

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4211966号
(P4211966)

(45) 発行日 平成21年1月21日 (2009. 1. 21)

(24) 登録日 平成20年11月7日 (2008. 11. 7)

(51) Int. Cl.

F I

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

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

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 3/10 (2006. 01)

A 6 1 P 3/10

請求項の数 32 (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-542530 (P2001-542530)
 (86) (22) 出願日 平成12年11月10日 (2000. 11. 10)
 (65) 公表番号 特表2003-530082 (P2003-530082A)
 (43) 公表日 平成15年10月14日 (2003. 10. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/030873
 (87) 国際公開番号 W02001/040465
 (87) 国際公開日 平成13年6月7日 (2001. 6. 7)
 審査請求日 平成14年5月31日 (2002. 5. 31)
 (31) 優先権主張番号 PCT/US99/28313
 (32) 優先日 平成11年11月30日 (1999. 11. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/170, 262
 (32) 優先日 平成11年12月9日 (1999. 12. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義敦
 (72) 発明者 フォン, シャーマン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
 02, アラ メダ, ベイシンサイド
 ウェイ 19

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫関連疾患を治療するための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物において炎症反応を誘発させるための組成物であって、配列番号：14に示したアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有し、かつ炎症反応誘発作用を持つポリペプチドと担体又は賦形剤を含んでなることを特徴とする医薬組成物。

【請求項 2】

哺乳動物においてウイルス感染、細菌感染、真菌感染、原生動物感染、寄生虫感染のような感染症、免疫欠損疾患及び癌を治療するための医薬組成物であって、配列番号：14に示したアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有し、かつ炎症反応誘発作用を持つポリペプチドの有効量と担体又は賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、ATCC受託番号PTA-1093で1999年11月22日に寄託されたDNA108700-2802の全長コード配列によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、

(a) 配列番号：14に示され、その関連シグナルペプチドを欠くポリペプチド；

(b) 配列番号：14に示され、その関連シグナルペプチドを伴うポリペプチドの細胞外ドメイン；又は

(c)配列番号：14に示され、その関連シグナルペプチドを欠くポリペプチドの細胞外ドメイン；

と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項5】

配列番号：14に示したアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有し、かつ炎症反応誘発作用を持つポリペプチドの存在を測定する方法であって、該ポリペプチドを含有すると推測される細胞を、該ポリペプチドに対する抗体に暴露し、抗体の細胞への結合を測定することを含んでなる方法。

【請求項6】

配列番号：14に示したアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有し、かつ炎症反応誘発作用を持つポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを測定する方法であって、ある哺乳動物から得た組織細胞の試験試料中における該核酸の発現レベルを同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中における該核酸の発現レベルと比較することを含んでなる方法。

【請求項7】

配列番号：14に示したアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有し、かつ炎症反応誘発作用を持つポリペプチドの発現レベルを測定する方法であって、ある哺乳動物から得た組織細胞の試験試料中における該ポリペプチドの発現レベルを同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中における該ポリペプチドの発現レベルと比較することを含んでなる方法。

【請求項8】

配列番号：14に示したアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有し、かつ炎症反応誘発作用を持つポリペプチドに対する抗体又はその断片及び担体を適当な包装中に具備してなる炎症疾患の診断キット。

【請求項9】

抗体を上記ポリペプチドの検出に使用するための説明書をさらに具備する、請求項8に記載のキット。

【請求項10】

配列番号：14に示したアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有し、かつ炎症反応誘発作用を持つポリペプチドの発現又は活性を阻害することのできる化合物を同定する方法であって、候補化合物と該ポリペプチドとを、これら2成分を相互作用させる条件下で十分な時間接触させることを含んでなる方法。

【請求項11】

候補化合物あるいは上記ポリペプチドが固体支持体上に固定化される請求項10に記載の方法。

【請求項12】

非固定化成分が検出可能な標識を担持する請求項11に記載の方法。

【請求項13】

配列番号：14に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸であり、該核酸がコードするポリペプチドが炎症反応誘発作用を持つ核酸。

【請求項14】

配列番号：13に示したヌクレオチド配列と少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸であり、該核酸がコードするポリペプチドが炎症反応誘発作用を持つ核酸。

【請求項15】

配列番号：13に示したヌクレオチド配列の全長コード配列と少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸であり、該核酸がコードするポリペプチドが炎症反応誘発作用を持つ核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

A T C C 受託番号 P T A - 1 0 9 3 で 1 9 9 9 年 1 1 月 2 2 日 に 寄 託 さ れ た D N A 1 0 8 7 0 0 - 2 8 0 2 の 全 長 コード配列と少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有する単離された核酸であり、該核酸がコードするポリペプチドが炎症反応誘発作用を持つ核酸。

【請求項 17】

請求項 13 ないし 16 の何れか 1 項に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 18】

ベクターで形質転換される宿主細胞に認識されるコントロール配列に作用可能に結合した請求項 17 に記載のベクター。

【請求項 19】

請求項 17 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 20】

前記細胞が C H O 細胞である請求項 19 に記載の宿主細胞。

【請求項 21】

前記細胞が大腸菌である請求項 19 に記載の宿主細胞。

【請求項 22】

前記細胞が酵母菌細胞である請求項 19 に記載の宿主細胞。

【請求項 23】

請求項 19 に記載の宿主細胞を、前記ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から前記 P R O ポリペプチドを回収することを含んでなる P R O ポリペプチドの製造方法。

【請求項 24】

配列番号：14 に示したアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチドであって、哺乳動物において炎症反応誘発作用を持つポリペプチド。

【請求項 25】

A T C C 受託番号 P T A - 1 0 9 3 で 1 9 9 9 年 1 1 月 2 2 日 に 寄 託 さ れ た D N A 1 0 8 7 0 0 - 2 8 0 2 の 全 長 コード配列によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチドであって、哺乳動物において炎症反応誘発作用を持つポリペプチド。

【請求項 26】

異種アミノ酸配列に融合した請求項 24 又は 25 に記載のポリペプチドを含んでなるキメラ分子。

【請求項 27】

前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である請求項 26 に記載のキメラ分子。

【請求項 28】

前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンの F c 領域である請求項 26 に記載のキメラ分子。

【請求項 29】

請求項 24 又は 25 に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 30】

前記抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である請求項 29 に記載の抗体。

【請求項 31】

(a) 配列番号：14 に示したポリペプチドをコードし、その関連シグナルペプチドを欠くヌクレオチド配列；

(b) 配列番号：14 に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードし、その関連シグナルペプチドを伴うヌクレオチド配列；又は

(c) 配列番号：14 に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードし、その関連シグナルペプチドを欠くヌクレオチド配列；

10

20

30

40

50

と少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸であって、該核酸がコードするポリペプチドが哺乳動物において炎症反応誘発作用を持つ核酸。

【請求項32】

- (a)配列番号：14に示され、その関連シグナルペプチドを欠くポリペプチド；
(b)配列番号：14に示され、その関連シグナルペプチドを伴うポリペプチドの細胞外ドメイン；又は
(c)配列番号：14に示され、その関連シグナルペプチドを欠くポリペプチドの細胞外ドメイン；
と少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチドであって、哺乳動物において炎症反応誘発作用を持つポリペプチド。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は免疫関連疾患の診断と治療に有用な組成物と方法に関する。

(発明の背景)

免疫関連及び炎症疾患は、正常な生理においては、侵襲又は傷害に反応し、侵襲又は傷害からの修復を開始し、異物性生物体に対する生得的及び後天性防御を備えるために重要である、かなり複雑で、しばしば複数の相互に関連した生物学的経路の現れ又は結果である。疾患又は病状は、これらの正常な生理学的経路が、反応の強度に直接関連したものとして、異常な調節又は過度な刺激の結果として、自己に対する反応として、又はこれらの組合

20

せとして、さらなる侵襲又は傷害を引き起こす場合に生じる。これらの疾患の発生は、多くの場合、多段階経路を含み、しばしば複数の異なる生物学的システム／経路を含むが、一又は複数のこれらの経路の重要な点での介入は改善又は治療効果を有し得る。治療的介入は、有害なプロセス／経路の拮抗か、又は有益なプロセス／経路の刺激のいずれかにより生じ得る。

【0002】

多くの免疫関連疾患が知られており、広範囲にわたって研究されている。このような疾患には、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染症、免疫欠損症、異常増殖等が含まれる。

Tリンパ球（T細胞）は哺乳動物の免疫反応の重要な成分である。T細胞は主要組織適合複合体（MHC）内の遺伝子によりコードされる自己分子と結合している抗原を認識する。抗原は抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片等々の表面にMHC分子と共に表示され得る。T細胞系は宿主哺乳動物の健康を脅かすこれらの改変細胞を除去する。T細胞はヘルパーT細胞と細胞障害性T細胞を含む。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体の認識に続いて広範囲に増殖する。またヘルパーT細胞は種々のサイトカイン、すなわちリンホカインを分泌し、これが、B細胞、細胞障害性T細胞、及び免疫反応に寄与する種々の他の細胞の活性化において中心的な役割を担う。

30

体液性及び細胞媒介性免疫反応の双方においての中心的事象は、ヘルパーT細胞の活性化とクローン性増殖である。ヘルパーT細胞の活性化は、抗原提示細胞の表面上の抗原-MHCとのT細胞レセプター（TCR）-CD3複合体の相互作用により開始させられる。この相互作用は休止ヘルパーT細胞を誘発して細胞周期（G0からG1転移）へ入らせる生化学的事象カスケードを媒介し、その結果、IL-2と、時にはIL-4に対する高親和性レセプターを発現させる。活性化されたT細胞は周期を通じて進展し、増殖しメモリー細胞又はエフェクター細胞に分化する。

40

TCRによって媒介されたシグナルに加えて、T細胞の活性化は、抗原提示細胞によって放出されるサイトカインにより、又は抗原提示細胞とT細胞上の膜結合性分子との相互作用により誘発されるさらなる同時刺激に関与している。サイトカインIL-1及びIL-6は同時刺激シグナルを提供することが示されている。また、抗原提示細胞の表面に発現したB7分子とT細胞表面に発現したCD28及びCTLA-4分子との相互作用によりT細胞の活性化がなされる。活性化したT細胞は増加した数の細胞接着分子、例えばIC

50

AM-1、インテグリン、VLA-4、LFA-1、CD56等を発現する。

【0003】

混合リンパ球培養又は混合リンパ球反応（MLR）におけるT細胞の増殖は、化合物が免疫系を刺激する能力の確立された指標である。多くの免疫反応において、炎症細胞は傷害又は感染部位に浸潤する。移動細胞は、患部組織の組織学的検査により定量可能な好中球、好酸球、単球又はリンパ球でありうる。Current Protocols in Immunology, John. E. Coligan編, 1994, John Wiley & Sons, Inc.。

免疫関連疾患は免疫反応を抑制することにより治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体を使用することは、免疫媒介及び炎症疾患の治療に有用である。免疫反応を阻害する分子は免疫反応の阻害に用いることができ（タンパク質を直接、又は抗体アゴニストの使用を介して）、よって免疫関連疾患を改善する。

【0004】

（発明の概要）

A. 実施態様

本発明は、ヒトを含む哺乳動物における免疫関連疾患の診断と治療に有用な組成物と方法に関する。本発明は、哺乳動物における免疫反応を刺激又は阻害するタンパク質（アゴニスト及びアンタゴニスト抗体を含む）の同定に基づいている。免疫関連疾患は免疫反応を抑制又は増強することで治療することができる。免疫反応を増強する分子は、抗原に対する免疫反応を刺激又は強化する。免疫反応の増強が有益である場合には、免疫反応を刺激する分子が治療に使用可能である。あるいは、免疫反応の鎮静が有用である場合（例えば炎症）には、抗原に対する免疫反応を鎮静又は低減するといった、免疫反応を抑制する分子（例えば中和抗体）を治療的に使用することができる。従って、PROポリペプチド、そのアゴニスト及びアンタゴニストは、免疫関連及び炎症疾患の治療のための医薬及び薬物の調製に有用である。特定の態様では、このような医薬及び薬物は、製薬的に許容可能な担体と共に、治療的有效量のPROポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニストを含有する。好ましくは、混合物は滅菌される。

さらなる実施態様では、本発明は、PROポリペプチドを候補分子と接触させ、前記PROポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターすることを含んでなる、PROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法に関する。好ましくは、PROポリペプチドは天然配列PROポリペプチドである。特定の態様では、PROアゴニスト又はアンタゴニストは抗PRO抗体である。

【0005】

他の実施態様では、本発明は、担体又は賦形剤と混合されてPROポリペプチド又は該ポリペプチドと結合するアゴニスト又はアンタゴニスト抗体を含んでなる組成物に関する。一態様では、組成物は治療に有効な量のポリペプチド又は抗体を含む。他の態様では、組成物が免疫刺激分子を含むとき、組成物は、（a）その必要とする哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を増大させ、（b）その必要とする哺乳動物における免疫反応を刺激又は増強し、（c）抗原に反応してその必要とする哺乳動物におけるT-リンパ球の増殖を増加させ、（d）T-リンパ球の活性を刺激し、又は（e）血管透過性を増加させるのに有用である。さらなる態様では、組成物が免疫阻害分子を含むとき、組成物は、（a）その必要とする哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を減少させ、（b）その必要とする哺乳動物における免疫反応を阻害又は低減させ、（c）T-リンパ球の活性を低減し、又は（d）抗原に反応してその必要とする哺乳動物におけるT-リンパ球の増殖を減少させるのに有用である。他の態様では、組成物は、例えばさらなる抗体又は細胞障害又は化学療法剤であり得るさらなる活性成分を含有する。好ましくは、組成物は滅菌されている。

【0006】

他の実施態様では、本発明は有効量のPROポリペプチド、そのアゴニスト又はそのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、その必要とする哺乳動物における免疫関連疾患を治療する方法に関する。好ましい態様では、免疫関連疾患は、全身性紅斑性狼瘡、

リウマチ様関節炎、骨関節症、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症性腸疾患、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患、中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン・バレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、例えば感染性、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸疾患、及びウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、アレルギー性疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば好球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患からなる群から選択される。

10

【0007】

他の実施態様では、本発明は上述の又は下記のポリペプチドの何れかに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、該抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は単鎖抗体である。一態様では、本発明は、PROポリペプチドに結合する単離された抗体に関する。他の態様では、抗体はPROポリペプチドの活性を模倣し（アゴニスト抗体）、又は逆に抗体がPROポリペプチドの活性を阻害又は中和する（アンタゴニスト抗体）。他の態様では、抗体はモノクローナル抗体であり、好ましくは非ヒト相補性決定領域（CDR）残基及びヒトフレームワーク領域（FR）残基を有する。抗体は標識されていても固体支持体上に固定化されていてもよい。さらなる態様では、抗体は抗体断片、モノクローナル抗体、単鎖抗体、又は抗イディオタイプ抗体である。

20

さらなる他の実施態様では、本発明は製薬的に許容可能な担体と混合して、抗PRO抗体を含有する組成物を提供する。一態様においては、該組成物は製薬的有效量の抗体を含む。好ましくは該組成物は滅菌されている。組成物は、貯蔵時の安定性の延長が達成されるように保存できる、液状製薬用製剤の形態で投与されてもよい。あるいは、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、ヒト化抗体、又は単鎖抗体である。

【0008】

さらなる実施態様では、本発明は：

（a）PROポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含有する組成物；

（b）該組成物を収容する容器；及び

30

（c）免疫関連疾患の治療における該PROポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの使用に言及した、該容器に添付されたラベル又は該容器に含められた包装挿入物を具備する製造品を提供する。該組成物は、治療的有效量のPROポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含んでいてもよい。

【0009】

さらなる他の実施態様では、本発明は、（a）哺乳動物から得た組織細胞の試験試料における、及び（b）同じ細胞型の既知の正常組織細胞の対照試料における、PROポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含む、哺乳動物における免疫関連疾患の診断方法に関し、ここで、対照試料と比較して試験試料の発現レベルが高い又は低いと、試験組織細胞を得た哺乳動物に免疫関連疾患が存在することを示す。

40

他の実施態様では、本発明は（a）抗PRO抗体を哺乳動物から得た組織細胞の試験試料に接触させ、（b）試験試料中における、PROポリペプチドと抗体との複合体形成を検出することを含む哺乳動物における免疫疾患の診断方法に関し、ここで、該複合体の形成は、該疾患の有無を示す。検出は、定性的でも定量的でもよく、同じ細胞型の既知の正常組織細胞の対照試料における複合体形成をモニターして比較することで実施してもよい。試験試料中に生成される多量の複合体は、試験組織細胞が得られた哺乳動物における免疫疾患の有無を示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を有する。複合体生成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光測定、又は他のこの分野で知られた技術によりモニターすることができる。通常、試験試料は、免疫システムに欠陥又は異常があると疑われる個体から採取される。

50

【0010】

他の実施態様では、本発明はPROポリペプチドを含有すると思われる細胞の試験試料を抗PRO抗体に暴露し、該細胞試料に対する該抗体の結合性を測定することを含んでなる、試料中におけるPROポリペプチドの有無を決定する方法を提供する。特定の態様では、試料は、PROポリペプチドを含有すると思われる細胞と、細胞に結合する抗体を含む。抗体は、好ましくは検出可能に標識化され、及び／又は固体支持体に結合される。

他の実施態様では、本発明は適当なパッケージ中に抗PRO抗体と担体を含んでなる免疫関連疾患の診断キットに関する。キットは好ましくはPROポリペプチドの有無を検出するために抗体を使用するための説明書を含む。好ましくは、担体は製薬的に許容可能なものである。

10

他の実施態様では、本発明は適当なパッケージに抗PRO抗体を含んでなる診断キットに関する。好ましくはキットはPROポリペプチドを検出するための抗体を使用するための説明書を含む。

【0011】

他の実施態様では、本発明は哺乳動物から得た組織細胞の試験試料におけるPROポリペプチドの有無を検出することを含む、哺乳動物における免疫関連疾患の診断方法を提供し、ここで、該試験試料におけるPROポリペプチドの有無が該哺乳動物に免疫関連疾患が存在することを示す。

他の実施態様では、本発明は、PROポリペプチドのアゴニストを同定する方法を提供し、それは：

20

(a) 細胞とスクリーニングされる試験化合物とを、PROポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；

(b) 前記細胞性反応の誘発を測定して、試験化合物が有効なアゴニストであるか否かを決定することを含んでなり、前記細胞性反応の誘発が前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す。

【0012】

他の実施態様では、本発明は、PROポリペプチドに候補化合物を、これら2つの成分を互いに作用させるのに十分な時間と条件の下で接触させ、PROポリペプチドの活性が阻害されているかどうかを決定することを含んでなる、PROポリペプチドの活性を阻害可能な化合物を同定する方法に関する。特定の態様では、候補化合物又はPROポリペプチドのどちらかは固体支持体上に固定される。他の態様では、非固定成分は検出可能な標識を保有する。好ましい態様では、この方法は、

30

(a) 細胞とスクリーニングされる試験化合物とを、PROポリペプチドが存在し、PROポリペプチドによって通常誘発される細胞性反応の誘発に適した条件下で接触させ；

(b) 前記細胞性反応の誘発を測定して、試験化合物が有効なアンタゴニストであるか否かを決定する過程を含んでなる。

他の実施態様では、本発明は、通常はPROポリペプチドを発現する細胞におけるPROポリペプチドの発現を阻害する化合物の同定方法を提供し、該方法は、細胞と試験化合物とを接触させ、PROポリペプチドの発現が阻害されるか否かを測定することを含む。好ましい態様では、この方法は：

40

(a) 細胞とスクリーニングされる試験化合物とをPROポリペプチドを発現させるのに適した条件下で接触させ；

(b) 前記ポリペプチドの発現の阻害を測定する過程を含んでなる。

【0013】

さらなる実施態様において、本発明は免疫関連疾患を患っている哺乳動物の該疾患の治療方法に関し、それは、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストのいずれかをコードする核酸分子を哺乳動物に投与することを含んでなり、ここで前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗PRO抗体であってよい。好ましい実施態様では、哺乳動物はヒトである。他の好ましい実施態様では、核酸はエキソビボでの遺伝子療法を介して投与される。さらなる好ましい実

50

施態様では、核酸はベクター、より好ましくはアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス又はレトロウイルスベクター内に包含される。

また、他の態様において、本発明は、プロモータ、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸、及びポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるウイルスベクターを含有する組換えウイルス粒子を提供し、ここでウイルスベクターはウイルス構造タンパク質に付随している。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然PROポリペプチドからのものである。

また、さらなる実施態様では、本発明は、レトロウイルス構造タンパク質を発現する核酸構築物を含有し、またプロモータ、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸、及びポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウイルスベクターをさらに含むエキソビド産生細胞に関し、ここで該産生細胞は、組換えレトロウイルス粒子を生産させるための構造タンパク質に関連するレトロウイルスベクターを包含している。

【0014】

さらなる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物組織への脈管構造からの炎症細胞の浸潤を増加させる方法を提供し、ここで哺乳動物において脈管組織からの炎症細胞の浸潤が増加する。

またさらなる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物組織への脈管構造からの炎症細胞の浸潤を減少させる方法を提供し、ここで哺乳動物において脈管構造からの炎症細胞の浸潤が減少する。

またさらなる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物におけるTーリンパ球の活性を増加させる方法を提供し、ここで哺乳動物におけるTーリンパ球の活性が増加する。

またさらなる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物におけるTーリンパ球の活性を低減させる方法を提供し、ここで哺乳動物におけるTーリンパ球の活性が低減する。

またさらなる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物におけるTーリンパ球の増殖を増加させる方法を提供し、ここで哺乳動物におけるTーリンパ球の増殖が増加する。

またさらなる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PROポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物におけるTーリンパ球の増殖を低減させる方法を提供し、ここで哺乳動物におけるTーリンパ球の増殖が低減する。

【0015】

さらなる実施態様では、本発明は、PRO1081、PRO1274、又はPRO10272ポリペプチド又はそのアゴニストとTー細胞を接触させることを含んでなる、Tー細胞の増殖を刺激する方法を提供し、ここで、該Tー細胞の増殖が刺激される。

またさらなる実施態様では、本発明は、PRO1199、PRO1556、PRO4401、又はPRO10268ポリペプチド又はそのアゴニストと前記Tーリンパ球を接触させることを含んでなる、Tーリンパ球の増殖を阻害させる方法を提供し、ここで、該Tーリンパ球の増殖が阻害される。

またさらなる実施態様では、本発明は、単核球細胞、好酸球又は多形核好中球(PMN)の哺乳類動物細胞への浸潤を増強する方法であって、PRO1754又はPRO9912

10

20

30

40

50

ポリペプチド又はそのアゴニストと核組織を接触させることを含んでなる該方法を提供し、ここで、該浸潤が増強される。

【0016】

B. さらなる実施態様

本発明の他の態様では、本発明はここに記載したポリペプチドの任意のものをコードするDNAを含むベクターを提供する。また、そのようなベクターの任意のものを含む宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母菌であってよい。ここに記載したポリペプチドの任意のものの製造方法がさらに提供され、それは、宿主細胞を所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から所望のポリペプチドを回収することを含む。

他の実施態様では、本発明は、異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合した、ここに記載したポリペプチドの任意のものを含んでなるキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例は、エピトープタグ配列又は免疫グロブリンのFc領域に融合したここに記載の任意のポリペプチドを含む。

他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの任意のものに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は単鎖抗体である。

さらに他の実施態様では、本発明は、ゲノム及びcDNAヌクレオチド配列又はアンチセンスプローブを単離するのに有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、それらのプローブは上記又は下記のヌクレオチド配列の任意のものから誘導されうる。

【0017】

他の実施態様では、本発明はPROポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

一態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示された全長アミノ酸配列の他に特別に定められた任意の断片を有するPROポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、又は少なくとも約81%の核酸配列同一性、又は少なくとも約82%の核酸配列同一性、又は少なくとも約83%の核酸配列同一性、又は少なくとも約84%の核酸配列同一性、又は少なくとも約85%の核酸配列同一性、又は少なくとも約86%の核酸配列同一性、又は少なくとも約87%の核酸配列同一性、又は少なくとも約88%の核酸配列同一性、又は少なくとも約89%の核酸配列同一性、又は少なくとも約90%の核酸配列同一性、又は少なくとも約91%の核酸配列同一性、又は少なくとも約92%の核酸配列同一性、又は少なくとも約93%の核酸配列同一性、又は少なくとも約94%の核酸配列同一性、又は少なくとも約95%の核酸配列同一性、又は少なくとも約96%の核酸配列同一性、又は少なくとも約97%の核酸配列同一性、又は少なくとも約98%の核酸配列同一性、又は少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる。

【0018】

他の態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された全長PROポリペプチドcDNAのコード配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くPROポリペプチドのコード配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わない膜貫通PROポリペプチドの細胞外ドメインのコード配列、又はここに開示された全長アミノ酸配列の他に特別に定められた任意の断片のコード配列を含むDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、又は少なくとも約81%の核酸配列同一性、又は少なくとも約82%の核酸配列同一性、又は少なくとも約83%の核酸配列同一性、又は少なくとも約84%の核酸配列同一性、又は少なくとも約85%の核酸配列同一性、又は少なくとも約86%の核酸配列同一性、又は少なくとも約87%の核酸配列同一性、又は少なくとも約88%の核酸配列同一性、又は少なくとも約89%の核

酸配列同一性、又は少なくとも約 90 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 91 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 92 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 93 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 94 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 95 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 96 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 97 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 98 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 99 % の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる。

【0019】

さらなる態様では、本発明は、(a) ここに開示された A T T C に寄託されたヒトタンパク質 c D N A の任意のものによりコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードする D N A 分子、又は (b) (a) の D N A 分子の相補鎖に対して、少なくとも約 80 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 81 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 82 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 83 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 84 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 85 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 86 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 87 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 88 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 89 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 90 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 91 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 92 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 93 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 94 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 95 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 96 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 97 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 98 % の核酸配列同一性、又は少なくとも約 99 % の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子に関する。

【0020】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失されているか膜貫通ドメインが不活性化されている P R O ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、またはそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的であるものを含んでなる単離された核酸分子を提供し、ここでそのようなポリペプチドの膜貫通ドメインがここに開示される。従って、ここに記載された P R O ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

他の実施態様は、P R O ポリペプチドコード配列の断片、又はその相補鎖に関し、それらは、例えば、場合によっては抗 P R O 抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードする P R O ポリペプチドの断片をコードする、ハイブリッド形成プローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされる。そのような核酸断片は通常少なくとも約 20 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 30 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 40 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 50 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 60 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 70 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 80 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 90 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 100 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 110 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 120 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 130 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 140 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 150 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 160 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 170 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 180 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 190 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 200 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 250 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 300 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 350 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 400 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 450 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 500 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 600 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 700 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 800 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 900 のヌクレオチド長、又は少なくとも約 1000 のヌクレオチド長であり、ここで、「約」という用語は、その参照している長さのプラス又はマイナス 10 % の参照ヌクレオチド配列長を意味する。P R O ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くのよく知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを使用して、P R O ポリペプチドコードヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさ

せ、どのPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片（類）が新規であるかを決定することにより常套的な形で決定することができることに留意される。そのようなPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の全てがここで考慮される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子断片によりコードされるPROポリペプチド断片、好ましくは抗PRO抗体に対する結合部位を含んでなるそれらのPROポリペプチド断片である。

【0021】

他の実施態様では、本発明は、上記で同定された単離された核酸配列の任意のものにコードされる単離されたPROポリペプチドを提供する。

ある態様では、本発明は、ここに開示された全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示された全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片を有するPROポリペプチドに対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を含んでなる単離されたPROポリペプチドに関する。

【0022】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示されたATTCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの任意のものによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を含んでなる単離されたPROポリペプチドに関する。

【0023】

特定の態様では、本発明は、N末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを持たない単離されたPROポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされる。これを生産する方法もまたここに記載され、ここで、これらの方法はPROポリペプチドの発現に適した条件下で適当なコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培養物からPROポリペプチドを回収することを含んでなる。

他の態様では、本発明は、膜貫通ドメインが欠失されたか膜貫通ドメインが不活性化された単離されたPROポリペプチドを提供する。これを生産する方法もまたここに記載され、ここで、これらの方法はPROポリペプチドの発現に適した条件下で適当なコード化核

10

20

30

40

50

酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培養物からPROポリペプチドを回収することを含んでなる。

さらに他の実施態様では、本発明は、ここで定められる天然PROポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特定の実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗PRO抗体又は小分子である。

さらなる実施態様では、本発明は、PROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関し、それは、PROポリペプチドを候補分子と接触させ、前記PROポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターすることを含む。好ましくは、PROポリペプチドは天然PROポリペプチドである。

またさらなる実施態様では、本発明は、PROポリペプチド、又はここに記載するPROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗PRO抗体を、担体と組み合わせて含有する物質の組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体である。

本発明の他の実施態様は、PROポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗PRO抗体の、PROポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗PRO抗体に起因する病状の治療に有用な医薬の調製のための使用に関する。

【0024】

(好適な実施態様の詳細な説明)

I. 定義

ここで使用される際の「PROポリペプチド」及び「PRO」という用語は、直後に数値標記がある場合、種々のポリペプチドを指し、完全な符号（すなわち、PRO／番号）は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を指す。「PRO／番号ポリペプチド」及び「PRO／番号」であって、「番号」がここで使用される実際の数値標記として与えられる用語は、天然配列ポリペプチド及びポリペプチド変異体（ここでさらに定義する）を含む。ここに記載されるPROポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成法によって調製してもよい。「PROポリペプチド」なる用語は、ここで記載する個々のPRO／番号ポリペプチドをそれぞれ指す。「PROポリペプチド」を意味するこの明細書における全開示は、ポリペプチドのそれぞれを個々に、また一緒に併せて意味する。例えば、それに対する抗体の調製、精製、誘導、形成、その投与、それを含む組成物、それを用いた病気の治療等々の記載は、本発明の各ポリペプチドにそれぞれ関与している。また「PROポリペプチド」なる用語には、ここに開示されるPRO／番号ポリペプチドの変異体も含まれる。

【0025】

「天然配列PROポリペプチド」は、天然由来の対応するPROポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。このような天然配列PROポリペプチドは、天然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列PROポリペプチド」という用語には、特に、特定のPROポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態（例えば、細胞外ドメイン配列）、自然に生じる変異形態（例えば、選択的にスプライシングされた形態）及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の種々の実施態様において、ここで記載の天然配列PROポリペプチドは、添付の図面に示される全長アミノ酸配列を含む成熟又は全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドンは、図において太字及び下線で示す。しかし、添付の図面に開示したPROポリペプチドは、図面におけるアミノ酸位置1としてここに命名されるメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置1の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をPROポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし可能でもある。

PROポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを本質的に有しないPROポリペプチドの形態を称する。通常、PROポリペプチドECDは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメイ

ンを0.5%未満しか持たない。本発明のPROポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、ここで最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えないと思われる。よって、PROポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン／細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約5又はそれ未満のアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、そのようなポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明で考慮される。

【0026】

ここに開示する種々のPROポリペプチドの「シグナルペプチド」のおおよその位置は、本明細書及び／又は添付の図面に示す。しかし、注記するように、シグナルペプチドのC-末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC-末端境界のいずれかの側で約5アミノ酸を越えないと思われ、シグナルペプチドのC-末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに当該技術にいて日常的に使用される基準に従って同定され得る（例えば、Nielsen等, Prot. Eng. 10:1-6 (1997) 及び von Heinje 等, Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)）。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、一以上の分泌種をもたらしことも認められる。シグナルペプチドがここに同定されるシグナルペプチドのC-末端境界のいずれかの側の約5アミノ酸を越えない範囲内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

【0027】

「PROポリペプチド変異体」とは、ここに開示される全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くPROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わないPROポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示された全長PROポリペプチド配列の他の断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する上記又は下記の活性PROポリペプチドを意味する。このようなPROポリペプチド変異体には、例えば、全長天然アミノ酸配列のN-又はC-末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたPROポリペプチドが含まれる。通常、PROポリペプチド変異体は、ここに開示された全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くPROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わないPROポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示された全長PROポリペプチド配列の任意の他の特に定められた断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、PRO変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、又は少なくとも約20アミノ酸長、又は少なくとも約30アミノ酸長、又は少なくとも約40アミノ酸長、又は少なくとも約50アミノ酸長、又は少なくとも約60アミノ酸長、又は少なくとも約70アミノ酸長、又は少なくとも約80アミノ酸長、又は少なくとも約90アミノ酸長、又は少なくとも約100アミノ酸長、又は少なくとも約150アミノ酸長、又は少なくとも約200アミノ酸長、又は少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0028】

ここで同定されているPROポリペプチド配列に対して「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、特定のPROポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが以下の表1に与えられている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはGenentech, Inc. によって作成され、以下の表1に示したソースコードは米国著作権庁, Washington D. C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはGenentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に入手可能であり、また以下の表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

10

20

【0029】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのアラインメントによって同一である一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは認識されるであろう。この方法を用いた%アミノ酸配列同一性の計算の例として、表2と3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「PRO」とは対象の仮のPROポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」とは対象の「PRO」ポリペプチドが比較されているポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」はそれぞれ異なった仮想のアミノ酸配列を表す。

30

【0030】

特に断らない限り、ここで用いられる全ての%アミノ酸配列同一性値は、直上のパラグラフに記載したようにしてALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性値は、以下に記載するように、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschul等, Methods in Enzymology 266:460-480(1996))を用いて得ることもできる。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値(T)=11、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62。WU-BLAST-2を用いた場合、%アミノ酸配列同一性値は、WU-BLAST-2により決定されるように、(a)天然PROポリペプチドから誘導された配列を有する対象のPROポリペプチドのアミノ酸配列と、対象の比較アミノ酸配列(即

40

50

ち、対象のPROポリペプチドが比較されるPROポリペプチド変異体であってもよい配列)との間の、一致する同一アミノ酸残基の数を、(b)対象のPROポリペプチドのアミノ酸残基の総数で割った商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列Bと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列Aを含むポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列Aが対象の比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Bが対象のPROポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0031】

また、パーセントアミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードしてもよく、別にNational Institute of Health, Bethesda, MDから得てもよい。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask=可、鎖=全て、予測される発生=10、最小低複合長=15/5、マルチパス値=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ=25、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62を含む。

アミノ酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される:

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のA及びBのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。

【0032】

「PRO変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性PROポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、ここに開示された全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わないPROポリペプチドの細胞外ドメイン又はここに開示された全長ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードするヌクレオチド配列と少なくとも80%の核酸配列同一性を有する。通常は、PROポリペプチド変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示された全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示されたシグナル配列を伴うか伴わないPROポリペプチド配列の細胞外ドメイン又はここに開示された全長PROポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、又は少なくとも約81%の核酸配列同一性、又は少なくとも約82%の核酸配列同一性、又は少なくとも約83%の核酸配列同一性、又は少なくとも約84%の核酸配列同一性、又は少なくとも約85%の核酸配列同一性、又は少なくとも約86%の核酸配列同一性、又は少なくとも約87%の核酸配列同一性、又は少なくとも約88%の核酸配列同一性、又は少なくとも約89%の核酸配列同一性、又は少なくとも約90%の核酸配列同一性、又は少なくとも約91%の核酸配列同一性、又は少なくとも約92%の核酸配列同一性、又は少なくとも約93%の核酸配列同一性、又は少なくとも約94%の核酸配列同一性、又は少なくとも約95%の核酸配列同一性、又は少なくとも約96%の核酸配列同一性、又は少なくとも約97%の核酸配列同一性、又は少なくとも約98%の核酸配列同一性、又は少なくとも約99%の核酸配列同一性を有している。変異体は天然ヌクレオチド配列を含まない。

通常は、PRO変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約30のヌクレオチド長、又は少

なくとも約60のヌクレオチド長、又は少なくとも約90のヌクレオチド長、又は少なくとも約120のヌクレオチド長、又は少なくとも約150のヌクレオチド長、又は少なくとも約180のヌクレオチド長、又は少なくとも約210のヌクレオチド長、又は少なくとも約240のヌクレオチド長、又は少なくとも約270のヌクレオチド長、又は少なくとも約300のヌクレオチド長、又は少なくとも約450のヌクレオチド長、又は少なくとも約600のヌクレオチド長、又は少なくとも約900のヌクレオチド長、又はそれよりも長い。

【0033】

ここで同定されるPROコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象のPRO核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。しかし、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが以下の表1に与えられている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、以下の表1に示したソースコードは米国著作権庁、Washington D. C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, Californiaから公に入手可能であり、また以下の表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0034】

核酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される：

分率 W/Z の100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、表4と5は、「比較DNA」と称される核酸配列の「PRO-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「PRO-DNA」は、対象の仮のPROコード化核酸配列を表し、「比較DNA」は対象の「PRO-DNA」核酸分子が比較されている核酸分子のヌクレオチド配列を表し、「N」、「L」及び「V」はそれぞれ異なった仮想のヌクレオチドを表す。

【0035】

特に断らない限り、ここで用いられる全ての%核酸配列同一性値は、直上のパラグラフに記載したようにしてALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性値は、以下に記載するように、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschul等、Methods in Enzymology 266: 460-480(1996))を用いて得ることもできる。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値(T)=11、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM

10

20

30

40

50

62。WU-BLAST-2を用いた場合、%核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2により決定されるように(a)天然配列PROポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象のPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と、対象の比較核酸分子(すなわち、対象のPROポリペプチドコード化核酸分子が比較される変異PROポリヌクレオチドであってもよい配列)との間の、一致する同一ヌクレオチドの数を、(b)対象のPROポリペプチドコード化核酸配列のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bと少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Aを含む単離された核酸分子」という記載において、核酸配列Aは対象の比較核酸分子であり、核酸配列Bは対象のPROポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

10

【0036】

また、パーセント核酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードしてもよく、別にNational Institute of Health, Bethesda, MDから得てもよい。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask=可、鎖=全て、予測される発生=10、最小低複合長=15/5、マルチパス=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ=25、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62を含む。

20

配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される:

分率W/Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチド数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。

30

【0037】

他の実施態様では、PRO変異体ポリヌクレオチドは、活性PROポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリッド形成及び洗浄条件下で、ここに開示する全長PROポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリッド形成可能な核酸分子である。PRO変異体ポリペプチドは、PRO変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するとき、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の夾雑成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一となるまで精製される。単離されたポリペプチドには、自然環境におけるPROポリペプチドの少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

40

「単離された」PROポリペプチドコード化核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、

50

同定され、ポリペプチドコード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも1つの夾核核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離されたポリペプチドコード化核酸は、天然の細胞中に存在する特定のポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるものを含む。

【0038】

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を称す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に寄与するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0039】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗PROモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、多エピトープ特異性を持つ抗PRO抗体組成物、単鎖抗PRO抗体、及び抗PRO抗体の断片を特にカバーしている（下記参照）。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を称する。

ハイブリッド形成反応の「緊縮性」は、通常、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなればなる程、適切なアニーリングのために温度を高くする必要があり、プローブが短くなればなる程、温度を低くする必要が生じる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合、変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリッド形成可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。ハイブリッド形成反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1) 洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50℃において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2) ハイブリッド形成中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42℃において50% (v/v) ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3) 42℃における50%ホルムアミド、5xSSC (0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナ

トリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハート液、超音波処理サケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42℃における0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55℃での50%ホルムアミド、次いで55℃におけるEDTAを含む0.1xSSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定され得る。

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリッド形成条件(例えば、温度、イオン強度及び%SDS)の使用を含む。中程度の緊縮性条件の例は、20%ホルムアミド、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハート液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37℃での終夜インキュベーション、次いで1xSSC中37-50℃でのフィルターの洗浄などである。当業者は、プローブ長等の因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

【0040】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したPROポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを称す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは、融合するPROポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~約50のアミノ酸残基(好ましくは約10~約20のアミノ酸残基)を有する。ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である(即ち「異種の」)アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA(IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgM等の任意の免疫グロブリンから得ることができる。

【0041】

ここでの目的において「活性な」又は「活性」とは、天然又は自然に生じるPROの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持しているポリペプチドの形態を意味し、ここで「生物学的」活性とは、天然又は自然に生じるPROによって生ずる(阻害性又は刺激性の)生物学的機能であって、天然又は自然に生じるPROが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を除くものを称し、「免疫学的」活性とは、天然又は自然に生じるPROが有する抗原性エピトープに対して抗体の生成を誘発する能力を称する。

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PROポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。同様に「アゴニスト」なる用語も最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PROポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然PROポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機小分子等を含む。PROポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、PROポリペプチドを候補アンタゴニスト又はアゴニスト分子と接触させ、PROポリペプチドに通常付随する一又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することを含

みうる。

【0042】

「治療」とは、治癒的処置、予防的療法及び防止的療法の両方を意味し、患者は標的とする病理学的状態又は疾患を防止又は低下（減少）させられる。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患に罹りやすいもの又は疾患が防止されているものを含む。

「慢性」投与とは、急性様式とは異なり連続的な様式で薬剤を投与し、初期の治療効果（活性）を長時間に渡って維持することを称する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

治療の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、及び動物園、スポーツ用、又はペット用動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む哺乳動物に分類される任意の動物を称する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

一又は複数の治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

【0043】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEENTM、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICSTMを含む。

【0044】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ（diabodies）；直鎖状抗体（Zapata等、Protein Eng. 8（10）：1057-1062 [1995]）；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置において各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してV_H-V_L二量体の表面に抗原結合部位を決定する。正しくは、6つのCDRsが抗体に対する抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分）でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

またFab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）も含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab'断片と相違する。ここで、Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つFab'を表す。F(ab')₂抗体断片は、通常はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる二つの明らかに異なる型の一つが割り当てられる。

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つの主たるクラス：Ig A、Ig D、Ig E、Ig G及びIg Mがあり、それらのいくつかは更にサブクラス（アイソタイプ）、例えばIg G 1、Ig G 2、Ig G 3及びIg G 4、Ig A及びIg A 2に分割される。

【0045】

「単鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、FvポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それはsFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

用語「ダイアボディ(diabodies)」は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖(V_H-V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、EP 404, 097; 国際公開第93/11161号; 及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び／又は回収されたものである。その自然環境の夾雑成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1) ローリ法で測定した場合95重量%を越える、最も好ましくは99重量%を越えるまで、(2) スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(3) クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0046】

特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに「特異的に結合する」又はこれに「特異的な」抗体とは、任意の他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープに実質的に結合しないで、その特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに結合するものである。

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、抗体に直接又は間接的に結合して「標識」抗体を生成する検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識は、それ自身検出可能でもよく（例えば、放射性標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに意図する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス（例えば、孔制御ガラス）、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンから形成されたものを含む。或る種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ；その他では精製カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4, 275, 149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物（PROポリペプチド又はその抗体など）の輸送に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

「小分子」とは、ここで、約500ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

【0047】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫系の成分が、哺乳動物の病的状態の原因であるか、媒介又は寄与するものである疾患を意味する。また、免疫反応の刺激又は介在により疾患の進行に改善された効果が付与される疾患も含まれる。この用語に含まれるものは、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染症、免疫欠損症、異常増殖等が含まれる。

「T細胞媒介疾患」という用語は、T細胞が直接的又は間接的に哺乳動物の病的状態を媒介するか又は寄与等する疾患を意味する。T細胞媒介疾患は細胞媒介効果、リンホカイン媒介効果等に、また例えばT細胞により分泌されるリンホカインによりB細胞が刺激されるならばB細胞に関連した効果にさえも関連している。

本発明により治療可能で、そのいくつかは免疫又はT細胞媒介性である免疫関連及び炎症疾患の例には、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症（強皮症）、特発性炎症ミオパシー（皮膚筋炎、多発性筋炎）、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿）、自己免疫性血小板減少（特発性血小板減少性紫斑病、免疫仲介血小板減少）、甲状腺炎（グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）、中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン・バレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、例えば感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎及び他の非肝親和性（nonhepatotropic）ウィルス）、自己免疫慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）、グルテン過敏性腸疾患、及びウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、アレルギー性疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば好球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患が含まれる。ウイルス性疾患、例えばAIDS（HIV感染）、A型、B型、C型、D型及びE型肝炎、ヘルペス等、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染等の感染症も含まれる。

【0048】

「有効量」という用語は、特に記載した目的の達成をもたらすPROポリペプチド及び／又はアゴニスト／アンタゴニストの濃度又は量のことである。PROポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの「有効量」は経験的に決定することができる。さらに「治療有効量」は、記載した治療効果の達成に有効なPROポリペプチド及び／又はアゴニスト／アンタゴニストの濃度又は量のことである。この量もまた経験的に決定することができる。

【0049】

ここで用いられる「細胞障害薬」なる用語は、細胞の機能を阻害又は抑制する及び／又は細胞破壊を生ずる物質を称する。この用語は、放射性同位体（例えば、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 及び Re^{186} ）、化学療法剤、及び細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素的活性毒素といった毒素、又はその断片を含むとされる。

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例は、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソイド類、例えばパクリタキセル（Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドキセタキセル（Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）、

10

20

30

40

50

タキソテール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンC、マイトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン（米国特許第4, 675, 187号を参照のこと）、メルファラン、及び他の関連するナイトロジェンマスタードを含む。また、この定義に含まれるのは、タモキシフェン及びオナプリストン等の腫瘍へのホルモン作用を調節又は阻害するように作用するホルモン様薬剤である。

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にここで同定される任意の遺伝子を過剰発現する癌細胞の成長を、インビトロ又はインビボで阻害する化合物又は組成物を称する。即ち、成長阻害剤は、S期でそのような遺伝子を過剰発現する細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を（S期以外の位置で）ブロックする薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール、及びトポIIインヒビター、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。G1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも溢流し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特にp13に見出すことができる。

【0050】

「サイトカイン」なる用語は、1つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエーターとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体化ホルモン（LH）；肝臓成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- α 及び- β ；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンプオエチン（TPO）；NGF- β 等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF- α 及びTGF- β 等のトランスフォーミング成長因子（TGF）；インスリン様成長因子-I及びII；エリスロポエチン（EPO）；骨誘発因子；インターフェロン- α 、- β 、及び- γ 等のインターフェロン；コロニー刺激因子（CSFs）、例えばマクロファージ-CSF（M-CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；及び顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（ILs）、例えばIL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12；腫瘍壊死因子、例えばTNF- α 及びTNF- β ；及びLIF及びキットリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子である。ここで用いられる際、用語サイトカインは、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質を含み、天然配列サイトカインの生物学的な活性等価物である。

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である（即ち「異種の」）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシン

10

20

30

40

50

の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、I g G-1、I g G-2、I g G-3又はI g G-4サブタイプ、I g A (I g A-1及びI g A-2を含む)、I g E、I g D又はI g M等の任意の免疫グロブリンから得ることができる。

ここで用いられる「炎症性の細胞」なる用語は、単核球、好酸球、マクロファージ、及び多形核好中球 (PMN) などの炎症反応を増強する細胞を指す。

【0051】

表1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */  {2,0,-2,0,0,-4,1,-1,-1,0,-1,-2,-1,0,_M,1,0,-2,1,1,0,0,-6,0,-3,0},
/* B */  {0,3,-4,3,2,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,2,_M,-1,1,0,0,0,0,-2,-5,0,-3,1},
/* C */  {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2,0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4,0,-2,0,-2,-8,0,0,-5},
/* D */  {0,3,-5,4,3,-6,1,1,-2,0,0,-4,-3,2,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,2},
/* E */  {0,2,-5,3,4,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,1,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,3},
/* F */  {-4,-5,-4,-6,-5,9,-5,-2,1,0,-5,2,0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3,0,-1,0,0,7,-5},
/* G */  {1,0,-3,1,0,-5,5,-2,-3,0,-2,-4,-3,0,_M,-1,-1,-3,1,0,0,-1,-7,0,-5,0},
/* H */  {-1,1,-3,1,1,-2,-2,6,-2,0,0,-2,-2,2,_M,0,3,2,-1,-1,0,-2,-3,0,0,2},
/* I */  {-1,-2,-2,-2,-2,1,-3,-2,5,0,-2,2,2,-2,_M,-2,-2,-2,-1,0,0,4,-5,0,-1,-2},
/* J */  {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* K */  {-1,0,-5,0,0,-5,-2,0,-2,0,5,-3,0,1,_M,-1,1,3,0,0,0,-2,-3,0,-4,0},
/* L */  {-2,-3,-6,-4,-3,2,-4,-2,2,0,-3,6,4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1,0,2,-2,0,-1,-2},
/* M */  {-1,-2,-5,-3,-2,0,-3,-2,2,0,0,4,6,-2,_M,-2,-1,0,-2,-1,0,2,-4,0,-2,-1},
/* N */  {0,2,-4,2,1,-4,0,2,-2,0,1,-3,-2,2,_M,-1,1,0,1,0,0,-2,-4,0,-2,1},
/* O */  {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */  {1,-1,-3,-1,-1,-5,-1,0,-2,0,-1,-3,-2,-1,_M,6,0,0,1,0,0,-1,-6,0,-5,0},
/* Q */  {0,1,-5,2,2,-5,-1,3,-2,0,1,-2,-1,1,_M,0,4,1,-1,-1,0,-2,-5,0,-4,3},
/* R */  {-2,0,-4,-1,-1,-4,-3,2,-2,0,3,-3,0,0,_M,0,1,6,0,-1,0,-2,2,0,-4,0},
/* S */  {1,0,0,0,0,-3,1,-1,-1,0,0,-3,-2,1,_M,1,-1,0,2,1,0,-1,-2,0,-3,0},
/* T */  {1,0,-2,0,0,-3,0,-1,0,0,0,-1,-1,0,_M,0,-1,-1,1,3,0,0,-5,0,-3,0},
/* U */  {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* V */  {0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2,4,0,-2,2,2,-2,_M,-1,-2,-2,-1,0,0,4,-6,0,-2,-2},
/* W */  {-6,-5,-8,-7,-7,0,-7,-3,-5,0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5,2,-2,-5,0,-6,17,0,0,-6},
/* X */  {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* Y */  {-3,-3,0,-4,-4,7,-5,0,-1,0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3,0,-2,0,10,-4},
/* Z */  {0,1,-5,2,3,-5,0,2,-2,0,0,-2,-1,1,_M,0,3,0,0,0,0,-2,-6,0,-4,4}
};

```

10

20

30

表1(続き)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX           4      /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT         3      /* value of matching bases */
#define DMIS         0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0        8      /* penalty for a gap */
#define DINS1        1      /* penalty per base */
#define PINS0        8      /* penalty for a gap */
#define PINS1        4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;      /* score at last jmp */
    long           offset;     /* offset of prev block */
    short          ijmp;       /* current jmp index */
    struct jmp     jp;         /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;        /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char             *ofile;      /* output file name */
char             *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char             *prog;       /* prog name for err msgs */
char             *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int              dmax;        /* best diag: nw() */
int              dmax0;       /* final diag */
int              dna;         /* set if dna: main() */
int              endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int              gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int              len0, len1;   /* seq lens */
int              ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int              smax;        /* max score: nw() */
int              *xbm;        /* bitmap for matching */
long             offset;      /* current offset in jmp file */
struct           diag         /* holds diagonals */
struct           path         /* holds path for seqs */
    pp[2];

char             *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char             *getseq(), *g_calloc();

```

表1(続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2(1<<('D'-'A'))(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25(1<<('E'-'A'))(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    main
    int      ac;
    char     *av[ ];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps(); /* get the actual jmps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

表1(続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    nw
    {
        char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
        int        *ndely, *dely;    /* keep track of dely */
        int        ndelx, delx;      /* keep track of delx */
        int        *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
        int        mis;              /* score for each type */
        int        ins0, ins1;       /* insertion penalties */
        register   id;                /* diagonal index */
        register   ij;               /* jmp index */
        register   *col0, *col1;     /* score for curr, last row */
        register   xx, yy;           /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

        smax = -10000;
        if (endgaps) {
            for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                ndely[yy] = yy;
            }
            col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
            for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                dely[yy] = -ins0;

        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
            /* initialize first entry in col
             */
            if (endgaps) {
                if (xx == 1)
                    col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                else
                    col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                ndelx = xx;
            }
            else {
                col1[0] = 0;
                delx = -ins0;
                ndelx = 0;
            }
        }
    }
}

```

表 1(続き)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongoing del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongoing del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

```

10

20

30

表1(続き)

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (1dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (1dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array pl[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE  256      /* maximum output line */
#define P_SPC    3      /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen;                /* set output line length */
FILE *fx;                /* output file */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) {               /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) {           /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) {               /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) {          /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

表1(続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
    int      lx, ly;
    int      firstgap, lastgap;
/* "core" (minus endgaps) */
/* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
    * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
    * else, knock off overhangs and take shorter core
    */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100. * (double)nm / (double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

getmat

10

20

30

40

表1(続き)

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char  *ps[2];      /* ptr to current element */
static char  *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char  out[P_LINE]; /* output line */
static char  star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[ ]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(nameex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表1(続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spe) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spe--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

10

20

30

40

表1(続き)

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}

```

10

```

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[ ] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = *py;
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

```

nums

20

30

```

/*
 * put out a line (name, {num}, seq, {num}): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

putline

40

表1(続き)

...putline

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[ ] is current element (from 1)
 * nc[ ] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A'] && xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

10

20

30

表1(続き)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    stripname
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

表1(続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;

int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                  cleanup
{
    int    i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                          getseq
{
    char    *file;      /* file name */
    int     *len;        /* seq len */

    char     line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int      natgc, tlen;
    FILE     *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

表1(続き)

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;          /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[ ] or tmp file, set pp[ ], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    readjmps

    {
        int fd = -1;
        int siz, i0, i1;
        register i, j, xx;

        if (!fj) {
            (void) fclose(fj);
            if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
            while (1) {
                for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

10

20

30

40

表1(続き)

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--, j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--, j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)
{
    writejumps
    int    ix;

    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

10

【 0 0 5 2 】

表2

20

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(長さ=15アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYYYY	(長さ=12アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性=

(ALIGN-2 で決定した 2 つのポリペプチド配列間の同一一致したアミノ酸残基の数) を
(PRO ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) で割る =

30

5 ÷ 15 = 33.3%

表3

PRO	XXXXXXXXXXXX	(長さ=10アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYYZZYZ	(長さ=15アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性=

(ALIGN-2 で決定した 2 つのポリペプチド配列間の同一一致したアミノ酸残基の数) を
(PRO ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) で割る =

40

5 ÷ 10 = 50%

表4

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(長さ=14ヌクレオチド)
比較DNA	NNNNNNLLLLLLLLLL	(長さ=16ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性=

(ALIGN-2で決定した2つの核酸配列間の同一一致したヌクレオチド数)を(PRO-DNA核酸配列のヌクレオチドの総数)で割る=

$$6 \div 14 = 42.9\%$$

10

表5

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ=12ヌクレオチド)
比較DNA	NNNNLLLVV	(長さ=9ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性=

(ALIGN-2で決定した2つの核酸配列間の同一一致したヌクレオチド数)を(PRO-DNA核酸配列のヌクレオチドの総数)で割る=

$$4 \div 12 = 33.3\%$$

20

【0053】

II. 本発明の組成物と方法

A. 全長PROポリペプチド

本発明は、本出願でPROポリペプチドと称されるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に開示するように、種々のPROポリペプチドをコードするcDNAが同定され単離された。別々の発現ラウンドで生成されたタンパク質には異なるPRO番号が与えられるが、UNQ番号は任意の与えられたDNA及びコード化タンパク質に独特であり、変わることはないことを記しておく。しかしながら、単純化のために、本明細書において、ここに開示した全長天然核酸分子にコードされるタンパク質並びに上記のPROの定義に含まれるさらなる天然相同体及び変異体は、それらの起源又は調製形式に関わらず、「PRO／番号」として呼称する。

30

下記の実施例に開示するように、種々のcDNAクローンがATCCに寄託されている。これらのクローンの事実上のヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載したPROポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

40

【0054】

B. PROポリペプチド変異体

ここに記載した全長天然配列PROポリペプチドに加えて、PRO変異体も調製できると考えられる。PRO変異体は、PRODNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び／又は所望のPROポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化が

50

P R O の翻訳後プロセスを変えうると認識するであろう。

天然全長配列 P R O 又はここに記載した P R O の種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第 5, 3 6 4, 9 3 4 号に記載されている保存的及び非保存的変異についての技術及び指針の任意のものをを用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列 P R O と比較して P R O のアミノ酸配列が変化する P R O をコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも 1 つのアミノ酸の P R O の一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、P R O の配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一

10

【 0 0 5 5 】

P R O ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、全長天然タンパク質と比較した際に、N-末端又は C-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、P R O ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

P R O 断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法是、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素で D N A を消化して所望の断片を単離することによる P R O 断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により、所望のポリペプチド断片をコードする D N A 断片を単離し増幅することを含む。D N A 断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、P C R の 5 ' 及び 3 ' プライマーで用いられる。好ましくは、P R O ポリペプチド断片は、ここに開示した天然 P R O ポリペプチドと少なくとも 1 つの生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

【 0 0 5 6 】

特別の実施態様では、対象の保存的置換を、好ましい置換と題して表 6 に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表 6 に例示的置換と示した又は以下に参照としてアミノ酸分類でさらに記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

10

20

30

表6

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン ; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

10

20

PROポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的な修飾は、

(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、
 (b) 標的部位における分子の電荷又は疎水性、又は
 (c) 側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。自然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

30

【0057】

非保存的置換とは、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするものである。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、もしくは好ましくは残りの（非保存）部位に導入されうる。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34:315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)]、又は他の知られた技術を用いてクローニングしたDNAに実施してPRO変異体DNAを作成することもできる。

40

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくい

50

で、この群の中で典型的に好ましいスキランニングアミノ酸である [Cunningham 及び Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に頻繁に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.) ; Chot hia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック (isot eric) アミノ酸を用いることができる。

【0058】

C. PROの修飾

PROの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一型は、PROポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、PROの選択された側鎖又はN-又はC-末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることを含む。二官能性試薬での誘導体化が、例えばPROを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗PRO抗体の精製方法、及びその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1, 1-ビス (ジアゾアセチル) -2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸、3, 3'-ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート) 等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3- [(p-アジドフェニル) -ジチオ] プロピオイミダート等の薬剤を含む。

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化 [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0059】

本発明の範囲内に含まれるPROポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。ここでの目的に対し、「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列PROに見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失 (潜在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる)、及び/又は天然配列PROに存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味することが意図される。さらに、この語句は、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含み、それには、存在する種々の糖質部分の性質及び特性の変化を含む。

PROポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、一又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列PRO (O-結合グリコシル化部位) への付加、又は置換によってなされてもよい。PROアミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、PROポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

PROポリペプチド上に糖質部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に発行されたWO 87/05330、及びApplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

PROポリペプチド上に存在する糖質部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によって

なすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) により、及びEdge等, Anal. Biochem., 118:131 (1981) により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138:350 (1987) に記載されているように、種々のエンドー及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

【0060】

PROの共有結合的修飾の他の型は、PROポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号又は同第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

また、本発明のPROポリペプチドは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したPROを含むキメラ分子を形成する方法で修飾されてもよい。

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとPROとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはPROのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなPROのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってPROを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリーヒスチジン(poly-his)又はポリーヒスチジーングリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5[Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体[Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体[Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド[Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド[Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]； α -チューブリンエピトープペプチド[Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ[Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]を含む。

【0061】

それに代わる実施態様では、キメラ分子はPROの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG1分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも1つの可変領域に換えてPROポリペプチドの可溶化(膜貫通ドメイン欠失又は不活性化)形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【0062】

D. PROの調製

以下の記述は、主として、PRO核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりPROを生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてPROを調製することができると考えられる。例えば、P

PRO配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい [例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963) 参照]。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機 (Foster City, CA) を用いて、製造者の指示により実施してもよい。PROの種々の部分は別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて全長PROを生産してもよい。

【0063】

1. PROをコードするDNAの単離

PROをコードするDNAは、mRNAを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができる。従って、ヒトPRODNAは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリーから簡便に得ることができる。またPROコード化遺伝子は、ゲノムライブラリー、オリゴヌクレオチド合成、又は他の既知の合成方法 (例えば、自動化核酸合成) により得ることもできる。

ライブラリーは、対象の遺伝子あるいはそれによりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ (例えば、PROに対する抗体又は少なくとも約20-80塩基のオリゴヌクレオチド) によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。PROをコードする遺伝子を単離する他の手段はPCR法を使用するものである [Sambrook等, 上掲; Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

下記の実施例には、cDNAライブラリーのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、疑陽性が最小化されるよう十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAとのハイブリッド形成時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³²P標識されたATPのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の緊縮性及び高度の緊縮性を含むハイブリッド形成条件は、上掲のSambrook等に与えられている。

【0064】

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、Genbank等の公共データベース又は他の個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の他の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の定められた領域内又は全長配列に渡っての (アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれかでの) 配列同一性は、この分野で知られた、そしてここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されなかったmRNAの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrook等に記述されているような従来のプライマー伸展会法を使用し、選択されたcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得られる。

【0065】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したPRO生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変更された従来の栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコル、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991) 及び Sambrook 等, 上掲に見出すことができる。

真核生物細胞形質移入及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、 CaCl_2 、 CaPO_4 、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは、通常、当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。上掲の Sambrook 等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw 等, Gene, 23: 315 (1983) 及び 1989 年 6 月 29 日公開の WO 国際公開第 89/05859 号に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham 及び van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法を使用することができる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第 4, 399, 216 号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen 等, J. Bact., 130: 946 (1977) 及び Hsiao 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、DNA を細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いられる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown 等, Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) 及び Mansour 等, Nature, 336: 348-352 (1988) を参照のこと。

【0066】

このベクターに DNA をクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌 K12 株 MM294 (ATCC 31, 446)；大腸菌 X1776 (ATCC 31, 537)；大腸菌株 W3110 (ATCC 27, 325) 及び K5772 (ATCC 53, 635) である。他の適切な原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E. coli、エンテロバクター、エルビニア (Erwinia)、クレブシエラ (Klebsiella)、プロテウス (Proteus)、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス (Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスブチリス (B. subtilis) 及びバシリリチエニフォルミス (B. licheniformis) (例えば、1989 年 4 月 12 日公開の DD266, 710 に記載されたバシリリチエニフォルミス 41P)、シュードモナス、例えば緑膿筋及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株 W3110 は、組換え DNA 生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株 W3110 は、宿主に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異に影響を与えるように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 tonA を有する大腸菌 W3110 株 1A2；完全な遺伝子型 tonA ptr3 を有する大腸菌 W3110 株 9E4；完全な遺伝子型 tonA prt3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r を有する大腸菌 W3110 株 2

10

20

30

40

50

7 C 7 (A T C C 5 5, 2 4 4) ; 完全な遺伝子型 *t o n A p t r 3 p h o A E 1 5 (a r g F - l a c) 1 6 9 d e g P o m p T r b s 7 i l v G k a n* ^r を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 3 7 D 6 ; 非カナマイシン耐性 *d e g P* 欠失変異を持つ 3 7 D 6 株である大腸菌 W 3 1 1 0 株 4 0 B 4 ; 及び 1 9 9 0 年 8 月 7 日発行の米国特許第 4, 9 4 6, 7 8 3 号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えば P C R 又は他の核酸ポリメラーゼポリメラーゼ反応が好ましい。

【0067】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、PROコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・ポンベ (Beach 及び Nurse, Nature, 290:140 [1981] ; 1985 年 5 月 2 日発行の EP 139, 383) ; クルベロミセスホスツ (Kluyveromyces hosts) (米国特許第 4, 943, 529 号; Fleer 等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991))、例えばケーラクチス (K. lactis) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt 等, J. Bacteriol. 154 (2):737-742 [1983])、ケーフラギリス (K. fragilis) (ATCC 12, 424)、ケーブルガリクス (K. bulgaricus) (ATCC 16, 045)、ケーウィケラミイ (K. wickerhamii) (ATCC 24, 178)、ケーワルチイ (K. waltii) (ATCC 56, 500)、ケードロソフィラルム (K. drosophilum) (ATCC 36, 906; Van den Berg 等, Bio/Technology, 8:135 (1990))、ケーテモトレランス (K. thermotolerans) 及びケーマルキシアナス (K. marxianus) ; ヤロウィア (yarrowia) (EP 402, 226) ; ピッチャパストリス (Pichia pastoris) (EP 183, 070; Sreekrishna 等, J. Basic Microbiol, 28:265-278 [1988]) ; カンジダ ; トリコデルマレーシア (reesia) (EP 244, 234) ; アカパンカビ (Case 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]) ; シュワニオマイセス (schwanniomycetes)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス (occidentalis) (1990 年 10 月 31 日発行の EP 394, 538) ; 及び糸状真菌、例えばニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム (Tolypocladium) (1991 年 1 月 10 日公開の国際公開第 91/00357 号) ; 及びコウジ菌、例えば偽単性コウジ菌 (Ballance 等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983] ; Tilburn 等, Gene, 26:205-221 [1983] ; Yelton 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]) 及びクロカビ (Kelly 及び Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]) が含まれる。ここではメチロトロピック (Methylotropic) 酵母が適切であり、これらに限られないが、ハンセンラ (Hansenula)、カンジダ、クロエケラ (Kloeckera)、ピチア (Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス (Torulopsis)、及びロドトルラ (Rhodotorula) からなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982) に見出される。

【0068】

グリコシル化 PRO の発現に適切な宿主細胞は多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエ S 2 及びスボドプテラ S f 9 等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 及び COS 細胞を含む。より特定の例は、SV40 によって形質転換されたサル腎

10

20

30

40

50

臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胎児性腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59(1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980)); マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251(1980)); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術範囲内にあると考えられる。

【0069】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

PROをコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

PROは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるPROコード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母菌の分泌に関しては、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces) α 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスホターゼリーダー、白体(C. albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行のEP 362,179)、又は1990年11月15日に公開された国際公開第90/13646号に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現において、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーの等の哺乳動物シグナル配列は、タンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0070】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は種々の細菌、酵母菌及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に対する耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのように、PROコード化核酸を取り込むことのできる細胞の同定を可能にするものである

10

20

30

40

50

。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、U r l a u b等による、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 77:4216 (1980)の記載により調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である [S t i n c h c o m b等, N a t u r e , 282:39 (1979); K i n g m a n等, G e n e , 7:141 (1979); T s c h e m p e r等, G e n e , 10:157 (1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファン存在下で増殖能を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [J o n e s , G e n e t i c s , 85:12 (1977)]。

【0071】

発現及びクローニングベクターは、通常、PROコード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成に指向するプロモーターを含む。種々の潜在的な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターはβ-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [C h a n g等, N a t u r e , 275:615 (1978); G o e d d e l等, N a t u r e , 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [G o e d d e l , N u c l e i c A c i d s R e s . , 8:4057 (1980); E P 36, 776]、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーター [d e B o e r等, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたPROをコードするDNAと作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ (S. D.) 配列を有する。

酵母宿主での使用に対して好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [H i t z e m a n等, J . B i o l . C h e m . , 255:2073 (1980)]又は他の糖分解酵素 [H e s s等, J . A d v . E n z y m e R e g . , 7:149 (1968); H o l l a n d , B i o c h e m i s t r y , 17:4900 (1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースを利用する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌による発現における使用に適する用ベクターとプロモーターはE P 73, 657に更に記載されている。

【0072】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのPRO転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス (1989年7月5日公開のUK 2, 211, 504)、アデノウィルス (例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40 (SV40) のようなウィルスのゲノム、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱ショックプロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

高等真核生物によるPROをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作動性因子である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期

10

20

30

40

50

SV40エンハンサー（100-270塩基対）、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期ポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PROコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞（酵母菌、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞）に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、PROをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

10

さらに、組換え脊椎動物細胞培養でのPROの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantel等, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117, 060; 及びEP 117, 058に記載されている。

【0073】

4. 遺伝子増幅／発現の検出

遺伝子増幅及び／又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりの、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、サザンブロット法、ドットブロット法（DNA分析）、又はインサイツハイブリッド形成法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

20

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列PROポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はPRO DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

30

【0074】

5. ポリペプチドの精製

PROの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液（例えばトリトン-X100）又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。PROの発現に用いられた細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

40

PROを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。次の手順が適切な精製手順の例である：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファロックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような夾雑物を除くプロテインAセファロースカラム；及びPROのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methodes in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された種々のタンパク質精製方法を用いる

50

ことができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のPROの性質に依存する。

【0075】

E. 組織分布

PROを発現させる組織の位置は、種々のヒト組織におけるmRNA発現を測定することにより特定可能である。このような遺伝子の位置により、PROポリペプチドの刺激及び阻害活性の影響を最も受けていると思われる組織の情報が提供される。また、特定の組織における遺伝子の位置により、以下で検討される活性阻止アッセイのための試料組織も提供される。

上記したように、種々の組織における遺伝子発現は、従来のサザンブロット、mRNAの転写の定量化のためのノーザンブロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980])、ドットブロット(DNA分析)、又はインサイツハイブリッド形成により、ここに提供する配列に基づいて適切な標識プローブを用いて測定できる。あるいは、DNA二重鎖、RNA二重鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二重鎖又はDNA-タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識可能な抗体を用いてもよい。

あるいは、種々の組織における遺伝子発現は、遺伝子産物を直接定量化するための、組織断片の免疫組織学的染色、及び細胞培養物又は体液のアッセイ等の免疫学的方法によっても測定できる。免疫組織学的染色及び／又は試料液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の動物から調製される。簡便には、抗体は天然配列PROポリペプチドに対して、又はPROポリペプチドをコードするDNA配列に基づく合成ペプチドに対して、又はPROポリペプチドをコードするDNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。抗体を生成する一般的な技術、及びノーザンブロット及びインサイツハイブリッド形成の特定のプロトコールは以下に提供する。

【0076】

F. 抗体結合性の研究

PROポリペプチドの活性は、抗体結合性の研究によって更に証明することが可能で、この場合、組織細胞上でPROポリペプチドの効果を各々阻害する抗PRO抗体の能力がテストされる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロ結合体抗体を含み、その調製は以下に記載する。

抗体結合性の研究は、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイなどの既知のアッセイ法で実施してよい。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

競合的結合アッセイは、限られた量の抗体との結合について、標識標準物が試験分析物と競合する能力に基づく。試験試料中の標的タンパク質の量は、抗体に結合する標準物の量に逆比例する。結合する標準物の量の測定を促進するために、抗体は好ましくは競合の前又は後に不溶化し、抗体に結合した標準物及び分析物が未結合で残っている標準物及び分析物から容易に分離できるようにする。

サンドウィッチアッセイは2つの抗体の使用を含み、各々、検出されるタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチアッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第1の抗体に結合し、その後第2の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の3成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第2の抗体は検出可能成分で標識され(直接サンドウィッチアッセイ)、あるいは検出可能成分で標識された抗-免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい(間接サンドウィッチアッセイ)。例えば、サンドウィッチアッセイの一形態はELISAアッセイであり、この場合の検出可能成分は酵素である。

免疫組織化学のために、組織試料はフレッシュなものでも凍結されたものでもよく、パラフィンに包埋して、例えばホルマリン等の保存剤で固定してもよい。

【0077】

G. 細胞ベースアッセイ

細胞ベースアッセイ及び免疫関連疾患の動物モデルは、ここで同定された遺伝子とポリペプチドとの関係、及び免疫関連疾患の進行及び病理との関係をさらに理解するために使用することができる。

異なる方法では、特定の免疫関連疾患に含まれることが知られている細胞型の細胞をここに記載のcDNAで形質移入し、これらのcDNAが免疫機能を刺激又は阻害する能力を分析する。適当な細胞は所望の遺伝子で形質移入され、免疫機能活性がモニターされる。このような形質移入株化細胞は、次いで、例えばT細胞増殖又は炎症細胞の侵入を調節するといった、免疫機能を刺激又は阻害するポリマー又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の能力を試験するのに使用できる。ここに同定した遺伝子のコード化配列で形質移入した細胞は、さらに、免疫関連疾患治療用の候補薬の同定に使用できる。

さらに、(下記のような)トランスジェニック動物から誘導された初代培養は、ここでの細胞ベースアッセイに使用できるが、安定な株化細胞が好ましい。トランスジェニック動物から連続株化細胞を誘導する技術はこの分野で良く知られている(Small等, Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985] 参照)。

一つの適切な細胞ベースアッセイは混合リンパ球反応(MLR)である。Current Protocols in Immunology, unit 3.12; J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Inc. から出版。このアッセイでは、試験化合物が活性化したT細胞の増殖を刺激又は阻害する能力をアッセイする。レスポンダーT細胞の懸濁液を同種刺激細胞と共に培養し、トリチウム化チミジンの取込によりT細胞の増殖能を測定する。このアッセイはT細胞反応性の一般的な測定法である。多くのT細胞が応答し、活性化してIL-2が産出されるため、このアッセイにおける応答性の差異は、応答細胞によるIL-2生成の差異を部分的に反映する。MLRの結果は、標準的なリンホカイン(IL-2)検出アッセイにより確認することができる。上掲のCurrent Protocols in Immunology, 3.15.6.3.を参照。

MLRアッセイにおける増殖性T細胞応答は、アッセイされる分子の直接的な分裂促進特性又は外的抗原が誘発した活性化による。PROポリペプチドのT細胞刺激活性のさらなる証明は、同時刺激アッセイにより得ることができる。T細胞活性化には、T細胞レセプター(TCR)を通して媒介される抗原特異的シグナル、及び第2のリガンド結合相互作用、例えばB7(CD80、CD86)/CD28結合相互作用を通して媒介される同時刺激シグナルが必要である。CD28の架橋により、活性化T細胞によるリンホカインの分泌が増加する。T細胞活性化はネガティブな又はポジティブな効果を有するリガンドの結合を通してネガティブとポジティブの双方のコントロールを有する。CD28及びCTLA-4はB7に結合するIgスーパーファミリーの関連糖タンパク質である。B7に結合するCD28は、T細胞活性化のポジティブな同時刺激効果を有し;逆にB7に結合するCTLA-4はネガティブなT細胞脱活性化効果を有する。Chambers, C. A. and Allison, J. P., Curr. Opin. Immunol. (1997) 9:396. Schwartz, R. H., Cell (1992) 71:1065; Linsey, P. S. and Ledbetter, J. A. Annu. Rev. Immunol. (1993) 11:191; June, C. H. 等 Immunol. Today (1994) 15:321; Jenkins, M. K., Immunity (1994) 1:405。同時刺激アッセイでは、PROポリペプチドはT細胞同時刺激又は阻害活性についてアッセイされる。

【0078】

PROポリペプチド、並びに本発明の他の化合物は、T細胞の増殖の刺激因子(同時刺激因子)及びアゴニスト、例えばMLR及び同時刺激アッセイで決定されるアゴニスト抗体であるが、例えば、減弱な、最適下限の又は不十分な免疫機能に特徴付けられる免疫関連

10

20

30

40

50

疾患を治療するのに有用である。これらの疾患はT細胞の増殖及び活性化（及びT細胞媒介免疫性）を刺激し、刺激化合物、例えば刺激性PROポリペプチドの投与により哺乳動物における免疫反応を増強することにより治療される。刺激性ポリペプチドは、例えばPROポリペプチド又はそのアゴニスト抗体であり得る。

本発明におけるような刺激化合物の直接の使用は、4-1BB糖タンパク質、すなわちブライムT細胞上で発現されるリガンド（4-1BBL）に結合しT細胞の活性化と成長をシグナル伝達する腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーを用いる実験において実証された。Alderson, M. E. 等, J. Immunol. (1994) 24: 2219。

また、アゴニスト刺激化合物の使用も実験的に実証されている。アゴニスト抗4-1BB抗体を用いた治療による4-1BBの活性化は腫瘍の根絶化を亢進する。Hellstrom, I. 及びHellstrom, K. E., Crit. Rev. Immunol. (1998) 18: 1。以下により詳細に記載する腫瘍治療のための免疫アジュバント治療は、本発明の刺激化合物の使用の他の例である。

また、免疫刺激又は増強効果はMLRアッセイにおいて阻害性であることが見出されたPROの活性に拮抗又はこれを阻害することにより達成することができる。化合物の阻害活性を無効にすることで、正味の刺激効果が生じる。適切なアンタゴニスト／阻害化合物は、阻害タンパク質を認識し、これに結合する抗体又はその断片であり、それにより該タンパク質とそのレセプターとの効果的な相互作用がブロックされ、レセプターを通してのシグナル伝達が阻害される。この効果は、おそらくCTLA-4結合により引き起こされる阻害シグナルの除去により、T細胞増殖を亢進する抗CTLA-4抗体を使用する実験で実証されている。Walunas, T. L. 等, Immunity (1994) 1: 405。

【0079】

別法として、免疫刺激又は増強効果は、血管透過性増強特性を有するPROの投与により達成することもできる。増強された血管透過性は炎症と免疫細胞（例えば単球、好酸球、PMN）の局部的浸潤により緩和可能な疾患に有益であろう。

他方、PROポリペプチド並びに本発明の他の化合物は、T細胞増殖／活性化、リンホカイン分泌、及び／又は血管透過性の直接の阻害剤であるが、免疫反応を抑制するために直接使用することができる。これらの化合物は、免疫反応の程度を低減し、過剰活性、超最適（superoptimal）又は自己免疫反応により特徴付けられる免疫関連疾患の治療に有用である。本発明の化合物のこの用途は、レセプターB7に結合するCTLA-4がT細胞を脱活性化する上述の実験により実証されている。本発明の直接の阻害化合物は類似した形で機能する。血管浸透性を抑制する化合物の使用は炎症を低減することが予想される。このような使用は過度の炎症を伴う病状の治療に有益である。

あるいは、刺激PROポリペプチドに結合し、これらの分子の刺激効果をブロックする化合物、例えば抗体により、正味の阻害効果がつくりだされ、T細胞の増殖／活性化及び／又はリンホカイン分泌を阻害することにより、T細胞媒介免疫反応を抑制するために使用することができる。ポリペプチドの刺激効果をブロックすることにより、哺乳動物の免疫反応が抑制される。この用途は抗IL2抗体を使用する実験において実証されている。これらの実験において、抗体はIL2に結合し、そのレセプターへのIL2の結合を阻害し、これによりT細胞阻害効果が達成される。

【0080】

H. 動物モデル

さらに、インビトロにおける細胞ベースアッセイの結果は、インビボ動物モデル及びT細胞機能アッセイにより証明することができる。免疫関連疾患の進行及び病因におけるここに同定される遺伝子の役割を更に理解するために、そして抗体、及び小分子アンタゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。これらのモデルのインビボ性質により、ヒト患者における反応を予測できる。免疫関連疾患の動物モデルは、非組換え及び組換え

(トランスジェニック)動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植等により、細胞を同系マウスに導入することにより作成される。

移植片対宿主疾患は、免疫適格細胞が免疫抑制され又は耐性のある患者に移植された場合に生じる。ドナー細胞は宿主抗原を認識しそれに反応する。反応は生命に危険性のある重度の炎症から、下痢や体重の減少等の軽度のケースまで多様である。移植片対宿主疾患モデルはMHC抗原及び少量の移植抗原に対するT細胞反応性を評価する手段を提供する。適切な手順は上記のCurrent Protocols in Immunology, unit 4. 3. に詳細に記載されている。皮膚同種移植片拒絶のための動物モデルは、T細胞がインビボで組織の破壊を媒介する能力を試験する手段であり、移植拒絶におけるそれらの役割の指標である。最も一般的で容認されているモデルではマウスの尾の皮膚の移植片が使用される。繰り返し実験により、皮膚同種移植片拒絶がT細胞、ヘルパーT細胞及びキラーエフェクターT細胞により媒介されるが、抗体では媒介されないことが分かった。Auchincloss, H. Jr. 及びSachs, D. H., Fundamental Immunology, 2nd ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992。適切な手順は上掲のCurrent Protocols in Immunology, unit 4. 4. に詳細に記載されている。本発明の化合物の試験に使用可能な他の移植拒絶モデルは、Tanabe, M. 等, Transplantation (1994) 58:23及びTinubu, S. A. 等, J. Immunol. (1994) 4330-4338により記載されている同種心臓移植片モデルである。

【0081】

遅発型過敏症の動物モデルは、細胞媒介免疫機能のアッセイをまた提供する。遅発型過敏反応は、抗原投与後の経過した時間まで、ピークに達しない炎症により特徴付けられるT細胞媒介インビボ免疫反応である。これらの反応はまた組織特異的自己免疫疾患、例えば多発性硬化症(MS)及び実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE、MS用のモデル)で生じる。適切な手順は上掲のCurrent Protocols in Immunology, unit 4. 5. に詳細に記載されている。

EAEは、T細胞及び単核細胞の炎症と、続いての中樞神経系における軸索の脱髄により特徴付けられるT細胞媒介自己免疫疾患である。EAEは、一般的にヒトにおけるMSの関連動物モデルであると考えられている。Bolton, C., Multiple Sclerosis (1995) 1:143。急性及び再発性弛緩モデルの双方が開発されている。本発明の化合物は上掲のCurrent Protocols in Immunology, unit 15. 1及び15. 2. に記載されているプロトコルを使用して、免疫媒介脱髄疾患に対するT細胞刺激又は阻害活性を試験することができる。また、Duncan, I. D. 等, Molec. Med. Today (1997) 554-561に記載されているようにして、オリゴデンドロサイト又はシュワン細胞が中枢神経系に移植されたミエリン疾患のモデルも参照されたい。

接触性過敏症は、細胞媒介免疫機能の単純な遅発型過敏インビボアッセイである。この手順において、遅発型過敏反応を生じさせる外因性ハプテンに皮膚を暴露し、反応を測定して定量する。接触過敏症は最初の感作段階に顕在化段階が続く。顕在化段階はTリンパ球が過去に接触したことがある抗原に遭遇したときに生じる。腫れと炎症が生じ、ヒトアレルギー性接触皮膚炎の優れたモデルが作成される。適切な手順は、Current Protocols in Immunology, J. E. Coligan, A. M. Krusbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, 及びW. Strober編, John Wiley & Sons, Inc, unit 4. 2に詳細に記載されている。また、Grabbe, S. 及びSchwarz, T. Immun. Today 19(1):37-44(1998)も参照のこと。

【0082】

関節炎の動物モデルは、コラーゲン誘発関節炎である。このモデルはヒト自己免疫慢性関節リウマチの臨床的、組織的及び免疫学的特徴を共有し、ヒト自己免疫関節炎の許容可能なモデルである。マウス及びラットモデルは滑膜炎、軟骨の腐食及び軟骨下（subchondral）骨により特徴付けられる。本発明の化合物は上掲のCurrent Protocols in Immunology, unit 15. 5. に記載されているプロトコルを使用し、自己免疫関節炎に対する活性を試験することができる。また、Isssekutz, A. C. 等, Immunology (1996) 88: 569 に記載されているCD18及びVLA-4インテグリンに対するモノクローナル抗体を使用するモデルも参照のこと。

抗原誘発性気道反応亢進、肺好酸球増加症及び炎症が卵白アルブミンで動物を感作させ、エアゾールにより送達される同様のタンパク質に動物を暴露することで誘発される喘息モデルが記載されている。いくつかの動物モデル（モルモット、ラット、非ヒト霊長類）では、エアゾール抗原への暴露時にヒトのアトピー性喘息に類似した徴候が示された。マウスモデルはヒト喘息の多くの特徴を有している。喘息治療における活性と有効性について本発明の化合物を試験するのに適した手順は、Wolyniec, W. W. 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (1998) 18: 777 とそこに引用されている文献に記載されている。

さらに、本発明の化合物は乾癬用疾患の動物モデルにおいて試験することができる。ある証拠によりT細胞が乾癬の病原であることを示唆されている。本発明の化合物は、Schon. M. P. 等, Nat. Med. (1997) 3: 183 により記載されているscid/scidマウスモデルにおいて試験することができ、そのモデルではマウスは乾癬に類似した組織病理学的皮膚病巣を示す。他の適切なモデルはNickoloff, B. J. 等, Am. J. Path. (1995) 146: 580 に記載されているようにして調製されたヒトskin/scidマウスキメラである。

【0083】

組換え（トランスジェニック）動物モデルは、ここで同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作成のための標準的技術を用いて、対象の動物ゲノムに導入することにより設計することができる。遺伝子組換え操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルを含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、前核マイクロインジェクション（Hoppe及びWanger, 米国特許第4, 873, 191号）；生殖系列へのレトロウイルス媒介遺伝子転移（例えば、Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]）；胚性肝細胞での遺伝子標的化（Thompson等, Cell 56, 313-321 [1989]）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814 [1983]）；精子媒介遺伝子転移（Lavitrano等, Cell 57, 717-73 [1989]）を含む。概説のためには、例えば、米国特許第4, 736, 866号を参照のこと。

本発明の目的のために、トランスジェニック動物は、それらの細胞の一部にのみ導入遺伝子を有するもの（「モザイク動物」）を含む。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子として、又はコンカテマー、例えば頭部と頭部又は頭部と尾部の直列型として組み込まれる。特定の細胞型への導入遺伝子の選択的導入も、例えば、Lasko等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-636 (1992) の技術に従って可能である。

トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は、標準的技術によってモニターできる。例えば、導入遺伝子の組み込みの確認にサザンブロット分析又はPCR増幅が用いられる。次いで、mRNA発現のレベルは、インサイツハイブリッド形成、ノーザンブロット分析、PCR、又は免疫組織化学等の技術を用いて分析できる。

【0084】

動物は、さらに、特定の組織中への免疫細胞の湿潤を測定するために例えば組織学的検査により、免疫疾患の病原の徴候を検査してもよい。またトランスジェニック動物を本発明の化合物で処理して、化合物のT細胞増殖刺激又は阻害の度合いを測定するブロック実験も実施することができる。これらの実験では、上述のようにして調製したPROポリペプチドに結合するブロック抗体が動物に投与され、免疫機能に対する効果が測定される。

あるいは、動物の胚性細胞に導入されたポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、その同じポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えの結果、ここに同定するポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を作成することができる。例えば、特定のポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従って当該ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。特定のポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みをモニターするために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは変更が加えられていないフランキングDNA（5'と3'末端の両方）数千ベース含む[例えば、相同的組換えベクターの記述についてはThomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987)を参照のこと]。ベクターは胚性幹細胞に（例えばエレクトロポレーションによって）導入され、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Li等, Cell, 69:915 (1992)参照]。選択された細胞は次に動物（例えばマウス又はラット）の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、「ノックアウト」動物を作ると言われる。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、ポリペプチドが存在しないことによるある種の病理的状态及び病理的状态の進行に対して防御する能力によって特徴付けられる。

【0085】

I. 免疫アジュバント治療

一実施態様では、本発明の免疫刺激化合物は腫瘍（癌）治療における免疫アジュバント治療に使用することができる。T細胞がヒト腫瘍特異的抗原を認識することは十分に確立されている。遺伝子のMAGE、BAGE及びGAGEファミリーによりコードされる腫瘍抗原のグループは全ての成人の正常組織においてサイレントであるが、腫瘍、例えばメラノーマ、肺腫瘍、頭部及び頸部の腫瘍、膀胱癌においては有意の量で発現している。DeSmet, C. 等, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:7149。T細胞の同時刺激により、インビトロ及びインビボの双方において、腫瘍の退行及び抗腫瘍反応が誘発されることが示されている。Melerio, I. 等, Nature Medicine (1997) 3:682; Kwon, E. D. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:8099; Lynch, D. H. 等, Nature Medicine (1997) 3:625; Finn, O. J. 及びLotze, M. T., J. Immunol. (1998) 21:114。本発明の刺激化合物はアジュバントとして単独で又は成長調節剤、細胞障害薬又は化学療法剤と共に投与することができ、T細胞増殖/活性化及び腫瘍抗原に対する抗腫瘍反応を刺激する。成長調節剤、細胞障害薬又は化学療法剤は既知の投与方法で使用されている従来からの量で投与することができる。本発明の化合物による免疫刺激活性により、成長調節剤、細胞障害薬又は化学療法剤の量を減らすことができ、よって、潜在的に患者に対する毒性を低下させることができる。

【0086】

J. 候補薬についてのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定される遺伝子にコードされるポリペプチ

10

20

30

40

50

ド、又はその生物学的に活性な断片と結合又は複合体を形成する化合物、あるいはコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、特に小分子候補薬の同定に適したものに、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含む。考慮される小分子とは、合成有機又は無機化合物を含み、それらは、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、(ポリ)ペプチド-免疫グロブリン融合体、特に、限定されないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、単鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びそれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。アッセイは、種々の形式で実施でき、この分野で良く特徴付けられたタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞ベースのアッセイを含む。全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるポリペプチド、即ち候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

【0087】

候補化合物がここで同定される遺伝子にコードされる特定のタンパク質と相互作用するが結合しない場合、そのタンパク質との相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、共免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)に開示されているようにして、Fields及び共同研究者等[Fields及びSong, Nature (London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)]に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることによりモニターすることができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化因子は、2つの物理的に別個のモジュールドメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。既刊の文献に記載された酵母菌発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER(商品名))は、Clontechから購入可能である。また、この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

ここで同定される遺伝子と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物を見出すために、通常、反応混合物は、2つの生成物の相互作用及び結合を可能ならしめる条件及び時間の下、遺伝子の生成物及び細胞内又は外成分を含むように調製される。試験化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物有り又は無しで実施する。さらに、第3の反応混合物にプラシーボを添加してポジティブ対照としてもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は外成分との結合（複合体形成）は上記のようにモニターする。対照反応において複合体が形成され、試験化合物を含む反応混合物では形成されないことは、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【0088】

K. 免疫関連疾患の治療のための組成物及び方法

免疫関連疾患の治療に有用な組成物は、限定するものではないが、例えば、T細胞の増殖／活性化、リンホカインの放出、又は免疫細胞の浸潤等の免疫機能を阻害又は刺激するタンパク質、抗体、有機小分子、ペプチド、リン酸化ペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、三重鎖ヘリックス分子等々を含む。

例えば、アンチセンスRNA及びRNA分子は、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接的に阻止するように作用する。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列のおよそ-10から+10位置の間から取り出されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリッド形成、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994) 及びPCT公報、番号WO 97/33551 (1997年9月18日公開)を参照のこと。

転写阻害に用いられる三重鎖ヘリックス形成における核酸分子は単鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介する三重鎖ヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報、番号WO 97/33551、上掲を参照のこと。

これらの分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの任意のもの又は任意の組合せにより、及び／又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【0089】

L. 抗PRO抗体

本発明はさらに抗PRO抗体を提供する。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロ結合体抗体が含まれる。

1. ポリクローナル抗体

抗PRO抗体はポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで産生させることができる。典型的には、免疫化剤及び／又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、PROポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に結合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント（モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート）が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択される

10

20

30

40

50

であろう。

【0090】

2. モノクローナル抗体

あるいは、抗PRO抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫化剤は、典型的にはPROポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球（「PBL」）が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適当な培養培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素の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（HGPR T又はHPRT）を欠いていると、ハイブリドーマの培養培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み（「HAT培地」）、この物質がHGPR T欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【0091】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現をサポートし、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髓腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫株化細胞も記載されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、PROに対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ（RIA）や酵素結合免疫測定法（ELISA）等のインビトロ結合アッセイによって測定される。このような技術及びアッセイは、当該分野において既知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキッチャード分析法によって測定することができる。

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させることができる [Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びRPMI-1640培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

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、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又

は腹水液から単離又は精製される。

【0092】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作製することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して）、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に組込むことができ、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより〔米国特許第4,816,567号；Morrison等，上掲〕、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。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でき、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

10

【0093】

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られてる。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の断片、特にFab断片を生成するための抗体の消化は、当該分野において知られている定法的技術を使用して達成できる。

20

【0094】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗PRO抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト（例えばマウス）抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域（CDR）の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる〔Jones等，Nature，321：522-525（1986）；Riechmann等，Nature，332：323-329（1988）；及びPresta，Curr. Op. Struct. Biol.，2：593-596（1992）〕。

30

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりWinter及び共同研究者〔Jones等，Nature，321：522-525（1986）；Riechmann等，Nature，332：323-327（19

40

50

88) ; Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体 (米国特許第4, 816, 567号) である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0095】

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリー [Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)] を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる (Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner等, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化してマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第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、及び次の科学文献: Marks等, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995) に記載されている。

また、抗体は上述した既知の選択及び／又は突然変異誘発法を使用し、親和成熟させてもよい。好ましい親和成熟抗体は、成熟抗体が調製された (一般的にマウス、ヒト化又はヒトの) 出発抗体のものよりも、5倍、より好ましくは10倍、さらに好ましくは20又は30倍の親和性を有する。

【0096】

4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、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モノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本ケースにおいて、結合特異性の一方はPROに対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の共発現に基づく [Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ (クアドローマ) は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO 93/08829、及びTraunecker等, EMBO J., 10:3655-3659 (1991) に開示されている。

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を免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインと行われる。少なくとも一つの融合

には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域 (CH1) が有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986) を参照されたい。

【0097】

WO 96/27011に記載された他のアプローチによれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な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。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖（例えばチロシン又はトリプトファン）と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」は、大きなアミノ酸側鎖が小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）と置き換えられた第2の抗体分子の界面に作り出される。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片（例えば、F(ab')₂ 二重特異性抗体）として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229:81 (1985) は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたFab'断片はついでチオニトロベンゾアート (TNB) 誘導体に転換される。Fab'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりFab'-チオールに再転換し、他のFab'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

大腸菌からFab'断片を直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) は完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の製造を記述している。各Fab'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、ErbB2レセプターを過剰発現する細胞及び正常なヒトT細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【0098】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し単離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelnýら, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のFab'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化し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生産に対して使用することができる。Hollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン (V_L) に重鎖可変ドメイン (V_H) を結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, *J. Immunol.* 152:5368 (1994) を参照されたい。二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら *J. Im*

munol. 147:60 (1991)。

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられたPROポリペプチドの2つの異なるエピートープに結合しうる。あるいは、抗PROポリペプチドアームは、特定のPROポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T細胞レセプター分子（例えばCD2、CD3、CD28、又はB7）等の白血球上のトリガー分子又はFcγRI (CD64)、FcγRII (CD32) 及びFcγRIII (CD16) 等のIgG (FcγR) に対するFcレセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定のPROポリペプチドを発現する細胞に細胞障害薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はPRO-結合アーム及び細胞障害薬又は放射性キレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTEETAと結合するアームを有する。対象の他の二重特異性抗体はPROポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合する。

10

【0099】

5. ヘテロ結合体抗体

ヘテロ結合抗体も本発明の範囲内に入る。ヘテロ結合抗体は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、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4,676,980号]及びHIV感染の治療のために[WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチルー4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

20

【0100】

6. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌の治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成されたホモダイマー抗体は、向上した内部移行能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を有しうる。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) 及びShopes, J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) 参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つホモダイマー抗体は、Wolff等, Cancer research 53: 2560-2565 (1993) に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) 参照。

30

【0101】

7. 免疫結合体

本発明はまた、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞障害薬、あるいは放射性同位体（即ち、放射性結合）に結合された抗体を含む免疫複合体にも関する。

40

このような免疫結合体の生成に有用な化学療法剤は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリアトキシンの非結合活性断片、（緑膿菌からの）エクソトキシナ鎖、リシナ鎖、アブリンA鎖、モデシナ鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、ツルレイシインヒビター、クルシン、クロチン、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonarisa officinalis)インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン(mitogell

50

in)、レストリクトシン (restric tocin)、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin) 及びトリコテセン (tricothecene) を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性結合抗体の生成に利用可能である。例として、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re を含む。

抗体及び細胞障害薬の結合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、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 (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデート HCl 等)、活性エステル (ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド (グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物 (ビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (ビス (p-ジアゾニウムベンゾイル) -エチレンジアミン等)、ジイソシアネート (トリエン 2, 6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物 (1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等) を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta 等, Science 238: 1098 (1987) に記載されたように調製することができる。カーボン-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キレート剤の例である。WO 94/11026 参照。

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトアビジン等) に結合されてもよく、抗体-レセプター結合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合結合体を循環から除去し、次に細胞障害薬 (放射性ヌクレオチド等) に結合された「リガンド」(アビジン等) を投与する。

【0102】

8. 免疫リポソーム

また、ここに開示するタンパク質、抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epstein 等, Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang 等, Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第 4, 485, 045 号及び同第 4, 544, 545 号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第 5, 013, 556 号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及び PEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、定められた孔サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体の Fab' 断片は、Martin 等, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに結合され得る。化学療法剤 (ドキソルビシン等) は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon 等, J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989) 参照。

【0103】

M. 製薬組成物

本発明の活性 PRO 分子 (例えば PRO ポリペプチド、抗 PRO 抗体、及び/又はその変異体)、並びに上述のスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、免疫関連疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

本発明の活性 PRO 分子、好ましくはポリペプチド又は抗体の治療用製剤は、所望される程度の純度を持つ活性分子を、親油性製剤又は水性溶液の形態で、任意の製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される (Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などのバッファー; アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤; 防腐剤 (オクタデ

シルジメチルベンジルアンモニウムクロイド；ヘキサメトニウムクロイド；ベンズアルコニウムクロイド；ベンズエトニウムクロイド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／又は又はトウイーン（TW E E N）（商品名）、プルロニクス（P L U R O N I C S）（商品名）、及びポリエチレングリコール（P E G）等の非イオン性界面活性剤を含む。

10

【0104】

ここで開示されたスクリーニングアッセイで同定された化合物は、同様の方式でこの分野で知られた標準技術を用いて製剤することができる。

リポフェクション又はリポソームもPRO分子を細胞に導入するのに使用できる。抗体断片が用いられる場合、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阻害断片が好ましい。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保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び／又は組換えDNA技術によって生成できる。（例えば、Marasco等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993]を参照のこと）。

20

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞障害薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性PRO分子は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

30

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0105】

徐放性製剤又はPRO分子を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、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）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOTTM（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュプロリドからなる注射可能なマイクロスフェア）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ（D）-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオージスルフィ

40

50

ド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【0106】

N. 治療方法

本発明のポリペプチド、抗体及び他の活性物質は、組織への炎症細胞の浸潤、T細胞の増殖の刺激、T細胞の増殖の阻害、血管透過性の増加又は低減又はその阻害によって特徴付けられるものを含む、T細胞媒介疾患等の種々の免疫関連疾患及び病状を治療するために使用できると考えられる。

本発明のポリペプチド、抗体及び他の化合物で治療される病状又は疾患の例には、限定するものではないが、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、若年性慢性関節炎、骨関節症、脊椎関節症、全身性硬化症（強皮症）、特発性炎症ミオパシー（皮膚筋炎、多発性筋炎）、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿）、自己免疫性血小板減少（特発性血小板減少性紫斑病、免疫仲介血小板減少）、甲状腺炎（グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）、例えば多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髓性多発神経障害、又はギラン＝バレー症候群、及び慢性炎症脱髓性多発神経障害、肝胆道疾患、例えば感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎及び他の非肝親和性ウイルス）、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）、グルテン過敏性腸疾患、及びウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、アレルギー性疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば好球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患が含まれる。

全身性紅斑性狼瘡では、疾患の中心的な媒介物は自己タンパク質／組織に対する自己反応性抗体の産生と、続いての免疫媒介炎症の発生である。抗体は直接的又は間接的に組織傷害を媒介する。Tリンパ球は組織損傷に直接的には関与していることは示されていないが、Tリンパ球は自己反応性抗体の発育に必要である。よって、疾患の発生はTリンパ球に依存している。腎臓、肺、筋骨格、皮膚粘膜、眼、中枢神経系、心臓血管系、胃腸管、骨髓及び血液を含む複数の器官及び系が臨床的に冒される。

【0107】

リウマチ様関節炎（RA）は、主に複数の関節の滑膜に関連する慢性全身性自己免疫炎症疾患であり、結果として関節軟骨に傷害が生じる。病原はTリンパ球依存性であり、リウマチ因子、自己IgGに対する自己抗体の生成に付随し、結果として滑液及び血液において高レベルに達する免疫複合体を生成する。関節中のこれらの複合体は、滑膜中へのリンパ球及び単球の顕著な浸潤と、続いての顕著な滑膜変化を誘発し；多数の好中球の添加により同様の細胞で浸潤されるならば、関節空間／液でもしかりである。冒されている組織は、多くの場合対称的なパターンで、主に関節である。しかしながら、2つの主な形態の関節外疾患もまた生じる。一形態は進行中の進行性関節疾患及び肺線維症の典型的病巣、血管炎、及び皮膚潰瘍を伴う関節外障害の発生である。関節外疾患の第2の形態はいわゆるフェルティー症候群であり、これは、RA疾患過程の末期、時には関節疾患が鎮静した後生じ、好中球減少、血小板減少及び脾肥大の存在に関与する。これには、梗塞、皮膚潰瘍及び壊疽の形成を伴う複数の器官において血管炎が付随する。多くの場合、患者には、発病している関節上にある皮下組織にリウマチ様小結節が発達し；その小結節は、末期には混合炎症細胞浸潤に包囲された壊死性中心を有する。RAにおいて生じる可能性のある他の徴候には：心外膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、肺線維症を伴う間質性肺炎、乾性角結膜炎、及びリウマチ様小結節が含まれる。

若年性慢性関節炎は、多くの場合16歳未満で発症する慢性特発性炎症疾患である。その表現型はRAといくつかの類似点があり；リウマチ因子が陽性である患者の中には若年性

リウマチ様関節炎に分類されるものもある。この疾患は3つの主要なカテゴリー：小関節（*p a u a r t i c u l a r*）、多関節及び全身性に細分類される。関節炎は重度で典型的には破壊的であり、関節強直症及び遅延成長に至る。他の徴候には慢性前部ブドウ膜炎及び全身性アミロイド症が含まれる。

【0108】

脊椎関節症は、いくつかの共通した臨床的特徴とH L A－B 2 7 遺伝子産物の発現との共通の関連性を持つ疾患のグループである。該疾患には：B e c h t e r e w氏病（*a n k y l o s i n g s p o n y l i t i s*）、ライター症候群（反応性関節炎）、炎症性大腸疾患に関連した関節炎、乾癬に関連した脊椎炎、若年発症脊椎関節症及び未分化脊椎関節症が含まれる。顕著な特徴には、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；炎症非対称性関節炎；H L A－B 2 7（クラス I M H CのH L A－B 座位にある血清学的に定義された対立遺伝子）との関連；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に関連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導に対する鍵として最も関わっている細胞はC D 8＋Tリンパ球で、クラス I M H C分子により提示される抗原を標的としている細胞である。C D 8＋T細胞は、M H Cクラス I 分子により発現された外来ペプチドであるかのように、クラス I M H C対立遺伝子H L A－B 2 7に対して反応する。H L A－B 2 7のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原性エピトープを模倣し、よってC D 8＋細胞の反応を誘発すると仮定されている。

全身性硬化症（強皮症）は病因がよく知られていない。疾患の顕著な特徴は皮膚の硬結であり；これは活性な炎症プロセスにより誘発されると思われる。強皮症は局所的又は全身性であり；血管病巣が共通しており、微小血管系における内皮細胞傷害が全身性硬化症の発達における初期の重要な事象であり；血管傷害は免疫媒介されうる。免疫学的基準は、皮膚病巣における単核細胞浸潤の存在と、多くの患者において抗細胞核抗体の存在によって導かれる。多くの場合、I C A M－1が皮膚病巣の線維芽細胞の細胞表面でアップレギュレーションされ、これらの細胞とのT細胞の相互作用が疾患の病因においてある役割を担っていることが示唆される。関連する他の器官には：胃腸管：結果的に異常なぜん動／運動性となる平滑筋萎縮症及び線維症；腎臓：小弓形及び小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎皮質の血流が低下し、タンパク尿、高窒素血尿及び高血圧になる同心性内皮下内膜増殖；骨格筋：萎縮、間質性線維症；炎症：肺：間質性肺炎及び間質性線維症；及び心臓：収縮バンド壊死、瘢痕／線維症が含まれる。

【0109】

皮膚筋炎、多発性筋炎及び他のものを含む特発性炎症ミオパシーは病因がよく知られていない慢性筋肉炎症疾患であり、筋肉の弱化に至る。筋肉損傷／炎症は多くの場合対照的で進行性である。自己抗体は多くの形態と関連している。これらの筋炎特異的自己抗体は、タンパク質合成に関与する成分、タンパク質及びR N Aに対して産生されその機能を阻害する。

シェーグレン症候群は、免疫媒介炎症と、涙腺及び唾液腺の続く機能破壊によるものである。この疾患は炎症結合組織疾患に関連するか又はそれに伴う場合がある。この疾患は、双方とも小さいR N A－タンパク質複合体であるR o及びL a抗原に対する自己抗体産生に関連している。病巣は乾性角結膜炎、口内乾燥症で、胆汁性硬変、末梢又は感覚ニューロパシー、及び明白な紫斑病を含む他の徴候又は関連を伴うものに至る。

全身性血管炎症は一次病巣が炎症で、続いて血管にダメージを受け、結果として冒された脈管により供給される組織に虚血／壊死／変性が生じ、いくつかのケースでは最終的な末端器官機能障害になるといった疾患である。また、血管炎（*v a s c u l i t i d e s*）は他の免疫炎症媒介疾患、例えばリウマチ様関節炎、全身性硬化症等、特に免疫複合体の生成に関連した疾患等の続発症として又は二次病変として生じる場合がある。原発性全身性血管炎症グループの疾患には：全身壊死性血管炎：多動脈炎結節（*p o l y a r t e r i t i s n o d o s a*）、アレルギー性脈管炎及び肉芽腫症、多脈管炎：ヴェゲナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症；及び巨細胞動脈炎が含まれる。その他の血管炎には：粘膜皮膚リンパ節症候群（M L N S又は川崎病）、隔離されたC N S血管炎、ベヘット（B e

h e t ' s) 病、閉塞性血栓性血管炎 (バージャー病) 及び皮膚壊死性細静脈炎 (v e n u l i t i s) が含まれる。列挙した血管炎のほとんどの種類の発病メカニズムは、主に脈管壁に免疫グロブリン複合体が付着し、続いて A D C C、補体活性又は双方を介して炎症反応が誘発されることによると考えられている。

サルコイドーシスは、体内のほとんど全ての組織中における類上皮細胞肉芽腫の存在により特徴づけられる病因がよく知られていない病状であり；肺の関与が最も一般的である。病因は疾患部位に活性マクロファージ及びリンパ球が残留していることに関連しており、続いてこれらの細胞型より放出される局所的又は全身的活性産物の放出の結果として慢性続発症が生じる。

自己免疫性溶血性貧血、免疫再生不良性貧血、及び発作性夜間血色素尿を含む自己免疫性溶血性貧血は、赤血球 (いくつかの場合においては血小板もまた含む他の血液細胞) 表面で発現した抗原と反応する抗体が産出される結果によるものであり、補体媒介溶解及び／又は A D C C / F c - レセプター-媒介メカニズムを介して、その抗体被覆細胞の除去に反映される。

【0110】

他の臨床的環境における血小板減少性紫斑病及び免疫仲介血小板減少を含む自己免疫性血小板減少では、血小板破壊／除去が、抗体又は補体が血小板に接合し、続いて補体溶解、A D C C 又は F c - レセプター-媒介メカニズムにより除去される結果として生じる。

グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、及び萎縮性甲状腺炎を含む甲状腺炎は、甲状腺内に存在し多くの場合甲状腺に特異的なタンパク質と反応する抗体の産生を伴う、甲状腺抗原に対する自己免疫反応の結果によるものである。自然のモデル：ラット (B U F 及び B B ラット) 及びチキン (肥満チキン種)；誘導性モデル：サイログロブリン、甲状腺ミクロソーム抗原 (甲状腺ペルオキシダーゼ) のいずれかでの動物の免疫化を含む実験用モデルが存在する。

I 型真性糖尿病又はインスリン依存性糖尿病は膵臓ランゲルハンス島 β 細胞の自己免疫破壊であり；この破壊は自己抗体及び自己反応性 T 細胞により媒介される。また、インスリン又はインスリン様レセプターに対する抗体は、インスリン-非反応性の表現型をつくりだすことができる。

糸球体腎炎及び尿細管間質性腎炎を含む免疫仲介腎疾患は、腎抗原に対する自己反応性抗体又は T 細胞が産生される結果として直接的に、又は他の非腎抗原に対して反応性である、腎臓中の抗体及び／又は免疫複合体の沈着の結果として間接的に、腎組織に抗体又は T 細胞媒介傷害が生じることによるものである。よって、免疫複合体の生成をもたらす他の免疫媒介疾患により、間接的続発症として免疫媒介腎疾患も誘発しうる。直接的及び間接的免疫メカニズムの双方により、結果として、器官機能が損なわれ、いくつかの場合では腎臓機能不全に進行する、病巣発達を腎組織に生じさせ／誘発する炎症反応が生じる。体液及び細胞免疫メカニズムの双方が障害の発病に関与しうる。

多発性硬化症；特発性脱髄性多発神経障害又はギラン-バレー症候群；及び慢性炎症脱髄性多発神経障害を含む中枢及び末梢神経系の脱髄疾患は、自己免疫に原因を有し、オリゴデンドロサイト又はミエリンに直接的に引き起こされる損傷の結果として神経脱髄が生じると考えられている。M S においては、疾患の誘発及び進行が T リンパ球に依存することを示唆する証拠がある。多発性硬化症は、T リンパ球依存性であり、再発性弛緩経路又は慢性進行経路のいずれかを有する脱髄疾患である。病因はよく知られていないが、ウイルス感染、遺伝的素因、環境及び自己免疫性の全てが寄与している。病巣は優勢な T 細胞媒介小膠細胞の湿潤と、浸潤しているマクロファージを含み；C D 4 + T リンパ球は病巣における優勢な細胞型である。オリゴデンドロサイトの細胞死と続く脱髄のメカニズムはよく知られていないが、T リンパ球により推進されていると思われる。

好球性肺炎；特発性肺線維症及び過敏性肺炎を含む炎症及び線維症の肺疾患には、調節されない免疫炎症反応が関連している。その反応の阻害は治療的に有益であろう。

水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患は自己抗体により媒介され、その発病は T リンパ球依存性である。

10

20

30

40

50

乾癬はTリンパ球媒介炎症疾患である。病巣にはTリンパ球、マクロファージ及び抗原プロセッシング細胞及びある種の好中球の浸潤が含まれる。

【0111】

喘息；アレルギー性鼻炎；アトピー性皮膚炎；食物過敏症及び蕁麻疹等を含むアレルギー性疾患はTリンパ球依存性である。これらの疾患はTリンパ球誘発性炎症、IgE媒介炎症、又は双方の組合せにより主に媒介される。

拒絶反応及び移植片対宿主疾患（GVHD）を含む移植関連疾患はTリンパ球依存性であり；Tリンパ球の機能を阻害することで改善される。

免疫及び／又は炎症反応への介在が有益である他の疾患には、限定するものではないがウイルス感染（限定するものではないがAIDS、A型、B型、C型、D型、E型肝炎及びヘルペス）、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染（MLRを刺激する分子（又は誘導体／アゴニスト）を治療に利用し、感染要因に対する免疫反応性を増強することができる）を含む感染疾患、MLRを刺激し、治療に利用し、遺伝子し、獲得し、感染誘発された（例えばHIV感染）状態に対する免疫反応を増強するために治療上利用することが可能な免疫欠損疾患（分子／誘導体／アゴニスト）又は医原性（即ち、化学療法からのもの）免疫欠損、及び異常増殖である。

ヒト癌患者の中には、異常増殖細胞上の抗原に反応する抗体及び／又はTリンパ球を発生させるものもいることが証明されている。また、異常増殖のある動物モデルにおいても、免疫反応を増強することで、特定の異常増殖が拒絶又は退行する結果になることも示されている。MLRにおけるTリンパ球反応を増強する分子は、異常増殖に対する免疫反応を増強するインビボでの利用性を有している。MLRにおけるTリンパ球増殖反応を増強する分子（又は拮抗的に同じレセプターに影響を及ぼした小分子アゴニスト又は抗体）は、癌の治療に治療的に使用することができる。また、MLRにおいてリンパ球反応を阻害する分子は、異常増殖中に、新生物に対する免疫反応を抑制するように、インビボで機能し；このような分子は新生物細胞自体により発現されうるか、又はその発現は他の細胞中の新生物により誘発されうる。このような阻害分子（抗体、小分子アンタゴニスト又は他の手段による）の拮抗作用により免疫媒介腫瘍拒絶が増強される。

さらに、炎症誘発性特性を有する分子を阻害することは、再灌流傷害；脳卒中；心筋梗塞；アテローム性動脈硬化；急性肺傷害；出血性ショック；火傷；敗血症／敗血症ショック；急性尿細管壊死；子宮内膜症；変性関節疾患及び膵炎（pancreatitis）の治療に有益である。

【0112】

本発明の化合物、例えばポリペプチド又は抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入（鼻孔内、肺内）経路などにより投与される。ポリペプチド及び抗体の静脈内又は吸入投与が好ましい。免疫アジュバント治療において、抗癌剤の投与などの他の投薬計画は、本発明のタンパク質、抗体又は化合物の投与と組み合わせられてもよい。例えば、本発明の免疫アジュバントで治療される患者は、抗癌剤（化学療法剤）又は放射線治療を受けてもよい。このような化学療法剤の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学療法に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service Ed. M. C. Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学療法剤は、免疫アジュバントの投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。加えて、タモキシフェン等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン（EP 616812参照）を、それらの分子について知られた用量で付与してもよい。

【0113】

また、他の免疫疾患に関連した、又は腫瘍に関連した抗原に対する抗体、例えばCD20、CD11a、CD18、ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4、又は血管内

10

20

30

40

50

皮因子（VEGF）に結合する抗体を投与することも好ましい。別法として、又は付加的に、同一の抗原又はここに開示した二又はそれ以上の異なる抗原に結合する二又はそれ以上の抗体を患者に同時投与してもよい。しばしば、患者に一又は複数のサイトカインを投与することも有益である。一実施態様では、PROポリペプチドは、成長阻害剤と同時投与される。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いてPROポリペプチドを投与する。しかしながら、同時投与、又は最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は現在用いられている量であるが、成長阻害剤とPROポリペプチドとの組み合わせ（相乗）効果により減少させ得る。

重篤な免疫関連疾患の治療又は低減のための、本発明の化合物の適切な用量は、上記で定義したような治療される疾患の型、疾患の重篤さ及び経過、防止又は治療目的で薬剤が投与されるか否か、従前の治療、患者の臨床履歴及び化合物に対する反応、及び主治医の裁量に依存する。化合物は、適切には患者に一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。

10

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1-20\text{mg}/\text{kg}$ ）のポリペプチド又は抗体が、例えば、一又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

20

【0114】

O. 製造品

本発明の他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質（例えばPRO分子を含有するもの）を含む製造品が提供される。この製造品は容器と使用説明書とを含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの種々の材料から形成されてよい。容器は、状態を診断し治療するのに有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤は通常、本発明のポリペプチド又は抗体である。容器上又は添付される使用説明書又はラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品はさらに、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容されるバッファーを含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

30

【0115】

P. 免疫関連疾患の診断及び予知

ある種の免疫関連疾患で過剰発現されるタンパク質等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は疾患治療の優れた標的である。同じタンパク質は免疫関連疾患で増幅された遺伝子にコードされる分泌タンパク質とともに、これらの疾患の診断及び予知における付加的な用途が見出される。例えば、多発性硬化症、リウマチ様関節炎、又は他の免疫関連疾患で増幅された遺伝子のタンパク質産物に対する抗体は診断又は予知として使用できる。

40

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅又は過剰発現された遺伝子にコードされるタンパク質（「マーカー遺伝子産物」）の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリー、又はこの分野で知られた他の技術によってモニターできる。これらの技術は、過剰発現した遺伝子が細胞表面タンパク質をコードする場合に特に適切である。このような結合アッセイは、本質的に上述したように実施される。

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ま

50

しくは生物学的試料に抗体を重層することにより、標識抗体をそれに適用する。この手法はまた、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布も決定できるようにする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【0116】

(実施例)

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC受託番号により以下の実施例及び明細書全体を通して同定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、VAである。

実施例1：新規なポリペプチド及びそれをコードするcDNAを同定するための細胞外ドメイン相同スクリーニング

Swiss-Prot 公的データベースからの約950の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン (ECD) 配列 (存在すれば、分泌シグナル配列を含む) を、ESTデータベースの検索に使用した。ESTデータベースは、公的データベース (例えば、Dayhoff、GenBank) 及び企業のデータベース (例えば、LIFESEQTM、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto, CA) を含む。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST-2 (Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を用いて、ECDタンパク質配列のEST配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70 (90の場合もある) 又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA) で集団化してコンセンサスDNA配列に構築した。

この細胞外ドメイン相同性スクリーニングを用い、phrapを用いて他の同定されたEST配列に対してコンセンサスDNA配列を構築した。さらに、得られたコンセンサスDNA配列を、しばしば (常にではない) BLAST又はBLAST-2及びphrapの繰り返しサイクルを用いて伸長し、コンセンサス配列を上で議論したEST配列の供給源を用いて可能な限り伸長させた。

上記のように得られたコンセンサス配列に基づいて、次いでオリゴヌクレオチドを合成し、PCRにより対象の配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、及びPROポリペプチドの全長コード配列のクローンを単離するプローブとして用いるために使用した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に40-55bp長である。ある場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbpより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを、Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、PCRプライマー対でのPCRによりスクリーニングした。ポジティブライブラリーを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象の遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、Not I 部位を含むオリゴdTでプライミングし、平滑末端でSal Iヘミキナーゼアダプターに結合させ、Not Iで切断し、ゲル電気泳動で適切にサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター (pRKB又はpRKD等; pRK5BはSfi I 部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照) に、ユニークなXho I 及びNot I 部位において

10

20

30

40

50

、所定の方向でクローニングした。

【0117】

実施例2：特定のデータベースクエリー (Database Query) を使用する cDNA クローンの単離

ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を、公的 (例えば、GenBank) 及び／又は私的 (LIFESEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) データベースにおいて、特定の遺伝子の相同性を検索するために、コンピュータプログラム BLAST 及又は BLAST2 (Altschul 等、Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) を用いて同定した。この場合、研究者は疑問配列として、予め同定されている一つの遺伝子を使用し、関連した相同性を検索した。相同性の有意性は各遺伝子に基づきケースバイケースで決定される。有意な相同性が見出された場合、これにより、検査され配列決定される全長クローンに対応するか、又は次に天然配列 PRO ポリペプチドをコードする DNA を単離するための種々の組織ライブラリーをスクリーニングするために使用されるクローニングオリゴヌクレオチドの創製のためのテンプレートとなる、さらなる EST 配列が同定される結果となる。

10

【0118】

実施例3：シグナルアルゴリズム分析を使用する cDNA クローンの単離

Genentech inc (South San Francisco, CA) によって開発された独自のシグナル配列発見アルゴリズムを、公的 (例えば、GenBank) 及び／又は私的 (LIFESEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) データベースからの EST 並びに集団化及び構築された EST 断片に適用して、種々のポリペプチドコード核酸配列を同定した。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の 5' -末端の第1の、場合によっては第2のメチオニンコドン (ATG) を取り囲む DNA ヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第1の ATG に続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも35の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第1の ATG が必要なアミノ酸を有する場合、第2のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけなかった。EST 配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ATG コドンを取り囲む DNA 及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた7つのセンサー (評価パラメータ) の組を用いてスコアをつけた。このアルゴリズムを使用すると、多数のポリペプチドコード化核酸配列の同定がなされる。

20

30

【0119】

実施例4：ゲノム DNA に対して ECD 相同性を使用する cDNA クローンの単離

Swiss-Prot 公的データベースからの約950の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン (ECD) 配列 (存在すれば、分泌シグナル配列を含む) を、配列データベースの検索に使用した。データベースは、公的データベース (例えば、GenBank) を含む。この場合、GenBank からのゲノム DNA 配列は、スタンフォード大学よりライセンスされた遺伝子予想プログラム、GENSCAN を用いて分析した。GENSCAN 分析は遺伝子のコード領域を予測し、ECD 検索の対象となり得る配列を作成する。検索は、コンピュータプログラム BLAST 又は BLAST-2 [Altschul 等、Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)] を用いて、ECD タンパク質配列の EST 配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。必要ならば、既知のタンパク質をコードせず、BLAST スコア70 (90の場合もある) 又はそれ以上を持つ比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA) で集団化してコンセンサス DNA 配列に構築した。

40

コンセンサス配列に基づいて、オリゴヌクレオチドが：1) PCR により対象の配列を含む cDNA ライブラリーを同定するために、2) 全長コード化配列のクローンを単離する

50

ためのプローブとしての使用のために、合成された。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に40-55bp長である。ある場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbpより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biologyに従って、PCRプライマー対でのPCRによりスクリーニングした。ポジティブライブラリーを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象の遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

10

様々な組織由来の50種の異なるヒトcDNAライブラリーのプールがクローニングに使用された。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適切にサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター(pRKB又はpRKD等;pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である;Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991)参照)に、ユニークなXhoI及びNotI部位において、所定の方法でクローニングした。

上述のように単離されたクローンのDNA配列は、全長ポリペプチドに対する全長DNA配列を与えた。

20

【0120】

実施例5:ゲノムDNA対してシグナルアルゴリズム検索を使用するcDNAクローンの単離

潜在的な対象遺伝子は、Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)によって開発された独自のシグナル配列検出アルゴリズムを、公的なデータベース(例えば、GenBank)からGENSCAN(スタンフォード大学よりライセンス)によりプロセスされたゲノム配列に対し適用することにより同定された。シグナル配列アルゴリズムは、考慮している配列又は配列断片の5'-末端の第1の、場合によっては第2のメチオニンコドン(ATG)を取り囲むDNAヌクレオチドの文字に基づく分泌シグナルスコアを計算する。第1のATGに続くヌクレオチドは、停止コドンを持たない少なくとも35の不明瞭でないアミノ酸をコードしなければならない。第1のATGが必要なアミノ酸を有する場合、第2のものは試験しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列にスコアをつけなかった。EST配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、ATGコドンを取り囲むDNA及び対応するアミノ酸配列を、分泌シグナルに関連することが知られた7つのセンサー(評価パラメータ)の組を用いてスコアをつけた。このアルゴリズムを使用すると、多数のポリペプチドコード化核酸配列の同定がなされる。

30

上記のシグナル配列アルゴリズムの使用により、ゲノム配列の同定が可能となる。その後、当該ゲノム配列は相同性の存在を同定するために種々のデータベース(例えば、GenBank)と比較された。相同性検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST-2(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて行われた。必要ならば、既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上となるこれらの比較物は、プログラム「phrap」(Phil Green, University of Washington, Seattle, WA)で集団化してコンセンサスDNA配列に構築した。

40

コンセンサス配列に基づいて、オリゴヌクレオチドが: 1) PCRにより対象の配列を含むcDNAライブラリーを同定するために、2) 全長コード化配列のクローンを単離するためのプローブとしての使用のために、合成された。正方向及び逆方向PCRプライマー

50

は一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を与えるために設計される。プローブ配列は、典型的に40-55bp長である。ある場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbpより大きいときに付加的なオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biologyに従って、PCRプライマー対でのPCRによりスクリーニングした。ポジティブライブラリーを、次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象の遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

様々な組織由来の50種の異なるヒトcDNAライブラリーのプールがクローニングに使用された。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適切にサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター(pRKB又はpRKD等；pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes等, Science, 253: 1278-1280 (1991) 参照)に、ユニークなXhoI及びNotI部位において、所定の方角でクローニングした。

上述のように単離されたクローンのDNA配列は、全長ポリペプチドに対する全長DNA配列を与えた。

【0121】

実施例6：ヒトPROポリペプチドをコードするcDNAクローンの単離

上述した実施例1ないし5に記載の技術を使用し、ここで開示されたPROポリペプチドをコードする多数の全長cDNAクローンを同定した。次に、これらのcDNAを、次の表7に示すように、ブダペスト条約に従ってアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801 ユニバーシティ・ブルバード、マナッサス、VA 20110-2209米国(ATCC)に寄託した。

表7

材料	UNQ	PRO	ATCC #	ATCC寄託年月日
DNA54229-1366	538	1081	209803	1998年 4月23日
DNA64889-1541	644	1274	203250	1998年 9月 9日
DNA65351-1366	612	1199	209856	1998年 5月12日
DNA76385-1692	827	1754	203664	1999年 2月 9日
DNA76529-1666	764	1556	203315	1998年10月 6日
DNA84912-2610	1926	4401	203964	1999年 4月27日
DNA108700-2802	3077	9912	PTA-1093	1999年11月22日
DNA145583-2820	3119	10268	PTA-1179	2000年 1月11日
DNA147531-2821	3120	10272	PTA-1185	2000年 1月11日

【0122】

実施例7：混合リンパ球反応(MLR)における刺激活性アッセイ(番号24)

この実施例は、本発明のポリペプチドが刺激されたTリンパ球の増殖刺激剤として活性であることを示す。リンパ球の増殖を刺激する化合物は、免疫反応の増強が好ましい治療に

において有用である。治療薬は本発明のPROポリペプチドのアンタゴニスト、例えばTリンパ球増殖の阻害が期待されるポリペプチドに対するマウスーヒトキメラ、ヒト化又はヒト抗体の形態をとりうる。

このアッセイの基本的プロトコルは、Current Protocols in Immunology, unit 3. 12; J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober 編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Incから出版のものに記載されている。

より特別には、このアッセイの一変形例では、末梢血液単核細胞(PBMC)を哺乳動物個体、例えばヒトのボランティアからロイコフェレーシスにより単離する(一人のドナーには刺激物PBMCを供給し、他のドナーにはレスポンダーPBMCを供給する)。所望するならば、単離後に、細胞をウシ胎児血清及びDMSO中で凍結する。凍結細胞をアッセイ用培地(37℃、5%CO₂)で一晩解凍し、ついで洗浄し、3x10⁶細胞/mlのアッセイ用培地(RPMI; 10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルビン酸塩)に再懸濁させる。

【0123】

刺激物PBMCは細胞を照射(約3000ラド)することにより調製される。このアッセイは混合物:100:1の1%又は0.1%に希釈された試験試料、50:1の光にさらされた刺激物細胞、及び50:1のレスポンダーPBMC細胞を三重ウェルに蒔くことにより調製される。100マイクロリッターの細胞培養培地又は100マイクロリッターのCD4-IgGをコントロールとして使用する。ついで、ウェルを37℃、5%CO₂で4日間インキュベートする。5日目、各ウェルにトリチウム化チミジン(1.0mCi/ウェル; Amersham)でパルス処理する。6時間後、細胞を3回洗浄し、ついで標識の取込を評価する。

このアッセイの他の変形例では、PBMCをBalb/cマウス及びC57B6マウスの脾臓から単離する。アッセイ用培地(RPMI; 10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルビン酸塩)において新たに回収された脾臓から細胞を、顕微鏡検査用に細かく切断し、リンホライト(Lympholyte)M(Organon Teknika)上にこれらの細胞をオーバーレイすることによりPBMCを単離し、2000rpmで20分間遠心分離し、集め、アッセイ用培地における単核細胞層を洗浄し、アッセイ用培地に1x10⁷細胞/mlになるように細胞を再懸濁させる。ついで、アッセイは上記のように行われる。本発明の化合物におけるこのアッセイの結果を次の表8に示す。コントロールより正に増加しているとポジティブであると考えられ、180%以上の増加が好ましい。しかしながら、コントロールより多い値は全て、試験用タンパク質についての刺激効果を示す。

表8

PRO	PRO濃度	コントロールに対する増加パーセント
PRO1081	18.39 nM	275.5
PRO1274	58.32 nM	230.1
PRO10272	0.84 nM	201.5

【0124】

実施例8:皮膚血管透過性アッセイ(番号64)

本アッセイは、特定のPROポリペプチドが哺乳動物の注入部位において、単核細胞、好酸球及びPMN浸潤を誘発することにより免疫反応を促進及び炎症反応を誘発することを示すものである。当該皮膚血管透過性アッセイは次のように実施される。体重が350グラム又はそれ以上の無毛のモルモットがケタミン(75-80mg/Kg)及び5mg/

K g キシラジン (x y l a z i n e) 筋肉注射 (I M) で麻酔される。精製された P R O ポリペプチドのサンプル又は条件培地試験サンプルが、注入部位あたり $100\mu\text{l}$ で試験動物の背中に皮内注入される。動物あたり約 $10-30$ 、好ましくは約 $16-24$ 箇所の部位に注入が可能である。エバンスブルー色素 (1% に生理的食塩水で緩衝) の 1ml が心臓内に注入される。ついで注入部位における斑点が注入後 1 時間、 6 時間及び 24 時間で測定 (直径 mm) される。動物は注入後、適当な時間の後屠殺される。それぞれの皮膚注入部位は生体組織検査され、パラホルムアルデヒドで固定される。次に、皮膚は組織病理学検査のために準備される。各部位は皮膚への炎症細胞浸潤を検査される。可視的な炎症細胞の炎症を有する部位はポジティブとして記録される。炎症細胞は好中球、好酸球、単球、リンパ球であり得る。

10

少なくとも注入部位での最小血管周囲の浸潤は陽性として記録され、注入部位で浸潤のなかった場合にはネガティブとして記録される。結果は表 9 中に示される。

表 9

PRO	時間 (h r s)	浸潤
PRO1754	6.00	ポジティブ
PRO9912	6.00	ポジティブ

【 0 1 2 5 】

20

実施例 9：混合リンパ球反応 (M L R) における阻害活性アッセイ (番号 6 7)

本実施例は、一又は複数の P R O ポリペプチドが刺激された T リンパ球の増殖阻害剤として活性であることを示す。リンパ球の増殖を阻害する化合物は、免疫反応の抑制が好ましい治療において有用である。

このアッセイの基本的プロトコルは、Current Protocols in Immunology, Unit 3.12; J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober 編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Inc から出版のものに記載されている。

より特別には、このアッセイの一変形例では、末梢血液単核細胞 (P B M C) を哺乳動物個体、例えばヒトのボランティアからロイコフェレーシスにより単離する (一人のドナーには刺激物 P B M C を供給し、他のドナーにはレスポンダー P B M C を供給する) 。所望するならば、単離後に、細胞をウシ胎児血清及び D M S O 中で凍結する。凍結細胞をアッセイ用培地 (37°C 、 $5\%\text{CO}_2$) で一晩解凍し、ついで洗浄し、 3×10^6 細胞 / ml のアッセイ用培地 (R P M I ; 10% ウシ胎児血清、 1% ペニシリン / ストレプトマイシン、 1% グルタミン、 1% H E P E S、 1% 非必須アミノ酸、 1% ビルバート) に再懸濁させる。刺激物 P B M C は細胞を照射 (約 3000 ラド) することにより調製される。

30

このアッセイは：

$100:1$ の 1% 又は 0.1% に希釈された試験試料、

$50:1$ の照射された刺激物細胞、及び

40

$50:1$ のレスポンダー P B M C 細胞、

の混合物を三重ウェルに蒔くことにより調製される。 100 マイクロリッターの細胞培養培地又は 100 マイクロリッターの C D 4 - I g G をコントロールとして使用する。ついで、ウェルを 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で 4 日間インキュベートする。 5 日目、各ウェルにトリチウム化チミジン (1.0mCi / ウェル ; A m e r s h a m) でパルス処理する。 6 時間後、細胞を 3 回洗浄し、ついで標識の取込を評価する。

このアッセイの他の改良法では、P B M C を B a l b / c マウス及び C 5 7 B 6 マウスの脾臓から単離する。細胞を、アッセイ用培地 (R P M I ; 10% ウシ胎児血清、 1% ペニシリン / ストレプトマイシン、 1% グルタミン、 1% H E P E S、 1% 非必須アミノ酸、 1% ビルビン酸塩) において新たに回収された脾臓から顕微鏡検査用に細かく切断し、リ

50

ンホライトM (Organon Teknika) 上にこれらの細胞をオーバーレイすることによりPBMCを単離し、2000rpmで20分間遠心分離し、集め、アッセイ用培地における単核細胞層を洗浄し、アッセイ用培地に 1×10^7 細胞/mlになるように細胞を再懸濁させる。ついで、アッセイは上記のように行われる。

コントロール以下に減少していると阻害化合物としてポジティブであると考えられ、80%以下の減少が好ましい。しかしながら、コントロールより少ない値は全て、試験用タンパク質の阻害効果を示す。結果を表10に示す。

表10

PRO	PRO濃度	コントロールに対する減少パーセント
PRO1199	4.97 nM	70
PRO1199	49.65 nM	66.8
PRO1199	119.99 nM	56.6
PRO1556	2.75 nM	66.2
PRO4401	1.42 nM	73.6
PRO4401	14.16 nM	66.3
PRO10268	1.77 nM	75.0
PRO10268	17.66 nM	18.0

10

20

【0126】

実施例10：インサイツハイブリッド形成

インサイツハイブリッド形成は、細胞又は組織調製物内での核酸配列の検出及び位置測定のための強力で多用途の技術である。それは、例えば、遺伝子発現部位の同定、転写物の組織分布の分析、ウイルス感染の同定と位置測定、特定のmRNA合成における変化の追跡及び染色体マッピングにおける補助に有用である。

インサイツハイブリッド形成は、Lu及びGillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)のプロトコルの最適化バージョンに従って、PCR生成 ^{33}P -標識リボプローブを用いて実施される。簡単には、ホルマリン固定、パラフィン包埋ヒト組織を切片化し、脱パラフィンし、プロテインナーゼK (20mg/ml)で15分間37℃で脱タンパクし、さらに上掲のLu及びGillettに記載されたようにインサイツハイブリッド形成する。 [^{33}P] UTP-標識アンチセンスリボプローブをPCR産物から生成し、55℃で終夜ハイブリッド形成する。スライドをKodak NTB2核トラックエマルジョンに浸漬して4週間露出する。

30

【0127】

^{33}P -リボプローブ合成

6.0 μl (125mCi) の ^{33}P -UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol) をスピード真空乾燥させた。乾燥 ^{33}P -UTPを含む各管に以下の成分を添加した：2.0 μl の5x転写バッファー；1.0 μl のDTT (100mM)；2.0 μl のNTP混合物 (2.5mM：各10 μl の10mM GTP, CTP及びATP+10 μl の H_2O)；1.0 μl のUTP (50 μM)；1.0 μl のRnasin；1.0 μl のDNAテンプレート (1 μg)；1.0 μl の H_2O 。

40

管を37℃で1時間インキュベートし、1.0 μl のRQ1 DNaseを添加し、次いで37℃で15分間インキュベートした。90 μl のTE (10mMトリスpH7.6/1mMのEDTA pH8.0) を添加し、混合物をDE81紙にピペットした。残りの溶液をMicrocon-50限外濾過ユニットに充填し、プログラム10を用いてスピンのさせた (6分間)。濾過ユニットを第2の管に変換し、プログラム2を用いてスピンのさせ

50

た（3分間）。最終回収スピンの後、100 μ lのTEを添加した。1 μ lの最終生成物をDE81紙にピペットし6mlのBIOFLUOR IIで数えた。

プローブをTBE/尿素ゲル上で泳動した。1-3 μ lのプローブ又は5 μ lのRNAMark IIを3 μ lのローディングバッファーに添加した。95℃の加熱ブロック上で3分間加熱した後、速やかにゲルを氷上に置いた。ゲルのウェルをフラッシングし、試料を充填し、180-250ボルトで45分間泳動した。ゲルをサランラップでラップし、-70℃冷凍機内で補強スクリーンを持つXARフィルムに1時間から一晩露出した。

【0128】

³³P-ハイブリッド形成

凍結切片の前処理 スライドを冷凍庫から取り出し、アルミニウムトレイに配置して室温で5分間解凍した。トレイを55℃のインキュベータに5分間配置して凝結を減らした。スライドを蒸気フード内において氷上の4%パラホルムアルデヒド中で10分間固定し、0.5xSSCで5分間室温で洗浄した（25ml 20xSSC+975ml SQH₂O）。0.5 μ g/mlのプロテイナーゼ中、37℃で10分間の脱タンパクの後（250mlの予備加熱RNaseフリーRNaseバッファー中の10mg/mlストック12.5 μ l）、切片を0.5xSSCで10分間室温で洗浄した。切片を、70%、95%、100%エタノール中、各2分間脱水した。

パラフィン包埋切片の前処理 スライドを脱パラフィンし、SQH₂O中に配置し、2xSSCで室温において各々5分間2回リンスした。切片を20 μ g/mlのプロテイナーゼK（250mlのRNaseフリーRNaseバッファー中10mg/mlを500 μ l；37℃、15分間）-ヒト胚又は8xプロテイナーゼK（250mlのRNaseバッファー中100 μ l、37℃、30分間）-ホルマリン組織で脱タンパクした。続く0.5xSSCでのリンス及び脱水は上記のように実施した。

プレハイブリッド化 スライドをBoxバッファー（4xSSC、50%ホルムアミド）-飽和濾紙で列を作ったプラスチックボックスに並べた。組織を50 μ lのハイブリッド形成バッファー（3.75gデキストラン硫酸+6ml SQ H₂O）で被覆し、ボルテックスし、キャップを外して2分間マイクロ波で加熱した。氷上で冷却した後、18.75mlのホルムアミド、3.75mlの20xSSC及び9mlのSQ H₂Oを添加し、組織を良くボルテックスし、42℃で1-4時間インキュベートした。

ハイブリッド形成 スライド当たり1.0x10⁶ c.p.のプローブ及び1.0 μ lのRNA（50mg/mlストック）を95℃で3分間加熱した。スライドを氷上で冷却し、スライド当たり48 μ lのハイブリッド形成バッファーを添加した。ボルテックスの後、50 μ lの³³P混合物をスライド上のプレハイブリッド50 μ lに添加した。スライドを55℃で一晩インキュベートした。

洗浄 洗浄は、2xSSC、EDTAで2x10分間、室温で実施し（400mlの20xSSC+16mlの0.25M EDTA、V_f=4L）、次いでRNase A処理を37℃で30分間行った（250ml RNaseバッファー中10mg/mlを500 μ l=20 μ g/ml）。スライドを2x10分間、2xSSC、EDTAで室温において洗浄した。緊縮性洗浄条件は次の通り：55℃で2時間、0.1xSSC、EDTA（20mlの20xSSC+16mlのEDTA、V_f=4L）。

【0129】

あるいは、種々のヒト組織からのポリA⁺RNA（レーン当たり2 μ g）を含有するマルチ組織プロットをClontech（Palo Alto, CA）から購入した。DNAプローブをランダムプライムDNAラベルビーズ（Pharmacia Biotech）により[α -³²P]-dCTPでラベルした。ハイブリッド形成はExpresshyb（Clontech）を使用し、68℃で1時間行った。ついで、プロットを2xSSC/0.05%SDS溶液を用い、室温で40分間洗浄し、次に新鮮な溶液に変えて、0.1xSSC/0.1%SDS溶液を用い、55℃で40分間洗浄した。プロットをホスホイメジャー（phosphor imager）にさらした。

この方法は、遺伝子発現を定量し、転写の組織分布を分析し、特定の病気に罹ったヒト個

10

20

30

40

50

体から単離された発病組織における本発明の遺伝子／DNA及びタンパク質の特定のmRNA合成の変化を追うために使用された。これらの結果は、本発明の遺伝子が発現した発病組織においてより特異的に示され、本発明の阻害又は刺激化合物（及びそのアゴニスト又はアンタゴニスト）の病気に対する治療効果の特定の局在化をより予測している。ハイブリッド形成は、一又は複数の次の組織及び細胞試料を使用し、上述の方法に従い実施される：

（a）リンパ球及び抗原提示細胞（樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ及び単球、NK細胞）；

（b）リンパ組織：正常及び反応性リンパ節、胸腺、気管支関連リンパ組織（BALT）、粘膜関連リンパ組織（MALT）；

（c）ヒト疾患組織：

- ・関節炎及び変性関節疾患を患っている患者の滑膜及び関節；
- ・潰瘍性大腸炎及びクローン病を含む炎症性大腸疾患を患っている患者の結腸；
- ・乾癬及び他の形態の皮膚炎由来の皮膚病巣；
- ・慢性及び急性気管支炎、肺炎、間質性肺炎、胸膜炎由来のBALT及びリンパ節組織を含む肺組織；
- ・喘息由来のリンパ節組織及びBALTを含む肺組織；
- ・鼻炎又は副鼻腔炎を患っている患者の鼻又は洞組織；
- ・多発性硬化症、アルツハイマー病及び脳卒中由来の脳及び脊髄；
- ・腎炎、糸球体腎炎及び全身性エリテマトーデス由来の腎臓；
- ・感染性及び非感染性肝炎及びアセトアミノフェン誘導性肝硬変由来の肝臓；
- ・新生物／癌由来の組織。

細胞又は組織試料に関連する疾患における本発明の化合物（及びそのアゴニスト又はアンタゴニスト）の治療効果の局在化を示す発現が一又は複数の細胞又は組織試料において観察される。

【0130】

結果

DNA 54229-1366

5'UTRプローブを用いたマウスDNA 54229-1366発現の特異的パターン
正常な成体の大腸：粘膜の陰窩細胞中に強い分節状の発現が見られる。；この発現は陰窩細胞にのみ存在し、絨毛のおよそ上半分に伸展する。絨毛の端の上皮細胞は、シグナルを示さない。パターンは、分裂可能な粘膜上皮細胞の密度に相関する。このパターンが分節状、即ちシグナルを示さない大腸のある領域が存在するという事実は興味深い。

炎症を起こした成体マウス（IL10 KO（ノックアウト）マウス）の大腸：発現のパターン及び強度は正常な大腸に関して上述したものと類似するようである。

正常な成体の小腸：粘膜の陰窩細胞中に発現する分節状の領域が僅かに存在する。；発現は、大腸での発現に比べて非常に弱く、小腸管の僅かな部分にのみ見られる；小腸及び大腸の更なる評価により保証される。

正常及び炎症を起こした成体マウス肺：シグナル無し。

5'UTRプローブをマウス組織中で用いたDNA 54229-1366の特異的発現パターン

結果：DNA 54229-1366の発現分布は、正常マウス組織の広範囲に及ぶスクリーニングにおいてさらに評価された。既に、インサイトハイブリダイゼーションにより、DNA 54229-1366の発現が結腸上皮に限定されることを報告した。

概要：DNA 54229-1366の発現は、盲腸上皮中に最小限の伸展を伴い結腸上皮に特異的に限定された。発現はこれら上皮細胞中で強く、散在していた。回腸、空腸、十二指腸基部、又は胃には発現は見られなかった。以下の正常マウス組織では、発現は見られなかった：肝臓、腎臓、脾臓、骨髄、肺、膵臓、胃、十二指腸基部、空腸、回腸、脳、皮膚、精巣、又は乳腺。結腸上皮に限定された発現は、珍しい分布パターンであるため、興味深い。

DNA 54229-1366 のインサイツハイブリダイゼーションに用いられたプライマー

54229. p1

5' ' GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC C
CC TGA GCT TTC TGG AGA GTG 3' ' (配列番号19)

54229. p2

5' ' CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA G
TG CAG GAG ATC GTC TTA GGC 3' ' (配列番号20)

【0131】

DNA 64889-1541

10

さらなる新規血管形成組織に対する血管形成組織スクリーニングによるDNA 64889-1541の発現：肺血管炎、血管筋脂肪腫、浸潤性子宮内膜腺癌、糖尿病眼症、関節リウマチ。

結果：14. 5週の胎児表皮、肺上皮及び間質、食道上皮、及び骨格筋において、中程度から弱い発現が見られる。正常成体の組織には検出可能な発現は見られない；子宮内膜癌腫上皮は弱い発現を示す。2つのヒト臍帯静脈血管内皮（HUV EC）細胞ペレットの一方は弱い発現を示す。

DNA 64889-1541 のインサイツハイブリッド形成に用いられたプライマー

64889. p1

5' ' GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC G
GC CCC CAT GAC TCC TTA CCT 3' ' (配列番号21)

20

64889. p2

5' ' CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA C
CC ATC AGC ACA CGC ATC TC 3' ' (配列番号22)

【0132】

DNA 65351-1366

SPDI スクリーニング組織、乳癌腫及び結腸腺癌における5' UTRプローブを用いたマウスDNA 65351-1366発現の特異的パターン

ヒト胎児性組織：

胎児性の肝臓、肺、骨格筋、骨、脊髄、血管、心臓、腸、生殖腺、副腎、脊椎傍神経節には発現は見られない。

30

胎児性肢：長骨の骨髓腔中でクラスター化している造血細胞における弱いシグナル。

アカゲザル及びチンパンジーの組織

脳：シグナル無

舌：シグナル無

胃：腺性粘膜中に弱い矛盾するシグナル

甲状腺／副甲状腺：シグナル無

胸腺：シグナル無

神経：シグナル無

ヒト正常及び疾患組織：シグナル無：胸腺、脳、肺、副腎、脾臓、腎臓（正常及び変性）、皮膚、臍帯、肝臓（正常及び炎症性）、乳癌腫、結腸腺癌、腸間膜脂肪組織、乳脂肪組織。

40

眼：内部神経節眼層において弱いシグナル。

65351. p1

5' ' GGA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC C
GA GAG GCG CCT GCA GGA TGA 3' ' (配列番号23)

65351. p2

5' ' CTA TGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA T
CC AGC TCC CCC GCA ACC C 3' ' (配列番号24)

【0133】

50

実施例 11：ハイブリッド形成プローブとしての P R O の使用

以下の方法は、P R O ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のハイブリッド形成プローブとしての使用を記載する。

全長又は成熟 P R O のコード配列を含む D N A は、ヒト組織 c D N A ライブラリー又はヒト組織ゲノムライブラリーにおける同種 D N A 類（P R O の自然に生じる変異体をコードするものなど）のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

いずれかのライブラリー D N A を含むフィルターのハイブリッド形成及び洗浄は、以下の高い緊縮条件で実施した。放射性標識 P R O - 誘導プローブのフィルターへのハイブリッド形成は、5 0 % ホルムアミド、5 x S S C、0. 1 % S D S、0. 1 % ピロリン酸ナトリウム、5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6. 8、2 x デンハート液、及び 1 0 % デキストラン硫酸の溶液中で、4 2 ° C において 2 0 時間行った。フィルターの洗浄は、0. 1 x S S C 及び 0. 1 % S D S の水溶液中、4 2 ° C で行った。

次いで、全長天然配列 P R O をコードする D N A と所望の配列同一性を有する D N A は、この分野で知られた標準的な方法を用いて同定できる。

【0134】

実施例 12：大腸菌における P R O の発現

この実施例は、大腸菌における組み換え発現による P R O の非グリコシル化形態の調製を例示する。

P R O をコードする D N A 配列は、選択された P C R プライマーを用いて最初に増幅する。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターを用いることができる。好適なベクターの例は、p B R 3 2 2（大腸菌から誘導されたもの；B o l i v a r 等, G e n e, 2 : 9 5 (1 9 7 7) を参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは制限酵素で消化され、脱リン酸化される。P C R 増幅した配列は、次いで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、t r p プロモーター、p o l y h i s リーダー（最初の 6 つの S T I I コドン、p o l y h i s 配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、P R O コード化領域、ラムダ転写終結区、及び a r g U 遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、次いで、上掲の S a m b r o o k 等に記載された方法を用いて選択した大腸菌株の形質転換に使用される。形質転換体は、それらの L B プレートで成長する能力により同定され、次いで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミド D N A が単離され、制限分析及び D N A 配列分析で確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加した L B ブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培養は、続いて大規模培養の播種に用いられる。次に細胞を最適光学密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

更に数時間の培養の後、細胞を遠心分離して採集することができる。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化 P R O タンパク質を金属キレート化カラムを用いてタンパク質を緊密に結合させる条件下で精製することができる。

【0135】

以下の手法を用いて、大腸菌においてポリ H i s タグ形態で P R O を発現させてもよい。P R O をコードする D N A を選択した P C R プライマーを用いて最初に増幅する。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いで P C R 増幅された、ポリ H i s タグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株 5 2 (W 3 1 1 0 f u h A (t o n A) l o n g a l E r p o H t s (h t p R t s) c l p P (l a c I q)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用する。形質転換体は、最初に 5 0 m g / m l のカルベニシリンを含有する L B 中、3 0 ° C で振盪しながら 3 - 5 の O. D. 6 0 0 に達するまで成長させる。ついで培養を C R A P 培地 (3. 5 7 g の (N H ₄) ₂ S O ₄、0. 7 1 g

のクエン酸ナトリウム・ $2\text{H}_2\text{O}$ 、 1.07g の KCl 、 5.36g の Difco 酵母抽出物、 500mL 水中の 5.36g の $\text{Sheffield hycase SF}$ 、並びに 110mM の MPOS 、 $\text{pH}7.3$ 、 0.55% (w/v) のグルコース及び 7mM の MgSO_4 の混合で調製) 中に $50-100$ 倍希釈し、 30°C で振盪させながら約 $20-30$ 時間成長させる。試料を取り出して SDS-PAGE 分析により発現を確認し、バルク培養を遠心分離して細胞をペレット化する。細胞ペレットを精製及びリフォールディングまで凍結させる。

0.5 から 1L の発酵 ($6-10\text{g}$ ペレット) からの大腸菌ペーストを、 7M のグアニジン、 20mM のトリス、 $\text{pH}8$ バッファー中で 10 容量 (w/v) で再懸濁させる。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々 0.1M 及び 0.02M とし、溶液を 4°C で終夜攪拌する。この工程により、亜硫酸化によりブロックされた全てのシステイン残基を持つ変性タンパク質がもたらされる。溶液を $\text{Beckman Ultracentrifuge}$ 中で $40,000\text{rpm}$ で 30 分間遠心分離する。上清を金属キレートカラムバッファー (6M のグアニジン、 20mM のトリス、 $\text{pH}7.4$) の $3-5$ 容量で希釈し、 0.22ミクロン フィルターを通して濾過して透明化する。透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた 5ml の QiaGen Ni-NTA 金属キレートカラムに充填する。カラムを 50mM のイミダゾール ($\text{Calbiochem, Utrol grade}$) を含む添加バッファー、 $\text{pH}7.4$ で洗浄する。タンパク質を 250mM のイミダゾールを含有するバッファーで溶離する。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、 4°C で保存する。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて 280nm におけるその吸収により見積もる。

【0136】

試料を、 20mM のトリス、 $\text{pH}8.6$ 、 0.3M の NaCl 、 2.5M の尿素、 5mM のシステイン、 20mM のグリシン及び 1mM の EDTA からなる新たに調製したリフォールディングバッファー中でゆっくりと希釈することによりタンパク質をリフォールディングさせる。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が $50-100$ マイクログラム/ ml となるように選択する。リフォールディング溶液を 4°C で $12-36$ 時間ゆっくり攪拌する。リフォールディング反応は TFA を最終濃度 0.4% (約 3 の pH) で添加することにより停止させる。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を 0.22ミクロン フィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度 $2-10\%$ になるまで添加する。リフォールディングされたタンパク質を、 Poros R1/H 逆相カラムで、 0.1% TFA の移動バッファーと $10-80\%$ のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかける。 A_{280} 吸収を持つ画分のアリコートに SDS ポリアクリルアミドゲルで分析し、相同なリフォールディングされたタンパク質を含有する画分をプールする。一般的に、殆どのタンパク質の正しくリフォールディングされた種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。タンパク質の誤って折りたたまれた形態を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の折りたたまれた PRO ポリペプチドタンパク質を含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去する。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化した $\text{G25 Superfine (Pharmacia)}$ 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、 0.14M の塩化ナトリウム及び 4% のマニトールを含む 20mM の Hepes 、 $\text{pH}6.8$ に処方した。

上述したように、ここに開示された多くの PRO ポリペプチドが成功裏に発現した。

【0137】

実施例13：哺乳動物細胞での PRO の発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現による潜在的にグリコシル化した形態の PRO の調製を例示する。

発現ベクターとしてベクター pRK5 (1989 年 3 月 15 日公開の EP307,247

10

20

30

40

50

参照)を用いる。場合によっては、PRODNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてPRODNAを挿入させる。得られたベクターは、例えばpRK5-PROと呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞である。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び／又は抗生物質を添加したDMEMなどの培地中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化する。約10 μ gのpRK5-PRODNAを約1 μ gのVARNA遺伝子コード化DNA[Thimmappaya等, Cell, 31:543(1982)]と混合し、500 μ lの1mMトリス-HCl、0.1mMEDTA、0.227M CaCl_2 に溶解させる。この混合物に、滴状の、500 μ lの50mMHEPES(pH7.35)、280mMのNaCl、1.5mMの NaPO_4 を添加し、25 $^{\circ}\text{C}$ で10分間沈殿物を形成させる。沈殿物を懸濁し、293細胞に加えて37 $^{\circ}\text{C}$ で約4時間安定させる。培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加する。293細胞を、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートする。

形質移入の約24時間後、培地を除去し、培地(のみ)又は200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{35}S -システイン及び200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{35}S -メチオニンを含む培地で置換する。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15%SDSゲルに充填する。処理したゲルを乾燥させ、PROポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムにさらす。形質移入した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験する。

【0138】

これに換わる技術において、PROは、Somparyrac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575(1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 μ gのpRK5-PROを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄する。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートする。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、5 μ g/mlウシインスリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入する。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去する。次いで発現されたPROを含む試料を濃縮し、透析及び／又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製する。

他の実施態様では、PROをCHO細胞で発現させることができる。pRK5-PROは、 CaPO_4 又はDEAE-デキストランなどの既知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(のみ)又は ^{35}S -メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。PROポリペプチドの存在を決定した後、培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたPROを含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

また、エピトープタグポリペプチドは、宿主CHO細胞において発現させてもよい。PROはpRK5ベクター外でサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物は、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-*his*タグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-*his*タグポリペプチド挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカーを含むSV40誘導ベクター／エンハンサーにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をベクターを含むSV40プロモータ／エンハンサーで(上記のように)形質移入することができる。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-*his*タグPROを含む培地を次いで濃縮し、 Ni^{2+} -キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された任意の方法により精製できる。

またPROは、一過性発現法によりCHO及び／又はCOS細胞で、又は他の安定な発現方法によりCHO細胞で発現させてもよい。

【0139】

CHO細胞における安定な発現は以下の方法を用いて実施された。タンパク質はそれぞれのタンパク質の可溶化形態のコード配列（例えば、細胞外ドメイン）がヒンジ、CH2及びCH2ドメインを含むIgG1定常領域配列に融合したIgG作成物（イムノアドヘンシ）、及び／又はポリーhisタグ形態として発現する。

PCR増幅に続いて、それぞれのDNAを、Ausubel等、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてCHO発現ベクターにサブクロニングする。CHO発現ベクターは、対象のDNAの5'及び3'に適合する制限部位を有し、cDNAの便利なシャトル化ができるように作成される。CHO細胞における発現に使用されたベクターは、Lucas等、Nucleic Acids res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようなものであり、対象のcDNA及びジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)の発現の制御にSV40初期プロモーター／エンハンサーを用いる。DHFR発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドDNAの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect^R (Qiagen), Dospers^R又はFugene^R (Boehringer Mannheim)を使用し約一千万のCHO細胞に導入する。細胞は、上掲のLucas等に記載されているように成長させる。約 3×10^{-7} 細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させる。

プラスミドDNAを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合する。内容物を10mLの媒質を含む遠心管にピペットして、1000rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を10mLの選択培地(0.2µm濾過PS20、5%の0.2µm透析濾過ウシ胎児血清)中に懸濁させる。次いで細胞を90mLの選択培地を含む100mlスピナーに分ける。1-2日後、細胞を150mLの選択培地を満たした250mLスピナーに移し、37℃でインキュベートする。さらに2-3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーを 3×10^5 細胞/mLで播種する。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させる。任意の適切なCHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5,122,469号に記載された生産培地を使用した。3Lの生産スピナーを 1.2×10^6 細胞/mLで播種する。0日目に、細胞数とpHを測定する。1日目に、スピナーをサンプル化し、濾過空気での散布を実施する。2日目に、スピナーをサンプル化し、温度を33℃に変え、500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)の30mLとする。生産を通して、pHを7.2近傍に調節し維持した。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して0.22µmフィルターを通して濾過する。濾過物を、4℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填する。

【0140】

ポリーHisタグ作成物について、タンパク質をNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製する。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加する。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes, pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi-NTAカラムに4-5ml/分の流速で4℃においてポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離する。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー中で25mlのG25 Superfine (Pharmacia)を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

イムノアドヘンシ(Fc含有)作成物を以下のようにして条件培地から精製する。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH6.8で平衡化した5mlのプロテ

インAカラム (Pharmacia) に汲み上げる。充填後、100mMのクエン酸、pH 3.5で溶離する前に、カラムを平衡バッファーで十分洗浄する。溶離したタンパク質を、1mlの画分を275 μ lの1Mトリスバッファー、pH 9を含む管に回収することにより即座に中和する。高度に精製されたタンパク質を、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩する。均一性はSDSポリアクリルアミドゲルとエドマン (Edman) 分解によるN-末端アミノ酸配列決定により評価する。ここに開示したPROポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【0141】

実施例14：酵母菌でのPROの発現

以下の方法は、酵母菌中でのPROの組換え発現を記載する。

10

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのPROの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。PROをコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してPROの細胞内発現を指示する。分泌のために、PROをコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然配列PROシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌アルファ因子又はインベルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば) PRO発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

酵母菌株AB110等の酵母菌を、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清を、10%トリクロロ酢酸での沈降及びSDS-PAGEによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

20

続いて組換えPROは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。PROを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

ここに開示されるPROポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【0142】

実施例15：バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPROの発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるPROの組換え発現を記載する。

30

PROをコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させる。このようなエピトープタグは、ポリ-hisタグ及び免疫グロブリンタグ (IgGのFc領域など) を含む。pVL1393 (Novagen) などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、PROをコードする配列又はPROのコード配列の所望部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列が、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、側方に位置する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

40

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGoldTM ウイルスDNA (Pharming) を、Spodoptera frugiperda (「Sf9」) 細胞(ATCC CRL 1711) 中にリポフェクチン (GIBCO-BRL から市販) を用いて同時形質移入することにより作成される。28℃で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いる。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilly等, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994) に記載されているように実施する。

50

【0143】

次に、発現されたポリ-*his* タグPROは、例えば Ni^{2+} -キレートアフィニティクロマトグラフィーにより次のように精製することができる。抽出は、Rupert等, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製する。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mLのHepes、pH7.9; 12.5mMの MgCl_2 ; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を充填バッファー(50mMリン酸塩、300mMのNaCl、10%グリセロール、pH7.8)で50倍希釈し、0.45 μm フィルターで濾過する。 Ni^{2+} -NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5mLの総容積で調製し、25mLの水で洗浄し、25mLの充填バッファーで平衡させる。濾過した細胞抽出物を、毎分0.5mLでカラムに充填する。カラムを分画回収が始まる点である A_{280} のベースラインまで充填バッファーで洗浄する。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50mMリン酸塩; 300mMのNaCl、10%グリセロール、pH6.0)で洗浄する。 A_{280} のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMイミダゾール勾配で展開する。1mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に結合した Ni^{2+} -NTAでのウェスタンブロットで分析する。溶離したHis₁₀-タグPROを含む画分をプールして充填バッファーで透析する。

10

20

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)PROの精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む既知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

ここに開示されるPROポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【0144】

実施例16: PROに結合する抗体の調製

この実施例は、PROに特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術はこの分野で知られており、例えば、上掲のGodlingに記載されている。用いられ得る免疫原は、本発明の精製PRO、PROを含む融合タンパク質、及び細胞表面にPROを発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなく行うことができる。

30

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムの量で注入したPRO免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)に乳化し、動物の後足蹠に注入する。免疫化したマウスを、次いで10から12日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗PRO抗体の検出のためのELISAアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

40

適当な抗体価が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物に、PROの最後の静脈内注射を注入することができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出す。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、ATCC番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させる。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害する。

ハイブリドーマ細胞を、PROに対する反応性についてELISAでスクリーニングする。PROに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ(陽性)」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

ポジティブハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入し、抗PROモ

50

ノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの結合性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【0145】

実施例17：特異的抗体を用いたPROポリペプチドの精製

天然又は組換えPROポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロPROポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレーPROポリペプチドは、対象のPROポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗PROポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインA (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N. J.) での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインAでのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、CnBr-活性化セファロースTM (Pharmacia LKB Biotechnology) 等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がブロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のPROポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによるPROポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化PROポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有用な量で分泌される。

可溶化PROポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはPROポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下（例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー）で洗浄される。次いで、カラムは、抗体／PROポリペプチド結合を分解する条件下（例えば、約2-3といった低pH、又は高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロップ）で溶離され、PROポリペプチドが回収される。

【0146】

実施例18：薬物スクリーニング

本発明は、PROポリペプチド又はその結合断片を任意の種々の薬物スクリーニング技術において使用することによる化合物のスクリーニングに特に有用である。そのような試験に用いられるPROポリペプチド又は断片は、溶液中の遊離状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、細胞内に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの1つの方法は、PROポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定に形質移入される真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのような形質移入細胞に対して、競合的結合アッセイにおいてスクリーニングされる。そのような細胞は、生存可能又は固定化形態のいずれかにおいて、標準的な結合アッセイに使用できる。例えば、PROポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体の形成を測定してよい。あるいは、試験する試薬によって生ずるPROポリペプチドとその標的細胞又は標的レセプターとの間の複合体形成における減少を試験することもできる。

従って、本発明は、PROポリペプチド関連疾患又は疾病に影響を与えうる薬剤又は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、その試薬をPROポリペプチド又は断片に接触させ、(i) 試薬とPROポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は(ii) PROポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について、当該技術でよく知られた方法でアッセイすることを含む。これらの競合結合アッセイでは、PROポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、自由なPROポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、自由又は未

複合の標識の量が、特定の試薬がPROポリペプチドに結合する又はPROポリペプチド／細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についての高スループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に公開されたWO 84 / 03564に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。PROポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はPROポリペプチドと反応して洗浄される。結合したPROポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製したPROポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。さらに、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。

10

また、本発明は、PROポリペプチドに結合可能な中和抗体がPROポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイに使用されることも考慮する。この方法において、抗体は、PROポリペプチドで一又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

【0147】

実施例19：合理的薬物設計

合理的薬物設計の目的は、対象の生物学的活性ポリペプチド（例えば、PROポリペプチド）又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例の任意のものが、PROポリペ

20

プチドのより活性で安定な形態又はインビボでPROポリペプチドの機能を向上又は阻害する薬物の創作に使用できる（参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)）。
1つの方法において、PROポリペプチド、又はPROポリペプチド-インヒビター複体の三次元構造が、X線結晶学により、コンピュータモデル化により、最も典型的には2つの方法の組み合わせにより決定される。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、PROポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、PROポリペプチドの構造に関する有用な情報が相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることもある。両方の場合において、関連する構造情報は、類似PROポリペプチド様分子の設計又は効果的なインヒビターの同定に使用される。合理的な

30

薬剤設計の有用な例は、Braxton及びWells, Biochemistry, 31: 7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、又はAthauda等, J. Biochem., 113: 742-746 (1993)に示されているような天然ペプチドのインヒビター、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する分子を含む。
また、上記のような機能アッセイによって選択された標的特異的な抗体を単離しその結晶構造を解明することもできる。このアプローチは、原理的には、それに続く薬剤設計が基礎をおくことのできるファーマコア (pharmacore) を生成する。機能的で薬理学的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体 (抗-id) を生成することにより、タンパク質結晶学をバイパスすることができる。鏡像の鏡像として、抗-idの結合

40

部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。抗-idは、次いで、化学的又は生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するのに使用できる。単離されたペプチドは、ファーマコアとして機能するであろう。
本発明により、十分な量のPROポリペプチドがX線結晶学などの分析実験を実施するために入手可能である。さらに、ここに提供したPROポリペプチドアミノ酸配列の知識は、X線結晶学に換える、又はそれに加えるコンピュータモデル化技術で用いられる指針を提供する。

【0148】

上記の文書による明細書は、当業者が本発明を実施するためには十分であると考えられる。寄託された実施例は、本発明のある側面の一つの例証としてのものであり、あらゆる機

50

能的に等価な構築物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された構築物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの材料の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明のあらゆる側面の実施を可能にするには不十分であることを認めるものではなく、それが表す特定の例証に請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に変形することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【図１】 図１は、天然配列 PRO1081 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：１）を示す図であり、配列番号：１はここで「DNA54229-1366」と称されるクローンである。 10

【図２】 図２は、図１に示す配列番号：１のコード配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：２）を示す図である。

【図３】 図３は、天然配列 PRO1274 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：３）を示す図であり、配列番号：３はここで「DNA64889-1541」称されるクローンである。

【図４】 図４は、図３に示す配列番号：３のコード配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：４）を示す図である。

【図５】 図５は、天然配列 PRO1199 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：５）を示す図であり、配列番号：５はここで「DNA65351-1366」と称されるクローンである。 20

【図６】 図６は、図５に示す配列番号：５のコード配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：６）を示す図である。

【図７】 図７は、天然配列 PRO1754 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：７）を示す図であり、配列番号：７はここで「DNA76385-1692」と称されるクローンである。

【図８】 図８は、図７に示す配列番号：７のコード配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：８）を示す図である。

【図９】 図９は、天然配列 PRO1556 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：９）を示す図であり、配列番号：９はここで「DNA76529-1666」と称されるクローンである。 30

【図１０】 図１０は、図９に示す配列番号：９のコード配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１０）を示す図である。

【図１１】 図１１Ａ-１１Ｂは、天然配列 PRO4401 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：１１）を示す図であり、配列番号：１１はここで「DNA84912-2610」と称されるクローンである。

【図１２】 図１２は、図１１Ａ-１１Ｂに示す配列番号：１１のコード配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１２）を示す図である。

【図１３】 図１３は、天然配列 PRO9912 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：１３）を示す図であり、配列番号：１３はここで「DNA108700-2802」と称されるクローンである。 40

【図１４】 図１４は、図１３に示す配列番号：１３のコード配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１４）を示す図である。

【図１５】 図１５は、天然配列 PRO10268 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：１５）を示す図であり、配列番号：１５はここで「DNA145583-2820」と称されるクローンである。

【図１６】 図１６は、図１６に示す配列番号：１６のコード配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：１６）を示す図である。

【図１７】 図１７は、天然配列 PRO10272 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：１７）を示す図であり、配列番号：１７はここで「DNA147531-2821」 50

【図 7】

CTCCATTAAACACACACAGCTCCCAAGCAACCCCTCAGCGATGAAGTCTCTGCTCTGGCTTGGCG
 CCTCGAGATTCCATCAGAGTATCCACAGCGAGTCCAGCGGGTCAAAATGTGTGATACACACCCACAGA
 TACTCGAGGACATGTTGCCATCGGGGAGACAGCATGTTTCATGTGCACGCTTCCAGAAATGCTGCAT
 CAGCTACTCCTCTCTGCCGAAGCTGACCTACCAACAGCTCATCGGTAAACACTGGCAATCAAGGAGAAGA
 ACACACAAAGGAAGACAAGAACCAACAGCCGTAAACATCAATAAACCTGCTATCGCTCCACACA
 ACTCAGAGAAATATCATTTCCACAGTTCCTAATCTCTCTACATTTGCTGAGTACTAGCCAAAGGCTCCTCTTT
 ATGGGGCAGATATCTATAGCCACCCCAAACTTCTGTCTCTATCATTTCTGTCATTCACTAGTAACATAA
 TTTGGAGTTTGTATCTATCTACAGAGAACAATCATCATGAGATTCTGCCACAGGGGATCTGTCAGTTTGG
 GTCTCCAAATGAAGAATGTCAAGACAATTTGACATGCAAAAGATTGACTGGGAGAACACCTCTGTAT
 GAGCAAGGTGAGACAGACGCCACAGGCGAGGAGGCTTCAAGCTGCACGCTGGCGTGAATGCTC
 AAAGGAGAGAGGGATAGAGAGGATTGAATAGAGAGGACTAAGACTGCAGCTCTAAGAAAGTCTCAGCCA
 AACAGATGGGAGGCCCAAGACAGGCTTGCCCTTCAGRGAGCTCAGCGAGGCGAGGAATAGCGAGGTTCT
 TCATATCCAGGGGTTCAAGCTTGGCTGAGAACAGCCCTGGAGAACATGGGGTGACTGCTACCATAGGCT
 TGGAAATATGAGGCTGCTCCACCAATCTCCCTTGAAGCAAGTCTCTTGAAGAAAGATCTAAACAGTGCA
 CCCCCATGGCTGCCACCGAGTATAGAGGGAGAGAAAGGCTGAAGTCTAGGTTTGGCCAGCTAGGTA
 GACTGACTTGTGAGGTATTTATTTATTTCAATTTGAGTAAACAAGCAGACAGATACATAGCCACCATTTGTA
 GTACACCCCAAAAGCAAGGATGCAATGATGCTGTGACTAAACGCTGCTCATGAGTGTCAATTTGCA
 TAATCCTCTTGGGAGCTGTGTGGAATAAGCACAGAGAAAGCAAGCTTAATTGCTTAACTCACTAAACA
 TTAATCTTGGGAATTTGGCTCATCTAATAATTATCCAAAGAGAACCAAAATTTGGCCAGGATTTCC
 ATATAAATATATTTAAATGCTGAGAAATGAAAAATCTAAATGGTGAATATATATAATGCTCATAT
 AAATGACAAATAAGATTTTATAGAAATTAATGAAACATATAACATTTCAAAATTCGATTTATGCTA
 TAGTTGTCAAAATTTGTCTCTTATATGATACAAAGCTCATGAAATTTATGCTTTTGTGTTGGAA
 GCAAGATATGCAATAAATTTCTTACATGTCAGTGCCATTAAGTTTATATAATTTATTTGACAGT
 ACTGACTTCTATCTGAGAGAACCAACCAACACTCAGGCTTAATAATTAATAAGGCTCTAAATACTA
 GCAACACAGATAGAAAGATTTAATGCCATTCCCTAATCTATGCTTAGACCAAAATTAATTTAGAT
 GGTTTTAAATGACAGTGTAAAGTAAAGTATTAAAGATTGTGTGCTCAATATTCAATTTAAAGCAAG
 GAAATTTCTATAAATATAACATAGAGGAGAACTCATGTAAGAATAAATGATTAGGTGATATAAATAT
 TAAAGTTCTATGATGTCAAAAGATATCATTTGAAATTCATCATCTTATTTGGTATTGACAGGATTCAT
 TCTGTTTGTGTTATAAATACTTCTTCGTATATGAATGATTTCAATTTGTATAGTGGTTTGTGATGGACA
 TTTGGTGTGTTCCAGTTTATGCTATTACAATAAGCTCTCTATGAACATTATGTACA

【図 8】

MKFLLLVLAALGFLITQVIFASAGGSKVSNTPGYCRTCCHWGETALFMCNASRKCISY
 SFLPKFDLPQLIGNHWQRRRRNTQRKDKKQTVTS

シグナルペプチド

1-16

膜貫通ドメイン

無

N-グリコシル化部位

50-54

cAMP-及びGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位

79-83

N-ミristol化部位

23-29

【図 10】

MAAASAGATRLLLLLMAVAASPRARGSGCRAGTGARGAGAGREGREACGTVGLLLEHS
 FEIDDSANFRKRSLLIWNQDGTLSISQRQLESEERGLRDLVAALNGLYVRIRPRPRA
 LDLEAGGYVSSFPACSLVSHLSLQDILHVDVAGNVVGVSVTHPGGCRGHEVEDVD
 LELENTSVQLGPPTAPGPETAARFIERLEMGAKXNPQEKSFPAKYWMIIPVLF
 LMMSGAPDTGGGGGGGGGGGGSLCVPFSL

シグナルペプチド

1-24

膜貫通ドメイン

226-243

N-グリコシル化部位

182-186

cAMP-及びGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位

70-74

N-ミristol化部位

29-35

35-41

117-123

121-127

125-131

154-160

166-172

241-247

246-252

247-253

249-255

【図 11】

図 11 A

【図 9】

GTGACACTATAGAAGAGCTATGACGTGCGATGCAAGCTACGTAAAGCTCGGAATCGGGCT
 CGAGGCTGGTGGGAAGAGCCGAGATGCGCGAGCGAGGCTGGGGCAACCCGGCTGCTC
 CTGCTCTTGTGATGGCGGTAGCAGCGCCAGCTCGAGCCGGGGACGGGCTGCCGGGC
 GGGACTGGTGGCGAGGGGCTGGGGCGGAAGGTGAGAGGGGGGGGCTGTGGCACGGTGG
 GGGCTGCTGGAGCACTCATTTGAGATCGATGACAGTGGCAATTTCCGAGAGCGGGGC
 TCAGTGTCTGGAAACAGCAGGATGGTACCTTTGCTCTGTACACAGCGAGCTCGGGAG
 GAGGAGCGGGGCCGACTCCGGGATGGGCAAGCTGATGGCTGTACGGGCTCGGGATC
 CCAAGGCGACCCGGGGCCCTGGATGGCTGGAAGCTGGTGGCTATGTCTCTCTCTTGTG
 CCTGCTGCTCCTGCTGGTGGAGTGGCACTGTGCGAGCAGCTGACCTGCACTGGATGTG
 GCCGGCAAGTGGTGGGCTGTGCTGCTGCTGACGACCCCGGGGGCTGCCGGGGCATGAG
 GTGGAGGACGTGGACCTGGAGCTGTTCAACACTCGGTGAGCTGACGCGCCCAACACA
 GCGCCAGGCGCTGAGACGGCGGCTTCAATGAGCGCTGGAGTGGAAACAGGCGCAAG
 GCGCAAGAACCCAGGAGCAGAGTCTCTTTCGCAAAATCTGGATGTACATCATTTCC
 GTGCTCTGTTCTCATGATGTAGGAGCGCAGACACCGGGGGCGAGGCTGGGGTGGG
 GGTGGGGGTGGTGGTGGGGGTAGTGGGCTTTGCTGTGTGCCACCTTCTCTGAGTCTAT
 TTAATAAACATCGACGATACATTTGAATGTGTGAAGTGTGAAAAAGCTACAGCTCCAGC
 AGCCAAAGCAACTGTTGTGTTTGGCAAGCGGCTCTGATGTACAAAGCTTGATTTGAATTC
 ACTGCTCACTTGATAGCTTATTCAAGAAACCAAGGAATGGCTGCCCATCTCATGTGG
 CTGTGTGGGCTCAGCTGTGTTGTGTGGCACTTATTAAACTGTCCCGCAGATCGACAGC
 CAAAAAAA

図 11 B

GTGTTGTTGCTTACAGCATATGGTAACCAAGGTTAGATGCCAGTTAAAAATTCCTTAGAA
 ATTGGATGAGCCTTGAGATTGCTTCTTAACGGGACATGACATTTTCTAGCTCTTATCA
 AGAATAACAACCTTCCATTTTTTTTAAACCTGACATTTTGACTTTTTTATGGTATAAAAA
 CAATAAATTATAAACATAAAGCTCATTTGTGTTTTTGAAGCTTTGATATTTTATGATAC
 GTACAAACTTTATTAATCAAGATGAAGAACCTACAGGACAGATCTCTTTCAGTGTGTA
 CATCAGTGGCTTTGTAGCAAAATGCTGTGTGGACCTGGACGCTATAACTTATGTAA
 AGACCTTGGAAATGGGACATAAGCTCTTCTCTTCTTCTTGTACTGTATTTAGTTGTG
 ATAAATTTTTCTGTTGTGATATTTATGCTCTAAATCACTACACAAATCCCATATTAAAA
 TATACATTTGACTGAAAAAAA

【図 1 2】

MALERLCSVLKYLILITVIVVEGIAVAQKTDQGGNIGIKHIPATQCGIIVVRTSNGGHFAS
PNYPDSYPMKKECIVILDAAPKQRIELTFDEHYIEPSFECKRFDHLEVRDGPFGFSPLI
DRYCGVKSPFLIRSTGRFWIKFSSDEELGLGFRAKYSITFDPDFTYLGGILAFIPDC
QFELSGADGIVRSSQVEQEKTKPGQAVDCIWTIKATPKAKIYLAFLOYQMEHSHNECKR
NFVAVYDSSSLENLAKFCSTVANDVMLKTIQVIRMWADGGSRLSRFMLFTSFVEP
PCTSTFFCHSNMCINNSLYCNQGMQACAYPDEHHCCKKKAGVFEQITKTHGTIIGIT
SGIVLYLIIISLYVQVKPRKKVMACKTAFNKTGFGQVDFDPHYELFSLADKEISADLA
DLSEELDNYQKMRSSSTASRCIHDHCGSQASSVKQSRNTLSMELPFRNDFAPQPMK
TFNSTFKKSSYTFKQGHECPEQALEDRVMEETPCEIYVRGREDSAQASISIDF

シグナルペプチド

1-22

膜貫通ドメイン

348-369

N-グリコシル化部位

311-315

385-389

453-457

475-479

cAMP-及びGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位

426-430

479-483

N-ミリスチル化部位

22-28

32-38

54-60

186-192

279-285

318-324

348-354

352-358

441-447

シグナルペプチド

1-22

膜貫通ドメイン

無

N-グリコシル化部位

100-104

121-125

146-150

168-172

267-271

N-ミリスチル化部位

92-98

134-140

144-150

151-157

161-167

446-452

ロイシンジッパーパターン

286-308

【図 1 3】

AGCA**ATG**AGAGGGCTGGCCGTCCTCCTCACTGTGGCTGTGGCCACGGCTCTGGCTCCCGGG
GCCGGAGCACCGGTACAAAGTCAGGGCTCCAGAACAGCTGCTCTGGTGTCTTCGAC
GGCTTCGCGTGGAACTACGACCAAGGTGTGACACCCCACTGGACGGCATGGCCCGA
GACGGGTTGAAGGCACGCTACATGACCCCGCTTTGTACACTGACACCGCCCTGGCAC
TTCACCTGGTCACCGGCAATATATCGAGAACACAGGGGTGTACACACATGTACTAC
AACATCACAGCAAGGTGAAGTGCCTACACGGCCACGCTGGGCATCGAGGGTGGTG
GACACGGCCAGCGTGCCCATCTGGATCACAGCCAGAGGCGAGGGCTGTGGGTGCTCC
TTCCTCTACCCGGGCGGGACGCTCACCTACCAAGGGTGGCTGTGACCGGGAGCCGGA
GAAGGCATCGCACACAACACAAAAATGAGACGGAGTGGAGAGCGAACATCGACACAGTG
ATGGCGTGGTTCACAGAGGAGGACCTGGATCTGGTCACACTCTACTTCGGGGAGCCGGAC
TCCACGGGCCACAGGTACGGCCCGGAGTCCCGGGAGGAGGGAGATGGTGGGGACGGTG
GACCGGACCGTGGGCTACCTCCGGGAGAGCATCGCGCGCAACCACCTCACAGACCCGCTC
AACCTGATCATCACATCCGACCAAGGATGACGACCGTGGACAAACGGGCTGGCGACCTG
GTTGAATTCACAAGTTCGCCAATCTCACCTTCGGGACATCGAGTTTGAAGTCTCTGGAC
TACGGACCAACAGGGATGCTGCTCCCTAAGAGAGGGAGGCTGGAGAGGTGTACGATGCC
CTCAAGGACGCCACCCCAAGTCCACGTCTACAGAGAGGAGGCGTTCCCGAGGGCTTC
CACTACGCCAACACCCCGGGTACACCCCTGCTGATGTACAGCGACCTTGGCTACGCTC
ATCCATGGGAGATTACGTCAGTCCAGTTCAACAATGGGAGCACGGCTTTGACACAAGGAC
ATGGACATGAAGACCATCTTCGCGCTGTGGGCCCTAGCTTCAGGGCGGGCTGGAGGCG
GAGCCCTTTGAGAGCGTCCACGTGTACGAGCTCATGTGCCGGCTGCTGGGCATGTGTGCC
GAGGCCAACGATGGGCACCTAGCTACTGCTGCTGCCATGCTGCACACAGAATCTGCTCTT
CGCCCTGATGGAGGGCTACTCTCCTGCCAAGGGAGATCTGCTCTCCGCGCCAGCAGC
AGGCCCTCTCTGTGATGGGACTGCTGGGGACCGTGATTTCTTGTCTGAGGTGGCA**TA**
CGCCCATGGCTCAAGGAAGCCCGGGAGCTGCCGGAGGCTGGCCGAGGCGCTGGGCGGCTGTCTCG
CTGGAGTGTCTGTGGTGGGAGCGGACCTGCTCCCGAGCTTATCCAGGGCCAGAGG
CTGATGCCACTGTCCCGGCGGCGCAACCCCTGCTGGCTGTATGGTGTGTGTGTATA
AGCTTCGACGCCAGGTCCAGAGCCCGCGGAGCCGCTCCATTAACGGGCGCTGCGCC
CTGCCCTGCTCTCTGCTCTCCCTTCGGGCCCTCTCTCTGCAAAACCGCTGCCGAA
CGCGCGCTGCGCTCTGACGACACGCGGGGCGCGGGAGCTCTCGGGCGCTGGAACTC
GCAGACCCGCGCTCGGTACGTGGGAGGGCGCGCCCGGCGCAAAAGACCCATGGGAAT
AAAGGCCAAGCCGCGCAGTCAAAAAAAAA

【図 1 5】

ACACTGGCCAAACGGGCTCGCCCTCGGCTCGGCTCGGCTCCCGGGGCGCTCGGCCCC
GAGCCCCCTCTCCCTACCCGCGCGGACAGGGAGGAGCCAA**AG**GGCTGGGCTGCCA
TCCACACCGCTCCCATGCTGTCTCTCTCTCTCTGTCGCCAGCTGAGCTGGCAGGCG
CCCTTGACCTGGGACCCCTGCCCGGAACCTCCCTGAGAATCACATGACCTCCAGGCC
CAGCGTGTGGAGCGCTCAGGCCAGCCACACCGCGGGGCGCGGCGAAGAGGAGT
GGGGCCAGGCTGCCCAGCGAGGCCAGGATGGGCTGTGGTCACCGCCACAGGCAAG
CTCCAGGCTGCCAGAGGCTGAGGGGCTGCTGCTGAGCAGATCTCTGAGGCTGCTGC
AGGACAAGGACCTGCTCTGGGACTGGCATTTGCCCTACCCGAGAGGAGAACAGACCTC
CAGGTTGGGAGGAGCACGGAACCGCAGCAGGGAGCACAAAGAGACGCGAGGACAGGTTGA
GGCTGCACCAAGGCCGAGGCTTGGTCCGAGGTCACAGCTCCCTGATGAAGAAGGCAAGC
TCTCCGAAGCCAGGCTGTGGATGCAGCCATGGAGGAATCCTCCACAGCTCTGGCGCCA
CAATGTTCTTTCTCACACACTTTGAGGACGACCTGCCACAGAAAGATCCCTGATCCTGC
CGCTCACCTCCCTGGGCGCGGCGGAGGACAGGCTGAGGAGCTTAAGACTTAAGACTGATGGTGGC
CCTCTGCAGAAAGAAAGAGAAACCCCGGTAACCTCTCAGTGTGTGAACAGAACT
CACCAGCCGAAGGGGAACATGCGACCATCACCAAGCTGCTGCCAGGACTTGTGG
ACCTCGGGAGCATCTCTGCACACCCACACAGGAGGCTCAACACAAATGCTTGCATG
ACTGCATGTGTGTGGAAGGGCTGCGCTGCTATGCCAAATTCACCGGACCGCAGGGTTA
CAGGAGGAAGGGGCGCTGTGTGGAGCCGAGAGCGGCCAACGGACGACAGGAGCTTCTCA
TCAACGTCT**AG**CGGCGCCCGGGGACTGGGACTGAGCCAGAGGTTTGCACAAAGCCGGG
CGATTTGTTGTAACTAGCAGTGGGAGATCAAGTTGGGGAACAGATGGCTGAGGCTGCAG
ACTCAGGCCAGGACACTCAACCC

【図 16】

MAGPAIHHTAFMLFVLLLPQISLAGALAPCTPARNLFENHIDLPGPALWTPQASHHRRR
GPGKKENWGFLPSQAQDCVVTATRQASRLPEARGLLEQS PAGILLQDKDLLLAGLALFY
PEKENRPPGWERTTRKRSREHKRRDRRLRLHQGRALVRGPSSLMKKAEISEAQVLDAME
ESSTSLLAFTMFFLTTFEAAAPTEESLILPVTS LAPQQAQPRSDGEVMEPTLDWALFDWTD
YEDLKPDGWPSAKKKEKHRGKLSSDGNETSPAEGEPCDHHQDCLPGTCCDLREHLCTPH
NRGLNNKCFDDCMCVEGLRCYAKFHRNRVRTRKGRCVEPETANGDQGSFINV

シグナルペプチド

1-24

膜貫通ドメイン

無

N-グリコシル化部位

263-267

cAMP-及びcGMP-依存性プロテインキナーゼリン酸化部位

132-136
323-327

N-ミリスチル化部位

77-83
343-349

アミド化部位

61-65

【図 17】

GGCTTGCTGAAAATAAAATCAGGACTCCTAACCTGCTCCAGTCAGCCTGCTTCCACGAGG
CCTGTGCTCAGTGCCCGACTTGTGACTGAGTGTGCACTGCCACGATGTACCAGGTGAG
TSCAGAGGGCTGCTGAGGGCTGTGCTGAGAGGGAGAGGAGCAGAGATGCTGCTGAGGGT
GGAGGAGGCCAAGCTGCCAGGTTTGGGGCTGGGGCCCAAGTGGAGTGAGAAATGGGAT
CCCAGGGGGAGGCTGCAGATGAGGGAGCCGACCCAGATTAGGTGAGGACAGTTCTCTCATT
AGCCTTTTCTACAGTGTGTGCTTGTGGCAATGTCTATGGGAACCCACACCTACAGC
CACTGGCCAGCTGCTGCCCAGCAAGGGCAGGACACCTCTGAGGAGCTGCTGAGGGTGG
AGCACTGTGCCTGTGCTCCCTTAGAGCTGCTAGGCCCAACCGCCACCCAGAGTCTCTGT
AGGGCCAGTGAAGATGGACCCCTCAACAGCAGGGCCATCTCCCTCTGGAGATATGAGTTG
GACAGAGACTTGAACGGCTCCCCAGGACCTGTACCAACGCCCTTGCTGTGCCCGCAC
TGCCTCAGCCTACAGACAGGCTCCCACTGGRACCCCGGGGCCAATCGGAGCTGCTCTAC
CACAAACAGACTGTCTTCTACAGCGGGCATGCCATGGCGAGAAGGGCACCCACNAGGGC
TACTGCTGGAGCGCAGGCTGTACCGTGTCTCTTAGCTTGTGTGTGTGTGCGGCCCGCT
GTGATGGGCTAGCCGACCTGCTGAGGCTGTGCTCCCTTTTGGGAAACCTGGAGCCAGGT
GTACAACCACTTGCCATGAAGGGCCAGGATGCCCAGATGCTTGGCCCTCTGGAAGTGGTG
TCTGGAGCAGCAGGATCCCGGACAGGATGGGGGGCTTTGGGGAAACCTGCACTTCTGC
ACATTTTGAAGAAGAGCTGCTGCTTAGGGCCGCCGGAAGCTGCTGTCTCTCTTTCC
TCTCAGGAAGAGTTTCAAGTTCTGCCCATTTCTGGAGGCCACCACTCCTGTCTCTTCC
TCTTTTCCATCCCTGCTACCTGGCCAGCAGGCACTTTCTAGATATTTCCCTT
GCTGGAGAAGAAAGAGCCCTGTTTATTTGTTGTTTACTCATCATCATGAGGATC
TACTTTGGTGATTTCTAGTGTAGTTACTAGTCTTTTGACATGGATGATTCTGAGGAGGA
AGCTGTTATTGAATGTATAGAGATTTATCCAATAAATATCTTTATTAAAAATGAAPAA

【図 18】

MRERPRIGEDSSLSLIFLQVVAFLLMVMGTHYSHWPSCCPKQDTSSELLRWSTVPV
PPLEPARENRHPESCRASEDGPLNSRAISFWRYELDRDLNRLPDLYHARCLCPHCVSL
QTGSHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRFCHGEKGTHKGICYLERRLRVSLACVCPVRPRVMG

シグナルペプチド

1-32

膜貫通ドメイン

無

N-グリコシル化部位

136-140

チロシンキナーゼリン酸化部位

127-135

N-ミリスチル化部位

44-50
150-156

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P 11/02
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/02
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/00
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/08
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 1
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K 14/47
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 16/18
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 0 7 K 16/46
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z
			G 0 1 N 33/53 D
			C 1 2 P 21/08

- (31)優先権主張番号 60/172,059
 (32)優先日 平成11年12月23日(1999.12.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/175,481
 (32)優先日 平成12年1月11日(2000.1.11)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/177,118
 (32)優先日 平成12年1月20日(2000.1.20)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US00/04342
 (32)優先日 平成12年2月18日(2000.2.18)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/187,202

- (32)優先日 平成12年3月3日(2000.3.3)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 PCT/US00/14941
(32)優先日 平成12年5月30日(2000.5.30)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/209,832
(32)優先日 平成12年6月5日(2000.6.5)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 PCT/US00/23328
(32)優先日 平成12年8月24日(2000.8.24)
(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-1093

- (72)発明者 ゴッダード, オードリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サンフ ランシスコ, コンゴ ストリート 110
(72)発明者 ゴドフスキー, ポール, ジェー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズ バラ, オレンジ コート 25
(72)発明者 グリマルディ, クリストファー, ジェー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94122, サンフランシスコ, サーティーシックス ス アベニュー 1434
(72)発明者 ガーニー, オースティン, エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモ ント, デビー レーン 1
(72)発明者 ヒラン, ケネス, ジェー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94114, サンフランシスコ, セワード ストリート 64
(72)発明者 タマス, ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94563, オリン ダ, レイ アベニュー 3
(72)発明者 ワタナベ, コリン, ケー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94556, モラガ , コーリス ドライブ 128
(72)発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズ バラ, サウスダウン コート 35
(72)発明者 ツァン, ツェミン.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォス ター シティ, トーラス ドライブ 876

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 国際公開第98/058061 (WO, A1)
Genome Res., 1996年, Vol.6, No.9, p.791-806

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-90
C12N 1/00-9/99
C12P 21/00-08
C07K 14/00-19/00
C12Q 1/00-70
G01N 33/00-98
A61k 31/00-48/00
A61P 1/00-43/00

PubMed、MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq
UniProt/GeneSeq