

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-508056

(P2006-508056A)

(43) 公表日 平成18年3月9日(2006.3.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/56 (2006.01)	A 6 1 K 31/56	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 5
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 6
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 133 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-532947 (P2004-532947)	(71) 出願人	591123609
(86) (22) 出願日	平成15年8月21日 (2003.8.21)		イミュネックス・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月20日 (2005.4.20)		I M M U N E X C O R P O R A T I O N
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/026354		アメリカ合衆国カリフォルニア州9132
(87) 国際公開番号	W02004/019866		0-1799, サウザンド・オークス, ワ
(87) 国際公開日	平成16年3月11日 (2004.3.11)		ン・アムジェン・センター・ドライブ
(31) 優先権主張番号	60/406, 418	(74) 代理人	100089705
(32) 優先日	平成14年8月28日 (2002.8.28)		弁理士 社本 一夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100076691
(31) 優先権主張番号	60/494, 457		弁理士 増井 忠武
(32) 優先日	平成15年8月12日 (2003.8.12)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 心臓血管疾患を治療するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、心臓血管疾患の病理状態に関連した炎症および免疫調節の応答を変調させることによって心臓血管疾患を治療する方法に関する。本発明の態様は、1以上のIL-17アンタゴニスト、IL-18アンタゴニスト、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニスト、OX40アンタゴニストおよび/またはCD39の有効量を単独またはあらゆる組合せで投与することを含んでなる、心臓血管疾患を有する被検者における心臓血管疾患の治療の方法を提供する。本要約は、読者が本技術開示の主題を速やかに把握することを可能にするためだけのものであり、特許請求項の範囲または意味を解釈または限定するために使用することを企図していない。37 C F R 1.72(b)。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

心臓血管疾患を有する被検者において心臓血管疾患を治療する方法であって、治療有効量のアンタゴニストを被検者へ投与することを含んでなり、ここでアンタゴニストは、IL - 17 アンタゴニスト、IL - 18 アンタゴニスト、4 - 1 BB アンタゴニスト、CD 30 アンタゴニストおよび OX 40 アンタゴニストからなる群より選択される、前記方法。

【請求項 2】

IL - 17 アンタゴニストが可溶性 IL - 17 受容体である、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

可溶性 IL - 17 受容体が融合タンパク質である、請求項 2 の方法。

【請求項 4】

IL - 17 アンタゴニストが抗体である、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

抗体が IL - 17 受容体へ特異的に結合する、請求項 4 の方法。

【請求項 6】

抗体が IL - 17 へ特異的に結合する、請求項 4 の方法。

【請求項 7】

抗体がヒト化抗体である、請求項 4 の方法。

【請求項 8】

抗体が単鎖抗体である、請求項 4 の方法。

【請求項 9】

IL - 17 アンタゴニストを週に 1 以上の回数投与する、請求項 1 の方法。

【請求項 10】

IL - 17 アンタゴニストを皮下注射により投与する、請求項 1 の方法。

【請求項 11】

非ステロイド性抗炎症薬；鎮痛薬；全身性ステロイド；炎症性サイトカインのアンタゴニスト；抗炎症性サイトカイン；化学療法剤；脂質低下薬；血圧調節薬；アンジオテンシン変換酵素阻害剤および／またはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体リガンドからなる群より選択される 1 以上の化合物との組合せにおいて IL - 17 アンタゴニストを投与する、請求項 1 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、米国特許法 (U.S.C.) 35 条 119 項の下で、2003 年 8 月 12 日出願の米国仮特許出願第 60 / 494, 457 号と 2002 年 8 月 28 日出願の米国仮特許出願第 60 / 406, 418 号の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明の態様は、心臓血管疾患に関連した炎症および免疫調節の応答を変調させることによって心臓血管疾患を治療するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景技術

心臓血管疾患には、心臓、末梢血管、筋肉、および様々な臓器の筋肉および／または血管に影響を及ぼすいくつかの障害が含まれる。当該技術分野においては、様々な形態の心臓血管疾患の病理発生に炎症および免疫調節のプロセスが関与していることが定説となっている。

【0004】

例えば、炎症免疫応答は、アテローム性動脈硬化症の病理発生に貢献することが示されている。C反応性タンパク質(CRP)の上昇レベルは、症候性アテローム性動脈硬化症の相対リスクの8.6倍までの増加に関連していた(Biasucci, L.ら, Circulation 1999, 99: 855-860)。CRPの上昇レベルより、心筋梗塞(MI)または卒中の上昇リスク状態にある患者も予測され、それはまた、不安定型狭心症の予後不良にも関連していた(Vorchheimer, D.ら, JAMA 2001, 286: 2154-2156)。C1qへ結合すると、CRPは、古典的な補体経路を活性化して、直接的な心筋損傷、冠平滑筋または内皮細胞の死、そして後続のアテローム硬化斑の破裂をもたらす可能性がある(Agrawal, A.ら, J Immunol 2001, 166: 3998-4004)。さらに、最近の研究は、上昇レベルのCRPにより、突然の心臓死で死亡する患者をそのイベントの9年前に同定することが可能であることを証明した(Albert, C.ら, Circulation 2002, 105: 2595-9)。これらの研究はまた、長期の炎症曝露と上昇CRPレベルが急性冠症候群の進行に貢献し得ることを示唆する(Buffon, A.ら, NEJM 2002, 347: 55-7)。アテローム硬化斑の内部に常在する炎症細胞の活性化により、細胞外マトリックスを破壊することの可能な酵素が複雑に合成され、斑破壊をもたらす可能性がある。あるいは、これらの炎症細胞は、内皮および平滑筋の細胞を直接殺傷する場合がある。いくつかの研究は、不安定型狭心症の患者が、安定型狭心症の患者に比較して、インターフェロン- γ のレベルを高める末梢T細胞を有することを証明した。さらに、これらの患者においては、CD4+CD28ヌルT細胞集団のクローン膨張が存在するようであり、これは細胞傷害性であるらしく、内皮細胞を殺傷することができて、CRPにより亢進される効果である(Nakajima, T.ら, Circulation 2002, 105: 570-5)。

10

20

30

40

【0005】

サイトカインは、1型ヘルパーT細胞(Th1)およびTh2のT細胞応答の重要な調節因子である。Th1応答は、マクロファージ活性化を特徴とする好炎症性サイトカインの放出をもたらす。対処しなければ、組織損傷をもたらす場合がある。Th2応答は、体液性免疫応答、B細胞活性化、およびアレルギー反応をもたらす(Neurath, M.ら, Nat Med 2002, 8: 567-73)。不安定型狭心症においては、TNF、IL-6およびケモカインMCP-1が含まれるいくつかのTh1型サイトカインが上昇している(AJC 2001, 88(8A): 10K-15K)。最近、IL-18が急性冠症候群と診断された患者の不都合なアウトカムの独立したマーカーであることが見出された(Blankenberg, S.ら, Circulation 2002, 106: 24-30)。上昇レベルのIL-18は、潰瘍化した症候性頸動脈病変に関連することも見出された(Mallat, Z.ら, Circulation 2001, 104: 1598-603)。アテローム硬化斑進展のマウスモデルのApoE欠乏マウスにおいて、IL-18は、プラーク形成を加速して亢進させ、IL-18結合タンパク質が平滑筋増殖を高めることが示され、それが冠の厚さを増すことによってプラーク安定性を促進し、浸潤性マクロファージおよびT細胞の数を低下させた(Mallat, Z.ら, Circ Res 2001, 89: E41-5)。このような研究成果は、炎症および免疫調節応答が心臓血管疾患に関連していることを示唆する十分な論拠となっている。

【0006】

当該技術分野には、心臓血管疾患の免疫病理に標的指向することによってこの疾患を治療することへの未充足ニーズが存在する。本発明の態様は、心臓血管疾患に関連した炎症および免疫調節応答を変調させることによって心臓血管疾患を治療するための組成物および方法を提供することによってこのようなニーズに対処する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明の概要

本発明の態様は、IL-17のIL-17受容体への結合を阻害するIL-17アンタゴニスト、並びにIL-17受容体の活性化を予防するかまたは減少させるアンタゴニスト；IL-18のIL-18受容体への結合を阻害するIL-18アンタゴニスト、並びにIL-18受容体の活性化を予防するかまたは減少させるアンタゴニスト；4-1BBリガンドの4-1BBへの結合を阻害する4-1BBアンタゴニスト、並びに4-1BBリガンドまたは4-1BBの活性化を予防するかまたは減少させるアンタゴニスト；CD30リガンドのCD30への結合を阻害するCD30アンタゴニスト、並びにCD30の活性化を予防するかまたは減少させるアンタゴニスト；OX40リガンドのOX40への結合を阻害するOX40アンタゴニスト、並びにOX40の活性化を予防するかまたは減少させるアンタゴニスト；および/または、単独またはあらゆる組合せのCD39といった、1以上のアンタゴニストの有効量を投与することを含んでなる、心臓血管疾患を有する被検者における心臓血管疾患の治療の組成物および方法を提供する。

10

【0008】

追加の態様は、以下に詳しく記載する。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

発明の詳細な説明

本発明の態様は、1以上のIL-17アンタゴニスト、IL-18アンタゴニスト、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニスト、OX40アンタゴニストおよび/またはCD39の有効量を単独またはあらゆる組合せで投与することを含んでなる、心臓血管疾患を有する被検者において心臓血管疾患を治療するための組成物および方法を提供する。

20

【0010】

本明細書に定義される心臓血管疾患には、心臓の筋肉および/または血管の疾患および障害、血管系の疾患および障害、および/または、心臓および/または脈管構造の病的状態により引き起こされる臓器および解剖系の疾患および障害が含まれる。例には、限定されないが、心筋炎、慢性自己免疫心筋炎、細菌性およびウイルス性心筋炎、並びに感染性心内膜炎のような心臓および/または脈管構造の炎症；心不全；鬱血性心不全；慢性心不全；心不全の悪液質；非虚血性（拡張性心筋症；突発性拡張性心筋症；心原性ショック、体外循環支援に続発する心不全（「ポンプ後症候群」）、虚血/再灌流損傷に続く心不全、脳死関連心不全（Owenら，1999（Circulation，1999 May 18；99（19）2565-70）に記載のような）；肥大型心筋症；拘束性心筋症；非虚血性全高血圧；弁疾患；不整脈起因性右心室心筋症）および虚血性（じゅく腫形成；アテローム硬化症；動脈硬化症；末梢血管疾患；冠動脈疾患；卒中、一過性虚血発作および心筋梗塞が含まれる梗塞）が含まれる心筋症が網羅される。心臓血管疾患の定義に網羅される追加の病態には、動脈瘤；動脈炎；狭心症；塞栓症；血小板関連虚血障害；虚血/再灌流損傷；再狭窄；僧房弁および/または三尖弁逆流；僧房弁狭窄；無症候性心筋虚血；レイノー現象；血栓症；深在性静脈血栓症；肺塞栓症；血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）および溶血性尿毒症性症候群（HUS）が含まれる血栓性微小血管症、本態性血小板血症、播種性血管内凝固（DIC）、および、外来または損傷組織への曝露に関連した血栓症および凝固障害、表面血栓性静脈炎；川崎脈管炎が含まれる脈管炎；高安動脈炎；静脈閉塞性疾患、巨細胞動脈炎、ウェジナー肉芽腫症；シェーンライン-ヘノッホ紫斑病、並びに細菌のような1以上の口内病原体による歯周感染症より生じる心臓血管疾患が網羅される。上記に提供する心臓血管疾患の例は単に例示であって、本明細書に記載の組成物および方法を使用して治療可能である心臓血管疾患の範囲を当業者が理解することに役立つために提供する。当然ながら、本発明の組成物および方法を使用して治療可能である他の心臓血管の疾患状態も存在し得る。心臓血管疾患に関連した心臓血管の疾患および障害の追加例、並びに心臓血管疾患の治療より生じる合併症は、治療適応症に関連して以下のセクションに提供する。

30

40

【0011】

50

本明細書に定義される「アンタゴニスト」は、2つのコグネイトの結合を一部または完全に遮断して、それによりコグネイトの相互作用の下流の生物学的効果を阻害する分子である。例えば、アンタゴニストは、リガンドのその受容体への結合を遮断することが可能であり、次いで、その受容体の活性化を介した細胞内シグナル伝達が抑制および/または防止され、次いで、限定されないが、細胞活性化、増殖、分化、サイトカイン放出、遺伝子のアップレギュレーション、タンパク質の細胞表面発現、などといった、その受容体の活性化の下流の生物学的効果が抑制および/または防止される。

【0012】

受容体を活性化することまたはその活性化は、本明細書において、限定されないが、受容体：リガンド相互作用のような、膜結合性受容体への分子結合に応答した、1以上の細胞内シグナル伝達経路の参画と細胞内シグナル伝達の導入（即ち、シグナル伝達）として定義される。

10

【0013】

本明細書に使用する「シグナル伝達」は、ある物理または化学形態から別のものへの変換によるシグナルのリレーである。細胞生物学においては、細胞が細胞外シグナルを応答へ変換するプロセスのことである。

【0014】

本明細書に提示するアンタゴニストは、可溶性の受容体分子、リガンドおよび/または結合タンパク質を含み、IL-17、IL-17受容体（IL-17R）、IL-18、IL-18受容体（IL-18R）、IL-18結合タンパク質（IL-18BP）、CD30、CD30リガンド（CD30-L）、4-1BB、4-1BBリガンド（4-1BB-L）、OX40、OX40リガンド（OX40-L）およびCD39が含まれる。本明細書に提示するアンタゴニストは、さらに、以下の1以上に対して向けられる抗体、融合タンパク質およびペプチド体（peptidobodies）を含む：IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、CD30、CD30-L、4-1BB、4-1BB-L、OX40および/またはOX40-L。本明細書に提示するアンタゴニストは、さらに、IL-17とIL-17R、IL-18とIL-18R、4-1BBと4-1BB-L、CD30とCD30-Lおよび/またはOX40とOX40-Lの間の相互作用に拮抗する、ペプチド模倣体およびミモトープ、などのような低分子を含む。追加のアンタゴニストは、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、CD30、CD30-L、4-1BB、4-1BB-L、OX40および/またはOX40-LのmRNAに特異的に標的指向してそれへハイブリダイズし、それによってそのそれぞれのタンパク質の遺伝子翻訳を妨げるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。さらなる態様は、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40および/またはOX40-Lのサイレンス発現用に設計したRNA干渉分子による遺伝子沈黙化（silencing）を含む。特別なアンタゴニストのより特定の定義および例は、以下のセクションにおいて提供する。

20

30

【0015】

「ペプチド体」は、Fcドメインと少なくとも1つのペプチドを含んでなる分子を意味する。そうしたペプチド体は、その多量体でも二量体でも断片でもよく、それらは誘導化されてもよい。ペプチド体は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、WO99/25044およびWO00/24782により詳しく記載されている。このペプチドは、IL-17、IL-17受容体（IL-17R）、IL-18、IL-18受容体（IL-18R）、IL-18結合タンパク質（IL-18BP）、CD30、CD30リガンド（CD30-L）、4-1BB、4-1BBリガンド（4-1BB-L）、OX40、OX40リガンド（OX40-L）および/またはCD39のアミノ酸配列に由来してよい。

40

【0016】

本明細書に使用する「ペプチド」は、1～40のアミノ酸の分子を意味する。代替の態様は、5～20のアミノ酸の分子を含む。例示のペプチドは、IL-17、IL-17

50

受容体 (I L - 1 7 R)、I L - 1 8、I L - 1 8 受容体 (I L - 1 8 R)、I L - 1 8 結合タンパク質 (I L - 1 8 B P)、C D 3 0、C D 3 0 リガンド (C D 3 0 - L)、4 - 1 B B、4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B - L)、O X 4 0、O X 4 0 リガンド (O X 4 0 - L) および / または C D 3 9 の天然に存在する分子の細胞外ドメインの部分を含んでも、その無作為化配列を含んでもよい。

【 0 0 1 7 】

ペプチド配列に言及するために使用する用語「無作為化」は、完全にランダムな配列 (例えば、ファージディスプレイ法または R N A - ペプチドスクリーニングにより選択される) と、天然に存在する分子の 1 以上の残基が天然に存在する分子中のその位置に出現しないアミノ酸残基に置き換わっている配列を意味する。ペプチド配列を同定するための例示の方法には、ファージディスプレイ、大腸菌 (E . c o l i) ディスプレイ、リボソームディスプレイ、R N A - ペプチドスクリーニング、化学スクリーニング、などが含まれる。

10

【 0 0 1 8 】

用語「F c ドメイン」には、ネイティブ F c および F c 変異分子と以下に定義するような配列が含まれる。F c 変異体およびネイティブ F c と同様に、用語「F c ドメイン」には、抗体全体より消化されるか、または他の手段により産生される、単量体または多量体の形態の分子が含まれる。

【 0 0 1 9 】

用語「ネイティブ F c」は、抗体全体の消化より生じる非抗原結合断片の配列を含んでなる、単量体または多量体のいずれかの形態の分子または配列を意味する。ネイティブ F c の元の免疫グロブリン源は、好ましくはヒト起源であり、いずれの免疫グロブリンでもよいが、I g G 1 および I g G 2 が好ましい。ネイティブ F c は、単量体のポリペプチドから構成され、それは、共有性 (即ち、ジスルフィド結合) および非共有性の会合により二量体または多量体へ連結可能である。ネイティブ F c 分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス (例、I g G、I g A、I g E) またはサブクラス (例、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g A 1、I g A 2) によって 1 ~ 4 に及ぶ。ネイティブ F c の 1 例は、I g G のパパイン消化より生じるジスルフィド結合性の二量体である (E l l i s o n ら (1 9 8 2) , N u c l e i c A c i d s R e s . 1 0 : 4 0 7 1 - 9 を参照のこと)。本明細書に使用する用語「ネイティブ F c」は、単量体、二量体、および多量体の形態に一般的である。

20

30

【 0 0 2 0 】

用語「F c 変異体」は、ネイティブ F c より修飾されるが、それでもサルベージ受容体、F c R n の結合部位を含む、分子または配列を意味する。国際特許出願 W O 9 7 / 3 4 6 3 1 (1 9 9 7 年 9 月 2 5 日 公 開) および W O 9 6 / 3 2 4 7 8 は、例示の F c 変異体、並びにサルベージ受容体との相互作用について記載し、参照により本明細書にそのまま組み込まれる。このように、用語「F c 変異体」は、非ヒトのネイティブ F c よりヒト化する分子または配列を含む。さらに、ネイティブ F c は、本発明の融合分子には必要とされない構造特性または生物学的活性を提供するので除去してよい部位を含む。このように、用語「F c 変異体」は、(1) ジスルフィド結合形成、(2) 選択宿主細胞との非適合性、(3) 選択宿主細胞における発現時の N 末端不均一性、(4) グリコシル化、(5) 補体との相互作用、(6) サルベージ受容体以外の F c 受容体への結合、(7) 抗体依存性細胞傷害 (A D C C) に影響を及ぼすかまたはそれに関与する 1 以上のネイティブ F c 部位または残基を欠く分子または配列を含む。F c 変異体は以下でより詳細に記述される。

40

【 0 0 2 1 】

「ペプチド模倣体」は、a) 代謝安定性、b) 良好なバイオアベイラビリティ、c) 高い受容体アフィニティーおよび受容体選択性、並びに d) 最小の副作用といった、その原型のネイティブペプチドより好ましい薬理特性を表示するペプチド類似体である。ペプチド模倣体を設計することとそれを産生する方法は当該技術分野で知られている (例えば、

50

U . S . P . N . 6 , 4 0 7 , 0 5 9 および 6 , 4 2 0 , 1 1 8 を参照のこと)。ペプチド模倣体は、I L - 1 7、I L - 1 7 受容体 (I L - 1 7 R)、I L - 1 8、I L - 1 8 受容体 (I L - 1 8 R)、I L - 1 8 結合タンパク質 (I L - 1 8 B P)、C D 3 0、C D 3 0 リガンド (C D 3 0 - L)、4 - 1 B B、4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B - L)、O X 4 0、O X 4 0 リガンド (O X 4 0 - L) および / または C D 3 9 の細胞外ドメインの結合部位より誘導可能である。代わりの態様において、ペプチド模倣体は、I L - 1 7、I L - 1 7 受容体 (I L - 1 7 R)、I L - 1 8、I L - 1 8 受容体 (I L - 1 8 R)、I L - 1 8 結合タンパク質 (I L - 1 8 B P)、C D 3 0、C D 3 0 リガンド (C D 3 0 - L)、4 - 1 B B、4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B - L)、O X 4 0、O X 4 0 リガンド (O X 4 0 - L) および / または C D 3 9 より誘導されるペプチドと同じ三次元構造を有する非ペプチド化合物、または上記に列挙する分子由来のペプチドの一部が同じ三次元構造を有する非ペプチド部分に置き換わっている化合物を含む。

10

【 0 0 2 2 】

「ミモトープ」は、本明細書において、タンパク質上の結合部位を模倣するペプチド配列として定義される (Partidos , C D , ら , Combinatorial Chem & High Throughput Screening , 2 0 0 2 5 : 1 5 - 2 7 を参照のこと)。ミモトープは、タンパク質のコンホメーション依存性結合部位を模倣する能力を有する場合がある。これらミモトープの配列は、連続した線状のネイティブ配列を同定しないし、必ずしも天然に存在するタンパク質に出現しない。ミモトープと産生の方法は、参照によりそのまま組み込まれる、U . S . P . N . 5 , 8 7 7 , 1 5 5 および U . S . P . N . 5 , 9 9 8 , 5 7 7 に教示される。

20

【 0 0 2 3 】

用語「酸性残基」は、酸性基を含んでなる側鎖を有する D 若しくは L 型のアミノ酸残基を意味する。例示の酸性残基には、D および E が含まれる。

用語「アミド残基」は、酸性基のアミド誘導体を含んでなる側鎖を有する D 若しくは L 型のアミノ酸を意味する。例示の残基には、N および Q が含まれる。

【 0 0 2 4 】

用語「芳香族残基」は、芳香族基を含んでなる側鎖を有する D 若しくは L 型のアミノ酸残基を意味する。例示の芳香族残基には、F、Y、および W が含まれる。

用語「塩基性残基」は、塩基性基を含んでなる側鎖を有する D 若しくは L 型のアミノ酸残基を意味する。例示の塩基性残基には、H、K、および R が含まれる。

30

【 0 0 2 5 】

用語「親水性残基」は、極性基を含んでなる側鎖を有する D 若しくは L 型のアミノ酸を意味する。例示の親水性残基には、C、S、T、N、および Q が含まれる。

用語「非機能性残基」は、酸性、塩基性、または芳香族の基を欠く側鎖を有する D 若しくは L 型のアミノ酸残基を意味する。例示の非機能性アミノ酸残基には、M、G、A、V、I、L および ノルロイシン (N l e) が含まれる。

【 0 0 2 6 】

用語「中性疎水性残基」は、塩基性、酸性、または極性の基を欠く側鎖を有する D 若しくは L 型のアミノ酸残基を意味する。例示の中性疎水性アミノ酸残基には、A、V、L、I、P、W、M、および F が含まれる。

40

【 0 0 2 7 】

用語「極性疎水性残基」は、極性基を含んでなる側鎖を有する D 若しくは L 型のアミノ酸残基を意味する。例示の極性疎水性アミノ酸残基には、T、G、S、Y、C、Q、および N が含まれる。

【 0 0 2 8 】

用語「疎水性残基」は、塩基性または酸性の基を欠く側鎖を有する D 若しくは L 型のアミノ酸残基を意味する。例示の疎水性アミノ酸残基には、A、V、L、I、P、W、M、F、T、G、S、Y、C、Q、および N が含まれる。

【 0 0 2 9 】

50

本明細書において使用する用語「被検者」は、哺乳動物を意味する。例えば、本発明により考慮される哺乳動物には、ヒト；霊長動物；イヌ、ネコ、などのようなあらゆる種類のペット；ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタ、ウマ、などのような家畜動物；マウス、ラット、ウサギ、モルモット、などのような一般実験動物；並びに、動物園にいるような捕囚動物、または自由な野生動物が含まれる。本明細書全体で、用語「宿主」は、被検者と交換可能に使用する。

【0030】

本明細書に使用するように、単数形（「a」、「an」、および「the」）には、文脈が明らかに別のことを指定する以外は、複数の指示物が含まれる。したがって、例えば、「免疫化（an immunization）」への言及には複数のそうした免疫化が含まれ、「細胞（the cell）」への言及には1以上の細胞と当業者に知られているその同等物への言及が含まれる、といった具合である。本明細書に使用するすべての技術および科学用語は、明らかに他に指定しなければ、本発明が属する技術分野の当業者が普通に理解するのと同じ意味を有する。

【0031】

本発明の様々な態様は、記載される特別な方法論、プロトコル、細胞系、動物の種または属、構築体、および試薬に限定されず、それは変動する場合があると理解される。また、本明細書に使用する用語は特別な態様を記載する目的のためだけのものであり、付帯の特許請求項によってのみ限定される、本発明の範囲を限定することを企図していないと理解される。

【0032】

I . IL - 17、IL - 18、4 - 1BB、CD30およびOX40アンタゴニスト
A . IL - 17アンタゴニスト

本発明の態様は、IL - 17アンタゴニストを含んでなる、心臓血管疾患の治療用の組成物および方法を提供する。本明細書に提示する試験は、心臓血管疾患の様々な形態および重症度を有するヒト患者においてIL - 17とIL - 18が上昇していることを証明する。これらの試験は、IL - 17および/またはIL - 18の循環レベルが心臓血管疾患の重症度と相関することを証明する。さらに、IL - 17および/またはIL - 18の血漿レベルは、心臓ミオシン誘発性心筋炎モデルにおいて上昇していて、疾患重症度と相関する。故に、IL - 17および/またはIL - 18は心臓血管疾患に関連があり、IL - 17および/またはIL - 18アンタゴニストを単独または組み合わせて投与することによって心臓血管疾患を治療することへの合理的根拠を提供する。さらに、IL - 17および/またはIL - 18は、心臓血管疾患および疾患重症度の予後指標である。IL - 17および/またはIL - 18はまた、ドナー適合および移植後アウトカムの予後指標である。故に、本発明のさらなる態様には、心臓血管疾患、心臓血管疾患重症度、ドナー適合および移植後アウトカムをスクリーニングする被検者中のIL - 17および/またはIL - 18レベルを測定するためのアッセイが含まれる。

【0033】

IL - 17アンタゴニストは、本明細書において、IL - 17とIL - 17受容体の相互作用を一部または完全に遮断すること、そしてそれにより膜結合性IL - 17受容体を介したIL - 17仲介性シグナル伝達を阻害することによって、並びにIL - 17を活性化する後続の生物学的効果を一部または完全に阻害することによって、被検者中の内因性IL - 17の有効量を低下させることが可能である実体として定義される。IL - 17アンタゴニストは、IL - 17へ結合しても、IL - 17受容体へ結合してもよい。

【0034】

こうしたIL - 17アンタゴニストには、限定されないが、IL - 17受容体の可溶型；IL - 17へ特異的に結合してIL - 17のIL - 17受容体への結合を一部または完全に阻害する、IL - 17に対して向けられる抗体；IL - 17受容体へ特異的に結合してそれ自身はIL - 17受容体を活性化せずにIL - 17の結合を阻害する、IL - 17受容体に対して向けられる抗体、融合タンパク質および/またはペプチド体；IL - 17

10

20

30

40

50

またはIL-17受容体へ結合してその相互作用を阻害する、IL-17および/またはIL-17受容体ペプチド模倣体および/またはミモトープのような分子が含まれる。本明細書に使用するように、IL-17またはIL-17受容体に基づいてIL-17アンタゴニストを作製することへ言及するときには、用語IL-17およびIL-17受容体には、以下に詳しく記載するように、その断片、変異体、ムテイン、誘導体および融合タンパク質も含まれると理解される。

【0035】

IL-17およびIL-17Rの生物学的活性は、本明細書において、IL-17のIL-17Rへの結合とIL-17Rの活性化；好炎症効果；限定されないが、IL-6、IL-8、G-CSF、GM-CSF、MCP-1、Gro、PGE2のようなサイトカインおよびケモカインの増加産生、並びに副刺激分子ICAMの誘導を含んでなると定義される。IL-17：IL-17R相互作用はまた、単球および好中球を動員すること；iNOS、NOおよびCOX-2のアップレギュレーション；全3つのサブクラスのMAPK（p44およびp42細胞外シグナル調節性キナーゼ、ERK1およびERK2）、NF- κ B、ストレス誘発性Jun-NH2末端キナーゼ（JNK1およびJNK2）およびp38の活性化という生物学的活性を有する。当然ながら、そうした生物学的活性に達する中間経路もIL-17およびIL-17Rの生物学的活性の定義に含まれると理解される。

【0036】

IL-17アンタゴニストは、IL-17受容体のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド配列、並びにその断片、変異体、ムテイン、誘導体および融合タンパク質を含んでも、それより開発してもよい。ヒトIL-17受容体（交換可能的にIL-17RまたはhuIL-17Rと呼ばれる）の単離、クローニング、調製および特性決定は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、U.S.P.N.5,869,286およびU.S.P.N.6,072,033に記載されている。ヒトIL-17Rの全長cDNA配列を配列番号3に提供し、対応するアミノ酸配列を配列番号4に提供する。

【0037】

ヒトIL-17受容体は、予測切断部位がアミノ酸27と28の間にあるN末端シグナルペプチドを有する。このシグナルペプチドに293アミノ酸の細胞外ドメイン、21アミノ酸の膜貫通ドメイン、および525アミノ酸の細胞質テールが続く。可溶性ポリペプチドは、発現される細胞より分泌されることが可能であるポリペプチドである。分泌される可溶性ポリペプチドは、望ましいポリペプチドを発現するインタクト細胞を、例えば遠心分離により培養基より分離して、その培地（上清）について望ましいポリペプチドの存在をアッセイすることによって同定可能である（および、その非可溶性の膜結合性対照物から識別可能である）。望ましいポリペプチドが培地中に存在すれば、このポリペプチドが細胞から分泌され、したがってこのポリペプチドの可溶型であることが示される。IL-17受容体の可溶型の使用は、多くの応用に有利である。可溶性ポリペプチドが細胞から分泌されるので、このポリペプチドの組換え宿主細胞からの精製が促進される。さらに、可溶性ポリペプチドは、非経口投与や多くの酵素法のために膜結合型より概して適している。心臓血管疾患を治療する方法に有用であるIL-17Rの可溶型には、IL-17の内因性IL-17Rへの結合に拮抗するかまたはそれを防止する特性を有する細胞外ドメイン（配列番号4の残基1～320またはシグナルペプチドを除く残基28～320）またはその細胞外ドメインの断片が含まれる。可溶性IL-17Rには、膜貫通領域の一部が含まれるポリペプチドも含まれるが、但し、この可溶性IL-17Rが、細胞から分泌されることが可能であり、好ましくは、IL-17へ結合してその生物学的効果を発揮させる能力を保持することが条件である。

【0038】

本発明に有用であるIL-17の他の型には、配列番号4のネイティブIL-17Rに実質的に相同であり、米国特許第6,072,033号に記載のように、IL-17Rの生物学的活性を保持する、天然に存在する変異体のようなムテインおよび変異体（類似体

10

20

30

40

50

とも呼ばれる)が含まれる。

【0039】

さらに本発明には、IL-17Rポリヌクレオチド配列より誘導されるIL-17アンタゴニストが含まれる。本発明の態様には、可溶性IL-17Rをコードする全長核酸分子、並びに配列番号3のヌクレオチド配列より誘導される単離断片およびオリゴヌクレオチドが含まれる。こうした核酸配列には、配列番号3のヌクレオチド178~1494またはその断片、そして配列番号3のヌクレオチド配列のコード領域へ中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズして、本発明のポリペプチドまたはその断片をコードするDNAおよび/またはRNA配列、またはその相補体を含めてよい。

【0040】

他の態様において、IL-17アンタゴニストは、IL-17ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの配列を含んでも、それより開発してもよい。ヒトIL-17の全長cDNA配列を配列番号1に提供し、対応するアミノ酸配列を配列番号2に提供する。市販の組換えヒトIL-17も、例えばR&Dシステムズ(ミネソタ州ミネアポリス)より入手可能である。IL-17ポリペプチド、並びに生物学的に活性なその断片または誘導体は、IL-17へ特異的に結合して、IL-17のIL-17受容体への結合を一部または完全に遮断する能力を有する抗体を産生するために使用可能である。

【0041】

さらなる態様において、IL-17アンタゴニストは、限定されないが、IL-17(配列番号2)および/またはIL-17R(配列番号4)のポリペプチド配列より開発されるペプチド模倣体、ペプチド体および/またはミモトープのような低分子およびポリペプチド模倣体である。ペプチド模倣体およびミモトープのようなポリペプチド模倣体は、コンビナトリアルペプチドライブラリーのような、当該技術分野で知られた技術を介して開発可能である。

【0042】

IL-17のアミノ酸配列に基づいたIL-17ポリペプチド模倣体は、IL-17Rを活性化せずにIL-17Rへ結合して、内因性IL-17の結合を立体的に妨害するだろう。逆に、IL-17Rのアミノ酸配列に基づいたIL-17Rポリペプチド模倣体は、IL-17へ結合して、IL-17が内因性IL-17Rへ結合することを立体的に妨害するだろう。IL-17ペプチド模倣体は、被検者においてIL-17に拮抗して、それによってIL-17の好炎症効果を抑えるために使用可能である。IL-17ポリペプチド模倣体は、そのものとして、心臓血管疾患に関連した炎症および/または免疫調節プロセスを治療するために使用可能である。

【0043】

本発明に有用であるIL-17の他の型には、配列番号2のネイティブIL-17に実質的に相同であり、IL-17の生物学的活性を保持する、天然に存在する変異体のような、ムテインおよび変異体(類似体とも呼ばれる)が含まれる。例えば、IL-17相同体B、C、D、EおよびFである。本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造におけるIL-17アンタゴニストの使用を追加的に提供する。本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造における、IL-17アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドの使用をさらに提供する。

【0044】

B. IL-18アンタゴニスト

本発明の態様は、IL-18アンタゴニストを含んでなる、心臓血管疾患の治療用の組成物および方法を提供する。IL-18アンタゴニストは、本明細書において、IL-18とIL-18受容体の相互作用を一部または完全に遮断すること、そしてそれにより膜結合性IL-18受容体を介したIL-18仲介性シグナル伝達を阻害することによって、並びにIL-18を活性化した後続の生物学的効果を一部または完全に阻害することによって、内因性IL-18の有効量を低下させることが可能である実体として定義される。IL-18アンタゴニストは、IL-18へ結合しても、IL-18受容体へ結合して

10

20

30

40

50

もよい。IL-18RおよびIL-18結合タンパク質より誘導されるアンタゴニスト（例えば、IL-18へ結合する可溶型）は、細胞表面でIL-18RとIL-18について競合し、それによりIL-18が細胞へ結合することを阻害し、それによってIL-18がその生物学的活性を発現することを妨げる。

【0045】

IL-18：IL-18Rの生物学的活性は、本明細書において、限定されないが、IL-18のIL-18Rへの結合とIL-18Rの活性化；先天性および後天性免疫応答の調節；好炎症効果；Tリンパ球ヘルパー細胞の1型応答（Th1）の誘導；細胞仲介性の細胞傷害の亢進；IFN-誘導；GM-CSFおよびIL-2の亢進産生；抗CD3誘発性T細胞増殖の増強；ナチュラルキラー細胞（NK細胞）およびCD4+Th1細胞によるFas仲介性殺傷の増加；Fas-FasL経路を介したアポトーシス死の増加；FasL発現のアップレギュレーション；T細胞およびNK細胞におけるTリンパ球ヘルパー細胞2型応答（Th2）の誘導；好塩基球および肥満細胞の刺激によるTh2サイトカインおよびヒスタミンの産生；IGE産生の誘導が含まれると定義される。

10

【0046】

こうしたIL-18アンタゴニストには、限定されないが、IL-18Rの可溶型；IL-18結合タンパク質；IL-18へ特異的に結合してIL-18のIL-18Rへの結合を一部または完全に阻害する、IL-18に対して向けられる抗体；IL-18Rへ特異的に結合してそれ自身はIL-18Rを介したシグナルを伝達せずにIL-18の受容体結合を阻害する、IL-18Rに対して向けられる抗体、融合タンパク質および/またはペプチド体；IL-18またはIL-18Rへ結合してその相互作用を阻害する、IL-18および/またはIL-18Rペプチド模倣体および/またはミモトープのような低分子が含まれる。本明細書に使用するように、IL-18、IL-18結合タンパク質またはIL-18受容体に基づいてIL-18アンタゴニストを作製することへ言及するときには、用語IL-18、IL-18結合タンパク質およびIL-18受容体には、以下に詳しく記載するように、その断片、変異体、ムテイン、誘導体および融合タンパク質も含まれると理解される。

20

【0047】

ヒトIL-18受容体（交換可能的にIL-18RまたはhuIL-18Rと呼ばれる）の単離、クローニング、調製および特性決定は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、U.S.P.N. 6,087,116および米国特許出願番号09/621,502（PCT公開公報WO99/37772）に記載されている。IL-18受容体は、IL-1Rrp1と呼ばれるIL-18結合サブユニットとAcPLと呼ばれる補助サブユニットを含有するヘテロ二量体タンパク質である。IL-1Rrp1サブユニットは、単独でIL-18へ結合するが、IL-18へのそのアフィニティーは、AcPLサブユニットとのヘテロ二量体複合体において存在するときに劇的に増加する。

30

【0048】

IL-1Rrp1ポリヌクレオチド配列とそれがコードする対応のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号5と配列番号6として提供する。IL-18へ結合する、IL-1Rrp1サブユニットの可溶性細胞外部分は、配列番号6のアミノ酸20～329により表され、シグナル配列の切断は、配列番号6のアミノ酸残基19の直後で起こる。しかしながら、配列番号6のアミノ酸残基20～123とアミノ酸残基20～226と同じほど小さな断片も、IL-18へ結合することが報告されていて、それも使用可能である。IL-1Rrp1ポリペプチドはまた、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、米国特許番号5,776,731に記載されている。

40

【0049】

AcPLポリヌクレオチド配列とそれがコードするアミノ酸配列を本明細書においてそれぞれ配列番号7と配列番号8として提供する。AcPLの成熟した細胞外ドメインは配列番号8のアミノ酸15～356からなり、シグナル配列の切断は、配列番号8のアミノ酸残基14の直後で起こる。AcPLポリペプチドとその可溶性細胞外断片も、参照によ

50

り本明細書にそのまま組み込まれる、米国特許出願番号 09 / 621 , 502 (P C T 公開公報 W O 99 / 37772) に記載されている。

【 0050 】

本発明の方法に使用の I L - 18 受容体の可溶型の 1 つの態様は、配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 329 配列を含み、I L - 18 受容体の可溶型の代わりの態様は、配列番号 6 のシグナル配列の切断後のアミノ酸 20 ~ 329 を含む。I L - 18 受容体の可溶型のさらなる態様は、配列番号 6 の少なくともアミノ酸残基 20 ~ 123、20 ~ 226 または 20 ~ 329 (I L - 1 R r p 1 サブユニット) と配列番号 8 の少なくともアミノ酸 15 ~ 340 (A c P L サブユニット) が共有性または非共有性の会合において含まれるヘテロ二量体受容体である。

10

【 0051 】

追加の I L - 18 アンタゴニストは、I L - 18 結合タンパク質を含む。P C T 公開公報 W O 99 / 09063 は、I L - 18 結合タンパク質について記載し、その有用な可溶性断片が含まれる。ヒト I L - 18 結合タンパク質の 1 つの態様は、配列番号 9 のポリヌクレオチド配列と配列番号 10 の対応するアミノ酸配列を有する「a」アイソフォームである。当然ながら、b、c および d アイソフォームのような、I L - 18 の I L - 18 R への結合に拮抗的である他の I L - 18 結合タンパク質のアイソフォームも使用可能である。b、c および d アイソフォームのポリヌクレオチドおよびアミノ酸配列は当該技術分野で知られていて、容易に利用可能である (例えば、K i m , S . H . ら , P N A S 97 : 3 1190 - 1195 (2000) を参照のこと)。I L - 18 結合タンパク質の特別に有用な型は、抗体の F c ドメインとの融合物である。本明細書において I L - 18 B P - F c と呼ぶ、そのような融合タンパク質の例のアミノ酸配列を配列番号 11 に提示する。この 422 アミノ酸のタンパク質は、哺乳動物細胞において発現されるときに分泌されるが、このタンパク質の成熟した分泌型は、アミノ残基 29 ~ 422 を含有する。これら残基のうち、アミノ酸残基 29 ~ 192 はこの分子の I L - 18 結合タンパク質部分を表し、アミノ酸残基 193 ~ 422 はこの分子の F c 部分を表す。F c 領域により、この融合ポリペプチドの精製および二量体化が促進される。

20

【 0052 】

I L - 18 アンタゴニストはまた、I L - 18 ポリヌクレオチドおよび / またはポリペプチドの配列を含んでも、それより開発してもよい。ヒト I L - 18 は、米国特許第 5 , 891 , 663 号に記載のようにクローニングされた c D N A より、そして米国特許第 6 , 060 , 283 号に開示されるようにクローニングされたゲノム D N A より組換え的に産生し、これらは参照により本明細書にそのまま組み込まれる。全長 c D N A 配列を配列番号 12 に提供し、対応するアミノ酸配列を配列番号 13 に提供する。I C E プロセス処理したヒト I L - 18 のアミノ酸配列を配列番号 14 に提供する。市販の組換えヒト I L - 18 も、例えば R & D システムズ (ミネソタ州ミネアポリス) より入手可能である。I L - 18 ポリペプチド、並びに生物学的に活性なその断片または誘導体は、I L - 18 へ特異的に結合して、I L - 18 の I L - 18 受容体への結合を一部または完全に遮断する能力を有する抗体を産生するために使用可能である。

30

【 0053 】

1 つの態様において、I L - 18 アンタゴニストは、限定されないが、I L - 18 のポリペプチド配列 (配列番号 13 および / または 14) より開発されるペプチド模倣体、ペプチド体および / またはミモトープのようなポリペプチド模倣体である。ポリペプチド模倣体は、コンビナトリアルペプチドライブラリーのような、当該技術分野で知られた技術を介して開発可能である。ポリペプチド模倣体は、タンパク質の二次構造の要素を模倣するペプチド含有分子である。I L - 18 のアミノ酸配列に基づいた I L - 18 ポリペプチド模倣体は、I L - 18 受容体を活性化せずに I L - 18 受容体へ結合して、内因性 I L - 18 の結合を立体的に妨害するだろう。I L - 18 ペプチド模倣体は、被検者において I L - 18 に拮抗して、それによって I L - 18 の好炎症効果を抑えるために使用可能である。I L - 18 ポリペプチド模倣体は、そのものとして、心臓血管疾患に関連した炎症

40

50

および/または免疫調節プロセスを治療するために使用可能である。

【0054】

IL-18アンタゴニストとして使用可能であるIL-18、IL-18受容体およびIL-18結合タンパク質の他の態様には、配列番号13および/または14のネイティブIL-18、配列番号6および8のIL-18受容体、および配列番号10のIL-18結合タンパク質に実質的に相同であり、生物学的活性を保持する、天然に存在する変異体のような、ムテインおよび変異体(以下により詳しく記載する)が含まれる。生物学的活性は、この事例において、そのコグネイトパートナーへ結合する能力のことである。

【0055】

本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造におけるIL-18アンタゴニストの使用を追加的に提供する。本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造における、IL-18アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドの使用をさらに提供する。

【0056】

C-4-1BBアンタゴニスト

本発明のさらなる態様は、4-1BBアンタゴニストを含んでなる、心臓血管疾患の治療用の組成物および方法を提供する。

【0057】

実施例7および8は、Adriamycin(登録商標)誘発性心筋症における4-1BB/4-1BBL免疫副刺激経路の役割を証明する、並びに4-1BBの新規な心臓発現パターンを証明して、Adriamycin(登録商標)誘発性心筋症に対する副刺激貢献の機序としてアポトーシスを示唆する試験について記載する。より具体的に言うと、4-1BB欠損マウスと4-1BBLデコイ受容体処置マウスでは、アドリアマイシン誘発性心臓損傷に対する部分的な抵抗性が得られたが、4-1BB活性化抗体は損傷の発症を加速して、心臓におけるAdriamycin(登録商標)効果に対する4-1BBの貢献を示唆した。TUNEL、sub-G1 DNAおよび活性化カスパーゼ-3を尺度とするアポトーシスは、Adriamycin(登録商標)処置野生型心筋において増加したが、4-1BBL-/-では減少した。Aktのリン酸化は、Adriamycin(登録商標)により選択的に抑制されたが、4-1BBLの欠失により維持されて、心臓中の副刺激経路によるアポトーシスの変調がおそらくはAktを介して、Jnkおよびp38のシグナル伝達を介さないことを示唆した。4-1BBL-/-におけるアポトーシス指標の一貫した減少と心機能の改善は、Adriamycin(登録商標)誘発性の心不全にアポトーシスが不可欠な役割を担うことを示唆する。

【0058】

アドリアマイシン(22.5mg/kg)の単回後眼窩(RO)注射は、炎症性浸潤の証拠がない進行性心不全をもたらす。この非炎症性の薬物誘発性心筋症モデルにおいて、4-1BBL-/-マウスは、超音波心臓動態検査法によると実質的に改善した心機能を有する。さらに、4-1BB(M6)に対する作動性抗体が心機能不全を加速して増悪させるのに対し、m4-1BBFc(4-1BBLの可溶性デコイ受容体)は、ADR-心機能不全を抑制した。このAdr-心筋症には炎症性浸潤液を観察しないものの、我々は、Adr投与から2日以内に4-1BBの発現が心臓間質細胞の1~5%に誘導されることを見出した。TUNELおよびsub-G1 DNAを尺度とする心臓のアポトーシスは、ADR(45mg/kg)投与から3日間増加し、4-1BBの間質細胞上での発現の増加に一致していた。Adrチャレンジから5週間後(このとき、心機能不全は、野生型で最大であるが、4-1BBL-/-マウスにはほとんど存在していない)に判定した、慢性の進行性アポトーシスは、WTマウス(ベースラインに対して4倍)に比較して、4-1BBL-/-マウス(ベースラインに対して1.5倍)においてより低かった。別の試験において、ウェスタンブロットにより判定するカスパーゼ3活性化は、ADR(45mg/kg)投与後48~72時間で増加した。対照的に、4-1BBL-/-心筋においては、ADRがカスパーゼ3の切断を誘導しなかった。ウェスタンブロットにより判定すると、アドリアマイシンは、野生型においてAktのリン酸化を抑えたが、4-1

B B L - / - の心臓では抑えなかった。J N Kおよび p 3 8 のリン酸化は、A d r により影響を受けなかった。要約すると、4 - 1 B B / 4 - 1 B B L 免疫副刺激経路は、おそらくはアポトーシスを心臓において調節する A k t シグナル伝達の変調を介して、A D R 誘発性心筋症に貢献する。

【 0 0 5 9 】

4 - 1 B B アンタゴニストは、本明細書において、4 - 1 B B と 4 - 1 B B - L の相互作用を一部または完全に遮断すること、そしてそれにより 4 - 1 B B - L を介した 4 - 1 B B 仲介性シグナル伝達と 4 - 1 B B を介した 4 - 1 B B - L 仲介性シグナル伝達、並びに 4 - 1 B B および / または 4 - 1 B B - L を活性化する後続の生物学的効果を阻害することによって、利用可能な内因性 4 - 1 B B および / または 4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B - L) の有効量を低下させることが可能である実体として定義される。換言すると、4 - 1 B B : 4 - 1 B B - L 相互作用は双方向のシグナル伝達を明示するので、4 - 1 B B アンタゴニストは、そのアンタゴニストがそれ自身で 4 - 1 B B と 4 - 1 B B - L を活性化しない限りにおいて、4 - 1 B B または 4 - 1 B B - L のいずれに結合してもよい。こうした 4 - 1 B B アンタゴニストには、限定されないが、4 - 1 B B の可溶型 ; 4 - 1 B B へ特異的に結合して 4 - 1 B B の 4 - 1 B B - L への結合を一部または完全に阻害する、4 - 1 B B に対して向けられる抗体、融合タンパク質および / またはペプチド体 ; 4 - 1 B B へ特異的に結合してそれ自身は 4 - 1 B B を介したシグナルを伝達せずに 4 - 1 B B - L の結合を阻害する、4 - 1 B B に対して向けられる抗体、融合タンパク質および / またはペプチド体 ; 4 - 1 B B または 4 - 1 B B - L へ結合してその相互作用を阻害する、4 - 1 B B および / または 4 - 1 B B - L 低分子、ペプチド模倣体および / またはミモトープのような分子、および / または、4 - 1 B B または 4 - 1 B B - L の全部または部分を含んでなるポリペプチドまたはその修飾変異体が含まれ、遺伝子修飾ムテイン、その多重体型および持続放出製剤も含まれる。

【 0 0 6 0 】

4 - 1 B B : 4 - 1 B B - L の生物学的活性は、本明細書において、限定されないが、4 - 1 B B - L の 4 - 1 B B への結合と 4 - 1 B B および 4 - 1 B B - L の一方または両方の活性化 ; T リンパ球に対する副刺激活性 ; C D 4 + および C D 8 + 細胞の活性化および分化 ; T R A F 経路 (T R A F 1 、 T R A F 2 および T R A F 3) を介したシグナル伝達と N F B および A P - 1 の活性化 ; 活性化誘導性細胞死の阻害 ; B 細胞増殖および単球活性化の促進 ; 限定されないが、I L - 6 、 I L - 8 および T N F - α が含まれるサイトカインのアップレギュレーション ; I C A M のような接着分子のアップレギュレーション ; F c γ R I I I のダウンレギュレーション ; 単球における M - C S F の産生 ; 単球増殖 ; および、抗 C D 3 抗体により誘導される T 細胞増殖の阻害が含まれると定義される。

【 0 0 6 1 】

4 - 1 B B アンタゴニストは、4 - 1 B B - L のポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列を含んでも、それより開発してもよい。ヒト 4 - 1 B B - L (交換可能的に h u 4 - 1 B B - L と呼ばれる) の単離、クローニング、調製および特性決定は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、U . S . P . N . 5 , 6 7 4 , 7 0 4 に記載されている。4 - 1 B B - L は、4 - 1 B B へ結合することが可能である哺乳動物のポリペプチドの種属 (g e n u s) を意味する。4 - 1 B B - L は、I I 型細胞外膜ポリペプチドであり、このポリペプチドの N 末端に細胞内 (細胞質) ドメイン (配列番号 1 5 のアミノ酸 1 ~ 2 5) を有し、膜貫通領域ポリペプチド (配列番号 1 5 のアミノ酸 2 6 ~ 4 8) とこのポリペプチドの C 末端にある細胞外 (受容体結合性) ドメイン (配列番号 1 5 のアミノ酸 4 9 ~ 2 5 4) がそれに続く。可溶性 4 - 1 B B - L ポリペプチドは、以下に記載のように、細胞外ドメインより誘導可能である。ヒト 4 - 1 B B - L の全長 c D N A 配列を配列番号 1 4 に提供し、対応するアミノ酸配列を配列番号 1 5 に提供する。ヒト 4 - 1 B B - L タンパク質は、細胞質ドメイン (配列番号 1 5 のアミノ酸 1 ~ 2 5) 、膜貫通ドメイン (アミノ酸 2 6 ~ 4 8) 、および細胞外ドメイン (アミノ酸 4 9 ~ 2 5 4) を含む。

【 0 0 6 2 】

さらに、4 - 1 B B アンタゴニストは、4 - 1 B B のポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列を含んでも、それより開発してもよい。ヒト 4 - 1 B B c D N A のポリヌクレオチド配列とそれによりコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 1 7 と配列番号 1 8 に提示する。ヒト 4 - 1 B B タンパク質は、N 末端シグナル配列（配列番号 1 8 のアミノ酸 - 2 3 ~ - 1 ）、アミノ酸 1 ~ 1 6 3 を含んでなる細胞外ドメイン、アミノ酸 1 6 4 ~ 1 9 0 を含んでなる膜貫通領域、およびアミノ酸 1 9 1 ~ 2 3 2 を含んでなる細胞質ドメインを含む。

【0063】

4 - 1 B B - L および 4 - 1 B B タンパク質の可溶型を本明細書に提供する。可溶性 4 - 1 B B - L または 4 - 1 B B ポリペプチドは、細胞外ドメインの全部または一部を含むが、該ポリペプチドの細胞膜上での保持を引き起こす可能性がある膜貫通領域を欠く。4 - 1 B B - L タンパク質がシグナルペプチドを欠くので、その分泌を促進するために可溶性 4 - 1 B B - L ポリペプチドの N 末端へ異種シグナルペプチドを融合してよい。シグナルペプチドは、宿主細胞からの分泌時に該タンパク質より切断される。可溶性 4 - 1 B B - L ポリペプチドには、4 - 1 B B へ結合する能力を保持する、細胞外ドメインの先端切断ポリペプチドのような断片が含まれ、可溶性 4 - 1 B B ポリペプチドには、4 - 1 B B - L へ結合する能力を保持する、4 - 1 B B の細胞外ドメインの先端切断ポリペプチドのような断片が含まれる。代替の態様において、可溶性タンパク質には、膜貫通領域の一部も、細胞質ドメインの一部も含めてよいが、但し、該タンパク質が細胞表面に保持されるのではなく、分泌されることが可能であることが条件である。可溶性ポリペプチドの例には、細胞外ドメイン全体を含んでなるものが含まれる。特定の例には、限定されないが、配列番号 1 6 のアミノ酸 4 9 ~ 2 5 4 を含んでなる可溶性のヒト 4 - 1 B B - L ポリペプチドと配列番号 1 8 のアミノ酸 1 ~ 1 6 3 を含んでなる可溶性のヒト 4 - 1 B B ポリペプチドが含まれる。

【0064】

1 つの態様において、4 - 1 B B アンタゴニストは、限定されないが、4 - 1 B B - L（配列番号 1 6）および 4 - 1 B B（配列番号 1 8）のポリペプチド配列より開発されるペプチド模倣体、ペプチド体および / またはミモトープのようなポリペプチド模倣体である。ポリペプチド模倣体は、コンビナトリアルペプチドライブラリーのような、当該技術分野で知られた技術を介して開発可能である。ポリペプチド模倣体は、タンパク質の二次構造の要素を模倣するペプチド含有分子である。4 - 1 B B のアミノ酸配列に基づいた 4 - 1 B B ポリペプチド模倣体は、4 - 1 B B - L を活性化せずに 4 - 1 B B - L へ結合して、内因性 4 - 1 B B の結合を立体的に妨害するだろう。同様に、4 - 1 B B - L のアミノ酸配列に基づいた 4 - 1 B B - L ポリペプチド模倣体は、4 - 1 B B を活性化せずに 4 - 1 B B へ結合して、内因性 4 - 1 B B - L の結合を立体的に妨害するだろう。4 - 1 B B および 4 - 1 B B - L ペプチド模倣体は、被検者においてそのそれぞれのコグネイトに拮抗して、それによって 4 - 1 B B / 4 - 1 B B - L 相互作用の好炎症効果を抑えるために使用可能である。ポリペプチド模倣体の形態の 4 - 1 B B アンタゴニストは、そのものとして、心臓血管疾患に関連した炎症および / または免疫調節プロセスを治療するために使用可能である。

【0065】

4 - 1 B B アンタゴニストとして使用可能である 4 - 1 B B および 4 - 1 B B - L の他の態様には、ネイティブ 4 - 1 B B - L（配列番号 1 6）および 4 - 1 B B（配列番号 1 8）のポリペプチド配列に実質的に相同であり、生物学的活性を保持する、天然に存在する変異体のような、ムテインおよび変異体（以下により詳しく記載するような）が含まれる。生物学的活性は、この事例において、そのコグネイトパートナーへ結合する能力である。

【0066】

本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造における 4 - 1 B B アンタゴニストの使用を追加的に提供する。本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造における、4 - 1

10

20

30

40

50

B B アнтаゴニストをコードするポリヌクレオチドの使用をさらに提供する。

【0067】

D . C D 3 0 アнтаゴニスト

本発明のさらなる態様は、1以上のC D 3 0 アнтаゴニストを含んでなる、心臓血管疾患の治療用の組成物および方法を提供する。C D 3 0 アнтаゴニストは、本明細書において、C D 3 0 - L とC D 3 0 の相互作用を一部または完全に遮断すること、そしてそれにより膜結合性C D 3 0 を介したC D 3 0 仲介性シグナル伝達を阻害することによって、並びにC D 3 0 を活性化する後続の生物学的活性を一部または完全に阻害することによって、内因性C D 3 0 リガンド (C D 3 0 - L) の有効量を低下させることが可能である実体として定義される。C D 3 0 アнтаゴニストは、C D 3 0 - L またはC D 3 0 のいずれへ結合してもよい。

10

【0068】

C D 3 0 : C D 3 0 - L の生物学的活性には、本明細書において、限定されないが、C D 3 0 - L のC D 3 0 への結合とC D 3 0 の活性化 ; N F B の細胞内活性化、サイトカイン放出および / またはC D 3 0 + 細胞の増殖 ; 抗C D 3 副刺激の存在下でのT細胞の増殖が含まれる。

【0069】

こうしたC D 3 0 アнтаゴニストには、限定されないが、C D 3 0 - L およびC D 3 0 の可溶型 ; C D 3 0 へ結合して膜結合性C D 3 0 を活性化せずにC D 3 0 - L の結合を阻害するC D 3 0 - L の断片 ; C D 3 0 - L へ結合してC D 3 0 - L のC D 3 0 への結合を阻害するC D 3 0 の断片 ; C D 3 0 - L へ特異的に結合してC D 3 0 - L のC D 3 0 への結合を一部または完全に阻害する、C D 3 0 - L に対して向けられる抗体、融合タンパク質および / またはペプチド体 ; C D 3 0 へ特異的に結合してそれ自身はC D 3 0 を活性化せずにC D 3 0 - L の結合を阻害する、C D 3 0 に対して向けられる抗体、融合タンパク質および / またはペプチド体 ; C D 3 0 - L またはC D 3 0 へ結合してその相互作用を阻害する、C D 3 0 - L および / またはC D 3 0 ペプチド模倣体および / またはミモトープのような低分子が含まれる。本明細書に使用するように、C D 3 0 - L またはC D 3 0 に基づいてC D 3 0 アнтаゴニストへ言及するときには、用語C D 3 0 - L およびC D 3 0 には、以下に詳しく記載するように、その断片、変異体、ムテイン、誘導体および融合タンパク質も含まれると理解される。

20

30

【0070】

C D 3 0 アнтаゴニストは、C D 3 0 - L のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列を含んでも、それより開発してもよい。ヒトC D 3 0 - L の単離、クローニング、調製および特性決定は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、U . S . P . N . 5 , 4 8 0 , 9 8 1 に記載されている。上述のように、本発明の態様には、C D 3 0 アнтаゴニストとしての抗C D 3 0 - L 抗体が含まれる。心臓血管疾患を治療するために使用可能である、C D 3 0 - L に対して向けられる抗体の例は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、U . S . P . N . 5 , 6 7 7 , 4 3 0 に記載されている。

【0071】

本明細書に使用する用語「C D 3 0 - L 」は、C D 3 0 へ結合することが可能であるポリペプチドの属を意味する。本明細書に使用する、用語「C D 3 0 - L 」には、膜結合型タンパク質 (細胞質ドメイン、膜貫通領域、および細胞外ドメインを含んでなる) 、並びにC D 3 0 結合特性を保持する先端切断タンパク質が含まれる。こうした先端切断タンパク質には、例えば、細胞外 (受容体結合) ドメインだけを含んでなる可溶性C D 3 0 - L が含まれる。C D 3 0 - L は、単球 / マクロファージ、顆粒球、B細胞のサブセット上と、活性化されているが休止していないT細胞上で発現される。細胞表面のC D 3 0 と結合することによって、C D 3 0 - L は、マウスのB細胞分化を誘導して、抗C D 3 副刺激の存在下に活性化T細胞の増殖を誘導することができる (例えば、Smithら, Cell 73 : 1349 - 1360 (1993) を参照のこと) 。さらに、C D 3 0 - L は、「逆シグナル伝達」を明示する、即ち、好中球および末梢血T細胞上で発現される細胞表面

40

50

CD30-Lは、架橋連結によって活性化されて、これらの細胞における代謝活性を刺激することができる(Wileyら, J Immunol 157:3235-39(1996))。

【0072】

本発明のCD30-Lタンパク質には、限定されないが、配列番号20のアミノ酸1~215または配列番号22のアミノ酸1~234を含んでなるヒトCD30-L;および、上記配列のN末端、C末端、または内部の先端切断型を含むが、望ましい生物学的活性を保持するタンパク質が含まれる。例には、配列番号22のアミノ酸y~234を含んでなるヒトCD30-Lタンパク質が含まれ、ここでyは1~19である(即ち、N末端アミノ酸は、配列番号22のアミノ酸1~19のいずれかであり、C末端アミノ酸は、アミノ酸234である。N末端で先端切断されている、こうしたタンパク質は、CD30へ結合することが可能である)。

10

【0073】

代替りの態様は、可溶性CD30-Lポリペプチドを提供する。可溶性CD30-Lポリペプチドは、ネイティブCD30-Lの細胞外ドメインの全部または一部を含むが、該ポリペプチドの細胞膜上での保持を引き起こす可能性がある膜貫通領域を欠く。CD30-Lタンパク質がシグナルペプチドを欠くので、その分泌を促進するために可溶性CD30-Lタンパク質のN末端へ異種シグナルペプチドを融合してよい。シグナルペプチドは、宿主細胞からの分泌時にCD30-Lタンパク質より切断される。可溶性CD30-Lポリペプチドは、CD30受容体へ結合する能力を保持する。可溶性CD30-Lには、膜貫通領域の一部または細胞質ドメインや他の配列の一部も含めてよいが、但し、可溶性CD30-Lタンパク質が分泌されることが可能であることが条件である。

20

【0074】

可溶性CD30-Lポリペプチドの例には、ネイティブCD30-Lタンパク質の細胞外ドメイン全体、またはCD30へ結合することが可能である前記細胞外ドメインの断片を含んでなるものが含まれる。1つのそうした可溶性CD30-Lポリペプチドは、配列番号20のヒトCD30-L配列のアミノ酸z~215(Asp)を含み、ここでzは、44、45、46、または47である。換言すると、可溶性ヒトCD30-LのN末端アミノ酸は、配列番号20の44~47位のアミノ酸より選択される。そうした可溶性ヒトCD30-LポリペプチドをコードするDNA配列には、限定されないが、配列番号19のヌクレオチド130~645、133~645、136~645、および139~645からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含んでなるDNA配列が含まれる。こうした配列は、配列番号20のアミノ酸44~215、45~215、46~215、および47~215をそれぞれ含んでなるポリペプチドをコードする。配列番号20のアミノ酸47~215と抗体Fcポリペプチドを含んでなる融合タンパク質の形態の、1つのそうした可溶性ヒトCD30-Lタンパク質の産生がU.S.P.N.5,480,981の実施例11に例示されている。

30

【0075】

CD30アンタゴニストは、CD30のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド配列を含んでも、それより開発してもよい。CD30をコードする遺伝子のクローニングおよび発現がすでに報告され、CD30は、神経成長因子受容体スーパーファミリーに対する実質的な相同性を保有する膜貫通タンパク質として特性決定されている(Durkopら, Cell 1992, 68:421)。Durkopら, 同上に報告されたCD30のポリヌクレオチド配列を配列番号23に提示し、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号24に提示する。ヒトCD30の細胞外部分は、アミノ酸1~390に対応するか、またはシグナルペプチドが除去されていれば、配列番号24のアミノ酸19~390に対応する。膜貫通領域は、配列番号24のアミノ酸391~407を含む。句「可溶性CD30」(sCD30)は、CD30タンパク質の細胞外ドメインの全部または一部を含み、CD30-Lと特異的に結合する能力を保持する可溶性分子を意味する。心臓血管疾患の治療用CD30アンタゴニストとして役立つ可能性がある、ポリヌクレオチド

40

50

およびポリペプチドの配列、並びにCD30-Fc融合タンパク質を作製する方法に関する記載は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、U.S.P.N.5,480,981に詳しく記載されている。

【0076】

さらなる態様において、CD30アンタゴニストは、限定されないが、CD30-L（配列番号20および/または22）および/またはCD30（配列番号24）のポリペプチド配列より開発されるペプチド模倣体、ペプチド体および/またはミモトープのようなポリペプチド模倣体である。ポリペプチド模倣体は、コンビナトリアルペプチドライブラリーのような、当該技術分野で知られた技術を介して開発可能である。ポリペプチド模倣体は、タンパク質の二次構造の要素を模倣するペプチド含有分子である。CD30-Lのアミノ酸配列に基づいたCD30-Lポリペプチド模倣体は、CD30を活性化せずにCD30へ結合して、内因性CD30-Lの結合を立体的に妨害するだろう。CD30受容体のアミノ酸配列に基づいたCD30受容体ポリペプチド模倣体は、CD30-Lへ結合して、内因性CD30-LのCD30への結合を立体的に妨害するだろう。CD30-LおよびCD30ペプチド模倣体は、被検者においてCD30-LがCD30へ結合することに拮抗して、それによってCD30-Lの好炎症効果を抑えるために使用可能である。ポリペプチド模倣体の形態のCD30アンタゴニストは、そのものとして、心臓血管疾患に関連した炎症および/または免疫調節プロセスを治療するために使用可能である。

10

【0077】

本発明に有用であるCD30-LおよびCD30の他の型には、ネイティブCD30-L（配列番号20および/または22）またはCD30（配列番号24）のポリペプチド配列に実質的に相同であり、U.S.P.N.5,480,981に記載のように生物学的活性を保持する、天然に存在する変異体のような、ムテインおよび変異体（類似体とも呼ばれる）が含まれる。

20

【0078】

本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造におけるCD30アンタゴニストの使用を追加的に提供する。本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造における、CD30アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドの使用をさらに提供する。

【0079】

E.OX40アンタゴニスト

本発明のさらなる態様は、1以上のOX40アンタゴニストを含んでなる、心臓血管疾患の治療用の組成物および方法を提供する。OX40アンタゴニストは、本明細書において、OX40-LとOX40の相互作用を一部または完全に遮断すること、そしてそれにより膜結合性OX40を介したOX40仲介性シグナル伝達を阻害することによって、並びにOX40を活性化する後続の生物学的活性を一部または完全に阻害することによって、内因性OX40リガンド（OX40-L）の有効量を低下させることが可能である実体として定義される。OX40アンタゴニストは、OX-40LまたはOX40のいずれへ結合してもよい。

30

【0080】

OX40:OX40-Lの生物学的活性には、本明細書において、限定されないが、OX40-LのOX40への結合とOX40の活性化;Tリンパ球に対する副刺激活性;IL-4が含まれるサイトカインの産生;CD4+T細胞の生存および増殖を促進すること;免疫応答の延長化;IL-2産生をアップレギュレートすること、およびエフェクターT細胞の寿命を増加させることによってエフェクターおよび記憶エフェクターT細胞の機能を亢進させること;並びに、腫瘍特異免疫の亢進が含まれるとして定義される。

40

【0081】

こうしたOX40アンタゴニストには、限定されないが、OX40-LおよびOX40の可溶型;OX40へ結合して膜結合性OX40を活性化せずにOX40-Lの結合を阻害するOX40-Lの断片;OX40-Lへ結合してOX40-LのOX40への結合を阻害するOX40の断片;OX40-Lへ特異的に結合してOX40-LのOX40への

50

結合を一部または完全に阻害する、OX40-Lに対して向けられる抗体、融合タンパク質および/またはペプチド体；OX40へ特異的に結合してそれ自身はOX40を活性化せずにOX40-Lの結合を阻害する、OX40に対して向けられる抗体、融合タンパク質および/またはペプチド体；OX40-LまたはOX40へ結合してその相互作用を阻害する、OX40-Lおよび/またはOX40ペプチド模倣体および/またはミモトープのような低分子が含まれる。本明細書に使用するように、OX40-LまたはOX40に基づいてOX40アンタゴニストへ言及するときには、用語OX40-LおよびOX40には、以下に詳しく記載するように、その断片、変異体、ムテイン、誘導体および融合タンパク質も含まれると理解される。

【0082】

OX40アンタゴニストは、OX40のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列を含んでも、それより開発してもよい。OX40、ACT-4およびACT35とも呼ばれる、OX-40受容体は、抗原活性化された哺乳動物のCD4+T細胞の表面に発現されるタンパク質である。マウス、ラットおよびヒトのOX-40受容体の相同体をコードするDNA配列がクローニングされて、配列決定されている(Malletら, EMBO, 9:1063-1068(1990); Calderheadら, J Immunol, 151:5261-5271(1993); Latzaら, Eur. J. Immunol. 24:673-683(1994); およびWO95/12673を参照のこと)。ヒトOX40の単離、クローニング、および特性決定は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、U.S.P.N. 5,821,332および6,277,962 B1に記載されている。上述のように、本発明の態様には、OX40アンタゴニストとしての抗OX40抗体が含まれる。OX40に対して向けられる抗体の例は、U.S.P.N. 5,821,332および6,277,962 B1に記載されている。

【0083】

本発明のOX40タンパク質には、限定されないが、配列番号28のアミノ酸1~277を含んでなるヒトOX40；および、上記配列のN末端、C末端、または内部の先端切断型を含むが、望ましい生物学的活性を保持するタンパク質が含まれる。そうしたヒトOX40ポリペプチドをコードするDNA配列には、限定されないが、配列番号27のヌクレオチド配列を含んでなるDNA配列が含まれる。

【0084】

代わりの態様は、可溶性OX40ポリペプチドを提供する。可溶性OX40ポリペプチドは、ネイティブOX40の細胞外ドメインの全部または一部を含むが、該ポリペプチドの細胞膜上での保持を引き起こす可能性がある膜貫通領域を欠く。可溶性OX40ポリペプチドは、OX40-Lへ結合する能力を保持する。可溶性OX40ポリペプチドには、膜貫通領域の一部または細胞質ドメインや他の配列の一部を含めてよいが、但し、可溶性OX40タンパク質が分泌されることが可能であることが条件である。推定シグナル配列は、配列番号28のアミノ酸1~22または1~24に由来し、細胞外ドメインはアミノ酸23~212または24~212に及び、膜貫通配列は、アミノ酸213~240に及び。

【0085】

可溶性OX40ポリペプチドの例には、ネイティブOX40タンパク質の細胞外ドメイン全体、またはOX40-Lへ結合することが可能である前記細胞外ドメインの断片を含んでなるものが含まれる。1つのそうした可溶性OX40-Lポリペプチドは、配列番号28のアミノ酸z~213を含み、ここでzは、22、23、24、または25である。換言すると、可溶性ヒトOX40-LのN末端アミノ酸は、配列番号28の22~25位のアミノ酸より選択される。

【0086】

OX40アンタゴニストは、OX40-Lのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの配列を含んでも、それより開発してもよい。ヒトOX40-Lの単離、クローニング、調製および特性決定は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、U.S.P.N. 6,

10

20

30

40

50

156, 878および6, 242, 566 B1、並びに米国特許出願番号: US 2001/0044523 A1およびUS 2002/0077460 A1に記載されている。上述のように、本発明の態様には、OX40アンタゴニストとしての抗OX40-L抗体が含まれる。OX40-Lに対して向けられる抗体の例は、U.S.P.N. 6, 156, 878および6, 242, 566 B1、並びに米国特許出願番号: US 2001/0044523 A1およびUS 2002/0077460 A1に記載されている。

【0087】

OX40-Lは、gp34またはACT-4-Lとも呼ばれ、抗原提示細胞のような、選択される哺乳動物細胞の表面で発現される。ヒトOX40-Lは、Miuraら, Mol Cell Biol 11(3): 1313-1325(1991)においてはじめて単離されて記載された。参照により本明細書にそのまま組み込まれる、米国特許第5, 457, 号は、OX40-Lのマウス相同体について記載する。

10

【0088】

本発明のOX40-Lタンパク質には、限定されないが、配列番号26のアミノ酸1~183を含んでなるヒトOX40-Lポリペプチドと、上記配列のN末端、C末端、または内部の先端切断型を含むが、望ましい生物学的活性を保持するポリペプチドが含まれる。そうしたヒトOX40ポリペプチドをコードするDNA配列には、限定されないが、配列番号25のヌクレオチド配列を含んでなるDNA配列が含まれる。

【0089】

代わりの態様は、可溶性OX40-Lポリペプチドを提供する。可溶性OX40-Lポリペプチドは、ネイティブOX40-Lの細胞外ドメインの全部または一部を含むが、該ポリペプチドの細胞膜上での保持を引き起こす可能性がある膜貫通領域を欠く。可溶性OX40-Lポリペプチドは、OX40へ結合する能力を保持する。可溶性OX40-Lポリペプチドには、膜貫通領域の一部も、細胞質ドメインや他の配列の一部も含めてよいが、但し、可溶性OX40-Lタンパク質が分泌されることが可能であることが条件である。

20

【0090】

さらなる態様において、OX40アンタゴニストは、限定されないが、OX40-L(配列番号26)および/またはOX40(配列番号28)のポリペプチド配列より開発されるペプチド模倣体、ペプチド体および/またはミモトープのようなポリペプチド模倣体である。ポリペプチド模倣体は、コンビナトリアルペプチドライブラリーのような、当該技術分野で知られた技術を介して開発可能である。ポリペプチド模倣体は、タンパク質の二次構造の要素を模倣するペプチド含有分子である。OX40-Lのアミノ酸配列に基づいたOX40-Lポリペプチド模倣体は、OX40を活性化せずにOX40へ結合して、内因性OX40-Lの結合を立体的に妨害するだろう。OX40受容体のアミノ酸配列に基づいたOX40受容体ポリペプチド模倣体は、OX40-Lへ結合して、内因性OX40-LのOX40への結合を立体的に妨害するだろう。OX40-LおよびOX40ペプチド模倣体は、被検者においてOX40-LがOX40へ結合することに拮抗して、それによってOX40-Lの好炎症効果を抑えるために使用可能である。ポリペプチド模倣体の形態のOX40アンタゴニストは、そのものとして、心臓血管疾患に関連した炎症および/または免疫調節プロセスを治療するために使用可能である。

30

40

【0091】

本発明に有用であるOX40-LおよびOX40の他の型には、ネイティブOX40-L(配列番号26)またはOX40(配列番号28)のポリペプチド配列に実質的に相同であり、生物学的活性を保持する、天然に存在する変異体のような、ムテインおよび変異体(類似体とも呼ばれる)が含まれる。

【0092】

本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造におけるOX40アンタゴニストの使用を追加的に提供する。本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造における、OX40

50

アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドの使用をさらに提供する。

【0093】

F . C D 3 9

本発明の代わりの態様は、1以上のIL-17アンタゴニスト、IL-18アンタゴニスト、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストと組み合わせて可溶性CD39ポリペプチドを投与することを含んでなる、心臓血管疾患を有する被検者において心臓血管疾患を治療することへ向けられる。

【0094】

CD39の分子クローニングと構造上の特性決定は、Maliszewskiら、(J . Immunol . 153 : 3574 , 1994)に提示されている。細胞表面分子のCD39をコードするcDNAは、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、米国特許出願番号09/835,147、並びにWO00/23459に記載のように、単離、クローニング、そして配列決定された。核酸配列と予測されるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号29と配列番号30に示す。

10

【0095】

本発明は、心臓血管疾患を治療するためにCD39の可溶型を使用する方法を提供し、これは、アミノおよびカルボキシ末端の膜貫通ドメインを除去することによって構築した。可溶性CD39は、ATPおよびADPを生理学的に関連した濃度で代謝する野生型CD39の能力、並びにADP誘発性血小板活性化および動員(血小板凝集が含まれる)を阻止して逆転させる能力を保持する。CD39の可溶型の使用は、該ポリペプチドの組換え宿主細胞からの精製が促進されるために、そして可溶性ポリペプチドが膜結合型より臨床投与に概して適しているために有利である。CD39が血小板の活性化および動員、そしてそれ故に血小板凝集を阻害するので、本発明は、血小板が不適切に活性化される哺乳動物中の部位での血栓の形成を阻害するための方法および組成物、血小板反応性を制御して、それによって止血および血栓形成プロセスを調節することに使用する方法、並びに血小板凝集を阻害する、および/または逆転させる方法を提供する。

20

【0096】

CD39は、2つの推定される膜貫通領域をアミノおよびカルボキシの末端近くに含有し、これは、そのネイティブタンパク質を細胞膜に留めることに役立つ可能性がある。膜貫通領域間の分子の部分は、細胞の外側にある。本明細書に使用する用語「CD39ポリペプチド」には、CD39、CD39の相同体、CD39の変異体、断片、および誘導体、CD39を含んでなる融合ポリペプチド、およびCD39ポリペプチドの可溶型が含まれる。CD39遺伝子ファミリーは、少なくとも4つのヒトメンバー：CD39、CD39L2、CD39L3、およびCD39L4を含有すると報告されている(ChadwickおよびFrischauf, Genomics 50 : 357 , 1998)。CD39-L4は、分泌アピラーゼであると報告されている(Muleroら, J . Biol . Chem . 274 (29) : 20064 , 1999)。追加のsol(可溶性)CD39変異体は、米国特許出願番号09/835,147に詳しく記載されるように、CD39L2、CD39L3、またはCD39L4からのN末端配列をCD39の可溶性部分へ融合することによって構築した。

30

40

【0097】

CD39は、内皮細胞の表面に位置するエクト(e c t o) - ADPアーゼ(アピラーゼ)である。この酵素は、主として血液流動性の維持に与っているので、血小板をベースライン(安定)状態に維持する。このことは、主要な血小板アゴニストであるアデノシン二リン酸を、アゴニストではないアデノシン一リン酸へ代謝することによって達成される。ADPが血小板凝集の最も重要なアゴニストであり、そして血小板放出液(releaseate)に存在するので、ADPを異化する物質は、不適切な血小板の凝集が関与する病態を治療するかまたは予防するのに有用である。

【0098】

アピラーゼ活性は、CD39の細胞外ドメインに存在する。したがって、CD39ポリ

50

ペプチドには、配列番号30のアミノ酸36～44からなる群より選択されるアミノ末端と配列番号30のアミノ酸471～478からなる群より選択されるカルボキシ末端を有してCD39生物学的活性を明示するもののような、CD39の可溶型が含まれる。可溶性CD39ポリペプチドには、膜貫通領域の片方または両方の部分が含まれるポリペプチドも含まれるが、但し、その可溶性CD39ポリペプチドが細胞から分泌されることが可能であり、CD39生物学的活性を保持することが条件である。さらに、可溶性CD39ポリペプチドには、CD39の細胞外部分を含んでなるオリゴマーまたは融合ポリペプチドと、生物学的活性を有するこれらポリペプチドのいずれかの断片が含まれる。

【0099】

CD39に関する用語「生物学的活性」には、アピラーゼ酵素活性、並びにCD39の *ex vivo* および *in vivo* 活性が含まれる。アピラーゼは、ヌクレオシド三および/またはニリン酸の加水分解を触媒するが、所与のアピラーゼは、ヌクレオシド三リン酸かヌクレオシドニリン酸のいずれか一方へ異なる相対特異性を表示する場合がある。CD39の可溶型の生物学的活性は、例えば、エクトヌクレオチダーゼまたはアピラーゼアッセイ（例えば、ATPアーゼまたはADPアーゼアッセイ）において、または血小板凝集の阻害を測定するアッセイにおいて定量可能である。例示のアッセイを本明細書に開示するが、当業者は、他の類似の種類のアッセイが生物学的活性を測定するために使用可能であることを理解されよう。

【0100】

さらなる態様において、心臓血管疾患の治療用のCD39組成物は、限定されないが、CD39のポリペプチド配列（配列番号30）より開発されるペプチド模倣体、ペプチド体および/またはミモトープのようなポリペプチド模倣体を含む。ポリペプチド模倣体は、コンビナトリアルペプチドライブラリーのような、当該技術分野で知られた技術を介して開発可能である。ポリペプチド模倣体は、タンパク質の二次構造の要素を模倣するペプチド含有分子である。CD39のアミノ酸配列に基づいたCD39ポリペプチド模倣体は、ヌクレオシド三および/またはニリン酸の加水分解を触媒するだろう。ポリペプチド模倣体の形態のCD39アンタゴニストは、そのものとして、心臓血管疾患を治療するために使用可能である。

【0101】

本発明に有用であるCD39の他の型には、ネイティブCD39（配列番号30）のポリペプチド配列に実質的に相同であり、米国特許出願番号09/835,147に記載のように生物学的活性を保持する、天然に存在する変異体のような、ムテインおよび変異体（類似体とも呼ばれる）が含まれる。

【0102】

本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造におけるCD39の使用を追加的に提供する。本発明は、心臓血管疾患の治療用医薬品の製造における、CD39をコードするポリヌクレオチドの使用をさらに提供する。

【0103】

CD39は、本明細書と米国特許出願番号09/835,147に記載のどの型でも、心臓血管疾患の治療において1以上のIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストと組み合わせて使用可能である。

【0104】

G、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30およびOX40アンタゴニストとCD39のさらなる態様

本発明に有用であるIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39の他の型には、本明細書に提供されるネイティブ配列、並びに参照により組み込まれる特許において提供される配列に実質的に相同である、天然に存在する変異体のような、ムテインおよび変異体（類似体とも呼ばれる）が含まれる。

【0105】

10

20

30

40

50

「実質的に相同」は、上記に開示されるように、ネイティブアミノ酸に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である変異アミノ酸配列を意味する。2つのアミノ酸または2つの核酸配列のパーセント同一性は、目視検査と数学的計算により決定可能であり、またはより好ましくは、この比較はコンピュータプログラムを使用して配列情報を比較することによってなされる。代表的な、好ましいコンピュータプログラムは、遺伝学コンピュータグループ(GCG; ウィスコンシン州マジソン)のウィスコンシン・パッケージ、バージョン10.0プログラム、「GAP」である(Devereuxら, 1984, Nucleic Acids Res. 12:387)。「GAP」プログラムの好ましいデフォルト変数には:(1)ヌクレオチドについての一対比較マトリックス(同一物について1、非同物について0の値を含有する)のGCG実行と、SchwartzおよびDayhoff監修「ポリペプチドの配列および構造のアトラス(Atlas of Polypeptide Sequence and Structure)」国立バイオ医学研究財団、353-358頁、1979により記載されるような、GribnikovおよびBurgess, Nucleic Acids Res. 14:6745, 1986の加重アミノ酸比較マトリックス; または他の比較可能な比較マトリックス;(2)アミノ酸配列の各ギャップについて30のペナルティと各ギャップ中の各記号について1の追加ペナルティ、または、ヌクレオチド配列の各ギャップについて50のペナルティと各ギャップ中の各記号について3の追加ペナルティ;(3)エンドギャップへのノーペナルティ; および(4)長いギャップへは最大ペナルティがないこと、が含まれる。例えば、国立医学ライブラリーのウェブサイト:www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgiによる使用に利用可能なBLASTNプログラム、バージョン2.0.9またはUW-BLAST2.0アルゴリズムのような、配列比較の技術分野において当業者により使用される他のプログラムも使用可能である。UW-BLAST2.0の標準デフォルト変数設定については、以下のインターネットサイトに記載されている:sapiens.wustl.edu/blast/blast/#Features。さらに、BLASTアルゴリズムは、BLOSUM62アミノ酸スコアリングマトリックスを使用し、使用可能である選択変数は以下の通りである:(A)低い組成複雑性を有するクエリー配列のセグメント(WoottonおよびFederhenのSEGプログラム(Computers and Chemistry, 1993)により決定される; WoottonおよびFederhen, 1996「配列データベースにおける組成偏重領域の解析(Analysis of compositionally biased regions in sequence databases)」Methods Enzymol. 266:554-71も参照のこと)、または、短周期性の内部リピートからなるセグメント(Cla-verieおよびStates(Computers and Chemistry, 1993)のXNUプログラムにより決定される)をマスクするためのフィルターを含むこと、および(B)データベース配列に対する適合を報告するための統計学的有意差の閾値、またはE-スコア(KarlinおよびAltschul(1990)の推計学的モデルにしたがって、単に偶然により見出される適合の期待確率; ある適合に起因する統計学的有意差がこのE-スコア閾値より大きい場合、この適合は報告されない); 好ましいE-スコア閾値の数値は0.5であるか、または好ましさが増える順に、0.25、0.1、0.05、0.01、0.001、0.0001、1e-5、1e-10、1e-15、1e-20、1e-25、1e-30、1e-40、1e-50、1e-75、または1e-100である。

【0106】

こうした変異体には、ネイティブなIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39配列に実質的に相同であるが、1以上の欠失、挿入または置換のためにネイティブIL-17受容体のものとは異なるアミノ酸配列を有するポリ

ペプチドが含まれる。特別な態様には、限定されないが、少なくとも1つの保守的アミノ酸置換を含むIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39のポリペプチドが含まれる。代わりの態様は、ネイティブ配列と比較したときに、アミノ酸残基の1~10の欠失、挿入または置換を含んでなる、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39のポリペプチドを含む。本発明のIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39をコードするポリヌクレオチドには、1以上の欠失、挿入または置換のためにネイティブなIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39のポリヌクレオチド配列とは異なるが、生物学的に活性なポリペプチドをコードする変異体が含まれる。IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39ポリペプチドの変異体として含まれるのは、対立遺伝子型および選択スプライス型のような天然に存在する変異体、並びにIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39ポリペプチドのアミノ酸配列またはIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39ポリペプチドをコードする核酸のヌクレオチド配列を修飾することによって構築した変異体である。

【0107】

上述のように、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39の変異体は、少なくとも1つの保守的置換アミノ酸を有する配列を含む場合があり、所与のアミノ酸残基を類似の物理化学特性を有する残基に置き換えることを意味する。代わりの態様は、1~10、1~20または1~30の間の保守的置換配列を含むIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39の変異体を含む。一般に、ネイティブポリペプチドに存在する1以上のアミノ酸の置換は、保守的になされるべきである。保守的置換の例には、活性ドメインの外側でのアミノ酸の置換と、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39の二次および/または三次構造を改変しないアミノ酸の置換が含まれる。保守的置換の例には、ある脂肪族残基をIle、Val、LeuまたはAlaのような別の残基に互いに置換すること、またはLysとArg；GluとAsp；またはGlnとAsnの間のように、ある極性残基を別のものに置換することが含まれる。他のそうした保守的置換、例えば、類似の疎水性特性を有する領域全体の置換もよく知られている。天然に存在する変異体も本発明に含まれる。そうした変異体の例は、選択的mRNAスプライシング事象より、またはネイティブタンパク質のタンパク分解的な切断より生じ、ネイティブな生物学的特性は保持される、タンパク質である。

【0108】

例えば、「保守的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性や電荷にほとんどまたはまったく影響がないように、ネイティブなアミノ酸残基を非ネイティブな残基に置換することを伴う場合がある。さらに、「アラニンスキャニング突然変異誘発」についてすでに記載されたように（例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発について論じたMacLennanら、1998、Acta Physiol. Scand. 補遺643:55-67；Sakaiら、1998、Adv. Biophys. 35:1-24を参照のこと）、ポリペプチド中のどのネイティブ残基もアラニンで置換してよい。

【 0 1 0 9 】

望まれるアミノ酸置換（保守的でも非保守的でも）は、そうした置換が望まれる時機に当業者により決定可能である。例えば、アミノ酸置換は、ペプチド配列の重要な残基を同定するために、または本明細書に記載のペプチドまたは担体 - ペプチド分子（先述の式を参照のこと）のアフィニティーを増加または減少させるために使用可能である。例示のアミノ酸置換を表 1 に示す。

【 0 1 1 0 】

【表 1】

表 1 - アミノ酸置換

元の残基	例示の置換	好ましい置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4 ジアミノ 酪酸, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

30

40

【 0 1 1 1 】

ある態様において、保守的アミノ酸置換には、生物系における合成によるよりは化学ペプチド合成により典型的には取り込まれる、非天然に存在するアミノ酸残基も含まれる。

上記に注目したように、天然に存在する残基は、配列の修飾に有用であり得る共通の側鎖の特性に基づいていくつかのクラスへ分類可能である。例えば、非保守的な置換は、これらのクラスの 1 つのメンバーを別のクラスのメンバーに交換することを伴う場合がある

50

。こうした置換残基は、非ヒトオルソログ (o r t h o l o g s) と相同であるペプチドの領域へ導入しても、該分子の非相同領域へ導入してもよい。さらに、鎖配向性に影響を及ぼす目的で、PまたはGを使用して修飾を行ってもよい。

【 0 1 1 2 】

こうした修飾を行うとき、アミノ酸のヒドロパシー指数 (h y d r o p a t h i c i n d e x) を考慮する場合がある。その疎水性と電荷特性に基づいて、各アミノ酸にヒドロパシー指数が割り当てられている。これらは：イソロイシン (+ 4 . 5) ; バリン (+ 4 . 2) ; ロイシン (+ 3 . 8) ; フェニルアラニン (+ 2 . 8) ; システイン / シスチン (+ 2 . 5) ; メチオニン (+ 1 . 9) ; アラニン (+ 1 . 8) ; グリシン (- 0 . 4) ; スレオニン (- 0 . 7) ; セリン (- 0 . 8) ; トリプトファン (- 0 . 9) ; チロシン (- 1 . 3) ; プロリン (- 1 . 6) ; ヒスチジン (- 3 . 2) ; グルタミン酸 (- 3 . 5) ; グルタミン (- 3 . 5) ; アスパラギン酸 (- 3 . 5) ; アスパラギン (- 3 . 5) ; リジン (- 3 . 9) ; およびアルギニン (- 4 . 5) である。

10

【 0 1 1 3 】

タンパク質に相互反応的な生物学的機能を与えるときにアミノ酸のヒドロパシー指数が重要であることは、当該技術分野で理解されている (K y t e ら , J . M o l . B i o l . , 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 1 (1 9 8 2)) 。あるアミノ酸を類似のヒドロパシー指数若しくはスコアを有する他のアミノ酸に置換しても類似の生物学的活性を保持し得ることが知られている。ヒドロパシー指数に基づいて変化させるときは、そのヒドロパシー指数が ± 2 以内にあるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内にあるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内にあるものがさらにより特別に好ましい。

20

【 0 1 1 4 】

疎水性を基にした類似のアミノ酸の置換が有効に実施可能であることも当該技術分野で理解されている。その近接アミノ酸の疎水性により支配されるような、タンパク質の最大の局部平均疎水性は、その免疫原性および抗原性に、即ち、該タンパク質の生物学的特性に相関する。

【 0 1 1 5 】

以下の疎水性値がアミノ酸残基へ割り当てられている：アルギニン (+ 3 . 0) ; リジン (+ 3 . 0) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0 \pm 1) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0 \pm 1) ; セリン (+ 0 . 3) ; アスパラギン (+ 0 . 2) ; グルタミン (+ 0 . 2) ; グリシン (0) ; スレオニン (- 0 . 4) ; プロリン (- 0 . 5 \pm 1) ; アラニン (- 0 . 5) ; ヒスチジン (- 0 . 5) ; システイン (- 1 . 0) ; メチオニン (- 1 . 3) ; バリン (- 1 . 5) ; ロイシン (- 1 . 8) ; イソロイシン (- 1 . 8) ; チロシン (- 2 . 3) ; フェニルアラニン (- 2 . 5) ; トリプトファン (- 3 . 4) 。類似の疎水性値に基づいて変化させるときは、その疎水性値が ± 2 以内にあるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内にあるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内にあるものがさらにより特別に好ましい。一次アミノ酸配列から疎水性に基づいてエピトープを同定することも可能である。これらの領域は、「エピトープコア領域」とも呼ばれる。

30

【 0 1 1 6 】

当業者は、よく知られた技術を使用して、先の配列に示すようなポリペプチドの好適な変異体を決定することができよう。活性を損なわずに変化させることができる分子の好適な領域を同定するために、当業者は、活性に重要であるとは考えられていない領域に標的指向することができる。例えば、類似の活性がある、同一種からかまたは他の種からの類似のポリペプチドが知られているとき、当業者は、ペプチドのアミノ酸配列を類似のペプチドへ比較することができる。そのような比較により、類似のポリペプチドの間で保存されている分子の残基および部分を同定することができる。そのような類似のペプチドに比較して保存されていないペプチドの領域における変化がペプチドの生物学的活性および / または構造に不都合に影響を及ぼす可能性はより少ないと理解されよう。当業者はまた、相対的に保存されている領域中でも、活性を保持しながら、天然に存在する残基を化学的に類似したアミノ酸に置換すること (保守的アミノ酸残基置換) が可能であるとも知って

40

50

いよう。故に、生物学的活性または構造に重要であり得る領域でも、生物学的活性を損なわなければ、またはペプチド構造に不都合に影響を及ぼさなければ、保守的アミノ酸置換へ処してよい。

【0117】

追加的に、当業者は、類似のペプチドにおいて、活性または構造に重要である残基を同定する構造-機能試験を検討することができる。そのような比較に照らして、類似のペプチド中で活性または構造に重要であるアミノ酸残基に対応する、あるペプチド中のアミノ酸残基の重要性を予測することができる。当業者は、該ペプチドのそうした予測される重要なアミノ酸残基について、化学的に類似したアミノ酸の置換を選ぶことができる。

【0118】

当業者はまた、類似のポリペプチドの構造に関連して、三次元構造とアミノ酸配列を解析することができる。その情報に照らして、当業者は、その三次元構造に関するペプチドのアミノ酸残基のアライメントを予測することができる。当業者は、タンパク質の表面にあると予測されたアミノ酸残基に対しては、そのような残基が他の分子との重要な相互作用に関与している可能性があるので、極端に変化させないことを選択することができる。さらに、当業者は、単一アミノ酸置換をそれぞれの望ましいアミノ酸残基で含有するテスト変異体を産生可能である。次いで、この変異体について、当業者に知られた活性アッセイを使用してスクリーニングすることができる。そうしたデータは、好適な変異体についての情報を収集するために使用可能である。例えば、特別なアミノ酸残基への変化により、損なわれるか、望まれないほどに低下するか、または不適切な活性がもたらされると判明すれば、そのような変化を伴う変異体を回避することができる。換言すると、そうしたルーチン実験より収集される情報に基づいて、当業者は、単独でも、他の突然変異と組み合わせても、さらなる置換を回避すべきアミノ酸を容易に決定可能である。

【0119】

いくつかの科学出版物が二次構造の予測を扱ってきた。例えば、Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4): 422-427 (1996); Chouら, Biochemistry, 13(2): 222-245 (1974); Chouら, Biochemistry, 113(2): 211-222 (1974); Chouら, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47: 45-148 (1978); Chouら, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276 および Chouら, Biophys. J., 26: 367-384 (1979) を参照のこと。さらに、二次構造を予測することに役立つコンピュータプログラムが現在利用可能である。二次構造を予測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%より高い配列同一性、または40%より高い類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、類似の構造トポロジーをしばしば有する。タンパク質構造データベース(PDB)の最近の拡充により、ポリペプチドまたはタンパク質の構造の内部にあるフォールドの潜在数が含まれる、亢進した二次構造の予測可能性がもたらされている。Holmら, Nucl. Acid. Res., 27(1): 244-247 (1999) を参照のこと。所与のポリペプチドまたはタンパク質中には限定数のフォールドがあること、そして臨界数の構造が解明されたなら、構造予測の精度が劇的に増すことが示唆されている(Brennerら, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3): 369-376 (1997))。

【0120】

二次構造を予測する追加の方法には、「スレッドイング法(threading)」(Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3): 377-87 (1997); Sipplら, Structure, 4(1): 15-9 (1996))、「プロファイル解析法」(Bowieら, Science, 253: 164-170 (1991); Gribskovら, Meth. Enzym., 183: 146-159 (1990); Gribskovら, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13): 4355-8 (1987))、および「進化系列法」(Holm, 同上, およ

10

20

30

40

50

びBrenner, 同上を参照のこと)が含まれる。

【0121】

IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39の変異体の態様には、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39の変異体が含まれ、上記のように、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39のそれぞれのアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるポリペプチド配列が含まれる。

10

【0122】

IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39ポリペプチドまたはIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39ポリヌクレオチド配列におけるさらなる修飾は、既知の技術を使用して当業者により行うことが可能である。ポリペプチド配列中での目的の修飾には、選択されたアミノ酸の改変、置換、置き換え、挿入、または欠失が含まれる場合がある。例えば、1以上のシステイン残基を欠失させるか、または別のアミノ酸で置き換えて、分子のコンホメーションを改変させることが可能であり、これは、折り畳みまたは再生のときに不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防ぐことを伴う場合がある改変である。こうした改変、置換、置き換え、挿入、または欠失の技術は当業者によく知られている(例えば、米国特許第4,518,584号を参照のこと)。別の例として、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39の細胞外ドメイン中のN-グリコシル化部位を、グリコシル化を排除するように修飾することが可能であり、哺乳動物および酵母の発現系において、炭水化物が低減した類似体の発現を可能にする。真核ポリペプチド中のN-グリコシル化部位は、アミノ酸の三つ組、Asn-X-Y(ここで、XはPro以外の任意アミノ酸であり、YはSerまたはThrである)を特徴とする。これらの三つ組をコードするヌクレオチド配列への適切な置換、追加、または欠失は、Asn側鎖での炭水化物残基の付加の防止をもたらす。例えば、Asnを異なるアミノ酸に置き換えるように選択される、単一ヌクレオチドの改変は、N-グリコシル化部位を不活性化するのに十分である。あるいは、SerまたはThrを、Alaのような別のアミノ酸に置き換えてもよい。ポリペプチド中のN-グリコシル化部位を不活性化するための手順が当該技術分野で知られていて、例えば、米国特許第5,071,972号に記載されるものが含まれる。本発明の範囲内にある追加の変異体には、グリコシル基、脂質、リン酸、アセチル基、などのような他の化学部分との共有または集合コンジュゲートを形成することによってその誘導体を創出するように修飾可能であるIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39のポリペプチドが含まれる。共有誘導体は、ポリペプチドのアミノ酸側鎖上の官能基へ、またはそのN末端またはC末端へ化学部分を連結させることによって製造可能である。好ましくは、こうした改変、置換、置き換え、挿入、または欠失は、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39の生物学的活性を減少させない。1つの例は、ネイティブ型と本質的に同じ結合アフィニティーで結合する変異体である。結合アフィニティーは、例えば米国特許第5,512,457号に記載され、本明細書に説明されるような、慣用手順により測定可能である。さらに、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX

20

30

40

50

40-LおよびCD39の分子は、限定されないが、ポリエチレングリコールのような1以上の水溶性ポリマーの付加によりバイオアベイラビリティおよび/または薬物動態半減期を高めるように修飾可能である。

【0123】

バイオアベイラビリティおよび/または薬物動態半減期を高めるのに有用な化学部分を付加する様々な手段が現在利用可能である。例えば、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、「N末端を化学修飾したタンパク質組成物と方法(N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods)」と題した、特許協力条約(「PCT」)国際公開公報番号WO96/11953を参照のこと。このPCT公開公報は、とりわけ、タンパク質のN末端への水溶性ポリマーの選択付加について開示する。

10

【0124】

好ましいポリマー担体は、ポリエチレングリコール(PEG)である。PEG基は、どんな簡便な分子量のものでもよく、直鎖でも分岐鎖でもよい。PEGの平均分子量は、好ましくは約2キロダルトン(「kD」)~約100kD、より好ましくは約5kD~約50kD、最も好ましくは約5kD~約10kDに及ぶだろう。一般に、PEG基は、PEG部分上の反応基(例、アルデヒド、アミノ、チオール、またはエステル基)から本発明の化合物上の反応基(例、アルデヒド、アミノ、またはエステル基)へのアシル化または還元アルキル化により本発明の化合物へ付加する。

【0125】

合成ペプチドのPEG化(PEGylation)に有用な戦略は、溶液中でコンジュゲート連結を形成させることにより、他方に対して相互に反応的である特定の官能基をそれぞれ担うペプチドおよびPEG部分を組み合わせることからなる。ペプチドは、慣用の固相合成で容易に製造可能である。ペプチドを特定部位の適切な官能基で「プレ活性化」する。この前駆体を精製し、完全に特性決定した後で、PEG部分と反応させる。ペプチドのPEGとの連結は、通常水相で起こり、逆相分析用HPLCにより容易にモニターすることができる。PEG化ペプチドは、分取用HPLCにより容易に精製可能であり、分析用HPLC、アミノ酸分析およびレーザーデソープション質量分析法により特性決定可能である。

20

【0126】

多糖ポリマーは、タンパク質修飾に使用可能である別の種類の水溶性ポリマーである。デキストランは、主に1-6連結により連結したグルコースの個別サブユニットを含む多糖ポリマーである。デキストランそのものは、多くの分子量範囲において利用可能であり、約1kD~約70kDの分子量において容易に利用可能である。デキストランは、それ自身でも、別の担体(例、Fc)との組合せでも、本発明における担体としての使用に適した水溶性ポリマーである。例えば、WO96/11953およびWO96/05309を参照のこと。治療薬または診断薬の免疫グロブリンへコンジュゲートしたデキストランの使用が報告されている;例えば、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、ヨーロッパ特許公開公報番号0315456を参照のこと。デキストランを本発明による担体として使用するとき、約1kD~約20kDのデキストランが好ましい。

30

40

【0127】

追加のIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39誘導体には、組換え培養における合成によるN末端またはC末端融合物のような、上記ポリペプチドと他のポリペプチドまたはポリペプチドとの共有または集合コンジュゲートが含まれる。融合ポリペプチドの例は、オリゴマーに関連して以下に論じる。さらに、融合ポリペプチドは、精製および同定を促進するために加えられるペプチドを含んでよい。こうしたペプチドには、例えば、米国特許第5,011,912号とHoppら, Bio/Technology 6:1204, 1988に記載される、ポリ-Hisまたは抗原同定ペプチドが含まれる。1つのこうしたペプチドはFLAG(登録商標)オクタペ

50

プチド（配列番号 31）であり、これは、きわめて抗原性であり、特異モノクローナル抗体により可逆的に結合されるエピトープを提供し、発現される組換えポリペプチドの迅速なアッセイと容易な精製を可能にする。4E11と命名されたマウスハイブリドーマは、米国特許第 5,011,912 号に記載されるように、特定の二価金属カチオンの存在下に FLAG（登録商標）ペプチドへ結合するモノクローナル抗体を産生する。4E11 ハイブリドーマ細胞系は、寄託番号 HB9259 の下でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されている。FLAG（登録商標）ペプチドへ結合するモノクローナル抗体は、イーストマンコダック社、科学造影システム部門、コネティカット州ニューヘーヴンより入手可能である。

【0128】

本明細書に記載の方法に使用可能である IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および CD39 の追加の態様には、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および / または CD39 ポリペプチドを含有するオリゴマーまたは融合ポリペプチド、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および / または CD39 の 1 以上の断片、または、本明細書、並びに上記に収載する米国特許に開示するような IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および / または CD39 の任意の誘導体または変異型が含まれる。特別な態様において、オリゴマーは、可溶性の IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および / または CD39 ポリペプチドを含む。オリゴマーは、共有結合しているか、または非共有結合している多量体の型であってよく、二量体、三量体またはより高次のオリゴマーが含まれる。代わりの態様において、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および CD39 のオリゴマーは、ポリペプチドへ融合したペプチド部分間の共有または非共有性の相互作用を介して連結した、多数の IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および CD39 ポリペプチドを含み、こうしたペプチドは、オリゴマー化を促進する特性を有する。ロイシンジッパーと抗体から誘導される特定のポリペプチドは、以下により詳しく記載されるように、それに付いたポリペプチドのオリゴマー化を促進することが可能であるペプチドの 1 つである。

【0129】

免疫グロブリンをベースとするオリゴマー。IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および CD39 アンタゴニストの好適な型にはキメラタンパク質が含まれ、それには、そのそれぞれのコグネイトへ結合することが可能であり、それによって炎症の効果と心臓血管疾患の症状を阻害するかまたは抑制する、二量体、三量体またはより高次の多量体のキメラタンパク質による自発形成を促進することが可能である第二のポリペプチドが含まれる。アンタゴニストとして使用するキメラタンパク質は、抗体分子の部分と IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および / または CD39 からの可溶性ポリペプチドを含有するタンパク質であり得る。好適な融合タンパク質には、免疫グロブリン Fc 領域へ連結した、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-L および CD39 のポリペプチド、例えば細胞外ドメイン、または細胞外ドメインの断片が含まれる。Fc 領域の断片、並びに Fc 受容体への

低下したアフィニティーを示すFcムテインも使用可能である。可溶性IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39、並びにその断片は、免疫グロブリンのFc部分へ直接融合しても、リンカー配列を介して融合してもよい。

【0130】

IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39アンタゴニストの1つの態様は、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39ポリペプチドを、抗体から誘導されるFcポリペプチドへ融合することによって創出される2つの融合ポリペプチドを含んでなる二量体へ向けられる。そうした融合ポリペプチドをコードする融合遺伝子を適切な発現ベクターへ挿入する。組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞においてIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39-Fc融合ポリペプチドが発現され、抗体分子とまったく同様に組立てられ、そのときに、鎖間ジスルフィド結合がFc部分間で形成され、二価分子を産生する。PCT出願WO93/10151に記載される、1つの好適なFcポリペプチドは、ヒトIgG1抗体のFc領域のN末端ヒンジ領域からネイティブC末端へ伸びる単鎖ポリペプチドである。IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39の二価型では、そうした融合がIgG分子のFc部分へなされる。他の免疫グロブリンのアイソタイプもこうした融合物を産生するために使用可能である。例えば、ポリペプチド-IgM融合は、本発明のポリペプチドの10価型を産生するだろう。

【0131】

本明細書に使用する用語「Fcポリペプチド」には、Fc領域のCHドメインのいくつかまたは全部を含んでなる、抗体のFc領域から構成される、ネイティブおよびムテイン型のポリペプチドが含まれる。二量体化を促進するヒンジ領域を含有する、こうしたポリペプチドの先端切断型も含まれる。好ましいFcポリペプチドは、ヒトIgG1抗体から誘導されるFcポリペプチドを含む。1つの代替物として、免疫グロブリンから誘導されるポリペプチドを使用して、オリゴマーを製造する。抗体から誘導されるポリペプチド(Fcドメインが含まれる)の様々な部分へ融合した特定の異種ポリペプチドを含んでなる融合ポリペプチドの製造は、当該技術分野で知られていて、例えば、Ashkenaziら、(PNAS USA 88:10535, 1991); Byrnら、(Nature 344:677, 1990); および、HollenbaughおよびAruffo(「免疫グロブリン融合ポリペプチドの構築(Construction of Immunoglobulin Fusion Polypeptides)」Current Protocols in Immunology中、補遺4、10.19.1-10.19.11頁、1992)に記載されている。別の有用なFcポリペプチドは、米国特許第5,457,035号とBaumら、(EMBO J. 13:3992-4001, 1994)に記載のFcムテインである。このムテインのアミノ酸配列は、アミノ酸19がLeuからAlaへ変化し、アミノ酸20がLeuからGluへ変化し、そしてアミノ酸22がGlyからAlaへ変化したことを除けば、WO93/10151に提示されるネイティブFc配列のそれと同一である。このムテインは、Fc受容体への低下したアフィニティーを示す。Fc部分(およびそれから形成されるオリゴマー)を含んでなる上記の融合ポリペプチドは、ポリペプチドAまたはポリペプチドGのカラムでのアフィニティークロマトグラフィーによる容易な精製の利点を提供する。他の態様において、本発明のポリペプチドを、抗体重鎖または軽鎖の可変部分に代用してもよい。抗体の重鎖と軽鎖の両方で融合ポリペプチドを作製すれば、4つものIL-17R細胞外領域があるオリゴマーを形成することが可能である。

【0132】

ペプチドリンカーをベースとするオリゴマー。あるいは、オリゴマーは、多数のIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39ポリペプチドを含んでなり、ペプチドリンカー（スパーサーペプチド）を有するかまたは有さない融合ポリペプチドである。好適なペプチドリンカーには、米国特許第4,751,180号および4,935,233号に記載されるものがある。望ましいペプチドリンカーをコードするDNA配列を、適切な慣用技術を使用して、本発明のDNA配列の間に、そしてそれと同じ読み枠で挿入することが可能である。例えば、このリンカーをコードする化学合成オリゴヌクレオチドをこの配列の間に連結してもよい。特別な態様において、融合ポリペプチドは、ペプチドリンカーにより分離された、2~4の可溶性IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39ポリペプチドを含む。好適なペプチドリンカー、他のポリペプチドとのその組合せ、およびその使用については当業者によく知られている。

10

【0133】

心臓血管疾患を治療する使用に適したIL-17、IL-18、4-1BB、CD30、OX40およびCD39アンタゴニストのオリゴマー型には、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,716,805号に記載のジッパータンパク質のような、ジッパードメインで会合した、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39ポリペプチド、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39ポリペプチドの細胞外ドメイン、または細胞外ドメインのIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39アンタゴニストの断片も含まれる。ジッパードメインの他の例は、酵母転写因子GCN4とラット肝臓に見出される熱安定性DNA結合タンパク質（C/EBP；Landschulzら，Science 243：1681，1989）、ヘテロ二量体を選好的に形成する、核のトランスフォーミングタンパク質、fosおよびjun（O'Sheaら，Science 245：646，1989；TurnerおよびTjian，Science 243：1689，1989）、およびマウス癌原遺伝子、c-mycの遺伝子産物（Landschulzら，Science 240：1759，1988）に見出されるものである。パラミクソウイルス、コロナウイルス、麻疹ウイルス、および多くのレトロウイルスが含まれるいくつかの異なるウイルスの融合産生（fusogenic）タンパク質もロイシンジッパードメインを保有する（BucklandおよびWild，Nature 338：547，1989；Britton，Nature 353：394，1991；DelwartおよびMosialos，AIDS Research and Human Retroviruses 6：703，1990）。ロイシンジッパードメインは、それが見出されるポリペプチドのオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、当初いくつかのDNA結合ポリペプチドにおいて同定され、以来、多様な異なるポリペプチドに見出されてきた。既知のロイシンジッパーには、二量体化するかまたは三量体化する、天然に存在するペプチドとその誘導体がある。ジッパードメイン（本明細書では、オリゴマー化ドメイン、またはオリゴマー形成ドメインとも呼ぶ）は、反復性の七個のリピートを含み、しばしば4または5のロイシン残基が他のアミノ酸で分散されている。ロイシンジッパーの使用とロイシンジッパーを使用するオリゴマーの製造は、当該技術分野でよく知られている。

20

30

40

【0134】

本発明は、スパーサーアミノ酸の連結基を有するかまたは有さない融合ポリペプチドを含む。例えば、2つの可溶性IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、I

50

L - 18BP、4 - 1BB、4 - 1BB - L、CD30、CD30 - L、OX40、OX40 - Lおよび/またはCD39ドメインは、(Gly)₄Ser(Gly)₅Ser(配列番号32)のように、米国特許第5,073,627号に記載されるリンカー配列で連結可能である。他のリンカー配列には、例えば、GlyAlaGlyGlyAlaGlySer(Gly)₅Ser(配列番号33)、(Gly₄Ser)₂(配列番号34)、(GlyThrPro)₃(配列番号35)、および(Gly₄Ser)₃Gly₄SerGly₅Ser(配列番号36)が含まれる。

【0135】

改変したグリコシル化部位、欠失または置換されたCys残基、または修飾されたタンパク分解切断部位を有する可溶性IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39ポリペプチドをコードする核酸配列、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39ポリペプチドのサブユニット、またはIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39の他のペプチドとの融合ポリペプチド、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39の対立遺伝子変異体、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39をコードする核酸配列、または、置換または追加のアミノ酸を有するペプチドをコードするものは、本発明による核酸配列の例である。

【0136】

遺伝暗号の縮重性により、同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列にはかなりの変異があり得る。態様には、中程度にストリンジェントな条件の下でハイブリダイズすることが可能な配列が含まれる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を及ぼす基本変数と適切な条件を考案するための手引きについては、Sambrook, Fritsch, およびManiatis(1989,「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、9章および11章；および「分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」1995, Ausubelら、監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ社、セクション2.10および6.3-6.4)に示されていて、例えば、DNAの長さおよび/または塩基組成に基づいて、当業者により容易に決定可能である。中程度にストリンジェントな条件を達成する1つの方法は、5×SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA(pH8.0)を含有する前洗浄溶液、約50%のホルムアミド、6×SSCのハイブリダイゼーション緩衝液、および約55のハイブリダイゼーション温度(または、約42のハイブリダイゼーション温度を伴う、約50%のホルムアミドを含有するものなどの、他の類似のハイブリダイゼーション溶液)、並びに約60、0.5×SSC、0.1% SDS中の洗浄条件の使用を伴う。一般的に、高ストリンジェント条件は、上記のようなハイブリダイゼーション条件として、およそ68、0.2×SSC、0.1% SDSでの洗浄を伴うと定義される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液では、SSC(1×SSCは、0.15M NaClおよび15mMクエン酸ナトリウムである)にSSPE(1×SSPEは、0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄、および1.25mM EDTA、pH7.4である)を代用してよく、洗浄は、ハイブリダイゼーションが完了した後で

10

20

30

40

50

15分間行う。当業者に知られていて、以下にさらに記載するように、ハイブリダイゼーション反応と二本鎖安定性を支配する基本原理を適用することによって望ましい度合いのストリンジェンシーを達成するために洗浄温度と洗浄塩濃度を必要に応じて調整してよいと理解されるべきである（例えば、Sambrookら、1989を参照のこと）。核酸を未知配列の標的核酸へハイブリダイズさせる場合、ハイブリッドの長さは、ハイブリダイズする核酸のそれであると仮定される。既知配列の核酸がハイブリダイズする場合、ハイブリッドの長さは、核酸の配列を並列し、最適な配列相補性のある単数または複数の領域を同定することによって決定可能である。50塩基対未満の長さであると予測されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度（ T_m ）より5～10低くなくならず、ここで T_m は、以下の等式により決定される。長さが18塩基対未満のハイブリッドでは、 $T_m(\text{℃}) = 2(A + T \text{塩基数}) + 4(G + C \text{塩基数})$ 。長さが18塩基対を超えるハイブリッドでは、 $T_m(\text{℃}) = 81.5 + 16.6(\log_{10} [Na^+]) + 0.41(G + C\%) - (600/N)$ であり、ここで、Nはハイブリッド中の塩基数であり、そして $[Na^+]$ は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオン濃度である（1xSSCの $[Na^+] = 0.165M$ ）。好ましくは、こうしたハイブリダイズする核酸は各々、少なくとも15ヌクレオチド（または、より好ましくは、少なくとも18ヌクレオチド、または少なくとも20ヌクレオチド、または少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも30ヌクレオチド、または少なくとも40ヌクレオチド、または最も好ましくは少なくとも50ヌクレオチド）、またはそれがハイブリダイズする本発明の核酸の長さの少なくとも25%（より好ましくは少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、そして最も好ましくは少なくとも80%）である長さを有し、それがハイブリダイズする本発明の核酸と少なくとも60%（より好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、または少なくとも99%、そして最も好ましくは少なくとも99.5%）の配列同一性を有し、ここで配列同一性は、上記により詳しく記載されるように、配列ギャップを最小化しながら重複部分と同一性を最大化するように並列したときにハイブリダイズする核酸の配列を比較することによって決定される。

【0137】

代わりの態様において、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39のポリヌクレオチドには、上記と配列リストに示すネイティブまたは少なくとも80%のポリペプチド配列のアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも75%、または少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるポリペプチドをコードするものが含まれる。IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39の断片をコードするポリヌクレオチドについて、断片のパーセント同一性は、全長のIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39のポリペプチドの対応部分に対するパーセント同一性にそれぞれ基づく。

【0138】

ネイティブ配列の断片への連結を可能にする制限部位が隣接する突然変異配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することによって、突然変異を核酸へ導入可能である。連結の後で、生じる再構築配列は、望ましいアミノ酸挿入、置換、または欠失を有する変異体をコードする。

【0139】

あるいは、オリゴヌクレオチド指定の部位特異的な突然変異誘発法を利用して、要求さ

れる置換、欠失、または挿入にしたがって改変される特別なコドンをも有する改変遺伝子を提供してよい。上記に示す改変を作製する例示の方法は、Walderら (Gene 42:133, 1986); Bauerら (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, 1985年1月, 12-19); Smithら (「遺伝子工学：原理と方法 (Genetic Engineering: Principles and Methods)」, プレナム・プレス、1981) に開示され; そして米国特許第4,518,584号および4,737,462号は好適な技術を開示し、参照により本明細書に組み込まれる。

【0140】

アミノ酸残基または配列の様々な付加または置換、または生物学的活性に必要とされない末端または内部の残基または配列の欠失を含んでなるIL-17受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が調製可能である。例えば、N-グリコシル化部位を、グリコシル化を排除するように修飾することが可能であり、酵母発現系を使用して、均質な、炭水化物が低減した変異体の発現を可能にする。真核ポリペプチド中のN-グリコシル化部位は、アミノ酸の三つ組、Asn-X-Y (ここで、XはPro以外の任意アミノ酸であり、YはSerまたはThrである) を特徴とする。この三つ組をコードするヌクレオチド配列への適切な修飾は、Asn側鎖での炭水化物残基の付加を妨げる置換、付加または欠失をもたらすだろう。

【0141】

別の例において、Cys残基をコードする配列を改変して、Cys残基を欠失させるかまたは他のアミノ酸に置き換えて、再生時に不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止することができる。このように、Cys残基は、ポリペプチドの三次構造またはジスルフィド結合形成に影響を及ぼすことなく、別のアミノ酸で置き換えても欠失させてもよい。

【0142】

突然変異誘発の他のアプローチは、KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母系における発現を高めるために、二塩基性アミノ酸残基をコードする配列を修飾することを伴う。KEX2プロテアーゼ活性が存在する酵母系における発現を高めるために、隣接する二塩基性アミノ酸残基の修飾により他の変異体を調製する。EP212,914は、ポリペプチド中のKEX2プロテアーゼプロセッシング部位を不活性化するための部位特異的突然変異誘発の使用を開示する。残基を欠失、付加または置換することによってKEX2プロテアーゼプロセッシング部位を不活性化して、Arg-Arg、Arg-Lys、およびLys-Arg対を改変してこれら隣接塩基性残基の出現を消失させる。他のタンパク分解酵素により認識されて切断される部位をコードする配列に対して同様の修飾を行ってよい。IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39ポリペプチドのサブユニットは、生物学的活性に必要でない末端または内部の残基または配列をコードする配列を欠失させることによって構築可能である。以下に記載のような融合ポリペプチドをコードする配列は、追加のアミノ酸残基をコードする配列を本発明の配列へ生物学的活性に影響を及ぼすことなく連結することによって構築可能である。

【0143】

可溶性IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39の発現のために構築されるヌクレオチド配列における突然変異は、当然ながら、コード配列の読み枠フェーズを保存しなければならず、好ましくは、ハイブリダイズして、受容体mRNAの翻訳に不都合に影響を及ぼすループまたはヘアピンのようなmRNAの二次構造をもたらし得る相補領域を創出しない。突然変異部位は予め決定可能であるが、突然変異の種類そのものを予め決定することは必要でない。例えば、所与の部位での突然変異体の最適特性を選択するには、標的コドンでランダム突然変異誘発を行って、発現された突然変異ポリペプチドについて望ましい活性をスクリーニングすればよい。

【0144】

IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列における突然変異がすべて最終産物において発現されるわけではなく、例えば、主として、転写されるmRNAにおいて二次構造ループを回避するために、または選択宿主によってより容易に翻訳されるコドン（例えば、大腸菌（*E. coli*）発現でのよく知られた大腸菌選好コドン）を提供するために、ヌクレオチド置換を行って、発現を高めることが可能である。

【0145】

ゲノムにおいて、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-Lおよび/またはCD39ポリペプチドは、マルチエクソン遺伝子によりコードされる。さらに本発明には、転写に続く様々なmRNAスプライシングイベントに起因し得て、本明細書に開示されるcDNAと上記に定義されるような中程度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする選択的mRNA構築体が含まれる。

【0146】

H. IL-17、IL-18、4-1BB、CD30およびOX40アンタゴニストとしての抗体

IL-17、IL-18、4-1BB、CD30およびOX40のアンタゴニストには、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40またはOX40-Lへ特異的に結合する抗体が含まれる。より具体的には、IL-17アンタゴニストには、IL-17へ特異的に結合して、IL-17のIL-17受容体への結合を一部または完全に阻害する、IL-17に対して向けられる抗体、そしてIL-17受容体へ特異的に結合してそれ自身はIL-17受容体を活性化せずにIL-17の結合を阻害する、IL-17受容体に対して向けられる抗体が含まれ；IL-18アンタゴニストには、IL-18へ特異的に結合して、IL-18のIL-18Rへの結合を一部または完全に阻害する、IL-18に対して向けられる抗体；IL-18Rへ特異的に結合してそれ自身はIL-18Rを介したシグナルを伝達せずにIL-18の受容体結合を阻害する、IL-18Rに対して向けられる抗体が含まれ；4-1BBアンタゴニストには、4-1BBへ特異的に結合して、4-1BBの4-1BB-Lへの結合を一部または完全に阻害する、4-1BBに対して向けられる抗体；4-1BBへ特異的に結合してそれ自身は4-1BBを介したシグナルを伝達せずに4-1BB-Lの結合を阻害する、4-1BBに対して向けられる抗体が含まれ；CD30アンタゴニストには、CD30-Lへ特異的に結合して、CD30-LのCD30への結合を一部または完全に阻害する、CD30-Lに対して向けられる抗体；CD30へ特異的に結合してそれ自身はCD30を活性化せずにCD30-Lの結合を阻害する、CD30に対して向けられる抗体が含まれ；そして、OX40アンタゴニストには、OX40-Lへ特異的に結合して、OX40-LのOX40への結合を一部または完全に阻害する、OX40-Lに対して向けられる抗体；OX40へ特異的に結合してそれ自身はOX40を活性化せずにOX40-Lの結合を阻害する、OX40に対して向けられる抗体が含まれる。

【0147】

IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40またはOX40-L、並びに、上記に示すようなその断片、変異体、ムテイン、誘導体および融合タンパク質は、心臓血管疾患の診断および治療に使用可能である抗体を産生する場合の「免疫原」として利用可能である。IL-17、IL-18、4-1BB、CD30およびOX40のアンタゴニストを抗体の形式で作製する場合、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40またはOX40-Lへ言及されるときは、その断片、変異体、ムテイン、誘導体および融合

タンパク質も含まれると理解されたい。実施例 6 の表 3 に示すように、IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、OX 40、CD 30、CD 30 - L および CD 39 に対していくつかの抗体を作製した。

【0148】

IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 B P、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - L および CD 39 は、抗体の形成を誘発する抗原決定基またはエピトープを含有する。これらの抗原決定基またはエピトープは、直鎖でも、配座的（断続的）でもよい。直鎖エピトープがポリペプチドのアミノ酸の単一部分から構成されるのに対し、配座的または断続的エピトープは、ポリペプチドの折り畳みと同時に近傍へ集められる、ポリペプチド鎖の様々な領域からのアミノ酸部分からなる。エピトープは、当該技術分野で知られているいずれの方法によっても同定可能である。さらに、本発明のポリペプチド由来のエピトープは、研究試薬として、アッセイにおいて、そしてポリクローナル血清や培養ハイブリドーマ由来の上清のような物質から特異結合抗体を精製するために使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、ポリペプチドの化学的または酵素的切断のような当該技術分野で知られた技術を使用するか、または組換え DNA 技術を使用して産生可能である。

10

【0149】

IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 B P、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - L および CD 39 に対する抗体は、簡便には、上記に記載のタンパク質の組換え産生型に対して産生して、それぞれの配列同定子数において提供することができる。抗体である IL - 17、IL - 18、4 - 1 B B、CD 30 および OX 40 アンタゴニストには、限定されないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、Fab 発現ライブラリーにより産生される断片、抗イディオタイプ（抗 Id）抗体と、上記のいずれかのエピトープ結合断片が含まれる。こうした抗体は、心臓血管疾患を治療する方法に利用可能である。

20

【0150】

IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 B P、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - L および CD 39 に対するポリクローナルとモノクローナル抗体のいずれもが慣用技術により調製可能である。例えば、「モノクローナル抗体、ハイブリドーマ：生物学的解析の新次元（Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses）」Kennetら（監修）、プレナム・プレス、ニューヨーク（1980）；および、「抗体：実験マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual）」（Harlow および Land（監修）、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（1988）；Kohler および Milstein,（米国特許第 4,376,110 号）；ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術（Kosborら, Immunology Today 4:72, 1983；Coleら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026, 1983）；および、EBV - ハイブリドーマ技術（Coleら, 1985, 「モノクローナル抗体と癌療法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy）」アラン・R. リス社、77 - 96 頁）を参照のこと。

30

40

【0151】

ヒト化モノクローナル抗体を作製する方法はよく知られていて、例えば、米国特許第 5,585,089 号（タンパク設計：CL Queenら；「ヒト化免疫グロブリン（Humanized Immunoglobulins）」、米国特許第 5,565,332 号（「キメラ抗体の産生 - コンビナトリアルアプローチ（Production of Chimeric Antibodies - A Combinatorial Approach）」）、米国特許第 5,225,539 号（Med Res Council

50

l : G P Winter ; 「組換え改変抗体と改変抗体の作製法 (R e c o m b i n a n t A l t e r e d A n t i b o d i e s A n d M e t h o d s O f M a k i n g A l t e r e d A n t i b o d i e s) 」 、 米 国 特 許 第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 ~ 7 6 2 号 (タ ン パ ク 設 計 : C L Q u e e n ら ; 「 改 善 ヒ ト 化 免 疫 グ ロ ブ リ ン を コ ー ド する ポ リ ヌ ク レ オ チ ド (P o l y n u c l e o t i d e s E n c o d i n g I m p r o v e d H u m a n i z e d I m m u n o g l o b u l i n s) 」 、 お よ び 「 ヒ ト 化 免 疫 グ ロ ブ リ ン 」) 、 お よ び 米 国 特 許 第 5 , 3 3 0 , 1 0 1 号 (タ ン パ ク 設 計 : C L Q u e e n ら ; 「 ヒ ト 化 免 疫 グ ロ ブ リ ン 」) と こ れ ら の 引 用 文 献 に 記 載 の も の が 含 ま れ る 。

【 0 1 5 2 】

I L - 1 7 、 I L - 1 7 R 、 I L - 1 8 、 I L - 1 8 R 、 I L - 1 8 B P 、 4 - 1 B B 、 4 - 1 B B - L 、 C D 3 0 、 C D 3 0 - L 、 O X 4 0 、 O X 4 0 - L お よ び C D 3 9 に 特 異 的 な モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 を 産 生 す る ハ イ ブ リ ド ー マ 細 胞 系 も 本 明 細 書 で 考 慮 さ れ る 。 こ う し た ハ イ ブ リ ド ー マ は 、 慣 用 技 術 に よ り 産 生 し て 同 定 す る こ と が 可 能 で あ る 。 抗 体 の 産 生 の た め に 、 様 々 な 宿 主 動 物 を 、 免 疫 原 性 の あ る I L - 1 7 、 I L - 1 7 R 、 I L - 1 8 、 I L - 1 8 R 、 I L - 1 8 B P 、 4 - 1 B B 、 4 - 1 B B - L 、 C D 3 0 、 C D 3 0 - L 、 O X 4 0 、 O X 4 0 - L ま た は C D 3 9 の ポ リ ペ プ チ ド を 用 い た 注 射 に よ り 免 疫 化 す る こ と が で き る 。 こ う し た 宿 主 動 物 に は 、 限 定 さ れ ない が 、 い く つ か 挙 げ れ ば 、 ウ マ 、 ヤ ギ 、 ヒ ツ ジ 、 ウ シ 、 ウ サ ギ 、 マ ウ ス 、 お よ び ラ ッ ト を 含 め て よ い 。 免 疫 学 的 応 答 を 高 め る た め に 様 々 な ア ジ ュ バ ン ト が 使 用 可 能 で あ る 。 宿 主 の 種 に 依 存 し て 、 こ う し た ア ジ ュ バ ン ト に は 、 限 定 さ れ ない が 、 フ ロ イ ン ト (完 全 お よ び 不 完 全) ア ジ ュ バ ン ト 、 水 酸 化 ア ル ミ ニ ウ ム の よ う な 鉱 質 ゲ ル 、 リ ゾ レ シ チ ン の よ う な 界 面 活 性 物 質 、 プ ル ロ ニ ッ ク ポ リ オ ー ル 、 ポ リ ア ニ オ ン 、 ペ プ チ ド 、 オ イ ル エ マ ル ジ ョ ン 、 ア オ ガ イ ヘ モ シ ア ニ ン 、 ジ ニ ト ロ フ ェ ノ ー ル 、 並 び に B C G (カ ル メ ッ ト ゲ ラ ン 桿 菌) お よ び 坐 瘡 プ ロ ピ オ ン バ ク テ リ ウ ム (C o r y n e b a c t e r i u m p a r v u m) の よ う な 潜 在 的 に 有 用 な ヒ ト ア ジ ュ バ ン ト が 含 ま れ る 。 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 は 、 慣 用 技 術 に よ り 回 収 可 能 で あ る 。 こ う し た モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 は 、 I g G 、 I g M 、 I g E 、 I g A 、 I g D 、 お よ び そ の ど の サ ブ ク ラ ス も 含 ま れ る 、 い か なる 免 疫 グ ロ ブ リ ン の ク ラ ス で あ っ て も よ い 。 m A b を 産 生 す る ハ イ ブ リ ド ー マ は 、 i n v i t r o で も i n v i v o で も 培 養 可 能 で あ る 。 ま た は 、 抗 体 遺 伝 子 を ク ロ ー ニ ン グ し て 、 随 意 に 他 の や り 方 で 改 変 し て 、 例 え ば C H O 細 胞 の よ う に 、 タ ン パ ク 医 薬 品 の 組 換 え 産 生 が 承 認 さ れ て い る 別 の 細 胞 系 に お い て 発 現 さ せ て よ い 。

【 0 1 5 3 】

あ る い は 、 抗 体 断 片 の ラ イ ブ ラ リ ー に つ い て ス ク リ ー ニ ン グ し て 、 組 換 え 技 術 に よ り ヒ ト 抗 体 を 開 発 す る た め に 使 用 し て よ い 。 こ う し た ラ イ ブ ラ リ ー は 、 例 え ば 、 ケ ン ブ リ ッ ジ 抗 体 テ ク ノ ロ ジ ー (メ ル ボ ル ン 、 イ ギ リ ス) 、 お よ び M o r p h o s y s (ミ ュ ン ヘ ン 、 ド イ ツ) よ り 市 販 さ れ て い る 。

【 0 1 5 4 】

さ ら に 、 適 切 な 抗 原 特 異 性 の あ る マ ウ ス 抗 体 分 子 由 来 の 遺 伝 子 を 、 適 切 な 生 物 学 的 活 性 の あ る ヒ ト 抗 体 分 子 由 来 の 遺 伝 子 と 一 緒 に ス プ ラ イ シ ン グ す る こ と に よ る 「 キ メ ラ 抗 体 」 (T a k e d a ら , N a t u r e , 3 1 4 : 4 5 2 , 1 9 8 5) の 産 生 の た め に 開 発 さ れ た 技 術 も 使 用 可 能 で あ る 。 キ メ ラ 抗 体 は 、 ブ タ m A b 由 来 の 可 変 領 域 と ヒ ト 免 疫 グ ロ ブ リ ン 定 常 領 域 を 有 す る も の の よ う に 、 異 な る 部 分 が 異 な る 動 物 種 に 由 来 す る 分 子 で あ る 。 本 発 明 の モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 に は ま た 、 マ ウ ス モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 の ヒ ト 化 バ ー ジ ョ ン も 含 ま れ る 。 こ う し た ヒ ト 化 抗 体 は 既 知 の 技 術 に よ り 調 製 可 能 で あ り 、 該 抗 体 を ヒ ト へ 投 与 す る と き に 、 低 減 し た 免 疫 原 性 と い う 利 点 を 提 供 し 得 る 。 例 え ば 、 1 以 上 の ヒ ト 免 疫 グ ロ ブ リ ン 鎖 を コ ー ド す る 遺 伝 物 質 を 導 入 し た ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク マ ウ ス が 利 用 可 能 で あ る 。 こ う し た マ ウ ス は 、 様 々 な や り 方 で 遺 伝 的 に 改 変 可 能 で あ る 。 こ の 遺 伝 子 操 作 に よ り 、 免 疫 化 の と き に 動 物 が 産 生 す る 少 な く と も い く つ か の (好 ま し く は ほ と ん ど す べ て の) 抗 体 中 の 内 因 性 免 疫 グ ロ ブ リ ン 鎖 に 置 き 換 わ る 、 ヒ ト 免 疫 グ ロ ブ リ ン ポ リ ペ プ チ ド 鎖 を も た ら す こ と が で き る 。 キ メ ラ 抗 体 と さ ら に 工 学 処 理 さ れ る モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 の 産 生 の 方 法 に は

、Riechmannら(Nature 332:323, 1988)、Liur(PNAS 84:3439, 1987)、Larrickら(Bio/Technology 7:934, 1989)および、WinterおよびHarris(TIPS 14:139, Can, 1993)に記載されるものが含まれる。抗体をトランスジェニックに生成する方法は、GB2, 272, 440、米国特許第5, 569, 825号および5, 545, 806号と、それより優先権を主張する関連特許に見出すことが可能であり、これらはいずれも参照により本明細書に組み込まれる。ヒトでの使用では、抗体は、典型的にはヒトであるかまたはヒト化され、こうしたヒト抗体を創出する技術も知られている。ヒト抗体を作製するためのトランスジェニック動物は、例えば、メダレクス(Medarex)社(ニュージャージー州プリンストン)、プロテイン・デザイン・ラボ(Protein Design Labs)社(カリフォルニア州フレモント)およびアブジェニクス(Abgenix)社(カリフォルニア州フレモント)より市販されている。

【0155】

ヒト化免疫グロブリン配列の細菌宿主における発現を使用して、CDR領域を突然変異誘発させること、そしてIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39へ結合する高いアフィニティーおよび/または高い特異性を保有するヒト化免疫グロブリンCDR変異体をスクリーニングすることができる。バクテリオファージのディスプレイライブラリーを産生することによって、より高いアフィニティーのヒト化免疫グロブリン配列を選択することができる。そのようなアフィニティー鋭敏化の1つの潜在的な利点は、改善された結合アフィニティー、および/またはそれらに対して産生した分子以外の分子との低下した交差反応性を有するヒト化免疫グロブリンCDR変異体の生成である。免疫グロブリン可変領域配列を有するファージディスプレイライブラリーを産生する方法が当該技術分野において提供される(例えば、Cesareni, FEB S Lett 307:66, 1992; Swimmerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3756, 1992; Gramら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576, 1992; Clacksonら, Nature 352:624, 1991; ScottおよびSmith, Science 249:386, 1990; Garrardら, Bio/Techniques 9:1373, 1991を参照のこと;これらは、すべての目的のために、参照により本明細書にそのまま組み込まれる)。生じるアフィニティー鋭敏化CDR変異体のヒト化免疫グロブリン配列を好適な宿主において引き続き発現させる。

【0156】

特異エピトープを認識する抗体断片は、既知の技術により生成可能である。例えば、こうした断片には、限定されないが、抗体分子のペプシン消化により産生可能であるF(ab')₂断片と、このF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成可能であるFab断片が含まれる。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築し(Huseら, Science, 246:1275, 1989)、望ましい特異性をもったモノクローナルFab断片の迅速かつ容易な同定を可能にしてよい。単鎖抗体の産生について記載される技術(米国特許第4, 946, 778号; Bird, Science 242:423, 1988; Hustonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988;およびWardら, Nature 334:544, 1989)も、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39のアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する単鎖抗体を産生するために適用可能である。さらに、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39ポリペプチドへの抗体はまた、当業者によく知られた技術を使用して、抗イデオ種類抗体を生成するために利用可能である(例えば、GreenspanおよびBona, FASEB J 7(5):437, 1993;およびNissinoff,

J. Immunol. 147(8):2429, 1991を参照のこと)。

【0157】

I. 核酸をベースとするIL-17、IL-18、4-1BB、CD30およびOX40アンタゴニスト

代わりの態様において、例えば、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39のmRNA転写物の翻訳を阻害するかまたは防止するためのアンチセンスまたはリボザイムアプローチ；IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39の遺伝子の転写を阻害するための三重らせんアプローチ；またはIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39の遺伝子またはその内因性プロモーターを不活性化するかまたは「ロックアウト」するための標的指向性相同的組換えを使用して、内因性IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39の遺伝子発現のレベルを低下させるように、核酸をベースとする免疫療法を設計することができる。

【0158】

アンチセンスRNAおよびDNA分子は、標的化mRNAへハイブリダイズしてポリペプチド翻訳を妨げることによってmRNAの翻訳を直接遮断するように作用する。アンチセンスアプローチは、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39のポリヌクレオチド配列を有するmRNAへ相補的であるオリゴヌクレオチド(DNAまたはRNAのいずれか)の設計を伴う。絶対的な相補性は、好ましいものの、必須ではない。本明細書に言及されるような、RNAの一部へ「相補的な」配列は、RNAとハイブリダイズして、それにより安定的な二本鎖を形成することが可能であるほどに十分な相補性を有する配列を意味する。メッセージの5'末端、例えば、AUG開始コドンまで、およびそれが含まれる5'非翻訳配列に相補的であるオリゴヌクレオチドは、翻訳を阻害するのに最も効率的に作用するはずである。しかしながら、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39遺伝子転写物の5'または3'-非翻訳、非コード領域のいずれかへ相補的なオリゴヌクレオチドも、内因性IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39の翻訳を阻害するアンチセンスアプローチに使用可能である。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドには、AUG開始コドンの相補体が含まれるはずである。アンチセンス核酸は、少なくとも6つのヌクレオチドの長さであるべきであり、好ましくは、6~約50のヌクレオチドの長さに及ぶオリゴヌクレオチドである。該オリゴヌクレオチドは、DNAまたはRNA、またはそのキメラ混合物、または誘導体、または修飾バージョンであってよく、一本鎖または二本鎖であってよい。オリゴヌクレオチドは、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、などを向上させるために、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で修飾可能である。オリゴヌクレオチドには、ペプチド(例えば、宿主細胞受容体をin vivoで標的指向するための)、または細胞膜を通過する輸送を促進する薬剤(例えば、Lettingerら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaîtreら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT公開公報番号WO 88/09810, 1988年12月15日公開を参照のこと)、またはハイブリダイゼーション誘発切断剤、または挿入剤(例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549を参照のこと)のような、他の付随基が含まれる場合がある。

【0159】

アンチセンス分子は、IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 B P、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - LまたはCD 39のポリヌクレオチド配列を有する転写物をin vivoで発現する細胞へ、例えば、組織または細胞の誘導部位へ直接注射することによるか、または望ましい細胞へ標的指向するように設計された修飾アンチセンス分子（例えば、標的細胞表面上で発現される受容体または抗原へ特異的に結合するペプチドまたは抗体へ連結したアンチセンス）の使用により送達され、全身的に投与可能である。別のアプローチは、組換えDNA構築体を活用し、ここでは、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを強いpol IIIまたはpol IIプロモーターの制御下に置く。こうした構築体を使用して被検者の標的細胞をトランスフェクトすると、十分な量の一本鎖RNAの転写を生じ、これが内因性IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 B P、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - LまたはCD 39転写物と相補的な塩基対を形成し、それによりIL - 17 mRNAの翻訳を妨げる。例えば、あるベクターを、細胞に取り込まれ、アンチセンスRNAの転写を指令するようにin vivoで導入することが可能である。こうしたベクターは、転写されて望ましいアンチセンスRNAを産生することが可能である間は、エピソームで留るか、または染色体に組み込まれる場合がある。ベクターは、プラスミド、ウイルス、または当該技術分野で知られた他のものであってよく、哺乳動物細胞における複製および発現に使用可能である。

10

【0160】

IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 B P、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - LまたはCD 39のポリヌクレオチド配列を有するmRNA転写物を触媒的に切断するように設計されたリボザイム分子は、IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 B P、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - LまたはCD 39 mRNAの翻訳を妨げる（例えば、PCT国際公開公報WO 90 / 11364、1990年10月4日公開；米国特許第5,824,519号を参照のこと）。リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼに類似したやり方で他の一本鎖RNAを特異的に切断する能力を保有するRNA分子である。このアプローチの主要な利点は、それらが配列特異的であるので、特別な配列のあるmRNAだけが不活性化されることである。リボザイムの2つの基本型、即ち、テトラヒメナ型（Hasselhoff, Nature, 334: 585 - 591, 1988）と「ハンマーヘッド」型がある。テトラヒメナ型リボザイムが4つの塩基の長さである配列を認識するのに対し、「ハンマーヘッド」型リボザイムは、11～18塩基の長さの塩基配列を認識する。認識配列が長いほど、その配列が標的mRNA種においてのみ出現する可能性が高くなる。必然的に、ハンマーヘッド型リボザイムはテトラヒメナ型リボザイムより好ましい。

20

30

【0161】

アンチセンスアプローチと同じように、リボザイムは（例えば、安定性の向上、標的指向性、などのために）修飾オリゴヌクレオチドから構成される可能性がある。典型的な送達の方法は、強い構成的pol IIIまたはpol IIプロモーターの制御下にリボザイムを「コードする」DNA構築体を使用することを伴う。そうすると、トランスフェクトされた細胞は、内因性IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 B P、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - LまたはCD 39のメッセージを壊し、翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを産生するだろう。リボザイムは、アンチセンス分子と違って触媒的なので、より低い細胞内濃度が効率のために必要とされる。

40

【0162】

あるいは、標的遺伝子の調節領域（即ち、標的遺伝子のプロモーター、および/またはエンハンサー）に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列に標的指向して、標的IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 B P、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - LまたはCD 39遺伝子の転写

50

を妨げる三重らせん構造を形成することによって、内因性 IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 BP、4 - 1 BB、4 - 1 BB - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - L または CD 39 の発現が抑制可能である（一般的には、Helene, 1991, Anticancer Drug Des., 6 (6), 569 - 584; Heleneら, 1992, Ann. N. Y. Acad. Sci., 660: 27 - 36; および Maher, 1992, Bioassays 14 (12), 807 - 815 を参照のこと）。

【0163】

本発明のアンチセンス RNA および DNA、リボザイム、および三重らせんの分子は、DNA および RNA 分子の合成について当該技術分野で知られているどの方法によって製造してもよく、これらには、例えば、固相ホスホロアミダイト化学合成（例えば、バイオリサーチ、アプライド・バイオシステムズ、などより市販されているような自動化 DNA 合成機の使用による）のような、オリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学合成する技術が含まれる。例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Steinら, 1988, Nucl. Acids Res. 16: 3209 の方法により合成可能である。メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御孔ガラスポリマー支持体の使用により製造可能である（Sarinら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 7448 - 7451）。あるいは、RNA 分子は、アンチセンス RNA 分子をコードする DNA 配列の *in vitro* および *in vivo* 転写により生成可能である。こうした DNA 配列は、T7 または SP6 ポリメラーゼプロモーターのような好適な RNA ポリメラーゼプロモーターを取り込む多種多様なベクターへ取り込むことが可能である。あるいは、使用するプロモーターに依存してアンチセンス RNA を構成的または誘導的に合成するアンチセンス cDNA 構築体を細胞系へ安定的に導入してよい。

【0164】

代わりの態様において、IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 BP、4 - 1 BB、4 - 1 BB - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - L または CD 39 の発現は、RNA 干渉（RNAi）としても知られる、二本鎖 RNA 誘導性の遺伝子沈黙化のような翻訳後遺伝子沈黙化によって阻止可能である。IL - 17、IL - 17 R、IL - 18、IL - 18 R、IL - 18 BP、4 - 1 BB、4 - 1 BB - L、CD 30、CD 30 - L、OX 40、OX 40 - L または CD 39 の RNA 配列は、療法使用のために二本鎖配列または短いヘアピン RNA を提供するように修飾可能である。

【0165】

J. IL - 17、IL - 18、4 - 1 BB、CD 30 および OX 40 アンタゴニストのスクリーニング

IL - 17、IL - 18、4 - 1 BB、CD 30 および OX 40 アンタゴニストは、ハイスループット試験系のような、当該技術分野で知られたスクリーニングアッセイを使用して評価可能である。アッセイは、タンパク質 - タンパク質結合アッセイ、競合結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、細胞をベースとするアッセイ、などが含まれる多様なフォーマットにおいて実施可能である。明快さのために、以下の例は、IL - 17 および IL - 17 R に関連した例示のアッセイについて記載し、それ故に例示的であって、限定的ではない。同じアッセイフォーマットと根底のラショナルは、それぞれのアンタゴニストをスクリーニングするための IL - 18: IL - 18 R、4 - 1 BB - L: 4 - 1 BB、CD 30 - L: CD 30 および OX - 40 L: OX 40 相互作用へ等しく適用可能である。

【0166】

様々な結合アッセイにおける IL - 17 と IL - 17 受容体の間の相互作用や、機能試験と細胞をベースとするスクリーニングにおける IL - 17 / IL - 17 受容体仲介性活性に及ぼす IL - 17 アンタゴニストの効果を観察することによって、IL - 17 と IL

- 17 受容体の間の相互作用を阻害するので潜在的な治療薬となる分子を同定する。IL - 17 が IL - 17 受容体へ結合すること、したがって、IL - 17 の活性化を一部または完全に阻害する IL - 17 アンタゴニストは、心臓血管疾患の治療において免疫抑制薬または抗炎症剤として有用であり得る。

【0167】

IL - 17 および IL - 17 受容体の相互作用を阻害するその能力を IL - 17 アンタゴニストについてスクリーニングするために使用可能であるスクリーニングアッセイの1つの態様は、IL - 17 タンパク質、IL - 17 受容体タンパク質、および試験化合物（即ち、推定 IL - 17 アンタゴニスト）を含んでなる組成物を形成する工程；IL - 17 タンパク質、IL - 17 受容体タンパク質の相互作用のレベルをアッセイする工程；並びに、試験化合物の存在下で得られるレベルを試験化合物の非存在下で得られるレベルと比較する工程を含み、そのようにして、得られるレベルが異なれば、IL - 17 および IL - 17 受容体の相互作用に影響を及ぼす化合物を同定する。代替の態様において、IL - 17 または IL - 17 受容体の少なくとも1つを検出可能な部分で標識可能である。代替の態様において、IL - 17 または IL - 17 受容体の一方は可溶性であり、他方は結合性であり得るが、代替のアッセイフォーマットも可能であり、よく知られている。試験化合物を組成物へ加えるのは、IL - 17 および IL - 17 受容体を加えた後でも、両タンパク質を加える前でも、一方のタンパク質を加えた後で他方を加える前でもよい。

【0168】

別の側面において、スクリーニング方法は、試験化合物、IL - 17 タンパク質、および IL - 17 受容体を発現する細胞を含んでなる組成物を形成すること；組成物中の IL - 17 受容体に対する IL - 17 の生物学的活性のレベルを決定すること；並びに、この生物学的活性のレベルを試験化合物の非存在下に生じるものと比較することを含み、ここで生物学的活性のレベルにおける差異は、試験化合物が IL - 17 / IL - 17 受容体複合体の生物学的活性に影響を及ぼすことを示す。IL - 17 受容体に対する IL - 17 の生物学的活性は、幾通りのやり方でアッセイしてもよく、例えば、限定されないが、細胞内タンパク質のリン酸化状態（即ち、IL - 17 による IL - 17 受容体の活性化）を判定すること；IL - 6、IL - 8、単球化学誘引タンパク質 - 1 および G r o のような好炎症因子の産生を判定すること；G - C S F および G M - C S F および IL - 8 のような造血性サイトカインの産生を判定すること；および、IL - 1 および T N F - の増加した発現を判定すること、並びにマクロファージにおける i N O S の誘導を測定することが含まれる。

【0169】

潜在的な IL - 17 アンタゴニストの同定用アッセイの特別な例は競合アッセイであり、これは、競合アッセイに適した条件の下で IL - 17 受容体と IL - 17 および IL - 17 受容体特異的アンタゴニストを組み合わせる。結合を測定してアンタゴニストの有効性を判定することができるよう、IL - 17 または IL - 17 受容体特異的アンタゴニストのいずれか一方を標識してよい。標識は、直接または間接の手段による検出を可能にする。直接手段には、限定されないが、蛍光、放射活性、光学、または電子密度が含まれる。間接手段には、限定されないが、酵素またはエピトープタグが含まれる。

【0170】

IL - 17 と IL - 17 受容体の間の相互作用を阻害する IL - 17 アンタゴニストを同定可能である別の方法は固相法であり、ここでは、IL - 17 受容体が結合型であり、標識化 IL - 17 のある媒体に入れる。IL - 17 と IL - 17 受容体の間の相互作用により産生されるシグナルの量を試験化合物の存在下と非存在下で測定する。対照に比較したシグナルのレベルの減少は、試験化合物が IL - 17 と IL - 17 受容体の間の相互作用を阻害したことを示す。対照に比較したシグナルのレベルの増加は、候補分子が IL - 17 と IL - 17 受容体の間の相互作用を促進することを示す。代替の態様において、IL - 17 が結合型であり、IL - 17 受容体を標識してよい。IL - 17 アンタゴニスト、IL - 17 受容体および / または IL - 17 タンパク質は、直接的または間接的に標

識してよい。例えば、タンパク質が組換え的に産生されるならば、可溶性、標識化、固定化および／または検出を促進することができる融合タンパク質を工学処理してよい。これらの方法を促進する融合タンパク質には、限定されないが、可溶性 Ig テール融合タンパク質と His タグ付きタンパク質を含めてよい。こうした可溶性 Ig テール融合タンパク質を工学処理する方法は、当業者によく知られている。例えば、米国特許第 5, 116, 964 号と以下に記載の例示の態様を参照のこと。間接的な標識化は、アッセイの成分へ特異的に結合する、標識抗体のようなタンパク質の使用を伴う。

【0171】

IL - 17、IL - 18、4 - 1BB、CD30 および OX40 アンタゴニストは、心臓および血管組織より誘導される細胞および／または細胞系を使用して、同定および評価可能である。例えば、心筋細胞とその細胞系は、本明細書に記載の好適なアッセイのいずれにおいても IL - 17、IL - 18、4 - 1BB、CD30 および OX40 アンタゴニストを評価するために使用可能である。細胞生存；肥大性の応答；および／または低酸素または環境ストレスに応答した ANP および／または BNP の産生のような、心筋細胞（または他の細胞）をベースとするアッセイにおける生物学的に関連した読出し情報は、潜在的なアンタゴニストを評価するために使用可能である。

10

【0172】

IL - 17、IL - 18、4 - 1BB、CD30 および OX40 アンタゴニストはまた、シンチレーション近似アッセイ (Udenfriendら, 1985, Proc Natl Acad Sci USA 82: 8672 - 8676)、酵母ツーハイブリッドまたは相互作用トラップアッセイ、均一時間分割蛍光法 (Parkら, 1999, Anal Biochem 269: 94 - 104)、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 法 (Clegg RM, 1995, Curr Opin Biotechnol 6: 103 - 110)、または、例えばバイアコア AB (ウプサラ、スウェーデン) により供給されるようなバイオセンサーを使用して、結合したポリペプチドが潜在的な結合パートナーへ曝露されるときに表面プラズモン共鳴の変化を測定する方法といった、ハイスループットスクリーニング法によく適している方法を使用して、同定可能である。

20

【0173】

アッセイ可能であり、IL - 17、IL - 18、4 - 1BB、CD30 および OX40 アンタゴニストでもあり得る化合物には、限定されないが、シグマ - アルドリッチ (ミズーリ州セントルイス)、Arqule (マサチューセッツ州ウォバーン)、Enzyme d (アイオワ州アイオワシティ)、メイブリッジケミカル社 (トレヴィレット、コーンウォール、イギリス)、MDS Panlabs (ワシントン州ボセル)、Pharmacopeia (ニュージャージー州プリンストン)、および Trega (カリフォルニア州サンディエゴ) のような企業から、多量のコンビナトリアルケミストリー化合物「ライブラリー」の一部としてよく市販されているような、低有機分子が含まれる。これらのアッセイを使用するスクリーニングに好ましい低有機分子は、通常 10 K 未満の分子量であり、細胞浸透を高め、分解に抵抗し、および／またはその生理学的半減期を延長させるいくつかの物理化学的および薬理学的特性を保有する場合がある (Gibbs, J., 1994, 「分子腫瘍学における製薬研究 (Pharmaceutical Research in Molecular Oncology)」Cell 79 (2): 193 - 198)。天然産物、無機化学品、および、タンパク質および毒素のような生物学的活性物質が含まれる化合物についても、IL - 17、IL - 18、4 - 1BB、CD30 および OX40 アンタゴニストとして役立つための結合する能力について上記の方法を使用してアッセイ可能である。

30

40

【0174】

IL - 17: IL - 17R、IL - 18: IL - 18R、4 - 1BB - L: 4 - 1BB、CD30 - L: CD30 および／または OX - 40 L: OX40 相互作用、それ故に細胞間情報伝達、細胞刺激、または免疫細胞活性に拮抗することは、IL - 17、IL - 18、4 - 1BB、CD30 および OX40 アンタゴニストによって操作して、これらの活

50

性を標的細胞において制御することが可能である。例えば、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30およびOX40アンタゴニスト、またはIL-17、IL-18、4-1BB、CD30およびOX40アンタゴニストをコードする核酸を細胞または細胞の集団へ投与して、IL-17：IL-17R、IL-18：IL-18R、4-1BB-L：4-1BB、CD30-L：CD30および/またはOX-40L：OX40の結合を阻止して、それにより標的細胞における細胞情報伝達、細胞刺激、または活性を抑制または停止させることが可能である。こうしたアッセイにおいて、IL-17：IL-17R、IL-18：IL-18R、4-1BB-L：4-1BB、CD30-L：CD30および/またはOX-40L：OX40結合の存在下での情報伝達または細胞刺激の割合を決定してから、こうした情報伝達または細胞刺激がIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストの存在下で改変するかどうかを決定可能である。本発明のこの側面の代表的なアッセイには、サイトカイン分泌アッセイ、T細胞副刺激アッセイ、および、抗原提示細胞およびT細胞が関与する混合リンパ球反応が含まれる。これらのアッセイは、当業者によく知られている。

10

【0175】

IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストは、サイトカイン、細胞増殖（誘導するかまたは阻害する）、または細胞分化（誘導するかまたは阻害する）の活性を調節可能であるか、またはある細胞集団では他のサイトカインの産生を誘導可能である。今日までに発見された多くのポリペプチド因子が1以上の因子依存型細胞増殖アッセイにおいてこうした活性を示したので、このアッセイは、細胞刺激活性の簡便な確認法として役立つ。IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストの活性は、限定なしに、NF- κ B、32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BaF3、MC9/G、M+（プレB M+）、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTLL2、TF-1、Mo7e、およびCMKが含まれる細胞系についての、いくつかのルーチン因子依存型細胞増殖アッセイのいずれか1つにより裏付けることができる。

20

【0176】

IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストの活性は、とりわけ、以下の方法により測定可能である：

受容体-リガンド活性のアッセイには、限定なしに、「免疫学の最新プロトコル（Current Protocols in Immunology）」Coliganら、監修、グリーン・パブリッシング・アソシエーツおよびウィリー・インターサイエンス（第7.28章、静的条件下での細胞接着の測定、7.28.1-7.28.22）；Takaiら、PNAS USA 84：6864-6868，1987；Biererら、J. Exp. Med. 168：1145-1156，1988；Rosensteinら、J. Exp. Med. 169：149-160，1989；Stoltenborgら、J. Immunol. Methods 175：59-68，1994；Stittら、Cell 80：661-670，1995に記載されるものが含まれる。

30

【0177】

T細胞または胸腺細胞増殖のアッセイには、限定なしに、「免疫学の最新プロトコル（Current Protocols in Immunology）」Coliganら、監修、グリーン・パブリッシング・アソシエーツおよびウィリー・インターサイエンス（3.1-3.19頁：マウス白血球機能のin vitroアッセイ；第7章、ヒトの免疫学的試験）；Takaiら、J. Immunol. 137：3494-3500，1986；Bertagnoliら、J. Immunol. 145：1706-1712，1990；Bertagnoliら、Cellular Immunology 133：327-341，1991；Bertagnoliら、J. Immunol. 149：3778-3783，1992；Bowmanら、J. Immunol. 152：1756-1761，1994に記載されるものが含まれる。

40

【0178】

50

脾臓細胞、リンパ節細胞、または胸腺細胞のサイトカイン産生および/または増殖のアッセイには、限定なしに、「免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」Coliganら、監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント中、KruisbeekおよびShevach, 1994「ポリクローナルT細胞刺激 (Polyclonal T cell stimulation)」第1巻、3.12.1-3.12.14頁; および「免疫学の最新プロトコル」Coliganら、監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント中、Schreiber, 1994「マウスおよびヒトの - インターフェロンの測定 (Measurement of mouse and human Interferon)」第1巻、6.8.1-6.8.8頁に記載されるものが含まれる。

10

【0179】

造血細胞およびリンパ生成細胞の増殖および分化についてのアッセイには、限定なしに、「免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」Coliganら、監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント中、Bottomlyら、1991「ヒトおよびマウスのインターロイキン - 2およびインターロイキン - 4の測定 (Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4)」第1巻、6.3.1-6.3.12頁; deVriesら, J Exp Med 173:1205-1211, 1991; Moreauら, Nature 336:690-692, 1988; Greenbergerら, Proc Natl Acad Sci USA 80:2931-2938, 1983; 「免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」Coliganら、監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント中、Nordan, 1991「マウスおよびヒトのインターロイキン - 6の測定 (Measurement of mouse and human interleukin 6)」第1巻、6.6.1-6.6.5頁; Smithら, Proc Natl Acad Sci USA 83:1857-1861, 1986; 「免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」Coliganら、監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント中、Bennettら, 1991「ヒトインターロイキン - 11の測定 (Measurement of human interleukin 11)」第1巻、6.15.1頁; 「免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」Coliganら、監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント中、Ciarlettaら, 1991「マウスおよびヒトのヒトインターロイキン - 9の測定 (Measurement of mouse and human interleukin 9)」第1巻、6.13.1頁に記載されるものが含まれる。

20

30

【0180】

抗原に対するT細胞クローン応答のアッセイ(とりわけ、T細胞の効果を指令するだけでなくAPC-T細胞相互作用に影響を及ぼすポリペプチドを、増殖とサイトカイン産生を測定することによって同定するもの)には、限定なしに、「免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」Coliganら、監修、グリーン・パブリッシング・アソシエーツおよびウィリー・インターサイエンス(第3章、マウス白血球機能のin vitroアッセイ; 第6章、サイトカインとその細胞受容体; 第7章、ヒトの免疫学的試験); Weinbergerら, PNAS USA 77:6091-6095, 1980; Weinbergerら, Eur. J. Immun. 11:405-411, 1981; Takaiら, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takaiら, J. Immunol. 140:508-512, 1988に記載されるものが含まれる。

40

【0181】

胸腺細胞または脾臓細胞の細胞傷害性のアッセイには、限定なしに、「免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」Co

50

liganら, 監修、グリーン・パブリッシング・アソシエーツおよびウィリー・インターサイエンス(第3章、マウス白血球機能の *in vitro* アッセイ、3.1-3.19; 第7章、ヒトの免疫学的試験); Herrmannら, PNAS USA 78:2488-2492, 1981; Herrmannら, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handaら, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takaiら, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takaiら, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Herrmannら, PNAS USA 78:2488-2492, 1981; Herrmannら, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handaら, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takaiら, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bowmanら, J. Virology 61:1992-1998; Takaiら, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnoliら, Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brownら, J. Immunol. 153:3079-3092, 1994に記載されるものが含まれる。

10

【0182】

T細胞依存性免疫グロブリン応答およびアイソタイプスイッチングについてのアッセイ(とりわけ、T細胞依存性抗体応答を変調させて、Th1/Th2プロフィールに影響を及ぼすポリペプチドを同定するもの)には、限定なしに、Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033, 1990; および「免疫学の最新プロトコル(Current Protocols in Immunology)」Coliganら, 監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、トロント中、MondおよびBrunswick, 1994「B細胞機能のアッセイ: *in vitro* 抗体産生(Assays for B cell function: *in vitro* antibody production)」第1巻、3.8.1-3.8.16頁に記載されるものが含まれる。

20

【0183】

混合リンパ球反応(MLR)のアッセイ(とりわけ、Th1およびCTLの応答を主に産生するポリペプチドを同定するもの)には、限定なしに、「免疫学の最新プロトコル(Current Protocols in Immunology)」Coliganら, 監修、グリーン・パブリッシング・アソシエーツおよびウィリー・インターサイエンス(第3章、マウス白血球機能の *in vitro* アッセイ、3.1-3.19; 第7章、ヒトの免疫学的試験); Takaiら, J. Immunol. 137:3494-3500; 1986; Takaiら, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnoliら, J. Immunol. 149:3778-3783, 1992に記載されるものが含まれる。

30

【0184】

樹状細胞依存性アッセイ(とりわけ、ネイティブT細胞を活性化する樹状細胞により発現されるポリペプチドを同定するもの)には、限定なしに、Gueryら, J. Immunol 134:536-544, 1995; Inabaら, J. Exp Med 173:549-559, 1991; Macatoniaら, J. Immunol 154:5071-5079, 1995; Porgadorら, J. Exp Med 182:255-260, 1995; Nairら, J. Virology 67:4062-4069, 1993; Huangら, Science 264:961-965, 1994; Macatoniaら, J. Exp Med 169:1255-1264, 1989; Hardwajら, J. Clin Invest 94:797-807, 1994; およびInabaら, J. Exp Med 172:631-640, 1990に記載されるものが含まれる。

40

【0185】

リンパ球生存/アポトーシスのアッセイ(とりわけ、超抗原誘導後のアポトーシスを防

50

止するポリペプチドとリンパ球のホメオスタシスを調節するポリペプチドを同定するもの)には、限定なしに、Darzynkiewiczら, Cytometry 13:795-808, 1992; Gorcezycaら, Leukemia 7:659-670, 1993; Gorcezycaら, Cancer Research 53:1945-1951, 1993; Itoら, Cell 66:233-243, 1991; Zacharchuk, J Immunol 145:4037-4045, 1990; Zamaïら, Cytometry 14:891-897, 1993; Gorcezycaら, International Journal of Oncology 1:639-648, 1992に記載されるものが含まれる。

【0186】

T細胞の拘束および発生の初期段階に影響を及ぼすポリペプチドのアッセイには、限定なしに、Anticaら, Blood 84:111-117, 1994; Fineら, Cell Immunol 155:111-122, 1994; Galyら, Blood 85:2770-2778, 1995; Tokiら, PNAS USA 88:7548-7551, 1991に記載されるものが含まれる。

【0187】

胚性幹細胞分化のアッセイ(とりわけ、胚分化造血作用に影響を及ぼすポリペプチドを同定するもの)には、限定なしに、Johanssonら, Cellular Biology 15:141-151, 1995; Kellerら, Molecular and Cellular Biology 13:473-486, 1993; McClanahanら, Blood 81:2903-2915, 1993に記載されるものが含まれる。

【0188】

細胞の運動および接着のアッセイには、限定なしに、「免疫学の最新プロトコル(Current Protocols in Immunology)」Coliganら, 監修、グリーン・パブリッシング・アソシエーツおよびウィリー・インターサイエンス(第6.12章、および-ケモカインの測定、6.12.1-6.12.28); Taubら, J. Clin. Invest. 95:1370-1376, 1995; Lindら, APMIS 103:140-146, 1995; Mullerら, Eur. J. Immunol. 25:1744-1748; Gruberら, J Immunol. 152:5860-5867, 1994; Johnstonら, J Immunol. 153:1762-1768, 1994に記載されるものが含まれる。

【0189】

止血および血栓溶解活性に関するアッセイには、限定なしに、Linettら, J. Clin. Pharmacol. 26:131-140, 1986; Burdickら, Thrombosis Res. 45:413-419, 1987; Humphreyら, Fibrinolysis 5:71-79(1991); Schaub, Prostaglandins 35:467-474, 1988に記載されるものが含まれる。

【0190】

II. 療法組成物とその投与

本発明は、心臓血管疾患に罹患している被検者、好ましくはヒト患者を治療するための化合物、組成物、および方法を提供する。本明細書に使用する用語「治療する」、「治療すること」、および「治療」には、治癒的、防御的(例えば、予防的)、および緩和的または寛解的な治療が含まれる。故に、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39の療法組成物は、症状の発現の前、その間、またはその後で投与することが必要となる場合がある。療法的使用には、可溶性のIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39を、その適応症に適切なやり方での治療のために被検者へ投与する。

【0191】

本発明の態様には、1以上の可溶性IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39を含んでなる療法組成物（医薬組成物とも呼ばれる）が含まれる。本明細書に使用する「療法組成物」は、1以上の可溶性IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39と製剤的に許容される希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび/または担体を含む。本明細書に使用する用語「製剤的に」許容されると「生理学的に」許容されるは、交換可能的に使用する。用語「製剤的に許容される」は、有効成分の生物学的活性の有効性に干渉しない、無毒の材料を意味する。

【0192】

故に、療法組成物は、上記のセクションに記載のアンタゴニストのすべて、例えば、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18結合タンパク質（IL-18BP）、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39のような可溶性の受容体分子、リガンドおよび/または結合タンパク質、並びに、その生物学的に活性な断片、ムテイン、変異体、誘導体、融合物、など；以下の1以上に対して向けられる抗体、融合タンパク質および/またはペプチド体：IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18結合タンパク質（IL-18BP）、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LおよびCD39；IL-17とIL-17R、IL-18とIL-18R、CD30-LとCD30、4-1BB-Lと4-1BBおよび/またはOX40-LとOX40の間の相互作用に拮抗するペプチド模倣体、ミモトープ、などのような低分子；内因性のIL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39のmRNAに特異的に標的指向してそれへハイブリダイズして、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39のmRNA転写物の翻訳を阻害するかまたは妨げるアンチセンスオリゴヌクレオチド；並びに、IL-17、IL-17R、IL-18、IL-18R、IL-18BP、4-1BB、4-1BB-L、CD30、CD30-L、OX40、OX40-LまたはCD39の発現を沈黙させるように設計したRNA干渉分子を含む。

【0193】

生理学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤は、利用する投与量および濃度でレシピエントにとって無害である。通常、そうした組成物を調製することは、緩衝剤、アスコルビン酸のような抗酸化剤、低分子量ポリペプチド（10未満のアミノ酸を有するもののような）、タンパク質、アミノ酸、ブドウ糖、ショ糖またはデキストリンのような炭水化物、EDTAのようなキレート剤、グルタチオンや他の安定化剤および賦形剤とIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39を組み合わせることを伴う。中性の緩衝化生理食塩水または非特異的な血清アルブミンと混合した生理食塩水は、例示の適切な希釈剤である。IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39は、好ましくは、好適な賦形剤溶液（例、ショ糖）を希釈剤として使用して、凍結乾燥品として製剤化する。適切な投与量は、標準投薬試験において決定可能であり、選択する投与経路に応じて変動してよい。適切な業界の標準に準じて、ベンジルアルコールのような保存剤も加えてよい。投与の量および頻度は、当然ながら、治療する適応症の性質および重症度、望まれる応答、患者の年齢および状態、などのような要因に左右されるものである。

【0194】

1つの態様において、本明細書に記載の可溶性IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39の持続放出型が使用される。開示される方法での使用に適した持続放出型には、限定されないが、こうしたポリマーと混合される遅溶解性の生体適合性ポリマーに被包化されるか、または生体適

合性半透性インプラントに封入される I L - 17、I L - 18、4 - 1 B B、C D 3 0 および / または O X 4 0 アンタゴニストおよび / または C D 3 9 が含まれる。さらに、I L - 17、I L - 18、4 - 1 B B、C D 3 0 および / または O X 4 0 アンタゴニストおよび / または C D 3 9 は、(上記に詳しく記載したように) その血清半減期を延長させるかまたはタンパク質送達を高めるためにポリエチレングリコールとコンジュゲート (P E G 化) してよい。

【 0 1 9 5 】

可溶性 I L - 17、I L - 18、4 - 1 B B、C D 3 0 および / または O X 4 0 アンタゴニストおよび / または C D 3 9 の療法組成物を投与するのに使用可能である持続放出技術の 1 つの種類は、ヒドロゲル材料、例えば、光重合可能ヒドロゲルを利用することである (S a w h n e y ら , M a c r o m o l e c u l e s 26 : 581 ; 1993)。術後の癒着形成を防止するために (H i l l - W e s t ら , O b s t e t G y n e c o l . 83 : 59 , 1994)、そして血管損傷に続く血栓症および血管狭小化を防止するために (H i l l - W e s t ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 91 : 5967 , 1994) 同様のヒドロゲルが使用されている。そうしたヒドロゲル中へポリペプチドを取り込ませて、有効薬剤の持続した局在化放出をもたらすことができる (W e s t と H u b b e l , R e a c t i v e P o l y m e r s 25 : 139 , 1995 ; H i l l - W e s t ら , J . S u r g . R e s . 58 : 759 , 1995)。ヒドロゲルへ取り込まれたときの I L - 17、I L - 18、4 - 1 B B、C D 3 0 および / または O X 4 0 アンタゴニストおよび / または C D 3 9 の持続した局在化放出は、I L - 17、I L - 18、4 - 1 B B、C D 3 0 および / または O X 4 0 アンタゴニストおよび / または C D 3 9 の長い半減期によって増幅されるだろう。

【 0 1 9 6 】

療法組成物は、注射用、または経口、肺、経鼻、経皮の投与用でも、他の投与形式用でもよい。一般に、本発明には、1 以上の I L - 17、I L - 18、4 - 1 B B、C D 3 0 および / または O X 4 0 アンタゴニストおよび / または C D 3 9 の有効量を製剤的に許容される希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび / または担体と一緒に含んでなる療法組成物が含まれる。こうした組成物には、様々な緩衝剤内容 (例、T r i s - H C l , 酢酸塩、リン酸塩)、p H およびイオン強度の希釈剤 ; 界面活性剤および可溶化剤 (例、T w e e n 80 , ポリソルベート 80)、抗酸化剤 (例、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、保存剤 (例、T h i m e r s o l , ベンジルアルコール) および賦形剤 (例、乳糖、マンニトール) のような添加剤が含まれ、この材料は、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、などのようなポリマー化合物の微粒子調製物またはリポソームへ取り込まれる。ヒアルロン酸も使用可能であり、これは、循環中の持続期間を促進する効果を有する場合がある。こうした組成物は、本発明のタンパク質および誘導体の物理状態、安定性、i n v i v o 放出速度、および i n v i v o クリアランス速度に影響を及ぼす可能性がある。例えば、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、「レミントン製薬科学 (R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s)」第 18 版 (1990 , マック・パブリッシング社、ペンシルヴェニア州イーストン、18042) 1435 - 1712 頁を参照のこと。本組成物は、液体型で調製しても、凍結乾燥型のような乾燥粉末で調製してもよい。経皮製剤のように、埋込み可能な持続放出製剤も考慮される。

【 0 1 9 7 】

本明細書における使用に考慮されるのは経口固体剤形であり、これについては、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、「レミントン製薬科学 (R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s)」(1990)、第 18 版、マック・パブリッシング社、ペンシルヴェニア州イーストン、18042) の第 89 章に概して記載されている。固体剤形には、錠剤、カプセル剤、丸剤、トローチ剤または甘味入り錠剤、カシェ剤またはペレット剤が含まれる。また、本組成物を製剤化するためにリポソームまたはタンパク様の被包化が使用可能である (例えば、米国特許第 4 , 925 , 67

10

20

30

40

50

3号に報告されるタンパク様ミクロスフェアのような)。リポソーム被包化が使用可能であり、リポソームは、様々なポリマーで誘導化してよい(例えば、米国特許第5,013,556)。治療薬に可能な固体剤形の記載は、参照により本明細書にそのまま組み込まれる、Marshall, K.,「最新の医薬品(Modern Pharmaceuticals)」(1979)、G.S.BankerおよびC.T.Rhodes監修の第10章に示される。一般に、この製剤には、1以上のIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39と、胃環境に対する保護と生物学的に活性な材料の腸での放出を可能にする不活性成分が含まれるものである。

【0198】

また、具体的に考慮されるのは、上記の本化合物の経口剤形である。必要ならば、経口送達が有効になるように、本化合物を化学修飾してよい。一般に、考慮される化学修飾は、化合物分子そのもののへ少なくとも1つの部分を付けることであり、ここで前記部分は、(a)タンパク分解の阻害;および(b)胃または腸から血流への取込みを可能にする。また望まれるのは、化合物の全体的な安定性の増加と体内での循環時間の増加である。本発明において共有付加運搬体として有用な部分は、この目的にも使用可能である。そうした部分の例には、PEG、エチレングリコールおよびプロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびポリプロリンが含まれる。例えば、AbuchowskiおよびDavis「可溶性ポリマー-酵素付加物、薬物としての酵素(Soluble Polymer-Enzyme Adducts, Enzyme as Drugs)」(1981)、HocenbergおよびRoberts(監修)、ウィリー・インターサイエンス、ニューヨーク州ニューヨーク、367-83頁;Newmarkら、(1982)、J.Appl.Biochem.4:185-9を参照のこと。使用可能である他のポリマーは、ポリ-1,3-ジオキソランおよびポリ-1,3,6-チオキソケインである。医薬使用に好ましいのは、上記に示したように、PEG部分である。経口送達剤形では、N-(8-[2-ヒドロキシベンゾイル]アミノ)カプリル酸ナトリウム(SNAC)のような修飾脂肪族アミノ酸の塩を本発明の療法化合物の吸収を高めるための担体として使用することも可能である。SNACを使用するヘパリン製剤の臨床効果がEmisphere Technologiesの実施したフェーズII試験において証明されている。米国特許第5,792,451号「経口医薬送達組成物と方法(Oral drug delivery composition and methods)」を参照のこと。

【0199】

本発明の化合物は、約1mmの粒子径の顆粒剤またはペレット剤の形態の微細な多粒子製剤としての製剤に含めることができる。カプセル投与用材料の製剤は、散剤、軽圧縮プラグ、または錠剤でもよい。治療薬は、圧縮により調製可能である。

【0200】

着色剤と芳香剤をいずれも含めてよい。例えば、タンパク質(または誘導体)を(リポソームによるかまたはミクロスフェア被包化によるように)製剤化してから、着色剤および芳香剤を含有する冷却飲料のような食用製品内にさらに含有してよい。

【0201】

本発明の化合物の容量を不活性材料で希釈または増加させてよい。これらの希釈剤には、炭水化物、特にマンニトール、乳糖、無水乳糖、セルロース、ショ糖、修飾デキストランおよびデンプンを含めてよい。ある種の無機塩も充填剤として使用可能であり、三リン酸カルシウム、炭酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムが含まれる。いくつかの市販の希釈剤は、Fast-Flow、Emdex、STA-Rx 1500、EmcompressおよびAvicellである。

【0202】

治療薬の固体剤形への製剤化には、崩壊剤が含まれる場合がある。崩壊剤として使用する材料には、限定されないが、デンプンが含まれ、デンプン、ExploTabを基にし

10

20

30

40

50

た市販の崩壊剤が含まれる。ナトリウムデンプングリコラート、アンバーライト (Amberlite)、カルボキシエチルセルロースナトリウム、ウルトラアミロペクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸性カルボキシメチルセルロース、天然スポンジおよびベントナイトがいずれも使用可能である。崩壊剤の別の型は、不溶性のカチオン交換樹脂である。粉末ゴムは崩壊剤としても結合剤としても使用可能であり、これらには、寒天、カラヤまたはトラガカントのような粉末ゴムを含めることができる。アルギン酸とそのナトリウム塩も崩壊剤として有用である。

【0203】

療法剤と一緒に保持して硬い錠剤を成形するために結合剤が使用可能であり、アカシア、トラガカント、デンプンおよびゼラチンのような天然産物由来の材料が含まれる。他には、メチルセルロース (MC)、エチルセルロース (EC) およびカルボキシメチルセルロース (CMC) が含まれる。ポリビニルピロリドン (PVP) とヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) は、治療薬を造粒するためにアルコール溶液中でともに使用可能である。

10

【0204】

製剤化プロセスの間の粘着を防止するために治療薬の製剤に抗摩擦剤を含めてよい。治療薬とダイ壁の間の層として滑沢剤が使用可能であり、これらには、限定されないが、ステアリン酸 (そのマグネシウム塩およびカルシウム塩が含まれる)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、流動パラフィン、植物油およびワックスが含まれる。ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、様々な分子量のポリエチレングリコール、C

20

【0205】

製剤化の間の薬物のフロー特性を向上させることが可能であり、圧縮の間の再配置に役立つ滑り剤 (glidant) も加えてよい。滑り剤には、デンプン、タルク、発熱シリカおよび水和シリコアルミネートが含まれる場合がある。

【0206】

本発明の化合物の水性環境への溶解を促進するために、界面活性剤を湿潤剤として加えてよい。界面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルナトリウムスルホスクシネートおよびジオクチルナトリウムスルホネートのようなアニオン界面活性剤が含まれる場合がある。カチオン界面活性剤も使用可能であり、塩化ベンズアルコニウムまたは塩化ベンゼトニウムが含まれる場合がある。界面活性剤として製剤に含めてよい潜在的な非イオン性界面活性剤のリストは、ラウロマクロゴール 400、ポリオキシシル 40 ステアレート、ポリオキシエチレン水素化ヒマシ油 10、50 および 60、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート 40、60、65 および 80、ショ糖脂肪酸エステル、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースである。これらの界面活性剤は、タンパク質または誘導体の製剤中に単独で存在しても、異なる比率の混合物として存在してもよい。

30

【0207】

化合物の取込みを高めるために製剤に添加剤を加えてもよい。この特性を潜在的に有する添加剤は、例えば、脂肪酸のオレイン酸、リノール酸およびリノレン酸である。

制御放出製剤も望ましい場合がある。本発明の化合物は、拡散または浸出の機序のいずれかによる放出を可能にする不活性マトリックス (例えば、ゴム) へ取り込んでよい。ゆっくり変性するマトリックスも製剤に取り込んでよい (例えば、アルギン酸塩、多糖類)。本発明の化合物の制御放出の別の型は、Oros 治療システム (Alza 社) に基づいた方法による。即ち、浸透効果により単一の小さな開口部を介して水を入れるが薬物は押し出すことを可能にする半透膜に薬物を取り囲むものである。腸溶コーティング剤の中にも、遅延放出効果を有するものがある。

40

【0208】

他のコーティング剤も本製剤に使用可能である。これらには、コーティングパン中で適用可能である、多様な糖が含まれる。療法剤はまた、フィルムコート錠剤において提供してもよく、この事例に使用する材料は、2つの群に分けられる。第一は、非腸溶材料であ

50

り、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシ - エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピル - メチルセルロース、カルボキシ - メチルセルロースナトリウム、プロピドンおよびポリエチレングリコールが含まれる。第二の群は、一般にフタル酸のエステルである腸溶材料からなる。

【0209】

材料の混合物を使用して、最適のフィルムコーティングを提供することが可能である。フィルムコーティングは、パン容器において、流動床において、または圧縮コーティングにより行ってもよい。

【0210】

本明細書にまた考慮されるのは、本タンパク質（またはその誘導体）の肺送達である。本タンパク質（または誘導体）は、吸入の間に哺乳動物の肺へ送達され、肺の上皮支持層（lining）より血流へ横断する。このことに関する他の報告には、Adjera, Pharma. Res. (1990) 7: 565 - 9; Adjera (1990), Internatl. J. Pharmaceutics 63: 135 - 44（酢酸リユーブロリド）; Braquetら (1989), J. Cardiovasc. Pharmacol. 13（補遺5）: s. 143 - 146（エンドセリン - 1）; Hubbardら (1989), Annals Int. Med. 3: 206 - 12（1 - 抗トリプシン）; Smithら (1989), J. Clin. Invest. 84: 1145 - 6（1 - プロテイナーゼ）; Osweinら (1990年3月), 「タンパク質のエアゾール化 (Aerosolization of Proteins)」, Proc. Symp. Resp. Drug Delivery II, コロラド州キーストン（組換えヒト成長ホルモン）; Debsら (1988), J. Immunol. 140: 3482 - 8（インターフェロン - および腫瘍壊死因子）、および Platzら, 米国特許第 5, 284, 656 号（顆粒球コロニー刺激因子）が含まれる。

【0211】

本発明の実施における使用に考慮されるのは、治療製品の肺送達用に設計される広範囲の機械デバイスであり、限定されないが、ネブライザー、目盛り量吸入器、および粉末吸入器が含まれ、これらのいずれも当業者には馴染みがある。本発明の実施に適した市販デバイスのある具体例は、マリנקロット社（ミズーリ州セントルイス）製の Ultravent 3000 目盛り量吸入器；Marquest Medical Products（コロラド州エンゲルウッド）製の Acorn II 目盛り量吸入器；グラクソ社（ノースカロライナ州リサーチ・トライアングル・パーク）製の Ventolin 目盛り量吸入器；および、ファイソンス社（マサチューセッツ州ベッドフォード）製の Spinhaler 粉末吸入器である。

【0212】

こうしたデバイスは、いずれも本発明の化合物の調合に適した製剤の使用を必要とする。典型的には、各製剤は利用するデバイスの種類に特異的であり、療法に有用な希釈剤、アジュバントおよび/または担体に加えて、適切な推進材料（propellant material）の使用を伴う場合がある。

【0213】

本発明の化合物は、遠い肺への最も有効な送達のためには、最も有利には、10 μ m（ミクロン）未満、最も好ましくは 0.5 ~ 5 μ m の平均粒子径の粒子型において調製すべきである。

【0214】

製剤的に許容される担体には、トレハロース、マンニトール、キシリトール、ショ糖、乳糖、およびソルビトールのような炭水化物が含まれる。製剤に使用の他の成分には、DPPC、DOPE、DSPC および DOPC が含まれる場合がある。天然または合成の界面活性剤が使用可能である。PEG が使用可能である（タンパク質または類似体を誘導化することにおけるその使用とは別に）。シクロデキストリンのようなデキストランが使用

10

20

30

40

50

可能である。胆汁酸塩と他の関連エンハンサーが使用可能である。セルロースとセルロース誘導体が使用可能である。緩衝製剤における使用のように、アミノ酸が使用可能である。

【0215】

また、リボソーム、ミクロカプセルまたはミクロスフェア、封入複合体、または他の種類の担体の使用が考慮される。

ジェット式または超音波式のネブライザーでの使用に適した製剤は、典型的には、1 mLの溶液につき約0.1~25 mgの生物学的に活性なタンパク質の濃度で水に溶けた本発明の化合物を含むものである。この製剤には、緩衝剤と単糖も含めてよい（例えば、タンパク質の安定化と浸透圧の調節のために）。ネブライザー製剤は、エアゾール形成時の溶液の微粉化により引き起こされるタンパク質の界面誘発凝集を抑えるかまたは妨げるために、界面活性剤を含有してよい。

10

【0216】

一般に、目盛り量吸入器デバイスで使用する製剤は、界面活性剤の支援により推進剤に懸濁した本発明の化合物を含有する微細化粉末を含む。推進剤は、クロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、またはヒドロカーボンのような、この目的に利用するどの慣用材料であってもよく、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、および1,1,1,2-テトラフルオロエタン、またはこれらの組合せが含まれる。好適な界面活性剤には、トリオレイン酸ソルビタンと大豆レシチンが含まれる。オレイン酸も界面活性剤として有用であり得る。

20

【0217】

粉末吸入デバイスより調合する製剤は、本発明の化合物を含有する微細化した乾燥粉末を含み、粉末のデバイスからの拡散を促進する量の乳糖、ソルビトール、ショ糖、マンニトール、トレハロース、またはキシリトールのような賦形剤も、例えば製剤の50~90重量%で含んでよい。

【0218】

IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39の経鼻送達も考慮される。経鼻送達は、治療生成物を鼻へ投与した後に、該生成物の肺における沈積の必要なしに、該タンパク質の血流への直接通過を可能にする。経鼻送達用の製剤には、デキストランまたはシクロデキストランのあるものが含まれる。他の粘膜を通過する輸送を介した送達も考慮される。

30

【0219】

IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39の治療または使用の方法を実施する場合、治療有効量を被検者へ投与する。本明細書に使用する用語「治療有効量」は、患者の有意義な利益、即ち、関連する医学的状態の治療、治癒、予防、または寛解、またはこうした状態の治療、治癒、予防、または寛解の率の増加を示すのに十分であるそれぞれの療法組成物の全体量を意味する。単独で投与される、個別の療法組成物へ適用される場合、この用語は、その成分だけを意味する。組合せ物へ適用される場合、この用語は、組み合わせても、連続的または同時に投与されても、治療効果をもたらす成分の組み合わせた量を意味する。本明細書に使用する療法剤の句「治療有効量を投与する」は、障害の重症度を反映する少なくとも1つの指標において、改善、および好ましくは持続した改善を誘導するのに十分な量で、および時間の間、患者が前記療法組成物で治療されることを意味する。改善が「持続している」とみなされるのは、1日以上、またはより好ましくは、1週間以上離れた少なくとも2つの機会に患者が改善を示す場合である。改善の度合いは、徴候または症状に基づいて決定され、決定には、「生活の質」質問表のような、患者へ渡される質問表も利用可能である。治療の量および時間が十分であるかどうかを判定するために、患者の疾病の程度を反映する様々な指標が評価可能である。選択される指標（群）のベースライン値を、療法剤の初回用量の投与に先立つ患者の検査により確定する。好ましくは、ベースライン検査は、

40

50

初回用量を投与する約60日以内に行う。急性症状を治療するために療法剤を投与するならば、初回用量は、損傷が起こってから現実に可能な限りすぐに投与する。IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39のような療法組成剤を投与することによって改善が誘導され、そのとき患者は、選択された指標(群)についてベースラインを上回る改善を示す。慢性状態を治療する場合、少なくとも1ヶ月以上、例えば1、2、または3ヶ月、またはそれより長い、際限ない期間にわたり、この医薬品を反復的に投与することによってこの改善の度合いが得られる。損傷または他の急性状態を治療するには、1~6週の期間、または単回用量でさえしばしば十分である。治療後の患者の疾病の程度が1以上の指標により改善されたように見える場合もあるが、同一レベルでかまたは低減された用量または頻度で、治療を際限なく継続してもよい。治療は、いったん低減されるかまたは中止されても、症状が再び現れたならば、元のレベルで再開してよい。

10

【0220】

当業者は、治療される障害の性質および重症度、患者の体重、年齢、一般状態、および以前の疾病および/または治療、並びに投与経路のような要因に依存して、適切な投与量に変化するものであることを認識されよう。予備用量は動物試験にしたがって決定可能であり、ヒト投与への投与量のスケールリングは、標準投薬試験のような当該技術分野で受け入れられた方法にしたがって実施する。例えば、治療有効量は、はじめは細胞培養アッセイから推定可能である。投与量は化合物の比活性に依存し、ルーチン実験法により容易に決定可能である。用量は、毒性を最小化する一方で、細胞培養において決定されるようなIC50(即ち、症状の半最大阻害を達成する試験化合物の濃度)が含まれる、循環血漿濃度範囲を達成する動物モデルにおいて定式化することが可能である。こうした情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用可能である。最終的には、担当医が、それぞれの個別患者を治療するのに用いる本発明のポリペプチドの量を決定するものである。最初、担当医は、本発明のポリペプチドの低用量を投与し、患者の応答を観察する。患者にとって最適な治療効果が得られるまで、本発明のポリペプチドのより高い用量を投与してよく、その時点で投与量はそれ以上増加されない。本発明の方法を実施するために使用される様々な療法組成物は、kg体重あたり、約0.01ng~約100mg(好ましくは約0.1ng~約10mg、より好ましくは約0.1マイクログラム~約1mg)の本発明のポリペプチドを含有すると考慮される。本発明の1つの態様において、本明細書に開示される様々な医学的障害を治療するために、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39を週に1回投与し、別の態様において、週に少なくとも2回投与し、そして別の態様において、週に少なくとも3回投与する。注射するならば、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39の成人用量での有効量は1~20mg/m²の範囲であり、好ましくは、約5~12mg/m²である。あるいは、均一量を投与してもよく、その量は5~100mg/用量の範囲に及ぶ場合がある。皮下注射により投与される均一量の代表的な用量範囲は、5~25mg/用量、25~50mg/用量、および50~100mg/用量である。本発明の1つの態様において、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39を25mg/用量で含有するか、またはあるいは、50mg/用量で含有する、注射に許容される調製物を投与することによって、以下に記載される様々な適応症を治療する。25mgまたは50mgの用量は、特に慢性状態では、反復的に投与してよい。注射以外の投与の経路を使用する場合、用量は、標準的な医療行為にしたがって適正に調整する。多くの場合、約25mg用量のIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39を少なくとも3週の期間にわたり週に1~3回、または約50mg用量のIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39を少なくとも3週の期間にわたり週に1または2回注射することによって、患者の状態の改善が得られるだろうが、望ましい度合いの改善を誘導するにはより長い期間の治療

20

30

40

50

が必要となる場合もある。治癒不能の慢性状態では、この治療方式を際限なく続けてもよく、そうしたことが患者の医師により必要とみなされた場合は、用量や頻度に対して調整がなされる。上記の用量は、18歳以上の人である成人患者についての例である。小児患者（4～17歳）では、適切な治療方式は、週1回以上の皮下注射により投与される、0.4mg/kg、最大用量25mgまでのIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39の皮下注射を伴う。IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストが抗体の型であるならば、好ましい用量範囲は0.1～20mg/kgであり、より好ましくは1～10mg/kgである。用量範囲の別の態様は、0.75～7.5mg/kg体重である。ヒト化抗体、即ち、抗体分子の抗原結合部分だけが非ヒト供給源に由来する抗体が好ましい。こうした抗体は、静脈内で注射または投与することが可能である。

10

【0221】

III. 療法上の応用

IL-17、IL-18、4-1BB、CD30およびOX40アンタゴニストは、心臓血管疾患を治療するために使用可能である。本発明の態様には、1以上のIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39の有効量を単独またはあらゆる組合せで投与することを含んでなる、心臓血管疾患を有する被検者において心臓血管疾患を治療する方法が含まれる。

【0222】

心臓血管疾患には、心臓および脈管系の病態生理を有する病態、並びに心臓および脈管系の病態により危険状態にある臓器および系が含まれる。例には、限定されないが、心筋炎、慢性自己免疫心筋炎、細菌性およびウイルス性心筋炎、並びに感染性心内膜炎のような心臓および/または脈管構造の炎症；心不全；鬱血性心不全；慢性心不全；心不全の悪液質；非虚血性（拡張性心筋症；突発性拡張性心筋症；心原性ショック、体外循環支援に続発する心不全（「ポンプ後症候群」）、虚血/再灌流損傷に続く心不全、脳死関連心不全（Owenら, 1999（Circulation, 1999 May 18; 99（19）2565-70）に記載のような）；肥大型心筋症；拘束性心筋症；非虚血性全身高血圧；弁疾患；不整脈起因性右心室心筋症）および虚血性（じゅく腫形成；アテローム硬化症；動脈硬化症；末梢血管疾患；冠動脈疾患；卒中、一過性虚血発作および心筋梗塞が含まれる梗塞）が含まれる心筋症が網羅される。心臓血管疾患の定義に網羅される追加の病態には、動脈瘤；動脈炎；狭心症；塞栓症；血小板関連虚血障害；虚血/再灌流損傷；再狭窄；僧房弁および/または三尖弁逆流；僧房弁狭窄；無症候性心筋虚血；レイノー現象；血栓症；深在性静脈血栓症；肺塞栓症；血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）および溶血性尿毒症性症候群（HUS）が含まれる血栓性微小血管症、本態性血小板血症、播種性血管内凝固（DIC）、および、外来または損傷組織への曝露に関連した血栓症および凝固障害、表面血栓性静脈炎；川崎脈管炎が含まれる脈管炎；高安動脈炎；静脈閉塞性疾患、巨細胞動脈炎、ウェジナー肉芽腫症；シェーンライン-ヘノッホ紫斑病、並びに細菌のような1以上の口内病原体による歯周感染症より生じる心臓血管疾患が網羅される。

20

30

【0223】

1以上のIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストの単独またはCD39との組合せの療法使用の追加例には、肺虚血、冠虚血および脳虚血が含まれる血小板関連の虚血障害に続く冠動脈疾患または損傷を罹患する個人の治療と、血栓症、血栓障害（冠動脈血栓症、脳動脈血栓症、心臓内血栓症、末梢動脈血栓症、静脈血栓症が含まれる）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）および溶血性尿毒症性症候群（HUS）が含まれる血栓性微小血管症、本態性血小板血症、播種性血管内凝固（DIC）、および、外来または損傷組織への曝露に関連した血栓症および凝固障害に続く再閉塞の予防が、血管形成術、頸動脈内膜切除術、血管移植片の吻合、および留置カテーテルまたはシャントのような慢性の心臓血管デバイスと組み合わせて含まれる。

40

【0224】

さらなる適応には、血管形成術（即ち、バルーン血管形成術、レーザー血管形成術、冠

50

アテローム切除術、および類似の技術)、頸動脈、冠動脈、末梢動脈や他の血管内ステントのような血管内補綴デバイス、透析アクセスデバイスの置換、または末梢血管疾患を治療する方法を受けているかまたは受ける予定の被検者;血栓形成の高いリスクがある手術(即ち、冠バイパス手術、人工弁または血管、などの挿入)を受けている個人が含まれる。

【0225】

さらに、IL-17および/またはIL-18は、心臓血管疾患および疾患重症度の予後指標である。IL-17および/またはIL-18は、ドナー適合および移植後アウトカムの予後指標でもある。故に、本発明のさらなる態様には、心臓血管疾患、心臓血管疾患重症度、ドナー適合および移植後アウトカムをスクリーニングする被検者中のIL-17および/またはIL-18レベルを測定するためのアッセイが含まれる。

10

【0226】

患者の疾病の程度を反映する様々な指標を、治療の量および時間が十分であるかどうかを決定するために評価することが可能である。選択される指標(群)のベースライン値を、単独または可溶性CD39と組み合わせたIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストの初回用量の投与に先立つ患者の検査により確定する。好ましくは、ベースライン検査は、初回用量を投与する約60日以内に行う。

【0227】

単独または可溶性CD39と組み合わせたIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストの用量を反復的に投与することによって改善が誘導され、そのとき患者は、選択される指標(群)についてベースラインを上回る改善を表出する。慢性状態を治療する場合、少なくとも1ヶ月以上、例えば1、2、または3ヶ月、またはそれより長い、際限ない期間にわたり、この医薬品を反復的に投与することによってこの改善の度合い得られる。急性状態を治療するには、1~6週の期間、または単回用量でさえしばしば十分である。

20

【0228】

患者の疾病の治療後の程度が1以上の指標により改善されたように見える場合でも、同一レベルでかまたは低減された用量または頻度で、治療を際限なく継続してもよい。治療は、いったん低減されるかまたは中止されても、症状が再び現れたならば、元のレベルで再開してよい。

30

【0229】

本発明の療法組成物は、単独で投与しても、治療有効量の他の薬物と組み合わせて投与してもよい。本発明には、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/またはCD39と組み合わせて同じ患者へ投与される1以上の他の薬物と同時に、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストを単独で、または可溶性CD39と組み合わせて投与することが含まれ、各薬物は、その医薬品に適した治療方式にしたがって投与される。「同時投与」には、組合せの成分での同時または連続の治療、並びに薬物が交互に投与される方式、または一方の成分が長期間投与されて、他方が間欠的に投与される方式が含まれる。成分は、同じ組成物でも別個の組成物でも、そして同じ投与経路でも異なる投与経路でも投与可能である。

40

【0230】

単独または可溶性CD39と組み合わせたIL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストと組み合わせて使用可能である他の薬物または療法組成物の例には、鎮痛剤、疾患改善抗リウマチ薬(DMARD)、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、およびあらゆる免疫および/または炎症変調剤が含まれる。非ステロイド性抗炎症薬には、限定されないが、サリチル酸(アスピリン);イブプロフェン;インドメタシン;セレコキシブ;ロフェコキシブ;ケトロラク;ナンプメトン;ピロキシカム;ナプロキセン;オキサプロジン;スリダク;ケトプロフェン;ジクロフェナク;他のCOX-1および/またはCOX-2阻害剤、サリチル酸誘導体、プロピオン酸

50

誘導体、酢酸誘導体、フマル酸誘導体、カルボン酸誘導体、酪酸誘導体、オキシカム、ピラゾールおよびピラゾロンが含まれ、新たに開発される抗炎症薬が含まれる。

【0231】

本発明の療法組成物は、以下の1以上とともに投与可能である；エタネルセプト（EnbrelTM）、sTNF-R I、オネルセプト、D2E7、およびRemicadeTMのようなTNFアンタゴニストが含まれる、TNF/TNF受容体ファミリーの他のメンバーの変調剤；アナキンラのようなIL-1ra分子とIL-1Hy1およびIL-1Hy2のようなより最近発見されたIL-ra様分子が含まれるIL-1阻害剤；米国特許第5,844,099号に記載されるようなIL-1「トラップ」分子；IL-1抗体；可溶性IL-1受容体、など；IL-6阻害剤（例、IL-6への抗体）；IL-8阻害剤（例、IL-8への抗体）；インターロイキン-1変換酵素（ICE）変調剤；インスリン様増殖因子（IGF-1, IGF-2）とその変調剤；トランスフォーミング増殖因子-（TGF-）、TGF-ファミリーメンバー、およびTGF-変調剤；線維芽細胞増殖因子FGF-1~FGF-10とFGF変調剤；CerebrexTMおよびVioxTMのようなCOX-2阻害剤；プロスタグランジン類似体（例、E系列のプロスタグランジン）；マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）変調剤；誘導性NOSの変調剤が含まれる、一酸化窒素合成酵素（NOS）変調剤；グルココルチコイド受容体の変調剤；グルタメート受容体の変調剤；リポ多糖（LPS）レベルの変調剤；腫瘍遺伝子（例、fos, jun）の阻害剤およびインターフェロンが含まれる、抗癌剤；ノルアドレナリンとその変調剤および模倣体。

【0232】

本発明の医薬組成物と同時に投与可能である組成物の追加の態様は、M-CSF、GM-CSF、Flt3-リガンド、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IFN、TNF0、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、トロンボポエチン、幹細胞因子、およびエリスロポエチンのようなサイトカイン、リンホカイン、または他の造血因子、またはこれら因子のいずれかの阻害剤またはアンタゴニストである。本医薬組成物は、ポリペプチドの活性を高めるか、または治療におけるその活性または使用を補填する他の薬剤もさらに含有してよい。そうした追加の因子および/または薬剤は、本発明のポリペプチドとの相乗効果をもたらすか、または副作用を最小化するために医薬組成物に含めてよい。逆に、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/または可溶性CD39は、特別なサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解または抗血栓因子、または抗炎症剤の副作用を最小化するために、そのサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解または抗血栓因子、または抗炎症剤の製剤に含めてよい。

【0233】

同時に投与することができる薬物のさらなる態様には、限定されないが、抗ウイルス薬、抗生物質、鎮痛薬、コルチコステロイド、炎症性サイトカインのアンタゴニスト、非ステロイド性抗炎症薬、ペントキシフィリン、サリドマイド、およびアザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、硫酸ヒドロキシクロロキン、メトトレキセート、レフルノミド、ミノサイクリン、ペニシラミン、スルファサラジンのような疾患改善抗リウマチ薬（DMARD）、および経口金、チオマレイン酸金ナトリウム、およびオーロチオグルコースのような金化合物が含まれる。

【0234】

当然ながら、IL-17、IL-18、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストおよび/または可溶性CD39、並びに上記に記載の他の療法組成物は、心臓および脈管構造が関与する外科的処置（冠バイパス、心臓移植、弁置換術、血管形成術、ステント導入、アテローム切除法、大動脈瘤修復、弁ヒダ形成、心室補助デバイス挿入、心室量減少手術、バイパス、血管の再管腔形成または再構築が含まれるあらゆる形式の末梢動脈手術、先天性複雑病巣の修復および矯正が含まれる小児心臓血管外科手術）；

脂質低下薬（限定されないが、リピトール、シンバスタチン、プラバスタチン、アトルバスタチン、非HMG-CoAレダクターゼ阻害剤のような）；血圧調節薬（限定されないが、カルシウムチャネルアンタゴニスト、ACE阻害剤、 α -ブロッカー、GTNのような経口および全身で利用可能な一酸化窒素ドナーが含まれる）；アンジオテンシン変換酵素阻害剤、およびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体リガンドのような、他の認知された療法または治療と組み合わせて投与可能である。

【0235】

本発明の他の態様において、4-1BB、CD30および/またはOX40アンタゴニストは、化学療法剤の心毒性を予防、抑制、および/または寛解するために使用可能である。薬物毒性は、治療量の癌化学療法剤の送達にとって依然として重大な障壁である。多くの化学療法薬は、心筋組織の損傷またはリズム障害の形式で急性に、または鬱血性心不全に関連した慢性の形式のいずれかで心臓への直接の損傷を引き起こす。急性心毒性の例には、ST-Tセグメント変化、電圧減少、T波平坦化のような、ECG変化に関連し得る上室性頻拍性不整脈、並びに心房および心室の転位症が含まれる。急性効果は、ボーラスのドキソルビシンを受けている患者の40%以内で起こり、通常一過性である。慢性のアントラサイクリン心毒性は、不整脈、心筋炎、心膜炎、心筋梗塞および心筋症として発露される場合があり、これは用量およびスケジュール依存性である。550mg/m²の累積ボーラス用量を超えると、鬱血性心不全のリスクが急速に増加する。450mg/m²未満の用量では、10%未満のリスクに留まる。アントラサイクリンを服用している患者は、ドキソルビシンへの曝露から5年以後に起こる、後期出現性の心毒性を示すこともある。心機能不全は、鬱血性心不全またはリズム障害として発露され、かつて無症候性だった患者に起こる場合がある。ドキソルビシンへの曝露後10年生存する患者のおよそ5%がこの毒性を経験すると推定されている（Page, R. 「癌の管理：学際的アプローチ（Cancer Management: A Multidisciplinary Approach）」, PRR社、第5版（2001）を参照のこと）。

10

20

【0236】

強心剤の中で主要であるのは、アントラサイクリンクラスの細胞増殖抑制性抗生物質である。このアントラサイクリンのクラスには、限定されないが、アドリアマイシン（ドキソルビシン）、ダウノルビシン、エレンス（エピルビシン）、イダルビシン、ミトザントロン、などが含まれる。故に、本発明の態様は、有効量の4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストを投与することを含んでなる、アントラサイクリンの心毒性効果を予防、抑制および/または寛解する方法を提供する。本発明の態様はまた、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストからなる群より選択されるアンタゴニストを含んでなる、アントラサイクリンの心毒性効果を予防、抑制および/または寛解するための組成物を提供する。

30

【0237】

本発明の態様は、有効量の4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストを投与することを含んでなる、アドリアマイシン（ドキソルビシン）、ダウノルビシン、エレンス（エピルビシン）、イダルビシンおよびミトザントロンからなる群より選択されるアントラサイクリンの心毒性効果を予防、抑制および/または寛解する方法を提供する。本発明の態様はまた、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストからなる群より選択されるアンタゴニストを含んでなる、アドリアマイシン（ドキソルビシン）、ダウノルビシン、エレンス（エピルビシン）、イダルビシンおよびミトザントロンからなる群より選択されるアントラサイクリンの心毒性効果を予防、抑制および/または寛解するための組成物を提供する。

40

【0238】

4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストは、限定されないが、アムサクリン、ブスルファン、シスプラチン、シクロホスフ

50

ファミド、フルオロウラシル、Herceptin（および、他のHer2/neu標的指向モダリティ）、イホスファミド、インターフェロン、インターロイキン-2、マイトマイシン、パクリタキセル、ビンブラスチン、ピンクリスチンおよびXeloda（カペシタピン）のような心毒性を有する他の化学療法剤の心毒性効果を予防、抑制および/または寛解するために使用可能である。

【0239】

故に、本発明の態様は、有効量の4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストを投与することを含んでなる、心毒性の副作用を有する化学療法剤の心毒性効果を予防、抑制および/または寛解する方法を提供する。本発明の態様はまた、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストからなる群より選択されるアンタゴニストを含んでなる、心毒性の副作用を有する化学療法剤の心毒性効果を予防、抑制および/または寛解するための組成物を提供する。

10

【0240】

本発明の態様は、有効量の4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストを投与することを含んでなる、アムサクリン、ブスルファン、シスプラチン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、Herceptin（および、他のHer2/neu標的指向モダリティ）、イホスファミド、インターフェロン、インターロイキン-2、マイトマイシン、パクリタキセル、ビンブラスチン、ピンクリスチンおよびXeloda（カペシタピン）からなる群より選択される化学療法剤の心毒性効果を予防、抑制および/または寛解する方法を提供する。本発明の態様はまた、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストからなる群より選択されるアンタゴニストを含んでなる、アムサクリン、ブスルファン、シスプラチン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、Herceptin（および、他のHer2/neu標的指向モダリティ）、イホスファミド、インターフェロン、インターロイキン-2、マイトマイシン、パクリタキセル、ビンブラスチン、ピンクリスチンおよびXeloda（カペシタピン）からなる群より選択される化学療法剤の心毒性効果を予防、抑制および/または寛解するための組成物を提供する。

20

【0241】

本発明の態様は、癌を治療する方法をその必要な被検者に提供し、ここで、心毒性を有する化学療法剤の投与量は、癌をより有効に治療するまで増加されるが、化学療法剤の心毒性効果は、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストからなる群より選択されるアンタゴニストを投与することによって、予防、抑制および/または寛解される。本発明の態様は、癌を治療する方法をその必要な被検者に提供し、ここで、アントラサイクリンの投与量は、癌をより有効に治療するまで増加されるが、アントラサイクリンの心毒性効果は、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストからなる群より選択されるアンタゴニストを投与することによって、予防、抑制および/または寛解される。本発明の態様は、癌を治療する方法をその必要な被検者に提供し、ここで、アドリマイシン（ドキソルビシン）、ダウノルビシン、エレンス（エピルビシン）、イダルビシンおよびミトザントロンからなる群より選択されるアントラサイクリンの投与量は、癌をより有効に治療するまで増加されるが、このアントラサイクリンの心毒性効果は、4-1BBアンタゴニスト、CD30アンタゴニストおよび/またはOX40アンタゴニストからなる群より選択されるアンタゴニストを投与することによって、予防、抑制および/または寛解される。本発明の態様は、癌を治療する方法をその必要な被検者に提供し、ここで、アムサクリン、ブスルファン、シスプラチン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、Herceptin（および、他のHer2/neu標的指向モダリティ）、イホスファミド、インターフェロン、インターロイキン-2、マイトマイシン、パクリタキセル、ビンブラスチン、ピンクリスチンおよびXeloda（カペシタピン）からなる群より選択される化学療法剤の投与量は、癌をより有効に治療するまで増加されるが、この化学療法剤の心毒性効

30

40

50

果は、4 - 1 B B アンタゴニスト、C D 3 0 アンタゴニストおよび / または O X 4 0 アンタゴニストからなる群より選択されるアンタゴニストを投与することによって、予防、抑制および / または寛解される。

【 0 2 4 2 】

本発明は、本発明の個々の側面の単なる例示として企図される、本明細書に記載の特定の態様により範囲を限定されず、機能的に同等な方法および成分は、本発明の範囲内にある。実際、本発明の様々な修飾は、本明細書に示して記載されるものに加えて、先の記載と付帯の図面より当業者に明らかになる。そのような修飾も付帯の特許請求項の範囲内に含まれると企図される。

【 0 2 4 3 】

本発明について記載してきたが、以下の実施例を、限定ではなく、例示のために提供する。

配列同定番号と関連分子

【 0 2 4 4 】

【表 2】

配列番号	分子
1	1 L-17 ポリヌクレオチド配列
2	1 L-17 アミノ酸配列
3	1 L-17 受容体ポリヌクレオチド配列
4	1 L-17 受容体アミノ酸配列
5	1 L-18 受容体: 1 L-1 R r p 1 ポリヌクレオチド配列
6	1 L-18 受容体: 1 L-1 R r p 1 アミノ酸配列
7	1 L-18 受容体: A c P L ポリヌクレオチド配列
8	1 L-18 受容体: A c P L アミノ酸配列
9	1 L-18 結合タンパク質ポリヌクレオチド配列
10	1 L-18 結合タンパク質アミノ酸配列
11	1 L-18 結合タンパク質-F c 融合アミノ酸配列
12	1 L-18 ポリヌクレオチド配列 (非プロセス処理)
13	1 L-18 アミノ酸配列 (非プロセス処理)
14	1 L-18 アミノ酸配列 (I C E プロセス処理)
15	4-1 B B-L ポリヌクレオチド配列
16	4-1 B B-L アミノ酸配列
17	4-1 B B ポリヌクレオチド配列
18	4-1 B B アミノ酸配列
19	C D 30-L ポリヌクレオチド配列 (n t 1-648)
20	C D 30-L ポリペプチド配列 (a a 1-215)
21	C D 30-L ポリヌクレオチド配列 (n t 1-705)
22	C D 30-L ポリペプチド配列 (a a 1-234)
23	C D 30 ポリヌクレオチド配列
24	C D 30 ポリペプチド配列
25	O X 40-L ポリヌクレオチド配列
26	O X 40-L ポリペプチド配列
27	O X 40 ポリヌクレオチド配列
28	O X 40 ポリペプチド配列
29	C D 39 ポリヌクレオチド配列
30	C D 39 ポリペプチド配列
31	F l a g (登録商標) オクタペプチド
32	リンカー-(Gly) ₄ Ser(Gly) ₅ Ser
33	リンカー-GlyAlaGlyGlyAlaGlySer(Gly) ₅ Ser
34	リンカー-(Gly ₄ Ser) ₂
35	リンカー-(GlyThrPro) ₃
36	リンカー-(Gly ₄ Ser) ₃ Gly ₄ SerGly ₅ Ser

10

20

30

40

【0245】

実施例1

IL-17およびIL-18の血漿レベルは、心筋症患者において上昇している

これまでの試験は、様々な型および重症度の心臓血管疾患を有するヒト患者においてIL-17およびIL-18が上昇していることを証明する。

【0246】

一連の試験において、急性および慢性の心不全を有する患者においてIL-17およびIL-18の血漿レベルが上昇していることが見出された。脳死臓器ドナーからの血漿を心臓除去のときに入手して、保存した。様々な臓器を受けたレシピエントの臨床アウトカムに注目した。生存して経過が良好であったレシピエントの群を、最高の医学的サポート 10
に対して抵抗性である心不全により移植後72時間以内に死亡した群とともに採取した。元のドナー、レシピエント、および30%未満の駆出率(EF)を有する非使用ドナーからの血漿について、IL-17およびIL-18をアッセイした。市販のELISAキットに提供されるプロトコルの記載とほとんど同じやり方で血漿試料中のサイトカインレベルを測定した(例えば、ヒトIL-17とヒトIL-18の定量決定のアッセイを提供する、QUANTIKINE(登録商標)R&Dシステムズ、ミネソタ州ミネアポリスを参照のこと)

図1Aおよび1Bに示すように、移植後まもなく死亡した患者では、生存した患者と対照的に、IL-17とIL-18が上昇していた。IL-17とIL-18は、30%未満の駆出率(EF)を有する非使用ドナーにおいても上昇していて、循環IL-17およびIL-18のレベルと疾患重症度の間の相関性を示唆した。さらに、この試験は、心臓患者においてIL-17およびIL-18のサイトカインレベルをアッセイすることの、移植後生存の評価といった診断および予後上の価値を示す。 20

【0247】

上記の試料を使用して、IL-18受容体の発現を評価した。心臓の試料を氷冷した溶解緩衝液(ニューイングランド・バイオラブズ、マサチューセッツ州ベヴェリー)にホモジェナイズした。このホモジェネートを4 (12000×5分)で遠心分離して、上清についてタンパク含量をアッセイした(ピアスBCAキット)。同じ全体量のタンパク質(20mg/レーン)を、5%ゲルを使用するSDS-PAGEへ処した。次いで、タンパク質をニトロセルロース膜へ移し、IL-18R に抗して産生したポリクローナル抗体(AF840-R&Dシステムズ、ミネソタ州ミネアポリス)とECLキットを使用してIL-18受容体を視覚化した。 30

【0248】

図2に示すように、IL-18受容体の相対量は、終末期心不全-ESF(即ち、NYHAのステージ4心筋症)の患者と60%より高い駆出率を有する患者に比較して、30%未満の駆出率(EF)を有する患者においてより高い。上記のデータは、IL-18受容体発現の上昇が心筋機能の損傷と関連していることを証明する。IL-18がToll-IL-1受容体経路(TIR)を介してシグナルを伝達し、リポ多糖とIL-1の両方が負変力性であると仮定すれば、上記の患者に見られる心筋機能不全の一部がIL-18受容体の上昇発現で説明できる。 40

【0249】

多施設「ルネサンス・トライアル」に参画した心臓患者からの試料を評価した。この患者は、ニューヨーク心臓学会の判定委員会(「心臓および大血管の疾患の命名法と診断基準」第9版、マサチューセッツ州ボストン、Little, Brown & co; 1994:253-256)により分類される、連続した機能キャパシティと心臓血管疾患の客観証拠を明示した。上記のアッセイを使用して、試料についてサイトカインレベルを評価した。

【0250】

図3A~3Dは、NYHAクラス1、2、3a、3bおよび4と診断された心筋症患者におけるIL-17およびIL-18の血漿濃度(pg/ml)を図示する。このデータ 50

は、NYHAクラス2、3aおよび3bにおいて循環IL-17の量が劇的かつ予想外に増加していることを示す(図1A)。上昇IL-17レベルは、同じクラスの非虚血および虚血の両方の心筋症で見出された(図1B)。IL-17レベルは、虚血心筋症のNYHAクラス3aにおいて有意により高かった。有意にも、このデータは、IL-17レベルとNYHAクラス3bまでの疾患の進行とNYHAクラス4におけるIL-17の減少との間の直接的な相関性を示す。

【0251】

IL-18の血漿レベルも、NYHAクラス2、3a、3bおよび4で上昇していた(図3C)。IL-17と同様に、このデータは、IL-18レベルとNYHAクラス3bまでの疾患の進行とNYHAクラス4におけるIL-18の減少との間の直接的な相関性を示す(図3C)。非虚血および虚血の心筋症へ細分すると、IL-18レベルは、同じNYHAクラスの非虚血および虚血の両方の心筋症で上昇していた(図3D)。NYHAクラス2、3aおよび3bでは、非虚血心筋症患者が比較的高いレベルのIL-18を有した。

10

【0252】

上記のデータは、IL-17血漿レベルが心臓血管疾患および疾患重症度の予後指標として使用可能であることを証明する。理論に束縛されなければ、IL-17およびIL-18の相対的な発現により、心筋症が非虚血性か虚血性かを診断できるかもしれない(図3Bおよび3Dを比較されたい)。故に、IL-17およびIL-18の循環レベルを検出するアッセイは、心臓血管疾患を診断して疾患重症度を定量的に評価するために使用可能である。総合すると、上記のデータは、IL-17およびIL-18が心臓血管疾患に関連していることを示し、IL-17および/またはIL-18アンタゴニストを単独または組み合わせて投与することによって心臓血管疾患を治療することの根拠を提供する。

20

【0253】

実施例2

心臓移植レシピエントのサイトカインプロフィール

この試験は、特に、移植後72時間以内に死亡した心臓移植レシピエントにおいて、IL-17、IL-18および可溶性4-1BBが上昇していることを示す。このデータは、有意に上昇したレベルのIL-17、IL-18および可溶性4-1BBと心筋機能不全が関連していることを示す。

30

【0254】

心臓移植は、終末期心不全の患者にとって依然として重要な治療モダリティであるが、ドナー臓器の数によりその利用可能性は著しく制限されている。この状況は、臓器ドナーのほぼ20%が脳死に関連した重篤な急性の心筋機能不全を有するので、その心臓を移植に使用することができないという事実によりさらに悪化している(Hosenpud J Dら, Heart Lung Transplant. 2001, 20(8): 805-11)。脳死は、免疫系の顕著な活性化とTNF およびIL6のようなサイトカインの上昇した血漿レベルに関連した破滅的なイベントである(Takada, Mら, Transplantation 1998, 65(12): 1533-42とBirks, E Jら, Transplant Proc. 2001; 33(5): 2749-51)。サイトカインは、ヘルパーT1(Th1)およびTh2のT細胞応答の必須調節因子である(Neurath, M Fら, Nat Med. 2002, 8(6): 567-73)。Th1応答は、マクロファージ活性化を特徴とする好炎症性サイトカインの放出をもたらす、そして妨害されなければ、組織障害をもたらす場合がある。Th2応答は、概してTh1応答を妨害する体液性の免疫応答をもたらす。

40

【0255】

我々は、心臓移植後早期の死が、例えば、急性の拒絶エピソードを始動させ、最終的には心筋機能不全をもたらすことによって、直接的または間接的に心臓機能に影響を及ぼすドナー由来の因子によるのではないかと仮定した。この仮説を検証するために、我々は、心臓移植ドナーの2つの群より血漿を入手した(上記の記載のように)。A群は、レシピ

50

エントが平穩無事な術後経過をたどり、1年より長く生存した16の臓器ドナー由来の試料を含んだ。B群の試料は、最高の医学療法にも抵抗性である心筋機能不全により移植後72時間以内にレシピエントが死亡した14のドナーより入手した。Th1（好炎症性）サイトカインのインターフェロン（IFN）、IL-12、IL-15、IL-17およびIL-18とともに、Th2（抗炎症性）サイトカインのIL-4、IL-5、IL-10およびIL-13の循環レベルを測定した。サイトカインレベルは、LUNIMEX（登録商標）技術（アップステート、マサチューセッツ州ウォルサム）、QUANTIKINE（登録商標）ELISAキット（R&Dシステムズ）または可溶性4-1BB用のカスタムメイドELISA（やはりR&Dシステムズからの捕捉および検出抗体を使用する）を使用して決定した。対照群は、ルーチンの冠動脈バイパス移植片手術を受けた、超音波心臓動態検査では正常な心筋機能を有する21名の健常患者からなった。Th2サイトカインの合計をTh1サイトカインの合計（いずれもpg/ml）で割ることによって循環Th2/Th1比を得た。さらに、抗原提示細胞とT細胞の相互作用の潜在的なマーカーとして、我々は、可溶性受容体4-1BBのレベルも測定した。4-1BBは、活性化T細胞上に存在し、4-1BBリガンド（4-1BB-L）は、抗原提示細胞上に存在し、4-1BB-Lによる4-1BBの動員（engagement）は、副刺激シグナルとして作用する（Kwon, B.ら, Mol Cells. 2000; 10(2): 119-26）。A群およびB群の炎症性メディエーターレベルを21名の非脳死対照被検者のそれと比較した。

【0256】

図9は、4-1BBレベルが、正常被検者に比較して心不全の患者において有意に上昇していたことを示し、慢性関節リウマチ患者と共通して、ヒト心不全におけるこの系の活性化を示唆する（Eur J Immunol. 1998 Jan; 28(1): 290-5）。

【0257】

表2に示すように、レシピエントが移植後に平穩無事なアウトカムを有した脳死臓器ドナーからの血漿試料（A群）は、対照被検者に比較して、有意に上昇したレベルのTh2サイトカイン、IL-4、10および13と、並びにTh1サイトカイン、IFN、IL-12、17および18を含有した。しかしながら、全体的には、前者は0.32の循環Th2/Th1比を維持し、これは対照被検者に見られた0.45と有意に異なっていた。レシピエントが移植後72時間以内に死亡したB群では、Th2サイトカイン、IL-4および13は対照レベルから変化せず、IL-10は対照被検者に比較して上昇していたが、A群試料に比較すると有意に低下していた。IFNは対照試料に比較して上昇していて、IL-12は不変であった。しかしながら、IL-17およびIL-18のレベルの顕著な上昇が確認され、Th2/Th1比の0.028への低下をもたらした（ $P < 0.05$ ）。可溶性4-1BBレベルは対照とA群の患者で同様であったが、B群患者の血漿では有意に上昇したレベルが見出された（図4を参照のこと）。

【0258】

上記のデータから、移植後早期のレシピエント死に関連するドナーの血漿における、循環サイトカインバランスの好炎症（Th1）環境へ向かう変化が確認される。これは、主として、IL-17およびIL-18のレベルの上昇によるものである。IL-18は、IL-1およびリポ多糖と同じシグナル伝達経路を利用する（Sims, JE, Curr Opin Immunol. 2002; 14(1): 117-22）が、これらはいずれも負変力性である。IL-17は、多様な細胞からの一酸化窒素産生を誘発し、多様な細胞種からのいくつかのサイトカインおよびプロスタグランジンの産生も刺激する。特に、B群患者に見られたIL-17およびIL-18の上昇レベルは、移植後早期の不都合なレシピエントアウトカムに十分貢献する可能性がある。B群のドナーの血漿試料では、可溶性4-1BBの有意に上昇したレベルも観察され、これらの患者では、亢進した抗原提示細胞：T細胞の相互作用が起こり得ることを示唆した。

【0259】

ドナーサイトカインの発現とIL-17、IL-18および4-1BBのような分子のレベルの分析は、移植後に集中的な支持療法が必要となり得るか、または本当は移植に使用すべきではないドナーからの心臓を同定するのに貴重である。上記のデータは、脳死における免疫活性化の重要性、移植後アウトカムに対するその潜在的な影響と、ドナーサイトカインバランスを改変させることを目的とした療法には改善されたレシピエントアウトカムをもたらす可能性があるという着想を明確にする。上記の結果は、上昇した4-1BB、並びにIL-17およびIL-18のような他のサイトカインが移植直後のレシピエントにおける拒絶へ心臓を準備させること、またはこれらの4-1BB、IL-17および/またはIL-18が心筋機能の損傷に直接仲介する可能性があることを示唆する。したがって、本明細書に提示する試験は、IL-17、IL-18および4-1BBが心臓血管疾患に関与している可能性があることを証明し、IL-17、IL-18および/または4-1BBアンタゴニストを単独または組み合わせて投与することによって心臓血管疾患を治療することの根拠を提供する。

10

【0260】

【表3】

表2

	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13	IFN γ	IL-12	IL-15	IL-17	IL-18	4-1BB
対照 平均 (SE)	2.6 (0.9)	0.9 (0.3)	1.7 (0.3)	1.9 (0.7)	1.9 (0.4)	10.4 (4.7)	38.7 (13.85)	1.1 (0.5)	68.1 (23)	30 (20)
A群 平均 (SE)	14 (5.3)	2.4 (1.6)	19.9 (4.8)	8.8 (5.9)	20.7 (8.6)	41.5 (31.6)	8.6 (3.1)	18 (18)	186 (50)	90 (80)
B群 平均 (SE)	3.5 (0.4)	0.45 (0.1)	7 (2)	1.1 (0.2)	8.4 (1.5)	7.4 (1.9)	5.4 (1.8)	292 (70)	373 (51)	420 (170)

20

【0261】

実施例3IL-17レベルと心室の寸法

これらの試験は、IL-17への曝露が左心室の寸法の低下をもたらすことを証明する。

。

【0262】

30

雌性C57/Black6マウスをアベルチンで麻酔した。中線開腹術を実施して、下大静脈ヘカニューレを挿入した。次いで、ベースラインの心エコー図測定を実施した。次いで、ヒトIL-17(200ng)を200mlのPBS(pH7.4)のボラスで投与した。指定の時点で心エコー図測定を繰り返し、左心室の内径を拡張期と収縮期で定量した。

【0263】

図4に示すように、これらのデータは、IL-17が、急激な投与に続き、持続した駆出率を伴う心室寸法の減衰をもたらすことを証明する。拡張期寸法の低下は、IL-17が拡張期機能不全に仲介するのにある役割を担うことを示唆するかもしれないが、それは収縮期心不全にも関与しているかもしれない。このデータは、IL-17が心臓血管疾患に関与している可能性があることを示唆し、IL-17アンタゴニストを投与することによって心臓血管疾患を治療することの根拠を提供する。

40

【0264】

実施例4

IL-17およびIL-18のレベルは、マウスのミオシン誘発性心筋炎モデルにおいて上昇している

この試験は、ヒトに見られるのと同様の疾患経過を示す、実験自己免疫心筋炎(EAM)モデルにおいてIL-17およびIL-18が上昇していることを示す。用語「EAM」および「心臓ミオシン誘発性心筋炎」は、同様のモデルを記載するために交換可能的に使用する。

50

【0265】

当該技術分野では、心臓ミオシンが主要な自己抗原である自己免疫プロセスに心筋炎が関連していることがよく知られている。心臓ミオシン誘発性心筋炎は、組織学的にはウイルス誘発性心筋炎に似ている。心筋炎のような炎症性の心臓疾患には抗体とT細胞の両方が関連している可能性があると考えられている。ヒトのこの疾患を模倣する実験自己免疫心筋炎モデルが多様な齧歯動物モデルにおいて開発されて、当該技術分野においてよく知られている（例えば、A/Jマウスでは：Neu, N, ら, J. Immunol. 1987, 139: 3630 - 3636とSmith, SC, ら, J. Immunol. 1991, 147: 2141 - 2147; BALB/cマウスでは：Pummaler, CL, ら, J. Clin. Invest. 1996, 97: 2057 - 2062とLiao, L, ら, J. Clin. Invest. 1993, 92: 2877 - 2882; および、Lewisラットでは：Kodama, M, ら, Clin. Immunol Immunopath. 1991, 57: 250 - 262とWegmann, KW, ら, J. Immunol. 1994, 153: 892 - 900を参照のこと）。

【0266】

A/JマウスEAMモデルにおいては、抗IL-4モノクローナル抗体でIL-4を遮断することが、免疫応答をTh2様応答からTh1様応答へシフトさせることによってEAMの重症度を低下させて、IFN- γ 産生の同時増加を伴うことが示され、このことは、IFN- γ がこの疾患を制限することを示唆した。IFN- γ の遮断が疾患を増悪させることが示され、それによって、EAMモデルにIFN- γ ノックアウト（IFN- γ ノックアウトマウス）を使用することの基礎が確立された（Afanas'yeva, M, ら, Am J Pathol 2001, 159: 193 - 203）。

【0267】

BALB/cとIFN- γ ノックアウトマウスを、200 μ gの α -ミオシン重鎖+MTB（結核菌は1ml H37Raにつき5mgで含めた；ディフコ/ベクトンディキンソン、ニュージャージー州フランクリンレイクス）と500 ngの百日咳毒素（Listバイオロジカル・ラボラトリーズ、カリフォルニア州キャンベル）を400 μ lの容量中で腹腔内に投与して、免疫化した。インターフェロン欠損マウスは、ジャクソンラボラトリーズ（メイン州バーハーバー）より入手した。BALB/cとIFN- γ ノックアウトマウスを、百日咳毒素のない完全フロイントアジュバント（CFA）中に製剤化したミオシンでの免疫化により、7日目に追加免疫した。35、55または85日目に動物を犠牲にし、以下の分析を実施した：組織学、抗ミオシン抗体力価、血清サイトカインプロファイルおよび抗原特異的T細胞増殖アッセイ。数匹の動物で超音波心臓動態診断を行った。

【0268】

α -ミオシン重鎖で免疫したBALB/cおよびIFN- γ ノックアウトマウスは、標準ELISA技術により測定されるように、ミオシンペプチドに対する抗体を発現した。ミオシン免疫化BALB/cおよびIFN- γ ノックアウトマウスは心筋病変を発症したが、ノックアウトマウスは、陰性対照およびBALB/cマウスに比較して、病変数および重症度の増加を示した。さらに、IFN- γ ノックアウトマウスは、陰性対照およびBALB/cマウスに比較して、より大きな度合いの心筋炎症および線維症、並びに心臓/体重比のより大きなパーセント増加を示した。ミオシン免疫化IFN- γ ノックアウトおよびBALB/cのマウスでは、標準チミジン取込みアッセイにより測定されるように、ミオシン特異的T細胞増殖応答が示された。

【0269】

さらに、心臓ミオシン誘発心筋炎モデルでは、IL-17およびIL-18の血漿レベルが上昇していた。実施例1に記載のような市販のELISAキットを使用して、IL-17およびIL-18をアッセイした。図5Aに示すように、IFN- γ ノックアウトマウスでは、免疫化から28および35日目にIL-17のレベルが顕著に増加していた。IL-18の血漿レベルは、免疫化から9日目に急激に上昇し、28日目まで上昇したままであった（図5B）。このデータは、IL-17およびIL-18の循環血漿レベルがミオシ

ン誘発モデルにおいて上昇することと、IL-17およびIL-18が心筋炎の免疫病理に関連していることを明らかに示す。このデータは、IL-17および/またはIL-18アンタゴニストを単独または組み合わせて投与することによって心臓血管疾患を治療することの根拠を提供する。

【0270】

実施例 5

ミオシン誘発心筋炎モデルのT細胞におけるIL-17発現

これらの実験は、EAMマウスより単離されるT細胞集団においてIL-17が高いレベルで発現されていることを証明する。EAMモデルの詳細は、先の実施例に提供する。

【0271】

標準技術を使用してEAMマウスよりT細胞を単離し、抗CD3抗体で刺激した。図6Aに示すように、心臓ミオシンで免疫化され、組織学的に証明された心臓病理を有する動物(動物B)は、陰性対照(動物CおよびD)、並びに心臓ミオシンで免疫化されたが心臓病理の徴候は明示しない動物(動物A)に比較して、IL-17の有意により高い発現レベルを有した。

【0272】

EAMマウスにおけるIL-17発現は、ミオシン特異的なT細胞応答であることが示された。平均すると、IL-17レベルは、心臓ミオシンで免疫化した動物より単離してミオシンを与えた抗原提示細胞へ曝露したT細胞では、ミオシンへ曝露していない抗原提示細胞に比較して、ほぼ25倍高かった(図6B)。

【0273】

関連した試験において、抗原提示細胞を、
- ミオシンタンパク質全体を与えるのではなく、
- ミオシンペプチドへ曝露した。先の試験と同じように、心臓ミオシンで免疫化して、心臓病理の組織学的証拠を有する動物(動物B)からのT細胞は、ペプチドをパルスされた抗原提示細胞による抗原特異的な刺激へ応答して、驚くほど高いレベルのIL-17を放出した(図6C)。理論に束縛されなければ、この試験は、活性化(おそらくはCD4+)T細胞が、心臓抗原を担う抗原提示細胞に遭遇すると、増殖してIL-17を放出することを示唆する。放出されたIL-17は、炎症細胞の心臓への浸潤、直接的な心筋損傷へ貢献する可能性があるか、または心臓機能に対する直接的な抑圧効果を及ぼす可能性がある。

【0274】

実施例 6

急性冠症候群患者におけるIL-18およびIL-18結合タンパク質の血漿レベル

上記の試験は、急性冠症候群を有する患者においてIL-18が上昇していることと、主要不都合心臓イベント(MACE)のリスク増加とIL-18が相関することを示す。

【0275】

患者を3つの患者群: 安定型冠動脈疾患(CAD)、心臓トロポニンI(cTnI)血漿レベルが0.4 ng/ml未満の急性冠症候群(ACS)、または心臓トロポニンI(cTnI)血漿レベルが0.4 ng/mlより高い急性冠症候群(ACS)へ層別した。CAD群には、安定型狭心症を有する患者が含まれ、ACS群には、不安定型狭心症、非ST上昇心筋梗塞、ST上昇心筋梗塞および突然虚血死を有する患者が含まれた。

【0276】

心臓トロポニンIは、虚血より生じる心筋壊死のような心筋損傷の診断の信頼し得る生化学マーカーとして認知されている。上昇した心臓トロポニンIは、短期および長期の不都合な心臓イベントの高リスクプロフィールと強く関連している。心臓トロポニンIの相対レベルを測定することは、急性冠症候群患者のリスクおよびアウトカム予測の信頼し得る層別化を提供する。この試験において、0.4 ng/mlより高い心臓トロポニンIレベルを有する患者は、重篤で不都合な心臓イベントを蒙り、しばしば、10日以内の死を生じた。

【0277】

10

20

30

40

50

市販のE L I S Aキットに提供されるプロトコル（例えば、ヒトI L - 1 8の定量決定のアッセイを提供する、Q U A N T K I N E（登録商標）R & Dシステムズ、ミネソタ州ミネアポリスを参照のこと）にほとんど記載のようにして、3群のそれぞれからの患者由来の血漿試料においてサイトカインレベルを測定した。I L - 1 8結合タンパク質A（I L - 1 8 B p a）は、R & Dからの市販の抗体を使用して測定した。捕捉抗体でプレートをコートした。次いで、試料をウェルへ加え、室温で2時間インキュベートした。次いで、ウェルを洗浄し、ビオチニル化検出抗体とともにインキュベートし、標準技術と色素原としてのT M Bを使用して、免疫反応を検出した。自社で産生したI L - 1 8結合タンパク質を標準品として使用した。

【0278】

10

図8Aに示すように、I L - 1 8の血漿レベルは、0 . 4 n g / m l未満のc T n Iレベルを有するA C S群において上昇し、そしてより有意には、I L - 1 8レベルは、0 . 4 n g / m lより高いc T n Iレベルを有するA C S群の患者において一層高かった。図8Bは、3群間のI L - 1 8 : I L - 1 8 B P a比を示し、I L - 1 8結合タンパク質レベルがいずれのA C S群でも上昇していないことを例示し、そのことは、上昇したI L - 1 8レベルがこの免疫機構によって抵抗されないことを証明する。

【0279】

上記のデータは、後続の主要不都合心臓イベントの高リスク状態にあるA C S患者においてI L - 1 8の循環レベルが上昇していることと、I L - 1 8結合タンパク質レベルがこの免疫応答に対処するために同時に上昇しないことを示す。このように、I L - 1 8は心臓血管疾患に関与している可能性があり、I L - 1 8アンタゴニストを単独で、または本明細書に記載の他のアンタゴニストと組み合わせて投与することによって心臓血管疾患を治療することの根拠を提供する。

20

【0280】

さらに、上昇I L - 1 8レベルは、上昇c T nレベルと疾患進行または疾患重症度と関連する。故に、I L - 1 8は、重篤で不都合な心臓イベントの増加リスクについての代替マーカーとしても役立つかもしれない。本発明の態様には、疾患の進行または重症度を評価する目的で、心臓血管疾患を有する患者のI L - 1 8のレベルを決定するための診断アッセイが含まれる。

【0281】

30

実施例7

4 - 1 B B ノックアウトマウスは、拡張性心筋症のA d r i a m y c i n（登録商標）誘発マウスモデルにおいて保護される

上記の実験は、4 - 1 B B - L ノックアウトマウス（4 - 1 B B - L^{-/-}または4 - 1 B B - L^{-/-} K O）が拡張性心筋症のA d r i a m y c i n（登録商標）誘発マウスモデルにおいて死亡を示さず、心臓機能不全の発症が遅延したことを証明する。

【0282】

A d r i a m y c i n（登録商標）（塩酸ドキソルピシン、アントラサイクリン抗生物質、ファルマシア、ミラノ、イタリア）は、鬱血性心不全をもたらす心筋毒性、即ち虚血性または拡張性の心筋症を明示することが示されている。A d r i a m y c i n（登録商標）を使用してこの数年にわたり多くの動物モデルが開発されて、当該技術分野においてよく知られている。

40

【0283】

この試験には雄性4 - 1 B B - L^{-/-}（53日齢）およびC 5 7 B 1 / 6（59日齢、T a c o n i c , ニューヨーク州ジャーマンタウン）を使用した。100 ~ 150 μ l のケタミン - キシラジンでマウスを麻酔して、体重測定し、耳タグを付けた。マウスを1 c m厚のアガロースゲルパッド（S o n o s 5 5 0 0 - フィリップス社、S 1 2プロープ付きと、1 c m厚の1 %アガロースゲルパッドの付いたI n s t e c加熱顕微鏡載物台）上で平伏させたまま、傍胸骨長軸図よりベースラインの超音波心臓動態診断（エコー）測定を撮った。測定項目には以下が含まれる：A o R径、L A寸法、A C S、R V d、I V

50

S d、L V I D d、L V P W d、I V S s、L V I D s、L V P W s、およびH R。0、2.5、5および7週目にエコー評価を実施して、週ごとのエコー測定に基づいて各マウスへ表現型を割り当てた。エコー機器により分割短縮(F S)を算出した。A o RおよびL Aの寸法が1:1の比を有するP S L A画像を入手することによって、マウス間の測定値を正規化した。追加的に、僧房弁の弁膜尖の遠位先端まで、L VをP W全体で垂直的に切開することによって入手するMモード画像よりL V寸法を採取した(掃引速度:100)。拡張期測定値はE K GのQ R Sコンプレックスのピークで採取し、収縮期測定値は、P Wの最大収縮の時点で記録した。すべての測定値を光学ディスクに記録し、ビデオテープに撮り、印字した。

【0284】

10

すべてのエコー測定値を入手した後で、22.5 mg/kgのA d r i a m y c i n (登録商標)(シグマ-アルドリッチ/フルカ、ミズーリ州セントルイス)をマウスの後眼窩に注射し、麻酔より開腹させた。アドリアマイシンは、10 mg/mlのストック濃度用に粉末ストックより10 mgを1 mlの滅菌水に溶かすことによって調製した。滅菌生理食塩水を用いてさらなる希釈を行った。溶液は注射の当日に作製した。22.5 mg/kgの用量を受けるマウスには、全量0.5625 mgのために3.75 mg/mlの調製希釈液の150 μ lを注射した。体重は毎日記録した。

【0285】

15%より大きい体重損失によるか、または試験の最後に動物を犠牲にしたならば、心臓を採取し、10% N B F (中性緩衝化ホルマリン)に固定した。簡潔に言うと、胸部切開を行って心臓を曝露した。27 g 針を使用して、1 M K C l (最終濃度=50 mM)を心臓へ直接注射して、心臓を拡張状態で停止させた。次いで、P B Sを心臓へ直接注射して、血液を房室より流した。心臓を慎重に取り出し、P B Sで濯ぎ、10% N B Fへ入れた。

20

【0286】

上記に述べたように、エコー結果に基づいて各マウスへ表現型を割り当て、各マウスを心毒性の度合いにしたがって、ステージI、II、IIIまたはIVへ分類した。マウスの表現型を決定するには、以下の判定基準を使用した: 拡張期機能不全: L V I D d % およびL V I D s % が>10%低下、F Sは同じまたは増加; 収縮期機能不全: L V I D d % + L V I D s % が>25%増加、F Sは>12%低下; 拡張期および収縮期機能不全: L V I D d % + L V I D s % が>20%低下、F Sは>12%低下; 拡張性: L V I D d % >12%、L V I D s % >12%。

30

【0287】

10匹の野生型マウスのうち4匹がA d r i a m y c i n (登録商標)注射後8~10日の間に死亡した。これらの死は、慢性心不全の死とみなされた。A d r i a m y c i n (登録商標)でチャレンジした野生型マウスは、およそ2週間の50%死亡率を示し、およそ66%のマウスがA d r i a m y c i n (登録商標)チャレンジ後2~2.5週で心機能不全の証拠を明示した。野生型生存個体は、概して2つの表現型を示した:(a) L V房室拡張と駆出率(E F)減少を伴う収縮期機能不全、および(b)房室寸法の進行性の低下と心室充填の減少を伴うが、E Fは維持されている拡張期機能不全。

40

【0288】

対照的に、4-1 B B - L K Oマウスでは死亡が観察されず、4-1 B B - L K Oマウスのいずれも、野生型マウスの59~71%に比較して、A d r i a m y c i n (登録商標)チャレンジに続くどんな重篤な心毒性の徴候も示さなかった。

【0289】

【表 4】

表 3

	4-1BB-L KO	野生型 B 1 6	従来型 B 1 6 対照
機能不全なし (クラス I)	7/14 (50%)	2/7 (29%)	9/22 (41%)
一過性の機能不全 (クラス II)	1/14 (7%)	0/7 (0%)	1/22 (5%)
進行性の機能不全 (クラス III)	6/14 (43%)	1/7 (14%)	5/22 (23%)
慢性不全 (クラス IV)	0/14 (0%)	4/7 (57%)	7/22 (32%)
全体の心毒性	7/14 (50%)	5/7 (71%)	13/22 (59%)

10

【0290】

上記の結果は、4 - 1 B B および 4 - 1 B B - L 受容体：リガンド対が心臓血管疾患に関連した免疫応答に関与する可能性があり、特に、虚血心筋症にある役割を担うことを証明する。これらのデータは、4 - 1 B B および 4 - 1 B B - L の相互作用に拮抗することによって、心臓血管疾患、特に虚血心筋症の症状を予防、治療または緩和することの信頼

20

【0291】

実施例 8

4 - 1 B B は、損傷した心臓間質細胞により発現されて、4 - 1 B B / 4 - 1 B B L シグナル伝達は、マウスの *Adriamycin* (登録商標) 誘発性心筋症へ貢献する

マウスおよびヒトの心筋炎および拡張性心筋症には、副刺激経路の関与が示唆されてきた。副刺激リガンドの発現が心筋細胞上で増加している一方で、その受容体は浸潤性免疫 / 炎症細胞上で発現されている (Sekoら, 2002; Sekoら, 2001; Sekoら, 1998)。これらの試験の目的は、他の型の拡張性心筋症で見られる広汎な炎症浸潤物とは関連していない、*Adriamycin* (登録商標) 誘発性心筋症の発症および進行における 4 - 1 B B / 4 - 1 B B L 副刺激経路の役割を決定することであった。これらの試験は、*Adriamycin* (登録商標) 誘発性心筋症における 4 - 1 B B / 4 - 1 B B L 免疫副刺激経路の役割を証明するものであり、4 - 1 B B の新規な心発現様式を証明し、*Adriamycin* (登録商標) 誘発性心筋症への副刺激貢献の機序としてアポトーシスとの関連を示唆した。

30

【0292】

1. 「4 - 1 B B および 4 - 1 B B L の発現は、*Adriamycin* (登録商標) 処置心筋においてアップレギュレートされる」

6 週齢の C 5 7 B 1 / 6 マウスに 45 mg / kg の *Adriamycin* (登録商標) を後眼窩より注射し、心臓を処置後 0、24、48、72、および 96 時間目に採取した。冷凍切片で CD 45 の免疫組織化学染色を実施して炎症浸潤物を検出し、並びに 4 - 1 B B についても染色した。CD 45 の免疫組織化学は、*Adriamycin* (登録商標) 処置心筋において陽性細胞を認識しなかった。陽性対照として、CD 45 陽性細胞を脾臓に検出した。*Adriamycin* (登録商標) 心筋症においては炎症浸潤物を観察しなかったが、我々は、*Adriamycin* (登録商標) 投与後 2 日以内に、1 ~ 5 % の心臓間質細胞上で 4 - 1 B B の発現が誘発されていることを見出した。4 - 1 B B 陽性細

40

50

胞を明示する動物の比率としては、心筋において4 - 1 B Bが陽性であったのは、48時間で50%のマウス、72時間で75%であった。免疫組織化学分析において、4 - 1 B B Lは、A d r i a m y c i n（登録商標）処置の後で陽性が増加した。野生型および4 - 1 B B L - / - における白血球数は、末梢血において好中球、単球およびリンパ球が同様のレベルにあることを明示し、4 - 1 B B Lの損失による心機能の改善が造血および炎症性の変化に無関係であることを示した。

【0293】

2. 「作動性抗4 - 1 B B抗体（M6）での処置は心機能不全を促進し、m4 - 1 B B - F cは、心機能不全を遅延および抑制した」

4 - 1 B B（M6）に対する作動性抗体は、A d r i a m y c i n（登録商標）チャレンジモデルにおいて心機能不全を促進して増悪させた。対照的に、4 - 1 B B Lの可溶性デコイ受容体であるm4 - 1 B B - F cは、心機能不全を遅延および抑制した。

【0294】

4 - 1 B Bに対する作動性抗体（M6，アムジェン・ハイブリドーマグループのロット9159 - 069）の100 μ g / マウスを0、3および6日目に腹腔内投与した。0日目は、A d r i a m y c i n（登録商標）チャレンジの日である。各処置方式にN a C l対照を含めた。野生型（WT）、4 - 1 B B L K O、または4 - 1 B Bへの活性化抗体（M6）で処置したWTマウスを22.5 ~ 45 mg / kgに及ぶ用量のA d r i a m y c i n（登録商標）で後眼窩注射によりチャレンジして、その直後に心機能の超音波心臓動態（E C H O）解析を行った。A d r i a m y c i n（登録商標）チャレンジ後1、2.5および/または5週目に連続E C H O解析を実施した。1つの試験では、WTおよび4 - 1 B B L K OマウスをA d r i a m y c i n（登録商標）（45 mg / kg）でチャレンジし、24、48および72時間目に心臓を採取した。I H CによるT U N E L陽性とウェスタンブロットによるカスパーゼ3活性化をアポトーシスの指標として判定した。4 - 1 B B L K Oマウスは、Mモード超音波心臓動態診断法により評価すると、WT対照に比較して心血管機能が改善し、心筋症の浸透度が減少した（以下の表4と図10を参照のこと）。表4では、心拍血液量、収縮終期および拡張終期容量の組合せを使用して、機能表現型を分類した。4 - 1 B B L K Oマウスでは、A d r i a m y c i n（登録商標）投与後の心毒性が抑制され、機能が改善した。WT C 5 7 B 1 / 6マウスの4 - 1 B B 活性化抗体（M6）での処置は、A D R誘発性心筋症の発症を促進した（図11）。

【0295】

【表5】

表4

表現型	WT	4-1BB-/- KO	M6 抗体	M4-1BB-Fc
正常	48%	79%	53%	70%
機能不全	52%	21%	47%	30%

【0296】

3. 「アドリアマイシン心筋ではアポトーシスが増加した」

C 5 7 B 1 / 6マウスを45 mg / kgのアドリアマイシンで処置した。心臓組織を様々な時点で採取し、T U N E L陽性核を分析した。T U N E L陽性は48時間で増加して、72時間でピークになった。A d r i a m y c i n（登録商標）処置マウスより心臓の全消化物を採取し、トロポニン - I（T n I）抗体およびF I T C共役二次抗体とヨウ化プロビジウムで染色した。T n I陽性細胞についてサブG 1 D N A断片を解析した。WTマウスでは、心臓のT U N E L陽性がA d r i a m y c i n（登録商標）注射後48および72時間で増加した。

【0297】

T U N E LおよびサブG 1 D N Aにより測定される心臓アポトーシスは、間質細胞での4 - 1 B Bの発現の増加に一致して、A d r i a m y c i n（登録商標）投与後3日間

10

20

30

40

50

増加した。A d r i a m y c i n (登録商標) チャレンジ後5週目(このとき、心機能不全は野生型において最大であるが、4 - 1 B B L - / - マウスではほとんど存在していない)に判定した慢性の進行性アポトーシスは、W T マウス(4倍)に比較して、4 - 1 B B L - / - マウスでより低かった(ベースラインの1.5倍)。別の試験において、ウェスタンブロットにより判定するカスパーゼ3活性化は、A d r i a m y c i n (登録商標)(45mg/kg)投与後48~72時間で増加した。対照的に、A d r i a m y c i n (登録商標)は、カスパーゼ3切断を4 - 1 B B L - / - 心筋において誘発しなかった。ウェスタンブロットにより判定すると、A d r i a m y c i n (登録商標)は野生型においてA k t のリン酸化を抑制したが、4 - 1 B B L - / - の心臓では抑制しなかった。J N K および p 3 8 のリン酸化は、A d r i a m y c i n (登録商標)により影響されなかった。故に、4 - 1 B B / 4 - 1 B B L の免疫副刺激経路がA d r i a m y c i n (登録商標)誘発性心筋症に貢献するのは、おそらくはA k t シグナル伝達の変調を介してであろう。

【0298】

結論として、4 - 1 B B L 欠損マウスと4 - 1 B B L デコイ受容体処置マウスにはアドリアマイシン誘発性心臓障害への部分抵抗性が与えられた一方で、4 - 1 B B 活性化抗体は障害の発症を促進し、心臓におけるA d r i a m y c i n (登録商標)効果へ4 - 1 B B が貢献することを示唆した。T U N E L、サブG1 D N A および活性化カスパーゼ3により測定されるアポトーシスは、A d r i a m y c i n (登録商標)処置された野生型心筋において増加したが、4 - 1 B B L - / - においては抑制された。A k t のリン酸化はA d r i a m y c i n (登録商標)により選択的に抑圧されたが、4 - 1 B B L の損失により維持され、心臓中の副刺激経路によるアポトーシスの変調がおそらくは、J n k や p 3 8 のシグナル伝達ではなく、A k t を介することを示唆した。4 - 1 B B L - / - におけるアポトーシス指標の減少と心機能の改善の一致は、A d r i a m y c i n (登録商標)誘発性の心不全にアポトーシスが必須の役割を担うことを示唆する。

【0299】

実施例9

I L - 17、I L - 17 R、I L - 18、I L - 18 R、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、O X 40、C D 30、C D 30 - L および C D 39 に対して産生する抗体

標準技術を使用して、I L - 17、I L - 17 R、I L - 18、I L - 18 R、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、O X 40、C D 30、C D 30 - L および C D 39 に対してモノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体を産生した。これらの抗体の1以上、またはI L - 17、I L - 17 R、I L - 18、I L - 18 R、4 - 1 B B、4 - 1 B B - L、O X 40、O X - 40 L、C D 30、C D 30 - L または C D 39 へ抗して向けられる他の抗体は、心臓血管疾患の治療のためにアンタゴニストとして使用可能である。抗体を産生するために使用する免疫原には、精製ポリペプチド、細胞外ドメインのようなその断片、細胞外ドメインのF c 融合タンパク質、並びに細胞外ドメインのロイシンジッパー誘導体が含まれる(以下の表3を参照のこと)。当然ながら、任意の免疫原性断片のような他の型のタンパク質も、単独または他のタンパク質と融合して、抗体を産生するために使用可能である。さらに、ポリペプチドをコードするD N A も免疫原として使用可能であり、例えば、D N A を皮内(R a z ら, 1994, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 91:9519)または筋肉内(W a n g ら, 1993, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90:4156)に投与することが可能であり(生理食塩水がD N A をベースとする抗原に適した希釈剤であることがわかっている)、P a r d o l l および B e c k e r l e g, I m m u n i t y 3:165, 1995により概説されるように、他の同様に技術によってもよい。

【0300】

一般に、抗体は以下の方法により産生した: アジュバント(完全または不完全フロイントアジュバント、ミョウバン、またはR i b i アジュバント R 700 (R i b i, マサチューセッツ州ハミルトン))のような別のアジュバントのような)に乳化したポリペプチ

ド免疫原で齧歯動物（例えば、BALB/cマウスまたはLewisラット）を免疫化して、10～100マイクログラムに及ぶ量で皮下または腹腔内に注射した。10日～3週日の後で、免疫化した動物を追加の免疫原で追加免疫し、その後1週、2週または3週ごとの免疫化スケジュールで定期的に追加免疫した。

【0301】

後眼窩出血または尾先端切除により血清試料を定期的に採取して、ドットブロットアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着検定）、免疫沈降法、または元の免疫原への抗体結合のFACS解析のような他の好適なアッセイにより、ポリペプチド特異抗体を試験した。適切な抗体力価の検出に続き、陽性動物に対して各免疫原の生理食塩水溶液を最後に1回静脈内注射した。3～4日後、動物を犠牲にし、脾臓細胞を採取し、マウス骨髄腫細胞系、例えばNS1または、好ましくはP3X63Ag8.653（ATCC CRL-1580）へ融合した。このハイブリドーマ細胞を、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）選択培地においてマルチプルマイクロタイタープレート中でプレート培養した。

10

【0302】

陽性ハイブリドーマ細胞を同系の齧歯動物へ腹腔内注射して、高濃度のモノクローナル抗体を含有する腹水を産生させた。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、様々な技術によって、フラスコまたはローラーボトルにおいて*in vitro*で増殖させた。硫酸アンモニウム沈殿法に続くゲル排除クロマトグラフィーによりモノクローナル抗体を精製した。あるいは、プロテインAまたはプロテインGへの抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーも使用した。

20

【0303】

当然ながら、米国特許第4,411,993号に記載されるような他の慣用技術も使用可能である。例えば、免疫原の調製、アジュバントの選択および免疫化プロトコルは、当該技術分野においてよく知られていて、例えば、「抗体：実験マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual）」HarlowおよびLand（監修）、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（1988）に見出すことができる。

【0304】

30

【表 6】

表 5

分子	抗体名	免疫原	種	種類/アイソタイプ
IL-17	mIL-17-M210	mCTLA8-Fc	ラット	mAb
IL-17	mIL-17-P1	mIL-17	ウサギ	ポリクローナル
IL-17R	hIL-17R-M202	hIL-17R-Fc (cos)	マウス	IgG2a
IL-17R	hIL-17R-M203	hIL-17R-Fc (cos)	マウス	IgG1
IL-17R	hIL-17R-M204	hIL-17R-Fc (cos)	マウス	IgG2a
IL-17R	mIL-17R-M177	mIL-17R-Fc	ラット	IgG2a
IL-17R	mIL-17R-M178	mIL-17R-Fc	ラット	IgG2a
IL-17RH	mIL-17RH-M561	mIL-17RH-Fc	ラット	IgG2a
IL-17RH	mIL-17RH-M561	mIL-17RH-Fc	ラット	IgG2a
IL-18	hIL-1R/AcpL-P1	hIL-1R/AcpL-Fc	ウサギ	ポリクローナル
IL-18	mIL-1R/AcpL-P1	mIL-1R/AcpL-Fc	ウサギ	ポリクローナル
IL-18R	hIL-18R-M495	hIL-18R	ラット	IgG2b
IL-18R	hIL-18R-M496	hIL-18R	ラット	未決定
IL-18R	hIL-18R-M497	hIL-18R	ラット	IgG2b
IL-18R	mIL-18R-M375	mRpl-Fc	ラット	IgG1
IL-18R	mIL-18R-M376	mIL-1R/RpL-Fc	ラット	IgG2a
IL-18R	mIL-18R-M377	mIL-1R/RpL-Fc	ラット	IgG1
IL-18R	hIL-18R-P1	h2F1 GST	ウサギ	ポリクローナル
IL-18R	hIL-18R-P1	sol m2F1	ウサギ	ポリクローナル
4-1BB	h41BB-M121	h4-1BB-Fc	マウス	mAb / IgG1
4-1BB	h41BB-M127	h4-1BB-Fc	マウス	mAb / IgG1
4-1BB	h41BB-M135	h4-1BB-Fc	マウス	mAb / IgG1
4-1BB	h41BB-M4	sol h4-1BB-Fc	マウス	mAb / IgM
4-1BB	h41BB-M8	sol h4-1BB-Fc	マウス	mAb / IgG3
4-1BB	h41BB-M6	sol m4-1BB-Fc	ラット	mAb / IgG2a
4-1BB	m41BB-P1	sol m4-1BB-Fc	ウサギ	ポリクローナル
4-1BB-L	m41BBL-M520	m4-1BBL-leuzip	ラット	mAb / IgG2a

【表 7】

4-1BB-L	m41BBL-P2	flag m4-1BBL	ウサギ	ポリクローナル
CD30	hCD30-M44	hCD30-Fc	マウス	mAb / IgG1
CD30	hCD30-M67	hCD30-Fc	マウス	mAb / IgG1
CD30-L	hCD30L-M80	hCD30L-Fc/CV-1	マウス	mAb / IgG2b
CD30-L	hCD30L-M81	hCD30L-Fc/CV-1	マウス	mAb / IgG2b
CD30-L	hCD30L-M82	hCD30L(CHO)	マウス	mAb / IgG2a
CD30-L	mCD30L-M15	mCD30L(CHO)	ラット	mAb / IgG2a
CD30-L	mCD30L-M30	mCD30L(CHO)	ラット	mAb / IgG2a
OX40	mOX40-M5	mOX40-Fc	ラット	IgG1
OX40	mOX40-M6	mOX40-Fc	ラット	IgG2b
CD39	mCD39-M105		ラット	mAb / IgG2a

10

【図面の簡単な説明】

【 0 3 0 6 】

20

【図 1】図 1 A および 1 B は、3 つの異なる群（生存ドナーレシピエント、48 時間未満に死亡したドナーレシピエント、および 30 % 未満の駆出率（EF）の非使用ドナー）に関する、心臓ドナー血漿中の IL - 17 および IL - 18 のレベルをそれぞれ図示する。

【図 2】図 2 は、30 % 未満の駆出率（EF）を有する患者、終末期不全（ESF）状態にある患者、および 60 % より高い駆出率（即ち、正常心筋）を有する患者における IL - 18 受容体の相対量（relative abundance）を示す。

【図 3】図 3 A ~ 図 3 D は、様々な段階の心筋症にある患者間の IL - 17 および IL - 18 血漿レベルの比較レベルを示す。図 3 B および 3 D は、この患者集団を非虚血群と虚血群へさらに分割する。

【図 4】図 4 は、移植後に好ましいレシピエントアウトカム（A 群）または不都合なレシピエントアウトカム（B 群）を有する対照被検者またはドナーの IL - 17（白棒）および IL - 18（黒棒）および 4 - 1 B B（斜線棒）の血漿レベルを例示する。

30

【図 5】図 5 は、IL - 17 を投与することの心室の大きさに対する経時的な効果を例示する。

【図 6】図 6 A および 6 B は、炎症性心筋炎および心筋症を誘発する心臓ミオシンペプチドで免疫した IFN - γ マウスにおける IL - 17 および IL - 18 の血漿レベルを図示する。

【図 7】図 7 A ~ 図 7 C : 図 7 A は、実験自己免疫心筋炎（EAM）モデルからのマウスにおける IL - 17 レベルを示し、ここで、組織学的に証明された心臓病理を有するマウス（動物 B）は、陰性対照（動物 C および D）より高い発現レベルの IL - 17 を有した。図 7 B は、EAM を有するマウスより入手した T 細胞からの IL - 17 放出が対照マウスと比較しておよそ 25 倍高かったことを示す。心臓ミオシンで免疫した動物より T 細胞を単離し、ミオシンを与えた抗原提示細胞またはミオシンへ曝露していない抗原提示細胞へ曝露した。図 7 C は、心臓ミオシンで免疫して心臓病理の組織学的な証拠を有する動物（動物 B）からの T 細胞がペプチドでパルスした抗原提示細胞による抗原特異刺激にตอบสนองして高レベルの IL - 17 を放出したことを例示する。

40

【図 8】図 8 A および 8 B は、3 つの患者群（安定型冠動脈疾患（CAD）、心臓トロポニン I（cTnI）血漿レベルが 0.4 ng / ml 未満の急性冠症候群（ACS）、または心臓トロポニン I（cTnI）血漿レベルが 0.4 ng / ml より高い急性冠症候群（ACS）を有する群）へ層別した患者における IL - 18 レベルと IL - 18 の IL - 1

50

8 結合タンパク質に対する比をそれぞれ示す。

【図 9】図 9 は、4 - 1 B B 血漿レベルが、正常被検者に比較して心不全の患者において有意に上昇していたことを例示し、それによりヒト心不全におけるこの系の活性化を示唆する。

【図 10】図 10 は、野生型および 4 - 1 B B L - / - ノックアウトマウスにおける A d r i a m y c i n (登録商標) の用量応答を表す。22.5 mg / kg と 25 mg / kg で、A d r i a m y c i n (登録商標) 誘発性心機能不全の比率は、4 - 1 B B L - / - において減少した。高い投与量 (30 mg / kg) でも、野生型と 4 - 1 B B L - / - 群の間に差を観測しなかった。

【図 11】図 11 は、A d r i a m y c i n (登録商標) 処置から 3、6、9 日後に投与した 4 - 1 B B 活性化抗体 (M 6) を示すグラフである。M 6 抗体により機能不全の発症が加速されたが、最終浸透率は対照群に類似していた。

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> IMMUNEX CORPORATION
BURTON, Paul B. J.
DEISHER, Theresa A.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING CARDIOVASCULAR DISEASE

<130> 3432-WO

<140> -to be assigned-

<141> 2003-08-21

<150> --to be assigned--

<151> 2003-08-12

<150> 60/406,418

<151> 2002-08-28

<160> 36

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1874

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (54)..(518)

<400> 1

```

gaattccggc aggcacaaac tcatccatcc ccagttgatt ggaagaaaca acg atg      56
                                         Met
                                         1

act cct ggg aag acc tca ttg gtg tca ctg cta ctg ctg ctg agc ctg      104
Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu
          5                      10                      15

gag gcc ata gtg aag gca gga atc aca atc cca cga aat cca gga tgc      152
Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys
          20                      25                      30

cca aat tct gag gac aag aac ttc ccc cgg act gtg atg gtc aac ctg      200
Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu
          35                      40                      45

aac atc cat aac cgg aat acc aat acc aat ccc aaa agg tcc tca gat      248
Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp
          50                      55                      60                      65

tac tac aac cga tcc acc tca cct tgg aat ctc cac cgc aat gag gac      296
Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp
          70                      75                      80

cct gag aga tat ccc tct gtg atc tgg gag gca aag tgc cgc cac ttg      344
Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu
          85                      90                      95

```

10

20

30

40

```

ggc tgc atc aac gct gat ggg aac gtg gac tac cac atg aac tct gtc      392
Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val
      100                      105                      110

ccc atc cag caa gag atc ctg gtc ctg cgc agg gag cct oca cac tgc      440
Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys
      115                      120                      125

ccc aac tcc ttc cgg ctg gag aag ata ctg gtg tcc gtg ggc tgc acc      488
Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr
      130                      135                      140                      145

tgt gtc acc ccg att gtc cac cat gtg gcc taagagctct ggggagccca      538
Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
      150                      155

cactccccaag agcagttaga ctatggagag ccgacccagc ccctcaggaa ccctcatcct      598
tcaaagacag cctcatttcg gactaaactc attagagttc ttaaggcagt ttgtccaatt      658
aaagcttcag aggtaacact tggccaagat atgagatctg aattaccttt ccctctttcc      718
aagaaggaag gtttgactga gtaccaattht gcttcttggt tactttttta agggctttaa      778
gttattttatg tatttaatat gccctgagat aactttgggg tataagattc cattttaatg      838
aattacctac tttattttgt ttgtcttttt aaagaagata agattctggg cttgggaatt      898
ttattattta aaaggtaaaa cctgtattta tttgagctat ttaaggatct atttatgttt      958
aagtatttag aaaaagggtga aaaagcacta ttatcagttc tgcctaggta aatgtaagat      1018
agaattaaat ggcagtgcaa aatttctgag tctttacaac atacggatat agtatttcct      1078
cctctttgtt tttaaaagtt ataactggc tgaagagaaa gattaaacct actttcatat      1138
gtattaattht aaattttgca atttgttgag gttttacaag agatacagca agtctaactc      1198
tctgttccat taaaccctta taataaaatc cttctgtaat aataaagttt caaaagaaaa      1258
tgtttatttg ttctcattaa atgtatttta gcaaactcag ctcttcctta ttgggaagag      1318
ttatgcaaat tctcctataa gcaaaacaaa gcatgtcttt gagtaacaat gacctggaaa      1378
taccacaaat tccaagttct cgatttcaca tgccttcaag actgaacacc gactaagggt      1438
ttcactactat tagccaatgc tgtagacaga agcattttga taggaataga gcaaataaga      1498
taatggccct gaggaatggc atgtcattat taaagatcat atggggaaaa tgaaaccctc      1558
cccaaaatac aagaagttct gggaggagac attgtcttca gactacaatg tccagtttct      1618
cccctagact caggcttctt ttggagatta agggccctca gagatcaaca gaccaacatt      1678
tttctcttcc tcaagcaaca ctctagggc ctggcttctg tctgatcaag gcaccacaca      1738
accagaaaag gagctgatgg ggcagaatga actttaagta tgagaaaagt tcagcccaag      1798
taaaataaaa actcaatcac attcaattcc agagtagttt caagtttcac atcgtaacca      1858

```

10

20

30

40

ttttcgcccg gaattc

1874

<210> 2
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

10

20

<210> 3
 <211> 3223
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> CDS
 <222> (93)..(2693)

<400> 3

gggagaccgg aattccggga aaagaaagcc tcagaacgtt cgctcgctgc gtccccagcc 60
 ggggccgagc cctccgcgac gccacccggg cc atg ggg gcc gca cgc agc ccg 113
 Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro
 1 5
 ccg tcc gct gtc ccg ggg ccc ctg ctg ggg ctg ctc ctg ctg ctc ctg 161
 Pro Ser Ala Val Pro Gly Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 10 15 20

40

ggc gtg ctg gcc ccg ggt ggc gcc tcc ctg cga ctc ctg gac cac cgg Gly Val Leu Ala Pro Gly Gly Ala Ser Leu Arg Leu Leu Asp His Arg 25 30 35	209	
gcg ctg gtc tgc tcc cag ccg ggg cta aac tgc acg gtc aag aat agt Ala Leu Val Cys Ser Gln Pro Gly Leu Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser 40 45 50 55	257	
acc tgc ctg gat gac agc tgg att cac cct cga aac ctg acc ccc tcc Thr Cys Leu Asp Asp Ser Trp Ile His Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser 60 65 70	305	
tcc cca aag gac ctg cag atc cag ctg cac ttt gcc cac acc caa caa Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln Leu His Phe Ala His Thr Gln Gln 75 80 85	353	10
gga gac ctg ttc ccc gtg gct cac atc gaa tgg aca ctg cag aca gac Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His Ile Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp 90 95 100	401	
gcc agc atc ctg tac ctc gag ggt gca gag tta tct gtc ctg cag ctg Ala Ser Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu 105 110 115	449	
aac acc aat gaa cgt ttg tgc gtc agg ttt gag ttt ctg tcc aaa ctg Asn Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu 120 125 130 135	497	
agg cat cac cac agg cgg tgg cgt ttt acc ttc agc cac ttt gtg gtt Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe Thr Phe Ser His Phe Val Val 140 145 150	545	20
gac cct gac cag gaa tat gag gtg acc gtt cac cac ctg ccc aag ccc Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr Val His His Leu Pro Lys Pro 155 160 165	593	
atc cct gat ggg gac cca aac cac cag tcc aag aat ttc ctt gtg cct Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro 170 175 180	641	
gac tgt gag cac gcc agg atg aag gta acc acg cca tgc atg agc tca Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser 185 190 195	689	
ggc agc ctg tgg gac ccc aac atc acc gtg gag acc ctg gag gcc cac Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr Val Glu Thr Leu Glu Ala His 200 205 210 215	737	30
cag ctg cgt gtg agc ttc acc ctg tgg aac gaa tct acc cat tac cag Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln 220 225 230	785	
atc ctg ctg acc agt ttt ccg cac atg gag aac cac agt tgc ttt gag Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met Glu Asn His Ser Cys Phe Glu 235 240 245	833	
cac atg cac cac ata cct gcg ccc aga cca gaa gag ttc cac cag cga His Met His His Ile Pro Ala Pro Arg Pro Glu Glu Phe His Gln Arg 250 255 260	881	

tcc aac gtc aca ctc act cta cgc aac ctt aaa ggg tgc tgt cgc cac Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu Arg Asn Leu Lys Gly Cys Cys Arg His 265 270 275	929	
caa gtg cag atc cag ccc ttc ttc agc agc tgc ctc aat gac tgc ctc Gln Val Gln Ile Gln Pro Phe Phe Ser Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu 280 285 290 295	977	
aga cac tcc gcg act gtt tcc tgc cca gaa atg cca gac act cca gaa Arg His Ser Ala Thr Val Ser Cys Pro Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu 300 305 310	1025	
cca att ccg gac tac atg ccc ctg tgg gtg tac tgg ttc atc acg ggc Pro Ile Pro Asp Tyr Met Pro Leu Trp Val Tyr Trp Phe Ile Thr Gly 315 320 325	1073	10
atc tcc atc ctg ctg gtg ggc tcc gtc atc ctg ctc atc gtc tgc atg Ile Ser Ile Leu Leu Val Gly Ser Val Ile Leu Leu Val Val Cys Met 330 335 340	1121	
acc tgg agg cta gct ggg cct gga agt gaa aaa tac agt gat gac acc Thr Trp Arg Leu Ala Gly Pro Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp Asp Thr 345 350 355	1169	
aaa tac acc gat ggc ctg cct gcg gct gac ctg atc ccc cca ccg ctg Lys Tyr Thr Asp Gly Leu Pro Ala Ala Asp Leu Ile Pro Pro Pro Leu 360 365 370 375	1217	
aag ccc agg aag gtc tgg atc atc tac tca gcc gac cac ccc ctc tac Lys Pro Arg Lys Val Trp Ile Ile Tyr Ser Ala Asp His Pro Leu Tyr 380 385 390	1265	20
gtg gac gtg gtc ctg aaa ttc gcc cag ttc ctg ctc acc gcc tgc ggc Val Asp Val Val Leu Lys Phe Ala Gln Phe Leu Leu Thr Ala Cys Gly 395 400 405	1313	
acg gaa gtg gcc ctg gac ctg ctg gaa gag cag gcc atc tcg gag gca Thr Glu Val Ala Leu Asp Leu Leu Glu Glu Gln Ala Ile Ser Glu Ala 410 415 420	1361	
gga gtc atg acc tgg gtg ggc cgt cag aag cag gag atg gtg gag agc Gly Val Met Thr Trp Val Gly Arg Gln Lys Gln Glu Met Val Glu Ser 425 430 435	1409	
aac tct aag atc atc gtc ctg tgc tcc cgc ggc acg cgc gcc aag tgg Asn Ser Lys Ile Ile Val Leu Cys Ser Arg Gly Thr Arg Ala Lys Trp 440 445 450 455	1457	30
cag gcg ctc ctg ggc cgg ggg gcg cct gtg cgg ctg cgc tgc gac cac Gln Ala Leu Leu Gly Arg Gly Ala Pro Val Arg Leu Arg Cys Asp His 460 465 470	1505	
gga aag ccc gtg ggg gac ctg ttc act gca gcc atg aac atg atc ctc Gly Lys Pro Val Gly Asp Leu Phe Thr Ala Ala Met Asn Met Ile Leu 475 480 485	1553	
ccg gac ttc aag agg cca gcc tgc ttc ggc acc tac gta gtc tgc tac Pro Asp Phe Lys Arg Pro Ala Cys Phe Gly Thr Tyr Val Val Cys Tyr 490 495 500	1601	
ttc agc gag gtc agc tgt gac ggc gac gtc ccc gac ctg ttc ggc gcg	1649	40

Phe	Ser	Glu	Val	Ser	Cys	Asp	Gly	Asp	Val	Pro	Asp	Leu	Phe	Gly	Ala		
505						510					515						
gcg	ccg	cgg	tac	ccg	ctc	atg	gac	agg	ttc	gag	gag	gtg	tac	ttc	cgc	1697	
Ala	Pro	Arg	Tyr	Pro	Leu	Met	Asp	Arg	Phe	Glu	Glu	Val	Tyr	Phe	Arg		
520					525					530					535		
atc	cag	gac	ctg	gag	atg	ttc	cag	ccg	ggc	cgc	atg	cac	cgc	gta	ggg	1745	
Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Met	Phe	Gln	Pro	Gly	Arg	Met	His	Arg	Val	Gly		
				540					545					550			
gag	ctg	tcg	ggg	gac	aac	tac	ctg	cgg	agc	ccg	ggc	ggc	agg	cag	ctc	1793	
Glu	Leu	Ser	Gly	Asp	Asn	Tyr	Leu	Arg	Ser	Pro	Gly	Gly	Arg	Gln	Leu		
				555				560						565			
cgc	gcc	gcc	ctg	gac	agg	ttc	cgg	gac	tgg	cag	gtc	cgc	tgt	ccc	gac	1841	
Arg	Ala	Ala	Leu	Asp	Arg	Phe	Arg	Asp	Trp	Gln	Val	Arg	Cys	Pro	Asp		
				570				575					580				
tgg	ttc	gaa	tgt	gag	aac	ctc	tac	tca	gca	gat	gac	cag	gat	gcc	ccg	1889	
Trp	Phe	Glu	Cys	Glu	Asn	Leu	Tyr	Ser	Ala	Asp	Asp	Gln	Asp	Ala	Pro		
						590							595				
tcc	ctg	gac	gaa	gag	gtg	ttt	gag	gag	cca	ctg	ctg	cct	ccg	gga	acc	1937	
Ser	Leu	Asp	Glu	Glu	Val	Phe	Glu	Glu	Pro	Leu	Leu	Pro	Pro	Gly	Thr		
600					605					610					615		
ggc	atc	gtg	aag	cgg	gcg	ccc	ctg	gtg	cgc	gag	cct	ggc	tcc	cag	gcc	1985	
Gly	Ile	Val	Lys	Arg	Ala	Pro	Leu	Val	Arg	Glu	Pro	Gly	Ser	Gln	Ala		
				620					625					630			
tgc	ctg	gcc	ata	gac	ccg	ctg	gtc	ggg	gag	gaa	gga	gga	gca	gca	gtg	2033	
Cys	Leu	Ala	Ile	Asp	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Ala	Ala	Val		
				635				640						645			
gca	aag	ctg	gaa	cct	cac	ctg	cag	ccc	cgg	ggt	cag	cca	gcg	ccg	cag	2081	
Ala	Lys	Leu	Glu	Pro	His	Leu	Gln	Pro	Arg	Gly	Gln	Pro	Ala	Pro	Gln		
				650				655					660				
ccc	ctc	cac	acc	ctg	gtg	ctc	gcc	gca	gag	gag	ggg	gcc	ctg	gtg	gcc	2129	
Pro	Leu	His	Thr	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Glu	Glu	Gly	Ala	Leu	Val	Ala		
				665								675					
gcg	gtg	gag	cct	ggg	ccc	ctg	gct	gac	ggt	gcc	gca	gtc	cgg	ctg	gca	2177	
Ala	Val	Glu	Pro	Gly	Pro	Leu	Ala	Asp	Gly	Ala	Ala	Val	Arg	Leu	Ala		
680					685					690					695		
ctg	gcg	ggg	gag	ggc	gag	gcc	tgc	ccg	ctg	ctg	ggc	agc	ccg	ggc	gct	2225	
Leu	Ala	Gly	Glu	Gly	Glu	Ala	Cys	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Pro	Gly	Ala		
				700						705				710			
ggg	cga	aat	agc	gtc	ctc	ttc	ctc	ccc	gtg	gac	ccc	gag	gac	tcg	ccc	2273	
Gly	Arg	Asn	Ser	Val	Leu	Phe	Leu	Pro	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Ser	Pro		
				715					720					725			
ctt	ggc	agc	agc	acc	ccc	atg	gcg	tct	cct	gac	ctc	ctt	cca	gag	gac	2321	
Leu	Gly	Ser	Ser	Thr	Pro	Met	Ala	Ser	Pro	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Asp		
				730				735						740			
gtg	agg	gag	cac	ctc	gaa	ggc	ttg	atg	ctc	tcg	ctc	ttc	gag	cag	agt	2369	
Val	Arg	Glu	His	Leu	Glu	Gly	Leu	Met	Leu	Ser	Leu	Phe	Glu	Gln	Ser		

10

20

30

40

```

745              750              755
ctg agc tgc cag gcc cag ggg ggc tgc agt aga ccc gcc atg gtc ctc 2417
Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Gly Cys Ser Arg Pro Ala Met Val Leu ,
760              765              770              775

aca gac cca cac acg ccc tac gag gag gag cag cgg cag tca gtg cag 2465
Thr Asp Pro His Thr Pro Tyr Glu Glu Glu Gln Arg Gln Ser Val Gln
780              785              790

tct gac cag ggc tac atc tcc agg agc tcc ccg cag ccc ccc gag gga 2513
Ser Asp Gln Gly Tyr Ile Ser Arg Ser Ser Pro Gln Pro Pro Glu Gly
795              800              805

ctc acg gaa atg gag gaa gag gag gaa gag gag cag gac cca ggg aag 2561
Leu Thr Glu Met Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gln Asp Pro Gly Lys
810              815              820

ccg gcc ctg cca ctc tct ccc gag gac ctg gag agc ctg agg agc ctc 2609
Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro Glu Asp Leu Glu Ser Leu Arg Ser Leu
825              830              835

cag cgg cag ctg ctt ttc cgc cag ctg cag aag aac tgc ggc tgg gac 2657
Gln Arg Gln Leu Leu Phe Arg Gln Leu Gln Lys Asn Ser Gly Trp Asp
840              845              850              855

acg atg ggg tca gag tca gag ggg ccc agt gca tga gggcggctcc 2703
Thr Met Gly Ser Glu Ser Glu Gly Pro Ser Ala
860              865

ccagggaaccg cccagatccc agctttgaga gaggagtgtg tgtgcacgta ttcattctgtg 2763

tgtacatgtc tgcattgtga tatgttcgtg tgtgaaatgt aggcctttaa atgtaaatgt 2823

ctggatttta atcccaggca tccctcctaa cttttctttg tgcagcggtc tggttatcgt 2883

ctatccccag gggaatccac acagcccgct cccaggagct aatggtagag cgtccttgag 2943

gctccattat tcgttcattc agcatttatt gtgcacctac tatgtggcgg gcatttggga 3003

taccaagata aattgcatgc ggcattggccc cagccatgaa ggaacttaac cgctagtgcc 3063

gaggacacgt taaacgaaca ggatgggccc ggcacggtgg ctcacgcctg taatcccagc 3123

acactgggag gccgaggcag gtggatcact ctgaggtcag gagtttgagc cagcctggcc 3183

aacatggtga aaccccggaa ttcgagctcg gtacccgggg 3223

```

```

<210> 4
<211> 866
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 4

```

```

Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro Gly Pro Leu Leu
1              5              10              15

Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Pro Gly Gly Ala Ser
20              25              30

```

10

20

30

40

Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser Gln Pro Gly Leu
 35 40 45
 Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp Ser Trp Ile His
 50 55 60
 Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln Leu
 65 70 75 80
 His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His Ile
 85 90 95
 Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala
 100 105 110
 Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg
 115 120 125
 Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe
 130 135 140
 Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr
 145 150 155 160
 Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln
 165 170 175
 Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val
 180 185 190
 Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr
 195 200 205
 Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp
 210 215 220
 Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met
 225 230 235 240
 Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro Arg
 245 250 255
 Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu Arg Asn
 260 265 270
 Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro Phe Phe Ser
 275 280 285
 Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr Val Ser Cys Pro
 290 295 300
 Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr Met Pro Leu Trp
 305 310 315 320
 Val Tyr Trp Phe Ile Thr Gly Ile Ser Ile Leu Leu Val Gly Ser Val
 325 330 335
 Ile Leu Leu Ile Val Cys Met Thr Trp Arg Leu Ala Gly Pro Gly Ser
 340 345 350

10

20

30

40

Glu Lys Tyr Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Thr Asp Gly Leu Pro Ala Ala
 355 360 365
 Asp Leu Ile Pro Pro Pro Leu Lys Pro Arg Lys Val Trp Ile Ile Tyr
 370 375 380
 Ser Ala Asp His Pro Leu Tyr Val Asp Val Val Leu Lys Phe Ala Gln
 385 390 395 400
 Phe Leu Leu Thr Ala Cys Gly Thr Glu Val Ala Leu Asp Leu Leu Glu
 405 410 415
 Glu Gln Ala Ile Ser Glu Ala Gly Val Met Thr Trp Val Gly Arg Gln
 420 425 430
 Lys Gln Glu Met Val Glu Ser Asn Ser Lys Ile Ile Val Leu Cys Ser
 435 440 445
 Arg Gly Thr Arg Ala Lys Trp Gln Ala Leu Leu Gly Arg Gly Ala Pro
 450 455 460
 Val Arg Leu Arg Cys Asp His Gly Lys Pro Val Gly Asp Leu Phe Thr
 465 470 475 480
 Ala Ala Met Asn Met Ile Leu Pro Asp Phe Lys Arg Pro Ala Cys Phe
 485 490 495
 Gly Thr Tyr Val Val Cys Tyr Phe Ser Glu Val Ser Cys Asp Gly Asp
 500 505 510
 Val Pro Asp Leu Phe Gly Ala Ala Pro Arg Tyr Pro Leu Met Asp Arg
 515 520 525
 Phe Glu Glu Val Tyr Phe Arg Ile Gln Asp Leu Glu Met Phe Gln Pro
 530 535 540
 Gly Arg Met His Arg Val Gly Glu Leu Ser Gly Asp Asn Tyr Leu Arg
 545 550 555 560
 Ser Pro Gly Gly Arg Gln Leu Arg Ala Ala Leu Asp Arg Phe Arg Asp
 565 570 575
 Trp Gln Val Arg Cys Pro Asp Trp Phe Glu Cys Glu Asn Leu Tyr Ser
 580 585 590
 Ala Asp Asp Gln Asp Ala Pro Ser Leu Asp Glu Glu Val Phe Glu Glu
 595 600 605
 Pro Leu Leu Pro Pro Gly Thr Gly Ile Val Lys Arg Ala Pro Leu Val
 610 615 620
 Arg Glu Pro Gly Ser Gln Ala Cys Leu Ala Ile Asp Pro Leu Val Gly
 625 630 635 640
 Glu Glu Gly Gly Ala Ala Val Ala Lys Leu Glu Pro His Leu Gln Pro
 645 650 655
 Arg Gly Gln Pro Ala Pro Gln Pro Leu His Thr Leu Val Leu Ala Ala
 660 665 670
 Glu Glu Gly Ala Leu Val Ala Ala Val Glu Pro Gly Pro Leu Ala Asp

10

20

30

40

675 680 685
 Gly Ala Ala Val Arg Leu Ala Leu Ala Gly Glu Gly Glu Ala Cys Pro
 690 695 700
 Leu Leu Gly Ser Pro Gly Ala Gly Arg Asn Ser Val Leu Phe Leu Pro
 705 710 715 720
 Val Asp Pro Glu Asp Ser Pro Leu Gly Ser Ser Thr Pro Met Ala Ser
 725 730 735
 Pro Asp Leu Leu Pro Glu Asp Val Arg Glu His Leu Glu Gly Leu Met
 740 745 750
 Leu Ser Leu Phe Glu Gln Ser Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Gly Cys
 755 760 765
 Ser Arg Pro Ala Met Val Leu Thr Asp Pro His Thr Pro Tyr Glu Glu
 770 775 780
 Glu Gln Arg Gln Ser Val Gln Ser Asp Gln Gly Tyr Ile Ser Arg Ser
 785 790 795 800
 Ser Pro Gln Pro Pro Glu Gly Leu Thr Glu Met Glu Glu Glu Glu Glu
 805 810 815
 Glu Glu Gln Asp Pro Gly Lys Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro Glu Asp
 820 825 830
 Leu Glu Ser Leu Arg Ser Leu Gln Arg Gln Leu Leu Phe Arg Gln Leu
 835 840 845
 Gln Lys Asn Ser Gly Trp Asp Thr Met Gly Ser Glu Ser Glu Gly Pro
 850 855 860
 Ser Ala
 865

10

20

<210> 5
 <211> 1626
 <212> DNA
 <213> Homo sapeins

30

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1626)

<400> 5
 atg aat tgt aga gaa tta ccc ttg acc ctt tgg gtg ctt ata tct gta 48
 Met Asn Cys Arg Glu Leu Pro Leu Thr Leu Trp Val Leu Ile Ser Val
 1 5 10 15
 agc act gca gaa tct tgt act tca cgt ccc cac att act gtg gtt gaa 96
 Ser Thr Ala Glu Ser Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu
 20 25 30
 ggg gaa cct ttc tat ctg aaa cat tgc tcg tgt tca ctt gca cat gag 144
 Gly Glu Pro Phe Tyr Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu
 35 40 45

40

att gaa aca acc acc aaa agc tgg tac aaa agc agt gga tca cag gaa Ile Glu Thr Thr Thr Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu 50 55 60	192	
cat gtg gag ctg aac cca agg agt tcc tcg aga att gct ttg cat gat His Val Glu Leu Asn Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp 65 70 75 80	240	
tgt gtt ttg gag ttt tgg cca gtt gag ttg aat gac aca gga tct tac Cys Val Leu Glu Phe Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr 85 90 95	288	
ttt ttc caa atg aaa aat tat act cag aaa tgg aaa tta aat gtc atc Phe Phe Gln Met Lys Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile 100 105 110	336	10
aga aga aat aaa cac agc tgt ttc act gaa aga caa gta act agt aaa Arg Arg Asn Lys His Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys 115 120 125	384	
att gtg gaa gtt aaa aaa ttt ttt cag ata acc tgt gaa aac agt tac Ile Val Glu Val Lys Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr 130 135 140	432	
tat caa aca ctg gtc aac agc aca tca ttg tat aag aac tgt aaa aag Tyr Gln Thr Leu Val Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys 145 150 155 160	480	
cta cta ctg gag aac aat aaa aac cca acg ata aag aag aac gcc gag Leu Leu Leu Glu Asn Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu 165 170 175	528	20
ttt gaa gat cag ggg tat tac tcc tgc gtg cat ttc ctt cat cat aat Phe Glu Asp Gln Gly Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn 180 185 190	576	
gga aaa cta ttt aat atc acc aaa acc ttc aat ata aca ata gtg gaa Gly Lys Leu Phe Asn Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu 195 200 205	624	
gat cgc agt aat ata gtt ccg gtt ctt ctt gga cca aag ctt aac cat Asp Arg Ser Asn Ile Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His 210 215 220	672	
gtt gca gtg gaa tta gga aaa aac gta agg ctc aac tgc tct gct ttg Val Ala Val Glu Leu Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu 225 230 235 240	720	30
ctg aat gaa gag gat gta att tat tgg atg ttt ggg gaa gaa aat gga Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly 245 250 255	768	
tcg gat cct aat ata cat gaa gag aaa gaa atg aga att atg act cca Ser Asp Pro Asn Ile His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro 260 265 270	816	
gaa ggc aaa tgg cat gct tca aaa gta ttg aga att gaa aat att ggt Glu Gly Lys Trp His Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly 275 280 285	864	

gaa agc aat cta aat gtt tta tat aat tgc act gtg gcc agc acg gga Glu Ser Asn Leu Asn Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly 290 295 300	912	
ggc aca gac acc aaa agc ttc atc ttg gtg aga aaa gca gac atg gct Gly Thr Asp Thr Lys Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp Met Ala 305 310 315 320	960	
gat atc cca ggc cac gtc ttc aca aga gga atg atc ata gct gtt ttg Asp Ile Pro Gly His Val Phe Thr Arg Gly Met Ile Ile Ala Val Leu 325 330 335	1008	10
atc ttg gtg gca gta gtg tgc cta gtg act gtg tgt gtc att tat aga Ile Leu Val Ala Val Val Cys Leu Val Thr Val Cys Val Ile Tyr Arg 340 345 350	1056	
gtt gac ttg gtt cta ttt tat aga cat tta acg aga aga gat gaa aca Val Asp Leu Val Leu Phe Tyr Arg His Leu Thr Arg Arg Asp Glu Thr 355 360 365	1104	
tta aca gat gga aaa aca tat gat gct ttt gtg tct tac cta aaa gaa Leu Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Leu Lys Glu 370 375 380	1152	
tgc cga cct gaa aat gga gag gag cac acc ttt gct gtg gag att ttg Cys Arg Pro Glu Asn Gly Glu Glu His Thr Phe Ala Val Glu Ile Leu 385 390 395 400	1200	20
ccc agg gtg ttg gag aaa cat ttt ggg tat aag tta tgc ata ttt gaa Pro Arg Val Leu Glu Lys His Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Glu 405 410 415	1248	
agg gat gta gtg cct gga gga gct gtt gtt gat gaa atc cac tca ctg Arg Asp Val Val Pro Gly Gly Ala Val Val Asp Glu Ile His Ser Leu 420 425 430	1296	
ata gag aaa agc cga aga cta atc att gtc cta agt aaa agt tat atg Ile Glu Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Val Leu Ser Lys Ser Tyr Met 435 440 445	1344	
tct aat gag gtc agg tat gaa ctt gaa agt gga ctc cat gaa gca ttg Ser Asn Glu Val Arg Tyr Glu Leu Glu Ser Gly Leu His Glu Ala Leu 450 455 460	1392	30
gtg gaa aga aaa att aaa ata atc tta att gaa ttt aca cct gtt act Val Glu Arg Lys Ile Lys Ile Ile Leu Ile Glu Phe Thr Pro Val Thr 465 470 475 480	1440	
gac ttc aca ttc ttg ccc caa tca cta aag ctt ttg aaa tct cac aga Asp Phe Thr Phe Leu Pro Gln Ser Leu Lys Leu Leu Lys Ser His Arg 485 490 495	1488	
gtt ctg aag tgg aag gcc gat aaa tct ctt tct tat aac tca agg ttc Val Leu Lys Trp Lys Ala Asp Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Arg Phe 500 505 510	1536	
tgg aag aac ctt ctt tac tta atg cct gca aaa aca gtc aag cca ggt Trp Lys Asn Leu Leu Tyr Leu Met Pro Ala Lys Thr Val Lys Pro Gly 515 520 525	1584	40
aga gac gaa ccg gaa gtc ttg cct gtt ctt tcc gag tct taa	1626	

Arg Asp Glu Pro Glu Val Leu Pro Val Leu Ser Glu Ser
 530 535 540

<210> 6
 <211> 541
 <212> PRT
 <213> Homo sapeins

<400> 6

Met Asn Cys Arg Glu Leu Pro Leu Thr Leu Trp Val Leu Ile Ser Val
 1 5 10 15

Ser Thr Ala Glu Ser Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu
 20 25 30

Gly Glu Pro Phe Tyr Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu
 35 40 45

Ile Glu Thr Thr Thr Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu
 50 55 60

His Val Glu Leu Asn Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp
 65 70 75 80

Cys Val Leu Glu Phe Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr
 85 90 95

Phe Phe Gln Met Lys Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile
 100 105 110

Arg Arg Asn Lys His Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys
 115 120 125

Ile Val Glu Val Lys Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr
 130 135 140

Tyr Gln Thr Leu Val Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys
 145 150 155 160

Leu Leu Leu Glu Asn Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu
 165 170 175

Phe Glu Asp Gln Gly Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn
 180 185 190

Gly Lys Leu Phe Asn Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu
 195 200 205

Asp Arg Ser Asn Ile Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His
 210 215 220

Val Ala Val Glu Leu Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu
 225 230 235 240

Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly
 245 250 255

Ser Asp Pro Asn Ile His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro
 260 265 270

10

20

30

40

Glu Gly Lys Trp His Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly
 275 280 285
 Glu Ser Asn Leu Asn Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly
 290 295 300
 Gly Thr Asp Thr Lys Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp Met Ala
 305 310 315 320
 Asp Ile Pro Gly His Val Phe Thr Arg Gly Met Ile Ile Ala Val Leu
 325 330 335
 Ile Leu Val Ala Val Val Cys Leu Val Thr Val Cys Val Ile Tyr Arg
 340 345 350
 Val Asp Leu Val Leu Phe Tyr Arg His Leu Thr Arg Arg Asp Glu Thr
 355 360 365
 Leu Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Leu Lys Glu
 370 375 380
 Cys Arg Pro Glu Asn Gly Glu Glu His Thr Phe Ala Val Glu Ile Leu
 385 390 395 400
 Pro Arg Val Leu Glu Lys His Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Glu
 405 410 415
 Arg Asp Val Val Pro Gly Gly Ala Val Val Asp Glu Ile His Ser Leu
 420 425 430
 Ile Glu Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Val Leu Ser Lys Ser Tyr Met
 435 440 445
 Ser Asn Glu Val Arg Tyr Glu Leu Glu Ser Gly Leu His Glu Ala Leu
 450 455 460
 Val Glu Arg Lys Ile Lys Ile Ile Leu Ile Glu Phe Thr Pro Val Thr
 465 470 475 480
 Asp Phe Thr Phe Leu Pro Gln Ser Leu Lys Leu Leu Lys Ser His Arg
 485 490 495
 Val Leu Lys Trp Lys Ala Asp Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Arg Phe
 500 505 510
 Trp Lys Asn Leu Leu Tyr Leu Met Pro Ala Lys Thr Val Lys Pro Gly
 515 520 525
 Arg Asp Glu Pro Glu Val Leu Pro Val Leu Ser Glu Ser
 530 535 540

10

20

30

<210> 7
 <211> 2681
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS

40

<222> (484)..(2283)

<400> 7

ctctctggat aggaagaaat atagtagaac cctttgaaaa tggatatttt cacatatttt	60	
cgttcagata caaaagctgg cagttactga aataaggact tgaagttcct tcctcttttt	120	
ttatgtctta agagcaggaa ataagagac agctgaaggt gtagccttga ccaactgaaa	180	
gggaaatctt catcctctga aaaaacatat gtgattctca aaaaacgcat ctggaaaatt	240	
gataaagaag cgattctgta gattctccca gcgctgttgg gctctcaatt ccttctgtga	300	
aggacaacat atggtgatgg ggaaatcaga agctttgaga ccctctacac ctggatatga	360	10
atcccccttc taatacttac cagaaatgaa ggggatactc agggcagagt tctgaatctc	420	
aaaacactct actctggcaa aggaatgaag ttattggagt gatgacagga acacgggaga	480	
aca atg ctc tgt ttg ggc tgg ata ttt ctt tgg ctt gtt gca gga gag	528	
Met Leu Cys Leu Gly Trp Ile Phe Leu Trp Leu Val Ala Gly Glu		
1 5 10 15		
cga att aaa gga ttt aat att tca ggt tgt tcc aca aaa aaa ctc ctt	576	
Arg Ile Lys Gly Phe Asn Ile Ser Gly Cys Ser Thr Lys Lys Leu Leu		
20 25 30		
tgg aca tat tct aca agg agt gaa gag gaa ttt gtc tta ttt tgt gat	624	
Trp Thr Tyr Ser Thr Arg Ser Glu Glu Glu Phe Val Leu Phe Cys Asp		20
35 40 45		
tta cca gag cca cag aaa tca cat ttc tgc cac aga aat cga ctc tca	672	
Leu Pro Glu Pro Gln Lys Ser His Phe Cys His Arg Asn Arg Leu Ser		
50 55 60		
cca aaa caa gtc cct gag cac ctg ccc ttc atg ggt agt aac gac cta	720	
Pro Lys Gln Val Pro Glu His Leu Pro Phe Met Gly Ser Asn Asp Leu		
65 70 75		
tct gat gtc caa tgg tac caa caa cct tcg aat gga gat cca tta gag	768	
Ser Asp Val Gln Trp Tyr Gln Gln Pro Ser Asn Gly Asp Pro Leu Glu		
80 85 90 95		
gac att agg aaa agc tat cct cac atc att cag gac aaa tgt acc ctt	816	
Asp Ile Arg Lys Ser Tyr Pro His Ile Ile Gln Asp Lys Cys Thr Leu		30
100 105 110		
cac ttt ttg acc cca ggg gtg aat aat tct ggg tca tat att tgt aga	864	
His Phe Leu Thr Pro Gly Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Ile Cys Arg		
115 120 125		
ccc aag atg att aag agc ccc tat gat gta gcc tgt tgt gtc aag atg	912	
Pro Lys Met Ile Lys Ser Pro Tyr Asp Val Ala Cys Cys Val Lys Met		
130 135 140		
att tta gaa gtt aag ccc cag aca aat gca tcc tgt gag tat tcc gca	960	
Ile Leu Glu Val Lys Pro Gln Thr Asn Ala Ser Cys Glu Tyr Ser Ala		
145 150 155		
tca cat aag caa gac cta ctt ctt ggg agc act ggc tct att tct tgc	1008	
Ser His Lys Gln Asp Leu Leu Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Ser Cys		40

160	165	170	175	
ccc agt ctc agc tgc caa agt gat gca caa agt cca gcg gta acc tgg				1056
Pro Ser Leu Ser Cys Gln Ser Asp Ala Gln Ser Pro Ala Val Thr Trp				
	180	185	190	
tac aag aat gga aaa ctc ctc tct gtg gaa agg agc aac cga atc gta				1104
Tyr Lys Asn Gly Lys Leu Leu Ser Val Glu Arg Ser Asn Arg Ile Val				
	195	200	205	
gtg gat gaa gtt tat gac tat cac cag ggc aca tat gta tgt gat tac				1152
Val Asp Glu Val Tyr Asp Tyr His Gln Gly Thr Tyr Val Cys Asp Tyr				
	210	215	220	
act cag tcg gat act gtg agt tcg tgg aca gtc aga gct gtt gtt caa				1200
Thr Gln Ser Asp Thr Val Ser Ser Trp Thr Val Arg Ala Val Val Gln				
	225	230	235	
gtg aga acc att gtg gga gac act aaa ctc aaa cca gat att ctg gat				1248
Val Arg Thr Ile Val Gly Asp Thr Lys Leu Lys Pro Asp Ile Leu Asp				
	240	245	250	255
cct gtc gag gac aca ctg gaa gta gaa ctt gga aag cct tta act att				1296
Pro Val Glu Asp Thr Leu Glu Val Glu Leu Gly Lys Pro Leu Thr Ile				
	260	265	270	
agc tgc aaa gca cga ttt ggc ttt gaa agg gtc ttt aac cct gtc ata				1344
Ser Cys Lys Ala Arg Phe Gly Phe Glu Arg Val Phe Asn Pro Val Ile				
	275	280	285	
aaa tgg tac atc aaa gat tct gac cta gag tgg gaa gtc tca gta cct				1392
Lys Trp Tyr Ile Lys Asp Ser Asp Leu Glu Trp Glu Val Ser Val Pro				
	290	295	300	
gag gcg aaa agt att aaa tcc act tta aag gat gaa atc att gag cgt				1440
Glu Ala Lys Ser Ile Lys Ser Thr Leu Lys Asp Glu Ile Ile Glu Arg				
	305	310	315	
aat atc atc ttg gaa aaa gtc act cag cgt gat ctt cgc agg aag ttt				1488
Asn Ile Ile Leu Glu Lys Val Thr Gln Arg Asp Leu Arg Arg Lys Phe				
	320	325	330	335
gtt tgc ttt gtc cag aac tcc att gga aac aca acc cag tcc gtc caa				1536
Val Cys Phe Val Gln Asn Ser Ile Gly Asn Thr Thr Gln Ser Val Gln				
	340	345	350	
ctg aaa gaa aag aga gga gtg gtg ctc ctg tac atc ctg ctt ggc acc				1584
Leu Lys Glu Lys Arg Gly Val Val Leu Leu Tyr Ile Leu Leu Gly Thr				
	355	360	365	
atc ggg acc ctg gtg gcc gtg ctg gcg gcg agt gcc ctc ctc tac agg				1632
Ile Gly Thr Leu Val Ala Val Leu Ala Ala Ser Ala Leu Leu Tyr Arg				
	370	375	380	
cac tgg att gaa ata gtg ctg ctg tac cgg acc tac cag agc aag gat				1680
His Trp Ile Glu Ile Val Leu Leu Tyr Arg Thr Tyr Gln Ser Lys Asp				
	385	390	395	
cag acg ctt ggg gat aaa aag gat ttt gat gct ttc gta tcc tat gca				1728
Gln Thr Leu Gly Asp Lys Lys Asp Phe Asp Ala Phe Val Ser Tyr Ala				
	400	405	410	415

10

20

30

40

aaa tgg agc tct ttt cca agt gag gcc act tca tct ctg agt gaa gaa	1776	
Lys Trp Ser Ser Phe Pro Ser Glu Ala Thr Ser Ser Leu Ser Glu Glu		
420 425 430		
cac ttg gcc ctg agc cta ttt cct gat gtt tta gaa aac aaa tat gga	1824	
His Leu Ala Leu Ser Leu Phe Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Tyr Gly		
435 440 445		
tat agc ctg tgt ttg ctt gaa aga gat gtg gct cca gga gga gtg tat	1872	
Tyr Ser Leu Cys Leu Leu Glu Arg Asp Val Ala Pro Gly Gly Val Tyr		
450 455 460		
gca gaa gac att gtg agc att att aag aga agc aga aga gga ata ttt	1920	10
Ala Glu Asp Ile Val Ser Ile Ile Lys Arg Ser Arg Arg Gly Ile Phe		
465 470 475		
atc ttg agc ccc aac tat gtc aat gga ccc agt atc ttt gaa cta caa	1968	
Ile Leu Ser Pro Asn Tyr Val Asn Gly Pro Ser Ile Phe Glu Leu Gln		
480 485 490 495		
gca gca gtg aat ctt gcc ttg gat gat caa aca ctg aaa ctc att tta	2016	
Ala Ala Val Asn Leu Ala Leu Asp Asp Gln Thr Leu Lys Leu Ile Leu		
500 505 510		
att aag ttc tgt tac ttc caa gag cca gag tct cta cct cat ctc gtg	2064	
Ile Lys Phe Cys Tyr Phe Gln Glu Pro Glu Ser Leu Pro His Leu Val		
515 520 525		
aaa aaa gct ctc agg gtt ttg ccc aca gtt act tgg aga ggc tta aaa	2112	20
Lys Lys Ala Leu Arg Val Leu Pro Thr Val Thr Trp Arg Gly Leu Lys		
530 535 540		
tca gtt cct ccc aat tct agg ttc tgg gcc aaa atg cgc tac cac atg	2160	
Ser Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Trp Ala Lys Met Arg Tyr His Met		
545 550 555		
cct gtg aaa aac tct cag gga ttc acg tgg aac cag ctc aga att acc	2208	
Pro Val Lys Asn Ser Gln Gly Phe Thr Trp Asn Gln Leu Arg Ile Thr		
560 565 570 575		
tct agg att ttt cag tgg aaa gga ctc agt aga aca gaa acc act ggg	2256	
Ser Arg Ile Phe Gln Trp Lys Gly Leu Ser Arg Thr Glu Thr Thr Gly		
580 585 590		
agg agc tcc cag cct aag gaa tgg tga aatgagccct ggagccccct	2303	30
Arg Ser Ser Gln Pro Lys Glu Trp		
595		
ccagtccagt ccctgggata gagatgttgc tggacagaac tcacagctct gtgtgtgtgt	2363	
gttcaggctg ataggaaatt caaagagtct cctgccagca ccaagcaagc ttgatggaca	2423	
atggaatggg attgagactg tggtttagag cctttgatatt cctggactgg acagacggcg	2483	
agtgaattct ctagaccttg ggtactttca gtacacaaca cccctaagat ttcccagtgg	2543	
tccgagcaga atcagaaaaat acagctactt ctgccttatg gctagggaac tgatcatgtct	2603	
accatgtatt gtacatatga ctttatgtat acttgcaatc aaataaatat tattttatta	2663	

gaaaaaaaaac cggaattc

2681

<210> 8
 <211> 599
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

10

20

30

40

Cys Lys Ala Arg Phe Gly Phe Glu Arg Val Phe Asn Pro Val Ile Lys
 275 280 285
 Trp Tyr Ile Lys Asp Ser Asp Leu Glu Trp Glu Val Ser Val Pro Glu
 290 295 300
 Ala Lys Ser Ile Lys Ser Thr Leu Lys Asp Glu Ile Ile Glu Arg Asn
 305 310 315 320
 Ile Ile Leu Glu Lys Val Thr Gln Arg Asp Leu Arg Arg Lys Phe Val
 325 330 335
 Cys Phe Val Gln Asn Ser Ile Gly Asn Thr Thr Gln Ser Val Gln Leu
 340 345 350
 Lys Glu Lys Arg Gly Val Val Leu Leu Tyr Ile Leu Leu Gly Thr Ile
 355 360 365
 Gly Thr Leu Val Ala Val Leu Ala Ala Ser Ala Leu Leu Tyr Arg His
 370 375 380
 Trp Ile Glu Ile Val Leu Leu Tyr Arg Thr Tyr Gln Ser Lys Asp Gln
 385 390 395 400
 Thr Leu Gly Asp Lys Lys Asp Phe Asp Ala Phe Val Ser Tyr Ala Lys
 405 410 415
 Trp Ser Ser Phe Pro Ser Glu Ala Thr Ser Ser Leu Ser Glu Glu His
 420 425 430
 Leu Ala Leu Ser Leu Phe Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Tyr Gly Tyr
 435 440 445
 Ser Leu Cys Leu Leu Glu Arg Asp Val Ala Pro Gly Gly Val Tyr Ala
 450 455 460
 Glu Asp Ile Val Ser Ile Ile Lys Arg Ser Arg Arg Gly Ile Phe Ile
 465 470 475 480
 Leu Ser Pro Asn Tyr Val Asn Gly Pro Ser Ile Phe Glu Leu Gln Ala
 485 490 495
 Ala Val Asn Leu Ala Leu Asp Asp Gln Thr Leu Lys Leu Ile Leu Ile
 500 505 510
 Lys Phe Cys Tyr Phe Gln Glu Pro Glu Ser Leu Pro His Leu Val Lys
 515 520 525
 Lys Ala Leu Arg Val Leu Pro Thr Val Thr Trp Arg Gly Leu Lys Ser
 530 535 540
 Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Trp Ala Lys Met Arg Tyr His Met Pro
 545 550 555 560
 Val Lys Asn Ser Gln Gly Phe Thr Trp Asn Gln Leu Arg Ile Thr Ser
 565 570 575
 Arg Ile Phe Gln Trp Lys Gly Leu Ser Arg Thr Glu Thr Thr Gly Arg
 580 585 590
 Ser Ser Gln Pro Lys Glu Trp

10

20

30

40

595

<210> 9
 <211> 644
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (66)..(599)

<400> 9
 gagaagagga cgttgtcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac gcatgcatca 60
 tgacc atg aga cac aac tgg aca cca gac ctc agc cct ttg tgg gtc ctg 110
 Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu
 1 5 10 15
 ctc ctg tgt gcc cac gtc gtc act ctc ctg gtc aga gcc aca cct gtc 158
 Leu Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Val Arg Ala Thr Pro Val
 20 25 30
 tcg cag acc acc aca gct gcc act gcc tca gtt aga agc aca aag gac 206
 Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp
 35 40 45
 ccc tgc ccc tcc cag ccc cca gtg ttc cca gca gct aag cag tgt cca 254
 Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro
 50 55 60
 gca ttg gaa gtg acc tgg cca gag gtg gaa gtg cca ctg aat gga acg 302
 Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr
 65 70 75
 ctg agc tta tcc tgt gtg gcc tgc agc cgc ttc ccc aac ttc agc atc 350
 Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile
 80 85 90 95
 ctc tac tgg ctg gcc aat ggt tcc ttc att gag cac ctc cca ggc cga 398
 Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg
 100 105 110
 ctg tgg gag ggg agc acc agc cgg gaa cgt ggg agc aca ggt acg cag 446
 Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln
 115 120 125
 ctg tgc aag gcc ttg gtg ctg gag cag ctg acc cct gcc ctg cac agc 494
 Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser
 130 135 140
 acc aac ttc tcc tgt gtg ctc gtg gac cct gaa cag gtt gtc cag cgt 542
 Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg
 145 150 155
 cac gtc gtc ctg gcc cag ctc tgg gct ggg ctg agg gca acc ttg ccc 590
 His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro
 160 165 170 175
 ccc acc caa gaagccctgc cctccagcca cagcagtcca cagcagcagg gttaa 644

10

20

30

40

Pro Thr Gln

<210> 10
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Thr Gln

<210> 11
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser
 20 25 30

10

20

30

40

Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro
 35 40 45
 Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala
 50 55 60
 Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu
 65 70 75 80
 Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu
 85 90 95
 Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu
 100 105 110
 Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu
 115 120 125
 Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser Thr
 130 135 140
 Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His
 145 150 155 160
 Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro
 165 170 175
 Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly
 180 185 190
 Arg Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 195 200 205
 Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 210 215 220
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 225 230 235 240
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 245 250 255
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 260 265 270
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 275 280 285
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 290 295 300
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 305 310 315 320
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 325 330 335
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 340 345 350
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

10

20

30

40

```

355          360          365
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
370          375          380
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
385          390          395          400
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
405          410          415
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
420

```

10

```

<210> 12
<211> 579
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(579)

```

```

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(108)

```

20

```

<220>
<221> mat_peptide
<222> (109)..()

```

```

<400> 12
atg gct gct gaa cca gta gaa gac aat tgc atc aac ttt gtg gca atg      48
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
-35          -30          -25

aaa ttt att gac aat acg ctt tac ttt ata gct gaa gat gat gaa aac      96
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn
-20          -15          -10          -5

ctg gaa tca gat tac ttt ggc aag ctt gaa tct aaa tta tca gtc ata      144
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile
-1 1          5          10

aga aat ttg aat gac caa gtt ctc ttc att gac caa gga aat cgg cct      192
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro
15          20          25

cta ttt gaa gat atg act gat tct gac tgt aga gat aat gca ccc cgg      240
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
30          35          40

acc ata ttt att ata agt atg tat aaa gat agc cag cct aga ggt atg      288
Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met
45          50          55          60

gct gta act atc tct gtg aag tgt gag aaa att tca ayt ctc tcc tgt      336
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys
65          70          75

```

30

40

gag aac aaa att att tcc ttt aag gaa atg aat cct cct gat aac atc 384
 Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile
 80 85 90
 aag gat aca aaa agt gac atc ata ttc ttt cag aga agt gtc cca gga 432
 Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly
 95 100 105
 cat gat aat aag atg caa ttt gaa tct tca tca tac gaa gga tac ttt 480
 His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
 110 115 120
 cta gct tgt gaa aaa gag aga gac ctt ttt aaa ctc att ttg aaa aaa 528
 Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
 125 130 135 140
 gag gat gaa ttg ggg gat aga tct ata atg ttc act gtt caa aac gaa 576
 Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
 145 150 155
 gac 579
 Asp

10

<210> 13
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (73)..(73)
 <223> The 'Xaa' at location 73 stands for Thr, or Ile.
 <400> 13

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
 -35 -30 -25
 Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn
 -20 -15 -10 -5
 Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile
 -1 1 5 10
 Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro
 15 20 25
 Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
 30 35 40
 Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met
 45 50 55 60
 Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys
 65 70 75
 Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile
 80 85 90

30

40

Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly
 95 100 105
 His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
 110 115 120
 Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
 125 130 135 140
 Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
 145 150 155

Asp

10

<210> 14
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30
 Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 55 60
 Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95
 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110
 Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140
 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 145 150 155

20

30

<210> 15
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

40

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(765)

<400> 15

gtc atg gaa tac gcc tct gac gct tca ctg gac ccc gaa gcc ccg tgg	48	
Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp		
1 5 10 15		
cct ccc gcg ccc cgc gct cgc gcc tgc cgc gta ctg cct tgg gcc ctg	96	
Pro Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu		
20 25 30		
gtc gcg ggg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ctc gct gcc gcc tgc gcc gtc	144	10
Val Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val		
35 40 45		
ttc ctc gcc tgc ccc tgg gcc gtg tcc ggg gct cgc gcc tcg ccc ggc	192	
Phe Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly		
50 55 60		
tcc gcg gcc agc ccg aga ctc cgc gag ggt ccc gag ctt tcg ccc gac	240	
Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp		
65 70 75		
gat ccc gcc ggc ctc ttg gac ctg cgg cag ggc atg ttt gcg cag ctg	288	
Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu		
80 85 90 95		
gtg gcc caa aat gtt ctg ctg atc gat ggg ccc ctg agc tgg tac agt	336	20
Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser		
100 105 110		
gac cca ggc ctg gca ggc gtg tcc ctg acg ggg ggc ctg agc tac aaa	384	
Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys		
115 120 125		
gag gac acg aag gag ctg gtg gtg gcc aag gct gga gtc tac tat gtc	432	
Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val		
130 135 140		
ttc ttt caa cta gag ctg cgg cgc gtg gtg gcc ggc gag ggc tca ggc	480	
Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly		
145 150 155		
tcc gtt tca ctt gcg ctg cac ctg cag cca ctg cgc tct gct gct ggg	528	30
Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly		
160 165 170 175		
gcc gcc gcc ctg gct ttg acc gtg gac ctg cca ccc gcc tcc tcc gag	576	
Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu		
180 185 190		
gct cgg aac tcg gcc ttc ggt ttc cag ggc cgc ttg ctg cac ctg agt	624	
Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser		
195 200 205		
gcc ggc cag cgc ctg ggc gtc cat ctt cac act gag gcc agg gca cgc	672	
Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg		
210 215 220		

cat gcc tgg cag ctt acc cag ggc gcc aca gtc ttg gga ctc ttc cgg 720
 His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
 225 230 235

gtg acc ccc gaa atc cca gcc gga ctc cct tca ccg agg tcg gaa 765
 Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 240 245 250

<210> 16
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

10

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
 20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
 35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
 50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
 65 70 75 80

20

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
 85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
 100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
 115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
 130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
 145 150 155 160

30

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
 165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
 180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
 195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
 210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
 225 230 235 240

40

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
 245 250

<210> 17
 <211> 1415
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (120)..(884)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (120)..(189)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (189)..()

<400> 17
 agtggaaagt tctccggcag ccctgagatc tcaagagtga catttgtgag accagctaata 60
 ttgattaataa ttctctttgga atcagctttg ctagtatcat acctgtgcga gatttcata 119
 atg gga aac agc tgt tac aac ata gta gcc act ctg ttg ctg gtc ctc 167
 Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
 -20 -15 -10
 aac ttt gag agg aca aga tca ttg cag gat cct tgt agt aac tgc cca 215
 Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
 -5 -1 1 5
 gct ggt aca ttc tgt gat aat aac agg aat cag att tgc agt ccc tgt 263
 Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
 10 15 20 25
 cct cca aat agt ttc tcc agc gca ggt gga caa agg acc tgt gac ata 311
 Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
 30 35 40
 tgc agg cag tgt aaa ggt gtt ttc agg acc agg aag gag tgt tcc tcc 359
 Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
 45 50 55
 acc agc aat gca gag tgt gac tgc act cca ggg ttt cac tgc ctg ggg 407
 Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
 60 65 70
 gca gga tgc agc atg tgt gaa cag gat tgt aaa caa ggt caa gaa ctg 455
 Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
 75 80 85
 aca aaa aaa ggt tgt aaa gac tgt tgc ttt ggg aca ttt aac gat cag 503
 Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
 90 95 100 105
 aaa cgt ggc atc tgt cga ccc tgg aca aac tgt tct ttg gat gga aag 551
 Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

10

20

30

40

110	115	120	
tct gtg ctt gtg aat ggg acg aag gag agg gac gtg gtc tgt gga cca			599
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro			
125	130	135	
tct cca gcc gac ctc tct ccg gga gca tcc tct gtg acc ccg cct gcc			647
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala			
140	145	150	
cct gcg aga gag cca gga cac tct ccg cag atc atc tcc ttc ttt ctt			695
Pro Ala Ala Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu			
155	160	165	
gcg ctg acg tcg act gcg ttg ctc ttc ctg ctg ttc ttc ctc acg ctc			743
Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu			
170	175	180	185
cgt ttc tct gtt gtt aaa cgg ggc aga aag aaa ctc ctg tat ata ttc			791
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe			
190	195	200	
aaa caa cca ttt atg aga cca gta caa act act caa gag gaa gat ggc			839
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly			
205	210	215	
tgt agc tgc cga ttt cca gaa gaa gaa gaa gga gga tgt gaa ctg			884
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
220	225	230	
tgaaatggaa gtcaataggg ctgttgggac tttcttgaaa agaagcaagg aaatatgagt			944
catccgctat cacagctttc aaaagcaaga acaccatcct acataatacc caggattccc			1004
ccaacacacg ttctttttcta aatgccaatg agttggcctt taaaaatgca ccactttttt			1064
tttttttttt gacagggctc cactctgtca cccaggctgg agtgagctgg caccaccatg			1124
gctctctgca gccttgacct ctgggagctc aagtgatcct cctgcctcag tctcctagta			1184
gctggaacta caaggaaggg ccaccacacc tgactaactt ttttgttttt tgtttggtaa			1244
agatggcatt tcgccatggt gtacaggctg gtctcaaact cctagggttca ctttggcctc			1304
ccaaagtgtc gggattacag acatgaactg ccaggcccg ccaaaataat gcaccacttt			1364
taacagaaca gacagatgag gacagagctg gtgataaaaa aaaaaaaaaa a			1415

<210> 18
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

-20

-15

-10

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

-5

-1

1

5

10

20

30

40

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
 10 15 20 25

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
 30 35 40

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
 45 50 55

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
 60 65 70

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
 75 80 85

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
 90 95 100 105

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
 110 115 120

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
 125 130 135

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
 140 145 150

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
 155 160 165

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
 170 175 180 185

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 190 195 200

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 205 210 215

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 220 225 230

10

20

<210> 19
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(645)

<400> 19
 atg cat gtg ccg gcg ggc tcc gtg gcc agc cac ctg ggg acc acg agc 48
 Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly Thr Thr Ser
 1 5 10 15

cgc agc tat ttc tat ttg acc aca gcc act ctg gct ctg tgc ctt gtc 96
 Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu Cys Leu Val

40

20	25	30	
ttc acg gtg gcc act att atg gtg ttg gtc gtt cag agg acg gac tcc			144
Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg Thr Asp Ser			
35	40	45	
att ccc aac tca cct gac aac gtc ccc ctc aaa gga gga aat tgc tca			192
Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly Asn Cys Ser			
50	55	60	
gaa gac ctc tta tgt atc ctg aaa aga gct cca ttc aag aag tca tgg			240
Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys Lys Ser Trp			
65	70	75	80
gcc tac ctc caa gtg gca aag cat cta aac aaa acc aag ttg tct tgg			288
Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys Leu Ser Trp			
85	90	95	
aac aaa gat ggc att ctc cat gga gtc aga tat cag gat ggg aat ctg			336
Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp Gly Asn Leu			
100	105	110	
gtg atc caa ttc cct ggt ttg tac ttc atc att tgc caa ctg cag ttt			384
Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln Leu Gln Phe			
115	120	125	
ctt gta caa tgc cca aat aat tct gtc gat ctg aag ttg gag ctt ctc			432
Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu Glu Leu Leu			
130	135	140	
atc aac aag cat atc aaa aaa cag gcc ctg gtg aca gtg tgt gag tct			480
Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val Cys Glu Ser			
145	150	155	160
gga atg caa acg aaa cac gta tac cag aat ctc tct caa ttc ttg ctg			528
Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln Phe Leu Leu			
165	170	175	
gat tac ctg cag gtc aac acc acc ata tca gtc aat gtg gat aca ttc			576
Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val Asp Thr Phe			
180	185	190	
cag tac ata gat aca agc acc ttt cct ctt gag aat gtg ttg tcc atc			624
Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val Leu Ser Ile			
195	200	205	
ttc tta tac agt aat tca gac tga			648
Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp			
210	215		

<210> 20
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly Thr Thr Ser
1 5 10 15

10

20

30

40

Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu Cys Leu Val
 20 25 30
 Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg Thr Asp Ser
 35 40 45
 Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly Asn Cys Ser
 50 55 60
 Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys Lys Ser Trp
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys Leu Ser Trp
 85 90 95
 Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp Gly Asn Leu
 100 105 110
 Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln Leu Gln Phe
 115 120 125
 Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu Glu Leu Leu
 130 135 140
 Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val Cys Glu Ser
 145 150 155 160
 Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln Phe Leu Leu
 165 170 175
 Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val Asp Thr Phe
 180 185 190
 Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val Leu Ser Ile
 195 200 205
 Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
 210 215

<210> 21
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)

<400> 21
 atg gac cca ggg ctg cag caa gca ctc aac gga atg gcc cct cct gga 48
 Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 gac aca gcc atg cat gtg ccg gcg ggc tcc gtg gcc agc cac ctg ggg 96
 Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly
 20 25 30
 acc acg agc cgc agc tat ttc tat ttg acc aca gcc act ctg gct ctg 144
 Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu

10

20

30

40

35	40	45	
tgc ctt gtc ttc acg gtg gcc act att atg gtg ttg gtc gtt cag agg			192
Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg			
50	55	60	
acg gac tcc att ccc aac tca cct gac aac gtc ccc ctc aaa gga gga			240
Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly			
65	70	75	80
aat tgc tca gaa gac ctc tta tgt atc ctg aaa aga gct cca ttc aag			288
Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys			
	85	90	95
aag tca tgg gcc tac ctc caa gtg gca aag cat cta aac aaa acc aag			336
Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys			
	100	105	110
ttg tct tgg aac aaa gat ggc att ctc cat gga gtc aga tat cag gat			384
Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp			
	115	120	125
ggg aat ctg gtg atc caa ttc cct ggt ttg tac ttc atc att tgc caa			432
Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln			
	130	135	140
ctg cag ttt ctt gta caa tgc cca aat aat tct gtc gat ctg aag ttg			480
Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu			
	145	150	155
gag ctt ctc atc aac aag cat atc aaa aaa cag gcc ctg gtg aca gtg			528
Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val			
	165	170	175
tgt gag tct gga atg caa acg aaa cac gta tac cag aat ctc tct caa			576
Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln			
	180	185	190
ttc ttg ctg gat tac ctg cag gtc aac acc acc ata tca gtc aat gtg			624
Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val			
	195	200	205
gat aca ttc cag tac ata gat aca agc acc ttt cct ctt gag aat gtg			672
Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val			
	210	215	220
ttg tcc atc ttc tta tac agt aat tca gac tga			705
Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp			
	225	230	

<210> 22
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly		
1	5	10
		15

10

20

30

40

Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly
 20 25 30
 Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu
 35 40 45
 Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg
 50 55 60
 Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly
 65 70 75 80
 Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys
 85 90 95
 Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys
 100 105 110
 Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp
 115 120 125
 Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln
 130 135 140
 Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu
 145 150 155 160
 Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val
 165 170 175
 Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln
 180 185 190
 Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val
 195 200 205
 Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val
 210 215 220
 Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
 225 230

<210> 23
 <211> 1788
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1785)

<400> 23
 atg cgc gtc ctc ctc gcc gcg ctg gga ctg ctg ttc ctg ggg gcg cta 48
 Met Arg Val Leu Leu Ala Ala Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu
 1 5 10 15
 cga gcc ttc cca cag gat cga ccc ttc gag gac acc tgt cat gga aac 96
 Arg Ala Phe Pro Gln Asp Arg Pro Phe Glu Asp Thr Cys His Gly Asn
 20 25 30

10

20

30

40

ccc agc cac tac tat gac aag gct gtc agg agg tgc tgt tac cgc tgc Pro Ser His Tyr Tyr Asp Lys Ala Val Arg Arg Cys Cys Tyr Arg Cys 35 40 45	144	
ccc atg ggg ctg ttc ccg aca cag cag tgc cca cag agg cct act gac Pro Met Gly Leu Phe Pro Thr Gln Gln Cys Pro Gln Arg Pro Thr Asp 50 55 60	192	
tgc agg aag cag tgt gag cct gac tac tac ctg gat gag gcc gac cgc Cys Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Asp Arg 65 70 75 80	240	
tgt aca gcc tgc gtg act tgt tct cga gat gac ctc gtg gag aag acg Cys Thr Ala Cys Val Thr Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr 85 90 95	288	10
ccg tgt gca tgg aac tcc tcc cgt gtc tgc gaa tgt cga ccc ggc atg Pro Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Val Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met 100 105 110	336	
ttc tgt tcc acg tct gcc gtc aac tcc tgt gcc cgc tgc ttc ttc cat Phe Cys Ser Thr Ser Ala Val Asn Ser Cys Ala Arg Cys Phe Phe His 115 120 125	384	
tct gtc tgt ccg gca ggg atg att gtc aag ttc cca ggc acg gcg cag Ser Val Cys Pro Ala Gly Met Ile Val Lys Phe Pro Gly Thr Ala Gln 130 135 140	432	
aag aac acg gtc tgt gag ccg gct tcc cca ggg gtc agc cct gcc tgt Lys Asn Thr Val Cys Glu Pro Ala Ser Pro Gly Val Ser Pro Ala Cys 145 150 155 160	480	20
gcc agc cca gag aac tgc aag gaa ccc tcc agt ggc acc atc ccc cag Ala Ser Pro Glu Asn Cys Lys Glu Pro Ser Ser Gly Thr Ile Pro Gln 165 170 175	528	
gcc aag ccc acc ccg gtg tcc cca gca acc tcc agt gcc agc acc atg Ala Lys Pro Thr Pro Val Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Thr Met 180 185 190	576	
cct gta aga ggg ggc acc cgc ctc gcc cag gaa gct gct tct aaa ctg Pro Val Arg Gly Gly Thr Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Ser Lys Leu 195 200 205	624	
acg agg gct ccc gac tct ccc tcc tct gtg gga agg cct agt tca gat Thr Arg Ala Pro Asp Ser Pro Ser Ser Val Gly Arg Pro Ser Ser Asp 210 215 220	672	30
cca ggt ctg tcc cca aca cag cca tgc cca gag ggg tct ggt gat tgc Pro Gly Leu Ser Pro Thr Gln Pro Cys Pro Glu Gly Ser Gly Asp Cys 225 230 235 240	720	
aga aag cag tgt gag ccc gac tac tac ctg gac gag gcc ggc cgc tgc Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Arg Cys 245 250 255	768	
aca gcc tgc gtg agc tgt tct cga gat gac ctt gtg gag aag acg cca Thr Ala Cys Val Ser Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr Pro 260 265 270	816	

tgt gca tgg aac tcc tcc cgc acc tgc gaa tgt cga cct ggc atg atc Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Thr Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met Ile 275 280 285	864	
tgt gcc aca tca gcc acc aac tcc tgt gcc cgc tgt gtc ccc tac cca Cys Ala Thr Ser Ala Thr Asn Ser Cys Ala Arg Cys Val Pro Tyr Pro 290 295 300	912	
atc tgt gca gga gag acg gtc acc aag ccc cag gat atg gct gag aag Ile Cys Ala Gly Glu Thr Val Thr Lys Pro Gln Asp Met Ala Glu Lys 305 310 315 320	960	
gac acc acc ttt gag gcg cca ccc ctg ggg acc cag ccg gac tgc aac Asp Thr Thr Phe Glu Ala Pro Pro Leu Gly Thr Gln Pro Asp Cys Asn 325 330 335	1008	10
ccc acc cca gag aat ggc gag gcg cct gcc agc acc agc ccc act cag Pro Thr Pro Glu Asn Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Ser Pro Thr Gln 340 345 350	1056	
agc ttg ctg gtg gac tcc cag gcc agt aag acg ctg ccc atc cca acc Ser Leu Leu Val Asp Ser Gln Ala Ser Lys Thr Leu Pro Ile Pro Thr 355 360 365	1104	
agc gct ccc gtc gct ctc tcc tcc acg ggg aag ccc gtt ctg gat gca Ser Ala Pro Val Ala Leu Ser Ser Thr Gly Lys Pro Val Leu Asp Ala 370 375 380	1152	
ggg cca gtg ctc ttc tgg gtg atc ctg gtg ttg gtt gtg gtg gtc ggc Gly Pro Val Leu Phe Trp Val Ile Leu Val Leu Val Val Val Gly 385 390 395 400	1200	20
tcc agc gcc ttc ctc ctg tgc cac cgg agg gcc tgc agg aag cga att Ser Ser Ala Phe Leu Leu Cys His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile 405 410 415	1248	
cgg cag aag ctc cac ctg tgc tac ccg gtc cag acc tcc cag ccc aag Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys 420 425 430	1296	
cta gag ctt gtg gat tcc aga ccc agg agg agc tca acg cag ctg agg Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg 435 440 445	1344	
agt ggt gcg tcg gtg aca gaa ccc gtc gcg gaa gag cga ggg tta atg Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met 450 455 460	1392	30
agc cag cca ctg atg gag acc tgc cac agc gtg ggg gca gcc tac ctg Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu 465 470 475 480	1440	
gag agc ctg ccg ctg cag gat gcc agc ccg gcc ggg ggc ccc tcg tcc Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser 485 490 495	1488	
ccc agg gac ctt cct gag ccc cgg gtg tcc acg gag cac acc aat aac Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn 500 505 510	1536	
aag att gag aaa atc tac atc atg aag gct gac acc gtg atc gtg ggg	1584	40

Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly
 515 520 525
 acc gtg aag gct gag ctg ccg gag ggc cgg ggc ctg gcg ggg cca gca 1632
 Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala
 530 535 540
 gag ccc gag ttg gag gag gag ctg gag gcg gac cat acc ccc cac tac 1680
 Glu Pro Glu Leu Glu Glu Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr
 545 550 555 560
 ccc gag cag gag aca gaa ccg cct ctg ggc agc tgc agc gat gtc atg 1728
 Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met
 565 570 575
 ctc tca gtg gaa gag gaa ggg aaa gaa gac ccc ttg ccc aca gct gcc 1776
 Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala
 580 585 590
 tct gga aag tga 1788
 Ser Gly Lys
 595

<210> 24
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

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

10

20

30

40

Ala Ser Pro Glu Asn Cys Lys Glu Pro Ser Ser Gly Thr Ile Pro Gln
165 170 175

Ala Lys Pro Thr Pro Val Ser Pro Ala Thr Ser Ser Ala Ser Thr Met
180 185 190

Pro Val Arg Gly Gly Thr Arg Leu Ala Gln Glu Ala Ala Ser Lys Leu
195 200 205

Thr Arg Ala Pro Asp Ser Pro Ser Ser Val Gly Arg Pro Ser Ser Asp
210 215 220

Pro Gly Leu Ser Pro Thr Gln Pro Cys Pro Glu Gly Ser Gly Asp Cys
225 230 235 240

Arg Lys Gln Cys Glu Pro Asp Tyr Tyr Leu Asp Glu Ala Gly Arg Cys
245 250 255

Thr Ala Cys Val Ser Cys Ser Arg Asp Asp Leu Val Glu Lys Thr Pro
260 265 270

Cys Ala Trp Asn Ser Ser Arg Thr Cys Glu Cys Arg Pro Gly Met Ile
275 280 285

Cys Ala Thr Ser Ala Thr Asn Ser Cys Ala Arg Cys Val Pro Tyr Pro
290 295 300

Ile Cys Ala Gly Glu Thr Val Thr Lys Pro Gln Asp Met Ala Glu Lys
305 310 315 320

Asp Thr Thr Phe Glu Ala Pro Pro Leu Gly Thr Gln Pro Asp Cys Asn
325 330 335

Pro Thr Pro Glu Asn Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Ser Pro Thr Gln
340 345 350

Ser Leu Leu Val Asp Ser Gln Ala Ser Lys Thr Leu Pro Ile Pro Thr
355 360 365

Ser Ala Pro Val Ala Leu Ser Ser Thr Gly Lys Pro Val Leu Asp Ala
370 375 380

Gly Pro Val Leu Phe Trp Val Ile Leu Val Leu Val Val Val Gly
385 390 395 400

Ser Ser Ala Phe Leu Leu Cys His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile
405 410 415

Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys
420 425 430

Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg
435 440 445

Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met
450 455 460

Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu
465 470 475 480

Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser

10

20

30

40

485 490 495
 Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn
 500 505 510
 Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly
 515 520 525
 Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala
 530 535 540
 Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr
 545 550 555 560
 Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met
 565 570 575
 Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala
 580 585 590
 Ser Gly Lys
 595

<210> 25
 <211> 696
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (138)..(686)

<400> 25
 ggccctggga cctttgccta ttttctgatt gataggcttt gttttgtctt tacctccttc 60
 tttctgggga aaacttcagt tttatcgcac gttccctttt tccatatctt catcttcctt 120
 ctaccagat tgtgaag atg gaa agg gtc caa ccc ctg gaa gag aat gtg 170
 Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val
 1 5 10
 gga aat gca gcc agg cca aga ttc gag agg aac aag cta ttg ctg gtg 218
 Gly Asn Ala Ala Arg Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val
 15 20 25
 gcc tct gta att cag gga ctg ggg ctg ctc ctg tgc ttc acc tac atc 266
 Ala Ser Val Ile Gln Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile
 30 35 40
 tgc ctg cac ttc tct gct ctt cag gta tca cat cgg tat cct cga att 314
 Cys Leu His Phe Ser Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile
 45 50 55
 caa agt atc aaa gta caa ttt acc gaa tat aag aag gag aaa ggt ttc 362
 Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe
 60 65 70 75
 atc ctc act tcc caa aag gag gat gaa atc atg aag gtg cag aac aac 410
 Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn

10

20

30

40

80	85	90	
tca gtc atc atc aac tgt gat ggg ttt tat ctc atc tcc ctg aag ggc			458
Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly			
95	100	105	
tac ttc tcc cag gaa gtc aac att agc ctt cat tac cag aag gat gag			506
Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu			
110	115	120	
gag ccc ctc ttc caa ctg aag aag gtc agg tct gtc aac tcc ttg atg			554
Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met			
125	130	135	
gtg gcc tct ctg act tac aaa gac aaa gtc tac ttg aat gtg acc act			602
Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr			
140	145	150	155
gac aat acc tcc ctg gat gac ttc cat gtg aat ggc gga gaa ctg att			650
Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile			
160	165	170	
ctt atc cat caa aat cct ggt gaa ttc tgt gtc ctt tgaggggctg			696
Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu			
175	180		

<210> 26
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg	
1 5 10 15	
Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln	
20 25 30	
Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser	
35 40 45	
Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val	
50 55 60	
Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln	
65 70 75 80	
Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn	
85 90 95	
Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu	
100 105 110	
Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln	
115 120 125	
Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr	
130 135 140	

10

20

30

40

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 27
<211> 865
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10

<220>
<221> CDS
<222> (15)..(845)

<400> 27
cagcagagac gagg atg tgc gtg ggg gct cgg cgg ctg ggc cgc ggg ccg 50
Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro
1 5 10

tgt gcg gct ctg ctc ctc ctg ggc ctg ggg ctg agc acc gtg acg ggg 98
Cys Ala Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly
15 20 25

20

ctc cac tgt gtc ggg gac acc tac ccc agc aac gac cgg tgc tgc cac 146
Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His
30 35 40

gag tgc agg cca ggc aac ggg atg gtg agc cgc tgc agc cgc tcc cag 194
Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
45 50 55 60

aac acg gtg tgc cgt ccg tgc ggg ccg ggc ttc tac aac gac gtg gtc 242
Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
65 70 75

agc tcc aag ccg tgc aag ccc tgc acg tgg tgt aac ctc aga agt ggg 290
Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
80 85 90

30

agt gag cgg aag cag ctg tgc acg gcc aca cag gac aca gtc tgc cgc 338
Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
95 100 105

tgc cgg gcg ggc acc cag ccc ctg gac agc tac aag cct gga gtt gac 386
Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp
110 115 120

tgt gcc ccc tgc cct cca ggg cac ttc tcc cca ggc gac aac cag gcc 434
Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala
125 130 135 140

tgc aag ccc tgg acc aac tgc acc ttg gct ggg aag cac acc ctg cag 482
Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
145 150 155

40

ccg gcc agc aat agc tcg gac gca atc tgt gag gac agg gac ccc cca 530
 Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
 160 165 170

gcc acg cag ccc cag gag acc cag ggc ccc ccg gcc agg ccc atc act 578
 Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr
 175 180 185

gtc cag ccc act gaa gcc tgg ccc aga acc tca cag gga ccc tcc acc 626
 Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr
 190 195 200

cgg ccc gtg gag gtc ccc ggg ggc cgt gcg gtt gcc gcc atc ctg ggc 674
 Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly 10
 205 210 215 220

ctg ggc ctg gtg ctg ggg ctg ctg ggc ccc ctg gcc atc ctg ctg gcc 722
 Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala
 225 230 235

ctg tac ctg ctg cgg agg gac cag agg ctg ccc ccc gat gcc cac aag 770
 Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys
 240 245 250

ccc cct ggg gga ggc agt ttc cgg acc ccc atc caa gag gag cag gcc 818
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala
 255 260 265

gac gcc cac tcc acc ctg gcc aag atc tgacctgggc ccaccaaggt 865
 Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile 20
 270 275

<210> 28
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110 40

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125
 Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140
 Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175
 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190
 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205
 Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
 210 215 220
 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 225 230 235 240
 Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
 245 250 255
 Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
 260 265 270
 Thr Leu Ala Lys Ile
 275

10

20

<210> 29
 <211> 1599
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (67)..(1596)

30

<400> 29
 ccacaccaag cagcggctgg gggggggaaa gacgaggaaa gaggaggaaa acaaaagctg 60
 ctactt atg gaa gat aca aag gag tct aac gtg aag aca ttt tgc tcc 108
 Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser
 1 5 10
 aag aat atc cta gcc atc ctt ggc ttc tcc tct atc ata gct gtg ata 156
 Lys Asn Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile
 15 20 25 30
 gct ttg ctt gct gtg ggg ttg acc cag aac aaa gca ttg cca gaa aac 204
 Ala Leu Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn
 35 40 45
 gtt aag tat ggg att gtg ctg gat gcg ggt tct tct cac aca agt tta 252
 Val Lys Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu

40

50	55	60	
tac atc tat aag tgg cca gca gaa aag gag aat gac aca ggc gtg gtg Tyr Ile Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val 65 70 75			300
cat caa gta gaa gaa tgc agg gtt aaa ggt cct gga atc tca aaa ttt His Gln Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe 80 85 90			348
gtt cag aaa gta aat gaa ata ggc att tac ctg act gat tgc atg gaa Val Gln Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu 95 100 105 110			396
aga gct agg gaa gtg att cca agg tcc cag cac caa gag aca ccc gtt Arg Ala Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val 115 120 125			444
tac ctg gga gcc acg gca ggc atg cgg ttg ctc agg atg gaa agt gaa Tyr Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu 130 135 140			492
gag ttg gca gac agg gtt ctg gat gtg gtg gag agg agc ctc agc aac Glu Leu Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn 145 150 155			540
tac ccc ttt gac ttc cag ggt gcc agg atc att act ggc caa gag gaa Tyr Pro Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu 160 165 170			588
ggt gcc tat ggc tgg att act atc aac tat ctg ctg ggc aaa ttc agt Gly Ala Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser 175 180 185 190			636
cag aaa aca agg tgg ttc agc ata gtc cca tat gaa acc aat aat cag Gln Lys Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln 195 200 205			684
gaa acc ttt gga gct ttg gac ctt ggg gga gcc tct aca caa gtc act Glu Thr Phe Gly Ala Leu Asp Leu Gly Ala Ser Thr Gln Val Thr 210 215 220			732
ttt gta ccc caa aac cag act atc gag tcc cca gat aat gct ctg caa Phe Val Pro Gln Asn Gln Thr Ile Glu Ser Pro Asp Asn Ala Leu Gln 225 230 235			780
ttt cgc ctc tat ggc aag gac tac aat gtc tac aca cat agc ttc ttg Phe Arg Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Asn Val Tyr Thr His Ser Phe Leu 240 245 250			828
tgc tat ggg aag gat cag gca ctc tgg cag aaa ctg gcc aag gac att Cys Tyr Gly Lys Asp Gln Ala Leu Trp Gln Lys Leu Ala Lys Asp Ile 255 260 265 270			876
cag gtt gca agt aat gaa att ctc agg gac cca tgc ttt cat cct gga Gln Val Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly 275 280 285			924
tat aag aag gta gtg aac gta agt gac ctt tac aag acc ccc tgc acc Tyr Lys Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr 290 295 300			972

10

20

30

40

```

aag aga ttt gag atg act ctt cca ttc cag cag ttt gaa atc cag ggt      1020
Lys Arg Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly
      305                      310                      315

att gga aac tat caa caa tgc cat caa agc atc ctg gag ctc ttc aac      1068
Ile Gly Asn Tyr Gln Gln Cys His Gln Ser Ile Leu Glu Leu Phe Asn
      320                      325                      330

acc agt tac tgc cct tac tcc cag tgt gcc ttc aat ggg att ttc ttg      1116
Thr Ser Tyr Cys Pro Tyr Ser Gln Cys Ala Phe Asn Gly Ile Phe Leu
      335                      340                      345                      350

cca cca ctc cag ggg gat ttt ggg gca ttt tca gct ttt tac ttt gtg      1164
Pro Pro Leu Gln Gly Asp Phe Gly Ala Phe Ser Ala Phe Tyr Phe Val
      355                      360                      365

atg aag ttt tta aac ttg aca tca gag aaa gtc tct cag gaa aag gtg      1212
Met Lys Phe Leu Asn Leu Thr Ser Glu Lys Val Ser Gln Glu Lys Val
      370                      375                      380

act gag atg atg aaa aag ttc tgt gct cag cct tgg gag gag ata aaa      1260
Thr Glu Met Met Lys Lys Phe Cys Ala Gln Pro Trp Glu Glu Ile Lys
      385                      390                      395

aca tct tac gct gga gta aag gag aag tac ctg agt gaa tac tgc ttt      1308
Thr Ser Tyr Ala Gly Val Lys Glu Lys Tyr Leu Ser Glu Tyr Cys Phe
      400                      405                      410

tct ggt acc tac att ctc tcc ctc ctt ctg caa ggc tat cat ttc aca      1356
Ser Gly Thr Tyr Ile Leu Ser Leu Leu Leu Gln Gly Tyr His Phe Thr
      415                      420                      425                      430

gct gat tcc tgg gag cac atc cat ttc att ggc aag atc cag ggc agc      1404
Ala Asp Ser Trp Glu His Ile His Phe Ile Gly Lys Ile Gln Gly Ser
      435                      440                      445

gac gcc ggc tgg act ttg ggc tac atg ctg aac ctg acc aac atg atc      1452
Asp Ala Gly Trp Thr Leu Gly Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Met Ile
      450                      455                      460

cca gct gag caa cca ttg tcc aca cct ctc tcc cac tcc acc tat gtc      1500
Pro Ala Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val
      465                      470                      475

ttc ctc atg gtt cta ttc tcc ctg gtc ctt ttc aca gtg gcc atc ata      1548
Phe Leu Met Val Leu Phe Ser Leu Val Leu Phe Thr Val Ala Ile Ile
      480                      485                      490

ggc ttg ctt atc ttt cac aag cct tca tat ttc tgg aaa gat atg gta      1596
Gly Leu Leu Ile Phe His Lys Pro Ser Tyr Phe Trp Lys Asp Met Val
      495                      500                      505                      510

tag                                                                    1599

```

```

<210> 30
<211> 510
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

10

20

30

40

<400> 30

Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn
 1 5 10 15
 Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu
 20 25 30
 Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn Val Lys
 35 40 45
 Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile
 50 55 60
 Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln
 65 70 75 80
 Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln
 85 90 95
 Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala
 100 105 110
 Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu
 115 120 125
 Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu
 130 135 140
 Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro
 145 150 155 160
 Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala
 165 170 175
 Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys
 180 185 190
 Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln Glu Thr
 195 200 205
 Phe Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Thr Phe Val
 210 215 220
 Pro Gln Asn Gln Thr Ile Glu Ser Pro Asp Asn Ala Leu Gln Phe Arg
 225 230 235 240
 Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Asn Val Tyr Thr His Ser Phe Leu Cys Tyr
 245 250 255
 Gly Lys Asp Gln Ala Leu Trp Gln Lys Leu Ala Lys Asp Ile Gln Val
 260 265 270
 Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly Tyr Lys
 275 280 285
 Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr Lys Arg
 290 295 300
 Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly Ile Gly
 305 310 315 320

10

20

30

40

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

10

20

<210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Flag peptide

<400> 31

30

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> linker

<400> 32

40

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> linker

<400> 33

10

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> linker

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

20

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide

<400> 35

Gly Thr Pro Gly Thr Pro Gly Thr Pro
1 5

<210> 36
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide

<400> 36

30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

40

【図 1】

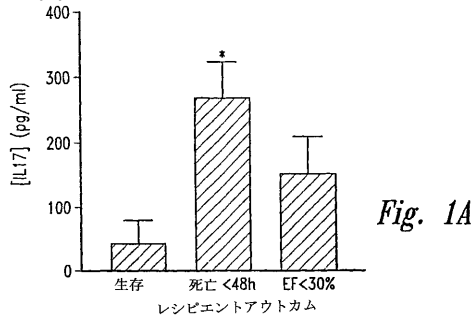
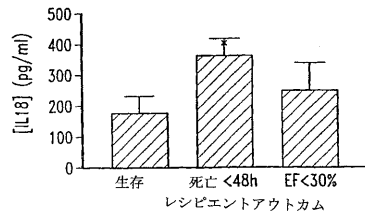
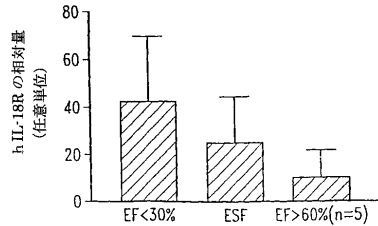


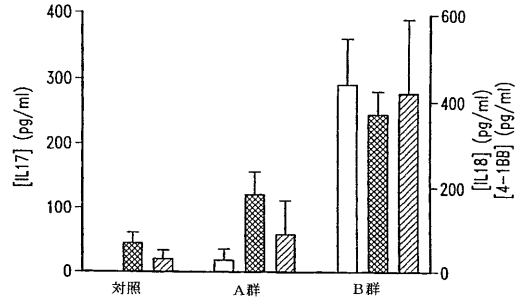
Fig. 1B



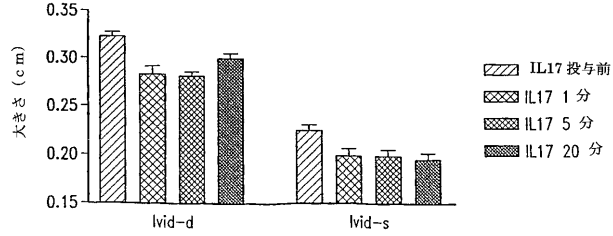
【図 2】



【図 4】



【図 5】



【図 3】

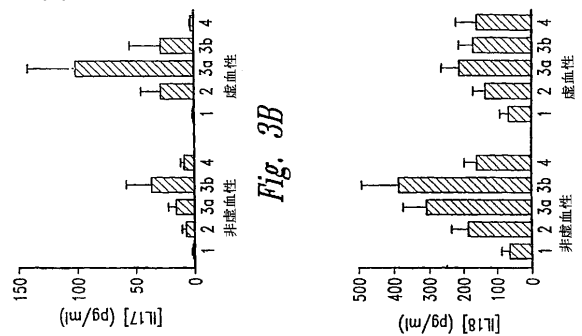


Fig. 3D

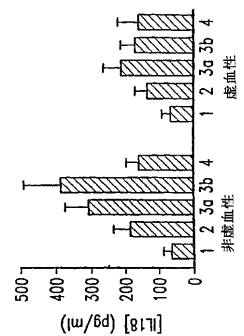
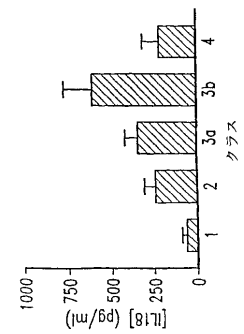
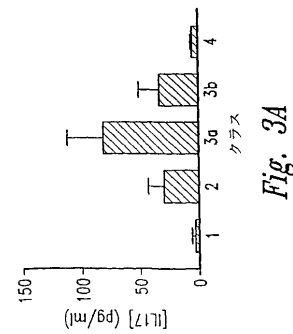


Fig. 3C



【図 6】

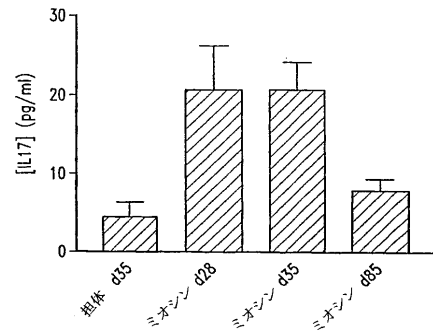


Fig. 6A

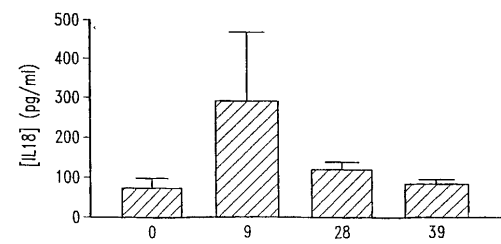


Fig. 6B

【 図 7 】

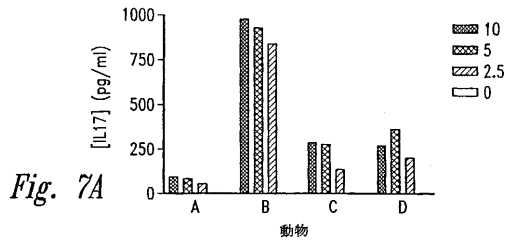


Fig. 7A

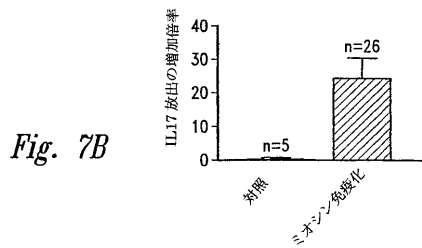


Fig. 7B

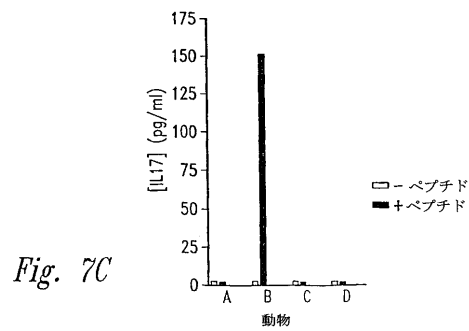


Fig. 7C

【 図 8 】

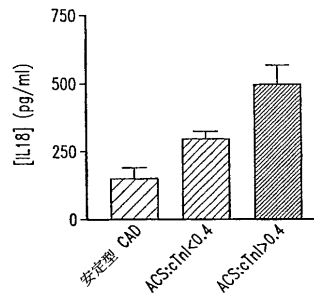


Fig. 8A

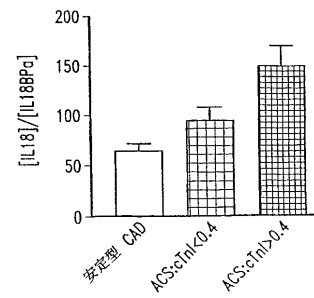
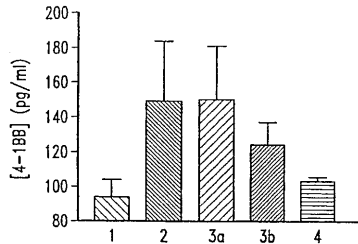
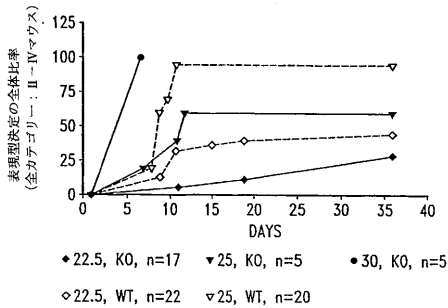


Fig. 8B

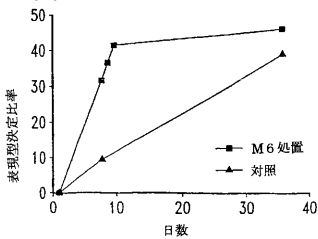
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/26354
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/00, 39/395 US CL : 514/2; 424/130.1, 133.1, 135.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/2; 424/130.1, 133.1, 135.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN (Medline, Biosis), EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,083,906 (TRDUTTI et al.) 04 July 2000, the abstract, and column 1, lines 59-60.	1 in part, 2, 3 and 9-11
A,P	CSISZAR et al., Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. FASEB, 2003, Vol. 17, No. 9, pages 1183-1185, especially page	1 in part, 2, 3 and 9-11
A	US 6,362,325 B1 (Kwon, B.S.) 26 March 2002, the abstract, and the paragraph bridging columns 22 and 23.	1 in part
A	YNDESTAD et al. Increased gene expression of TNF superfamily ligands in peripheral blood mononuclear cells during chronic heart failure. Cardiovascular Res., April 2002, Vol. 54, No. 1, pages 175-182, especially the abstract.	1 in part
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 February 2004 (12.02.2004)	Date of mailing of the international search report 27 APR 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Yvonne Eyster <i>Yvonne Eyster</i> Telephone No. 571-272-1600	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/26354

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1 in part, 2, 3, and 9-11
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/26354

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1 in part, and 2-11, drawn to a method of treating cardiovascular disease using an IL-17 antagonist.

Group II, claim(s) 1 in part, drawn to a method of treating cardiovascular disease using an IL-18 antagonist.

Group III, claim(s) 1 in part, drawn to a method of treating cardiovascular disease using a 4-1BB antagonist.

Group IV, claim(s) 1 in part, drawn to a method of treating cardiovascular disease using a CD30 antagonist.

Group V, claim(s) 1 in part, drawn to a method of treating cardiovascular disease using OX40 antagonist.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: although all of Groups I-V are drawn to a method of treating cardiovascular disease, the method in each group uses a distinct active ingredient, and they are physically and functionally distinct chemical entities, which share neither structure nor function. None of the five active ingredients is required for the manufacture of the others. As such, the groups are not so linked by a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 so as to form a single general inventive concept.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/26354

Species A: a soluble IL-17 receptor,
Species B: an antibody specifically binds IL-17 receptor,
Species C: an antibody specifically binds IL-17.

The claims are deemed to correspond to the species listed above in the following manner:

Claims 1-3, 9-11: Species A,
Claims 1, 4, 5 and 7-11: Species B,
Claims 1, 4 and 6-11: Species C.

The following claim(s) are generic: 1 and 9-11.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Each species set forth above has distinct chemical, and structural properties, and therefore, these species do not share a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, and thus do not relate to a single invention concept within the meaning of PCT Rule 13.1.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
	C 0 7 K 14/54	
	C 0 7 K 14/715	
	C 1 2 N 15/00	A

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

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 パートン, ポール・ビー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 3 2 0, サウザンド・オークス, ジャヴリン・コート 9 9 8

(72)発明者 デイシャー, テレサ・エイ

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 1 5, シアトル, ノース・イースト・シックスティファースト・ストリート 6 3 1 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA26 BA63 CA02 CA10 HA14

4C084 AA01 AA02 AA17 BA01 BA08 BA13 BA22 BA23 DC50 NA14

ZA21 ZA36 ZA38 ZA39 ZA40 ZA42 ZA45 ZA51 ZA54 ZA59

ZA67 ZA81 ZB07 ZB08 ZB11 ZB32 ZB33 ZB35 ZC54

4C085 AA13 AA14 CC03 DD61 DD62 DD63

4C086	AA01	AA02	DA08	MA01	MA04	NA14	ZA21	ZA36	ZA38	ZA39
	ZA40	ZA42	ZA45	ZA51	ZA54	ZA59	ZA67	ZA81	ZB07	ZB08
	ZB11	ZB32	ZB33	ZB35	ZC54					
4H045	BA10	CA40	DA02	DA51	EA20					