

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4979385号
(P4979385)

(45) 発行日 平成24年7月18日 (2012. 7. 18)

(24) 登録日 平成24年4月27日 (2012. 4. 27)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/00 1 O 1

請求項の数 23 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-539833 (P2006-539833)
 (86) (22) 出願日 平成16年11月12日 (2004. 11. 12)
 (65) 公表番号 特表2007-513609 (P2007-513609A)
 (43) 公表日 平成19年5月31日 (2007. 5. 31)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/037578
 (87) 国際公開番号 W02005/047478
 (87) 国際公開日 平成17年5月26日 (2005. 5. 26)
 審査請求日 平成19年1月19日 (2007. 1. 19)
 (31) 優先権主張番号 60/519, 818
 (32) 優先日 平成15年11月12日 (2003. 11. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 506159297
 ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ
 ティ・オブ・コロラド、ア・ボディー・コ
 ーポレート
 アメリカ合衆国、コロラド・80309、
 ボールダー、リージェンツ・アドミニスト
 レイティブ・センター・201
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 キム、スー・ヒョン
 アメリカ合衆国、コロラド・80013、
 オーロラ、イースト・ピラノバ・プレイス
 ・19833

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍壊死因子 α の調節のための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる - イソ型の I L - 3 2 をコードする精製核酸。

【請求項 2】

配列が異種プロモーターに機能し得る形で連結されている請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】

核酸がベクター内に含まれている請求項 2 に記載の核酸。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 5】

請求項 1 の核酸によりコードされる精製タンパク質。

【請求項 6】

I L - 3 2 が細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳動物細胞からなる群から選択される細胞において発現される組換えタンパク質である請求項 5 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

組換えタンパク質が融合タンパク質である請求項 6 に記載のタンパク質。

【請求項 8】

i n v i t r o において少なくとも 1 つの細胞を T N F 産生を誘導するのに適した条件下で I L - 3 2 タンパク質と接触させることを含む T N F 産生の誘導方法。

【請求項 9】

IL - 3 2 タンパク質が - イソ型、 - イソ型、 - イソ型及び - イソ型からなる群から選択される請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの細胞が白血球を含む請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

白血球が単核及びマクロファージからなる群から選択される請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

自己免疫疾患の治療のための医薬の製造における請求項 5 に記載のタンパク質に結合する抗体の使用。

10

【請求項 13】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 12 に記載の抗体の使用。

【請求項 14】

モノクローナル抗体の Fab 断片の請求項 13 に記載の使用。

【請求項 15】

モノクローナル抗体がヒト化モノクローナル抗体である請求項 13 に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 16】

モノクローナル抗体が標的細胞による IL - 3 2 誘導 TNF 産生を抑制する請求項 13 に記載のモノクローナル抗体の使用。

20

【請求項 17】

モノクローナル抗体が標的細胞において IL - 3 2 誘導 I B 分解を抑制する請求項 13 に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 18】

モノクローナル抗体が標的細胞において迅速な IL - 3 2 誘導 p38 MAPK リン酸化を抑制する請求項 13 に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 19】

自己免疫疾患が多発性硬化症、重症筋無力症、自己免疫性神経障害、自己免疫性ぶどう膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫性血小板減少症、1 型糖尿病、グレーブス病、橋本病、自己免疫性卵巣炎及び睾丸炎、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、脈管炎、ベーチェット病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症、シェーグレン症候群、乾せん、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡及び白斑からなる群から選択される請求項 12 に記載の使用。

30

【請求項 20】

抗体がヒトモノクローナル抗体及びヒト化マウスモノクローナル抗体からなる群から選択される請求項 12 に記載の使用。

【請求項 21】

a) 請求項 5 に記載の IL - 3 2 タンパク質及び少なくとも 1 つの薬物候補を用意すること、

40

b) 前記 IL - 3 2 タンパク質によって誘導される TNF 発現の上方制御に対する前記薬物候補の効果を分析することを含む IL - 3 2 阻害剤のスクリーニング方法。

【請求項 22】

薬物候補が IL - 3 2 反応性モノクローナル抗体及び IL - 3 2 ドミナントネガティブミュータントからなる群から選択される請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

癌を治療するための医薬の製造における請求項 5 に記載の IL - 3 2 タンパク質の使用。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍壊死因子 誘導因子 (T A I F) またはインターロイキン 3 2 (I L - 3 2) と称されるインターロイキン 1 8 誘導サイトカインに関する組成物及び方法に関する。特に、本発明は、部分的に腫瘍壊死因子 発現を調節することにより自己免疫疾患及び癌を治療するための組成物及び方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチ (R A) は、世界中の成人の約 1 % を襲っている一般的な慢性炎症性関節炎であり、女性が多く、ピーク発病は 3 0 歳代である (F i r e s t e i n , “ R h e u m a t o i d A r t h r i t i s ” , S c i e n t i f i c A m e r i c a n M e d i c i n e (2 0 0 0) ; 及び C o h e n , “ S y s t e m i c A u t o i m m u n i t y ” , P a u l 編 , F u n d a m e n t a l I m m u n o l o g y , フィラデルフィアに所在の L i p p i n c o t t - R a v e n P u b l i s h e r s (1 9 9 9 年) 発行 , p . 1 0 6 7 - 1 0 8 8 参照) 。滑膜性の連結で強い炎症が起こり、滑膜に単核食細胞、リンパ球及び好中球が浸潤しているために強い関節痛が生じている。加えて、R A 患者は通常関節の周りの軟膏及び硬骨が損失して、可動性が失われる。

10

【0003】

R A の原因は正確に定義されていないが、病気の諸特徴が R A 病因に対する自己免疫成分を示している。特に、関節リウマチではマクロファージ及び線維芽細胞誘導サイトカインが大量に発現している (F i r e s t e i n ら , J . I m m u n o l . , 1 4 4 : 3 3 4 7 (1 9 9 4)) 。腫瘍壊死因子 (T N F) 及びインターロイキン (I L - 1) は、過剰発現は動物モデルにおいて関節炎を誘発させ得るが、いずれも滑膜細胞増殖、コラゲナーゼ産生及びプロスタグランジン放出を誘導できる点で主要な病原因子であるようである (上掲の F i r e s t e i n (2 0 0 0)) 。 I L - 1 8 は R A 関節中にも存在し、炎症誘発性サイトカインを産生するようにマクロファージを直接活性化できる (G r a c i e ら , J . C l i n . I n v e s t . , 1 0 4 : 1 3 9 3 (1 9 9 9)) 。

20

【0004】

現在の R A 治療は鎮痛、炎症のコントロール及び病気経過の変更に向けられている。より攻撃的な治療アプローチが最近しばしば採用されており、R A 患者は直ぐに非ステロイド系抗炎症薬 (N S A I D) から第 2 系統物質 (例えば、メトトレキセート) への変更を要求している。残念ながら、多くの患者でメトトレキセート単独では R A を十分にコントロールできず、医者は追加治療または一連の単一物質、例えばレフルノミド、スルファサラジンまたは T N F 阻害剤のいずれかを選択している (上掲の F i r e s t e i n (2 0 0 0)) 。 R A を治療するために使用してある程度成功した T N F 阻害剤には T N F 反応性モノクローナル抗体 (インフリキシマブ / R E M I C A D E 及びアダリムマブ / H U M I A) 及び可溶性 T N F 受容体 / 免疫グロブリン融合タンパク質 (エタネルセプト / E N B R E L) が含まれる。しかしながら、この衰弱させる病気の進行を停止させるべく単独でまたは組み合わせて使用するために追加治療を医者に提供することが望ましい。

30

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、腫瘍壊死因子 誘導因子 (T A I F) またはインターロイキン 3 2 (I L - 3 2) と称されるインターロイキン 1 8 誘導サイトカインに関する組成物及び方法に関する。特に、本発明は、部分的に腫瘍壊死因子 発現を調節することにより自己免疫疾患及び癌を治療するための組成物及び方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、配列番号 1 5 と少なくとも 8 0 % 同一であり、インターロイキン 3 2 (I L - 3 2) をコードし、 I L - 3 2 のエキソン 3 及びエキソン 4 を実質的に隣接関係で含む

50

配列を含む精製核酸を提供する。幾つかの好ましい実施態様では、IL-32は配列番号7のアミノ酸配列を含む - イソ型、配列番号8のアミノ酸配列を含む - イソ型または配列番号10のアミノ酸配列を含む - イソ型である。他の実施態様では、上記配列はIL-32のイントロン4を欠き、特に好ましい実施態様では上記配列は配列番号15と少なくとも90%同一である。配列番号3、配列番号4及び配列番号6からなる群から選択される配列を含む精製核酸も提供される。幾つかの実施態様では、配列は異種プロモーターに対して機能し得る形で連結されている。好ましい実施態様では、核酸はベクター内に含まれている。更に、ベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0007】

加えて、本発明は、配列番号15と少なくとも80%同一であり、インターロイキン32(IL-32)をコードし、IL-32のエキソン3及びエキソン4を実質的に隣接関係で含む配列を含む核酸によりコードされる精製タンパク質を提供する。幾つかの好ましい実施態様では、IL-32は配列番号7のアミノ酸配列を含む - イソ型、配列番号8のアミノ酸配列を含む - イソ型または配列番号10のアミノ酸配列を含む - イソ型である。他の実施態様ではIL-32は - イソ型ではなく、好ましい実施態様ではIL-32は配列番号14のアミノ酸配列を含まない。幾つかの好ましい実施態様では、IL-32は細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳動物細胞からなる群から選択される細胞において発現される組換えタンパク質である。これらの実施態様のサブセットでは、組換えタンパク質は融合タンパク質である。

【0008】

本発明はまた、IL-32に結合する抗体も提供する。幾つかの好ましい実施態様では抗体はモノクローナル抗体であり、他の実施態様ではモノクローナル抗体のFab断片が提供される。幾つかの実施態様では、モノクローナル抗体(mAb)は32-4及び32-9から選択されるが、これらに限定されない。32-4 mAbを産生するハイブリドーマ細胞はバージニア州マナサスに所在のBoulevard大学のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に寄託されている。32-9 mAbを産生するハイブリドーマ細胞もATCCに寄託されている。更に、幾つかの好ましい実施態様では、モノクローナル抗体はキメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体から選択されるが、これらに限定されない。これらの実施態様のサブセットでは、モノクローナル抗体は標的細胞によるIL-32誘導TNF産生を抑制し、標的細胞におけるIL-32誘導I β 分解を抑制し及び/または標的細胞における迅速なIL-32誘導p38 MAPKリン酸化を抑制する。

【0009】

更に、本発明は、少なくとも1つの細胞とIL-32タンパク質をTNF産生を誘導するのに適した条件下で接触させることを含むTNF産生の誘導方法を提供する。好ましい実施態様では、IL-32タンパク質は - イソ型、 - イソ型、 - イソ型及び - イソ型からなる群から選択される。幾つかの実施態様では、少なくとも1つの細胞は白血球を含む。これらの実施態様のサブセットでは、白血球は単球及びマクロファージからなる群から選択される。

【0010】

本発明はまた、被験者及びIL-32を結合する抗体を用意し、前記被験者に前記抗体を投与することを含む被験者の治療方法も提供する。好ましい実施態様では、IL-32は - イソ型、 - イソ型、 - イソ型及び - イソ型からなる群から選択される。特に好ましい実施態様では、被験者は自己免疫疾患を有している、自己免疫疾患を有していると疑われている、または自己免疫疾患を有する恐れのある者である。幾つかの実施態様では、自己免疫疾患は多発性硬化症、重症筋無力症、自己免疫性神経障害、自己免疫性ぶどう膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫性血小板減少症、1型糖尿病、グレーブス病、橋本病、自己免疫性卵巣炎及び睾丸炎、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、脈管炎、ベーチェット病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症

、シェーグレン症候群、乾せん、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡及び白斑から選択されるが、これらに限定されない。本発明はヒトモノクローナル抗体及びヒト化マウスモノクローナル抗体から選択される抗体を提供するが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、投与は自己免疫疾患の少なくとも1つの症状を緩和するのに適した条件下でなされる。

【0011】

更に、本発明は、IL-32タンパク質及び少なくとも1つの薬物候補を用意し、前記薬物候補のIL-32タンパク質の少なくとも1つの活性に対する効果を分析することを含むIL-32阻害剤のスクリーニング方法も提供する。幾つかの実施態様では、IL-32タンパク質は - イソ型、 - イソ型、 - イソ型及び - イソ型からなる群から選択され組換えタンパク質である。好ましい実施態様では、薬物候補はIL-32反応性モノクローナル抗体及びドミナントネガティブIL-32バリエーションから選択されるが、これらに限定されない。特に好ましい実施態様では、IL-32タンパク質の少なくとも1つの活性はTNF 発現の上方制御を含む。

【0012】

本発明はまた、被験者及びIL-32タンパク質を用意し、前記被験者に前記IL-32タンパク質を投与することを含む被験者の治療方法も提供する。好ましい実施態様では、IL-32タンパク質は - イソ型、 - イソ型、 - イソ型及び - イソ型からなる群から選択される組換えタンパク質である。特に好ましい実施態様では、被験者は癌にかかっている、癌にかかっていると疑われる、または癌にかかる恐れのある者である。

【0013】

本発明はまた、被験者由来の血清及びIL-32反応性抗体を用意し、前記血清を前記抗体を用いてIL-32を定量するのに適した条件下でスクリーニングすることを含む被験者の血清中のIL-32濃度を測定するための方法及びキットも提供する。幾つかの実施態様では被験者は自己免疫疾患患者であり、他の実施態様では被験者は敗血症患者である。幾つかの好ましい実施態様ではスクリーニングは電気化学ルミネッセンスアッセイにより実施され、他の実施態様ではスクリーニングは酵素結合免疫検定法により実施される。幾つかの実施態様では、IL-32反応性抗体はポリクローナル家兎及びヒト-IL-32抗体及びモノクローナルマウス抗ヒトIL-32抗体から選択されるが、これらに限定されない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

定義

本発明の理解を助けるために、多数の用語及び成句は以下のように定義される。

【0015】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド、前駆体またはRNA（例えば、tRNA、siRNA、rRNA等）の産生に必要なコード配列を含む核酸（例えば、DNA）配列を指す。前記ポリペプチドは、完全長または断片の所望活性または機能性（例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達等）が維持される限り完全長コード配列またはコード配列の一部によりコードされ得る。この用語は、構造遺伝子のコード領域及び遺伝子が完全長mRNAの長さに相当するように5'及び3'の両末端のコード領域に隣接して位置している配列も包含する。コード領域の5'に位置し、mRNA上に存在する配列は5'非翻訳配列と称される。コード領域の3'、すなわち下流に位置し、mRNA上に存在する配列は3'非翻訳配列と称される。用語「遺伝子」は遺伝子のcDNA形態及びゲノム形態を包含する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」、「介在領域」または「介在配列」と称される非コード領域で中断され得るコード領域を含む。イントロンは核または一次転写産物から除去または「スプライシング」され、従ってメッセンジャーRNA（mRNA）転写産物中には存在しない。mRNAは翻訳中新生ポリペプチド中のアミノ酸の配列または順序を特定するように機能する。

【0016】

特に、用語「T A I F 遺伝子」及び「I L - 3 2 遺伝子」は、完全長 I L - 3 2 ヌクレオチド配列を指す。しかしながら、この用語は I L - 3 2 ヌクレオチド配列の断片及び完全長 I L - 3 2 ヌクレオチド配列内の他のドメイン（例えば、機能ドメイン）を包含すると意図される。更に、用語「I L - 3 2 遺伝子」、「I L - 3 2 ヌクレオチド配列」及び「I L - 3 2 ポリヌクレオチド配列」は D N A、c D N A 及び R N A 配列を包含する。

【 0 0 1 7 】

本明細書中で使用する場合、用語「プラスミド」は、D N A の小さい独立的に複製する片を指す。また、用語「裸プラスミド」は、通常トランスフェクションに影響を及ぼすために使用される外来材料が欠けているプラスミド D N A を指す。本明細書中で使用する場合、「裸プラスミド」はカルシウム - ホスフェート、D E A E - デキストラン、リポソーム及び/またはポリアミンを実質的に含まないプラスミドを指す。

10

【 0 0 1 8 】

本明細書中で使用する場合、用語「精製された」は、自然環境から取り出された、単離または分離された分子（ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指す。「実質的に精製された」分子は、天然に結合している他の成分を少なくとも 5 0 %、好ましくは少なくとも 7 5 %、より好ましくは少なくとも 9 0 % 含まない。

【 0 0 1 9 】

用語「組換え D N A」は、分子生物学的技術により一緒に連結されている D N A セグメントからなる D N A 分子を指す。また、用語「組換えタンパク質」は、組換え D N A から発現されるタンパク質分子を指す。

20

【 0 0 2 0 】

本明細書中で使用する場合、用語「融合タンパク質」は、2 つの遺伝子配列を組み合わせることにより作成されるハイブリッド遺伝子の発現により形成されるタンパク質を指す。通常、これは c D N A を既存遺伝子とインフレームで発現ベクターにクローン化することにより実施される。融合パートナーは、レポーター（例えば、g a l）として作用し得、単離目的のための道具を提供し得（例えば、G S T）、またはインビボでタンパク質の半減期を向上させ得る（例えば、I g G F c）。

【 0 0 2 1 】

組換えタンパク質を産生するための適当な系には、原核生物（例えば、大腸菌（E s c h e r i c h i a c o l i））、酵母（例えば、サッカロミセス・セレビシエ（S a c c a r o m y c e s c e r e v i s i a e））、昆虫（例えば、バキュロウイルス）、哺乳動物（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞）、植物（例えば、サフラワー）及び無細胞系（例えば、家兔網状赤血球）が含まれるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 2 2 】

本明細書中で使用する場合、用語「コード領域」は、m R N A 分子の翻訳の結果として新生ポリペプチド中に存在するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を指す。コード領域は真核生物において 5 ' 側では開始メチオニンをコードするヌクレオチドトリプレット“ A T G ”、3 ' 側では終止コドン进行特定する 3 トリプレット（すなわち、T A A、T A G 及び T G A）と接している。

【 0 0 2 3 】

天然に存在するタンパク質分子に関連してアミノ酸配列を本明細書中に示すとき、用語「アミノ酸配列」及び類似用語、例えば「ポリペプチド」または「タンパク質」はアミノ酸配列が当該タンパク質分子に関連する完全な天然アミノ酸配列に限定されるとは意味しない。

40

【 0 0 2 4 】

用語「野生型」は、天然起源から単離したとき遺伝子または遺伝子産物の特性を有する遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は最も頻繁に集団中に見られるものであり、よって任意に遺伝子の「通常」すなわち「野生型」形態を指す。

【 0 0 2 5 】

本明細書中で使用する場合、遺伝子または遺伝子産物に関して用語「ミュータント」、

50

「多形」及び「バリエーション」は、野生型遺伝子または親遺伝子産物と比較して配列及び／または機能性（すなわち、各種特性）の点での変化を指す。幾つかの好ましい実施態様では、用語「ミュータント」は突然変異の結果として親遺伝子または遺伝子産物とは異なる遺伝子または遺伝子産物を指す。天然及び誘導ミュータントは単離され得ることに注目されたい。これらは、野生型遺伝子または親遺伝子産物と比較して変化した特性を有しているという事実により同定される。加えて、ミュータント遺伝子は実験室において人工的（例えば、部位特異的変異）または合成的に作成され得る。

【0026】

本明細書中で使用する場合、用語「インターロイキン-32」、「IL-32」、「TAIF」、「腫瘍壊死因子 誘導因子」、「NK4」及び「ナチュラルキラー細胞転写物4」は、ヒトIL-32遺伝子（例えば、配列番号11のホモサピエンス）及びその遺伝子産物（例えば、野生型、及び イソ型、並びにそのバリエーション）を指す。残基の20%以下（好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下、最も好ましくは1%以下）が野生型IL-32配列と異なるIL-32バリエーションも本発明の方法及び組成物において使用するのに適している（これには配列番号12として開示されているマウスcDNA断片に対応する遺伝子産物が含まれるが、これに限定されない）。対照的に、本明細書中で使用する場合、用語「NK4」、「TAIF」及び「IL-32」は、肝細胞増殖因子（HGF）の特定アンタゴニスト（Dateら、FEBS Lett., 420:1-6（1997））であるHGF/NK4と称される（または、N末端へパリンドメイン及びその後の4つのクリングルドメインについて単にNK4と称される）HGFの内部断片を指さない。

【0027】

本明細書中で使用する場合、用語「ハイブリダイゼーション」は相補的核酸の対形成を指す。ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの強度（すなわち、核酸間の結合力）は、核酸間の相補性の程度、関与する条件のストリンジェンシー、形成されるハイブリッドの T_m 及び核酸内のG:C比のような諸因子により影響される。

【0028】

本明細書中で使用する場合、用語「 T_m 」は「融点」に関して使用される。融点は、二本鎖核酸分子の集団が一本鎖に半分解離ようになる温度である。核酸の T_m を計算する式は当業界で公知である。一般的文献に記載されているように、核酸が1M NaClで水溶液中にあるときには T_m 値の簡単な推定値は式： $T_m = 81.5 + 0.41(\%G + C)$ により計算され得る（例えば、Anderson及びYoung, "Quantitative Filter Hybridization", Nucleic Acid Hybridization（1985））。他の文献には、 T_m を算出するために構造及び配列特徴を考慮するより高性能な計算が含まれている。

【0029】

本明細書中で使用する場合、用語「ストリンジェンシー」は、核酸ハイブリダイゼーションを実施する温度、イオン強度及び他の化合物（例えば、有機溶媒）の存在の条件に関して使用される。当業者は「ストリンジェンシー」条件が個別にまたはまとめて記載されているパラメーターを変化させることにより変更され得ることを認識している。「高ストリンジェンシー」条件では、核酸対形成は高頻度の相補的塩基配列を有している核酸断片間でのみ生ずる（例えば、「高ストリンジェンシー」条件下でのハイブリダイゼーションは約85～100%の同一性、好ましくは約70～100%の同一性を有するホモログ間で起こり得る）。「中ストリンジェンシー」条件では、核酸対形成は中頻度の相補的塩基配列を有している核酸間で生ずる（例えば、「中ストリンジェンシー」条件下でのハイブリダイゼーションは約50～70%の同一性を有するホモログ間で起こり得る）。よって、「弱」または「低」ストリンジェンシーの条件は、相補配列の頻度が通常低いので遺伝的に異なる生物から誘導される核酸の場合にしばしば必要である。

【0030】

核酸ハイブリダイゼーションに関して使用される場合、用語「高ストリンジェンシー条

10

20

30

40

50

件」及び「ストリンジェントな条件」は、約500ヌクレオチド長のプローブを用いるとき、5×SSPE(43.8g/lのNaCl, 6.9g/lのNaH₂PO₄・H₂O及び1.85g/lのEDTA、NaOHでpH7.4に調節)、0.5% SDS、5×デンハート試薬及び100μg/ml 変性サケ精子DNAからなる溶液中での42度の結合またはハイブリダイゼーション及びその後の0.1×SSPE、1.0% SDSを含む溶液中での42度の洗浄に等しい条件を含む。

【0031】

核酸ハイブリダイゼーションに関して使用される場合、用語「中ストリンジェンシー条件」は、約500ヌクレオチド長のプローブを用いるとき、5×SSPE(43.8g/lのNaCl, 6.9g/lのNaH₂PO₄・H₂O及び1.85g/lのEDTA、NaOHでpH7.4に調節)、0.5% SDS、5×デンハート試薬及び100μg/ml 変性サケ精子DNAからなる溶液中での42度の結合またはハイブリダイゼーション及びその後の1.0×SSPE、1.0% SDSを含む溶液中での42度の洗浄に等しい条件を含む。

【0032】

核酸ハイブリダイゼーションに関して使用される場合、用語「低ストリンジェンシー条件」は、約500ヌクレオチド長のプローブを用いるとき、5×SSPE(43.8g/lのNaCl, 6.9g/lのNaH₂PO₄・H₂O及び1.85g/lのEDTA、NaOHでpH7.4に調節)、0.1% SDS、5×デンハート試薬[50×デンハートは500mlあたり5g Ficoll(タイプ400, Pharmacia)、5g BSA(フラクションV, Sigma)]及び100μg/ml 変性サケ精子DNAからなる溶液中での42度の結合またはハイブリダイゼーション及びその後の5×SSPE、1.0% SDSを含む溶液中での42度の洗浄に等しい条件を含む。

【0033】

本明細書中で使用する場合、用語「ノーザンブロット」は、その後のハイブリダイゼーションアッセイで使用するために変性RNAを固体支持体上へ移す方法を指す。通常、全RNAまたはポリA富化RNAをアガロースゲルで電気泳動し、膜に移し、放射性標識したDNAまたはRNA断片を用いてプローブすると、特定のRNA配列が検出される。ノーザンブロットは当業界でルーチンに使用されている(例えば、Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205(1980); 及びAusubelら編, Current Protocols in Molecular Biology, ニューヨークに所在のJohn Wiley & Sons, Inc. (1994年)発行参照)。

【0034】

本明細書中で使用する場合、用語「サザンブロット」は、その後のハイブリダイゼーションアッセイで使用するためにアガロース電気泳動により分画した変性DNAを固体支持体に移す方法を指す。この方法は、通常アガロース電気泳動前にゲノムDNAを適当な制限酵素で消化し、このDNAを膜に移し、特定のDNA配列を検出するために放射性標識したDNAまたはRNA断片とインキュベーションすることを含む。サザンブロットは当業界でルーチンに使用されている(Southern, J. Mol. Biol., 98:503-517(1975); 及び上掲のAusubel(1994年)参照)。

【0035】

本明細書中で使用する場合、用語「ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)」は、クローニングまたは精製することなくDNA混合物中の標的配列のセグメントの濃度を高める方法を指す(例えば、参照により本明細書に含まれるとする米国特許第4,683,195号明細書、同第4,683,202号明細書及び同第4,965,188号明細書参照)。この標的配列の増幅方法は、大過剰の2つのオリゴヌクレオチドプライマーを所望標的細胞を含むDNA混合物に導入した後DNAポリメラーゼの存在下で熱サイクルを正確に繰り返すことを含む。前記した2つのプライマーは2本鎖標的配列の各鎖に対して相補性である。増幅を実施するためには、混合物を変性し、その後プライマーを標的分子内の相補性

10

20

30

40

50

配列にアニーリングする。アニーリング後、プライマーをポリメラーゼを用いて延長させて新しい対の相補鎖を形成する。この変性、プライマーアニーリング及びポリメラーゼ延長のステップ（すなわち、変性、アニーリング及び延長が1“サイクル”を構成する）を複数回繰り返すと、所望標的配列の増幅セグメントが高濃度で得られ得る。所望標的配列の増幅セグメントの長さは、プライマーの相互の相対位置により決められ、従ってこの長さは制御可能なパラメーターである。前記プロセスの反復性により、この方法は「ポリメラーゼ連鎖反応（以下、“PCR”）」と称される。標的配列の所望増幅セグメントは（濃度の点で）混合物中の優勢な配列となるので、これらのセグメントは“PCR増幅される”ものである。鋳型がRNAの場合、逆転写（RT）ステップは増幅サイクル前に意図される。よって、この変法は“RT-PCR”と称される。

10

【0036】

用語「抗体」はポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を指す。当該タンパク質またはその断片に対する免疫反応の結果として動物において形成されるポリクローナル抗体は、その後公知方法を用いて血液から容易に単離され、例えばカラムクロマトグラフィーにより精製され得る。モノクローナル抗体も公知方法（例えば、Winter及びMilstein, Nature, 349: 293-299 (1991) 参照）により作成され得る。本明細書中で使用する場合、用語「抗体」は、組換え技術で作成し、修飾された抗体及びその抗原結合断片、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、多機能抗体、二重特異性またはオリゴ特異性抗体、一本鎖抗体及びF(ab)またはF(ab)₂断片を包含する。抗体に関して使用される用語「反応性」は、抗体が当該抗原に結合できることを意味する。例えば、IL-32反応性抗体は、IL-32またはIL-32断片に結合する抗体である。

20

【0037】

用語「ドミナントネガティブミュータント」は、野生型活性を欠くが、基質、受容体等に関して野生型分子と効果的に競合し、よって野生型分子の活性を阻害する分子を指す。好ましい実施態様では、用語「IL-32ドミナントネガティブミュータント」は、IL-32受容体に関して野生型IL-32タンパク質と競合するが、IL-1βの分解、p38 MAPKのリン酸化及びTNF産生のような下流効果を誘導できないIL-32ミュータントタンパク質を指す。適当なドミナントネガティブIL-32ミュータントはランダムIL-32ミュータントのライブラリーから選択され得、またはTNF系（Steedら, Science, 301: 1895-1898 (2003)）に記載されているように合理的に設計され得る。

30

【0038】

ヌクレオチド配列に関して使用される場合、用語「一部」は、10ヌクレオチド～全ヌクレオチド配列-1ヌクレオチドのサイズを有する前記配列の断片を指す。

【0039】

本明細書中で使用する場合、用語「生物学的に活性な」は、野生型IL-32分子の構造、調節及び/または生化学的機能を有する分子を指す。幾つかの例では生物学的に活性な分子は哺乳動物IL-32分子のホモログであり、他の例では生物学的に活性な分子は哺乳動物IL-32分子の一部である。本発明の組成物及び方法に使用される他の生物学的に活性な分子には、ミュータント（例えば、少なくとも1つの欠失、挿入または置換を有するミュータント）哺乳動物IL-32分子が含まれるが、これに限定されない。生物学的活性は、例えば実施例に記載されているインビトロでのTNF-誘導を測定することにより調べられる。

40

【0040】

本明細書中で使用する場合、用語「動物」は、細胞壁及びクロロフィルの不在及び自発運動能力の点で植物細胞とは異なる細胞を有する生物を含む動物界のメンバーを指す。本発明の好ましい実施態様は、主に動物界の脊椎動物（脊柱または脊索）メンバーである。

【0041】

用語「患者」及び「被験者」は、医学的治療を受ける候補者である哺乳動物（ヒトまた

50

は動物)を指す。

【0042】

用語「対照」は、実験被験者またはサンプルを比較するための基礎を与える被験者またはサンプルを指す。例えば、対照被験者またはサンプルを用いると、実験手順の有効性が確認できる。幾つかの実施態様では、用語「対照被験者」は偽治療(例えば、PBS単独または食塩液中正常家兎IgG)を受ける動物を指す。

【0043】

用語「サンプル」及び「試料」は広義で使用される。この用語は試料または培養物を含むと意味する一方、この用語は生物学的及び環境サンプルの両方を含むと意味する。この用語にはヒト及び他の動物から得られるあらゆるタイプのサンプルが包含され、体液(例えば、尿、血液、便、脊髄液、精液、唾液及び創傷滲出液)及び固体組織が含まれるが、これらに限定されない。しかしながら、これらの例は本発明に適用されるサンプルの種類を限定すると解釈されない。

10

【0044】

本明細書中で使用する場合、用語「白血球」は、身体が感染及び他の疾患と戦うのを助ける白血球と称される細胞を指し、顆粒球(例：好中球、好酸球、好塩基球)、単核食細胞及びリンパ球(例：B細胞、T細胞、ナチュラルキラー細胞)が例示される。

【0045】

本明細書中で使用する場合、用語「単球」は、後に組織に移出し、マクロファージに分化する血液中に循環している単核食細胞を指す。用語「マクロファージ」は、血液単球から誘導される哺乳動物組織の比較的長命の食細胞を指す。異なる部位からのマクロファージは明らかに異なる特性を有する。主タイプは腹腔及び肺胞マクロファージ、組織マクロファージ(組織球)、肝臓のクッパー細胞及び破骨細胞である。マクロファージは、幾つかの細菌、原生細胞及び腫瘍細胞の死滅、免疫系の他の細胞を刺激する物質の放出及びプロセス抗原のTリンパ球への提示において重要な役割を発揮する。

20

【0046】

本明細書中で使用する場合、用語「炎症」は、血流及び白血球の組織への進入の多さを特徴とし、膨潤、発赤、高い温度及び痛みが生ずることを特徴とする外傷に対する組織応答を指す。

【0047】

本明細書中で使用する場合、用語「症状」は、病気または患者の状態(例えば、幾つかの身体的または精神状態を示す患者の状態の変化)の主観的証拠を指す。

30

【0048】

例えば、炎症性腸疾患(IBD)の関係における成句「炎症の症状」は、本明細書において腹痛、下痢、直腸出血、体重減少、発熱、食欲不振及び他の重大な合併症(例えば、脱水、貧血及び栄養不良)のような症状が含まれると定義されるが、これらに限定されない。多くの症状は定量分析(例えば、体重減少、発熱、貧血等)を受ける。幾つかの症状は血液検査(例えば、貧血)または血液の存在(例えば、直腸出血)を検出する検査から容易に判明する。

【0049】

また、IBDの関係における成句「症状が軽減する状態で」は、IBDの検出可能な症状が定性的または定量的に軽減する程度を指し、病気からの回復度(例えば、体重増加率)または腹痛、下痢、直腸出血、体重減少、発熱、食欲不振、脱水、貧血、膨張、線維化、炎症腸管及び栄養不良の症状の少なくとも1つの軽減に対する検出可能な影響が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0050】

用語「自己免疫疾患」は、多発性硬化症、重症筋無力症、自己免疫性神経障害(例えば、ギラン-バレー)、自己免疫性ぶどう膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫性血小板減少症、1型糖尿病、グレーブス病、橋本病、自己免疫性卵巣炎及び睾丸炎、側頭動脈炎、抗リン

50

脂質症候群、脈管炎（例えば、ウェグナー肉芽腫症）、ベーチェット病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症（例えば、強直性脊椎炎）、シェーグレン症候群、乾せん、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡及び白斑が含まれるが、これらに限定されない。

【0051】

本明細書中で使用する場合、用語「関節リウマチ」及び「RA」は、関節が破壊している慢性炎症性疾患を指す。RAは、免疫複合体が関節に形成され、炎症性応答（複合体媒介過敏反応）を促す自己免疫疾患と見なされる。細胞媒介（IV型）過敏反応も起こり、その結果マクロファージが蓄積し、滑膜が破壊する。

【0052】

本明細書中で使用する場合、用語「IBD」及び「炎症性腸疾患」は幾つかの病的プロセス、最も一般的には潰瘍性大腸炎及びクローン病を包含する一般的用語である。

【0053】

本明細書中で使用する場合、用語「クローン病」は胃腸管の炎症性疾患を指す。一般的症状には、再発する腹痛、発熱、悪心、嘔吐、体重減少、及び時々血が混じる下痢が含まれる。

【0054】

用語「化合物」及び「薬物候補」は、身体機能の疾患、病気、疾病または障害を治療または予防するために使用され得る化学的または生物学的単位（例えば、医薬品、薬物等を含む）を指す。化合物は公知の治療用化合物及び潜在的な治療用化合物を含む。化合物はスクリーニングにより、例えば本発明のスクリーニング方法を用いて治療用であるかが調べられ得る。「公知の治療用化合物」は、治療または予防において有効であることが（例えば、動物実験によりまたはヒトに投与した今までの経験で）立証されている治療用化合物を指す。

【0055】

本明細書中で使用する場合、用語「アゴニスト」は、「天然」または「自然」化合物の作用に似せた分子または化合物を指す。アゴニストはコンフォメーション、電荷または他の特性に関して天然化合物と相同であり得る。よって、アゴニストは細胞表面で発現する受容体により認識され得る。この認識により、天然化合物が存在していたのと同様に細胞がアゴニストの存在と反応するように細胞内で生理学的及び/または生化学的变化が生じ得る。アゴニストには、IL-32結合タンパク質に結合または相互作用するタンパク質、核酸、炭水化物または他の分子が含まれ得る。

【0056】

本明細書中で使用する場合、用語「アンタゴニスト」及び「阻害剤」は、「天然」または「自然」化合物の作用を抑制する分子または化合物を指す。アンタゴニストはコンフォメーション、電荷または他の特性に関して天然化合物と相同であってもなくてもよい。よって、アンタゴニストは、アゴニストが認識する同一または異なる受容体により認識され得る。アンタゴニストは、アゴニストの作用を防止する（例えば、天然IL-32がIL-32受容体に結合するのを防止する）アロステリック効果を有し得る。アゴニストと対照的に、アンタゴニスト化合物は、あたかも天然化合物が存在していたようにして細胞がアゴニストに対して反応するようには細胞内で生理学的及び/または生化学的变化を生じさせない。アンタゴニスト及び阻害剤には、IL-32結合タンパク質に結合または相互作用するかまたは機能的IL-32マルチマーの形成を防止するタンパク質、核酸、炭水化物または他の分子が含まれ得る。

【0057】

本明細書中で使用する場合、用語「調節する」は生物学的活性の変化または変更を指す。調節はタンパク質活性の上昇または低下、結合特性の変化、またはタンパク質または他の興味深い構造物の活性に関連する生物学的、機能的または免疫学的特性の他の変化であり得る。

【0058】

発明の説明

インターロイキン 18 (IL - 18) は、先天性及び適応免疫応答の両方において役割を有する多機能サイトカインである。IL - 18 は、広範囲の Th 1 または Th 2 関連自己免疫疾患における効果について研究されてきた (Okamura, Nature, 378: 88 - 91 (1995); Nakanishi, Cytokine Growth Factor Rev., 12: 53 - 72 (2001); Okamura, Adv. Immunol., 70: 281 - 312 (1998))。IL - 1 及び IL - 18 は構造類似性を有する IL - 1 ファミリーに属し、プロセシングのためにカスパーゼ 1 を必要とする (Bazan, Nature, 379: 591 (1996); 及び Gu, Science, 275: 206 - 209 (1997))。IL - 18 はまた、IL - 1 受容体関連キナーゼ (IRAK) の補充、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体関連因子 6 との IRAK 複合体の形成及び I B / NF - B のカスケードの活性化を含めた類似のシグナル伝達経路を誘因する (Kojima, Biochem. Biophys. Res. Commun., 244: 183 - 186 (1998); Matsumoto, Biochem. Biophys. Res. Commun., 234: 454 - 457 (1997); 及び Robinson, Immunity, 7: 571 - 581 (1997))。IL - 1 サイトカインファミリーのメンバーは自己免疫疾患及び炎症性疾患において病理学的役割を發揮すると考えられている。なぜならば、IL - 1 及び IL - 18 活性を阻止すると関節リウマチ及び全身炎症を持っている被験者の病気重篤度を低下させるからである (Arend, Adv. Immunol., 54: 167 - 227 (1993); Dinarello, Blood, 87: 2095 - 2147 (1996); Novick, Immunity, 10: 127 - 136 (1999); 及び Banda, J. Immunol., 170: 2100 - 2105 (2003))。しかしながら、ヒト NK 及び KG - 1 細胞系のような少数の細胞系しか IL - 18 に応答しないので IL - 18 誘導遺伝子の研究を妨げるものがある。加えて、これらの細胞系は IL - 18 に応答するが、IL - 18 応答性を発現させるためには補助刺激因子、例えば IL - 2、IL - 12 または IL - 15 を必要とする (Ahn, J. Immunol., 195: 2125 - 2131 (1997); Ohtsuki, Anticancer Rev., 17: 3253 - 3258 (1997); Lauwerys, J. Immunol., 165: 1847 - 1853 (2000); 及び Hoshino, J. Immunol., 162: 51 - 59 (1999))。補助刺激因子が必要なことから、遺伝子発現の IL - 18 誘導の独立評価が妨げられる。

【0059】

IL - 18 は 2 つの公知受容体鎖、すなわちリガンド結合 IL - 18 R 鎖及びシグナル伝達 IL - 18 R 鎖を有する。IL - 18 受容体の両鎖は IL - 1 受容体ファミリーに属し、細胞外領域中の 3 つの Ig 様ドメインから構成されている (Kato, Nat. Struct. Biol., 10: 966 - 971 (2003); 及び Yamamoto, Biochem. Biophys. Res. Commun., 317: 181 - 186 (2004))。IL - 18 調節に関与する追加成分は IL - 18 結合タンパク質 (IL - 18 BP) である。IL - 18 BP は IL - 18 シグナル伝達複合体の一部ではなく、むしろ IL - 18 活性を拮抗させる (Kim, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 1190 - 1195 (2000); 及び Novick, Immunity, 10: 127 - 136 (1999))。IL - 18 BP は単一 Ig 様ドメインからなる分泌受容体様分子である。IL - 18 BP はウイルスタンパク質と高い相同性を有し、ヒト IL - 18 の生物学的活性を中和する (Xiang 及び Moss, Virology, 257: 297 - 302 (1999); Reading 及び Smith, J. Virol., 77: 9960 - 9968 (2003); Esteban 及び Buller, Virology, 323: 197 - 207 (2004); 及び Esteban, J. Gen. Virol., 85: 1291 - 1299 (2004))。

【0060】

補助刺激剤の非存在下では、IL - 18 R 鎖は全くまたは殆ど発現しないので非免疫細胞はIL - 18に応答しない(Thomas senら, J. Interferon Cytokine Res., 18:1077-1088(1998);及びChandrasekarら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 303:1152-1158(2003))。従って、IL - 18シグナルの伝達のためにはこの受容体成分が必要であるので、IL - 18 R 鎖を発現する安定なクローンを作成しなければならなかった(上掲のThomas senら(1998);及びKimら, J. Immunol., 166:148-154(2001))。IL - 18 R 鎖の安定な発現はヒト肺癌A549細胞(A549-R)において実現され、前記細胞を補助刺激の非存在下でもIL - 18に応答性とする。安定なA549-R クローンはマイクロアレー分析によりIL - 18誘導遺伝子を同定するために使用された。実施例1に記載されていたマイクロアレー研究で、12年前はナチュラルキラー細胞転写物4または単にNK4として記載されていたサイトカイン様分子のIL - 18誘導が分かった(Dahlら, J. Immunol., 148:597-603(1992))。用語「NK4」は現在は肝細胞成長因子のバリエーションを表すために使用されていることに留意すべきである(Martinら, J. Cell Physiol., 192:268-275(2002))。肝細胞成長因子バリエーションとNK4/IL - 32転写物の間に配列相同性はない。より最近では、悪性メラノーマのために高量のIL - 12治療を受けている患者からのPBMCで高いNK4発現が報告されている(Panelliら, Genome Biol., 3(7):RESEARCH0035(2002))が、NK4の機能は本発明の開発に至るまで未知のままであった。

【0061】

実施例に詳記するように、インターロイキン32(IL - 32)または腫瘍壊死因子誘導因子(TAIF)と称される新規な炎症性サイトカインがA549-R細胞のマイクロアレー分析から同定された。加えて、IL - 32の遺伝子構造、発現パターン及び機能も解明された。本発明が開発されるまで、IL - 32の単一イソ型(TAIF/NK4)は機能が未知のリンパ球転写物として記載されていた(Dahlら, J. Immunol., 148:597-603(1992))。前記転写物は、家族性地中海熱遺伝子座内またはそれに隣接しているヒト染色体16p13.3から転写された(Bernotら, Genomics, 50:147-160(1998))。本明細書中に記載されているように、IL - 32は、公知のサイトカインファミリーとの配列相同性を欠いているが、TNF 分泌を誘導し、公知の炎症誘発性サイトカインの古典的経路を介してシグナル伝達する能力により明らかにサイトカインである。更に、IL - 32は、IL - 32調節における類似性及び明白なシグナルペプチドがない点でIL - 1サイトカインファミリーのメンバーであると見なされる(Ghayurら, Nature, 386:619-623(1997);Cerrettiら, Science, 256:97-100(1992);及びKuidaら, Science, 267:2000-2003(1995))。加えて、IL - 1及びIL - 18のように、IL - 32は主に刺激細胞から分泌される。本明細書中で最初に示したように、IL - 32は典型的な炎症誘発性サイトカインシグナル伝達経路NF- κ B及びp38 MAPKを誘因し、それにより炎症誘発性サイトカインTNF の産生が誘導される。同様に、IL - 1、IL - 18及びLPSはIL - 32発現を誘導し、活性化NKまたはT細胞におけるNK4の元の記載とは異なり、各種臓器で偏在性IL - 32発現が観察された。IL - 32発現パターンは各種組織により産生されるIL - 15と似ている。これは、専ら活性化T細胞により産生されるIL - 2と対照的である(Bamfordら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:2897-2902(1996);及びGrabsteinら, Science, 264:965-968(1994))。

【0062】

IL - 32によるTNF の誘導から、このサイトカインが自己免疫/炎症性疾患病因において重要な役割を有することが分かる。本発明が開発されるまで、(健康人の血清中

10

20

30

40

50

で観察された I L - 3 2 レベルと比較して) 数人の敗血症患者の循環中で高レベルの I L - 3 2 が観察されることも示されていなかった。すなわち、I L - 3 2 活性を阻止することが、有効な T N F ブロック手法 (D a v i s ら , A n n . R h e m . D i s . , 5 9 S u p p l 1 : 1 4 1 - 3 (2 0 0 0) ; 及び S h a n a h a n 及び S t C l a i r , C l i n . I m m u n o l . , 1 0 3 : 2 3 1 - 2 4 2 (2 0 0 2)) と同様に各種自己免疫疾患における非常に有効な治療アプローチであると考えられる。I L - 3 2 を主成分とする組成物は癌の治療及び T N F 産生を含む細胞死またはアポトーシスの誘導が有効である他の疾患において使用されるであろうとも考えられる。

【 0 0 6 3 】

加えて、マウス R a w 2 6 4 . 7 マクロファージ細胞系は I L - 3 2 受容体を発現し、この受容体は I L - 3 2 により結合したとき活性化される (細胞外 I L - 3 2 機能) と考えられている。しかしながら、I L - 3 2 が細胞ライゼート中でも検出されたので、I L - 3 2 は細胞内機能を有しているとも考えられる。よって、I L - 3 2 は、I L - 1 (S t e v e n s o n ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 4 : 5 0 8 - 5 1 3 (1 9 9 7)) 及び高易動性グループ 1 (W a n g ら , S c i e n c e , 2 8 5 : 2 4 8 - 2 5 1 (1 9 9 9)) に類似の細胞内及び細胞外タンパク質として活性であると考えられる。

【 0 0 6 4 】

明白なシグナルペプチドの非存在下での I L - 3 2 の分泌は幾つかのサイトカインファミリーの特徴である (C e r r e t t i ら , S c i e n c e , 2 5 6 : 9 7 - 1 0 0 (1 9 9 2) ; K u i d a ら , S c i e n c e , 2 6 7 : 2 0 0 0 - 2 0 0 3 (1 9 9 5) ; 及び G h a y u r ら , N a t u r e , 3 8 6 : 6 1 9 - 6 2 3 (1 9 9 7)) 。 I L - 1 及び I L - 1 8 と同様に、I L - 3 2 は刺激一次細胞の細胞培地及び細胞系中に可溶性タンパク質として分泌される。I L - 3 2 は一次配列分析により可能性あるカスパーゼ 1 切断部位を持たず、新しいスプライスバリエーションが見つかったが、いずれも N 末端に典型的な疎水性シグナルペプチドを有していない。

【 0 0 6 5 】

複数の種中での I L - 3 2 の存在は、炎症の調節において重要な役割を果たすと考えられる進化的に保存された分子の証である。数少ない I L - 3 2 イソ型は他の哺乳動物種で同定されたが、この結果はこれらの種での E S T の相対欠乏を反映し得る。また、マウス I L - 3 2 ホモログの広範囲の研究は不成功に終わった。しかしながら、ウマ及びウシ I L - 3 2 ホモログはヒト I L - 3 2 と 3 1 . 8 ~ 2 8 . 1 % の配列同一性しか有していないので、推定マウス I L - 3 2 遺伝子がヒト遺伝子と非常に低い相同性を有している可能性がある。

【 0 0 6 6 】

本発明の幾つかの好ましい実施態様、すなわち (I) I L - 3 2 ポリヌクレオチド、(I I) I L - 3 2 ポリペプチド、(I I I) I L - 3 2 抗体、(I V) I L - 3 2 ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは抗体を含む医薬組成物、及び (V) I L - 3 2 阻害剤の同定方法を以下のセクションで記載する。

【 0 0 6 7 】

I . I L - 3 2 ポリヌクレオチド

本発明は、I L - 3 2 タンパク質、ホモログ、バリエーション及びミュータント (例えば、配列番号 3、4、6) をコードする核酸を提供する。幾つかの実施態様では、本発明は、ハイブリダイズし得るポリヌクレオチド配列が天然 I L - 3 2 遺伝子の T N F 誘導活性を維持しているタンパク質をコードする限り、高ストリンジェンシー条件下で配列番号 3、4、6 にハイブリダイズし得るポリヌクレオチド配列を提供する。幾つかの実施態様では、天然 I L - 3 2 遺伝子の T N F 誘導活性を保持しているタンパク質は野生型 I L - 3 2 と 8 0 % 相同、好ましくは 9 0 % 相同、より好ましくは 9 5 % 相同、最も好ましくは 9 9 % 相同である。特に好ましい実施態様では、I L - 3 2 生物活性を保持しているタンパク質は連続アミノ酸配列 L K A R M H Q A I E R F Y D K M Q N A E S G R G Q V (配列

10

20

30

40

50

番号 13) をコードし、野生型 IL-32 (IL-32、IL-32、IL-32、IL-32) と 99% 相同である核酸配列を含む。幾つかの好ましい実施態様では、核酸配列は配列番号 14 に記載のアミノ酸配列をコードしない。これらの実施態様のサブセットでは、核酸配列は配列番号 15 (エキソン 4 に隣接してエキソン 3) に記載されている配列を含む。好ましい実施態様では、ハイブリダイゼーション条件は核酸結合複合体の融点 (T_m) に基づき、定義のセクションで上記した定義「ストリンジェンシー」を与える。

【0068】

本発明の他の実施態様では、IL-32 の対立遺伝子を提供する。好ましい実施態様では、対立遺伝子は突然変異 (例えば、核酸配列の変化) により生じ、通常構造または機能が変更されているまたは変更されていない変更 mRNA またはポリペプチドを生じる。所与の遺伝子は、対立遺伝子形態を、含まず、1 つ含み、多数含み得る。対立遺伝子を生ずる一般的な突然変異変化は、通常核酸の欠失、付加または置換の結果と見なされる。これらの変化の各々は単独でまたは他の変化と組み合わせ、所与の配列で 1 回以上の割合で生じ得る。

【0069】

本発明の他の実施態様では、本発明のヌクレオチド配列は、いろいろな理由で IL-32 コード配列を変化させるように工学操作され得る。前記理由には、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング及び/または発現を修飾する変更が含まれるが、これに限定されない。例えば、突然変異は当業界で公知の技術 (例えば、新しい制限部位の挿入、グリコシル化パターンの変更、コドン優先度の変化等のための部位特異的変異) を用いて導入され得る。

【0070】

ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を例えば置換、欠失または付加により変更した修飾ペプチドが産生され得る。幾つかの好ましい実施態様ではこれらの修飾は修飾 IL-32 (例えば、IL-32 アゴニスト) の TNF 誘導活性に大きな影響を与えず、他の好ましい実施態様ではこれらの修飾は修飾 IL-32 (例えば、IL-32 アンタゴニスト) の TNF 誘導活性を除去する。換言すると、所与の構築物は、構造的よりはむしろ機能的に規定される本発明の修飾またはバリエーション IL-32 の属のメンバーであるかどうかを調べるために評価され得る。好ましい実施態様では、バリエーションまたはミュータント IL-32 の活性は実施例 2 に記載されている方法 (TNF 誘導) により評価される。

【0071】

更に、上記したように、IL-32 のバリエーション形態も本明細書に詳記されているペプチド及び DNA 分子と均等であると見なされる。例えば、ロイシンをイソロイシンまたはバリンでの分離置換、アスパルテートのグルタメートでの分離置換、スレオニンをセリンでの分離置換、またはアミノ酸を構造的に関連しているアミノ酸での類似置換 (すなわち、保存的突然変異) は生じる分子の生物学的活性に大きな影響を及ぼさないと考えられている。従って、本発明の幾つかの実施態様は保存的置換を含む本明細書に記載されている IL-32 のバリエーションを提供する。保存的置換は側鎖に関連あるアミノ酸のファミリー間で起こるものである。遺伝的にコードされるアミノ酸は 4 つのファミリー、すなわち (1) 酸性 (アスパルテート、グルタメート)、(2) 塩基性 (リシン、アルギニン、ヒスチジン)、(3) 非極性 (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) 及び (4) 非帯電性 (グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン) に分類され得る。フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンは時々芳香族アミノ酸としてまとめて分類されている。同様に、アミノ酸レパートリーは、(1) 酸性 (アスパルテート、グルタメート)、(2) 塩基性 (リシン、アルギニン、ヒスチジン)、(3) 脂肪族 (グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン)、セリン及びスレオニンは場合により脂肪族 - ヒドロキシとして別に分類される、(4) 芳香族 (フェニルアラ

10

20

30

40

50

ニン、チロシン、トリプトファン)、(5)アミド(アスパラギン、グルタミン)及び(6)硫黄含有(システイン及びメチオニン)として分類され得る(例えば、S t y e r 編、B i o c h e m i s t r y、p. 17 - 21、第2版、W H F r e e m a n a n d C o. (1981年)発行)。ペプチドのアミノ酸配列の変化が機能的ホモログを生ずるかどうかは、バリエーションペプチドが野生型タンパク質と同様に機能する能力を評価することにより容易に調べることができる。1つ以上の置換を有するペプチドは同様に容易に検査することができる。

【0072】

非常にまれに、バリエーションは“非保存的”変化(例えば、グリシンのトリプトファンでの置換)を含む。相似のマイナーな変化はアミノ酸欠失及び/または挿入をも含み得る。生物学的活性を無効にすることなくいずれのアミノ酸を置換、挿入または欠失し得るかを定めるガイダンスはコンピュータプログラム(例えば、ウィスコンシン州マディソンに所在のD N A S T A R I n c. 製L A S E R G E N E)を用いて見つけることができる。

【0073】

I I . I L - 3 2 ポリペプチド

他の実施態様では、本発明はI L - 3 2 ポリペプチド配列をコードするI L - 3 2 ポリヌクレオチド配列を提供する。I L - 3 2 ポリペプチド(例えば、配列番号7、8、10)は図4に記載されている。本発明の他の実施態様はI L - 3 2 タンパク質の断片、融合タンパク質または機能的均等物を提供する。本発明の更に他の実施態様では、各種I L - 3 2 ホモログ及びミュータントに相当する核酸配列は適当な宿主細胞においてI L - 3 2 ホモログ及びミュータントを発現させる組換えD N A 分子を作成するために使用され得る。本発明の幾つかの実施態様ではポリヌクレオチドは天然精製産物であり得、他の実施態様ではポリペプチドは化学合成手順の生成物であり得、更に他の実施態様ではポリペプチドは原核または真核宿主を用いて(例えば、培養されている細菌、酵母、高級植物、昆虫及び哺乳動物により)産生され得る。幾つかの実施態様では、組換え産生法で使用する宿主に応じて、本発明のポリペプチドはグリコシル化されていても、またはグリコシル化されていなくてもよい。他の実施態様では、本発明のポリペプチドは当初のメチオニンアミノ酸残基をも含み得る。

【0074】

本発明の1実施態様では、遺伝コードの固有縮重のために配列番号3、4及び6のポリヌクレオチド配列以外であり、実質的に同一または機能的に均等なアミノ酸配列をコードするD N A 配列がI L - 3 2 をクローン化し、発現させるために使用され得る。

【0075】

(A) I L - 3 2 の産生のためのベクター

本発明のポリヌクレオチドは、ポリペプチドを組換え技術により産生するために使用され得る。例えば、ポリヌクレオチドはポリペプチドを発現させるための各種発現ベクターの1つに組み込まれ得る。本発明の幾つかの実施態様では、ベクターには染色体、非染色体及び合成D N A 配列(例えば、S V 4 0 の誘導体、細菌プラスミド、ファージD N A ; バキュロウィルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージD N A の組み合わせから誘導されるプラスミド、ウィルスD N A (例: ワクシニア、アデノウィルス、鶏痘ウィルス及び仮性狂犬病))が含まれるが、これらに限定されない。宿主において複製可能であり、生存可能である限り、任意のベクターが使用できると考えられる。

【0076】

特に、本発明の幾つかの実施態様は上に広く説明した配列(例えば、配列番号3、4、6)の1つ以上を含む組換え構築物を提供する。本発明の幾つかの実施態様では、構築物はベクター、例えばプラスミドまたはウィルスベクターを含み、このベクターには本発明の配列が順または逆方向に挿入されている。更に別の実施態様では、異種構造配列が翻訳開始及び停止配列と適当な相中で合体されている。本発明の好ましい実施態様では、適当なD N A 配列が各種手順を用いてベクターに挿入される。通常、D N A 配列は適当な制限

エンドヌクレアーゼ中に当業界で公知の手順により挿入される。

【0077】

多数の適当なベクターが当業界で公知であり、市販されている。前記ベクターには、

1) 細菌ベクター: pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pBSKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene); ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)、及び

2) 真核ベクター: pWLEO、pSV12CAT、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia)

が含まれるが、これらに限定されない。宿主中で複製可能であり、製造可能である限り、他のプラスミドまたはベクターも使用可能である。本発明の幾つかの実施態様では、哺乳動物発現ベクターは複製起点、適当なプロモーター及びエンハンサー、更に必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及びアクセプター部位、転写終結配列及び5'フランキング非転写配列を含む。他の実施態様では、SV40スプライスに由来するDNA配列及びポリアデニル化部位が必要な非転写遺伝因子を与えるために使用され得る。

【0078】

(B) IL-32産生のための宿主細胞

更なる実施態様で、本発明は上記構築物を含む宿主細胞を提供する。本発明の幾つかの実施態様では、前記宿主細胞は高級真核細胞(例えば、哺乳動物または昆虫細胞)である。本発明の他の実施態様では、宿主細胞は下級真核細胞(例えば、酵母細胞)である。本発明の更に別の実施態様では、宿主細胞は原核細胞(例えば、細菌細胞)であり得る。宿主細胞の具体例には大腸菌、ねずみチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、枯草菌、シュードミナス属、ストレプトミセス属、ストレプトコッカス属及びスタフィロコッカス属中の各種種、並びにサッカロミセス・セレビシエ、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、ショウジョウバエS2細胞、ヨトウSF9細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、サル腎臓線維芽細胞のCOS-7株、C127、3T3、293、293T、ヒーラ細胞及びBHK細胞系が含まれるが、これらに限定されない。

【0079】

宿主細胞中の構築物は、組換え配列によりコードされる遺伝子産物を産生するための慣用的方法で使用され得る。幾つかの実施態様では、構築物の宿主細胞への導入はリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクションまたはエレクトロポレーションにより実施され得る。或いは、幾つかの実施態様では、IL-32ポリペプチドは慣用的ペプチド合成装置を用いて産生される。

【0080】

(C) IL-32の精製

本発明はまた、組換え細胞培養物からIL-32を回収し、精製するための方法を提供する。これらの方法には硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレシチンクロマトグラフィーが含まれるが、これらに限定されない。本発明の他の実施態様では、必要に応じて、成熟タンパク質の立体配置を完成させる際にタンパク質リフォoldingステップを使用し得る。本発明の更に他の実施態様では、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が最終精製ステップのために使用され得る。

【0081】

本発明は更に、本発明のポリペプチドを精製できる、コード配列がマーカー配列にインフレームで融合されているポリヌクレオチドを提供する。マーカー配列の非限定例は、ペ

クター、好ましくは p Q E - 9 ベクターにより供給され得るヘキサヒスチジンタグであり、細菌宿主ではマーカーに融合されているポリペプチドが精製される。または、哺乳動物細胞（例えば、C O S - 7 細胞）を使用するときにはマーカー配列は赤血球凝集素（H A）タグであり得る。

【0082】

（D） I L - 3 2 融合タンパク質

本発明はまた、I L - 3 2 の全部または一部を含む融合タンパク質を提供する。従って、本発明の幾つかの実施態様では、ポリペプチドのコード配列は、異なるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む融合遺伝子の一部として導入され得る。このタイプの発現系は、I L - 3 2 タンパク質の免疫原性断片を産生したい状況下で使用されると考えられる。

10

【0083】

免疫原性を高めるために融合タンパク質を使用することに加えて、融合タンパク質はタンパク質（例えば、本発明の I L - 3 2 タンパク質）の発現を促進させ得ると広く認められている。従って、本発明の幾つかの実施態様では、I L - 3 2 はグルタチオン - S - トランスフェラーゼ（すなわち、G S T 融合タンパク質）として作成され得る。この G S T 融合タンパク質により、例えばグルタチオン誘導化マトリックスを用いることにより I L - 3 2 を容易に精製できると考えられる。本発明の別の実施態様では、精製リーダー配列をコードする融合遺伝子、例えば I L - 3 2 の所望部分の N 末端のポリ - (H i s) / エンテロキナーゼ切断部位配列により、発現 I L - 3 2 融合タンパク質を N i ²⁺ 金属樹脂を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製できる。本発明の更に別の実施態様では、その後精製リーダー配列はエンテロキナーゼでの処理により除去され得る。

20

【0084】

（E） I L - 3 2 バリエーション

本発明の更に他の実施態様は I L - 3 2 のミュータントまたはバリエーション形態を提供する。治療または予防効果、または安定性（例えば、エキソピボの保存寿命及び/またはインピボでのタンパク質分解に対する耐性）を高めるような目的で I L - 3 2 の活性を有するペプチドの構造を修飾させることができる。この修飾ペプチドは本明細書で定義されている I L - 3 2 タンパク質の活性を有するペプチドの機能均等物と見なされる。アミノ酸置換、欠失または付加等によりアミノ酸配列が変更されている修飾ペプチドが産生され得る。幾つかの実施態様では好ましい I L - 3 2 バリエーションには I L - 3 2 アゴニスト（例えば、T N F 誘導活性を有する I L - 3 2 バリエーション）が含まれ、他の好ましい I L - 3 2 バリエーションには I L - 3 2 アンタゴニスト（例えば、T N F 誘導活性を持たず、野生型 I L - 3 2 タンパク質の T N F 誘導活性を阻害する I L - 3 2 バリエーション）が含まれる。

30

【0085】

I I I . I L - 3 2 抗体

I L - 3 2 タンパク質を検出できるように抗体が作成され得る。前記抗体は各種免疫原を用いて作成され得る。1 実施態様では、免疫原は、ヒト I L - 3 2 を認識する抗体を作成するためのヒト I L - 3 2 ペプチドである。前記抗体にはポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、F a b 断片及び F a b 発現ライブラリーが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0086】

当業界で公知の各種手順が I L - 3 2 に対するポリクローナル抗体を作成するために使用され得る。抗体を作成するためには、各種宿主動物に I L - 3 2 エピトープに対応するペプチドを注射することにより前記動物を免疫化し得る。前記動物には家兎、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、ペプチドを免疫原性担体（例えば、ジフテリア毒素、ウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニン）にコンジュゲート形成する。免疫応答を高めるために、宿主の種類に応じて各種アジュバントが使用され得る。前記アジュバントにはフロイント（完全

50

及び不完全)、無機ゲル(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、ブルーニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノール、及び潜在的に有用なヒトアジュバント(例:カルメット-ゲラン桿菌))が含まれるが、これらに限定されない。

【0087】

IL-32に対するモノクローナル抗体を作成するためには、培養されている連続的経代細胞系により抗体分子を産生する技術が本発明で使用されると考えられる(例えば、Harlow及びLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, ニューヨーク州コールドスプリングハーバーに所在のCold Spring Harbor Laboratory Press発行を参照)。これらにはハイブリドーマ技術(Kohler及びMilstein, *Nature*, 256:495-497(1975))、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(例えば、Kozborら, *Immunol. Today*, 4:72(1983)参照)及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, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985年)発行, p.77-96)が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0088】

加えて、一本鎖抗体を作成するために記載されている技術(参照により本明細書に含まれるとする米国特許第4,946,778号明細書)がIL-32特異的単鎖抗体を作成する際に使用されると考えられる。本発明の追加実施態様では、IL-32に対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片を迅速且つ簡単に同定するためにFab発現ライブラリーの構築について記載されている技術を用いる(Huseら, *Science*, 246:1275-1281(1989))。

20

【0089】

抗体断片を作成するのに適した技術が抗体分子のイディオタイプ(抗原結合領域)を含む抗体断片を作成する際に使用されると考えられる。例えば、前記断片には抗体分子をペプシン消化させることにより産生され得るFab'断片、Fab'断片のジスルフィド架橋を還元させることにより作成され得るFab断片、及び抗体分子をパバイン及び還元剤で処理することにより作成され得るFab断片が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0090】

抗体を作成する際、所望抗体のスクリーニングは当業界で公知の方法(例えば、ラジオイムノアッセイ)、ELISA(酵素結合免疫検定法)、“サンドイッチ”イムノアッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、(例えば、コロイド状金、酵素、放射性同位元素標識を用いる)in-situイムノアッセイ、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ(例えば、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集アッセイ等)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、タンパク質Aアッセイ及び免疫電気泳動アッセイ等により実施されることが考えられる。

【0091】

1実施態様では、抗体結合は一次抗体上の標識を検出することにより検出される。別の実施態様では、一次抗体はこの一次抗体への二次抗体または試薬の結合を検出することにより検出される。更なる実施態様では、二次抗体を標識する。イムノアッセイにおいて結合を検出するための多くの手段が当業界で公知であり、本発明の範囲に含まれる。当業界で公知のように、免疫原性ペプチドは免疫化プロトコルで使した担体分子を含むべきではない。例えば、ペプチドがKLHにコンジュゲート形成されていたならば、BSAにコンジュゲート形成しても、または直接スクリーニングアッセイで使用してもよい。

40

【0092】

上記抗体は、IL-32の局在化及び構造(例えば、ウェスタンブロットングのため)、適当な生物学的サンプル中のそのレベルを測定する等に関する当業界で公知の方法で

50

使用され得る。前記抗体は個人由来の生物学的サンプル中の I L - 3 2 を検出するために使用され得る。前記生物学的サンプルは生物学的流体であり得、この流体の例には細胞を含む血液、血清、血漿、腸液、尿、脳脊髄液等が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 3 】

その後、生物学的サンプルは適当な方法（例えば、E L I S A またはラジオイムノアッセイ）及びフォーマット（例えば、マイクロウェル、ディップスティック等）を用いてヒト I L - 3 2 の存在について直接検査され得る。或いは、サンプル中のタンパク質は、例えばドデシル硫酸ナトリウム（S D S）の存在または不在下及び免疫ブロッティング（ウェスタンブロッティング）により検出される I L - 3 2 の存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動（P A G E）によりサイズ分離され得る。免疫ブロット法は通常タンパク質のエピトープに相当するペプチドに対して作成した抗体を用いるとより有効であり、よって本発明に特に適している。

10

【 0 0 9 4 】

本発明の特に好ましい実施態様は、関節リウマチのような自己免疫疾患を治療するための I L - 3 2 抗体を含む。I L - 3 2 の T N F 誘導活性を中和する I L - 3 2 反応性抗体は、少なくとも 1 つの R A 疾患症状を軽減すると考えられ、特に好ましい実施態様では R A 疾患の進行を遅らすと考えられる。更に、I L - 3 2 系に適用され得ると考えられる治療用抗体の作成及び使用に関連する教示は、治療用 T N F 反応性抗体に関する米国特許第 6 , 2 7 7 , 9 6 9 号明細書及び同第 6 , 4 4 8 , 3 8 0 号明細書（いずれも、参照により本明細書に含まれるとする）に記載されている。

20

【 0 0 9 5 】

I V . I L - 3 2 核酸、ペプチドまたは抗体を含む医薬組成物

本発明は更に、I L - 3 2 ポリヌクレオチド配列の全部または一部、I L - 3 2 ポリペプチド、抗体を含めた I L - 3 2 生物活性の阻害剤またはアンタゴニストを単独でまたは少なくとも 1 つの他の物質（例えば、安定化化合物）と組み合わせて含み得、滅菌の生体適合性医薬用担体中の形態で投与され得る医薬組成物を提供する。前記担体には食塩水、緩衝食塩水、デキストロース及び水が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 6 】

本発明の方法は、自己免疫疾患及び癌を治療する際に使用される。ペプチドは患者に対して生理食塩水のような医薬的に許容され得る担体中の形態で静脈内に投与され得る。ペプチドを細胞内に送達するための標準的方法（例えば、リポソームを介する送達）が使用され得る。前記方法は当業者に公知である。本発明の組成物は非経口投与、例えば静脈内、皮下、筋肉内及び腹腔内投与のために使用される。治療のためのポリペプチドの細胞内投与は遺伝子治療を用いても実施され得る。

30

【 0 0 9 7 】

医学界で公知のように、一人の患者に対する用量は患者の体格、体表面積、年齢、投与しようとする特定化合物、性別、投与時間及びルート、全身健康状態及び同時に投与される他の薬物との相互作用を含めた諸因子に依存する。

【 0 0 9 8 】

従って、本発明の幾つかの実施態様では、I L - 3 2 ヌクレオチド及び I L - 3 2 アミノ酸配列は患者に対して単独で、または他のヌクレオチド配列、薬物またはホルモンと組み合わせて、または賦形剤または他の医薬的に許容され得る担体が混合されている医薬組成物の形態で投与され得る。本発明の 1 実施態様では、医薬的に許容され得る担体は医薬的に不活性である。本発明の別の実施態様では、I L - 3 2 ヌクレオチド配列及び I L - 3 2 アミノ酸配列は単独で病気を患っている個人に投与され得る。

40

【 0 0 9 9 】

他の実施態様では、本発明の医薬組成物は経口投与に適した剤形で当業者に公知の医薬的に許容され得る担体を用いて製剤化され得る。前記担体により、医薬組成物は治療を受ける患者が経口または経鼻摂取するために錠剤、-pill 剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁液剤等として製剤化され得る。

50

【 0 1 0 0 】

本発明において使用するのに適した医薬組成物には、活性成分が所期目的を達成するのに有効な量含有されている組成物が含まれる。例えば、有効量の I L - 3 2 は T N F の産生を誘導する量であり得る。有効量の決定は当業者の能力の範囲内であり、特に本明細書の開示内容にてらしてなし得る。

【 0 1 0 1 】

本発明の方法に使用される化合物の場合、治療有効量はまず細胞培養アッセイから推定され得る。次いで、好ましくは、T N F レベルを調節する所望の循環濃度範囲を得るために用量を動物モデル（特に、マウスモデル）において決定する。

【 0 1 0 2 】

治療有効量は、病的状態（例えば、癌）の少なくとも1つの症状を緩和する I L - 3 2 の量または病的状態（例えば、関節リウマチのような自己免疫疾患）の少なくとも1つの症状を緩和する I L - 3 2 抗体またはアンタゴニストの量を指す。前記化合物の毒性及び治療効果は、細胞培養または実験動物において一般的な薬学手順により決定され得る（L D₅₀ は集団の 50 % が致死する量であり、E D₅₀ は集団の 50 % において治療上有効な量である）。毒性と治療効果の用量比が治療指数であり、L D₅₀ / E D₅₀ 比として表され得る。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイ及び追加の動物研究から得たデータはヒトに使用するための用量範囲を決定する際に使用され得る。前記化合物の用量は毒性は全くまたは殆どなく、E D₅₀ を含む循環濃度範囲内であることが好ましい。用量は、この範囲内で使用する剤形、患者の感受性及び投与ルートに応じて変更される。通常用量は、投与ルートに応じて 0 . 1 ~ 1 0 0 , 0 0 0 μ g、最高約 1 g の全用量の範囲で変更され得る。

【 0 1 0 3 】

V . I L - 3 2 を用いる薬物スクリーニング

本発明は、炎症誘発性サイトカイン応答（例えば、T N F 産生）を変更できる薬物をスクリーニングするための標的として I L - 3 2 を用いるための方法及び組成物を提供する。

【 0 1 0 4 】

薬物スクリーニング方法は、I L - 3 2 ペプチドに対して適当な結合アフィニティを有する化合物の高スループットスクリーニングを提供し、参照により本明細書に含まれるとする国際特許出願公開第 8 4 / 0 3 5 6 4 号パンフレットに詳記されている。簡単に説明すると、多数の各種小ペプチド試験化合物を固体基質（例えば、プラスチックピンまたは幾つかの他の表面）上で合成する。次いで、ペプチド試験化合物を I L - 3 2 ペプチドと反応させ、洗浄する。次いで、結合した I L - 3 2 ペプチドを当業界で公知の方法により検出する。

【 0 1 0 5 】

別の方法では、上記したように作成した I L - 3 2 抗体を用いている。この I L - 3 2 ペプチドに特異的に結合できる抗体は I L - 3 2 に対する結合に関して試験化合物と競合する。こうして、前記抗体は I L - 3 2 ペプチドの 1 つ以上の抗原決定基を有するペプチドの存在を検出するために使用され得る。

【 0 1 0 6 】

本発明は、化合物をスクリーニングするための多くの他の手段も意図している。上に挙げた例は利用できる方法の範囲を単に例示するために記載されている。当業者は、多くの他のスクリーニング方法が使用可能であることを認識している。

【 0 1 0 7 】

特に、本発明は、活性に関して化合物をスクリーニングするための、特にコンビナトリアルライブラリー（例えば、10⁴ 個以上の化合物を含有するライブラリー）からの化合物の高スループットスクリーニングのための I L - 3 2 及びそのバリエーションもしくはミュータントをトランスフェクトした細胞系の使用を考えている。本発明の細胞系は各種スクリーニング方法において使用され得る。幾つかの実施形態では、細胞は細胞表面受容体を

活性化後のシグナル伝達をモニターするセカンドメッセンジャーアッセイにおいて使用され得る。他の実施態様では、細胞は転写 / 翻訳レベルで細胞応答をモニターするレポーター遺伝子アッセイにおいて使用され得る。

【0108】

セカンドメッセンジャーアッセイでは、宿主細胞に上記したようにIL-32またはそのバリエーションもしくはミュータントをコードするベクターをトランスフェクトすることが好ましい。その後、宿主細胞を（例えば、コンビナトリアルライブラリーからの）1つまたは複数の化合物で処理し、応答の有無についてアッセイする。コンビナトリアルライブラリー中の少なくとも一部の化合物はベクターによりコードされるタンパク質のアゴニスト、アンタゴニスト、アクチベーターまたは阻害剤として機能し得ると考えられている。また、コンビナトリアルライブラリー中の少なくとも一部の化合物はシグナル伝達経路中のベクターによりコードされるタンパク質の上流または下流で作用するタンパク質のアゴニスト、アンタゴニスト、アクチベーターまたは阻害剤として機能し得ると考えられている。

10

【0109】

上記細胞はレポーター遺伝子アッセイにおいても有用である。レポーター遺伝子アッセイは、レポーター遺伝子に対するコード配列にスプライスされる標的遺伝子（すなわち、病気標的の生物学的発現及び機能を制御する遺伝子）の転写制御因子を含む核酸をコードするベクターをトランスフェクトした宿主細胞の使用を含む。従って、標的遺伝子を活性化するとレポーター遺伝子産物が活性化される。

20

【0110】

実験

下記実施例は本発明の特定の好ましい実施態様及び態様を示し、更に説明するために提示するものであり、本発明の範囲を限定するものと解釈されない。

【0111】

以下の実験の開示内容中、次の略号を用いる：eq（当量）、M（モル）、 μ M（マイクロモル）、N（規定）、mol（モル）、mmol（ミリモル）、 μ mol（マイクロモル）、nmol（ナノモル）、g（グラム）、mg（ミリグラム）、 μ g（マイクログラム）、ng（ナノグラム）、lまたはL（リットル）、ml（ミリリットル）、 μ l（マイクロリットル）、cm（センチメートル）、mm（ミリメートル）、 μ m（マイクロメートル）、nm（ナノメートル）、（セ氏）、U（単位）、mU（ミリ単位）、min（分）、sec（秒）、%（パーセント）、kb（キロベース）、bp（塩基対）、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）。

30

【0112】

加えて、以下の細胞及びバイオアッセイを用いた。ヒトNK細胞系は、Hans Klinger博士（イリノイ州シカゴに所在のRush Medical Center）から入手し、10% FCS、IL-2（50 pg/ml）及びIL-15（200 pg/ml）を含有するRPMI 1640培地（ニュージャージー州ロッキーヒルに所在のPeprotech）において培養した。マウスマクロファージRaw 264.7細胞、ヒトA549肺癌細胞、サルCos7腎臓細胞、Anjou65（ヒト線維芽細胞293T株のサブクローン）、ヒト上皮Wish細胞及びヒト単球THP-1細胞系はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）から入手し、与えられた指示に従って維持した。バイオアッセイは96ウェルプレートで実施した。

40

【0113】

簡単に説明すると、Raw細胞（ 5×10^5 / ml, 0.1 ml / ウェル）、A549-R細胞（ 2×10^5 / ml, 0.1 ml / ウェル）及びヒトNK細胞（ 5×10^5 / ml, 0.1 ml / ウェル）を96ウェルプレートに接種し、細胞がプレートに接着するまで培養した。Raw細胞アッセイの場合には、使い尽くした培地を除去し、細胞を5 μ g / mlのポリミキシンB（オハイオ州ベッドフォードに所在のBedford Laboratories）の存在下で異なる濃度のrIL-32を含有する新鮮培地（0.2

50

ml)で刺激した。A549-R 細胞アッセイの場合には、使い尽くした培地を除去し、細胞を(Kimら, J. Immunol., 166:148-154(2001))に記載されているように産生した)IL-18を含有する新鮮培地(0.2ml)で刺激した。NK細胞アッセイの場合には、細胞をIL-12(Peprrotech)、IL-18または両サイトカインで刺激した。THP-1細胞(5×10^5 /ml, 0.1ml/ウェル)をFCSの非存在下で96ウェルプレートに接種した後、各種ソースからのrIL-32で刺激した。ホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)THP-1分化アッセイの場合には、THP-1細胞(0.25×10^5 /ml, 0.1ml/ウェル)を24ウェルプレートに接種した後、100ng/mlのPMA(ミズーリ州セントルイスに所在のSigma)で48時間刺激し、細胞をFCSを欠く培地で洗浄し、細胞をrIL-32で処理した。プレートを細胞培養インキュベーターに6~20時間置いた後、培養上清をサイトカイン測定のために収集した。

【0114】

ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を、Combined Colorado Investment Review Boardにより承認されていたHistopaque(Sigma)を用いて健康ドナーの血小板フェレーシスに従って残存白血球から単離した。PBMC(1.5×10^7)を6ウェルプレート中の10% FCS含有RPMI(3ml)に接種し、ConA(Sigma)(20 μ g)で刺激した。プレートを細胞培養インキュベーターに60時間置いた後、培養上清及び細胞ライゼートをIL-32測定のために収集した。

【0115】

大腸菌において産生したrIL-32と哺乳動物細胞において産生したrIL-32の間で活性レベルに差があり、バッチ間で活性レベルに差があったので、IL-32を生物学的活性の単位によって評価した。1単位のIL-32は、上記したアッセイ条件下でそれぞれPMA分化THP-1細胞及びマウスRaw細胞においてヒトまたはマウスTNFの2倍増加をもたらすIL-32の量と定義される。1単位の大腸菌rIL-32のおおよその濃度は20ng/mlになり、1単位の哺乳動物rIL-32のおおよその濃度は0.1ng/mlになる(ECL及びウェスタンブロットにより計算)。

【実施例1】

【0116】

NK4/IL-32を含めたIL-18誘導遺伝子の同定

野生型ヒトA549肺癌細胞(A549-WT)はIL-18Rを発現するが、IL-18Rを発現しない。よって、A549細胞において機能性IL-18受容体を発現させるために、A549細胞にIL-18R鎖発現ベクターをトランスフェントした。簡単に説明すると、トランスフェクションの前日に、ヒト肺癌A549細胞(3×10^5 /ウェル)を6ウェルプレートに接種した。次いで、細胞をOpti-MEM(カリフォルニア州カールスバッドに所在のInvitrogen)(2ml)で洗浄し、新鮮培地(1ml)において25分間インキュベートした。各ウェルあたりのトランスフェクション混合物溶液を、Opti-MEM(100 μ l)中にリポフェクタミン2000(5 μ l)を混合し、その後組織培養フッドにおいて5分間インキュベートすることにより調製した。次いで、プラスミドDNAのpTARGET/huIL-18R(Kimら, J. Immunol., 166:148-154(2001))(2 μ g)を添加した後、20分間インキュベートした。トランスフェクション混合物溶液をウェルに添加し、プレートを37℃で更に4時間インキュベートした。各ウェルに10% FCSを含有する細胞培地(2ml)を添加することによりトランスフェクションを停止した。翌日、細胞をトリプシン処理し、15cmプレートに移した。細胞がプレートに接着したら、培地を800 μ g/mlのネオマイシン(G418, Invitrogen)を含有する新鮮培地と交換した。選択培地は3日毎に、個々のコロニーが現れる(~10~14日)まで新鮮培地と交換した。円形3MMペーパーの小片を滅菌し、トリプシンで湿らし、その後各コロニーを選ぶために使用した。コロニーを、1ml/ウェルの選択培地を収容している2

10

20

30

40

50

4 ウェルプレートに移した。10⁶ 細胞が得られるまで各コロニーを増殖させ、次いで各コロニーをトランスフェクトした遺伝子の発現についてRT-PCRにより試験し、24時間IL-18刺激後細胞培地中のIL-6及びIL-8を測定するバイオアッセイにおいて試験した。3コロニーはRT-PCR及びバイオアッセイによりポジティブであった。単クローンを得るために限界希釈培養物を作成した。

【0117】

図1のパネルAに図示するように、IL-18R 構築物(Kimら, J. Immunol., 166:148-154(2001))をトランスフェクトしたA549細胞(A549-R)は、RT-PCRにより測定してIL-18R 鎖及びIL-18R 鎖を発現した。安定なクローン(A549-R)は、16時間IL-18(100 ng/ml)刺激後のIL-8の誘導について試験した。A549細胞においてIL-18Rを発現させると、A549-R細胞はIL-6及びIL-8を産生させることにより補助刺激物質の非存在下でIL-18に応答し、A549親細胞系(A549-WT)はIL-18に応答しないままであった(図1のパネルB及びC参照、N=7)。

【0118】

その後、A549-R細胞を用いて、マイクロアレーによりIL-18誘導遺伝子発現を研究した。簡単に説明すると、実験の前日にA549-R細胞を9cmプレートに2×10⁶で接種した。次いで、細胞をIL-18(50 ng/ml)で6時間刺激し、この時点で処理細胞及び対照を収集した。全RNAをTri-Reagentを用いて単離し、RNeasyキット(カリフォルニア州バレンシアに所在のQiagen)を用いて精製した。次いで、全RNAをAffymetrixの指示に従ってマイクロアレー分析のために使用した。全RNA(10 µg/ml)をSuperscript II RT(Invitrogen)を用いて第1鎖cDNAに変換した。第2鎖cDNAはT4 DNAポリメラーゼIを用いて合成した。第2鎖合成後、反応混合物をGeneChipから供給されたキットを用いて清浄した。cRNA合成をRNA転写物標識キットを用いて実施して、ビオチン標識cRNAを作成した。ビオチニル化cRNAはハイブリダイゼーション前に分画した。サンプルをAffymetrix GeneChip HG-U133にハイブリダイズし、データをコロラド健康科学センター大学のマイクロアレーコア実験室で分析した。

【0119】

マイクロアレーデータは、IL-18がIL-6及びIL-8を含めた幾つかのサイトカイン遺伝子を誘導したことを示した。その発現がIL-18誘導性であると既に公知であるインターフェロン-2及びIL-1を含めた幾つかのケモカインは、IL-18処理に応答して発現が3倍以上(logベース2)増加することが判明している群にあった(2つの独立実験からのデータを示している表1参照)。興味深いことに、ナチュラルキラー細胞転写物4(NK4)もかなり誘導された(5.3倍)。NK4遺伝子は元々活性化NKまたはT細胞産物として記載されていた(Dahlら, J. Immunol., 148:597-603(1992))が、この遺伝子に関する機能的データは集められていなかった。NK4 mRNAの発現を、マイクロアレー研究のために使用したと同一の全RNAを用いてRT-PCRにより調べた。第1鎖cDNAは、Superscript II(カリフォルニア州カールスバッドに所在のInvitrogen)を用いて全RNA(約1 µg)から合成した。PCR反応は、センスプライマー5'-CTGTC CCGAG TCTGGACTTT-3'(配列番号1)及びアンチセンスプライマー5'-GCA AAGGTGG TGGTCAGTAT C-3'(配列番号2)を用いて、94℃で45秒間、70℃で2分間、59℃で1分間を1サイクルとして30サイクル実施した。NK4転写物はIL-18処理A549-R細胞中で検出されたが、非刺激A549-R細胞中では検出されなかった(図1のパネルD参照)。

【0120】

【表 1】

表1:マイクロアレイ分析により同定したIL-18誘導遺伝子

ジエパンク受託番号	倍増加	遺伝子名
M28130	8.6	インターロイキン-8 (IL-8)
U64197	8.0	ケモカイン exodus-1
X04430	7.7	インターフェロン-β2 (IL-6)
U81234	5.8	ケモカイン-α3 (CKA-3)
U37518	5.3	TNF関連アポトシス誘導リガンド (TRAIL)
AB007872	5.3	TNF α 誘導因子 (TAIF, NK4)
X54489	5.0	メラノマ成長刺激活性 (MGSA)
M36821	4.6	GRO- γ
X03656	4.0	顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)
Z70276	3.7	線維芽細胞成長因子 12
M36820	3.2	GRO- β
X04500	3.5	プロインターロイキン-1 β
J04513	3.1	塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)

NK4 遺伝子発現もNK92細胞系 (Hoshinoら, J. Immunol., 162: 51-59 (1999)) において調べた。NK4 遺伝子は、IL-2 及びIL-15の両方を含有する調整培地に維持したときこの細胞系において構成的及び高度に発現された。調整培地中のIL-2は、NK92細胞系において観察された高レベルのNK4遺伝子に関与すると考えられる。

【実施例 2】

【0121】

組換えNK4 / IL-32によるTNF 誘導

余り記載されていない遺伝子産物の機能を調べるために、NK4 cDNA (図3のIL-32 参照) をNK92細胞 (参照により本明細書に含まれるとする上掲のDahlら (1992)) から配列決定するためにpGEMT-Easy (Promega) にクローン化した後、インサートを大腸菌での発現のためにはpPROEX/Hta (Invitrogen) または哺乳動物発現のためにはpTARGET (Promega) に移した。組換えNKを大腸菌で発現させ、組換えタンパク質のN末端にHis⁶ タグを導入することによりTALONアフィニティークラム (Invitrogen) により精製した。TALONアフィニティー精製したタンパク質をサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 75, AKTAFPLC) にかけて、タバコエッチウイルス (Invitrogen) を用いて4 で16時間消化して、His⁶ タグを除去した。切断された組換えタンパク質をリン酸緩衝液 (20 mM, pH 9) で透析した。この物質は後にイオン交換クロマトグラフィー (HiTrap QFF, AKTAFPLC) にかけて、3つの連続ステップ (His タグアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィー) を用いて精製した組換えNKタンパク質は10

% SDS-PAGEゲル中約20kDaの均一バンドとして流れ、その後クーマシーブルーにより染色した(図2のパネルA参照)。

【0122】

その後、3度精製した組換えNK4タンパク質は、ポリミキシンB(100U/ml)の存在下でのマウスRaw 264.7マクロファージ細胞によるTNF分泌を測定することにより生物学的活性について試験した。マウスRaw 264.7マクロファージ細胞は組換えNK4に応答し、大量のTNFを産生することによりイオン交換カラムから溶離するタンパク質のピークフラクションと一致していた(図2のパネルA参照)。NK4の新しく発見された生物学的活性を認識する際、前記分子の名前はIL-32/TNF誘導因子(TAIF)に変えられた。図2のパネルBに示すように、IL-32は400pg/ml(IL-32の14.8kDa計算分子量に基づいて27ピコモル)くらい低いIL-32濃度で大量のTNFを誘導し、用量依存的にTNF産生を増加させた。TNFが多数の炎症性及び自己免疫疾患において原因的役割を発揮する複数の炎症性を有していることは公知である(Beutlerら, Blood Cells Mol. Dis., 24:216-230(1998))。

【0123】

組換えIL-32は、Cos-7細胞(8×10^6)にDEAE-デキストラン技術(Sampayracら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:7575-7578(1981))を用いてpTAGET/IL-32発現ベクターを一過的にトランスフェントすることにより哺乳動物細胞においても産生された。図2のパネルCに示すように、IL-32をトランスフェクトした細胞の濃縮上清から得た組換えIL-32(100pg/ml)はTNF産生を誘導し、偽トランスフェクト細胞からの濃縮上清はTNF産生を誘導しなかった。Cos-7上清中の組換えIL-32の濃度はECL及びイムノブロットにより推定した。更に、哺乳動物細胞において産生したIL-32は、細菌細胞において産生した組換えIL-32よりも高いTNF誘導活性を有していることが判明した。

【実施例3】

【0124】

IL-32ゲノム構造及びスプライスバリエーションの同定

IL-32遺伝子の構造及びそのヒトゲノム内での局在化を分析した。IL-32をヒトNK92細胞系からRT-PCRによりクローン化し、IL-2(50pg/ml)及びIL-15(200pg/ml)の存在下で培養した。この目的のために以下のプライマー、すなわちセンス5'-CTGTCCCGAGTCTGGACTT-3'(配列番号1)及びアンチセンス5'-GCAAGGTGGTGGTCACTATC-3'(配列番号2)を用いた。図3及び5に示すように、IL-32の3つのスプライスバリエーション(IL-32は配列番号3及びジェンバンク受託番号AY495331として; IL-32は配列番号4及びジェンバンク受託番号AY495332として; IL-32は配列番号5及びジェンバンク受託番号AY495333として開示されている)はNK92細胞から誘導したRNAから同定され、別のスプライスバリエーション(IL-32は配列番号6及びジェンバンク受託番号BK004065として開示されている)は以前はNK4転写物(ジェンバンク受託番号NM_004221)として報告されていた。よって、IL-32は選択的mRNAスプライシングのために少なくとも4つのバリエーションとして発現される。

【0125】

NCBIウェブサイトからのBlastプログラムを用いて、IL-32遺伝子が染色体16p13.3にあるかを調べた。IL-32遺伝子(配列番号1及びジェンバンク受託番号AY495334として開示されている)を包囲する約5kbの配列は、ヒト染色体16配列(ジェンバンク受託番号AC108134)の180kb範囲から同定された。スプライスバリエーションの配列とゲノム配列を比較することにより、IL-32遺伝子は8個の小エクソンを含み、第2及び第3エクソンはATG開始コドンを含むことが判明

した。IL-32 は、エクソン3と4の間にスプライシングが存在しないのでN末端に追加の46アミノ酸（配列番号14）を有している。しかしながら、IL-32 では、第2エクソンは存在せず、よって第2エクソン中のATGの代わりに第3エクソン中にATG開始コドンを使用した。IL-32 は最も豊富なcDNAクローンであり、従ってこのイソ型を本明細書に記載されている多くの実験で使用した。IL-32 は、エクソン7と8の間のスプライシングのためにC末端の57アミノ酸残基が欠失しており、C末端をコードする1つの大きなエクソンを有している他のバリエーションと対照的である。IL-32アミノ酸配列の分析から、3つの可能性あるN-ミリスチル化部位及び1つの可能性あるN-グリコシル化部位の存在が明らかとなった（図4A参照）。

【0126】

BLASTプログラムを用いて、IL-32のホモログに関するNCBIデータベースを探した。このようにして、ウマ、ウシ、ヒツジ及びブタIL-32の発現配列タグ（EST）クローンを同定した。ウマIL-32 タンパク質配列（ジェンバンク受託番号CD469554及びBI961524）はヒト配列と最高の相同性（31.8%）を有しており、次いでウシ（ジェンバンク受託番号CK834339及びCK832489）、ヒツジ（ジェンバンク受託番号CO202364）及びブタ（ジェンバンク受託番号CB287292）の順であった。ヒト、ウマ及びウシIL-32 タンパク質配列のアラインメントを図4Bに示す。特に、ヒツジ及びブタのイソ型Aは同定されており、イソ型A及びBはウマで同定されており、イソ型B及びCはウシで同定されている。ウマIL-32 及びウシIL-32 の配列はそれぞれ2つのESTクローンから合わされ、オープンリーディングフレームは合わせた配列から推定された。

【実施例4】

【0127】

IL-32発現の分析

IL-32の各種ヒト組織における発現をノーザンブロットにより調べた。簡単に説明すると、IL-32 及びアクチンcDNAインサートをプラスミドベクターから適当な制限酵素を用いて切除し、サイズ分画し、GeneClean IIキット（カリフォルニア州カールスバッドに所在のQ-BIO gene）を用いて精製した。cDNAをクレノウ酵素（マサチューセッツ州ビバリーに所在のNew England Biolabs）を用いるランダムプライミングにより³²P-dCTP（マサチューセッツ州ボストンに所在のNEN Life Science）で標識した。各種組織からのヒトポリ（A）⁺RNAを含有する膜（ヒトMTNブロットII）をcDNAプローブとインキュベートし、その結合をオートラジオグラフィーにより検出した。図8Aに示すように、1.2kbのIL-32転写物が多くの組織で検出され、他の細胞タイプに比して免疫細胞において高レベルのIL-32が検出された。免疫組織におけるIL-32 mRNAの高い発現は、ブロットをアクチン断片で再プローブすることにより明らかなようにローディングの差に起因しなかった。

【0128】

内因性IL-32発現もタンパク質レベルで検出された。簡単に説明すると、A549-R細胞を6ウェルプレートに 10^6 細胞/mlで接種した。細胞がプレートに接着した後、F12K培地を除去し、無血清培地を入れた。数個のウェルでは、無血清培地はIL-18（50ng/ml）、IL-1（100ng/ml）またはLPS（500ng/ml）を含んでいた。48時間後、上清を収集し、Centricon濃縮装置で10倍に濃縮した。図8Bに示すように、内因性IL-32に対応する約30kDa種をアフィニティー精製した家兎抗ヒトIL-32 ポリクローナル抗体を用いるイムノブロットにより検出した。アミノ酸配列の分析から可能性あるN結合グリコシル化及びミリスチル化部位の存在が明らかとなったので、大腸菌由来のrIL-32と内因性IL-32間の分子量の差は内因性分子の翻訳後修飾によるものと考えられる。IL-32はIL-18（100ng/ml）、IL-1（100ng/ml）またはLPS（500ng/ml）で処理した細胞の細胞培地中に分泌されるが、非刺激細胞（対照）によっては分

泌されなかった。IL - 32はそのN末端に典型的な疎水性シグナルペプチドを持たないが、IL - 32は細胞培地中で分泌分子として検出された。IL - 18は、IL - 1 やLPSよりも高度にIL - 32発現を誘導した。60kDaバンドも観察され(データ示さず)、これはIL - 32の二量体化形態であると考えられる。モノマーと同様に、60kDaバンドは処理細胞の上清中で見られたが、非刺激細胞の上清には存在しなかった。

【0129】

Wish細胞は通常抗ウイルスアッセイのため及びIFNの他の生物学的活性を評価するために使用されているので、IFNで処理したヒト上皮Wish細胞におけるIL - 32の誘導も調べた。IL - 32産生の時間経過に関して、Wish細胞、A549 - WT細胞及びA549 - R細胞を6ウェルプレートに 5×10^4 細胞/ウェルで接種し、一晩インキュベートした後、IFN(100U/ml)、IL - 18(50ng/ml)またはIL - 1(10ng/ml)で刺激した。細胞培地中のIL - 32をイムノブロットにより検出するためにアフィニティー精製した家兎抗IL - 32を使用した。ブロットを増強化学ルミネッセンス(NEN Life Science)を用いて展開するためにペルオキシダーゼコンジュゲートした二次抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)を用いた。IL - 32を電気化学ルミネッセンス(ECL)により検出するために、アフィニティー精製した抗IL - 32抗体のアリコートを生オチンで標識し、別のアリコートを製造業者(メリーランド州ゲーズバーグに所在のIgen)の指示に従ってルテニウムで標識した。生オチン - 及びルテニウム - 標識抗体を用いて、組換えIL - 32を用いて標準曲線を作成した。液相ECL法を用いて、細胞培地及び血清サンプル中の各種サイトカインを調べた。電気化学ルミネッセンスの量はOrigen Analyzer(Igen)を用いて測定した。

【0130】

図9Aに示すように、IL - 32はヒト上皮細胞の細胞ライゼート中で時間依存的に誘導され、46時間後に漸減するが、IL - 32は未刺激細胞中では誘導されなかった。また、IL - 18及びIL - 1はA549 - R細胞のライゼート中での内因性IL - 32の発現を時間依存的に増加させた(図9B)が、IL - 32はA549 - WT細胞ではIL - 1によってしか誘導されなかった(図9C)。加えて、IFNもA549 - WT細胞のライゼート中でIL - 32を誘導することが観察された(データ示さず)。

【0131】

哺乳動物細胞においてIL - 32及びのcDNAから発現させた組換えタンパク質が内因性IL - 32と類似しているかどうかを調べるために、Cos7細胞にIL - 32及びcDNAを一時的にトランスフェクトした。図9D及び9Eに示すように、組換えIL - 32及びIL - 32はイムノブロットで調べると細胞培地及びトランスフェクト細胞のライゼートの両方中に存在していた。イムノブロットにおける組換え哺乳動物IL - 32の分子サイズは、図8Bに示す内因性IL - 32の分子サイズと同一であった。IL - 32は主に細胞結合しているIL - 32に比してより効率的に分泌されるようであるが、ECLアッセイは培地及びライゼート中のIL - 32及びIL - 32の類似分泌を示した。

【0132】

ポリクローナル抗ヒトIL - 32抗体を、アガロースビーズ(Affigel 15)に固定させたIL - 32を含有するカラムを用いてアフィニティー精製した。ペルオキシダーゼコンジュゲートした抗家兎免疫グロブリン二次抗体はJackson ImmunoResearchから入手した。抗ヒトIL - 32抗体は内因性IL - 32を特異的に認識するので、ヒト被験者(健康人及び敗血症患者)の血清中のIL - 32レベルをECLにより測定した。IL - 32は健康人の血清で検出された(42サンプル中5サンプル)が、IL - 32レベルは70pg/ml未満であった。対照的に、敗血症患者の血清中の平均IL - 32レベルは健康人からの血清より35倍高かった。本発明の開発中に初めて、IL - 32は細菌感染にตอบสนองして(直接または間接的に)産生される炎症誘発性サイトカインであることが分かった。加えて、IL - 32は活動型間接リウマチ患者で

検出された。このことから、IL-32が自己免疫においても役割を果たすことが示される。

【0133】

IL-32産生の調節を調べるために、IL-32を各種細胞系の細胞培地及びヒトPBMCにおいて調べた。IL-32はIL-18またはIL-1刺激後のA549-Rの培地中で検出されたが、対照培地では検出されなかった(図10A)。NK4(IL-32)遺伝子はIL-2活性化NK細胞から単離されたので、ヒトNK細胞系をIL-12+IL-18の組み合わせで刺激した。図10Bに示すように、NK細胞ではIL-12またはIL-18によりIL-32が有意に誘導され、これら2つのサイトカインの組み合わせの効果は相加的のようであった。対照的に、前記細胞系をIL-12またはIL-18により刺激するとIFNの誘導は全くまたは殆どなかったのに対して、IL-12+IL-18の組み合わせによるIFNの産生は非常に相乗的である(Kimら, J. Biol. Chem., 277:10998-11003(2002))。NK細胞を中和抗IFN抗体の存在下でIL-12及びIL-18で刺激することにより、(IFNを介する)IL-32の誘導を調べた。この組合せはIL-32誘導に効果はなかった(データ示さず)。ヒト末梢血単核細胞(PBMC)は主にT細胞を含み、単球及びB細胞は少数である。新たに調製したPBMCをLPSまたはConAで刺激し、上清及びライゼートを収集し、IL-32濃度についてアッセイした。60時間後、LPSで刺激したPBMCの上清またはライゼート中にIL-32は検出されなかった(データ示さず)。しかしながら、ConAは常にIL-32を誘導し、これが上清及びライゼート中で検出された。図10Cに示すように、ライゼートは上清よりもIL-32を多く含んでいた。

【実施例5】

【0134】

IL-32応答性シグナル伝達経路の同定

本実施例は、カップB(IBM)のシグナル伝達分子阻害剤及びp38マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)に対するサイトカインIL-32の効果を評価するために実施した実験の詳細を記載する。簡単に説明すると、マウスRAW264.7マクロファージ細胞を5µg/mlのポリミキシンB(オハイオ州ベッドフォードに所在のBedford Lab)の存在下でIL-32(50ng/ml)で指定時間(分)刺激した。細胞をキナーゼ溶解緩衝液(Hanら, J. Biol. Chem., 277:47167-47174(2002))で溶解した。細胞内容物を10% SDS-PAGEゲルで分離し、ニトロセルロース膜に移し、この膜はその後3% BSAでブロックした。膜を家兎抗IBMでプローブし、ヤギ抗アクチン(カリフォルニア州サンタクルーズに所在のSanta Cruz Biotechnology)で標準化した。図11Aに示すように、IL-32は時間依存的にIBM分解を誘導し、処理から15分後に始まり、45分で最高レベルに達し、90分後に回復した。

【0135】

膜を家兎抗ホスホ-p38 MAPKでプローブし、家兎抗p38 MAPK(マサチューセッツ州ビバリーに所在のCell Signaling)で標準化した。図10Bに示すように、ホスホ-p38 MAPKはIL-32による刺激から5分後に劇的に上昇し、その後15~30分間低下した。興味深いことに、p38 MAPKリン酸化の第2上昇は45分に見られ、その後よりゆっくり低下した。

【実施例6】

【0136】

IL-32結合タンパク質の同定

組換えIL-32(または、IL-32、IL-32及びIL-32)を大腸において発現させ、実施例2に記載されている3連続ステップを用いて精製する。精製IL-32(約5mg)をAffigel 15アガロースビーズ(カリフォルニア州ヘラクレスに所在のBio-Rad Laboratories)上に固定化する。いろ

いゝな可能性ある受容体源（例えば、ヒト血清、またはIL-32 に応答してTNFを分泌するRaw 264.7細胞のような細胞のライゼート）をIL-32 アフィニティーカラムにかける。IL-32 アフィニティーカラムを十分に洗浄し、その後IL-32 受容体を溶離緩衝液（例えば、50 mM クエン酸、100 mM NaCl, pH 2.5）で溶離する。直ちに、溶離フラクションを2 M トリス塩基で中和する。このようにして単離したIL-32 結合タンパク質を更に化学分析（例えば、エドマン分解によりペプチド配列分析及び/または質量分析）及びバイオアッセイ（例えば、精製または組換え受容体をRaw 264.7細胞によるIL-32 誘導TNF 分泌を阻止する能力について調べる）により特性づける。標準IL-32 結合タンパク質は（TNF BPで観察されたものと類似の）IL-32 生物学的活性を阻害する能力を有していると考えられる。標準IL-32 結合タンパク質の他のタイプは（IL-6 リガンド結合鎖で観察されたものと同様の）IL-32 生物学的活性を強化する能力をも有していると考えられる。

10

【実施例7】

【0137】

関節炎のマウスモデルにおけるIL-32 抗体及びIL-32 阻害剤の治療効果

本実施例は、マウスにおいてIL-32 抗体及びIL-32 アンタゴニスト（例えば、可溶性IL-32 受容体、ドミナントネガティブIL-32 バリエーション、小分子阻害剤等）のコーラーゲン誘発関節炎（CIA）を治療するための治療薬としての効果を評価するために実施した実験の詳細を記載する。簡単に説明すると、当業界で公知のように（Bandara, Arthritis Rheum., 46:3065 (2002)）、CIAを8~10週齢のDBA/1Jマウス（メーン州バーハーバーに所在のJackson Laboratories）においてII型ウシコーラーゲン（CII）を皮内注射することにより誘発させる。0日目及び21日目に、各マウスに不完全フロイントアジュバント中に200 µgのCII及び200 µgの不活化結核菌（ミシガン州デトロイトに所在のDifco）を含有する注射液（100 µl）を与える。マウスを21~42日の間3日毎にIP注射として与えた3つの治療、すなわち2 mg/マウスの正常家兎IgG；2 mg/マウスのHiTrap Protein G HP（スウェーデンのウプサラに所在のAmersham Pharmacia Biotech AB）を用いて作成した中和家兎抗IL-32；及び2 mg/マウスの組換えIL-32 アンタゴニスト（例えば、IL-32 受容体-IgG1 Fc融合タンパク質またはドミナントネガティブIL-32 バリエーション）の1つで治療する。42日目に、マウス（各群5匹と5匹の未処理マウス）を麻酔及び頸椎脱臼により屠殺する。

20

30

【0138】

CIAの臨床疾患活動度を21~42日の間1日おきにブラインド観察者により各肢を3点スケールを用いて評価した。0 = 関節は正常；1 = 僅かな炎症及び発赤；2 = 使用の妨げを伴い、肢全体に影響を及ぼすひどい紅斑及び腫張、及び3 = 強直、関節の硬直及び機能損失を伴い、肢または関節の変形。臨床疾患活動度の全スコアは四肢全てに基づいており、各動物の最大スコアは12である。屠殺後、42日目に両前肢及び右外肢を外科的に取り出し、当業界で公知のように（Bendele, Arthritis Rheum., 43:2648 (2000)）組織サンプルの作成及び組織学的分析のために10% 緩衝ホルマリリンに固定する。（治療に対してブラインドな）経験ある観察者は肢、足首及び膝の組織学的所見を採点する。データは0~5のスケールに基づいて炎症、パンス、軟膏損傷及び硬骨損傷について平均スコア及び全スコアとして表す。

40

【0139】

公開されている方法（Bandara, J. Immunol., 170:2100-2105 (2003)）を用いて、各種免疫パラメーターを測定した。前記パラメーターには、脾臓及びリンパ節細胞によるCII特異的増殖、抗コーラーゲン抗体の産生、脾臓細胞によるCII誘導サイトカイン分泌（例えば、TNF、IFN、IL-1、IL-1Ra及びIL-10 ELISAを用いる）及び関節における定常状態サイトカインmRNAレベル（例えば、TNF、IFN、IL-1、IL-1Ra、IL-6、IL

50

- 18、M I F、T N F、L T、T G F 1、T G F 2)が含まれるが、これらに限定されない。本発明の幾つかの好ましい実施態様は、臨床疾患活動度スコア及び関節損傷の組織学的スコアを少なくとも50% (より好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも90%) 低下させるI L - 32抗体またはI L - 32アンタゴニストを含む。他の好ましい実施態様は、C I I誘導リンパ球増殖及び/またはコラーゲン結合I g G抗体の血清レベルを少なくとも50% (より好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも90%) 低下させるI L - 32抗体またはI L - 32アンタゴニストを含む。特に好ましい実施態様は、単離関節中のT N F、I F N及び/またはI L - 1の定常状態m R N Aレベルを少なくとも50% (より好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも90%) 低下させるI L - 32抗体またはI L - 32アンタゴニストを含む。重要なことは、本明細書に記載されているI L - 32抗体またはI L - 32アンタゴニストを含む好ましい実施態様は、T N F反応性抗体(インフリキシマブ/ R E M I C A D E及びアダリムマブ/ H U M I A)及び可溶性T N F受容体/免疫グロブリン融合タンパク質(エタネルセプト/ E N B R E L)を投与するために使用される方法と同様の方法を用いてヒト関節リウマチ患者の治療に使用されることが考えられる。

【実施例8】

【0140】

組換えI L - 32の生物学的活性

I L - 32は大量のT N F及びM I P - 2を誘導し、図6Aに示すように両サイトカインの産生を用量依存的に増加させた。その後、I L - 32の生物学的活性を完全C末端を有するI L - 32の生物学的活性と比較した。I L - 32はマウスマクロファージR a w細胞系においてI L - 32と同等レベルのT N F及びM I P - 2を誘導した(図6B)。実験はすべてポリミキシンB(5 µg / ml)の存在下で実施したが、大腸菌で産生させた組換えタンパク質のエンドトキシン汚染の可能性は除外できなかった。

【0141】

エンドトキシン汚染を避けるために、組換えI L - 32を哺乳動物系でも産生させた。r I L - 32を哺乳動物細胞の3つの異なる源、すなわちA n j o u 65安定クローン、C o s 7安定クローン(C o s 7 - S)及びC o s 7一過性トランスフェクタント(C o s 7 - T)から産生させた。一過性及び安定なクローン化細胞を0.5% F C S中で4日間培養してから、収集した。哺乳動物r I L - 32の最大収率はたった1 ng / mlであり、I L - 32は100 pg / ml濃度以下であったので、エンドトキシンを含まない哺乳動物r I L - 32の各々を、精製中の微生物汚染を避けるためにアジ化ナトリウム(0.2%)の存在下でアガロースビーズ(A f f i - G e l H z, B i o - R a d)に抗I L - 32 m A bを固定化することにより作成したアフィニティーカラムを用いて精製した。精製したr I L - 32をペニシリン/ストربتマイシン(10 µg / ml)を含有するR P M Iに対して4で一晩透析した後、バイオアッセイのために使用した。3つの哺乳動物r I L - 32調製物はいずれもヒトP M A分化T H P - 1細胞及びマウスR a w細胞においてT N Fを誘導した(図6C)。大腸菌r I L - 32及び哺乳動物r I L - 32はP M A分化T H P - 1細胞において用量依存的にヒトT N F産物を増加させた(図6D)。更に、高単位の大腸菌r I L - 32及び哺乳動物A n j o u 65 r I L - 32 I L - 32調製物是非分化T H P - 1細胞においてヒトI L - 8を誘導したが、偽A n j o u 65トランスフェクタントは誘導しなかった(図6E)。

【実施例9】

【0142】

抗I L - 32モノクローナル抗体の中和F a b断片の作成

5週齢の雌B a l b / cマウスをフロイント完全アジュバント(S i g m a)中に乳化させたr I L - 32抗原(20 µg)を用いて免疫化した。14日目及び21日目に、マウスにフロイント完全アジュバント(S i g m a)中に乳化させた抗原を静脈内及び腹腔内注射した。3回注射した後、マウスを屠殺し、脾臓を無菌的に収集し、脾細胞を融合

のために得た。簡単に説明すると、 1×10^7 個の脾細胞及び 1×10^6 個の NS - 1 マウスミエローマ細胞 (ATCC) をポリエチレングリコール 1500 (インディアナ州インディアナポリスに所在の Roche Applied Science) を用いて融合した。融合細胞を 10% FCS 及び HAT を含むハイブリドーマ増殖培地において $1 \times 10^6 / \text{ml}$ で再懸濁させ、96 ウェルにおいて平板培養した。2 週間後、ハイブリドーマの培養上清を間接 ELISA で滴定した。モノクローナル抗体のクラス及びサブクラスは IMMUNO - TYPE マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット (カリフォルニア州サンジェゴに所在の BD Bioscience) を用いて製造業者の指示に従って決定した。

【0143】

約 5×10^6 細胞の 2 つのハイブリドーマ 32 - 4 (IgG₁) 及び 32 - 9 (IgG₁) を 8 週齢の雌 B a b / c マウスに腹腔内注射した。1 週間後、腹水を滅菌皮下注射針を用いて収集した。腹水上清由来の抗体をタンパク質 A セファロースカラム (Bio - Rad) を用いて精製し、0.1 M グリシン - HCl (pH 2.7) で溶離させた。溶離させた mAb を PBS で透析し、精製抗体を Centricon 濃縮装置 (YM - 50, ミシガン州アナーバーに所在の Life Science) を用いて濃縮した。精製抗体の濃度を 280 nm の吸光度を測定することにより求めた。

【0144】

rIL - 32 に対するアフィニティー精製モノクローナル抗体 (32 - 4) は高バックグラウンドレベルの mTNF を誘導したので、このモノクローナル抗体 (mAb) の Fab 断片を作成した。簡単に説明すると、精製抗 IL - 32 mAb (32 - 4) の Fab 断片は、37 で固定化ペプシン (イリノイ州ロックフォードに所在の PIERCE) と 4 時間インキュベートすることにより作成した。Fc 断片及び残存非切断 mAb をタンパク質 G セファロース (スウェーデンのウブサラに所在の Amersham Bioscience) を用いて除去した。Fab 断片を PBS に対して 4 で一晩透析し、切断が完全であることを確認するために SDS - PAGE にかけた。Fc 断片を除去後バックグラウンドレベルは劇的に低下し、抗 rIL - 32 mAb の IL - 32 中和活性が評価できた。図 7 A に示すように、32 - 4 mAb の Fab (50 ng / ml) は大腸菌 rIL - 32 の生物学的活性を 70% 以上阻害した。図 7 B に示すように、同一 Fab はアフィニティー精製した Cos7 - S rIL - 32 の生物学的活性を 65% 以上阻害する。高濃度の Fab 断片はこれらのアッセイでは IL - 32 誘導 TNF 産生を更に阻害しなかった。

【実施例 10】

【0145】

炎症性腸疾患のマウスモデルにおける IL - 32 抗体及び IL - 32 阻害剤の治療効果
本実施例は、マウスにおいてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎を治療するための治療薬としての IL - 32 抗体及び IL - 32 アンタゴニスト (例えば、可溶性 IL - 32 受容体、ドミナントネガティブ IL - 32 バリエーション、小分子阻害剤等) の効果を評価するために実施した実験の詳細を説明する。

【0146】

簡単に説明すると、当業界で公知のように (Sivakumar ら, Gut, 50: 812 - 820 (2002))、8 ~ 10 週齢の雌 C57BL / 6 マウス (Taconic Laboratories) において 0 ~ 7 日目まで飲料水中 2% (wt / vol) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS, 分子量 40,000, ICN Biochemicals 製) を自由に与え、その後通常の水に戻すことにより大腸炎を誘発させる。0 日目から毎日マウスの体重を測定し、13 日目まで体重変化を記録する。各マウスの体重変化は次のように計算する: 体重変化% = (特定日の体重 - 0 日目の体重) / 0 日目の体重 \times 100。マウス群は、それぞれ 1 回の注射用量を 200 μ l (エンドトキシン非含有 PBS) として、対照タンパク質 (50 μ g または 500 μ g)、マウス抗 IL - 32 mAb (50 μ g または 500 μ g) 及び組換え IL - 32 アンタゴニスト (例えば IL - 3

10

20

30

40

50

2 受容体 - I g G 1 F c 融合タンパク質またはドミナントネガティブ I L - 3 2 バリエーション, 5 0 μ g または 5 0 0 μ g) で治療する。マウスに 0 ~ 7 日間 I P 注射する。D S S 治療開始から 0、2、4、6 または 8 日目にマウスを麻酔及び頸部脱臼により屠殺し、当業界で公知の方法により R N A 抽出、組織病理検査及びサイトカイン分析するために組織 (例えば、大腸、リンパ節) を取り出し、処理する。I L - 3 2 アンタゴニストの投与はマウスにおいて D S S 誘発大腸炎の炎症を緩和するのに適しており、中和 I L - 3 2 活性は腸疾患に関連する炎症を緩和するのに有効であると考えられる。

【実施例 1 1】

【0 1 4 7】

肝炎のマウスモデルにおける I L - 3 2 抗体及び I L - 3 2 阻害剤の治療効果

本実施例は、熱死滅させた座瘡プロピオニバクテリウム (P . a c n e s) でプライミングしたマウス (F a s / F a s L 媒介肝疾患のモデル) において L P S 誘発肝障害を治療するための治療薬としての I L - 3 2 抗体及び I L - 3 2 アンタゴニスト (例えば、可溶性 I L - 3 2 受容体、ドミナントネガティブ I L - 3 2 バリエーション、小分子阻害剤等) の効果を評価するために実施した実験の詳細を説明する。

【0 1 4 8】

簡単に説明すると、肝炎を 8 ~ 1 0 週齢の雌 B A L B / c マウス (C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s) において 5 0 0 μ g / マウスの熱死滅させた P . a c n e s (R i b i I m m u n o - C h e m R e s e a r c h) を I V 投与することにより誘発させ、12 日後当業界で公知のように (F a g g i o n i ら, J . I m m u n o l . , 1 6 7 : 5 9 1 3 - 5 9 2 0 (2 0 0 1)) 5 0 μ g / k g の L P C で I V 攻撃する。マウス群は、それぞれ 1 回の注射用量を 2 0 0 μ l (エンドトキシン非含有 P B S) として、対照タンパク質 (5 0 μ g または 5 0 0 μ g)、マウス抗 I L - 3 2 m A b (5 0 μ g または 5 0 0 μ g) 及び組換え I L - 3 2 アンタゴニスト (例えば、I L - 3 2 受容体 - I g G 1 F c 融合タンパク質またはドミナントネガティブ I L - 3 2 バリエーション, 5 0 μ g または 5 0 0 μ g) で治療する。P . a c n e s の投与時または L P S 攻撃の 1 0 分前にマウスに I P 注射する。マウスは生存についてモニターするか、または組織学的検査、m R N A 及びケモカイン測定のために肝臓、当業界で公知の方法を用いる血清 I F N 及びトランスアミナーゼ測定のために血液を集めるために屠殺する。I L - 3 2 アンタゴニストの投与は、P . a c n e s プライミングしたマウスを L P S 攻撃する 1 0 分前に投与したとき L P S 誘発肝障害及び I F N 及び F a s リガンド発現を防止するのに適していると考えられる。加えて、I L - 3 2 アンタゴニストの投与は P . a c n e s のプライミング時に与えたとき P . a c n e s 誘発肉芽腫形成、マクロファージ炎症性タンパク質 1 及びマクロファージ炎症性タンパク質 2 産生を低下させるのに適していると考えられる。よって、H C V 誘発肝炎、自己免疫性肝炎及び原発性胆汁性肝硬変のような肝疾患の患者は I L - 3 2 アンタゴニストを含む臨床レジメンの恩恵を受けるであろうと考えられる。

【実施例 1 2】

【0 1 4 9】

虚血性疾患のマウスモデルにおける I L - 3 2 抗体及び I L - 3 2 阻害剤の治療効果

本実施例は、虚血性損傷にตอบสนองして組織血管新生を刺激するための治療薬としての I L - 3 2 抗体及び I L - 3 2 アンタゴニスト (例えば、可溶性 I L - 3 2 受容体、ドミナントネガティブ I L - 3 2 バリエーション、小分子阻害剤等) の効果を評価するために実施した実験の詳細を説明する。

【0 1 5 0】

簡単に説明すると、雄 C 5 7 B L / 6 J マウスは、当業界で公知の方法 (M a l l a t ら, C i r c . R e s . , 9 1 : 4 4 1 - 4 4 8 (2 0 0 2)) を用いて片側後肢に虚血を誘発するための手術を受ける。イソフルラン吸入により動物を麻酔する。伏在動脈と膝窩動脈の分岐から 0 . 5 c m の範囲の右大腿動脈を結さつし、通常の条件下で 3 日間または 2 8 日間収容する。マウス群は、それぞれ 1 回の注射用量を 2 0 0 μ l (エンドトキシ

10

20

30

40

50

ン非含有PBS)として、対照タンパク質(50 µgまたは500 µg)、マウス抗IL-32 mAb(50 µgまたは500 µg)及び組換えIL-32アンタゴニスト(例えば、IL-32受容体-IgG1Fc融合タンパク質またはドミナントネガティブIL-32バリエーション、50 µgまたは500 µg)で治療した。マウスには0日目及び7日目にIP注射する。血管形成の程度を3日目及び10日目に細血管造影法により血管密度を測定することにより定量し、血管新生における虚血誘発変化はレーザードップラー灌流イメージングによりモニターする。IL-32アンタゴニストの投与が虚血性損傷にตอบสนองして組織血管新生を刺激するのに適していると考えられる。

【0151】

本明細書に挙げられている刊行物及び特許文献はすべて参照により本明細書に含まれるとする。発明の範囲及び趣旨を逸脱することなく本明細書に記載されている本発明の方法及び系をいろいろに修飾及び変更することは当業者に自明である。本発明を特に好ましい実施態様に関連して説明してきたが、本発明はこれらの特定実施態様に不当に限定されるべきではないと理解すべきである。実際、分子生物学、遺伝学、免疫学または関連分野の当業者に自明である本発明を実施するための本明細書に記載のモードの各種修飾が本発明の範囲内であると解される。

【図面の簡単な説明】

【0152】

【図1】ヒトA549肺癌細胞における機能性IL-18R鎖の発現及び活性を示す。パネルAは、トランスフェクトA549細胞及び野生型A549細胞におけるIL-18R発現のRT-PCR分析の結果を示す。パネルB及びCはそれぞれ、野生型及びトランスフェクトA549細胞におけるIL-18(50 ng/ml)刺激に応答した16時間後のIL-6及びIL-8分泌を示すグラフ(N=7)である。パネルDは、IL-18の存在下及び非存在下でのトランスフェクト細胞におけるNK4(IL-32)RNA発現の誘導を示す。

【図2】マウスRaw264.7マクロファージ細胞をポリミキシンBの存在下で組換えIL-32(TAIF)で処理したときのTNF発現の誘導をグラフで示す。パネルAは、イオン交換クロマトグラフィー分画中の組換えIL-32のレベルが処理細胞が分泌したTNFのレベルと相関していたことを示している。各イオン交換クロマトグラフィー分画は10% SDS-PAGEし、クーマシーブルー染色した後に示されている。パネルBは、細菌において発現させた組換えIL-32は用量依存的にTNF発現を誘導したことを示している。パネルCは、哺乳動物細胞において発現させた組換えIL-32もTNFの発現を誘導したことを示している。組換えIL-32の量はイムノプロットにより推定した。

【図3A】4つのIL-32スプライスバリエーション(IL-32は配列番号3として; IL-32は配列番号4として; IL-32は配列番号5として; IL-32は配列番号6として開示されている)のオープンリーディングフレームのDNA配列のアラインメントを示す。アラインメントをEMBNETのSwissノードのウェブサイト上で入手可能なClustalWプログラムを用いて実施し、手動で補正した。Myr及びGlyはそれぞれ可能性あるN-ミリスチル化またはN-グリコシル化部位を示す。

【図3B】4つのIL-32スプライスバリエーション(IL-32は配列番号3として; IL-32は配列番号4として; IL-32は配列番号5として; IL-32は配列番号6として開示されている)のオープンリーディングフレームのDNA配列のアラインメントを示す。アラインメントをEMBNETのSwissノードのウェブサイト上で入手可能なClustalWプログラムを用いて実施し、手動で補正した。Myr及びGlyはそれぞれ可能性あるN-ミリスチル化またはN-グリコシル化部位を示す。

【図4】パネルAには、4つのヒトIL-32スプライスバリエーション(IL-32は配列番号7として; IL-32は配列番号8として; IL-32は配列番号9として; IL-32を配列番号10として開示されている)のアラインメント及び幾つかの哺乳動物種からのIL-32タンパク質配列(ヒト配列は配列番号8として; ウマ配列は配

10

20

30

40

50

列番号 16 として；ウシ配列は配列番号 17 として開示されている）のアラインメントを示す。アラインメントを EMBnet の Swiss ノードのウェブサイト上で入手可能なプログラムを用いて実施し、手動で補正した。

【図 5】染色体 16 p 13.3 上のヒト IL-32 遺伝子の構造を示す。エキソンは点刻ボックスで示されている。IL-32 遺伝子の図の上及び下の数字は 8 個のエキソンを表し、この 5 kb ゲノム断片の配列は配列番号 11 として本明細書中に示す。4 つの IL-32 バリエーション（ 、 、 及び ）のスプライシングも示す。

【図 6】rIL-32 がマクロファージ細胞（Raw）及び単球（THP-1）において炎症誘発性サイトカインを誘導することを示している。パネル A は、大腸菌で産生した rIL-32 は用量依存的に MIP-2 及び TNF の両方の分泌を誘導することを示している。IL-32 濃度を x 軸に単位 / ml で示す。パネル B は、IL-32（10 U / ml）及び IL-32（10 U / ml）バリエーションはマウス Raw 264.7 マクロファージ細胞を活性化することを示している。パネル C は、IL-32 の各種ソースにより誘導されたヒト及びマウス TNF のグラフである。Raw 細胞及び PMA 分化 THP-1 細胞を 1 U / ml の Anjou 65 及び Cos-7 S、または 2 U / ml の Cos-7-T で処理した。大腸菌中で産生した IL-32 及び哺乳動物細胞中で産生した IL-32 は PMA 分化 THP-1 細胞において用量依存的に TNF 発現を誘導した。パネル E は、高濃度の大腸菌 rIL-32（20 U / ml）または哺乳動物 rIL-32（Anjou 65, 10 U / ml）は未分化 THP-1 細胞において IL-8 分泌を誘導することを示している。

【図 7】大腸菌 rIL-32 及び哺乳動物 rIL-32 活性が抗 IL-32 Fab（32-4）処理により中和されることを示している（3 つの別々の実験の平均値 ± SEM）。パネル A は、大腸菌 rIL-32（3 U / ml）及び抗 IL-32 Fab の存在下で培養したマウス Raw 細胞による TNF 分泌の用量依存的減少を示している。パネル B は、哺乳動物（Cos-7-S）rIL-32（2 U / ml）誘導 mTNF 分泌が抗 IL-32 Fab（40 ng / ml）により抑制されたことを示している。

【図 8】mRNA 6 レベル及びタンパク質レベルでの IL-32 の内因性発現を示す。パネル A は、ノーザンブロットにより測定した各種ヒト組織における IL-32 mRNA の発現を示す。左側の数字は mRNA のサイズを示す。パネル B は、可溶性 IL-32 がウェスタンブロットにより測定して細胞培養上清中に存在していることを示している。安定な A549-R クローンを IL-18（50 ng / ml）または IL-1（10 ng / ml）の存在下、図示するように FCS の非存在下で 48 時間刺激した。上清を収集し、アフィニティー精製抗 IL-32 抗体でプローブした。

【図 9】細胞ライゼートにおける IL-32 の検出を示す。IFN（100 U / ml）、IL-18（50 ng / ml）または IL-1（10 ng / ml）で刺激したときの Wish 細胞（パネル A）、A549-R 細胞（パネル B）及び A549-WT 細胞（パネル C）による IL-32 産生を示す。データは 4 つの独立した実験の 1 つを示す。Cos-7 細胞を IL-32 及び IL-32 cDNA で一過性トランスフェクトしたときの IL-32 発現をイムノブロットにより細胞培養上清（パネル D）及び細胞ライゼート（パネル E）において検出した。パネル F は、ECL により測定した上清及びライゼート中の IL-32 濃度の比較を示す。データは 5 つの別々の実験の平均値 ± SEM を示す。

【図 10】内因性 IL-32 の電気化学ルミネッセンス（ECL）による測定を示す。パネル A では、図 9 B においてイムノブロットのために用いた同一サンプル中で ECL アッセイにより IL-32 が検出された。パネル B では、IL-12、IL-18 または IL-12 + IL-18 で処理した後のヒト NK 細胞系の上清中で IL-32 が検出された。データは 4 つの別々の実験の平均値 ± SEM を示す。パネル C では、ConA 誘導 IL-32 がヒト PBMC の上清及びライゼートの両方で検出された（N = 7）。

【図 11】マウス Raw 264.7 マクロファージ細胞を IL-32（20 U / ml）で処理後の IL-32 誘導 I B 分解（パネル A）及び p38 MAPK リン酸化（パ

10

20

30

40

50

ネル B) を示す。正規化目的で、膜をヤギ抗アクチンまたは家兎抗 p 3 8 M A P K でブロープした。

【図 1 2】パネル A 及び C にはそれぞれウマ I L - 3 2 のアミノ酸配列 (配列番号 1 8) 及びウマ I L - 3 2 のアミノ酸配列 (配列番号 1 6) を示し、パネル B 及び D にはそれぞれウマ I L - 3 2 の c D N A 配列 (配列番号 1 9) 及びウマ I L - 3 2 の c D N A 配列 (配列番号 2 0) を示す。

【図 1 3】パネル A 及び C にはそれぞれウシ I L - 3 2 のアミノ酸配列 (配列番号 1 7) 及びウシ I L - 3 2 のアミノ酸配列 (配列番号 2 2) を示し、パネル B 及び D にはそれぞれウマ I L - 3 2 の c D N A 配列 (配列番号 2 1) 及びウシ I L - 3 2 の c D N A 配列 (配列番号 2 3) を示す。

【図 1 4】パネル A 及び B にはそれぞれヒツジ I L - 3 2 のアミノ酸配列 (配列番号 2 4) 及び c D N A 配列 (配列番号 2 5) を示す。パネル C 及び D にはそれぞれブタ I L - 3 2 のアミノ酸配列 (配列番号 2 6) 及び c D N A 配列 (配列番号 2 7) を示す。

10

【図 1】

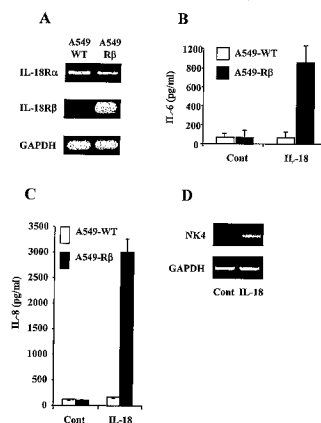


Fig. 1

【図 2】

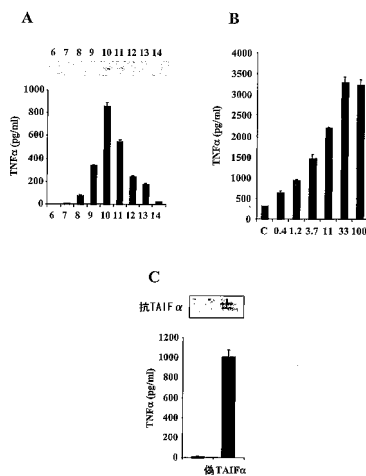


Fig. 2

【図 3 A】

```

IL-32α  ATGTGCTTCCCGAAGTCTCTCTGATGACATGAAAGAGCTGAAAGGCCGGAATG-----
IL-32β  ATGTGCTTCCCGAAGTCTCTCTGATGACATGAAAGAGCTGAAAGGCCGGAATG-----
IL-32γ  ATGTGCTTCCCGAAGTCTCTCTGATGACATGAAAGAGCTGAAAGGCCGGAATG-----
IL-32δ  -----ATGAAAGAGCTGAAAGGCCGGAATG-----

IL-32α  -----
IL-32β  -----
IL-32γ  CTGCTCTCTTCTCTCTCTGAGGCTTGGGAGCCTGGGCTCTGAGCTGTGACACTGAGGAC
IL-32δ  -----

IL-32α  -----
IL-32β  ACTGTGAGACACTGAGGACTGAGAGGCAAGAGATCCGCGCCTTTGCTGCAACTCTTCC
IL-32γ  -----
IL-32δ  -----

IL-32α  -----CACGAGCTATGAGAGAGTTTATGATATAAATGCAAAATGAGAGATCA
IL-32β  -----CACGAGCTATGAGAGAGTTTATGATATAAATGCAAAATGAGAGATCA
IL-32γ  CTCTCTCTGAGGACCGAGGCTCTGAGAGAGTTTATGATATAAATGCAAAATGAGAGATCA
IL-32δ  -----CACGAGGCTATGAGAGAGTTTATGATATAAATGCAAAATGAGAGATCA

IL-32α  GGAAGCTGAGAGAGTGTGAGAGCTTGGAGAGCTGAGAGAGCTTCAAGAGAGGCTAC
IL-32β  GGAAGCTGAGAGAGTGTGAGAGCTTGGAGAGCTGAGAGAGCTTCAAGAGAGGCTAC
IL-32γ  GGAAGCTGAGAGAGTGTGAGAGCTTGGAGAGCTGAGAGAGCTTCAAGAGAGGCTAC
IL-32δ  GGAAGCTGAGAGAGTGTGAGAGCTTGGAGAGCTGAGAGAGCTTCAAGAGAGGCTAC

IL-32α  CTGAGAGAGAGTGGGCTTATTTATGAGAGAGAGAGAGAGCTTCACTCTCTACTTGAA
IL-32β  CTGAGAGAGAGTGGGCTTATTTATGAGAGAGAGAGAGAGCTTCACTCTCTACTTGAA
IL-32γ  CTGAGAGAGAGTGGGCTTATTTATGAGAGAGAGAGAGAGCTTCACTCTCTACTTGAA
IL-32δ  CTGAGAGAGAGTGGGCTTATTTATGAGAGAGAGAGAGAGCTTCACTCTCTACTTGAA

```

Fig. 3A

【図 3 B】

```

IL-32α  AAAAGAAAGATGAGTTACGCTGCGGAGGCAACAGATCCCTGTCCCGATGTTGAGGAT
IL-32β  AAAAGAAAGATGAGTTACGCTGCGGAGGCAACAGATCCCTGTCCCGATGTTGAGGAT
IL-32γ  AAAAGAAAGATGAGTTACGCTGCGGAGGCAACAGATCCCTGTCCCGATGTTGAGGAT
IL-32δ  AAAAGAAAGATGAGTTACGCTGCGGAGGCAACAGATCCCTGTCCCGATGTTGAGGAT

IL-32α  CCGCAACCGAGAGCTTGGGAGAGCTTTTGTGACAG
IL-32β  CCGCAACCGAGAGCTTGGGAGAGCTTTTGTGACAG
IL-32γ  CCGCAACCGAGAGCTTGGGAGAGCTTTTGTGACAG
IL-32δ  CCGCAACCGAGAGCTTGGGAGAGCTTTTGTGACAG

IL-32α  ATGCTGAGAGGCTGACAGCTGTGAGAGAGGCTTCTGAGCTGAGTGAAGAGAGAGT
IL-32β  ATGCTGAGAGGCTGACAGCTGTGAGAGAGGCTTCTGAGCTGAGTGAAGAGAGAGT
IL-32γ  ATGCTGAGAGGCTGACAGCTGTGAGAGAGGCTTCTGAGCTGAGTGAAGAGAGAGT
IL-32δ  ATGCTGAGAGGCTGACAGCTGTGAGAGAGGCTTCTGAGCTGAGTGAAGAGAGAGT

IL-32α  -----TCCTAGAGAGGCTTGGGAGAGAG
IL-32β  CTGCTGAGAGCTTCTGAGTGTGCTTTCTGAGCTGAGAGAGGCTTGGGAGAGAG
IL-32γ  CTGCTGAGAGCTTCTGAGTGTGCTTTCTGAGCTGAGAGAGGCTTGGGAGAGAG
IL-32δ  CTGCTGAGAGCTTCTGAGTGTGCTTTCTGAGCTGAGAGAGGCTTGGGAGAGAG

IL-32α  GAGCTGACAGGCTTCTGAGTGTGCTTTCTGAGCTGAGAGAGGCTTGGGAGAGAG
IL-32β  GAGCTGACAGGCTTCTGAGTGTGCTTTCTGAGCTGAGAGAGGCTTGGGAGAGAG
IL-32γ  GAGCTGACAGGCTTCTGAGTGTGCTTTCTGAGCTGAGAGAGGCTTGGGAGAGAG
IL-32δ  GAGCTGACAGGCTTCTGAGTGTGCTTTCTGAGCTGAGAGAGGCTTGGGAGAGAG

```

Fig. 3B

【図 4】

A

```

1 Myr
IL-32α  MCFPKVLSIDMKKLLKARM-----
IL-32β  MCFPKVLSIDMKKLLKARM-----
IL-32γ  MCFPKVLSIDMKKLLKARM-----
IL-32δ  -----MKKLLKARM-----

61 Myr
IL-32α  ---HQAIFRYDQKQASGRGQVMSLAELEDFKEGYLETVAAYYEQHPRLTFLLE
IL-32β  ---HQAIFRYDQKQASGRGQVMSLAELEDFKEGYLETVAAYYEQHPRLTFLLE
IL-32γ  LSSQAIFRYDQKQASGRGQVMSLAELEDFKEGYLETVAAYYEQHPRLTFLLE
IL-32δ  ---HQAIFRYDQKQASGRGQVMSLAELEDFKEGYLETVAAYYEQHPRLTFLLE

121 Gly
IL-32α  KERDGLRCRGNRPVVEDPATEEPQSPCKV-----
IL-32β  KERDGLRCRGNRPVVEDPATEEPQSPCKV-----
IL-32γ  KERDGLRCRGNRPVVEDPATEEPQSPCKV-----
IL-32δ  KERDGLRCRGNRPVVEDPATEEPQSPCKV-----

181 Myr
IL-32α  ---SYGAPRGDKBELTFPQKSEFPQSK
IL-32β  VALVAVQALWKQPSFCCSLSELFMSFSQSYGAPRGDKBELTFPQKSEFPQSK
IL-32γ  VALVAVQALWKQPSFCCSLSELFMSFSQSYGAPRGDKBELTFPQKSEFPQSK
IL-32δ  VALVAVQALWKQPSFCCSLSELFMSFSQSYGAPRGDKBELTFPQKSEFPQSK

```

B

```

1
huIL-32β  MCFPKVLSIDMKKLLKARMQAIFRYDQKQASGRGQVMSLAELEDFKEGYLETVA
EgIL-32  MCFPKVLSIDMKKLLKARMQAIFRYDQKQASGRGQVMSLAELEDFKEGYLETVA
BoIL-32  MCFPKVLSIDMKKLLKARMQAIFRYDQKQASGRGQVMSLAELEDFKEGYLETVA
*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*

61
huIL-32β  YVERQMPBELTFLLEKERDGLRCRGNRPV---PVEDP---ATH---EPQSPCKVNR
EgIL-32  HMQKNSSEAPLLPDVIFRLKRAQKSVLNPEEPQGLQVLAERAPERPSPVRAKR
BoIL-32  HQBELPES---LQSSPL---LQARQVRRIRQPSV---SARLEVNPRESI---KA
*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*

121
huIL-32β  IFQMLQR---L---QVWNGVLAWEKVVV---LVAVQALWKQPS---FCCSLSELF
EgIL-32  IFQMLQR---L---QVWNGVLAWEKVVV---LVAVQALWKQPS---FCCSLSELF
BoIL-32  RALGRFQVIL---QSLQRC---MDALVLRKAVTFLEALCVVKAIVGLVTFQSVQOLF
*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*

181
huIL-32β  MSSP---QSYGAPRGDKBELTFPQKSEFPQSK
EgIL-32  RVH---IQV-----
BoIL-32  -----
*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*

```

Fig. 4

【図 5】

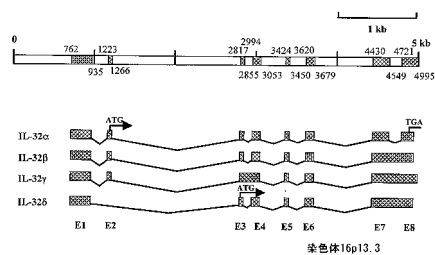


Fig. 5

【図 6】

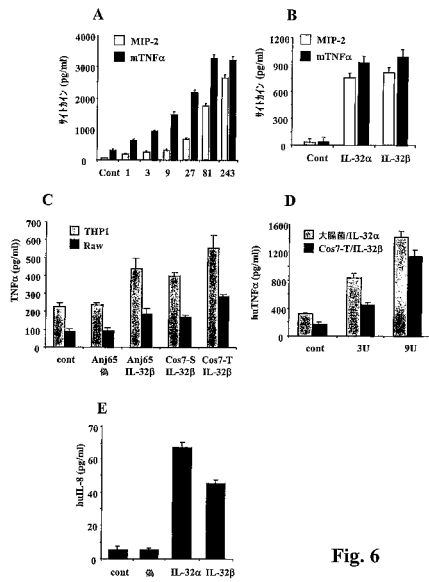


Fig. 6

【図 7】

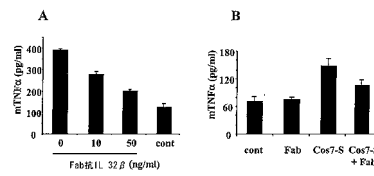


Fig. 7

【図 8】

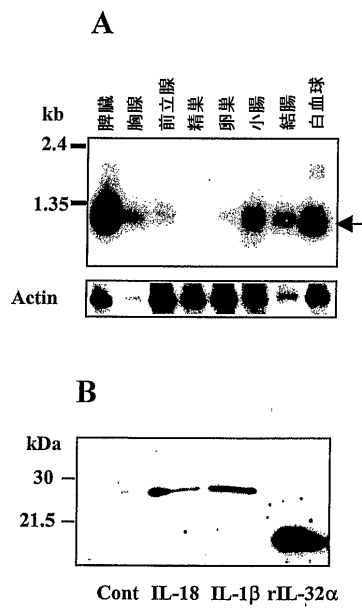


Fig. 8

【図 9】

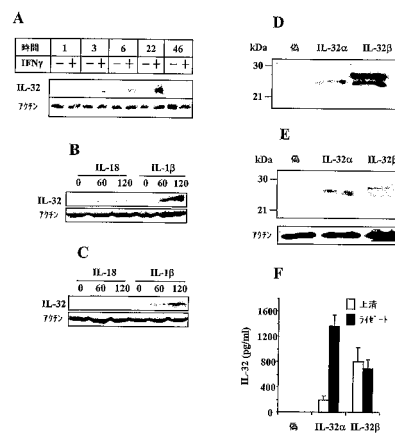


Fig. 9

Fig. 10

Fig. 11

[illegible]

Fig. 12

[illegible]

Fig. 13

【図 14】

A
OvIL-32 α (配列番号24)
 MCFARGVPHDQASLBSMLATWVDHVCDKMONREFEAQMEALAMSEBELSKDVCEWKITFFKRTFPNPCR
 SPVPCFRKRKSKYAAESRD PQSLPVWRTAIRKRAAGFPFCGGSEVPFCUVSGSGVAMY

B
OvIL-32 α (配列番号25)
 CTGCGGTACCGGTCCGGATTCCCGGGGAGACAGTGCTCAGCTGAGGCTCTGGCTGCAGGATCTCAGATC
 CCAGCCGGAGGACCTAATCCACCATGTGCTTCGCTAGGGGAGTCCACATGACCAGGCTTCTCTGAGGA
 GCATGCTGCACACCTGGGTGATCATGCTCTGTATAGATGGGAAATGAACAGAGAAGCACAGATGGA
 GGARCCCTTAGCAGAGATGGAGAGAACTGACCAAGGATGCTGTGAATCATGGAAGATCAATTCAG
 AGAACCTTCCGAACTCTTGCGAGGATCCAGTCTTCTGCTTCGGAAGCTCAGCAGAAATACCCCGAG
 AATCCAGAGACCTCAGTCTCTGCTGTCTGAGGACAGAAACCGGAAGAGAGCATCTGGGCCAGAGCC
 CTGCGCGGTTCCGAGGTTTTCTGCGAGTCTCTGGCAGCGGTGTGCGATGTACTGAOCTGCTGCAAG
 AGAAGGAGACGCTGCTGAGAGCCTCTGAGTGCGGTGAAGACATCTGGGGAGTGCTGACGSAITTT
 CTGCTCCTGTGTGGGCGACTCTTGAAGAACTCATCCAGGCTTAGAGACCCAGGTGCTTTGAGGAA
 CTGCTCCTCATCTAGAGAGCCTTCAACATCCCTTCCAGAAACCATCTCTGAGAGGACCTTTACCTC
 CTTGTTCACTTCAAGAACTCTTAACTGCGCTCACCTCCTGTCTGAGGAGACACACCAACATCAA
 GCGAGGTTCCCTTCTCCAGTCTGACCGTCTGTCAAGGA

C
SwIL-32 α (配列番号26)
 MRGVSKRTLPKAGQPRRGLGLPLFRVPEPPPIPAESSELLNVEVQVSEVBRPPGHNPYALAVR
 EPRQSTFRRLILFBEMLKRLQQRWBGALAWQERAAACFEGLCRALEAPWSLVQSFCSMGAPOGVIO
 V

D
SwIL-32 α (配列番号27)
 ATGACTTGGAGGAACTGAGCCGCCAGGCCAGACCCCTGGAJAAAGTCTCGGGTCTGTGSSGCTGTG
 GCAGGAAAGCAGCTGTGCTCAGAGCGGGCATGAGGGGGTGTCTGCGACCGAGACTCTCCCAAGGA
 GGGCTCAGCCAGGTCAAGACTGGAGCTGCTCTCCAGCGGGTCCCTGAACACACCCCATCCCTG
 CAGAATCCAGTCTCTGCTCAACGAACTCCGGCAGGAGTCCGTTCTAGATCCGAAGGCTCTCTGGCA
 CAACAGCCACATATATGAGCTAGGAGTCCGGGAGGCCAGGACAGGCACTTCAGAGCGATCTTGAGCTG
 TTGAGGAATGTTGAGGCTCTCAGCAGAGTGGAGGCTGCTGCTGGCTTGGTGCAGGAAGAGCTG
 CTGCTGCTTCCGGGCTGTGACAGGCTTTGAAGCTTCTGGAGCTGGTGCAGGTTTGTCTCTC
 CATGGGACAGGCTTCGGAGTGTCATCCAGGCTTAAGGTGCTCCAGGTGAATAGAGTTTCTAGAGCA
 CAACCTCCCTGCTTGGCTAAAGGCGAGCTGTAGGCTTT

Fig. 14

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K	14/54	
C 0 7 K	16/24	(2006.01)	C 0 7 K	16/24	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	

(72)発明者 デイナレロ, チャールズ・エイ

アメリカ合衆国、コロラド・8 0 3 0 2、ボールダー、ファイフティーンズ・ストリート・3 3 3

(72)発明者 アザム, タニア

アメリカ合衆国、コロラド・8 0 2 3 1、デンバー、イースト・ガニソン・プレイス・7 6 8 5

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 Genome Biology, 2002, Vol.3, No.7, research0035.1-0035.17

"Homo sapiens natural killer cell transcript 4, mRNA (cDNA clone MGC:32101 IMAGE:4873608), complete cds. ", Accession No. BC018782, BC018782.1, [online], National Center for Biotechnology Information, 2003年10月6日掲載, 2009年10月27日検索, インターネット, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?17511867:OLD04:661808>,
Journal of Immunology, 1992, Vol.148, pp.597-603
Science, September 2003, Vol.301, pp.1895-1898

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

PubMed