

(11)特許出願公表番号

ATGCACAGAAACTTTCGCAAGTGGATTTCCTACGTGTTTTCCTGCTTTGGCGCTCCCTGTACGTGAAGCTC
GCGACACTGTGATCTCGTGCGTGCCCTGGGAGCCACATCATCTGCACAAAGATCTCGGCGCTATGCCGCC
GGCAGCGTGCATCTTCGACAGATGGCCCGGCAACATCATCTGTTGTTGGGAGGAGCGCATAGGGC
ATCAACAGCTGCGACGATCAAGTTCCGTTTCGGAGAGCTGGAACCTGCTCTGCCCTCGCGAGAAAGACCGTC
TTCGGGCAAGAGCTTCCGATAGGAGCCGTGAGGCTGCCCTACGTGACGCATCAACCGCGCGTGGCGTGC
CGCCACGCGCGTCAACCGTGCCTTCGACCGAAGGAACTGAGAACCTGCGGACCGCGACCGGAGAGCGAG
GGCTATCAACCAAGCGCAGAGGTTGAGATGTTGGGCGCGCTGCTCGGCGCAGCTGCTGTTACGAGATCGAC
TTCCTCCGCGCGCTTGTGGAGCGCTCGGAGATACGAAGAAGACCGGCGCGCTTCTATGAACCTGCATAC
AATGAGCGCGGACGAGAGCTTTATAGAGGACCGGATGAGCTGGAGTGAAGTGCACGCGCGTGTCTGGC
TCTGCACACCAAAAACCTCGTGGCCACCGCTGCCAAGTTCCGAGAGGTTGGCCCACTGCTCGAAGAG
AAGTACAACCGCGGCGCGTCAAGTGGAGGTTGTGGGCGCAGCGCTTCTCGGCGACCAACCTCTCTGCGC
ATCAACCAAGCTGCGAGCTATCAAGAAGCCATATGAGACAGACCTGTTGTATATGAGAAGTCCGCCAC
TACTCGGAGGAGAGCGCGGCGACCGGACCTGGGACAGCGGCGGCTGTTCTGCACCGCAAGCTCGCC
CGCGCGGACGACTGTGACCACTGTGCTCGGCGCGAGGTCACACACCCACAGTACACCAAGGTCTGCG
CAGTGCACCTGCAGAAATCCACTGTGCTGTTCTGTCAGTGCACACCTCGACGAGCGCACAGAGTTC
TTCACCTGCAAGTGAGCGAGCGCGGAGCGCGCC (阮J) 第17

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたW n t - 7 B様核酸分子であって、該分子は、配列番号2または該核酸分子の相補体に対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを以下の条件でコードし、該条件が、

該ポリペプチドが、配列番号2に従って番号付けされた配列の、70～72位のI D E、74～76位のQ H Q、196～198位のM K L、または302～304位のD G C以外アミノ酸配列以外のアミノ酸配列を含む条件である、核酸分子。

【請求項2】 請求項1に記載のW n t - 7 B様核酸分子であって、前記ポリペプチドが、70～72位のI N E、74～76位のQ Y Q、196～198位のM Q L、および302～304位のD D Cのアミノ酸配列のうち少なくとも1つを含む、核酸分子。

【請求項3】 請求項1に記載のW n t - 7 B様核酸分子であって、前記ポリペプチドが、70～72位のI N E、74～76位のQ Y Q、196～198位のM Q L、および302～304位のD D Cのアミノ酸配列を含む、核酸分子。

【請求項4】 請求項1に記載のW n t - 7 B様核酸分子であって、前記核酸分子が、配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸分子に相補的な核酸配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、核酸分子。

【請求項5】 請求項1に記載のW n t - 7 B様核酸分子であって、前記分子がさらに、配列番号2のアミノ酸配列、または、配列番号2のアミノ酸配列において1つ以上の保存的置換を含む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。

【請求項6】 請求項1に記載のW n t - 7 B様核酸分子であって、前記ポリペプチドが、天然に存在するヒトポリペプチドのアミノ酸配列を含む、核酸分子。

【請求項7】 請求項1に記載のW n t - 7 B様核酸分子であって、前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列を含む、核酸分子。

【請求項8】 請求項1に記載のW n t - 7 B様核酸分子であって、前記ポ

リペプチドが、配列番号3のアミノ酸配列を含まない、核酸分子。

【請求項9】 請求項1に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項10】 請求項1に記載の核酸分子を含む、細胞。

【請求項11】 100ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドであって、該ヌクレオチドは、配列番号1の少なくとも6つの連続したヌクレオチド、またはその相補体を含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項12】 単離されたWnt-7B様ポリペプチドであって、以下：

- a) 配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドのフラグメントであって、ここで該フラグメントが、配列番号2の少なくとも6つの連続したアミノ酸を含む、フラグメント；
- c) 配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドの誘導体；
- d) 配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドのアナログ；
- e) 配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモログ；および
- f) 配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子改変体であって、ここで、該ポリペプチドは、ストリンジェントな条件下で核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によってコードされる、対立遺伝子改変体、

からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも85%同一である配列を有するポリペプチドであり、ここで、該ポリペプチド、該フラグメント、該誘導体、該アナログ、該ホモログまたは該改変体は、配列番号2に従って番号付けされた配列の、70～72位のIDE、74～76位のQH Q、196～198位のMK L、または302～304位のDGC以外のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項13】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、70～72位のINE、74～76位のQY Q、196～198位のMQ L、および302～304位のDDCのアミノ酸配列のうち少なくとも1つを含む、ポリペプチド。

【請求項14】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって

、前記ポリペプチドが、アミノ酸配列70～72位のINE、74～76位のQYQ、196～198位のMQL、および302～304位のDDCのアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項15】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、配列番号3のアミノ酸配列を含まない、ポリペプチド。

【請求項16】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項17】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、ヒトポリペプチドである、ポリペプチド。

【請求項18】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドに選択的に結合する、抗体。

【請求項19】 請求項18に記載の抗体であって、前記抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群から選択される、抗体。

【請求項20】 Wnt-7B様ポリペプチドを産生する方法であって、該方法は、請求項11に記載の細胞を、Wnt-7B様核酸分子が発現される条件下で培養する工程を包含する、方法。

【請求項21】 生物学的サンプル中において請求項12に記載のポリペプチドの存在を検出する方法であって、該方法は以下：

該サンプルを提供する工程；

該サンプルを、該ポリペプチドに選択的に結合する化合物と接触させる工程；
および

該ポリペプチドと該化合物との間の複合体を検出する工程であって、ここで該複合体の存在が、該サンプル中に該ポリペプチドが存在することを示す、工程、を包含する方法。

【請求項22】 生物学的サンプル中において請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子の存在を検出する方法であって、該方法は以下：

該生物学的サンプルを提供する工程；

該サンプルを、該サンプル中でプローブおよび相同な核酸分子との間で安定なハイブリッドが形成することが可能な条件下で、該プローブ核酸分子と接触させ

る工程；および

該プローブ分子によって形成された該ハイブリッドまたは増幅産物を検出する工程であって、

ここで該ハイブリッドまたは該増幅産物の存在が、該サンプル中に該W n t - 7 B 様核酸分子が存在することを示す、工程、
を包含する方法。

【請求項23】 請求項12に記載のW n t - 7 B 様ポリペプチドの活性を調節する方法であって、該方法は以下：

該ポリペプチドを提供する工程；

該ポリペプチドを、該ポリペプチドの活性を調節するのに十分な量において、因子と接触させる工程；
を包含する、方法。

【請求項24】 W n t - 7 B 様関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、該障害を有する被験体に、該被験体の該W n t - 7 B 様関連障害を処置または予防するに十分な量の、請求項1に記載のW n t - 7 B 様核酸分子を投与する工程を包含する、方法。

【請求項25】 W n t - 7 B 様関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、該障害を有する被験体に、該被験体の該W n t - 7 B 様関連障害を処置または予防するに十分な量の、請求項12に記載のW n t - 7 B 様ポリペプチドを投与する工程を包含する、方法。

【請求項26】 W n t - 7 B 様関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、該障害を有する被験体に、該被験体の該W n t - 7 B 様関連障害を処置または予防するに十分な量の、請求項18に記載のW n t - 7 B 様抗体を投与する工程を包含する、方法。

【請求項27】 請求項1に記載のW n t - 7 B 様核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項28】 請求項12に記載のW n t - 7 B 様ポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項29】 請求項19に記載のW n t - 7 B 様抗体および薬学的に受

容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項30】 1つ以上の容器の中に、請求項27に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項31】 1つ以上の容器の中に、請求項28に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項32】 1つ以上の容器の中に、請求項29に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項33】 Wnt-7B様関連障害に対する活性もしくは潜伏性のモジュレーターまたは素因をスクリーニングするための方法であって、該方法が、以下：

(a) Wnt-7B様関連障害に対する増加した危険性の試験動物に試験化合物を投与する工程であって、ここで、該試験動物はWnt-7B様タンパク質を組み換え発現する、工程；

(b) 該試験動物中の該タンパク質の活性を測定する工程；

(c) 該タンパク質を組み換え発現し、かつWnt-7B様関連障害に対する危険性の増加していないコントロール動物中の該タンパク質の活性を測定する工程；

(d) 該試験動物および該コントロール動物における該タンパク質の発現を比較する工程であって、ここで、該コントロール動物と比較した該試験動物中の該タンパク質の活性における変化は、該試験化合物がWnt-7B様関連障害の潜伏性のモジュレーターであることを示す、工程；

を包含する、方法。

【請求項34】 請求項34に記載の方法であって、ここで、前記試験動物が、野生型試験動物と比較して増加したレベルで、試験タンパク質導入遺伝子を発現するかまたはプロモーターの制御下で該導入遺伝子を発現する、組換え試験動物であり、ここで、該プロモーターは、該導入遺伝子のネイティブな遺伝子プロモーターではない、方法。

【請求項35】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドの変化したレベルと関連する疾患の存在または該疾患の素因を決定するための方法であっ

て、該方法が、以下：

(a) 哺乳動物被験体由来の細胞サンプル中の該ポリペプチドの量を測定する工程；および

(b) 工程(a)の該ポリペプチドの量を、コントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程であって、

ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の工程(a)の該ポリペプチドのレベルにおける変化が、疾患状態を示す、工程；
を包含する、方法。

【請求項36】 請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子の変化したレベルと関連する疾患の存在または該疾患の性質を決定するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 哺乳動物被験体由来の細胞サンプル中の該核酸分子の量を測定する工程；および

(b) 工程(a)の該核酸分子の量を、コントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程であって、

ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の工程(a)の該核酸分子の発現レベルにおける変化が、疾患状態を示す、工程；
を包含する、方法。

【請求項37】 哺乳動物被験体において病理学的状態を処置する方法であって、該方法が、該病理状態を緩和する量でポリペプチドを該被験体に投与する工程を包含し、ここで、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列またはこれらの生物学的に活性なフラグメントを含むポリペプチドと少なくとも85%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドである、方法。

【請求項38】 哺乳動物被験体において病理学的状態を処置する方法であって、該方法が、該病理状態を緩和するに十分な量で請求項19に記載の抗体を該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項39】 請求項41に記載の方法であって、前記被験体がヒトである、方法。

【請求項40】 請求項41に記載の方法であって、前記病理学的状態が、

腫瘍、癌、または新生物形成に関連する、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、核酸およびポリペプチドに関する。

【0002】**(発明の背景)**

Wnt遺伝子ファミリーは、構造的に関連した分泌糖タンパク質をコードする少なくとも10個の遺伝子を含む。Wntファミリーのメンバーは、乳房細胞の増殖および分化の調節因子として報告されている。例えば、メンバーは、種々の発生的プロセス（例えば、細胞運命の特定化、細胞増殖、細胞極性および細胞移動）を制御することが示されてきた。さらに、Wntシグナル伝達の調節不全は、発生的欠陥を引き起こし、そしていくつかのヒト癌の発生に関係していると報告されている。

【0003】

Wntファミリー遺伝子メンバーWnt-4、Wnt-7b、およびWnt-11は、後腎において発現される。Wnt遺伝子ファミリーのメンバーの発現は、腎臓形成の間にそして完全な尿道閉塞に関連するプロセスにおいて試験されてきた。後腎発生の際に誘導される尿道閉塞は、間葉の成分を維持することおよび上皮の間葉への変換を誘導することによって、Wnt-7b発現の正常なパターンを妨げ、そして発生する腎臓における正常な変換プロセスと干渉する。従って、Wntタンパク質は、腎臓の間葉の上皮への変換のメディエータとして機能し得る。

【0004】

Wnt-7Bタンパク質の過剰発現は、C57MG細胞の細胞性変換を生じ得る。Wnt7bのより高いレベルの発現はまた、侵襲性の膀胱癌と比較して、表在性の膀胱癌細胞において報告されている。これらの結果は、Wnt-7Bタンパク質が、膀胱腫瘍発生の初期事象に関与することを示唆する。

【0005】**(発明の要旨)**

本発明は、Wnt-7Bに配列類似性を有するポリペプチドをコードする新規のヒト核酸配列の発見に、一部基づく。本明細書中に記載される、Wnt-7B様核酸、ポリヌクレオチド、タンパク質およびポリペプチドまたはそのフラグメントは、クローン29518614.0.61（配列番号1）およびクローン29518614.0.61によってコードされるポリペプチド（配列番号2）において見出されるものを含む。

【0006】

1つの局面において、本発明は、単離されたWnt-7B様核酸分子を含み、この核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む。例えば、種々の実施形態において、この核酸は、配列番号1を含むヌクレオチド配列を含み得る。あるいは、コードされたWnt-7B様ポリペプチドは、本明細書中に記載されるように、改変体アミノ酸配列を有し得る（例えば、開示されたアミノ酸配列に100%未満の同一性または類似性を有する）。

【0007】

本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列またはこれらのアミノ酸配列の少なくとも6アミノ酸を有するフラグメントを含む単離されたポリペプチドを含む。Wnt-7B様ポリペプチドの天然に存在するポリペプチド改変体もまた含まれ、ここで、このポリペプチドは、Wnt-7B様核酸分子からなる核酸分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされる。

【0008】

Wnt-7B様ポリペプチドに選択的に結合する抗体もまた本発明に含まれる。この抗体は、好ましくはモノクローナル抗体であり、最も好ましくはヒト抗体である。このような抗体は、例えば、被験体における病理学的状態の処置において有用であり、ここで、この処置は、抗体を被験体に投与する工程を包含する。

【0009】

本発明は、核酸分子が発現される条件下で本明細書中に記載されるWnt-7B様核酸分子の1つを発現する宿主細胞を培養することによって、Wnt-7B様ポリペプチドを産生するための方法をさらに含む。

【0010】

本発明はまた、哺乳動物（例えば、ヒト）由来のサンプルと本明細書中に記載されたポリペプチドの1つに選択的に結合する抗体とを接触すること、ならびにこのサンプル中の抗体およびポリペプチドを含む反応複合体の形成を検出することによって、哺乳動物由来のサンプル中のWnt-7B様ポリペプチドまたは核酸の存在を検出するための方法を含む。サンプル中の複合体の形成を検出することは、サンプル中のポリペプチドの存在を示す。

【0011】

本発明はさらに、サンプル中のWnt-7B様ポリペプチドに少なくとも80%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドの変更されたレベルに関連する疾患（例えば、病理学的状態）の存在を検出または診断するための方法を含む。この方法は、哺乳動物被験体（例えば、ヒト）由来の生物学的サンプル中のポリペプチドのレベルを測定する工程、および正常な被験体または異なる時間（例えば、状態の発症の前）における同一の被験体に存在するポリペプチドのレベルに対して、検出されたレベルを比較する工程を包含する。正常レベルと比較して、ポリペプチドのレベルにおける増加または減少は、疾患状態を示す。

【0012】

哺乳動物（例えば、ヒト）由来のサンプル中のWnt-7B様核酸分子の存在を検出する方法もまた本発明に含まれる。この方法は、核酸分子に選択的にハイブリダイズする核酸プローブまたはプライマーとサンプルを接触させる工程、およびこれらの核酸プローブまたはプライマーがサンプル中の核酸分子に結合するか否かを決定する工程を包含する。核酸プローブまたはプライマーの結合は、核酸分子がサンプル中に存在することを示す。

【0013】

本発明は、哺乳動物（例えば、ヒト）由来のサンプル中のWnt-7B様核酸の変更されたレベルに関連する疾患の存在を検出または診断するための方法をさらに含む。この方法は、哺乳動物被験体由来の生物学的サンプル中の核酸分子のレベルを測定する工程、および正常な被験体中または異なる時間に同じ被験体中に存在する核酸のレベルに対して、検出されたレベルを比較する工程を包含する

。正常なレベルに対して比較される核酸のレベルにおける増加または減少は、疾患状態を示す。

【0014】

本発明はまた、病理学的状態を軽減するために十分な量で、被験体にこの被験体に対するWnt-7B様ポリペプチドを投与することによって、哺乳動物（例えば、ヒト）における病理学的状態を処置する方法を含む。このポリペプチドは、Wnt-7B様ポリペプチドに少なくとも80%同一なアミノ酸配列を有する。

【0015】

あるいは、哺乳動物は、病理学的状態を軽減するのに十分な量で本明細書中に記載された抗体を投与することによって、処置され得る。

【0016】

本発明の処置の方法が想定する病理学的状態としては、癌（例えば、結腸直腸癌）、前立腺癌良性腫瘍、免疫障害、免疫不全、自己免疫疾患、先天性免疫不全症候群、移植拒絶、アレルギー、病理学的生物または病原体による感染、炎症障害、関節炎、血友病障害、皮膚障害、アテローム硬化症、再狭窄、神経学的疾患、アルツハイマー病、外傷、外科的または外傷性損傷、脊髄損傷、および骨格障害が挙げられる。

【0017】

他に規定しない限り、本明細書中で使用される全ての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または等価な方法または材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料は以下に記載される。本明細書中で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の文献は、その全体が参考として援用される。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先される（control）。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみであって限定することを意図しない。

【0018】

本発明の他の特徴および他の利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲

から明らかとなる。

【0019】

(発明の詳細な説明)

本発明は、Wnt-7B-1様核酸、およびこれらの核酸によってコードされるポリペプチドを提供する。1072ヌクレオチド(配列番号1)の新規の核酸(これは、また本明細書中でクローン29518614.0.61と称される)は、本発明に含まれる。この配列は、図1に示される。

【0020】

配列番号1のオープンリーディングフレームは、ヌクレオチド1~3のATG開始コドンで開始し、そしてヌクレオチド1048~1050のTGAコドンで終了すると同定された。コードされるタンパク質のアミノ酸配列は、349アミノ酸残基であり、そして図2Aに示される。

【0021】

コードされるタンパク質は、Mus musculus Wnt-7Bタンパク質(ACC:P28047)(図2B)に対して、349アミノ酸のうち345アミノ酸(98%)の同一性を有する。このタンパク質の全長アミノ酸配列は、Homo sapiens由来の349アミノ酸残基のWnt7Aタンパク質(ptnr:SPTR EMBL-ACC:Q9Y560)に対して349アミノ酸残基のうち268アミノ酸残基(76%)の同一であり、そして349残基のうち316残基(90%)がポジティブである。

【0022】

PSORT分析は、0.6850の確実性で、コードされたタンパク質が、原形質膜に局在することを予想する。SIGNALP分析を使用して、本発明のタンパク質は、31位と32位との間に切断部位:VVA-LGを最も有するようである非切断アミノ末端シグナル配列を有することが予想される。本発明のこのタンパク質の予想される分子量は、39384.8ダルトンである。

【0023】

本発明の核酸およびタンパク質は、例えば、(a)発生的疾患(腎臓発生に関連する発生的疾患を含む)；(b)腫瘍形成および癌(乳癌および膀胱癌を含む

); ならびに(c)他の病状および障害、に關与する治療適用において有用である。

【0024】

例えば、Wnt-7B様タンパク質をコードするcDNAは、Wnt-7B療法において有用であり得、そしてWnt-7B様タンパク質は、それが必要な患者に投与される場合に有用であり得る。非制限的な例として、本発明の組成物は、発生的疾患、癌、および/または他の病状および障害に罹患する患者の処置に効力を有する。本発明のWnt-7B様タンパク質をコードする新規の核酸およびWnt-7B様タンパク質またはそれらのフラグメントは、診断適用においてさらに有用であり得、ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が、評価される。これらの物質は、治療方法または診断方法における使用のための本発明の新規の物質に免疫特異的に結合する抗体のWnt-7B定量においてさらに有用である。

【0025】

本発明のWnt-7B様核酸は、全ての主要な癌腫の群由来の複数の腫瘍細胞株において高い発現を示す。従って、本発明に従うWnt-7B様ポリペプチドは、腫瘍増殖の自己分泌刺激、化学耐性(chemoresistance)、放射線治療耐性、接着の喪失に対する生存における役割を有し得、従って、腫瘍細胞移動(侵襲)を刺激する際に役割を有し得る。細胞接着および細胞移動ならびに遺伝子発現プロファイルにおける関連する分子の役割に基づいて、多数の腫瘍型について、モノクローナル抗体を使用したWnt-7B様ポリペプチド(例えば、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチド)の成功した標的化が、腫瘍増殖に対する阻害効果を有することが、期待される。

【0026】

本明細書中に開示されるポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、それらの対応する配列識別番号と共に、表1に示される。

【0027】

【表1】

表1: 配列および対応する配列番号

クローン番号またはプライマー番号	配列番号
Wnt-7B 様核酸 : 分子 (クローン29518614.0.61)	1
クローン29518614.0.61に よってコードされるポリペプチド	2
マウス Wnt-7B ポリペプチド	3
	4
Ag 316 (R)	5
Ag 316 (P):	6

(Wnt-7B様核酸)

Wnt-7B様ポリペプチドをコードする単離された核酸分子(例えば、配列番号1)は、本発明によって提供される。いくつかの実施形態において、この核酸分子は、配列番号2(図2)のアミノ酸配列またはその生物学的に活性な部分を含むWnt-7B様ポリペプチドをコードする。本発明はまた、Wnt-7B様核酸分子の増幅または変異のためのPCRプライマーとしての使用のためのWnt-7B様コード核酸(例えば、Wnt-7B様mRNA)およびフラグメントを同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分な核酸フラグメントを含む。本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」は、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)、RNA分子(例えば、mRNA)、ヌクレオチドアナログを使用して作製されたDNAまたはRNAのアナログ、ならびにそれらの誘導体およびホモログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは、二本鎖DNAである。本発明のWnt-7B様核酸は、配列番号1ならびにそのフラグメント、ホモログ、および誘導体を含む。

【0028】

別の実施形態において、この核酸分子は、70~72位のIDE、74~76位のQH Q、196~198位のMK L、または302~304位のDGC以外のアミノ酸配列を含むWnt-7B様ポリペプチドをコードする。例えば、この単離された核酸は、70~72位のINE、74~76位のQY Q、196~198位のMQ L、または302~304位のDDCのアミノ酸配列の少なくとも

1つを含むポリペプチドをコードし得る。いくつかの実施形態において、この核酸分子は、これらの3ペプチド配列の2つまたは3つを有するポリペプチドをコードする。

【0029】

「プローブ」とは、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、使用に依存して、少なくとも約10ヌクレオチド(nt)、100nt、または例えば、約6,000ntほどの大きさの間である。プローブは、同一、類似または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長いプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から入手され、非常に特異的であり、そしてオリゴマーよりもはるかに遅くハイブリダイズする。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得、そしてPCR、メンブレンベースのハイブリダイゼーション技術またはELISAのような技術において特異性を有するように設計される。

【0030】

「単離された」核酸分子は、この核酸の天然の供給源中に存在するその他の核酸分子から分離されているものである。好ましくは、「単離された」核酸は、この核酸が由来する生物のゲノムDNA中でこの核酸に天然に隣接する配列（すなわち、この核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態で、Wnt-7B様ポリペプチドをコードする単離された核酸分子（例えば、本発明のWnt-7B様タンパク質）は、この核酸が由来する細胞（例えば、骨組織（骨髄を含む）、心臓、リンパ節、膵臓、脾臓、胸腺、胎盤、腎臓、肝臓、視床、脳、下垂体、乳房、肺、唾液腺および副腎を含む組織由来の成体および胎児の細胞）のゲノムDNA中でこの核酸分子に天然で隣接する、約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、または0.1kb未満のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技術により産生される場合、その他の細胞物質または培養培地を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、化学物質前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。

【0031】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号1のヌクレオチド配列を有するWnt-

7 B様核酸分子、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の相補体は、標準的な分子生物学的技法および本明細書で提供される配列情報を用いて単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして、配列番号1のWnt - 7 B様核酸配列の全部または一部を使用して、このWnt - 7 B様核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニング技術（例えば、Sambrookら（編）、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989；およびAusubelら、（編）、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993）を用いて単離され得る。

【0032】

本発明の核酸は、標準的なPCR増幅技術に従って、テンプレートとしてcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され、そしてDNA配列分析により特徴付けられ得る。さらに、Wnt - 7 B様ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術、例えば、自動化DNA合成機を用いることにより調製され得る。

【0033】

本明細書で用いられる用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、PCR反応で用いられる十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づき得るか、またはそれから設計され得、そして特定の細胞もしくは組織において、同一、類似もしくは相補的DNAまたはRNAを増幅し、確認し、もしくはその存在を示すために用いられる。オリゴヌクレオチドは、約10nt、50nt、または100ntの長さ、好ましくは約15nt～30ntの長さを有する核酸配列の部分を含む。1つの実施形態では、100ntより少ない長さの核酸分子を含むオリゴヌクレオチドは、さらに、配列番号1の少なくとも6個連続するヌクレオチド、またはその相補体を含む。オリゴヌ

クレオチドは、化学的に合成され得、そしてプローブとして用いられ得る。

【0034】

1つの実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列またはこのヌクレオチド配列の一部の相補体であるWnt-7B様核酸分子を含む。Wnt-7B様ヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列またはこのヌクレオチド配列の一部に十分相補的である核酸分子であり、所望のWnt-7B様核酸配列に対しミスマッチがほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二本鎖を形成する。

【0035】

本明細書で用いる用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位間のWatson-CrickまたはHoogsteen塩基対形成をいい、そして用語「結合」は、2つのポリペプチドまたは化合物または関連ポリペプチドまたは化合物またはその組合せ間の物理的または化学的相互作用を意味する。結合は、イオン性、非イオン性、ファンデルワールス性、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用は直接的であるかまたは間接的であり得る。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物を介するか、またはその効果に起因し得る。直接的結合は、別のポリペプチドもしくは化合物を介して、またはその効果に起因して生じない、その他の実質的な化学的中間体がない相互作用をいう。

【0036】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1の核酸配列の一部のみ、またはプラスミドのDNAインサートのヌクレオチド配列（例えば、実施例3に記載されるpSecTag2-BおよびpSecV5Hisベクター）（例えば、プローブまたはプライマーとして使用され得るフラグメント、あるいはWnt-7B様の生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）を含み得る。本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6個の（連続する）核酸配列または少なくとも6個の（連続する）アミノ酸配列または、少なくとも4個の（連続する）アミノ酸配列（それぞれ、核酸の場合には、特異的なハイブリダイゼーションを可能にし、またはアミノ酸の場合には、エピトープの特異的な認識を可能にするに

十分な長さ)として規定され、そして全長配列未満のせいぜいいくつかの部分である。フラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。誘導体は、直接的にかまたは改変もしくは部分的置換によってかのいずれかでネイティブな化合物から形成される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、ネイティブな化合物に類似する構造を有する(しかし、同一ではない)が、特定の成分または側鎖に関してそれとは異なる核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成物であり得るか、または進化的に異なる起源に由来し得、そして野生型と比較して、類似の代謝活性または反対の代謝活性を有し得る。相同体は、異なる種に由来する特定の遺伝子の核酸配列またはアミノ酸配列である。

【0037】

誘導体およびアナログは、以下に記載のように、誘導体またはアナログが、修飾された核酸またはアミノ酸を含む場合、全長、または全長以外のものであり得る。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、種々の実施形態において、本発明の核酸もしくはタンパク質に、同一の大きさの核酸またはアミノ酸配列にわたって、または整列した配列に比較した場合(この整列は、当該分野で公知であるコンピューター相同性プログラムによって実施される(以下を参照のこと))、少なくとも約30%、50%、70%、80%、95%、98%、もしくは99%もの同一性(好ましい同一性は、80~95%)で実質的に相同であるか、あるいはそのコードする核酸がストリンジェントの、中程度にストリンジェントの、または低いストリンジェントの条件下で上記のタンパク質をコードする配列の相補体にハイブリダイズし得る、領域を含む分子を包含するが、これらに限定されない。例えば、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993、および以下を参照のこと。

【0038】

いくつかの実施形態において、Wnt-7B誘導体またはアナログをコードする核酸は、配列番号2と上記の割合で異なり、そして70~72位のIDE、7

4～76位のQH Q、196～198位のMK L、または302～304位のDGC以外のアミノ酸をコードする。例えば、この単離された核酸は、70～72位のINE、74～76位のQY Q、196～198位のMQ L、および302～304位のDDCのアミノ酸配列の少なくとも1つを含むポリペプチドをコードし得る。いくつかの実施形態において、この核酸分子は、これらの3ペプチド配列の2つまたは3つを有するポリペプチドをコードする。

【0039】

「相同な核酸配列」、「相同なアミノ酸配列」、「類似の核酸配列」もしくは「類似のアミノ酸配列」、またはこれらの成句の改変体とは、上記で考察したように、それぞれヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおける相同性または類似性によって特徴付けられる配列をいう。類似のヌクレオチド配列は、本発明のWnt-7B様ポリペプチドのアイソフォーム、改変体、パラログまたはオルソログであるアミノ酸配列をコードする。アイソフォームは、例えば、RNAの選択的スプライシングの結果として、同一の生物の異なる組織において発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、類似のヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（哺乳動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられ得る）のWnt-7B様ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同なヌクレオチド配列はまた、天然に生じる対立遺伝子改変体および本明細書に記載されるヌクレオチド配列の変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、類似のヌクレオチド配列は、ヒトまたはマウスWnt-7B様タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない。類似核酸配列は、配列番号2の保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）、およびWnt-7B様活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。個々のWnt-7B様タンパク質の生物学的活性は以下に記載されている。類似のアミノ酸配列は、ヒトまたはマウスのWnt-7B様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードしない。

【0040】

Wnt-7B様ポリペプチドは、Wnt-7B様核酸のオープンリーディング

フレーム(「ORF」)によってコードされる。本発明は、配列番号1の核酸配列のストレッチを含む核酸配列を含む。配列番号1は、その核酸配列のORFを含み、そして配列番号2のポリペプチドをコードする。

【0041】

「オープンリーディングフレーム」(「ORF」)は、ポリペプチドに潜在的に翻訳され得るヌクレオチド配列に対応する。ORFを含む核酸配列のストレッチは、終止コドンによって妨げられない。全長タンパク質についてのコード配列を示すORFは、ATG「開始」コドンで始まり、そして3つの「終止」コドン(すなわち、TAA、TAG、またはTGA)の1つで終了する。本発明の目的のために、ORFは、開始コドン、終止コドン、または両方を有するかまたは有さないコード配列の任意の一部であり得る。本物の細胞性タンパク質をコードする良好な候補として考えられるORFについて、最小サイズの必要条件は、しばしば、例えば、50アミノ酸以上のタンパク質をコードするDNAのストレッチを設定する。

【0042】

ヒトWnt-7B様遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型(例えば、他の組織由来)におけるWnt-7B様ホモログ(例えば、アイソフォームおよびパラログ)、ならびに他の哺乳動物由来のWnt-7B様ホモログ(例えば、オルソログ)を同定および/またはクローニングする際の使用のために設計されるプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ/プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号1の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列、もしくは、例えば、実施例3において記載されるpSecTag2-BおよびpSecV5HisベクターのようなプラスミドのDNAインサートのヌクレオチド配列;または当該分野で公知のプラスミドのDNAインサートのWnt-7B様ヌクレオチドのアンチセンス鎖ヌクレオチド配列もしくはアンチセンス鎖Wnt-7B様ヌクレオチド配列;またはWnt-7B様ヌクレオチドの天

然に存在する変異体、もしくは当該分野で公知のプラスミドベクターのDNAインサートの天然に存在する変異体のヌクレオチド配列に、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の領域を含む。

【0043】

ヒトWnt-7B様ヌクレオチド配列に基づくプローブは、同じまたは相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用され得る。種々の実施形態において、このプローブはさらに、プローブに付着した標識基を含み、例えば、この標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、Wnt-7B様タンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のWnt-7B様をコードする核酸のレベルを測定すること（例えば、Wnt-7B様 mRNAレベルを検出すること、またはゲノムWnt-7B様遺伝子に変異しているかまたは欠失しているか否かを決定すること）によって使用され得る。

【0044】

「Wnt-7B様の生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、本発明のポリペプチドの活性に類似するが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいい、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような成熟形態を含む。「Wnt-7B様の生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、Wnt-7B様の生物学的活性（Wnt-7B様タンパク質の生物学的活性は、以下に記載される）を有するポリペプチドをコードする、Wnt-7B様ヌクレオチドの一部を単離し、Wnt-7B様タンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてWnt-7B様のコードされた部分の活性を評価することによって調製され得る。例えば、Wnt-7B様の生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、細胞外ドメインを含み得る。別の実施形態において、Wnt-7B様の生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、1つ以上の領域を含む。

【0045】

(Wnt-7B様改変体の核酸)

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1の少なくとも1つに示されるWnt-7B様ヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含する。それにより、これらの核酸は、上記のヌクレオチド配列のいずれかによってコードされるWnt-7B様タンパク質と同じWnt-7B様タンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の単離されたWnt-7B様核酸分子は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0046】

ヒトWnt-7B様ヌクレオチド配列、またはプラスミドまたはベクターのDNAインサートのWnt-7B様ヌクレオチド配列に加えて、Wnt-7B様のアミノ酸配列における変化を導くDNA配列多型は、集団(例えば、ヒト集団)内に存在し得ることが、当業者によって理解される。Wnt-7B様遺伝子中のこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、Wnt-7B様タンパク質、好ましくは哺乳動物のWnt-7B様タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のバリエーションは、代表的には、Wnt-7B様遺伝子のヌクレオチド配列において1~5%の変動性を生じ得る。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、そしてWnt-7B様の機能的活性を変化させない、Wnt-7B様内の任意および全てのこのようなヌクレオチドのバリエーションならびに得られるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であると意図される。

【0047】

さらに、他の種由来のWnt-7B様タンパク質をコードし、従って、本明細書中に開示されるヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明のWnt-7B様のcDNAの天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、本明細書中に開示されるヒトWnt-7B様核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジェン

トハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとしてヒトcDNAまたはその一部を用いて単離され得る。例えば、可溶性ヒトWnt-7B様cDNAは、ヒトの膜結合Wnt-7B様に対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜結合ヒトWnt-7B様cDNAは、可溶性ヒトWnt-7B様に対するその相同性に基づいて単離され得る。

【0048】

従って、別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも6ヌクレオチド長であり、そしてストリンジェント条件下で少なくとも1つのWnt-7B様ヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも10、25、50、100、250、500または2000ヌクレオチド長である。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、互いに少なくとも60%類似のヌクレオチド配列が代表的には互いにハイブリダイズしたままである条件を記載することを意図する。

【0049】

オルソログ（すなわち、ヒト以外の種由来のWnt-7B様タンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（*paralogs*））は、特定のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。

【0050】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズ

する。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHで、特定の配列の熱融解点(T_m)より約5%低いように選択される。この T_m は、標的配列に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする(規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度下)温度である。標的配列は一般に過剰で存在するので、 T_m では、50%のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジェントな条件は、pH7.0~8.3で、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオンより少なく、代表的には約0.01~1.0Mナトリウムイオン(またはその他の塩)、そして温度が短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10nt~50nt)について少なくとも約30%、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについて少なくとも約60%であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

【0051】

ストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そしてAusubelら、(編)CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%または約99%類似の配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500mg/ml変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液中での65%でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションに、0.2×SSC、0.01% BSA中での50%での1回以上の洗浄が続く。ストリンジェント条件下でWnt-7B様ヌクレオチド配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する(例えば、天然のタンパク質をコードする)ヌクレオチド配列を有する、RNA分子またはDNA

分子をいう。

【0052】

第2の実施形態では、Wnt-7B様核酸分子またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体の少なくとも1つに、中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、55 での6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100mg/ml変性サケ精子DNA中でのハイブリダイゼーション、続いて1×SSC、0.1% SDS中での37

での1回以上の洗浄である。用いられ得る中程度のストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYおよびKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NYを参照のこと。

【0053】

第3の実施形態では、Wnt-7B様核酸分子、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体の少なくとも1つに、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100mg/mlの変性サケ精子DNA、10%(重量/容量)デキストラン硫酸中での40 でのハイブリダイゼーション、続いて2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDS中での50 での1回以上の洗浄である。用いられ得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である(例えば、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように)。例えば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & So

ns, NYならびにKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; ShiloおよびWeinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78:6789-6792を参照のこと。

【0054】

(保存的変異)

集団中に存在し得る、Wnt-7B様配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列番号1の少なくとも1つのWnt-7B様ヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、Wnt-7B様タンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされるWnt-7B様タンパク質のアミノ酸配列に変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号2の配列、または当該分野で公知のプラスミドまたはベクターのDNAインサートのWnt-7B様ヌクレオチド配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更することなく、Wnt-7B様の野生型配列から、変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のWnt-7B様タンパク質の間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される。

【0055】

本発明の別の局面は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、Wnt-7B様タンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなWnt-7B様タンパク質は、配列番号2由来のアミノ酸配列とは異なるが、生物学的活性をなお保持する。1つの実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、Wnt-7B様アミノ酸配列の少なくとも1つに少なくとも約45%類似であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、この核酸分子によってコードされるタンパク質は、少なくとも1つのWnt-7B様ポリペプチドに少なくとも約60%類似しており、より好ましくは所定のWnt-7B様ポリペプチドに対して、少なくとも約70%

類似、少なくとも約80%類似、少なくとも約90%類似、そして最も好ましくは少なくとも約95%類似している。

【0056】

所定のWnt-7B様タンパク質に相同であるWnt-7B様タンパク質をコードする単離された核酸分子は、1つ以上のアミノ酸置換、付加または欠失がコードされたタンパク質中に導入されるように、相当するWnt-7B様ヌクレオチド配列中に1つ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失を導入することにより作成され得る。

【0057】

変異は、標準的な技法、例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発により、配列番号2中に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1つ以上の予測された非必須アミノ酸残基において作成される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野で規定されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖もつアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖もつアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖もつアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖もつアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖もつアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖もつアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。従って、Wnt-7B様中の予測された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、Wnt-7B様コード配列のすべてまたは一部分に沿って、例えば、飽和変異誘発によりランダムに導入され得、そして得られる変異体をWnt-7B様生物学的活性についてスクリーニングされ得、活性を保持する変異体を同定する。変異誘発の後、コードされたWnt-7B様タンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技法により発現され得、そしてタンパク質の活性が測定され得る。

【0058】

1つの実施形態では、変異体Wnt-7B様タンパク質は、(1)他のWnt-7B様タンパク質、他の細胞表面タンパク質、またはその生物学的に活性な部分とタンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、(2)変異体Wnt-7B様タンパク質とWnt-7B様リガンドとの間の複合体形成；(3)細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する変異体Wnt-7B様タンパク質の能力；(例えばアビジンタンパク質)についてアッセイされ得る。

【0059】

(アンチセンス)

本発明の別の局面は、Wnt-7B様核酸分子、またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体にハイブリダイズし得るかまたは相補的である単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的であるヌクレオチド配列、例えば、二本鎖cDNA分子のコード配列に相補的であるか、またはmRNA配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、Wnt-7B様コード鎖の少なくとも約10、25、50、100、250または500ヌクレオチドに相補的、またはその一部分にのみ相補的な配列を含むアンチセンス核酸分子が提供される。Wnt-7B様タンパク質のフラグメント、相補体、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、またはWnt-7B様核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

【0060】

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、Wnt-7B様をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対するアンチセンスである。用語「コード領域」は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、Wnt-7B様をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対するアンチセンスである。用語「非コード領域」は、アミノ酸に翻訳されない、コード領域に隣接する5'および3'配列をいう(すなわち、5'および3'非翻訳領域ともいう)。

【0061】

本明細書に開示されるWnt-7B様をコードするコード鎖（例えば、配列番号1）が与えられれば、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickまたはHoogsteen塩基対合の規則に従って設計され得る。このアンチセンス核酸分子は、Wnt-7B様mRNAの全コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、Wnt-7B様mRNAのコードまたは非コード領域の一部に対してのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Wnt-7B様mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いる化学的合成または酵素的連結を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増大するため、もしくはアンチセンスとセンス核酸との間に形成される二本鎖の物理的安定性を増大するために設計された種々に改変されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換されたヌクレオチドが用いられ得る）を用いて化学的に合成され得る。

【0062】

アンチセンス核酸を生成するために用いられ得る改変されたヌクレオチドの例は：5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、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-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-マンノシルケオシン

、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、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(v)、ヴィブトキシシン(wybutoxosin)、プソイドウラシル、ケオシン(queosine)、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、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(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノプリンを含む。あるいは、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクローン化された発現ベクターを用いて生物学的に産生され得る(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下のサブセクションでさらに記載されるように、目的の標的核酸に対してアンチセンス配向である)。

【0063】

代表的には、本発明のアンチセンス核酸分子は、それらがWnt-7B様タンパク質をコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれに結合するように被検体に投与されるか、またはインサイチュ(in situ)で生成され、それによって、例えば、転写および/または翻訳を阻害することによりタンパク質の発現を阻害する。このハイブリダイゼーションは、従来のヌクレオチド相補性により、安定な二本鎖を形成するか、または、例えば、DNA二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝における特異的相互作用を通じてであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例は、組織部位における直接注入を含む。あるいは、アンチセンス核酸分子は、改変されて、選択された細胞を標的にし、次いで全身的に投与される。例えば、全身投与には、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。例えば、これは、このアンチセンス核酸分子を、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによる。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書に記載のベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強

力な pol II または pol III プロモーターの制御下に配置されるベクター構築物が好適である。

【0064】

なお別の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸分子は、 α アノマー核酸分子である。 α アノマー核酸分子は、相補的 RNA と特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、そこでは、通常の β ユニットとは反対に、鎖は互いに平行に走る (Gaultier ら、(1987) *Nucleic acid Res* 15:6625-6641)。このアンチセンス核酸分子はまた、2'-O-メチルリボヌクレオチド (Inoue ら (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6131-6148)、またはキメラ RNA-DNA アナログ (Inoue ら、(1987) *FEBS Lett* 215:327-330) を含み得る。

【0065】

(リボザイムおよび PNA 成分)

核酸改変は、非制限的な例として、改変された塩基、および糖リン酸骨格が改変または誘導体化されている核酸を含む。これらの改変は、少なくとも一部分、改変された核酸の化学的安定性を、それらが、例えば、被験体における治療的適用にアンチセンス結合性核酸として用いられ得るように増大するために実施される。

【0066】

1つの実施形態では、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それらに対してリボザイムが相補的領域を有する一本鎖核酸、例えば mRNA を切断し得るリボヌクレアーゼ活性をもつ触媒的 RNA 分子である。従って、リボザイム (例えば、ハンマーヘッドリボザイム (Haselhoff および Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591 に記載されている)) は、Wnt-7B 様 mRNA 転写物を触媒的に切断し、それによって Wnt-7B 様 mRNA の翻訳を阻害するために用いられ得る。Wnt-7B 様をコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示の Wnt-7B 様 cDNA のヌクレオチド配列 (すなわち、配列番号 1) に基づいて設計さ

れ得る。例えば、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体を、活性部位のヌクレオチド配列が、Wnt-7B様をコードするmRNAにおいて切断されるべきヌクレオチド配列に相補的であるように構築し得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、Wnt-7B様mRNAは、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒的RNAを選択するために用いられ得る。例えば、Bartelら(1993) Science 261:1411-1418を参照のこと。

【0067】

あるいは、Wnt-7B様遺伝子発現は、Wnt-7B様遺伝子の調節領域（例えば、Wnt-7B様プロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的であるヌクレオチド配列を標的にし、標的細胞中のWnt-7B様遺伝子の転写を妨害する三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。一般に、Helene(1991) Anticancer Drug Des. 6:569-84；Heleneら(1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36；およびMaher(1992) Bioassays 14:807-15を参照のこと。

【0068】

種々の実施形態では、Wnt-7B様の核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変してペプチド核酸を生成し得る(Hyrupら(1996) Bioorg Med Chem 4:5-23を参照のこと)。本明細書で用いる用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格がプソイドペプチド(pseudopeptide)骨格で置換され、かつ4つの天然のヌクレオ塩基のみが保持されている、核酸模倣物、例えば、DNA模倣物をいう。PNAの中性の骨格は、低イオン強度条件下で、DNAおよびRNAへの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrupら(1996) 上述；Perry-O'Keefeら(1996) PNAS 93

: 14670 - 675に記載のような、標準的な固相ペプチド合成プロトコルを用いて実施され得る。

【0069】

Wnt - 7 B様のPNAは、治療適用および診断適用で用いられ得る。例えば、PNAは、例えば、転写または翻訳抑止 (arrest) を誘導すること、または複製を阻害することにより、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたはアンチ遺伝子剤として用いられ得る。Wnt - 7 B様のPNAはまた、例えば、PNA特異的PCRクランピングによる、例えば、遺伝子中の1塩基対変異の分析に；他の酵素、例えば、S1ヌクレアーゼと組み合わせて用いる場合、人工の制限酵素として (Hyrup B. (1966) 上述)；またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプロブまたはプライマーとして (Hyrupら (1966) 上述；Perry - O'Keefe (1996) 上述) 用いられ得る。

【0070】

別の実施形態では、Wnt - 7 B様のPNAは、例えば、それらの安定性または細胞の取り込みを増大するために、PNAに親油性基またはその他の補助基を結合することによるか、PNA - DNAキメラの形成によるか、またはリボソームの使用もしくは当該分野で公知のその他の技法によって改変され得る。例えば、PNAとDNAの有利な性質を組み合わせ得る、Wnt - 7 B様のPNA - DNAキメラが生成され得る。このようなキメラは、PNA部分の高い結合親和性および特異性を提供しながら、DNA部分と相互作用するために、DNA認識酵素、例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼを可能にする。PNA - DNAキメラは、塩基スタッキング、ヌクレオ塩基間の結合の数、および配向の点から選択された適切な長さのリンカーを用いて連結され得る (Hyrup (1996) 上述)。PNA - DNAキメラの合成は、Hyrup (1966) 上述およびFinnら (1996) Nucleic Acids Res 24:3357 - 63に記載のように実施されえる。例えば、DNA鎖を、標準的なホルホルアミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成し得、そして改変ヌクレオシドアナログ、例えば、5' - (4 - メトキシトリチル) アミノ - 5' - デオキ

シ - チミジンホスホルアミダイトを、PNAとDNAの5'末端との間に用い得る (Magら (1989) Nucl Acid Res 17:5973-88)。次いで、PNAモノマーを段階的様式でカップリングし、5' PNAセグメントと3' DNAセグメントをもつキメラ分子を生成する (Finnら (1996) 上述)。あるいは、キメラ分子は、5' DNAセグメントと3' PNAセグメントを有して合成され得る。Petersenら (1975) Bioorg Med Chem Lett 5:1119-11124を参照のこと。

【0071】

その他の実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、ペプチド (例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的にするため)、または細胞膜を横切る輸送を容易にする薬剤 (例えば、Letsingerら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:6553-6556; Lemaitreら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT公報番号WO088/09810を参照のこと) もしくは血液脳関門を横切る輸送を容易にする薬剤 (例えば、PCT公報番号W089/10134を参照のこと) のような他の付属基を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーショントリガー切断剤 (例えば、Krolら、1988、BioTechniques 6:958-976を参照のこと) またはインターカーレーティング剤 (例えば、Zon、1988、Pharm. Res. 5:539-549を参照のこと) を用いて改変され得る。この目的のために、このオリゴヌクレオチドは、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーショントリガー架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーショントリガー切断剤などの他の分子に連結され得る。

【0072】

(Wnt-7B様タンパク質)

本発明はまた、Wnt-7B様タンパク質を提供する。例えば、本発明は、70~72位のIDE、74~76位のQH Q、196~198位のMKL、または302~304位のDGC以外の、配列番号2のアミノ酸配列に関するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。例えば、単離された核酸は、70~72位の

INE、74～76位のQYQ、196～198位のMQL、および302～304位のDDCのうちの少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし得る。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、2つまたは3つのトリペプチド配列を含む。

【0073】

いくつかの実施形態において、Wnt-7B様タンパク質は、図2において提供されるアミノ酸配列（配列番号2）を含むポリペプチドを含む。本発明はまた、変異体または改変体タンパク質を含み、その任意の残基が図2に示される対応する残基から変化し得るが、なおそのWnt-7B様活性および生理学的機能を維持するタンパク質、またはその機能的フラグメントをコードする。この変異体または改変体タンパク質において、20%までまたはそれ以上の残基がそのように変化し得る。いくつかの実施形態において、残基の1%、2%、3%、5%、7%、9%、10%、13%、15%が変化する。

【0074】

本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の相同的（例えば、85%、90%、92%、95%、97%、98%、または99%の相同的）であるポリペプチドを含み、70～72位のIDE、74～76位のQH Q、196～198位のMKL、または302～304位のDGC以外の、配列番号2のアミノ酸配列に関するアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。例えば、ポリペプチドは、70～72のINE、74～76位のQYQ、196～198位のMQL、または302～304位のDDCのうち少なくとも1つのアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、2つ、3つ、または4つのこれらのトリペプチド配列を含む。

【0075】

一般に、Wnt-7B様機能を保持するWnt-7B様改変体は、配列中の特定位置の残基が他のアミノ酸により置換され、そしてさらに、親タンパク質の2つの残基間にさらなる残基（単数または複数）を挿入する可能性、および親配列から1つ以上の残基を欠失する可能性を含む。任意のアミノ酸置換、挿入または欠失は、本発明に包含される。好適な状況では、この置換は、上記で規定され

るような保存的置換である。

【0076】

本発明の1つの局面は、単離されたWnt-7B様タンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくは相同体に関する。抗Wnt-7B様抗体を惹起するための免疫原としての使用に適するポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態では、ネイティブWnt-7B様タンパク質が、標準的なタンパク質精製技法を用いる適切な精製スキームにより、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態では、Wnt-7B様タンパク質は、組換えDNA技法により生産される。組換え発現の代替えとして、Wnt-7B様タンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技法を用いて化学的に合成され得る。

【0077】

「単離された」または「精製された」タンパク質または生物学的に活性なその部分は、Wnt-7B様タンパク質が由来する細胞または組織供給源からの細胞材料またはその他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、化学的に合成されたとき、化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞材料を実質的に含まない」は、Wnt-7B様タンパク質が、単離されるかまたは組換えにより産生された細胞の細胞成分から分離されているこのタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態では、用語「細胞材料を実質的に含まない」は、非Wnt-7B様タンパク質（本明細書ではまた「汚染タンパク質」と呼ばれる）が約30%（乾燥重量による）より少ない、より好ましくは約20%より少ない非Wnt-7B様タンパク質、なおより好ましくは約10%より少ない非Wnt-7B様タンパク質、そして最も好ましくは約5%より少ない非Wnt-7B様タンパク質を有する、Wnt-7B様タンパク質の調製物を含む。このWnt-7B様タンパク質または生物学的に活性なその部分が組換えにより産生されるとき培養培地を実質的に含まないこともまた好適である。すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の容量の約20%より少ないか、より好ましくは約10%より少ないか、そして最も好ましくは約5%より少ない。

【0078】

用語「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質の合成において含まれる化学的前駆体またはその他の化学物質からこのタンパク質が分離されているWnt-7B様タンパク質の調製物を含む。1つの実施形態では、用語「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない」は、化学的前駆体またはその他の化学物質を約30%（乾燥重量による）より少く、より好ましくは化学的前駆体またはその他の化学物質を約20%より少なく、なおより好ましくは化学的前駆体またはその他の化学物質を約10%より少なく、そして最も好ましくは化学的前駆体またはその他の化学物質を約5%より少なく有するWnt-7B様タンパク質の調製物を含む。

【0079】

Wnt-7B様タンパク質の生物学的に活性な部分は、完全長のWnt-7B様タンパク質より少ないアミノ酸配列を含み、そしてWnt-7B様タンパク質の少なくとも1つの活性を示す、Wnt-7B様タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2）に十分に相長的であるか、またはそれに由来するアミノ酸配列を含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、Wnt-7B様タンパク質の少なくとも1つの活性をとまなうドメインまたはモチーフを含む。Wnt-7B様タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100またはそれ以上のアミノ酸の長さのポリペプチドであり得る。

【0080】

本発明のWnt-7B様タンパク質の生物学的活性な部分は、上記で同定された保存ドメインの少なくとも1つを含み得る。Wnt-7B様タンパク質の代替の生物学的に活性な部分は、Wnt-7B様タンパク質の細胞外ドメインを含み得る。Wnt-7B様タンパク質の別の生物学的に活性な部分は、Wnt-7B様タンパク質の膜貫通ドメインを含み得る。本発明のWnt-7B様タンパク質のなお別の生物学的に活性な部分は、Wnt-7B様タンパク質の細胞内ドメインを含み得る。

【0081】

さらに、このタンパク質のその他の領域が欠失したその他の生物学的に活性な部分が、組換え技法により調製され、ネイティブなWnt-7B様タンパク質の

1つ以上の機能的活性について評価され得る。

【0082】

1つの実施形態では、このWnt-7B様タンパク質は、配列番号2に示される任意の1つ以上のアミノ酸配列を有し得る。他の実施形態では、このWnt-7B様タンパク質は、配列番号2の任意の1つに実質的に相同であり、そして以下に詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子変動または変異誘発に起因してアミノ酸配列がなお異なるが、所定のWnt-7B様タンパク質の機能的活性を保持する。例えば、ポリペプチドは、70～72位のIDE、74～76位のQH_Q、196～198位のMKL、または302～304位のDGC以外のアミノ酸配列を含む。従って、別の実施形態では、このWnt-7B様タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列の任意の1つに少なくとも約75%相同であるアミノ酸配列を含み、そしてWnt-7B様タンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

【0083】

本発明はさらに、配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸分子にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされる、Wnt-7B様タンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくは相同体を特徴にする。

【0084】

(2つ以上の配列間の相同性の決定)

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の相同性のパーセントを決定するために、これらの配列を最適な比較の目的にアラインする(例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適アラインメントのために第1のアミノ酸または核酸配列のも配列中にギャップを導入し得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でアミノ酸またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められるとき、この分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書で用いるとき、アミノ酸または核酸「相同性」は、アミノ酸または核酸「同一性」と等価である)。

【0085】

核酸配列相同性は、2つの配列間の同一性の程度で決定され得る。この相同性は、GCGプログラムパッケージで提供されるGAPソフトウェアのような当該分野で公知のコンピュータプログラムを用いて決定され得る。NeedlemanおよびWunsch 1970 J Mol Biol 48:443-453を参照のこと。GCG GAPソフトウェアを核酸配列比較のために以下の設定を用い：5.0のGAP作成ペナルティーおよび0.3のGAP伸長ペナルティー、上記で言及した類似の核酸配列のコード領域は、好ましくは、配列番号1で示されたDNA配列のCDS（すなわちコードする）部分と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の同一性の程度を示す。

【0086】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列が、比較の特定の領域に亘って残基ごとについて同一である程度をいう。用語「配列同一性のパーセント」は、その比較の領域に亘り最適にアラインされた配列を比較すること、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合、A、T、C、G、U、またはI）がある位置の数を決定し、一致した位置の数を生成すること、比較領域中の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）で一致した位置の数を除すること、およびこの結果に100を乗じ配列同一性のパーセントを得ることにより算出される。本明細書で用いる用語「実質的に同一」は、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここで、このポリヌクレオチドは、比較領域に亘って参照配列と比較したとき、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の配列同一性そしてしばしば90～95%の配列同一性、より通常は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。ポリペプチド配列中のアミノ酸残基を比較するとき、同様の計算が用いられる。

【0087】

（キメラおよび融合タンパク質）

本発明はまた、Wnt-7B様キメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書で用いられるとき、Wnt-7B様「キメラタンパク質」または「融合タン

パク質」は、非Wnt-7B様ポリペプチドと作動可能に連結されたWnt-7B様ポリペプチドを含む。「Wnt-7B様ポリペプチド」は、Wnt-7B様に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、その一方、「非Wnt-7B様ポリペプチド」は、このWnt-7B様タンパク質に実質的に相同ではないタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう（例えば、Wnt-7B様タンパク質とは異なり、しかも同一かまたは異なる生物に由来するタンパク質）。Wnt-7B様融合タンパク質の中で、Wnt-7B様ポリペプチドは、Wnt-7B様タンパク質のすべてか、またはその一部分に対応する。1つの実施形態では、Wnt-7B様融合タンパク質は、Wnt-7B様タンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態では、Wnt-7B様融合タンパク質は、Wnt-7B様タンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。なお別の実施形態では、Wnt-7B様融合タンパク質は、Wnt-7B様タンパク質の少なくとも3つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結される」は、Wnt-7B様ポリペプチドおよび非Wnt-7B様ポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すことを意図する。非Wnt-7B様ポリペプチドは、Wnt-7B様ポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

【0088】

例えば、1つの実施形態では、Wnt-7B様融合タンパク質は、目的の活性に関与することが知られる第2のタンパク質の細胞外ドメインに作動可能に連結されたWnt-7B様ドメインを含む。このような融合タンパク質はさらに、Wnt-7B様活性を調節する化合物のためにスクリーニングアッセイにおいて利用され得る（このようなアッセイは以下に詳細に記載される）。

【0089】

1つの実施形態では、この融合タンパク質は、GST-Wnt-7B様融合タンパク質であり、ここではWnt-7B様配列が、GST（すなわち、グルタチオンS-トランスフェラーゼ）配列のC末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換えWnt-7B様の精製を容易にし得る。

【0090】

別の実施形態では、この融合タンパク質は、そのN末端に異質シグナル配列を含むWnt-7B様タンパク質である。特定の宿主では（例えば、哺乳動物宿主細胞）、Wnt-7B様の発現および/または分泌は、異質シグナル配列の使用により増大され得る。

【0091】

なお別の実施形態では、この融合タンパク質は、Wnt-7B様-免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここでは主に細胞外ドメインを含むWnt-7B様配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合される。本発明のこのWnt-7B様-免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に取り込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でWnt-7B様リガンドとWnt-7B様タンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボのWnt-7B様媒介信号伝達を抑制し得る。このWnt-7B様-免疫グロブリン融合タンパク質を用い、Wnt-7B様同族リガンドの生体利用性に影響を与え得る。Wnt-7B様リガンド/Wnt-7B様相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害の両方の処置、および細胞生存を調節（例えば、促進または阻害）することに、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのWnt-7B様-免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗Wnt-7B様抗体を産生するための免疫原として用い得、Wnt-7B様リガンドを精製し、そしてWnt-7B様リガンドとのWnt-7B様の相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。

【0092】

本発明のWnt-7B様キメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着（*stagger*）末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて粘着（*cohesive*）末端のフィルイン、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を採用することにより、インフレームで一緒に連結する。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのP

C R増幅を、キメラ遺伝子配列を生成するために次いでアニールおよび再増幅され得る、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて実施し得る（例えば、Ausbelら（編）CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと）。さらに、融合成分（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。Wnt-7B様をコードする核酸は、この融合成分がWnt-7B様タンパク質にインフレーム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

【0093】

本発明はまた、種々のWnt-7B様ポリペプチド由来のシグナル配列を提供する。このシグナル配列は、例えば、上記の、Wnt-7B様ポリペプチドのためのSignalPソフトウェアプログラムにより推定されるWnt-7B様ポリペプチドについて同定されるシグナルペプチドを含むポリペプチドを含む。これらのシグナル配列は、所望の細胞内または細胞外（細胞からの分泌が所望される場合）位置に連結されたポリペプチド配列を指向させるために有用である。いくつかの実施形態では、このシグナル配列は、連結されたポリペプチドを所望の細胞内区画に指向させるに十分であるWnt-7B様シグナル配列の一部を含む。

【0094】

（Wnt-7B様アゴニストおよびアンタゴニスト）

本発明はまた、Wnt-7B様アゴニスト（模倣物）として、またはWnt-7B様アンタゴニストとして機能するWnt-7B様タンパク質の改変体に関する。Wnt-7B様タンパク質の改変体、例えば、Wnt-7B様タンパク質の離散した点変異または短縮型が、変異誘発により生成され得る。Wnt-7B様タンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態のWnt-7B様タンパク質と実質的に同じ生物学的活性、またはその生物学的活性のサブセットを保持し得る。Wnt-7B様タンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態のWnt-7B様タンパク質の1つ以上の活性を、例えば、Wnt-7B様タンパク質を

含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流メンバーに競合的に結合することにより阻害し得る。従って、特異的生物学的効果が、限られた機能の改変体を用いた処理により惹起され得る。1つの実施形態では、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、Wnt-7B様タンパク質の天然に存在する形態を用いた処置に対して被験体におけるより少ない副作用を有する。

【0095】

Wnt-7B様アゴニスト（模倣物）として、またはWnt-7B様アンタゴニストのいずれかとして機能するWnt-7B様タンパク質の改変体は、Wnt-7B様タンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性のためのWnt-7B様タンパク質の変異体、例えば短縮型変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。1つの実施形態では、Wnt-7B様改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。Wnt-7B様改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的なWnt-7B様配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にWnt-7B様配列のセットを含む（例えば、ファージディスプレイのための）より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、酵素的に連結することにより産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なWnt-7B様改変体のライブラリーを産生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機中で実施され得、次いでこの合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なWnt-7B様配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給量を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で公知である（例えば、Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraら (1984) Annu Rev Biochem 53:323; Itakuraら (1984) Science 198:1056; Ikeら (1983) Nucl Acid Res 11:477）。

【0096】

(ポリペプチドライブラリー)

さらに、Wnt-7B様タンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、Wnt-7B様タンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のためのWnt-7B様フラグメントの多彩な集団を生成し得る。1つの実施形態では、コード配列フラグメントのライブラリーは、Wnt-7B様コード配列の二本鎖PCRフラグメントを、1分子あたり約1つのみのニックが生じる条件下、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖を形成するためにこのDNAを再生すること、S1ヌクレアーゼを用いた処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成し得る。この方法により、Wnt-7B様タンパク質の種々のサイズのN末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが派生し得る。

【0097】

点変異または短縮により作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、選択された性質を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該分野で公知である。このような技法を、Wnt-7B様タンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、およびこのコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセブル変異誘発(REM)を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、Wnt-7B様改変体を同定し得る(ArkinおよびYourvan(1992)PNAS 89:7811-7815;

Delgraveら(1993) Protein Engineering 6 : 327 - 331)。

【0098】

1つの実施形態では、細胞を基礎にしたアッセイを開発して、多彩なWnt - 7B様ライブラリー、例えば、変異体Wnt - 7B様ポリペプチドのライブラリーを分析し得る。例えば、発現ベクターのライブラリーを、通常、Wnt - 7B様依存様式(例えば、シグナル伝達複合体による)で特定のリガンドまたはレセプターに応答する細胞株中にトランスフェクトし得る。次いでトランスフェクトされた細胞を、推定のWnt - 7B様相互作用体と接触させ、そしてシグナル伝達複合体によるシグナル伝達に対する変異体Wnt - 7B様の発現の影響を、例えば、細胞活性または細胞生存を測定することにより検出し得る。次いで、プラスミドDNAを、阻害、あるいは例えばサイトカイン誘導の能力をスコアする細胞から回収し、そして個々のクローンをさらに特徴付け得る。

【0099】

(抗Wnt - 7B様抗体)

Wnt - 7B様タンパク質に対する抗体、またはWnt - 7B様タンパク質のフラグメントもまた、本発明に含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン(Ig)分子の免疫学的に活性な部分(すなわち、抗原に特異的に結合する(免疫反応する)抗原結合部位を含む分子)をいう。このような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、F_{ab}フラグメント、F_{ab'}フラグメントおよびF_{(ab')₂}フラグメント、ならびにF_{ab}発現ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。一般的に、ヒト由来の抗体分子は、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDの任意のクラスに関連し、これらは分子内に存在する重鎖の性質によってお互いに異なる。特定のクラスは同様にサブクラス(例えば、IgG₁、IgG₂など)を有する。さらに、ヒトにおいては、軽鎖はκ鎖またはλ鎖であり得る。本明細書中で抗体に対する参照は、ヒト抗体種のすべてのこのようなクラス、サブクラスおよび型に対する参照を含む。

【0100】

本発明の単離されたWnt-7B様関連タンパク質は、抗原、またはその一部もしくはフラグメントとして役立つことが意図され得、そしてさらに、免疫原として使用され、ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体の調製のための標準的な技術を用いて、抗原に免疫特異的に結合する抗体を生成し得る。全長タンパク質が使用され得るか、あるいは本発明は、免疫原として使用するための抗原の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。抗原性ペプチドフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2において示されるアミノ酸配列）の少なくとも6アミノ酸残基を含み、そしてそれらのエピトープを含み、その結果このペプチドに対して惹起された抗体は、全長タンパク質またはこのエピトープを含む任意のフラグメントと特定の免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、または少なくとも15アミノ酸残基、または少なくとも20アミノ酸残基、または少なくとも30アミノ酸残基を含む。この抗原性ペプチドにより含まれる好ましいエピトープは、そのペプチド表面上に位置するタンパク質の領域であり；通常、これらは親水性領域である。

【0101】

本発明の特定の実施形態において、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも1つのエピトープは、Wnt-7B様タンパク質の表面上に位置するこのタンパク質の領域、例えば、親水性領域である。ヒトWnt-7B様タンパク質配列の疎水性分析は、Wnt-7B様ポリペプチドのどの領域が特に親水性であるか、そして従って、抗体産生を標的にするために有用な表面残基をコードするようであるかを示す。抗体産生を標的にする手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換とともにまたはなしのいずれかの、Kyte DoolittleまたはHopp Woods法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、各々が、それらの全体が本明細書に参考として援用される、HoppおよびWoods、1981、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824-3828; KyteおよびDoolittle 1982、J. Mol. Biol. 157:105-142を参照のこと。抗原性タンパク質またはその誘導体、フラグメン

ト、アナログもしくはホモログ内の1つ以上のドメインに対して特異的な抗体もまた、本明細書中で提供される。

【0102】

本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログは、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の産生における免疫原として利用され得る。

【0103】

当該分野において公知の種々の手順が、本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログに対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の産生のために使用され得る（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, および Lane D, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。これらの抗体のうちのいくつかは、以下で考察される。

【0104】

ポリクローナル抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の動物）は、ネイティブなタンパク質、その合成改変体、または前記の誘導体を用いる1以上の注射によって免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然に存在する免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質を提示する化学的に合成されたポリペプチド、または組換え的に発現される免疫原性タンパク質を含み得る。さらに、このタンパク質は、免役されている哺乳動物において免疫原性であることが知られている第2のタンパク質に結合体化され得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールカザガイヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、および大豆トリブシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。この調製物はさらに、アジュバントを含み得る。種々のアジュバントが免疫学的応答を増加させるために使用され、このようなアジュバントとしては、Freund's（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リ

ゾレシチン、プルロニック (pluronic) ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど)、ヒトにおいて使用可能なアジュバント (例えば、Bacille Calmette - Guerin および Corynebacterium parvum) または類似の免疫刺激剤が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、MPL - TDMアジュバント (モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコレート) が挙げられる。

【0105】

免疫原性タンパク質に対するポリクローナル抗体分子は、哺乳動物から (例えば、血液から) 単離され得、そして周知の技術 (例えば、プロテインAまたはプロテインGを用いるアフィニティクロマトグラフィー (これは、主に免疫血清のIgG画分を提供する)) によってさらに精製され得る。続いて、または代替的に、求められている免疫グロブリンの標的である特定の抗原またはその抗原のエピトープがカラムに固定され、免疫アフィニティクロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製し得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkinson (The Scientist (The Scientist, Inc., Philadelphia PAより発行)、第14巻、第8号 (2000年4月17日)、25~28頁) によって考察される。

【0106】

本明細書で用いられる場合、用語「モノクローナル抗体」(MAb) または「モノクローナル抗体組成物」は、独特の軽鎖遺伝子産物および独特の重鎖遺伝子産物からなる唯一の分子種の抗体分子を含む抗体分子の集団をいう。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR) は、すべての分子の集団に同一である。従って、MAbは、抗原への独特の結合親和性によって特徴付けられる抗原の特定のエピトープと免疫反応可能な抗原結合部位を含む。

【0107】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法 (例えば、Kohler および Milstein, Nature, 256: 495 (1975) に記載されるような方法) を使用して調製され得る。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハム

スター、または他の適切な宿主動物は、免疫因子で代表的に免疫され、免疫因子に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生し得るリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

【0108】

免疫因子としては、代表的に、タンパク質抗原、そのフラグメントまたはその融合タンパク質が挙げられる。一般的には、ヒト起源の細胞が望まれる場合は、末梢血リンパ球が使用されるか、または非ヒト哺乳動物供給源が望まれる場合は、脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用されるか、のいずれかである。次いで、適切な融合因子（例えば、ポリエチレングリコール）を使用して、リンパ球を不死化細胞株に融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（*Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986) 59-103頁*）。不死化細胞株は、哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髓腫細胞に通常形質転換される。通常ラットまたはマウスの骨髓腫細胞株が使用される。このハイブリドーマ細胞は、1以上の物質（融合されていない不死化細胞の増殖または生存を阻害する）を好ましくは含む、適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親の細胞が酵素、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（*HGPRT*または*HPRT*）を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的に、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み（「*HAT*培地」）、それらの物質は、*HGPRT*欠失細胞の増殖を阻害する。

【0109】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合する細胞株であり、それらは、選択された抗体産生細胞による安定な高レベルの抗体の発現を支持し、そして*HAT*培地のような培地に敏感である。より好ましい不死化細胞株は、マウス骨髓腫株であり、それらを、例えば、*Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California* および *American Type Culture Collection, Manassas, Virginia* から入手し得る。ヒト骨髓腫およびマウス - ヒト骨髓腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載される

(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 51-63頁)。

【0110】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって決定されるか、またはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA））によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、MunsonおよびPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) のスキャッチャード分析によって決定され得る。標的抗原に対する高い程度の特異性および高結合親和性を有する抗体を同定することが、目的であり、モノクローナル抗体の治療的適用において特に重要である。

【0111】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、希釈手順を限定することによって、クローンをサブクローニングし得、そして標準的な方法（Goding, 1986）によって増殖し得る。例えば、この目的のために適切な培養培地としては、Dulbecco's Modified Eagle's MediumおよびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物内の腹水としてインビボで増殖され得る。

【0112】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、プロテインAセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィー）によって、培養培地または腹水から、単離または精製され得る。

【0113】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,567号に記載される方法）によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され得、そして配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに配置され得、次いでそれらは、宿主細胞（例えば、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞）にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインへのコード配列の置換（米国特許第4,816,567号；Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)）によってか、または非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列のすべてまたは一部の配列をコードする免疫グロブリンへの共有結合的な連結によって改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換されるか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変領域に置換されて、キメラ二価の抗体を作製し得る。

【0114】

本発明のタンパク質抗原に対する抗体は、さらに、ヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。これらの抗体は、投与された免疫グロブリンに対するヒトによる免疫応答を引き起こさずに、ヒトへの投与に適する。抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または他の抗体の抗原結合部分配列）であり、それらは主にヒト免疫グロブリンの配列から構成され、そして非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列のげっ歯類CDRまたはCDR配列での置換によって、Winterおよび共同研究者の方法（Jonesら、Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmannら、Nature, 332:323-327 (1988)）

; Verhoeyenら、Science, 239:1534-1536(1988))の後に達成され得る。(米国特許第5,225,539号もまた参照のこと。)いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFv骨格(framework)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエントの抗体においても、移入されたCDRまたは骨格配列においても見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、および代表的には2つの可変ドメインを実質的にすべて含む。これらにおいて、すべてのまたは実質的にすべてのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンの領域に対応し、そしてすべてまたは実質的にすべての骨格領域は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の領域に対応する。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を必要に応じて含む(Jonesら、1986; Riechmannら、1988; および Presta、Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992))。

【0115】

本質的に、十分なヒト抗体は、CDRを含む軽鎖および重鎖の両方の全体配列がヒト遺伝子から生じる抗体分子に関連する。このような抗体を、「ヒト抗体」、または「十分なヒト抗体」と本明細書中で呼ぶ。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ(trioma)技術; ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら、1983 Immunol Today 4:72を参照のこと)およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁)によって調製され得る。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実行において使用され得、そしてヒトハイブリドーマの使用によってか(Coteら、1983. Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030を参照のこと)、またはインビトロでのEpstein Barr Virusを用いたヒトB細胞による形質転換によって(Coleら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY,

Alan R. Liss, Inc., 77-96頁を参照のこと) 産生され得る。

【0116】

さらに、ヒト抗体はまた、さらなる技術(ファージディスプレイライブラリー(HoogenboomおよびWinter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marksら、J. Mol. Biol., 222:581(1991))を含む)を使用して産生され得る。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物(例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が、部分的または完全に不活化されているマウス)に導入することによって、ヒト抗体は作製され得る。チャレンジの際にヒト抗体産生が観察され、このことはすべての点(遺伝子再配列、アセンブリー、および抗体レパートリーを含む)でヒトにおいて観察されたものに密接に類似する。このアプローチは、例えば、以下に記載される: 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,661,016号、およびMarksら(Bio/Technology 10、779-783(1992)); Lonbergら(Nature 368 856-859(1994)); Morrison(Nature 368、812-13(1994)); Fishwildら(Nature Biotechnology 14、845-51(1996)); Neuberger(Nature Biotechnology 14、826(1996)); ならびにLonbergおよびHuszar(Intern. Rev. Immunol. 13 65-93(1995))。

【0117】

ヒト抗体は、抗原によるチャレンジに応答して動物の内因性抗体よりもヒト抗体を十分に産生するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を使用して、さらに産生され得る。(PCT公開WO94/02602を参照のこと。)非ヒト宿主における免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖をコードする内因性遺伝子は、耐えられなくなっており、そしてヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な遺伝子座は、宿主のゲノムに挿入される。例えば、要求

性ヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を使用して、ヒト遺伝子は組み込まれる。次いで、すべての所望の改変を提供する動物を、完全な改変の相補体よりもより少ない改変の相補体を含む中間トランスジェニック動物を雑種することによって子孫として得る。このような非ヒト動物の好ましい実施形態は、マウスであり、PCT公開WO96/33735およびWO96/34096に開示されるようにXenomouseTMと呼ばれる。この動物は、ヒト免疫グロブリンを十分に分泌するB細胞を産生する。目的の免疫原による免疫後の動物から（例えば、ポリクローナル抗体の調製）、またはあるいは、動物由来の不活化されたB細胞（例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ）から、抗体を直接得ることが可能である。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子は、抗体を直接得るために回復され、そして発現され得るか、または抗体のアナログ（例えば、1本鎖Fv分子）を得るために、さらに改変され得る。

【0118】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主（マウスとして例証される）を生成するための方法の例は、米国特許第5,939,598号に記載される。それを、以下の工程を包含する方法によって得ることが可能である：遺伝子座の再配列を防ぎ、そして再配列された免疫グロブリン重鎖位置の転写物の形成、選択マーカーをコードする遺伝子を含む標的ベクターによってもたらされる欠失を防ぐために、胚性幹細胞における少なくとも1つの内因性重鎖位置由来のJセグメント遺伝子を欠失する工程；およびトランスジェニックマウス（その体細胞および生殖細胞は、選択マーカーをコードする遺伝子を含む）を、胚性幹細胞から生成する工程。

【0119】

目的の抗体（例えば、ヒト抗体）を産生する方法は、米国特許第5,916,771号に開示される。それは以下の工程を包含する：重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、培養物中の1つの哺乳動物宿主細胞に導入する工程、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、別の哺乳動物宿主細胞に導入する工程、ならびにハイブリッド細胞を形成するために2つの

細胞融合する工程。ハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。

【0120】

この手順のさらなる改善において、免疫原上の臨床的に関連するエピトープを同定する方法、および関連するエピトープに高い親和性で免疫特異的に結合する抗体を選択する関連する方法は、PCT公開WO99/53049に開示される。

【0121】

技術はまた、本発明の抗原性タンパク質に特異的な1本鎖抗体の産生に適用され得る（例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと）。さらに、方法は、 F_{ab} 発現ライブラリーの構築に適用され得（例えば、Huseら、1989 Science 246:1275-1281を参照のこと）、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに対して所望の特異性を有するモノクローナル F_{ab} フラグメントの迅速かつ効果的な同定を可能にする。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントは、以下を含むが、これらに限定されない当該分野で公知の技術によって産生され得る：(i) 抗体分子のペプシン消化によって産生される $F_{(ab')_2}$ フラグメント；(ii) $F_{(ab')_2}$ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって産生される F_{ab} フラグメント(iii) ペプシンおよび還元剤を用いた抗体分子の処理によって産生される F_{ab} フラグメント、ならびに(iv) F_v フラグメント。

【0122】

二重特異的抗体がまた、提供される。二重特異的抗体は、モノクローナル抗体（好ましくはヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体）であって、これは、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有する。この場合において、結合特異性の1つは、本発明の抗原性タンパク質に対してである。第2の結合標的は、任意の他の抗原であり、そして有利には、細胞表面タンパク質またはレセプターもしくはレセプターサブユニットである。

【0123】

二重特異的抗体を作製する方法は、当該分野で公知である。伝統的に、二重特異的抗体の組換え体生成は、2つの免疫グロブリンの重鎖/軽鎖の対の同時発現に基づき、ここで、これら2つの重鎖は、異なる特異性を有する(MilsteinおよびCuello、Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせに起因して、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の異なる抗体分子の潜在的混合物を作製し、このうち1つのみが、正確な二重特異的構造を有する。この正確な分子の精製は、通常アフィニティクロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順は、1993年5月13日開示のWO93/08829、およびTrauneckerら、1991 EMBO J., 10:3655-3659において開示される。

【0124】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合され得る。この融合は、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常ドメインを有し、ヒンジ、CH2、およびCH3領域の少なくとも部分を含む。この融合物の少なくとも1つに存在する軽鎖結合のために必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH1)を有することが好ましい。この免疫グロブリン重鎖融合体、および所望の場合、この免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別々の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物体に同時トランスフェクトされる。二重特異的抗体の生成のさらなる詳細は、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照のこと。

【0125】

WO96/27011に記載される別のアプローチに従って、抗体分子対の間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するために操作され得る。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置換される。大きな側鎖についての同一または同様のサイズの代

償的な「空洞」は、大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）で置換することによって、第2の抗体分子の界面上に生成される。このことは、ホモダイマーのような他の不必要な最終生成物を超えて、ヘテロダイマーの収量を増加するための機構を提供する。

【0126】

二重特異的抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、 $F(a b')$ ₂二重特異的抗体）として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を生成するための技術は、文献において記載される。例えば、二重特異的抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Brennanら、Science 229: 81 (1985) は、インタクトな抗体がタンパク分解的に切断されて $F(a b')$ ₂フラグメントを生成する手順を記載する。これらのフラグメントは、ビシナルジチオールを安定化し、そして分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール錯化剤ナトリウム亜ヒ酸塩の存在下で還元される。次いで、この生成された $F a b'$ フラグメントは、チオニトロベンゾエート(TBN)誘導体に変換される。次いで、 $F a b' - TBN$ 誘導体の1つは、メルカプトエチルアミンでの還元によって $F a b' -$ チオールに再変換され、そしてこれは等モル量の他の $F a b' - TBN$ 誘導体と混合されて二重特異的抗体を形成する。生成された二重特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

【0127】

さらに、 $F a b'$ フラグメントは、E. coli から直接回収され得、そして化学的にカップリングされて二重特異的抗体を形成する。Shalabyら、J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) は、完全にヒト化された二重特異的抗体 $F(a b')$ ₂分子の生成を記載する。各 $F a b'$ フラグメントは、E. coli から別々に分泌され、そしてインビトロでの指向的な化学的カップリングに供され、二重特異的抗体を形成する。従って、形成されたこの二重特異的抗体は、Erbb2レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合し得、そしてヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解性を誘引し得る。

【0128】

組換え細胞培養物から直接二重特異的抗体フラグメントを作製し、そして単離するための種々の技術が記載されてきた。例えば、二重特異的抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生される。K o s t e l n y ら、J . I m m u n o l . 148 (5) : 1547 - 1553 (1992)。F o s およびJ u n タンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のF a b ' 部分に連結される。この抗体ホモダイマーは、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで再酸化されて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた、抗体ホモダイマーの産生のために使用され得る。H o l l i n g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90 : 6444 - 6448 (1993) に記載されるこの「ディアボディー (d i a b o d y) 」技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための代替的な機構を提供した。このフラグメントは、短すぎて同じ鎖上の2つのドメインの間を対にできないリンカーによって軽鎖可変領域 (V_L) に接続された重鎖可変ドメイン (V_H) を含む。従って、1つのフラグメントのV_HおよびV_Lドメインは、別のフラグメントの相補的なV_LおよびV_Hドメインと対になるように強制され、これによって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F_v (s F_v) ダイマーの使用によって二重特異的抗体フラグメントを作製するための別のストラテジーもまた、報告されてきた。G r u b e r ら、J . I m m u n o l . 152 : 5368 (1994) を参照のこと。

【0129】

2つより多い結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が、調製され得る。T u t t ら、J . I m m u n o l . 147 : 60 (1991)。

【0130】

例示的な二重特異的抗体は、2つの異なるエピトープに結合し得、このうち少なくとも1つは、本発明のタンパク質抗原に起源を有する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、T細胞レセプター分子のような白血球（例えば、C D 2、C D 3、C D 28、またはB 7）、あるいはI g G に対するF c レセプター (F c R) (例えば、F c R I (C D 64)、F c R I I (C D 32) およびF c R I I I (C D 16)) 上の誘発分子に結合するアームに、特

定の抗原を発現する細胞に対する細胞の防御機構に焦点を合わせるように結合され得る。二重特異的抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞傷害性因子に指向するために使用され得る。これらの抗体は、抗原結合アーム、および細胞傷害性因子または放射性核種キレーター（例えば、EOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETA）に結合するアームを保有する。目的の別の二重特異的抗体は、本明細書中に記載のタンパク質抗原に結合し、そしてさらに組織因子（TF）に結合する。

【0131】

ヘテロ接合体抗体はまた、本発明の範囲内である。ヘテロ接合体抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不必要な細胞に標的化するために（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の処置のために（WO91/00360；WO92/200373；EP03089）提案されてきた。この抗体（架橋剤を含む抗体を含む）は、インビトロで、合成タンパク質化学において公知の方法を使用して調製され得ることが意図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応の使用またはチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第4,676,980号において開示される試薬が挙げられる。

【0132】

本発明の抗体を、エフェクター機能について、例えば癌の処置における抗体の効力を増大するように改変することが望ましくあり得る。例えば、システイン残基は、Fc領域に導入され得、これによってこの領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にする。従って、生成されるこのホモダイマー抗体は、改良されたインターナリゼーションの可能性および/または増加した補体媒介細胞死滅、ならびに抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を有し得る。Caronら、J. Exp. Med.、176:1191-1195（1992）およびShopes、J. Immunol. 148:2918-2922（1992）を参照のこと。増大した抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体はまた、Wolffら、Cancer Research、53:2560-2656（1993）に記載さ

れるヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、抗体は操作され得、これは二重のFc領域を有し、そしてこれによって増大した補体溶解およびADCCの可能性を有し得る。Stevensonら、*Anti - Cancer Drug Design*, 3: 219 - 230 (1989)を参照のこと。

【0133】

本発明はまた、細胞傷害性の薬剤（例えば、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素学的に活性な毒素、あるいはそれらのフラグメント）、または放射性同位体（すなわち、放射性結合体））に結合した抗体を含む免疫接合体に関する。

【0134】

このような免疫接合体の生成において有用な化学療法剤は、上記に記載される。使用され得る酵素学的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖（*Pseudomonas aeruginosa*由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン（*modeccin*）A鎖、 α -サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンチン（*dianthin*）タンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質（PAPI、PAPII、およびPASP）、*momordica charantia*インヒビター、クルシン（*curcin*）、クロチン（*crotin*）、*sepaonaria officinalis*インヒビター、ゲロニン（*gelonin*）、ミトゲリン（*mitogellin*）、レストリクトシン（*restrictocin*）、フェノマイシン（*phenomycin*）、エノマイシン（*enomycin*）、およびトリコテセン（*tricothecene*）が挙げられる。種々の放射性核種は、放射性結合した抗体の生成のために利用可能である。その例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、および¹⁸⁶Reが挙げられる。

【0135】

抗体および細胞傷害性因子の結合体は、種々の二官能性タンパク質結合因子（例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（*iminothiolane*）（IT）、イ

ミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート HCL）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド（glutaredialdehyde））、ビスアジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス-（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン2,6-ジイソシアネート）、およびビス-活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン））を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、Science, 238:1098(1987)に記載されるように調製され得る。炭素-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸（MX-DTPA）は、放射性ヌクレオチドの抗体への結合のための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照のこと。

【0136】

別の実施形態において、腫瘍の前標的化における利用のために、この抗体は、「レセプター」（例えば、ストレプトアビジン）に結合され得、ここで抗体-レセプター結合体は患者に投与され、続いて除去剤を使用して結合していない結合体が循環から除去され、次いで細胞傷害性因子に次々に結合する「リガンド」（例えば、アビジン）が投与される。

【0137】

本明細書中に開示された抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。この抗体を含むリポソームは、当該分野で公知の方法によって調製される（例えば、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688(1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); および米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号において記載される）。増強された循環時間を有するリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示される。

【0138】

特に、有用であるリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含有す

る脂質組成物との逆層エバポレーション法によって生成され得る。リポソームは、規定された孔径のフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームを生じる。本発明の抗体のFab'フラグメントは、Martinら、J. Biol. Chem., 257:286-288(1982)に記載のようにジスルフィド交換反応を介してリポソームに結合体化され得る。化学治療剤(例えば、Doxorubicin)は、必要に応じてリポソーム内に含まれ得る。Gabizonら、J. National Cancer Inst., 81(19):1484(1989)を参照のこと。

【0139】

本発明のタンパク質に対する抗体は、タンパク質の局在および/または定量化に関連する、当該分野で公知の方法において使用され得る(例えば、適切な生理学的サンプル内のタンパク質のレベルの測定における使用のため、診断方法における使用のため、タンパク質の画像化における使用のためなど)。所定の実施形態では、タンパク質に対する抗体または抗原結合ドメインを含むその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログは、薬理学的に活性な組成物として使用される(以下を参照のこと)。

【0140】

本発明のタンパク質に特異的な抗体は、標準技術(例えば、免疫親和性クロマトグラフィまたは免疫沈降)によって、タンパク質を単離するために用いられ得る。このような抗体は、細胞からの天然のタンパク質抗原の精製および宿主細胞において発現される組換え的に産生された抗原の精製を容易にし得る。さらに、抗原タンパク質の発現の量およびパターンを評価するために、このような抗体を用いて(例えば、細胞の溶解液または細胞上清における)抗原タンパク質を検出し得る。このタンパク質に対する抗体は、例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングする(すなわち、物理的に連結する)ことにより容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワ

サビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン(dichlorotriazinylamine)フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ、そして、適切な放射性物質の例としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

【0141】

本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体、ならびに本明細書中で開示されるスクリーニングアッセイによって同定される他の分子は、薬学的組成物の形態で種々の障害の処置のために投与され得る。このような組成物を調製する際に関する原理および考慮、ならびに成分の選択の際の手引きは、例えば、Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 第19編(Alfonso R. Gennaroら、編) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; および Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, 第4巻)、1991、M. Dekker, New York. に提供される。

【0142】

抗原性タンパク質が、細胞内にあり、そして完全な抗体が、インヒビターとして使用される場合、抗体を内在化することが、好ましい。しかし、リポソームはまた、抗体または抗体フラグメントを細胞に送達するために使用され得る。抗体フラグメントが使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合

する最小の抑制フラグメントが、好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を維持するペプチド分子が、設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得、そして/または組み換えDNA技術によって産生され得る。例えば、Marascoら、1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893を参照のこと。本明細書中の処方物はまた、処置される特定の指標について必要な1より多くの活性化合物を含み得、好ましくは、互いに悪影響を与えない相補的活性を有する化合物を含み得る。あるいは、またはさらに、この組成物は、その機能を増強する薬剤（例えば、細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤または増殖抑制剤）を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効である量で組み合わせて適切に存在する。

【0143】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術または界面重合化によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン - マイクロカプセルおよびポリ - （メタクリル酸メチル）マイクロカプセル）で、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンにおいてトラップされ得る。

【0144】

インビボ投与のために使用される処方物は、滅菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0145】

徐放性調製物が、調製され得る。徐放性調製物の適切な例としては、抗体を含む有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形された粒子（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L - グルタミン酸のコポリマーおよびエチル - L - グルタメート、非分解性エチレン - ビニルアセテート

、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（例えば、LUPRON DEPOTTM（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドで構成される注入可能なミクロスフェア））、ならびにポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、100日を超えて分子の放出を可能にする一方で、特定のヒドロゲルは、より短い期間でタンパク質を放出する。

【0146】

本発明の抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、および完全なヒト抗体を含む）は、治療剤として使用され得る。このような薬剤は、一般的に、被験体における疾患および病理を処置または予防するために使用される。抗体調製物（好ましくは、その標的抗原について高い特異性および高い親和性を有するもの）は、被験体に対して投与され、そして一般的に、標的とのその結合に起因して効果を有する。このような効果は、所定の抗体分子と問題の標的抗原との間の相互作用の特異的性質に依存して、2つの種類のうちの1つであり得る。第1の例では、抗体の投与は、標的とそれが天然に結合する内因性リガンドとの結合を抑止または阻害し得る。この場合、抗体は、標的に結合し、そして天然に存在するリガンドの結合部位をマスクし、ここでそのリガンドは、エフェクター分子として働く。従って、レセプターは、シグナル伝達経路を媒介する。そのリガンドは、シグナル伝達の原因である。

【0147】

あるいは、その効果は、標的分子上のエフェクター結合部位への結合によって、抗体が生理学的結果を誘発するものであり得る。この場合、標的（存在し得ないかまたは疾患もしくは病理を欠損し得る内因性リガンドを有するレセプター）が、代理のエフェクターリガンドとして抗体を結合して、レセプターによって、レセプターに基づくシグナル伝達事象を開始する。

【0148】

治療的に有効な量の本発明の抗体は、治療目的を達成するために必要とされる量を一般的にいう。上記のように、これは、いくつかの場合において標的の機能を妨害し、そして他の場合において生理学的応答を促進する、抗体とその標的抗

原の間の結合相互作用であり得る。投与されるために必要とされる量は、その特異的抗原についての抗体の結合親和性にさらに依存し、そしてまた、その量は、投与される抗体が、その抗体が投与される自由な体積の他の被験体から枯渇される速度に依存する。本発明の抗体または抗体フラグメントの治療的有效用量の一般的な範囲は、非限定的な例として、約0.1mg/kg体重～約50mg/kg体重であり得る。一般的な投薬の頻度は、例えば、毎日2回～1週間に1回の範囲であり得る。

【0149】

(Wnt-7B様組換え発現ベクターおよび宿主細胞)

本発明の別の局面は、Wnt-7B様タンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、これが連結される別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントが連結し得る環状の二本鎖DNAループをいう。ベクターの別の型は、ウイルス性ベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントは、このウイルス性ゲノムに連結され得る。特定のベクターは、宿主細胞中で自発的に複製し得、この中に導入される(例えば、細菌の複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソードの哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)は、宿主細胞に導入される際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そしてこれによって宿主のゲノムと同調して複製される。さらに、特定のベクターは、これらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、このプラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるため、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、ウイルス性ベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような発現ベクターのこのような他の形態を含むことを意図し、これは等価な機能を果たす。

【0150】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で含み、これはこの組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基いて選択される1つ以上の調節配列を含むこと意味し、これは発現される核酸配列に作動可能に連結される。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする（例えば、このベクターが宿主細胞に導入される場合、インビトロ転写／翻訳系または宿主細胞において）ような様式で調節配列に連結されることを意味することを意図する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。このような調節配列は、例えば、Goeddel、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990)に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指向する配列（例えば、組織特異的調節配列）を含む。発現ベクターの設計が形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に理解される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載されるような核酸によりコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質または融合ペプチドを含む）（例えば、Wnt-7B様タンパク質、Wnt-7B様タンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を生成し得る。

【0151】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における、Wnt-7B様タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、Wnt-7B様タンパク質は、細菌細胞（例えば、E. coli）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、

Academic Press, San Diego, Calif. (1990)においてさらに考察される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳され得る。

【0152】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有する*E. coli*において実行される。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の3つの目的のために役立つ：(1)組換えタンパク質の発現を増加させること；(2)組換えタンパク質の溶解度を増加させること；および(3)親和性精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製の際に補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位が、融合部分の結合部に導入され、そして融合タンパク質の精製の後に、組換えタンパク質が組換えタンパク質の融合部分から分離されることを可能にする。このような酵素、およびその同族の認識配列は、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを、それぞれ、標的の組換えタンパク質に融合するpGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) *Gene* 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.)およびpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.)が挙げられる。

【0153】

適切な誘導性非融合*E. coli*発現ベクターの例としては、pTrc (Amannら(1988) *Gene* 69:301-315)およびpET 11d (Studierら、*GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY* 185, Academic

Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89) が挙げられる。

【0154】

E. coli における組換えタンパク質発現を最大化するための1つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でタンパク質を発現させることである。例えば、Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128を参照のこと。別のストラテジーは、各アミノ酸についての個々のコドンが、E. coli において優先的に利用されるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである(例えば、Wadaら(1992) Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118を参照のこと)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

【0155】

別の実施形態において、Wnt-7B様発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母S. cerevisiaeにおける発現のためのベクターの例には、pYepSec1(Baldarir, (1987) EMBO J 6: 229-234)、pMFa(KurjanおよびHerskowitz, (1982) Cell 30: 933-943)、pJRY88(Schultzら, (1987) Gene 54: 113-123)、pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、ならびにpicZ(Invitrogen Corp., San Diego, Calif.) が挙げられる。

【0156】

あるいは、Wnt-7B様は、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養された昆虫細胞(例えば、SF9細胞)中でタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ(Smithら(1983) Mol Cell Biol 3: 2156-2

165) および pVL シリーズ (Lucklow および Summers (1989) *Virology* 170:31-39) が挙げられる。

【0157】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329:840) および pMT2PC (Kaufman ら (1987) *EMBO J* 6:187-195) が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方のための他の適切な発現系については、例えば、Sambrook ら、*MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0158】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する）中で優先的に核酸の発現を指向し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkert ら (1987) *Genes Dev* 1:268-277）、リンパ特異的プロモーター（Calame および Eaton (1988) *Adv Immunol* 43:235-275）、特に、T細胞レセプタープロモーター（Winoto および Baltimore (1989) *EMBO J* 8:729-733) および免疫グロブリン (Banerji ら (1983) *Cell* 33:729-740; Queen および Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748) のプロモーター、ニューロン特異

的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle (1989) PNAS 86:5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlundら (1985) Science 230:912-916）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、ミルク乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州出願公開第264,166号）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターもまた含まれる（例えば、マウスホックス (murine hox) プロモーター (KesselおよびGruss (1990) Science 249:374-379) および α -フェトプロテインプロモーター (CampesおよびTilghman (1989) Genes Dev 3:537-546)。

【0159】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、そのDNA分子は、Wnt-7B様 mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現（DNA分子の転写によって）を可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型におけるアンチセンスRNA分子の連続的な発現を指向する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結される調節配列が選択され得る。例えば、アンチセンスRNAの直接的な構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指向する、ウイルスプロモーターおよび/もしくはエンハンサー、または調節配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態であり得、ここではアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、例えば、Weintraubら、「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」、Reviews - Trends in Genetics、第1巻(1)1986を参照のこと。

【0160】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関

する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象の細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をいうことが理解される。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変は次の世代において存在し得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書中で使用されるような用語の範囲内に含まれる。

【0161】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、Wnt-7B様タンパク質は、細菌細胞（例えば、E. coli）、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0162】

ベクターDNAは、従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術を紹介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションするための適切な方法は、Sambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0163】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションについては、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部のみが外来

DNAをそのゲノムに組み込み得ることが知られている。これらの組み込み物を同定および選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、一般的には目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マーカーには、薬物に対する耐性を付与するもの（例えば、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキセート）が含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、Wnt-7B様をコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、あるいは別々のベクター上で導入され得る。導入された核酸とともに安定にトランスフェクトされる細胞は、薬物選択によって同定され得る（例えば、選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存し、一方、他の細胞は死滅する）。

【0164】

本発明の宿主細胞（例えば、培養中の原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞）は、Wnt-7B様タンパク質を産生（すなわち、発現）するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して、Wnt-7B様タンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、Wnt-7B様タンパク質が産生されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞（ここに、Wnt-7B様をコードする組換え発現ベクターが導入された）を培養する工程を包含する。別の実施形態において、この方法はさらに、培地または宿主細胞からWnt-7B様を単離する工程を包含する。

【0165】

（トランスジェニック動物）

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、Wnt-7B様コード配列が導入される、受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞は、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得、ここで外因性のWnt-7B様配列は、それらのゲノムまたは相同組換え動物（ここで内因性のWnt-7B様配列が変更されている）に導入される。このような動物は、Wnt-7B様の機能および/または活性を研究するため、ならびにWnt-7B様の活性のモジュレーターを同定および/または評価

するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」とは、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのような齧歯動物であり、ここでこれらの動物の1つ以上の細胞は、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが含まれる。導入遺伝子は、細胞のゲノムに組み込まれ（この細胞からトランスジェニック動物が発生する）、そして成熟動物のゲノムに残存する外因性のDNAであり、それによって、このトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織においてコード遺伝子産物の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであり、ここで、内因性Wnt-7B様遺伝子は、この内因性の遺伝子と、動物の発生の前に動物の細胞（例えば、動物の胚細胞）に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって、変更されている。

【0166】

本発明のトランスジェニック動物は、Wnt-7B様をコードする核酸を、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって、受精した卵母細胞の雄性前核に導入すること、およびこの卵母細胞が偽妊娠雌性フォスター動物（*foster animal*）中で発生することを可能にすることによって作製され得る。ヒトWnt-7B様cDNAは、非ヒト動物のゲノムに導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトWnt-7B様遺伝子の非ヒトホモログ（例えば、マウスWnt-7B様遺伝子）は、ヒトWnt-7B様cDNAに対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得（上にさらに記載される）、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた導入遺伝子中に含まれ、その導入遺伝子の発現の効率を増大させ得る。組織特異的調節配列（単数または複数）は、特定の細胞に対して、Wnt-7B様タンパク質の発現を指向するために、Wnt-7B様導入遺伝子に作動可能に連結され得る。胚の操作およびマイクロインジェクションを介するトランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を生成するための方法は、当該分野で従来的になっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号；同

第4,870,009号;および同第4,873,191号;ならびにHogan 1986、MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。同様の方法は、他のトランスジェニック動物の作製のために使用される。トランスジェニック初代動物は、そのゲノムにおけるWnt-7B様導入遺伝子の存在および/またはその動物の組織または細胞中のWnt-7B様 mRNAの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック初代動物は、導入遺伝子を有するさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、Wnt-7B様をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物に繁殖され得る。

【0167】

相同組換え動物を作製するために、欠失、付加、または置換が導入されて、それによってWnt-7B様遺伝子が変化(例えば、機能的に破壊)されている、少なくとも、Wnt-7B様遺伝子の一部を含むベクターを調製する。Wnt-7B様遺伝子はヒト遺伝子(例えば、配列番号1のcDNA)であり得るが、より好ましくは、ヒトWnt-7B様遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号29のヒトWnt-7B様遺伝子のマウスホモログは、マウスゲノムにおいて内因性Wnt-7B様遺伝子を変更するのに適切な相同組換えベクターを構築するために使用され得る。1つの実施形態において、そのベクターは、相同組換えに際して、内因性Wnt-7B様遺伝子が、機能的に破壊される(すなわち、機能的タンパク質をもはやコードしない;「ノックアウト」ベクターともいわれる)ように設計される。

【0168】

あるいは、このベクターは、相同組換えに際して、内因性Wnt-7B様遺伝子の変異されるか、あるいは他の様式で変更されるが、なお機能性タンパク質をコードするように設計され得る(例えば、上流の調節領域を変更して、それによって内因性Wnt-7B様タンパク質の発現を変更し得る)。相同組換えベクターにおいて、Wnt-7B様遺伝子の変更された部分は、Wnt-7B様遺伝子

のさらなる核酸によって、その5'末端および3'末端で隣接され、相同組換えが、ベクターによって運ばれる外因性Wnt-7B様遺伝子と胚幹細胞中の内因性Wnt-7B様遺伝子との間で起こることを可能にする。さらなる隣接するWnt-7B様核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えに十分な長さである。代表的に、数キロベースの隣接するDNA(5'末端および3'末端の両方における)が、ベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの記載について、Thomasら(1987)Cell 51:503を参照のこと。このベクターは、胚幹細胞株に導入され(例えば、エレクトロポレーションによって)、この導入されたWnt-7B様遺伝子が内因性Wnt-7B様遺伝子と相同組換えされた細胞が、選択される(例えば、Liら(1992)Cell 69:915を参照のこと)。

【0169】

次いで、この選択された細胞を、動物(例えば、マウス)の胚盤胞へ注入して、凝集キメラを形成する。例えば、Bradley(1987)のTERATO CARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH、Robertson編、IRL、Oxford 113頁~152頁を参照のこと。次いで、このキメラ胚を、適切な偽妊娠雌性フォスター動物に移植し得、そしてこの胚を、一定期間置く。それらの胚芽細胞中に相同組換えDNAを保有する子孫を使用して、動物を繁殖し得、ここで、この動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達によって相同組換えされたDNAを含む。相同的組換えベクターおよび相同的組換え動物を構築するための方法が、さらに以下に記載される; Bradley(1991)Curr Opin Biotechnol 2:823-829; PCT国際公開番号: WO90/11354; WO91/01140; WO92/0968; およびWO93/04169。

【0170】

別の実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含む、非ヒトトランスジェニック動物が産生され得る。このような系の1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。

cre/loxPリコンビナーゼ系の記載については、例えば、Laksら(1992)PNAS 89:6232-6236を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である(O'Gormanら(1991)Science 251:1351-1355)。cre/loxPリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が、必要となる。このような動物は、例えば、2種のトランスジェニック動物(一方は選択されたタンパク質をコードした導入遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコードした導入遺伝子を含む)を交配することによる、「二重の」トランスジェニック動物の構築によって提供され得る。

【0171】

本明細書中に記載されるトランスジェニック非ヒト動物のクローンがまた、Wilmutら(1997)Nature 385:810-813に記載される方法に従って、産生され得る。簡単には、トランスジェニック動物からの細胞(例えば、体細胞)を、単離および誘導し、増殖サイクルから出させて、そしてG₀期に入らせ得る。次いで、静止細胞を、例えば、電気パルスの使用により、静止細胞が単離される同種動物由来の、摘出された卵母細胞へ融合し得る。次いで、この再構成された卵母細胞を培養し、これにより、これは桑実胚または未分化胚芽細胞に発達し、次いで、偽妊娠雌性フォスター動物に移される。この雌性フォスター動物の産生子孫は、この細胞(例えば、体細胞)が単離される動物のクローンである。

【0172】

(薬学的組成物)

本発明のWnt-7B様核酸分子、Wnt-7B様タンパク質、および抗Wnt-7B様抗体(これはまた、本明細書中で「活性化化合物」と称される)、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、およびホモログが、投与に適した薬学的組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、代表的に、核酸分子、タンパク質または抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中

で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与に適合した、任意および全ての溶媒、分散液、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤 (delaying agent) などを含むことが意図される。適切なキャリアは、当該分野における標準的な参考書である、Remington's Pharmaceutical Sciencesの最新版(本明細書中で参考として援用される)に記載される。このようなキャリアまたは希釈剤の好ましい例としては、水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。リボソームおよび非水性ビヒクル(例えば、不揮発性油)もまた、使用され得る。薬学的に活性な物質に対する、このような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤が、この活性化合物と不適合である限りを除いて、この組成物におけるそれらの使用が考慮される。補助活性化合物もまた、組成物へ組み込まれ得る。

【0173】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与の経路と適合するように処方される。投与の経路の例には、非経口(例えば、静脈内、皮内、皮下)投与、経口(例えば、吸入)投与、経皮(局所的)投与、経粘膜(transmucosal)投与、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝液；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度の調節のための薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジあるいはガラスまたはプラスチックから作製される多用量のバイアル中に入れられ得る。

【0174】

注射使用に適した薬学的組成物は、滅菌の水溶液(水溶性である場合)または

水性分散液、滅菌の注射可能な溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与について、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌性水、Cremophor EL™ (BASF、 Parsippany、 N. J.) またはリン酸塩緩衝化生理食塩水 (PBS) が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌性でなければならず、そして容易な注射可能性 (syringeability) が存在する程度に流動的であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して維持されなければならない。このキャリアは、例えば、以下を含む溶媒または分散液であり得る：水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）ならびにそれらの適切な混合物。適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合、要求される粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張剤（例えば、糖、マンニトール (mannitol)、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注入可能組成物の長期の吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチン）を組成物に含ませることによってもたらされ得る。

【0175】

滅菌注射可能液剤は、必要量のこの活性化合物（例えば、Wnt-7B様タンパク質あるいは抗Wnt-7B様抗体）を、適切な溶媒中に、必要な場合、上記で列挙される成分の1つまたは組み合わせと共に組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般的に、分散液は、活性化合物を、基本 (basic) 分散媒および上記で列挙される成分からの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中へ組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合において、調製方法は、減圧乾燥および凍結乾燥であり、これにより、既に滅菌濾過されたその溶液から、活性成分および任意のさらなる所

望の成分の粉末を得る。

【0176】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤へ圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュ (mouth wash) としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして素早く動かされ (スウィッシュ) (swish)、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、任意の以下の成分または同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤 (例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン)；賦形剤 (例えば、デンプンまたはラクトース)、崩壊剤 (例えば、アルギン酸)、Primogel、またはコーンスターチ；滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes)；グライダント (glidant) (例えば、コロイド状二酸化ケイ素)；甘味剤 (例えば、スクロースまたはサッカリン)；あるいは香味剤 (例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー)。

【0177】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤 (例えば、二酸化炭素のような気体) を含む圧縮容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器から、エアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0178】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透されるバリアに対して適切な浸透剤が、処方において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用によって達成され得

る。経皮投与については、この活性化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏剤、軟膏、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

【0179】

この化合物はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤ベースと共に）または保持浣腸の形態で調製され得る。

【0180】

1つの実施形態において、この活性化合物は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、制御放出処方物）、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性の生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当該業者には明らかである。これらの材料はまた、Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手可能である。リボソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染させた細胞へ標的化されるリボソームを含む）がまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【0181】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用される投薬単位形態は、処置される被験体のための単一の投薬量として適切な、物理的に別個の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアとともに、所望の治療的效果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、この活性化合物の固有の特性、および達成される特定の治療効果によって決定され、そしてこれらに直接依存する。

【0182】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとし

て使用され得る。遺伝子治療ベクターは、被験体へ、例えば米国特許第5,703,055号に記載されるような、多数の経路のいずれかによって送達され得る。従って、送達はまた、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）、または定位注射（例えば、Chenら（1994）PNAS 91:3054-3057を参照のこと）を含み得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物には、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターが挙げられ得、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれる徐放性マトリックスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが、組換え細胞からインタクトで産生され得る場合（例えば、レトロウイルスベクター）、この薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。

【0183】

薬学的組成物は、投与のための使用説明書を伴って、容器、包装、またはディスペンサーに含まれ得る。

【0184】

（本発明の使用および方法）

本明細書中に記載される核酸分子、タンパク質、タンパク質ホモログ、および抗体が、以下の方法の1つ以上において使用され得る：（a）スクリーニングアッセイ；（b）検出アッセイ（例えば、染色体マッピング、細胞および組織型決定、司法生物学）、（c）予測医学（例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、臨床試験モニタリング、および薬理ゲノミックス）；および（d）処置方法（例えば、治療および予防）。従って、他の細胞性タンパク質と相互作用するWnt-7B様タンパク質を、使用して、（i）それぞれのタンパク質活性を調節し；（ii）細胞の増殖を調節し；（iii）細胞の分化を調節し；そして（iv）細胞の生存を調節する。

【0185】

本発明の単離された核酸分子は、Wnt-7B様タンパク質を発現するために（例えば、遺伝子治療適用の際に宿主細胞における組み換え発現ベクターを介して）使用され、Wnt-7B様 mRNA（例えば、生物学的サンプルにおける）またはWnt-7B様遺伝子における遺伝的病变を検出し得、かつ以下にさら

に記載されるようなWnt-7B様活性を調節し得る。さらに、Wnt-7B様タンパク質は、Wnt-7B様活性または発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングし、ならびにWnt-7B様タンパク質の不十分かもしくは過剰な産生（例えば、増殖障害または分化障害）あるいはWnt-7B様野生型タンパク質と比較して減少または異常な活性を有するWnt-7B様タンパク質形態の産生によって特徴づけられる障害を処置するために使用され得る。さらに、本発明の抗Wnt-7B様抗体は、Wnt-7B様タンパク質を検出および単離し、ならびにWnt-7B様活性を調節するために使用され得る。

【0186】

本発明は、さらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規の薬剤および本明細書中に記載される処置のためのそれらの使用に関する。

【0187】

（スクリーニングアッセイ）

本発明は、調節因子、すなわち、Wnt-7B様タンパク質に結合するか、あるいは例えば、Wnt-7B様発現またはWnt-7B様活性に対して刺激効果または阻害効果を有する、候補化合物または候補薬剤、あるいは試験化合物または試験薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中において「スクリーニングアッセイ」とも称される）を提供する。

【0188】

1つの実施形態において、本発明は、Wnt-7B様のタンパク質またはポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはそれらの活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における任意の多数のアプローチを使用して得られ得、これらのライブラリーには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアクセス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプロ

ーチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である(Lam(1997)Anticancer Drug Des 12:145)。

【0189】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る:DeWittら(1993)Proc Natl Acad Sci U.S.A.90:6909;Erbら(1994)Proc Natl Acad Sci U.S.A.91:11422;Zuckermannら(1994)J Med Chem 37:2678;Choら(1993)Science 261:1303;Carrellら(1994)Angew Chem Int Ed Engl 33:2059;Carellら(1994)Angew Chem Int Ed Engl 33:2061;およびGallopら(1994)J Med Chem 37:1233。

【0190】

化合物のライブラリーは、溶液中で(例えば、Houghten(1992)Biotechniques 13:412~421)、あるいはビーズ上(Lam(1991)Nature 354:82~84)、チップ上(Fodor(1993)Nature 364:555~556)、細菌(Ladner 米国特許第5,223,409号)、孢子(Ladner 米国特許第5,233,409号)、プラスミド(Cullら(1992)Proc Natl Acad Sci USA 89:1865~1869)またはファージ上(ScottおよびSmith(1990)Science 249:386~390;Devlin(1990)Science 249:404~406;Cwirllaら(1990)Proc Natl Acad Sci U.S.A.87:6378~6382;Felici(1991)J Mol Biol 222:301~310;上記Ladner)において示され得る。

【0191】

1つの実施形態において、アッセイは細胞ベースのアッセイであり、ここで、

膜結合形態のW n t - 7 B様タンパク質、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物が、W n t - 7 B様タンパク質に結合する能力が、決定される。例えば、細胞は、哺乳動物起源または酵母細胞であり得る。この試験化合物がW n t - 7 B様タンパク質に結合する能力の決定は、例えば、その試験化合物を放射性同位体標識または酵素標識とカップリングさせて、その結果、この試験化合物のW n t - 7 B様タンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する結合が、複合体におけるその標識化合物を検出することによって決定され得ることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてその放射性同位体が、放射線放射の直接の計数により、またはシンチレーション計数により、検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識が、適切な基質の生成物への転換を決定することにより、検出され得る。1つの実施形態において、このアッセイは、膜結合形態のW n t - 7 B様タンパク質、またはその生物学的に活性な部分をその細胞表面上に発現する細胞を、W n t - 7 B様と結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物に試験化合物を接触させる工程、ならびにこの試験化合物がW n t - 7 B様タンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がW n t - 7 B様タンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、W n t - 7 B様またはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

【0192】

別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、これは、膜結合形態のW n t - 7 B様タンパク質またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物が、W n t - 7 B様タンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物が、W n t - 7 B様またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力の

決定は、例えば、Wnt-7B様相互作用タンパク質が、Wnt-7B様標的分子に結合またはこれら標的分子と相互作用する能力を決定することによって、達成され得る。本明細書中において使用する場合には、「標的分子」とは、Wnt-7B様タンパク質が自然に結合または相互作用する分子であり、例えば、Wnt-7B様タンパク質を発現する細胞表面上の分子、第二の細胞表面上の分子、細胞外環境中の分子、細胞膜の内部表面と会合する分子、または細胞質分子である。Wnt-7B様標的分子は、非Wnt-7B様分子あるいは本発明のWnt-7B様タンパク質またはポリペプチドである。1つの実施形態において、Wnt-7B様標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を通して細胞内への細胞外シグナル（例えば、化合物が膜結合Wnt-7B様分子に結合することにより発生するシグナル）の伝達を促進する。その標的は、例えば、触媒活性を有する第二の細胞内タンパク質、または下流シグナル分子のWnt-7B様との会合を容易にするタンパク質であり得る。

【0193】

Wnt-7B様タンパク質がWnt-7B様標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、直接的結合を決定するための上記方法の1つにより、達成され得る。1つの実施形態において、Wnt-7B様タンパク質がWnt-7B様標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、その標的分子の活性を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の活性は、その標的の細胞セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、 IP_3 など）の誘導を検出すること、適切な基質への標的の触媒活性/酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動的に連結されたWnt-7B様応答性調節エレメントを含む）の誘導を検出すること、または細胞応答（例えば、細胞生存度、細胞分化、または細胞増殖）を検出することにより、決定され得る。

【0194】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞アッセイであり、Wnt-7B様タンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物に接触さ

せる工程、ならびにその試験化合物がW n t - 7 B様タンパク質またはその生物学的に活性な部分と結合する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物の、W n t - 7 B様タンパク質への結合は、上記のように、直接的または間接的にいずれかで決定され得る。1つの実施形態において、このアッセイは、W n t - 7 B様タンパク質またはその生物学的に活性な部分を、W n t - 7 B様を結合する公知の化合物に接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物に接触させる工程、ならびにその試験化合物がW n t - 7 B様タンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がW n t - 7 B様タンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、W n t - 7 B様、またはその生物学的に活性な部分と優先的に相互作用する能力を決定する工程を包含する。

【0195】

別の実施形態において、アッセイは、無細胞アッセイであり、W n t - 7 B様タンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させる工程、ならびにその試験化合物がW n t - 7 B様タンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物がW n t - 7 B様の活性を調節する能力の決定は、例えば、W n t - 7 B様タンパク質が、W n t - 7 B様標的分子に結合する能力を、直接的結合の決定のための上記方法の1つによって決定することにより、達成され得る。代替の実施形態において、この試験化合物がW n t - 7 B様の活性を調節する能力の決定は、W n t - 7 B様タンパク質が、W n t - 7 B様標的分子をさらに調節する能力を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の適切な基質に対する触媒活性 / 酵素活性は、上に記載のように決定され得る。

【0196】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、W n t - 7 B様タンパク質またはその生物学的に活性な部分を、W n t - 7 B様に結合する公知の化合物に接触させてアッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物がW n t - 7 B様タンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がW n t - 7 B様タ

ンパク質と相互作用する能力の決定は、Wnt-7B様タンパク質が、Wnt-7B様標的分子と優先的に結合するか、またはその標的分子の活性を調節する能力を決定する工程を包含する。

【0197】

本発明の無細胞アッセイは、Wnt-7B様の、可溶性の形態または膜結合形態の両方の使用に受け入れられる。膜結合形態のWnt-7B様を含む無細胞アッセイの場合には、Wnt-7B様の膜結合形態が溶液中に維持されるように、可溶化剤を利用することが所望され得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤（例えば、n-オクチルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton（登録商標）X-100、Triton（登録商標）X-114、Thesit（登録商標）、イソトリデシルポリ（エチレングリコールエーテル）_n（Isotridecypoly（ethylene glycol ether）_n）、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、3-（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホネート（3-（3-cholamidopropyl）dimethylamminiol-1-propane sulfonate）（CHAPS）、または3-（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート（3-（3-cholamidopropyl）dimethylamminiol-2-hydroxy-1-propane sulfonate）（CHAPSO）、が挙げられる。

【0198】

本発明の上記アッセイ方法の1つより多い実施形態において、Wnt-7B様、またはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合形態からの複合形態の分離を促進し、そしてそのアッセイの自動化に適用させることが、所望され得る。試験化合物の、Wnt-7B様への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での、Wnt-7B様の標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するために適切な任意の容器内で、達成され得る。

。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1実施形態において、そのタンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、GST-Wnt-7B様融合タンパク質またはGST標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical、St. Louis、MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いでこれらは、試験化合物と合わせられるか、あるいは試験化合物および吸着されない標的タンパク質、またはWnt-7B様タンパク質のいずれかと合わせられ、そしてこの混合物が、複合体形成に貢献する条件下(例えば、塩およびpHに関して生理学的条件)でインキュベートされる。インキュベーションに続いて、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体がマトリックスから解離され得、そしてWnt-7B様の結合レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使用して決定し得る。

【0199】

タンパク質をマトリックスに固定するための他の技術がまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、Wnt-7B様、またはその標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンとの結合体化を利用して、固定され得る。ビオチン化Wnt-7B様、または標的分子は、当該分野において周知の技術(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals、Rockford、Ill.)を使用して、ビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から調製され得、そしてストレプトアビジン被覆した96ウェルのプレート(Pierce Chemical)のウェルに固定され得る。あるいは、Wnt-7B様、または標的分子と反応性であるがWnt-7B様タンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、そのプレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的またはWnt-7B様が、抗体結合体化によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定複合体に関しての上記のものに加えて、Wnt-7B

様、または標的分子と反応性の抗体を使用する複合体の免疫検出、ならびにWnt-7B様、または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

【0200】

別の実施形態において、Wnt-7B様発現のモジュレーターは、細胞を候補化合物と接触させ、そして細胞中のWnt-7B様mRNAまたはタンパク質の発現を決定する方法において同定される。候補化合物の存在下でのWnt-7B様mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、候補化合物の非存在下でのWnt-7B様mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較される。次いで、候補化合物は、この比較に基づいて、Wnt-7B様発現のモジュレーターとして同定され得る。例えば、Wnt-7B様mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりも、その存在下における方が大きい（統計的に有意に大きい）場合、この候補化合物は、Wnt-7B様mRNAまたはタンパク質の発現の刺激物質として同定される。あるいは、Wnt-7B様mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりもその存在下の方が少ない（統計的に有意に少ない）場合、この候補化合物は、Wnt-7B様mRNAまたはタンパク質の発現のインヒビターとして同定される。細胞中のWnt-7B様mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、Wnt-7B様mRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書中に記載の方法によって決定され得る。

【0201】

本発明のなお別の局面において、Wnt-7B様タンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「ベイト（bait）タンパク質」として使用されて（例えば、米国特許第5,283,317号；Zervosら（1993）Cell 72:223-232；Maduraら（1993）J Biol Chem 268:12046-12054；Bartelら（1993）BioTechniques 14:920-924；Iwabuchiら（1993）Oncogene 8:1693-1696；およびBrent WO94/10300を参照のこと）、Wnt-7B様に結合するか、またはこれと相互作用し、そしてWnt-7B様活性を調節する他のタ

ンパク質（「Wnt-7B様結合タンパク質」または「Wnt-7B様-bp」）を同定し得る。このようなWnt-7B様結合タンパク質はまた、例えば、Wnt-7B様経路の上流または下流エレメントとしてWnt-7B様タンパク質によるシグナル伝達に関与するようである。

【0202】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる、大部分の転写因子のモジュール的性質に基づく。簡潔には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。一方の構築物においては、Wnt-7B様をコードする遺伝子が公知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物においては、DNA配列のライブラリー由来の、未同定タンパク質（「プレイ」または「サンプル」）をコードするDNA配列が、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用して、Wnt-7B様依存的複合体を形成し得る場合、この転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、非常に近くにある。近位にあることにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写を可能にする。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーが、単離され得、そしてWnt-7B様と相互作用するタンパク質をコードするクローニングされた遺伝子を得るために使用され得る。

【0203】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な薬剤および本明細書中に記載の処置のためのこの薬剤の使用に関する。

【0204】

（検出アッセイ）

本明細書中で同定されるcDNA配列の部分またはフラグメント（および対応する完全な遺伝子配列）は、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法で使用され得る。例えば、これらの配列を使用して、（i）染色体上にそれぞれの遺伝子をマッピングし得；従って遺伝病と関連する遺伝子領域を位置決定し得る；（ii

）微量の生物学的サンプルから個体を同定し得る（組織型決定）；および（i i i）生物学的サンプルの法医学的識別を助け得る。これらの適用は、以下の節において記載される。

【0205】

（染色体マッピング）

一旦遺伝子の配列（または配列の一部）が単離されると、この配列を用いて染色体上に遺伝子の位置をマッピングし得る。このプロセスは、染色体マッピングと呼ばれる。従って、本明細書中に記載のWnt-7B様配列の一部またはフラグメントを用いて、それぞれ、Wnt-7B様遺伝子の位置を染色体上にマッピングし得る。Wnt-7B様配列を染色体にマッピングすることは、これらの配列と、疾患に関連する遺伝子とを相関付ける際の重要な第一歩である。

【0206】

簡潔には、Wnt-7B様遺伝子は、Wnt-7B様配列からPCRプライマー（好ましくは、15～25bpの長さ）を調製することにより染色体にマッピングされ得る。Wnt-7B様配列のコンピューター分析を用いて、ゲノムDNAにおける1つより多いエキソンにまたがらないプライマーを迅速に選択し得、従って、増幅プロセスを複雑にし得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために使用され得る。Wnt-7B様配列に対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが増幅されたフラグメントを生じる。

【0207】

体細胞ハイブリッドは、異なる哺乳動物由来の体細胞（例えば、ヒトおよびマウス細胞）を融合することにより調製される。ヒトおよびマウス細胞のハイブリッドが増殖および分裂するにつれ、それらは、無作為な順序で徐々にヒト染色体を失うが、マウス染色体を維持する。特定の酵素を欠くことから、マウス細胞は増殖できないが、ヒト細胞は増殖できる培地を使用することにより、必要な酵素をコードする遺伝子を含む1つのヒト染色体が維持される。種々の培地を使用することによって、ハイブリッド細胞株のパネルが確立され得る。パネルにおける各細胞株は、単一のヒト染色体または少数のヒト染色体のいずれかおよびマウス

染色体の完全なセットを含み、これにより、個々の遺伝子を特定のヒト染色体にマッピングすることが容易に可能になる (D' E u s t a c h i o ら (1 9 8 3) S c i e n c e 2 2 0 : 9 1 9 - 9 2 4)。ヒト染色体のフラグメントのみを含む体細胞ハイブリッドはまた、転座および欠失を伴うヒト染色体を使用することにより生成され得る。

【0208】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定の配列を割り当てるための迅速な手順である。1つのサーマルサイクラーを用いて一日に3つ以上の配列が割り当てられ得る。W n t - 7 B 様配列を使用して、オリゴヌクレオチドプライマーを設計すると、下位位置決定 (s u b l o c a l i z a t i o n) は、特定の染色体由来のフラグメントのパネルを用いて達成され得る。

【0209】

中期染色体スプレッドに対するDNA配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (F I S H) をさらに使用して、一工程で正確な染色体位置を提供し得る。染色体スプレッドは、コルセミド (染色体紡錘体を破壊する) のような化学物質により分裂が中期においてブロックされた細胞を使用して行われ得る。この染色体は、トリプシンで短時間処理され得、次いで、ギムザ染色され得る。薄いバンドおよび濃いバンドのパターンが各染色体で発生し、その結果、これらの染色体は、個々に同定され得る。F I S H 技術は、500または600塩基ほどの長さのDNA配列と共に使用され得る。しかし、1,000塩基より大きなクローンは、簡単な検出に十分なシグナル強度で、独特の染色体位置に結合する可能性がより高い。好ましくは、1,000塩基、そしてより好ましくは、2,000塩基が、妥当な時間量で良好な結果を得るために十分である。この技術の総説については、V e r m a ら、H U M A N C H R O M O S O M E S : A M A N U A L O F B A S I C T E C H N I Q U E S (P e r g a m o n P r e s s , N e w Y o r k 1 9 8 8) を参照のこと。

【0210】

染色体マッピングの試薬は、単一の染色体またはその染色体上の単一部位をマークするために個々に使用され得るか、または試薬のパネルは、複数部位および

／または複数染色体をマークするために使用され得る。遺伝子の非コード領域に対応する試薬は、実際に、マッピング目的のために好ましい。コード配列は、遺伝子ファミリー内に保存される可能性がより高く、従って、染色体マッピングの間に交叉ハイブリダイゼーションの機会が増大する。

【0211】

一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされると、その配列の染色体上の物理的位置は、遺伝子マップデータと相関し得る。このようなデータは、例えば、McKusick, MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通じてオンラインで入手可能)において見いだされる。次いで、同じ染色体領域にマッピングされる遺伝子と疾患との間の関係は、例えば、Egelandら(1987) Nature, 325:783-787に記載される連鎖分析(物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝)によって同定され得る。

【0212】

さらに、Wnt-7B様遺伝子と関連する疾患に罹患した個体と、この疾患に罹患していない個体との間のDNA配列における差異が決定され得る。罹患した個体のいくらかまたは全てにおいて変異が認められるが、非罹患個体のいずれにおいても認められない場合、この変異は、特定の疾患の原因となる因子である可能性が高い。罹患個体と非罹患個体の比較は、一般に、染色体における構造的変化(例えば、染色体スプレッドから可視であるか、またはそのDNA配列に基づいたPCRを用いて検出可能な欠失または転座)を最初に見つけることを包含する。最終的に、いくらかの個体に由来する遺伝子の完全な配列決定を行って、変異の存在を確認し、かつ多型に由来する変異を識別し得る。

【0213】

(組織型決定(tissue typing))

本発明のWnt-7B様配列はまた、わずかな生物学的サンプルから個体を識別するために使用され得る。この技術において、個体のゲノムDNAは、1つ以上の制限酵素で消化され、そして同定のために独特のバンドを得るためにサザン

プロット上でプローブされる。本発明の配列は、RFLP（米国特許第5,272,057号に記載の「制限フラグメント長多型」）のためのさらなるDNAマーカーとして有用である。

【0214】

さらに、本発明の配列を用いて、個体のゲノムの選択された部分について実際の塩基ごとにDNA配列を決定する代替的技術を提供し得る。従って、本明細書中に記載のWnt-7B様配列を用いて、配列の5'末端および3'末端から2つのPCRプライマーを調製し得る。次いで、これらのプライマーを使用して、個体のDNAを増幅し得、そして続いてこれを配列決定し得る。

【0215】

この様式で調製された、個体由来の対応するDNA配列のパネルは、各個体が、対立遺伝子差異に起因するこのようなDNA配列の独特のセットを有するので、唯一の個体識別を提供し得る。本発明の配列は、個体由来および組織由来の配列のこのような識別を得るために使用され得る。本発明のWnt-7B様配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。対立遺伝子のバリエーションは、これらの配列のコード領域においてある程度生じ、そして非コード領域においてより大きな程度に生じる。個々のヒト間での対立遺伝子のバリエーションは、各500塩基につき約1回の頻度で生じると推定される。対立遺伝子のバリエーションの多さは、制限フラグメント長多型（RFLP）を含む単一ヌクレオチド多型（SNP）に起因する。

【0216】

本明細書中で記載の配列の各々は、標準（これに対して個体からのDNAが識別の目的で比較され得る）として使用され得る。より多くの多型が非コード領域で生じるので、個体を区別するために、それほど多くの配列が必要であるわけではない。配列番号1の非コード配列は、おそらく10～1,000プライマーのパネルを用いてポジティブな個体識別を不自由なく提供し得る。これらのプライマーは、各々が100塩基の増幅された非コード配列を生じる。推定コード配列が使用される場合、ポジティブな個体識別に関するプライマーのより多くの適切な数は、500～2,000である。

【0217】

Wnt-7B様配列のさらなる用途は、生物学的サンプルにおける細胞型または組織型を同定することである。上記で議論したように、種々のWnt-7B様遺伝子は1つ以上の細胞型において発現される。従って、1つ以上のWnt-7B様遺伝子に由来するRNA分子の存在に基づいて細胞型が同定され得る。種々のWnt-7B様遺伝子の組織分布は、以下の図19～23および実施例6～11において示され、そして議論される。

【0218】

(法医学的生物学におけるWnt-7B様配列の使用)

DNAに基づく識別技術はまた、法医学的生物学において使用され得る。法医学的生物学は、例えば、犯罪の加害者をポジティブに識別するための手段として、犯罪現場で見出された生物学的証拠の遺伝子型決定を利用する科学分野である。このような識別を行うために、PCR技術を用いて非常に少量の生物学的サンプル(例えば、犯罪現場で見出された毛髪もしくは皮膚のような組織、または血液、唾液もしくは精液のような体液)から得られたDNA配列を増幅し得る。次いで、増幅された配列は標準と比較され、それによって、生物学的サンプルの起源の識別を可能にし得る。

【0219】

本発明の配列を使用して、ヒトゲノムにおける特定の遺伝子座に標的化され得るポリヌクレオチド試薬(例えば、PCRプライマー)を提供し得る。このPCRプライマーは、例えば、別の「識別マーカ―」(すなわち、特定の個体に独特な別のDNA配列)を提供することにより、DNAベースの法医学的識別の信頼性を増大し得る。上記のように、実際の塩基配列情報は、制限酵素で生成したフラグメントにより形成されるパターンに対する正確な代替手段として識別のために使用され得る。Wnt-7B様遺伝子の非コード領域に標的化される配列は、より多くの多型が非コード領域に生じ、このことにより、この技術を使用して個体を区別することがより容易になるので、この用途のために特に適切である。ポリヌクレオチド試薬の例としては、Wnt-7B様配列またはその部分(例えば、本明細書中に記載のWnt-7B様遺伝子の非コード領域に由来するフラグメ

ント)が挙げられ得、この部分は、少なくとも20塩基、好ましくは少なくとも30塩基の長さを有する。

【0220】

本明細書中に記載のWnt-7B様配列は、ポリヌクレオチド試薬(例えば、インサイチュハイブリダイゼーション技術において使用され得る標識プローブまたは標識可能プローブ)を提供して、特定の組織(例えば、脳組織など)を同定するためにさらに使用され得る。これは、法医学的病理学者に未知の起源の組織が提示された場合に非常に有用であり得る。このようなWnt-7B様プローブのパネルを使用して、種により、および/または起源の型により組織を同定し得る。

【0221】

類似の様式で、これらの試薬(例えば、Wnt-7B様プライマーまたはプローブ)を用いて、組織培養物を夾雑物質についてスクリーニングし得る(すなわち、培養物中の異なる型の細胞の混在についてのスクリーニング)。

【0222】

(治療剤の生物学的効果の決定)

本発明の種々の実施形態において、適切なインビトロまたはインビボアッセイを利用して、特定の治療剤の効果、およびその投与が罹患組織の処置を示すか否かを決定する。

【0223】

種々の特定の実施形態において、インビトロアッセイが患者の障害に関与する代表的な細胞型で行われ、所定の治療剤がこの細胞型に対して所望の効果を発揮したか否かを決定し得る。治療において使用する化合物は、ヒト被験体において試験する前に適切な動物モデル系において試験され得る。これらの動物モデル系としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなど。同様に、インビボ試験については、当該分野で公知の任意の動物モデル系が、ヒト被験体に対する投与の前に使用され得る。

【0224】

(悪性疾患)

Wnt-7B様タンパク質は、細胞膜に位置し、そして細胞の増殖および分化の調節に関与すると考えられている。従って、本発明の治療剤は、細胞の過剰増殖および/または細胞増殖の制御の欠損(例えば、癌、悪性疾患および腫瘍)に関連する疾患または障害の治療的処置または予防的処置において有用であり得る。そのような過剰増殖障害の総説について、例えば、Fishmanら、1985、MEDICINE、第2版、J.B.Lippincott Co.、Philadelphia、PAを参照のこと。

【0225】

本発明の治療剤を、悪性疾患および関連する障害の処置または予防における効力について、当該分野内において公知の任意の方法によってアッセイし得る。そのようなアッセイとしては、形質転換された細胞または患者の腫瘍由来の細胞を利用するインビトロアッセイ、ならびに癌または悪性疾患の動物モデルを使用するインビボアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。潜在的に有効な治療剤は、例えば、コントロールと比較して、培養物中での腫瘍由来細胞または形質転換細胞の増殖を阻害するか、または動物モデルにおいて腫瘍の後退を生じる治療剤である。

【0226】

本発明の実施において、一旦、悪性疾患または癌が、活性を調節すること(すなわち、阻害するか、アンタゴナイズするか、またはアゴナイズする)による処置に対して感受性であることが示されると、引き続いて、その癌または悪性疾患が、タンパク質機能を調節するように作用する治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0227】

(前悪性状態)

癌または悪性疾患の治療または予防処置において有効な本発明の治療剤はまた、前悪性状態の処置のために、および/または前悪性から新生物状態もしくは悪性疾患状態への進行を防ぐために投与され得る。そのような予防的用途または治療的用途が、新生物または癌への先行する進行が知られているか、またはそれが疑われる状態(特に、過形成、化生、または最も詳細には、異形成からなる非新

生物細胞増殖が生じた場合)において、示される。そのような異常な細胞増殖の総説について、例えば、Robbins & Angell、1976、BASIC PATHOLOGY、第2版、W.B. Saunders Co.、Philadelphia、PAを参照のこと。

【0228】

過形成は、細胞の構造または機能における有意な変化なしに、組織または器官における細胞数の増加を含む、制御された細胞の増殖の形態である。例えば、子宮内膜の過形成は、しばしば子宮内膜癌に進行することが実証されている。化生は、成熟した細胞または十分に分化した細胞の1つの型が、成熟した細胞の別の型に置換する、制御された細胞増殖の形態である。化生は、上皮細胞または結合組織細胞において生じ得る。異形成は、一般に癌の前駆体であると考えられ、そして上皮において主に見出される。異形成は、非新生物細胞増殖の最も無秩序な形態であり、個々の細胞の均一性および細胞の構築上の配向の損失を含む。異形成は、慢性の刺激または炎症が存在する場所で特徴的に生じ、そしてしばしば、頸部、気道、口腔、および胆嚢において見出される。

【0229】

あるいは、または過形成、化生もしくは異形成として特徴付けられる異常な細胞増殖の存在に加えて、患者由来の細胞サンプル内で、インビボまたはインビトロのいずれかで示される形質転換表現型または悪性疾患表現型の1つ以上の特徴の存在が、上記のタンパク質の活性を調節する能力を有する治療剤の予防的/治療的投与の望ましさの指標である。形質転換された表現型の特徴としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：(i)形態学的変化；(ii)よりゆるい、下層への付着；(iii)細胞間接触阻害の喪失；(iv)足場依存性の喪失；(v)プロテアーゼ放出；(vi)増加した糖輸送；(vii)減少した血清要求性；(viii)胎児抗原の発現；(ix)250kDa細胞表面タンパク質の消滅など。例えば、Richardsら、1986、MOLECULAR PATHOLOGY、W.B. Saunders Co.、Philadelphia、PAを参照のこと。

【0230】

本発明の特定の実施形態において、悪性疾患についての以下の素因の1つ以上を示す患者が、治療剤の有効量の投与によって処置される：(i)悪性疾患に関連する染色体転座（例えば、慢性骨髄性白血病についてのフィラデルフィア染色体（*bcr / abl*）および濾胞性リンパ腫についての*t*（14；18）など）；(ii)家族性ポリープ症またはガードナー症候群（結腸癌の可能性のある前兆）；(iii)未確認の重要性の単クローン性高ガンマグロブリン血症（多発性骨髄腫の可能性のある前駆体）；ならびに(vi)メンデル（遺伝子）遺伝パターンを示す癌または前癌疾患（例えば、結腸の家族性ポリープ症、ガードナー症候群、遺伝性外骨腫症、多発性内分泌腺腫症（*polyendocrine adenomatosis*）、ポイツ-ジェガーズ症候群、フォン・レックリングハウゼン病の神経線維腫症、アミロイド産生および褐色細胞腫をともなう甲状腺髄様癌（*medullary thyroid carcinoma*）、網膜芽細胞腫、頸動脈小体腫瘍、皮膚の黒色癌、眼内の黒色癌、色素性乾皮症、毛細血管拡張性運動失調、チェディアック-東症候群、白子症、ファンコーニ再生不良性貧血およびブルーム症候群）を有する人の一親等。

【0231】

別の実施形態において、本発明の治療剤が、ヒト患者に投与されて、乳癌、結腸癌、肺癌、膵臓癌、または子宮癌、あるいは黒色腫または肉腫の進行を防ぐ。

【0232】

（過剰増殖性障害および異常増殖性（*dysproliferative*）障害）

本発明の1つの実施形態において、治療剤が、過剰増殖性障害または良性の異常増殖性障害の治療的処置または予防的処置において投与される。過剰増殖性疾患または障害の処置または予防における本発明の治療剤の効力が、当該分野において公知の任意の方法によってアッセイされ得る。そのようなアッセイとしては、インビトロの細胞増殖アッセイ、過剰増殖性疾患または障害の動物モデルを使用するインビトロまたはインビボアッセイなどが挙げられる。潜在的に効果的な治療剤は、例えば、コントロールとの比較において、培養物中の細胞増殖を促進し得るか、あるいは動物モデルにおける増殖または細胞増殖を生じ得る。

【0233】

本発明の特定の実施形態は、肝臓の肝硬変（瘢痕が、通常の肝臓再生プロセスを上回る状態）；瘢痕プロセスが通常の再生を妨げる、皮膚の形状を損じることを生じるケロイド（過形成性瘢痕）形成の処置；乾癬（皮膚の過剰な増殖および適切な細胞運命の決定の遅延によって特徴付けられる一般的な皮膚の状態）；良性腫瘍；線維性嚢状態および組織肥厚（例えば、良性脾臓肥厚）の処置または予防に関する。

【0234】

（神経変性障害）

Wnt-7B様タンパク質は、細胞成熟の脱調節およびアポトーシス（この両方が神経変性疾患の特徴である）に関係する。従って、本発明の治療剤（限定されることはないが、特に上記のタンパク質の活性を調節（または供給）する治療剤）が、神経変性疾患の処置または予防において効果的であり得る。神経変性障害に關与する上記のタンパク質の活性を調節する本発明の治療剤を、そのような神経変性疾患および障害を処置または予防することにおける効力について、当該分野において公知の任意の方法によってアッセイし得る。そのようなアッセイとしては、調節された細胞成熟もしくはアポトーシスの阻害についてのインビトロアッセイ、または神経変性疾患もしくは障害の動物モデルを使用するインビボアッセイ、あるいは以下に記載する任意のアッセイが挙げられる。潜在的に効果的な治療剤は、例えば限定されないが、コントロールと比較して、調節された細胞成熟を促進するか、培養物中の細胞アポトーシスを防ぐか、あるいは動物モデルにおける神経変性を減少する。

【0235】

一旦、神経変性疾患または障害が、調節活性による処置に対して感受性であることが示されると、その神経変性疾患または障害が、活性を調節する治療剤の投与によって処置または予防され得る。そのような疾患としては、加齢に關与する全ての変性性障害（特に、変形性関節症および神経変性障害）が挙げられる。

【0236】

（器官移植に關連する障害）

Wnt-7B様は、器官移植に関連する障害（特に、限定されないが、器官拒絶反応）に関係する。本発明の治療剤（特に、活性を調節（または供給）する治療剤）は、器官移植に関連する疾患または障害の処置または予防において効果的であり得る。本発明の治療剤（特に、上記タンパク質のレベルまたは活性を調節する治療剤）は、器官移植に関連するこのような疾患および障害の処置または予防における効力について、当該分野で公知の任意の方法によってアッセイされ得る。このようなアッセイとしては、下記のような細胞培養モデルを使用するインビトロアッセイ、または器官移植に関連する疾患および障害の動物モデルを使用するインビボアッセイが挙げられ、例えば、以下を参照のこと。潜在的に効果的な治療剤は、例えば、限定されないが、コントロールと比較して、動物モデルにおける免疫拒絶応答を減少する。

【0237】

従って、一旦、器官移植に関連する疾患および障害が、活性の調節による処置に対して感受性であることが示されると、このような疾患または障害は、活性を調節する治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0238】

（心臓血管疾患）

Wnt-7B様は、アテローム性動脈硬化症のプラーク形成を含む、心臓血管障害に関係する。心臓血管疾患（脳血栓症または脳出血を含む）、虚血性心疾患または虚血性腎疾患、末梢血管疾患、または他の主要な血管の血栓症、および他の疾患（真性糖尿病、高血圧、甲状腺機能不全、コレステロールエステル貯蔵病、全身性エリテマトーデス、ホモシステイン症（homocysteinemia）、および家族性のタンパク質または脂質プロセッシング疾患などを含む）のような疾患は、アテローム性動脈硬化症に直接的または間接的のいずれかで関連する。従って、本発明の治療剤（特に、活性または形成を調節（または供給）する治療剤）は、アテローム性動脈硬化症に関連する疾患または障害の処置または予防に有効であり得る。本発明の治療剤（特に、レベルまたは活性を調節する治療剤）は、このような疾患および障害の処置または予防における効力について、当該分野で公知の任意の方法（以下に記載の方法を含む）によってアッセイされ得

る。

【0239】

広範な動物モデルおよび細胞培養モデルが、アテローム性動脈硬化症に関与するプロセスのために存在する。動物モデルの限定的かつ非排他的な列挙としては、以下が挙げられる：早発性アテローム性動脈硬化症についてのノックアウトマウス (KurabayashiおよびYazaki, 1996, *I. Angiol.* 15:187-194)、アテローム動脈硬化症のトランスジェニックマウスモデル (Kappelら、1994、*FASEB J.* 8:583-592)、動物モデルのアンチセンスオリゴヌクレオチド処置 (Callow, 1995、*Curr. Opin. Cardiol.* 10:569-576)、アテローム性動脈硬化症についてのトランスジェニックウサギモデル (Taylor, 1997, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 811:146-152)、高コレステロール血症動物モデル (Rosenfeld, 1996, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 30 (補遺):1-11)、高脂血症マウス (Paigenら、1994、*Curr. Opin. Lipidol.* 5:258-264)、および動物におけるリポキシゲナーゼの阻害 (Sigalら、1994、*Ann. N. Y. Acad. Sci.* 714:211-224)。さらに、インビトロ細胞モデルとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：低密度リポタンパク質に曝露された単球 (Frostegardら、1996、*Atherosclerosis* 121:93-103)、クローン化された血管平滑筋細胞 (Suttlesら、1995、*Exp. Cell Res.* 218:331-338)、内皮細胞由来の化学誘引物質に曝されたT細胞 (Katzら、1994、*J. Leukoc. Biol.* 55:567-573)、培養されたヒト大動脈内皮細胞 (Farberら、1992、*Am. J. Physiol.* 262:H1088-1085)、および泡沫細胞培養物 (Libbyら、1996、*Curr Opin Lipidol* 7:330-335)。潜在的に効果的な治療剤は、例えば、限定されないが、コントロールと比較して、細胞培養モデルにおける泡沫細胞形成、またはアテローム性動脈硬化症の高コレステロール血症マウスモデルにおけるアテローム性動脈硬化症のプラーク

形成を減少する。

【0240】

従って、一旦、アテローム性動脈硬化症に関連する疾患または障害が、活性または形成の調節による処置に対して感受性であることが示されると、この疾患または障害は、活性を調節する治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0241】

(サイトカインおよび細胞増殖/分化活性)

本発明のWnt-7B様タンパク質は、サイトカイン活性、細胞増殖活性(誘導するか、または阻害するかのいずれか)、または細胞分化活性(誘導するか、または阻害するかのいずれか)を示し得るか、あるいは特定の細胞集団における他のサイトカインの産生を誘導し得る。全ての既知のサイトカインを含む、現在までに発見された多くのタンパク質因子は、因子依存性の1以上の細胞増殖アッセイにおいて活性を示し、従って、これらのアッセイは、サイトカイン活性の簡便な確認法として役立つ。本発明のタンパク質の活性は、以下を含むが、これらに限定されない細胞株についての多くの従来の因子依存性細胞増殖アッセイの任意の1つによって確認される: 32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BaF3、MC9/G、M+(preB M+)、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTLL2、TF-1、Mo7eおよびCMK。

【0242】

本発明のタンパク質の活性は、数ある手段でもとりわけ、以下の方法によって測定され得る: 以下に記載されるアッセイを含むが、これらに限定されない、T細胞増殖または胸腺細胞増殖についてのアッセイ: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Coliganら編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(第3章および第7章); Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986; Bertagnoliら、J Immunol 145:1706-1712、1990; Bertagnoliら、Cell Immunol 133:327-341、1991; Ber

tagnolliら、J Immunol 149:3778-3783、1992; Bowmanら、J Immunol 152:1756-1761, 1994。

【0243】

脾細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞のサイトカイン産生および/または増殖についてのアッセイとしては、KruisbeekおよびShevach: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、3.12.1-14頁、John Wiley and Sons, Toronto 1994; およびSchreiber: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.8.1-8頁、John Wiley and Sons, Toronto 1994に記載のアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。

【0244】

造血細胞およびリンパ球産生細胞の増殖および分化についてのアッセイとしては、以下によって記載されるアッセイが挙げられるが、これらに限定されない: Bottomlyら: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.3.1-6.3.12頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991; deVriesら、J Exp Med 173:1205-1211, 1991; Moreauら、Nature 336:690-692、1988; Greenbergerら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 80:2931-2938, 1983; Nordan: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.6.1-5頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991; Smithら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 83:1857-1861, 1986; Measurement of human Interleukin 11 - Bennettら: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.15.1頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991;

Ciarlettaら: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、第1巻、6.13.1頁、John Wiley and Sons, Toronto 1991。

【0245】

抗原に対するT細胞クローン応答についてのアッセイ（とりわけ、増殖およびサイトカイン産生を測定することによって、APC-T細胞相互作用に影響し、そしてT細胞の効果を指向するタンパク質を同定する）としては、以下に記載されるアッセイが挙げられるが、これらに限定されない: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、Green Publishing Associates and Wiley-Interscience（第3章、第6章、第7章）; Weinbergerら、Proc Natl Acad Sci USA 77:6091-6095, 1980; Weinbergerら、Eur J Immun 11:405-411, 1981; Takaiら、J Immunol 137:3494-3500, 1986; Takaiら、J Immunol 140:508-512, 1988。

【0246】

（免疫刺激活性または免疫抑制活性）

本発明のWnt-7B様タンパク質はまた、免疫刺激活性または免疫抑制活性（アッセイが本明細書中に記載される活性を含むが、これらに限定されない）を示し得る。タンパク質は、種々の免疫不全および免疫障害（重症複合型免疫不全（SCDI）を含む）の処置（例えば、Tリンパ球および/またはBリンパ球の成長および増殖の（上方または下方）調節、ならびにNK細胞および他の細胞集団の細胞溶解活性をもたらすこと）において有用であり得る。これらの免疫不全は、遺伝性であり得るか、またはウイルス（例えば、HIV）および細菌感染または真菌感染によって引き起こされ得るか、あるいは自己免疫障害から生じ得る。より詳細には、ウイルス感染、細菌感染、真菌感染または他の感染によって引き起こされる感染性疾患は、本発明のタンパク質を使用して処置可能であり得、この感染としては、HIV、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ミコバクテリア

、リーシュマニア種、マラリア種による感染、およびカンジダ症のような種々の真菌感染が挙げられる。もちろん、この点に関して、本発明のタンパク質はまた、免疫系に対するブーストが、一般に所望され得る（すなわち、癌の処置において）場合に有用であり得る。

【0247】

本発明のタンパク質を使用して処置され得る自己免疫障害としては、例えば、以下が挙げられる：結合組織疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、自己免疫性肺炎、ギヤン - バレー症候群、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性真性糖尿病、重症筋無力症、対宿主性移植片病および自己免疫性炎症性眼疾患。本発明のこのようなタンパク質はまた、喘息（特に、アレルギー性喘息）または他の呼吸系の問題のような、アレルギー反応およびアレルギー状態の処置に有用であり得る。免疫抑制が所望される他の状態（例えば、器官移植を含む）もまた、本発明のタンパク質を使用して処置可能であり得る。

【0248】

本発明のタンパク質を使用して、多くの方法で、免疫応答することもまた可能であり得る。下方調節は、すでに進行中の免疫応答を阻害またはブロックする形態であり得るか、あるいは、免疫応答の誘導を妨げることを含み得る。活性化T細胞の機能は、T細胞応答を抑制することによってか、またはT細胞における特異的寛容を誘導することによってか、あるいはその両方によって阻害され得る。T細胞応答の免疫抑制は、一般に、抑制剤に対するT細胞の連続的曝露を必要とする、能動的な非抗原特異的プロセスである。寛容（T細胞における非応答性またはアネルギー（energy）を誘導することを含む）は、一般的に抗原特異的であり、そして寛容化剤に対する曝露が停止した後で持続するという点で免疫抑制と識別可能である。操作的には、寛容は、寛容化剤の非存在下における特異的抗原に対する再曝露の際に、T細胞応答の欠如によって実証され得る。

【0249】

1以上の抗原機能（Bリンパ球抗原機能（例えば、B7のような）を含むが、限定されない）を下方調節するか、または妨げる（例えば、活性化T細胞による高レベルのリンホカイン合成を妨げる）ことは、組織、皮膚および器官の移

植の状況、ならびに対宿主性移植片病（GVHD）において有用である。例えば、T細胞機能のブロックは、組織移植における組織破壊の減少を生じるはずである。代表的に、組織移植において、移植片の拒絶は、T細胞によるその外来としての認識、それに続く移植片を破壊する免疫反応を介して開始される。移植前に免疫細胞上でのB7リンパ球抗原とその天然のリガンドとの相互作用を阻害またはブロックする分子（例えば、B7-2活性を有するペプチドの可溶性モノマー形態単独、あるいは別のBリンパ球抗原（例えば、B7-1、B7-3）またはブロッキング抗体の活性を有するペプチドのモノマー形態との組み合わせ）は、対応する同時刺激シグナルの移行を伴わずに、免疫細胞上でその分子の天然のリガンドへの結合を導き得る。このような形態でBリンパ球抗原機能をブロックすることは、免疫細胞（例えば、T細胞）によるサイトカイン合成を妨げ、従って、免疫抑制剤として作用する。さらに、同時刺激の欠如はまた、T細胞を活性化して、それによって被験体において寛容を誘導するのに十分であり得る。Bリンパ球抗原ブロッキング試薬による長期の寛容の誘導は、これらのブロッキング試薬の繰り返しの投与の必要性を回避し得る。被験体において十分な免疫抑制または寛容を達成するために、Bリンパ球抗原の機能をブロックすることが必要であり得る。

【0250】

器官移植片拒絶またはGVHDの予防における特定のブロッキング試薬の効力は、ヒトにおける効力を予測する動物モデルを使用して評価され得る。使用され得る適切な系の例としては、ラットにおける同種異系の心臓移植片およびマウスにおける異種膵臓島細胞移植片が挙げられ、その両方は、Lenschowら、*Science* 257:789-792(1992)およびTurkaraら、*Proc Natl Acad Sci USA*, 89:11102-11105(1992)に記載されるようなインビボでのCTLA4Ig融合タンパク質の免疫抑制効果を試験するために使用されている。さらに、GVHDのマウスモデル（Paul編、*FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY*, Raven Press, New York, 1989, 846~847頁を参照のこと）は、その疾患の発症に対する、インビボでのBリンパ球抗原機能のブロックの効

果を決定するために使用され得る。

【0251】

ブロッキング抗原機能はまた、自己免疫疾患の処置に治療的に有用であり得る。多くの自己免疫障害は、自己組織に対して反応性であり、そしてその疾患の病理に関係するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進する、T細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性T細胞の活性化の予防は、疾患の症状を軽減し得るか、または排除し得る。Bリンパ球抗原のレセプター：リガンド相互作用を破壊することによってT細胞の同時刺激をブロックする試薬の投与は、T細胞の活性化を阻害し、そしてその疾患プロセスに関係し得る自己抗体またはT細胞誘導性サイトカインの産生を妨げるために使用され得る。さらに、ブロッキング試薬は、疾患からの長期の軽減を導き得る自己反応性T細胞の抗原特異的寛容を誘導し得る。自己免疫障害の予防または軽減におけるブロッキング試薬の効力は、ヒト自己免疫疾患のよく特徴付けられた多くの動物モデルを使用して決定され得る。例としては、マウス実験用自己免疫脳炎、MRL/lpr/lprマウスまたはNZBハイブリッドマウスにおける全身性エリテマトーデス、マウス自己免疫コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBラットにおける真性糖尿病、ならびにマウス実験用重症筋無力症が挙げられる(Paul編、FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY、Raven Press、New York、1989、840～856頁を参照のこと)。

【0252】

免疫応答を上方調節する手段として、抗原機能(好ましくは、Bリンパ球抗原機能)の上方調節もまた、治療に有用であり得る。免疫応答の上方調節は、既存の免疫応答を増強するか、または初期免疫応答を誘発する形態であり得る。例えば、Bリンパ球抗原機能の刺激を介して免疫応答を増強することは、ウイルス感染の場合において有用であり得る。さらに、全身性ウイルス疾患(例えば、インフルエンザ、感冒および脳炎)は、Bリンパ球抗原の刺激形態の全身性投与によって軽減され得る。

【0253】

あるいは、抗ウイルス免疫応答は、患者からT細胞を除去し、本発明のペプチ

ドを発現するか、または本発明の可溶性ペプチドの刺激形態を伴うかのいずれかの、ウイルス抗原でパルスしたAPCで、このT細胞をインビトロで同時刺激し、そして患者にこのインビトロ活性化T細胞を再導入することによって、感染患者において増強され得る。抗ウイルス免疫応答を増強する別の方法は、患者から感染細胞を単離し、本明細書中に記載されるような本発明のタンパク質をコードする核酸を、この感染細胞にトランスフェクトして（その結果、これらの細胞がその表面上にこのタンパク質の全てまたは一部を発現する）、そしてこのトランスフェクト細胞を患者に再導入することである。ここで、この感染細胞は、インビボでT細胞に対して同時刺激シグナルを送達し、それによってT細胞を活性化することが可能である。

【0254】

別の適用では、抗原機能（好ましくはBリンパ球抗原機能）の上方調節または増大が腫瘍免疫の誘導において有用であり得る。本発明の少なくとも1つのペプチドをコードする核酸をトランスフェクトされた腫瘍細胞（例えば、肉腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、癌腫）を、被験体中の腫瘍特異的寛容を克服するために被験体に投与し得る。所望であれば、腫瘍細胞はトランスフェクトされてペプチドの組み合わせを発現し得る。例えば、患者から得られた腫瘍細胞に、B7-2-様活性を有するペプチド単独の発現、またはB7-1-様活性および/またはB7-3-様活性を有するペプチドの組み合わせた発現を指向する発現ベクターを用いて、エクスピボでトランスフェクトし得る。このトランスフェクトされた腫瘍細胞は、患者に戻され、トランスフェクトされた細胞の表面上にペプチドの発現を生じる。あるいは、遺伝子治療技法を用いて、インビボのトランスフェクションのために腫瘍細胞を標的化し得る。

【0255】

腫瘍細胞の表面上のB細胞リンパ球抗原の活性を有する本発明のペプチドの存在は、T細胞に対して必要な同時刺激シグナルを提供し、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対するT細胞媒介免疫応答を誘導する。さらに、MHCクラスIまたはMHCクラスII分子を欠くか、または十分な量のMHCクラスIまたはMHCクラスII分子を再発現しない腫瘍細胞は、MHCクラスI鎖タンパク質

および β_2 マイクログロブリンタンパク質、またはMHCクラスII α 鎖タンパク質およびMHCクラスII β 鎖タンパク質のすべてまたは一部（例えば、細胞質 - ドメイン短縮化部分）をコードする核酸でトランスフェクトされ得、それによって細胞表面上にMHCクラスIまたはMHCクラスIIタンパク質を発現する。Bリンパ球抗原（例えば、B7-1、B7-2、B7-3）の活性を有するペプチドと組み合わせた適切なクラスIまたはクラスII MHCの発現は、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対するT細胞媒介性免疫応答を誘導する。必要に応じて、不変鎖（invariant chain）のようなMHCクラスII関連タンパク質の発現をブロックするアンチセンス構築物をコードする遺伝子もまた、Bリンパ球抗原の活性を有するペプチドをコードするDNAで同時トランスフェクトされ得、腫瘍関連抗原の提示を促進し、そして腫瘍特異的免疫を誘導する。従って、ヒト被験体におけるT細胞媒介免疫応答の誘導は、被験体における腫瘍特異的寛容を十分に克服し得る。

【0256】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法により測定され得る：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coliganら編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience（第3章、第7章）；Herrmannら、Proc Natl Acad Sci USA 78:2488-2492、1981；Herrmannら、J Immunol 128:1968-1974、1982；Handaら、J Immunol 135:1564-1572、1985；Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986；Takaiら、J Immunol 140:508-512、1988；Herrmannら、Proc Natl Acad Sci USA 78:2488-2492、1981；Herrmannら、J Immunol 128:1968-1974、1982；Handaら、J Immunol 135:1564-1572、1985；Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986；Bowmanら、J Virology 61:1992-1998；Takaiら、J Imm

unol 140:508-512、1988; Bertagnolliら、Cell Immunol 133:327-341、1991; Brownら、J Immunol 153:3079-3092、1994に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない、胸腺細胞または脾細胞の細胞傷害性に関する適切なアッセイ。

【0257】

T細胞依存性免疫グロブリン応答およびアイソタイプスイッチングに関する(特に、T細胞依存性抗体応答を調節し、そしてTh1/Th2プロフィールに影響するタンパク質を同定する)アッセイとしては、Maliszewski、J Immunol 144:3028-3033、1990;ならびにMondおよびBrunswick、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganら(編)、第1巻、3.8.1.-3.8.16、John Wiley and Sons、Toronto 1994に記載のようなアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0258】

混合リンパ球反応(MLR)アッセイ(特に、優先的にTh1およびCTL応答を生成するタンパク質を同定するアッセイ)としては、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganら編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(第3章、第7章);Takaiら、J Immunol 137:3494-3500、1986;Takaiら、J Immunol 140:508-512、1988;Bertagnolliら、J Immunol 149:3778-3783、1992に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0259】

樹状細胞依存性アッセイ(特に、ナイーブなT細胞を活性化する樹状細胞により発現されるタンパク質を同定するアッセイ)としては、Gueryら、J Immunol 134:536-544、1995;Inabaら、J Exp Med 173:549-559、1991;Macatoniaら、J I

mmunol 154:5071-5079、1995; Porgadorら、J Exp Med 182:255-260、1995; Nairら、J Virol 67:4062-4069、1993; Huangら、Science 264:961-965、1994; Macatoniaら、J Exp Med 169:1255-1264、1989; Bhardwajら、J Clin Invest 94:797-807、1994; および Inabaら、J Exp Med 172:631-640、1990に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0260】

リンパ球生存/アポトーシスのためのアッセイ（特に、スーパー抗原誘導後にアポトーシスを妨げるタンパク質およびリンパ球ホメオスタシスを調節するタンパク質を同定する）としては、Darzynkiewiczら、Cytometry 13:795-808、1992; Gorczycaら、Leukemia 7:659-670、1993; Gorczycaら、Cancer Res 53:1945-1951、1993; Itohら、Cell 66:233-243、1991; Zacharchuk、J Immunol 145:4037-4045、1990; Zamaïら、Cytometry 14:891-897、1993; Gorczycaら、Internat J Oncol 1:639-648、1992に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0261】

T細胞の拘束および発生の初期段階に影響するタンパク質のアッセイとしては、Anticaら、Blood 84:111-117、1994; Fineら、Cell Immunol 155:111-122、1994; Galyら、Blood 85:2770-2778、1995; Tokiら、Proc Nat Acad Sci USA 88:7548-7551、1991に記載のアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0262】

（造血調節活性）

本発明のWnt-7B-様タンパク質は、造血の調節において、そして結果として骨髓細胞不全またはリンパ球細胞不全の処置において有用であり得る。コロニー形成性細胞または因子依存性細胞株を支援する下限に近い生物学的活性でさえ、造血を調節することにおける、例えば、単独またはその他のサイトカインとの組み合わせで、赤血球系前駆体細胞の成長および増殖を支援することにおける関与を示し、それによって、以下の有用性を示す：例えば、種々の貧血を処置することにおけるか、または赤血球系前駆体細胞および/または赤血球細胞の産生を刺激するための照射/化学療法と組み合わせた使用のための有用性；例えば、結果として骨髓抑制を防ぐかまたは処置するための化学療法と組み合わせて有用な、骨髓細胞（例えば、顆粒球および単球/マクロファージ）の成長および増殖を支持する（すなわち伝統的なCSF活性）ことにおける有用性；巨核球そして結果として血小板の成長および増殖を支持し、それによって血小板減少症のような種々の血小板障害の予防または処置を可能にすること、そして一般に、血小板輸血に代わる使用か、またはそれへの優待のための有用性；および/または上記の任意および全ての造血細胞に成熟し得、そしてそれ故、種々の幹細胞障害（再生不良性貧血および発作性夜間血色素尿症を含むがこれらに限定されない、通常、移植で処置されるような障害）における治療有用性を見出す、造血幹細胞の成長および増殖を支持することにおける有用性、ならびに正常細胞または遺伝子治療のために遺伝子操作された細胞として、インビボまたはエキソビボ（すなわち、骨髓移植または末梢前駆体細胞移植（同種または異種）と組み合わせた）のいずれかで、照射/化学療法後に幹細胞区画を再増殖させることにおける有用性。

【0263】

本発明のタンパク質の活性は、特に、以下の方法により測定され得る：種々の造血株の増殖および分化の適切なアッセイは上記で引用される。

【0264】

胚幹細胞分化のアッセイ（特に、胚分化造血に影響するタンパク質を同定するアッセイ）は、以下に記載のアッセイが挙げられるが、これらに限定されない：Johanssonら、Cellular Biology 15:141-151、1995；Kellerら、Mol Cell Biol 13:473

- 486、1993; McClanahanら、Blood 81:2903-2915、1993。

【0265】

幹細胞生存および分化のアッセイ（特にリンパ-造血を調節するタンパク質を同定するアッセイ）は、以下に記載のアッセイが挙げられるが、これらに限定されない：メチルセルロースコロニー形成アッセイ、CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 265-268頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、Freshney; Hirayamaら、Proc Natl Acad Sci USA 89:5907-5911、1992; CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 23-39頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、McNieceおよびBridgeli; Nebenら、Exp Hematol 22:353-359、1994; CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 1-21頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、Ploemacher; CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 163-179頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、Sponcerら; CULTURE OF HEMATOPOIETIC CELLS. Freshneyら、編、Vol 139-162頁、Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y 1994における、Sutherland。

【0266】

（組織増殖活性）

本発明のWnt-7B-様タンパク質はまた、骨、軟骨、腱、靱帯および/または神経組織成長または再生のために使用される組成物、ならびに創傷治癒および組織修復および組織置換のために使用される組成物、そして火傷、切開および潰瘍の処置における組成物に有用性を有し得る。

【0267】

本発明のタンパク質は、骨が正常に形成されない状況で軟骨および／または骨増殖を誘導し、ヒトおよびその他の動物における骨折および軟骨損傷または欠損の治癒における適用を有する。本発明のタンパク質を使用するこのような調製物は、閉鎖骨折整復および開放骨折整復における予防的使用、そしてまた人工関節の改善された固定における使用を有し得る。骨形成剤により誘導されたデノボ骨形成は、先天的な、外傷誘導性脳顔面頭蓋欠陥または腫瘍切除誘導性脳顔面頭蓋欠陥の修復に寄与し、そしてまた美容成形手術に有用である。

【0268】

本発明のタンパク質はまた、歯周病の処置において、およびその他の歯修復プロセスで用いられ得る。このような薬剤は、骨形成性細胞を誘因するか、骨形成性細胞の増殖を刺激するか、骨形成性細胞の前駆体の分化を誘導する環境を提供し得る。本発明のタンパク質はまた、骨および／または軟骨修復の刺激によるか、または炎症プロセスにより媒介される組織破壊の炎症またはプロセス（コラゲナーゼ活性、破骨細胞活性など）をブロックすることによるような、骨粗鬆症または変形性関節炎の処置で有用であり得る。

【0269】

本発明のタンパク質に寄与し得る組織再生活性の別のカテゴリーは、腱／靭帯形成である。このような組織が通常形成されない状況で、腱／靭帯様組織またはその他の組織形成を誘導する本発明のタンパク質は、ヒトおよびその他の動物における、腱または靭帯断裂、変形およびその他の腱または靭帯欠陥の治癒における適用を有する。腱／靭帯様組織誘導性タンパク質を採用するこのような調製物は、腱または靭帯組織への損傷を防ぐことにおける予防的使用、ならびに腱または靭帯の骨またはその他の組織への改善された固定、および腱または靭帯組織への欠陥を修復することにおける使用を有し得る。本発明の組成物により誘導されるデノボの腱／靭帯様組織形成は、先天的な、外傷誘導性の他起源の腱または靭帯欠陥、またはその他の他起源の腱または靭帯欠陥の修復に寄与し、そしてまた腱または靭帯の付着または修復のための美容成形手術で有用である。本発明の組成物は、腱形成性細胞または靭帯形成性細胞を誘引するか、腱形成性細胞または

靱帯形成性細胞の増殖を刺激するか、靱帯形成性細胞または靱帯形成性細胞の前駆体の分化を誘導するか、または組織修復を行うためにインビボに戻すためにエキソビボで靱帯/靱帯の細胞または前駆体の増殖を誘導する環境を提供し得る。本発明の組成物はまた、靱帯炎、毛根管症候群およびその他の靱帯または靱帯欠陥の処置において有用であり得る。この組成物はまた、当該分野で周知であるキャリアとして、適切なマトリックスおよび/または金属イオン封鎖剤を含み得る。

【0270】

本発明のタンパク質はまた、ニューロン細胞の増殖のため、ならびに神経および脳組織の再生のために、すなわち、中枢神経系疾患および末梢神経系疾患および神経障害、ならびにニューロン細胞または神経組織への変性、死滅または外傷を含む機械的および外傷障害の処置のために有用であり得る。より詳細には、タンパク質は、末梢神経損傷、末梢神経障害および局所神経障害のような末梢神経系の疾患、ならびにアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮側索硬化症、およびシャイ-ドレーガー症候群のような中枢神経系の疾患の処置で用いられ得る。本発明に従って処置され得るさらなる症状は、脊髄障害、頭部外傷および発作のような脳血管性疾患のような機械的および外傷的障害を含み得る。化学的療法またはその他の医療治療から生じる末梢神経障害もまた、本発明のタンパク質を用いて治療可能であり得る。

【0271】

本発明のタンパク質はまた、圧迫性潰瘍、血管不全に関連する潰瘍、手術および外傷創傷などを含むがこれらに限定されない非治癒創傷のより良好な、またはより迅速な閉鎖を促進するために有用であり得る。

【0272】

本発明のタンパク質がまた、器官（例えば、脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮を含む）、筋肉（平滑筋、骨格筋または心筋）および血管（血管内皮を含む）組織のようなその他の組織の生成または再生に、またはこのような組織を含む細胞の増殖の促進に対して活性を示し得ることが予想される。所望の効果の一部分は、繊維症瘢痕の阻害または調節により、正常組織を再生させる。本発明のタンパク質はまた、血管形成活性を示し得る。

【0273】

本発明のタンパク質はまた、腸の保護または再生のため、および肺もしくは肝臓の繊維症、種々の組織における再灌流傷害、および全身サイトカイン損傷から生じる症状の処置のために有用であり得る。

【0274】

本発明のタンパク質はまた、前駆体組織または細胞から上記の組織の分化を促進もしくは阻害するため；または上記の組織の増殖を阻害するために有用であり得る。

【0275】

本発明のタンパク質の活性はまた、特に、以下の方法により測定され得る：組織生成活性のためのアッセイは、以下に記載されるアッセイが挙げられるが、これらに限定されない：国際特許公開番号WO95/16035（骨、軟骨、腱）；国際特許公開番号WO95/05846（神経、ニューロン）；国際特許公開番号WO91/07491（皮膚、内皮）。

【0276】

創傷治癒活性のためのアッセイは、以下に記載のアッセイが挙げられるが、これらに限定されない：Eaglst einおよびMenz、J. Invest. Dermatol 71:382-84(1978)によって改変されるような、Winter、EPIDERMAL WOUND HEALING、71-112頁(MaibachおよびRovee編)、Year Book Medical Publishers、Inc.、Chicago。

【0277】

（アクチビン/インヒビン活性）

本発明のWnt-7B-様タンパク質はまた、アクチビン関連活性またはインヒビン関連活性を示し得る。インヒビンは、卵胞刺激ホルモン(FSH)の放出を阻害するその能力によって特徴付けられ、一方、アクチビンは、卵胞刺激ホルモン(FSH)の放出を刺激するその能力によって特徴付けられる。従って、本発明のタンパク質は、単独またはインヒビンファミリーのメンバーとのヘテロ二量体において、雌性哺乳動物における受胎能を減少し、そして雄性哺乳動物にお

ける精子形成を減少するインヒビンの能力に基づく避妊薬として有用であり得る。他のインヒビンの十分な量の投与は、これら哺乳動物における不妊症を誘導し得る。あるいは、本発明のタンパク質は、ホモ二量体としてか、またはインヒビンb群の他のタンパク質サブユニットとのヘテロ二量体として、下垂体前葉製剤の細胞からのFSH放出を刺激するアクチビン分子の能力に基づいて、受胎能誘導治療として有用であり得る。例えば、米国特許第4,798,885号を参照のこと。本発明のタンパク質はまた、ウシ、ヒツジ、およびブタのような家畜の一生の生殖効率を増加するように、性的に未熟な哺乳動物における受胎能の開始の促進のために有用であり得る。

【0278】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る：アクチビン/インヒビン活性のアッセイとしては、以下に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない：Valeら、Endocrinology 91:562~572、1972；Lingら、Nature 321:779~782、1986；Valeら、Nature 321:776~779、1986；Masonら、Nature 318:659~663、1985；Forageら、Proc Natl Acad Sci USA 83:3091~3095、1986。

【0279】

(走化性/ケモキネシス活性)

本発明のタンパク質は、哺乳動物細胞（例えば、単球、線維芽細胞、好中球、T細胞、肥満細胞、好酸球、上皮細胞および/または内皮細胞を含む）についての走化性またはケモキネシス活性（例えば、ケモカインとして作用する）を有し得る。走化性およびケモキネシスタンパク質を使用して、所望の細胞集団を所望の作用部位に動員または誘引し得る。走化性またはケモキネシスタンパク質は、組織に対する創傷および他の外傷の処置、ならびに局所的感染の処置において、特に利点を提供する。例えば、リンパ球、単球または好中球の、腫瘍または感染部位への誘引は、腫瘍または感染因子に対する改善された免疫応答を生じ得る。

【0280】

タンパク質またはペプチドは、それが直接的または間接的に、特定の細胞集団の指向された方向付けまたは移動を刺激し得る場合、そのような細胞集団について走化性活性を有する。好ましくは、タンパク質またはペプチドは、細胞の指向された移動を直接刺激する能力を有する。特定のタンパク質が細胞の集団について走化性活性を有するか否かは、細胞の走化性についての任意の公知のアッセイにおいて、そのようなタンパク質またはペプチドを使用することによって、容易に決定され得る。

【0281】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る。走化性活性についてのアッセイ（走化性を誘導するか、または妨げるタンパク質を同定する）は、細胞の膜を横切る移動を誘導するタンパク質の能力、ならびに1つの細胞集団の別の細胞集団に対する接着を誘導するタンパク質の能力を測定するアッセイからなる。移動および接着についての適切なアッセイとしては以下に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganら編（第6.12章、MEASUREMENT OF ALPHA AND BETA CHEMOKINES 6.12.1～6.12.28）；Taubら、J Clin Invest 95：1370～1376、1995；Lindら、APMIS 103：140～146、1995；Mullerら、Eur J Immunol 25：1744～1748；Gruberetら、J Immunol 152：5860～5867、1994；Johnstonら、J Immunol 153：1762～1768、1994。

【0282】

（うっ血活性および血栓崩壊活性）

本発明のタンパク質はまた、うっ血活性または血栓崩壊活性を示し得る。結果として、そのようなタンパク質は、種々の凝固障害（血友病のような遺伝性障害を含む）の処置において有用であること、または凝固および外傷、外科手術または他の原因によって生じる創傷の処置における他のうっ血事象を促進することが予測される。本発明のタンパク質はまた、血栓症の溶解またはその形成を阻害す

るため、およびそこから生じる状態（例えば、心臓血管および中枢神経系血管の梗塞（例えば、発作））の処置および予防のために有用であり得る。

【0283】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る：

うっ血および血栓崩壊活性のアッセイとしては、以下に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない：Lin et al., J. Clin. Pharmacol. 26:131~140, 1986; Burdick et al., Thrombosis Res. 45:413~419, 1987; Humphrey et al., Fibrinolysis 5:71~79 (1991); Schaub, Prostaglandins 35:467~474, 1988。

【0284】

（レセプター/リガンド活性）

本発明のタンパク質はまた、レセプター、レセプターリガンドまたはレセプター/リガンド相互作用のインヒビターもしくはアゴニストとしての活性を実証し得る。そのようなレセプターおよびリガンドの例としては、サイトカインレセプターおよびそのリガンド、レセプターキナーゼおよびそのリガンド、レセプターホスファターゼおよびそのリガンド、細胞間相互作用に關与するレセプターおよびそのリガンド（細胞接着分子（セレクトリン、インテグリンおよびそのリガンドなど）、ならびに抗原提示、抗原認識および細胞性免疫応答および体液性免疫応答の發生に關与するレセプター/リガンド対が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。レセプターおよびリガンドはまた、關連するレセプター/リガンド相互作用の可能性のあるペプチドまたは低分子インヒビターのスクリーニングにおいて有用である。本発明のタンパク質（レセプターおよびリガンドのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない）が、それ自体で、レセプター/リガンド相互作用のインヒビターとして有用であり得る。

【0285】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る：

レセプター - リガンド活性の適切なアッセイとしては、以下に記載されるもの

が挙げられるが、これらに限定されない：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Coliganら編、Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第7.28章、Measurement of Cellular Adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22)、Takaiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6864~6868、1987; Biererら、J. Exp. Med. 168:1145~1156、1988; Rosensteinら、J. Exp. Med. 169:149~160 1989; Stoltenborgら、J. Immunol. Methods 175:59~68、1994; Stittら、Cell 80:661~670、1995。

【0286】

(抗炎症活性)

本発明のタンパク質はまた、抗炎症活性を示し得る。抗炎症活性は、炎症応答に関与する細胞に対する刺激を提供することによってか、細胞間相互作用(例えば、細胞接着)を阻害するかまたは促進することによって、炎症プロセスに関与する細胞の走化性を阻害するかまたは促進することによってか、細胞の血管外遊出を阻害するかまたは促進するかによってか、あるいは炎症応答をより直接的に阻害するかまたは促進する他の因子の産生を刺激するかまたは抑制することによって、達成され得る。そのような活性を示すタンパク質を使用して、炎症状態(慢性状態または急性状態を含む)(感染に関連する炎症(例えば、敗血症性ショック、敗血症または全身性炎症応答症候群(SIRS))、虚血-灌流損傷、内毒素の致死性、関節炎、補体媒介性激症拒絶症、腎炎、サイトカイン誘導性肺損傷またはケモカイン誘導性肺損傷、炎症性腸疾患、クローン病、またはTNFもしくはIL-1のようなサイトカインの過剰産生より生じるものが挙げられるが、これらに限定されない)を処置し得る。本発明のタンパク質はまた、抗原性物質または抗原性材料に対する、アナフィラキシーおよび過敏症の処置のためにも、有用であり得る。

【0287】

(腫瘍阻害活性)

腫瘍の免疫学的処置または予防について上記に記載された活性に加えて、本発明のタンパク質は、他の抗腫瘍活性を示し得る。タンパク質は、直接的または間接的(例えば、ADCCを介して)腫瘍増殖を阻害し得る。タンパク質は、腫瘍組織または腫瘍前駆体組織に作用することによって、腫瘍増殖を支持するために必要な組織の形成を阻害することによって(例えば、新脈管形成を阻害することによって)、腫瘍増殖を阻害する他の因子、物質または細胞型の産生を生じることによって、あるいは腫瘍増殖を促進する因子、物質または細胞型を、抑制、除去または阻害することによって、その腫瘍阻害活性を示し得る。

【0288】

(他の活性)

本発明のタンパク質はまた、以下のさらなる活性または効果の1つ以上を示し得る:細菌、ウイルス、真菌および他の寄生生物が挙げられるが、これらに限定されない感染因子の、増殖、感染または機能を阻害するか、あるいは死滅させること;身体的特徴(身長、体重、髪の色、目の色、皮膚、赤肉に対する脂肉の比、または他の組織色素沈着、あるいは器官または身体部分のサイズまたは形状(例えば、胸部増大または減少、骨の形態または形状の変化)が挙げられるが、これらに限定されない)を生じること(抑制することまたは増強すること);バイオリズムあるいはサーカディアンサイクルまたはサーカディアンリズムを生じること;雄性被験体または雌性被験体の受胎能を生じること;食事脂肪、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子または他の栄養因子もしくは栄養成分の、代謝、異化作用、同化作用、処理、利用、貯蔵または除去を生じること;行動的特徴(食欲、性欲、ストレス、認識(認識障害を含む)、うつ病(抑うつ障害を含む)および狂暴症を含むが、これらに限定されない)を生じること;鎮痛性効果または他の疼痛減少効果を提供すること;造血系列以外の系列における胚性幹細胞の分化および増殖を促進すること;ホルモン活性または内分泌活性;酵素の場合、酵素の欠損を矯正すること、および欠損関連疾患を処置すること;過剰増殖障害(例えば、乾癬)の処置;免疫グロブリン様活性(例えば、抗原または補体に結合する活性);ならびにワクチン組成物において抗原として

作用し、そのようなタンパク質または他の物質あるいはそのようなタンパク質と交差反応する実体に対する免疫応答を惹起する能力。

【0289】

(予測医療)

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬物ゲノム (p h a r m a c o g e n o m i c s) およびモニタリング臨床試験が、予後 (予測) の目的に使用され、これによって個体を予防的に処置する、予測医療の分野に関する。従って、本発明の1つの局面は、W n t - 7 B - 様タンパク質および / または核酸の発現、ならびにW n t - 7 B - 様の活性を、生物学的サンプル (例えば、血液、血清、細胞、組織) の関連で決定し、これによって、異常なW n t - 7 B - 様の発現または活性に関連して、個体が疾患または障害に罹患するかどうか、あるいは障害を発症するリスクがあるかどうかを決定するための診断アッセイに関する。本発明はまた、個体が、W n t - 7 B - 様のタンパク質、核酸の発現または活性と関連した障害を発症するリスクがあるかどうかを決定するための予後的 (または予測的) アッセイを提供する。例えば、W n t - 7 B - 様遺伝子における変異が、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後的または予測的な目的に使用され得、これによってW n t - 7 B - 様のタンパク質、核酸の発現または活性によって特徴付けられるかまたはそれに関連した障害の発病の前に個体を予防的に処置する。

【0290】

本発明の別の局面は、個体におけるW n t - 7 B - 様タンパク質、核酸の発現またはW n t - 7 B - 様活性を決定し、これによって、その個体についての適切な治療的または予防的因子 (本明細書において「薬物ゲノム」とよばれる) を選択するための方法を提供する。薬物ゲノムは、個体の遺伝型 (例えば、特定の因子に対して応答する個体の能力を決定するために試験された個体の遺伝型) に基づいた、個体の治療的または予防的処置のための因子 (例えば、薬物) の選択を可能にする。

【0291】

本発明のなお別の局面は、臨床試験におけるW n t - 7 B - 様の発現または活

性に対する因子（例えば、薬剤、化合物）の影響をモニタリングすることに関する。

【0292】

これらおよび他の因子は、以下の節にさらに詳細に記載される。

【0293】

（診断アッセイ）

生物学的サンプルにおけるWnt-7B-様の存在または非存在を検出するための例示的な方法は、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、およびその生物学的サンプルをWnt-7B-様タンパク質またはWnt-7B-様タンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出し得る化合物もしくは薬剤とを接触させ、その結果、Wnt-7B-様の存在が、その生物学的サンプルにおいて検出される、工程を包含する。Wnt-7B-様のmRNAもしくはゲノムDNAを検出するための薬剤は、Wnt-7B-様のmRNAもしくはゲノムDNAにハイブリダイズし得る、標識された核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長のWnt-7B-様核酸もしくはその部分の核酸（例えば、少なくとも、15、30、50、100、250もしくは500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、かつストリンジェントな条件下でWnt-7B-様のmRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズするに十分である核酸）であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書において記載されている。

【0294】

Wnt-7B-様タンパク質を検出するための因子は、Wnt-7B-様タンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルであり得るか、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント（例えば、FabまたはF(ab')₂）が使用され得る。用語「標識（された）」とは、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をそのプローブもしくは抗体にカップリングさせる（すなわち、物理的に連結する）ことによって、そのプローブまたは抗体を直接標識すること、ならびに、直接標識される別の試薬との反応性によっ

て、そのプローブもしくは抗体を間接的に標識をすることを包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いた一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようにDNAプローブのビオチンを用いた末端標識が挙げられる。用語「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された、組織、細胞および生物学的流体ならびに被験体に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を用いて、Wnt-7B-様のmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを、生物学的サンプル中で、インビトロおよびインビボで検出し得る。例えば、Wnt-7B-様のmRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。Wnt-7B-様のタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられる。Wnt-7B-様のゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、Wnt-7B-様のタンパク質の検出のためのインビボ技術としては、標識された抗Wnt-7B-様抗体を被験体に導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、放射性マーカーを用いて標識され得る。この被験体における放射性マーカーの存在および位置は、標準的な画像化技術によって検出され得る。

【0295】

1つの実施形態において、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのタンパク質分子を含む。あるいは、この生物学的サンプルは、その試験被験体からのmRNA分子またはその試験被験体からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来の手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

【0296】

別の実施形態において、この方法はさらに、コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、そのコントロールサンプルを、Wnt-7B-様のタンパク質、mRNAもしくはゲノムを検出し得る化合物もしくは因子と接触させ、その結果、Wnt-7B-様のタンパク質、mRNAもしくはゲノム

DNAの存在がその生物学的サンプルにおいて検出される、工程、およびそのコントロールサンプルにおけるWnt-7B様のタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在と、その試験サンプルにおけるWnt-7B様のタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

【0297】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるWnt-7B様の存在を検出するためのキットを包含する。例えば、このキットは、以下を備え得る：生物学的サンプルにおいてWnt-7B様のタンパク質またはmRNAを検出し得る、標識された化合物もしくは因子；そのサンプルにおいてWnt-7B様の量を決定するための手段；およびそのサンプルにおけるWnt-7B様の量を標準と比較するための手段。この化合物または因子は、適切な容器内に包装され得る。このキットは、さらに、Wnt-7B様タンパク質または核酸を検出するためにキットを用いるための説明書を備え得る。

【0298】

(予後アッセイ)

本明細書において記載された診断方法をさらに利用して、Wnt-7B様異常発現または異常活性に関連した疾患もしくは障害を有するか、またはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。例えば、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、上述の診断アッセイまたは下記のアッセイ）を利用して、Wnt-7B様タンパク質、核酸の発現または活性に関連する障害（例えば、癌または線維性障害）、あるいは上記の個々の節1～14に記載されるWnt-7B様特異的疾患を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。あるいは、この予後アッセイを利用して、疾患または障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体を同定し得る。従って、本発明は、Wnt-7B様の異常発現または異常活性に関連する疾患もしくは障害を同定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルは、被験体から得られ、そしてWnt-7B様タンパク質または核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）が検出され、ここで、Wnt-7B様タンパク質または核酸の存在は、Wnt-7B様の異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を有するかまたはその発症の危険性を有する被験体

についての診断指標である。本明細書において使用される場合「試験サンプル」とは、目的の被験体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的流体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織であり得る。

【0299】

さらに、本明細書に記載される予後アッセイを使用して、被験体に薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）を投与してWnt-7B様の異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を処置し得るか否かを、決定し得る。例えば、このような方法を使用して、被験体が癌または子かん前症（precursor）のような障害、あるいは上記の個々の節1～14に記載されるWnt-7B様特異的疾患のための薬剤で有効に処置され得るか否かを決定し得る。従って、本発明は、Wnt-7B様の異常発現または異常活性に関連する障害についての薬剤を用いて、被験体が有効に処置され得るか否かを決定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルが得られ、そしてWnt-7B様タンパク質または核酸が検出される（例えば、ここで、Wnt-7B様タンパク質または核酸の存在は、この薬剤が投与されてWnt-7B様の異常発現または異常活性に関連する障害が処置され得る被験体についての、診断指標である）。

【0300】

本発明の方法はまた、Wnt-7B様遺伝子における遺伝的損傷を検出し、それによって、その損傷遺伝子を有する被験体が異常な細胞増殖および/または分化によって特徴付けられる障害についての危険性を有するか否かを決定するためにも使用され得る。種々の実施形態において、この方法は、その被験体からの細胞のサンプルにおいて、Wnt-7B様タンパク質をコードする遺伝子の統合性に影響を与える少なくとも1つの変更によって特徴付けられる遺伝的損傷の存在または非存在、あるいはWnt-7B様遺伝子の誤発現を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝的損傷は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：（1）Wnt-7B様遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；（2）Wnt-7B様遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；（3）Wnt-7B様遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、（4）Wn

t - 7 B 様遺伝子の染色体再配置；(5) W n t - 7 B 様遺伝子のメッセンジャー R N A 転写物のレベルにおける変更、(6) W n t - 7 B 様遺伝子の異常改変（例えば、ゲノム D N A のメチル化パターンの異常改変）、(7) W n t - 7 B 様遺伝子のメッセンジャー R N A 転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(8) W n t - 7 B 様タンパク質の非野生型レベル、(9) W n t - 7 B 様遺伝子の対立遺伝子の欠失、ならびに(10) W n t - 7 B 様タンパク質の不適切な翻訳後修飾。本明細書において記載されるように、当該分野において、W n t - 7 B 様遺伝子における損傷を検出するために使用され得る、多数の公知のアッセイ技術が存在する。好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって被験体から単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプルが使用され得、これには、例えば、頬粘膜細胞が挙げられる。

【0301】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）（例えば、米国特許第 4 , 6 8 3 , 1 9 5 号および同第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号を参照のこと）（例えば、アンカー P C R または R A C E P C R）、あるいは、連結連鎖反応（L C R）（例えば、L a n d e g r a n ら（1988）S c i e n c e 241 : 1077 - 1080；および N a k a z a w a ら（1994）P N A S 91 : 360 - 364 を参照のこと）におけるプローブ/プライマーの使用を包含する。後者は、W n t - 7 B 様遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る（A b r a v a y a ら（1995）N u c l A c i d s R e s 23 : 675 - 682 を参照のこと）。この方法は、患者から細胞のサンプルを収集する工程、核酸（例えば、ゲノム、m R N A またはその両方）をそのサンプルの細胞から単離する工程、W n t - 7 B 様の遺伝子に特異的にハイブリダイズする 1 つ以上のプライマーとその核酸サンプルとを、W n t - 7 B 様遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で接触させる工程、ならびに増幅産物の存在もしくは非存在を検出する工程、またはその増幅産物のサイズを検出する工程およびその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含し得る。P C R および / または L C R は、本明細書中に記載される変異を検出するために使用される技術のいずれかとともに予備的

増幅工程として使用されることが望ましくあり得ることが予想される。

【0302】

代替的な増幅方法としては、以下が挙げられる：当業者に周知な技術を用いた、その増幅された分子の検出の前の、自己維持配列複製 (Guatelliら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅系 (Kwohら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q β レプリカーゼ (Lizardiら、1988、BioTechnology 6:1197)、または他の任意の核酸増幅方法。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に極少数で存在する場合に、そのような核酸分子の検出のために特に有用である。

【0303】

代替の実施形態において、サンプル細胞からのWnt-7B様遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールのDNAが単離され、増幅され(必要に応じて)、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて消化され、そしてフラグメント長の大きさがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長の大きさにおける差異は、そのサンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイムの使用(例えば、米国特許第5,493,531号を参照のこと)を使用して、リボザイム切断部位の発生または喪失によって特異的な変異の存在についてスコア付けし得る。

【0304】

他の実施形態において、Wnt-7B様における遺伝子変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸(例えば、DNAまたはRNA)を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る(Croninら(1996) Human Mutation 7:244-255; Kozalら(1996) Nature Medicine 2:753-759)。例えば、Wnt-7B様における遺伝子変異は、Croninら(上記)に記載されるように光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、プローブの第一ハイブリダイ

ゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおける長いストレッチのDNAにわたって走査し、連続的に重複するプローブの線形アレイを作成することによって、その配列間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程に第二のハイブリダイゼーションアレイが続き、これは、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さな特化されたプローブアレイを用いることによる特定の変異の特徴付けを可能にする。各変異アレイは、一方が野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方が変異遺伝子に対して相補である並行プローブセットから構成される。

【0305】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、Wnt-7B様遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルWnt-7B様配列と対応する野生型（コントロール）配列とを比較することによって、変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、MaximおよびGilbert (1977) PNAS 74:560またはSanger (1977) PNAS 74:5463によって開発された技術に基づくものが挙げられる。診断アッセイを実施する場合、種々の自動化配列決定手順のいずれかを利用し得ることもまた意図される (Naevra (1995) BioTechniques 19:448)。これらには、質量分析法による配列決定法（例えば、PCT国際公開番号WO 94/16101; Cohenら (1996) Adv Chromatogr 36:127-162; およびGriffinら (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159を参照のこと）が含まれる。

【0306】

Wnt-7B様遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断剤からの保護を使用して、RNA/RNAもしくはRNA/DNAのヘテロ二重鎖に基づくミスマッチ塩基を検出する方法が挙げられる (Myersら (1985) Science 230:1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野の技術は、野生型のWnt-7B様配列を含む（標識された）RNAまたはDNAを、組織サンプルから得られた潜在的な変異体RNAまたはDNAとハイ

ブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供する工程によって始まる。この二本鎖の二重鎖を、二重鎖の一本鎖領域（例えば、そのコントロールとサンプルの鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するもの）を切断する薬剤を用いて処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖を、RNaseを用いて処理し得、そしてDNA/DNAハイブリッドを、そのミスマッチ領域を酵素的に消化することに対して、S₁ヌクレアーゼを用いて処理し得る。他の実施形態において、DNA/DNAまたはRNA/DNAのいずれかの二重鎖を、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウム、およびピペリジンを用いて処理し得る。そのミスマッチ領域の消化後、次いで、得られた物質を変性ポリアクリルアミドゲル上で、大きさにより分離して、変異の部位を決定する。例えば、Cottonら(1988)Proc Natl Acad Sci USA 85:4397; Saleebaら(1992)Methods Enzymol 217:286-295を参照のこと。1つの実施形態において、コントロールのDNAまたはRNAは、検出のために標識され得る。

【0307】

なお別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質（いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素）を、細胞のサンプルから得られたWnt-7B様cDNAにおける点変異を検出およびマッピングするために規定された系において使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、そしてHeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(Hsuら(1994)Carcinogenesis 15:1657~1662)。例示的な実施形態に従って、Wnt-7B様配列（例えば、野生型Wnt-7B様配列）に基づくプローブは、試験細胞由来のcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素を用いて処理され、そしてその切断産物（もしあれば）は、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

【0308】

他の実施形態において、電気泳動の移動度における変化は、Wnt-7B様遺伝子における変異を同定するために使用される。例えば、一本鎖コンホメーション多型(SSCP)は、変異体と野生型核酸との間の電気泳動の移動度における差異を検出するために使用され得る(Oritaら(1989)Proc Natl Acad Sci USA:86:2766、またCotton(1993)Mutat Res 285:125~144; Hayashi(1992)Genet Anal Tech Appl 9:73~79を参照のこと)。サンプルおよびコントロールWnt-7B様核酸の一本鎖DNAフラグメントは、変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動の移動度において得られる変化は、1つの塩基変化の検出さえも可能にする。DNAフラグメントは、標識され得るか、または標識されたプローブを用いて検出され得る。アッセイの感度は、DNAよりもむしろ、二次構造が配列中の変化に対してより感受的であるRNAを使用することによって増強され得る。1つの実施形態において、本発明の方法は、ヘテロ二重鎖分析を利用して、電気泳動の移動度における変化に基づいて二本鎖のヘテロ二重鎖分子を分離する(Keenら(1991)Trends Genet 7:5)。

【0309】

なお別の実施形態において、一定勾配の変性剤を含有するポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)を使用してアッセイされる(Myersら(1985)Nature 313:495)。DGGEが分析の方法として使用される場合、DNAは、例えば、PCRにより約40bpの高融点GCリッチDNAのGCクランプを付加することによって、完全には変性されないことを確実に改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールおよびサンプルDNAの移動度における差異を同定するために、変性剤勾配の代わりに使用される(RosenbaumおよびReissner(1987)Biophys Chem 265:12753)。

【0310】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるが、これら

に限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の変異が中心的に配置されるように調製され得、次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的DNAにハイブリダイズされる (Saikiら (1986) Nature 324:163; Saikiら (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:6230)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に付着され、そして標識された標的DNAとハイブリダイズされる場合に、PCR増幅された標的DNAまたは多くの異なる変異にハイブリダイズされる。

【0311】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と合わせて使用され得る。特異的増幅についてのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において (その結果、増幅は、差次的ハイブリダイゼーションに依存する) (Gibbsら (1989) Nucleic Acids Res 17:2437~2448) か、あるいは適切な条件下でミスマッチが妨げられ得るかまたはポリメラーゼ伸長を減少し得る、1つのプライマーの3'の最末端で、目的の変異を保有し得る (Prossner (1993) Tibtech 11:238)。さらに、変異領域に新規な制限部位を導入することは、切断に基づく検出を行うために望ましくあり得る (Gaspariniら (1992) Mol Cell Probes 6:1)。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅用Taqリガーゼを使用して実施され得ることが予測される (Barany (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:189)。このような場合において、連結は、5'配列の3'末端に完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、増幅の存在または非存在を探索することによって、特定の部位における既知の変異の存在を検出することを可能にする。

【0312】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも

1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実施され得、これは、例えば、Wnt-7B様遺伝子を含む疾患または疾病の症状または家族病歴を示す患者を診断するための臨床的設定において簡便に使用され得る。

【0313】

さらに、Wnt-7B様が発現される任意の細胞型または組織（好ましくは、末梢血白血球）は、本明細書中に記載される予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプル（例えば、頬粘膜細胞を含む）が、使用され得る。

【0314】

（薬理ゲノム学（Pharmacogenomics））

Wnt-7B様活性（例えば、Wnt-7B様遺伝子発現）に対する刺激性または阻害性の影響を有する因子、すなわちモジュレーターは、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるように、異常なWnt-7B様活性に関連する障害（例えば、癌またはプロゲステロン障害、あるいは上記の個々の節1～14に記載されるようなWnt-7B様特異的疾患）を処置（予防的または治療的に）するために個体に投与され得る。このような処置と合わせて、個体の薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と外来化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係についての研究）が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理学的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗を導き得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づく予防的または治療的処置のために有効な薬剤（例えば、薬物）の選択を許容する。このような薬理ゲノム学は、さらに、適切な投薬量および治療剤レジメンを決定するために使用され得る。従って、個体におけるWnt-7B様タンパク質の活性、Wnt-7B様核酸の発現、あるいはWnt-7B様遺伝子の変異含量が決定されて、それによって個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。

【0315】

薬理ゲノム学は、罹患された人における変更された薬物の性質および異常な作

用に起因して、薬物に応答する臨床的に有意な遺伝性変更を扱う。例えば、Eichelbaum、Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996, 23: 983~985およびLinder、Clin Chem, 1997, 43: 254~266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学状態が、区別され得る。薬物が身体に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される遺伝的状态(変更された薬物作用)、または身体が薬物に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される遺伝的状态(変更された薬物代謝)。これらの薬理ゲノム学状態は、稀な欠損としてか、または多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)欠損は、一般的な遺伝性酵素病であり、この主な臨床的合併症は、酸化剤薬物(抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

【0316】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続期間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素(例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)およびシトクロムP450酵素CYP2D6およびCYP2C19)の遺伝的多型の発見は、幾人かの患者が予期される薬物効果を得ないか、または標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に過大な薬物応答および深刻な毒性を示すことに関しての説明を提供した。これらの多型は、集団において2つの表現型(高い代謝能を持つ人(extensive metabolizer)(EM)および低い代謝能を持つ人(poor metabolizer)(PM))で表現される。PMの有病率は、異なる集団の間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしていくらかの変異がPMにおいて同定されており、この全ては機能的CYP2D6の非存在に至る。CYP2D6およびCYP2C19の低い代謝能を持つ人は、彼らが標準的な用量を受ける場合に、かなり頻繁に過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝産物が活性な治療的部分である場合、そのCYP2D6形成代謝産物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるように、PMは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に応答しな

い、いわゆる超迅速な代謝能を持つ人である。最近、超迅速な代謝の基準となる分子は、CYP2D6遺伝子増幅に起因していることが同定されている。

【0317】

従って、個体におけるWnt-7B様タンパク質の活性、Wnt-7B様核酸の発現、あるいはWnt-7B様遺伝子の変異含量を決定して、それによって、その個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。さらに、薬理ゲノム学の研究を使用して、個体の薬物応答性の表現型の同定に対して薬物代謝酵素をコードする多型対立遺伝子の遺伝子型を適用し得る。この知見は、用量または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、従って、被験体をWnt-7B様調節因子（例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイの1つによって同定される調節因子）を用いて処置する場合に治療的または予防的効率を増強し得る。

【0318】

（臨床試験中の効果のモニタリング）

Wnt-7B様の発現または活性（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力）に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることは、基本的な薬物スクリーニングおよび臨床試験に適用され得る。例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される、Wnt-7B様遺伝子発現、タンパク質レベルを増加するため、またはWnt-7B様活性をアップレギュレートする薬剤の効力は、減少したWnt-7B様遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたWnt-7B様活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、スクリーニングアッセイによって決定される、Wnt-7B様遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはWnt-7B様活性をダウンレギュレートする薬剤の効力は、増加したWnt-7B様遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたWnt-7B様活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験において、Wnt-7B様発現または活性、および好ましくは、例えば、細胞増殖障害または上記の個別の節1～14に記載されるWnt-7B様特異的疾患に関与するような他の遺伝子が、「リードアウト（読み出

し) (read out)」、すなわち、特定の細胞の免疫応答性のマーカーとして使用され得る。

【0319】

例えば(限定ではなく)、Wnt-7B様を含む遺伝子(これは、Wnt-7B様活性(例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される)を調節する薬剤(例えば、化合物、薬物または低分子)を用いる処置によって、細胞内で調節される)が、同定され得る。従って、細胞性増殖障害に対する薬剤の効果を研究するために、例えば、臨床試験において、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、そしてWnt-7B様およびこの障害に関与する他の遺伝子の発現のレベルについて分析され得る。遺伝子発現のレベル(すなわち、遺伝子発現パターン)は、本明細書中に記載されるように、ノーザンブロット分析もしくはRT-PCRによるか、あるいは産生されるタンパク質の量を測定することによるか、本明細書中に記載されるような方法の1つによるか、あるいはWnt-7B様または他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この様式で、この遺伝子発現パターンは、この薬剤に対する細胞の生理学的応答の指標であるマーカーとして作用し得る。従って、この応答状態は、この薬剤を用いる個体の処置の前、および処置の間の種々の時点で、決定され得る。

【0320】

1つの実施形態において、本発明は、薬剤(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、核酸、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補物)を用いる、被験体の処置の効力をモニタリングするための方法を提供し、これは、以下の工程を包含する：(i)薬剤の投与の前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；(ii)この投与前サンプルにおいて、Wnt-7B様タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現のレベルを検出する工程；(iii)この被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程；(iv)この投与後サンプルにおいて、Wnt-7B様タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを検出する工程；(v)この投与前サンプルにおけるWnt-

7 B様タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを、この投与後サンプルにおけるWnt - 7 B様タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルと比較する工程；ならびに(vi)従って、この被験体に対する薬剤の投与を変更する工程。例えば、この薬剤の増加した投与は、検出されるよりも高いレベルにWnt - 7 B様の発現または活性を増加することが(すなわち、この薬剤の効力を増加すること)望ましくあり得る。あるいは、この薬剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルにWnt - 7 B様の発現または活性を減少することが(すなわち、この薬剤の効力を減少すること)望ましくあり得る。

【0321】

(処置方法)

本発明は、異常なWnt - 7 B様の発現または活性に関連する障害の危険性のある(または感受性)か、またはこの障害を有する被験体を処置する予防的および治療的の両方の方法を提供する。

【0322】

(障害)

(その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して)増加したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を拮抗する(すなわち、低減または阻害する)治療剤を用いて処置され得る。活性を拮抗する治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：(i)上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ；(ii)上記ペプチドに対する抗体；(iii)上記ペプチドをコードする核酸；(iv)相同組換えによって上記ペプチドの内因性機能を「ロックアウトする」ために利用される、アンチセンス核酸および「機能不全性」である(すなわち、上記ペプチドに対するコード配列のコード配列内の異種挿入に起因する)核酸の投与(例えば、Capecci、1989、Science 244：1288～1292を参照のこと)；または(v)上記ペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させる、調節因子(すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタ

ゴニスト（本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに対して特異的な抗体を含む））。

【0323】

（その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して）減少したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増加させる（すなわち、活性に対するアゴニストである）治療剤を用いて処置され得る。活性をアップレギュレートする治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：上記ペプチド、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ；あるいはバイオアベイラビリティを増加させるアゴニスト。

【0324】

増加したレベルまたは減少したレベルは、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって、容易に検出され得る。この定量は、患者の組織サンプルを（例えば、生検組織から）入手し、そしてそのサンプルを、その発現したペプチド（または上記ペプチドのmRNA）のRNAレベルまたはペプチドレベル、構造および/または活性をインビトロでアッセイすることによる。当該分野において周知の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イムノアッセイ（例えば、ウェスタンブロット分析、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動が後に続く免疫沈降、免疫細胞化学などによる）および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）。

【0325】

（予防的方法）

1つの局面において、本発明は、被験体において異常なWnt-7B様の発現または活性と関連する疾患または状態を、Wnt-7B様の発現または少なくとも1つのWnt-7B様活性を調節する薬剤をこの被験体に投与することによって予防するための方法を提供する。異常なWnt-7B様の発現または活性によって引き起こされるかまたはこれらに起因する、疾患にかかる危険がある被験体

は、例えば、本明細書中に記載の診断アッセイまたは予後アッセイのいずれか、またはそれらの組み合わせによって、同定され得る。予防薬剤の投与は、疾患または障害が予防されるか、あるいはその進行を遅らせられるように、このWnt-7B様異常の特徴である症状の発現の前に行い得る。このWnt-7B様異常の型に依存して、例えば、Wnt-7B様アゴニスト薬剤またはWnt-7B様アンタゴニスト薬剤が、その被験体を処置するために使用され得る。その適切な薬剤は、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。本発明の予防方法は、以下の小区分において、さらに議論される。

【0326】

(治療方法)

本発明の別の局面は、治療目的のためにWnt-7B様の発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、その細胞に関するWnt-7B様タンパク質活性の活性のうちの1つ以上を調節する薬剤と接触させる工程を包含する。Wnt-7B様タンパク質活性を調節する薬剤は、核酸またはタンパク質、Wnt-7B様タンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、Wnt-7B様ペプチド模倣物、または他の低分子のような、本明細書中に記載されるような薬剤であり得る。1つの実施形態において、この薬剤は、Wnt-7B様タンパク質活性のうちの1つ以上を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、活性なWnt-7B様タンパク質、およびその細胞に導入されたWnt-7B様をコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、Wnt-7B様タンパク質活性のうちの1つ以上を阻害する。このような阻害薬剤の例としては、アンチセンスWnt-7B様核酸分子、および抗Wnt-7B様抗体が挙げられる。これらの調節方法は、インビトロで（例えば、その薬剤とともにその細胞を培養することによって）、あるいはインビボで（例えば、被験体にその薬剤を投与することによって）実施され得る。このように、本発明は、Wnt-7B様タンパク質または核酸分子の、異常な発現または異常な活性によって特徴付けられる、疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、Wnt-7B様の発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）薬剤

(例えば、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される薬剤)あるいはそのような薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、Wnt-7B様タンパク質または核酸分子を、低減したかまたは異常なWnt-7B様の発現または活性を補償するための治療として、投与する工程を包含する。

【0327】

Wnt-7B様活性の刺激は、Wnt-7B様が異常にダウンレギュレートされている状況、および/またはWnt-7B様活性の増加が有益な効果を有するようである状況において、望ましい。このような状況の1つの例は、被験体が、異常な細胞増殖および/または細胞分化によって特徴付けられる障害(例えば、癌)を有する場合である。このような状況の別の例は、被験体がプロゲステロン疾患(例えば、子かん前症)を有する場合である。本発明の他の疾患としては、上記の個々の節1~14に記載のWnt-7B様特異的疾患が挙げられる。

【0328】

本発明は、以下の非限定的な実施例によって例示される。

【0329】

(実施例)

(実施例1. TaqManTM分析によって決定される、組織中でのクローン29518614核酸の発現)

クローン29518614核酸の発現を、以下の表2で示す組織において、リアルタイム定量的PCRによって評価した。表2の1行目における番号付けは、図3A~Cにおけるヒストグラムのレーンの順序に対応する。

【0330】

(表2. TaqMan^{YM}分析において使用した細胞型のパネル)

- 1 内皮細胞
- 2 内皮細胞(処置)
- 3 脾臓
- 4 脾臓癌 CAPAN 2
- 5 脂肪

- 6 副腎
- 7 甲状腺
- 8 唾液腺
- 9 下垂体
- 10 脳（胎児）
- 11 脳（全体）
- 12 脳（扁桃）
- 13 脳（小脳）
- 14 脳（海馬）
- 15 脳（視床下部）
- 16 脳（黒質）
- 17 脳（視床）
- 18 脊髓
- 19 CNS癌（神経膠腫／星状細胞腫） U87-MG
- 20 CNS癌（神経膠腫／星状細胞腫） U-118-MG
- 21 CNS癌（星状細胞腫） SW1783
- 22 CNS癌*（神経芽腫；転移） SK-N-AS
- 23 CNS癌（星状細胞腫） SF-539
- 24 CNS癌（星状細胞腫） SNB-75
- 25 CNS癌（神経膠腫） SNB-19
- 26 CNS癌（神経膠腫） U251
- 27 CNS癌（神経膠腫） SF-295
- 28 心臓
- 29 骨格筋
- 30 骨髓
- 31 胸腺
- 32 脾臓
- 33 リンパ節
- 34 結腸（上行）

- 35 胃
- 36 小腸
- 37 結腸癌 SW480
- 38 結腸癌* (SW480転移) SW620
- 39 結腸癌 HT29
- 40 結腸癌 HCT-116
- 41 結腸癌 CaCo-2
- 42 結腸癌 HCT-15
- 43 結腸癌 HCC-2998
- 44 胃癌* (肝臓転移) NCI-N87
- 45 膀胱
- 46 気管
- 47 腎臓
- 48 腎臓 (胎児)
- 49 腎臓癌 786-0
- 50 腎臓癌 A498
- 51 腎臓癌 RXF 393
- 52 腎臓癌 ACHN
- 53 腎臓癌 UO-31
- 54 腎臓癌 TK-10
- 55 肝臓
- 56 肝臓 (胎児)
- 57 肝臓癌 (胚芽細胞腫) HepG2
- 58 肺
- 59 肺 (胎児)
- 60 肺癌 (スモール細胞) LX-1
- 61 肺癌 (スモール細胞) NCI-H69
- 62 肺癌 (スモール細胞改変体) SHP-77
- 63 肺癌 (ラージ細胞) NCI-H460

- 6 4 肺癌 (非スモール細胞) A 5 4 9
- 6 5 肺癌 (非スモール細胞) N C I - H 2 3
- 6 6 肺癌 (非スモール細胞) H O P - 6 2
- 6 7 肺癌 (非スモール細胞) N C I - H 5 2 2
- 6 8 肺癌 (扁平上皮) S W . 9 0 0
- 6 9 肺癌 (扁平上皮) N C I - H 5 9 6
- 7 0 乳腺
- 7 1 乳癌* (胸水) M C F - 7
- 7 2 乳癌* (胸水) M D A - M B - 2 3 1
- 7 3 乳癌* (胸水) T 4 7 D
- 7 4 乳癌 B T - 5 4 9
- 7 5 乳癌 M D A - N
- 7 6 卵巢
- 7 7 卵巢癌 O V C A R - 3
- 7 8 卵巢癌 O V C A R - 4
- 7 9 卵巢癌 O V C A R - 5
- 8 0 卵巢癌 O V C A R - 8
- 8 1 卵巢癌 I G R O V - 1
- 8 2 卵巢癌* (腹水) S K - O V - 3
- 8 3 子宮筋層
- 8 4 子宮
- 8 5 胎盤
- 8 6 前立腺
- 8 7 前立腺癌* (骨転移) P C - 3
- 8 8 精巢
- 8 9 黒色腫 H s 6 8 8 (A) . T
- 9 0 黒色腫* (転移) H s 6 8 8 (B) . T
- 9 1 黒色腫 U A C C - 6 2
- 9 2 黒色腫 M 1 4

- 93 黒色腫 LOX IMVI
 94 黒色腫* (転移) SK-MEL-5
 95 黒色腫 SK-MEL-28
 96 黒色腫 UACC-257。

【0331】

使用されるPCRアッセイにおいて、結合したレポーター色素およびクエンチャー色素の両方を有するオリゴヌクレオチドからなる蛍光発生プローブを、順方向プライマーと逆方向プライマーとの間の標的配列に特異的にアニールする。このプローブが、DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性によって切断される場合、このレポーター色素は、クエンチャー色素から分離され、そして配列特異的シグナルが生成する。各サイクルを用いて、さらなるレポーター色素分子を、そのそれぞれのプローブから切断し、そして蛍光強度における増加を、PCRの間にモニターする。

【0332】

プローブおよびプライマーを、インプットとして2777610の配列を使用して、Perkin Elmer BiosystemのPrimer Express Softwareパッケージ(アップルコンピュータのMacintosh Power PC用のバージョンI)に従って設計した。反応条件のためにデフォルトの設定を使用し、そしてプライマー選択の前に、以下のパラメータを設定した: プライマー濃度 = 250 nM、プライマー融点 (T_m) 範囲 = 58 ~ 60、プライマーの最適 T_m = 59、最大プライマー差異 = 2、プローブは5' Gを有さない、プローブ T_m は、プライマー T_m よりも10 高くなければならない、アンプリコンサイズ 75 bp ~ 100 bp。選択したプローブおよびプライマー(以下を参照のこと)を合成し、二重HPLC精製して未結合色素を除去し、そしてレポーター色素およびクエンチャー色素の、それぞれ5' および3' 末端への十分な結合について、質量分析法によって評価した。

【0333】

PCR条件: サンプルRNAを、広範な正常組織および腫瘍組織から提供した。各組織由来のRNA (ポリA+ RNA, 2.8 pg) および細胞株由来のR

NA (全RNA, 70 ng) を、96ウェルPCRプレートの各ウェルにスポットした。順方向プライマー、逆方向プライマーおよび2777610特異的プローブ(以下; および参照として役立つ別の遺伝子についての別のセットのプライマーおよびプローブを参照のこと)を含むPCRカクテルを、5 mMのMgCl₂、dNTP (dA、dG、dC、dTを1:1:1:2の比)、0.25 U/mlのAmpli Taq Gold™ (PE Biosystems)、および0.4 U/μlのRNaseインヒビターを含むPE Biosystems 7700についての1×TaqMan™ PCR Master Mix、ならびに0.25 U/μlの逆転写酵素を使用して作製した。逆転写を、48℃で30分間行い、続いて増幅/PCRサイクルを以下のように行った: 95℃で10分、次いで95℃で15秒、60℃で1分の40サイクル。

【0334】

この分析において使用したTaqManプローブおよびプライマーは、以下の通りであった:

Ag316 (F): 5' - CCGGCCTCATTTGTTATGCA - 3' (配列番号4)

Ag316 (R): 5' - TCTCCCCGGCGCTTCG - 3' (配列番号5)

Ag316 (P): TET - 5' - CGCGCGTTCTTCTTGATCTCCCG - 3' - TAMRA (配列番号6)。

【0335】

図3A~Cに示される、TaqManで生成した29518614 hWnt-7Bの発現プロファイルは、全ての主用な癌グループ由来の複数の腫瘍細胞株において、高度な発現が存在することを示す。

【0336】

(実施例2. ヒト抗Wnt-7B抗体の産生)

トランスジェニックXenomouse™と名付けられたマウスを、この実施例で用いる。このXenomouse™の作製および特徴付けは、PCT公開WO94/02602に詳細に記載される。

【0337】

2匹と6匹との間の多くのXenomouseTM動物を、フロイント不完全アジュバントまたはフロイント完全アジュバントのいずれかにおいて乳化した免疫原性量（約20～60マイクログラム）の29518614ポリペプチド免疫原で、腹腔内免疫化する。このマウスは、少なくとも2回、そして6回までのこのような免疫化注射を、2～3週の間隔で受ける。血清力価を、第2用量およびその後の各用量の後に決定する。血液を、モニターするために、注射の約1週間後に眼球後叢から得る。

【0338】

免疫特異的血清の力価を、酵素結合免疫吸着アッセイを使用して決定する。この目的のために、100～500 ngの抗原を含む溶液を添加し、そして4で一晩または37で約2時間のいずれかでインキュベートすることによって、29518614抗原を、アッセイのマイクロタイタープレートのウェルに固定化する。このプレートを3回洗浄し、そして無害なタンパク質で約2時間ブロックし、続いて3回洗浄する。XenomouseTM動物から得られたこの血清を、段階希釈でこのウェルに添加し、そして室温で約2時間、抗原に吸収させ、そして3回洗浄する。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールのウェルもまた、調製する。過剰の未結合血清を洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に結合体化した過剰の抗ヒトκ鎖抗体、抗ヒトμ鎖抗体、または抗ヒトγ鎖抗体を添加し、そして約1時間結合を進行させることによって、ヒト特性を有する結合抗体を検出する。次いで、HRPについての色素生産性基質を添加し、そしてこのプレートを読み取り、各ウェルに存在する結合HRPの量を決定する。

【0339】

このアッセイは、IgGおよびIgMの両方の、1:3000～1:70000の範囲の力価での生成を示すと予想される。

【0340】

（等価物）

本発明の特定の実施形態の前述の詳細な記載から、Wnt-7B様遺伝子につ

いての独特のヌクレオチド、ポリペプチド、およびその使用方法が記載されていることは明らかであるはずである。特定の実施形態が本明細書に詳細に開示されているが、これは、例示のみの目的のために例としてなされ、そして上記の添付の特許請求の範囲に関して制限することを意図しない。特に、種々の置換、変更、および改変が、特許請求の範囲によって規定される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明になされ得ることが本発明者によって意図される。例えば、W n t - 7 B 様ヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはその使用方法の選択は、本明細書に記載の実施形態の知識を持つ当業者にとって慣用的な事項であると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明に従う W n t - 7 B - 1 ヌクレオチド配列（配列番号 1）を示す。

【図 2】

図 2 A は、本発明に従う W n t - 7 B - 1 ポリペプチド配列（配列番号 2）を示す。図 2 B は、マウス W n t - 7 B ポリペプチド配列（配列番号 3）を示す。

【図 3 A】

図 3 A は、本発明に従う W n t - 7 B - 1 核酸の発現解析を示す。

【図 3 B】

図 3 B は、本発明に従う W n t - 7 B - 1 核酸の発現解析を示す。

【図 3 C】

図 3 C は、本発明に従う W n t - 7 B - 1 核酸の発現解析を示す。

【図1】

ATGCACAGAACTTTTCGCAAGTGGATTTTCTACGTGTTTCTCTGCTTTGGCGTCTGTACGTGAAGCTC
 GGAGCACTGTCATCCGTGGTGGCCCTGGGAGCCAACATCATCTGCAACAAGATTCTGGCCTAGCCCCG
 CGGCAGCGTGCCATCTGCCAGAGTCGGCCCGATGCCATCATTGTGATTGGGGAGGGGGCGCAGATGGGC
 ATCAACGAGTGCCAGTACCAGTTCGGCTTCGGACGCTGGAACGCTCTGCCCTCGGCGAGAAGACCGTC
 TTCGGGCAAGAGCTCCGAGTAGGGAGCCGTGAGGCTGCCTTCACGTACGCCATCACCGCGGCTGGCGTG
 GCGCAGCCGTCACCGCTGCCTGCAGCCAAGGGAACCTGAGCAACTGCGGCTGCGACCGCGAGAAGCAG
 GGCTACTACAACCAAGCCGAGGGCTGGAAGTGGGGCGGCTGCTCGGCCGACGTGCGTTACGGCATCGAC
 TTCTCCCGCGCTTCGTGGACGCTCGGGAGATCAAGAAGAACGCGCGGCGCCTCATGAACCTGCATAAC
 AATGAGGCCCGCAGGAAGGTTCTAGAGGACCGGATGCAGCTGGAGTGCAAGTGCCACGGCGTGTCTGGC
 TCCTGCACCAACCAAACTGCTGGACCACGCTGCCCAAGTTCGAGAGGTGGGCCACCTGCTGAAGGAG
 AAGTACAACGCGCCGTGCAGGTGGAGGTGGTGGGGCCAGCCGCTGCGGGCAGCCACCTTCTTGC
 ATCAAACGCTGCGCAGCTATCAGAAGCCATGGAGACAGACCTGGTGTACATTGAGAAGTCGCCAAC
 TACTGCGAGGAGGACGCGGCCACGGGCGAGCTGGGCACGCAGGGCCGCTCTGCAACCGCACGTGCCCC
 GCGCGGACGACTGTGACACCATGTGCTGCGGCCGAGGCTACAACACCCACAGTACACCAAGGTGTGG
 CAGTGCAACTGCAAAATTCACCTGGTGTGCTTCGTCAAGTGCAACACCTGCAGCGAGCGCACCGAGGTC
 TTCACCTGCAAGTGAGCCAGGCCCGGAGGCGGCC (配列番号1)

Fig. 1

【図2】

MHRNFRKWIFVFLCFGLVYVKLGALSSVVALGANIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDALIVIGEGAQMGINECQYQ
 FRFGRWNCALGEKTVFGQELRVGSREAAFTYAITAAGVAHAVTAACSQGNLSNCGCDREKQGYYNQAEQWKGCC
 SADVRYGIDFSRRFVDAREIKKNARRLMNLHNNEAGRKVLEDRMQLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPKFREVGHLL
 KEKYNAAVQVEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMETDLVYIEKSPNYCEEDAATGSVGTQGRLCNRTSPGADDC
 DTMCCGRGYNTHQYTKVWQCNCKFHWCCFVKCNTCSERVEFTCK (配列番号2)

Fig. 2A

MHRNFRKWIFVFLCFGLVYVKLGALSSVVALGANIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDALIVIGEGAQMG
 DECQHQFRFGRWNCALGEKTVFGQELRVGSREAAFTYAITAAGVAHAVTAACSQGNLSNCGCDREKQGY
 YNQAEQWKGCCSADVRYGIDFSRRFVDAREIKKNARRLMNLHNNEAGRKVLEDRMKLECKCHGVSGSCT
 TKTCWTTLPKFREVGHLLKEYNAAVQVEVVRASRLRQPTFLRIKQLRSYQKPMETDLVYIEKSPNYCEE
 DAATGSVGTQGRLCNRTSPGADGCDTMCCGRGYNTHQYTKVWQCNCKFHWCCFVKCNTCSERVEFTCK
 (配列番号3)

Fig. 2B

【図3A】

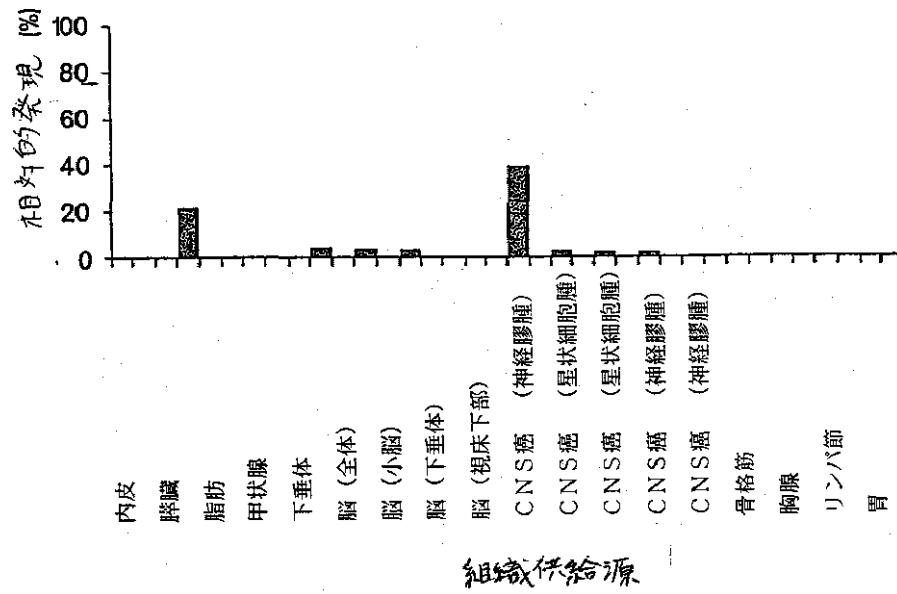


Fig. 3A

【図3B】

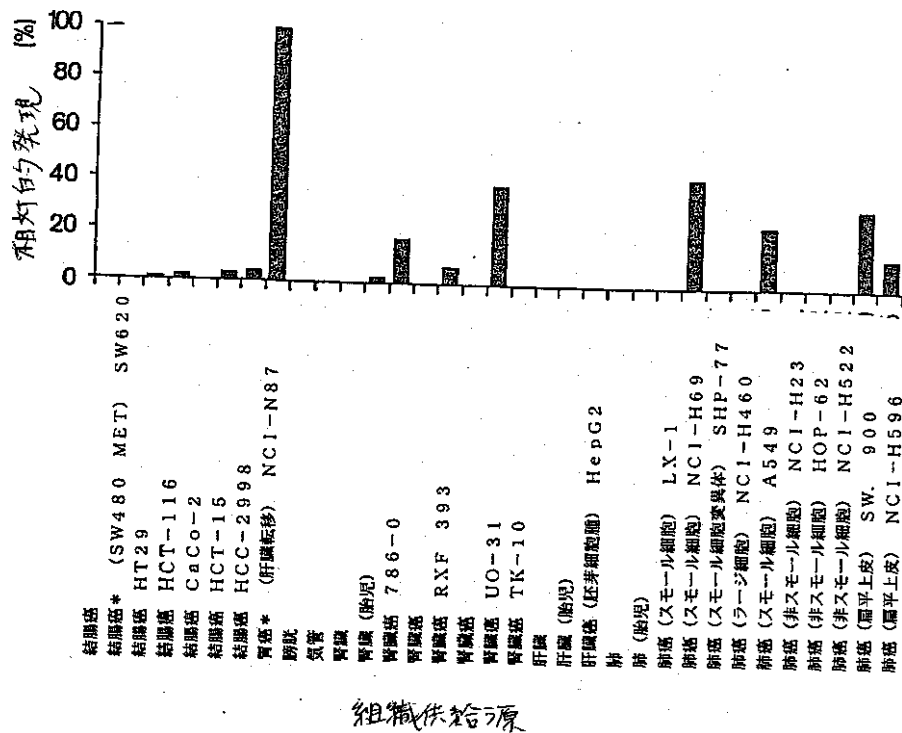


Fig. 3B

【圖3C】

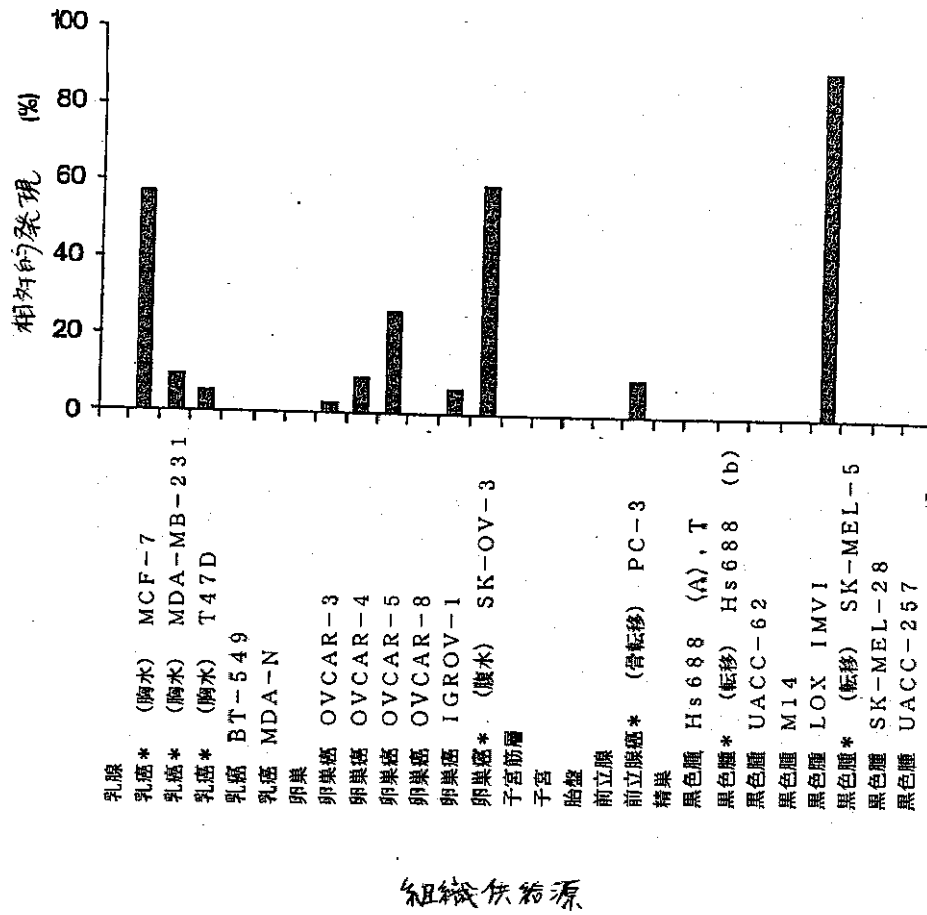


Fig. 3C

【手続補正書】

【提出日】平成14年11月29日(2002.11.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたWnt-7B様核酸分子であって、該分子は、配列番号2または該核酸分子の相補体に対して少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを以下の条件でコードし、該条件が、

該ポリペプチドが、配列番号2に従って番号付けされた配列の、70～72位のIDE、74～76位のQH Q、196～198位のMK L、または302～304位のDGC以外アミノ酸配列以外のアミノ酸配列を含む条件である、核酸分子。

【請求項2】 請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子であって、前記ポリペプチドが、70～72位のINE、74～76位のQY Q、196～198位のMQL、および302～304位のDDCのアミノ酸配列のうち少なくとも1つを含む、核酸分子。

【請求項3】 請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子であって、前記ポリペプチドが、70～72位のINE、74～76位のQY Q、196～198位のMQL、および302～304位のDDCのアミノ酸配列を含む、核酸分子。

【請求項4】 請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子であって、前記核酸分子が、配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸分子に相補的な核酸配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、核酸分子。

【請求項5】 請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子であって、前記分子がさらに、配列番号2のアミノ酸配列、または、配列番号2のアミノ酸配列において1つ以上の保存的置換を含む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。

【請求項 6】 請求項 1 に記載の W n t - 7 B 様核酸分子であって、前記ポリペプチドが、天然に存在するヒトポリペプチドのアミノ酸配列を含む、核酸分子。

【請求項 7】 請求項 1 に記載の W n t - 7 B 様核酸分子であって、前記ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、核酸分子。

【請求項 8】 請求項 1 に記載の W n t - 7 B 様核酸分子であって、前記ポリペプチドが、配列番号 3 のアミノ酸配列を含まない、核酸分子。

【請求項 9】 請求項 1 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 10】 請求項 1 に記載の核酸分子を含む、細胞。

【請求項 11】 100ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドであって、該ヌクレオチドは、配列番号 1 の少なくとも 6 つの連続したヌクレオチド、またはその相補体を含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項 12】 単離された W n t - 7 B 様ポリペプチドであって、以下：

- a) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドのフラグメントであって、ここで該フラグメントが、配列番号 2 の少なくとも 6 つの連続したアミノ酸を含む、フラグメント；
- c) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの誘導体；
- d) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドのアナログ；
- e) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドのホモログ；および
- f) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子改変体であって、ここで、該ポリペプチドは、ストリンジェントな条件下で核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によってコードされる、対立遺伝子改変体、

からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも 85%同一である配列を有するポリペプチドであり、ここで、該ポリペプチド、該フラグメント、該誘導体、該アナログ、該ホモログまたは該改変体は、配列番号 2 に従って番号付けされた配列の、70～72位の I D E、74～76位の Q H Q、196～1

98位のMKL、または302～304位のDGC以外のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項13】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、70～72位のINE、74～76位のQYQ、196～198位のMQL、および302～304位のDDCのアミノ酸配列のうち少なくとも1つを含む、ポリペプチド。

【請求項14】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、アミノ酸配列70～72位のINE、74～76位のQYQ、196～198位のMQL、および302～304位のDDCのアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項15】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、配列番号3のアミノ酸配列を含まない、ポリペプチド。

【請求項16】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項17】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、ヒトポリペプチドである、ポリペプチド。

【請求項18】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドに選択的に結合する、抗体。

【請求項19】 請求項18に記載の抗体であって、前記抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群から選択される、抗体。

【請求項20】 Wnt-7B様ポリペプチドを産生する方法であって、該方法は、請求項11に記載の細胞を、Wnt-7B様核酸分子が発現される条件下で培養する工程を包含する、方法。

【請求項21】 生物学的サンプル中において請求項12に記載のポリペプチドの存在を検出する方法であって、該方法は以下：

該サンプルを提供する工程；

該サンプルを、該ポリペプチドに選択的に結合する化合物と接触させる工程；
および

該ポリペプチドと該化合物との間の複合体を検出する工程であって、ここで該

複合体の存在が、該サンプル中に該ポリペプチドが存在することを示す、工程、を包含する方法。

【請求項22】 生物学的サンプル中において請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子の存在を検出する方法であって、該方法は以下：

該生物学的サンプルを提供する工程；

該サンプルを、該サンプル中でプローブおよび相同な核酸分子との間で安定なハイブリッドが形成することが可能な条件下で、該プローブ核酸分子と接触させる工程；および

該プローブ分子によって形成された該ハイブリッドまたは増幅産物を検出する工程であって、

ここで該ハイブリッドまたは該増幅産物の存在が、該サンプル中に該Wnt-7B様核酸分子が存在することを示す、工程、を包含する方法。

【請求項23】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドの活性を調節する方法であって、該方法は以下：

該ポリペプチドを提供する工程；

該ポリペプチドを、該ポリペプチドの活性を調節するのに十分な量において、因子と接触させる工程；を包含する、方法。

【請求項24】 Wnt-7B様関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、該障害を有する被験体に、該被験体の該Wnt-7B様関連障害を処置または予防するに十分な量の、請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子を投与する工程を包含する、方法。

【請求項25】 Wnt-7B様関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、該障害を有する被験体に、該被験体の該Wnt-7B様関連障害を処置または予防するに十分な量の、請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドを投与する工程を包含する、方法。

【請求項26】 Wnt-7B様関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、該障害を有する被験体に、該被験体の該Wnt-7B様関連障害

を処置または予防するに十分な量の、請求項18に記載のWnt-7B様抗体を投与する工程を包含する、方法。

【請求項27】 請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項28】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項29】 請求項19に記載のWnt-7B様抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項30】 1つ以上の容器の中に、請求項27に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項31】 1つ以上の容器の中に、請求項28に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項32】 1つ以上の容器の中に、請求項29に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項33】 Wnt-7B様関連障害に対する活性もしくは潜伏性のモジュレーターまたは素因をスクリーニングするための方法であって、該方法が、以下：

(a) Wnt-7B様関連障害に対する増加した危険性の試験動物に試験化合物を投与する工程であって、ここで、該試験動物はWnt-7B様タンパク質を組み換え発現する、工程；

(b) 該試験動物中の該タンパク質の活性を測定する工程；

(c) 該タンパク質を組み換え発現し、かつWnt-7B様関連障害に対する危険性の増加していないコントロール動物中の該タンパク質の活性を測定する工程；

(d) 該試験動物および該コントロール動物における該タンパク質の発現を比較する工程であって、ここで、該コントロール動物と比較した該試験動物中の該タンパク質の活性における変化は、該試験化合物がWnt-7B様関連障害の潜伏性のモジュレーターであることを示す、工程；
を包含する、方法。

【請求項34】 請求項33に記載の方法であって、ここで、前記試験動物が、野生型試験動物と比較して増加したレベルで、試験タンパク質導入遺伝子を発現するかまたはプロモーターの制御下で該導入遺伝子を発現する、組換え試験動物であり、ここで、該プロモーターは、該導入遺伝子のネイティブな遺伝子プロモーターではない、方法。

【請求項35】 請求項12に記載のWnt-7B様ポリペプチドの変化したレベルと関連する疾患の存在または該疾患の素因を決定するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 哺乳動物被験体由来の細胞サンプル中の該ポリペプチドの量を測定する工程；および

(b) 工程(a)の該ポリペプチドの量を、コントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程であって、

ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の工程(a)の該ポリペプチドのレベルにおける変化が、疾患状態を示す、工程；
を包含する、方法。

【請求項36】 請求項1に記載のWnt-7B様核酸分子の変化したレベルと関連する疾患の存在または該疾患の性質を決定するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 哺乳動物被験体由来の細胞サンプル中の該核酸分子の量を測定する工程；および

(b) 工程(a)の該核酸分子の量を、コントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程であって、

ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の工程(a)の該核酸分子の発現レベルにおける変化が、疾患状態を示す、工程；
を包含する、方法。

【請求項37】 哺乳動物被験体において病理学的状態を処置する方法であって、該方法が、該病理状態を緩和する量でポリペプチドを該被験体に投与する工程を包含し、ここで、該ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列またはこれらの生物学的に活性なフラグメントを含むポリペプチドと少なくとも85%同

一なアミノ酸配列を有するポリペプチドである、方法。

【請求項38】 哺乳動物被験体において病理学的状態を処置する方法であって、該方法が、該病理状態を緩和するに十分な量で請求項19に記載の抗体を該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項39】 請求項35～38のいずれか1項に記載の方法であって、前記被験体がヒトである、方法。

【請求項40】 請求項37～39のいずれか1項に記載の方法であって、前記病理学的状態が、腫瘍、癌、または新生物形成に関連する、方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/10679

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/475 G01N33/68 C12Q1/68 C07K16/22 A61K38/18 A61K39/395 A61K31/7088		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, EMBL, BIOSIS, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHENBEI CHANG AND AL: "Neural crest induction by Xwnt7B in Xenopus" DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 194, no. 1, 1998, pages 129-134, XP002185717 the whole document --& DATABASE EMBL 'Online! Accession number AF026894, 8 November 1997 (1997-11-08) C. CHANG ET AL: "Xenopus laevis Wnt-7B mRNA, complete cds." XP002185718 --- -/-	1,2,4,6, 8-13,15, 20,22
☒ Further documents are listed in the continuation of box C.		
☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 December 2001		14/01/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Le Cornec, N

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/10679

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAVIN BJ ET AL: "Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR, NY, US, vol. 4, no. 12B, December 1990 (1990-12), pages 2319-2332, XP002121510 ISSN: 0890-9369	11
A	page 2320; figure 1 page 2330 page 2321; figure 2	1-10, 12-16,22
X	HUGUET E L ET AL: "Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 54, no. 10, 15 May 1994 (1994-05-15), pages 2615-2621, XP002121611 ISSN: 0008-5472	11,12, 15,17, 20,22,36
A	the whole document	1-10,35
X	WO 99 57248 A (LEE SCOTT K ;TAKADA SHINJI (US); HARVARD COLLEGE (US); MCMAHON AND) 11 November 1999 (1999-11-11) page 6, line 2 - line 5; claims	12,15, 17,20
A		22,24, 25,27, 28,37
X	WO 98 06747 A (GENENTECH INC) 19 February 1998 (1998-02-19) sequence ID no.5 page 56	11
X	BUI T D ET AL: "High expression of Wnt7b in human superficial bladder cancer vs invasive bladder cancer." BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 77, no. 2, January 1998 (1998-01), pages 319-324, XP001042161 ISSN: 0007-0920	11,22,36
A	the whole document	1-10, 12-17, 24,27
A	EP 0 887 408 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 30 December 1998 (1998-12-30) claims	1-22, 24-38

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/10679

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAN BOKHOVEN H ET AL: "Assignment of WNT7B to human chromosome band 22q13 by in situ hybridization." CYTOGENETICS AND CELL GENETICS, vol. 77, no. 3-4, 1997, pages 288-289, XP001042134 ISSN: 0301-0171 the whole document ---	11
T	HIROYUKI KIRIKOSHI ET AL: "Molecular cloning and characterization of human WNT7B" INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 19, no. 4, October 2001 (2001-10), pages 779-783, XP001041868 the whole document -----	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 23, 39-40

Claim 23 refers to a method of modulating the activity of the Wnt-7B-like polypeptide using an agent without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claim is ambiguous and vague, and its subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (art. 5/6 PCT).

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

Claims 39 and 40 refer to a claim 41 which does not exist and thus have not been searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/10679

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9957248 A	11-11-1999	WO 9957248 A1	11-11-1999
WO 9806747 A	19-02-1998	US 5851984 A	22-12-1998
		AU 721947 B2	20-07-2000
		AU 3911297 A	06-03-1998
		CA 2262469 A1	19-02-1998
		EP 0918794 A2	02-06-1999
		JP 2000516466 T	12-12-2000
		WO 9806747 A2	19-02-1998
EP 0887408 A	30-12-1998	CA 2232807 A1	23-11-1998
		EP 0887408 A1	30-12-1998
		JP 11075873 A	23-03-1999
		US 6043053 A	28-03-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
A 6 1 K	48/00	A 6 1 P	25/28	4 C 0 8 4
A 6 1 P	9/10		29/00	4 C 0 8 5
	25/28		35/00	4 C 0 8 6
	29/00		37/00	4 H 0 4 5
	35/00		37/08	
	37/00		43/00	1 0 5
	37/08	C 0 7 K	14/47	
	43/00		16/18	
C 0 7 K	14/47	C 1 2 N	1/15	
	16/18		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10		1/68	A
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15			M
	33/50		33/566	
	33/53	C 1 2 P	21/08	
		C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/566		5/00	A
// C 1 2 P	21/08	A 6 1 K	37/02	

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

(72)発明者 ラステリ, ルカ
アメリカ合衆国 コネチカット 06437,
ギルフォード, ペPPERブッシュ レ
ーン 52

(72)発明者 ハーマン, ジョン エル.
アメリカ合衆国 コネチカット 06437,
ギルフォード, パーンシェド レーン
78

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB14 DA13 DA36
FB02 FB03 FB06 FB12 GC15
4B024 AA01 AA12 BA45 BA80 CA04
GA11 HA12
4B063 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QQ79
QR55 QR60 QR80 QS05 QS24
QS25 QS28 QS34
4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA05
DA14
4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01
BA08 BA22 CA23 NA14 ZA02
ZA36 ZA45 ZA89 ZB05 ZB07
ZB08 ZB09 ZB11 ZB13 ZB21
ZB26 ZB31
4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 CC23
EE01
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04
NA14 ZA02 ZA36 ZA45 ZA89
ZB05 ZB07 ZB08 ZB09 ZB11
ZB13 ZB21 ZB26 ZB31
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA76 DA86 EA28 EA51
FA72 FA74

专利名称(译)	WNT-7 B样多肽和编码它们的核酸		
公开(公告)号	JP2003529355A	公开(公告)日	2003-10-07
申请号	JP2001572545	申请日	2001-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	ヴェルネコリーヌアーエム ラステリルカ ハーマンジョンエル		
发明人	ヴェルネ, コリーヌ アー.エム. ラステリ, ルカ ハーマン, ジョン エル.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P9/10 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/475 C07K16/18 C12N1/15 C12N1 /19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33 /15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/28 A61P29/00 C07K14/475		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P9/10 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 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 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB14 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045 /FB06 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063 /QR55 4B063/QR60 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA93Y 4B065 /AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA23 4C084/NA14 4C084 /ZA02 4C084/ZA36 4C084/ZA45 4C084/ZA89 4C084/ZB05 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB09 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZB31 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085 /BB11 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA36 4C086/ZA45 4C086/ZA89 4C086/ZB05 4C086 /ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB09 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB31 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045 /DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/194256 2000-04-03 US 09/625634 2000-07-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了新颖的分离的Wnt-7B样多核苷酸和由Wnt-7B样多核苷酸编码的膜相关或分泌的多肽。还提供了与Wnt-7B样多肽或Wnt-7B样多肽的任何衍生物，变体，突变体或片段，多核苷酸或抗体免疫特异性结合的抗体。本发明进一步提供了其中Wnt-7B样多肽，多核苷酸和抗体用于检测和治疗多种病理状况和其他用途的方法。

ATGCACAGAACTTTCGCAAGTGGATTTCCTACGTGTTTCTCTGCTTTGGCGTCCTGTACGTGAAGCTC
GGAGCACTGTATCCGTGTGGCCTTGGGAGCCACATCATCTGCAACAAATTCCTGGCCTAGCCCCG
CGGCACTGTGCAATCTCCAGAGTCGGCCCATGCAATCATTTGATTGGGAGGGGGCGAGATGGGC
ATCAACGAGTCCAGTACCGATTCCGCTTCGGACGCTGGAACTGCTCTGCCCTCGGCGAGAAGACGTC
TTGGGCGAGAGTCCGAGTGGGAGCCCTGAGGCTGCTTCACGTACGCCATCACCGCGGTGGCGTG
GGGCAAGCCCTCAACGCTGCTGCAAGGGAACCTGAGCAACTGCGGCTGGGACCGGAGAGCAG
GGCTACTACAAACCAAGCCGAGCGCTGGGAGTGGGGCGGCTGCTGGGCGACGTGGCTTACGGCATCEAC
TTCTCCCGGCTTCTGGGAGCTTCGGGAGATCAAGAGAGAGCGGCGGCTCATGAACCTGCATBAC
AATGAGGCGGCGAGGAGGTTCTAGAGGACCGGATGCACTGGAGTGAAGTGGCAGCGCTCTCTGGC
TCTGCACTACCAAACTCTGCTGACACGCTCTCCAACTTCGAGAGGTGGGCGACCTGCTGAGGAG
AAGTACAACTGCGGCGCTTCAGGTGGAGGTGGTGGGCGAGCGCTCTGGGCGAGCCACTTCTGCGC
ATCAACAGCTGGCGACCTATCAGAACTCATGAGACAGACCTGCTGTATGAGAGTGGGCGAAC
TACTGCGAGAGGAGCGGCGACCGGCGAGCTGGGCGAGGCGCTTCTGCAACCGGACGCTGGCGC
GGCGCGGAGCACTGTGACACCATGCTGCGGCGGAGGCTACAAACCCACCTGATACCAAGGTGTCG
GATGCAACTGCAATTCACATGCTGCTGCTGCTCAAGTGAACACTGCAAGCGAGCGCACCGGAGTC
TTCACCTGCAAGTGAAGCGGCGGAGGCGGCGC (8251号1)