マトリクス、類似性の閾値が使用され得、これには、Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを含む。なされる特定の選択は、当業者に明らかであり、なされる特定の比較（例えば、DNA-DNA間、タンパク質-タンパク質間、タンパク質-DNA間）；比較が所定の配列の対間である（この場合、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい）か、一つの配列と配列の大きなデータベースとの間（この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい）であるか）に依存する。

【0093】

（核酸分子）

TEM7αポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、化学合成、cDNAライブラリースクリーニングもしくはゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および／またはcDNAのPCR増幅が挙げられるがこれらに限定されない種々の方法で容易に取得され得る。

【0094】

本明細書中で使用される組換えDNA法は、一般に以下に示される方法である：Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)および／またはCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994)。本発明は、本明細書中に記載されるような核酸分子およびこのような分子を得るための方法を提供する。 40

【0095】

TEM7αポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子がある種から同定された場合、この遺伝子の全てまたは一部をプローブとして使用して、同一種由来のオルソログまたは関連遺伝子を同定し得る。このプローブまたはプライマーを使用して、TEM7αポリペプチドを発現すると考えられている種々の組織供給源からcDNAライブラリーをスクリーニングし得る。さらに、配列番号1または配列番号3のいずれかに示される配列を有する核酸分子の一部または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングして 50

TEM7 α ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的には、中程度のストリンジェンシー条件または高ストリンジェンシー条件が、スクリーニングから得られる偽陽性の数を最小化するためのスクリーニングに使用される。

【0096】

TEM7 α ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現したタンパク質の特性に基づくポジティブクローンの検出を使用する発現クローニングによって同定され得る。代表的には、核酸ライブラリーは、宿主細胞に発現されかつその表面上に提示されるクローニングされたタンパク質に、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）を結合させることによってスクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

10

【0097】

以下に示される記載に従って行われる組換え発現技術を、これらのポリヌクレオチドを産生するために、そしてコードされるポリペプチドを発現するために続け得る。例えば、TEM7 α ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望のヌクレオチド配列を容易に産生し得る。次いで、この配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを作製し得る。あるいは、TEM7 α ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、発現ベクターに挿入され得る。適切な宿主にこの発現ベクターを導入することによって、コードされたTEM7 α ポリペプチドは、多量に産生され得る。

20

【0098】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法において、cDNAは、酵素（逆転写酵素）を使用してポリ（A）+RNAまたは総RNAより調製され得る。次いで、2つのプライマー（代表的には、TEM7 α ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの別々の領域に相補的な）が、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにcDNAに添加され、そしてこのポリメラーゼは、2つのプライマー間のcDNA領域を増幅する。

【0099】

TEM7 α ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら、1989, Angew. Chem. Intl. Ed. 28: 716-34に記載される方法のような、当業者に周知の方法を使用する化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのホスホトリエステル法、ホスホルアミダイト法およびH-ホスホネート法が挙げられる。このような化学合成に好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用するポリマー支持された合成である。代表的には、TEM7 α ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用していくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、このフラグメントと一緒に連結して、TEM7 α 遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、ポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、メチオニン残基をコードするATGを有する。このメチオニンは、宿主細胞中で産生されたTEM7 α ポリペプチドがこの細胞から分泌されるように設計されているか否かに依存して、このポリペプチドの成熟形態上に存在してもしなくてもよい。当業者に既知の他の方法もまた使用され得る。

30

40

【0100】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞において最適なTEM7 α ポリペプチド発現のために変更されているコドンを含む。特定のコドン変更は、TEM7 α ポリペプチドおよび発現のために選択された宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞中で高度に発現される遺伝子における使用のために好ましいコドンを選択することによって）行われ得る。高度に発現される細菌性遺伝子のコドン嗜好（preference）のための「Eco_high.Cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピューターアルゴリズムが使用され得、そ

50

して University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI) によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、以下が挙げられる：「C e l e g a n s _ h i g h . c o d」、「C e l e _ g a n s _ l o w . c o d」、「D r o s o p h i l a _ h i g h . c o d」、「H u m a n _ h i g h . c o d」、「M a i z e _ h i g h . c o d」および「Y e a s t _ h i g h . c o d」。

【0101】

いくつかの場合において、TEM7 α ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが望ましくあり得る。改変体をコードする核酸分子は、部位特異的変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して産生され得、ここで、プライマーは、所望の点変異を有する（変異誘発技術の記載については、Sambrookら、上述、およびAusubelら、上述、を参照のこと）。Engelら（上述）によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に既知の他の方法もまた、使用され得る。

【0102】

（ベクターおよび宿主細胞）

TEM7 α ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、標準的連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入される。ベクターは、代表的には、使用される特定の宿主細胞中で機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、宿主細胞機構に適合可能であり、その結果、遺伝子増幅および／または遺伝子発現が生じ得る）。TEM7 α ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞（バキュロウイルス系）および／または真核生物宿主細胞において増幅／発現され得る。宿主細胞の選択は、TEM7 α ポリペプチドが翻訳後修飾されるべきか否かに一部依存する（例えば、グリコシル化および／またはリン酸化）。そうならば、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説については、Meth. Enz., vol. 185 (D. V. Goeddel編, Academic Press 1990)を参照のこと。

【0103】

代表的には、宿主細胞のいずれかにおいて使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列、ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。特定の実施形態において、このような配列（「隣接配列」と総称される）は、代表的には1つ以上の以下のヌクレオチド配列を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナースプライシング部位およびアクセプタースプライシング部位を含む完全イントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸の挿入のためのポリリンカー領域、ならびに選択マーカーエレメント。これらの配列の各々は、以下に論じられる。

【0104】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、TEM7 α ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子）を含み得；そのオリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、または別の「タグ」（例えば、FLAG、HA（インフルエンザウイルス赤血球凝集素）またはmyc（これらに対しては、市販の抗体が存在する））をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にそのポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、TEM7 α ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、親和性マトリクスとしてのタグに対する抗体を使用する、カラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、そのタグは、続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたTEM7 α ポリペプチドから除去され得る。

【0105】

10

20

30

40

50

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種由来および／または同じ系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種以外または宿主細胞系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、TEM7αポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、その隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0106】

本発明のベクター中において有用な隣接配列は、当該分野において周知であるいくつかの方法のいずれかによって得られ得る。代表的には、TEM7α遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は、公知であり得る。ここで、その隣接配列は、核酸合成またはクローニングのための本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

【0107】

その隣接配列の全てまたは一部のみが既知である場合、PCRを使用して、そして／あるいは適切なオリゴヌクレオチドおよび／または同じ種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、その隣接配列は得られ得る。その隣接配列が既知でない場合、隣接配列を含むDNAフラグメントが、例えば、コード配列または別の遺伝子さえ含み得る、より大きなDNA片から単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、その後のアガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatworth, CA）、または当業者に公知の他の方法によって、達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【0108】

複製起点は、代表的には、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、その起点は、宿主細胞においてそのベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数へのベクターの増幅は、いくつかの場合において、TEM7αポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、既知の配列に基づいて複製起点が化学合成され得、そしてそのベクター中に連結され得る。例えば、プラスミドpBR322（New England Biolabs, Beverly, MA）由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起点（例えば、SV40の起点、ポリオーマの起点、アデノウイルスの起点、水疱性口内炎ウイルス（VSV）の起点、またはパピローマウイルス（例えば、HPVもしくはBPV）の起点）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターには必要とされない（例えば、SV40起点は、初期プロモーターを含むという理由だけで、しばしば使用される）。

【0109】

転写終結配列は、代表的には、ポリペプチドコード領域の末端の3'側に位置し、そしてその転写終結配列は、転写を終結させる働きをする。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメント、続いてポリT配列である。この配列は、ライブラリーから容易にクローニングされるか、またはベクターの一部として市販さえされているが、この配列はまた、本明細書中に記載される方法のような核酸合成方法を使用して、容易に合成され得る。

【0110】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、（a）原核

10

20

30

40

50

生物宿主細胞に、抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるタンパク質をコードするか、（b）細胞の栄養要求性欠損を補うタンパク質をコードするか、あるいは（c）複合培地から入手可能ではない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0111】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生のために大いに要求される遺伝子が、組換え細胞の連続する世代の染色体においてタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、その選択圧下で、その形質転換体のみが、そのベクター中に存在する選択遺伝子によって生存するように独自に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子とTEM7 α ポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量のTEM7 α ポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

10

【0112】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてShine-Dalgarno配列（原核生物）またはKozak配列（真核生物）によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的には、発現されるべきTEM7 α ポリペプチドのプロモーターの3'側でありかつコード配列の5'側に位置する。そのShine-Dalgarno配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン（すなわち、高いA-G含量を有する）である。多くのShine-Dalgarno配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して容易に合成され得、そして原核生物ベクター中で使用され得る。

20

【0113】

リーダー配列すなわちシグナル配列は、宿主細胞から外へとTEM7 α ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、TEM7 α 核酸分子のコード領域に位置するか、または直接TEM7 α ポリペプチドコード領域の5'末端に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能性であるシグナル配列のいずれもが、TEM7 α 核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、TEM7 α 核酸分子に対して同種であっても（天然に存在しても）または異種であってもよい。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学合成され得る。多くの場合、シグナルペプチドの存在を介する宿主細胞からのTEM7 α ポリペプチドの分泌は、分泌されたTEM7 α ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。そのシグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはそのシグナル配列は、ベクター中に挿入されたTEM7 α 核酸分子の一部であり得る。

30

40

【0114】

TEM7 α ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなTEM7 α ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列、またはTEM7 α ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が、本発明の範囲内に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなTEM7 α ポリペプチドシグナル配列を認識せずプロセッシングしない原核生物宿主細胞のために、そのシグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、そのネイティブなTEM7

50

α ポリペプチドシグナル配列は、酵母インペルターゼ、 α 因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、このネイティブシグナル配列は十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0115】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいようないくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のプレ配列が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列を加え得、このことはまた、グリコシル化に影響し得る。最終タンパク質産物は、(成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して) -1 位に、発現に付随して1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、この1つ以上のさらなるアミノ酸は、完全に除去されていないかもしれない。例えば、その最終タンパク質産物は、アミノ末端に結合された、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、その酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合、所望のTEM7 α ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

10

【0116】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞(特に、哺乳動物宿主細胞)において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に、使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合に、TEM7 α 遺伝子内に天然に存在し得る。そのイントロンが遺伝子内に天然には存在しない場合(ほとんどのcDNAの場合)、そのイントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列およびTEM7 α 遺伝子に関するイントロンの位置は、そのイントロンが有効に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、TEM7 α cDNA分子が転写される場合、そのイントロンに好ましい位置は、転写開始部位の3'側でありかつポリA転写終結配列の5'側である。好ましくは、そのイントロンは、コード配列を中断しないように、そのcDNAの一方の側または他方の側(すなわち、5'側または3'側)に位置する。任意の供給源(ウイルス生物、原核生物および真核生物(植物または動物)を含む)由来の任意のイントロンが本発明を実行するために使用され得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞と適合性である。合成イントロンもまた、本明細書中に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンが、ベクター内で使用され得る。

20

30

【0117】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、そしてTEM7 α ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結された、プロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する、その構造遺伝子の開始コドンに対して上流(すなわち、5'側)に(一般的に、約100~1000bp内に)位置する非転写配列である。プロモーターは、従来、2つのクラス(誘導プロモーターおよび構成的プロモーター)のうちの1つに分類される。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくつかの変化(例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化)にตอบสนองして、その誘導プロモーターの制御下にあるDNAからの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成的プロモーターは、継続的な遺伝子産物産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対する制御がほとんど存在しないかまたは全く存在しない。多数のプロモーター(種々の潜在的な宿主細胞によって認識される)が、周知である。適切なプロモーターは、供給源のDNAからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクター中に挿入することによって、TEM7 α ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなTEM7 α プロモーター配列は、TEM7 α 核酸分子の増幅および/または発現に指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して発現タンパク質のより多い転写およびより高い収率が可能である場合、および使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

40

【0118】

50

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

【0119】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターもまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーが、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモーターは周知であり、そして限定されないが、ウイルス（例えば、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、ニワトリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス40 (SV40)）のゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0120】

TEM7 α 遺伝子発現を制御する際に興味深くあり得るさらなるプロモーターとしては、限定されないが、以下が挙げられる：SV40 初期プロモーター領域 (Bernois t および Chambon, 1981, Nature 290:304-10)；CMV プロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3' 長末端反復に含まれるプロモーター (Yamamoto ら、1980, Cell 22:787-97)；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner ら、1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:1444-45)；メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster ら、1982, Nature 296:39-42)； β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター (Villa-Kamaroff ら、1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75:3727-31)；または tac プロモーター (DeBoer ら、1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80:21-25)。組織特異性を示しかつトランスジェニック動物において利用されている、以下の動物転写制御領域もまた興味深い：膵臓腺房細胞において活性な、エラスターゼ I 遺伝子制御領域 (Swift ら、1984, Cell 38:639-46；Ornitz ら、1986 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986)；MacDonald、1987, Hepatology 7:425-515)；膵臓 β 細胞において活性な、インシュリン遺伝子制御領域 (Hanahan、1985, Nature 315:115-22)；リンパ球において活性な、免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl ら、1984, Cell 38:647-658；Adames ら、1985, Nature 318:533-38；Alexander ら、1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-44)；精巢細胞、乳房細胞、リンパ球細胞、および肥満細胞において活性な、マウス乳腺癌ウイルス制御領域 (Leder ら、1986, Cell 45:485-95)；肝臓において活性な、アルブミン遺伝子制御領域 (Pinker ら、1987, Genes and Devel. 1:268-76)；肝臓において活性な、 α -フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf ら、1985, Mol. Cell. Biol., 5:1639-48；Hammer ら、1987, Science 235:53-58)；肝臓において活性な、 α 1-抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelsey ら、1987, Genes and Devel. 1:161-171)；骨髄性細胞において活性な、 β -グロビン遺伝子制御領域 (Mogram ら、1985, Nature 315:338-40；Kollias ら、1986, Cell 46:89-94)；脳の稀突起神経膠細胞において活性な、ミエリン塩基性タンパク質遺伝

10

20

30

40

50

子制御領域 (Read headら、1987, Cell 48:703-12) ; 骨格筋において活性な、ミオシン軽鎖-2 遺伝子制御領域 (Sani、1985, Nature 314:283-86) ; ならびに視床下部において活性な、性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら、1986, Science 234:1372-1378)。

【0121】

エンハンサー配列は、高等真核生物による本発明のTEM7 α ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加させるように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシス作用エレメントである。エンハンサーは、比較的方向および位置に依存しない。これらは、転写単位に対して5'側および3'側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である (例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインシュリン)。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化に対する例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、TEM7 α 核酸分子に対して5'側または3'側の位置でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'側の部位に配置される。

10

【0122】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような出発ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望の隣接配列を含んでもよいし、含まなくてもよい。本明細書中に記載される隣接配列のうちの1つ以上がこのベクター内に予めない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。それぞれの隣接配列を得るために使用される方法は、当業者に周知である。

20

【0123】

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

30

【0124】

さらなる適切なベクターとしては、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるがこれらに限定されず、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPOTM TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA) のようなプラスミド、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはバキュロウイルス発現系のようなウイルスベクター (pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA) が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0125】

ベクターが構築され、そしてTEM7 α ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。TEM7 α ポリペプチドについての発現ベクターを、選

50

択された宿主細胞へ形質転換することは、以下の方法を含む周知の方法によって達成され得る：例えば、トランスフェクション法、感染法、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、DEAE-デキストラン法、または他の公知の方法。選択された方法は、部分的に、使用される宿主細胞の種類と相関関係にある。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、そしてこれらは、例えば、Sambrookら（前出）に示されている。

【0126】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞（例えば、*E. coli*）であっても、真核生物宿主細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞）であってもよい。宿主細胞は、適切な条件下で培養された場合、TEM7 α ポリペプチドを合成し、これは、引き続き、培養培地から収集され得る（宿主細胞がこれを培地に分泌する場合）か、またはこれを産生する宿主細胞から直接収集され得る（これが分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、種々の因子（例えば、所望の発現レベル、活性に望ましいかもしくは必要とされるポリペプチド修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）、および生物学的に活性な分子への折り畳みの容易さ）に依存する。

【0127】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA から入手可能である。例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、CHO DHFR⁽⁻⁾細胞 (Urlaubら、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 4216-20)、ヒト胚性腎臓 (HEK) 293細胞または293T細胞、あるいは3T3細胞のような哺乳動物細胞。適切な哺乳動物宿主細胞の選択、ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1およびCOS-7細胞株、およびCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長類細胞株および齧歯動物細胞株（形質転換細胞株を含む）が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞株、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠き得るか、または優性に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swiss、Balb-cまたはNIHマウスから誘導された3T3株、BHKまたはHakハムスター細胞株（これらは、ATCCから入手可能である）。これらの細胞株の各々は、タンパク質発現の当業者によって公知であり入手可能である。

【0128】

同様に、細菌細胞が、本発明に適切な宿主細胞として有用である。例えば、*E. coli*の種々の菌株（例えば、HB101、DH5 α 、DH10、およびMC1061）は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。*B. subtilis*、*Pseudomonas* spp.、他の*Bacillus* spp.、*Streptomyces* spp.などの種々の菌株がまた本方法において使用され得る。

【0129】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*および*Pichia pastoris*が挙げられる。

【0130】

さらに、所望される場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら、1993、*Biotechniques*, 14: 810-17; Lucklow、1993、*Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 564-72; およびLucklowら、1993、*J. Virol.*, 67: 4566-79に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (Invitrogen

10

20

30

40

50

en) である。

【0131】

グリコシル化TEM7 α ポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物（例えば、ウシまたはヤギ）を使用し、本発明のグリコシル化ポリペプチドをその動物の乳汁中に得ることができる。TEM7 α ポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、しかし、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0132】

（ポリペプチド産生）

TEM7 α ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養分を含む。E. coli細胞を培養するために適切な培地としては、例えば、Luria Broth (LB) および／または Terrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するために適切な培地としては、Roswell Park Memorial Institute 培地 1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM) および／または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要な血清および／または増殖因子を補充され得る。昆虫培養物についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および／またはウシ胎仔血清を補充したグレース培地である。

【0133】

代表的に、トランスフェクトまたは形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物として加えられる。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されたプラスミドに存在する選択マーカーエレメントによって指示される。例えば、選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に加えられる化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

【0134】

宿主細胞によって産生されるTEM7 α ポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、および／またはDNA結合ゲルシフトアッセイのような活性アッセイが挙げられる。

【0135】

TEM7 α ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計された場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、TEM7 α ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、これは、細胞質および／または核（真核生物宿主細胞について）に、あるいは、細胞質ゾル（グラム陰性細菌宿主細胞について）に存在する。

【0136】

宿主細胞細胞質および／または核（真核生物宿主細胞について）に位置するかあるいは細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に位置するTEM7 α ポリペプチドについて、細胞内物質（グラム陰性細菌について封入体を含む）が、当業者に公知の任意の標準的技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および／または超音波処理、それらに続く遠心分離によって、ペリプラズム／細胞質の中身を放出するように溶解され得る。

【0137】

TEM7 α ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、細胞内膜および／または細胞外膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後にペレ

10

20

30

40

50

ット物質において見出される。次いで、ペレット物質は、pH極限值で処理され得るか、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下でアルカリ性のpHにて、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下で酸性のpHにて、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理して、封入体を放出させ、分断させ、そして可溶化させ得る。次いで、可溶化したTEM7αポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。TEM7αポリペプチドを単離することが所望される場合、単離は、本明細書中およびMarstonら、1990、Meth. Enz., 182: 264-75に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

【0138】

いくつかの場合、TEM7αポリペプチドは、単離の際、生物学的に活性でなくてもよい。「再折り畳みする」、つまり、ポリペプチドをその三次構造に変換し、ジスルフィド結合を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、可溶化ポリペプチドをあるpH（通常7より上）および特定の濃度のカオトロピック剤（chaotropic）の存在下に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、封入体可溶化に使用される選択に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤はより低い濃度で使用され、可溶化に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。ほとんどの場合、再折り畳み／酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成においてジスルフィドシャフリングを生成させる。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン／シスタミン、グルタチオン（GSH）／ジチオビスGSH、塩化銅（II）、ジチオトレイトール（DTT）／ジチアンDTT、および2, 2-メルカプトエタノール（bME）／ジチオ-b（ME）が挙げられる。多くの場合、共溶媒が、再折り畳みの効率を増加するために使用され得るかまたは必要とされ得、この目的のために使用されるさらに一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

【0139】

封入体がTEM7αポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載される方法のような方法を使用して上清から単離され得る。

【0140】

溶液からのTEM7αポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。そのポリペプチドがそのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかに、ヘキサヒスチジンのようなタグを含む（TEM7αポリペプチド／ヘキサHis）かまたはFLAG（Eastman Kodak Co., New Haven, CT）もしくはmyc（Invitrogen, Carlsbad, CA）のような他の小さいペプチドを含むように合成されている場合、そのポリペプチドは、カラムマトリックスがそのタグに高い親和性を有するアフィニティークラムにその溶液を通すことによって、1工程のプロセスで精製され得る。

【0141】

例えば、ポリヒスチジンはニッケルに大きな親和性および特異性で結合する。従って、ニッケルのアフィニティークラム（例えば、Qiagen（登録商標）ニッケルカラム）が、TEM7αポリペプチド／ポリHisの精製に使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、10.11.8節、（Ausubelら編、Green Publishers Inc. およびWiley and Sons 1993）を参照のこと。

【0142】

さらに、TEM7αポリペプチドは、TEM7αポリペプチドに特異的を認識し得そして結合し得るモノクローナル抗体の使用を介して、精製され得る。

10

20

30

40

50

【0143】

精製に適切な他の手順としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）に続くゲル溶出、ならびに分取等電点電気泳動（*preparative isoelectric focusing*）（「Isoprime」マシーン／技術、Hoefer Scientific、San Francisco、CA）。いくつかの場合、2つ以上の精製技術が、純度の増大を達成するために組み合わせられ得る。

【0144】

TEM7 α ポリペプチドもまた、当該分野で公知の技術を使用して化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）により調製され得、その公知技術は、たとえば、Merrifieldら、1963、J. Am. Chem. Soc. 85:2149；Houghtenら、1985、Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132；ならびにStewartおよびYoung、Solid Phase Peptide Synthesis（Pierce Chemical Co.、1984）に示される技術である。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含んで合成され得るか、またはこれを含まずに合成され得る。化学合成されたTEM7 α ポリペプチドは、これらの参考文献に示される方法を使用して、ジスルフィド架橋を形成するように酸化され得る。化学合成されたTEM7 α ポリペプチドは、組換え産生されるかもしくは天然の供給源から精製された対応するTEM7 α ポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると予測され、従って、組換えTEM7 α ポリペプチドもしくは天然のTEM7 α ポリペプチドと互換可能に使用され得る。

【0145】

TEM7 α ポリペプチドを得る別の手段は、TEM7 α ポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および／または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、TEM7 α ポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたTEM7 α ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体を使用してモニターされ得る。

【0146】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、TEM7 α ポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:12297-303を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Roberts、1999、Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73もまた参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を発揮し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、オリゴヌクレオチドの不均一プールを生成する工程を包含し、このオリゴヌクレオチドは、それぞれが、5'ランダム化配列、中心予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる不均一プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の部分集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その部分集団から、所望の生物学的機能を発揮し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0147】

米国特許第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,723,323号；および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成され、この細胞によって、確率論的遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質が産生される。次いで、この宿主細胞はスクリーニングされて、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生す

るクローンが同定される。

【0148】

ペプチドまたはポリペプチドを産生するための別の方法は、Athersys, Inc. によって出願されたPCT/US98/20094 (WO99/15650)に記載される。これは、「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同組換えまたは非正統的(illegitimate)組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増大される。この標的DNAは、まず、照射に供せられ、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方に最終的に小休止を置き、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現を引き起こす。

【0149】

これらの方法はまた、包括的なTEM7 α ポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ(例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび生物全体のアッセイ(例えば、植物、マウスなど))において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0150】

(合成)

本明細書中に記載される核酸分子およびポリペプチド分子が、組換え手段および他の手段によって産生され得ることは、当業者によって認識される。

【0151】

(選択的結合因子)

用語「選択的結合因子」は、1以上のTEM7 α ポリペプチドに対して特異性を有する分子を言及する。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なTEM7 α ポリペプチド選択的結合因子は、TEM7 α ポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、このポリペプチドのTEM7 α ポリペプチドレセプターへの結合を阻害する。

【0152】

TEM7 α ポリペプチドを結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異性ポリクローナル抗体を含むポリクローナル抗体；モノクローナル抗体(MAb)；組換え抗体；キメラ抗体；ヒト化(例えば、相同性決定領域(CDR)グラフト化抗体；ヒト抗体；単鎖抗体；および／または二重特異性抗体；ならびにそれらのフラグメント；改変体；または誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、この抗体のうちのTEM7 α ポリペプチド上のエピトープに結合する部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって産生されたFabおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術(例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現)によって産生されたフラグメントが挙げられる。

【0153】

TEM7 α ポリペプチドに対して指向されるポリクローナル抗体は、一般に、TEM7 α ポリペプチドおよびアジュバントの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物(例えば、ウサギまたはマウス)において産生される。免疫される種において免疫原性であるキャリアタンパク質にTEM7 α ポリペプチドを結合させることは有用であり得、キャリアタンパク質は、キーホールリンベットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターである。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、この動物は採血され、そして血清を、抗TEM7 α 抗体力価についてアッセイする。

【0154】

TEM7 α ポリペプチドに対して指向されるモノクローナル抗体は、培養中の連続的な細胞株によって抗体分子を産生するために提供される任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するのに適切な方法の例としては、Kohlerら、1975、Nature 256:495-497のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor、1984、J. Immunol. 133:3001; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., 1987))が挙げられる。TEM7 α ポリペプチドと反応する、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。 10

【0155】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。1実施形態は、この重(H)鎖および／または軽(L)鎖の一部が、特定の種から誘導されるかまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかまたは相同性である一方で、この鎖の残りは、別の種から誘導されるかまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかまたは相同性である、「キメラ」抗体である。抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、このような抗体のフラグメントもまた含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855を参照のこと。 20

【0156】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および同第5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された1以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野で記載される方法(Jonesら、1986、Nature 321:522-25; Reichmannら、1998、Nature 332:323-327; Verhoevenら、1988、Science 239:1534-36)を使用して、齧歯動物の相補的決定領域(CDR)の少なくとも一部でヒトの抗体の対応する領域を置換することによって、実施され得る。 30

【0157】

TEM7 α ポリペプチドに結合するヒト抗体もまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリン産物の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物(例えば、マウス)を使用して、このような抗体は、TEM7 α ポリペプチド抗原(すなわち、少なくとも6個の連続アミノ酸を有する)(必要に応じて、キャリアに結合される)を用いて免疫することによって産生される。例えば、Jakobovitsら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci., 90:2551-55; Jakobovitsら、1993、Nature 362:255-58; Bruggemannら、1993、Year in Immunol. 7:33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、本明細書中の重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重鎖タンパク質および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物(この動物は、完全ではない相補体の改変を有する)は、全ての所望の免疫系の改変を有する動物を得るために交雑される。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト(むしろ、例えば、マウス)アミノ酸配列(このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である可変領域を含む)を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、PCT出願番号PCT/US91/245およびPCT/GB89/0 40 50

1207、ならびに欧州特許第546073B1号および同第546073A1号に記載される。ヒト抗体はまた、宿主細胞中の組換えDNAの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0158】

代替の実施形態において、ヒト抗体または、ファージディスプレイライブラリから産生され得る (Hoo genboomら, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marksら, 1991, J. Mol. Biol. 222:581)。これらのプロセスは、糸状のバクテリオファージの表面上の抗体レパートリーのディスプレイを介した免疫選択、および選択した抗原への結合によるファージの続く選択を模倣する。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これには、このようなアプローチを使用して、MPL-レセプターおよびmsk-レセプターに対する、高い親和性かつ機能的なアゴニスト抗体の単離が記載される。

10

【0159】

キメラ抗体、CDR移植抗体、およびヒト化抗体は、代表的に、組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載される材料および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）中で産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0160】

本発明の抗TEM7α抗体は、TEM7αポリペプチドの検出および定量のために、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ）（Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158頁（CRC Press, Inc., 1987））において使用され得る。これらの抗体は、使用されるアッセイ方法に適切な親和性でTEM7αポリペプチドに結合する。

20

【0161】

診断適用のために、特定の実施形態において、抗TEM7α抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを発生し得る任意の部分であり得る。例えば、この検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²⁵I、⁹⁹Tc、¹¹¹Inまたは⁶⁷Ga）、蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）；または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る（Bayerら, 1990, Meth. Enz., 184:138-63）。

30

【0162】

競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、TEM7αポリペプチド、またはその免疫学的に反応性の部分）が、限定された量の抗TEM7α抗体との結合に関して、試験サンプル検体（TEM7αポリペプチド）と競合する能力に依存する。試験サンプル中のTEM7αポリペプチドの量は、抗体に結合する標準の量と反比例する。結合する標準の量を決定するのを容易にするために、この抗体は、代表的には、競合の前または後に不溶化され、その結果、この抗体に結合する標準および検体は、結合しないままの標準および検体から好都合に分離され得る。

40

【0163】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用を代表的に含み、各々は、検出および／または定量される予定のタンパク質の異なる免疫原部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル分析物は、固体支持体上に固定された第1の抗体によって代表的に結合され、その後、第2の抗体が、この分析物に結合され、このようにして不可溶性の3部の複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、検出可能な部分でそれ自体標識され得るか（直接的な

50

サンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る(間接的なサンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)(この場合、検出可能な部分は、酵素である)である。

【0164】

抗TEM7 α 抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボでの画像化に有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物、好ましくは血流に投与され得、そして宿主中の標識された抗体の存在および位置が、アッセイされる。抗体は、核磁気共鳴、放射線医学、または当該分野において公知の他の検出手段のいずれによるかに関わらず、動物中で検出可能な任意の部分で標識され得る。

10

【0165】

抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、TEM7 α ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、それぞれ、増強または減少させるかのいずれかであるという点で、アゴニストまたはアンタゴニストである。1実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、TEM7 α ポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでTEM7 α ポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る、抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子(例えば、アンタゴニスト抗体)は、少なくとも約50%、そして好ましくは、少なくとも約80%、TEM7 α ポリペプチドの機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、TEM7 α ポリペプチド結合パートナー(リガンドまたはレセプター)と相互作用し得る抗TEM7 α のポリペプチド抗体であり得、これにより、インビトロまたはインビボにおいてTEM7 α ポリペプチド活性を阻害または排除する。アゴニストおよびアンタゴニストの抗TEM7 α ポリペプチド抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

20

【0166】

本発明はまた、生物学的サンプル中のTEM7 α 選択結合因子(例えば、抗体)およびTEM7 α ポリペプチドのレベルを検出するために有用な他の試薬を含むキットに関する。このような試薬は、検出可能な標識、ブロッキング血清、ポジティブコントロールサンプルおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬を含み得る。

【0167】

30

(マイクロアレイ)

DNAマイクロアレイ技術が、本発明に従って利用され得ることが理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体(例えば、ガラス)上に配置される核酸の、小型で高密度のアレイである。アレイ内の各セルまたはエレメントは、相補的な核酸配列(例えば、mRNA)とのハイブリダイゼーションのための標的として働く単一の核酸種の多数のコピーを含む。DNAマイクロアレイ技術を用いた発現プロファイリングにおいて、mRNAはまず、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素的に転換される。この物質は、このマイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAが洗浄によって除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各標的核酸分子に特異的に結合する標識されたcDNAの量を定量化することによって可視化される。このように、幾千もの遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットの並列様式で定量化され得る。

40

【0168】

このハイスループット発現プロファイリングは、以下を含むが、これらに限定されない、本発明のTEM7 α 分子に関する。広い範囲の適用を有する：治療のための標的としてのTEM7 α 疾患関連遺伝子の同定および検証；関連TEM7 α 分子およびそのインヒビターの分子毒物学；治療のための代理マーカーの集団および世代の階層化；ならびに、ハイスループットスクリーニングにおける選択的化合物の同定に役立つことによって向上する関連TEM7 α 低分子薬物発見。

【0169】

50

(化学的誘導体)

T E M 7 α ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、本明細書中に記載された開示を考慮して、当業者によって調製され得る。T E M 7 α ポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然に結合した分子の型または位置のいずれかにおいて異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の天然に結合した化学的な基の欠失によって形成される分子を含み得る。配列番号2もしくは配列番号4または他のT E M 7 α ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、それが結合するタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終生成物の調製物の治療学的用途のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。 10

【0170】

このポリマーの各々は、任意の分子量であり得、そして分枝であっても非分枝であってもよい。このポリマーの各々は、代表的に、約2 k D aと約100 k D aとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、いくつかの分子が示された分子量より多く、いくつかは少ない分子量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5 k D aと約50 k D aの間、より好ましくは、約12 k D aと約40 k D aとの間、そして最も好ましくは、約20 k D aと約35 D aとの間である。

【0171】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-結合型またはO-結合型の炭水化物、糖、ホスフェート、ポリエチレングリコール（P E G）（これは、モノー（ $C_1 - C_{10}$ ）のアルコキシポリエチレングリコール、またはアリアルオキシポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用されてきたP E Gの形態を含む）、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、約6 k Dの低分子量デキストラン）、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリー（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびポリビニルアルコール。共有結合したT E M 7 α ポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る二官能性架橋分子もまた、本発明に包括される。 30

【0172】

一般に、化学的誘導体化は、タンパク質と活性化ポリマー分子とを反応させるために用いられる任意の適切な条件下で実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に、（a）ポリペプチドと活性化ポリマー分子（例えば、反応性エステルまたはポリマー分子のアルデヒド誘導体）とを反応させる工程であって、配列番号2または配列番号4あるいはT E M 7 α ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドが、1つ以上のポリマー分子との結合する条件下で行われる、工程、および（b）反応生成物を得る工程、を包含する。最適反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、タンパク質に対するポリマー分子の比がより大きくなればなるほど、結合したポリマー分子の割合がより多くなる。1つの実施形態において、T E M 7 α ポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一のポリマー分子の部分を含み得る。例えば、米国特許第5, 234, 784号を参照のこと。 40

【0173】

ポリペプチドのペグ化は、当該分野で公知のペグ化反応のいずれかを使用して実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載される：F r a n c i s ら、1992, F o c u s o n G r o w t h F a c t o r s, 3: 4-10; 欧州特許第0154316および同第0401384; ならびに米国特許第4, 179, 337号。例えば、ペグ化は、本明細書において記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を 50

介して実施され得る。アシル化反応について、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。反応性アルデヒドは、例えば、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド（これは、水溶性である）であるか、またはモノC₁ - C₁₀ アルコキシもしくはそのアリアルオキシ誘導体である（米国特許第5, 252, 714号を参照のこと）。

【0174】

別の実施形態において、TEM7αポリペプチドは、ビオチンと化学的に結合し得る。次いで、ビオチン／TEM7αポリペプチド分子は、アビジンへの結合が可能となり、その結果、四価のアビジン／ビオチン／TEM7αポリペプチド分子を生じる。TEM7αポリペプチドはまた、ジニトロフェノール（DNP）またはトリニトロフェノール（TNP）に共有結合し得、そして得られた結合体は、抗DNPまたは抗TNP-IgMによって沈澱され10の結合価の十量体の結合体を形成し得る。

【0175】

一般に、本発明のTEM7αポリペプチド誘導体の投与によって緩和され得るかまたは調節され得る状態は、TEM7αポリペプチドについて本明細書において記載される状態を含む。しかし、本明細書において開示されるTEM7αポリペプチド誘導体は、誘導体化されていない分子と比較した場合、さらなる活性、増強した生物学的活性もしくは減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加した半減期もしくは減少した半減期）を有し得る。

【0176】

（遺伝子操作された非ヒト動物）

非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜）は、本発明の範囲内にさらに含まれ、ここで、ネイティブTEM7αポリペプチドをコードする遺伝子は、破壊（すなわち、「ノックアウト」）されており、その結果、TEM7αポリペプチドの発現レベルは、有意に減少するかまたは完全に消失する。このような動物は、米国特許第5, 557, 032号に記載されるような技術および方法を用いて調製され得る。

【0177】

本発明はさらに、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜）を含み、ここで、この動物についてのTEM7α遺伝子のネイティブな形態または異種TEM7α遺伝子のいずれかは、この動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5, 489, 743号およびPCT出願番号WO94/28122に記載されるような、周知の方法を用いて調製され得る。

【0178】

本発明はさらに、非ヒト動物を含み、ここで、本発明の1つ以上のTEM7αポリペプチドについてのプロモーターは、1つ以上のネイティブTEM7αポリペプチドの発現のレベルを変更するために、（例えば、相同組換え方法を用いることによって）活性化されるかまたは不活性化されるかのいずれかである。

【0179】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングのために用いられ得る。このようなスクリーニングにおいて、動物に対する薬物候補の影響が測定され得る。例えば、薬物候補は、TEM7α遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生されるTEM7αポリペプチドの量は、薬物候補への動物の曝露後、測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患または病的状態を生じる得るか、あるいは疾患または病的状態に関連し得る。このような場合、遺伝子の発現を減少させる薬物候補の能力または病的状態を予防もしくは抑制する薬物候補の能力を試験し得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の産生は、疾患または病的状態を生

10

20

30

40

50

じ得るか、あるいは疾患または病的状態に関連し得る。このような場合、このような代謝産物の産生を減少させる薬物候補の能力または病的状態を予防するかもしれない抑制する薬物候補の能力を試験し得る。

【0180】

(TEM7αポリペプチド活性の他のモジュレーターについてのアッセイ)

いくつかの状況において、TEM7αポリペプチドの活性のモジュレーターである分子(すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト)を同定することが所望され得る。TEM7αポリペプチドを調節する天然の分子または合成分子は、1つ以上のスクリーニングアッセイ(例えば、本明細書において記載されるアッセイ)を用いて同定され得る。このような分子は、エキソビボ様式、または注射もしくは経口送達、移植装置などによるインビボ様式のいずれかによって投与され得る。

【0181】

「試験分子」とは、TEM7αポリペプチドの活性を調節(すなわち、増加または減少)する能力についての評価されている分子をいう。最も一般的には、試験分子は、TEM7αポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまた、TEM7αポリペプチド活性を、例えば、TEM7α遺伝子発現に影響することによってか、またはTEM7αポリペプチド結合パートナー(例えば、レセプターまたはリガンド)に結合することによって、間接的に調節し得ることも企図される。1つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは約 10^{-8} M、より好ましくは約 10^{-9} M、そしてなおより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数で、TEM7αポリペプチドと結合する。

【0182】

TEM7αポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される、特定の実施形態において、TEM7αポリペプチドは、試験分子とTEM7αポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で、試験分子とともにインキュベートされ、そして相互作用の程度が測定され得る。試験分子は、実質的に精製された形態または粗混合物でスクリーニングされ得る。

【0183】

特定の実施形態において、TEM7αポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、TEM7αポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得る。TEM7αポリペプチド発現を調節する分子は、TEM7αポリペプチドをコードする核酸に相補的であるか、またはTEM7αポリペプチドの発現を指向するかまたは制御する核酸配列に相補的である核酸を含み、そしてこれらの核酸は、発現のアンチセンス調節因子として作用する。

【0184】

一旦、試験化合物がTEM7αポリペプチドと相互作用するとして同定されると、この分子は、TEM7αポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とTEM7αポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形式で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、溶液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、TEM7αポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてTEM7αポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するための1以上のアッセイによって決定される。

【0185】

試験分子とTEM7αポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むTEM7αポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0186】

TEM7αポリペプチドが、結合パートナー(例えば、レセプターまたはリガンド)との相互作用を介して生物学的活性を示す事象において、種々のインビトロアッセイが、対

応する結合パートナー（例えば、選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのTEM7αポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、その結合パートナーに対するTEM7αポリペプチドの結合の速度および／または程度を増加または減少させるその能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1つのアッセイにおいて、TEM7αポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中に固定化される。次いで、放射標識したTEM7αポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化したTEM7αポリペプチド結合パートナー）および試験分子は、このウェルに、一時に一方を（いずれかの順序で）または同時に添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して放射活性を計数し、結合パートナーがTEM7αポリペプチドに結合する程度を決定し得る。代表的に、分子は、ある濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1以上の要素を欠く一連のコントロールウェルが、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代わりは、タンパク質の「位置」を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対してTEM7αポリペプチド結合パートナーを固定化し、試験分子および放射標識したTEM7αポリペプチドと共にインキュベートし、そしてTEM7αポリペプチド結合の程度を決定する工程）を包含する。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、第18章（Ausubelら編、Green Publishers Inc., and, Wiley and Sons 1995）を参照のこと。

10

【0187】

20

放射性標識に対する代替として、TEM7αポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP））（これらは、比色定量的に検出され得る）に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。TEM7αポリペプチドまたはTEM7αポリペプチド結合パートナー（これらは、ビオチンに結合されている）に対する抗体はまた、APまたはHRPに連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーションに続いて、検出の目的のために使用され得る。

【0188】

30

TEM7αポリペプチドまたはTEM7αポリペプチド結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固相基材への付着によって固定化され得る。基材-タンパク質複合体は、相補的タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そしてTEM7αポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材-タンパク質複合体は、カラムを通過する試験分子および相補的タンパク質を用いてカラム内に固定化され得る。TEM7αポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。

40

【0189】

TEM7αポリペプチド結合タンパク質とTEM7αポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、BIAcoreアッセイシステム（Pharmacia, Piscataway, NJ））である。BIAcoreシステムは、製造業者によって指定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、TEM7αポリペプチドまたはTEM7αポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（これは、検出器中に位置する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補的タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補的

50

タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側に物理的に会合する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定される。

【0190】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、TEM7αポリペプチドとTEM7αポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける残りの工程は、本明細書中に記載される。

10

【0191】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、TEM7αポリペプチドとTEM7αポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0192】

TEM7αポリペプチドとTEM7αポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少される化合物はまた、TEM7αポリペプチドまたはTEM7αポリペプチド結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞システムを使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞システムは、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌ類もしくはげっ歯類の供給源由来である。TEM7αポリペプチドの、TEM7αポリペプチド結合パートナーをその表面で発現する細胞への結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、TEM7αポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

20

【0193】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、TEM7α遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるTEM7αポリペプチドまたはTEM7αポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

30

40

【0194】

（内部移行（internalize）タンパク質）

tatタンパク質配列（HIV由来）は、細胞にタンパク質を内部移行するために使用され得る。例えば、Fallwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91：664-68を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸配列（Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R：配列番号7）（「タンパク質伝達ドメイン」、またはTAT-PDTと呼ばれる）は、細胞の細胞膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら、Science、285：1569-72（1999）；およびNagaharaら、Nat. Med. 4：1449-52（1998）を参照のこと。これらの手順において、静脈投与後に組織

50

を貫く F I T C - 構築物 (F I T C 標識化 - G - G - G - G - Y - G - R - K - K - R - R - Q - R - R - R ; 配列番号 8) が、調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合は、蛍光活性化細胞ソーティング (F A C S) 分析によって検出される。t a t - β - g a l 融合タンパク質で処理された細胞は、 β - g a l 活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現は、多くの組織 (肝臓、腎臓、肺、心臓、および脳組織を含む) において検出され得る。これらの構築は、細胞への侵入のためにある程度のアンフォールディングを受け；細胞への侵入後にリフォールディングが必要とされ得ることが信じられている。

【0195】

従って、t a t タンパク質配列が所望のポリペプチドの細胞内へ内部移行するために使用され得ることは明白である。例えば、t a t タンパク質配列を使用して、T E M 7 α アンタゴニスト (例えば、抗 T E M 7 α 選択結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド) は、細胞内へ投与されて T E M 7 α 分子の活性を阻害し得る。本明細書中で使用される場合、用語「T E M 7 α 分子」は、本明細書中で規定されるような T E M 7 α 核酸分子および T E M 7 α ポリペプチドの両方をいう。所望の場合、T E M 7 α タンパク質自身はまた、これらの手順を使用して細胞内部に投与され得る。S t r a u s 、S c i e n c e , 2 8 5 : 1 4 6 6 - 6 7 (1 9 9 9) をまた参照のこと。

【0196】

(T E M 7 α ポリペプチドを使用する細胞供給源同定)

本発明の特定の実施形態に従って、T E M 7 α ポリペプチドに結合する特定の細胞型の供給源を決定し得ることは有用であり得る。例えば、適切な治療の選択における補助として疾患または病理学的状態の起源を決定することは、有用であり得る。特定の実施形態において、T E M 7 α ポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載される細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗 T E M 7 α ポリペプチド抗体を使用して、細胞における T E M 7 α ポリペプチドの存在について、従って、このような細胞が、本明細書中に記載される型の細胞であるかどうかを、試験し得る。

【0197】

(T E M 7 α ポリペプチド組成物および投与)

治療組成物は、本発明の範囲内である。このような T E M 7 α ポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量の T E M 7 α ポリペプチドまたは T E M 7 α 核酸分子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物で、含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の 1 以上の T E M 7 α ポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物で、含み得る。

【0198】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0199】

薬学的組成物は、例えば、p H、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、におい、無菌性、安定性、溶解もしくは放出の速度、吸着、または組成物の浸透を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸 (例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン)、抗菌剤、抗酸化剤 (例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム (s o d i u m h y d r o g e n - s u l f i t e))、緩衝液 (例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、T r i s - H C l、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸)、バルキング剤 (例えば、マンニトールまたはグリシン)、キレート剤 (例えば、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A))、錯化剤 (例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル β -シクロ

10

20

30

40

50

デキストリン)、フィラー(充填剤)、単糖類、二糖類、および他の炭水化物(例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン)、タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン)、着色剤、香味剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン)、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン(例えば、ナトリウム)、保存剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン(TEM7α or hexidine)、ソルビン酸、または過酸化水素)、溶媒(例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール)、糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール)、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤(例えば、プルオニック(pluronic); PEG; ソルビタンエステル; ポリソルベート(例えば、ポリソルベート20またはポリソルベート80); トリトン; トロメタミン; レシチン; コレステロールまたはチロキサポール(tyloxapal))、安定性増強剤(例えば、スクロースまたはソルビトール)、張度増強剤(例えば、ハロゲン化アルカリ金属(好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム)、またはマンニトールソルビトール)、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的アジュバント)。Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版, A. R. Gennaro編, Mack Publishing Company 1990)。

【0200】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、TEM7α分子の物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【0201】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、本質的には、水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、適切なビヒクルまたはキャリアは、注射用の水、生理食塩水溶液または人工脳脊髄液であり得、これらは、非経口投与のための組成物において一般的な他の材料で補充され得る。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH7.0~8.5のTris緩衝液または約pH4.0~5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な代用物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、TEM7αポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出)と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、TEM7αポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

【0202】

このTEM7αポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達(例えば、経口的)のために選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術の範囲内にある。

【0203】

処方成分は、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたはわずかにより低いpH(典型的に、約5~約8のpH範囲内)でこの組成物を維持するために使用される。

【0204】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクル中に所望のTEM7α分子を含む、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水

であり、ここで、TEM7 α 分子は、滅菌の等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物としては、その産物の制御性放出または持続性放出を提供する、注射可能なミクロスフェア、生分解性 (bio-erodible) 粒子、ポリマー化合物 (例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸)、ビーズ、またはリポソームのような因子と、所望の分子との処方物が挙げられ得、これは、次いで、蓄積注射を介して送達され得る。ヒアルロン酸もまた使用され得、そしてこれは、循環中の持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段としては、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

【0205】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、TEM7 α ポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。TEM7 α ポリペプチドまたはTEM7 α 核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧剤と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与は、PCT公開番号WO 94/20069にさらに記載され、これは、化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

10

【0206】

特定の処方物が、経口投与され得ることもまた意図される。本発明の1つの実施形態において、この様式で投与されるTEM7 α ポリペプチドは、固体投薬形態 (例えば、錠剤およびカプセル) の調合において慣用的に使用されるこれらのキャリアを伴うかまたは伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化されそして前全身性分解 (pre-systemic degradation) が最小化される場合、胃腸管内にある時点でその処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、TEM7 α ポリペプチドの吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、香料、低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤 (バインダー) もまた使用され得る。

20

【0207】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のTEM7 α ポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：不活性な希釈剤 (例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、またはリン酸カルシウム)；あるいは結合剤 (例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア)；あるいは滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク)。

30

【0208】

さらなるTEM7 α ポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、これらには、持続性送達処方物または制御性送達処方物中にTEM7 α ポリペプチドを含む処方物が挙げられる。種々の他の持続送達手段または制御送達手段 (例えば、リポソームキャリア、生分解性微粒子もしくは多孔性ビーズ) の処方および蓄積注射のための技術もまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US93/00829 (これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性微粒子の制御された放出を記載する) を参照のこと。

40

【0209】

持続性放出調製物のさらなる例としては、成形品の形態 (例えば、フィルム、またはマイクロカプセル) の半透過性ポリマーマトリクスが挙げられる。持続性放出マトリクスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド (米国特許第3,773,919号、欧州特許第058481号)、L-グルタミン酸と γ -エチルーL-グルタメートとのコポリマー (Sidmanら, Biopolymers 22:547-56, (1983))、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート) (Langerら, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, (1981)) および Langer, Chem. Tech. 12:98-105, (1982))、エチレンビニルアセテート (Langerら, 前出) またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (欧州特許第133

50

988号)が挙げられ得る。持続性放出組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、E p p s t e i nら, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 82:3688-3692, (1985); 欧州特許第036676号; 同第088046号; 同第143949号を参照のこと。

【0210】

インビボ投与のために使用されるTEM7αの薬学的組成物は、代表的に、滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、これらの方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前後のいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液中で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器(例えば、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアル)内に配置される。

10

【0211】

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

【0212】

特定の実施形態において、本発明は、単回投与の投与単位を生成するためのキットに関する。これらのキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を備え得る。単一チャンバおよびマルチチャンバの予め充填されたシリンジ(例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ(l y o s y r i n g e))を備えるキットもまた、本発明の範囲内に含まれる。

20

【0213】

治療的に使用されるTEM7αの薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。従って、処置のための適切な投薬レベルが、送達される分子、TEM7α分子が使用される指標、投与の経路、ならびに患者のサイズ(体重、体表面、または器官のサイズ)および患者の状態(年齢および全身的な健康状態)に部分的に依存して変化することが、当業者に理解される。従って、臨床家は、最適な治療効果を得るために、投薬量を滴定(t i t e r)し得、そして投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約0.1 μg/kg~約100 mg/kgまでまたはそれを超える範囲にあり得る。他の実施形態において、投薬量は、0.1 μg/kg~約100 mg/kgまで; または1 μg/kg~約100 mg/kgまで; または5 μg/kg~約100 mg/kgまでの範囲であり得る。

30

【0214】

投薬の頻度は、使用される処方物中でのTEM7α分子の薬物動態学的パラメーターに依存する。典型的に、臨床家は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。従って、組成物は、単回投与として、長期にわたる2回以上の投与(これは、同じ量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい)として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そして当業者によって慣用的に実施される作業の範囲内にある。適切な投薬量は、適切な用量-応答データの使用を介して確認され得る。

40

【0215】

薬学的組成物の投与の経路は、公知の方法に従う: 例えば、経口的にか; 静脈内、腹腔内、大脳内(実質内)、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内または病巣内の経路による注射か、あるいは持続放出系もしくは移植デバイスによる。所望される場合、これらの組成物は、ボーラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

【0216】

50

あるいは、またはさらに、組成物は、膜、スポンジ、または所望の分子が吸収されるかもしくはカプセル化されている他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出 (time d - r e l e a s e) ポーラスまたは連続投与を介し得る。

【0217】

いくつかの場合において、エキソビボ様式において、TEM7αポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から取り出された細胞、組織または器官は、TEM7αポリペプチドの薬学的組成物に曝露され、その後これらの細胞、組織または器官は続いて患者に移植し戻される。

10

【0218】

他の場合において、TEM7αポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して、TEM7αポリペプチドを発現および分泌するように遺伝子操作された特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であり得、そして自己、異種 (heterologous)、または異種間 (xenogenic) であり得る。必要に応じて、細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半透性ポリマーの包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系によるかまたは周囲の組織由来の他の有害な因子による細胞の破壊を防止する。

20

【0219】

本明細書中で考察されるように、単離された細胞集団 (例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど) を、1以上のTEM7αポリペプチドで処置することが所望され得る。これは、細胞膜に対して透過性の形態のポリペプチドに、単離された細胞を直接曝すことによって達成され得る。

【0220】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法 (例えば、相同組換えおよび／または他の組換え産生方法) に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写的にサイレントなTEM7α遺伝子 (すなわち、過少発現される遺伝子) を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のTEM7αポリペプチドを発現する細胞を産生する。

30

【0221】

相同組換えは、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または矯正するように遺伝子を標的化するために元々開発された技術である (Kucherlapati, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol., 36:301, 1989)。この基本的技術は、特定の変異を、哺乳動物ゲノムの特定の領域へ導入するための方法として (Thomasら, Cell, 44:419-428, 1986; ThomasおよびCapeocchi, Cell, 51:503-512, 1987; Doetschmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85:8583-8587, 1988)、または欠損遺伝子内の特定の変異を矯正するための方法として (Doetschmanら, Nature, 330:576-578, 1987) 開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5, 272, 071号、欧州特許第9193051号、および同第505500号; PCT/US90/07642、ならびに国際公開番号 WO 91/09955に記載される。

40

【0222】

相同組換えを介して、ゲノム中に挿入されるべきDNA配列は、標的化DNAにこのDNA配列を結合することによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的化DNAは、ゲノムDNA領域に相補的である (相同である) ヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に相補的である標的化DNAの小片は、DNA複製プロセスの間に親

50

鎖との接触下に置かれる。共有される相同領域を介して内因性DNAの他の小片とハイブリダイズし、そして従って、組み換わることは、細胞内に挿入されたDNAの一般的な特性である。この相補鎖が、変異配列もしくは異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに結合された場合、これもまた、新たに合成された鎖に組換えの結果として組み込まれる。プルーフリーディング機能の結果として、この新たなDNA配列が、テンプレートとして作用することが可能である。このように、この移入されたDNAは、ゲノム内に組み込まれる。

【0223】

TEM7 α ポリペプチドと相互作用し得るかまたはTEM7 α ポリペプチドの発現を制御し得るDNA領域（例えば、隣接配列）が、標的化DNAのこれらの小片に結合される。例えば、プロモーター／エンハンサーエレメント、サプレッサーまたは外因性転写調節エレメントが、所望のTEM7 α ポリペプチドをコードするDNAの転写に影響を与えるに十分に近位でかつ十分な方向で、その意図される宿主細胞のゲノムに挿入される。制御エレメントは、宿主細胞ゲノム中に存在するDNAの一部を制御する。従って、所望のTEM7 α ポリペプチドの発現は、TEM7 α 遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、むしろDNA調節セグメントと結合された標的化DNA（その目的の内因性遺伝子と相同な領域を含む）の使用によって達成され得、この調節セグメントは、TEM7 α 遺伝子の転写について認識可能なシグナルを、その内因性遺伝子配列に提供する。

10

【0224】

例示的な方法において、細胞内の所望の標的化された遺伝子（すなわち、所望の内因性の細胞遺伝子）の発現は、少なくとも調節配列、エキソンおよびスプライスドナー部位を含むDNAの導入による、予め選択された部位でのその細胞ゲノムへの相同組換えを介して変更される。これらの成分は、実際には、これらの成分が、新たな転写単位の産生を生じる（ここで、そのDNA構築物中に存在する調節配列、エキソンおよびスプライスドナー部位が、内因性遺伝子に作動可能に連結される）このような様式で染色体（ゲノム）DNA中に導入される。染色体DNAへのこれらの成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変更される。

20

【0225】

本明細書中に記載されるように、変更された遺伝子発現は、得られたときの細胞において通常サイレントな（発現されない）遺伝子を活性化すること（または発現されるのを引き起こすこと）、ならびに得られたときの細胞において生理学的に有意なレベルで発現されない遺伝子の発現を増大させることを包含する。この実施形態はさらに、得られたときの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なるように調節または誘導のパターンを変更すること、ならびに得られたときの細胞において発現される遺伝子の発現を減少させること（除去することを含む）を包含する。

30

【0226】

相同組換えを用いて、細胞の内因性TEM7 α 遺伝子からのTEM7 α ポリペプチド産生を増大させ得るかまたは生じさせ得る1つの方法は、第1に、相同組換えを用いて部位特異的組換え系（例えば、Cre/loxP、FLP/FRT）（Sauer, Curr. Opin. Biotechnol., 5:521-527, 1994; Sauer, Methods Enzymol., 225:890-900, 1993）由来の組換え配列を、細胞の内因性ゲノムTEM7 α ポリペプチドコード領域の上流に（すなわち、5'側に）配置することを含む。ゲノムTEM7 α ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に相同な組換え部位を含むプラスミドは、この改変された細胞株に、適切なリコンビナーゼ酵素と共に導入される。このリコンビナーゼは、このプラスミドを、プラスミドの組換え部位を介して、その細胞株におけるゲノムTEM7 α ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込ませる（BaubonisおよびSauer, Nucleic Acids Res., 21:2025-2029, 1993; O'Gormanら, Science, 251:1351-1355, 1991）。転写を増

40

50

大させることが公知の任意の隣接配列（例えば、エンハンサー／プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド内に適切に配置された場合に、新たな転写単位または改変された転写単位を作製するような様式で組み込み、この細胞の内因性 T E M 7 α 遺伝子からの新規の T E M 7 α ポリペプチド産生または増大した T E M 7 α ポリペプチド産生を生じる。

【0227】

部位特異的な組換え配列がその細胞の内因性ゲノム T E M 7 α ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するためのさらなる方法は、相同組換えを使用して、第2の組換え部位を、この細胞株のゲノムの他の箇所に導入することである。次いで、適切なリコンビナーゼ酵素が、この2つの組換え部位の細胞株に導入されて、これが、組換え事象（欠失、反転、転移）を引き起こす（Sauer, Curr. Opin. Biotechnol., 5:521-27, 1994; Sauer, Methods Enzymol., 225:890-900, 1993）。この組換え事象は、新たな転写単位または改変された転写単位を作製し、この転写単位が、この細胞の内因性 T E M 7 α 遺伝子からの新規の T E M 7 α ポリペプチド産生または増加した T E M 7 α ポリペプチド産生を生じる。

10

【0228】

細胞の内因性 T E M 7 α 遺伝子からの T E M 7 α ポリペプチドの発現を増加させるかまたは引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内因性 T E M 7 α 遺伝子からの新規の T E M 7 α ポリペプチド産生または増加した T E M 7 α ポリペプチド産生を生じる様式で、ある遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増加させるかもしくは引き起こすこと、および／またはある遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサー）の発現を減少させることを包含する。この方法は、細胞の内因性 T E M 7 α 遺伝子からの新規の T E M 7 α ポリペプチド産生または増加した T E M 7 α ポリペプチド産生が生じるように、天然には存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的 D N A 結合ドメインを含むポリペプチド）をその細胞に導入することを包含する。

20

【0229】

本発明はさらに、標的遺伝子発現を変更する方法において有用な D N A 構築物に関する。特定の実施形態において、例示的 D N A 構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）調節配列、（c）エキソン、および（d）不對スプライシングドナー部位。D N A 構築物中の標的配列は、細胞内の標的遺伝子中に要素（a）～（d）の組み込みを指向し、その結果、要素（b）～（d）は、内因性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、D N A 構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）調節配列、（c）エキソン、（d）スプライシングドナー配列、（e）イントロン、および（f）スプライシングアクセプター部位（ここで、この標的配列は、要素（a）～（f）の組み込みを指向し、その結果、（b）～（f）の要素は、内因性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同組換えが生じる細胞内染色体 D N A における予め選択された部位に相同である。対照的に、エキソンは、一般に調節配列の 3' であり、そしてスプライシングドナー部位は、エキソンの 3' である。

30

40

【0230】

特定の遺伝子の配列が公知の場合、例えば、本明細書中に示される T E M 7 α ポリペプチドの核酸配列（その遺伝子の選択された領域に相補的な D N A 小片）は、合成され得るか、またはさもなくば、例えば、目的の領域に結合する特定の認識部位でネイティブな D N A の適切な制限によって取得され得る。この小片は、細胞内での挿入の際に標的配列として働き得、そしてゲノム内のその相同領域内にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが D N A 複製中に生じる場合、この D N A 小片、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、岡崎フラグメントとして働き、そして新たに合成された D N A 娘鎖に組み込まれる。よって、本発明は、標的配列として使用され得る、T E M 7 α ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む。

50

【0231】

TEM7 α ポリペプチド細胞治療（例えば、TEM7 α ポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた企図される。この実施形態は、TEM7 α ポリペプチドの生物学的活性型を合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このようなTEM7 α ポリペプチド産生細胞は、TEM7 α ポリペプチドの天然の生産者である細胞であり得るか、または所望のTEM7 α ポリペプチドをコードする遺伝子またはTEM7 α ポリペプチドの発現を増加させる遺伝子での形質転換によってTEM7 α ポリペプチドを産生する能力が増加された組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子の送達ならびにその発現および分泌の促進に適切なベクターによって達成され得る。TEM7 α ポリペプチドを投与された患者において潜在的免疫学的反応を最小化するために、外来種のポリペプチドの投与で生じ得るように、TEM7 α ポリペプチドを産生する天然の細胞がヒト起源でありかつヒトTEM7 α ポリペプチドを産生することが、好ましい。同様に、TEM7 α ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトTEM7 α ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されていることが、好ましい。

【0232】

移植された細胞は、周囲の組織の浸潤を避けるためにカプセル化され得る。ヒト細胞または非ヒト動物細胞は、TEM7 α ポリペプチドの放出を可能にするが患者の免疫系または周辺組織からの他の有害因子による細胞の崩壊を防ぐ生体適合性、半透過性のポリマー性封入物または膜中で患者に移植され得る。あるいは、形質転換されてTEM7 α ポリペプチドをエキソビボで産生する患者自身の細胞は、このようなカプセル化なしで患者に直接移植され得る。

【0233】

生細胞のカプセル化のための技術は、当該分野において公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製および患者におけるその移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgeら（PCT公開番号WO95/05452およびPCT/US94/09299）は、生物学的活性分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、容易に回収可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主への移植の際にインビボでのダウンレギュレーションに供されないプロモーターに作動可能に連結された生物学的活性分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、生細胞からレシピエント内の特定部位への分子送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同5,106,627号を参照のこと。生細胞をカプセル化するための系は、PCT公開番号WO91/10425（Aebischerら）に記載される。また、PCT公開番号WO91/10470（Aebischerら）；Winnら、1991、Exper. Neurol. 113:322-29；Aebischerら、1991、Exper. Neurol. 111:269-75；およびTrescoら、1992、ASAIO 38:17-23を参照のこと。

【0234】

インビボおよびインビトロでのTEM7 α ポリペプチドの遺伝子治療送達がまた想定される。遺伝子治療技術の1例は、「遺伝子治療DNA構築物」を形成するように構成性プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結され得る、TEM7 α ポリペプチドをコードするTEM7 α 遺伝子（ゲノムDNA、cDNA、および／または合成DNAのいずれか）を使用することである。このプロモーターは、この構築物が挿入される細胞型または組織型中で活性である限り、内因性TEM7 α 遺伝子に相同であっても非相同であってもよい。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されたDNA分子（例えば、相同組換えに有用な内因性配列）、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を超える選択的利点を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化のための）、細胞特異的内部移行因子、ベクターからの発現を増強する転写因子、ならびにベクター産生を可能にする因

子を含み得る。

【0235】

次いで、遺伝子治療DNA構築物は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して（エキソビボまたはインビボのいずれかで）細胞に導入され得る。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの手段は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターによる。特定のベクター（例えば、レトロウイルスベクター）は、DNA送達物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてその遺伝子は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質内に残存する。

【0236】

なお他の実施形態において、調節エレメントは、標的細胞中でのTEM7 α 遺伝子の制御された発現のために含まれ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応じてオンにされる。この様式において、所望される場合、治療的ポリペプチドが発現され得る。1つの慣用的制御手段としては、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性化タンパク質）を二量体化するための低分子二量体化因子（dimerizer）またはラパログ（rapalog）の使用を含む（PCT公開番号WO96/41865、WO97/31898およびWO97/31899を参照のこと）。タンパク質の二量体化を使用して、導入遺伝子の転写を開始し得る。

【0237】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を凝集体またはクラスターとして細胞内で貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、小胞体内で凝集したタンパク質の残留を生じる条件付き凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。この貯蔵されたタンパク質は、細胞内で安定かつ不活性である。しかし、タンパク質は、この条件付き凝集ドメインを除去しこれにより凝集体またはクラスターを特異的に分離する薬物（例えば、低分子リガンド）の投与によって放出され得、その結果このタンパク質は細胞から放出される。Aridorら、2000、Science 287:816-17、およびRiveraら、2000、Science 287:826-30を参照のこと。

【0238】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中に記載される系が挙げられるがこれらに限定されない。Mifepristone（RU486）は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストに対する結合は、2つの転写因子のダイマーの形成によって転写を活性化し、次いで、DNAを結合するために核内に入る。リガンド結合ドメインは、天然のリガンドに結合するためのレセプターの能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第5,364,791号ならびにPCT公開番号WO96/40911およびWO97/10337に記載される。

【0239】

なお別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合しそしてこれを活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは、核内へ移行して特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）を結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するために、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、およびリガンド結合ドメインを含む。エクジソン系はさらに、米国特許第5,514,578号ならびにPCT公開番号WO97/38117、WO96/37609およびWO93/03162に記載される。

【0240】

別の制御手段は、ポジティブにテトラサイクリン制御可能なトランスアクチベーターを使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異されたtetレプ

10

20

30

40

50

レッサータンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランスアクチベータータンパク質（すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する）を生じる変異されたtet R-4アミノ酸変化）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号、同第5,654,168号に記載される。

【0241】

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

【0242】

インビボでの遺伝子治療は、TEM7α核酸の局所注射を介してか、あるいは他の適切なウイルス性送達ベクターまたは非ウイルス性送達ベクターによってTEM7αポリペプチドをコードする遺伝子を細胞内に導入することによって、達成され得る。Heflitz 1994, Neurobiology 25:1418-35。例えば、TEM7αポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに含まれ得る（例えば、Johnson, PCT公開番号WO95/34670; PCT出願番号PCT/US95/07178を参照のこと）。組換えAAVゲノムは、典型的には、機能的プロモーター配列およびポリアデニル化配列に作動可能に連結された、TEM7αポリペプチドをコードするDNA配列に隣接するAAV逆(inverted)終末反復を含む。

10

20

【0243】

代替の適切なウイルスベクターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レンチウイルスベクター、肝炎ウイルスベクター、パルボウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、コロナウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、およびパピローマウイルスベクター。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含むインビボでのウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するようにインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、治療タンパク質を有する患者を提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術を実施するためのさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号（アデノウイルスベクターに関する）、同第5,672,510号（レトロウイルスベクターに関する）、同第5,635,399号（サイトカインを発現するレトロウイルスベクターに関する）に記載される。

30

【0244】

非ウイルス性送達法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：リポソーム媒介移入、裸のDNA送達（直接注入）、レセプター媒介移入（リガンド-DNA複合体）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、および微小粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃）。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、以下が挙げられ得る：誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサープロモーター、部位特異的組込みのために設計されたDNA配列、親細胞を超える選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全手段）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のための）、細胞特異的内部移行因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクター製造法。遺伝子治療技術の実施のためのこのようなさらなる方法および材料は、以下に記載される：米国特許第4,970,154号（エレクトロポレーション技術に関する）、同第5,679,559号（遺伝子送達のためのリポタンパク質を含む系を記載する）、同第5,676,954号（リポソームキャリアに関する）、同第5,593,875号（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する）、および同第4,945,050号（プロセス（ここで、生物学的に活性な粒子が、ある速度で細胞にて推進され、これによりこの粒子が細

40

50

胞の表面を貫通しそして細胞の内部へ組み込まれる)を記載する)およびPCT公開番号WO 96/40958(核リガンドに関する)。

【0245】

TEM7αの遺伝子治療または細胞治療はさらに、同一または異なる細胞内への1つ以上のさらなるポリペプチドの送達を含み得ることがまた企図される。このような細胞は、患者へ別々に導入され得るか、またはこの細胞は、単一の移植可能なデバイス(例えば、上記のカプセル化膜)に含まれ得るか、またはこの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0246】

遺伝子治療によって細胞内で内因性TEM7αポリペプチド発現を増加させる手段は、TEM7αポリペプチドプロモーター内に1つ以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、TEM7α遺伝子の転写活性を増加させるように働き得る。使用したこのエンハンサーエレメントは、遺伝子が活性化されることが望まれる組織に基いて選択され、この組織でプロモーター活性を付与することが知られているエンハンサーエレメントが選択される。例えば、TEM7αポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞内で「オンされる」場合、Ickプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、添加されるべき転写エレメントの機能的部分が、標準的なクローニング技術を使用してTEM7αポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに(そして必要に応じて、ベクター、ならびに/あるいは配列の5'隣接配列および/または3'隣接配列に)挿入され得る。次いで、「相同組換え構築物」として知られるこの構築物は、エキソビボまたはインビボのいずれかで所望の細胞に導入され得る。

10

20

【0247】

遺伝子治療をまた使用して、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによってTEM7αポリペプチド発現を減少し得る。このような改変は、典型的には、相同組換え法を介して達成される。例えば、活性化について選択されたTEM7α遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーターの小片を除去および/または置換するように操作され得る。例えば、TATAボックスおよび/またはプロモーターの転写アクチベーターの結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得る；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得これにより対応するTEM7α遺伝子の転写を抑制し得る。プロモーター中のTATAボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、(調節されるべきTEM7α遺伝子として、同一種または関連種由来の)TEM7αポリペプチドプロモーターの全てまたは関連部分を含むDNA構築物を作製することによって達成され得、ここで、1つ以上のTATAボックスおよび/または転写アクチベーター結合部位ヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および/または挿入を介して変異される。結果として、TATAボックスおよび/またはアクチベーター結合部位は、減少した活性を有するか、または完全に不活性にされる。この構築物(これはまた、典型的には、改変されたプロモーターセグメントにネイティブな(内因性の)隣接する5'DNA配列および3'DNA配列に対応する少なくとも約500塩基のDNAを含む)は、(エキソビボまたはインビボのいずれかで)直接的にかまたは本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介してかのいずれかで適切な細胞内に導入され得る。典型的には、細胞のゲノムDNAへの構築物の組込みは、相同組換えを介し、ここで、プロモーター構築物中の5'DNA配列および3'DNA配列は、内因性染色体DNAへのハイブリダイゼーションを介する改変されたプロモーター領域の組込みを補助するように働き得る。

30

40

【0248】

(治療用途)

TEM7αの核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストを使用して、多くの疾患、障害または状態(本明細書中に列挙されるものを含む)を処置、診断、改善または予防し得る。

50

【0249】

TEM7 α ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストとしては、TEM7 α ポリペプチド活性を調節し、そしてTEM7 α ポリペプチドの成熟形態の少なくとも1つの活性を増加または減少させる分子を含む。アゴニストまたはアンタゴニストは、TEM7 α ポリペプチドと相互作用しそれによりその活性を調節する補因子（例えば、タンパク質、ペプチド、炭化水素、脂質、または低分子）であり得る。潜在的なポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストとしては、TEM7 α タンパク質の細胞外ドメインの一部または全てを含むTEM7 α ポリペプチドの可溶性形態または膜結合形態のいずれかと反応する抗体が挙げられる。TEM7 α ポリペプチド発現を調節する分子としては、典型的には、発現のアンチセンス調節因子として働き得る、TEM7 α ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。 10

【0250】

TEM7の発現は、結腸直腸腫瘍における血管の内皮コンパートメント中に検出された（St. Croixら、2000、Science 289:1197-202）。よって、TEM7 α ポリペプチドは、原発性腫瘍および転移性腫瘍における新脈管形成の調節において役割を担い得る。よって、TEM7 α の核酸分子、ポリペプチド、それらのアゴニストおよびアンタゴニスト（抗TEM7 α 選択的結合因子が挙げられるが、これに限定されない）は、癌疾患の処置または診断についての代理マーカーとして有用である。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：結腸直腸癌、乳癌、肺癌、胃癌、前立腺癌および肝癌。他の原発性癌疾患および転移性癌疾患は、本発明の 20 範囲内に含まれる。

【0251】

TEM7 α ポリペプチドはまた、炎症性疾患における新脈管形成の制御において役割を担い得る。よって、TEM7 α の核酸分子、ポリペプチド、これらのアゴニストおよびアンタゴニスト（抗TEM7 α 選択的結合因子を含むがこれに限定されない）は、炎症性疾患の処置または診断に有用であり得る。このような疾患の例としては、慢性関節リウマチおよび炎症性腸疾患が挙げられるがこれらに限定されない。他の炎症性疾患は、本発明の範囲内に含まれる。

【0252】

TEMポリペプチド（TEM7を含む）はまた、肺において検出された（例えば、St. Croixら、2000を参照のこと）。よって、TEM7 α の核酸分子、ポリペプチド、これらのアゴニストおよびアンタゴニスト（TEM7 α 選択的結合因子を含むが、これに限定されない）は、肺に関与する疾患の処置または診断に有用であり得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：喘息、気管支痙攣、および急性呼吸窮迫症候群。肺に関連する他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。 30

【0253】

TEMポリペプチド（TEM7を含む）はまた、心臓において検出された（例えば、St. Croixら、2000を参照のこと）。よって、TEM7 α の核酸分子、ポリペプチド、これらのアゴニストおよびアンタゴニスト（TEM7 α 選択的結合因子を含むが、これに限定されない）は、心臓に関与する疾患の処置または診断に有用であり得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：不整脈、アンギナ、高血圧、心筋梗塞およびうっ血性心不全。心臓に関連する他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。 40

【0254】

TEMポリペプチド（TEM7を含む）はまた、腎臓において検出された（例えば、St. Croixら、2000を参照のこと）。よって、TEM7 α の核酸分子、ポリペプチド、これらのアゴニストおよびアンタゴニスト（TEM7 α 選択的結合因子を含むが、これに限定されない）は、腎臓に関与する疾患の処置または診断に有用であり得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：多発性嚢胞腎疾患、および急性腎不全。腎臓に関連する他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。 50

【0255】

TEM7 α ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、処置されるべき状態に適切のように1つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および／または化学療法剤と組合わせて（同時にかまたは連続して）使用され得る。

【0256】

所望されないレベルのTEM7 α ポリペプチドによって生じるかまたは媒介される他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。所望されないレベルとしては、過剰レベルのTEM7 α ポリペプチドおよび正常未満レベルのTEM7 α ポリペプチドが挙げられる。

【0257】

（TEM7 α 核酸およびTEM7 α ポリペプチドの使用）

10

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）を使用して、TEM7 α 遺伝子および関連遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーションのような、当該分野において公知の技術によって行われ得る。

【0258】

TEM7 α 核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、哺乳動物組織または体液サンプル中のTEM7 α 核酸分子の存在について定性的または定量的のいずれかで試験するための診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0259】

20

他の方法はまた、1つ以上のTEM7 α ポリペプチドの活性を阻害することが好ましい場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列（三重ヘリックス形成）またはTEM7 α mRNAに相補的かつこれらにハイブリダイズする核酸分子によって影響され得る。例えば、TEM7 α 遺伝子の少なくとも一部に相補的な配列を有するアンチセンスDNA分子またはアンチセンスRNA分子が、細胞内に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるTEM7 α 遺伝子の配列を使用して利用可能な技術によって設計され得る。典型的には、このようなアンチセンス分子の各々は、選択されたTEM7 α 遺伝子の各々の開始部位（5'末端）に相補的である。次いで、アンチセンス分子が対応するTEM7 α mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳は、阻止されるかまたは減少される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物中のTEM7 α ポリペプチドの減少または非存在に関する情報を提供する。

30

【0260】

あるいは、1つ以上のTEM7 α ポリペプチドの優性ネガティブインヒビターを作製するために、遺伝子治療が使用され得る。この状況において、本明細書中に記載されるようなウイルス法または非ウイルス法のいずれかを使用して、選択されたTEM7 α ポリペプチド各々の変異ポリペプチドをコードするDNAが調製され得、そして、患者の細胞中に導入され得る。このような変異の各々は、典型的には、その生物学的役割において内因性ポリペプチドと競合するように設計される。

【0261】

さらに、（生物学的に活性またはそうでない）TEM7 α ポリペプチドは、免疫原として使用され得、すなわち、このポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。（本明細書中に記載されるような）TEM7 α ポリペプチドに結合する選択的結合因子が、体液または細胞サンプル中のTEM7 α ポリペプチドの存在を検出するために標識された形態における使用を含むが、これに限定されない、インビボ診断目的およびインビトロ診断目的のために使用され得る。抗体をまた使用して、多くの疾患および障害（本明細書中に列挙されるものを含む）を予防、処置または診断し得る。抗体は、TEM7 α ポリペプチドに特徴的な活性の少なくとも1つを減少またはブロックするように、TEM7 α ポリペプチドに結合し得るか、またはTEM7 α ポリペプチドに特徴的な活性の少なくとも1つを増加する（TEM7 α ポリペプチドの薬物動態学を増加させることを含む）ようにポリペプチドに結合し得る。

40

50

【0262】

TEM7 α ポリペプチドは、「発現クローニング」ストラテジーを使用してTEM7 α リガンドをクローニングするために使用され得る。放射標識された(¹²⁵ヨード)TEM7 α ポリペプチドまたは「親和性／活性タグ化」TEM7 α ポリペプチド(例えば、Fc融合物またはアルカリホスファターゼ融合物)を結合アッセイに使用して、TEM7 α リガンドを発現する細胞型、細胞株または組織を同定し得る。次いで、このような細胞または組織より単離されたRNAを、cDNAへ変換し得、哺乳動物発現ベクターにクローニングし得、そして哺乳動物細胞(例えば、COSまたは293)にトランスフェクトして発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射標識されたかまたはタグ化されたTEM7 α ポリペプチドを親和性試薬として使用して、TEM7 α リガンドを発現するこのライブラリー中の細胞のサブセットを同定および単離し得る。次いで、DNAを、これらの細胞より単離し、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトして二次発現ライブラリーを作製し、ここで、TEM7 α リガンドを発現する細胞の画分は、もともとのライブラリーにおいてよりも数倍高い。この富化プロセスは、TEM7 α リガンドを含む単一の組換えクローンが単離されるまで、反復性に繰り返され得る。TEM7 α リガンドの単離は、TEM7 α シグナル伝達経路の新規なアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、TEM7 α リガンド、抗TEM7 α リガンド抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0263】

本発明のマウスおよびヒトのTEM7 α 核酸はまた、対応する染色体TEM7 α ポリペプチド遺伝子を単離するために有用なツールである。例えば、TEM7 α 配列を含有するマウス染色体DNAを使用して、ノックアウトマウスを構築し得、これにより、TEM7 α ポリペプチドについてのインビボでの役割の実験を可能にする。ヒトTEM7 α ゲノムDNAを使用して、遺伝性の組織分解疾患を同定し得る。

【0264】

ヒトおよびマウスのTEM7 α ポリペプチドをコードするcDNA(それぞれ、登録番号PTA-3199およびPTA-3200を有する)の寄託は、2001年3月23日にAmerican Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209になされた。

【0265】

以下の実施例は、例示の目的のみに意図され、本発明の範囲をいかようにも限定するようには解釈されるべきではない。

【実施例】

【0266】

(実施例1：マウスおよびヒトのTEM7 α ポリペプチド遺伝子のクローニング)

一般に、Sambrookら(上述)に記載されるような材料および方法を使用して、マウスTEM7 α ポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングおよび分析した。

【0267】

ヒトTEM7 cDNA配列をプローブとして使用して、私的に示された配列タグデータベースおよび公的に示された配列タグ(EST)データベースにおいてマウスTEM7 α 遺伝子に対応する配列を同定した。ヒトTEM7に対して中程度の相同性(すなわち、約60%)を有する7つのクローンを見出した；1つのクローンは、マウスTEM7 α 遺伝子についての全長コード配列を含むことが見出された。マウスTEM7 α cDNA配列を、上記で同定されたESTクローン由来のアンプリマー(5'-C-C-A-G-C-A-G-A-G-C-T-C-G-G-C-C-G-T-G-3'(配列番号9)、および5'-G-C-C-A-G-T-A-C-T-G-G-T-G-C-T-G-C-T-C-3'(配列番号10))を使用するPCRによってマウス肺第1鎖cDNA(Clontech)より単離した。この増幅反応において生成したPCR産物を、PCR II

10

20

30

40

50

ベクターにサブクローニングし、そして配列決定した。ヒトTEM7α遺伝子についてのコンセンサス配列を、少なくとも4つのクローンについて得られた配列より導き出した。

【0268】

マウスTEM7αポリペプチドについての全長cDNAの配列分析は、この遺伝子が、530アミノ酸のタンパク質をコードする1590bpのオープンリーディングフレームを含むことを、示した。図1A～1Cは、マウスTEM7α核酸配列のヌクレオチド配列およびマウスTEM7αポリペプチドの推定のアミノ酸配列を示す。

【0269】

マウスTEM7α配列をプローブとして使用して、私的ヒトゲノム配列データベース中のヒトTEM7α遺伝子について全てであるが2つのエクソンに対応する配列を同定した。ヒトTEM7α cDNA配列を、ヒトTEM7α遺伝子の推定のエクソン配列より得られたアンプリマー（5'-G-C-T-T-C-A-C-A-G-A-C-C-T-G-C-T-G-C-3'；配列番号11、および5'-A-A-T-G-T-G-A-A-G-C-T-T-C-C-C-A-G-G-3'；配列番号12）を使用するPCRによってヒト心臓cDNAライブラリーパネル（Origene Technologies, Rockville, MD）より単離した。この第1のアンプリマー対を用いていくつかのポジティブcDNAプールを同定した後、ヒトTEM7α遺伝子についての全長コード配列を、第2のアンプリマー対（5'-T-T-C-T-T-C-A-G-G-C-T-A-C-A-G-C-A-G-C-3'；配列番号13、および5'-C-G-G-C-A-T-G-G-C-G-A-G-G-T-T-C-C-C-G-3'；配列番号14）を用いて単離した。この第2の増幅反応において生成したPCR産物を、pCRIIベクター（Invitrogen）にサブクローニングし、そして配列決定した。ヒトTEM7α遺伝子についてのコンセンサス配列を、少なくとも4つのクローンについて得られた配列から導き出した。

【0270】

ヒトTEM7αポリペプチドについての全長cDNAの配列分析は、この遺伝子が、529アミノ酸のタンパク質をコードする1587bpのオープンリーディングフレームを含むことを、示した。図2A～2Cは、ヒトTEM7α核酸配列のヌクレオチド配列およびヒトTEM7αポリペプチドの推定のアミノ酸配列を示す。

【0271】

TEM7α遺伝子は、腫瘍内皮マーカー7（TEM7）に関連するポリペプチドをコードする（St. Croixら、2000、Science 289:1197-202）。図3A～3Bは、ヒトTEM7αポリペプチド（huTEM7α；配列番号4）、マウスTEM7αポリペプチド（muTEM7α；配列番号2）、ヒトTEM7ポリペプチド（huTEM7；配列番号5）およびマウスTEM7ポリペプチド（muTEM7；配列番号6）のアミノ酸配列アラインメントを示す。ヒトTEM7α遺伝子は、ヒトTEM7遺伝子と63.5%の類似性を有し、そしてヒトTEM7αポリペプチドは、ヒトTEM7ポリペプチドと60%の類似性を有する。ヒトおよびマウス両方のTEM7αポリペプチドの構造は、TEM7ポリペプチドの構造を類似し、ここで、両方のポリペプチドは、N末端の推定のシグナルペプチド配列およびC末端付近の膜貫通ドメインを含み、このことは、TEM7αが膜結合タンパク質であることを示す。

【0272】

ヒトTEM7αポリペプチド（huTEM7α；配列番号4）、マウスTEM7αポリペプチド（muTEM7α；配列番号2）、ヒトTEM7ポリペプチド（huTEM7；配列番号5）およびマウスTEM7ポリペプチド（muTEM7；配列番号6）についてのアミノ酸配列をまた、Clustal Wアルゴリズム（Thompsonら、1994、Nucleic Acids Res. 22:4673-80）を使用して整列した。ヒトのTEM7α配列およびTEM7配列ならびにマウスのTEM7α配列およびTEM7配列（図4A～4B）のClustal W整列は、ヒトTEM7αポリペプチドが多く、多くの位置で非保存的アミノ酸置換を許容し、さらに保存的アミノ酸置換がヒトTEM7

α アミノ酸配列中のいくつかの他の位置（例えば、位置 50、72、82、175、386、396、402 および 470 で）で起こり得ることを示唆する。Conserved Domain Database（主に Smart データベースおよび Pfam データベース由来の機能ドメインおよび構造ドメインの収集）に対するヒトおよびマウスの TEM7α オルソログの BLAST 分析は、これらのタンパク質が少なくとも 1 つの保存されたタンパク質ドメイン（すなわち、Plexin リピートドメイン（いくつかの細胞外レセプター（Plexin レセプター、マホガニーレセプターおよび Met レセプターを含む））に見出されるシステインリッチドメイン）（図 5））をまた有することを示した。ここで、このシステイン残基は、ジスルフィド結合の形成に関与し得る。BLAST 分析はまた、マウス TEM7α アミノ酸配列がまた NIDODメイン（ニドゲン（nidogen）（エンタクチン（entactin））に見られる細胞外ドメイン）を有することを示した。

【0273】

ヒト TEM7α 遺伝子の配列を使用して、CELERA ヒトゲノム DNA 配列データベースを検索した。ヒト TEM7α 遺伝子は、約 465 kb にわたり 14 個のエキソンおよび 13 個のイントロンから構成されることが、見出された。Fichant の法則（Fichant、1992、Hum. Mol. Genet. 1:259-67）を使用して、推定のエキソン／イントロン連結の全てが CELERA データベースで同定された（表 I I I）。TEM7α に関するエキソン／イントロン連結の位置および数は、TEM7 のものと類似し、このことは、これらの 2 つの遺伝子が共通の祖先に由来することを示唆する。

【0274】

（表 I I I：ヒト TEM7α 遺伝子のエキソン／イントロン境界）

【0275】

【表 3】

イントロン	スプライシングドナー AAGgt(a/g)agt	スプライシングアクセプター (Py) ₁₁₋₁₂ ncagN(G/A)	イントロンサイズ (bp)	イントロン フェーズ (Phase)
1	AAATCCTTGgtaagt	tttcttttttcaaacagATTGGCAGT	185151	1
2	CAGATCGAGgtagat	ttatctattattgcagGAGGATACA	46007	0
3	CAAGCTGCagtaagt	gtgttggttctttgcagAGAGTGAAT	21155	0
4	CAACCGGGGgtaagt	atTTTTctaatcttagGTTTCATAT	74943	1
5	TTGATAATGgtatgt	tcaaattgggtgtatagGCACAGCAC	4385	1
6	TACAAAGAAgtaagt	ctttgtttttttccagATTCCTGTC	16548	0
7	AAATCCCCAgtagct	tccttttttttcttagATGTTTCGAA	12435	1
8	CATTACCCAgtaagc	ctttcctcttcccttagCATGCCTCC	233	1
9	ACTTCAAGGtaaaaa	gtgggtcttctttgaagATGTTCAG	34273	2
10	CCTGAAGAGgtacac	tcttttctcttacttagTCAAAAGAG	5679	0
11	CTACAGAAGgtaccc	tgaatttctcttccagATGATACCA	1490	1
12	ATAATGGAGgtagga	tgggatgttcttttcagCTTCTACAG	26249	1
13	TTTATTGAGgtaagt	gtgttttctgttttcagAGACGCCCA	34272	1

* 推定のエキソン／イントロン連結を、Fichant、1992 によって記載されるように同定した；コンセンサススプライシングドナー配列およびアクセプター配列中の不変のヌクレオチドに下線を付した；エキソン配列を大文字で、そしてイントロン配列を小文字で示した。

【0276】

ヒト TEM7α 遺伝子の染色体位置を、BAC クローンに対するヒト TEM7α 遺伝子

に対応する配列のハイブリダイゼーションによって決定した。ヒトTEM7 α についてのエキソン配列を、ヒト第10染色体にマッピングされたBACクローン番号337N19に見出した。ヒトTEM7 α 配列をまた、CELLERAヒトゲノムデータベースからの大きなコンティグ配列中に同定した。このコンティグはまた、以下の遺伝子を含むことが見出された：マクロファージマンノースレセプター（MRC1；GenBank登録番号XM_167415）、AF-10（GenBank登録番号U13948）およびネブレット（nebulette）（NEBL；GenBank登録番号NM_006393）。MRC1遺伝子は、TEM7 α 遺伝子から約2000kb上流（distal）に位置され、そしてNEBL遺伝子およびAF10遺伝子は、それぞれTEM7 α 遺伝子から約600kbおよび1250kb下流（proximal）に位置される（図6）。これらの遺伝子の全てが、ヒト染色体10p12-p13にマッピングされ、このことは、ヒトTEM7 α 遺伝子が同様にこの領域に位置されることを示す。この領域は、混合系統リンパ球（MLL）を有する幾人かの患者における転座事象に關与することが示されたので、ヒトTEM7 α 遺伝子発現は、白血病の転座マーカーとして働き得る。

【0277】

（実施例2：TEM7 α mRNA発現）

ヒトTEM7 α の発現を、実施例1に記載したような推定のエキソン配列由来のアンプリマー（5'-G-C-T-T-C-A-C-A-G-A-C-C-T-G-C-T-G-C-3'；配列番号11、および5'-A-A-T-G-T-G-A-A-G-C-T-T-C-C-C-A-G-G-3'；配列番号12）を使用するPCRによって分析した。予想したPCR産物（527bp）を、心臓、肺、腎臓、脾臓、胎盤、脳および骨格筋において検出した。予想したPCR産物を、肝臓には検出しなかった。肺および腎臓で検出した高発現のTEM7 α は、TEM7の発現パターン（St. Croixら、2000、Science 289：1197-202）と類似する。TEM7もまた、結腸直腸腫瘍における血管の内皮コンパートメントで上昇したことを示した。TEM7（およびTEMファミリーの他のメンバー）の発現もまた、肺、胸部、脳および脾臓の肉腫および原発性腫瘍で示した。さらに、TEM発現を、転移性内皮組織で示した。

【0278】

TEM7 α mRNA発現を、複数のヒト組織のノザンブロット（MTNブロット#7760-1；Clontech）で分析した。TEM7 α プローブを、Random Prime Kit（Roche Biomedical, Burlington, NC）を使用して全長ヒトTEM7 α cDNAから作製した。このプローブを、標準的技術を使用して³²P-dATPで標識した。

【0279】

ノザンブロットを、Stark溶液（50%ホルムアルデヒド、50mMリン酸カリウム、5 $\times$ SSC、1%SDS、5 $\times$ デンハルト溶液、0.05%ザルコシル、および300 μ g/mLサケ精子DNA）中にて42 $^{\circ}$ Cで2時間プレハイブリダイズし、次いで、標識したプローブを含む新鮮なハイブリダイゼーション溶液中にて42 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、フィルターを、6 $\times$ SSC中にて室温でリンスし、次いで、0.1 $\times$ SSCおよび0.1%SDS中にて42 $^{\circ}$ Cで30分間2度洗浄した。次いで、このブロットを、ホスホロ画像化カセット（phosphor imaging cassette）（Molecular Dynamics, Piscataway, NJ）中で一晩露光し、ホスホロ画像化リーダーで走査した。図7は、ノザンブロット分析によって検出した場合のTEM7 α mRNAの発現を示す。

【0280】

TEM7 α mRNAの発現を、インサイチュハイブリダイゼーションによって位置付ける。正常な胎児および成体のマウス組織のパネルを、4%パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン中で包埋し、そして5 μ mで切片化する。切片化した組織を、0.2M HCl中で透過性にし、プロテイナーゼKで消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化する。切片を、ハイブリダイゼーション溶液（300mM Na

C l、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、1×デンハルト溶液、0.2% SDS、10 mM DTT、0.25 mg/ml tRNA、25 µg/ml ポリA、25 µg/ml ポリC および 50% ホルムアミド) 中にて 60℃ で 1 時間 プレハイブリダイズし、次いで、10% デキストラン および 2×10^4 cpm/µl の ³²P-標識したアンチセンスリボプローブ (ヒト TEM7α 遺伝子に相補的) を含む同一の溶液中にて 60℃ で一晩ハイブリダイズする。このリボプローブを、標準的技術を使用して、ヒト TEM7α cDNA 配列を含むクローンのインビトロ転写によって得る。

【0281】

ハイブリダイゼーション後、切片を、ハイブリダイゼーション溶液中でリンスし、RNase A で処理してハイブリダイズしていないプローブを消化し、次いで、0.1×SSC 中にて 55℃ で 30 分間洗浄する。次いで、切片を、NTB-2 エマルジョン (Kodak, Rochester, NY) 中に浸漬し、4℃ で 3 週間露光し、現像し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色する。組織形態およびハイブリダイゼーションシグナルを、以下について暗視野および標準的照明によって同時に分析する：脳 (1つの矢状切片および2つの冠状切片)、胃腸管 (食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、上行結腸および下行結腸)、下垂体、肝臓、肺、心臓、脾臓、胸腺、リンパ節、腎臓、副腎、膀胱、膵臓、唾液腺、雄性生殖器官および雌性生殖器官 (雌性において卵巣、卵管および子宮；ならびに雄性において精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、および精管)、BAT および WAT (皮下、腎臓周囲 (perirenal)、骨 (大腿)、皮膚、胸部、ならびに骨格筋。

10

20

【0282】

(実施例 3：TEM7α ポリペプチドの産生)

(A. 細菌での TEM7α ポリペプチド発現)

PCR を使用して、TEM7α ポリペプチドをコードするテンプレート DNA 配列の 5' 末端および 3' 末端に対応するプライマーを用いてこの配列を増幅する。この増幅した DNA 産物を、発現ベクターへの挿入を可能にするための制限酵素部位を含むように改変し得る。PCR 産物をゲル精製し、そして標準的組換え DNA 方法論を使用して発現ベクターに挿入する。lux プロモーター、およびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含む例示的ベクター (例えば、pAMG21 (ATCC 番号 98113)) を、挿入した DNA の指向性クローニングのために BamHI および NdeI で消化する。連結した混合物を、エレクトロポレーションによって E. coli 宿主株に形質転換し、そして形質転換体を、カナマイシン耐性について選択する。選択したコロニーからプラスミド DNA を単離し、そして挿入物の存在を確認するために DNA 配列決定に供する。

30

【0283】

形質転換した宿主細胞を、30 µg/mL カナマイシンを含む 2×YT 培地中にて 30℃ でインキュベートした後、誘導する。遺伝子発現を、N-(3-オキソヘキサノイル)-D-グルタミン酸を最終濃度 30 ng/mL で添加することによって誘導し、続いて、30℃ または 37℃ のいずれかで 6 時間インキュベートする。TEM7α ポリペプチドの発現を、培養物の遠心分離、再懸濁および細胞性ペレットの溶解、ならびに SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価する。

40

【0284】

TEM7α ポリペプチドを含む封入体を、以下のように精製する。遠心分離によって細菌細胞をペレット化し、そして水中に再懸濁する。この細胞懸濁物を、超音波処理によって溶解し、そして 195,000×g で 5~10 分間の遠心分離によってペレット化する。この上清を捨て、そしてこのペレットを洗浄し、ホモジナイザーに移す。このペレットを、5 mL の Percoll 溶液 (75% 液体 Percoll および 0.15 M NaCl) 中で均一に懸濁するまでホモジナイズし、次いで、希釈し、21,600×g で 30 分間遠心分離する。封入体を含む勾配画分を回収し、そしてプールする。単離した封入体を、SDS-PAGE によって分析する。

50

【0285】

E. coli によって産生されたTEM7αポリペプチドに対応する、SDS-ポリアクリルアミドゲル上の単一のバンドを、ゲルから切り出し、そしてN末端アミノ酸配列を、Matsuda ら、1987、J. Biol. Chem. 262:10-35によって本質的に記載されるように決定する。

【0286】

(B. 哺乳動物細胞でのTEM7αポリペプチドの発現)

PCRを使用して、TEM7αポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列の5'末端および3'末端に対応するプライマーを用いてこの配列を増幅する。この増幅したDNA産物を、発現ベクターへの挿入を可能にするための制限酵素部位を含むように改変し得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的組換えDNA方法論を使用して発現ベクターに挿入する。エプスタインバーウイルス複製起点を含む例示的発現ベクター(pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA))を、293-EBNA-1細胞でのTEM7αポリペプチドの発現のために使用し得る。増幅およびゲル精製したPCR産物を、pCEP4ベクターに連結し、そしてリポフェクションによって293-EBNA細胞に形質導入する。トランスフェクトした細胞を、100 μg/mLハイグロマイシンにて選択し、そして生じた薬物耐性培養物を、コンフルエントまで増殖させる。次いで、この細胞を、無血清培地中で72時間培養する。馴化培地を回収し、そしてTEM7αポリペプチド発現をSDS-PAGEによって分析する。

【0287】

TEM7αポリペプチド発現を、銀染色によって検出し得る。あるいは、TEM7αポリペプチドを、このペプチドタグに対する抗体を使用するウェスタンブロット分析によって検出し得るエピトープタグ(例えば、IgG定常ドメインまたはFLAGエピトープ)との融合タンパク質として産生する。

【0288】

TEM7αポリペプチドを、SDS-ポリアクリルアミドゲルから切り出し得るか、またはTEM7α融合タンパク質を、エピトープタグに対するアフィニティクロマトグラフィーによって精製して本明細書中に記載されるようなN末端アミノ酸配列分析に供する。

【0289】

(C. 哺乳動物細胞でのTEM7αポリペプチドの発現および精製)

TEM7αポリペプチド発現構築物を、リポフェクションプロトコルまたはリン酸カルシウムプロトコルのいずれかを使用して293EBNA細胞またはCHO細胞に導入する。

【0290】

産生したTEM7αポリペプチドに対する機能的研究を行うために、多量の馴化培地を、ハイグロマイシン選択293EBNAクローンのプールから生成する。この細胞を、500 cmのNunc Triple Flask中で80%コンフルエントに増殖させ、その後、無血清培地に交換した1週間後に培地を回収する。馴化培地を回収し、そして精製まで-20℃で凍結する。

【0291】

馴化培地を、以下に記載するようなアフィニティクロマトグラフィーによって精製する。この培地を融解し、次いで、0.2 μmフィルターを通す。プロテインGカラムをPBS (pH 7.0)で平衡化し、次いで、濾過した培地をロードする。A₂₈₀での吸光度が基底線に達するまで、このカラムをPBSで洗浄する。TEM7αポリペプチドを、0.1 Mグリシン-HCl (pH 2.7)でカラムから溶出し、1 M Tris-HCl (pH 8.5)で直ちに中和する。TEM7αポリペプチドを含む画分をプールし、PBSに透析し、そして-70℃で保存する。

【0292】

ヒトTEM7αポリペプチド-Fc融合ポリペプチドの第Xa因子切断のために、アフィニティクロマトグラフィー精製したタンパク質を、50 mM Tris-HCl (pH

8.0)、100mM NaCl、2mM CaCl₂に透析する。制限プロテアーゼ第Xa因子を、透析したタンパク質に1/100(w/w)で添加し、そしてこのサンプルを室温で一晩消化する。

【0293】

(実施例4：抗TEM7αポリペプチド抗体の産生)

TEM7αポリペプチドに対する抗体を、生物学的に生成した精製タンパク質または化学合成したTEM7αペプチドで免疫することによって取得し得る。抗体生成のための適切な手順としては、HudsonおよびBay, Practical Immunology (第2版、Blackwell Scientific Publications)に記載されるような手順が挙げられる。

10

【0294】

抗体生成のための1つの手順において、動物(典型的にはマウスまたはウサギ)に、TEM7α抗原(例えば、TEM7αポリペプチド)を注入し、ELISAによって決定されるような十分な血清力価レベルを有する動物を、ハイブリドーマ産生のために選択する。免疫化した動物の脾臓を収集しそして単一細胞懸濁物として調製し、そこから脾細胞を回収する。この脾細胞を、マウス骨髄腫細胞(例えば、Sp2/0-Ag14細胞)に融合し、200U/mLペニシリン、200μg/mL硫酸ストレプトマイシン、および4mMグルタミンを含むDMEM中でまずインキュベートし、次いで、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)選択培地中でインキュベートする。選択後、この組織培養上清を、各融合ウェルから取り出し、そしてELISAによって抗TEM7α抗体産生について試験する。

20

【0295】

あるいは、抗TEM7α抗体を得るための手順(例えば、ヒト抗体の産生のためのヒトIg遺伝子座を有するトランスジェニックマウスの免疫化、および合成抗体ライブラリー(例えば、抗体可変ドメインの変異誘発によって生成されるライブラリー)のスクリーニング)をまた利用し得る。

【0296】

(実施例5：トランスジェニックマウスでのTEM7αポリペプチドの発現)

TEM7αポリペプチドの生物学的活性を評価するために、肝臓特異的Apoeプロモーターの制御下でTEM7αポリペプチド/Fc融合タンパク質をコードする構築物を調製する。この構築物の送達によって、TEM7αポリペプチドの機能についての情報となる病理学的変化を引き起こされることを予想する。同様に、βアクチンプロモーターの制御下で全長TEM7αポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達によって、遍在性発現を生じることを予想する。

30

【0297】

これらの構築物を生成するために、PCRを使用して、所望の配列の5'末端および3'末端に対応するプライマー(これは、増幅産物の発現ベクターへの挿入を可能にする制限酵素部位を含む)を用いてTEM7αポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。増幅後、PCR産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的組換えDNA技術を使用して発現ベクターに連結する。例えば、増幅したTEM7αポリペプチド配列を、Grahamら、1997、Nature Genetics, 17:272-74、およびRayら、1991、Genes Dev. 5:2265-73に記載されるように、ヒトβ-アクチンプロモーターの制御下で発現ベクター中にクローニングし得る。

40

【0298】

連結後、反応混合物を使用して、エレクトロポレーションによってE.coli宿主株を形質転換し、そして形質転換体を、薬物耐性について選択する。選択したコロニーからプラスミドDNAを単離し、そして適切な挿入物の存在および変異の非存在を確認するためにDNA配列決定に供する。TEM7αポリペプチド発現ベクターを、2度のCsCl密度勾配遠心分離によって精製し、適切な制限酵素で切断し、そしてTEM7αポリペ

50

チド導入遺伝子を含む線状化フラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。この精製したフラグメントを、5 mM Tris (pH 7.4) および 0.2 mM EDTA 中に 2 mg/mL の濃度で再懸濁する。

【0299】

BDF1 × BDF1 交配マウス由来の単細胞胚に、記載される (PCT 公開番号 WO 97/23614) ように注入する。胚を、CO₂ インキュベーター内で一晩培養し、15 ~ 20 個の 2 細胞胚を、偽妊娠 CD1 雌性マウスの卵管に移す。マイクロインジェクションした胚の移植から得られた子孫を、以下のように、ゲノム DNA サンプル中に組み込まれた導入遺伝子を PCR 増幅することによってスクリーニングする。耳片を、20 mL の耳緩衝液 (20 mM Tris (pH 8.0)、10 mM EDTA、0.5 % SDS および 500 mg/mL プロテイナーゼ K) 中にて 55 °C で一晩消化する。次いで、このサンプルを、200 mL の TE で希釈し、そして耳サンプル 2 mL を、適切なプライマーを用いる PCR 反応に使用する。

10

【0300】

8 週齢で、トランスジェニックファウンダー動物およびコントロール動物を、剖検および病理学的分析のために屠殺する。脾臓の一部を回収し、Total RNA Extraction Kit (Qiagen) を使用してこの脾臓から総細胞 RNA を単離し、そして導入遺伝子発現を、RT-PCR によって決定する。脾臓から回収した RNA を、SuperScriptTM Pre-amplification System (Gibco-BRL) を以下のように使用して cDNA に変換する。発現ベクター配列中に位置しそして TEM7α ポリペプチド導入遺伝子の 3' である適切なプライマーを使用して、導入遺伝子転写物から cDNA 合成をプライムする。トランスジェニックファウンダーおよびコントロールからの 10 mg の総脾臓 RNA を、1 mM のプライマーとともに 70 °C で 10 分間インキュベートし、そして氷上に置く。次いで、この反応液に、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、10 mM の各 dNTP、0.1 mM DTT、および 200 U の SuperScript II 逆転写酵素を補充する。42 °C で 50 分間のインキュベーション後、72 °C で 15 分間加熱することによって反応を停止し、37 °C で 20 分間、2 U の RNase H で消化する。次いで、サンプルを、TEM7α ポリペプチドに特異的なプライマーを用いる PCR によって増幅する。

20

30

【0301】

(実施例 6 : トランスジェニックマウスでの TEM7α ポリペプチドの生物学的活性)
安楽死の前に、トランスジェニック動物を秤量し、イソフルオランによって麻酔し、そして心臓穿刺によって放血させる。このサンプルを、血液学および血清化学分析に供する。放血終了 (terminal exsanguination) 後に、ラジオグラフィーを行う。全体的な切開の際に、主要な内臓器官を秤量分析に供する。

【0302】

全体的な切開後に、組織 (すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節および骨格筋) を回収し、組織学的試験のために 10 % 緩衝化 Zn-ホルマリン中で固定する。固定後、この組織をパラフィンブロックに処理し、そして 3 mm 切片を得る。ヘマトキシリンおよびエオシンで切片全てを染色し、次いで、組織学的分析に供する。

40

【0303】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節およびパイアー斑を、以下のような B 細胞特異的抗体および T 細胞特異的抗体を用いる免疫組織学的分析に供する。ホルマリン固定化パラフィン包埋切片を、脱パラフィン化し、そして脱イオン水で水和させる。この切片を、3 % 過酸化水素水でクエンチし、Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA) でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウス B220 および CD3 (Harlan, Indianapolis, IN) 中でインキュベートする。抗体結合を、色素原として DAB (BioTek

50

、Santa Barbara, CA)を用いて、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンおよびペルオキシダーゼ複合体化ストレプトアビジン (BioGenex, San Ramon, CA) によって検出する。切片を、ヘマトキシリンで対比染色する。

【0304】

剖検後、脾臓および胸腺のMLNおよび切片を、トランスジェニック動物およびコントロール同腹仔から回収する。単一細胞懸濁物を、100mmのナイロンセルストレイナー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) の底に対してシリンジの平坦な末端を用いて組織を穏やかに磨りつぶすことによって調製する。細胞を2度洗浄し、計数し、次いで、各組織からの約 1×10^6 細胞を、20 μ L容量中で0.5 μ g CD16/32 (Fc γ II/II) Fcブロックとともに10分間インキュベートする。次いで、サンプルを、100 μ L容量のPBS (Ca⁺ およびMg⁺ を含まない)、0.1%ウシ血清アルブミン、および0.01%アジ化ナトリウム中にて、CD90.2 (Thy-1.2)、CD45R (B220)、CD11b (Mac-1)、Gr-1、CD4またはCD8 (PharMingen, San Diego, CA) に対するFITC複合体化モノクローナル抗体またはPE複合体化モノクローナル抗体 (0.5 μ g) を用いて、2~8℃で30分間染色する。抗体結合後、細胞を洗浄し、次いで、FACScan (Becton Dickinson) でのフローサイトメトリーによって分析する。

【0305】

本発明は好ましい実施形態に関して記載されているが、バリエーションおよび改変が当業者に思い浮かぶことが理解される。よって、添付の特許請求の範囲は請求されるような本発明の範囲内にあるこのような等価なバリエーションの全てを含むことが、意図される。

【図面の簡単な説明】

【0306】

【図1A】図1A~図1Cは、マウスTEM α 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号1) およびマウスTEM α ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号2) を例示する。

【図1B】図1A~図1Cは、マウスTEM α 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号1) およびマウスTEM α ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号2) を例示する。

【図1C】図1A~図1Cは、マウスTEM α 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号1) およびマウスTEM α ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号2) を例示する。

【図2A】図2A~図2Cは、ヒトTEM α 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号3) およびヒトTEM α ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号4) を例示する。

【図2B】図2A~図2Cは、ヒトTEM α 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号3) およびヒトTEM α ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号4) を例示する。

【図2C】図2A~図2Cは、ヒトTEM α 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号3) およびヒトTEM α ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号4) を例示する。

【図3A】図3A~図3Bは、ヒトTEM7 α ポリペプチド (huTEM7 α ; 配列番号4)、マウスTEM7 α ポリペプチド (muTEM7 α ; 配列番号2)、ヒトTEM7ポリペプチド (huTEM7; 配列番号5)、およびマウスTEM7ポリペプチド (muTEM7; 配列番号6) のアミノ酸配列アラインメントを例示する。

【図3B】図3A~図3Bは、ヒトTEM7 α ポリペプチド (huTEM7 α ; 配列番号4)、マウスTEM7 α ポリペプチド (muTEM7 α ; 配列番号2)、ヒトTEM7ポリペプチド (huTEM7; 配列番号5)、およびマウスTEM7ポリペプチド (muTEM7; 配列番号6) のアミノ酸配列アラインメントを例示する。

【図4A】図4A~図4Cは、ClustalWアルゴリズムを用いて調製された、ヒトTEM7 α ポリペプチド (huTEM7 α ; 配列番号4)、マウスTEM7 α ポリペプチド (muTEM7 α ; 配列番号2)、ヒトTEM7ポリペプチド (huTEM7; 配列番号5)、およびマウスTEM7ポリペプチド (muTEM7; 配列番号6) のアミノ酸配列アラインメントを例示する。これらの配列は、アプリケーションMacVector

7. 1. 1 (Accelrys、Cambridge、UK；[http//www.accelrys.com](http://www.accelrys.com)) をデフォルトの設定で用いて整列された。保存された残基は四角で囲まれている。

【図4B】図4A～図4Cは、ClustalWアルゴリズムを用いて調製された、ヒトTEM7 α ポリペプチド(huTEM7 α ；配列番号4)、マウスTEM7 α ポリペプチド(muTEM7 α ；配列番号2)、ヒトTEM7ポリペプチド(huTEM7；配列番号5)、およびマウスTEM7ポリペプチド(muTEM7；配列番号6)のアミノ酸配列アラインメントを例示する。これらの配列は、アプリケーションMacVector7. 1. 1 (Accelrys、Cambridge、UK；[http//www.accelrys.com](http://www.accelrys.com)) をデフォルトの設定で用いて整列された。保存された残基は四角で 10

【図4C】図4A～図4Cは、ClustalWアルゴリズムを用いて調製された、ヒトTEM7 α ポリペプチド(huTEM7 α ；配列番号4)、マウスTEM7 α ポリペプチド(muTEM7 α ；配列番号2)、ヒトTEM7ポリペプチド(huTEM7；配列番号5)、およびマウスTEM7ポリペプチド(muTEM7；配列番号6)のアミノ酸配列アラインメントを例示する。これらの配列は、アプリケーションMacVector7. 1. 1 (Accelrys、Cambridge、UK；[http//www.accelrys.com](http://www.accelrys.com)) をデフォルトの設定で用いて整列された。保存された残基は四角で 20

【図5】図5は、保存されたドメインのデータベースに対するアミノ酸配列のBLAST分析に従って示されるような、ヒトTEM7 α ポリペプチド(配列番号4)およびマウスTEM7 α ポリペプチド(配列番号2)により保有される複数の保存されたドメインの位置を例示する。

【図6】図6は、ヒト染色体10p12～p13上のMRC1遺伝子、TEM7 α 遺伝子、NEBL遺伝子、およびAF-10遺伝子の位置および方向を示す略図を例示する。

【図7】図7は、ノーザンブロット分析により検出されるようなTEM7 α mRNAの発現を例示する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Juan, Todd
 Bass, Michael B.
 Oliner, John

<120> Tumor Endothelial Marker 7a Molecules and Uses Thereof

<130> 01-072-B

<140>

<141>

<150> 60/293,852

<151> 2001-05-25

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2176

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (256)..(1848)

<400> 1

```

attgtgtctc agtgggggc tgcgaggggtg acaagttgca gtgagagctc ccgaagtctg 60
gagaggggttc agctgtctct ccttcacttc tgttaccggt agtgaaatcc tagcgaaact 120
gtcagaggcc tccggtatccc acccaagact caccagcaga gctcggccgt gtcgccccat 180
ccccagggat aaccccgag cccaggggtct caagaaaaaa ttcgttgggc aggggagaga 240
ggtcgcgggca gcggc atg gca agg ttc cgg agg gcc gac ctg gcc gca gca 291
          Met Ala Arg Phe Arg Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ala
          1             5             10

gga gtt atg tta ctt tgt cac ttt tta aca gac cgg ttc cag ttc gcc 339
Gly Val Met Leu Leu Cys His Phe Leu Thr Asp Arg Phe Gln Phe Ala
          15             20             25

cac ggg gag cct gga cac cat acc aat gat tgg att tat gaa gtt aca 387
His Gly Glu Pro Gly His His Thr Asn Asp Trp Ile Tyr Glu Val Thr
          30             35             40

aac gct ttt cct tgg aat gaa gag ggg gta gaa gtg gac tct caa gca 435
Asn Ala Phe Pro Trp Asn Glu Glu Gly Val Glu Val Asp Ser Gln Ala
          45             50             55             60

tac aac cac agg tgg aaa aga aat gtg gac cct ttt aag gca gta gac 483
Tyr Asn His Arg Trp Lys Arg Asn Val Asp Pro Phe Lys Ala Val Asp
          65             70             75

aca aac aga gcc agc atg ggc caa gcc tct cca gag tcc aaa ggg ttc 531
Thr Asn Arg Ala Ser Met Gly Gln Ala Ser Pro Glu Ser Lys Gly Phe
          80             85             90

```

10

20

30

act gac ctg cta ctg gat gac gga cag gac aat aac acc cag ata gag 579
 Thr Asp Leu Leu Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu
 95 100 105

gag gac acg gat cac aat tac tac att tct cgg ata tat ggt cca gcg 627
 Glu Asp Thr Asp His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ala
 110 115 120

gat tct gcc agc cgg gat ctg tgg gtt aac ata gac caa atg gaa aaa 675
 Asp Ser Ala Ser Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys
 125 130 135 140

gac aaa gtg aag att cac ggg ata ctt tcc aac act cat cgg caa gct 723
 Asp Lys Val Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala
 145 150 155

gca aga gtg aat ctg tcc ttc gat ttt cca ttt tat ggt cat ttt cta 771
 Ala Arg Val Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu
 160 165 170

aat gaa gtc act gtg gca act ggg ggt ttc ata tat act gga gaa gtt 819
 Asn Glu Val Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val
 175 180 185

gta cat cga atg ctc aca gct aca cag tat ata gct cct tta atg gca 867
 Val His Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala
 190 195 200

aat ttt gat ccc agt gta tcc aga aat tca act gtc aga tat ttt gat 915
 Asn Phe Asp Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp
 205 210 215 220

aat ggc aca gct ctt gtt gtc cag tgg gac cat gtc cac ctg cag gat 963
 Asn Gly Thr Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp
 225 230 235

aat tac aac ctg gga agc ttc aca ttc cag gcc aca ctc ctc atg gac 1011
 Asn Tyr Asn Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp
 240 245 250

ggg cgc atc atc ttt gga tac aaa gaa atc cct gtc ttg gtc aca cag 1059
 Gly Arg Ile Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln
 255 260 265

ata agt tct acc aac cat cca gtg aaa gtc ggg ttg tct gat gca ttt 1107
 Ile Ser Ser Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe
 270 275 280

gtc gtg gtc cac agg atc cag caa ata ccc aat gtt cga aga aga aca 1155
 Val Val Val His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr
 285 290 295 300

att tat gaa tat cac cga gta gaa cta caa atg tcc aaa att acc aac 1203
 Ile Tyr Glu Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn
 305 310 315

atc tca gct gtg gag atg act cca ctt ccc aca tgt ctc cag ttc aat 1251
 Ile Ser Ala Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn
 320 325 330

10

20

30

ggt tgt ggc cct tgt gtg tcc tgg cag att ggt ttc aac tgc agt tgg 1299
 Gly Cys Gly Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp
 335 340 345

tgc agc aaa ctt caa aga tgc tcc agt gga ttt gat cgc cat cgg cag 1347
 Cys Ser Lys Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln
 350 355 360

gac tgg gtg gac agt gga tgc ccg gaa gag gta cag tca aaa gag aag 1395
 Asp Trp Val Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Val Gln Ser Lys Glu Lys
 365 370 375 380

atg tgt gag aag aca gag cca gga gag aca tct caa act acc acg acc 1443
 Met Cys Glu Lys Thr Glu Pro Gly Glu Thr Ser Gln Thr Thr Thr Thr
 385 390 395

tcc cac acg acc acc atg caa ttc agg gtc ctg acc acc acc agg aga 1491
 Ser His Thr Thr Thr Met Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg
 400 405 410

gct gtg aca tct cag atg cct acc agc ctg cct aca gaa gat gac acg 1539
 Ala Val Thr Ser Gln Met Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr
 415 420 425

aag ata gcc cta cat ctc aaa gac agt gga gcc tcc aca gat gac agt 1587
 Lys Ile Ala Leu His Leu Lys Asp Ser Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser
 430 435 440

gca gct gag aag aaa gga gga acc ctc cat gca gcc ctc att gtt gga 1635
 Ala Ala Glu Lys Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly
 445 450 455 460

att ctc atc ttg gtc ctc att ata gca gcg gcc att ctg gtg aca gtg 1683
 Ile Leu Ile Leu Val Leu Ile Ile Ala Ala Ala Ile Leu Val Thr Val
 465 470 475

tat atg tat cac cat cca aca tca gca gcc agc atc ttc ttc att gag 1731
 Tyr Met Tyr His His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu
 480 485 490

aga cgc cca agc aga tgg cca gca atg aag ttt cga aga gcc tca gga 1779
 Arg Arg Pro Ser Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly
 495 500 505

cac cct gcc tat gca gaa gtt gaa cca gtt gga gag aaa gaa ggt ttt 1827
 His Pro Ala Tyr Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe
 510 515 520

att gta tca gag cag tgc taa aatttttagga cagagcagca ccagtactgg 1878
 Ile Val Ser Glu Gln Cys
 525 530

cttacaggtg ttaagactaa aactttgctt atgcatttaa gacaaacaga cacacaaccc 1938

acaaccacac acaaaggagc cctaaactgc tgtagacaga agggcgacga gattttctgga 1998

caagcccagc ccaggaacat tgaaaggaaa actcagactt gtacaagaca ccatgtacaa 2058

tgattaaaga attccctagt ggaatgacat ccatggttca caaggaacat ctccggtgga 2118

cttgccagga gtgtgacgag atgacgatgc ttttgggtta ggtgcagggt tgcaaaaa 2176

10

20

30

<210> 2
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

10

20

30

Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr
 290 295 300
 His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val
 305 310 315 320
 Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Gly Cys Gly Pro
 325 330 335
 Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu
 340 345 350
 Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val Asp
 355 360 365
 Ser Gly Cys Pro Glu Glu Val Gln Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Lys
 370 375 380
 Thr Glu Pro Gly Glu Thr Ser Gln Thr Thr Thr Thr Ser His Thr Thr
 385 390 395 400
 Thr Met Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser
 405 410 415
 Gln Met Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu
 420 425 430
 His Leu Lys Asp Ser Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys
 435 440 445
 Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu
 450 455 460
 Val Leu Ile Ile Ala Ala Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His
 465 470 475 480
 His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser
 485 490 495
 Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr
 500 505 510
 Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu
 515 520 525
 Gln Cys
 530

10

20

30

<210> 3
 <211> 2149
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (5)..(1594)

<400> 3
 cggc atg gcg agg ttc ccg aag gcc gac ctg gcc gct gca gga gtt atg 49

Met	Ala	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Met		
1				5					10					15		
tta	ctt	tgc	cac	ttc	ttc	acg	gac	cag	ttt	cag	ttc	gcc	gat	ggg	aaa	97
Leu	Leu	Cys	His	Phe	Thr	Asp	Gln	Phe	Gln	Phe	Ala	Asp	Gly	Lys		
				20				25					30			
ccc	gga	gac	caa	atc	ctt	gat	tgg	cag	tat	gga	gtt	act	cag	gcc	ttc	145
Pro	Gly	Asp	Gln	Ile	Leu	Asp	Trp	Gln	Tyr	Gly	Val	Thr	Gln	Ala	Phe	
			35				40					45				
cct	cac	aca	gag	gag	gag	gtg	gaa	gtt	gat	tca	cac	gcg	tac	agc	cac	193
Pro	His	Thr	Glu	Glu	Glu	Val	Glu	Val	Asp	Ser	His	Ala	Tyr	Ser	His	
			50				55					60				
agg	tgg	aaa	aga	aac	ttg	gac	ttt	ctc	aag	gcg	gta	gac	acg	aac	cga	241
Arg	Trp	Lys	Arg	Asn	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Ala	Val	Asp	Thr	Asn	Arg	
	65				70						75					
gca	agc	gtc	ggc	caa	gac	tct	cct	gag	ccc	aga	agc	ttc	aca	gac	ctg	289
Ala	Ser	Val	Gly	Gln	Asp	Ser	Pro	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Thr	Asp	Leu	
	80				85				90						95	
ctg	ctg	gat	gat	ggg	cag	gac	aat	aac	act	cag	atc	gag	gag	gat	aca	337
Leu	Leu	Asp	Asp	Gly	Gln	Asp	Asn	Asn	Thr	Gln	Ile	Glu	Glu	Asp	Thr	
				100					105					110		
gac	cac	aat	tac	tat	ata	tct	cga	ata	tat	ggt	cca	tct	gat	tct	gcc	385
Asp	His	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Ser	Arg	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ser	Asp	Ser	Ala	
			115					120					125			
agc	cgg	gat	tta	tgg	gtg	aac	ata	gac	caa	atg	gaa	aaa	gat	aaa	gtg	433
Ser	Arg	Asp	Leu	Trp	Val	Asn	Ile	Asp	Gln	Met	Glu	Lys	Asp	Lys	Val	
		130					135					140				
aag	att	cat	gga	ata	ttg	toc	aat	act	cat	cgg	caa	gct	gca	aga	gtg	481
Lys	Ile	His	Gly	Ile	Leu	Ser	Asn	Thr	His	Arg	Gln	Ala	Ala	Arg	Val	
	145				150						155					
aat	ctg	toc	ttc	gat	ttt	cca	ttt	tat	ggc	cac	ttc	cta	cgt	gaa	atc	529
Asn	Leu	Ser	Phe	Asp	Phe	Pro	Phe	Tyr	Gly	His	Phe	Leu	Arg	Glu	Ile	
	160				165				170					175		
act	gtg	gca	acc	ggg	ggg	ttc	ata	tac	act	gga	gaa	gtc	gta	cat	cga	577
Thr	Val	Ala	Thr	Gly	Gly	Phe	Ile	Tyr	Thr	Gly	Glu	Val	Val	His	Arg	
			180						185					190		
atg	cta	aca	gcc	aca	cag	tac	ata	gca	cct	tta	atg	gca	aat	ttc	gat	625
Met	Leu	Thr	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ile	Ala	Pro	Leu	Met	Ala	Asn	Phe	Asp	
			195					200					205			
ccc	agt	gta	tcc	aga	aat	tca	act	gtc	aga	tat	ttt	gat	aat	ggc	aca	673
Pro	Ser	Val	Ser	Arg	Asn	Ser	Thr	Val	Arg	Tyr	Phe	Asp	Asn	Gly	Thr	
		210					215					220				
gca	ctt	gtg	gtc	cag	tgg	gac	cat	gta	cat	ctc	cag	gat	aat	tat	aac	721
Ala	Leu	Val	Val	Gln	Trp	Asp	His	Val	His	Leu	Gln	Asp	Asn	Tyr	Asn	
	225				230						235					
ctg	gga	agc	ttc	aca	ttc	cag	gca	acc	ctg	ctc	atg	gat	gga	cga	atc	769
Leu	Gly	Ser	Phe	Thr	Phe	Gln	Ala	Thr	Leu	Leu	Met	Asp	Gly	Arg	Ile	

10

20

30

240	245	250	255	
atc ttt gga tac aaa gaa att cct gtc ttg gtc aca cag ata agt tca	817			
Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser				
260	265	270		
acc aat cat cca gtg aaa gtc gga ctg tcc gat gca ttt gtc gtt gtc	865			
Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val				
275	280	285		
cac agg atc caa caa att ccc aat gtt cga aga aga aca att tat gaa	913			
His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu				
290	295	300		
tac cac cga gta gag cta caa atg tca aaa att acc aac att tcg gct	961			
Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala				
305	310	315		
gtg gag atg acc cca tta ccc aca tgc ctc cag ttt aac aga tgt ggc	1009			
Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly				
320	325	330	335	
ccc tgt gta tct tct cag att ggc ttc aac tgc agt tgg tgt agt aaa	1057			
Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys				
340	345	350		
ctt caa aga tgt tcc agt gga ttt gat cgt cat cgg cag gac tgg gtg	1105			
Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val				
355	360	365		
gac agt gga tgc cct gaa gag tca aaa gag aag atg tgt gag aat aca	1153			
Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn Thr				
370	375	380		
gaa cca gtg gaa act tct tct cga acc acc aca acc ata gga gcg aca	1201			
Glu Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ile Gly Ala Thr				
385	390	395		
acc acc cag ttc agg gtc cta act acc acc aga aga gca gtg act tct	1249			
Thr Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser				
400	405	410	415	
cag ttt ccc acc agc ctc cct aca gaa gat gat acc aag ata gca cta	1297			
Gln Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu				
420	425	430		
cat cta aaa gat aat gga gct tct aca gat gac agt gca gct gag aag	1345			
His Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys				
435	440	445		
aaa ggg gga acc ctc cac gct ggc ctc atc gtt gga atc ctc atc ctg	1393			
Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu				
450	455	460		
gtc ctc att gta gcc aca gcc att ctt gtg aca gtc tat atg tat cac	1441			
Val Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His				
465	470	475		
cac cca aca tca gca gcc agc atc ttc ttt att gag aga cgc cca agc	1489			
His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser				
480	485	490	495	

10

20

30

aga tgg cct gcg atg aag ttt aga aga ggc tct gga cat cct gcc tat 1537
 Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr
 500 505 510

gct gaa gtt gaa cca gtt gga gag aaa gaa ggc ttt att gta tca gag 1585
 Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu
 515 520 525

cag tgc taa aatttctagg acagaacaac accagtactg gtttacaggt 1634
 Gln Cys
 530

gttaagacta aaattttgcc tataccttta agacaaacaa acaaacacac acacaaacaa 1694
 gctotaagct gctgtagcct gaagaagaca agatttctgg acaagctcag cccaggaaac 1754
 aaagggtaaa caaaaaacta aaacttatac aagataccat ttacactgaa catagaattc 1814
 cctagtggaa tgcatctat agttcactcg gaacatctcc cgtggactta tctgaagtat 1874
 gacaagatta taatgctttt ggcttaggtg cagggttgca aagggtatcag aaaaaaaaaa 1934
 tcataataaa gctttagttc atgagggatc gacacctttg gttcaaatgt tctctgatgt 1994
 ctcaagata actgttttcc aaagcctgaa ccttttcaact caaaagagca atgatgaatg 2054
 tctcaagatt gctaagaaaa acagcccatg caagagttag aacaaacaca aaataagaga 2114
 ttttctacat tttcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2149

<210> 4
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ala Arg Phe Pro Lys Ala Asp Leu Ala Ala Ala Gly Val Met Leu
 1 5 10 15
 Leu Cys His Phe Phe Thr Asp Gln Phe Gln Phe Ala Asp Gly Lys Pro
 20 25 30
 Gly Asp Gln Ile Leu Asp Trp Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Phe Pro
 35 40 45
 His Thr Glu Glu Glu Val Glu Val Asp Ser His Ala Tyr Ser His Arg
 50 55 60
 Trp Lys Arg Asn Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg Ala
 65 70 75 80
 Ser Val Gly Gln Asp Ser Pro Glu Pro Arg Ser Phe Thr Asp Leu Leu
 85 90 95
 Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr Asp
 100 105 110
 His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser Ala Ser
 115 120 125

10

20

30

Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val Lys
 130 135 140
 Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val Asn
 145 150 155 160
 Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu Ile Thr
 165 170 175
 Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg Met
 180 185 190
 Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp Pro
 195 200 205
 Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala
 210 215 220
 Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn Leu
 225 230 235 240
 Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile Ile
 245 250 255
 Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser Thr
 260 265 270
 Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val His
 275 280 285
 Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr
 290 295 300
 His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala Val
 305 310 315 320
 Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly Pro
 325 330 335
 Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys Leu
 340 345 350
 Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val Asp
 355 360 365
 Ser Gly Cys Pro Glu Glu Ser Lys Glu Lys Met Cys Glu Asn Thr Glu
 370 375 380
 Pro Val Glu Thr Ser Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ile Gly Ala Thr Thr
 385 390 395 400
 Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser Gln
 405 410 415
 Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu His
 420 425 430
 Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys Lys
 435 440 445

10

20

30

Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu Val
 450 455 460

Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His His
 465 470 475 480

Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser Arg
 485 490 495

Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr Ala
 500 505 510

Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu Gln
 515 520 525

Cys

10

<210> 5
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Met Arg Gly Glu Leu Trp Leu Leu Val Leu Val Leu Arg Glu Ala Ala
 1 5 10 15

Arg Ala Leu Ser Pro Gln Pro Gly Ala Gly His Asp Glu Gly Pro Gly
 20 25 30

Ser Gly Trp Ala Ala Lys Gly Thr Val Arg Gly Trp Asn Arg Arg Ala
 35 40 45

Arg Glu Ser Pro Gly His Val Ser Glu Pro Asp Arg Thr Gln Leu Ser
 50 55 60

Gln Asp Leu Gly Gly Gly Thr Leu Ala Met Asp Thr Leu Pro Asp Asn
 65 70 75 80

Arg Thr Arg Val Val Glu Asp Asn His Ser Tyr Tyr Val Ser Arg Leu
 85 90 95

Tyr Gly Pro Ser Glu Pro His Ser Arg Glu Leu Trp Val Asp Val Ala
 100 105 110

Glu Ala Asn Arg Ser Gln Val Lys Ile His Thr Ile Leu Ser Asn Thr
 115 120 125

His Arg Gln Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr
 130 135 140

Gly His Pro Leu Arg Gln Ile Thr Ile Ala Thr Gly Gly Phe Ile Phe
 145 150 155 160

Met Gly Asp Val Ile His Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Val Ala
 165 170 175

Pro Leu Met Ala Asn Phe Asn Pro Gly Tyr Ser Asp Asn Ser Thr Val
 180 185 190

Val Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Val Phe Val Val Gln Trp Asp His Val

20

30

195	200	205
Tyr Leu Gln Gly Trp Glu Asp Lys Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Ala 210 215 220		
Leu His His Asp Gly Arg Ile Val Phe Ala Tyr Lys Glu Ile Pro Met 225 230 235 240		
Ser Val Pro Glu Ile Ser Ser Ser Gln His Pro Val Lys Thr Gly Leu 245 250 255		
Ser Asp Ala Phe Met Ile Leu Asn Pro Ser Pro Asp Val Pro Glu Ser 260 265 270		
Arg Arg Arg Ser Ile Phe Glu Tyr His Arg Ile Glu Leu Asp Pro Ser 275 280 285		
Lys Val Thr Ser Met Ser Ala Val Glu Phe Thr Pro Leu Pro Thr Cys 290 295 300		
Leu Gln His Arg Ser Cys Asp Ala Cys Met Ser Ser Asp Leu Thr Phe 305 310 315 320		
Asn Cys Ser Trp Cys His Val Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp 325 330 335		
Arg Tyr Arg Gln Glu Trp Asp Gly Thr Met Gly Cys Ala Gln Glu Ala 340 345 350		
Glu Gly Gln Asp Val Arg Gly Leu Pro Gly Met Arg Thr Thr Thr Ser 355 360 365		
Ala Ser Pro Asp Thr Ser Phe Ser Pro Tyr Asp Gly Asp Leu Thr Thr 370 375 380		
Thr Ser Ser Ser Leu Phe Ile Asp Ser Leu Thr Thr Glu Asp Asp Thr 385 390 395 400		
Lys Leu Asn Pro Tyr Ala Gly Gly Asp Gly Leu Gln Asn Asn Leu Ser 405 410 415		
Pro Lys Thr Lys Gly Thr Pro Val His Leu Gly Thr Ile Val Gly Ile 420 425 430		
Val Leu Ala Val Leu Leu Val Ala Ala Ile Ile Leu Ala Gly Ile Tyr 435 440 445		
Ile Asn Gly His Pro Thr Ser Asn Ala Ala Leu Phe Phe Ile Glu Arg 450 455 460		
Arg Pro His His Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Ser His Pro Asp His 465 470 475 480		
Ser Thr Tyr Ala Glu Val Glu Pro Ser Gly His Glu Lys Glu Gly Phe 485 490 495		
Met Glu Ala Glu Gln Cys 500		

10

20

30

<211> 500
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Met Arg Ala Gln Leu Trp Leu Leu Gln Leu Leu Leu Arg Gly Ala
 1 5 10 15

Ala Arg Ala Leu Ser Pro Ala Thr Pro Ala Gly His Asn Glu Gly Gln
 20 25 30

Asp Ser Ala Trp Thr Ala Lys Arg Thr Arg Gln Gly Trp Ser Arg Arg
 35 40 45

Pro Arg Glu Ser Pro Ala Gln Val Leu Lys Pro Gly Lys Thr Gln Leu
 50 55 60

Ser Gln Asp Leu Gly Gly Gly Ser Leu Ala Ile Asp Thr Leu Pro Asp
 65 70 75 80

Asn Arg Thr Arg Val Val Glu Asp Asn His Asn Tyr Tyr Val Ser Arg
 85 90 95

Val Tyr Gly Pro Gly Glu Lys Arg Ser Gln Asp Leu Trp Val Asp Leu
 100 105 110

Ala Val Ala Asn Arg Ser His Val Lys Ile His Arg Ile Leu Ser Ser
 115 120 125

Ser His Arg Gln Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe
 130 135 140

Tyr Gly His Pro Leu Arg Gln Ile Thr Ile Ala Thr Gly Gly Phe Ile
 145 150 155 160

Phe Met Gly Asp Met Leu His Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Val
 165 170 175

Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asn Pro Gly Tyr Ser Asp Asn Ser Thr
 180 185 190

Val Ala Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Val Phe Val Val Gln Trp Asp His
 195 200 205

Val Tyr Leu Gln Asp Arg Glu Asp Arg Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala
 210 215 220

Ala Leu His Arg Asp Gly Arg Ile Val Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro
 225 230 235 240

Met Ala Val Leu Asp Ile Ser Ser Ala Gln His Pro Val Lys Ala Gly
 245 250 255

Leu Ser Asp Ala Phe Met Ile Leu Asn Ser Ser Pro Glu Val Pro Glu
 260 265 270

Ser Gln Arg Arg Thr Ile Phe Glu Tyr His Arg Val Glu Leu Asp Ser
 275 280 285

Ser Lys Ile Thr Thr Thr Ser Ala Val Glu Phe Thr Pro Leu Pro Thr
 290 295 300

10

20

30

Cys Leu Gln His Gln Ser Cys Asp Thr Cys Val Ser Ser Asn Leu Thr
 305 310 315 320
 Phe Asn Cys Ser Trp Cys His Val Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe
 325 330 335
 Asp Arg Tyr Arg Gln Glu Trp Leu Thr Tyr Gly Cys Ala Gln Glu Ala
 340 345 350
 Glu Gly Lys Thr Cys Glu Asp Phe Gln Asp Asp Ser His Tyr Ser Ala
 355 360 365
 Ser Pro Asp Ser Ser Phe Ser Pro Phe Asn Gly Asp Ser Thr Thr Ser
 370 375 380
 Ser Ser Leu Phe Ile Asp Ser Leu Thr Thr Glu Asp Asp Thr Lys Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Tyr Ala Glu Gly Asp Gly Leu Pro Asp His Ser Ser Pro Lys
 405 410 415
 Ser Lys Gly Pro Pro Val His Leu Gly Thr Ile Val Gly Ile Val Leu
 420 425 430
 Ala Val Leu Leu Val Ala Ala Ile Ile Leu Ala Gly Ile Tyr Ile Ser
 435 440 445
 Gly His Pro Asn Ser Asn Ala Ala Leu Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro
 450 455 460
 His His Trp Pro Ala Met Lys Phe His Asn His Pro Asn His Ser Thr
 465 470 475 480
 Tyr Thr Glu Val Glu Pro Ser Gly His Glu Lys Glu Gly Phe Val Glu
 485 490 495
 Ala Glu Gln Cys
 500

10

20

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 7
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

30

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: internalizing
 domain derived from HIV tat protein

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10 15

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 9
ccagcagagc tcggccgtg 19

10

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 10
gccagtactg gtgctgctc 19

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

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

<400> 11
gcttcacaga cctgctgc 18

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 12
aatgtgaagc ttcccagg 18

30

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

ttcttcaggc tacagcagc

19

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 14
 cggcatggcg aggttcccg

19

<210> 15
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial TEM7a
 amino acid sequence

<400> 15
 Met Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala Ala Ala Gly Val Met Leu
 1 5 10 15
 Leu Xaa His Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Pro
 20 25 30
 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Trp Xaa Tyr Xaa Val Thr Xaa Ala Phe Pro
 35 40 45
 Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa Xaa Ala Tyr Xaa His Arg
 50 55 60
 Xaa Lys Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Leu Lys Ala Val Asp Xaa Xaa Arg Xaa
 65 70 75 80
 Xaa Val Xaa Gln Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Thr Xaa Leu Leu
 85 90 95
 Leu Asp Xaa Gly Xaa Asp Asn Xaa Thr Xaa Ile Xaa Glu Asp Xaa Asp
 100 105 110
 His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Xaa Asp Xaa Xaa Ser
 115 120 125
 Arg Asp Leu Trp Val Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Lys Val Lys
 130 135 140
 Ile His Xaa Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Xaa Arg Val Xaa
 145 150 155 160
 Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Xaa Leu Arg Xaa Ile Thr
 165 170 175
 Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Xaa Gly Glu Val Val His Arg Met
 180 185 190

10

20

30

Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Xaa Pro
 195 200 205
 Xaa Xaa Ser Xaa Asn Ser Thr Val Xaa Tyr Phe Asp Asn Gly Thr Ala
 210 215 220
 Xaa Val Val Gln Trp Asp His Val Xaa Leu Gln Asp Xaa Xaa Xaa Xaa
 225 230 235 240
 Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Xaa Leu Xaa Xaa Asp Gly Arg Ile Ile
 245 250 255
 Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Xaa Leu Val Xaa Xaa Ile Ser Ser Thr
 260 265 270
 Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Xaa Val Val Xaa
 275 280 285
 Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Pro Xaa Xaa Arg Arg Arg Thr Ile Tyr Glu Tyr
 290 295 300
 His Arg Val Glu Leu Xaa Xaa Ser Lys Ile Thr Xaa Xaa Ser Ala Val
 305 310 315 320
 Glu Xaa Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Xaa Asn Xaa Cys Xaa Xaa
 325 330 335
 Cys Val Ser Ser Gln Ile Xaa Phe Asn Cys Ser Trp Cys Xaa Xaa Leu
 340 345 350
 Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg Xaa Arg Gln Asp Trp Val Xaa
 355 360 365
 Xaa Gly Cys Xaa Xaa Glu Xaa Lys Glu Lys Met Cys Xaa Xaa Thr Xaa
 370 375 380
 Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Thr Thr Thr Ile Xaa Xaa Xaa Thr
 385 390 395 400
 Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Arg Xaa Xaa Xaa Thr Ser Xaa
 405 410 415
 Phe Xaa Xaa Ser Leu Xaa Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Xaa Xaa Xaa
 420 425 430
 Leu Xaa Xaa Xaa Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Lys Lys
 435 440 445
 Gly Xaa Xaa Leu His Ala Gly Xaa Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu Val
 450 455 460
 Leu Ile Val Ala Xaa Ala Ile Leu Val Xaa Val Tyr Xaa Xaa Xaa His
 465 470 475 480
 Pro Thr Ser Xaa Ala Xaa Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Xaa Arg
 485 490 495
 Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Tyr Ala
 500 505 510
 Glu Val Glu Pro Xaa Gly Xaa Lys Glu Gly Phe Ile Xaa Xaa Glu Gln

10

20

30

40

515 520 525
 Cys

【図 1 A】

FIG. 1A

attgtgtcttc agttgggggg tgcgaggggtg acaagttgca gtgagagcttc ccgaagttcg 69
 gagaggggttc agctgtctct ccttcaacttc tgttaccogg agtgaatatcc tagcgaaact 120
 gtcaagaggcc tcocgagtcac acccaagact caccagcaga gctcggcgt gtgcctccat 180
 ccccaaggat aaccocggag cccagggtct caagaaaaaa ttcttggggc aggggagaga 240
 ggtcgcgcca gcggc atg gca agg ttc cgg agg gcc gac ctg gcc gca gca 291
 Met Ala Arg Phe Arg Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ala
 1 5 10
 gga gtt atg tta ctt tgt cac ttt tta aca gac cgg ttc cag ttc gcc 339
 Gly Val Met Leu Leu Cys His Phe Leu Thr Asp Arg Phe Gln Phe Ala
 15 20 25
 cac ggg gag cct gga cac cat acc aat gat tgg att tat gaa gtt aca 387
 His Gly Glu Pro Gly His His Thr Asn Asp Trp Ile Tyr Glu Val Thr
 30 35 40
 aac gct ttt cct tgg aat gaa gag ggg gta gaa gtg gac tct caa gca 435
 Asn Ala Phe Pro Trp Asn Glu Glu Gly Val Glu Val Asp Ser Gln Ala
 45 50 55 60
 tac aac cac agg tgg aaa aga aat gtg gac cct ttt aag gca gta gac 483
 Tyr Asn His Arg Trp Lys Arg Asn Val Asp Pro Phe Lys Ala Val Asp
 65 70 75
 aca aac aca gcc agc atg ggc caa gcc tct cca gag tcc aaa ggg ttc 531
 Thr Asn Arg Ala Ser Met Gly Gln Ala Ser Pro Glu Ser Lys Gly Phe
 80 85 90
 act gac ctg cta ctg gat gac gga cag gac aat aac acc cag ata gag 579
 Thr Asp Leu Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu
 95 100 105
 gag gac acg gat cac aat tac tac att tct cgg ata tat ggt cca gcg 627
 Glu Asp Thr Asp His Asn Tyr Tyr Ile Ser Asn Thr His Arg Gln Ala
 110 115 120
 gat tct gcc agc cgg gat ctg tgg gtt aac ata gac caa atg gaa aaa 675
 Asp Ser Ala Ser Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys
 125 130 135 140
 gac aaa gtg aag att cac ggg ata ctt tcc aac act cat cgg caa gct 723
 Asp Lys Val Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala
 145 150 155
 gca aga gtg aat ctg tcc ttc gat ttt cca ttt tat ggt cat ttt cta 771
 Ala Arg Val Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu
 160 165 170
 aat gaa gtc act ctg gca act ggg ggt ttc ata tat act gaa gaa gtt 819
 Asn Glu Val Thr Val Ala Thr Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val
 175 180 185

【図 1 B】

FIG. 1B

gta cat cga atg ctc aca gct aca cag tat ata gct cct tta atg gca 867
 Val His Arg Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala
 190 195 200
 aat ttt gat ccc agt gta ttc aga aat tca act gtc aga tat ttt gat 915
 Asn Phe Asp Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp
 205 210 215 220
 aat ggc aca gct ctt gtt gtc cag tgg gac cat gtc cac ctg cag gat 963
 Asn Gly Thr Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp
 225 230 235
 aat tac aac ctg gga agc ttc aca ttc cag gcc aca ctc ctc atg gac 1011
 Asn Tyr Asn Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp
 240 245 250
 ggg cgc atc atc ttt gga tac aaa gaa atc cct gtc ttg gtc aca cag 1059
 Gly Arg Ile Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln
 255 260 265
 ata agt tct acc aac cat cca gtg aaa gtc ggg ttg tct gat gca ttt 1107
 Ile Ser Ser Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe
 270 275 280
 gtc gtg gtc cag agg atc cag caa ata ccc aat gtt cga aga aga aca 1155
 Val Val Val His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Arg Thr
 285 290 295 300
 att tat gaa tat cac cga gta gaa cta caa atg tcc aaa att acc aac 1203
 Ile Tyr Glu Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn
 305 310 315
 atc tca gct gtg gag atg act cca cct ccc aca tgt ctc cag ttc aat 1251
 Ile Ser Ala Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn
 320 325 330
 ggt tgt ggc cct tgt gtg tcc tgg cag att ggt ttc aac tgc agt tgg 1299
 Gly Cys Gly Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp
 335 340 345
 tgc agc aaa ctt caa aga tgc tcc agt gga ttt gat cgc cat cgg cag 1347
 Cys Ser Lys Leu Gln Arg Cys Ser Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln
 350 355 360
 gac tgg gtg gac agt gga tgc ccg gaa gag gta cag tca aaa gag aag 1395
 Asp Trp Val Asp Ser Gly Cys Pro Glu Glu Val Gln Ser Lys Glu Lys
 365 370 375 380
 atg tgt gag aag aca gag cca gga gag aca tct caa act acc acc aac 1443
 Met Cys Glu Lys Thr Glu Pro Gly Glu Thr Ser Gln Thr Thr Thr
 385 390 395
 tcc cac agc acc acc atg caa ttc agt gtc ctg acc acc acc agg aga 1491
 Ser His Thr Thr Thr Met Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg
 400 405 410

【図 1 C】

FIG. 1C

gct gtg aca tct cag atg cct acc agc ctg cct aca gaa gat gac acg 1539
 Ala Val Thr Ser Gln Met Pro Thr Ser Thr Glu Asp Asp Thr
 415 420 425
 aag ata gcc cta cat ctc aaa gac agt gga gcc tcc aca gat gac agt 1587
 Lys Ile Ala Leu His Leu Lys Asp Ser Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser
 430 435 440
 gca gct gag aag aaa gga gca acc ctc cat gca ggc ctc att gtt gga 1635
 Ala Ala Glu Lys Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly
 445 450 455 460
 att ctc atc ttg gtc ctc att ata gca gcg gcc att ctg gtg aca gtg 1683
 Ile Leu Ile Leu Val Leu Ile Ile Ala Ala Ala Ile Leu Val Thr Val
 465 470 475
 tat atg tat cac cat cca aca tca gca gcc agc atc ttc ttc att gag 1731
 Tyr Met Tyr His His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu
 480 485 490
 aga cgc cca agc aga tgg cca gca atg agt ttt cga aga ggc tca gga 1779
 Arg Arg Pro Ser Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly
 495 500 505
 cac cct gcc tat gca gaa gtt gaa cca gtt gga gag aaa gaa ggt ttt 1827
 His Pro Ala Tyr Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe
 510 515 520
 att gta tca gag cag tgc taa aatttagga cagagcagca ccagtaactgg 1878
 Ile Val Ser Glu Gln Cys
 525 530
 ctacaggtg ttaagactaa aactttgctt atgcntitaa gacaaacaga cacacaaccc 1938
 acaaccacac acaaggagc cctaaactgc tgcagacaga aggggcagca gattttctga 1998
 caagccacag ccaggaacat tgaaggaata actcagactt gtacaagaca ccatgtacaa 2058
 tgattaaaga attccctagt ggaatgacat ccatggttca cwaggaacat ctccggctga 2118
 ctgcccagga gtgtgacgag atscagatgc ttttggttta ggtgcagggt tgcacaaa 2176

【図 2 A】

FIG. 2A

cggc atg gcg agg ttc cgg aag gcc gac ctg gcc gct gca gga gtt atg 49
 Met Ala Arg Phe Pro Lys Ala Asp Leu Ala Ala Ala Gly Val Met
 1 5 10 15
 tta ctt tgc cac ttc ttc acg gac cag ttt cag ttc gcc gat ggg aat 97
 Leu Leu Cys His Phe Phe Thr Asp Gln Phe Gln Phe Ala Asp Gly Lys
 20 25 30
 ccc gga cag caa atc ctt gat tgg cag tat gga gtt act cag gcc ttc 145
 Pro Gly Asp Gln Ile Leu Asp Trp Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Phe
 35 40 45
 cct cac aca gag gag gag gtg gaa gtt gat tca cac gcg tac agc cac 193
 Pro His Thr Glu Glu Glu Val Glu Val Asp Ser His Ala Tyr Ser His
 50 55 60
 agg tgg aaa aga aac ttg gac ttt ctc agc gcg gta gac acg aac cga 241
 Arg Trp Lys Arg Asn Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg
 65 70 75
 gca agc gtc ggc caa gac tct cct gag ccc aga agc ttc aca gac ctg 289
 Ala Ser Val Gly Gln Asp Ser Pro Glu Pro Arg Ser Phe Thr Asp Leu
 80 85 90 95
 ctg ctg gat gat ggg cag gac aat aac act cag atc gag gag gat aca 337
 Leu Leu Asp Asp Gly Gln Asp Asn Asn Thr Gln Ile Glu Glu Asp Thr
 100 105 110
 gac cac aat tac tat ata tct cga ata tat ggt cca tct gat tct gcc 385
 Asp His Asn Tyr Tyr Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Pro Ser Asp Ser Ala
 115 120 125
 agc cgg gat tta tgg gtg aac ata gac caa atg gaa aaa gat aaa gtg 433
 Ser Arg Asp Leu Trp Val Asn Ile Asp Gln Met Glu Lys Asp Lys Val
 130 135 140
 aag att cat gga ata ttg tcc aat act cat cgg caa gct gca aga gtg 481
 Lys Ile His Gly Ile Leu Ser Asn Thr His Arg Gln Ala Ala Arg Val
 145 150 155
 aat ctg tcc ttc gat ttt cca ttt tat ggc cac ttc cta cgt gaa atc 529
 Asn Leu Ser Phe Asp Phe Pro Phe Tyr Gly His Phe Leu Arg Glu Ile
 160 165 170 175
 act gtg gca acc ggg ggt ttc ata tac act gga gaa gtc gta cat cga 577
 Thr Val Ala Thr Gly Gly Phe Ile Tyr Thr Gly Glu Val Val His Arg
 180 185 190
 atg cta aca gcc aca cag tac ata gca cct tta atg gca aat ttc gat 625
 Met Leu Thr Ala Thr Gln Tyr Ile Ala Pro Leu Met Ala Asn Phe Asp
 195 200 205
 ccc agt gta tcc aga aat tca act gtc aga tat ttt gat aat ggc aca 673
 Pro Ser Val Ser Arg Asn Ser Thr Val Arg Tyr Phe Asp Asn Gly Thr
 210 215 220

【図 2 B】

FIG. 2B

```
gca ctt gtg gtc cag tgg gac cat gta cat ctc cag gat aat tat aac 721
Ala Leu Val Val Gln Trp Asp His Val His Leu Gln Asp Asn Tyr Asn
225 230 235

ctg gga agc ttc aca ttc cag gca acc ctg ctc atg gat gga cga atc 769
Leu Gly Ser Phe Thr Phe Gln Ala Thr Leu Leu Met Asp Gly Arg Ile
240 245 250 255

atc ttt gga tac aaa gaa att cct gtc ttg gtc aca cag ata agt tca 817
Ile Phe Gly Tyr Lys Glu Ile Pro Val Leu Val Thr Gln Ile Ser Ser
260 265 270

acc aat cat cca gtg aaa gtc gga ctg tcc gat gca ttt gtc gtt gtc 865
Thr Asn His Pro Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Ala Phe Val Val Val
275 280 285

cac agg atc caa cca att ccc aat gtt cga aga aga aca att tat gaa 913
His Arg Ile Gln Gln Ile Pro Asn Val Arg Arg Thr Ile Tyr Glu
290 295 300

tac cac cga gta gag cta caa atg tca aaa att acc aac att tgc gct 961
Tyr His Arg Val Glu Leu Gln Met Ser Lys Ile Thr Asn Ile Ser Ala
305 310 315

gtg gag atg acc cca tta ccc aca tgc ctc cag ttt aac aga tgt ggc 1009
Val Glu Met Thr Pro Leu Pro Thr Cys Leu Gln Phe Asn Arg Cys Gly
320 325 330 335

ccc tgt gta tct tct cag att gcc ttc aac tgc agt tgg tgt agt aaa 1057
Pro Cys Val Ser Ser Gln Ile Gly Phe Asn Cys Ser Trp Cys Ser Lys
340 345 350

ctt caa aga tgt tcc agt gga ttt gat cgt cat cgg cag gac tgg gtg 1105
Leu Gln Arg Cys Ser Gly Phe Asp Arg His Arg Gln Asp Trp Val
355 360 365

gac agt gga tgc cct cca gag tca aaa gag aag atg tgt gag aat aca 1153
Asp Ser Gly Cys Pro Glu Gln Ser Lys Glu Lys Met Cys Gln Asn Thr
370 375 380

gaa cca gtg gaa act tct tct cga acc acc aca acc ata gga gcg aca 1201
Glu Pro Val Glu Thr Ser Arg Thr Thr Thr Thr Ile Gly Ala Thr
385 390 395

acc acc cag ttc agg gtc cta act acc acc aga aga gca gtg act tct 1249
Thr Thr Gln Phe Arg Val Leu Thr Thr Thr Arg Arg Ala Val Thr Ser
400 405 410 415

cag ttt ccc acc agc ctc cct aca gaa gat gat acc aag ata gca cta 1297
Gln Phe Pro Thr Ser Leu Pro Thr Glu Asp Asp Thr Lys Ile Ala Leu
420 425 430

cat cta aaa gat aat gga gct tct aca gat gac agt gca gct gag aag 1345
His Leu Lys Asp Asn Gly Ala Ser Thr Asp Asp Ser Ala Ala Glu Lys
435 440 445
```

【図 3 A】

FIG. 3A

```
1 50
huTEM7a MARFFPKADIA AAGVLLCHP FTDQFPQFAD KPQDQLLDWQ YGVYQAF.PH
muTEM7a MARFFPRADIA AAGVLLCHP LTRDPQFANG EPGHNTNDMI YEYTNAP.PW
huTEM7 -----MAG ELMLL.VLVL REAARALSPQ
muTEM7 -----MRA QLMLLQLLLL RGAARALSPA

51 100
huTEM7a TEEK.VEVDS HAYSHR....WKNNL.DF LKAVDTNPAAS VQGDSPERES
muTEM7a NEEK.VEVDS QAYNHR....WKNNV.DP PKAVDTNPAAS MQQASPEREK
huTEM7 PGAGHDGPG SGWAAKGVYR GWNRRARESP GHVSEPDRTQ LQSD...LG
muTEM7 TPAGHNDEGD SAWTAKRTQ GWSRRPRESP AQVLKPKTKO LQSD...LG

101 150
huTEM7a FTDLLLDGQ DNNTQIREDT DHNYISRIY GPDSASRDLL WNIDQMRKD
muTEM7a FTDLLLDGQ DNNTQIEEDT DHNYISRIY GPADSASRDLL WNIDQMRKD
huTEM7 GTTLAMDTP DNRTRVVED. NHSVYVSRLY GPSEPSRELL WVDVAENRS
muTEM7 GGS LAIDTLP DNRTRVVED. NHNHYVSRYV GPGEKRSQDL WVDLAVNRS

151 200
huTEM7a KVKIHGILSN THRQAARVNL SDFPPFYGHF LREITVATGG FIYTGVEVVR
muTEM7a KVKIHGILSN THRQAARVNL SDFPPFYGHF LNEVTVATGG FIYTGVEVVR
huTEM7 QVKIHILSN THRQASRVLL SDFPPFYGHF LRQITATGG FIPMGDVHHR
muTEM7 HVKIHRIEES SHRQASRVLL SDFPPFYGHF LRQITATGG FIPMGDVHHR

201 250
huTEM7a MLTATQYIAP LMANFPDPSVS RNSIVRYFDN GTALVQWQH VHLQDNMYLG
muTEM7a MLTATQYIAP LMANFPDPSVS RNSIVRYFDN GTALVQWQH VHLQDNMYLG
huTEM7 MLTATQYVAP LMANFNPQYS DNSTVYFDN GTVFPVQWQH VYLQDNEDKG
muTEM7 MLTATQYVAP LMANFNPQYS DNSTVYFDN GTVFPVQWQH VYLQDNEDKG

251 300
huTEM7a SFTFQAILLM DGRIFPYKE IPVLVQIIS TNHPVKVGLS DAFVTVHRIQ
muTEM7a SFTFQAILLM DGRIFPYKE IPVLVQIIS TNHPVKVGLS DAFVTVHRIQ
huTEM7 SFTFQALHHR DGRIFPAYKE IPMSVPEISS SQHPVKVGLS DAFMILNPSF
muTEM7 SFTFQALHHR DGRIFPYKE IPMSVLDISS AQHPVKVGLS DAFMILNPSF

301 350
huTEM7a QIPNVRRRTI YEYHRELQM SKITNISAVE MTPPLTCLQF NRCGFCVSSQ
muTEM7a QIPNVRRRTI YEYHRELQM SKITNISAVE MTPPLTCLQF NRCGFCVSSQ
huTEM7 DVESRRRSI FEYHRIELDP SKVTSMSAVE FTPLPTCLQH RSCDACMSSE
muTEM7 EVFESQRRTI FEYHRELDLS SKITNISAVE FTPLPTCLQH QSCDTCVSSN

351 400
huTEM7a IGFNCSWCXK LQRCSSGFDR HRQDWDS.G CPTEE.SKKK MCENTEFVET
muTEM7a IGFNCSWCXK LQRCSSGFDR HRQDWDS.G CPSEVQSEK MCENTEFVET
huTEM7 LTFNCSWCHV LQRCSSGFDR YRQDWDTMG CAQEAESQD.VRQDPNET
muTEM7 LTFNCSWCHV LQRCSSGFDR YRQDW.LTYG CAQEAESKT..CEDPDQ.DS
```

【図 2 C】

FIG. 2C

```
aaa ggg gga acc ctc ctc gct ggc ctc atc gtt gga atc ctc atc ctg 1393
Lys Gly Gly Thr Leu His Ala Gly Leu Ile Val Gly Ile Leu Ile Leu
450 455 460

gtc ctc att gta gcc aca gcc att ctt gtc aca gtc tat atg tat cac 1441
Val Leu Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu Val Thr Val Tyr Met Tyr His
465 470 475

cac cca aca tca gca gcc agc atc ttc ttt att gag aga cgc cca agc 1489
His Pro Thr Ser Ala Ala Ser Ile Phe Phe Ile Glu Arg Arg Pro Ser
480 485 490 495

aga tgg cct gcg atg aag ttt aga aga ggc tct gga cat cct gcc tat 1537
Arg Trp Pro Ala Met Lys Phe Arg Arg Gly Ser Gly His Pro Ala Tyr
500 505 510

gct gaa gtt gaa cca gtt gga gag aaa gaa ggc ttt att gta tca gag 1585
Ala Glu Val Glu Pro Val Gly Glu Lys Glu Gly Phe Ile Val Ser Glu
515 520 525

cag tgc taa aatttttagg acagaacaac accagtagtg gtttacaggt 1634
Gln Cys 530

gttaagacta aaatttttgc tatactctta agacaacaaca acaaacacac acacaacaa 1694
gctctaagct gctgtagcct gaagaagaca agattttctgg acaagctcag cccaggaaac 1754
aaagggtaaa caaaaaacta aaactttatc aagataccat ttacactgaa catagaattc 1814
octagtggaa tgcacttat agttcaactg gaacatctcc cgtggaacta tetgaagtat 1874
gacaagatta taatgctttt ggcttaggtg cagggttgca aagggtcag aaaaaaaaaa 1934
tcataataaa gotttagtgc atgagggtac gacacctttg gttcaaatgt tctctgagt 1994
ctcaagata actgttttcc aaagctgaa ccttttcaat caaagagca atgatgaatg 2054
tctcaagatt gctaagaaaa acagcccatg caagagtgcg acaacaacaa aataagaga 2114
ttttctcat tttcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2149
```

【図 3 B】

FIG. 3B

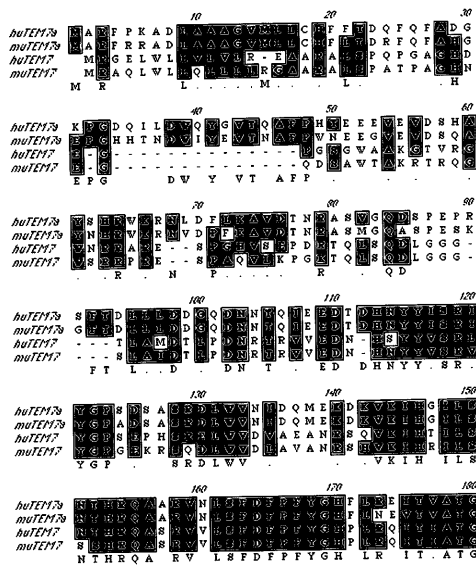
```
401 450
huTEM7a SSRTTTTIGA TTQFRLVLT TRRAVTSQFP TSLPTEDDTK IALLKKNQGA
muTEM7a .SQTITTSHT TTQFRLVLT TRRAVTSQFP TSLPTEDDTK IALLKKNQGA
huTEM7 TTSASPDTSF SPYDGLTIT S...SELF DSLTTEDDTK LNPVAGDGL
muTEM7 HYSASPDTSF SPYDGLTIT S...SELF DSLTTEDDTK LNPVAGDGL

451 500
huTEM7a STDSAAEKK GTLHAGLIV GILILVLIYA TAILVTVMY HHPTSAASIF
muTEM7a STDSAAEKK GTLHAGLIV GILILVLIYA TAILVTVMY HHPTSAASIF
huTEM7 Q.NLSPKTK GTFVHLQTV GIVLAVLIYA AILACIYIS GHPTSAALF
muTEM7 P.DHSSPKSK GTFVHLQTV GIVLAVLIYA AILACIYIS GHPTSAALF

501 543
huTEM7a FIERRPSRW AMKFRGSGH PAYAVEPVG .EKGFVSE QC*
muTEM7a FIERRPSRW AMKFRGSGH PAYAVEPVG .EKGFVSE QC*
huTEM7 FIERRPHWF AMKFRSHPDH STYAVEPVG HEKGFVSE QC*
muTEM7 FIERRPHWF AMKFRNHPNH STYAVEPVG HEKGFVSE QC*
```

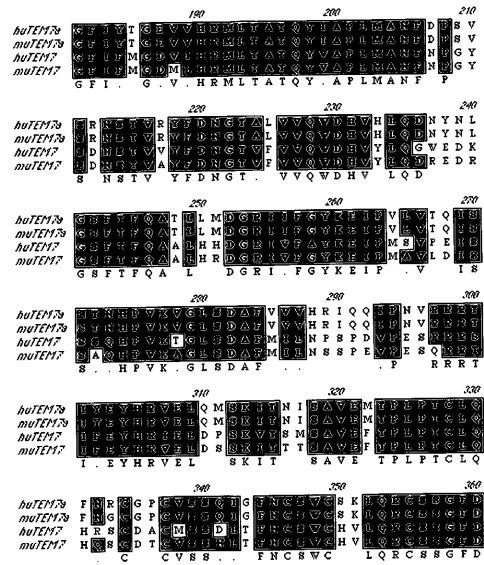

【図 4 A】

FIG. 4A



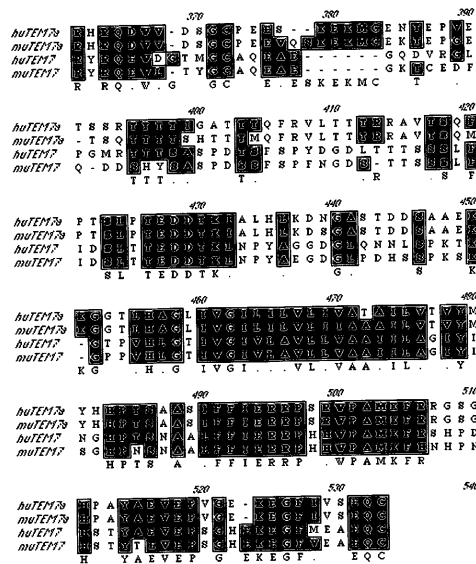
【図 4 B】

FIG. 4B



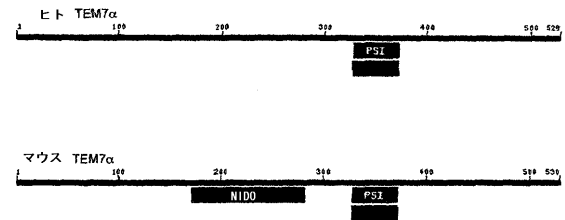
【図 4 C】

FIG. 4C



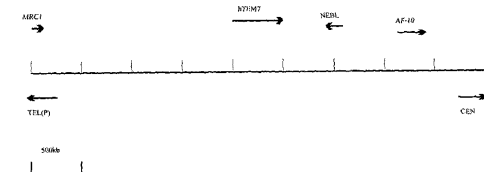
【図 5】

FIG. 5



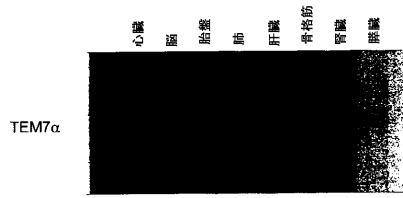
【図 6】

FIG. 6



【図 7】

FIG. 7



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 4
C 0 7 K 19/00	C 1 2 M 1/00	4 H 0 4 5
C 1 2 M 1/00	C 1 2 N 1/15	5 B 0 7 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 6 F 17/30	1 7 0 F
G 0 6 F 17/30	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジュアン, トッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 2 0, ニューベリー パーク, ケール サン ジュアン 4 6 2 9

(72)発明者 バス, マイケル ブライアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 6 0-2 1 6 3, サウザンド オークス, ノース マリアン アベニュー 1 7 4 3

(72)発明者 オリナー, ジョナサン ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 2 0, ニューベリー パーク, ゴールデン クレスト アベニュー 9 5 9

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA06 EA04 GA13 GA14 HA14
4B029 AA07 BB20 CC03 FA15
4B063 QA01 QA05 QA11 QQ08 QQ53 QQ79 QR32 QR48 QR51 QR56
QR77 QS33 QS34
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 CE12 CE13 DA01 DA13
4B065 AA26X AA91Y AA92Y AA93X AA93Y AB01 BA02 BA03 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 BA08 BA22 CA18 DB60 NA14 ZA96 ZA97
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 EA20 EA50 FA74
GA26
5B075 UU18

专利名称(译)	肿瘤内皮标志物7α分子及其用途		
公开(公告)号	JP2005516582A	公开(公告)日	2005-06-09
申请号	JP2003500275	申请日	2002-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	ジュアントッド バスマイケルブライアン オリナージョナサンダニエル		
发明人	ジュアン, トッド バス, マイケル ブライアン オリナー, ジョナサン ダニエル		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61P19/08 A61P19/10 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G06F17/30		
CPC分类号	A61K38/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/08 A61P19/10 C07K14/4748		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61P19/08 A61P19/10 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G06F17/30.170.F C12N15/00.F C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/GA14 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA11 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/CE13 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91Y 4B065/AA92Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/DB60 4C084/NA14 4C084/ZA96 4C084/ZA97 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26 5B075/UU18		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/293852 2001-05-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了肿瘤内皮标记物7α (TEM7α) 多肽和编码该多肽的核酸分子。 本发明还提供选择性结合剂, 载体, 宿主细胞和产生TEM7α多肽的方法。 本发明进一步提供了用于诊断, 治疗, 改善和/或预防与TEM7α多肽有关的疾病, 病症和病状的药物组合物和方法。

元の残基	例示の置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg