

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6968696号  
(P6968696)

(45) 発行日 令和3年11月17日 (2021. 11. 17)

(24) 登録日 令和3年10月29日 (2021. 10. 29)

(51) Int. Cl.	F I	
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 29/00 (2006. 01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00 (2006. 01)	A 6 1 P 31/00	
請求項の数 12 (全 92 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-510624 (P2017-510624)	(73) 特許権者	520317963
(86) (22) 出願日	平成27年8月21日 (2015. 8. 21)		インファン・リウ
(65) 公表番号	特表2017-528129 (P2017-528129A)		中華人民共和国・5 1 1 4 0 0・グアンドン・プロヴァンス・グァンジョウ・シティ
(43) 公表日	平成29年9月28日 (2017. 9. 28)		ー・パンユイ・ディストリクト・ユニバー
(86) 国際出願番号	PCT/CN2015/000602		シティ・タウン・モーシャン・ノース・パ
(87) 国際公開番号	W02016/026258		ーク・ビルディング・4・ルーム・1 2 0
(87) 国際公開日	平成28年2月25日 (2016. 2. 25)		6
審査請求日	平成30年8月21日 (2018. 8. 21)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	201410418773.1		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成26年8月22日 (2014. 8. 22)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		弁理士 実広 信哉
		(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 異常なレベル及び／又は活性の I F P 3 5 ファミリーのタンパク質に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための方法及び組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体における疾患又は障害の治療及び／又は予防のための、インターフェロン誘導タンパク質 3 5 k D ( I F P 3 5 ) 及び／又は N - M y c 相互作用タンパク質 ( N M I ) の産生及び／又は活性を防止又は低減する剤であって、

前記疾患又は障害は、炎症、感染症、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択され、

前記疾患又は障害は、異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I に関連し、

前記剤が、

I F P 3 5 及び／又は N M I の発現及び／又は活性を阻害又は低減する抗体又はその抗原結合断片；及び／又は

I F P 3 5 及び／又は N M I をコードしている遺伝子を標的とするアンチセンス R N A；及び／又は

I F P 3 5 に特異的に結合する抗体若しくはその抗原結合断片及び／又は N M I に特異的に結合する抗体若しくは抗原結合断片を含む、剤。

## 【請求項 2】

前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 9 に記載の重鎖可変領域、及び配列番号 10 に記載の軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の剤。

## 【請求項 3】

前記疾患又は障害が、炎症、及び敗血症からなる群から選択される、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の剤。

【請求項 4】

前記抗体又はその抗原結合断片が、1 以上の N I D ( N M I / I F P 3 5 ドメイン) に特異的に結合する、請求項 1 に記載の剤。

【請求項 5】

被験体における疾患又は障害の治療及び／又は予防のための医薬組成物であって、前記疾患又は障害は、炎症、感染症、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択され、

前記疾患又は障害は、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I に関連し、

前記医薬組成物は、有効量の、請求項 1 に記載の剤と、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とを含むことを特徴とする、医薬組成物。

【請求項 6】

有効量の、前記疾患又は障害の治療及び／又は予防するための医薬を更に含む、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記疾患又は障害が、炎症、及び敗血症からなる群から選択される、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記 I F P 3 5 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片及び／又は N M I に特異的に結合する抗体又は抗原結合断片が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、又は配列番号 8 内のエピトープに特異的に結合することを特徴とする、請求項 1 に記載の剤。

【請求項 9】

前記抗体又は抗原結合断片が、配列番号 2 のアミノ酸 8 1 ~ 1 7 0、1 7 7 ~ 2 6 8、1 2 4 ~ 2 2 0、又は 1 3 6 ~ 2 1 6 ;

配列番号 4 のアミノ酸 8 1 ~ 1 6 8、1 7 5 ~ 2 6 6、又は 1 3 4 ~ 2 1 4 ;

配列番号 6 のアミノ酸 1 0 4 ~ 1 9 3、2 0 2 ~ 2 9 3、又は 1 5 1 ~ 2 5 0 ; 又は配列番号 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 1 9 2、2 0 1 ~ 2 9 2、又は 1 5 1 ~ 2 4 0 内のエピトープに特異的に結合する、請求項 8 に記載の剤。

【請求項 10】

前記疾患又は障害が、過剰な免疫応答及び／又はサイトカインストームに関連する請求項 1 に記載の剤。

【請求項 11】

被験体における疾患又は障害の診断用キットであって、前記疾患又は障害は、炎症、感染症、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択され、

I F P 3 5 及び／又は N M I に特異的に結合する抗体を含む、前記被験体に由来する血清サンプル中の異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I を決定するための、キット。

【請求項 12】

前記疾患又は障害が、炎症、及び敗血症からなる群から選択される請求項 11 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2014 年 8 月 22 日に中国特許出願第 201410418773 . 1 号に対する優先権を主張し、その開示全文を全ての目的のために参照により本明細書

に援用する。

#### 【 0 0 0 2 】

幾つかの態様では、本開示は、異常なレベル及び／又は活性の I F P 3 5 ファミリーのタンパク質（ I F P 3 5 及び N M I を含む）に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための方法及び組成物；異常なレベル及び／又は活性の I F P 3 5 ファミリーのタンパク質に関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングのための方法及び組成物；並びに I F P 3 5 ファミリーのタンパク質の調節因子を同定するための方法及び組成物に関する。

#### 【 背景技術 】

#### 【 0 0 0 3 】

内因性危険信号は、炎症応答を誘発する壊死性細胞又はストレスを受けた細胞から放出される「損傷関連分子パターン」（ D A M P ）である。例えば、細胞は、感染又は傷害の後に免疫制御のために内因性 D A M P を産生する。非特許文献 1 ～ 3 を参照。公知の D A M P は、尿酸、コレステロール、及び A T P 等の低分子だけではなく（非特許文献 4 ～ 6 を参照）、高移動度群ボックスタンパク質 1（ H M G B 1 ）（非特許文献 7 及び 8 を参照）、熱ショックタンパク質（ H S P ）（非特許文献 9 を参照）、インターロイキン - 1（ I L - 1 ）（非特許文献 1 0 を参照）、インターロイキン - 3 3（ I L - 3 3 ）（非特許文献 1 1 を参照）、ミエロイド関連タンパク質 - 8（ M r p 8 ）及びミエロイド関連タンパク質 - 1 4（ M r p 1 4 ）（非特許文献 1 2 及び 1 3 を参照）等のタンパク質も含む。 D A M P は、病原体の排除及び損傷修復において重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、 D A M P によって炎症が無秩序に活性化されると、有毒なサイトカインが持続的に過剰発現し、これは、敗血症ショック及び全身性炎症反応症候群の主な危険因子となる。非特許文献 1 4 及び 1 5 を参照。

#### 【 0 0 0 4 】

何千ものサイトカインが免疫応答に関与している。サイトカインは、選択的に活性化又は抑制されることによって、複雑であるが、正確に制御されているネットワークを構成して、抗ウイルス機能又は免疫制御機能を果たしている。非特許文献 1 6 を参照。更に、サイトカインは、他の細胞活性、例えば、腫瘍成長の抑制、生体消耗の促進、及びアポトーシス誘導等にも広く関与していると考えられている。非特許文献 1 7 ～ 2 0 を参照。しかし、これらタンパク質の機能機序は、殆ど不明である。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 非特許文献 】

#### 【 0 0 0 5 】

【非特許文献 1】 Gallucci et al., Current Opinion in Immunology 13, 114 - 119 (2001)

【非特許文献 2】 Matzinger, Science 296, 301 - 305 (2002)

【非特許文献 3】 Hirsiger et al., Mediators of Inflammation, 315941 (2012)

【非特許文献 4】 Gombault et al., Frontiers in Immunology 3, 414 (2012)

【非特許文献 5】 Heil et al., Frontiers in Plant Science 5, 578 (2014)

【非特許文献 6】 Shi, Journal of Clinical Investigation 120, 1809 - 1811 (2010)

【非特許文献 7】 Tsung et al., Journal of Internal Medicine 276, 425 - 443 (2014)

【非特許文献 8】 Wang et al., Science 285, 248 - 251 (1999)

【非特許文献 9】 Tamura et al., Immunotherapy 4, 84

10

20

30

40

50

1 - 852 (2012)

【非特許文献10】Dinarelllo, Annual Review of Immunology 27, 519 - 550 (2009)

【非特許文献11】Liew et al., Nature Reviews Immunology 10, 103 - 110 (2010)

【非特許文献12】Vogl et al., Nature Medicine 13, 1042 - 1049 (2007)

【非特許文献13】Austermann et al., Cell Reports 9, 2112 - 2123 (2014)

【非特許文献14】Srikrishna et al., Neoplasia 11, 615 - 628 (2009)

【非特許文献15】Piccinini et al., Mediators of Inflammation, doi:10.1155/2010/672395 (2010)

【非特許文献16】Dinarelllo, Chest 118, 503 - 508 (2000)

【非特許文献17】Crusz et al., Nature Reviews Clinical Oncology, doi:10.1038/nrclinonc.2015.105 (2015)

【非特許文献18】Chen et al., Drug Design, Development and Therapy 9, 2941 - 2946 (2015)

【非特許文献19】Villeda et al., Nature 477, 90 - 94 (2011)

【非特許文献20】Eckhardt et al., Cell Death Disease 5, e1562 (2014)

【発明の概要】

【0006】

1つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35 (インターフェロン誘導タンパク質35kD) 及び/又はNMI (N-My c相互作用タンパク質) に関連する疾患又は障害を治療及び/又は予防する方法について本明細書に記載する。幾つかの実施形態では、前記方法は、かかる治療及び/又は予防を必要としている被験体に、前記被験体におけるIFP35 及び/又はNMI の産生及び/又は活性を防止又は低減する剤を有効量投与することを含む。

【0007】

前述の実施形態のいずれかでは、前記異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35 及び/又はNMI に関連する疾患又は障害は、過剰な免疫応答に関連し得る。前述の実施形態のいずれかでは、前記疾患又は障害は、サイトカインストームに関連し得る。前述の実施形態のいずれかでは、前記疾患又は障害は、炎症、感染症、臓器損傷、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択することができる。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35 及び/又はNMI に関連する疾患又は障害を治療するためのものであってよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35 及び/又はNMI に関連する疾患又は障害を予防するためのものであってよい。

【0008】

前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、IFP35 及び/又はNMI の発現及び/又は活性を阻害又は低減する分子 (例えば、低分子又はポリペプチド) を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、IFP35 及び/又はNMI の発現及び/又は活性を阻害又は低減する抗体又はその抗原結合断片を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、IFP35 及び/又はNMI をコードしている遺伝子を標的とするポリヌクレオチド (例えば、siRNA、shRNA、又はmiRNA) を含ん



でいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I をコードしている遺伝子を標的とするアンチセンスポリヌクレオチド（例えば、アンチセンス R N A ）を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I のオリゴマー化を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、インターフェロンの発現及び / 又は活性を阻害又は低減して I F P 3 5 及び / 又は N M I の発現及び / 又は活性を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の分泌を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I と I F P 3 5 及び / 又は N M I の細胞受容体との間の相互作用を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I と I F P 3 5 及び / 又は N M I の細胞表面受容体との間の相互作用を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。

10

**【 0 0 0 9 】**

前述の実施形態のいずれかでは、I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性の防止又は低減によって、炎症因子の発現及び / 又は活性の阻害又は低減、及び / 又は N F - B シグナル伝達の阻害又は低減が生じ得る。1つの態様では、前記炎症因子は、I L - 1 、 T N F - 、 i N O S 、 及び / 又は C D 8 6 を含み、前記 N F - B シグナル伝達は、T L R 4 等の T L R によって媒介される。

**【 0 0 1 0 】**

前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、I F P 3 5 に特異的に結合する抗体若しくは抗原結合断片及び / 又は N M I に特異的に結合する抗体若しくは抗原結合断片を含んでいてよい。1つの態様では、前記抗体又は抗原結合断片は、1以上の N I D ( N M I / I F P 3 5 ドメイン ) に特異的に結合する。

20

**【 0 0 1 1 】**

前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤を投与することを更に含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、経口、経鼻、吸入、非経口 ( p a r e n t a l ) 、 静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、局所、又は直腸内経路を介して投与してよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、前記被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を、異常に高いレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を有しない同等の被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性のレベルと実質的に同一のレベルまで低減する量で投与してよい。

30

**【 0 0 1 2 】**

前述の実施形態のいずれかでは、前記被験体は、哺乳類であってよい。幾つかの実施形態では、前記哺乳類は、ヒト又は非ヒト哺乳類であってよい。

**【 0 0 1 3 】**

別の態様では、被験体における異常に高いレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための医薬組成物について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記医薬組成物は、有効量の、被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を防止又は低減する剤と、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とを含む。前述の実施形態のいずれかでは、前記医薬組成物は、有効量の、被験体における異常に高いレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための医薬を更に含んでいてよい。

40

**【 0 0 1 4 】**

更に別の態様では、被験体における異常に高いレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための医薬を製造するための、被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を防止又は低減する剤の有効量の使用について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記異常に高いレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害は、炎症、感染症、敗血症、臓器損傷、及び自己免疫疾患である。

50

## 【0015】

更に別の態様では、I F P 3 5 及び / 又は N M I に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、又は配列番号 8 内のエピトープに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号 2 のアミノ酸 8 1 ~ 1 7 0、1 7 7 ~ 2 6 8、又は 1 3 6 ~ 2 1 6 内のエピトープに特異的に結合する。他の実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号 4 のアミノ酸 8 1 ~ 1 6 8、1 7 5 ~ 2 6 6、又は 1 3 4 ~ 2 1 4 内のエピトープに特異的に結合する。更に他の実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号 6 のアミノ酸 1 0 4 ~ 1 9 3、2 0 2 ~ 2 9 3、又は 1 5 1 ~ 2 5 0 内のエピトープに特異的に結合する。他の実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号 8 のアミノ酸 1 0 3 ~ 1 9 2、2 0 1 ~ 2 9 2、又は 1 5 1 ~ 2 4 0 内のエピトープに特異的に結合する。

10

## 【0016】

別の態様では、I F P 3 5 及び / 又は N M I に特異的に結合する抗体又は抗原結合断片について本明細書に開示し、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 9 に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域 ( C D R ) のアミノ酸配列からなる C D R を含む重鎖可変領域、及び / 又は配列番号 1 0 に記載の軽鎖可変領域配列における C D R のアミノ酸配列からなる C D R を含む軽鎖可変領域を含む。1 つの実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号 9 に記載の重鎖可変領域と、配列番号 1 0 に記載の軽鎖可変領域とを含む。

20

## 【0017】

前述の実施形態のいずれかでは、前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又は二重特異性抗体であってよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記抗原結合断片は、F a b 断片、F ( a b ) 2 断片、F v 断片、又は s c F v 断片であってよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記抗体又は抗原結合断片は、ヒト重鎖定常領域とヒト軽鎖定常領域とを更に含んでいてもよい。

## 【0018】

前述の実施形態のいずれかでは、前記抗体又は抗原結合断片は、完全ヒト抗体若しくは抗原結合断片又はヒト化抗体若しくは抗原結合断片であってよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記抗体又は抗原結合断片は、組み換え的に産生してもよい。

30

## 【0019】

1 つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び / 又は活性及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療及び / 又は予防する方法について本明細書に開示する。前記方法は、かかる治療及び / 又は予防を必要としている被験体に、有効量の前述の実施形態のいずれかに係る抗体又は抗原結合断片を投与することを含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記疾患又は障害は、過剰な免疫応答に関連し得る。前述の実施形態のいずれかでは、前記疾患又は障害は、サイトカインストームに関連し得る。前述の実施形態のいずれかでは、前記異常に高いレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害は、炎症、感染症、臓器損傷、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択してよい。前述の実施形態のいずれかでは、I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性の防止又は低減によって、炎症因子の発現及び / 又は活性の阻害又は低減、及び / 又は N F - B シグナル伝達の阻害又は低減が生じ得る。1 つの態様では、前記炎症因子は、I L - 1、T N F - 、i N O S、及び / 又は C D 8 6 を含み、前記 N F - B シグナル伝達は、T L R 4 等の T L R によって媒介される。

40

## 【0020】

1 つの態様では、I F P 3 5 及び / 又は N M I に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片をコードしている単離ポリヌクレオチドについて本明細書に開示する。幾つかの実施形態では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 9 に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域 ( C D R ) のアミノ酸配列からなる C D R を含む重鎖可変領域、及

50

び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含む。幾つかの態様では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域と、配列番号１０に記載の軽鎖可変領域とを含む。

#### 【００２１】

また、１つの態様では、前述の実施形態のいずれかに係るポリヌクレオチドを含む単離ベクターについて本明細書に開示する。また、別の態様では、前述の実施形態のいずれかに係るベクターを含む単離宿主細胞について本明細書に開示する。

#### 【００２２】

別の態様では、以下からなる群から選択される宿主細胞について本明細書に開示する：  
（ａ）抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドと、抗体又はその抗原結合断片の軽鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドとを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び（ｂ）抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、抗体又はその抗原結合断片の軽鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターとで形質転換された宿主細胞。幾つかの実施形態では、前記抗体又は断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含む。前述の実施形態のいずれかでは、前記宿主細胞は、ＣＨＯ細胞等の真核細胞であってよい。

#### 【００２３】

別の態様では、抗ＩＦＰ３５抗体若しくはその抗原結合断片及び／又は抗ＮＭＩ抗体若しくはその抗原結合断片を作製する方法について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記方法は、ａ）前記抗体又は抗原結合断片をコードしているポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で前述の実施形態のいずれか１つに記載の宿主細胞を培養することと、ｂ）前記抗体又は抗原結合断片を単離することとを含む。また、１つの態様では、前述の実施形態のいずれかに係る方法によって作製される抗体又は抗原結合断片について本明細書に開示する。

#### 【００２４】

幾つかの実施形態では、（１）配列番号２のアミノ酸８１～１７０、１７７～２６８、若しくは１３６～２１６に記載の配列、又は（２）配列番号４のアミノ酸８１～１６８、１７５～２６６、若しくは１３４～２１４に記載の配列、又は（３）配列番号６のアミノ酸１０４～１９３、２０２～２９３、若しくは１５１～２５０に記載の配列、又は（４）配列番号８のアミノ酸１０３～１９２、２０１～２９２、若しくは１５１～２４０に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。

#### 【００２５】

幾つかの実施形態では、配列番号２のアミノ酸８１～１７０、１７７～２６８、又は１３６～２１６に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号２の１４５位、１４７位、１５０位、１５１位、１７２位、１７３位、１７５位、１７７位、１８２位、１８８位、１９２位、２１２位、１９９位、２０１位、２０７位、２０８位、２１０位、２１４位、及び２１６位のアミノ酸残基（Ｓｅｒ１４５、Ａｒｇ１４７、Ｇｌｕ１５０、Ｇｌｕ１５１、Ａｓｐ１７２、Ｖａｌ１７３、Ｇｌｕ１７５、Ｌｅｕ１７７、Ｍｅｔ１８２、Ａｓｐ１８８、Ｇｌｎ１９２、Ａｒｇ２１２、Ｇｌｎ１９９、Ｔｈｒ２０１、Ｇｌｎ２０７、Ｇｌｎ２０８、Ｐｒｏ２１０、Ｓｅｒ２１４、及びＴｙｒ２１６）のうちの１以上が変異及び／又は修飾されている単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。幾つかの態様では、構造に基づく配列アラインメントによれば、決定されたＩＦＰ３５ ＮＩＤ－Ｈドメイン構造の外側の左ＮＩＤドメインは、ＮＩＤ－Ｈに類似の構造を有する。配列番号２のＳｅｒ２３４、Ｌｅｕ２３６、Ａｒｇ１１０、Ａｒｇ１０８、Ａｒｇ２３３、Ｌｅｕ８２、Ｇｌｕ２６８、Ｔｈｒ２７１、Ｖａｌ２７

10

20

30

40

50

3、G l u 9 2、A s p 8 7、A s p 2 4 5、及びG l y 2 4 6は、I F P 3 5の決定されたN I Dドメイン構造における表面残基に対応する、左N I Dドメインにおけるアミノ酸残基である。前述の実施形態のいずれかでは、前記変異は、I F P 3 5受容体又はI F P 3 5に特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除することができる。

【0026】

幾つかの実施形態では、配列番号4のアミノ酸81～168、175～266、又は134～214に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号4の143位、145位、148位、149位、170位、172位、173位、175位、180位、186位、190位、210位、197位、199位、204位、205位、206位、208位、212位、及び214位のアミノ酸残基(S e r 1 4 3、A r g 1 4 5、G l u 1 4 8、G l u 1 4 9、G l u 1 7 0、A r g 1 7 2、G l u 1 7 3、L e u 1 7 5、M e t 1 8 0、G l u 1 8 6、G l n 1 9 0、A r g 2 1 0、G l n 1 9 7、A r g 1 9 9、A r g 2 0 4、G l n 2 0 5、G l n 2 0 6、L e u 2 0 8、S e r 2 1 2、及びT y r 2 1 4)のうちの1以上が変異及び/又は修飾されている単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。前述の実施形態のいずれかでは、前記変異は、I F P 3 5受容体又はI F P 3 5に特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除することができる。

10

【0027】

幾つかの実施形態では、配列番号6のアミノ酸104～193、202～293、又は151～250に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号6の107位、112位、117位、159位、172位、173位、192位、197位、215位、256位、267位、及び292位のアミノ酸残基(L e u 1 0 7、L y s 1 1 2、G l n 1 1 7、L y s 1 5 9、G l u 1 7 2、G l u 1 7 3、G l u 1 9 2、A s p 1 9 7、A s p 2 1 5、L y s 2 5 6、A s p 2 6 7、及びG l u 2 9 2)のうちの1以上が変異及び/又は修飾されている単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。前述の実施形態のいずれかでは、前記変異は、N M I受容体又はN M Iに特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除することができる。

20

【0028】

幾つかの実施形態では、配列番号8のアミノ酸103～192、201～292、又は151～240に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号8の106位、111位、116位、158位、171位、172位、191位、196位、214位、255位、266位、及び291位のアミノ酸残基(L e u 1 0 6、L y s 1 1 1、G l n 1 1 6、L y s 1 5 8、G l u 1 7 1、A s p 1 7 2、A s p 1 9 1、A s p 1 9 6、A s p 2 1 4、A r g 2 5 5、A s p 2 6 6、及びA s p 2 9 1)のうちの1以上が変異及び/又は修飾されている単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。前述の実施形態のいずれかでは、前記変異は、N M I受容体又はN M Iに特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除することができる。

30

40

【0029】

1つの態様では、前述の実施形態のいずれか1つに記載のポリペプチドを含む医薬組成物について本明細書に開示する。幾つかの実施形態では、前記医薬組成物は、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤を含む。

【0030】

1つの態様では、被験体において免疫応答を刺激する方法について本明細書に開示し、前記方法は、かかる刺激を必要としている被験体に、有効量の前述の実施形態のいずれか1つに記載のポリペプチド又は医薬組成物を投与することを含む。1つの態様では、前記被験体は、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌を有する。別の態様では、前記増殖異常は、肉腫、扁平上皮癌、線維肉腫、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、肺癌、非小

50

細胞肺癌、結腸癌、CNS癌、メラノーマ、卵巣癌、腎臓癌、前立腺癌、乳癌、肝臓癌、頭頸部癌、膵臓癌、膀胱癌、及び食道癌からなる群から選択される。前述の実施形態のいずれかでは、免疫反応応答の刺激は、炎症因子の発現及び/又は活性、免疫細胞（例えば、好中球）の動員、及び/又はNF- $\kappa$ Bシグナル伝達の刺激を含んでいてよい。幾つかの態様では、炎症因子は、IL-1、TNF- $\alpha$ 、iNOS、及び/又はCD86を含み、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達は、TLR4等のTLRによって媒介される。前述の実施形態のいずれか1つでは、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達の刺激は、リン酸化I $\kappa$ Bの増加及び/又は全I $\kappa$ Bの減少を含んでいてよい。

#### 【0031】

幾つかの態様では、被験体における免疫応答を活性化、促進、増大、及び/又は増強するための組成物及び方法を本明細書に提供する。本組成物及び方法を用いて、被験体における異常に低いレベルのIFP35ファミリーのタンパク質（例えば、IFP35及び/又はNMI）に関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び/又は予防することができる。例えば、前記被験体における異常に低いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害は、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌であってよい。例示的な増殖異常としては、肉腫、扁平上皮癌、線維肉腫、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、肺癌、例えば、非小細胞肺癌（NSCLC）、結腸癌、CNS癌、メラノーマ、卵巣癌、腎臓癌、前立腺癌、乳癌、肝臓癌、頭頸部癌、膵臓癌、膀胱癌、及び食道癌が挙げられる。

#### 【0032】

別の態様では、前述の実施形態のいずれか1つに記載のポリペプチドを含むポリペプチドをコードしている単離ポリヌクレオチドについて本明細書に開示する。更に別の態様では、前述の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを含む単離ベクターについて本明細書に開示する。更に別の態様では、前述の実施形態のいずれか1つに記載のベクターを含む単離宿主細胞について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記宿主細胞は、CHO細胞等の真核細胞である。幾つかの態様では、単離ポリヌクレオチドを作製する方法であって、a) 前述の実施形態のいずれかに記載のポリペプチドを含むポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で前記宿主細胞を培養することと、b) 前記ポリペプチドを単離することを含む方法について本明細書に開示する。

#### 【0033】

幾つかの態様では、被験体における異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングの方法について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記方法は、異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるIFP35及び/又はNMIのレベル及び/又は活性を評価することを含む。1つの実施形態では、前記異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害は、過剰な免疫応答に関連し得る。別の実施形態では、前記異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害は、サイトカインストームに関連する。前述の実施形態のいずれかでは、前記異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害は、炎症、感染症、臓器損傷、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択することができる。

#### 【0034】

前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、被験体における異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害を診断するために用いることができ、被験体におけるIFP35及び/又はNMIのレベル及び/又は活性が、異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害（例えば、炎症、感染症、臓器損傷、敗血症、及び自己免疫疾患）を有しない同等の被験体におけるIFP35及び/又はNMIのレベル及び/又は活性よりも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150

10

20

30

40

50

%、200%、300%、400%、又は500%高い場合、前記被験体が前記異常に高いレベル及び／又は活性のIFP35及び／又はNMIに関連する疾患又は障害を有していることを示す。

【0035】

前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、異常に高いレベル及び／又は活性のIFP35及び／又はNMIに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるIFP35及び／又はNMIのレベルを評価することを更に含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、異常に高いレベル及び／又は活性のIFP35及び／又はNMIに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるIFP35及び／又はNMIの活性を評価することを含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、IFP35及び／又はNMIのレベル及び／又は活性は、DNA、RNA、及び／又はタンパク質のレベルで評価してよい。1つの態様では、IFP35及び／又はNMIのレベルは、IFP35及び／又はNMIのDNA又はRNAにおける少なくとも10の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いてDNA及び／又はRNAのレベルで評価される。別の態様では、IFP35及び／又はNMIのレベルは、IFP35及び／又はNMIに特異的に結合する抗体を用いてタンパク質レベルで評価される。

10

【0036】

また、1つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のIFP35及び／又はNMIに関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングのキットについて本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記キットは、異常に高いレベル及び／又は活性のIFP35及び／又はNMIに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるIFP35及び／又はNMIのレベル及び／又は活性を評価するための手段を含む。

20

【0037】

また、1つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のIFP35及び／又はNMIに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断の方法について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記方法は、異常に高いレベル及び／又は活性のIFP35及び／又はNMIに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるIFP35及び／又はNMIの遺伝子の遺伝的状态を決定することを含む。1つの態様では、被験体におけるIFP35及び／又はNMIの遺伝子の遺伝的状态は、IFP35及び／又はNMIのDNA又はRNAにおける少なくとも10の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いて決定される。

30

【0038】

また、1つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のIFP35及び／又はNMIに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断のキットについて本明細書に開示する。1つの態様では、前記キットは、異常に高いレベル及び／又は活性のIFP35及び／又はNMIに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるIFP35及び／又はNMIの遺伝子の遺伝的状态を決定するための手段を含む。

【0039】

40

1つの態様では、IFP35及び／又はNMIの調節因子を同定する方法について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記方法は、a) IFP35及び／又はNMIを試験物質と接触させ、前記試験物質と接触したIFP35及び／又はNMIの活性を評価することと、b) 前記試験物質と接触していないIFP35及び／又はNMIの活性を評価することと、c) 工程a)及びb)で評価したIFP35及び／又はNMIの活性を比較し、工程a)及びb)で評価したIFP35及び／又はNMIの活性が異なる場合、前記試験物質をIFP35及び／又はNMIの調節因子として同定することとを含む。1つの態様では、前記試験物質は、低分子、IFP35及び／又はNMIの変異体及び／又は断片を含むポリペプチドライブラリ、IFP35及び／又はNMIに特異的に結合する抗体、ポリヌクレオチド(例えば、siRNA、shRNA、miRNA、又はアンチセンス

50

R N A ) である。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法を用いて、I F P 3 5 及び / 又は N M I の活性の阻害剤を同定することができる。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法を用いて、被験体における異常なレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための医薬を同定することができる。幾つかの態様では、前記異常なレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害は、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌である。幾つかの実施形態では、前記疾患又は障害（例えば、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌）は、異常に低いレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 ファミリーのタンパク質（例えば、I F P 3 5 及び / 又は N M I ）に関連する。

【 0 0 4 0 】

10

また、幾つかの態様では、前述の実施形態のいずれか 1 つに記載の方法によって同定される医薬候補について本明細書に開示する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 1 】

【図 1】図 1 は、N I D - H（ヘテロ接合性 N I D）の結晶構造を示す。a . I F P 3 5 のトランケート型及び推定ドメインを示し、配列中のドメイン間の境界に注釈をつける。b . I F P 3 5 二量体（閉構造二量体、c - 二量体）の構造、二次構造要素に注釈をつける。c . 分子内相互作用に参与する残基を標識し、スティックで示す。明確性のために、相互作用の半分だけを示す。d . 八量体の環構造、ここではモノマーを示す。e . ドメイン交換構造を有する二量体（開構造二量体、o - 二量体）を強調し、上方パネルにおける二次構造要素に注釈をつける。下方パネルに示す通り c - 二量体由来の N I D - H 分子を o - 二量体に重ねる。

20

【図 2】図 2 は、N I D - H の 2 つの安定凝集状態である二量体及び八量体を示す。a . S u p e r d e x - 2 0 0（16 / 60 又は 10 / 30）カラム（G E）を用いた N I D - H のサイズ排除クロマトグラフィー分析。280 nm における UV 吸収を青色で示す。2 つのピークの溶出体積は、75 mL 及び 90 mL であり、これは、二量体及び八量体の形成を示唆する。b . 八量体に重ねた o - 二量体及び c - 二量体。4 つの o - 二量体は、1 - 1 相互作用を通じて互いに相互作用し、環様八量体構造を形成する。c . N I D - H と R N A 認識モチーフ（R R M）との構造比較。これらの間の R . M . S . D は、約 1 . 3 である。

30

【図 3】図 3 は、N I D - H の開構造二量体（o - 二量体）が、免疫応答の刺激の原因であることを示す。a . 八量体 N I D - H は、R A W 2 6 4 . 7 細胞において T N F - 及び I L - 1 の転写をアップレギュレートする。G A P D H を内部標準として用いて、R T - P C R によって T N F - 及び I L - 1 の細胞 m R N A を検出した。b . 1 における二量体状態変異体である K 1 5 6 E / K 1 6 3 E / R 1 6 5 E は、T N F - 及び I L - 1 の転写を部分的にアップレギュレートする。c . L - z i p ドメインを含まない I F P 3 5（N）は、N I D - F 八量体よりも有効に免疫応答を刺激した。d . L P S と同様に、N は、R A W 2 6 4 . 7 細胞の T N F - の放出を有効に刺激することができた。4 時間インキュベートした後の細胞培養物中の T N F - レベルを E L I S A によって決定した。

40

【図 4】図 4 は、ヒト起源の N M I タンパク質が、T H P 1 細胞において T N F - 及び I L - 1 の転写をアップレギュレートすることを示す。P B S パッファをネガティブコントロール（N C）として用いた。結果は、3 つの独立した反復実験の平均として得た。エラーバーは、それらの間の標準偏差を示す。

【図 5】図 5 は、I F P 3 5 が内因性 D A M P の特徴を有することを示す。a . L P S で刺激された R A W 2 6 4 . 7 細胞によって放出された I F P 3 5。R A W 2 6 4 . 7 マクロファージを 100 ng / mL の L P S で前処理した。0 時間、1 時間、2 時間、3 時間、5 時間、9 時間後の細胞溶解物及び上清を I F P 3 5、H M G B 1、及び - アクチンのウェスタンブロットによって分析した。b . I F P 3 5 は、L P S 誘導性敗血症マウスの血清に蓄積される。L P S 注射の 3 時間後及び 6 時間後に、マウスにおける I F P

50

35の血清濃度をELISAによって測定した。c. IFP35は、敗血症患者の血清に蓄積される。このデータは、12人の患者及び8人の正常個体の血清から得た。d. IgG及びIFP35モノクローナル抗体(抗NID-H)を投与した敗血症マウスの生存率を示す。マウスにLPSを注射(i.p.)し、次いで、抗IFP35又はIgGで処理した。動物の生存率を、n=15頭/群で評価した。e. 抗NID-Hの中和によって、ELISAを用いて検出したIL-6、TNF- $\alpha$ 、及びIL-1等の早期炎症性サイトカインの放出が減少した。f. LPS及びD-galで処理した野生型マウス(n=12)及びIFP35 $\alpha$ マウス(n=12)の生存。g. IFP35ノックアウトマウスの血清における早期炎症性サイトカインの放出は、減少する。LPS及びD-gal注射の1時間後及び3時間後にELISAによって測定したときのIFP35 $\alpha$ マウス及び野生型マウスにおけるIL-6、TNF- $\alpha$ 、及びIL-1の血清濃度。

10

【図6】図6は、IFP35ファミリーのメンバーが内因性DAMPとして放出されることを示す。a. 10 ng/mLのINF- $\gamma$ で刺激されたRAW細胞によって放出されたIFP35。b. サルモネラ菌(SR)で刺激されたRAW細胞によって放出されたNMI。c及びd. IFP35(パネルc)及びNMI(パネルd)の凝集状態を検出した。RAW細胞をSRで刺激した後、細胞培養物を回収し、放出されたIFP35ファミリーのメンバーをゲル濾過(Superdex-200(16/60又は10/30)カラム、GE)及びウエスタンブロットによって検出した。IFP35の溶出体積は、パネルcに示す通り、約90 mLであり、これは、35 kDのモノマーであることを示唆する。NMIは、ゲル濾過によって検出された複数の凝集状態を示した。その主な立体構造の溶出体積は、約76 mL~約82 mLであり、これは、放出されたNMIが溶液中で二量体として存在することを示す。e. LPS注射の3時間後及び6時間後にELISAによって測定したとき、NMIは、LPS誘導性敗血症マウスの血清中に蓄積されている。f. NMIは、敗血症患者の血清中に蓄積される。8人の健常人及び12人の敗血症患者から血清を得た。NMIの血清濃度は、ELISAによって測定した。g. NMIノックアウトマウスは、LPS曝露に対して耐性である。LPSを投与した野生型マウス(WT)(n=14)及びNmi $\alpha$ マウス(KO)(n=14)の生存率を示す。h. Nmi $\alpha$ マウスの血清中のIL-6、TNF- $\alpha$ 、及びIL-1等の炎症性サイトカインの放出は、減少する。WTマウス及びKOマウスから得られた結果を、それぞれ、灰色及び黒色で示す。全ての結果は、独立に分析した複数の生物学的複製物によって確認された。

20

30

【図7】図7は、IFP35が、TLR4/MD2/CD14複合体に基づくサイトカインストームを刺激することを示す。a. TLR4、CD14、MD2、及びNF- $\kappa$ BプロモーターシフェラーゼプラスミドでトランスフェクトされたHEK293細胞株において、八量体NID-Hは、NF- $\kappa$ Bプロモータ活性を誘導した。トランスフェクトの24時間後、(25 mg/mLのポリミキシンBの有り無しで)10  $\mu$ g/mLの八量体NID-H又は100 ng/mLのLPSで4時間細胞を刺激し、ルシフェラーゼ活性についてアッセイした。LPSによって誘発されるルシフェラーゼ活性は、グラム陰性菌感染症に対する有効な抗生物質であるポリミキシンBによってブロックすることができる。b. 精製IFP35(N)、IFP35のN末端トランケート型、及びLPSは、NF- $\kappa$ B及びAP-1を誘導するが、IRF3プロモータ活性は誘導しない。ルシフェラーゼ活性を有するTLR4、MD2、及びCD14、及びNF- $\kappa$ Bプロモータ(又はAP-1、IRF3)の遺伝子をHEK293細胞に一過的にトランスフェクトした。IFP35は1  $\mu$ g/mLで用い、一方、ポジティブコントロールとして100 ng/mLのLPSを投与した。

40

【図8】図8は、IFP35におけるタンデムNIDドメインの構造モデルを示す。a及びb. AとA'及びBとB'の二次構造要素及び配列アラインメントをパネルaに示す。同一残基を「\*」で標識し、一方、類似の特徴を有する残基を「:」又は「.」で標識する。パネルaにおいて四角で強調したNID-H構造の疎水性コアにおける残基をパネ

50



ルbに示す。c. タンデムN I Dの二重バレル構造。B'部を緑色で示し、A'部をシアン色で示す。N I D - H構造を紫色で示す。

【図9】図9は、C l u s t a l Wによって作成したI F P 3 5及びN M Iの配列アラインメントを示す。同一残基を「\*」で標識し、一方、類似の特徴を有する残基を「:」又は「.」で標識する。N M Iの二次構造要素をP s i P r e dによって予測する。 - ヘリックス及び - スtrandを、それぞれ、赤色及び黄色で示す。I F P 3 5のN I Dドメインと平行な2つのN I Dドメインを標識し、四角で強調する。

【図10】図10は、I F P 3 5タンパク質の精製プロセスを示す。

【図11】図11は、様々なオリゴマー状態のI F P 3 5を示す。

【図12】図12は、I F P 3 5 - N I Dの結晶を示す。

10

【図13】図13は、二量体I F P 3 5 - N I Dの構造を示す。

【図14】図14は、八量体I F P 3 5 - N I Dの構造を示す。

【図15】図15は、ドメイン交換構造を有する二量体の構造を示す。

【図16】図16は、幾つかの領域の残基を示す。

【図17】図17は、組み換えN M Iの精製を示す。

【図18】図18は、サルモネラ菌によって刺激したときのI F P 3 5の発現レベルを明らかにする。

【図19】図19は、免疫蛍光法によって測定したとき、I F P 3 5の量が経時的に変化したことを示す。

【図20】図20は、細胞にウイルスを感染させたとき、様々な期間に培地に分泌されたI F P 3 5の量を示す。

20

【図21】図21は、マウス腹膜炎モデルを示す。

【図22】図22は、炎症を刺激するプロセス中の様々なオリゴマー状態のI F P 3 5の寄与を示す。

【図23】図23は、フローサイトメトリー分析の結果を示し、これは、八量体I F P 3 5 - n i dが多量の好中性顆粒球を動員できることを示す。

【図24】図24は、外因性八量体I F P 3 5 - N I Dが、マクロファージにおいてN F - B経路を刺激できることを示す。

【図25】図25は、I F P 3 5がm y d 8 8シグナル伝達経路を介して炎症を刺激できることを示す。

30

【図26】図26は、I F P 3 5によって誘導したとき、W Tマウス、T L R 9 - / - マウス、及びT L R 4 - / - マウスにおけるI L - 1 及びT N Fのレベルを示す。

【図27】図27 Aは、敗血症マウスの血清中のI F P 3 5の量を示す。図27 Bは、I F P 3 5モノクローナル抗体を投与したとき、敗血症マウスの生存率が上昇したことを示す。

【図28】図28は、マウスにおいて、I F P 3 5をブロックすることによって、L P Sによって誘導されるI L - 6の放出が減少したことを示す。

【図29】図29は、サルモネラ菌によって刺激したT h p 1細胞の細胞溶解物及び上清中のN M Iの量を示す。

【図30】図30は、マウス起源のN M Iタンパク質がT h p 1細胞におけるT H F 及びI L - 1 の転写をアップレギュレートできることを証明する。

40

【図31】図31は、凝集状態のN M Iの検出を示す。

【図32】図32は、ヒトI F P 3 5の二次構造予測を示す。

【図33 A】図33 Aは、N I D - H二量体の結晶構造座標を示す。

【図33 B】図33 Bは、N I D - H二量体の結晶構造座標を示す。

【図33 C】図33 Cは、N I D - H二量体の結晶構造座標を示す。

【図33 D】図33 Dは、N I D - H二量体の結晶構造座標を示す。

【図33 E】図33 Eは、N I D - H二量体の結晶構造座標を示す。

【図33 F】図33 Fは、N I D - H二量体の結晶構造座標を示す。

【図33 G】図33 Gは、N I D - H二量体の結晶構造座標を示す。

50

【図 3 3 H】図 3 3 H は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 I】図 3 3 I は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 J】図 3 3 J は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 K】図 3 3 K は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 L】図 3 3 L は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 M】図 3 3 M は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 N】図 3 3 N は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 O】図 3 3 O は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 P】図 3 3 P は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 Q】図 3 3 Q は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 3 R】図 3 3 R は、N I D - H 二量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 A】図 3 4 A は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 B】図 3 4 B は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 C】図 3 4 C は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 D】図 3 4 D は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 E】図 3 4 E は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 F】図 3 4 F は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 G】図 3 4 G は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 H】図 3 4 H は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 I】図 3 4 I は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 J】図 3 4 J は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 K】図 3 4 K は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 L】図 3 4 L は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 M】図 3 4 M は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 N】図 3 4 N は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 O】図 3 4 O は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 P】図 3 4 P は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 Q】図 3 4 Q は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 R】図 3 4 R は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 S】図 3 4 S は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 T】図 3 4 T は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 U】図 3 4 U は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【図 3 4 V】図 3 4 V は、N I D - H 八量体の結晶構造座標を示す。  
 【発明を実施するための形態】

#### 【 0 0 4 2 】

##### A . 一般技術

本発明の実施には、特に指定しない限り、分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、免疫学、及び薬理学の従来の技術を使用し、これらは、当技術分野における技能の範囲内である。かかる技術は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. (Sambrook et al., 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, 及び定期的最新版); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994); 及び Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup> ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003) 等の文献に十分説明されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 3 】

## 定義

特に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者が一般的に理解しているのと同じ意味を有する。本明細書に引用する全ての特許、特許出願（公開又は未公開）、及び他の刊行物は、参照することによって全文が援用される。この項に記載する定義が、参照することによって本明細書に援用される特許、特許出願、公開された出願、及び他の刊行物に記載されている定義に反するか又はその他の点で一致しない場合、参照することによって本明細書に援用される定義よりもこの項に記載する定義が優先される。

## 【 0 0 4 4 】

本明細書で使用する時、「a」又は「an」は、「少なくとも1つの」又は「1以上」を意味する。

## 【 0 0 4 5 】

用語「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書において互換的に用いられ、任意の長さのアミノ酸、例えば、少なくとも5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、20アミノ酸、30アミノ酸、40アミノ酸、50アミノ酸、100アミノ酸、200アミノ酸、300アミノ酸、400アミノ酸、500アミノ酸、1,000アミノ酸、又はそれ以上のアミノ酸のポリマーを指す。前記ポリマーは、直鎖状であっても分枝状であってもよく、修飾アミノ酸を含んでいてもよく、非アミノ酸が割り込んでいてもよい。また、前記用語は、天然に又は介入によって、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、又は標識成分とのコンジュゲーション等の任意の他の操作若しくは修飾によって修飾されているアミノ酸ポリマーも包含する。また、例えば、アミノ酸の1以上のアナログ（例えば、非天然アミノ酸等を含む）及び当技術分野において公知の他の修飾を含有するポリペプチドも本定義の範囲に含まれる。

## 【 0 0 4 6 】

本明細書で使用する時、用語「変異体」は、親ポリペプチド配列とある程度のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに関して用いられる。変異体は、親配列と類似しているが、そのアミノ酸配列中に、前記アミノ酸配列を親ポリペプチドの配列と異ならしめる少なくとも1つの置換、欠失、又は挿入を有する。更に、変異体は、親ポリペプチドの機能的特徴を保持し得る、例えば、親ポリペプチドの生物活性の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%を維持する。

## 【 0 0 4 7 】

「抗体」は、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を通して標的（例えば、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド等）に特異的に結合することができる免疫グロブリン分子であり、任意のクラスの免疫グロブリン、例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEであってよい。ニワトリ等の鳥類の種における主な抗体の種類であるIgYもこの定義に含まれる。本明細書で使用する時、この用語は、インタクトなポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体だけではなく、その断片（例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv）、単鎖（ScFv）、その変異体、自然界に存在する変異体、必要な特異性を有する抗原認識部位と共に抗体の一部を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、及び必要な特異性を有する抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾構造も包含する。

## 【 0 0 4 8 】

本明細書で使用する時、用語「抗原」は、その抗原認識部位を通して抗体と特異的に結合する標的分子を指す。抗原は、一価であってもよく、多価であってもよい、即ち、1以上の抗体によって認識される1以上のエピトープを有していてもよい。抗体によって認識され得る抗原の種類例としては、ポリペプチド、オリゴ糖、糖タンパク質、ポリヌクレオチド、脂質等が挙げられる。

## 【 0 0 4 9 】

本明細書で使用する時、用語「エピトープ」とは、抗原の一部、例えば、少なくとも約3～約5、好ましくは約5～約10又は約15、且つ約1,000以下のアミノ酸（又はこれらの間の任意の整数）のペプチド配列等を指し、これは、単独で又はより大きな配列の一部として、かかる配列に反応して産生される抗体に結合する配列を規定する。断片の長さに臨界上限はなく、例えば、抗原配列の略全長、又は更には標的抗原由来の2以上のエピトープを含む融合タンパク質も含まれ得る。本発明において使用するためのエピトープは、それが由来する親タンパク質の一部の正確な配列を有するペプチドに限定されるものではなく、ネイティブ配列と同一の配列、並びに欠失、付加、及び置換等のネイティブ配列に対する修飾（自然界において保存的）も包含する。

#### 【0050】

本明細書で使用する時、用語「特異的に結合する」とは、特定の結合対の結合特異性を指す。他の潜在的標的の存在下で特定の標的が抗体によって認識されることは、かかる結合の1つの特徴である。特異的結合には、2つの異なる分子が関与し、前記分子のうちの1つが化学的又は物理的な手段を介して第2の分子に特異的に結合する。前記2つの分子は、類似の特徴を有する他のアッセイ成分と結合パートナーとを区別することができるように互いに結合するという意味で関連している。結合成分対のメンバーは、リガンド及び受容体（抗リガンド）、特異的結合対（SBP）メンバー及びSBPパートナー等と称される。また、分子は、分子の凝集体についてのSBPパートナーであってもよく、例えば、第2の抗体の免疫複合体に対する抗体及びその対応する抗原は、免疫複合体についてのSBPメンバーであるとみなしてよい。

#### 【0051】

本明細書で使用する時、「タグ」又は「エピトープタグ」とは、典型的にはポリペプチドのN末端及び/又はC末端に付加されるアミノ酸の配列を指す。ポリペプチドに融合しているタグを含むことによって、ポリペプチドの精製及び/又は検出を容易にすることができる。典型的には、タグ又はタグポリペプチドは、抗体によって認識されるエピトープを提供するのに十分な残基を有するか又は検出若しくは精製に役立ち得るが、それが結合しているキメラポリペプチドの活性には干渉しないように十分に短いポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、典型的には、十分に独特であるので、それに特異的に結合する抗体は、前記タグポリペプチドに結合しているポリペプチドにおけるエピトープとは実質的に交差反応しない。好適なタグポリペプチドは、一般的には、少なくとも5アミノ酸残基又は6アミノ酸残基、通常、約8アミノ酸残基～約50アミノ酸残基、典型的には、9残基～30残基を有する。タグは、多量体中の1以上のキメラポリペプチドに結合することができる、前記多量体の検出又はサンプル若しくは混合物からの回収を可能にすることができる。かかるタグは、周知であり、容易に合成及び設計することができる。例示的なタグポリペプチドとしては、アフィニティ精製に用いられるものが挙げられ、例えば、Hisタグ、インフルエンザ血球凝集素（HA）タグポリペプチド及びその抗体12CA5；c-mycタグ並びにそれに対する抗体8F9、3C7、6E10、G4、B7、及び9E10；並びに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D（gD）タグ及びその抗体が挙げられる。例えば、Field et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165；Evan et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3610-3616；Paborsky et al. (1990) Protein Engineering 3: 547-553を参照。

#### 【0052】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、本明細書において互換的に用いられ、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド若しくは塩基、及び/又はこれらのアナログ、或いはDNA又はRNAポリメラーゼによってポリマーに組み込むことができる任意の基質であってよい。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチド及びそのアナログを含んでいてよい。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリ前又は後に付与してよい。ヌクレオチドの配列

10

20

30

40

50

に非ヌクレオチド成分が割り込んでいてもよい。ポリヌクレオチドは、例えば、標識成分とのコンジュゲーション等によって、重合後に更に修飾されてもよい。他の種類の修飾としては、例えば、「キャップ」、天然ヌクレオチドのうちの1以上のアナログによる置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等）及び荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）を有するもの、ペンダント部分、例えば、タンパク質を含有するもの（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、poly-L-リジン等）、介入物を有するもの（例えば、アクリジン、プソラレン等）、キレート剤を含有するもの（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等）、アルキル化剤を含有するもの、修飾結合を有するもの（例えば、アルファアノマー核酸等）、並びにポリヌクレオチドの非修飾形態が挙げられる。更に、糖中に通常存在するヒドロキシル基のいずれかを、例えば、ホスホン酸基、リン酸基で置換してもよく、標準的な保護基によって保護してもよく、活性化して更なるヌクレオチドに対する更なる結合を調製してもよく、固体支持体にコンジュゲートしてもよい。5'及び3'末端のOHは、リン酸化してもよく、アミン又は1個～20個の炭素原子の有機キャッピング基部分で置換してもよい。他のヒドロキシルを標準的な保護基に誘導体化してもよい。また、ポリヌクレオチドは、例えば、2'-O-メチル-2'-O-アシル、2'-フルオロ-又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖アナログ、-アノマー糖、エピマー糖（例えば、アラビノース、キシロース、又はリキソース）、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、アクリルアナログ及び無塩基ヌクレオシドアナログ（例えば、メチルリボシド）を含む、当技術分野において一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖のアナログ形態を含有していてもよい。1以上のホスホジエステル結合を別の結合基によって置換してもよい。これら別の結合基としては、ホスフェートがP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR<sub>2</sub>(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO、又はCH<sub>2</sub>(「ホルムアセタール」)（式中、各R又はR'は、独立して、H又は任意でエーテル( O )結合を含有する置換若しくは非置換のアルキル(1～20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、若しくはアラルジルである)によって置換されている実施形態が挙げられるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドにおける全ての結合が同一である必要はない。前述の記載は、RNA及びDNAを含む、本明細書において言及する全てのポリヌクレオチドに当てはまる。

#### 【0053】

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で使用する時、一般的に、一般的に約200ヌクレオチド長未満であるが必ずしもそうではない、短く、一般的に一本鎖の、一般的に合成のポリヌクレオチドを指す。用語「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、互いに排他的ではない。ポリヌクレオチドに関する上の記載は、オリゴヌクレオチドにも等しく且つ完全に適用可能である。

#### 【0054】

本明細書で使用する時、用語「ホモログ」は、天然核酸に対する軽微な変更によって天然核酸（例えば、「プロトタイプ」又は「野生型」核酸）とは異なるが、天然形態の基本ヌクレオチド構造は維持している核酸を指すために用いられる。かかる変化としては、欠失（例えば、核酸のランケートバージョン）、挿入、及び/又は置換を含む、1個又は数個のヌクレオチドの変化が挙げられるが、これらに限定されない。ホモログは、天然核酸と比べて強化された、低下した、又は実質的に同様の特性を有していてもよい。ホモログは、天然核酸に対して相補的であってもよく、天然核酸と一致していてもよい。ホモログは、組み換えDNA技術、化学合成等を含むがこれらに限定されない、核酸を生成するための当技術分野において公知の技術を用いて生成することができる。

#### 【0055】

本明細書で使用する時、「実質的に相補的であるか又は実質的に一致している」とは、2つの核酸配列が少なくとも90%の配列同一性を有することを意味する。好ましくは、前記2つの核酸配列は、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、又は1

10

20

30

40

50

00%の配列同一性を有する。或いは、「実質的に相補的であるか又は実質的に一致している」とは、2つの核酸配列が高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得ることを意味する。

#### 【0056】

一般に、ハイブリッドの安定性は、イオン濃度及び温度の関数である。典型的には、ハイブリダイゼーション反応は、より低ストリンジェンシー条件下で実施され、次いで、様々であるが、より高ストリンジェンシーで洗浄される。中ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、プローブ等の核酸分子を相補的核酸分子に結合させることができる条件を指す。ハイブリダイズした核酸分子は、一般的に、少なくとも60%の同一性（例えば、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、又は95%の同一性のいずれか）を有する。中ストリンジェンシー条件は、42℃にて50%ホルムアミド、5×デンハルト液、5×SSPE、0.2%SDS中でハイブリダイズさせ、次いで、42℃にて0.2×SSPE、0.2%SDS中で洗浄するのと等価な条件である。高ストリンジェンシー条件は、例えば、42℃にて50%ホルムアミド、5×デンハルト液、5×SSPE、0.2%SDS中でハイブリダイズさせ、次いで、65℃にて0.1×SSPE及び0.1%SDS中で洗浄することによって提供され得る。低ストリンジェンシー条件は、22℃にて10%ホルムアミド、5×デンハルト液、6×SSPE、0.2%SDS中でハイブリダイズさせ、次いで、37℃にて1×SSPE、0.2%SDS中で洗浄するのと等価な条件を指す。デンハルト液は、1%Ficoll、1%ポリビニルピロリドン、及び1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有する。20×SSPE（塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)）は、3M塩化ナトリウム、0.2Mリン酸ナトリウム、及び0.025M(EDTA)を含有する。他の好適な中ストリンジェンシー及び高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションバッファ及び条件は、当業者に周知である。

#### 【0057】

本明細書で使用する時、用語「RNA干渉」又は「RNAi」は、一般的に、二本鎖RNA分子又はショートヘアピンRNA分子が、前記二本鎖RNA分子又はショートヘアピンRNA分子と実質的に又は完全に相同性を共有している核酸配列の発現を低減又は阻害するプロセスを指す。用語「低分子干渉RNA」又は「siRNA」又は「RNAi剤」は、RNA干渉を誘発する約10ヌクレオチド～約50ヌクレオチド（又はヌクレオチドアナログ）を含むRNA（又はRNAアナログ）配列を指す。Kreutzer et al.、国際公開第00/44895号パンフレット；Zernicka-Goetz et al.、国際公開第01/36646号パンフレット；Fire、国際公開第99/32619号パンフレット；Mello & Fire、国際公開第01/29058号パンフレットを参照。本明細書で使用する時、siRNA分子は、化学的に修飾されたヌクレオチド及び非ヌクレオチドを包含するRNA分子を含む。用語「ddRNAi剤」は、外来ベクターから転写されるDNA指向性RNAi剤を指す。用語「ショートヘアピンRNA」又は「shRNA」は、二本鎖領域及びループ領域を有するRNA構造を指す。特定の実施形態では、ddRNAi剤は、最初にshRNAとして発現する。

#### 【0058】

本明細書で使用する時、「ベクター（又はプラスミド）」は、異種DNAを発現又は複製するために前記異種DNAを細胞に導入するために用いられる分離したエレメントを指す。かかるベクターの選択及び使用は、当業者に周知である。発現ベクターとしては、DNA断片を発現させることができる制御配列（例えば、プロモータ領域）と機能的に連結されているDNAを発現させることができるベクターが挙げられる。したがって、発現ベクターは、プラスミド、ファージ、組み換えウイルス、又は適切な宿主細胞に導入された際にクローニングされたDNAを発現させる他のベクター等の組み換えDNA又はRNAコンストラクトを指す。適切な発現ベクターは、当業者に周知であり、例えば、真核細胞及び/又は原核細胞において複製可能なもの、並びにエピソームが残存しているもの、又は宿主細胞のゲノムに組み込まれるものが挙げられる。

## 【0059】

本明細書で使用する時、「プロモータ領域又はプロモータエレメント」は、それが機能的に連結しているDNA又はRNAの転写を制御するDNA又はRNAのセグメントを指す。プロモータ領域は、RNAポリメラーゼを認識し、結合し、転写を開始させるのに十分な特異的配列を含む。プロモータ領域のこの部分は、プロモータと称される。更に、プロモータ領域は、RNAポリメラーゼの認識、結合、及び転写開始活性を調節する配列を含む。これら配列は、シス作用性であってもよく、トランス作用性因子に対して応答性であってもよい。プロモータは、制御の性質に依存して、構成的であっても制御されていてもよい。原核生物において使用することが企図される例示的なプロモータとしては、バクテリオファージT7及びT3プロモータ等が挙げられる。

10

## 【0060】

本明細書で使用する時、「機能的に連結しているか又は機能可能に結合している」とは、DNAとヌクレオチドの制御配列及びエフェクタ配列（例えば、プロモータ、エンハンサー、転写及び翻訳停止部位、並びに他のシグナル配列）との機能的関係を指す。例えば、DNAのプロモータへの機能的連結とは、かかるDNAの転写が、前記DNAを特異的に認識し、結合し、転写するRNAポリメラーゼによってプロモータから開始されるような、DNAとプロモータとの物理的及び機能的な関係を指す。発現及び／又はインビトロ転写を最適化するために、余分な潜在的に不適切な別の翻訳開始（即ち、読み始め）コドン又は転写若しくは翻訳のレベルで発現に干渉し得るか若しくは発現を減少させ得る他の配列を除去するためにクローンの5'非翻訳部分を除去、付加、又は変更することが必要になる場合もある。或いは、コンセンサス部位を開始コドンの直ぐ5'側に挿入し、発現を増強してもよい。例えば、Kozak(1991)J. Biol. Chem. 266:19867-19870を参照。かかる修飾の望ましさ（又は必要性）は、経験的に決定することができる。

20

## 【0061】

「処置」又は「治療」又は「緩和」は、標的とする病状又は障害を治癒させることも前記病状の再発を予防することもないとしても、減速（軽減）を目的とする治療的処置を指す。治療量の治療剤が投与されたか又は処置を受けた後、被験体が特定の疾患の1以上の徴候及び症状の観察可能及び／又は測定可能な減少を示すか又は前記徴候及び症状がなくなった場合、被験体は成功裏に「治療」されている。疾患の徴候又は症状の減少は、患者も感じることができる。また、患者が不変を経験した場合、治療されたと考えられる。幾つかの実施形態では、治療剤による治療は、治療後3ヶ月間、好ましくは6ヶ月間、より好ましくは1年間、更により好ましくは治療後2年間以上、患者を無症候とするのに有効である。治療の成功及び疾患の改善を評価するためのこれらパラメータは、当技術分野において適切な技能を有する医師によく知られている常法によって容易に測定可能である。幾つかの実施形態では、「治療」は、病態、障害、又は疾患の症状が寛解するか又は他の点で有利に変化する任意の方法を意味する。また、治療は、本明細書における組成物の任意の薬学的使用も包含する。幾つかの実施形態では、特定の医薬組成物の投与による特定の障害の症状の「寛解」とは、前記組成物の投与に起因するか又は関連する任意の軽減（永続的であろうと一時的であろうと）を指す。

30

40

## 【0062】

本明細書で用いられる用語「予測」又は「予後」は、患者が薬物又は薬物セットに対して好ましい又は好ましくない応答を示す可能性、或いは可能性のある疾患の転帰を指す。1つの実施形態では、予測は、これら応答又は転帰の程度に関する。1つの実施形態では、予測は、患者が、疾患が再発することなしに治療（例えば、特定の治療剤による治療）後特定の期間生存又は好転するかどうか及び／又はその可能性に関する。本発明の予測方法は、任意の特定の患者について最も適切な治療法を選択することによって治療決定を行うために臨床的に使用することができる。本発明の予測方法は、患者が治療レジメン（例えば、所与の治療剤又は組み合わせ物の投与、外科的介入、ステロイド治療等を含む所与の治療レジメン）に対して好ましい応答を示す可能性があるかどうかを予測する有用なツ

50

ールである。

【0063】

本明細書で使用するとき、用語「薬学的に許容し得る担体」は、医薬投与に適合する任意の及び全ての溶媒、分散媒体、コーティング、等張剤、及び吸収遅延剤等を含むことを意図する。薬学的活性物質にかかる媒体及び剤を使用することは当技術分野において周知である。例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup> ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003)を参照。任意の従来の媒体又は剤が活性化化合物と不適合である場合を除いて、前記組成物におけるかかる使用が企図される。

【0064】

「薬学的に許容し得る塩」は、非毒性であり、生物学的に耐容性であるか又は他の点で被験体に投与するのに生物学的に適している、本明細書に記載する化合物の遊離酸又は塩基の塩を意味することを意図する。概要については、Berge, et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19を参照。好ましい薬学的に許容し得る塩は、薬理学的に有効であり、且つ過度の毒性も刺激もアレルギー反応もなしに被験体の組織と接触させるのに好適なものである。本明細書に記載する化合物は、十分に酸性の基、十分に塩基性の基、両種の官能基、又は各種のうちの1超を有してよく、したがって、多数の無機又は有機塩基、並びに無機及び有機酸と反応して薬学的に許容し得る塩を形成することができる。

【0065】

薬学的に許容し得る塩の例としては、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、リン酸塩、リン酸一水素塩、リン酸二水素塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソ酪酸塩、カブロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオン酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン-1, 4-ジオエート、ヘキシン-1, 6-ジオエート、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、スルホン酸塩、メチルスルホン酸塩、プロピルスルホン酸塩、ベシル酸塩、キシレンスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、 $\alpha$ -ヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、及びマンデル酸塩が挙げられる。

【0066】

本明細書で使用するとき、用語「治療有効量」又は「有効量」は、単独で又は更なる治療剤と併用して細胞、組織、又は被験体に投与したとき、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害を予防するか又は寛解させるのに有効な治療剤の量を指す。治療有効用量は、更に、症状の寛解、例えば、関連する病状の治療、治癒、予防、又は寛解、或いは、かかる病状の治療、治癒、予防、又は寛解の速度増大に十分な治療剤の量を指す。単独で投与される個々の活性成分に適用するとき、治療有効用量は、その成分のみを指す。組み合わせ物に適用するとき、治療有効用量は、連続して併用投与しようと、同時に併用投与しようと、治療効果をもたらす活性成分の合計量を指す。幾つかの実施形態では、「特定の疾患を治療するための化合物の有効量」は、疾患に関連する症状を寛解させるか又は何らかの方法で低減するのに十分な量である。かかる量は、単回投与量として投与されてもよく、レジメンに従って投与されてもよく、それによって有効になる。前記量は、疾患を治癒させる場合もあるが、典型的には、疾患の症状を寛解させるために投与される。症状の所望の寛解を達成するために反復投与が必要になる場合もある。

【0067】

用語「組み合わせ物」は、1つの単位剤形中の固定組み合わせ物を指すか、又は化合物及び組み合わせパートナー（例えば、「治療剤」又は「助剤」とも称される、以下に説明

10

20

30

40

50



する別の薬物)を独立して同時に又は時間間隔内に別々に投与する場合、特に、これら時間間隔によって前記組み合わせパートナーが共同的効果、例えば、相乗効果を示すことができる場合、併用投与するためのキットオブパーツを指す。用語「同時投与」又は「併用投与」等は、本明細書で使用するときに、選択された組み合わせパートナーのそれを必要としている単一被験体(例えば、患者)への投与を包含することを意味し、必ずしも前記剤を同じ投与経路によって又は同時に投与しなくてもよい治療レジメンを含むことを意図する。用語「医薬組み合わせ物」は、本明細書で使用するときに、1超の活性成分を混合するか又は合わせることによって得られる生成物を意味し、活性成分の固定組み合わせ物及び非固定組み合わせ物の両方を含む。用語「固定組み合わせ物」は、活性成分、例えば、化合物及び組み合わせパートナーの両方を単一の実体又は剤形の形態で同時に患者に投与することを意味する。用語「非固定組み合わせ物」は、活性成分、例えば、化合物及び組み合わせパートナーの両方を、特に時間を限定することなしに同時に、一斉に、又は逐次別々の実体として患者に投与することであって、かかる投与によって、患者の体内において2つの化合物が治療有効レベルになることを意味する。また、後者は、カクテル療法、例えば、3以上の活性成分の投与にも適用される。

10

**【0068】**

本明細書で使用するときに、「生物学的サンプル」とは、生体若しくはウイルス起源、又は巨大分子及び生体分子の他の起源から得られる任意のサンプルを指し、それから核酸又はタンパク質又は他の巨大分子を得ることができる被験体の任意の細胞型又は組織を含む。生物学的サンプルは、生物源から直接得られたサンプルであってもよく、加工されたサンプルであってもよい。例えば、増幅された単離核酸は、生物学的サンプルを構成する。生物学的サンプルとしては、動物及び植物由来の体液(例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿、及び汗)、組織、及び臓器のサンプル、並びにこれらに由来する加工サンプルが挙げられるが、これらに限定されない。

20

**【0069】**

用語「レベル」は、標的、例えば、タンパク質又はポリヌクレオチドの存在又は量を指すために用いられ、定性的に又は定量的に決定することができる。標的、タンパク質、又はポリヌクレオチドのレベルにおける「定性的」変化は、正常コントロールから得られたサンプル中において検出不可能であるか又は存在する標的、タンパク質、又はポリヌクレオチドの出現又は消失を指す。1以上の標的、タンパク質、又はポリヌクレオチドのレベルにおける「定量的」変化は、健常コントロールと比較したときの、前記標的、タンパク質、又はポリヌクレオチドのレベルにおける測定可能な増加又は減少を指す。

30

**【0070】**

「健常コントロール」又は「正常コントロール」は、異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害に罹患していない個体から採取された生物学的サンプルである。「ネガティブコントロール」は、アッセイで検出されるように設計された特定のアナライトを全く含まないので、前記アッセイの参照ベースラインを与えるサンプルである。

**【0071】**

本明細書で使用するときに、「哺乳類」は、哺乳類綱の種のいずれかを指す。多くの場合、用語「哺乳類」は、本明細書で使用するときに、ヒト、ヒト被験体、又はヒト患者を指す。また、「哺乳類」は、非ヒト哺乳類綱の種のいずれか、例えば、実験用、愛玩用、又は家畜用の非ヒト哺乳類を指す。例示的な非ヒト哺乳類としては、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サル、ゴリラ、及びチンパンジーが挙げられる。

40

**【0072】**

本明細書で使用するときに、「組み換え手段による生成」とは、クローニングされた核酸がコードしているタンパク質を発現させるための分子生物学の周知の方法に依存する組み換え核酸方法を用いる生成方法を指す。

**【0073】**

50

本明細書で使用する時、用語「被験体」は、特定の種又はサンプルの種類に限定されるものではない。例えば、用語「被験体」は、患者、多くの場合、ヒト患者を指し得る。しかし、この用語は、ヒトには限定されないもので、様々な非ヒト動物又は哺乳類種を包含する。

【0074】

本明細書で使用する時、「プロドラッグ」は、インビボで投与された際、代謝されるか又は他の方法でその化合物の生物学的、薬学的、又は治療的活性型に変換される化合物である。プロドラッグを生成するために、薬学的活性化合物は、前記活性化合物が代謝プロセスによって再生するように修飾される。プロドラッグは、薬物の代謝安定性又は輸送特性を変化させたり、副作用又は毒性をマスクしたり、薬物の味を改善したり、薬物の他の特徴又は特性を変化させたりするように設計してよい。インビボにおける薬力学的プロセス及び薬物代謝に関する知見に基づいて、当業者は、一旦薬学的活性化合物が見出されたら、その化合物のプロドラッグを設計することができる（例えば、Nogrody (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388 - 392を参照）。

10

【0075】

本明細書で使用する時、「試験物質（又は候補化合物）」は、本明細書に開示及び／又は請求する方法によってIFP35及び／又はNMIに対するその効果が求められる、化学的に定義されている化合物（例えば、有機分子、無機分子、有機／無機分子、タンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、多糖、糖、又は糖タンパク質等のこれら分子のハイブリッド）、又は化合物の混合物（例えば、試験化合物、天然抽出物、又は培養上清等のライブラリ）を指す。

20

【0076】

本明細書で使用する時、ハイスループットスクリーニング（HTS）は、多数のサンプル、例えば、「ヒット」を同定するための疾患標的に対する多様な化学構造のサンプルを試験するプロセスである（例えば、Broach, et al., High throughput screening for drug discovery, Nature, 384: 14 - 16 (1996); Janzen, et al., High throughput screening as a discovery tool in the pharmaceutical industry, Lab Robotics Automation: 8261 - 265 (1996); Fernandes, P. B., Letter from the society president, J. Biomol. Screening, 2: 1 (1997); Burbaum, et al., New technologies for high-throughput screening, Curr. Opin. Chem. Biol., 1: 72 - 78 (1997)を参照）。HTS操作は、サンプル調製、アッセイ手順、及びその後の大量のデータ処理に対処するために高度に自動化及びコンピュータ化されている。

30

【0077】

本明細書に記載する発明の態様及び実施形態は、「からなる」及び／又は「から本質的になる」態様及び実施形態を含むと理解される。

40

【0078】

本開示全体を通して、本発明の様々な態様を範囲形式で表す。範囲形式による記載は単に便宜上簡潔にするためのものであると理解すべきであり、本発明の範囲を強く限定すると解釈すべきではない。したがって、範囲の記載は、具体的に開示されている全ての可能な部分範囲に加えてその範囲内の個々の数値も含むとみなすべきである。例えば、1～6等の範囲の記載は、具体的に開示されている部分範囲、例えば、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6等に加えて、その範囲内の個々の数値、例えば、1、2、3、4、5、及び6も含むとみなすべきである。これは、範囲の幅にかかわらず適用される。

【0079】

50

本発明の他の目的、利点、及び特徴は、添付図面と合わせて以下の記載から明らかになるであろう。

【0080】

C、異常に高いレベル及び/又は活性のIFP35ファミリーのタンパク質に関連する疾患又は障害を治療及び/又は予防する方法

IFP35ファミリーのタンパク質(IFP35及びNMIを含む)は、多数の免疫細胞においてI型又はII型のインターフェロンによって速やかにアップレギュレートされ得る。Yang et al., PLoS One 7, e50932 (2012); Das et al., Journal of Virology 88, 3103-3113 (2014); Zhu et al., Cell 96, 121-130 (1999) 10; 及びLebrun et al., Journal of Interferon & Cytokine Research 18, 767-771 (1998)。IFP35ファミリーのメンバーの機能は、明らかになっていない。IFP35ファミリーのメンバーは、N末端におけるロイシンジッパー(L-zip)ドメインと、それに続く2つのタンデム構造及び機能的に未知であるNMI/IFP35ドメイン(NID)とからなると予測されている。初期の報告では、免疫蛍光顕微鏡法を用いて、IFP35及びNMIが細胞質に位置することが見出された。Lebrun et al., Journal of Interferon & Cytokine Research 18, 767-771 (1998)。これらは、そのNIDドメインによって媒介される高分子質量複合体(HMMC)にアセンブリされ、更に、機能的に未知であるスペックル様凝集体に 20アセンブリされ得る。Zhou et al., JBC 275, 21364-21371 (2000); 及びChen et al., JBC 275, 36278-84 (2000)。IFP35は、ウシ泡沫状ウイルス由来の特定のウイルス核酸を認識し、ウイルス転写を阻害できることが知られている。Tan et al., Journal of Virology 82, 4275-4283 (2008)。しかし、最近の結果は、RIG-1(レチノイン酸誘導性遺伝子I)と特異的に相互作用し、宿主の自然免疫応答を負に制御することによって、水疱性口内炎ウイルスの複製を支援し得ることが示唆した。Das et al., Journal of Virology 88, 3103-3113 (2014)。NMIの研究は、複数のシグナル伝達経路を制御することによる、癌細胞の増殖及び転移に対する阻害効果に主に集中している。Li et al., 30Mol Biol Cell 23, 4635-4646 (2012); Fillmore et al., International Journal of Cancer 125, 556-64 (2009); 及びLi et al., JBC 277, 20965-73 (2002)。IFP35ファミリーのメンバーの潜在的機能及び機序について更に調べるために、本発明者らは、IFP35におけるNIDドメインのX線結晶構造解析による構造を決定した。IFP35及びNMIは、免疫調節のためのDAMPとして機能し得ることが見出された。一部のDAMPタンパク質は、MD2及び他の関連タンパク質の助けを借りて、特異的細胞表面受容体TLR4によって認識されることが報告された。Yang et al., PNAS 107, 11942-11947 (2010) 40; Nagai et al., Nature Immunology 3, 667-672 (2002); 及びZanoni et al., Cell 147, 868-880 (2011)を参照。複雑なシグナルカスケードが誘発されて転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化し、その結果、サイトカインが放出され、宿主の免疫応答が強化され得る。Meylan et al., Nature Immunology 5, 503-507 (2004); Moynagh, Trends in Immunology 26, 469-476 (2005); 及びLu et al., Cytokine 42, 145-151 (2008)を参照。

【0081】

幾つかの態様では、免疫応答を調節する剤の調製におけるランケート型IFP35タンパク質(例えば、ランケート型タンパク質の八量体)又はランケート型NMIタン 50

パク質の使用について本明細書に開示する。幾つかの態様では、抗悪性腫瘍生成物の調製におけるトランケート型 I F P 3 5 タンパク質（例えば、トランケート型タンパク質の八量体）又はトランケート型 N M I タンパク質の使用について本明細書に開示する。幾つかの態様では、細胞又は体液中の I F P 3 5 及び / 又は N M I を中和するために I F P 3 5 抗体及び / 又は N M I 抗体を用いることによって、I F P 3 5 又は N M I のタンパク質の過剰発現によって誘導される過剰な免疫応答を有効に制御し、炎症作用を阻害し、炎症によって身体及び組織の損傷が生じるのを回避し、被験体（例えば、細菌若しくはウイルス感染症又は自己免疫疾患を有する被験体）の生存率を劇的に改善することができる。幾つかの実施形態では、被験体は、ウイルス感染症（例えば、インフルエンザウイルス、S A R S、M E R S、H B V、H C V）、細菌感染症（例えば、結核菌（*M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s*））、真菌感染症、及び / 又は他の病原体によって引き起こされる感染症を有している。幾つかの態様では、前記感染症は、I F P 3 5 ファミリーのタンパク質の発現、例えば、I F P 3 5 及び / 又は N M I の発現を引き起こす。感染患者における I F P 3 5 及び / 又は N M I の過剰発現は、臓器及び身体における重篤な損傷につながる恐れがある。異常に高いレベルの I F P 3 5 は、サイトカインストームの誘発に起因して、組織又は臓器の損傷につながる恐れがある。

#### 【 0 0 8 2 】

したがって、本組成物及び / 又は方法を用いて、多数の感染性疾患、感染状態、炎症、自己免疫疾患、移植片対宿主病、又は被験体の免疫系の過剰活性化に関連する病態を治療、寛解、及び / 又は予防することができる。病原性ウイルスとしては、レトロウイルス科（例えば、ヒト免疫不全ウイルス、例えば、H I V - 1（H T L V - I I I、L A V、又は H T L V - I I I / L A V、又は H I V - I I I と称される）；及び他の単離菌、例えば、H I V - L P；ピコルナウイルス科（例えば、ポリオウイルス、A 型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カリシウイルス科（例えば、胃腸炎を引き起こす株）；トガウイルス科（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（例えば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（例えば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、R S ウイルス）；オルトミクソウイルス科（例えば、インフルエンザウイルス）；ブニヤウイルス科（例えば、ハンタウイルス、ブニヤウイルス、フレボウイルス、及びナイロウイルス）；アレナウイルス科（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（例えば、レオウイルス、オルビウイルス、及びロタウイルス）；ビマウイルス科（*B i m a v i r i d a e*）；ヘパドナウイルス科（B 型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（パルボウイルス）；パポバウイルス科（乳頭腫ウイルス、ポリオームウイルス）；アデノウイルス科（大部分のアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（単純疱疹ウイルス（H S V）1 型及び 2 型、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（C M V）、ヘルペスウイルス）；ポクシーウイルス科（*P o x y i r i d a e*）（天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；及びイリドウイルス科（例えば、アフリカ豚コレラウイルス）；C 型肝炎ウイルス；並びに未分類のウイルス（例えば、デルタ肝炎の病原因子（B 型肝炎ウイルスの欠陥サテライトであると考えられる）、ノーウォーク及び関連ウイルス、並びにアストロウイルス）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 8 3 】

病原性細菌としては、ヘリコバクター・ピロリ（*H e l i c o b a c t e r p y l o r i s*）、ボレリア・ブルグドルフェリ（*B o r e l i a b u r g d o r f e r i*）、レジオネラ・ニューモフィラ（*L e g i o n e l l a p n e u m o p h i l a*）、マイコバクテリア属の種（例えば、結核菌（*M . t u b e r c u l o s i s*）、マイコバクテリウム・アビウム（*M . a v i u m*）、マイコバクテリウム・イントラセルラーエ（*M . i n t r a c e l l u l a r e*）、マイコバクテリウム・カンサシ（*M . k a n s a i i*）、マイコバクテリウム・ゴルドネ（*M . g o r d o n a e*））、黄色ブドウ球菌（*S t a*

10

20

30

40

50

*phyllococcus aureus* )、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae* )、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis* )、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes* )、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyrogenes* ) (A群レンサ球菌)、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae* ) (B群レンサ球菌)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus* ) (ビリダンス群)、大便連鎖球菌 (*Streptococcus faecalis* )、ウシレンサ球菌 (*Streptococcus bovis* )、ストレプトコッカス属 (嫌気性種)、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae* )、病原性カンピロバクター属 (*Campylobacter* ) の種、エンテロコッカス属 (*Enterococcus* ) の種、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae* )、炭疽菌 (*Bacillus anthracis* )、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae* )、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* ) の種、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae* )、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens* )、破傷風菌 (*Clostridium tetani* )、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes* )、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae* )、パスツレラ・ムルトシダ (*Pasturella multocida* )、バクテロイデス属 (*Bacteroides* ) の種、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum* )、大腸菌 (*Escherichia coli* ) の病原性株、ストレプトバチルス・モニリホルミス (*Streptobacillus moniliformis* )、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum* )、トレポネーマ・ペルテニュー (*Treponema pertenuis* )、レプトスピラ属 (*Leptospira* )、及びアクチノマイセス・イスラエリー (*Actinomyces israelii* ) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0084】

感染性真菌としては、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans* )、ヒストプラスマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum* )、コクシディオイデス・イミティス (*Coccidioides immitis* )、ブラストマイセス・デルマチチジス (*Blastomyces dermatitidis* )、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis* )、カンジダ・アルビカンズ (*Candida albicans* ) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0085】

感染性原生動物としては、マラリア原虫属 (*Plasmodium* ) の種、例えば、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum* ) ; トリパノソーマ属 (*Trypanosoma* )、例えば、クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi* ) ; 及びトキソプラズマ・ゴンヂ (*Toxoplasma gondii* ) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0086】

アレルゲンとしては、花粉、昆虫毒、動物鱗屑粉塵、真菌孢子、及び薬物 (例えば、ペニシリン) が挙げられるが、これらに限定されない。天然、動物、及び植物のアレルゲンの例としては、以下の属に対して特異的なタンパク質が挙げられる: イヌ属 (イヌ (*Canis familiaris* ) ) ; ヒョウヒダニ属 (例えば、コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae* ) ) ; ネコ属 (ネコ (*Felis domesticus* ) ) ; プタクサ属 (プタクサ (*Ambrosia artemisiifolia* ) ) ; ドクムギ属 (例えば、ホソムギ (*Lolium perenne* ) 又はネズミムギ (*Lolium multiflorum* ) ) ; スギ属 (スギ (*Cryptomeria japonica* ) ) ; アルテルナリア属 (アルテルナリア・アルテルナータ (

10

20

30

40

50

*Alternaria alternata*)) ; ハンノキ ; ハンノキ属 ( ヨーロッパハンノキ (*Alnus gultinosa*)) ; カバノキ属 ( シラカンバ (*Betula verrucosa*)) ; コナラ属 ( アルバオーク (*Quercus alba*)) ; オリーブ属 ( オリーブ (*Olea europa*)) ; ヨモギ属 ( オウシュウヨモギ (*Artemisia vulgaris*)) ; オオバコ属 ( 例えば、ヘラオオバコ (*Plantago lanceolata*)) ; ヒカゲミズ属 ( 例えば、パリエタリア・オフィチナリス (*Parietaria officinalis*) 又はカベイラクサ (*Parietaria judaica*)) ; チャバネゴキブリ属 ( 例えば、チャバネゴキブリ (*Blattella germanica*)) ; ミツバチ属 ( 例えば、アピス・ムルティフロルム (*Apis multiflorum*)) ; イトスギ属 ( 例えば、イタリアイトスギ (*Cupressus sempervirens*)、アリゾナイトスギ (*Cupressus arizonica*)、及びモントレーイトスギ (*Cupressus macrocarpa*)) ; ビャクシン属 ( 例えば、ジュニペラス・サビオノイデス (*Juniperus sabinooides*)、エンピツビャクシン (*Juniperus virginiana*)、セイヨウネズ (*Juniperus communis*)、及びジュニペラス・アシェイ (*Juniperus ashei*) ; クロベ属 ( 例えば、コノテガシワ (*Thuya orientalis*)) ; ヒノキ属 ( 例えば、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)) ; ゴキブリ属 ( 例えば、ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*)) ; カモジグサ属 ( 例えば、シバムギ (*Agropyron repens*)) ; ライムギ属 ( 例えば、ライムギ (*Secale cereale*)) ; コムギ属 ( 例えば、コムギ (*Triticum aestivum*)) ; カモガヤ属 ( 例えば、カモガヤ (*Dactylis glomerata*)) ; ウシノケグサ属 ( 例えば、ヒロハノウシノケグサ (*Festuca elatior*)) ; イチゴツナギ属 ( 例えば、ナガハグサ (*Poa pratensis*) 又はコイチゴツナギ (*Poa compressa*)) ; カラスムギ属 ( 例えば、マカラスムギ (*Avena sativa*)) ; シラゲガヤ属 ( 例えば、シラゲガヤ (*Holcus lanatus*)) ; ハルガヤ属 ( 例えば、ハルガヤ (*Anthoxanthum odoratum*)) ; オオカニツリ属 ( 例えば、オオカニツリ (*Arrhenatherum elatius*)) ; コヌカグサ属 ( 例えば、コヌカグサ (*Agrostis alba*)) ; アワガエリ属 ( 例えば、オオアワガエリ (*Phleum pratense*)) ; クサヨシ属 ( 例えば、クサヨシ (*Phalaris arundinacea*)) ; スズメノヒエ属 ( 例えば、バヒアグラス (*Paspalum notatum*)) ; モロコシ属 ( 例えば、セイバンモロコシ (*Sorghum halepensis*)) ; 及びスズメノチャヒキ属 ( 例えば、コスズメノチャヒキ (*Bromus inermis*))。抗体検出及び分析のために本方法において上記アレルゲン由来のエピトープを使用することも考えられる。

#### 【 0 0 8 7 】

幾つかの態様では、本組成物及び / 又は方法は、疾患に誘導される又は関連する被験体の免疫系の抑制、例えば、癌に誘導される又は関連する被験体の免疫系の抑制を緩和するために用いることもできる。例えば、I F P 3 5 ファミリーのタンパク質又はアナログ若しくは誘導体を投与することによって、疾患を引き起こすベクターの能力に打ち勝って免疫反応を回避するために、被験体の免疫応答を活性化及び / 又は増強することができる。この治療アプローチは、それによって免疫系が抑制されることが証明されている疾患状態、例えば、細菌感染症、寄生虫感染症 ( マラリア及びトリパノソーマ症 )、ウイルス感染症、消化管潰瘍、及び避妊と共にヘリコバクター・ピロリ感染に起因する胃癌に適用可能である。

#### 【 0 0 8 8 】

幾つかの態様では、I F P 3 5 受容体又は I F P 3 5 に対するアンタゴニスト抗体との結合に関与するアミノ酸残基を本明細書に提供する。1つの態様では、ドメイン交換二量体は、弧交差表面領域を形成し、前記二量体は、S e r 1 4 5、A s p 1 7 2、V a l 1

10

20

30

40

50

73、Leu177、Arg212、Gln199、Gln207、Gln208、Pro210、Ser214、Thr201、及びTyr216等の幾つかの残基を提供して、図16Aに示す大きな露出表面を形成する。残基の中でも、残基Glu150、Glu175、Leu177、Gln207、及びGln208が、より重要な位置である(図16A)。したがって、これらは、受容体又は抗体に結合する可能性が高い。

【0089】

幾つかの態様では、IFP5-NID八量体によって形成される環構造の内面上の他の残基が、他のタンパク質との相互作用に関与している。これら残基は、Ser145、Arg147、Glu150、Glu151、Val173、Gly206、Gln207、及びGln208を含んでいてよい。幾つかの態様では、Arg147、Gln207、Gln208、Glu150、及びGlu151は、八量体環構造の内面から突出している延長側鎖を提供する(図16B)。

10

【0090】

二量体又は八量体の構造に基づいて、単一の単量体又はドメイン交換単量体のシートバレル様構造のアミノ末端及びカルボキシル末端の先端近傍の幾つかの比較的大きなアミノ酸残基が存在する。これら比較的大きなアミノ酸残基は、外向きに延在している。これら残基は、Arg187、Glu188、Gln192、Gln196、Arg212、及びTyr216を含んでいてよく、これらは距離が近接している。更に、幾つかのアミノ酸残基は、他のタンパク質、抗体、又は低分子との結合に関与し得る(図16C)。

【0091】

20

上記これら残基は、構造の表面上に位置する。幾つかの実施形態では、これら残基は、受容体又は抗体との結合に関与し、薬物阻害にとって鍵となる位置である。

【0092】

幾つかの態様では、本発明者らは、IFP35及びNMIを発現させ、精製し、結晶化し、また、IFP35の1つの断片の構造を決定した。IFP35の断片は、炎症応答を誘導することができ、更に、IFP35及びNMIは、細胞から分泌されて、激しい免疫応答を刺激することができる。IFP35抗体又はNMI抗体を用いて細胞溶液又は体液中のIFP35又はNMIを中和することを通してIFP35又はNMIの過剰な分泌発現によって引き起こされる過剰な免疫応答を制御することが有効であり得る。幾つかの態様では、本開示は、身体及び組織の損傷を避け、被験体の生存率を上昇させる。この結果は、IFP35及びNMIの過剰発現に関連する疾患又は病態、例えば、細菌感染症、ウイルス侵入、自己免疫疾患、腫瘍、及び他の感染症を、IFP35及び/又はNMIの濃度低減によって制御できることを示す。一方、IFP35及び/又はNMIの発現及び/又は進行(例えば、分泌)の欠陥又は欠損によって引き起こされる疾患は、タンパク質の添加を通して改善することができる。

30

【0093】

以下は、CLUSTAL2.1多重配列アラインメントを用いた、ヒトIFP35(hIFP)、マウスIFP35(mIFP)、ヒトNMI(hNMI)、及びマウスNMI(mNMI)の配列アラインメントである。

【0094】

40

【表 1】

hNMI	MEADKDDTQQILKEHSPD-EFIKDEQNKGLIDEITKKNIQLKKEIQKLETELQEATKEFQ	59
mNMI	MDADKDNKQACDERSAEMDDMRGEQSMGLVHEIMSENKELDEEIKKLEAELQSDAREFQ	60
hIFP	-----MSAPLDAALHALQEEQARLKMRLWDLQQLRKELGDSPK	38
mIFP	-----MSVTLQTVLYSLQEEQARLKMRLQELQQLKRRTGSPG	38
.	: : : . : . * . : . * . : .	
hNMI	IKEDIPETKMKFLSVETPENDSQLSNISCSFQVSSKVPYEQKQALITFEKEEVAQNVI	119
mNMI	IKENVPEKKLKLTSVESPKDGCHFSNSSCSFQVSSQILYELQEGQALITFEKEEVAQNVI	120
hIFP	DKVPFSVPKIPLVFRGHTQQDPEVPKSLVS---NLRIHCPLLAGSALITFDDPKVAEQVL	95
mIFP	AKIPFSVPEVPLVFQGGTKQGRQVPKFVVS---NLKVCCLPEGSALVTFEDPKVVDRL	95
*	. : . : : . : . : . * . : . : . * . : . : . * . : . : .	
hNMI	SMKHHVQIKDVNLEVTAQVPLNSGVRFQVY--VEVSKMKINVTEIPD--TLREDQMRD	175
mNMI	SMGNHVVQMEGTPVKVSAHPVPLNTGVRFQVH--VDISKMKINVTGIPD--ELSEEQTRD	176
hIFP	QQKEHTINMEECLRVQVQPLELPMVTTIQVMSSQLSGRRVLVTGFPASRLRLSEELLD	155
mIFP	QQKEHRVNLEDCLRVQVQPLELPMVTTIQV--SSQPDNHRVLVSGFPAGLRLSEELLD	153
.	: * : : : . : * : : * . : * : . : : * : . : : * . : : .	
hNMI	KLELSFSKSRNGGGEVDVDRQSGSAVITFVEIGVADKILKKKEYPLYINQTCRVRTV	235
mNMI	KLELSFCKSRNGGGEVESVDYDRKRSVAVITFVETGVVDKILKKKTYPLYMNQKCHSVAV	236
hIFP	KLEIFFGKTRNGGDDVDVR--ELLPGSVMLGFARDGVAQRLCQIGQFTVPLGGQVPLRV	213
mIFP	KLEIFFGKAKNGGDDVETR--EMLQGTVMLGFADEEVAQHLCQIGQFRVPLDRQVLLRV	211
***	: * : : : * : : : : . : : : . : : : . : : : .	
hNMI	SPYTEIHLKKYQIFSGTSKRTVLLTGMEGIQMDDEIIVEDLINIHFQRAKNGGGEVDVVKC	295
mNMI	SPCIERCLEKYQVFSVAVSKKTVLLTGLEGIPVDEETGEDLLNIHFQKNGGGEVEVVKC	296
hIFP	SPYVNGEIQKAEIRSQVPRSVLVNIPDI-LDGPELHDVLEIHFQKPTRGGGEVEALTV	272
mIFP	SPYVSGEIQKAEIKFQQAAPHSVLVNIPDV-MDAQELHDILEIHFQKPTRGGGEVEALTV	270
**	. : * : : . : : : . : : * . : : : * : : : : . : : : .	
hNMI	S-LGQPHIAYFEE-----	307
mNMI	S-LDQSFAAYFKEEARETI	314
hIFP	VPQGQQLAVFTSESG---	288
mIFP	VPSGQQLAIFTSESS---	286
.	* * *	

10

20

## 【0095】

幾つかの実施形態では、免疫応答の誘発においてIFP35ファミリーのタンパク質を用いる方法を本明細書に提供する。別の実施形態では、例えば、食品又は薬物によって、異常に高いレベルのIFP35/NMIによって誘導される細菌、ウイルスの感染又は臓器の損傷によって、サイトカインストームを阻害するために、IFP35ファミリーのタンパク質、例えば、IFP35及びNMI等を阻害及び/又は低減する方法を本明細書に提供する。前記臓器は、肺、腎臓、肝臓、又は他の臓器を含んでよい。

## 【0096】

30

幾つかの実施形態では、異常なレベルのIFP35ファミリーのタンパク質に関連するか又は引き起こされる疾患又は病態を治療又は予防するための、IFP35ファミリーのタンパク質のアнтаゴニスト化合物、例えば、抗体又は低分子を本明細書に提供する。

## 【0097】

他の実施形態では、抗体又は化合物を更に設計及び/又は選択するために結晶構造法を適用する方法を本明細書に提供する。1つの態様では、前記構造を用いて、薬物又は抗体がどのように標的タンパク質に結合するかを見出し、次いで、前記抗体又は化合物を更に修飾してよい。標的タンパク質/抗体共結晶構造から、標的タンパク質のエピトープを同定することもできる。

## 【0098】

40

実施形態1：免疫応答及び炎症を引き起こすための試薬/製品の調製又は抗腫瘍製品の調製におけるランケート型IFP35タンパク質の適用であって、前記ランケート型IFP35が、ヒトIFP35又はマウスIFP35であり、前記ランケート型ヒトIFP35が、以下の1)又は2)であり：

- 1) 配列番号2に記載の残基136～216を含むタンパク質；
- 2) 1個～10個の追加の残基が配列のアミノ及び/又はカルボキシル末端に付加され、配列相同性が1)の配列に対して少なくとも約90%である、1)に記載のタンパク質配列；

前記ランケート型マウスIFP35が、以下の3)又は4)である適用：

- 3) 配列番号4に記載の残基134～216を含むタンパク質；

50



4) 1個～10個の追加の残基が配列のアミノ及び／又はカルボキシル末端に付加され、配列相同性が3)の配列に対して少なくとも約90%である、3)に記載の前記タンパク質配列。

【0099】

実施形態2：前記トランケート型ヒトIFP35タンパク質が、配列番号2に示す残基124～220である実施形態1に記載の方法。

【0100】

実施形態3：IFP35タンパク質による免疫応答／炎症を誘発するための製品の調製又は腫瘍／癌に対する製品の調製における方法であって、前記IFP35タンパク質の配列が、配列番号2又は配列番号4に示す通りである方法。

10

【0101】

実施形態4：IFP35変異型タンパク質による免疫応答／炎症を誘発するための製品の調製又は腫瘍／癌に対する製品の調製における方法であって、前記IFP35変異型タンパク質が、IFP35受容体又は阻害抗体との結合に関与している残基の少なくとも1つの変異及び／又は修飾を有し、前記変異及び／又は修飾によって、IFP35受容体又は阻害抗体に対するIFP35の結合が低減するか又はなくなり、受容体結合／抗体結合に関与している前記残基が、Ser145、Asp172、Val173、Leu177、Arg212、Gln199、Gln207、Gln208、Pro210、Ser214、Thr201、Tyr216、Glu150、Glu175、Gln208、Arg147、Glu151、若しくはGly206、又はこれらの任意の組み合わせである方法。構造比較結果に従って、他の起源のIFP35及びNMIに由来する配列中に存在する対応する位置の残基は、本開示の範囲内である。構造比較結果によれば、IFP35及びNMIは、いずれも2つのNIDドメインを有し、これら2つのNIDドメインは互いに相同であるので、構造決定されたIFP35のNIDドメインの外側のIFP35及びNMIの対応するNID領域残基は、本開示の範囲内である。

20

【0102】

実施形態5：実施形態1から4のいずれかに記載の方法であって、前記方法が、免疫応答／炎症を誘導して、炎症因子の発現を増加させるか、好中性を動員するか、又はNF- $\kappa$ B経路を刺激し、前記炎症因子が、IL-1、TNF- $\alpha$ 、iNOS、又はCD86を含み、前記NF- $\kappa$ B経路の刺激が、IBを増加させて、IB全量を減少させることである方法。

30

【0103】

実施形態6：異常に多量のIFP35によって誘導される過剰な免疫応答によって疾患を阻害する方法、又はIFP35タンパク質を阻害して炎症因子の発現／反応を阻害する製品の適用。

【0104】

実施形態7：前記阻害製品又は試薬が、IFP35タンパク質活性を阻害するIFP35抗体である、及び／又は前記抗体が、モノクローナル又はポリクローナルである、及び／又は前記疾患が、敗血症である、及び／又は前記炎症因子が、IL-1、TNF- $\alpha$ 、iNOS、又はCD86を含む、実施形態6に記載の方法。

40

【0105】

実施形態8：免疫応答及び炎症を誘発するための試薬／製品の調製又は抗腫瘍製品の調製におけるトランケート型NMIタンパク質の使用であって、前記トランケート型NMIが、トランケート型のヒトNMI又はマウスNMIであり、前記トランケート型ヒトNMIタンパク質が、配列番号8に記載の配列の残基155～240を有し、前記トランケート型マウスNMIタンパク質が、配列番号6に記載の配列の残基151～250を有する使用。

【0106】

実施形態9：NMIタンパク質によって免疫応答／炎症を誘発するための製品の調製、又は腫瘍／癌に対する製品の調製における方法であって、前記NMIタンパク質が、ヒト

50

又はマウスのNM I タンパク質であり、前記ヒトNM I の配列が、配列番号 8 に記載の配列であるか、又は前記マウス I F P 3 5 の配列が、配列番号 6 に記載の配列である方法。

【 0 1 0 7 】

実施形態 1 0 : NM I 変異型タンパク質によって免疫応答 / 炎症を誘発するための製品の調製、又は腫瘍 / 癌に対する製品の調製における方法であって、前記NM I 変異型タンパク質が、含まれている残基が変異しており、それによって、NM I がNM I 受容体又は阻害抗体に結合しなくなるタンパク質である方法。

【 0 1 0 8 】

実施形態 1 1 : 前記免疫応答 / 炎症の誘発が、炎症因子の発現を刺激し及び / 又はNF - B 経路のシグナル伝達を刺激し、前記炎症因子が、IL - 1 、TNF - 、iNO S、又はCD 8 6 を含み、前記NF - B 経路の刺激が、I B を増加させて、I B 全量を減少させることである実施形態 8 から 1 1 のいずれかに記載の方法。

10

【 0 1 0 9 】

実施形態 1 2 : NM I タンパク質活性を阻害して、NM I の異常な高発現によって誘導される疾患を治療する製品、又はNM I を阻害して、炎症因子の発現を阻害する製品を調製する方法。

【 0 1 1 0 】

実施形態 1 3 : 前記製品が、NM I 抗体であり、任意で、前記抗体が、モノクローナル又はポリクローナル抗体であり、任意で、前記疾患が敗血症であり、任意で、前記炎症因子が、IL - 1 、TNF - 、iNO S、又はCD 8 6 を含む実施形態 1 2 に記載の方法。

20

【 0 1 1 1 】

実施形態 1 4 : トランケート型 I F P 3 5 タンパク質を過剰発現及び結晶化させる方法であって、

- 1 ) 細菌細胞を用いて実施形態 1 に記載のトランケート型タンパク質を発現させることと、
- 2 ) 前記トランケート型 I F P 3 5 タンパク質を精製することと、
- 3 ) 精製された前記トランケート型タンパク質を結晶化させることとを含む方法。

【 0 1 1 2 】

実施形態 1 5 : N 末端 GST タグ付融合タンパク質 ( GST - I F P 3 5 - N I D ) を発現させるために前記トランケート型 I F P 3 5 N I D 断片遺伝子をベクター (例えば、p G E X - 6 p - 1 ベクター) にクローニングし、次いで、I P T G 誘導後、このプラスミドベクターを大腸菌細胞に形質転換し、次いで、精製のために細菌を回収することを更に含み、前記精製工程が、アフィニティクロマトグラフィー ( グルタチオンカラム ) 工程、GST 融合タグを酵素によって除去する工程、及び / 又はイオン交換カラム工程、及び / 又はゲル濾過カラム工程を含む実施形態 1 4 に記載の方法。

30

【 0 1 1 3 】

実施形態 1 6 : NM I タンパク質又はそのトランケート型を結晶化する方法であって、  
1 ) 真核細胞において実施形態 8 に記載のNM I トランケート型タンパク質を発現させることと、

40

- 2 ) これらトランケート型タンパク質を精製することと、
- 3 ) これらタンパク質を結晶化させることとを含む方法。

【 0 1 1 4 】

実施形態 1 7 : N 末端 GST タグ付融合タンパク質 ( GST - NM I - N I D ) を発現させるために前記トランケート型NM I N I D 断片遺伝子をベクター (例えば、p G E X - 6 p - 1 ベクター) にクローニングし、次いで、I P T G 誘導後、このプラスミドベクターを大腸菌細胞に形質転換し、次いで、精製のために細菌を回収することを更に含み、前記精製工程が、アフィニティクロマトグラフィー ( グルタチオンカラム ) 工程、GST 融合タグを酵素によって除去する工程、及び / 又はイオン交換カラム工程、及び / 又はゲル濾過カラム工程を含む実施形態 1 4 に記載の方法。

50

## 【 0 1 1 5 】

実施形態 18：疾患を治療するために I F P 3 5 ファミリーのタンパク質を標的とすることによって、腫瘍、免疫不全疾患等を治療するために、I F P 3 5 ファミリーのタンパク質、例えば、I F P 3 5 及び N M I を設計又は修飾する方法。

## 【 0 1 1 6 】

実施形態 19：本明細書に開示する I F P 3 5 - N I D 結晶構造の原子座標に従って、本明細書に開示する I F P 3 5 - N I D 構造まで約 1 . 5 オングストローム未満のコア領域における平均平方根偏差 ( R M S D ) を有する構造。

## 【 0 1 1 7 】

実施形態 20：I F P 3 5 - N I D ドメイン ( 残基 1 3 6 ~ 2 1 6 を含む ) のコア領域まで 1 . 5 アングストローム ( a s t r o m ) 未満の平均平方根偏差 ( R M S D ) を有する原子レベル構造。

## 【 0 1 1 8 】

実施形態 21：マウスにおいてヒト I F P 3 5 に対して生成され、中国普通微生物菌種保蔵管理センター ( C G M C C ) に C G M C C 9 5 7 3 として寄託されている I F P 3 5 抗体 1 D 7。

## 【 0 1 1 9 】

実施形態 22：ヒト又はマウス起源を有する I F P 3 5 トランケート型タンパク質であって、前記ヒト I F P 3 5 トランケート型が、

- 1 ) 配列番号 4 に記載の残基 1 3 4 ~ 2 1 6 を含むタンパク質；
- 2 ) 追加の 1 個 ~ 1 0 個の残基がそのアミノ及び / 又はカルボキシル末端に付加されていることを除いて 1 ) と同じ配列を有するタンパク質であって、1 ) に記載のタンパク質に対する相同性が少なくとも約 9 0 % であるタンパク質。

## 【 0 1 2 0 】

実施形態 23：受容体又は中和抗体に対する I F P 3 5 ファミリーのタンパク質の結合に関与する残基に変異を有する I F P 3 5 ファミリーのタンパク質であって、前記変異が、前記受容体又は中和抗体に対する結合を崩壊させるか又は低減し、前記残基が、配列番号 2 に記載のヒト I F P の S e r 1 4 5、A s p 1 7 2、V a l 1 7 3、L e u 1 7 7、A r g 2 1 2、G l n 1 9 9、G l n 2 0 7、G l n 2 0 8、P r o 2 1 0、S e r 2 1 4、T h r 2 0 1、T y r 2 1 6、G l u 1 5 0、G l u 1 7 5、G l n 2 0 8、A r g 1 4 7、G l u 1 5 1、及び / 又は G l y 2 0 6、又は配列番号 2 の上記残基に対応する前記 I F P 3 5 ファミリーのタンパク質中の残基であるタンパク質。

## 【 0 1 2 1 】

実施形態 25：( 配列番号 8 に記載のヒト N M I については ) 残基 1 5 5 ~ 2 4 0 及び ( 配列番号 6 に記載のマウス N M I については ) 残基 1 5 1 ~ 2 5 0 の N M I トランケート型タンパク質。

## 【 0 1 2 2 】

D、異常に高いレベル及び / 又は活性の I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための医薬組成物

別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための医薬組成物であって、有効量の、被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を防ぐか又は低減する剤と、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 1 2 3 】

本医薬組成物を用いて、被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び / 又は予防することができる。

## 【 0 1 2 4 】

幾つかの実施形態では、本医薬組成物を用いて、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療することができる。他の実施形態では、本医薬組成物を用いて、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障

害を予防することができる。

【0125】

任意の好適な剤は、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び/又は予防するために、本医薬組成物中で用いてよい。例えば、好適な剤を用いて、IFP35及び/又はNMIの遺伝子のコピー数を低減する、IFP35及び/又はNMIの遺伝子の複製をブロック又は低減する、IFP35及び/又はNMIの遺伝子の転写をブロック又は低減する、IFP35及び/又はNMIのmRNAの翻訳をブロック又は低減する、及び/又はIFP35及び/又はNMIの1つの、幾つかの、若しくは全ての活性を阻害することができる。幾つかの実施形態では、前記剤は、IFP35及び/又はNMIをコードしている遺伝子を標的とするポリヌクレオチド(例えば、siRNA、shRNA、又はmiRNA)を含む。siRNAは、IFP35及び/又はNMIの遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。例えば、siRNAは、1以上のNIDをコードしているIFP35及び/又はNMIの遺伝子の一部を標的とし得る。他の実施形態では、前記剤は、IFP35及び/又はNMIをコードしている遺伝子を標的とするアンチセンスRNAを含む。アンチセンスRNAは、IFP35及び/又はNMIの遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。

10

【0126】

更に他の実施形態では、前記剤は、IFP35及び/又はNMIの転写を制御する核因子を阻害又は調節する。IFP35及び/又はNMIの転写を制御する核因子を阻害又は調節する任意の好適な剤を本方法で用いてよい。

20

【0127】

更に他の実施形態では、前記剤は、IFP35及び/又はNMIに特異的に結合する抗体を含む。前記抗体は、IFP35及び/又はNMIの任意の好適な部分に特異的に結合することができる。例えば、前記抗体は、IFP35及び/又はNMIの1以上のNIDに特異的に結合することができる。別の例では、前記抗体は、細胞IFP35及び/又はNMI受容体と相互作用するIFP35及び/又はNMIの一部に特異的に結合することができる。

【0128】

幾つかの態様では、IFP35及び/又はNMIに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片について本明細書に開示し、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号9に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列からなるCDRを含む重鎖可変領域、及び/又は配列番号10に記載の軽鎖可変領域配列におけるCDRのアミノ酸配列からなるCDRを含む軽鎖可変領域を含む。1つの実施形態では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号9に記載の重鎖可変領域と、配列番号10に記載の軽鎖可変領域とを含む。本明細書に開示する抗体のCDR及び/又はフレームワーク領域(FR)に保存的置換を導入してもよい。

30

【0129】

VQLVESGPELK KPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGETPTFADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINN LKNEDTATYFCARYGYSWAMDYWGQGTSTVTVSSAST(配列番号9)。

40

【0130】

DIVMTQSPAIMSASPGEKV TMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAE DAATY YCQQWSSNPPI TFGAGTKLEIK(配列番号10)。

【0131】

1つの態様では、IFP35及び/又はNMIに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片をコードしている単離ポリヌクレオチドについて本明細書に開示する。幾つかの実施形態では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号9に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列からなるCDRを含む重鎖可変領域、及

50

び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含む。幾つかの態様では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域と、配列番号１０に記載の軽鎖可変領域とを含む。他の実施形態では、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号１１及び／又は配列番号１２に記載の核酸配列を含む。

【０１３２】

TGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCCCTTGAC  
CCCAGTAGTCCATAGCCCAAGAGTACCCGTATCTTGCACA  
GAAATATGTAGCCGTGTCCTCATTTCTTGAGGTTGTTGATC  
TGCAAATAGGCAGTGCTGGCAGAGGTTTCCAAAGAGAAAGG  
CAAACCGTCCCTTGAAAGTCATCAGCAAATGTTGGCTCTCC  
AGTGTAGGTGTTTATCCAGCCCATCCACTTTAAACCCCTTT  
CCTGGAGCCTGCTTCACCCAGTTTCATTCATAGTTTGTGA  
AGGTATACCCAGAAAGCCTTGCAAGGAGATCTTGACTGTCTC  
TCCTGACTCCTTAAGCTGCAACCT (配列番号１１)。

10

【０１３３】

GACATTTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA  
TCTCCAGGGGAGAAAGGTCAACCATGACCTGCAGTGCCAGCT  
CAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAAGTCAGG  
CACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTG  
GCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTG  
GGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGCATGGAGGGCTGA  
AGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGAGTAGTAAC  
CCACCCATCACGTTTCGGTGCTGGCACCAAGCTGGAAATCA  
AA (配列番号１２)。

20

【０１３４】

用語「相補性決定領域」及び「ＣＤＲ」は、当技術分野において公知であり、抗原特異性及び結合親和性を付与する、抗体の可変領域内のアミノ酸の非連続配列を指す。一般的に、各重鎖可変領域に３つのＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）が存在し、各軽鎖可変領域に３つのＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）が存在する。

30

【０１３５】

所与のＣＤＲの正確なアミノ酸配列の境界は、Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabat」付番スキーム)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (「Chothia」付番スキーム)、MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745. (「Contact」付番スキーム)、Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 Jan; 27 (1): 55-77 (「IMGT」付番スキーム)、及びHonegger A and Plueckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,

40

50

" J Mol Biol, 2001 Jun 8; 309 (3): 657 - 70, (A H o 付番スキーム)に記載されているものを含む多数の周知のスキームのいずれかを用いて容易に決定することができる。

【0136】

所与のCDRの境界は、同定に用いられるスキームに応じて変化し得る。例えば、K a b a tスキームは、構造アラインメントに基づいているが、一方、C h o t h i aスキームは、構造情報に基づいている。K a b a t及びC h o t h i aの両スキームの付番は、最も一般的な抗体領域の配列長に基づいており、例えば、「30a」等の挿入文字によって適応させる挿入、及び幾つかの抗体に存在する欠失を含む。2つのスキームは、異なる位置に特定の挿入及び欠失(「インデル」)を配置するので、付与される番号が異なる。C o n t a c tスキームは、複合結晶構造の分析に基づいており、多くの点でC h o t h i a付番スキームと類似している。

10

【0137】

したがって、特に指定しない限り、所与の抗体又はその領域、例えば、可変領域の「C D R」及び「相補性決定領域」という用語、並びに前記抗体又はその領域の個々のC D R(「C D R - H 1、C D R - H 2」は、本明細書に上記した公知のスキームのいずれかによって規定される相補性決定領域を包含すると理解すべきである。

【0138】

本明細書で使用する時、用語「保存的置換」とは、当業者に公知のアミノ酸及び/又はアミノ酸配列の置換を指し、一般的に、得られる分子の生物活性を変化させることなしに行うことができる。当業者は、一般的に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換が生物活性を実質的に変化させないことを認識している(例えば、W a t s o n, et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (第4版 1987))。例えば、かかる変化としては、以下が挙げられる: イソロイシン(I)、バリン(V)、及びロイシン(L)のいずれかをこれら疎水性アミノ酸のうちのいずれか他のアミノ酸の代わりに用いる; アスパラギン酸(D)をグルタミン酸(E)の代わりに用いる、及びグルタミン酸(E)をアスパラギン酸(D)の代わりに用いる; グルタミン(Q)をアスパラギン(N)の代わりに用いる、及びアスパラギン(N)をグルタミン(Q)の代わりに用いる; 並びにセリン(S)をトレオニン(T)の代わりに用いる、及びトレオニン(T)をセリン(S)の代わりに用いる。また、特定のアミノ酸の環境及びタンパク質の三次元構造におけるその役割に依存して、他の置換も保存的であると考えられる場合がある。例えば、グリシン(G)及びアラニン(A)は、多くの場合、アラニン(A)及びバリン(V)と同様、互換的に用いることができる。比較的疎水性であるメチオニン(M)は、多くの場合、ロイシン及びイソロイシンと互換的に用いることができ、時に、バリンとも互換的に用いられる。リジン(K)及びアルギニン(R)は、多くの場合、アミノ酸残基の重要な特徴がその変化であり、且つこれら2つのアミノ酸残基のpKが異なることが重要ではない位置において互換的に用いられる。特定の環境においては、更に他の変化が「保存的」であると考えられる場合もある(pages 13 - 15 "Biochemistry" 第2版. Lubert Stryer ed (Stanford University); Henikoff et al., PNAS 1992 Vol 89 10915 - 10919; Lei et al., J Biol Chem 1995 May 19; 270 (20): 11882 - 6を参照)。他の置換も許容可能であり、経験的に又は公知の保存的置換に従って決定することができる。

20

30

40

【0139】

更に他の実施形態では、前記剤は、I F P 3 5及び/又はN M Iの変異体形態を含んでいてよい。I F P 3 5及び/又はN M Iの任意の好適な変異体形態を本方法で用いることができる。例えば、I F P 3 5及び/又はN M Iの変異体形態は、変異型I F P 3 5及び/又はN M I、及び/又はI F P 3 5及び/又はN M Iの断片であってよい。

【0140】

50

前記医薬組成物は、任意の好適な経路を介して投与してよい。例えば、前記医薬組成物は、経口、経鼻、吸入、非経口、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、局所、又は直腸内経路を介して投与してよい。

【0141】

幾つかの実施形態では、本医薬組成物は、別の好適な治療又は予防用の物質又は処理を更に含んでいてよい。例えば、前記医薬組成物は、更に、被験体における増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌を治療又は予防するための薬物を有効量含んでいてよい。

【0142】

本医薬組成物は、任意の好適な量又は投与量で用いてよい。例えば、本医薬組成物は、前記被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を有しない同等の被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性のレベルと実質的に同一のレベルまで低減する量で投与してよい。

10

【0143】

本医薬組成物を用いて、任意の好適な被験体における疾患又は障害を治療及び / 又は予防することができる。例えば、前記被験体は、哺乳類であってよい。幾つかの実施形態では、前記哺乳類は、ヒトである。他の実施形態では、前記被験体は、非ヒト動物又は非ヒト哺乳類、例えば、実験用、愛玩用、又は家畜用の非ヒト動物又は非ヒト哺乳類である。

【0144】

E、医薬を製造するための、被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を防止又は低減する剤の有効量の使用

20

更に別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための医薬を製造するための、前記被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を防止又は低減する剤の有効量の使用を提供する。

【0145】

被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を防止又は低減する剤は、前記被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための医薬を製造するために用いることができる。

30

【0146】

幾つかの実施形態では、被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を防止又は低減する剤は、前記被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する任意の好適な疾患又は障害を治療するための医薬を製造するために用いることができる。他の実施形態では、被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を防止又は低減する剤は、前記被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する任意の好適な疾患又は障害を予防するための医薬を製造するために用いることができる。

【0147】

任意の好適な剤は、被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する任意の好適な疾患又は障害を治療するための医薬を製造するために用いることができる。例えば、好適な剤を用いて、I F P 3 5 及び / 又は N M I の遺伝子のコピー数を低減し、I F P 3 5 及び / 又は N M I の遺伝子の複製をブロック又は低減し、I F P 3 5 及び / 又は N M I の遺伝子の転写をブロック又は低減し、I F P 3 5 及び / 又は N M I の mRNA の翻訳をブロック又は低減し、及び / 又は I F P 3 5 及び / 又は N M I の 1 つ、幾つか、若しくは全ての活性を阻害することができる。幾つかの実施形態では、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I をコードしている遺伝子を標的とする s i R N A を含む。s i R N A は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。例えば、s i R N A は、1 以上の N I D をコードしている I F P 3 5 及び / 又は N M I の遺伝子の一部を標的とし得る。

40

50

## 【 0 1 4 8 】

他の実施形態では、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I をコードしている遺伝子を標的とするアンチセンス R N A を含む。アンチセンス R N A は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。例えば、1 以上の N I D をコードしている I F P 3 5 及び / 又は N M I の遺伝子の一部を標的とし得る。

## 【 0 1 4 9 】

更に他の実施形態では、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の転写を制御する核因子を阻害又は調節する。I F P 3 5 及び / 又は N M I の転写を制御する核因子を阻害又は調節する任意の好適な剤は、被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を治療及び / 又は予防するための医薬を製造するために用い

10

## 【 0 1 5 0 】

更に他の実施形態では、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I に特異的に結合する抗体を含む。前記抗体は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の任意の好適な部分に特異的に結合することができる。例えば、前記抗体は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の 1 以上の N I D ドメインに特異的に結合することができる。別の例では、前記抗体は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の N I D ドメインの一部に特異的に結合することができる。

## 【 0 1 5 1 】

更に他の実施形態では、前記剤は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の変異体形態を含んでいてよい。I F P 3 5 及び / 又は N M I の任意の好適な変異体形態を本方法で用いること

20

## 【 0 1 5 2 】

前記医薬は、任意の好適な経路を介して投与するように製造してよい。例えば、前記医薬は、経口、経鼻、吸入、非経口、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、局所、又は直腸内経路を介して投与してよい。

30

## 【 0 1 5 3 】

幾つかの実施形態では、本医薬は、別の好適な治療又は予防用の物質又は処理を更に含んでいてよい。例えば、前記医薬は、更に、被験体における増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌を治療又は予防するための薬物を有効量含んでいてよい。

## 【 0 1 5 4 】

本医薬は、任意の好適な量又は投与量で用いてよい。例えば、本医薬は、前記被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性を、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を有しない同等の被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の産生及び / 又は活性のレベルと実質的に同一のレベルまで低減する量で投与してよい。

40

## 【 0 1 5 5 】

本医薬を用いて、任意の好適な被験体における疾患又は障害を治療及び / 又は予防することができる。例えば、前記被験体は、哺乳類であってよい。幾つかの実施形態では、前記哺乳類は、ヒトである。他の実施形態では、前記被験体は、非ヒト動物又は非ヒト哺乳類、例えば、実験用、愛玩用、又は家畜用の非ヒト動物又は非ヒト哺乳類である。

## 【 0 1 5 6 】

本明細書に記載する化合物の任意の好適な製剤を調製することができる。概要については、Remington's Pharmaceutical Sciences, ( 2 0 0 0 ) Hoover, J. E. editor, 第 2 0 版, Lippincott Williams and Wilkins Publishing Company

50



, Easton, Pa., pages 780 - 857 を参照。製剤は、適切な投与経路に好適であるように選択される。一部の投与経路は、経口、非経口、吸入によって、局所、直腸、経鼻、頬側、膺、移植リザーバを介して、又は他の薬物投与方法である。化合物が、安定な非毒性の酸又は塩基塩を形成するのに十分に塩基性又は酸性である場合、前記化合物を塩として投与することが適切であり得る。薬学的に許容し得る塩の例は、生理学的に許容し得るアニオンを形成する酸と形成される有機酸付加塩、例えば、トシル酸塩、メタンスルホン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、マロン酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、安息香酸塩、アスコルビン酸塩、 $\alpha$ -ケトグルタル酸塩、及び  $\beta$ -グリセロリン酸塩である。塩化物、硫酸塩、硝酸塩、重炭酸塩、及び炭酸塩を含む好適な無機塩を形成してもよい。薬学的に許容し得る塩は、例えば、アミン等の十分に塩基性の化合物と生理学的に許容し得るアニオンが得られる好適な酸とによって、当技術分野において周知の標準的な手順を用いて得られる。カルボン酸のアルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウム、又はリチウム）又はアルカリ土類金属（例えば、カルシウム）塩も作製される。

10

#### 【0157】

企図する化合物を医薬組成物で投与する場合、前記化合物を薬学的に許容し得る賦形剤及び/又は担体との混合物に配合することが企図される。例えば、企図する化合物は、中性化合物又は薬学的に許容し得る塩として経口投与してもよく、生理食塩水中で静脈投与してもよい。従来のバッファ、例えば、リン酸バッファ、重炭酸バッファ、又はクエン酸バッファをこの目的のために用いてよい。無論、当業者は、特定の投与経路用の多数の製剤を提供するために、本明細書の教示内で製剤を改変することができる。具体的には、企図する化合物を改変して、水又は他のビヒクルに対する可溶性を高めてもよく、これは、例えば、当技術分野における通常の技能の範囲内の軽微な改変（塩形成、エステル化等）で容易に達成することができる。また、患者において最大限の有益な効果を得るために本化合物の薬物動態を管理するために、特定の化合物の投与経路及び投与レジメンを改変することも当技術分野における通常の技能の範囲内である。

20

#### 【0158】

本明細書に記載する剤は、一般的に、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル、エタノール、メタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、グリセロール、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド等の有機溶媒に可溶性であってもよく、可溶性にしてもよい。1つの実施形態では、本発明は、剤を薬学的に許容し得る担体と混合することによって調製される製剤を提供する。1つの態様では、前記製剤は、a) 水溶性有機溶媒、非イオン性溶媒、水溶性脂質、シクロデキストリン、ビタミン（例えば、トコフェロール）、脂肪酸、脂肪酸エステル、リン脂質、又はこれらの組み合わせに、記載する剤を溶解させて溶液を提供することと、b) 生理食塩水又は1~10%炭水化物溶液を含有するバッファを添加することを含む方法を用いて調製してよい。一例では、前記炭水化物は、デキストロースを含む。本方法を用いて得られる医薬組成物は、安定であり、動物及び臨床用途に有用である。

30

#### 【0159】

本方法及び組成物で用いるための水溶性有機溶媒の例示的な例としては、ポリエチレングリコール（PEG）、アルコール、アセトニトリル、N-メチル-2-ピロリドン、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。アルコールの例としては、メタノール、エタノール、イソプロパノール、グリセロール、又はプロピレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0160】

本方法及び組成物で用いるための水溶性非イオン性界面活性剤の例示的な例としては、CREMOPHOR（登録商標）EL、ポリエチレングリコール修飾CREMOPHOR（登録商標）（ポリオキシエチレングリセロールトリリシノレート35）、水素添加CREMOPHOR（登録商標）RH40、水素添加CREMOPHOR（登録商標）RH60、PEG-コハク酸塩、ポリソルベート20、ポリソルベート80、SOLUTOL（

50

登録商標)HS(ポリエチレングリコール660 12-ヒドロキシステアレート)、モノオレイン酸ソルピタン、ポロキサマー、LABRAFIL(登録商標)(エトキシ化杏仁油)、LABRASOL(登録商標)(カプリル-カプロイルマクロゴール-8-グリセリド)、GELUCIRE(登録商標)(グリセロールエステル)、SOFTIGEN(登録商標)(PEG6カプリル酸グリセリド)、グリセリン、グリコール-ポリソルベート、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0161】

本方法及び組成物で用いるための水溶性脂質の例示的な例としては、野菜油、トリグリセリド、植物油、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。脂質油の例としては、ヒマシ油、ポリオキシルヒマシ油、コーン油、オリーブ油、綿実油、ピーナッツ油、ペパーミント油、紅花油、ゴマ油、ダイズ油、水素添加野菜油、水素添加ダイズ油、ココヤシ油のトリグリセリド、パーム核油、及びこれらの水素添加形態、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0162】

本方法及び組成物で用いるための脂肪酸及び脂肪酸エステルの例示的な例としては、オレイン酸、モノグリセリド、ジグリセリド、PEGのモノ若しくはジ脂肪酸エステル、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0163】

本方法及び組成物で用いるためのシクロデキストリンの例示的な例としては、アルファ-シクロデキストリン、ベータ-シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリン、又はスルホブチルエーテル-ベータ-シクロデキストリンが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0164】

本方法において用いるためのリン脂質の例示的な例、シクロデキストリンとしては、ダイズホスファチジルコリン、又はジステアロイルホスファチジルグリセロール、及びこれらの水素添加形態、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0165】

当業者は、特定の投与経路用の多数の製剤を提供するために、本明細書の教示内で製剤を改変することができる。具体的には、化合物を改変して、水又は他のビヒクルに対する可溶性を高めてもよい。また、患者において最大限の有益な効果を得るために本化合物の薬物動態を管理するために、特定の化合物の投与経路及び投与レジメンを改変することも当技術分野における通常の技能の範囲内である。

30

【0166】

F、診断、予後診断、又は治療モニタリングの方法

更に別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害を診断、予後診断、又は治療モニタリングする方法であって、異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるIFP35及び/又はNMIのレベル及び/又は活性を評価することを含む方法を提供する。

40

【0167】

本方法は、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する任意の好適な疾患又は障害を診断、予後診断、又は治療モニタリングするために用いることができる。

【0168】

幾つかの実施形態では、本方法は、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害の診断に用いられ、被験体におけるIFP35及び/又はNMIのレベル及び/又は活性が、異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害(例えば、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌)を有しない同等の被験体におけるIFP35及び/又はNMIのレベル及び/又は活性よりも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%

50

、 1 5 0 %、 2 0 0 %、 3 0 0 %、 4 0 0 %、又は 5 0 0 % 高い場合、前記被験体が前記異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害を有していることを示す。

【 0 1 6 9 】

幾つかの実施形態では、本方法は、被験体の更なる治療を調整する、例えば、投与量を増加若しくは減少させる、又は治療を延長、短縮、若しくは停止するために、被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害の治療モニタリングを行うために用いられる。

【 0 1 7 0 】

幾つかの態様では、本方法は、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I のレベルを評価することを含む。他の実施形態では、本方法は、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I の活性を評価することを含む。例えば、細胞受容体又は抗体に結合する任意の好適な I F P 3 5 及び / 又は N M I 活性を評価することができる。更に他の実施形態では、本方法は、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I のレベル及び活性を評価することを含む。

【 0 1 7 1 】

I F P 3 5 及び / 又は N M I のレベル及び / 又は活性は、任意の好適なレベルで評価することができる。例えば、I F P 3 5 及び / 又は N M I のレベル及び / 又は活性は、D N A、R N A、及び / 又はタンパク質のレベルで評価することができる。I F P 3 5 及び / 又は N M I の D N A 及び / 又は R N A のレベルは、任意の好適な手段又は方法を用いて評価することができる。例えば、I F P 3 5 及び / 又は N M I の D N A 及び / 又は R N A のレベルは、I F P 3 5 及び / 又は N M I の D N A 及び / 又は R N A 中の少なくとも 1 0、1 5、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0、1, 0 0 0、又はそれ以上の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いて評価することができる。I F P 3 5 及び / 又は N M I のタンパク質のレベルは、任意の好適な手段又は方法を用いて評価することができる。例えば、I F P 3 5 及び / 又は N M I のタンパク質のレベルは、I F P 3 5 及び / 又は N M I に特異的に結合する抗体を用いて評価することができる。任意の好適な抗体を用いてよい。例えば、前記抗体は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の N I D ドメインの一部、又は 1 以上の N I D ドメインに特異的に結合することができる。更に別の例では、抗体は、ポリクローナル抗体である。

【 0 1 7 2 】

更に別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングのキットであって、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び / 又は N M I に関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体における I F P 3 5 及び / 又は N M I のレベル及び / 又は活性を評価するための手段を含むキットを提供する。

【 0 1 7 3 】

任意の好適な手段は、本キットで用いることができる。例えば、前記手段は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の活性の評価において用いることができる。別の例では、前記手段は、I F P 3 5 及び / 又は N M I の D N A 及び / 又は R N A のレベルを評価するための、I F P 3 5 及び / 又は N M I の D N A 及び / 又は R N A 中の少なくとも 1 0、1 5、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0、1, 0 0 0、又はそれ以上の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドであってよい。更に別の例では、前記手段は、I F P 3 5 及び / 又は N M I のタンパク質のレベルを評価するための、I F P 3 5 及び / 又は N M I に特異的に結合する抗体であってよい。前記好適な手段は、任意の好適な単一の又は

10

20

30

40

50

複数の容器、例えば、試験管、マイクロタイタープレート等に含まれていてもよい。また、前記好適な手段は、任意の好適な単一の又は複数の表面、例えば、ビーズ、チップ、又はマイクロ流体装置等に固定化されていてもよい。

【0174】

更に別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断の方法であって、異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるIFP35及び/又はNMIの遺伝子の遺伝的状态を決定することを含む方法を提供する。

【0175】

被験体におけるIFP35及び/又はNMIの遺伝子の遺伝的状态は、任意の好適な方法又は手段を用いて評価することができる。例えば、被験体におけるIFP35及び/又はNMIの遺伝子の遺伝的状态は、IFP35及び/又はNMIのDNA及び/又はRNA中の少なくとも10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いて決定することができる。

【0176】

更に別の態様では、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断のキットであって、異常に高いレベルのIFP35及び/又はNMIに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるIFP35及び/又はNMIの遺伝子の遺伝的状态を決定する手段を含むキットを提供する。

【0177】

本キットでは任意の好適な手段を用いてよい。例えば、本キットは、被験体におけるIFP35及び/又はNMIの遺伝子の遺伝的状态を決定するための、IFP35及び/又はNMIのDNA及び/又はRNA中の少なくとも10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含んでいてよい。前記好適な手段は、任意の好適な単一の又は複数の容器、例えば、試験管、マイクロタイタープレート等に含まれていてよい。また、前記好適な手段は、任意の好適な単一の又は複数の表面、例えば、ビーズ、チップ、又はマイクロ流体装置等に固定化されていてもよい。

【0178】

本方法は、任意の好適な方式で実施してよい。例えば、本方法は、手動で実施してよい。別の例では、本方法は、半自動的又は自動的に実施してよい。本方法は、任意の好適な場所で実施してよい。例えば、本方法は、病院、診療所、診察室、臨床検査室、薬局、会社、又は家庭で実施してよい。本方法は、任意の好適な人によって実施してよい。例えば、本方法は、医師、看護師、検査技師、介護者、又は患者によって実施されてよい。

【0179】

本キットは、追加の好適な構成要素、例えば、被験体からサンプルを得るための手段、アッセイ標準、被験体及び/又は試験指導書の識別子等を含んでいてもよい。本キットは、スタンドアロンキットであってもよく、アッセイシステム、例えば、自動化アッセイシステムの一部であってもよい。

【0180】

G、IFP35及び/又はNMIの調節因子を同定する方法

更に別の態様では、本開示は、IFP35及び/又はNMIの調節因子を同定する方法であって、a) IFP35及び/又はNMIを試験物質と接触させ、前記試験物質と接触したIFP35及び/又はNMIの活性を評価することと、b) 前記試験物質と接触していないIFP35及び/又はNMIの活性を評価することと、c) 工程a)及びb)で評価したIFP35及び/又はNMIの活性を比較し、工程a)及びb)で評価したIFP

10

20

30

40

50

35及び/又はNM Iの活性が異なる場合、前記試験物質をIFP35及び/又はNM Iの調節因子として同定することを含む方法を提供する。

【0181】

本方法では任意の好適な試験物質を用いてよい。例えば、前記試験物質は、低分子、IFP35及び/又はNM Iの変異型及び/又は断片を含むポリペプチドライブラリ、IFP35及び/又はNM Iに特異的に結合する抗体、siRNA、又はアンチセンスRNAであってよい。

【0182】

幾つかの実施形態では、本方法を用いて、IFP35及び/又はNM Iの活性の阻害剤を同定することができる。

10

【0183】

幾つかの実施形態では、本方法を用いて、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNM Iに関連する疾患又は障害を治療及び/又は予防するための薬物を同定することができる。本方法を用いて、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNM Iに関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び/又は予防するための薬物を同定することができる。例えば、被験体における異常に高いレベルのIFP35及び/又はNM Iに関連する疾患又は障害は、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌であってよい。

【0184】

本方法は、任意の好適なアッセイフォーマットを用いて実施してよい。好ましくは、本方法は、ハイスループットアッセイフォーマットを用いて実施してよい。

20

【0185】

幾つかの実施形態では、本開示は、本方法によって同定されるIFP35及び/又はNM Iの調節因子、又は薬物候補を提供する。

【実施例】

【0186】

H、実施例

実施例1：早期内因性DAMPとしてのIFP35ファミリーのメンバー

要約

この実施例では、IFP35のハイブリッドNIDドメイン(NID-H)の構造を決定した。NID-Hは、開構造又は閉構造に折り畳まれ得た。開構造のNID-Hは、幾つかの早期炎症因子の発現のアップレギュレーションを特徴とする、マクロファージにおけるサイトカインカスケードを誘導することによって、マウスに対して高い病原性を示した。更に、IFP35及びNM Iは、LPS又はIFN- $\gamma$ によって刺激した1時間後に単球又はマクロファージの細胞培養培地に放出された。また、LPSショックを与えたマウス及び敗血症患者の血清中においてもIFP35及びNM Iの蓄積が検出された。IFP35 NID-Hに対する中和抗体は、LPS誘導性炎症応答を弱め、敗血症マウスの生存率を有効に改善した。それに加えて、IFP35又はNM Iノックアウトマウスは、LPS曝露に対して耐性であった。公知の後期DAMPであるHMGB-1と比べて、IFP35ファミリーのメンバーは、TLR4の内因性リガンドとして機能し、転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化することができた。したがって、幾つかの態様では、IFP35及びNM Iを含む1以上のNIDドメインを有するIFP35ファミリーのメンバーは、早期内因性DAMPとして機能することができた。幾つかの態様では、感染症及び傷害の診断及び/又は治療におけるIFP35及び/又はNM I又は結合パートナーの使用を提供する。

30

40

【0187】

結果

1. NIDの構造から、その開構造及び閉構造が明らかになった。

配列解析によれば、IFP35は、そのN末端に最初の80アミノ酸を含有するL-zipドメインを有し、続いて、それぞれ81~170アミノ酸及び177~268アミノ酸に及ぶ2つのタンデムNIDドメインを有する(図1a)。二次構造予測に従ってトラ

50

ンケート型タンパク質コンストラクトを構築した。124番目～220番目のアミノ酸を含有するトランケート型IFP35タンパク質は、大腸菌で十分に発現した。このトランケート型IFP35タンパク質は2つの予測NIDドメインにまたがっているので、NID-H（ヘテロ接合性NID）と命名した（図1a）。精製プロセス中、NID-Hは、少なくとも2つの安定な凝集状態、二量体及び八量体で存在することが見出された（図2a）。

#### 【0188】

二量体状態及び八量体状態の両方を有する十分に回折されたNID-H結晶を得た。セレノ-L-メチオニン起源の二量体NID-Hの結晶は、2.2 Åで回折した。構造は、単一波長異常分散（SAD）法によって決定した（表1）。SAD法は、Chayen & Saridakis, Nature methods 5, 147-153 (2008)に開示されている。NID-Hは、1-1-2-3-2-4-5の順で互いに接続されている5本の鎖及び2つのα-ヘリックスによって形成されるバレル様構造に折り畳まれる（図1b）。ヘリックス1、及び1と2とを接続する次のループ（L1）に存在する幾つかの対は、二量体形成に重要な役割を果たす。構造に基づいて、各モノマー由来のIle159の側鎖間の疎水性相互作用、Lys163とGlu158との間及びAsp155とLys156との間の電子的相互作用、Asp170の側鎖とThr164の骨格におけるアミノ基との間の相互作用、Arg165の側鎖とVal171の骨格におけるカルボニル基との間の相互作用を含む、少なくとも5対の相互作用を観察することができた（図1c）。

#### 【0189】

10

20

## 【表 2】

表 1. データ収集及び精密化の統計値

	二量体 (Se-Met)	八量体 (ネイティブ)	
データ収集			
ビームライン	BL17U1	BL17U1	
波長 (Å)	0.9798	0.9792	
分解能レンジ(Å)	40.0-2.3 (2.34-2.30) <sup>a</sup>	50.0-2.5 (2.54-2.50)	
空間群	H3	P2 <sub>1</sub>	10
細胞寸法			
a, b, c (Å)	170.3, 170.3, 53.0	44.4, 125.3, 77.2	
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.3, 90.0	
全反射	25,256 (1,263)	29,326 (1,447)	
独自反射	1,148	6,110	
完全性 (%)	99.9 (100.0)	97.8 (99.9)	
平均 I/σ	74.2 (21.3)	21.1 (5.4)	
多重度	22.0 (22.5)	4.8 (5.4)	
R <sub>sys</sub> (%)	12.5 (69.9)	10.8 (57.9)	20
精密化			
分解能レンジ (Å)	32.38-2.30	36.71-2.50	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	18.1/22.9	20.6/25.3	
Rmsd 結合距離(Å)	0.002	0.003	
Rmsd 結合角(°)	0.619	0.639	
ラマチャンドランプ ロット			
最も好まれる (%)	98.2	97.6	
追加の許容 (%)	1.8	2.4	30
非許容 (%)	0.0	0.0	
平均 B 因子 (Å <sup>2</sup> )	29.0	55.0	

<sup>a</sup> 括弧内の値は、最高分解能シェルの値である。

## 【 0 1 9 0 】

次いで、N I D - Hの八量体構造を、分子置換 (M R) 法によって 2 . 8 の分解能で決定した (図 1 d、表 1)。八量体構造では 2 つのモノマー間のドメイン交換構造を観察することができる。具体的には、一方のモノマー由来の 1 - 1 - 2 が別のモノマー由来の 3 - 2 - 4 - 5 と相互作用し、バレル様構造に折り畳まれている (図 1 d)。この場合、2 つのモノマーが全体に亘って積み重ねられ、二量体において緊密に相互作用する。明確にするために、このドメイン交換二量体を開構造二量体 (o - 二量体) と命名した。ドメイン交換しない二量体を閉構造二量体 (c - 二量体) と呼ぶ。4 つの o - 二量体は、更に、c - 二量体に記載の通り、1 - 1 相互作用を通じて互いに相互作用し、環様構造を形成する (図 2 b)。o - 二量体における単量体は、c - 二量体における単量体とかなり類似している (図 1 e)。これらの間の平均平方根偏差 (R M S D) は、僅か約 0 . 7 である。主な違いは、2 と 3 とを接続する c - 二量体における - ターン (T 1) が、o - 二量体では真っ直ぐになっている点であり、この場合、それが、ループ (L 2) を形成し、2 つのバレル様構造を接続する。二量体構造及び八量体構造の結晶構造座標を、それぞれ、図 3 3 及び図 3 4 に提供する。

## 【0191】

強力な構造比較ツールであるDaliサーバを用いて、PDBにおける公知の構造をNID-Hのバレル様構造と比較した。NID-H構造は、RNA認識モチーフ(RRM)と非常に類似していることが見出された(図2c)。RRMは、様々な配列及び構造のRNAを同定するために広く用いられている。しかし、NID-Hの構造には明らかなRNA結合部位は存在せず、これは、その表面電荷分布によって示されている。また、NID-H及び様々な配列を有するRNAを用いてEMSA実験を実施したところ、NID-Hと試験したRNA配列との間に相互作用はみられなかった(データ不図示)。

## 【0192】

2. 開構造のIFP35 NID-Hは、免疫応答を刺激した。  
IFP35を検出するために、マウスで産生されるポリクローナル抗体を刺激するための抗原としてNID-Hドメインを用いた。NID-H八量体によって、用いた4頭のマウス全てにおいて死亡率が100%になった。更に、全てのマウスが腹部膨満及び明らかな腹水増加を伴って死亡した。この現象は、NID-H八量体が細胞毒性を有している可能性を示す。IFP35は、典型的には、単球、マクロファージ、樹状細胞、及びリンパ球等の免疫細胞で特異的に発現するので、NID-H八量体は、炎症応答を刺激することができた。

## 【0193】

TNF- 及びIL-1 等の炎症促進因子の転写レベルは、マウスマクロファージ様RAW264.7細胞においてNID-H八量体の存在下でアップレギュレートされた(図3a)。この結果は、リポ多糖(LPS)によって誘導される炎症性サイトカインの産生に類似していた。比較すると、NID-H二量体(c-二量体)は、この作用を有していなかった。これら結果に基づいて、八量体構造のNID-Hは、TNF- 及びIL-1 に関連するサイトカインストームを誘導する傾向がある。

## 【0194】

c-二量体自体は炎症を誘導することができなかったので、NID-H八量体におけるo-二量体が活性構造として機能した可能性がある。八量体骨格がその細胞毒性に必須であるかどうかを検証するために、図1cに示す通り1ヘリックスに3点の変異K156E/K163E/R165Eを有する変異体を構築した。これら変異体は、c-二量体の形成を部分的に破壊するはずであり、これは、八量体の脱重合につながる。したがって、幾つかの独立したo-二量体が生成されるはずである。結果は、変異型及び/又は改変型二量体がTNF- 及びIL-1 の転写を部分的にアップレギュレートできることを示し(図3b)、これは、独立したo-二量体の形成が原因であった可能性がある。結果は、o-二量体がサイトカインストームを誘導するNID-Hの活性状態であることを示した。

## 【0195】

NID-Hは、自然免疫応答を活性化することができるので、IFP35完全長タンパク質が発現した。しかし、IFP35は、真核細胞における収量が低く、恐らくそのN末端における疎水性L-zipドメインが原因で大腸菌において封入体を形成した。N末端の34アミノ酸が欠失しているトランケート型IFP35(N)を構築し、原核発現系を用いて発現させた。可溶性Nタンパク質が得られ、Nタンパク質は、NID-H八量体よりも有効にTNF- 及びIL-1 の転写を刺激した(図3c)。NID-Hの有効用量(約10µg/mL~約50µg/mL)と比べて、Nの有効用量は約1µg/mLであり、これは、HMGB-1又はMrpsと同等であった。更に、Nは、低用量でTNF- 等の炎症性サイトカインの放出を刺激する強力な効果を有している。ELISAによって検出したところ、1µg/mLのN又はLPSによって刺激したRAW264.7細胞によって100pg/mL~200pg/mLのTNF- が培養物中に放出され得た(図3d)。更に、組み換えmNMIタンパク質を用いてRAW264.7細胞を刺激したときも、同様の炎症応答が検出された(図4)。これら結果に基づいて、IFP35ファミリーのメンバーは、内因性DAMPタンパク質として機能することがで

10

20

30

40

50



きる。

#### 【0196】

ヒトIFP35の二次構造予測を図32に示す。この予測によれば、幾つかの態様では、ヒトIFP35における最初の20残基、21残基、22残基、23残基、24残基、25残基、26残基、27残基、28残基、29残基、30残基、31残基、32残基、33残基、34残基、35残基、36残基、37残基、38残基、39残基、40残基、41残基、42残基、43残基、44残基、45残基、46残基、47残基、48残基、49残基、50残基、51残基、52残基、53残基、54残基、55残基、56残基、57残基、58残基、59残基、60残基、61残基、62残基、63残基、64残基、65残基、66残基、67残基、68残基、69残基、70残基、71残基、72残基、73残基、74残基、75残基、76残基、77残基、又は78残基を除去することによって、この実施例で用いたNと同様の結果が得られるであろう。

10

#### 【0197】

3. IFP35ファミリーのメンバーは、内因性DAMPの典型的な特徴を有する。HSP、HMGB-1、Mrp8、及びMrp14を含むDAMPは、細胞によって分泌され、次いで、細胞表面上のパターン認識受容体(PRR)によって認識される。Kawai et al., *Immunity* 34, 637-650 (2011); Wu & Chen, *Annual Review of Immunology* 32, 461-488 (2014); 及びZhong et al., *Frontiers in Immunology* 4, 333 (2013)。IFP35及びNMIは、IFN-によってアップレギュレートされた後、細胞質に局在することが報告されている。しかし、この実施例では、IFN-によって刺激された後3時間以内又はLPS若しくはサルモネラ菌によって刺激された後1時間以内に、IFP35及びNMIが分泌され、RAW264.7細胞の培養上清において検出された(図5a、図6a、図6b、及び図18~21)。その後数時間で、イムノプロットの結果によって明らかである通り、IFP35及びNMIは時間依存的に培養物中に蓄積した。対照的に、内毒素血症の早期及び後期メディエータであるTNF-及びHMGB-1は、それぞれ、数分間及び6時間~8時間で放出された。Wang et al., *Science* 285, 248-251 (1999); 及びTracey et al., *Science* 234, 470-474 (1986)。IFP35は、細胞中でNMIと結合して、HMMC、更には、スペクル様凝集体を形成することが報告されている。Chen et al., *JBC* 275, 36278-84 (2000)。サルモネラ菌SR-11によって刺激されたRAW264.7細胞の培養物中に分泌されたIFP35及びNMIを、ゲル濾過及びウエスタンブロットを用いて分析した。結果は、溶液中において、分泌されたIFP35が単量体として存在し、NMIが二量体として存在することを示した(図6c及び図6d)。HMGB-1及びMrpsと同様に、IFP35ファミリーのメンバーの配列中に明らかな膜貫通シグナルペプチドは存在しない。したがって、IFP35ファミリーのタンパク質は、早期DAMPとして機能することができる。

20

30

#### 【0198】

DAMPは、感染及び傷害に密接に関連していることが報告されている。Hirsiger et al., *Mediators of Inflammation*, 315941 (2012); 及びBianchi, *Journal of Leukocyte Biology* 81, 1-5 (2007)。HMGB-1及びMrps等の公知のDAMPの濃度は、敗血症患者の血清中で著しく増加する。Wang et al., *Science* 285, 248-251 (1999); Austermann et al., *Cell Reports* 9, 2112-2123 (2014); 及びSunden-Cullberg et al., *Critical Care Medicine* 33, 564-573 (2005)。IFP35及びNMIが感染中に血清に放出されるかどうかを判定するために、LPSにマウスを曝露し、敗血症マウスの血清中でそれらを検出した。IFP35及びNMIは、LPS曝露後3時間以内に分泌された。コントロ

40

50

ール群と比較して、L P Sを投与したマウスにおける血清I F P 3 5及びN M Iは、6時間以内に約1 2 0 n g / m Lまで用量依存的に急激に増加した(図5 b及び図6 e)。更に、敗血症患者の血清を分析したところ、1 2サンプルのうちの殆ど全てにおいてI F P 3 5の濃度が上昇していた。これら症例間には大きな偏差が存在しており、これは恐らく病原体及び健康状態が異なっていたためであるが、血清I F P 3 5は、1 n g / m L ~ 1 0 n g / m Lであると定量することができ、一方、正常個体の血清中では、前記タンパク質は僅かに検出可能であった(図5 c及び図6 f)。これら結果は、I F P 3 5が感染中に血清に放出されることを証明した。

#### 【0199】

H M G B - 1とは異なり、I F P 3 5ファミリーのメンバーは、L P S刺激後最初の1時間以内に放出され得た。致死用量(L D<sub>100</sub>)のL P Sに曝露する前にN I D - Hに対する抗体(抗N I D - H)を投与すると、マウスに有効な保護を与えることができた。コントロールにおける生存率0%と比べて、抗N I D - H処理マウスのうちの60%超がL P S曝露後7日間生存した(図5 d)。L P Sの毒性効果はT N F - 、I L - 1、及びI L - 6等の炎症性サイトカインによって部分的に媒介されるので、L P S及び抗I F P 3 5モノクローナル抗体を投与した後の血清におけるこれらサイトカインの濃度を求めた。この現象と一致して、抗N I D - Hの投与は、T N F - 、I L - 1、及びI L - 6等の幾つかの毒性炎症因子の敗血症マウスの血清への放出を約20%~約50%低減することができた(図5 e)。C R I S P P R - C a s 9技術を用いてI F P 3 5及びN M Iノックアウトマウスを作製した。R a n e t a l . , N a t u r e P r o t o c o l s 8 , 2 2 8 1 - 2 3 0 8 ( 2 0 1 3 )。ガラクトサミン(D - g a l)と併用した細菌L P Sに対する反応は、炎症性サイトカインによって媒介されるマウスにおける内毒素ショックの十分に特徴付けられているモデルである。V o g l e t a l . , N a t u r e M e d i c i n e 1 3 , 1 0 4 2 - 1 0 4 9 ( 2 0 0 7 ) ; 及びG a l a n o s e t a l . , P N A S 7 6 , 5 9 3 9 - 5 9 4 3 ( 1 9 7 9 )。L P S及びD - g a lを腹腔内注射した後、野生型動物は急性疾患の症状を示し、5時間~8時間以内に死亡した。対照的に、I F P 3 5<sup>-/-</sup>マウスは重篤度が低く、有意に長く生存した(図5 f)。マウスにD - g a lなしに多量のL P Sを注射したときも、I F P 3 5<sup>-/-</sup>マウス及びN M I<sup>-/-</sup>マウスのL P S誘導致死毒性に対する耐性が観察された。致死用量のL P Sを投与したときに致死率が略100%である正常マウスと比べて、N M Iノックアウトマウスの致死率は改善される(図6 g)。L P S曝露中、公知の炎症促進因子の濃度は、これらノックアウトマウスの血清中で大きく減少した(図5 g及び図6 h)。したがって、これら結果は全て、I F P 3 5がD A M Pとして機能し、強い炎症応答を引き起こすことを証明した。

#### 【0200】

4. I F P 3 5は、T L R 4経路に基づいている可能性のあるサイトカINSTORMを刺激する。

これまでの報告に基づいて、H M G B - 1及びM r p sは、T L R 4シグナル経路によってN F -  $\kappa$  Bの活性化を誘発することを通して免疫応答を誘導する。V o g l e t a l . , N a t u r e M e d i c i n e 1 3 , 1 0 4 2 - 1 0 4 9 ( 2 0 0 7 ) ; Y a n g e t a l . , P N A S 1 0 7 , 1 1 9 4 2 - 1 1 9 4 7 ( 2 0 1 0 ) ; 及びY u e t a l . , S h o c k 2 6 , 1 7 4 - 1 7 9 ( 2 0 0 6 )。したがって、この経路における幾つかの鍵となる因子を検出し、I F P 3 5ファミリーのメンバーによって誘導される免疫応答におけるその効果を分析した。まず、ルシフェラーゼアッセイを用いてN I D - HによるN F -  $\kappa$  Bプロモータの活性化を検出した。N F -  $\kappa$  Bプロモータに続いてT L R 4、C D 1 4、M D 2、及びルシフェラーゼ等を含むプラスミドでH E K 2 9 3細胞を一過的にトランスフェクトした。トランスフェクトの24時間後、細胞を10  $\mu$  g / m Lの精製八量体N I D - Hタンパク質と共にインキュベートした。ルシフェラーゼ活性は、転写因子であるリン酸化N F -  $\kappa$  Bによるルシフェラーゼ遺伝子の転写レベルに依存するので、N F -  $\kappa$  Bの活性化を表すために用いた。N I D - Hによって誘発

されるルシフェラーゼ活性は、強くはないが、明らかであった（図 7 a）。L P S の活性は、グラム陰性菌感染症に対する有効な抗生物質であるポリミキシン B によってブロックすることができる。しかし、N I D - H の活性は影響を受けなかった。I F P 3 5 の N 末端がトランケートされている I F P 3 5 ( N ) は炎症応答を誘発する効率が高いので、転写因子を活性化する能力も検出された。この結果は、精製 N が強力な N F - B 及び A P - 1 プロモータ活性を誘導したことを示す。対照的に、I R F 3 プロモータには効果を有しない（図 7 b）。これら結果は、I F P 3 5 が N F - B 及び A P - 1 は活性化するが、I R F - 3 は活性化しないことを示唆し、これは、恐らく、M y d 8 8 依存性経路を介したものであり、I F P 3 5 ファミリーのメンバーの機序は、公知の D A M P と類似しているはずである。インターフェロンによる刺激後、I F P 3 5 ファミリーのメンバーは、危険信号として放出され、次いで、T L R 4 - M y D 8 8 - N F - B / A P - 1 シグナル伝達経路を介してサイトカインストームを引き起こすことができる。

10

#### 【 0 2 0 1 】

##### 考察

この実施例では、I F P 3 5 ファミリーのメンバーに特徴的なドメインである N I D ドメインの構造を決定した。N I D - H の開構造は自然免疫応答を活性化できることが見出された。この結果は、I F P 3 5 ファミリーのメンバーが早期内因性 D A M P として機能し、T L R 4 経路を通して転写因子 N F - B を活性化し、サイトカインストームを引き起こし得ることを示す。しかし、I F P 3 5 ファミリーのメンバーの構造及び機能については、更に考察及び説明する必要がある。

20

#### 【 0 2 0 2 】

##### 1 . タンデム N I D ドメインの構造

I F P 3 5 及び N M I の両方において 2 つのタンデム N I D ドメインが存在する。N I D - H の構造は、I F P 3 5 における 2 つの予測 N I D ドメインにまたがっている。それは、それぞれ配列中の 1 3 1 ~ 1 7 9 アミノ酸及び 1 8 0 ~ 2 2 8 アミノ酸に及ぶ 2 つの断片 1 - 1 - 2 (「A 部」と命名) 及び 3 - 2 - 4 - 5 (「B 部」と命名) に分けることができた。二次構造予測結果に基づいて、8 0 ~ 1 3 0 に及ぶ断片は、- - - 二次構造要素を含み、B 部に対して「B' 部」と命名した。同様に、2 2 9 ~ 2 7 6 に及ぶ「A' 部」は、- - - 二次構造要素を含む。配列アラインメントによって、A' 部及び B' 部を A 部及び B 部と比較することができる（図 8 a）。N I D - H 構造の疎水性コアに含まれる残基は、図 8 b に示す通りであることが分かった。これら残基は、これら 2 つの群 A と A' 及び B と B' において略完全に保存されている（図 8 a）。したがって、同じ群のメンバーは互いに置き換えることができる。上述のドメイン予測に従って、A 及び B' は、第 1 の N I D ドメインに属し、一方、A' 及び B は、第 2 の N I S ドメインに属する。N I D - H の構造に従って、I F P 3 5 における 2 つのタンデム N I D ドメインの構造を二重バレル構造に折り畳むことができた（図 8 c）。

30

#### 【 0 2 0 3 】

このモデルでは、A 部及び B 部からなる N I D - H 領域は、開構造として存在する。タンデム N I D モデル及び N I D - H o - 二量体構造の骨格は、類似している。それにもかかわらず、これらには多くの相違点がある。例えば、A' 及び B' の表面残基は、A 及び B の表面残基と正確に同じではない。更に、これら 2 つの N I D の相対位置は融通が利くべきであることが合理的であり、受容体認識中に調整され得る。対照的に、N I D - H の o - 二量体の立体配座は、八量体の環構造に固定されているので安定である。これらに基づいて、N I D - H 八量体は、N と比べて約 5 % ~ 約 1 0 % の活性しか有しないことが理解できる。ロングループ ( L L ) は、推定 N I D ドメインに存在するはずである。前記ロングループは、N I D ドメインの 2 つの部分を接続し、前記ドメインは、- - - - L L - - - 構造に折り畳まれる。I F P 3 5 では、これら 2 つのロングループは、それぞれ、1 1 5 ~ 1 3 0 アミノ酸及び 2 2 0 ~ 2 2 8 アミノ酸に及ぶ。これらアミノ酸の特徴は、これら 2 つのループが柔軟性であることを示す。したがって、これら 2 つのループは、細胞における H M M C 形成又は外膜における受容体認識に関与している可

40

50

能性がある。I F P 3 5 と相同なタンパク質である N M I の構造及び機能機序も I F P 3 5 の構造から推測することができた ( 図 9 ) 。

#### 【 0 2 0 4 】

##### 2 . I F P 3 5 と T L R 4 との間の認識

I F P 3 5 と T L R 4 との間の認識を検証するために、インビトロ結合アッセイを用いて、T L R 4、T L R 4 / M D 2、及び T L R 4 / M D 2 / C D 1 4 複合体によって I F P 3 5 をプルダウンした。バイトを 6 \* H i s と融合させ、N i - N T A ビーズに固定化した。処理したビーズを用いて、精製 N I D - H 八量体、N、及び R A W 細胞培養物中に放出された I F P 3 5 を含む完全長又はトランケート型の I F P 3 5 タンパク質をプルダウンした。結果は、放出された I F P 3 5 のみが、C D 1 4 の存在下で T L R 4 / M D 2 複合体によって捕捉され得ることを示した ( データ不図示 ) 。したがって、T L R 4、M D 2、及び C D 1 4 は、I F P 3 5 の認識中に協働し得る。

10

#### 【 0 2 0 5 】

##### 3 . I F P 3 5 ファミリーのメンバーと公知の D A M P との相違点

I F P 3 5 ファミリーのメンバーは、公知の後期 D A M P と同様に、T L R 4 経路を通して N F - B を刺激することができるが、実は、これらはより多くの差を有していると予測される。早期 D A M P として、I F P 3 5 及び N M I は、H M G B - 1 の 6 時間 ~ 8 時間に対して、病原体によって細胞が刺激された後最初の 1 時間で放出される。免疫応答の早期状態において重要な役割を果たすので、I F P 3 5 ファミリーのメンバーは、T N F - 、I L - 1 等の公知の他の早期炎症因子とクロストークし得る。これら結果から、N I D - H の抗体は、これら炎症性サイトカインの発現をダウンレギュレートするのに有効であるので、L P S に曝露されたマウスに対してより効率的な保護を与えることができた。更に、患者の血清におけるこれらの濃度は、H M G B - 1 とは大きく異なるが、他のサイトカインとは同等であるので、これらは、エフェクタとしてではなくシグナル分子として機能する可能性がより高い。

20

#### 【 0 2 0 6 】

一方では、I F P 3 5 は、疎水性 L - z i p ドメインを含有するので凝集する傾向があるが、他方、2 つの N I D ドメインの柔軟性に起因して容易に分解する。したがって、多くの発現系において I F P 3 5 タンパク質をうまく折り畳むことができなかった。免疫細胞によって放出される I F P 3 5 は、限定的であり、グリコシル化されている。活性八量体高次構造に折り畳まれる N I D - H 断片は、大腸菌における収量が高い。活性高次構造は安定化されており、八量体構造において結合表面が露出しているので、N I D - H 八量体は、モノクローナル抗体をスクリーニングするための非常に強力なツールである。N I D - H のモノクローナル抗体は、I F P 3 5 を中和し、敗血症マウスに保護を与えた。更に、可溶性 N を用いてモノクローナル抗体を調製することもできた。更なるエビデンスが依然として必要であるが、感染症及び傷害との戦いへの応用を期待することができる。

30

#### 【 0 2 0 7 】

これらデータは、I F P 3 5 ファミリーのメンバーが早期 D A M P の一種であることを証明した。前記メンバーは、免疫細胞が病原体又はインターフェロンによって刺激されたときに放出され、更に、T L R 4 シグナル経路を介して免疫応答を増強する。N I D - H の構造によって、これら新規 D A M P の機序が解明された。この実施例の結果は、感染症及び傷害関連疾患の診断及び治療の方法を提供する。

40

#### 【 0 2 0 8 】

##### 方法

プラスミドの構築。T H P 1 細胞及び R A W 2 6 4 . 7 細胞 ( アクセッション番号 : N P \_ 0 0 5 5 2 4 . 2 及び N P \_ 0 0 1 1 3 5 4 2 1 . 1 ) から逆転写した c D N A からヒト I F P 3 5 及びマウス N M I の c D N A を増幅させた。プライマーの設計、P C R 増幅、切断、及び回収については標準的な方法を用いた。ヒト I F P 3 5 タンパク質のアミノ酸 1 2 4 ~ 2 4 0 及び 3 5 ~ 2 8 9 に対応する D N A 配列 ( N I D - H 及び N ) を、N 末端の G S T タグと共に B a m H I 部位及び X h o I 部位を用いて p G E X - 6 p

50

- 1ベクター (Invitrogen) に挿入した。また、マウスNMITタンパク質のDNA配列を、BamH I 部位及びXho I 部位を用いてRSFDuetベクター (Novagen) に挿入した。全てのプラスミドをDNAシーケンシングによって確認した。

#### 【0209】

IFP35 (NID-H及びN) の精製。大腸菌BL21 (DE3) 発現株 (ネイティブタンパク質発現用) 及び大腸菌B834 (DE3) 発現株 (セレノメチオニン誘導体 (Se-Met) 発現用) に前記プラスミドを形質転換した。ネイティブタンパク質又はSe-Metタンパク質を発現させるための細胞を、OD<sub>600</sub>が0.8~1.0に達するまで37℃でLenox Broth培地又はSelenoMet Medium Base (Molecular Dimensions Limited) 中0.1g/Lアンピシリンの存在下で培養し、次いで、37℃で5時間、0.5mMイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導した。

10

#### 【0210】

過剰発現しているネイティブ又はSe-Met IFP35 (残基124~220) を含有する細胞を収集し、コールド1xPBSバッファ (137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4) に再懸濁させ、それぞれ、5,000psi及び15,000psiのEmulsiFlex-C5ホモジナイザ (Avestin) に細胞懸濁液を2回通すことによって溶解させた。細胞溶解物を30,700g/4 / 40分間遠心分離し、レジン1mL当たり上清100mLの比で、上清をGlutathione Sepharose 4Bレジン (GE Healthcare) と共に4℃で30分間~60分間インキュベートした。インキュベートした後、GSTレジンを1xPBSバッファで洗浄し、150mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH8.0のバッファで平衡化した。組み換えタンパク質を20mM GSHで溶出し、4℃で一晩GSTタグをプレジジョンプロテアーゼ (PPase) によって切断した。切断後、組み換えタンパク質をHiTrap Q HP (GE Healthcare) カラムで更に精製し、直線勾配の150mM~1,000mM NaClで溶出した。150mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH8.0で平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) カラム (プレップグレード) を最後の精製工程として用いた。溶出ピークから得られた各画分のタンパク質含量をSDS-PAGEによって分析した。標的タンパク質を含む2つのピークを別々にプールし、濃縮し、液体窒素で急速冷凍し、更に使用するまで-80℃で保存した。

20

30

#### 【0211】

NMI、GFP-NID-H、及びGFP-NMIの精製。前記プラスミドを大腸菌株BL21 (DE3) に形質転換した。100mg/Lアンピシリンを含むLB培地中37℃にて細胞を培養した。OD<sub>600</sub>が0.8~1.0に達したら、16℃で20時間、最終濃度が0.5mMになるようにイソプロピル-D-ガラクトシダーゼ (IPTG) (Sigma) を添加することによって培養物を誘導した。5,000rpmで10分間遠心分離することによって細胞を収集した。ペレットをTrisバッファ (20mM Tris (pH8.0)、150mM NaCl) に再懸濁させ、超音波処理によって溶解させた。16,000rpmで30分間遠心分離することによって溶解物を分離し、回収した上清をNi-NTAアフィニティカラム (Qiagen) に適用し、次いで、洗浄バッファ (20mM Tris (pH8.0)、150mM NaCl、50mMイミダゾール) で激しく洗浄した。溶出バッファ (20mM Tris (pH8.0)、150mM NaCl、500mMイミダゾール) を用いてNi-NTAアフィニティカラムから組み換えタンパク質を溶出し、FPLCタンパク質精製システムにおいて上記Trisバッファを用いてSuperdex 200カラム (GE Healthcare) でゲル濾過することによって更に精製した。

40

#### 【0212】

50

S D S - P A G E 後クマシーブルーで染色することによって全ての組み換えタンパク質の純度及び完全性を検証したところ、純度は主に > 90 % であった。全てのタンパク質製剤中の L P S 含量は、L i m u l u s アッセイによって測定したとき、検出不可能であるか又は < 10 p g / m g ( タンパク質 ) である。

#### 【 0 2 1 3 】

結晶化及びデータ収集。ネイティブ及び S e - M e t I F P 3 5 断片はいずれも S u p e r d e x 200 カラムにおいて2つのオリゴマー状態、八量体及び二量体を示した。両形態のタンパク質を結晶化スクリーニングに用いた。最終的に、ネイティブ I F P 3 5 ( 残基 1 2 4 ~ 2 2 0 ) は、16 で14日間、6 m g / m L タンパク質 1  $\mu$  L 及びウエル溶液 ( 0 . 2 M ( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub>、0 . 1 M B i s - T r i s - H C l、20 % [ w / v ] P E G 3 3 5 0、p H 5 . 4 ) 1  $\mu$  L からなるドロップを用いるハンギングドロップ法によって八量体形態で結晶化した。S e - M e t I F P 3 5 ( 残基 1 2 4 ~ 2 2 0 ) の結晶は、16 で50日間、10 m g / m L タンパク質 1  $\mu$  L 及びウエル溶液 ( 0 . 2 M ( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub>、0 . 1 M B i s - T r i s - H C l、22 % [ w / v ] P E G 3 3 5 0、0 . 1 M 酒石酸カリウムナトリウム、p H 5 . 5 ) 1  $\mu$  L からなる溶液からハンギングドロップ法によって二量体形態で成長した。

#### 【 0 2 1 4 】

データ収集まで、結晶を液体窒素で急速冷凍した。S e - M e t 結晶については、更なる20 % [ v / v ] グリセロールを凍結保護剤として用いた。ネイティブタンパク質及び S e - M e t タンパク質の X 線回折データは、それぞれ、0 . 9 7 9 8 及び0 . 9 7 9 2 の波長で上海放射光施設 ( S S R F ) においてビームライン B L 1 7 U で収集した。収集したデータを積分し、H K L - 2 0 0 0 ( O t w i n o w s k i , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 7 6 , 3 0 7 - 3 2 6 ( 1 9 9 7 ) ) を用いてスケールし、C C P 4 スイートの S H E L X D ( S c h n e i d e r e t a l . , A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a , S e c t i o n D , B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 5 8 , 1 7 7 2 - 1 7 7 9 ( 2 0 0 2 ) ; 及び W i n n e t a l . , A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a , S e c t i o n D , B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 6 7 , 2 3 5 - 2 4 2 ( 2 0 1 1 ) ) を用いて S e - M e t タンパク質におけるセレンウム標識位置を決定し、6 つのセレン部位を見出した。

#### 【 0 2 1 5 】

構造の決定及び精密化。二量体形態の I F P 3 5 の構造 ( 残基 1 2 4 ~ 2 2 0 ) を P h e n i x スイートの S A D を用いて決定した。A d a m s e t a l . , A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a , S e c t i o n D , B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 6 6 , 2 1 3 - 2 2 1 ( 2 0 1 0 ) 。 A u t o S o l を用いて初期位相を得た。モデルにおける欠損領域を A u t o B u i l d 又は C o o t を用いて再構築した。E m s l e y e t a l . , A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a , S e c t i o n D , B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 6 6 , 4 8 6 - 5 0 1 ( 2 0 1 0 ) 。前記モデルを、R 値が収束するまで繰り返し p h e n i x . r e f i n e で更に精密化した。マシュー係数値が 2 . 3 9 <sup>3</sup> D a <sup>-1</sup> でありと計算された1つの非対称ユニットに6つの分子が見出され、溶媒含量は 4 8 . 6 % であった。M a t t h e w s , J M o l B i o l 3 3 , 4 9 1 - 4 9 7 ( 1 9 6 8 ) 。

#### 【 0 2 1 6 】

P h a s e r - M R ( A d a m s e t a l . , A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a , S e c t i o n D , B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 6 6 , 2 1 3 - 2 2 1 ( 2 0 1 0 ) ) 及び探索モデルとして二量体構造を用いて分子置換によって八量体形態の構造を解析した。このモデルを C o o t ( E m s l e y e t a l . , A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a , S e c t i o n D , B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 6 6 , 4 8 6 - 5 0 1 ( 2 0

10))で再構築し、phenix.refineで精密化した。Adams et al., Acta Crystallographica, Section D, Biological Crystallography 66, 213-221 (2010)。最後の工程で、TLS精密化を導入し、TLSMDサーバによってTLSグループが提案された。Painter et al., Acta Crystallographica, Section D, Biological Crystallography 62, 439-450 (2006)。非対称ユニットにおいて8つの分子が見出された。計算したマシュー係数及び溶媒含量は、 $2.61 \text{ \AA}^3$ 及び52.8%であった。Matthews, J Mol Biol 33, 491-497 (1968)。分子間相互作用をPISAによって分析した。Krissinel et al., J Mol Biol 372, 774-797 (2007)。全ての結晶構造に関連する図面は、PyMOL (www.pymol.org)で作製した。

10

#### 【0217】

抗体及び試薬。抗IFP35抗体は、Abnovaから入手した(D01P)。抗HMB1抗体は、Abcamから入手した(ab79823)。抗-アクチン抗体は、Sigma-Aldrichから入手した(A5441)。抗CD11b(M1/70)及びGr-1(RB6-8C5)抗体は、BD Biosciencesから入手した。抗IkBa抗体及びpIkBa抗体は、Abcamから入手した。IFN- $\gamma$ 、トリクロロ酢酸(TCA)、大腸菌055:5由来のリポ多糖(LPS)、及びD-ガラクトサミン(D-gal)は、Sigma-Aldrichから購入した。MCSFは、PeproTechから購入した。

20

#### 【0218】

細胞及び細胞培養条件。RAW264.7マクロファージ(ATCCから入手)は、37℃で10%ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中で培養した。B6/C57マウス由来のwt細胞、Tlr3<sup>-/-</sup>細胞、Tlr4<sup>-/-</sup>細胞、Tlr7<sup>-/-</sup>細胞、Tlr9<sup>-/-</sup>細胞、Myd88<sup>-/-</sup>BMDM細胞は、37℃で10%ウシ胎児血清及び20 ng/mLのMCSFを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中で培養した。THP1細胞は、37℃で10%ウシ胎児血清を添加したRPMI1640培地中で培養した。RAW264.7マクロファージ、BMDM細胞、及びTHP1細胞を $2 \times 10^6$ 細胞/ウェルの密度で6ウェルプレートに播種し、一晚増殖させた。次いで、図のレジェンドに指定の通り様々な時間LPS(100 ng/mL)、様々な濃度のサルモネラ菌SR-11、IFN- $\gamma$ 、精製組み換えタンパク質IFP35-NID又はNMIで前記細胞を刺激した。

30

#### 【0219】

RNAの単離及びq-PCR。製造業者の指示書に従ってTrizol試薬(Invitrogen)を用いてRAW264.7細胞、THP1細胞、及びBMDM細胞から全RNAを抽出した。ランダムプライマー及びMMLV逆転写酵素(Invitrogen)を用いて全RNA 1  $\mu$ gからcDNAの第1の鎖を合成した。SYBRグリーンPCRキット(Bio-Rad)を用いてリアルタイムRT-PCRを実施し、CFX96 Real-Time PCRシステム(Bio-Rad)を用いてリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応分析を実施した。各測定を二連で設定し、3回の独立した実験を実施した。プライマー配列は、以下の通りであった：

40

#### 【0220】

マウス(m)GAPDH：センス、CAGAACATCATCCCTGCATC；アンチセンス、TACTTGGCAGGTTTCTCCAG；

#### 【0221】

mTNF- $\alpha$ ：センス、CCAGTGTTGGGAAGCTGTCTT；アンチセンス、AGCAAAAGAGGAGGCAACA；

#### 【0222】

mIL-1 $\beta$ ：センス、AAGGAGAACCAAGCAACGACAAAA；アンチ

50

センス、T G G G G A A C T C T G C A G A C T C A A A C T。

#### 【0223】

ウエスタンブロット。RAW264.7マクロファージ及びTHP1細胞を100ng/mLのLPS又はサルモネラ菌SR-11で1時間、2時間、3時間、5時間、及び9時間前処理した。次いで、前記細胞を冷PBSで2回洗浄し、掻き取り、溶解バッファ(20mM Tris、pH7.4、150mM NaCl、5mM EDTA、0.5% NP-40、10%グリセロール、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche))に回収した。細胞溶解物全体を4℃で45分間インキュベートし、次いで、遠心分離した(12,000g×15分間、4℃)。細胞培養上清中の分泌タンパク質を、トリクロロ酢酸(TCA)/アセトン沈殿によって回収した。細胞培養上清に0.11体積の氷冷100% TCAを添加し、氷上に2時間置き、次いで、20,000gで30分間遠心分離した。次いで、上清を慎重に取り除き、アセトン500μLを添加し、20,000gで10分間遠心分離し、上清を慎重に取り除き、真空エバポレータでタンパク質のペレットを乾燥させた。タンパク質サンプルをSDS-PAGEによって分離し、PVDF膜に転写し、IFP35、HMGB1、及びNMIに対する特異的抗体でプロービングした。

10

#### 【0224】

BMDM細胞を、精製組み換えタンパク質IFP35-NID又はNMIで5分間、15分間、30分間、60分間処理した。次いで、前記細胞を冷PBSで2回洗浄し、掻き取り、溶解バッファで回収した。細胞溶解物全体を4℃で45分間インキュベートし、次いで、遠心分離した。ウエスタンブロット用のタンパク質サンプルを調製した。IkBa、pIkBa、 $\alpha$ -アクチンをWBによって検出した。

20

#### 【0225】

LPS誘導ショックモデル。大腸菌055:B5由来のLPS及びD-galをパイロジェンフリー生理食塩水で希釈した。LPS(体重1kg当たり50μg)及びD-gal(体重1kg当たり1.0g)の組み合わせをIFP35<sup>-/-</sup>マウス、NMI<sup>-/-</sup>マウス、及び野生型マウスに腹腔内注射した。D-galなしに多量のLPS(体重1kg当たり50mg)をマウスに注射したときも、LPS誘導致死毒性に対するIFP35<sup>-/-</sup>マウス及びNMI<sup>-/-</sup>マウスの耐性が観察された。1週間マウスを観察し、死亡率を記録する。

#### 【0226】

30

IFP35モノクローナル抗体は、LPSショックを受けたマウスを保護する。生存実験では、LPS(体重1kg当たり50mg)を注射する4時間前にB6/C57マウスにIFP35 mAb及びIgG1(10μg/マウス)を腹腔内注射した。LPS注射の2時間後に追加用量(10μg/マウス)を投与した。24時間毎に4回、遅延用量(10μg/マウス)を投与した。1週間マウスを観察し、死亡率を記録する。

#### 【0227】

サイトカイン濃度の決定。ELISAキット(CUSABIO)を用いてヒト及びマウスの血清中のIFP35及びNMIを測定した。培養上清又はマウス血清中のサイトカイン(IL-1、IL-6、及びTNF)の放出をELISAキット(Biolegend, Thermo Fisher)によって測定した。

40

#### 【0228】

IFP35<sup>-/-</sup>マウスの作製。記載の通りCRISPR/Cas9システムを用いてIFP35のゲノム改変を行った。

#### 【0229】

フローサイトメトリー。組み換えタンパク質IFP35-NID-H、NMI、又はPBSを、それぞれ、24時間B6/C57マウスに腹腔内注射した。マウスの腹水をCD11b及びGr-1に対する抗体と共にインキュベートし、次いで、FITCコンジュゲート二次抗体と共にインキュベートした。細胞をFACS Calibur machine(BD Biosciences)で分析して、腹腔好中球を検出し、CellQuestソフトウェアを用いてデータを解析した。

50



## 【0230】

B6/C57マウス由来の野生型細胞又はTlr4<sup>-/-</sup>細胞を、PBSバッファ(2% FBSを含有)中で1時間GFP-NID-H及びGFP-NMIと共にインキュベートした。細胞をFACS Calibur machine (BD Biosciences)で分析し、Cell Quest Proソフトウェアを用いてデータを解析した。

## 【0231】

本明細書における刊行物又は文書の引用は、前述のいずれかが関連技術であることを認めることを意図するものではなく、これら刊行物又は文書の内容又はデータに関して何らかの承認を与えるものでもない。

## 【0232】

実施例2：IFP35ファミリーのタンパク質の使用

IFP35及びNMIは、インターフェロン(IFN)によって速やかにアップレギュレートされ得る。細胞におけるIFP35のタンパク質レベルは、IFNの誘導なしでは低い。IFP35及びNMIは、多数の免疫細胞においてI型又はII型のインターフェロン(IFN $\alpha/\beta$ )によって誘導され得る。IFP35タンパク質の量及びmRNAレベルは、6時間IFN $\alpha$ で刺激した後に劇的に増加し、24時間で最高レベルに達し、未処理と比べて25倍増加することが明らかになった。大部分の細胞はNMIを発現することができ、IFP35と同様に、NMIの発現はIFN処理後に2倍~20倍増加する。

## 【0233】

ヒトIFP35は、17q21に位置し、NCBIアクセッション番号はNP\_005524.2である。cDNA配列は、288アミノ酸のタンパク質をコードしており、推定分子量は31.8 kDaである。128位のメチオニンが変異している及び/又はパリンに変化している(M128V)天然変異体が存在する。ヒトNMIは、2番染色体に位置し、NCBIアクセッション番号はAAC12949.1であり、307アミノ酸を含む。

## 【0234】

IFP35及びNMIは、相同なタンパク質である。構造予測によれば、これらはいずれも2つのタンデムN-My c結合タンパク質/IFP35ドメイン(Nmi/IFP35ドメイン、NID)を含む。配列解析によれば、そのN末端に最初の80アミノ酸を含有するL-zipドメインを有し、続いて、それぞれ81~170アミノ酸及び177~268アミノ酸に及ぶ2つのタンデムNIDドメインを有する。

## 【0235】

IFP35及びNMIは、免疫蛍光顕微鏡技術によって、様々な細胞型の細胞質に共局在する。NMI及びIFP35タンパク質は、ネイティブゲル電気泳動及びゲル濾過によって決定したとき、NIDドメインを通じて300 kDa~400 kDaの高分子質量複合体(HMMC)を形成することができ、これは、プロテアソームによるIFP35の分解を抑制する。IFP35及びNMIは、IFN $\alpha$ で刺激した後にスペckル様凝集体を形成することができ、これは、NMI/IFP35スペckル(NIS)と呼ばれる。IFN $\alpha$ 処理されたアポトーシス細胞では、NISは解離するが、高分子質量複合体は解離しない。

## 【0236】

IFP35は、抗ウイルスタンパク質とみなすことができ、ウシ泡沫状ウイルスの複製を阻害できることが報告されている。IFP35の第2のNIDドメインがウシ泡沫状ウイルスの早期制御タンパク質BTas(ウシトランスアクチベータタンパク質)の長い末端反復配列に結合し、転写活性を阻害して、ウイルスが細胞に感染するのを抑制することができる。更に、ハイスループットスクリーニングによって、IFP35タンパク質がRas-MAPK/PI3K経路においてCLEC4G(C型レクチンドメインファミリーメンバー4G)と相互作用できることが示された。

## 【0237】

10

20

30

40

50

N M I は、I F N によって誘導される J A K - S T A T 経路に關与し得る。N M I は、S t a t 2 を除く全ての S T A T と相互作用し、相互活性化因子 C B P / p 3 0 0 の会合を増強して、下流の遺伝子の S T A T 媒介転写レベルを増強する。

#### 【 0 2 3 8 】

悪性乳癌細胞株における N M I の m R N A レベルは、正常乳房細胞と比べて 2 5 倍 ~ 4 5 倍減少し、N M I のタンパク質レベルも正常乳房細胞よりも著しく低かった。連続テロメラーゼ活性は、癌の必須条件のうちの 1 つであると考えられ、N M I は、乳癌感受性タンパク質 B R C A 1 ( 1 型乳癌感受性タンパク質 ) 及び c - M y c に結合して三元複合体を形成し、人為的起源のテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子 ( ヒトテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子、h T E R T ) のプロモータ活性をダウンレギュレートすることができる。F l a g - N m i 及び H A - B R C A 1 を細胞にコトランスフェクトしたとき、h T E R T プロモータ活性は約 7 5 % 減少した。更に、W n t / - カテニン経路においてタンパク質 D k k 1 ( D i c k k o p f - 1 ) が検出されたとき、データは、N M I の過剰発現が D k k 1 のアップレギュレートを介して W n t / - カテニンシグナル伝達を阻害し、腫瘍の成長を遅らせることを示唆している。

#### 【 0 2 3 9 】

N M I は、T G F / S M A D シグナル伝達経路におけるネガティブフィードバック制御因子 S M A D 7 をアップレギュレートして、T G F / S M A D シグナル伝達経路を阻害し、乳癌細胞の病原性及び可動性を低減することができる。I F P 3 5 及び N M I は、炎症シグナルに関連している。

#### 【 0 2 4 0 】

図 1 0 は、I F P 3 5 タンパク質の精製プロセスを示す。( A ) I F P 3 5 - N I D の S D S - P A G E 分析。左のレーン：分子マーカー。レーン 1：アフィニティークロマトグラフィー精製後の G S T タグ付 I F P 3 5 - N I D。レーン 2：P P a s e による切断後のタンパク質の混合物。レーン 3：G S T レジンカラムから溶出した I F P 3 5 - N I D。レーン 4：サイズ排除クロマトグラフィー後に精製した I F P 3 5 - N I D。( B ) サイズ排除クロマトグラフィー分析 ( s u p e r d e x - 2 0 0 ( 1 6 / 6 0 ) )。ピークの溶出体積は、タンパク質の凝集状態が二量体に近いことを示唆する。

#### 【 0 2 4 1 】

図 1 1 は、様々なオリゴマー状態の I F P 3 5 を示す。( A ) アニオン交換カラム分析。( B ) サイズ排除クロマトグラフィー分析。2 つのピークの溶出体積は、異なるオリゴマーの形成を示唆している。( C ) 精製プロセス全体についての S D S - P A G E 分析。レーン 1：G S T タグ付 I F P 3 5。レーン 2：G S T カラムから溶出した I F P 3 5。レーン 3：P P a s e による切断後の I F P 3 5。レーン 4：アニオン交換カラムに結合しているサンプル。レーン 5：アニオン交換カラムに結合しなかったサンプル。レーン 6：サイズ排除クロマトグラフィー s u p e r d e x - 2 0 0 から溶出したタンパク質 ( ピークの溶出体積は 7 2 m L ~ 7 4 m L であった )。レーン 7：サイズ排除クロマトグラフィー s u p e r d e x - 2 0 0 から溶出したタンパク質 ( ピークの溶出体積は 9 0 m L ~ 9 2 m L であった )。

#### 【 0 2 4 2 】

図 1 2 は、I F P 3 5 - N I D の結晶を示す。( A ) ネイティブな八量体結晶。0 . 2 M 硫酸アンモニウム、0 . 1 M B i s - t r i s、2 5 % [ w / v ] P E G 3 3 5 0、p H 5 . 5 を含むリザーバ溶液中でタンパク質を結晶化させた。ドロップは、タンパク質 1  $\mu$  L 及びリザーバ溶液 1  $\mu$  L で構成されていた。温度 2 8 9 K で 1 4 日間結晶を成長させた。( B ) ネイティブな八量体結晶。ネイティブ I F P 3 5 - N I D ( 残基 1 2 4 ~ 2 2 0 ) は、1 6 で 1 日間 ~ 1 4 日間、タンパク質 1  $\mu$  L 及びウェル溶液 ( 0 . 2 M ( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub>、0 . 1 M B i s - T r i s - H C l、2 0 % [ w / v ] P E G 3 3 5 0、p H 5 . 4 ) 1  $\mu$  L を含有し、添加剤として 3 0 % [ w / v ] d - グルコースを含むドロップを用いるハンギングドロップ法によって八量体形態で結晶化した。( C ) S e - M e t I F P 3 5 - N I D ( 残基 1 2 4 ~ 2 2 0 ) の結晶は、1 6 で 7 日間、タン

10

20

30

40

50

パク質 1  $\mu$ L 及びウェル溶液 (0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1 M Bis-Tris-HCl、22% [w/v] PEG 3350、pH 5.4) 1  $\mu$ L からなる溶液からハンギングドロップ法を用いて二量体形態で成長した。スケールバー = 100  $\mu$ m。(D) Se-Met IFP35 (残基 124 ~ 220) の結晶は、16 で 30 日間、タンパク質 1  $\mu$ L 及びウェル溶液 (0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1 M Bis-Tris-HCl、22% [w/v] PEG 3350、pH 5.5) 1  $\mu$ L からなる溶液からハンギングドロップ法を用いて二量体形態で成長した。スケールバー = 200  $\mu$ m。結晶を矢印で示す。

#### 【0243】

図 13 は、二量体 IFP35 - NID の構造を示す。(A) 及び (B) は、異なる視点から見た全体構造である。(C) 及び (D) は、異なる視点から見た分子間相互作用に与する残基 (スティックで示す) を示す。H1 は、二量体形成に主に与する  $\alpha$ -ヘリックスを示す。1 つの分子を赤色又は青色で示す。

10

#### 【0244】

図 14 は、八量体 IFP35 - NID の構造を示す。モノマーを異なる色で示す。八量体は、二量体を形成する相互作用と同様に 4 つのドメイン交換二量体で形成された。分子 A のアミノ末端及びカルボキシル末端を A - N 及び A - C で示す。

#### 【0245】

図 15 は、ドメイン交換構造を有する二量体の構造を示す。八量体のドメイン交換モデル。A 二量体及び B 二量体を八量体から抽出する。赤色及び青色は、それぞれ、1 分子を示す。2 つの分子は、互いに結合することができる。二量体は、最終的に、1 つの二量体の側面 H1  $\alpha$ -ヘリックスとそれに近接する二量体の H1  $\alpha$ -ヘリックスとの間の相互作用を通じて八量体の環構造を形成する。

20

#### 【0246】

図 16 は、幾つかの領域の残基を示す。(A) 弧交差表面領域における残基 (側鎖における原子を標識し、スティックで示し、主鎖における原子は標識しない)。(B) 八量体環構造の内面における残基 (側鎖における原子を標識し、スティックで示し、主鎖における原子は標識しない)。(C) 二量体内のモノマーの頭部における残基 (2 つの分子から、側鎖における原子を標識し、スティックで示し、主鎖における原子は標識しない)。構造全体をリボンで示し、異なる色は、異なる分子を示す。

30

#### 【0247】

図 17 は、組み換え NM I の精製を示す。(A) マウス NM I - NID 断片の SDS-PAGE。(B) NM I - NID のサイズ排除クロマトグラフィーの結果。(C) 6 \* His タグの付いた完全長マウス NM I の SDS-PAGE。(D) N 末端に 6 \* His タグの付いた完全長マウス NM I のサイズ排除クロマトグラフィーの結果。

#### 【0248】

図 18 は、サルモネラ菌によって刺激したときの IFP35 及び HMGB1 (コントロールとして) の発現レベルを明らかにする。

#### 【0249】

図 19 は、サルモネラ菌によって刺激したとき、免疫蛍光法によって測定したときに IFP35 の量が経時的に変化したことを示す。

40

#### 【0250】

図 20 は、細胞にウイルスを感染させたとき、様々な期間に培地に分泌された IFP35 の量を示す。(A) 細胞が MOI の異なる A59 及び MHV68 に感染している間にウエスタンブロットによって測定した、様々な時点における分泌された IFP35 の量。(B) 細胞が MOI の異なる A59 及び MHV68 に感染している間にウエスタンブロットによって測定した、様々な時点における分泌された HMGB1 の量。

#### 【0251】

図 21 は、マウス腹膜炎モデルを示す。(A) サルモネラ・チフィリウム (salmonella typhimurium) SR-11 のマウス標準株によって誘導される腹

50

膜炎モデルにおいて、生菌 S R - 1 1 を前記モデルに注射したとき、I F P 3 5 が培地に放出された。( B ) L P S 及び A T P によってインフラマソームが刺激された場合、I F P 3 5 が媒体に放出される。

【 0 2 5 2 】

図 2 2 は、炎症を刺激するプロセス中の様々なオリゴマー状態の I F P 3 5 の寄与を示す。幾つかの炎症因子の発現レベルは、図中に示す通り測定する。

【 0 2 5 3 】

図 2 3 は、フローサイトメトリー分析の結果を示し、これは、八量体 I F P 3 5 - n i d が多量の好中性顆粒球を動員できることを示す。

【 0 2 5 4 】

図 2 4 は、外因性八量体 I F P 3 5 - N I D が、マクロファージにおいて N F - B 経路を刺激できることを示す。

【 0 2 5 5 】

図 2 5 は、I F P 3 5 が m y d 8 8 シグナル伝達経路を介して炎症を刺激できることを示す。

【 0 2 5 6 】

図 2 6 は、I F P 3 5 によって誘導したとき、W T マウス、T L R 9 - / - マウス、及び T L R 4 - / - マウスにおける I L - 1 及び T N F のレベルを示す。

【 0 2 5 7 】

図 2 7 A は、敗血症マウスの血清中の I F P 3 5 の量を示す。図 2 7 B は、I F P 3 5 モノクローナル抗体を投与したとき、敗血症マウスの生存率が上昇したことを示す。

【 0 2 5 8 】

図 2 8 は、マウスにおいて、I F P 3 5 をブロックすることによって、L P S によって誘導される I L - 6 の放出が減少したことを示す。

【 0 2 5 9 】

図 2 9 は、サルモネラ菌によって刺激した T h p 1 細胞の細胞溶解物及び上清中の N M I の量を示す。

【 0 2 6 0 】

図 3 0 は、マウス起源の N M I タンパク質が T h p 1 細胞における T H F 及び I L - 1 の転写をアップレギュレートできることを証明する。

【 0 2 6 1 】

図 3 1 は、サイズ排除クロマトグラフィーを実行することによる凝集状態の N M I の S D S - P A G E 検出を示す。各タンパク質レーンに記載されている数字は、溶出体積を示す。持続性の N M I 溶出プロファイルが存在しているので、結果は、N M I がマウス血清において異なるオリゴマーとして存在し得ることを示す。

【 0 2 6 2 】

図 3 2 は、ヒト I F P 3 5 の二次構造予測を示す ( P S I P r e d ( <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> ) によって実施 ) 。

【 0 2 6 3 】

以下のプロトコールで用いる実験方法は、特に指定しない限り、全て従来の方法である。以下のプロトコールで用いる材料及び試薬は全て、特に指定しない限り、商業的に入手することができる。以下のプロトコールにおける I F P 3 5 - N I D 1 及び I F P 3 5 - N I D 2 の結果は、有意な差を有しない。

【 0 2 6 4 】

I F P 3 5 及び N M I の発現、精製、及び結晶化。

【 0 2 6 5 】

## 1 . プラスミドの構築

ヒト I F P 3 5 及びマウス N M I の c D N A を、T H P 1 細胞及び R A W 2 6 4 . 7 細胞 ( アクセッション番号 : N P \_ 0 0 5 5 2 4 . 2 及び N P \_ 0 0 1 1 3 5 4 2 1 . 1 ) から逆転写した D N A から増幅させた。I F P 3 5 の配列は、D N A シークエンシングに

10

20

30

40

50

よってM128Vの野生型変異体であることが確認された。

【0266】

配列番号1は、ヒトIFP35のcDNA配列である。配列番号2は、ヒトIFP35のアミノ酸配列である。1つの態様では、IFP35のNIDは、配列番号1の核酸372～660(5'末端から)によってコードされており、前記核酸は、配列番号2のアミノ酸残基124～220(N末端から)をコードしている。1つの態様では、IFP35のNIDは、配列番号1の核酸408～648(5'末端から)によってコードされており、前記核酸は、配列番号2のアミノ酸残基136～216(N末端から)をコードしている。

【0267】

10

配列番号3は、マウスIFP35のcDNA配列である。配列番号4は、マウスIFP35のアミノ酸配列である。

【0268】

配列番号5は、マウスNMIのcDNA配列である。配列番号6は、マウスNMIのアミノ酸配列である。NMI-NIDは、配列番号5の核酸453～750(5'末端から)によってコードされており、前記核酸は、配列番号6のアミノ酸残基151～250(N末端から)をコードしている。

【0269】

配列番号7は、ヒトNMIのcDNA配列である。配列番号8は、ヒトNMIのアミノ酸配列である。NMI-NIDは、配列番号7の核酸465～720(5'末端から)によってコードされており、前記核酸は、配列番号8のアミノ酸残基155～240(N末端から)をコードしている。

20

【0270】

このプロトコルで用いたPCRプライマーは、Beijing Synthesis, Sangon Biological Engineering (Shanghai) Co., LTD.によって合成されている。用いたスーパースターハイフィデリティDNAポリメラーゼは、GenStar Biosolutions Co., Ltd.から購入した。制限エンドヌクレアーゼは、Takara biotechnology (Dalian) Co., LTDから購入した。アガロースは、Biowest (US)から購入した。迅速ゲル抽出キットは、Beijing Transgen Biotechnology Co., LTD.から購入した。大腸菌発現ベクターpGEX-6p-1は、GE Healthcare Incorporation製である。DH5, BL21(DE3)ケミカルコンピテントセル及びB834ディフェクトコンピテントセルは、Invitrogen Companyから購入した。DNAシーケンシングは、Beijing Liuhe Genomics Technology Co., LTD.で行った。

30

【0271】

2. タンパク質の発現及び精製

大腸菌を培養するために用いるトリプトン及び酵母抽出物は、Thermo Fisher Oxoid (UK)から購入する。細胞を破碎するために用いる高圧ホモジナイゼーション細胞破碎機EmulsiFlex-C5は、Avestin (Canada)から購入する。プレシジョンプロテアーゼ(Ppase)は、大腸菌株から精製する。GSTアフィニティカラム(Glutathione Sepharose 4B)、アニオン交換カラム(HiTrap Q HP 5 ml)、サイズ排除クロマトグラフィーカラム(HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grad及びSuperdex 200 10/300 GL, 24 mL)、タンパク質精製システム(AKTApurifier)は、GE healthcare life sciencesから購入する。濃度検出のために用いるNanoDrop 2000分光光度計は、Thermo (US)から購入する。

40

【0272】

50

用いる他の生化学試薬は、Sigma Aldrich Company又はBeijing Chemical Reagent Companyから購入する。

【0273】

### 3. 結晶化及びデータ収集

結晶化スクリーニングキット及びSe-Metは、Hampton Research Incorporationから購入する。Trisベース、Bis-Tris、及びポリマーPEG3350を含むバッファは、Sigma-Aldrich(US)から購入する。Home Source X線回折計は、株式会社リガク(日本)から購入する。

【0274】

### IFP35の発現、精製、及び結晶化

精製のために、6×HIS、GST、又はMBP等の多くのタグを選択してよい。GSTタグ付タンパク質を例にとると、ヒトIFP35タンパク質のアミノ酸1~288、128~216、及び136~216に対応するDNA配列を、N末端GSTタグと共にBamHI部位及びXhoI部位を用いてpGEX-6p-1ベクター(Invitrogen)に挿入した。全てのプラスミドをDNAシーケンシングによって確認した。この方法で得られた組み換えタンパク質は、プレジジョンプロテアーゼ(PPase)によって切断することができる。完全長IFP35及び他の断片の組み換えプラスミドも同様に構築する。

【0275】

pGEX-6p-1ベクターは、マルチクローニングサイトの前にGSTタグ及びPPase切断部位を有する。

【0276】

### (1). プラスミドの構築

IFP35のcDNA配列をテンプレートとし、PCR増幅用のプライマー対を用いて、それぞれ、完全長IFP35タンパク質をコードしている遺伝子、IFP35 NID1をコードしている遺伝子、IFP35 NID2をコードしている遺伝子を得、これらをBamHI及びEcoRI制限エンドヌクレアーゼによって切断し、次いで、同じ制限酵素によって切断したベクターpGEX-6p-1にライゲーションした。ライゲーション反応後、ライゲーションされたプラスミドDNAを、熱ショック法を用いて、大腸菌DH5(Invitrogen)等のコンピテントセルに形質転換した。安定した抗生物質耐性(100 µg/mLアンピシリン)を有する細菌をプレート上に薄く広げ、プレートを37℃で一晩インキュベートした。次の日、幾つかのコロニーをピックしてLB培地2mLに入れ、プラスミドを抽出してDNAシーケンシングによって組み換えプラスミドの存在を確認するために、37℃で10時間培養した。インサートが適切な向きであり、正確に連結されていることが立証されたら、プラスミドをタンパク質発現のために用いる。

【0277】

DNAシーケンシングによって、プラスミド1は、BamHI部位及びXhoI部位を用いてpGEX-6p-1に挿入された配列番号1を含有するGST-IFP35組み換えプラスミドである。プラスミド2は、配列番号1の5'末端から372~660のDNA配列を含有するGST-IFP35-NID1組み換えプラスミドであり、前記DNA配列は、BamHI部位及びXhoI部位を用いてpGEX-6p-1に挿入され、終止コドンが付加されていた。プラスミド3は、配列番号1の5'末端から408~648のDNA配列を含有するGST-IFP35-NID2組み換えプラスミドであり、前記DNA配列は、BamHI部位及びXhoI部位を用いてpGEX-6p-1に挿入され、終止コドンが付加されていた。

【0278】

完全長IFP35を増幅するためのプライマー：  
上流プライマー：5' GG TAG AT CT AT GT C A G C C C C A C T G G A T G 3

10

20

30

40

50

下流プライマー：5' GGT GAATTCCTAGCCTGACTCAGAGGTGA  
AGACT3'

IFP35-NID1を増幅するためのプライマー（配列番号2のアミノ酸124～220）：

上流プライマー：5' GGTGGATCCCCAGGTGATGATGTCCAGCCA3'

下流プライマー：5' GGTGAATTCCTTACTCCCCGTTTACATACGG  
AGAGAC3'

IFP35-NID2を増幅するためのプライマー（配列番号2のアミノ酸136～216）：

上流プライマー：5' GGTGAATTCAGGGTGTTGGTCACTGGATT  
TCCT3'

下流プライマー：5' GGTGAATTCCTTACTCCCCGTTTACATACGG  
AGAGAC3'

【0279】

（2）．タンパク質の発現

大腸菌BL21（DE3）細胞を組み換えプラスミドで形質転換し、100μg/mLアンピシリンを含有するLB寒天平板培地で増殖させた。37℃で一晩インキュベートした後、100μg/mLアンピシリンを含有するLBブロス100mLにシングルコロニーを移し、振盪（200rev/分）しながら37℃で一晩増殖させた。100μg/mLアンピシリンを添加したLBブロス1Lの入ったフラスコにおいて細胞を1/400希釈し、OD600nmが0.6に達するまで連続振盪（200rev/分）しながら37℃で培養した。次いで、前記細胞を1mM IPTGで処理して、組み換えタンパク質の発現を誘導した。連続振盪（200rev/分）しながら37℃で5時間インキュベートした後、4℃で30分間4,000rev/分で遠心分離することによって細胞を収集した。

【0280】

過剰発現しているタンパク質を含有する細胞を収集し、コールド1×PBSバッファ（137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4）に10/1を再懸濁させ、それぞれ、5,000psi及び15,000psiのEmulsiFlex-C5ホモジナイザ（Avestin）に細胞懸濁液を2回通すことによって溶解させた。細胞溶解物を30,700g/4/40分間遠心分離し、上清を回収した。

【0281】

（3）．タンパク質の精製

1）アフィニティークロマトグラフィー

遠心分離後、レジン1mL当たり上清100mLの比で、上清をGlutathione Sepharose 4Bレジン（GE Healthcare）と共に4℃で30分間～60分間インキュベートした。インキュベートした後、溶液混合物からレジンを分離するために、GSTレジンを重力カラムに添加し、次いで、レジンの約10倍の体積の1×PBSバッファでカラムを洗浄して、GSTタグ付タンパク質をレジン上に結合させた。

【0282】

次に、GSTレジンを150mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH8.0のバッファで平衡化した。組み換えタンパク質を4℃で一晩プレジジョンプロテアーゼ（PPase）によって切断し、次いで、1mL/分の速度で30分間、15mM GSH、150mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH8.0を含有するカラムの2倍の体積のバッファで溶出する。切断及び溶出後、IFP35、IFP35-NID1、及びIFP35-NID2（全て溶出体積は、約50mLである）を得た。

【0283】

10

20

30

40

50

## 2) アニオン交換クロマトグラフィー

プロテアーゼ P P a s e 酵素によって切断したタンパク質をアニオン交換カラム ( H i T r a p Q H P \_ 5 m L 、 G E H e a l t h c a r e c o m p a n y ) に注入し、これを F P L C 精製装置 ( G E H e a l t h c a r e ) に固定し、注入前に 2 0 m M T r i s - H C l ( P H 8 . 0 ) 、 5 0 m M N a C l でバランスをとった。流速 1 m L / 分及び溶出体積 1 0 0 m L で勾配溶出を実施するために溶出バッファ ( 2 0 m M T r i s - H C l ( P H 8 . 0 ) 、 1 M N a C l ) を用いて、2 8 0 n m 及び 2 6 0 n m 紫外線吸収に従って、対応するタンパク質のサンプルを回収した。

【 0 2 8 4 】

## 3) サイズ排除クロマトグラフィー

1 5 0 m M N a C l 、 2 0 m M T r i s - H C l 、 5 % g l y 、 p H 8 . 0 で平衡化した H i L o a d 1 6 / 6 0 S u p e r d e x 2 0 0 ( G E H e a l t h c a r e ) カラム ( プレップグレード ) を、アニオン交換クロマトグラフィー後の次の精製工程として用いた。同様にカラムを F P L C 精製装置 ( G E H e a l t h c a r e ) に固定し、流速 1 m L / 分で 1 2 0 分間溶出した。完全長ヒト I F P 3 5 タンパク質及び I F P 3 5 - N I D を、それぞれ、約 4 5 m L 及び 9 0 m L ~ 9 2 m L の溶出体積で回収した。最後に、精製 I F P 3 5 ( 溶出体積 4 5 m L ) 、 I F P 3 5 N I D 1 ( 溶出体積 9 0 m L ~ 9 2 m L ) 、 及び I F P 3 5 N I D 2 ( 溶出体積 9 0 m L ~ 9 2 m L ) を得た。

【 0 2 8 5 】

I F P 3 5 N I D 1 及び I F P 3 5 N I D 2 のサイズ排除クロマトグラフィーを図 1 0 に示す。I F P 3 5 N I D 1 サンプル及び I F P 3 5 N I D 2 サンプルの溶出体積は 9 0 m L ~ 9 2 m L であり、これは分子量 1 7 K D ~ 4 3 K D に相当する。遠心分離分析及び結晶構造の結果は、I F P 3 5 N I D 1 及び I F P 3 5 N I D 2 が二量体であることを示した。

【 0 2 8 6 】

I F P 3 5 N I D 1 及び I F P 3 5 N I D 2 の精製中、溶出体積 7 2 m L 及び 9 0 m L ~ 9 2 m L に対応する 2 つの異なるオリゴマー状態のタンパク質を得ることができる ( 図 1 1 ) 。 P P a s e で切断する前にタンパク質をレジンカラムから溶出した場合、2 つのピーク ( 一方は、体積 7 2 m L 、他方は、体積 9 0 m L ~ 9 2 m L ) が観察された。体積 7 2 m L におけるピークは、分子量 7 0 k d ~ 1 0 0 k d に対応し、体積 9 0 m L ~ 9 2 m L のピークは、二量体に対応する。I F P 3 5 N I D 1 及び I F P 3 5 N I D 2 の溶出体積のピークは、二量体及び八量体を示唆していた。

【 0 2 8 7 】

I F P 3 5 N I D 1 及び I F P 3 5 N I D 2 の S D S - P A G E 分析は、有意な差を有していなかった。

【 0 2 8 8 】

## 4) S e - M e t I F P 3 5 - N I D 精製

S e - M e t I F P 3 5 - N I D の精製は、ネイティブ I F P 3 5 - N I D と同様であった。相違点は、大腸菌 B 8 3 4 ( D E 3 ) 発現株 ( セレノメチオン誘導体 ( S e - M e t ) 発現用 ) 及び S e - M e t を添加した M 9 培地を適用したことである。M 9 培地で b 8 3 4 によって発現されたタンパク質のメチオニンを S e - M e t に置き換えた。この方法で得られた結晶は、結晶相を決定するため、更には構造決定のために用いることができる。

【 0 2 8 9 】

## ( 4 ) . タンパク質の結晶化

### 1) 結晶化

ネイティブ及び S e - M e t の I F P 3 5 - n i d 1 及び I F P 3 5 - n i d 2 断片は、いずれも S u p e r d e x 2 0 0 カラムにおいて 2 つのオリゴマー状態、八量体及び二量体を示した。両形態のタンパク質を、市販のキット ( H a m p t o n R e s e a r c h ) を用いて複数の条件で実施する結晶化スクリーニングのために用いた。精製タンバ

10

20

30

40

50



ク質を14,000rpm/10分間/4で遠心分離して、沈殿及び気泡を除去する。シッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を試み、シリコン処理したスライドガラス上でタンパク質サンプル1μLを等体積のスクリーニング溶液と混合し、リザーバにおいて後者200μLで平衡化した。結晶は16で成長させる。IFP35-NID1の結晶を図12に示す。

#### 【0290】

##### 2) 構造決定及び精密化

二量体IFP35-NID1又はIFP35-NID2の結晶構造(図13)では、各非対称ユニット内に6つの分子が存在し、この6つのIFP35-NID1又はIFP35-NID2の分子の構造は同じである。電子密度チャートは、IFP35のアミノ酸136~216の残基を明瞭に示すことはできるが、結晶構造は、アミノ末端における残基(124~135)及びカルボキシル末端における残基(216~220)を明瞭且つ完全に示すことはできない。この現象は、IFP35-NIDドメイン構造のコアがアミノ酸136~216で主に構成されていることを示し、カルボキシル末端及びアミノ末端における個々の残基の増加又は減少は、構造全体にとって重要ではない。したがって、これら残基は、結晶構造解析及び結晶化実験において必ずしも必要ではない。IFP35-NID構造では、5つの逆平行ベータ片(それぞれ、配列順序に従ってB1~B5と命名)がバレル構造を構成しており、これがアルファヘリックス(H1)を取り囲んで完全なバレル構造を形成した(図13A及び図13B)。

#### 【0291】

水素結合及び疎水性相互作用、ファンデルワールス力等を通じてアルファヘリックス(H1)が位置する界面上にIFP35-NID2二量体が形成された(図13C及び図13D)。PISA(タンパク質界面、表面、及びアセンブリ)によって計算した相互作用表面のサイズは、約586.5平方Åである。二量体形成に主に関与する残基は、アルファヘリックス(H1)におけるGlu150、Glu151、Asp155、Lys158、Ile159、Arg165、及びAsp172を含んでいた。

#### 【0292】

8つのNID-1又は2分子は、互いに相互作用し、環様構造を形成した。八量体における単量体は、5本の鎖及び2つのヘリックスによって形成されるバレル様構造に折り畳まれる点で、二量体における単量体とかなり類似している。八量体構造のヘリックス1における数対の残基が分子間の相互作用及び二量体形成の媒介に重要な役割を果たしており、これは、二量体構造と同じである。相違点については、二量体の逆平行2及び3(177Lue-216Ty r)が八量体では真っ直ぐになっており、近接するNIDドメインの一部である隣接分子の構造に挿入されている。このように、2つの単量体が二量体に積み重ねられ、2つの単量体間でドメイン交換構造を形成し、この点で二量体とは異なる。

#### 【0293】

明確にするために、このドメイン交換二量体を開構造二量体(o-二量体)と命名した。それに対して、ドメイン交換しない上記二量体を閉構造二量体(c-二量体)と呼ぶ。o-二量体はc-二量体と同様に折り畳まれるので、交換NIDドメインの構造は、c-二量体におけるモノマーと類似している(図15)。隣接するo-二量体がc-二量体で用いられるのと同じH1ヘリックスを用いて相互作用するとき、4つのo-二量体から四角星状構造が形成された(図14)。8つの単量体にN末端から始めて時計回りにA~Gと印を付けると、構造全体をそれぞれ4つのo-二量体対A/B、C/D、E/F、及びG/Hに分けることができ、そのうち、A/BとE/F又はC/DとG/Hの構造の詳細は類似しており、ループの構造の違いによってA/B及びE/FをC/D及びG/Hと区別した。四角星を形成した4つのドメイン交換二量体(o-二量体)については、内孔の直径が35であり、外側直径が80である。八量体は2つの交換分子のクロスオーバーを通じて新規弧交差表面を形成するが、これは、c-二量体には存在しない。八量体環構造にc-二量体は存在していなかった。構造の違いは、異なるオリゴマー状態間の機

能の違いに基づいている可能性がある。

【0294】

八量体構造に基づいて、一部の残基は構造形成に関与していることが観察され、他の残基は構造全体の表面上に主に露出していることが観察されるので、他のタンパク質と相互作用するはずである。これら外部残基は、主に、以下の通り3つの領域に分布している：

【0295】

ドメイン交換二量体は、大きな露出表面を形成するために幾つかの残基、例えば、Ser145、Asp172、Val173、Leu177、Arg212、Gln199、Gln207、Gln208、Pro210、Ser214、Thr201、及びTyr216等を前記二量体が提供する弧交差表面領域を形成する(図16A)。これらの中でも、残基Glu150、Glu175、Leu177、Gln207、及びGln208が、より重要な位置である(図16A)。

10

【0296】

八量体IFP5-NIDによって形成される環構造の内面上の他の残基は、他のタンパク質との相互作用に関与し得る。これら残基としては、Ser145、Arg147、Glu150、Glu151、Val173、Gly206、Gln207、及びGln208が挙げられる。幾つかの態様では、Arg147、Gln207、Gln208、Glu150、及びGlu151は、八量体環構造の内面から突出している延伸側鎖を提供する(図16B)。

【0297】

20

二量体又は八量体の構造に基づいて、単一の単量体又はドメイン交換単量体のシートバレル様構造のアミノ末端及びカルボキシル末端の先端近傍に幾つかの比較的大きなアミノ酸残基が存在し；これら比較的大きなアミノ酸残基は、外向きに延在している。これら残基は、Arg187、Glu188、Gln192、Gln196、Arg212、及びTyr216を含んでいてよく、これらは距離が近接している。更に、幾つかのアミノ酸は、他のタンパク質、抗体、又は低分子との結合に関与し得る(図16C)。

【0298】

3) データ収集及び構造決定

調製した結晶をRigaku-007X線回折計で試験し、回折データを上海放射光施設(SSRF)においてビームラインBL17Uで収集した。HKL2000及びMosflm等のデータ解析ソフトウェア、画像処理ソフトウェアcoot及びpymol、重原子解析ソフトウェアshelx、並びに構造精密化ソフトウェアPhenix及びCCP4を含む既存の一般的な構造決定又は解析用のソフトウェア又はパッケージを用いてX線回折データを計算した。本明細書において主に用いる方法は、単一波長異常散乱及び分子置換である。

30

【0299】

Se-Metタンパク質のX線回折データは、0.979の波長で、上海放射光施設(SSRF)においてビームラインBL17Uで収集した。1画像当たり回転範囲10で720枚の画像を収集し、HKL-2000を用いて積分し、スケールした。計算後、解像力比は、2.3であり、空間群はH3であった。Se-Metタンパク質のセレン標識位置エレニウム標識位置をSAD OF SHELDを用いて決定し、6つのセレン部位を見出した。AutoSolを用いて初期位相を得た。AutoBuildを用いてモデルを再構築し、coot及びphenix.refineを用いて更に精密化した。

40

【0300】

同様に、上海放射光施設においてネイティブ八量体結晶の2.5 X線回折データを得た。PhenixのPhaser-MR及び探索モデルとして二量体構造を用いて、前記八量体形態の構造を分子置換によって解析し、coot及びphenix.refineを用いて更に精密化した。

【0301】

上記結果は全て、予測された完全長IFP35又はNID断片が発現することができな

50

かったか又は高ポリマーとして発現したことを示し、これによって、均一な状態のタンパク質を得ることが困難になる。しかし、第1のNIDドメインの第2の半分及び第2のNIDドメインの第1の半分（残基124～220又は134～216、それぞれIFP35-NID1及びIFP35-NID2と命名、類似の精製結果を有することからIFP35-NIDと総称する）は、発現し、うまく精製された。上記方法を用いて、特にGSTに融合しているとき、大量の高純度可溶性IFP35-NIDを得ることができる。GST融合タンパク質は、GST-IFP35-NIDと称する。

#### 【0302】

精製中、IFP35-NIDの2つの安定な凝集状態が存在し、両状態の十分に回折された結晶を得ることができる。

10

#### 【0303】

NMIの発現及び精製

NMIのcDNA配列をテンプレートとし、PCR増幅用のプライマー対を用いて、それぞれ、完全長ヒトNMITanpak質をコードしている遺伝子（配列番号7の5'末端から1～924）、ヒトNMI-NID（アミノ酸残基155～240に対応する残基）をコードしている遺伝子（配列番号7の5'末端から465～720）、マウスNMIをコードしている遺伝子（配列番号5の5'末端から1～945）、マウスNMI-NID（アミノ酸残基151～250に対応する残基）をコードしている遺伝子（配列番号5の5'末端から453～750）を得、これらをBamH1及びXhoI制限エンドヌクレアーゼによって切断し、次いで、同じ制限酵素によって切断したベクターpGEX-6p-1にライゲーションした。この方法で、3'末端に終止コドンが付加されたGST-ヒト-NMI、GST-ヒト-NMI-NID、GST-マウス-NMI、及びGST-マウス-NMI-NIDを発現する組み換えプラスミドが得られた。

20

#### 【0304】

完全長ヒトNMIを増幅するためのプライマー：

上流プライマー：5'GGTGGATCCATGGAAAGCTGATAAAGATGAC3'

下流プライマー：5'GGTCTCGAGCTATTCTTCAAAGTATGCTATGTG3'

#### 【0305】

ヒトNMI（155～240）を増幅するためのプライマー：

上流プライマー：5'GGTGGATCCTCTAAAATGAAAATCAATGTTAC3'

下流プライマー：5'GGTCTCGAGTTATTCTGTGTATGGAGAAACAG3'

30

#### 【0306】

完全長マウスNMIを増幅するためのプライマー：

上流プライマー：5'CGCGGATCCATGGATGCTGATAAAGACAAC3'

下流プライマー：5'CCGCTCGAGTCAATATGGTTTCTCTGGCCTC3'

40

#### 【0307】

マウスNMI（151～250）を増幅するためのプライマー：

上流プライマー：5'CGCGGATCCGTTTCATGTGGACATTTCTAAAATG3'

下流プライマー：5'CCGCTCGAGTCAAAACACCTGGTACTTTTCTAAG3'

#### 【0308】

大腸菌原核生物発現系を用いてマウス及びヒトの完全長又は断片のNMIを発現させた。用いた試薬及び発現方法は、基本的にIFP35タンパク質の発現と同様である。

50

## 【0309】

NMIを発現させるためのプロトコールは、IFP35と本質的に同様であった。NMI精製のプロトコールは、IFP35と本質的に同様であった。精製は、4つの工程に分けられる：GST重力カラムアフィニティクロマトグラフィー、PPaseによるGSTの切断、アニオン交換クロマトグラフィー、及びゲル濾過クロマトグラフィー。

## 【0310】

## 1) GSTアフィニティクロマトグラフィー

遠心分離後、レジン1mL当たり上清100mLの比で、上清をGlutathione Sepharose 4Bレジン(GE Healthcare)と共に4で1時間～2時間インキュベートした。インキュベートした後、溶液混合物からレジンを分離するために、GSTレジンを重力カラムに添加した。次いで、レジン上に雑多なタンパク質が存在しなくなるまで、1xPBSバッファでカラムを洗浄した。

10

## 【0311】

10mM GSHを含有する溶出バッファでGSTタグ付NMIを溶出し、次いで、4で8時間PPaseによって切断した。切断及び溶出後、マウスNMI及びマウスNMI-NIDが得られた(溶出体積は、それぞれ約30mLであった)。タンパク質を、10mM GSH、150mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH8.0を含有するバッファで、30分間1mL/分の速度で溶出した。

## 【0312】

## 2) サイズ排除クロマトグラフィー

PPaseによって切断したタンパク質を、サイズ排除クロマトグラフィー(Hiload 16/60 Superdex 200 プレップグレード及びSuperdex 200 10/300 GL、24mL)によって更に精製した。150mM NaCl、20mM Tris-HCl、5% gly, pH8.0でカラムのバランスをとり、流速1mL/分で120分溶出した。完全長マウスNMIタンパク質及びNMI-NIDを、それぞれ、約30mL及び約120mLの溶出体積で回収した。最後に、精製NMI(溶出体積30mL)、NMI-NID(溶出体積120mL)を得た。

20

## 【0313】

完全長及び断片マウスNMIを大腸菌で発現させ、精製することはできるが、NMI-NIDでは、IFP35-NIDと同様の異なるオリゴマー状態は観察されなかった。完全長NMI及びNMI断片は、重合状態を示した。

30

## 【0314】

ヒトNMI及びNMI-NIDを、マウスNMI関連タンパク質と同様に精製した。

## 【0315】

この実施例は、IFP35-NIDの2つのオリゴマー状態：二量体及び八量体が存在することを示す。IFP35における2つのNIDドメインは、恐らく、2つの独立したドメインではなく、2つの交換相互作用ドメインである。IFP35-NIDの2つのオリゴマー状態は、IFP35が細胞内で2つの異なるオリゴマー状態(機能に応じてである可能性が極めて高い)を有し得ることを示した。NMIは、IFP35と同様の機能を有しており、その構造も類似している可能性がある。しかし、NMIは、IFP35と比べて、異なるオリゴマー状態を有していなかった。細胞から分泌されたNMIは、均質なポリマー状態であった。重量による推測に基づいて、分泌されたNMIは、恐らく、二量体又は四量体であった。

40

## 【0316】

続いての機能実験では、八量体IFP35-NIDのみがNMIと同様に炎症を誘導できることが見出され、これは、八量体IFP35-NIDが完全長IFP35と同じ構造的特徴を有することを示唆している。したがって、IFP35の受容体に対する結合に関与している八量体表面上のアミノ酸を見出し、前記結合をブロックすることによって、IFP35が正常に機能するのをブロックすることができる。同様に、IFP35とその細胞受容体との相互作用に関与しているアミノ酸残基を標的とするIFP35及び/又はN

50

MIの阻害抗体を開発することができる。

【0317】

実施例3 IFP35免疫機能の分析

IFP35は、過剰な免疫応答を引き起こす

ヒトのIFP35-NID1、IFP35-NID2、又はIFP35-NID-Hドメイン(二量体及び八量体)は、マウスの免疫応答を刺激するための抗原として用いることができる。各タンパク質につき4頭のマウスを用い、各マウスを4回免疫し、1頭当たりタンパク質0.2mgをマウスに腹腔内注射した。次いで、最初の免疫後、14日間毎に1回、合計4回マウスの免疫を強化した。

【0318】

免疫プロセスでは、マウスを免疫するためにヒトIFP35-NID二量体を用いることによって、予想通り対応する抗体を得ることができ、NID-H八量体は、3回目の免疫までに腹部膨満を引き起こし、4回目の免疫までに殆ど全てのマウスが腹部膨満を伴って死亡した。NID-H八量体は、免疫応答を刺激することができた。RAW264.7マクロファージ(ATCCから入手)を、10%ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中37で培養した。

【0319】

IFP35-NID1及びIFP35-NID2は、有意な差を有していなかった。

【0320】

インビボにおけるIFP35の免疫学的機能

BMDM細胞の培養：マウスの頸部を破壊することによってマウスを屠殺し、マウスの2本の後肢を外し、前記肢を70%アルコールに1分間浸漬し、背骨の筋肉の除去を試み、骨髓腔をPBSで洗い流す。次いで、400gで100分間遠心分離し、上清を慎重に取り除く。赤血球細胞を細胞溶解バッファに回収し、次いで、PBS10mLを添加して前記細胞溶解バッファを中和する。10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1%L-グルタミン、及び20ng/mLのMCSFを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中37でBMDM細胞を培養した。

【0321】

RAW264.7マクロファージ(ATCCから入手)を、10%ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中37で培養した。

【0322】

1. マクロファージ264.7及びBMDMにおけるサルモネラ菌感染は、IFPの放出を引き起こす

細胞を予熱PBSで3回洗浄した。Raw264.7細胞及びBMDM細胞を脾臓酵素で分解し、血球計数器でカウントして、全ての穴の細胞数を確認した。予熱DMEM1mLを細胞培養皿に添加した。サルモネラ菌SR-11を12,000RPMで10分間遠心分離し、PBSで2回洗浄した。サルモネラ菌を懸濁させ、血球計数器でカウントした。感染多重度に従ってRaw264.7細胞にサルモネラ菌を添加し(1:100又は1:10)、一方、感染多重度に従ってBMDM細胞にも添加した(1:10又は1:2)。細胞培養皿を室温で10分間1,500RPMで遠心分離したが、これは、細胞に細菌を吸着させるのに有益である。1時間Raw264.7細胞をサルモネラ菌に感染させ、0.5時間BMDMをサルモネラ菌に感染させたとき、細胞培養物中のサルモネラ菌を除去し、100µg/mLアミカシンDMEMを培地に添加した。3時間Raw264.7細胞をサルモネラ菌に感染させ、1時間BMDM細胞をサルモネラ菌に感染させたとき、10µg/mLアミカシンDMEMを培地に添加した。それぞれ、1時間、3時間、5時間、9時間、又は0.5時間、1時間、2時間、4時間、Raw264.7細胞及びBMDM細胞をサルモネラ菌に感染させた後、細胞培養上清中の分泌タンパク質を回収した。

【0323】

細胞培養上清を濃縮し、細胞をサルモネラ菌に感染させた後の全細胞溶解物を抽出する：細胞培養上清の濃縮：(1)細胞培養上清に0.1体積の氷冷100%TCAを添加し

10

20

30

40

50

、2時間氷上に置いた。(2)4 で30分間12,000gで遠心分離する。(3)前記上清を慎重に除去し、沈降物を冷アセトンで2回洗浄する。(4)4 で10分間12,000gで遠心分離する。(5)前記沈降物を、1×SDS-PAGEローディングバッファ30μL中、95 で5分間加熱した。

#### 【0324】

細胞にサルモネラ菌を感染させた後、全細胞溶解物を抽出する：(1)細胞の回収：細胞培養上清を除去し、PBSで2回洗浄し、PBS 1mLを細胞培養皿に添加し、細胞スクラッチャーで細胞を掻き取り、細胞懸濁液を1.5mLチューブにピペットで移し、1,500RPMで5分間遠心分離し、上清を除去する。細胞沈降を用いて全タンパク質を抽出する。(2)細胞の溶解：適切な量のRIPA溶解バッファをとり、最終濃度1mm 10  
になるようにPMSFを溶解バッファに添加する、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Roc he)。RIPA溶解バッファ150μLを細胞培養皿の各穴に添加し、細胞を氷上で15分間分割する。(3)細胞溶解バッファの回収：細胞が完全に分割した後、4 で5分間12,000RPMで遠心分離し、上清を新たなチューブに移す。(4)サンプルの煮沸：細胞溶解バッファを、2×SDS-PAGEローディングバッファ150μL中95 で5分間加熱した。

#### 【0325】

図18に示す通り、細胞培養上清中にIFP35は全く又は殆ど存在しない。しかし、サルモネラ菌によって刺激した後1時間以内に、RAW264.7細胞の培養上清中で、放出されたIFP35を検出することができた。次の数時間では、IFP35が時間依存的に培養物中に蓄積した。対照的に、IFP35の放出時間は、公知の危険信号HMG B 20  
-1よりも早い。また、細胞内のIFP35のタンパク質レベルは減少する(図18A)。BMDM細胞及びPBDM細胞を用いたときも同じ結果が得られた(図18B及び図18C)。

#### 【0326】

サルモネラ菌に感染した後の細胞内IFP35タンパク質含量の変化をよりよく観察するために、免疫蛍光法を用いてIFP35タンパク質を検出した。図19に示す通り、IFP35を赤色で染色し、DAPIを青色で染色した。2つの異なる感染スキーム(細胞数のMOIに対する比がそれぞれ1:2又は1:10)を用いて、0時間~3時間のIFP35タンパク質含量の変化を観察した。細胞内IFP35タンパク質含量は、時間が経 30  
つにつれて徐々に低下し、MOIのより高い感染細胞においてIFP35がより速やかに減少することが見出された。感染によって誘導されたIFP35の蓄積が細胞内部で生じたのではなく、主に細胞の外側に分泌されたことが更に証明された。この結果は、細胞内のIFPタンパク質含量の変化についての上記試験と一致している。

#### 【0327】

### 2. ウイルス感染におけるIFP35の放出

実験方法：感染多重度に従ってRAW264.7細胞にウイルスを添加した。時間依存的に細胞培養上清を回収する。4 で30分間、200gで遠心分離する。トリクロ酢酸(TCA)によって上清を回収し、ウェスタンブロットする。

#### 【0328】

インビトロでRAW264.7に感染させたのがDNAウイルス(MHV68)であろうとRNAウイルス(A59)であろうと、感染多重度(MOI)が0.2であるとき、感染の8時間後にIFP35が放出される。同条件下で、HMG B 1は放出されない。感染多重度を5に増大させると、24時間感染させた後にHMG B 1が明らかに放出される。インビトロで細菌感染させた細胞と同様に、IFP35は、HMG B 1よりも早く放出され、これは、IFP35が非常に重要な危険信号分子であることを示した。

#### 【0329】

### 3. マウス腹膜炎モデル

図21Aは、サルモネラ菌SR-11の標準株によって引き起こされたマウス腹膜炎モデルにおいて、IFP35が放出され得たことを示す。サルモネラ菌の生菌(生菌SR- 50

11) の注射によってマウス腹膜炎が引き起こされ、マウス腹水に I F P 3 5 が放出され得た。一方、共生大腸菌 (E . c o l i S t a b l e 3) 及びサルモネラ菌の熱死菌 (H K S R - 1 1、熱死 S R - 1 1) を注射しても、炎症は引き起こされず、I F P 3 5 も検出できなかった。この結果は、I F P 3 5 が炎症応答と関連していることを示す。

#### 【0330】

サルモネラ菌 S R - 1 1 の標準株の樹立によって、マウス腹膜炎モデルが得られた。2 時間、4 時間、8 時間細菌を注射した後、マウスの腹水を P B S 8 m L で洗浄し、腹水洗浄バッファ 4 m L で抽出する。トリクロロ酢酸 (T C A) 沈殿し、ウエスタンブロットによって I F P 3 5 を検出する。(1) C 5 7 / B 6 マウス、雄、8 週齢 ~ 1 0 週齢、体重約 2 0 g、4 時間絶食。(2) 各マウスに  $2 \times 10^5$  個の細菌を注射する。(3) 2 時間、4 時間、8 時間細菌を注射した後、マウスの腹水を P B S 8 m L で洗浄し、腹水洗浄バッファ 4 m L で抽出する。(4) 4 で 1 0 分間、2 0 0 g で遠心分離し、細胞培養物を回収し、トリクロロ酢酸 (T C A) 沈殿する。(5) ウエスタンブロットによって I F P 3 5 を検出する。

#### 【0331】

図 2 1 B に示す通り、L P S、A T P がインフラマソームを活性化したとき、I F P 3 5 が放出され得た。実験方法：(1) R a w 2 6 4 . 7 細胞を L P S (1  $\mu$  g / m L) で 4 時間刺激し；(2) A T P (5 m M) で 1 0 分間、3 0 分間、6 0 分間、細胞を連続刺激し；(3) 4 で 1 0 分間、2 0 0 g で遠心分離し、細胞培養物を回収し、トリクロロ酢酸 (T C A) 沈殿し；(4) ウエスタンブロットによって I F P 3 5 を検出する。

#### 【0332】

炎症応答における I F P 3 5

##### 1. I F P 3 5 は炎症性サイトカインの産生を誘導する

実験手順：実施例 1 における I F P 3 5 の二量体及び八量体の内毒素を取り除き、それらを B M D M 細胞培養培地 (最終濃度 5  $\mu$  g / m L、2 5  $\mu$  g / m L、5 0  $\mu$  g / m L) に添加し、4 時間刺激し、Q - P C R 及び内部標準としての G A P D H を用いて公知の炎症促進因子 T N F - 及び I L - 1 を検出する。

#### 【0333】

Q - P C R 増幅プライマー：

I L - 1 :

センス：5 ' A A G G A G A A C C A A G C A A C G A C A A A A 3 '

アンチセンス：5 ' T G G G G A A C T C T G C A G A C T C A A A C T 3 '

T N F - :

センス：5 ' C C A G T G T G G G A A G C T G T C T T 3 '

アンチセンス：5 ' A A G C A A A A G A G G A G G C A A C A 3 '

G A P D H :

センス：5 ' A G G T C G G T G T G A A C G G A T T T G 3 '

アンチセンス：5 ' T G T A G A C C A T G T A G T T G A G G T C A 3 '

#### 【0334】

図 2 2 に示す通り、公知の炎症促進因子 T N F - 、I L - 1、i N O S、及び C D 8 6 は、B M D M 細胞において N I D - H 八量体の存在下でアップレギュレートされ得るが、N I D - H 二量体は、この効果を有していなかった。この結果は、異なる凝集状態の I F P 3 5 - N I D が異なる効果を有していることを証明した。

#### 【0335】

I F P 3 5 N I D 1 及び I F P 3 5 N I D 2 は、同じ方法を用い、その結果は、有意な差を有しない。

#### 【0336】

##### 2. I F P 3 5 は、過剰な免疫応答につながる

I F P 3 5 - N I D の二量体及び八量体をマウスの腹腔に注射した。8 時間後、I F P 3 5 - N I D 八量体は、好中球の蓄積によって顕在化する急性炎症応答を引き起こした。

この作用が、早期炎症応答におけるマウスの腹部膨満及び死亡の理由であるはずである。この結果は、I F P 3 5 - N I D 八量体が、インビトロでマクロファージを誘導して炎症因子を産生させるだけでなく、マウスにおける炎症応答を制御する能力を有することも証明した。

#### 【 0 3 3 7 】

3 . I F P 3 5 は、マクロファージにおける N F - B 経路を活性化する

I F P 3 5 - N I D 八量体による N F - B の活性化が観察された。N F - B 経路は、マクロファージ活性化の重要な経路である。検出方法：I F P 3 5 - N I D の二量体及び八量体の内毒素を含まないタンパク質を R a w 2 6 4 . 7 細胞に添加し、1 5 分間、3 0 分間、及び 6 0 分間刺激する。氷上で 3 0 分間 R I P A ( プロテアーゼ阻害剤カクテル、R o c h e ) バッファに細胞を回収した。4 で 1 0 分間 1 2 , 0 0 0 r p m で遠心分離する。上清を回収し、S D S - P A G E ローディングバッファ中 9 5 で 1 0 分間加熱する。サンプルを - 7 0 度で保存する。ウエスタンブロットを用いて、N F - k B シグナル伝達経路における抑制因子 I k B のリン酸化を検出した。ホスホ I k B 及び I k B 抗体は、C S T から入手した。結果は、図 2 4 に示す通り、原核生物で発現させた異なる重合状態の内毒素を含まないタンパク質を添加した後、I F P 3 5 - N I D 組み換えタンパク質の八量体の発現によって、I k B のリン酸化が増加したが、全 I k B タンパク質レベルは低下した。I F P 3 5 - N I D 組み換えタンパク質の八量体は、N F - k B シグナル伝達経路を活性化することが示唆された。まとめると、これら結果は、八量体は、N F - k B シグナル伝達経路を活性化することによって、マクロファージ活性化を誘導して多数の炎症性サイトカインを産生させることができるが、二量体はできないことを示した。

#### 【 0 3 3 8 】

I F P 3 5 の細胞表面受容体

I F P 3 5 は、細胞外又は体液に分泌されることによって炎症応答を誘導したので、この実施例は、I F P 3 5 活性を媒介する細胞表面受容体を同定し、次いで、このプロセスにおける T L R - M y d 8 8 経路の生物学的機能を検出することを目的とする。

#### 【 0 3 3 9 】

B M D M 細胞の培養：マウスの頸部を破壊することによってマウスを屠殺し、マウスの 2 本の後肢を外し、前記肢を 7 0 % アルコールに 1 分間浸漬し、背骨の筋肉の除去を試み、骨髓腔を P B S で洗い流す。次いで、4 0 0 g で 1 0 0 分間遠心分離し、上清を慎重に取り除く。赤血球細胞を細胞溶解バッファに回収し、次いで、前記細胞溶解バッファを中和するために P B S 1 0 m L を添加する。B M D M 細胞を、1 0 % ウシ胎児血清、1 % ペニシリン - ストレプトマイシン、1 % L - グルタミン、及び 2 0 n g / m L の M C S F を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中 3 7 で培養した。

#### 【 0 3 4 0 】

I F P 3 5 又は N M I の刺激：I F P 3 5 - N I D の二量体、八量体、又は N M I ( 5  $\mu$  g / m L 、 2 5  $\mu$  g / m L 、又は 5 0  $\mu$  g / m L ) を添加して、4 時間 B M D M 細胞を刺激し、I L - 1 及び T N F - を Q - P C R によって検出した。

#### 【 0 3 4 1 】

細胞の全 R N A の抽出：K a n g W e i C o m p a n y ( カタログ番号 C W 0 5 9 7 ) 製の R N A 抽出キットを用いて B M D M 細胞から全 R N A を抽出した。T r i z o l 試薬 ( I n v i t r o g e n ) を用いて R A W 2 6 4 . 7 細胞から全 R N A を抽出した。

#### 【 0 3 4 2 】

逆転写：P r i m e S c r i p t ( 商標 ) I I 1 s t S t r a n d c D N A S y n t h e s i s K i t ( カタログ番号 6 2 1 0 A ) を用いて全 R N A 1  $\mu$  g から c D N A の第 1 の鎖を合成した。S Y B R ( 登録商標 ) P r e m i x E x T a q ( 商標 ) ( T l i R N a s e H P l u s ) 及び R O X p l u s Q - P C R キット ( カタログ番号 R R 4 2 L R ) を用いてリアルタイム R T - P C R を実施した。図 2 5 に示す通り、I F P 3 5 - N I D タンパク質を用いて M y d 8 8 ノックアウト B M D M 細胞を処理し



たところ、これら細胞においてN I D - Hの活性が急激に低下し、I F P 3 5 - N I DによってI L - 1 (図25A)及びT N F - (図25B)を誘導することができなかった。I F P 3 5は、細胞表面におけるT L R受容体に結合して、M y d 8 8依存性経路を通じてN F - Bを活性化し、炎症因子を産生させる傾向がある。

#### 【0343】

T L R - 4及びT L R - 9は、炎症応答を誘導することができる2つの主な細胞表面受容体タンパク質である。図26に示す通り、T L R 4は、I F P 3 5 - N I Dを通じてI L - 1 (図26A)及びT N F - (図26B)の増加を媒介する。N I D - H八量体が野生型マウス、T L R 9 - / - マウス、及びT L R 4 - / - マウスのB M D M細胞においてT N F - 及びI L - 1 をアップレギュレートすることができたのに対して、I F P 3 5ファミリーのタンパク質は、直接又は間接的に、T L R 4によって同定することもできる。

10

#### 【0344】

敗血症等の過剰な免疫応答によって引き起こされる疾患の治療におけるI F P 3 5モノクローナル抗体

I F P 3 5 - N I Dは、マクロファージを活性化し、炎症応答を誘導することができるので、I F P 3 5は、敗血症において何らかの役割を果たしている可能性があり、I F P 3 5は、敗血症においてサイトカインストームを激化させ、マウスを死に至らしめることができる。

#### 【0345】

20

##### 1. 敗血症マウスにおけるI F P 3 5の発現

L P D誘導性ショックモデルの樹立：(1) B 6 / C 5 7マウスを一晩絶食させ；(2) 次の日の朝、L P S (体重1 k g当たり5 m g及び1 0 m g)をマウスに腹腔内注射し；(3) 注射の3時間後にキャピラリーを用いて採血し；(4) 注射の6時間後にマウスの眼を摘出し、採血する。

#### 【0346】

E L I S Aを用いた、L P S誘導性ショックモデルにおけるI F P 3 5の濃度検出。(1) 抗体のコーティング：I F P 3 5 1 D 7の精製モノクローナル抗体をP B Sで2 m g / m Lに希釈し、1 0 0 m L / 穴を酵素標識プレートに入れる、4 で一晩；(2) 洗浄：P B S T (0 . 0 5 % T w e e n - 2 0)で3回洗浄する；(3) ブロッキング：振動テーブル上に2 % B S Aを含有するP B S T (0 . 0 5 % T w e e n - 2 0)を置き、室温で1時間退色させる；(4) 希釈した標準及びサンプル1 0 0  $\mu$  L / 穴を添加する、4 で一晩；(5) 洗浄：P B S T (0 . 0 5 % T w e e n - 2 0)で3回洗浄し、d d H<sub>2</sub>Oで2回洗浄する；(6) 発色：各ウェルにT M B 1 0 0  $\mu$  Lを添加し、光を避け、振動テーブルに1 0 分間～2 0 分間置く。(7) 反応の停止：2 M H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> 5 0  $\mu$  Lを各ウェルに添加する；(8) 酵素標識プレート、4 5 0 n mでO Dをスキャンする。

30

#### 【0347】

敗血症マウスモデルの血液中におけるI F P 3 5濃度の定量的検出は、L P S誘導性敗血症マウスの血液で高濃度のI F P 3 5を示し、これは、ナノグラムレベル(約8 n g)に達する。しかし、H M G B 1のレベルは、先行論文によればp g 6 0 0～8 0 0である。そして、それは、L P S注射の時間又は用量に依存する(3時間及び6時間、体重1キログラム当たり5 m g及び1 0 ミリグラムのL P S用量)。

40

#### 【0348】

##### 2. I F P 3 5モノクローナル抗体を注射することによる敗血症マウスの生存率上昇

I F P 3 5モノクローナル抗体1 D 7をマウスに注射した。図27に示す通り、I F P 3 5モノクローナル抗体は、敗血症マウスの生存率を増大させることができた。この結果は、I F P 3 5モノクローナル抗体1 D 7が細菌モデルにおいて有効にマウスを死から保護することができることを証明した。1 D 7で処理したマウス(n = 1 0)の中央致死時間は、1 0 7時間であったが、一方、コントロールは5 0時間であった。

#### 【0349】

50

3. IFP35モノクローナル抗体を注射した後のマウスにおける炎症因子IL-6の発現の検出について、具体的な方法は、以下の通りであった：IL-6 ELISAキットは、BD Biosciencesから入手し、詳細な操作情報については、製品の仕様書を参照する。

#### 【0350】

図28に示す結果から、重篤な敗血症のマウスでは、IFP35抗体(1D7)を注射することによってマウスの体液中でIL-6タンパク質が高度に発現したが、注射していないマウスでは発現しなかった。

#### 【0351】

IFP35及び抗腫瘍治療

10

幾つかの腫瘍では、NMIのタンパク質レベルが低下する。IFP35及びNMIは、生物の炎症応答を促進する、免疫系を活性化し、及び炎症性サイトカインの放出を促進する等、生物学的進行における様々な機能を有することが強調されたので、精製IFP35又はNMIを血液中に注射することによって、抗腫瘍治療を活性化及び/又は増強することができる。したがって、IFP35又はNMIのタンパク質は、有望な抗癌薬であり得る。

#### 【0352】

実施例4 NMI免疫機能分析

NMIは、過剰な免疫応答を引き起こす

完全長NMI及びNMI-NIDをマウスの免疫応答を刺激するための抗原として用いた。各タンパク質につき4頭のマウスを用い、各マウスを4回免疫し、マウス1頭当たりタンパク質0.2mgをマウスの腹腔に注射した。次いで、最初の免疫後14日間毎に1回、合計4回マウスの免疫を強化した。

20

#### 【0353】

免疫プロセスでは、マウスを免疫するためにマウスNMI-NIDを用いることによって、3回目の免疫までに腹部膨満を引き起こし、4回目の免疫までに殆ど全てのマウスが腹部膨満を伴って死亡した。したがって、マウスにおいて抗体を得ることは困難である。したがって、NID-H八量体は、免疫応答を刺激し得る。

#### 【0354】

インビボにおけるNMIの免疫学的機能研究

30

1. 細胞が細菌に感染したとき、NMIが細胞外空間に分泌される

NMIとIFP35とは相同なタンパク質である。IFP35及びNMIは、高分子質量複合体(HMMC)を構築し得る。この実施例では、NMIを検出した。

#### 【0355】

BMDM細胞の培養：マウスの頸部を破壊することによってマウスを屠殺し、マウスの2本の後肢を外し、前記肢を70%アルコールに1分間浸漬し、背骨の筋肉の除去を試み、骨髓腔をPBSで洗い流す。次いで、400gで100分間遠心分離し、上清を慎重に取り除く。赤血球細胞を細胞溶解バッファに回収し、次いで、PBS10mLを添加して前記細胞溶解バッファを中和する。BMDM細胞を、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン-ストربتマイシン、1%L-グルタミン、及び20ng/mLのMCSFを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中37で培養した。

40

#### 【0356】

RAW264.7マクロファージ(ATCCから入手)を、10%ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中37で培養した。

#### 【0357】

2. THP1細胞におけるサルモネラ菌による感染、並びに細胞の溶解物及び上清におけるNMIのタンパク質レベルの検出

実験方法：15mLチューブにTHP1細胞を回収し、500gで5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を予熱PBSで洗浄し、500gで5分間遠心分離し、上清を除去する。DMEMに細胞を懸濁させ、血球計数器で細胞をカウントする。3×10<sup>5</sup>細胞を全

50

ての穴に添加する。細胞培養皿に予熱DMEM 1 mLを添加する。サルモネラ菌SR-11を12,000 RPMで10分間遠心分離し、PBSで2回洗浄した。サルモネラ菌を懸濁させ、血球計数器でカウントした。感染多重度に従ってTHP1細胞にサルモネラ菌を添加した(1:100又は1:10)。細胞培養皿を室温で10分間1,500 RPMで遠心分離したが、これは、細胞上に細菌を吸着させるのに有益である。1時間THP1細胞をサルモネラ菌に感染させた場合は、細胞培養物中のサルモネラ菌を除去し、100 µg/mLアミカシンDMEMを培地に添加した。3時間THP1細胞をサルモネラ菌に感染させた場合は、10 µg/mLアミカシンDMEMを培地に添加した。それぞれ、1時間、3時間、5時間、及び9時間、THP1細胞をサルモネラ菌に感染させた後、細胞培養上清中の分泌タンパク質を回収した。

10

#### 【0358】

細胞培養上清を濃縮し、細胞をサルモネラ菌に感染させた後に全細胞溶解物を抽出する：細胞培養上清の濃縮：細胞培養上清に0.1体積の氷冷100%TCAを添加し、氷上で2時間置いた。4で30分間、12,000 gで遠心分離する。前記上清を慎重に除去し、沈降物を冷アセトンで2回洗浄する。(4)4で10分間、12,000 gで遠心分離する。(5)前記沈降物を、1×SDS-PAGEローディングバッファ30 µL中、95で5分間加熱した。

#### 【0359】

細胞にサルモネラ菌を感染させた後、全細胞溶解物を抽出する：(1)細胞の回収：THP1細胞を15 mLチューブに回収し、500 gで5分間遠心分離し、上清を除去し、予熱PBSで細胞を洗浄し、500 gで5分間遠心分離し、上清を除去する。細胞沈降を用いて全タンパク質を抽出する。(2)細胞溶解：適切な量のRIPA溶解バッファをとり、PMSFを最終濃度1 mmの溶解バッファ、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Rocke)に添加する。RIPA溶解バッファ150 µLを細胞培養皿の各穴に添加し、細胞を氷上で15分間分割する。(3)細胞溶解バッファの回収：細胞が完全に分割した後、4で5分間12,000 RPMで遠心分離し、上清を新たなチューブに移す。(4)サンプルの煮沸：細胞溶解バッファを、2×SDS-PAGEローディングバッファ150 µL中95で5分間加熱した。

20

#### 【0360】

THP1細胞の培養：THP1細胞を、10%ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中37で培養した。

30

図29に示す通り、細胞培養上清中にNMIは全く又は殆ど存在しない。しかし、サルモネラ菌によって刺激した後1時間以内に、THP1細胞の培養上清中において、放出されたNMIを検出することができた。一方、細胞内のNMIは、それ程変化しない。この結果は、細菌に感染したとき、NMIが細胞外に分泌され得ることを示した。

#### 【0361】

炎症応答におけるNMI

マウス完全長NMIをTHP1細胞培養培地(最終濃度5 µg/mL、25 µg/mL、50 µg/mL)に添加し、4時間刺激し、公知の炎症促進因子TNF-及びIL-1を検出する。

40

#### 【0362】

Raw264.7細胞の培養：細胞を、10%ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中37で培養した。

#### 【0363】

細胞の全RNAの抽出：KangWei Company(カタログ番号CW 0597)製のRNA抽出キットを用いてBMDM細胞から全RNAを抽出した。Trizol試薬(Invitrogen)を用いてRAW264.7細胞から全RNAを抽出した。

#### 【0364】

逆転写：PrimeScript(商標)II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(カタログ番号6210A)を用いて、全RNA 1 µgからc

50

DNAの第1の鎖を合成した。SYBR(登録商標)Premix Ex Taq(商標)(Tli RNaseH Plus)及びROX plus Q-PCRキット(カタログ番号RR42LR)を用いてリアルタイムRT-PCRを実施した。

#### 【0365】

図30に示す通り、コントロール、LPS、NMITタンパク質(5 µg/mL、25 µg/mL、又は50 µg/mL)を添加すると、THP1細胞においてNMIの存在下で公知の炎症促進因子TNF-及びIL-1がアップレギュレートされ得る。この結果は、IFP35と同様にNMIも他の炎症因子を誘導し得ることを示した。

#### 【0366】

同方法を用いてNMI-NID1及び完全長NMIを試験したところ、結果に有意な差はない。

10

#### 【0367】

NMITタンパク質の凝集状態

細菌に感染した後の細胞によって分泌されたNMIの凝集状態について試験した。THP1細胞をサルモネラ菌に感染させたとき、NMIが細胞培養培地に分泌され得る。図31に示す通り、分泌されたNMIを含有する細胞培養培地10 mLを、Millipore濃縮チューブを用いて2 mLまで濃縮する。Superdex S-200分子篩カラムを用いてクロマトグラフ分離によってサンプルを分離した。次いで、溶出サンプルをウエスタンによって試験し、NMIの溶出ピーク位置をNMI抗体によって試験した。図中の数字は、溶出バッファの体積である。これは、NMI溶出ピークトップが主に78 mLに存在することを示し、対応する分子量は70 kDa ~ 140 kDaである。

20

#### 【0368】

NMIの細胞表面受容体

NMIは細胞から体液に分泌されて炎症応答を誘導することができるので、この実施例は、NMIの細胞表面受容体を同定し、次いで、このプロセスにおけるTLR-Myd88経路の生物学的機能を検出することを目的とする。

#### 【0369】

BMDM細胞の培養：マウスの頸部を破壊することによってマウスを屠殺し、マウスの2本の後肢を外し、前記肢を70%アルコールに1分間浸漬し、背骨の筋肉の除去を試み、骨髓腔をPBSで洗い流す。次いで、400 gで100分間遠心分離し、上清を慎重に取り除く。赤血球細胞を細胞溶解バッファに回収し、次いで、前記細胞溶解バッファを中和するためにPBS 10 mLを添加する。BMDM細胞を、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1%L-グルタミン、及び20 ng/mLのMCSFを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中37 °Cで培養した。

30

#### 【0370】

細胞の全RNAの抽出：Kang Wei Company(カタログ番号CW 0597)製のRNA抽出キットを用いてBMDM細胞から全RNAを抽出した。Trizol試薬(Invitrogen)を用いてRAW264.7細胞から全RNAを抽出した。

#### 【0371】

逆転写：PrimeScript(商標)II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(カタログ番号6210A)を用いて、全RNA 1 µgからcDNAの第1の鎖を合成した。SYBR(登録商標)Premix Ex Taq(商標)(Tli RNaseH Plus)及びROX plus Q-PCRキット(カタログ番号RR42LR)を用いてリアルタイムRT-PCRを実施した。

40

#### 【0372】

敗血症等の過剰な免疫応答によって引き起こされる疾患の治療におけるNMIモノクローナル抗体

NMIの構造及び機能はIFP35と非常に類似しており、これら2つのタンパク質は協働するので、NMIの阻害は、NMIによって誘導される過剰活性免疫応答を阻害するIFP35と同じ効果を有し得る。したがって、NMI阻害剤は、IFP35阻害剤と同

50

様に、敗血症、ウイルス感染誘導性NM I過剰発現、及び自己免疫疾患を治療すると予測される。

#### 【0373】

敗血症マウスにおけるNM Iの発現

L P D誘導性ショックモデルの樹立：(1) B 6 / C 5 7マウスを一晩絶食させ；(2) 次の日の朝、L P S (体重1 k g当たり5 m g及び1 0 m g)をマウスに腹腔内注射し；(3) 注射の3時間後にキャピラリーを用いて採血し；(4) 注射の6時間後にマウスの眼を摘出し、採血する。

#### 【0374】

E L I S Aを用いた、L P S誘導性ショックモデルにおけるNM Iの濃度検出。敗血症マウスモデルの血液中NM I濃度の定量的検出は、L P S誘導性敗血症マウスの血液で高濃度のNM Iを示し、ナノグラムレベルに達することを示す。しかし、H M G B 1のレベルは、先行論文によればp g 6 0 0 ~ 8 0 0である。そして、それは、L P S注射の時間又は用量に依存する(3時間及び6時間、体重1キログラム当たり5 m g及び1 0ミリグラムのL P S用量)。NM Iモノクローナル抗体は、敗血症マウスの生存率を増大させることができる。

10

#### 【0375】

免疫応答の過剰反応

外因性原核生物系によって発現させた様々な長さの精製タンパク質を、内毒素を排出させた後、マウス1頭当たりタンパク質1 0 0 m gでマウスの腹腔内に注射した。マウスの腹腔内におけるI F P 3 5及びNM Iによる幾つかの免疫細胞の動員(例えば、好中球)をフローサイトメトリーによって検出した。

20

#### 【0376】

癌治療におけるNM I

本開示のI F P 3 5及びNM Iに基づいて、異常に高いレベルのI F P 3 5及び/又はNM Iの発現、分泌、及び/又は活性に関連する、敗血症、炎症ストーム、抗炎症疾患、及び他の疾患を治療するための薬物を開発することができる。幾つかの態様では、(1) I F P 3 5及びNM Iの放出を阻害する小化合物又はペプチド；(2) I F P 3 5及びNM Iの産生及び機能を抑制するI F P 3 5及び/又はNM Iに対する抗体；(3) インビボにおけるI F P 3 5又はNM Iのポリマーの形成に干渉する低分子；(4) インターフェロンの分泌を阻害してI F P 3 5の産生を低減する剤；(5) I F P 3 5及びNM Iとその細胞表面受容体との間の相互作用を阻害してI F P 3 5及び/又はNM Iの機能を抑制する剤；(6) I F P 3 5及びNM Iとその受容体との間の相互作用を阻害して、その機能を抑制する剤を本明細書に提供する。同様に、腫瘍組織等の低免疫又は免疫抑制条件下では、I F P 3 5又はNM Iを生物又はその一部に供給することによって免疫応答の機能を強化することができた。

30

#### 【0377】

この目的を達成するための技術は、以下であってよい：(1) I F P 3 5若しくはNM Iタンパク質又はその標的とする誘導体を生物に直接注射する；(2) I F P 3 5若しくはNM I又はその標的とする誘導体によって誘導ペプチド又は低分子を直接与える。更に、敗血症及び炎症応答の診断の観点で、E L I S Aキットを開発することができる。インビトロで発現及び結晶化させられるのはI F P 3 5の断片のみであるので、サイトカインストームを誘導する機能を実行するために完全長のI F P 3 5がポリマーを形成しなくてもよい。マウスでは、I F P 3 5の中和モノクローナル抗体を用いることによって、サイトカインストームを阻害することができた。この結果は、I F P 3 5がどんなポリマー状態で存在していようと、サイトカインストームを引き起こす要因であることを示唆している。したがって、I F P 3 5は、サイトカインストームを引き起こす主な理由であり得、これによって、サイトカインストームを阻害するための標的となる。したがって、I F P 3 5モノクローナル抗体又はI F P 3 5の他の阻害分子の適切な使用は、サイトカインストームを阻害するために有益であり得る。NM Iの構造及び機能はI F P 3 5と非常に類

40

50

似しており、細胞の外側に分泌されるこれら2つのタンパク質は協働し、細胞の炎症因子の産生を誘導する等の機能を有するので、NM IはIF P 3 5と同じ又は類似の機能を有し得ることが示される。したがって、NM Iの阻害も炎症を阻害し、また、過剰反応した炎症応答から動物を保護することもできる。したがって、幾つかの態様では、NM Iの過剰産生又はNM Iが媒介する過剰免疫応答によって誘導される死亡又は傷害を避けることができる。幾つかの腫瘍ではNM Iがあまり発現しないので、NM Iを補充することによって抗腫瘍機能が提供される。NM IとIF P 3 5との類似性は、2つの機能態様を示し、1つは、生物の免疫を増強して癌を阻害するか又は感染を回避することであり、2つ目は、これらが腫瘍治療の標的となって、その活性を阻害することにより過剰な免疫機能を抑制し、次いで、炎症の発生による生物の損傷を予防及び治療することである。まとめると、これら結果は、IF P 3 5及びNM Iの発現によって炎症応答を誘導する重要な機能を示し、更に、医学におけるこれらの重大な価値を証明する。

10

## 【0378】

## 実施例5 IF P 3 5抗体の産生

抗体における可変領域の配列をクローニングするために、6つのファミリーの軽鎖に従って軽鎖可変領域(VL)用の7対のPCRプライマーを設計した。プライマーP1~P7は、FWR1領域から始まる7つの上流プライマーであり、P8は、FWR4領域の最後で終わる下流プライマーである。4つのファミリーの重鎖可変領域に従って、PCR増幅用の5対の重鎖VHプライマーを設計した。プライマーP9~P12は、FWR1領域から始まる上流プライマーであり；プライマー13は、FWR4の最後で終わる下流プライマーである。

20

## 【0379】

これらプライマーの配列を以下に示す：

P1 G A C A T T G T G A T G W C A C A G T C T C C  
P2 G A T R T T K T G A T G A C Y C A R R C T C C  
P3 G A C A T T G T G C T G A C C C A A T C T C C  
P4 G A C A T T G T G C T G A C A C A G T C T C C  
P5 S A A A W T G T K C T C A C C C A G T C T C C  
P6 G A Y A T Y M A G A T G A C M C A G W C  
P7 G A Y A T T G T G A T G A C M C A G W C T  
P8 (VL - R) T T T B A K Y T C C A G C T T G G T S C C  
P9 A G G T G C A G C T K M A G G A G T C A G G  
P10 A G G T Y C A G C T K C A R S A R T C T  
P11 A G G T C C A R C T G C A G C A G Y C T  
P12 A G G T G M A G C T K G W G G A R T C T G G  
P13 (VH - R) T G G T C G A C G C T G A G G A G A C G G T

30

## 【0380】

Trizol試薬(Life Technologies Inc.)を用いてIF P 3 5抗体ハイブリドーマ細胞を培養及び回収して、全RNAを抽出した。次いで、抽出したRNAをテンプレートとして用いて、cDNA合成試薬キット(Life Technologies Inc.製)を用いることによってcDNAを合成した。軽鎖可変領域及び重鎖領域のPCR断片産物を寒天ゲルから回収し、次いで、T-ベクター(GE Healthcare)にクローニングした。これらコンストラクトを大腸菌DH5コンピテントセルに形質転換し、シングルクローンを選択し、配列を決定した。

40

## 【0381】

NCBI BLASTにおける配列と比較した本明細書の重鎖及び軽鎖の配列比較結果は、本明細書の配列がマウスIg Gと類似の特徴を有することを示す。

## 【0382】

G A C A T T G T G A T G A C C C A G T C T C C A G C A A T C A T G T C T G C A T  
C T C C A G G G G A G A A G G T C A C C A T G A C C T G C A G T G C C A G C T C

50

A A G T G T A A G T T A C A T G C A C T G G T A C C A G C A G A A G T C A G G C  
 A C C T C C C C C A A A A G A T G G A T T T A T G A C A C A T C C A A A C T G G  
 C T T C T G G A G T C C C T G C T C G C T T C A G T G G C A G T G G G T C T G G  
 G A C C T C T T A C T C T C T C A C A A T C A G C A G C A T G G A G G C T G A A  
 G A T G C T G C C A C T T A T T A C T G C C A G C A G T G G A G T A G T A A C C  
 C A C C C A T C A C G T T C G G T G C T G G C A C C A A G C T G G A A A T C A A  
 A ( 配列番号 1 2 )

【 0 3 8 3 】

【 表 3 】

マウス単離AIDKO-glimmB-1免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域遺伝子、部分配列

10

Sequence ID: gb|EF543888.1| Length: 444 Number of Matches: 1

Range 1: 31 to 329 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
547 bits(296)	3e-152	298/299(99%)	0/299(0%)	Plus/Plus
Query 16	CAGACTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCC	75		
Sbjct 31	CAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCC	90		
Query 76	AGCTCAAGTGTAAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGA	135		
Sbjct 91	AGCTCAAGTGTAAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGA	150		
Query 136	TGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGG	195		
Sbjct 151	TGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGG	210		
Query 196	TCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTAT	255		
Sbjct 211	TCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTAT	270		
Query 256	TACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCATCAGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGA	314		
Sbjct 271	TACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCATCAGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGA	329		

20

【 0 3 8 4 】

T G G T C G A C G C T G A G G A G A C G G T G A C T G A G G T T C C T T G A C C  
 C C A G T A G T C C A T A G C C C A A G A G T A C C C G T A T C T T G C A C A G  
 A A A T A T G T A G C C G T G T C C T C A T T C T T G A G G T T G T T G A T C T  
 G C A A A T A G G C A G T G C T G G C A G A G G T T T C C A A A G A G A A G G C  
 A A A C C G T C C C T T G A A G T C A T C A G C A A A T G T T G G C T C T C C A  
 G T G T A G G T G T T T A T C C A G C C C A T C C A C T T T A A A C C C T T T C  
 C T G G A G C C T G C T T C A C C C A G T T C A T T C C A T A G T T T G T G A A  
 G G T A T A C C C A G A A G C C T T G C A G G A G A T C T T G A C T G T C T C T  
 C C T G A C T C C T T A A G C T G C A C C T ( 配列番号 1 1 )

30

【 0 3 8 5 】

## 【表 4】

マウスクローンnat28H免疫グロブリン重鎖可変領域mRNA、部分cDs

Sequence ID: [gb|HQ446555.1|](#) Length: 331 Number of Matches: 1Range 1: 8 to 331 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
518 bits(280)	3e-143	313/328(95%)	5/328(1%)	Plus/Minus
Query 10	CTGAGGAGACGGTACTGAGGTTCCTTGACCCAGTAGTCCATAGCCC-AAGAGTACCCG	68		
Sbjct 331	CTGAGGAGACGGTACTGAGGTTCCTTGACCCAGTAGTCCATAGCCCTCACGG-A---G	276		
Query 69	TATCTTGCACAGAAATATGTAGCCGTGTCTCATTCTTGAGGTTGTTGATCTGCAATAG	128		
Sbjct 275	TTTCTTGCACAGAAATATGTAGCCGTGTCTCATTCTTGAGGTTGTTGATCTGCAATAG	216		
Query 129	GCAGTGCTGGCAGAGGTTTCCAAAGAGAAGGCAAACCGTCCCTTGAAGTCATCAGCAAAT	188		
Sbjct 215	GCAGTGCTGGCAGAGGTTTCCAAAGAGAAGGCAAACCGTCCCTTGAAGTCATCAGCATAT	156		
Query 189	GTTGGCTCTCCAGTGTAGGTGTTTATCCAGCCCATCCACTTTAAACCCCTTCTGGAGCC	248		
Sbjct 155	GTTGGCTCTCCAGTGTAGGTGTTTATCCAGCCCATCCACTTTAAACCCCTTCTGGAGCC	96		
Query 249	TGCTTCACCCAGTTCATTCCATAGTTTGTGAAGGTATACCCAGAAGCCTTGCAGGAGATC	308		
Sbjct 95	TGCTTCACCCAGTTCATTCCATAGTTTGTGAAGGTATACCCAGAAGCCTTGCAGGAGATC	36		
Query 309	TTGACTGTCTCTCCTGACTCCTTAAGCT	336		
Sbjct 35	TTGACTGTCTCTCAGGCTTCTTCAGCT	8		

10

20

## 【 0 3 8 6 】

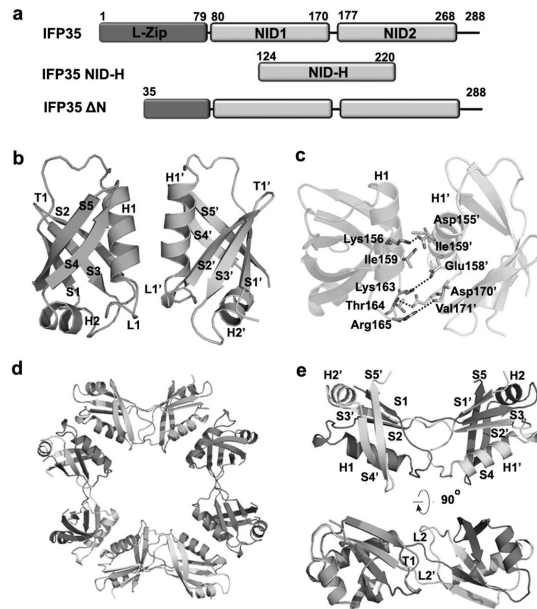
DNA 配列に基づく翻訳された軽鎖タンパク質配列及び重鎖タンパク質配列：

軽鎖：DIVMTQSPA IMSASPG EKVTMTCSASSSVSYMHWWYQQ  
 KSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSM  
 EAEDAATYYCQQWSSNPPI TFAGTKLEIK (配列番号 10)；  
 重鎖：VQLVESGP ELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVK  
 QAPGKGLKWMGWINTYTGEPTFADDFKGRFAFSLETSAST  
 AYLQINN LKNEDTATYFCARYGYSWAMDYWGQGTSTVTVSS  
 AST (配列番号 9)。

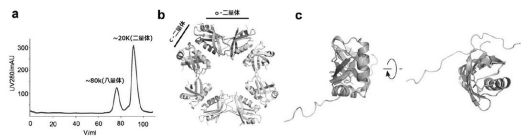
30



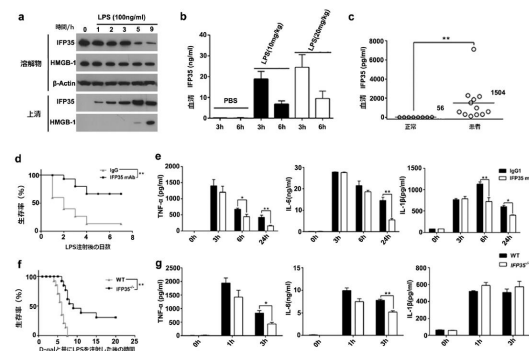
【図 1】



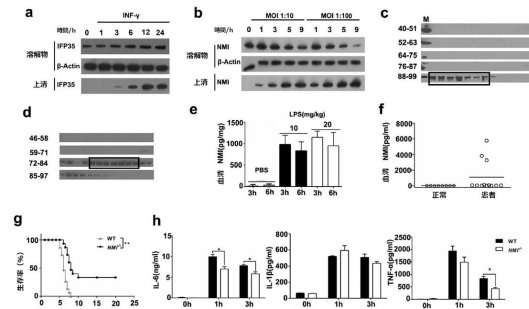
【図 2】



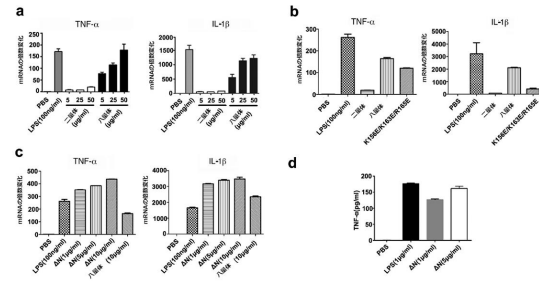
【図 5】



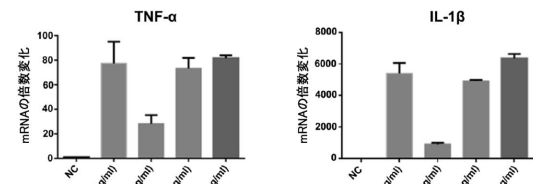
【図 6】



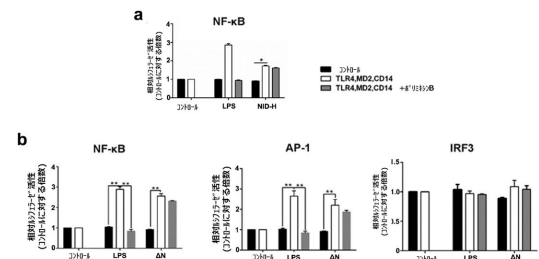
【図 3】



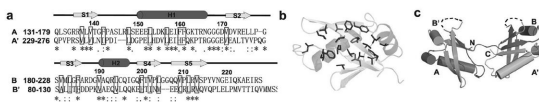
【図 4】



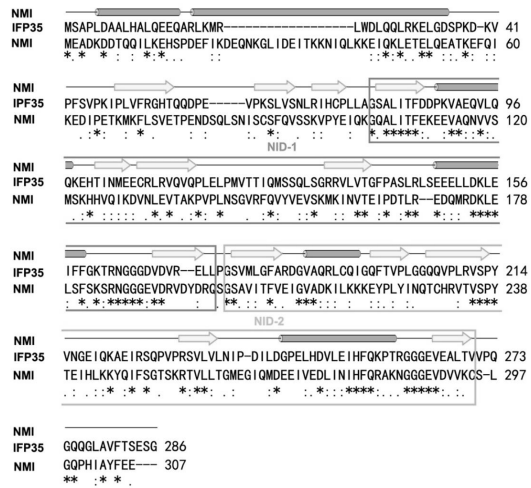
【図 7】



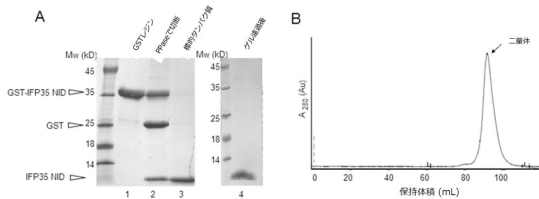
【図 8】



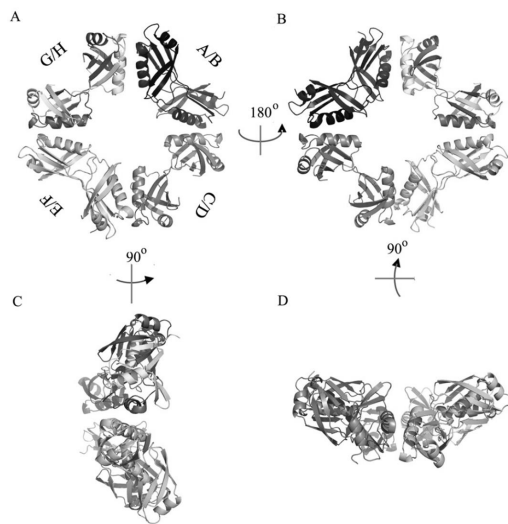
## 【図 9】



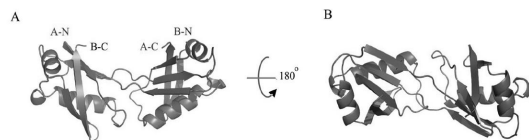
## 【図 10】



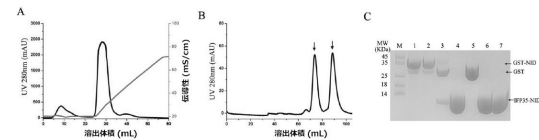
## 【図 14】



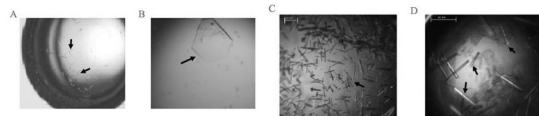
## 【図 15】



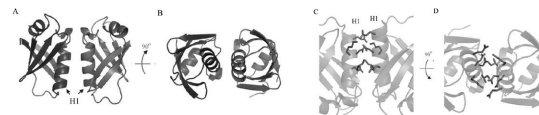
## 【図 11】



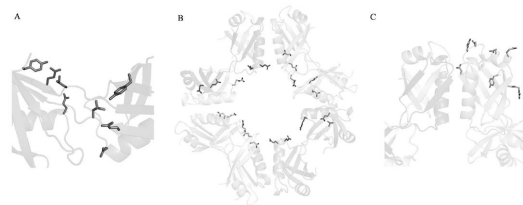
## 【図 12】



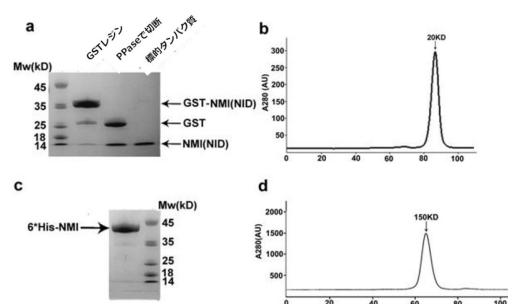
## 【図 13】



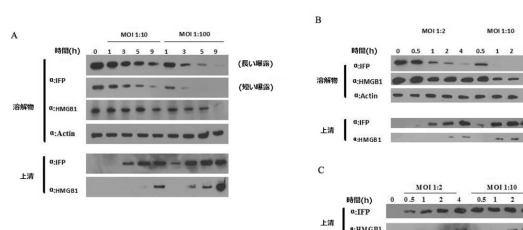
## 【図 16】



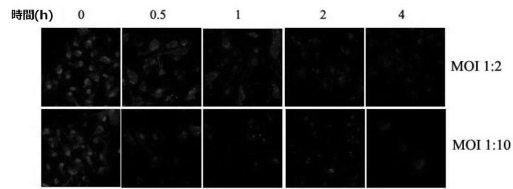
## 【図 17】



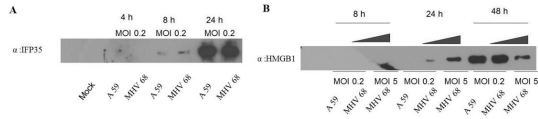
## 【図 18】



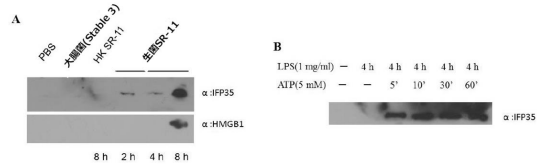
【図 19】



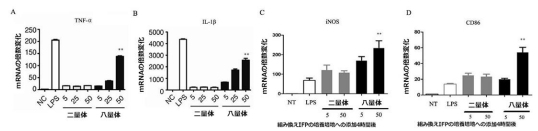
【図 20】



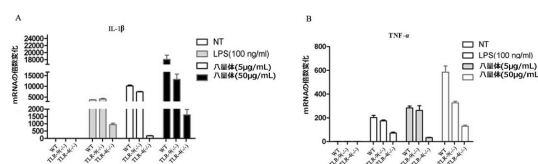
【図 21】



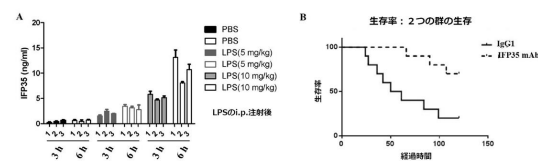
【図 22】



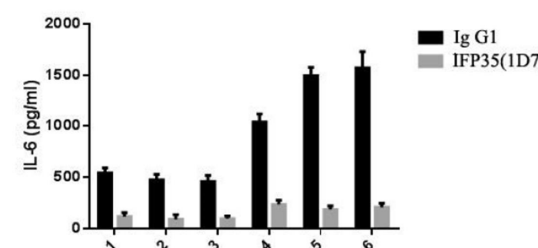
【図 26】



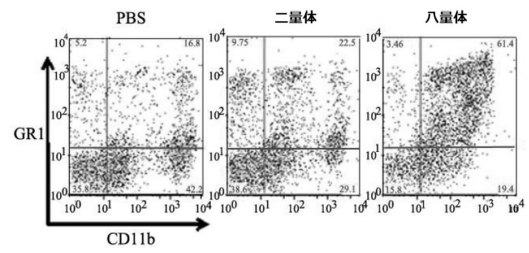
【図 27】



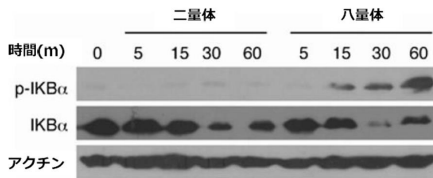
【図 28】



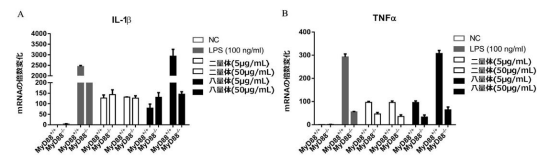
【図 23】



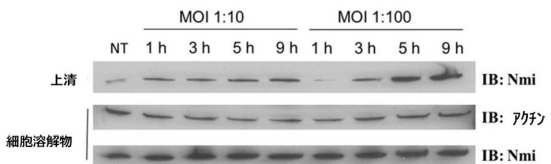
【図 24】



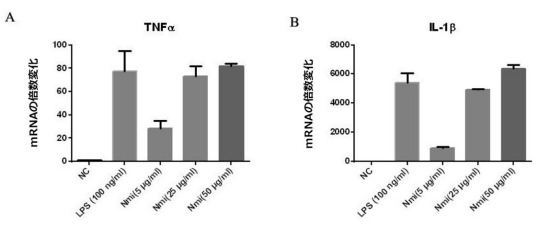
【図 25】



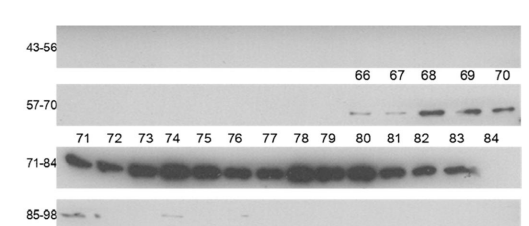
【図 29】



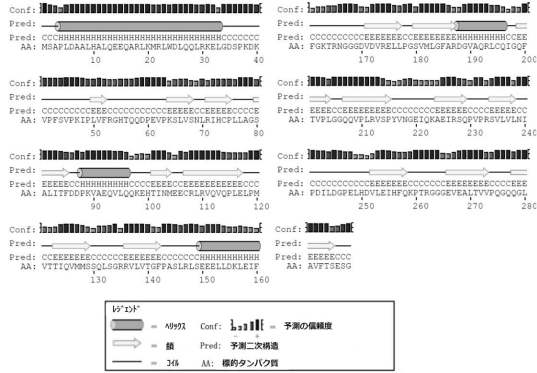
【図 30】



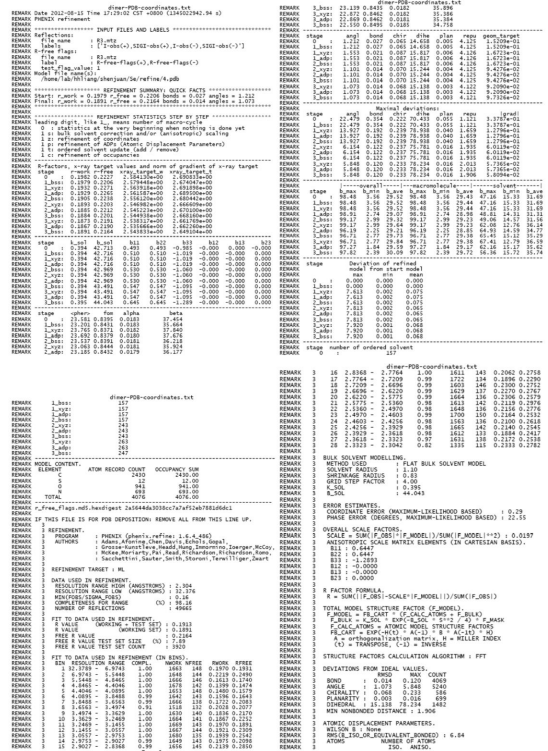
【図 31】



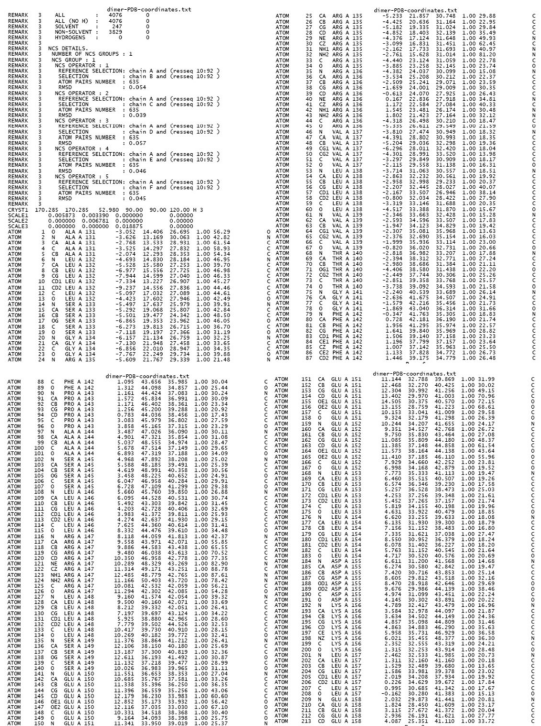
## 【図 3 2】



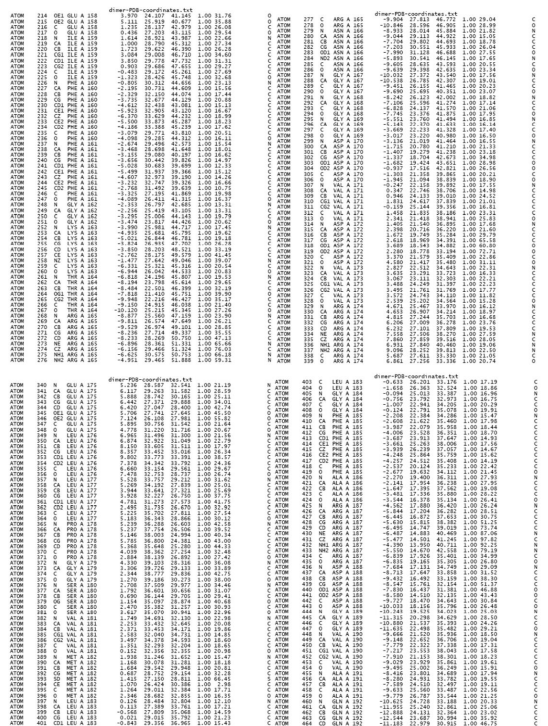
## 【図 3 3 A】



## 【図 3 3 B】



## 【図 3 3 C】



【 図 3 3 E 】

【 図 3 3 G 】

【 図 3 3 I 】

[illegible]

【 図 3 3 K 】

[illegible]



【 図 3 3 M 】

【 図 3 3 N 】

【 ㊦ 3 3 0 】

[illegible]

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

[illegible][illegible]



【 図 3 4 C 】

【 図 3 4 E 】

octamer-P88-coincubated, 1st										octamer-P88-coincubated, 1st										octamer-P88-coincubated, 1st										octamer-P88-coincubated, 1st													
ATOM 828	C1	THR	A	214	11.252	-22.068	10.241	10.0	13.21	C	ATOM 828	C1	THR	A	214	11.252	-22.068	10.241	10.0	13.21	C	ATOM 828	C1	THR	A	214	11.252	-22.068	10.241	10.0	13.21	C	ATOM 828	C1	THR	A	214	11.252	-22.068	10.241	10.0	13.21	C
ATOM 829	C2	THR	A	214	11.312	-22.068	9.941	10.0	16.19	C	ATOM 829	C2	THR	A	214	11.312	-22.068	9.941	10.0	16.19	C	ATOM 829	C2	THR	A	214	11.312	-22.068	9.941	10.0	16.19	C	ATOM 829	C2	THR	A	214	11.312	-22.068	9.941	10.0	16.19	C
ATOM 830	C3	THR	A	214	11.372	-22.068	9.641	10.0	19.17	C	ATOM 830	C3	THR	A	214	11.372	-22.068	9.641	10.0	19.17	C	ATOM 830	C3	THR	A	214	11.372	-22.068	9.641	10.0	19.17	C	ATOM 830	C3	THR	A	214	11.372	-22.068	9.641	10.0	19.17	C
ATOM 831	C4	THR	A	214	11.432	-22.068	9.341	10.0	22.15	C	ATOM 831	C4	THR	A	214	11.432	-22.068	9.341	10.0	22.15	C	ATOM 831	C4	THR	A	214	11.432	-22.068	9.341	10.0	22.15	C	ATOM 831	C4	THR	A	214	11.432	-22.068	9.341	10.0	22.15	C
ATOM 832	C5	THR	A	214	11.492	-22.068	9.041	10.0	25.13	C	ATOM 832	C5	THR	A	214	11.492	-22.068	9.041	10.0	25.13	C	ATOM 832	C5	THR	A	214	11.492	-22.068	9.041	10.0	25.13	C	ATOM 832	C5	THR	A	214	11.492	-22.068	9.041	10.0	25.13	C
ATOM 833	C6	THR	A	214	11.552	-22.068	8.741	10.0	28.11	C	ATOM 833	C6	THR	A	214	11.552	-22.068	8.741	10.0	28.11	C	ATOM 833	C6	THR	A	214	11.552	-22.068	8.741	10.0	28.11	C	ATOM 833	C6	THR	A	214	11.552	-22.068	8.741	10.0	28.11	C
ATOM 834	C7	THR	A	214	11.612	-22.068	8.441	10.0	31.09	C	ATOM 834	C7	THR	A	214	11.612	-22.068	8.441	10.0	31.09	C	ATOM 834	C7	THR	A	214	11.612	-22.068	8.441	10.0	31.09	C	ATOM 834	C7	THR	A	214	11.612	-22.068	8.441	10.0	31.09	C
ATOM 835	C8	THR	A	214	11.672	-22.068	8.141	10.0	34.07	C	ATOM 835	C8	THR	A	214	11.672	-22.068	8.141	10.0	34.07	C	ATOM 835	C8	THR	A	214	11.672	-22.068	8.141	10.0	34.07	C	ATOM 835	C8	THR	A	214	11.672	-22.068	8.141	10.0	34.07	C
ATOM 836	C9	THR	A	214	11.732	-22.068	7.841	10.0	37.05	C	ATOM 836	C9	THR	A	214	11.732	-22.068	7.841	10.0	37.05	C	ATOM 836	C9	THR	A	214	11.732	-22.068	7.841	10.0	37.05	C	ATOM 836	C9	THR	A	214	11.732	-22.068	7.841	10.0	37.05	C
ATOM 837	C10	THR	A	214	11.792	-22.068	7.541	10.0	40.03	C	ATOM 837	C10	THR	A	214	11.792	-22.068	7.541	10.0	40.03	C	ATOM 837	C10	THR	A	214	11.792	-22.068	7.541	10.0	40.03	C	ATOM 837	C10	THR	A	214	11.792	-22.068	7.541	10.0	40.03	C
ATOM 838	C11	THR	A	214	11.852	-22.068	7.241	10.0	43.01	C	ATOM 838	C11	THR	A	214	11.852	-22.068	7.241	10.0	43.01	C	ATOM 838	C11	THR	A	214	11.852	-22.068	7.241	10.0	43.01	C	ATOM 838	C11	THR	A	214	11.852	-22.068	7.241	10.0	43.01	C
ATOM 839	C12	THR	A	214	11.912	-22.068	6.941	10.0	46.00	C	ATOM 839	C12	THR	A	214	11.912	-22.068	6.941	10.0	46.00	C	ATOM 839	C12	THR	A	214	11.912	-22.068	6.941	10.0	46.00	C	ATOM 839	C12	THR	A	214	11.912	-22.068	6.941	10.0	46.00	C
ATOM 840	C13	THR	A	214	11.972	-22.068	6.641	10.0	49.00	C	ATOM 840	C13	THR	A	214	11.972	-22.068	6.641	10.0	49.00	C	ATOM 840	C13	THR	A	214	11.972	-22.068	6.641	10.0	49.00	C	ATOM 840	C13	THR	A	214	11.972	-22.068	6.641	10.0	49.00	C
ATOM 841	C14	THR	A	214	12.032	-22.068	6.341	10.0	52.00	C	ATOM 841	C14	THR	A	214	12.032	-22.068	6.341	10.0	52.00	C	ATOM 841	C14	THR	A	214	12.032	-22.068	6.341	10.0	52.00	C	ATOM 841	C14	THR	A	214	12.032	-22.068	6.341	10.0	52.00	C
ATOM 842	C15	THR	A	214	12.092	-22.068	6.041	10.0	55.00	C	ATOM 842	C15	THR	A	214	12.092	-22.068	6.041	10.0	55.00	C	ATOM 842	C15	THR	A	214	12.092	-22.068	6.041	10.0	55.00	C	ATOM 842	C15	THR	A	214	12.092	-22.068	6.041	10.0	55.00	C
ATOM 843	C16	THR	A	214	12.152	-22.068	5.741	10.0	58.00	C	ATOM 843	C16	THR	A	214	12.152	-22.068	5.741	10.0	58.00	C	ATOM 843	C16	THR	A	214	12.152	-22.068	5.741	10.0	58.00	C	ATOM 843	C16	THR	A	214	12.152	-22.068	5.741	10.0	58.00	C
ATOM 844	C17	THR	A	214	12.212	-22.068	5.441	10.0	61.00	C	ATOM 844	C17	THR	A	214	12.212	-22.068	5.441	10.0	61.00	C	ATOM 844	C17	THR	A	214	12.212	-22.068	5.441	10.0	61.00	C	ATOM 844	C17	THR	A	214	12.212	-22.068	5.441	10.0	61.00	C
ATOM 845	C18	THR	A	214	12.272	-22.068	5.141	10.0	64.00	C	ATOM 845	C18	THR	A	214	12.272	-22.068	5.141	10.0	64.00	C	ATOM 845	C18	THR	A	214	12.272	-22.068	5.141	10.0	64.00	C	ATOM 845	C18	THR	A	214	12.272	-22.068	5.141	10.0	64.00	C
ATOM 846	C19	THR	A	214	12.332	-22.068	4.841	10.0	67.00	C	ATOM 846	C19	THR	A	214	12.332	-22.068	4.841	10.0	67.00	C	ATOM 846	C19	THR	A	214	12.332	-22.068	4.841	10.0	67.00	C	ATOM 846	C19	THR	A	214	12.332	-22.068	4.841	10.0	67.00	C
ATOM 847	C20	THR	A	214	12.392	-22.068	4.541	10.0	70.00	C	ATOM 847	C20	THR	A	214	12.392	-22.068	4.541	10.0	70.00	C	ATOM 847	C20	THR	A	214	12.392	-22.068	4.541	10.0	70.00	C	ATOM 847	C20	THR	A	214	12.392	-22.068	4.541	10.0	70.00	C
ATOM 848	C21	THR	A	214	12.452	-22.068	4.241	10.0	73.00	C	ATOM 848	C21	THR	A	214	12.452	-22.068	4.241	10.0	73.00	C	ATOM 848	C21	THR	A	214	12.452	-22.068	4.241	10.0	73.00	C	ATOM 848	C21	THR	A	214	12.452	-22.068	4.241	10.0	73.00	C
ATOM 849	C22	THR	A	214	12.512	-22.068	3.941	10.0	76.00	C	ATOM 849	C22	THR	A	214	12.512	-22.068	3.941	10.0	76.00	C	ATOM 849	C22	THR	A	214	12.512	-22.068	3.941	10.0	76.00	C	ATOM 849	C22	THR	A	214	12.512	-22.068	3.941	10.0	76.00	C
ATOM 850	C23	THR	A	214	12.572	-22.068	3.641	10.0	79.00	C	ATOM 850	C23	THR	A	214	12.572	-22.068	3.641	10.0	79.00	C	ATOM 850	C23	THR	A	214	12.572	-22.068	3.641	10.0	79.00	C	ATOM 850	C23	THR	A	214	12.572	-22.068	3.641	10.0	79.00	C
ATOM 851	C24	THR	A	214	12.632	-22.068	3.341	10.0	82.00	C	ATOM 851	C24	THR	A	214	12.632	-22.068	3.341	10.0	82.00	C	ATOM 851	C24	THR	A	214	12.632	-22.068	3.341	10.0	82.00	C	ATOM 851	C24	THR	A	214	12.632	-22.068	3.341	10.0	82.00	C
ATOM 852	C25	THR	A	214	12.692	-22.068	3.041	10.0	85.00	C	ATOM 852	C25	THR	A	214	12.692	-22.068	3.041	10.0	85.00	C	ATOM 852	C25	THR	A	214	12.692	-22.068	3.041	10.0	85.00	C	ATOM 852	C25	THR	A	214	12.692	-22.068	3.041	10.0	85.00	C
ATOM 853	C26	THR	A	214	12.752	-22.068	2.741	10.0	88.00	C	ATOM 853	C26	THR	A	214	12.752	-22.068	2.741	10.0	88.00	C	ATOM 853	C26	THR	A	214	12.752	-22.068	2.741	10.0	88.00	C	ATOM 853	C26	THR	A	214	12.752	-22.068	2.741	10.0	88.00	C
ATOM 854	C27	THR	A	214	12.812	-22.068	2.441	10.0	91.00	C	ATOM 854	C27	THR	A	214	12.812	-22.068	2.441	10.0	91.00	C	ATOM 854	C27	THR	A	214	12.812	-22.068	2.441	10.0	91.00	C	ATOM 854	C27	THR	A	214	12.812	-22.068	2.441	10.0	91.00	C
ATOM 855	C28	THR	A	214	12.872	-22.068	2.141	10.0	94.00	C	ATOM 855	C28	THR	A	214	12.872	-22.068	2.141	10.0	94.00	C	ATOM 855	C28	THR	A	214	12.872	-22.068	2.141	10.0	94.00	C	ATOM 855	C28	THR	A	214	12.872	-22.068	2.141	10.0	94.00	C
ATOM 856	C29	THR	A	214	12.932	-22.068	1.841	10.0	97.00	C	ATOM 856	C29	THR	A	214	12.932	-22.068	1.841	10.0	97.00	C	ATOM 856	C29	THR	A	214	12.932	-22.068	1.841	10.0	97.00	C	ATOM 856	C29	THR	A	214	12.932	-22.068	1.841	10.0	97.00	C
ATOM 857	C30	THR	A	214	12.992	-22.068	1.541	10.0	100.00	C	ATOM 857	C30	THR	A	214	12.992	-22.068	1.541	10.0	100.00	C	ATOM 857	C30	THR	A	214	12.992	-22.068	1.541	10.0	100.00	C	ATOM 857	C30	THR	A	214	12.992	-22.068	1.541	10.0	100.00	C
ATOM 858	C31	THR	A	214	13.052	-22.068	1.241	10.0	103.00	C	ATOM 858	C31	THR	A	214	13.052	-22.068	1.241	10.0	103.00	C	ATOM 858	C31	THR	A	214	13.052	-22.068	1.241	10.0	103.00	C	ATOM 858	C31	THR	A	214	13.052	-22.068	1.241	10.0	103.00	C
ATOM 859	C32	THR	A	214	13.112	-22.068	0.941	10.0	106.00	C	ATOM 859	C32	THR	A	214	13.112	-22.068	0.941	10.0	106.00	C	ATOM 859	C32	THR	A	214	13.112	-22.068	0.941	10.0	106.00	C	ATOM 859	C32	THR	A	214	13.112	-22.068	0.941	10.0	106.00	C
ATOM 860	C33	THR	A	214	13.172	-22.068	0.641	10.0	109.00	C	ATOM 860	C33	THR	A	214	13.172	-22.068	0.641	10.0	109.00	C	ATOM 860	C33	THR	A	214	13.172	-22.068	0.641	10.0	109.00	C	ATOM 860	C33	THR	A	214	13.172	-22.068	0.641	10.0	109.00	C
ATOM 861	C34	THR	A																																								



【 図 3 4 K 】

[illegible]

【 図 3 4 N 】

[illegible]

## 【図 3 4 0】

[illegible]

【 図 3 4 P 】

[illegible]

【 図 3 4 Q 】

[illegible]



【 図 3 4 S 】

[illegible]

【配列表】

【配列表】

NETW	NAME	AGE	SEX	HT	WT	HT2	WT2	HT3	WT3	HT4	WT4	HT5	WT5	HT6	WT6	HT7	WT7	HT8	WT8	HT9	WT9	HT10	WT10	HT11	WT11	HT12	WT12	HT13	WT13	HT14	WT14	HT15	WT15	HT16	WT16	HT17	WT17	HT18	WT18	HT19	WT19	HT20	WT20	HT21	WT21	HT22	WT22	HT23	WT23	HT24	WT24	HT25	WT25	HT26	WT26	HT27	WT27	HT28	WT28	HT29	WT29	HT30	WT30	HT31	WT31	HT32	WT32	HT33	WT33	HT34	WT34	HT35	WT35	HT36	WT36	HT37	WT37	HT38	WT38	HT39	WT39	HT40	WT40	HT41	WT41	HT42	WT42	HT43	WT43	HT44	WT44	HT45	WT45	HT46	WT46	HT47	WT47	HT48	WT48	HT49	WT49	HT50	WT50	HT51	WT51	HT52	WT52	HT53	WT53	HT54	WT54	HT55	WT55	HT56	WT56	HT57	WT57	HT58	WT58	HT59	WT59	HT60	WT60	HT61	WT61	HT62	WT62	HT63	WT63	HT64	WT64	HT65	WT65	HT66	WT66	HT67	WT67	HT68	WT68	HT69	WT69	HT70	WT70	HT71	WT71	HT72	WT72	HT73	WT73	HT74	WT74	HT75	WT75	HT76	WT76	HT77	WT77	HT78	WT78	HT79	WT79	HT80	WT80	HT81	WT81	HT82	WT82	HT83	WT83	HT84	WT84	HT85	WT85	HT86	WT86	HT87	WT87	HT88	WT88	HT89	WT89	HT90	WT90	HT91	WT91	HT92	WT92	HT93	WT93	HT94	WT94	HT95	WT95	HT96	WT96	HT97	WT97	HT98	WT98	HT99	WT99	HT100	WT100	HT101	WT101	HT102	WT102	HT103	WT103	HT104	WT104	HT105	WT105	HT106	WT106	HT107	WT107	HT108	WT108	HT109	WT109	HT110	WT110	HT111	WT111	HT112	WT112	HT113	WT113	HT114	WT114	HT115	WT115	HT116	WT116	HT117	WT117	HT118	WT118	HT119	WT119	HT120	WT120	HT121	WT121	HT122	WT122	HT123	WT123	HT124	WT124	HT125	WT125	HT126	WT126	HT127	WT127	HT128	WT128	HT129	WT129	HT130	WT130	HT131	WT131	HT132	WT132	HT133	WT133	HT134	WT134	HT135	WT135	HT136	WT136	HT137	WT137	HT138	WT138	HT139	WT139	HT140	WT140	HT141	WT141	HT142	WT142	HT143	WT143	HT144	WT144	HT145	WT145	HT146	WT146	HT147	WT147	HT148	WT148	HT149	WT149	HT150	WT150	HT151	WT151	HT152	WT152	HT153	WT153	HT154	WT154	HT155	WT155	HT156	WT156	HT157	WT157	HT158	WT158	HT159	WT159	HT160	WT160	HT161	WT161	HT162	WT162	HT163	WT163	HT164	WT164	HT165	WT165	HT166	WT166	HT167	WT167	HT168	WT168	HT169	WT169	HT170	WT170	HT171	WT171	HT172	WT172	HT173	WT173	HT174	WT174	HT175	WT175	HT176	WT176	HT177	WT177	HT178	WT178	HT179	WT179	HT180	WT180	HT181	WT181	HT182	WT182	HT183	WT183	HT184	WT184	HT185	WT185	HT186	WT186	HT187	WT187	HT188	WT188	HT189	WT189	HT190	WT190	HT191	WT191	HT192	WT192	HT193	WT193	HT194	WT194	HT195	WT195	HT196	WT196	HT197	WT197	HT198	WT198	HT199	WT199	HT200	WT200	HT201	WT201	HT202	WT202	HT203	WT203	HT204	WT204	HT205	WT205	HT206	WT206	HT207	WT207	HT208	WT208	HT209	WT209	HT210	WT210	HT211	WT211	HT212	WT212	HT213	WT213	HT214	WT214	HT215	WT215	HT216	WT216	HT217	WT217	HT218	WT218	HT219	WT219	HT220	WT220	HT221	WT221	HT222	WT222	HT223	WT223	HT224	WT224	HT225	WT225	HT226	WT226	HT227	WT227	HT228	WT228	HT229	WT229	HT230	WT230	HT231	WT231	HT232	WT232	HT233	WT233	HT234	WT234	HT235	WT235	HT236	WT236	HT237	WT237	HT238	
------	------	-----	-----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
G 0 1 N	33/68	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/68	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
			C 0 7 K	14/47	

- (72)発明者 インファン・リウ  
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 베이진 차오얀 다탐 로드 1 5
- (72)発明者 지어파・리우  
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 베이진 차오얀 다탐 로드 1 5
- (72)発明者 ファンファン・リャン  
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 베이진 차오얀 다탐 로드 1 5
- (72)発明者 ジュエン・シェン  
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 베이진 차오얀 다탐 로드 1 5
- (72)発明者 루이첸・이엔  
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 베이진 차오얀 다탐 로드 1 5
- (72)発明者 지카이・시아하우  
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 베이진 차오얀 다탐 로드 1 5

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 特開 2 0 1 3 - 0 6 6 4 7 4 ( J P , A )  
特表 2 0 1 0 - 5 0 0 0 3 8 ( J P , A )  
国際公開第 9 9 / 0 2 8 4 6 0 ( W O , A 2 )  
Journal of Virology , 88(4) , 2014年 , pp.3103-3113  
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY , Vol.275 , No.28 , 2000年 , pp.21364-21371  
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY , Vol.275 , No.46 , 2000年 , pp.36278-36284  
Database: GenBank [online] , Accession No.AAH01356.1 , 2006年 , [retrieved on 2019.08.30]  
 , Retrieved from the Internet: <URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAH01356.1>>  
Database: GenBank [online] , Accession No.AAC12949.1 , 1998年 , 2016.07.25 , [retrieved on 2019.08.30] , Retrieved from the Internet: <URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC12949.1>>

## (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 1 2 P 2 1 / 0 8  
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6  
C 1 2 Q 1 / 6 8 - 1 / 6 8 9 7  
C 0 7 K 1 4 / 4 7  
A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 2 9 / 0 0  
A 6 1 P 3 1 / 0 0  
A 6 1 P 3 1 / 0 4  
A 6 1 P 3 7 / 0 2  
A 6 1 K 3 8 / 0 2  
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5  
A 6 1 K 3 1 / 7 1 3  
A 6 1 K 3 1 / 7 1 0 5  
A 6 1 K 4 8 / 0 0  
A 6 1 P 3 5 / 0 0  
A 6 1 P 3 5 / 0 2  
G 0 1 N 3 3 / 5 0  
G 0 1 N 3 3 / 6 8  
G 0 1 N 3 3 / 5 3  
G 0 1 N 3 3 / 1 5

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )