

(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2016-540506

(P2016-540506A)

(43) 公表日 平成28年12月28日(2016.12.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAC	4B065
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	4C076
C07K 14/54 (2006.01)	C07K 14/54	4C084
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4C085
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4C086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-533639 (P2016-533639)
(86) (22) 出願日 平成26年11月20日 (2014.11.20)
(85) 翻訳文提出日 平成28年6月23日 (2016.6.23)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/066712
(87) 国際公開番号 W02015/077506
(87) 国際公開日 平成27年5月28日 (2015.5.28)
(31) 優先権主張番号 61/906,855
(32) 優先日 平成25年11月20日 (2013.11.20)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591052398
ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
ティ オブ カリフォルニア
THE REGENTS OF THE
UNIVERSITY OF CALIF
ORNIA
アメリカ合衆国・94607-5200・
カリフォルニア州・オークランド・12階
・フランクリン ストリート・1111
(74) 代理人 100074332
弁理士 藤本 昇
(74) 代理人 100114432
弁理士 中谷 寛昭
(74) 代理人 100171310
弁理士 日東 伸二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規B細胞サイトカインの同定

(57) 【要約】

活性化B細胞により産生された新規サイトカインであるIL40を含む組成物及び方法が提供される。本組成物としては、以下が挙げられる：a) 抗-IL40抗体、IL40ペプチド及びIL40タンパク質；b) IL40遺伝子及びcDNA配列をコードする核酸；及びc) これらの医薬組成物。本方法としては、治療法、診断法及び単離法が挙げられる。

【選択図】 図2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C 1 7 o r f 9 9 ポリペプチド遺伝子産物 (I L 4 0) に対する抗体であって、
 a) I g G、I g M、I g A、I g D または I g E ;
 b) モノクローナル抗体 ;
 c) F a b '、F a b、F (a b ')₂、シングルドメイン抗体 (s d A b)、F v または s c F v (単鎖 F v) ;
 d) 標識抗体 ;
 e) 中和抗体 ; または
 f) a) ~ e) の任意の組み合わせである、
 前記抗体。

10

【請求項 2】

サンプル中の I L 4 0 の検出方法であって、
 免疫検出方法において、検出剤として請求項 1 に記載の前記抗体を用いて I L 4 0 を免疫検出することを含む前記方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、前記免疫検出法は、酵素結合免疫吸着法 (E L I S A)、組織学的方法、蛍光活性化細胞選別、ラジオイムノアッセイ (R I A)、免疫放射定量分析法、免疫組織化学的方法、蛍光免疫測定法、化学発光分析法、生物発光分析法、ウエスタンブロッティング法またはドットブロッティング法である、前記方法。

20

【請求項 4】

I L 4 0 が関与する疾患の治療を必要とする対象における、I L 4 0 が関与する疾患の治療方法であって、前記対象に治療有効量の請求項 1 の抗体を投与して、I L 4 0 を中和させることを含む前記方法。

【請求項 5】

前記疾患は、自己免疫疾患またはリンパ腫である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

I L 4 0 が関与する疾患のための診断法またはセラノスティクス法 (t h e r a n o s t i c) において検出剤として請求項 1 の前記抗体を用いて、I L 4 0 を免疫検出することを含む、サンプル中の I L 4 0 検出方法。

30

【請求項 7】

前記疾患は、リンパ腫、白血病、免疫不全または自己免疫疾患である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記自己免疫疾患は全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎または乾癬であり、前記免疫不全は I g A 欠損症候群である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

I L 4 0 の前記アミノ酸配列の一部若しくは全部、または I L 4 0 の成熟形態を含むペプチド若しくは単離タンパク質。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のペプチドであって、
 a) I L 4 0 の配列変異型、多形体または種対応物 ;
 b) I L 4 0 の置換変異型、挿入変異型または欠失変異型 ;
 c) 以下からなる群から選択される I L 4 0 の非配列誘導体 ;
 グリコシル化修飾 I L 4 0、化学修飾 I L 4 0 及び I L 4 0 抱合体 ;
 d) I L 4 0 の機能的変異型 ;
 e) I L 4 0 の機能的セグメント、I L 4 0 の保存領域、または I L 4 0 の非保存領域 ;
 f) I L 4 0 の融合タンパク質 ; または
 g) a) ~ f) の任意の組み合わせである、

40

50

前記ペプチドまたはタンパク質。

【請求項 1 1】

IL40 が関与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40 が関与する疾患の治療方法であって、

請求項 9 または請求項 10 に記載の治療有効量の前記ペプチドまたはタンパク質を前記対象へ投与することを含み、前記ペプチドまたはタンパク質はIL40 アンタゴニストである、前記方法。

【請求項 1 2】

前記疾患は、自己免疫疾患またはリンパ腫である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

IL40 が関与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40 が関与する疾患の治療方法であって、

治療有効量のIL40 または請求項 9 または請求項 10 に記載の前記ペプチドまたはタンパク質を前記対象へ投与することを含み、前記ペプチドまたはタンパク質はIL40 アゴニストである、前記方法。

【請求項 1 4】

前記疾患はIgA欠損症候群、ホジキンリンパ腫若しくは非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、菌状息肉腫、マンツル細胞リンパ腫、多発性骨髄腫または別のリンパ腫若しくは白血病；リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、強皮症、グレーブス病、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変症、自己免疫性肝炎、多発性硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎、特発性肺胞線維症、過敏性肺炎、非特異的間質性肺炎または別の自己免疫疾患である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

IL40 の関与する疾患の診断法であって、診断/セラノスティクス法において標的またはサンプル対照として請求項 9 または請求項 10 に記載の前記ペプチドまたはタンパク質を使用することを含む、前記方法。

【請求項 1 6】

前記疾患は、リンパ腫、自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎または乾癬である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

IL40 を発現する細胞のサブセットの精製方法または単離方法であって、精製剤/単離剤として請求項 1 に記載の抗体を用いて、前記細胞のサブセットを精製または単離することを含む方法。

【請求項 1 8】

前記サブセットは蛍光活性化細胞選別(FACS)により精製または単離され、前記細胞サブセットを選択する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記細胞は、ハイブリドーマ、組換え型細菌細胞、組換え型酵母菌細胞または組換え型哺乳類細胞である、請求項 1 の抗体を産生する細胞。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の前記細胞を含む動物。

【請求項 2 1】

前記機能的変異型はIL40のアゴニスト若しくはアンタゴニストであり、前記融合タンパク質は、共有結合構造体若しくは非共有結合構造体または標識構造体である、請求項 10 に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項 2 2】

免疫細胞の誘導方法であって、synaptogyrin2 及び/若しくはB細胞によって産生される他のIL40誘導タンパク質を産生するため、または前記免疫細胞の分化または成熟を誘発するために活性剤として請求項 9 または請求項 10 に記載の前記ペプチ

10

20

30

40

50

ドまたはタンパク質を使用することを含む、前記方法。

【請求項 23】

IL40 受容体を同定する方法であって、前記 IL40 受容体に結合するためのリガンドとして請求項 9 または請求項 10 に記載の前記ペプチドまたはタンパク質を使用することを含む、前記方法。

【請求項 24】

前記細胞は、組換え型細菌細胞、組換え型酵母菌細胞または組換え型哺乳類細胞である、請求項 9 または請求項 10 に記載のペプチドまたはタンパク質を産生する細胞。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の細胞を含む動物。

10

【請求項 26】

IL40 遺伝子または IL40 cDNA のヌクレオチド配列の一部または全体を含む、核酸。

【請求項 27】

IL40 遺伝子または IL40 cDNA のヌクレオチド配列の一部または全体を含む核酸であって、請求項 9 に記載のペプチドまたはタンパク質をコードする、前記核酸。

【請求項 28】

請求項 26 または請求項 27 に記載の核酸であって、

- a) 別のヌクレオチド配列、標識または化学的誘導体に共役結合される；
- b) プライマー、プローブ、アンチセンス分子、または IL40 遺伝子または IL40 cDNA 配列をベースとしたオリゴヌクレオチドである；
- c) 異種核酸配列に付着した組換え型構造体である；または
- d) a) ~ c) の任意の組み合わせである；

20

前記核酸。

【請求項 29】

前記異種核酸配列は、プロモーター、エンハンサー、ベクターまたは発現ベクターである、請求項 28 に記載の核酸。

【請求項 30】

IL40 が関与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40 が関与する疾患の治療方法であって、前記対象に治療有効量の請求項 26 または請求項 27 に記載の核酸を投与することを含み、前記核酸により IL40 の発現が減少する、前記方法。

30

【請求項 31】

前記疾患は、自己免疫疾患またはリンパ腫である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

IL40 が関与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40 が関与する疾患の治療方法であって、前記対象に治療有効量の請求項 26 または請求項 27 に記載の核酸を投与することを含み、前記核酸により IL40 の発現が増加する、前記方法。

【請求項 33】

前記疾患は IgA 欠損症候群、ホジキンリンパ腫若しくは非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、菌状息肉腫、マントル細胞リンパ腫、または別のリンパ腫若しくは白血病；リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、強皮症、グレーブス病、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変症、自己免疫性肝炎、多発性硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎、特発性肺胞線維症、過敏性肺炎、非特異的間質性肺炎または別の自己免疫疾患である、請求項 32 に記載の方法。

40

【請求項 34】

前記核酸は RNAi 分子である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 35】

IL40 の関与する疾患の診断法であって、前記疾患の診断/セラノスティクス法においてプローブとして請求項 26 または請求項 27 に記載の核酸を使用することによってサンプルをプローブすることを含む、前記方法。

50

【請求項 36】

前記疾患は、リンパ腫、自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎または乾癬である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記細胞は、組換え型細菌細胞、組換え型酵母菌細胞または組換え型哺乳類細胞である、請求項 26 または請求項 27 に記載の核酸の組換え型形態を含む細胞。

【請求項 38】

請求項 37 に記載の細胞を含む動物。

【請求項 39】

IL40 を発現する細胞のサブセットの選択方法であって、

IL40 を発現する細胞を含む細胞集団に IL40 を結合させる分子を添加することと

、
選択された細胞の集団を提供するために前記 IL40 結合分子により標識された細胞を選択することを含む、前記方法。

10

【請求項 40】

請求項 39 に記載の方法であって、

- a) 前記 IL40 発現細胞は、マウス細胞、ラット細胞、ヒト細胞である；
- b) 前記 IL40 結合分子は、抗-IL40 抗体または IL40 受容体である；
- c) 前記選択細胞は、血液、体液、細胞懸濁液または患者サンプルから選択される；
- d) 前記選択細胞は、IL40 発現細胞を調べるための調査ツールである；
- e) 前記選択細胞は血球であり、また
- i) 前記選択細胞により作製された免疫グロブリンの mRNA 供給源；
- ii) 完全ヒト化抗体の新規作製方法の供給源であり；

20

または

f) a) ~ e) のいずれかの組み合わせ、である前記方法。

【請求項 41】

それを必要とする対象において、IL40 が関与する疾患の治療方法であって、

治療有効量の請求項 39 に記載の選択細胞を前記対象へ投与することを含む、前記方法

【請求項 42】

前記疾患は IgA 欠損症候群、ホジキンリンパ腫若しくは非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、菌状息肉腫、マンツル細胞リンパ腫、または別のリンパ腫若しくは白血病；リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、強皮症、グレーブス病、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変症、自己免疫性肝炎、多発性硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎、特発性肺胞線維症、過敏性肺炎、非特異的間質性肺炎または別の自己免疫疾患である、請求項 41 に記載の方法。

30

【請求項 43】

対象中での活性化 B 細胞の検出方法であって、前記対象中での前記 IL40 濃度を測定することを含み、IL40 濃度が対照よりも上昇する場合には、活性化 B 細胞が示唆される、前記方法。

40

【請求項 44】

請求項 43 に記載の方法であって、

- a) 前記 IL40 濃度は、免疫検出技術により測定される；
- b) 前記方法は更に、別のバイオマーカーを測定することを含む；
- c) 前記方法により、自己免疫疾患またはリンパ腫の診断を必要とする前記対象において、自己免疫疾患またはリンパ腫を診断し、前記濃度の上昇により、リンパ腫または自己免疫疾患が示唆される；
- d) 前記 IL40 濃度の上昇により、リンパ腫または自己免疫疾患の IL40 産生サブタイプを決定する；または
- e) a) ~ d) のいずれかを組み合わせたものである、前記方法。

50

【請求項 4 5】

前記免疫検出方法は E L I S A 法、組織学的方法、蛍光活性化細胞選別、ラジオイムノアッセイ (R I A)、免疫放射定量分析法、免疫組織化学的方法、蛍光免疫測定法、化学発光分析法、生物発光分析法、ウエスタンブロッティング法またはドットブロッティング法である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

リンパ腫または自己免疫疾患の治療を必要とする対象において、リンパ腫または自己免疫疾患の治療方法であって、前記対象、または前記対象の腫瘍、組織若しくは細胞に治療有効量の請求項 1 に記載の抗体、または請求項 2 6 若しくは請求項 2 7 に記載の核酸を投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 4 7】

前記抗体は中和抗体であり、また前記核酸はアンチセンス R N A である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記アンチセンス R N A は R N A i 分子である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

対象における I L 4 0 産生細胞の同定方法であって、請求項 1 に記載の抗体、または請求項 2 6 若しくは請求項 2 7 に記載の核酸をプローブとして使用し、前記細胞を同定することを含む、前記方法。

【請求項 5 0】

前記方法は、免疫組織化学的方法またはインサイチュハイブリダイゼーションを含む、請求項 4 9 に記載の方法。

20

【請求項 5 1】

I L 4 0 受容体の同定方法であって、

a) I L 4 0、標識 I L 4 0、H i s - タグ I L 4 0、またはこれらの組み合わせにより I L 4 0 応答細胞の標識を行うこと、及び前記標識細胞の単離、精製及び / または分離を行うこと；

b) I L 4 0、標識 I L 4 0、H i s - タグ I L 4 0、またはこれらの組み合わせにより I L 4 0 応答細胞の標識を行うこと、及び前記標識細胞の単離、精製及び / または分離を行うことを含む、前記細胞は前記 I L 4 0 受容体を発現する真核またはバクテリア細胞である；

30

c) 酵母 2 ハイブリッド系において I L 4 0 に結合するタンパク質を同定すること；または

d) 前記 I L 4 0 受容体発現細胞由来のメンブレン調製からの I L 4 0 結合タンパク質を免疫沈降させること、を含む前記方法。

【請求項 5 2】

a) インビトロまたはインビボにおいて B 細胞の成長及び分化を促進する；

b) ハイブリドーマ培養物の成長を増大させる；

c) ハイブリドーマ培養物による抗体生成物を増加させる；または

d) 異なる哺乳類種由来の I L 4 0 を使用することにより、組織または細胞の種発生源を決定する；

40

ように免疫細胞を I L 4 0 またはその機能的変異型に曝露することを含む I L 4 0 の使用方法。

【請求項 5 3】

前記哺乳類種は、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギまたはヒツジである請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

自己免疫、自己免疫疾患またはリンパ腫に関する請求項 1 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の主題であって、

前記自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎、乾癬、グレーブス

50

病、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、またはシェーグレン症候群であり、

前記リンパ腫は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ性白血病、MALTリンパ腫、パーキットリンパ腫、菌状息肉腫、または多発性骨髄腫である、主題。

【請求項55】

前記抗体、ペプチド、タンパク質または核酸を局所的または全身に送達する、治療することまたは治療を含む請求項1～53のいずれか一項に記載の主題。

【請求項56】

診断法、診断、診断するまたは診断法/セラノスティクス法を含み、
前記方法をサンプル上で実施する、
請求項1～53のいずれか一項に記載の主題。

10

【請求項57】

前記サンプルは血清、血液、体液、腫瘍、組織、または細胞である請求項56に記載の主題。

【請求項58】

抗体、ペプチド、タンパク質または核酸分子を含み、前記分子は、

- a) 薬学的に許容可能な担体、賦形剤またはそれらを組み合わせたものを含む；
- b) 滅菌配合物として使用される；
- c) 自己免疫疾患またはリンパ腫を治療するための別の治療薬を含む；
- d) 緩効性または徐放性製剤である；
- e) 標的投与形態である；
- f) a)～e)のいずれかの組み合わせである、

20

製剤処方である請求項1～53のいずれか一項に記載の主題。

【請求項59】

前記緩効性製剤または徐放製剤は、エマルションまたはミセルを含み、前記標的投与形態は、リポソーム、包接錯体または担体である、請求項58に記載の主題。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

連邦政府資金による研究開発に関する記載事項

本発明は、米国国立保健研究所の認可番号第A I 0 9 6 2 7 8号において、政府支援の下でなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0002】

関連出願の相互参照

本願は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、2013年11月20日出願された、米国特許仮出願第61/906,855号の優先権を主張する。

【0003】

技術分野

本発明は、IL40と称される新規サイトカインが関与する組成物及び方法に関する。

40

【背景技術】

【0004】

関連技術

サイトカインは、免疫系を調節する低分子分泌タンパク質である。これらのタンパク質は、分類及び応答の大きさなど、免疫応答を調節する非常に重要な媒介物質である。例えば、インターロイキン、ケモカイン、腫瘍壊死因子スーパーファミリー及びインターフェロンが挙げられる。これらの多くは、現在、免疫療法として調査されている。これらは、自己免疫疾患、癌及び他の疾患に関与している。

【発明の概要】

【0005】

50

本発明の実施形態は、本明細書において、インターロイキン40 (IL40またはIL-40)と称される新規サイトカインの同定に關与する。この分子は、活性化B細胞により作製された低分子分泌タンパク質である。このため、この分子は活性化B細胞のバイオマーカーである。また、全身性エリテマトーデスなどの特定の疾患では上方制御されている。B細胞はリンパ腫及び自己免疫疾患に結合することから、IL40がこれらの疾患の病理学における役割を果たし、診断または予後のバイオマーカーとなることが期待される。また、この細胞は、これらの癌の発現に影響を及ぼすか、またはアポトーシスに対する耐性、これらの成長の促進若しくはこれらの分化の支持を付与することにより、リンパ腫の発現に影響を及ぼす。自己免疫では、病原体B細胞により作製されたIL40は、他の細胞に影響を及ぼすものとし、これらの状態と關連する炎症反応を支持している。その受容体を同定するために、IL40の使用方法が意図される。その特定の受容体の同定は、リガンド及びその受容体の利用率を用いて上述の適応症において使用され得るこの相互作用のアゴニスト及びアンタゴニストを同定することができるため、重要である。

10

20

30

40

50

【0006】

一態様では、C17orf99ポリペプチド遺伝子産物 (IL40) に対する抗体が提供される。抗-IL40抗体は、以下であってもよい

;

- a) IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE;
- b) モノクローナル抗体;
- c) Fab'、Fab、F(ab')₂、シングルドメイン抗体 (sdAb)、FvまたはscFv (単鎖Fv);
- d) 標識抗体;
- e) 中和抗体; または
- f) a) ~ e) の任意の組み合わせ。

【0007】

別の態様では、抗-IL40抗体の使用方法が提供される。本方法では、例えば次の方法において抗-IL40抗体を使用することができる。

a) サンプル中でのIL40の検出方法。本方法としては、免疫検出方法において、IL40を検出するための検出剤として抗体を使用してIL40を免疫検出することが挙げられる。いくつかの実施形態では、免疫検出法は酵素結合免疫吸着法 (ELISA)、組織学的方法、蛍光活性化細胞選別、ラジオイムノアッセイ (RIA)、免疫放射定量分析法、免疫組織化学的方法、蛍光免疫測定法、化学発光分析法、生物発光分析法、ウエスタンブロッティング法またはドットブロッティング法である。ELISA法では、所定のタンパク質の2つの異なるエピトープを認識する2つの異なる抗体を使用して、比色分析法において抗体の1つに結合される基質の検出を介してタンパク質を検出することができる。組織学的方法では、標識抗体を使用して、新鮮凍結組織、またはホルマリン固定パラフィン包埋サンプルのいずれかにおいて、組織サンプル中でタンパク質を検出することができる。蛍光活性化細胞選別では、蛍光色素標識抗体を使用して、特定のタンパク質を発現させる細胞を検出することができる。分泌タンパク質の場合、当業者に既知の手技により、該タンパク質の細胞内染色が可能である利用可能な技術が存在する。ラジオイムノアッセイでは、放射性標識タンパク質を使用して、競合法中に存在する放射活性量を測定することによって (例えば、特定の抗体を使用することにより)、所与のサンプル中に存在するタンパク質の量を測定することができる。これらの分析法の変異型としては、抗体/標識化合物を使用して、特定の抗体の親和性/結合活性に依存する競合法を介して所定のサンプル中における特定のタンパク質の量を測定することを伴う。ウエスタンブロッティング法では、ゲルの移動後に特定の抗体を使用することにより所与のタンパク質を検出ことができ、この方法では、技術者は検出されるタンパク質の分子量を知ることでもある。

b) IL40が關与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40が關与する疾患の治療方法。この方法は、治療有効量の抗-IL40抗体を対象へ投与し、IL40を

中和することを含む。いくつかの実施形態では、本疾患は、自己免疫疾患またはリンパ腫である。

c) サンプル中でのIL40の検出方法。本方法としては、IL40が関与する疾患のための診断法またはセラノスティクス法(theranostic)において検出剤として抗-IL40抗体を使用してIL40を免疫検出することが挙げられる。抗体の使用をベースにして、生理液中での可溶性タンパク質の存在を検出するために利用可能な多くの方法がある。最も一般的なものとしては、IL40の異なるエピトープを認識する2つの異なる抗体を使用する酵素関連イムノアッセイである。そのうちの1つを生理液を配置するプレート中での捕捉抗体として使用する。この抗体をプレートに固着させて、液体内に存在するIL40を「捕捉」する。二次抗体は酵素に結合する。最終的に、基質を使用して、酵素により処理し、典型的には、ELISAリーダーで検出され得る所与の色を発現させる。他の方法としては、酵素基質の代わりに放射能を使用して、所与の液体中に存在するIL40の量を測定するラジオイムノアッセイが挙げられる。本液体は、異なる疾患を有する患者から得ることができる。典型的には、活性化B細胞は、さまざまな癌(リンパ腫、白血病)または炎症若しくは自己免疫疾患(リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、強直性脊椎炎、乾癬、その他のもの)の病原体において任意の役割を担っていることが判明した。いくつかの実施形態では、本疾患は、リンパ腫、白血病、免疫不全または自己免疫疾患である。特定の実施形態では、自己免疫疾患は全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎または乾癬であり、免疫不全はIgA欠損症候群である。

10

20

d) IL40が発現する細胞のサブセットの精製方法または単離方法。本方法には、細胞のサブセットを精製するまたは単離するために、精製剤/単離剤として抗-IL40抗体を使用することを含む。抗体は、ハイブリドーマ培養から精製することができる。典型的には、最初に0.45mmフィルターを介して上清を濾過し、細胞片を除去する。好ましい方法としては、タンパク質A/Gクロマトグラフィーを含む。濾過したハイブリドーマ培養をA/Gタンパク質カラムに入れ、pHが変化することによって破断され、カラムから精製抗体が溶出する可能性がある結合基において、抗体分子がA/Gタンパク質に結合することになる。次に精製抗体をさまざまな蛍光色素により標識し、その後、蛍光活性化セルソーターにおいて分析することができる細胞懸濁液の染色に使用することができる。この手技により、抗体によって認識される抗原を発現する細胞サブセットを同定することとなり得る。いくつかの実施形態では、サブセットは蛍光活性化細胞選別(FACS)により精製または単離され、細胞サブセットを選択する。

30

【0008】

更なる態様では、抗-IL40抗体を産生する細胞が提供され、本細胞は、ハイブリドーマ、組換え型細菌細胞、組換え型酵母菌細胞または組換え型哺乳類細胞である。本細胞は、本明細書に記載のいずれかの抗-IL40抗体を産生し得る。また、細胞を含む臓器、組織、または動物が提供される。

【0009】

別の態様では、IL40のアミノ酸配列の一部またはすべてを含むペプチドまたは単離タンパク質、若しくはIL40の成熟形態を含むペプチドまたは単離タンパク質が提供される。IL40ペプチドまたはタンパク質は、以下であり得る。

40

- a) IL40の配列変異型、多形体または種対応物；
- b) IL40の置換変異型、挿入変異型または欠失変異型；
- c) グリコシル化修飾IL40、化学修飾IL40及びIL40抱合体からなる群から選択されるIL40の非配列誘導体；
- d) IL40の機能的変異体；
- e) IL40の機能的活性セグメント、IL40の保存領域、またはIL40の非保存領域；
- f) IL40の融合タンパク質；または
- g) a) ~ f)の任意の組み合わせ。

50

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、機能的変異型は I L 4 0 のアゴニスト若しくはアンタゴニストであり、融合タンパク質は、共有結合生成物若しくは非共有結合構造体または標識構造体である。

【 0 0 1 1 】

I L 4 0 は、一般に、リンパ球及び白血球の特定の集団中に存在し得る特定の受容体に結合されるものとする。受容体を同定するために、本明細書に記載のとおり I L 4 0 が標識 (F L A G 若しくは H I S - タグ) または放射能のいずれかで標識される方法を使用することができる。アミノ酸基を用いた標識 (F L A G または H I S - タグ) で標識した場合、第 2 の抗 F L A G または蛍光色素で標識した抗 - H I S 抗体を用いることによって、 I L 4 0 がその受容体と上手く結合しているところを検出することができ、また、蛍光活性化セルソーター (F A C S) で検出することができる。放射能で標識した場合、結合は、受容体を発現させる細胞に結合させている放射活性計数を測定することによって監視することができる。 I L 4 0 の生物活性は、さまざまな白血球集団中において (例えば、表 5 に列挙した集団を参照のこと) 発現が I L 4 0 によって調節される遺伝子の発現を測定することによって監視し得る。白血球 (例えば脾細胞) は、 m R N A を細胞から調製する前にインビトロにおいて I L 4 0 の存在下で 6 時間培養することができ、かつ、リアルタイム P C R でこれらの遺伝子の発現を測定するために使用することができる。インビボでは、 I g A の最適な生成に I L 4 0 が必須である。このため、インビボでは、 I L 4 0 アンタゴニストをマウスに投与し、さまざまな時間間隔でその後の血清または血漿中の I g A 濃度を測定することによって、 I L 4 0 アンタゴニストの活性を監視することができる。逆に、インビボでは、 I L 4 0 - / - マウスに投与し、さまざまな時間間隔で血清または血漿中の I g A 濃度を測定することによって、 I L 4 0 アンタゴニストの活性を測定することができる。奏功する I L 4 0 アゴニストにより、 I L 4 0 - / - の突然変異によって誘発された I g A の欠損を補正することができるものとし、このため、 I g A 濃度は、正常なマウスの I g A 濃度まで上昇するものとする。

10

20

【 0 0 1 2 】

また、 I L 4 0 融合タンパク質を使用して、インビボまたはインビトロでの I L 4 0 活性を監視するか、またはインビボでの未変性 I L 4 0 の薬物速度を変動させることができる。融合タンパク質の例としては、これらに限定されないが、融合により I L 4 0 - F c 融合タンパク質となるような免疫グロブリン重鎖に結合するものが挙げられる。この融合タンパク質は、多くの白血球集団中に存在する F c 受容体に結合することができることによって、インビボにおいて更に安定し得るか、または所望の結合特性を示し得る。このため、リンパ系組織に対して融合タンパク質の選択的局在がもたらされ得る。別の方法としては、 I L 4 0 を使用して、 B 細胞に優先的に結合する他のサイトカインまたはケモカインとの融合タンパク質を産生し得る。例えば、 I L 4 0 は、 B 細胞及び T 細胞の双方のサブセット中に存在する I L 4 受容体と結合する I L 4 サイトカインのこれらの一部をコードするインターロイキン 4 (I L 4) 遺伝子の一部に融合し得る。別の方法としては、 I L 4 0 は、 C X C R 5 に結合するケモカインである C X C L 1 3 に融合させることができ、受容体も B 細胞中に優先的に発現する。これらの融合タンパク質が、 B リンパ球の生物学的応答またはヒトの体内でのそれらのホーミングパターンを向上させるか、または変化させ得る所望の生物学的性質を示す場合もある。

30

40

【 0 0 1 3 】

I L 4 0 は、放射能 (アミノ酸または原子) により、または少量のアミノ酸をその配列に添加することによって標識させ得る。これまでに使用された二つ共通の標識としては、 H I S - タグ及び F L A G が挙げられる。後者は、速やかに利用可能であり、それらのエピトープを認識し、このため、標識を付着させたときに標識 I L 4 0 の検出に使用することができる商業用モノクローナル抗体であるという利点を有する。

【 0 0 1 4 】

更なる態様では、 I L 4 0 ペプチドまたはタンパク質の使用方法が提供される。本方法

50

では、ペプチドまたはタンパク質を使用することができる。例えば：

a) 免疫細胞の誘導方法。本方法は、免疫細胞を誘導して、synaptogyrin 2 及び/若しくはB細胞によって産生される他のIL40誘導タンパク質を産生するため、または免疫細胞の分化または成熟を誘発するために活性剤としてペプチドまたはタンパク質を使用することを含む。細胞は、24時間インビトロで、組織培養培地、典型的には、RPMI 1640若しくはDMEM若しくはウシ胎児血清、グルタミン及びメルカプトエタノールを補足した類似の培地を用いて、IL40と共にインキュベートすることができる(さまざまな濃度にて)。

b) IL40が関与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40が関与する疾患の治療方法。本方法は、治療有効量のペプチドまたはタンパク質を対象へ投与することを含む、このペプチドまたはタンパク質はIL40アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、本疾患は、自己免疫疾患またはリンパ腫である。

c) IL40が関与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40が関与する疾患の治療方法。本方法は、治療有効量のIL40またはペプチド若しくはタンパク質を対象へ投与することを含む、このペプチドまたはタンパク質はIL40アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、疾患はIgA欠損症候群、ホジキンリンパ腫若しくは非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、菌状息肉腫、マントル細胞リンパ腫、多発性骨髄腫または別のリンパ腫若しくは白血病；リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、強皮症、グレーブス病、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変症、自己免疫性肝炎、多発性硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎、特発性肺胞線維症、過敏性肺炎、非特異的間質性肺炎または別の自己免疫疾患である。

d) IL40が関与する疾患の診断方法。本方法としては、診断法/セラノスティクス法において、標的またはサンプル対照としてペプチドまたはタンパク質を使用することを含む。抗体の使用をベースにして、唾液、血清、血漿精液、気管支肺胞洗浄液体、尿、涙、リンパ液、汗、胆汁、脳脊髄液などの生理液中での可溶性タンパク質の存在を検出するために利用可能な多くの方法がある。最も一般的な方法としては、IL40の異なるエピトープを認識する2つの異なる抗体を使用する酵素結合(ELISA)免疫吸着法である。そのうちの1つを生理液を配置するプレート中での捕捉抗体として使用する。この抗体をプレートに固着させて、液体内に存在するIL40を「捕捉」する。二次抗体は酵素に結合する。最終的に、基質を使用して、酵素により処理し、典型的には、専用ELISAリーダーで検出され得る所与の色を発現させる。他の方法としては、酵素基質の代わりに放射能を使用して、所与の液体中に存在するIL40の量を測定するラジオイムノアッセイが挙げられる。本液体は、異なる疾患を有する患者から得ることができる。典型的には、活性化B細胞は、さまざまな癌または炎症若しくは自己免疫疾患の病原体において任意の役割を担っていることが判明した。いくつかの実施形態では、本疾患は、リンパ腫、自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎または乾癬である。

e) IL40の受容体の同定方法。本方法は、IL40受容体に結合するためのリガンドとしてペプチドまたはタンパク質を使用することを含む。IL40受容体は、その受容体に結合するために使用することができる標識IL40を用いて同定され得る。次に、抗-IL40または抗-標識抗体を使用してリガンド/受容体複合体を免疫沈降させることができる。こうした標識の例としては、His-タグ、フラグ-タグなどが挙げられる。また、受容体を発現するラジオイムノアッセイ細胞を介して最初に検出されるように、IL40を放射線標識することもできる。異なる細胞を放射線標識と共にインキュベートし、インキュベート後、細胞を洗浄するか、または粘度及び遊離対結合放射線標識IL40の遠心分離によって分離される勾配を介して通過させる。放射能を保持する細胞は、特定のIL40受容体を発現するものとする。

【0015】

更なる態様では、IL40ペプチドまたはタンパク質を産生する細胞が提供され、本細胞は、組換え型細菌細胞、組換え型酵母菌細胞または組換え型哺乳類細胞である。本細胞は、本明細書に記載のいずれかのIL40ペプチドまたはタンパク質を産生し得る。また

10

20

30

40

50

、細胞を含む臓器、組織、または動物が提供される。

【0016】

別の態様では、未変性遺伝子において発見される1つ以上のイントロンを欠失している配列か、または非天然ヌクレオチドが導入されている配列など、IL40遺伝子またはIL40 cDNAのヌクレオチド配列の一部または全体を含む核酸が提供される。核酸は、以下のものであり得る。

a) IL40遺伝子またはIL40 cDNAのヌクレオチド配列の一部または全体を含み、この核酸が本明細書に記載のIL40ペプチドまたはタンパク質をコードする；

b) 別のヌクレオチド配列、標識（例えば、HIS-タグ若しくはFLAG）、またはビニルスルホン誘導体染料、蛍光色素分子などの化学誘導体、またはプロテオミクスなど他の技術で一般的に使用される他のタグ（例えばビオチン）に共役結合されている。

c) プライマー、プローブ、アンチセンス分子、またはIL40遺伝子またはIL40 cDNA配列をベースとしたオリゴヌクレオチド、

d) 異種核酸配列に付着した組換え型構造体、または

e) 混合a)～d)のいずれかを組み合わせたもの。

【0017】

いくつかの実施形態では、異種核酸配列は、プロモーター、エンハンサー、ベクターまたは発現ベクターであってもよい。

【0018】

更なる態様では、IL40配列含有核酸の使用方法が提供される。本方法では、核酸を使用することができる。例えば：

a) IL40が関与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40が関与する疾患の治療方法。この方法は、治療有効量の核酸を対象へ投与することを含み、本核酸により、IL40の発現が減少する。いくつかの実施形態では、本疾患は、自己免疫疾患またはリンパ腫である。

b) IL40が関与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40が関与する疾患の治療方法。この方法としては、治療有効量の核酸を対象へ投与することを含み、本核酸によりIL40の発現が減少する。いくつかの実施形態では、疾患はIgA欠損症候群、ホジキンリンパ腫若しくは非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、菌状息肉腫、マンツル細胞リンパ腫、または別のリンパ腫若しくは白血病；リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、強皮症、グレーブス病、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変症、自己免疫性肝炎、多発性硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎、特発性肺胞線維症、過敏性肺炎、非特異的間質性肺炎または別の自己免疫疾患である。また、いくつかの実施形態では、核酸はRNAi分子であってもよい。

c) IL40が関与する疾患の診断方法。本方法は、疾患の診断法/セラノスティクス法においてプローブとして核酸を使用することを含む。いくつかの実施形態では、本疾患は、リンパ腫、自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎または乾癬である。

【0019】

更なる態様では、IL40配列含有核酸の組換え型形態を含む細胞が提供され、本細胞は、組換え型細菌細胞、組換え型酵母菌細胞または組換え型哺乳類細胞である。本細胞は、本明細書に記載のいずれかのIL40配列含有核酸を含み得る。また、細胞を含む臓器、組織、または動物が提供される。

【0020】

別の態様では、IL40を発現する細胞のサブセットの選択方法が提供される。本方法は、IL40を発現する細胞を含む細胞集団にIL40結合分子を添加すること及び選択された細胞の集団を提供するためにIL40結合分子により標識された細胞を選択することを含む。IL40発現細胞としては、B細胞、場合により他の白血球及び骨髄細胞及び胎児肝細胞が挙げられる。IL40を発現し得る細胞型は、上皮細胞、内皮細胞、線維芽

10

20

30

40

50

細胞、他の間質細胞またはさまざまな細胞型または特定の系譜への関与レベルの造血前駆体を含み得るこれらの臓器である。いくつかの実施形態では、a) IL40 発現細胞は、マウス細胞、ラット細胞、ヒト細胞であってもよい；b) IL40 結合分子は、抗-IL40 抗体またはIL40 受容体であってもよい。c) 選択細胞は、血液、体液、細胞懸濁液または患者サンプルから選択することができる；d) 選択細胞は、IL40 発現細胞を調べるための調査ツールであり得る；e) また、選択細胞が血球である場合、選択細胞は、i) 選択細胞により作製された免疫グロブリンのmRNA 供給源；またはii) 完全ヒト化抗体の新規作製方法の供給源であり得る；またはf) a) ~ e) のいずれかの組み合わせである。

【0021】

本方法の更なる実施形態では、IL40 が関与する疾患の治療を必要とする対象における、IL40 が関与する疾患の治療方法が提供される。本方法は、治療有効量の選択細胞を対象へ投与することを含む。いくつかの実施形態では、疾患はIgA 欠損症候群、ホジキンリンパ腫若しくは非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、菌状息肉腫、マントル細胞リンパ腫、または別のリンパ腫若しくは白血病；リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、強皮症、グレーブス病、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変症、自己免疫性肝炎、多発性硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎、特発性肺胞線維症、過敏性肺炎、非特異的間質性肺炎または別の自己免疫疾患である。

【0022】

別の態様では、対象における活性化B細胞の検出方法が提供される。本方法は、対象中のIL40 濃度を測定することを含み、IL40 濃度が対照よりも上昇する場合には、活性化B細胞が示唆される。本方法では、例えば、

a) IL40 濃度は、免疫検出技術により測定することができる；

b) 本方法は、これらに限定されないが、例えばインターロイキン6、インターロイキン10 及び特定の免疫グロブリンなど別のバイオマーカーを測定すること更に含むことができる；

c) 本方法は、自己免疫疾患またはリンパ腫の診断を必要とする患者において、自己免疫疾患またはリンパ腫を診断することができ、濃度の上昇により、リンパ腫または自己免疫疾患が示唆される；

d) IL40 濃度の上昇により、リンパ腫または自己免疫疾患のIL40 産生サブタイプを決定することができる；または

e) 混合a) ~ d) のいずれかを組み合わせたものである。

【0023】

いくつかの実施形態では、免疫検出方法はELISA 法、組織学的方法、蛍光活性化細胞選別、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫放射定量分析法、免疫組織化学的方法、蛍光免疫測定法、化学発光分析法、生物発光分析法、ウエスタンブロッティング法またはドットブロッティング法である。

【0024】

別の態様では、リンパ腫または自己免疫疾患の治療を必要とする対象におけるリンパ腫または自己免疫疾患の治療方法が提供される。この方法は、治療有効量の抗-IL40 抗体またはIL40 配列含有核酸を対象または対象の腫瘍、組織または細胞へ投与することを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、中和抗-IL40 抗体であってもよく、また、核酸はアンチセンスRNA であってもよい。いくつかの実施形態では、アンチセンスRNA はRNA i 分子である。

【0025】

別の態様では、対象におけるIL40 産生細胞の同定方法が提供される。本方法は、例えば、免疫組織化学的方法またはインサイチュハイブリダイゼーションにおいてIL40 産生細胞を同定するために、プローブとして抗-IL40 抗体またはIL40 配列含有核酸を使用することを含む。IL-40 抗体を使用して、フローサイトメトリーによりIL

10

20

30

40

50

40 産生細胞を検出することができるか、または免疫組織化学的方法を実施することができる、IL40 配列含有核酸プローブを使用して、IL-40 を産生する細胞から得られた mRNA のノーザンブロット法を行うことができる。この IL40 配列を使用して、IL40 産生細胞から得た mRNA でリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を実施するためにプライマーをデザインすることができる。この IL40 配列プローブを使用して、インサイチュハイブリダイゼーションにより IL40 産生細胞を同定することができる。

【0026】

更なる態様では、IL40 受容体の同定方法が提供される。いくつかの実施形態では、本方法には、

a) IL40、標識 IL40、His-タグ IL40、ビオチン標識 IL40、またはこれらの組み合わせにより IL40 応答細胞の標識を行うことと、標識細胞を単離、精製及び/または分離することを含む。これらのラベルにより標識された細胞は、例えば、HIS-タグに対する蛍光色素標識特異的抗体を用いることにより、また、蛍光活性化セルソーターを介してサンプルを実行することにより、または、ビオチン標識 IL40 の場合、類似した方法において蛍光色素標識ストレプトアビジンを使用することによって分離することができる。または、

b) IL40、標識 IL40、His-タグ IL40、ビオチン標識 IL40、またはこれらの組み合わせにより IL40 応答細胞の標識を行うことと、標識細胞を単離、精製及び/または分離することを含み、本細胞は、IL40 受容体が発現する真核細胞または細菌細胞である；

c) 酵母 2 ハイブリッド系において IL40 に結合するタンパク質を同定する；または

d) IL40 受容体発現細胞由来のメンブレン調製からの IL40 結合タンパク質を免疫沈降させる。例えば、水性培地中において少量のガラスビーズ、セラミックビーズまたは鋼鉄ビーズを細胞サンプルと混合したものをを用いて、IL40 受容体を発現する細胞を破壊することができる。この混合物に対して、攪拌及び振盪により高水準攪拌を行う。ビーズは細胞と衝突し、細胞を破壊して、細胞間成分を放出させる。均質化中、機械的剪断 (ボルテックス) を適度に行い、遠心分離によって分離できる最良のメンブレンまたは細胞内調製物となる。標識 (HIS-タグであってもよい) に対して抗体を使用することにより、タンパク質複合体 (その受容体に結合された標識 IL40 など) の免疫沈降を達成することができる。免疫沈降の分析及び配列決定により、この複合体中に存在するタンパク質が同定されるものとする。

【0027】

別の態様では、IL40 またはその機能的変異体の使用方法が提供される。本方法は、以下となるように免疫細胞を IL40 または機能的変異体に曝露することを含む；

a) インビトロまたはインビボにおいて B 細胞の成長及び分化を促進する；

b) ハイブリドーマ培養物の成長を増大させる；

c) ハイブリドーマ培養物により抗体生成物が増加する；または

d) 例えば、ヒト、イヌ、マウス、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、またはヒツジなど異なる哺乳類種由来の IL40 を使用することにより、組織または細胞の種発生源を決定する。

【0028】

例えば、B リンパ球は、さまざまなサイトカイン (IL4、IL6) 及び B 細胞受容体 (抗-免疫グロブリン) を刺激する抗体、または CD40 受容体 (CD40 リガンドまたは CD40 受容体に対する抗体) に結合する分子を補充した標準的組織培養培地において培養によってインビトロで成長し、分化し得る。これらの条件により、B リンパ球の成長及び/または分化を招く。B 細胞の分化を支持することで既知の他のサイトカインとしては、IFN、TGF、IL5、IL13 及び CXCL13 が挙げられる。正常 B 細胞の B 細胞骨髄腫または他の腫瘍細胞との融合から得られる B 細胞ハイブリドーマは、ハイブリドーマ (IL6) の成長を支持するサイトカインを補充した選択的培地 (ハイブリド

10

20

30

40

50

ーマの成長を支持するため)においてインビトロで培養され得る。

【0029】

自己免疫、自己免疫疾患またはリンパ腫に關与する前述の組成物または方法のいずれかにおいて、

自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎、乾癬、グレーブス病、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、またはシェーグレン症候群であってもよく、

リンパ腫は、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、MALTリンパ腫、パーキットリンパ腫、菌状息肉腫、または多発性骨髄腫であってもよい。

10

【0030】

治療するまたは治療を含む前述の組成物または方法のいずれかにおいて、抗体、ペプチド、タンパク質または核酸を局所的または全身に送達することができる。

【0031】

診断の、診断、診断するまたは診断法/セラノスティクス法を含む前述の組成物または方法のいずれかにおいて、本方法は、生検または組織学的サンプルなど、例えば、血清、血液、体液、腫瘍、組織、または細胞などのサンプルにて実施することができる。

【0032】

抗体、ペプチド、タンパク質または核酸分子を含む前述の組成物または方法のいずれかにおいて、以下の製剤処方において本分子であり得る。

20

a) 薬学的に許容可能な担体、賦形剤またはそれらを組み合わせたものを含む；

b) 滅菌製剤として使用される；

c) これらに限定されないが、抗-TNF α 抗体 (Remicade, Humira)；抗-BAFF (Benlysta)；抗-CD20 (Rituximab)；及び抗-CD30 (Adcetris) など、自己免疫疾患またはリンパ腫を治療するための別の治療薬を含む；

d) 例えば、エマルション、ミセルなどの緩効性または徐放性製剤である；

e) 例えば、リポソーム、包接錯体、担体などの標的投与形態である；または

f) a) ~ e) のいずれかの組み合わせである。

30

【図面の簡単な説明】

【0033】

本発明を更に完全に理解するためには、添付図面と共に考慮される以下の発明を実施するための形態を参照する。

【図1A】C17orf99は、胎児肝臓、骨髄、及び活性化B細胞内に発現する新規サイトカインであることを示すパネルである。図1A) 正常ヒト組織及び免疫細胞内でのC17orf99の発現。C17orf99 mRNAの発現プロファイルを示すBIGE (Body Index of Gene Expression) データベースのデータ (Affymetrix gene array (U1332.0) を用いるヒトマイクロアレイデータ)。X軸は器官系別で示す。CNS (中枢神経系)、Gut (胃腸)、Struct (構造)、Vasc (血管系)、Resp (呼吸器)、Endo (内分泌腺)、Ur (泌尿器)、Rep (生殖器)、Imm__T (免疫組織)、Imm__C (免疫細胞)、Dev (発生)。Y軸は、C17orf99 (236981__at) に対応して設定されたプローブのハイブリダイゼーション強度を示す。

40

【図1B】C17orf99は、胎児肝臓、骨髄、及び活性化B細胞内に発現する新規サイトカインであることを示すパネルである。図1B) シグナルペプチドを示すC17orf99ヒトアミノ酸配列 (配列番号1)。

【図1C】C17orf99は、胎児肝臓、骨髄、及び活性化B細胞内に発現する新規サイトカインであることを示すパネルである。図1C) 293HEK細胞に形質移入されたpTT5V5H8-C17orf99の上清のウェスタンブロット。293HEK細胞は

50

、pTT5V5H8 - C17orf99または空ベクターのいずれかで形質移入した。上清を収集し、GE HiSTrap精製カラムを用いて精製し、抗-His mAb、その後、抗-ウサギHRP二次抗体を用いて、ウェスタンブロットを行った。

【図1D】C17orf99は、胎児肝臓、骨髄、及び活性化B細胞内に発現する新規サイトカインであることを示すパネルである。図1D) ヒト胎児肝臓及び骨髄におけるRT-PCRによるC17orf99の発現の確認。

【図1E】C17orf99は、胎児肝臓、骨髄、及び活性化B細胞内に発現する新規サイトカインであることを示すパネルである。図1E) 10の哺乳類種におけるC17orf99のアミノ酸配列のClustal Omega解析。C17orf99相同体は、有胎盤哺乳類(真獣類)、有袋類、及び単孔類に限定した。

【図2】IL40の発現がマウス及びヒトにおいて類似していることを示すグラフのパネルである。図2A) 市販のRNA由来のヒトサンプルのqRT-PCR解析。図2B) 市販のRNA由来のマウス組織のqRT-PCR解析。

【図3】ヒトIL40タンパク質(配列番号2)とマウスIL40タンパク質(配列番号3)とのアミノ酸配列の比較。BLASTプログラムを用いて、解析を実施した。コンセンサス配列(配列番号: 4)も示す。

【図4A】ヒト活性化B細胞及びマウス活性化B細胞においてIL40が発現することを示すグラフのパネルである。図4A) 抗-CD40 mAb + IL4を用いたヒト休止B細胞及びヒト活性化B細胞のIL40及びTSPAN33の24時間qRT-PCR解析。

【図4B】ヒト活性化B細胞及びマウス活性化B細胞においてIL40が発現することを示すグラフのパネルである。図4B) 1 µg/mL LPS + IL-4を用いた休止または刺激条件下のマウス脾細胞のIL40及びTSPAN33の24時間qRT-PCR解析。

【図4C】ヒト活性化B細胞及びマウス活性化B細胞においてIL40が発現することを示すグラフのパネルである。図4C) CD40L + IL-4により刺激されたIL40及びTspan33に対して、C57BL/6マウス脾臓由来のFACS精製CD19+B細胞の8時間、24時間、72時間、及び96時間qRT-PCR解析。

【図4D】ヒト活性化B細胞及びマウス活性化B細胞においてIL40が発現することを示すグラフのパネルである。図4D) 2 ng/mLのIL-4、IL-13、IFN またはTGF により3日間刺激した脾細胞のqRT-PCR解析。

【図4E】ヒト活性化B細胞及びマウス活性化B細胞においてIL40が発現することを示すグラフのパネルである。図4E) 抗-CD40及びサイトカインの組み合わせにより刺激されたIL40及びTspan33の発現のqRT-PCR解析。

【図5A】ヒト細胞株及びB細胞株においてIL40のqRT-PCR解析のグラフのパネルである。図5A) 休止及び刺激条件下において、IL40の発現に関して、ヒト2E2B細胞及びヒトジャーカット細胞を測定した。

【図5B】ヒト細胞株及びB細胞株においてIL40のqRT-PCR解析のグラフのパネルである。図5B) 休止及び刺激条件下において、IL40の発現に関して、マウスA20-2Jマウス細胞を測定した。

【図6A】マウス脾細胞由来のCD19+B細胞のFACS精製結果を示すパネルである。図6A) 選別前のマウス脾細胞におけるCD19+細胞。

【図6B】マウス脾細胞由来のCD19+B細胞のFACS精製結果を示すパネルである。図6B) 選別後のマウス脾細胞におけるCD19+細胞。

【図7】IL40転写がLPS + TGF によって誘発されることを示すグラフである。IL-4、LPSまたはLPS及びIL-4、IL-13、IFN、TGF の組み合わせにより刺激されたマウス脾細胞のqRT-PCR解析。

【図8A】IL40欠損マウスは、変形B細胞表現型を有することを示すパネルである。図8A) IL40-/-マウスの発生に使用される標的構造体。

【図8B】IL40欠損マウスは、変形B細胞表現型を有することを示すパネルである。

10

20

30

40

50

図 8 B) W T (左) 及び I L 4 0 - / - (右) マウスの脾臓の写真である。

【図 8 C】I L 4 0 欠損マウスは、変形 B 細胞表現型を有することを示すパネルである。

図 8 C) W T 及び I L 4 0 - / - マウスの脾臓における C D 1 9 + (B 細胞) 対 C D 3 e + (T 細胞) の比率。フローサイトメトリーにより測定。この数値は、少なくとも 3 つの独立した実験の代表値を示す。

【図 8 D】I L 4 0 欠損マウスは、変形 B 細胞表現型を有することを示すパネルである。

図 8 D) W T 及び I L 4 0 欠損マウス (n = 5 匹 / 群) における脾臓サイズ (左) 、重量 (中間) 及び全リンパ球数 (右) の測定。この数値は、少なくとも 3 つの独立した実験の代表値を示す。

【図 8 E】I L 4 0 欠損マウスは、変形 B 細胞表現型を有することを示すパネルである。

図 8 E) W T 及び I L 4 0 欠損マウス (n = 5) における C (左) と T 細胞及び B 細胞の全数から得られる比率のグラフである。この数値は、少なくとも 3 つの独立した実験の代表値を示す。

【図 8 F】I L 4 0 欠損マウスは、変形 B 細胞表現型を有することを示すパネルである。

図 8 F) サンドイッチ E L I S A によって測定された野生型及び I L 4 0 - / - マウスにおける I g G (左) 及び I g A (右) の血清値 (n = 5) 。この数値は、少なくとも 3 つの独立した実験の代表値を示す。

【図 9】W T 及び I L 4 0 - / - コロニーからの遺伝子型決定の P C R 確認結果を示す写真である。2 5 0 b p (I L 4 0 ゲノム D N A) 及び 2 0 0 b p (ネオマイシン構造体) にて明らかなバンドが確認される。W T マウス由来の D N A は、I L 4 0 ゲノム D N A のみを含有し、欠失を有するマウスは、ネオマイシン構造体のみを保持する。ヘテロ接合体は、I L 4 0 ゲノム D N A 及びネオマイシン構造体をいずれも含有する。

【図 1 0】I L 4 0 - / - マウスは、体重増加において異常を有さないことを示すグラフである。3 ~ 6 週の W T 由来マウス及び I L 4 0 - / - マウスの体重 (g) を測定した。n = 5 。

【図 1 1 A】I L 4 0 - / - マウスは、胸腺における T 細胞の発現において異常を有さないことを示すパネルである。図 1 1 A) リンパ球を測定した。C D 3 e の発現にゲート設定し、その後、フローサイトメトリーを使用して C D 4 対 C D 8 の発現を測定した。

【図 1 1 B】I L 4 0 - / - マウスは、胸腺における T 細胞の発現において異常を有さないことを示すパネルである。図 1 1 B) 陽性細胞の割合。図は、2 つの独立した実験から得た実験結果を示す。n = 3 。

【図 1 2 A】I L 4 0 - / - マウスは、休止脾臓からの B 2 細胞の腹腔由来の B 1 細胞において I g A の産生に異常を有さないことを示すパネルである。脾臓細胞または腹腔細胞のゲート設定は、B 1 a、B 1 b、または B 2 細胞の集団を認識する / ゲート設定するために、C D 5 または B 2 2 0 + 細胞の亜集団で行い、その後、フローサイトメトリーによって I g A の発現を測定した (n = 3) 。

【図 1 2 B】I L 4 0 - / - マウスは、休止脾臓からの B 2 細胞の腹腔由来の B 1 細胞において I g A の産生に異常を有さないことを示すパネルである。脾臓細胞または腹腔細胞のゲート設定は、B 1 a、B 1 b、または B 2 細胞の集団を認識する / ゲート設定するために、C D 5 または B 2 2 0 + 細胞の亜集団で行い、その後、フローサイトメトリーによって I g A の発現を測定した (n = 3) 。

【図 1 2 C】I L 4 0 - / - マウスは、休止脾臓からの B 2 細胞の腹腔由来の B 1 細胞において I g A の産生に異常を有さないことを示すパネルである。脾臓細胞または腹腔細胞のゲート設定は、B 1 a、B 1 b、または B 2 細胞の集団を認識する / ゲート設定するために、C D 5 または B 2 2 0 + 細胞の亜集団で行い、その後、フローサイトメトリーによって I g A の発現を測定した (n = 3) 。

【図 1 2 D】I L 4 0 - / - マウスは、休止脾臓からの B 2 細胞の腹腔由来の B 1 細胞において I g A の産生に異常を有さないことを示すパネルである。脾臓細胞または腹腔細胞のゲート設定は、B 1 a、B 1 b、または B 2 細胞の集団を認識する / ゲート設定するために、C D 5 または B 2 2 0 + 細胞の亜集団で行い、その後、フローサイトメトリーによ

10

20

30

40

50

って I g A の発現を測定した (n = 3) 。

【図 1 2 E】 I L 4 0 - / - マウスは、休止脾臓からの B 2 細胞の腹腔由来の B 1 細胞において I g A の産生に異常を有さないことを示すパネルである。脾臓細胞または腹腔細胞のゲート設定は、 B 1 a、 B 1 b、または B 2 細胞の集団を認識する / ゲート設定するために、 C D 5 または B 2 2 0 + 細胞の亜集団で行い、その後、フローサイトメトリーによって I g A の発現を測定した (n = 3) 。

【図 1 3 A】 I L 4 0 欠損マウスは、 P r o、 P r e または未成熟 B 細胞集団において異常を有さないことを示すパネルである。図 1 3 A) B 2 2 0 + C D 1 9 + 細胞で骨髄滲出液細胞のゲート設定を行い、 I g M 対 C D 4 3 の発現に関して測定した。代表的実験結果は、 2 つの独立した実験から得た。

【図 1 3 B】 I L 4 0 欠損マウスは、 P r o、 P r e または未成熟 B 細胞集団において異常を有さないことを示すパネルである。図 1 3 B) 3 匹の別のマウスに関して測定された細胞の割合。代表的実験結果は、 2 つの独立した実験から得た。

【図 1 3 C】 I L 4 0 欠損マウスは、 P r o、 P r e または未成熟 B 細胞集団において異常を有さないことを示すパネルである。図 1 3 C) 3 匹の別のマウスに関して測定された細胞総数。代表的実験結果は、 2 つの独立した実験から得た。

【図 1 4 A】 B 細胞の脾細胞集団は、結果得られた I L 4 0 欠損マウスにおいて正常であることを示すパネルである。図 1 4 A) マウスは、 B 2 2 0 + 細胞でゲート設定を行い、その後、 I g M 対 I g D の発現に関して染色した。 N = 3 マウス / 群。

【図 1 4 B】 B 細胞の脾細胞集団は、結果得られた I L 4 0 欠損マウスにおいて正常であることを示すパネルである。図 1 4 B) その後、 I g M 対 I g A の発現に関して、 B 2 2 0 + 細胞を測定した。 N = 3 マウス / 群。

【図 1 4 C】 B 細胞の脾細胞集団は、結果得られた I L 4 0 欠損マウスにおいて正常であることを示すパネルである。図 1 4 C) B 2 2 0 + 細胞を 7 A A D で染色し、細胞生存度を測定した。 N = 3 マウス / 群。

【図 1 5 A】 I L 4 0 - / - マウスは、パリエル腺叢における I g A 産生細胞において異常を有することを示すパネルである。図 1 5 A) パリエル腺叢における全胚中心 (B 2 2 0 + P N A +) 細胞の測定。 n = 5。図 1 5 A は、 3 つの独立した実験の代表値 (少なくとも 3 匹 / 群) である。

【図 1 5 B】 I L 4 0 - / - マウスは、パリエル腺叢における I g A 産生細胞において異常を有することを示すパネルである。図 1 5 B) B 2 2 0 + P N A h i リンパ球でゲート設定した I g A 分泌プラズマ細胞の測定。 n = 5。図 1 5 B は、 3 つの独立した実験の代表値 (少なくとも 3 匹 / 群) である。

【図 1 5 C】 I L 4 0 - / - マウスは、パリエル腺叢における I g A 産生細胞において異常を有することを示すパネルである。図 1 5 C) I g A スイッチ細胞、 B 2 2 0 l o - h i P N A + リンパ球の総数の測定。 n = 5。図 1 5 C は、 3 つの独立した実験の代表値 (少なくとも 3 匹 / 群) である。

【図 1 5 D】 I L 4 0 - / - マウスは、パリエル腺叢における I g A 産生細胞において異常を有することを示すパネルである。図 1 5 D) 糞塊中の総 I g A の測定。 n = 1 0。 1 5 E) 泌乳雌の乳腺において、 I L 4 0 転写が上方調節されている。 1 週齢及び 3 週齢のバージン、妊娠及び泌乳マウスの乳腺から入手した q R T - P C R 解析。図 1 5 D は、 3 つの独立した実験の代表値 (少なくとも 3 匹 / 群) である。

【図 1 5 E】 I L 4 0 - / - マウスは、パリエル腺叢における I g A 産生細胞において異常を有することを示すパネルである。図 1 5 E) 泌乳雌の乳腺において、 I L 4 0 転写が上方調節されている。

【図 1 5 F】 I L 4 0 - / - マウスは、パリエル腺叢における I g A 産生細胞において異常を有することを示すパネルである。バージン、妊娠、泌乳 1 週及び泌乳 3 週マウスの乳腺から入手した q R T - P C R 解析。

【図 1 6 A】 I L 4 0 - / - マウスは、インビトロ誘導アッセイ中に C S R を受ける能力において固有の B 細胞を有さないことを示すパネルである。以下により 4 日間刺激された

10

20

30

40

50

マウス脾細胞のCSRの誘導：図16A) LPS + 抗-B CR + TGF (IgAスイッチ)。代表的データは、少なくとも2つの独立した実験の代表値(少なくとも3匹/群)から得た。

【図16B】IL40-/-マウスは、インビトロ誘導アッセイ中にCSRを受ける能力において固有のB細胞を有さないことを示すパネルである。以下により4日間刺激されたマウス脾細胞のCSRの誘導：図16B) LPS + IL-4 (IgGスイッチ)。代表的データは、少なくとも2つの独立した実験の代表値(少なくとも3匹/群)から得た。

【図16C】IL40-/-マウスは、インビトロ誘導アッセイ中にCSRを受ける能力において固有のB細胞を有さないことを示すパネルである。以下により4日間刺激されたマウス脾細胞のCSRの誘導：図16C) LPS + IFN (IgG3スイッチ)、フローサイトメトリーにより測定。代表的データは、少なくとも2つの独立した実験の代表値(少なくとも3匹/群)から得た。

【図16D】IL40-/-マウスは、インビトロ誘導アッセイ中にCSRを受ける能力において固有のB細胞を有さないことを示すパネルである。以下により4日間刺激されたマウス脾細胞のCSRの誘導：図16D) LPS + IL-4によるIgGプラズマ細胞の刺激。代表的データは、少なくとも2つの独立した実験の代表値(少なくとも3匹/群)から得た。

【図16E】IL40-/-マウスは、インビトロ誘導アッセイ中にCSRを受ける能力において固有のB細胞を有さないことを示すパネルである。代表的データは、少なくとも2つの独立した実験の代表値(少なくとも3匹/群)から得た。

【図17】ヒトsynaptogyrin2が活性化B細胞において発現することを示すグラフである。ヒト組織の発現プロファイルは、BIGEから得た。

【図18】IL40がT細胞ではなく、B細胞にのみに影響を及ぼすことを示すパネルである。休止(左)及び活性化(右)条件下でのWT及びIL40-/-マウス脾細胞由来の「B細胞」及び「T細胞」遺伝子のマイクロアレイ解析。

【図19A】MRL Fas^{1Pr/1Pr}マウスでのIL40の増加を示すパネルである。CD19の発現に対して正規化したMRL/fas^{1Pr/1Pr}マウス由来の全脾細胞のIL40及びTspan33の発現のqRT-PCR。Tspan33の発現に関して、9週齢(検出可能な病理学なし)、24週齢(軽度の耳部損傷を有無に関わらずリンパ節症)及び36週齢(耳部かつ顔に病変を伴うリンパ節症)のマウスを比較した。n=5。

【図19B】MRL Fas^{1Pr/1Pr}マウスでのIL40の増加を示すパネルである。CD19の発現に対して正規化したMRL/fas^{1Pr/1Pr}マウス由来の全脾細胞のIL40及びTspan33の発現のqRT-PCR。Tspan33の発現に関して、9週齢(検出可能な病理学なし)、24週齢(軽度の耳部損傷を有無に関わらずリンパ節症)及び36週齢(耳部かつ顔に病変を伴うリンパ節症)のマウスを比較した。n=5。

【図20】IL40がT細胞ではなく、B細胞に結合していることを示すパネルである。

【図21】ヒトIL40タンパク質をコードするcDNAのコード領域のヌクレオチド配列(配列番号5)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

遺伝子C17orf99の遺伝子産物に関連した抗体、ペプチド、タンパク質及び核酸は、さまざまな実施形態に含まれる。さまざまな種のC17orf99遺伝子のヌクレオチド配列及びC17orf99cDNA及びさまざまな種由来のC17orf99遺伝子産物のアミノ酸配列は、以下の受け入れ番号を有する(すべてが本明細書に参照として採用される): ヒトC17ORF99: NM_001163075; マウスC17ORF99: NM_029964 (全米バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)ウェブサイト(nebi.nlm.nih.gov)を参照されたい)。本明細書で使用するとき、C17orf99遺伝子産物はインターロイキン-40(IL40またはIL-40)とも称される。

10

20

30

40

50

【0035】

抗体は、例えば、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEなど、任意の免疫結合剤である。また、抗体は、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子であってもよく、また、例えばFab'、Fab、F(ab')₂、シングルドメイン抗体(DAB)、Fv、scFv(単鎖Fv)などの抗体断片が挙げられる。さまざまな抗体ベース構造体及び断片の調製及び使用のための技術は、当業者に周知である。抗体の調製及び特性付けのための手段も当業者に周知である(例えば、Harlow and Lane, 「Antibodies: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、を参照されたい)。モノクローナル抗体(mAb)は、例えば、再現性及び大規模生産など、特定の利点を有すると認識されている。このため、ヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ウサギ及びニワトリさえも起源とするモノクローナル抗体が予想される。

10

【0036】

広範の動物種においてIL40に対するポリクローナル抗体の調製が可能である。典型的には、抗血清の産生に使用される動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはヤギである。免疫原性の増大には、補助剤の使用及びこれらに限定されないが、例えば、アオガイヘモシアニンまたはウシ血清アルブミンなどの担体タンパク質との共役が公知の手技である。

【0037】

モノクローナル抗体は、例えば、米国特許第4,196,265号(参照によって本明細書に援用される)に例示されているものなど、既知の技術を使用して、迅速に調製することができる(40~44)。典型的には、この技術は、例えば、精製または部分的精製タンパク質、ペプチドまたはドメインなどの選択された免疫原組成物で好適な動物を免疫化することを含む。本免疫化組成物は、効率よく抗体産生細胞を刺激する方法で投与する(45~47)。ハイブリドーマ分泌モノクローナル抗体は、単離することができる。

20

【0038】

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、所望の場合、濾過、遠心分離及びHPLCまたは親和性クロマトグラフィーなどのさまざまなクロマトグラフ法を用いて、更に精製することができる(47)。

【0039】

ヒト化モノクローナル抗体は、起源抗原の特異性を保持しつつ、遺伝子工学技術を用いて修飾され、定常領域及び/または可変領域フレームワーク配列をヒト配列に置き換えた動物発生源抗体である。このような抗体は、概して、ヒト抗原に対して特異性を有するげっ歯類抗体から誘導される。このような抗体は、概して、インビボでの治療的適用に有用である。この戦略により、外来性抗体に対する宿主反応が減少し、かつヒトエフェクター機能の選択が可能になる。したがって、本発明のいくつかの実施形態には、マウス、ラットまたはヒト定常及び/または可変領域ドメイン、二重特異性抗体、組換え型及び遺伝子操作抗体及びそれらの断片を担持する他の種由来のキメラ抗体と同様に、IL40に対するヒト化抗体が含まれる。ヒト化免疫グロブリンの産生技術は、当業者に既知である(44、47~51)。例えば、米国特許第5,693,762号は、1つ以上の相補的決定領域(CDRの)を有するヒト化免疫グロブリンの産生方法及びその組成物について開示している。無処置抗体に混ぜ合わせるとき、ヒト化免疫グロブリンは、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、抗原に対してタンパク質またはエピトープを含有する他の化合物などのドナー免疫グロブリンと実質的に同一の親和性を保持する。本分野での他の教示の例としては、米国特許第6,054,297号;同5,861,155号;及び同6,020,192号が挙げられる(具体的には、すべてが参照によって援用される)。患者の疾患に対して「カスタム」作製された抗体の発現方法も同様に公知であり、こうした「カスタム」作製抗体も意図される。

30

40

【0040】

本発明のいくつかの実施形態としては、IL40ペプチドまたはタンパク質が挙げられ

50

る。ある実施形態では、自然発生 I L 4 0 タンパク質は、I L 4 0 変異型、例えば、置換変異型、欠失変異型及び/または挿入変異型と置換することができる。

【0041】

置換変異型は、タンパク質内で更に1つ以上の部位でのアミノ酸の交換を含有する。置換は、通常、形状及び/または電荷が類似しているアミノ酸の交換が関与する同類置換である。欠失変異型では、未変性タンパク質の1つ以上の残基が欠失している。挿入突然変異体または変異型としては、タンパク質中の非末端点において1つ以上のアミノ酸の添加が挙げられる。変異型は、自然発生 I L 4 0 タンパク質配列に対して、約80%以上の同一性、約85%以上の同一性、または約90%以上の同一性、約95%以上の同一性、約100%以上の同一性を有していてもよい。例えば、C l u s t a l O m e g a、M U S C L E、M V i e w または M A F F T 配列比較プログラムを用いて配列比較を実施することができる。比較配列では、1つのタンパク質と別のタンパク質との比較セグメントは、比較されるアミノ酸長さの約100%、または比較されるアミノ酸長さの約95%、約85%、または約80%であってもよい。比較長さは、少なくとも約20、30、40、50、55、60、65、70、または75アミノ酸以上であってもよい。変異型は、一般の自然配列のように特定の物理化学的または機能的特徴を維持していてもよく、他の変異型は、構造的及び機能的特徴の修飾された組み合わせを有してもよい。したがって、いくつかの実施形態としては、例えば I L 4 0 受容体と結合する、または I g A 応答に対する B 細胞の分化に関与するなど、いくつかのまたはすべての I L 4 0 の機能を有する機能的活性 I L 4 0 変異型が挙げられる。また、いくつかの実施形態としては、I L 4 0 アゴニストまたは I L 4 0 アンタゴニストとして機能する変異型が挙げられる。いくつかの実施形態では、変異型としては自然発生ヒト I L 4 0 配列または他の種の自然発生 I L 4 0 配列と同一である配列は含まない。機能的活性 I L 4 0 ペプチド及び I L 4 0 ペプチド変異型を包含するなど、I L 4 0 ペプチド及びこれらの置換変異型、欠失変異型及び/または挿入変異型並びに I L 4 0 アゴニストまたは I L 4 0 アンタゴニストとして機能する I L 4 0 ペプチド及び I L 4 0 ペプチド変異型もまた意図される。いくつかの実施形態では、ペプチド変異型は、ヒトまたは他の種の I L 4 0 内に存在する自然発生アミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列は含まない。

10

20

【0042】

ある実施形態としては、I L 4 0 タンパク質の切頭型または他のセグメントとの融合が挙げられ、記載された機能を示す。融合タンパク質は、第二のタンパク質のすべてまたは一部に結合されているすべてのまたは一部の I L 4 0 を含有することができる。例えば、1つのタンパク質の C 末端は、他のタンパク質の N 末端に結合してもよい。あるいは、タンパク質は、例えば、インテグリン、フィブロネクチン受容体または他の膜糖タンパク質と非共有結合により結合されていてもよい。I L 4 0 タンパク質は、自然発生 I L 4 0 アミノ酸配列またはそれらの変異型を含有することができる。

30

【0043】

いくつかの実施形態では、アミノ酸変異型が関与していないか、またはアミノ酸変異型に加えて、I L 4 0 誘導体が提供される。こうした誘導体の例としては、グリコシル化修飾 I L 4 0 タンパク質、例えば、ポリエチレングリコールによって修飾されたタンパク質 (P E G 化) などの化学修飾 I L 4 0 タンパク質、及び例えば ¹³¹I 標識 I L 4 0、ビオチン - I L 4 0 などの I L 4 0 抱合体が挙げられる。

40

【0044】

本発明のいくつかの実施形態としては、自然発生 I L 4 0 タンパク質またはそれらの変異型など、I L 4 0 タンパク質のすべてまたは一部をコードする核酸が挙げられる。核酸は、DNA または RNA 分子であってもよい。核酸は、例えば、発現を目的とした別の核酸配列に共役結合されてもよく、検出を目的とした標識に共役結合されてもよく、または検出を目的とした化学的誘導体に共役結合されてもよい。例えば、核酸は、緑色蛍光タンパク質 (G F P) などの標識に共役結合されてもよく、ビオチンなどの化学的誘導体に共役結合されてもよい。

50

【0045】

核酸は、IL40ヌクレオチド配列の増幅または合成のためのプライマーとして、またはIL40ヌクレオチド配列の同定のためのプローブとして利用することができる。いくつかの実施形態では、核酸は、IL40遺伝子またはIL40cDNA配列を含むオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態では、核酸はアンチセンス分子である。

【0046】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、自然発生ヌクレオチド及び/または修飾若しくは置換オリゴヌクレオチドであってもよいリボ核酸(RNA)またはデオキシリボ核酸(DNA)のオリゴマーまたはポリマーである。さまざまな実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、IL40標的配列にハイブリッド形成されているヌクレオチド配列が挙げられ、例えば、プライマー結合部位として使用するための追加の5'及び/または3'フランキング配列を挙げることができる。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、これに限定されるものではないが、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロトリエステル、アミノアルキルホスホロトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネート(例えば、3'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートなど)、ホスフィネート、ホスホルアミデート(例えば、3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートなど)、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、並びにこれらの類縁体に連結される正常な3'-5'連結、並びに2'-5'連結を有する及びヌクレオチド単位の近接対が3'-5'から5'-3'または2'-5'から5'-2'に連結される逆極性を有するボラノホスフェートなどの修飾オリゴヌクレオチド主鎖が挙げられる。また、種々の塩、混合塩及び遊離酸形態も挙げられる。こうした修飾主鎖オリゴヌクレオチドの調製は、例えば、米国特許第4,469,863号及び同第5,750,666号に提供されて教示されており、これらはすべて参照により本明細書に援用される。アンチセンスオリゴヌクレオチドのデザイン及び合成は、当該技術分野において周知である(52)。また、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列をデザインするためのコンピュータープログラムも利用可能である(53)。

【0047】

ペプチド、タンパク質及び核酸の標準的産生方法及び作製方法が適用されてもよい。組換え型核酸コード構造体のデザインなどの標準的組換え方法が開発されてもよい。例えば、Thompson D. A. Cell and Molecular Biology Manual 2011を参照されたい。発現ベクター、例えば、コード領域に操作可能に連結されたプロモーターなどが発明され得る。組換え型酵母菌及び組換え型哺乳類細胞などの組換え型原核生物細胞及び組換え型真核生物細胞など、ベクターを含む細胞が提供される。互換性のある発現方法論も開発することができる。

【0048】

例えば、IL40タンパク質またはタンパク質変異型をコードするポリヌクレオチドを、所望の宿主細胞中で機能的であるプロモーターの制御下に配置してもよい。非常に広範のプロモーターが公知であり、また、特定用途に応じて本発明の実施形態の発現ベクター中で使用可能である。通常は、選択されたプロモーターは、そのプロモーターが活性となる細胞に依存する。例えば、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写末端部位などの他の発現制御配列も任意により含まれる。1つ以上のこれらの制御配列を含む構造体は、「発現カセット」と称される。したがって、本発明の実施形態は、関連のある機能的タンパク質をコードする核酸が所望の原核または真核宿主細胞中に多く発現するために導入される発現カセットを提供する(例えば、Ream W and Field K. G. Molecular Biology Techniques. Academic Press. 2012を参照されたい)。

【0049】

いくつかの実施形態では、均質性が少なくとも約70%、75%、80%、85%または90%であるペプチドまたはタンパク質の実質的に純粋である組成物が含まれ、約92

10

20

30

40

50

%、95%、98%、または99%以上の均質性も含まれる。精製されたペプチド及びタンパク質は、例えば、抗体産生の免疫原として、免疫細胞中での誘導分化、成熟またはタンパク質発現のための活性剤として、または医薬組成物中の治療薬として使用可能である。

【0050】

IL40の濃度は、核酸またはタンパク質濃度で測定され得る。例えば、細胞中でのIL40 mRNAの発現量を測定することができるか、または活性化B細胞中に存在するIL40タンパク質の量を測定することができる。これらに限定されないがPCR、マイクロアレイ法またはノーザンブロット法などの方法を用いて、mRNAの定量化を行うことができる(54、55)。タンパク質の定量化は、これらに限定されないが、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫放射定量分析法、蛍光免疫測定法、化学発光分析法、生物発光分析法、またはウエスタンブロッティング法、抗-タンパク質特異的抗体を含むFACS(細胞によって産生するため)などの免疫検出法を使用して実施可能である。制御値は、制御細胞集団または1つ以上の制御対象からのIL40濃度の平均値または中央値であり得る。

10

【0051】

いくつかの実施形態では、対象がIL40が関与する疾患を有しているという診断の後に本明細書に記載のものなどの治療が行われてもよい。例えば、診断の後に治療有効量のIL40アンタゴニストを、自己免疫またはリンパ腫と診断された対象に投与すること、またはIL40ヌクレオチド配列を含有する治療的有効量のオリゴヌクレオチドを対象へ投与することを含む治療が行われ得る。

20

【0052】

いくつかの実施形態は、本発明のさまざまな実施形態の治療的使用を伴う。これらの実施形態では、対象は、本発明のさまざまな実施形態の抗体、ペプチド、タンパク質若しくは核酸またはこれらの任意の組み合わせであってもよい治療的有効量の活性剤を投与され得る。治療的有効量は、個人の状態の薬物治療に対する対象の健全性を促進するか、または改善する量である。例えば、任意の期間の対象の寿命の延長、対象の状態に寄与し得る対象への疼痛の減少、疾病の重症度の低下、治療薬の治療的効果の増大、病態または疾患の予後の改善、治療薬の投与量または投与頻度の減少、治療の侵襲性が低下している対象の治療計画の変更、及び治療薬による副作用の重症度または頻度の減少である。リンパ腫または白血病について、治療上の利益としては、疾患の新生物発生の減少または遅延、過剰増殖の低減、腫瘍成長の低下、転移の遅延、癌細胞または腫瘍細胞増殖率の低下も挙げられる。対象への活性物質の投与量は、熟練の施術者が好適な量を決定することができる対象の体重、投与態様及び疾患の適応症及び重症度に応じて変化する。

30

【0053】

いくつかのケースでは、IL40遺伝子またはIL40cDNA配列を含むアンチセンス分子は、IL40が関与する疾患を有する対象において、IL40の発現を低下させるために治療薬として使用され得る。例えば、アンチセンス分子はsiRNAであってもよい。siRNAは、RNA干渉(RNAi)法において使用するための小型阻害物質RNA二重鎖である。RNAiは、二本鎖RNAが小型二本鎖セグメント(siRNA)に切断される自然発生遺伝子サイレンシングプロセスであり、その後、タンパク質-RNA複合体(「RISC」と称する)と関連し、標的mRNAが切断される(56)。さまざまな実施形態において、siRNAは、その標的IL40mRNAに対して相補度が変動し、サイズ18~30の塩基対であってもよい。いくつかの実施形態では、siRNAとしては、センス鎖及びアンチセンス鎖の一方またはその両方の5'及び/または3'末端部での不對塩基を含んでもよい。いくつかの実施形態では、siRNAは、2つの別個の鎖の二重鎖であるか、または二重鎖領域を形成するためにヘアピン構造体を形成する一本鎖であってもよい。siRNAのデザイン及び合成は、当該技術分野において周知である(57)。また、siRNAをデザインするためのコンピュータープログラムも利用可能である(58)。他のRNAi分子としては、ゲノム的にコードするRNAであり、IL4

40

50

0 の遺伝子発現を調整し得るマイクロRNAが挙げられる。

【0054】

対象は、ヒト、イヌ、マウス、ネコ、または、例えばウシ、ウマ、ブタ、ヤギまたはヒツジなどの他の哺乳類であってもよい。いくつかの実施形態では、対象はIL40が関与する疾患の疑いのある対象である。いくつかの実施形態では、対象はIL40が関与する疾患の治療の必要のある対象または患者である。

【0055】

解析、診断及びテラノシス(theranosis)用のサンプルは、ヒト、イヌ、マウス、ネコ、または、例えばウシ、ウマ、ブタ、ヤギまたはヒツジなどの他の哺乳類由来であってもよい。

【0056】

異なる投与用製剤(滅菌、バッファ、緩効性、徐放性安定剤、軟膏など)は、最適の投与経路に依存して使用可能である。例えば、Niazi S.K. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations Informa Healthcare 2012を参照されたい。IL40/IL40受容体相互作用の抗炎症性アゴニストまたはアンタゴニストを用いた場合と同様に、治療効果を最適化するために他の確立された薬剤と組み合わせて使用可能である。加えて、本化合物(複数可)は、1つの製剤戦略において他の治療と組み合わせて使用してもよい。薬理変化体を使用して、所望の薬物動態学成果(分泌、半減期、溶解度、または分泌経路の最適化)を得ることができる。

【0057】

これらの正確な投与量は、治療目的に依存し、当業者が既知の技術を使用して確認できる。例えば、Ansel, et al, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery; Lieberman (1992) Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1~3)、Dekker, ISBN 0824770846, 082476918X, 0824712692, 0824716981; Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding; 及びPickar (1999) Dosage Calculationsを参照されたい。従来技術で公知なとおり、タンパク質の分解、全身投与対局所送達、新規プロテアーゼ合成率、並びに年齢、体重、全身健康状態、性別、食事、投与時期、薬物相互作用及び状態の重症度の調整は、必須であってもよく、また当業者によっていくつかの実験で確認し得る。

【0058】

さまざまな薬学的に許容可能な賦形剤は当業者において周知である。本明細書で使用するとき、「薬学的に許容可能な賦形剤」としては、組成物の活性成分と混ぜ合わせたとき、成分が生物活性を保持することができ、対象の免疫系との破壊的応答を招くことのない材料が挙げられる。このようなものとしては、安定剤、防腐剤、塩若しくは糖複合体または結晶などを挙げることもできる。例えば、Niazi S.K. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations Informa Healthcare 2012を参照されたい。

【0059】

例示的薬学的担体としては、滅菌水性非水性溶液、懸濁液及び乳濁液が挙げられる。例としては、これらに限定されないが、リン酸緩衝生理食塩水、水、水中油型エマルジョンなどのエマルジョン、及びさまざまな種類の湿潤剤などの標準的薬学的賦形剤が挙げられる。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油及びエチルオレートなどの注射用有機エステルである。水性担体としては、水、アルコール性溶液/水性溶液、エマルジョンまたは塩類溶液及び緩衝媒体などの懸濁液が挙げられる。親ピヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロス及びデキストロス及び塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液また凝固油が挙げられる

10

20

30

40

50

。静脈内ビヒクルとしては、流体及び栄養素補液、電解質補液（例えば、リンガーデキストロースをベースとしたものなど）が挙げられる。他の実施形態では、組成物は、緩効性粒子、ガラスビーズ、包帯、眼へのインサート及び局所形態などの固体基質中に導入される。投与経路としては、局所、全身、呼吸器系、経口、眼、インプラント、腔内、肛門、座薬、除放デバイスなどが挙げられる。

【0060】

核酸化合物のインビボ投与については、核酸は、遊離（または「裸」）核酸として投与されることができ、または核酸の細胞標的への送達を増大させる送達剤と共に配合することができる。送達剤の例としては、これらに限定されないが、リポソーム、カチオン性脂質、PEG化ポリカチオン、カチオン性ブロックコポリマー及びポリエチレンアミン複合体が挙げられる（59）。

10

【0061】

本明細書内の別の項で記載した適応症用の既存の治療薬は、IL40 / IL40 受容体相互作用のアゴニスト / アンタゴニストを組み合わせ、または引き続いて、治療成果を最適化するために使用することができる。

【0062】

本明細書に記載のIL40 遺伝子、cDNA 核酸、ペプチドまたはタンパク質は、ヒトIL40 ヌクレオチドまたはアミノ酸配列をベースにしてもよく、またはイヌ、マウス、ネコ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ若しくはウマなど、別の哺乳類由来のヌクレオチド及びアミノ酸配列をベースにしてもよい。同様に、抗-IL40 抗体を作製するために使用される抗原は、ヒトIL40 抗原をベースにしてもよく、またはイヌ、マウス、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギまたはヒツジなどの別の哺乳類由来のIL40 抗原をベースにしてもよい。

20

【0063】

本発明は、添付の例を参照することによって更に理解されてもよく、これらの例は目的を説明することのみを意図するものであって、いかなる意味においても本発明の範囲を制限するために構築されるものではない。

【実施例】

【0064】

（実施例1）

30

序論

近年特性が決定されたサイトカイン産生B細胞のサブセット、すなわち、B調節細胞（Breg / B10）、Bエフェクタ-1（Be1）及びBエフェクタ-2（Be2）細胞により、炎症及び自己免疫疾患におけるB細胞の役割が抗体生成物に優ることを示すエビデンスが示される。特に、これらは、サイトカイン生成能力を示す。本明細書では、インターロイキン-40（IL40）と称された活性化B細胞により作製された新規サイトカインについて記載する。IL40は、マウス及びヒトの両者の胎児肝臓及び骨髄において発現する未同定遺伝子（C17ORF99）によってコードされる。また、CD40L（またはLPS）によって刺激されたB細胞中に発現する。その産生は、いくつかのサイトカイン（IL-4、IL-13及びTGF β ）によって増強され、IFN γ によって阻害される。IL40は24kDの分泌タンパク質であり、他の既知のサイトカインとの関連はない。IL40欠損マウス（IL40^{-/-}）は、巨脾腫また改変B細胞表現型を呈し、パイエル板では、CD19+B細胞数の増大及びIgA産生細胞数の低下を有する。IL40の転写は、泌乳乳腺において誘導される。更に、IL40の転写がSLE患者由来のPBMC内及びMRLFas^{1Pr/1Pr}マウス由来の脾細胞内で上昇する。IL40はB細胞の発現及び分化への多面効果を有する新規B細胞誘導サイトカインであると結論付けられる。

40

【0065】

サイトカインは、細胞の成長、分化、炎症の調節及び造血に影響を与える活性を有する多面性分泌タンパク質の大規模な多様スーパーファミリーである（1、2）。ヒトの疾患

50

を調節するサイトカインを介するメカニズムの解明において、新規サイトカイン及びそれらの受容体の同定は中心的であった。この情報は、これらの疾患の診断、治療及び予防に重要であった(3)。これらの重要性を考慮すると、例えば配列予測ソフトウェア及びデータベース検索など、新規サイトカインの検索に強い関心があった(4)。これによって、多くのサイトカインの同定が得られ、そのうちの最も多くは、遺伝子重複から発生する可能性の高いスーパーファミリーに属している。

(A) サイトカインとしてのIL40の同定

【0066】

本発明者らは、新規サイトカインの検索に関心を持っていた。この目的を達成するために、Affymetrix U133 2.0 microarrays (5, 6)をベースとするBody Index of Gene Expression (BIGE)として公知のヒトの身体における遺伝子発現の包括的データベースを用いた。このデータベースは、現在、105の異なるヒト組織/細胞型由来のゲノム規模での発現データを含み、かつ、リンパ系組織並びに休止及び活性化されたBリンパ球及びTリンパ球の両者が挙げられる。免疫系において重要な新規遺伝子を同定するために、非免疫組織と比較したとき、リンパ球若しくは骨髄細胞のいずれかまたは免疫系の組織(骨髄、脾臓、リンパ節、胸腺、扁桃)において多く発現した遺伝子に関してBIGEデータベースを検索した。このスクリーニングにより、リンパ系組織に関連した511の遺伝子及び免疫細胞に関連した1569を得て、ここ数十年において同定され、記述されたすべての免疫系遺伝子を実質上同定した(ほとんどのサイトカイン及びケモカイン遺伝子を含む)。重要なことに、35の新規の良好でない特性決定された遺伝子が同定され、免疫系において多く発現されている膜貫通または分泌タンパク質のいずれかをコードすることが予測された。本発明者らは、近年これらの遺伝子、tetraspanin33 (TSPAN33)、活性化B細胞によって発現する膜貫通タンパク質の例を公表した(7)。

B. IL40は、B細胞により産生されたサイトカインである。

【0067】

胎児肝臓、骨髄及び活性化B細胞に発現する新規低分子分泌タンパク質をコードするこれらの遺伝子C17orf99の別の1つの特性決定について記述している。本発明者らは、活性化B細胞により産生された低分子分泌タンパク質であるという事実も含め、典型的なサイトカイン特性を有するために、この分子をインターロイキン40(IL40)と称した。IL40は、活性化時にB細胞により産生され、その生成物は、Th2サイトカイン(IL-4及びIL-13)またはTGFにより増強される。逆に、その生成物はIFN、Th1サイトカインによって阻害される。IL40^{-/-}マウスは、脾臓中でのB細胞数の増加を有する巨脾症を示す。更に、IL40^{-/-}マウスは、腸パイエル板内、IgA産生部位での胚中心数及び全IgA分泌B細胞が少ない。IL40とIgAとの結合は、乳腺において泌乳の発生時にIL40が誘導される観測結果によって更に示唆される。最終的に、MRL Fas^(1Pr/1Pr)マウス(SLEマウスモデル)由来の脾細胞においてIL40転写が増加していることが判明し、自己免疫疾患において関与し得ることが示唆される。

【0068】

結果

A. 新規サイトカインの同定

アノテーションされていない免疫系関連遺伝子(C17orf99)は、BIGEデータベースの解析を介して最初に同定した。C17orf99 mRNAは、胎児肝臓、骨髄及び30時間抗-CD40+IL-4により活性化させたB細胞において多く発現し、他の部位での発現は、ほとんどまたはまったく認められない。すべての組織及びC17orf99の発現の平均強度の完全なリストを表1に提示する。ヒト遺伝子は、予測された20のアミノ酸(図1B)のN末端シグナル配列を有する265のアミノ酸のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含有し、245のアミノ酸(約27kDa)の成熟タンパク質が予測される。BIGEデータベースにおいてIL40の発現の完全な

10

20

30

40

50

リストは、表 1 に提供される。霊長類、イヌ及びマウスなどの哺乳類において相同遺伝子が同定された (6030468 B19 Rik、72% のタンパク質配列変換) が、ニワトリ及びゼブラフィッシュ (図 2) 中には存在しなかった。遺伝子は、造血臓器 (ホメオスタシス) (9) においてかつ活性化 B リンパ球 (炎症性) (2) によって産生された低分子分泌タンパク質 (8) をコードするため、IL40 (図 1) と称している。BIGE の発現プロファイルは、ヒト組織 RNA (図 2 A) の qRT-PCR 解析を使用して、マウス RNA サンプルの同等の収集を用いて確認し、これは、免疫系関連組織及び特に骨髄においてマウス相同体が多くかつ特異的に発現していることが示された (図 2 B)。Pfam search から、IL40 は、現在公知のいかなるサイトカインファミリーにも属さずに (データに図示せず)、IL40 が造血臓器及び活性化 B 細胞において産生された新規サイトカインであることがわかる。

【表 1】

表 1 B I G E データベースによる I L 4 0 発現の中央強度値の全リスト

大静脈	24.6
気管	17.6
気管支	19.3
肺	18.3
副腎皮質	15.5
膵臓	24.7
下垂体腺	19.8
甲状腺	16.6
腎臓	19.0
腎臓皮質	17.1
腎臓髄質	19.5
尿道	16.4
卵巣	16.1
精巣	16.5
卵管	22.5
子宮	20.7
子宮筋層	18.9
子宮内膜	26.2
頸部	19.9
膣	21.5
外陰	20.4
乳腺	18.7
乳頭断面	22.7
陰茎	20.3
前立腺	15.3
骨髄	156.0
胸腺	27.5
リンパ節	26.0
脾臓	21.5
扁桃	28.2
PBMC 培地 BB	18.4
PBMC PMA+イオノマイシン	20.0
単球休止-30 時間	22.4
単球 LPS+FN γ -30 時間	26.8
B 細胞休止-30 時間	31.9
B 細胞抗 CD40+IL4-30 時間	52.0
T 細胞休止-30 時間	23.6
T 細胞抗 CD3-30 時間	19.1
CD4+	20.3
CD4+抗 CD3+抗 CD28	19.5
CD8+	19.8
CD8+抗 CD3+抗 CD28	17.6
胎児_肝臓	608.7
胎児_脳	18.7
胎盤	20.6

10

20

30

40

† 組織及び臓器系にしたがって作製された B I G E データベースから得た表。 I L 4 0 発現の中央強度値を示す (n = 8)。

本試験の前に、C17orf99は、遺伝子の調査において分泌タンパク質として同定し、シグナル配列を予測した(10)。IL40が分泌されていることを確かめるために、ヒトIL40cDNAをB細胞活性化及び分化のパーキットリンパ腫モデルであるヒト2E2B細胞からクローン化し(11)、インフレームをpTT5のクローニング部位に挿入し(12)、その結果、C末端8xHisタグとの融合タンパク質をコードする組換え型遺伝子となる。その後、HEK293細胞をpTT5-IL40構造体または対照として空のベクターにより形質移入し、1日目及び3日目に上清を収集し、組換え型IL40タンパク質の存在について解析した。抗-His抗体を用いた精製上清の親和力のウエスタンブロッティング法により、pTT5-IL40構造体により形質移入された細胞のみに約27kDのタンパク質を検出し(図1C)、IL40が分泌タンパク質であることを確認する。

10

【0070】

B・IL40は、活性化B細胞により産生される。

例えばIL-2、IL-7及びIL-15などのサイトカインの多くは、リンパ球の個体発生及び活性化の両方において機能を有するため(13)、本発明者らは、IL40は更にこれらのプロセスに関与している可能性があるかと仮定した。BIGEデータベースにおけるその発現パターンから、B細胞がCD40L+IL-4により刺激されるとき、IL40の発現が増加していることがわかる。この点を確認するために、休止または活性条件下において、PBMCから精製されたヒトB細胞におけるIL40の転写を抗-CD40+IL-4を用いて24時間測定し(図4A)、TSPAN33の発現と比較した(本発明者らが近年記述したB細胞活性化マーカー)(7)。IL40の転写は、TSPAN33($p=0.01$)と共に50倍を超えて($p=0.002$)上方制御したところ、活性化されたヒトB細胞によるIL40の発現が示された。これらの実験は、休止または活性条件下においてヒト2E2及びジャーカット(T細胞株)を使用して繰り返し行った(2E2活性化用の抗-CD40mAb及び抗-CD3+抗-CD28)(図5A)。IL40転写は、活性化2E2細胞においてのみ誘導された。LPS+IL-4によって活性化されたマウス脾細胞(図4B)及び同一条件下にて刺激されたA20-2JマウスB細胞(図5B)と類似の結果が得られた。IL40転写の反応速度を測定するために、C57Bl/6マウス由来のCd19+B細胞(図6)にCD40L+IL-4により、8時間、24時間、72時間及び96時間刺激を与え、IL40及びAicda(遺伝子コードAID、活性化B細胞において免疫グロブリンクラススイッチに関与する酵素(14))；遺伝子の発現をqRT-PCRによって測定した(図4C)。IL40 mRNAを8時間以内で上方制御し、その発現は96時間以上上昇し続けた。

20

30

【0071】

活性化B細胞は、刺激に依存してTh1型(Be1由来)またはTh2(Be2由来)サイトカインを分泌することが示されたため(15)、IL40の発現をサイトカインによって同様に調節したか否かを判断する必要があった。

【0072】

マウス脾細胞においてCD40(図4E)またはTLR4(図7)の刺激は、IL-4、IL-13、IFN または組み合わせたものを混ぜ合わせた(図4D)。IL40転写はTh2サイトカインの刺激時に誘発され(IL-4及び/またはIL-13、約8倍)、IFN(Th1サイトカイン)は3倍増加させたのみであった。抗-CD40の刺激によりIL40の転写が20倍以上増加した。興味深いことに、Th2サイトカイン(IL4またはIL13)は、抗-CD40の刺激のみの場合よりもほぼ2倍以上のIL40の産生と協同しており、その一方でIFNにより、抗-CD40単独で観測されたレベルの半分までIL40の発現が減少した。更に、抗-CD40+TGFによる刺激により最も高いレベルのIL40の産生が誘導された(図4E)。本発明者らは、抗-CD40の刺激時にIL40の産生が誘導され、Th2サイトカイン及びTGFにより協同され、IFNにより阻害されると結論付けている。

40

【0073】

50

C. IL40^{-/-}マウスは、B細胞ホメオスタシスにおいて欠陥を有する。

IL40の生物活性の特性を更に決定するために、IL40(6030468B19Rik)遺伝子の標的欠失を有する突然変異マウス株を得た(図8a、遺伝子型の決定を確認するには図9を参照されたい)。IL40^{-/-}マウスは、生存可能であり、かつ受精し、体重増加または身体の大きさに欠陥はない(図10)。それぞれ、胸腺、腹腔、脾臓及び骨髄におけるT細胞サブセット(図11)、B1/B2の細胞比率(図12)、プラズマ細胞及び胚中心細胞のB細胞成熟(図13)、及びpro/pre/未成熟B細胞集団(図14)を比較し、WtとIL40^{-/-}マウスとでは有意差のないことが判明した。しかし、6週齢までにIL40^{-/-}マウスは巨脾症を呈し、IL40^{-/-}マウスでは、長さ(0.0940±0.004対0.1360±0.0151cm、p=0.005)、腫瘍(0.1018±0.005対0.1366±0.0147g、p=0.0285)及び総細胞数(76.03±6.87対96.34±2.15*10⁶細胞、p=0.0224)が増大した。CD19+B細胞対T細胞(CD3+)との比率を比較したとき、IL40^{-/-}マウスは、Wtマウスと比較して、T細胞に対してより高い比率のB細胞を含むことが明らかになり、この差は統計的に有意であった(4.4対3.4、p=0.086(図8C))。更に、IL40^{-/-}マウスでは、IgG1及びIgAはこれらの野生型(WT)対応物(それぞれ、616対189µg/mL、p=0.05及び10対21µg/mL、p=0.03)を上回る血清レベルの上昇を示した(図8F)。これらのデータからIL40^{-/-}マウスにおけるB細胞のホメオスタシスが変化する可能性が示唆され、かつ、IL40は、B細胞の分化/生存において任意の役割を果たし得ることが示唆される。

10

20

【0074】

D. IL40^{-/-}マウスは、より少ないIgA産生細胞を有する。

IL40^{-/-}マウスは、血清IgA値の上昇を示すと考えられるため、粘膜免疫と結合した抗体イソタイプ、パイエル板、消化管の免疫監視に關与するリンパ結節関連の腸におけるプラズマ及び胚中心細胞の量を比較した(15)。パイエル板は、天然胚中心及びIgA分泌プラズマ細胞を含む(16)。胚中心細胞(B220⁺PNA⁺)の存在に關して、WT及びIL40^{-/-}マウスのパイエル板から単細胞懸濁液を調製し、染色した(図15a)。IgAスイッチ胚中心細胞(PNA⁺B220^{hi}IgM^{lo}IgA⁺) (図15B)及び全IgAスイッチ細胞(B220^{lo-hi}PNA⁺IgA⁺) (図15C)をフローサイトメトリーにより測定した(17~19)。IL40^{-/-}マウスは、2倍超の胚中心細胞の減少(n=5、p=0.0005)、IgAスイッチ胚中心細胞では2.5倍の減少(n=5、p=0.0001)、及び全IgA陽性細胞(PNA⁺胚中心B220^{hi}及びB220^{neg-lo}プラズマ細胞)では10倍の減少(n=5、p=0.0001)が認められた。更に、Wt及びIL40^{-/-}マウスの糞塊中のIgA濃度は、ELISA(図15D)により測定し、IgA陽性細胞の欠失が粘膜におけるIgA分泌レベルに影響を与えるか否かを判断した。Wtマウスと比較して、IL40^{-/-}の糞塊中のIgA値は2倍の減少が認められた(n=10、p=0.006)。IgAの欠失がIL40^{-/-}マウス中に存在することにより、IL40が乳腺に発現するか否かを調査した。図15Eに示すように、乳腺内での泌乳時にIL40の発現が誘導される。総合すれば、これらの観測結果からIgA応答におけるIL40の役割が示唆される。

30

40

【0075】

これらの変化は、クラススイッチ組換え(CSR)機構(20、21)での欠陥または欠陥、胚中心応答(増殖(22)、生存(23)、活性化(24))の成熟での欠陥に起因し得る。最初に可能性のある機構として特定するために、WT及びIL40^{-/-}B細胞におけるインビトロでのCSRの誘発を実施し、得られたIgG1、IgG2a、IgG2b及びIgAのクラススイッチはフローサイトメトリーを使用して監視した(図16を参照されたい)。WtとIL40^{-/-}IgG1、IgG2a及びIgG3スイッチ細胞との間で差異は認められず、IL40^{-/-}B細胞(p=0.03)においてIgAスイッチのわずかな増加のみ認められた。したがって、本発明者らは、IL40^{-/-}マウスのパイ

50

エル板における I g A 産生細胞の欠乏は、C S R を受ける能力の欠陥によるものではないと結論付ける。

【 0 0 7 6 】

I L 4 0 応答遺伝子の同定

その後、本発明者らは、I L 4 0 がリンパ球に及ぼす効果をより詳細に調査することにした。この目的を達成するために、遺伝子アレイを用いて、休止及び W T または I l 4 0^{-/-}マウスのリンパ節から得たリンパ球を刺激した L P S + I L - 4 に関する国際的な遺伝子発現解析を実施した。

【 0 0 7 7 】

遺伝子プロファイルの 2 つの群：休止または活性化条件下で、W T マウス対 I L 4 0^{-/-}マウスにおいて上方制御されている遺伝子（表 2）及び I L 4 0^{-/-}マウス対 W T マウスにおいて上方制御されている遺伝子（表 3）の特性を決定した。予測したとおり、最も特異的な発現遺伝子は I L 4 0 であった。興味深いことに、上位 4 番目に特異的に発現した遺伝子は *s y n a p t o g y r i n 2* (*S y n g r 2*) であった。*S y n a p t o g y r i n 2* は、中枢神経系のニューロン中に発見される *s y n a p t o g y r i n* ファミリーに属しているが、そのファミリーメンバーとは異なり、*S y n g r 2* は、中枢神経系内に発現するものではない。*S Y N G R 2* の発現プロファイルを決定するために、*S Y N G R 2* の発現部位に関して B I G E データベースを解析した（図 17。B I G E における *S Y N G R 2* の最上発現部位に関して表 4 を参照されたい）。*S Y N G R 2* は、活性化 B 細胞、単細胞及びヒト結腸によって発現すると判断された。

10

20

【表 2】

表 2 WT 対 IL4 欠失マウスの脾細胞中において上方制御される上位 25 の遺伝子リスト

遺伝子の詳細	遺伝子記号	Wt 対 KOR の比率	Wt 対 KOA の比率	注記
RKEN cDNA 6030468B19 遺伝子	6030468B19Rik	5.23	7.84	
予測遺伝子,6664	Gm6664	0.30	6.49	偽遺伝子
プロリン富化タンパク質 BstNi サブファミリー 1	Prb1	1.11	4.65	
synaptogyrin 2	Syngn2	3.65	4.51	
予測遺伝子,9312	Gm9312	0.15	3.27	偽遺伝子
予測遺伝子,24724	Gm24724	1.11	3.05	snRNA
ヒストンクラスター 1, H1a	Hist1h1a	3.34	2.98	
予測遺伝子,23825	Gm23825	0.74	2.96	snoRNA
予測遺伝子,15807	Gm15807	1.57	2.95	偽遺伝子
予測遺伝子,25153	Gm25153	2.09	2.85	snRNA
RKEN cDNA 4930457A20 遺伝子	4930457A20Rik	1.17	2.75	既知のアンチセンス
嗅覚受容体 820	Olfir820	0.77	2.70	
microRNA 20b	Mir20b	1.11	2.68	
線維芽細胞成長因子 23	Fgf23	1.09	2.62	
microRNA 669o	mir69o	1.20	2.60	miRNA
キラー細胞レクチン様受容体ファミリーメンバー 1	Klrl1	1.73	2.58	
予測遺伝子,23516	Gm23516	1.35	2.57	snRNA
T 細胞受容体アルファ可変 15N-1	Tray15n-1	0.88	2.52	

†表: Affymetrix MOGENE 2.0 STアレイより入手。WT (n=1) 及び IL-4 欠失マウス由来のリンパ節の休止及び LPS + IL-4 誘導リンパ球。

10

20

30

【表 3】

表 3 I L 4 0^{-/-}マウス対WT脾細胞中において上方制御される上位 25 の遺伝子リスト

遺伝子の詳細	遺伝子記号	Wt 対 KOR の 比率	Wt 対 KOA の 比率	注記
鋤鼻 1 受容体 208	Vmn1r208	6.61	1.38	
RIKEN cDNA 60304688B19 遺伝子	6030468B19Rik	5.23	7.84	KO 標的遺伝子
予測遺伝子 4567	Gm4567	4.28	0.56	セリン/トレオニンキナーゼ様
synaptogyrin 2	Syngn2	3.65	4.51	
キラー細胞レクチン様受容体ファミリーGメンバー1	Klrg1	3.39	2.35	
ヒストンクラスター1, H1a	Hist1h1a	3.34	2.98	
SH2 領域タンパク質 1B1	Sh2d1b1	3.24	0.95	
予測遺伝子,22657	Gm22657	3.15	0.76	SnoRNA
嗅覚受容体 917	Olfir917	3.02	0.70	
小核小体 RNA, H/A CA box 34	Snora34	2.96	1.13	
リボソーム L24 領域含有 1	Rsl24d1	2.88	1.24	
予測遺伝子,25291	Gm25291	2.87	1.29	SnoRNA
免疫グロブリン重鎖可変 V3-3	Ighv3.3	2.86	1.30	
S100 カルシウム結合タンパク質 A6(カルサイクリン)	S100a6	2.86	1.56	
予測遺伝子,26419	Gm26419	2.77	1.03	SnoRNA
ヘモグロビン、ベータ成体主鎖	Hbb-b1	2.72	2.10	
小核小体 RNA, H/A CA box 15	Snora15	2.71	1.94	SnoRNA
予測遺伝子,24727	Gm24727	2.68	0.91	SnoRNA
クローン MBI-31 H/ACA box snoRNA, 部分配列	AF357391	2.62	1.02	SnoRNA
予測遺伝子,25803	Gm25803	2.62	1.17	SnoRNA
pentatric opeptide 反復領域 3	Ptcd3	2.61	1.18	
予測遺伝子	Gm	2.56	1.19	SnoRNA
予測遺伝子	Gm	2.54	1.06	SnoRNA
予測遺伝子	Gm	2.53	1.02	SnoRNA

†表: A f f y m e t r i x MOGENE 2. OSTアレイより入手。WT (n = 1) 及び I L - 4 欠失マウス由来のリンパ節の休止及び L P S + I L - 4 誘導リンパ球。

10

20

30

40

【表 4】

表 4 ヒトにおける上位10のsynaptogyrin2の発現部位

組織	中央強度	組織	中央強度
B細胞_抗CD40+IL4-30h	2998	唾液腺	682
B細胞_休止-30h	1299	単球_LPS+IFNg-30h	671
単球_休止-30h	1224	舌	661
結腸	803	気管	658
前立腺	767	CD4+_抗CD3+抗CD28	647
扁桃	706	T細胞_抗CD3-30h	647
小腸	694	肺	641
PMBC_培地_BB	685	舌_上	630

†BIGEデータベースより入手したSynaptogyrin2の発現に関する表

【0078】

近年では、IL40は活性化B細胞により産生されると判断されているが、IL40の標的細胞は明らかになっていない。IL40がB細胞またはT細胞の遺伝子発現に作用するか否かを判断するために、WTマウスサンプルとIL40^{-/-}マウスサンプルにおいて、CD81、CD86、Ms4a1(CD20)、IL-4及びStat6など、「B細胞の活性化/分化」に關与する遺伝子」と考えられる50の遺伝子とCD3(3遺伝子)、Cxcr4、Il2及びIFNγなど、「T細胞の活性化/分化」に關与する遺伝子」と考えられる38の遺伝子とを比較した(表5)。IL40がT細胞に作用するとき、IL40が存在しないことにより(IL40^{-/-}サンプルにおいて)、B細胞ではなくT細胞に影響を及ぼすものであり、反対に、IL40がB細胞に作用するとき、B細胞活性化遺伝子の差が予期される(図18)。更には、IL40が双方の細胞型に作用するとき、双方の遺伝子セットは変化するものとする。休止状態では、B細胞発現遺伝子のみがWTとIL40^{-/-}マウスとの間で特異的に発現するが、この差は、統計上有意ではなかった(p=0.09)(これはおそらく、T細胞との比較に使用されたリンパ節サンプルでのB細胞の数がより少ないためである)。しかし、LPS+IL-4により刺激されたサンプルにおいて(T細胞遺伝子ではなく)、B細胞は、特異的に発現した唯一の細胞であった(p=0.018)。これらの結果により、IL40応答細胞がB細胞であることが強く示唆される。

10

20

30

【表 5 - 1】

表 5 野生型及び I L 4 0 - / - サンプルにおける遺伝子の発現

遺伝子記号	Wt 対 KOR の比率	Wt 対 KOA の比率
Cd28	0.87	0.96
Cd4	0.72	0.66
Cd40	1.21	1.18
Cd401g	1.13	1.04
Il10	1.26	0.89
Cr2	1.29	1.08
Icosl	1.32	1.23
Igbpl	1.04	0.89
Ms4al	1.31	1.32
Rgs1	1.04	0.68
Sla2	0.77	0.71
Cd81	0.91	0.93
Cdkn1a	0.89	1.05
Prkcd	1.09	1.15
Ptprc	0.94	1.12
Bad	1.06	0.86
Clcfl	1.17	1.34
Hdac5	1.05	1.02
Hdac7	0.6	0.67
Pik3r1	0.87	0.89
Cd86	1.18	1.07
Egr1	0.96	0.79
Stat6	1.05	1.13
Ptpn2	1.08	1
Bcl2l1	0.36	0.63
Ighg	1.05	1.19
Ighg	1.24	1.12
Ighg	0.9	1
Ighg	1.09	1.57
Ighg	1.08	1.16
Ighg	1.21	0.97
Ighg	1.36	1.28
Ccl22	0.5	0.44
Nfatc1	1.07	1.05
Nfatc2	1.07	1.2
Ikzf3	0.96	1.04
Spib	1.22	1.28
Tcf3	1	1.03
Pou2af1	1.39	1.28
Il2lr	1.03	1.13
Cd44	1.31	1.19
Fas	0.59	0.61
Fasl	1.33	1.04
Cblb	1.1	1.12
Cd1d1	0.89	0.85

10

20

30

40

【表 5 - 2】

Cd3g	0.88	0.84
Cd8a	0.58	0.52
Dock2	0.99	1.07
Irf4	1.42	1.4
Prkcq	1.03	0.98
Sit1	0.67	0.56
Vavl	1	0.97
Was	0.96	0.94
Ccnd3	0.73	0.7
Cd3e	0.83	0.81
Cxcll2	0.84	1.29
Cxcr4	1.08	0.95
Glmn	1.13	1
Il12b	0.94	0.52
Il18	1.04	1.2
Il2ra	1.21	1.16
Cd74	1.09	1.13
H2-Aa	1.37	1.29
Hsp90aal	1.05	1.13
Il27	0.8	0.94
Jag2	0.82	1.02
Socs5	1.3	1.01
Wwp1	1	0.95
Cd93	1.02	1.12
Tlr6	1.01	1.08
Impdh1	0.65	0.74
Flt3	0.91	0.88
Nfatc1	1.07	1.05
Nfatc2	1.07	1.2
Ikzf3	0.96	1.04
Spib	1.22	1.28
Tcf3	1	1.03
Pou2af1	1.39	1.28
Il2lr	1.03	1.13
Cd44	1.31	1.19
Fas	0.59	0.61
Fasl	1.33	1.04
Cblb	1.1	1.12
Cd1d1	0.89	0.85

10

20

30

40

【 0 0 7 9 】

IL40は、全身性エリテマトーデスにおいて上方制御される。

自己免疫疾患では、多くの場合、例えばIL-6、IL-21及びBlySなどの既知のB細胞サイトカインの量の異常調節が行われるため(7)、全身性エリテマトーデス(SLE)のMRL/Fas^{1Pr/1Pr}マウスモデル由来の脾細胞におけるIL40のmRNAの発現を測定した。このモデルでは、マウスは、抗-dsDNA(二重鎖DNA)抗体の産生と共に全身的自己免疫値及び免疫性系球体腎炎の上昇を示し、そのいずれもがSLEの特徴である。幼若マウスは正常であると考えられ、9週の時点で目に見える症状は示さなかった。24週までにリンパ腺症及びいくつかの皮膚病変を伴う中間狼瘡症状が発現

50

し、36週までに完全な狼瘡症状が明らかになり、多くの場合死に至る(25)。IL40 mRNAの発現(図19)が増加することが判明した。マウスモデルにおいて検出されたIL40値の上昇により、IL40の異常調節がSLEの病理学に關与する場合もあり、また、本疾患の治療の対象を示し得ることが示唆される。

【0080】

これらのヒト遺伝子の機能的特性付けにおいて有意な進歩があったが、それらの大多数においては、情報はほとんどまたはまったくなかった。実際に、コンセンサスコード配列(CCDs)(26、27)プロジェクトでは、18,673の遺伝子番号(公表14)が列挙されており、そのうちの13669のみが記述名(HUGO Gene Nomenclature Committee: ヒト遺伝子命名委員会)を有する(28)。このため、5,000を超えるCCDSエントリーには有用な名前はなく、ほとんどが確実に特性が決定されていない状態である。これらの研究を阻害する別の合併症では、研究するための試薬を欠いている。本明細書では、本発明者らは、未同定遺伝子C17orf99によってコードされるIL40と称される新規サイトカインの同定に關して報告している。C17orf99は、最初は、ヒト遺伝子発現のBIGEデータベースの解析を介して同定された86の遺伝子セットの一部として同定された(29)。これらの発現パターンは、体内の他の場所に発現がほとんどまたはまったく認められず、膜貫通または分泌タンパク質のいずれかをコードすることが予測されている細胞器官または免疫系のいずれかと關連している。本発明者らは、近年、この方法を使用して同定した新規B細胞活性化分子(TSPAN33)の同定についても報告している(7)。IL40/C17orf99は、本発明者らがこの解析の一部として報告している第2の遺伝子である。

10

20

【0081】

新規サイトカインインターロイキン-40(IL40)としてC17orf99によりコードされたタンパク質の同定は、いくつかの因子に基づく。第1に、発現が免疫系のいくつかの組織及び細胞に制限される低分子分泌タンパク質であり、他の多くの公知のサイトカインに關する発現プロファイルに類似している。本発明者らは、骨髓におけるIL40の発現に關して調査を開始し、他のサイトカインと対照的に、骨髓間質細胞ではなく、リンパ液により発現したことを見出した。BIGEデータベースにおいて活性化された末梢血B細胞により、わずかではあるが、IL40が有意に発現することから、更にこれがB細胞生成物であったことが示唆された。IL40は、低分子分泌タンパク質をコードし、その発現が、前炎症状態下で培養されたB細胞中において誘発され、さまざまなサイトカインによって調節されている。総合すれば、本発明者らは、C17orf99は、新規B細胞誘導サイトカインをコードしていると結論付ける。

30

【0082】

近年まで、もっとも公知であるサイトカインは、近年特徴が明らかになったものであっても、公知のサイトカインファミリーに屬している。例えば、IL37は、インターロイキンファミリーのメンバーである。これにより、同定が促進される。その一方で、IL40は、任意の公知サイトカインファミリーには屬さない。本発明者らは、哺乳類において相同遺伝子を同定したが、ニワトリまたはゼブラフィッシュでは同定しなかった。このことは、その機能が哺乳類の免疫系に制限され得ることを示している。

40

【0083】

実際に、本発明者らは、IFN、Th1サイトカインではなく、Th2サイトカイン(IL-4及びIL-13)の存在下において、抗-CD40mAb(またはCD40L、若しくはLPS)による活性化時に、B細胞内でIL40が誘導されると判断した。IL40は、TGFの存在下における活性化により最も有意に誘導される。これまでB細胞機能上でTGFに寄与していたいくつかの機能は、間接的にIL40によって媒介されてもよい。TGFがB細胞の増殖(30)及びIgG1、IgG2a、IgG3及びIgEへのCSRを同時に阻害し、IgA及びIgG2bに対するCSRを誘導する。

【0084】

B細胞条件でのTGFノックアウト(31)またはTGF β R(30)(もしくはTGF

50

F Rの成分、すなわちS m a d 2^{-/-} (3 2)) マウスは、パイエル板中でのI g Aの産生において欠陥を有するが、胚中心細胞の頻度及び数の増大並びに他のイソタイプのすべてに対するC S Rは増加した。I L 4 0^{-/-} マウスは、パイエル板のI g A産生細胞中に欠陥を有するが、胚中心細胞が減少していることから、この欠陥の機構はT G F またはT G F R欠失マウスから分離されていることが示唆される。更に、内因性T G F は、C S Rのインビトロ脾細胞の誘導中においてすべてのイソタイプに対してC S Rには必須である。内因性T G F が阻害されることによりすべてのイソタイプのC S Rが減少し(3 3) するため、L P S及びT h 1またはT h 2サイトカインによるインビトロ誘導中、I L 4 0^{-/-} マウス由来のB細胞でもC S Rに欠陥を有することはないが、I g Aスイッチのわずかな増加は認められた。G C及びI g A産生細胞内の欠陥は、例えば、活性化(C D 4 0またはB 7欠失マウス) (3 4)、増殖(C c n d 3^{-/-} マウス) (2 2)、生存(P d c d 1 l g 2^{-/-}、C D 2 7 4^{-/-} P d c d 1 l g 2^{-/-}及びP d c d 1^{-/-} マウス) (3 5)、または基底膜への移動(F T Y 7 2 0によるS 1 P阻害) (3 6) など、G C応答の欠陥により発生したと考えられる点に注意することが重要である。しかし、これらの欠陥はいずれも、脾臓においてB細胞数の増加を有するが、パイエル板における胚中心細胞及びI g A分泌細胞の数が少ないI L 4 0^{-/-} マウスの表現型に類似している。また、I L 4 0^{-/-} マウスの糞便中のI g A数が少ないことを明らかにした。T G F では、活性化B細胞によるI L 4 0の産生を強く増強し、また乳腺における泌乳時にI L 4 0が誘導される。総合して考えると、これらの観測結果から、I L 4 0がI g A応答に対するB細胞の分化に関与していることがわかる。

10

20

【 0 0 8 5 】

近年では、分泌サイトカインを介する炎症誘発性または抗炎症性応答のスキューニングにおいて、B細胞は、T細胞との相互作用を有することがわかっているため(3 7)、B細胞サブセットによって産生されるサイトカインは、免疫調節の主要調節因子として認識されている。リウマチ性関節炎(R A)及びS L Eなどの自己免疫疾患の治療における治療戦略として、特異的サイトカイン相互作用の改変により需要が増加しているため、活性化B細胞により産生される新規サイトカインを発見することは非常に有用である(3 8、3 9)。更に、B細胞は、多くのヒト自己免疫疾患に関与していることがわかっており、このため、B細胞により産生された新規サイトカインを同定することにより、B細胞媒介病態の理解に寄与することになる。

30

【 0 0 8 6 】

本明細書において、本発明者らは、周辺域において活性化B細胞により排他的に産生された新規サイトカインであるI L 4 0に関する最初の報告について記述している。これまでにI L 4 0に関する報告が存在しないため、その確実な経路及びシグナル伝達機構は明らかになっていない。本発明者らは、マイクロアレイ解析により、W TとI L 4 0^{-/-} マウスのリンパ節とを比較したとき、ほとんどのB細胞遺伝子が増加したことを明らかにしたため、I L 4 0は、自己分泌シグナル伝達において活性化B細胞により機能し得ると考えている。また、免疫応答の調節におけるB細胞サイトカインの関与を理解するにあたって、B細胞の分化に伴う新規サイトカインの発見も重要である。更に、I L 4 0^{-/-} 転写は、S L Eマウス及びS L Eヒトにおいて増加していることから、I L 4 0の異常調節が自己免疫疾患に関与し得ることが示唆される。

40

【 0 0 8 7 】

方法：

B細胞、C S R及びプラズマ細胞の分化

脾臓細胞をF B S (1 0 %)、5 0 m M β-メルカプトエタノール及び1 x 抗生物質 - 抗かび物質混合物 (1 5 2 4 0 - 0 6 2 ; I n v i t r o g e n C o r p .) の入ったR P M I 中で3 7 ° Cにて4 8 ウェルプレートで再懸濁し、以下の試薬により刺激した：I g AへのC S Rに関して、大腸菌由来のL P S (5 μ g / m l) (0 5 5 : B 5 ; S i g m a - A l d r i c h) 及びT G F - β (2 n g / m l ; R & D S y s t e m s) 及び抗 - I g Dデキストラン (F i n a B i o s o l u t i o n s)。更に、I g Gへの

50

CSR用のrmIL-4 (5 ng/ml) とIgG3へのCSR用のIFN- γ (50 ng/ml; PeproTech Inc.) とを組み合わせてLPSを使用した。表面Igを解析するために、FITC-抗-マウスIgG1 (クローンA85-1)、抗-マウスIgG2a (クローンR19-15)、抗-マウスIgG2b (クローンR12-3)、抗-マウスIgG3 (クローンR40-82) または、抗-マウスIgA (クローンC10-3) ラットmAb及びPE-抗-マウスCD45R (B220) (クローンRA3-6B2) ラットmAb (BD Biosciences) による染色後、第4日目に細胞を収集した。細胞はPBS中1%パラホルムアルデヒドで固定し、FACSにより解析した。

【0088】

パイエル板B細胞をフィリコエリトリン (PE) - 標識抗-マウスCD45R (B220) rat mAb (RA3-6B2, eBiosciences) 及びFITC-標識PNA (E-Y Laboratories, San Mateo, CA)、7AAD (Biolegend) 及びAPC-標識IgM (Biolegend) で染色し、FACS caliber (Becton-Dickinson) 及びFlowJoソフトウェアにより解析した。

10

【0089】

リアルタイムPCRを用いて、所与のサンプル中のIL40 mRNAの量を測定することができる。この目的では、さまざまなマシンは利用可能であり、それぞれが正確なmRNAを増幅し、測定するために、特定のプライマーのデザインを必要とする。Light cycler (Roche (Indianapolis, Indiana, USA)) を使用した。

20

【0090】

実施例 2

IL40受容体運搬細胞の同定

IL40受容体を運搬している細胞を判定するために、C57BL/6マウス由来の脾臓を収集し、均質化し、FACSチューブ (0.5 x 10⁶ 細胞/チューブ) に入れた。まず、脾臓を氷上で30分間、FACSブロックバッファにてインキュベートした。次に、氷冷FACS洗浄により1回細胞を洗浄して、組換え型His-タグIL40 (10 μ g/ml) で30分間氷上でインキュベートした。その後、細胞を2回洗浄し、氷上でウサギ抗-6x His標識抗体 (1:500希釈) で30分間インキュベートした。次に、細胞を2回洗浄し、FITC (1:200希釈)、イソタイプ対照または他の細胞表面染色抗体に共役結合されたヤギ抗-ウサギ二次抗体でインキュベートした。結果は図20に示す。この実験から、IL40はB細胞に結合するが、T細胞に結合しないことがわかった。

30

【0091】

実験で使用した試薬:

ウサギ抗-6x Hisタグ抗体 (Abeam、カタログ番号 ab9108)

FITCロバ抗-ウサギ (Biolegend、カタログ番号 406403)

ウサギIgGイソタイプ対照 (Santa Cruz、カタログ番号 sc-2027)

PE抗-マウスCD45R/B220 (Biolegend、カタログ番号 103207)

APC抗-マウスCD8b.2抗体 (Biolegend、カタログ番号 140409)

PE抗-マウスCD3抗体 (Biolegend、カタログ番号 100307)

APC抗-マウスCD19抗体 (Biolegend、カタログ番号 115511)

40

【0092】

実施例 3

受容体発現細胞のサイトカインに対する機能的応答。細胞においてIL40によって調節するバイオマーカー遺伝子を見出すために、脾臓、リンパ節、胸腺または骨髄などの免疫器官由来細胞をさまざまな量の組換え型マウスまたはヒトIL40 (使用される細胞の

50

発生源に依存して)と共にインキュベートし、その後、細胞をこれらの遺伝子の mRNA に転写させるために、数時間(6時間、8時間、24時間)インキュベートした。その後、細胞を採取して、Affymetrixの遺伝子アレイを用いてマイクロアレイ解析のために処理した。標準的技術を用いて mRNA を調製し、マイクロアレイを用いて、ハイブリダイゼーションのために cDNA を産生している。マイクロアレイを読み取り、データは専有 Affymetrix ソフトウェアにより解析した。遺伝子は制御されている。

【0093】

実施例 4

アゴニストまたはアンタゴニストの機能に関する IL40 配列変異型の評価。受容体発現細胞の機能的応答を使用して、アゴニストまたはアンタゴニストを監視することができる。この目的を達成するために、アゴニストまたはアンタゴニストのいずれか一方を用いて受容体発現細胞をインキュベートし、qPCRによりIL40 応答遺伝子の発現を監視することができる。これらの遺伝子の量により、IL40 がその受容体に結合できるか否かが示される。キラー細胞は、これらのキラー細胞においてIL40 によって誘導される遺伝子と同一の遺伝子誘導するIL40 アゴニストを用いてインキュベートする。IL40 及びそれぞれの候補アンタゴニストを用いてキラー細胞をインキュベートした場合、アンタゴニストにより、これらのバイオマーカー遺伝子の誘導をブロックするものとする。

【0094】

実施例 5

受容体構造の同定の予測的実施例。サイトカインの受容体は、いくつかのタンパク質鎖から構成され得る。良好な結果をもたらす確立された方法を使用して、後述のようないくつかの可能な方法を使用してIL40 受容体を同定することができる。

【0095】

方法 A : 種子方法、cDNA ライブラリ、及びクローン結合試験。cDNA ライブラリにより、IL40 に結合することが既知の細胞を調製することができる。いずれの細胞がIL40 に結合するかは、IL40 を放射能タグで標識し、ラジオイムノアッセイを実施することによって決定することができる。別の方法としては、His-タグIL40 を使用して、細胞に結合することができ、また、抗-His 抗体を使用して、受容体を発現する細胞へのサイトカインの結合を検出することができる。His の代わりにFLAGなどの他の標識を使用することができる。一旦、受容体を発現する細胞が同定されると、これらの細胞のcDNA ライブラリを作製することができ、HEK293 またはBAF3 細胞などの細胞をcDNA ライブラリークローンのプールにより形質移入することができる。現在、IL40 に結合するこれらの細胞は、上述のとおり監視することができる。蛍光性標識細胞は、フローサイトメトリーにより選別することができ、mRNA の供給源として使用するように培養することができる。このmRNA を使用して、IL40 受容体鎖の発現も担う所与の細胞に形質移入されたライブラリからcDNA をクローニングすることができる。cDNA 構造体における特定の配列を使用して、その細胞中に見出されるライブラリcDNA の他に、PCR用にプライマーをデザインすることができる。IL40 受容体が構成される鎖の数とは関係なく、本方法を使用することができ、唯一の相違点は、陽性細胞が同定される頻度である。

【0096】

方法 B : 生化学的方法、リガンドの標識及び結合複合体の単離。このリガンドをHis 若しくはFLAG (またはその他)などのタグにより標識し、IL40 受容体を発現する細胞由来の膜を用いてインキュベートすることができる。さまざまな洗剤を添加して、受容体を結合し、抗-His または抗-Flag 抗体により免疫沈降させたゲル中で複合体を奏功させることができるリガンドの能力を最適化することができる。この方法は、IL40 受容体が有する鎖の数に関係なく使用するものとする。得られた免疫沈降バンドを単離して、配列を決定し、パイオインフォマティクスを使用して、各タンパク質をコードする遺伝子の同一性を判定することができる。

【0097】

10

20

30

40

50

方法 C : 遺伝的方法 ; 2 ハイブリッドシステム。IL40 相互作用タンパク質は、2 つの酵母菌ハイブリッド系を用いて同定することができる。IL40 は、融合タンパク質 (例えば、GALBD) として調製し、その潜在的に相互作用するタンパク質は、GALAD で標識された融合タンパク質として調製することができる。この場合、IL40 は「餌」であり、相互作用タンパク質は「餌食」である。サッカロマイセス・セレビシエにおいてこの系の試験を行い、この酵母菌系は、相互作用タンパク質により報告された遺伝子 (例えば、LacZ) の転写を招くことになる。LacZ 遺伝子に発現する酵母菌は、2 つのタンパク質の良好な相互作用 (相補性) が発現する酵母菌である。この系により、IL40 受容体を構成するいくつかのタンパク質を同定することができる。

【0098】

実施例 6

抗体の産生

方法 A : マウスまたはウサギポリクローナル ; 免疫的選択。抗体は、組換え型ヒト、マウスまたはラット IL40 により動物を免疫化することにより、作製することができる。ヒツジ、ヤギ、ロバまたはウマは、免疫化することができる。いくつかの免疫化量を用いることができ、また、抗体の作製は、ELISA によって監視することができる。一旦所望の応答が得られると、免疫化させた動物を出血させることにより、また血清を得ることにより、抗体を採取することができる。

【0099】

方法 B : マウスまたはラットモノクローナル抗体。マウスを IL40 により免疫化し、マウスの応答を監視し、かつ IL40 に対して強い応答を示すものを選択することによって、ヒト IL40 に対するモノクローナル抗体を作製することができる。脾臓を得て、骨髄腫細胞に対してポリエチレングリコールまたは類似の融合試薬により融合して、ハイブリドーマを産生する。得られたハイブリドーマをインビトロで成長させ、HAT 培養液を用いて選択し、ハイブリドーマを選択的に成長させることができる。得られたハイブリドーマをクローン化し、産生された抗体は、ELISA、ウエスタン、FACS または免疫組織化学的方法によりスクリーニングすることができる。

【0100】

ファージディスプレイを用いる抗体の作製。マウスをヒト IL40 により免疫化し、これらの脾臓を使用して、ファージディスプレイライブラリを生成する。その後、組換え型 IL40 に結合する能力に関して、このライブラリをスクリーニングする。良好なファージディスプレイクローンを同定し、抗体の結合部位の配列情報を得るためにこれらの配列を得る。分子生物学技術を用いて得られた抗体に遺伝子操作を行い、適切な完全ヒト抗体とすることができる。

【0101】

実施例 7

サイトカインの発現のための核酸構造体

方法 1 : ヒトまたはマウス由来の細胞、IL40 mRNA の発現を使用して、固定オリゴ-dT を用いる RT-PCR を実施することができる。次に IL40 のためにデザインされたプライマーを用いて、IL40 cDNA を増幅することができる。この cDNA を哺乳類、細菌または昆虫プラスミドベクターなどの高発現ベクターに挿入することができる。各系では、IL40 遺伝子を含むこの cDNA を適切な受容体細胞に挿入して、その細胞が IL40 タンパク質を産生することができるようにインキュベートすることができる。これらの細胞の上清を採取して、生化学的方法を用いて IL40 を精製するために使用する。ヒト IL40 cDNA 配列 (配列番号 4) を図 21 に示す。

【0102】

方法 2 : 方法 1 と同様ではあるが、方法 1 にはないエクソン/イントロンに特異的なプライマーをデザインすることによって、IL40 mRNA のクローニング/ライシング変異体のクローニングを行う。

【0103】

10

20

30

40

50

方法3：標識遺伝子またはレポーター遺伝子をコードする配列を挿入して、融合タンパク質を作製することができる点以外は方法1と同様である。融合タンパク質を使用して、IL40産生細胞を検出することができる。ウェスタンブロット法または親和性精製では、標識融合タンパク質も使用することができる。

【0104】

方法4：プロモーターを異なる遺伝子の高誘導性または高活性プロモーターと置換することができる点以外は、方法1と同様である。これにより、最終発現系において導入遺伝子の発現を制御することができる。

【0105】

実施例8

IL40タンパク質の作製及び精製のための上記核酸構造体の使用

方法1：陽性または陰性選択剤（ネオマイシン / ガラクトシダーゼ / GFP）と共にIL40cDNAインサートを含むプラスミドベクター構造体を使用して、IL40cDNAが挿入されるベクターに依存して、哺乳類（HEK、HELAなど）細胞株、昆虫細胞または細菌に形質移入することができる。プラスミドを発現する形質転換 / 形質移入細胞は、正の選択または負の選択を行い、組換え型タンパク質を産生することのない細胞を除去することができる。高用量組換え型IL40は、形質移入細胞 / 形質転換細胞の上清または溶解産物から直接得ることができる。

【0106】

方法2：別の方法では、IL40cDNAインサートを含むベクターにより形質移入 / 形質転換した細胞の溶解産物で化学的沈殿を実施して、濃縮量のタンパク質を得ることができる。化学的方法としては、塩、pH、有機溶剤、金属イオン、非イオン性ポリマー、すべてのタンパク質を非特異的に沈殿させる方法が挙げられる。組換え型タンパク質を含む溶解産物は、化学的沈殿剤と共に混合する。沈殿物は、低速遠心分離またはデカントすることにより採取することができる。次により小さい沈殿剤がメンブレンを通過することができるような透析チューブを介して透析することにより沈殿物を再懸濁し、そのチューブ内にタンパク質を保持することができる。沈殿物は、組換え型タンパク質など、濃縮した量の全タンパク質を含むことになる。

【0107】

方法3：別の方法では、抗-IL40抗体または電磁ビーズに連結させた組換え型IL40受容体を含むカラムを用いて、IL40cDNAインサートを含むベクターにより形質移入 / 形質転換した細胞の溶解産物で親和性精製を実施することができる。このカラムを洗浄して、非特異的結合タンパク質を除去することができる一方で、組換え型IL40とビーズに連結された抗体との結合を維持することができる。次に、rIL40と抗-IL40抗体との間の相互作用に影響を及ぼすpHまたは塩の変化を用いて、カラムを溶出させることができる。

【0108】

方法4：別の方法では、IL40cDNAインサートを含むベクターにより形質移入 / 形質転換した細胞の溶解産物は、メンブレンを介するサイズ排除を用いて収集し、濃縮させることができる。30KD未満のタンパク質に対してのみ貫通可能なメンブレンを含む遠心分離カラムを使用することができる。次に、30KD未満のタンパク質を収集し、その中には、形質移入 / 形質転換細胞から作製した高用量の組換え型IL40を含むものとする。

【0109】

方法5：別の方法では、IL40cDNAインサートを含むベクターにより形質移入 / 形質転換した細胞の溶解産物は、高速液体クロマトグラフィーを用いて収集し、精製することができる。各タンパク質が分析物と別々に相互作用するため、組換え型IL40を含む分画を収集することができる。

【0110】

実施例9

10

20

30

40

50

IL40受容体発現細胞の単離 (FACS単離)

方法A：単離、精製。IL40受容体(複数可)を運搬している細胞を判定するために、マウス脾臓を収集し、均質化し、FACSチューブ(0.5e6細胞/チューブ)に入れる。まず、FACSブロックバッファにより30分間氷上で脾細胞をインキュベートする。次に、氷冷FACS洗浄により1回細胞を洗浄して、組換え型His-タグIL40(10µg/ml)で30分間氷上でインキュベートする。その後、細胞を2回洗浄し、ウサギ抗-Hisタグ抗体(1:500希釈)で氷上で30分間インキュベートする。その後、細胞を2回洗浄し、FITC、イソタイプ対照または他の細胞表面染色抗体に共役結合されたヤギ抗-ウサギ二次抗体で30分間インキュベートする。この実験から、IL40はB細胞に結合し、陽性対照として使用できることがわかる。

10

【0111】

標識細胞は、FITCのこれらの発現をベースとしたフローサイトメトリーにより選別することができる。選別した細胞は、IL40受容体を発現するものとする。

【0112】

方法B：細胞集団からの枯渇。毒素で標識したIL40(例えば、抗体薬物共役など)を使用して、IL40受容体を発現する細胞を破壊することができる。IL40受容体に対する抗体は、単独または抗体-薬物共役のいずれか一方を同じ目的で使用することもできる。

方法C：動物における細胞の枯渇。抗-IL40受容体モノクローナル抗体の静脈内注射を使用して、IL40受容体-発現細胞を枯渇させることができる。抗体は、「裸」抗体であるか、または抗体薬物共役であってもよい。

20

【0113】

実施例10

IL40の影響を発見するためのIL40トランスジェニックまたはノックアウトマウスの使用。IL40^{-/-}マウスを使用して、IL40の機能を調査することができる。このマウスを公表した(Tang, T. et al. A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins, 2010. Nat. Biotechnol. 7: 749-55)。観察された唯一の表現型は、マウスを免疫化したとき、血清中でIgG1が上昇した。このマウス由来の免疫組織を得ることができ、異なる剤(T細胞では抗-CD3及び抗-CD28; B細胞ではリポポリサッカリド(LPS)または抗-CD40及びIL4; 単球ではLPS)により活性化することができる。次にマイクロアレイ分析を行って野生型とIL40^{-/-}組織との間に特異的に発現する遺伝子を同定することができる。さまざまな組織のフローサイトメトリーによりマウスも表現型となっているか、または血液化学検査並びに血球計数を実施することができる。癌、自己免疫疾患または感染性疾患など、さまざまな疾患モデルでマウスを使用することができる。

30

【0114】

IL40^{-/-}マウスのほかに、マウスの導入遺伝子として、IL40が過剰発現することもあり得る。このため、インビボでのIL40の影響が拡大し、マウスモデルにおけるこのサイトカインの影響を調査する。この調査を行うために、マウスの胚の単一細胞への前核の注入により導入遺伝子を導入し、ゲノム内に集約させる。遺伝子は、遺伝子の発現がトリガーされ得るプロモーターの制御下にある。インビボでのIL40の過剰発現により、このサイトカインのインビボでの影響を理解する。得られたトランスジェニックIL40マウスの表現型により、インビボでのその機能を理解することができる。

40

【0115】

参考文献

以下の公開は、参照により本明細書に組み込まれる。

1. Oppenheim J J. Cytokines: past, present, and future. International journal of hematology 2001; 74(1): 3-8.

50

2. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *European journal of immunology* 2007;37 Suppl 1:S34-45.
3. Shi Y, Ullrich SJ, Zhang J, Connolly K, Grzegorzewski KJ, Barber MC, et al. A novel cytokine receptor-ligand pair Identification, molecular characterization, and in vivo immunomodulatory activity. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(25):19167~76. 10
4. Zou Q, Wang Z, Guan X, Liu B, Wu Y, Lin Z. An approach for identifying cytokines based on a novel ensemble classifier. *BioMed research international*. 2013:2013:686090.
5. Lee J, Hever A, Willhite D, Zlotnik A, Hevezi P. Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(10):1356~8. 20
6. Roth RB, Hevezi p, Lee J, Willhite D, Lechner SM, Foster AC, et al. Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics*. 2006;7(2):67-80.
7. Luu VP, Hevezi P, Vences-Catalan F, Maravillas-Montero JL, White CA, Casali P, et al. TSPAN33 is a novel marker of activated and malignant B cells. *Clinical Immunology*. 2013;149(3, Part B):388~99. 30
8. Ioannidou E. Therapeutic modulation of growth factors and cytokines in regenerative medicine. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(19):2397~408.
9. Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, Furlonger C, Vesely S, Bernstein A, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(12):1599~611. 40
10. Clark HF, Gumey AL, Abaya E, Baker K, Baldwin D, Brush J, et al. The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome research*. 2003;13(10):2265~70.
11. Xu Z, Fulop Z, Wu G, Pone EJ, Zhang J 50

- , Mai T, et al. 14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5'-AGCT-3'-rich switch regions for class switch recombination. *Nature structural & molecular biology*. 2010; 17(9):1124~35.
12. Loignon M, Perret S, Kelly J, Boulais D, Cass B, Bisson L, et al. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. *BMC biotechnology*. 2008;8:65. 10
13. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annual review of immunology*. 2006;24:657~79.
14. Rosenberg BR, Papavasiliou FN. Beyond SHM and CSR: AID and related cytidine deaminases in the host response to viral infection *Advances in immunology* 2007;94:215~44.
15. Lycke NY, Bemark M. The role of Peyer's patches in synchronizing gut IgA responses. *Frontiers in immunology* 2012;3:329. 20
16. Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, Ikuta K, Honjo T. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature*. 2001;413(6856):639~43.
17. Park SR, Zan H, Pal Z, Zhang J, Al-Qahatani A, Pone EJ, et al. HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation *Nature immunology*. 2009;10(5):540~50. 30
18. Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, et al. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature*. 2007;448(7156):929~33. 40
19. Chen L, Chen Z, Baker K, Halvorsen EM, da Cunha AP, Flak MB, et al. The short isoform of the CEACAM1 receptor in intestinal T cells regulates mucosal immunity and homeostasis via Tfh cell induction. *Immunity* 2012;37(5):930~46.
20. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deamin 50

- ase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000; 102(5):553~63.
21. Rada C, Di Noia JM, Neuberger MS. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Molecular cell*. 2004; 16(2):163~71.
22. Cato MH, Chintalapati SK, Yau IW, Omori SA, Rickert RC. Cyclin D3 is selectively required for proliferative expansion of germinal center B cells. *Molecular and cellular biology*. 2011; 31(1):127~37. 10
23. Durandy A, Kracker S, Fischer A. Primary antibody deficiencies. *Nature reviews Immunology*. 2013; 13(7):519~33.
24. Bergqvist P, Gardby E, Stensson A, Beemark M, Lycke NY. Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *Journal of immunology*. 2006; 177(11):772~83. 20
25. Liu J, Karypis G, Hippen KL, Vegoe AL, Ruiz P, Gilkeson GS, et al. Genomic view of systemic autoimmunity in MRL/lpr mice. *Genes and immunity*. 2006; 7(2):156~68.
26. Pruitt KD, Harrow J, Harte RA, Wallin C, Diekhans M, Maglott DR, et al. The consensus coding sequence (CCDS) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes. *Genome research*. 2009; 19(7):1316~23. 30
27. Harte RA, Farrell CM, Loveland JE, Suner MM, Wilming L, Aken B, et al. Tracking and coordinating an international curation effort for the CCDS Project. *Database: the journal of biological databases and curation*. 2012; 2012:bas008.
28. Gray KA, Daugherty LC, Gordon SM, Seal RL, Wright MW, Bruford EA. Genenames.org: the HGNC resources in 2013. *Nucleic acids research*. 2013; 41(Database issue):D545~52. 40
29. Burkhardt AM, Tai KP, Flores-Guiterrez JP, Vilches-Cisneros N, Kamdar K, Barbosa-Quintana O, et al. CXCL17 is a mucosal chemokine elevated in idiopathic pulmonary fibrosis that exhibits broad antimicrobial activity. *Journal of immunology*. 2012; 188(12):6399-406. 50

30. Cazac BB, Roes J. TGF-beta receptor controls B cells responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 2000;13(4):443~51.
31. Gros MJ, Naquet p, Guinamard RR. Cell intrinsic TGF-beta 1 regulation of B cells. *Journal of immunology*. 2008;180(12):8153~8.
32. Klein J, Ju W, Heyer J, Wittek B, Hanke T, Knaus p, et al. B cells-specific deficiency for Smad2 in vivo leads to defects in TGF-beta-directed IgA switching and changes in B cells fate. *Journal of immunology*. 2006;176(4):2389~96. 10
33. Snapper CM, Waegell W, Beernink H, Dasch JR. Transforming growth factor-beta 1 is required for secretion of IgG of all subclasses by LPS-activated murine B cells in vitro. *Journal of immunology*. 1993;151(9):4625~36. 20
34. Wong SC, Oh E, Ng CH, Lam KP. Impaired germinal center formation and recall T-cell-dependent immune responses in mice lacking the costimulatory ligand B7~H2. *Blood*. 2003;102(4):1381~8.
35. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cells survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature immunology*. 2010;11(6):535~42. 30
36. Gohda M, Kunisawa J, Miura F, Kagiya Y, Kurashima Y, Higuchi M, et al. Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *Journal of immunology*. 2008;180(8):5335~43.
37. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature immunology*. 2000;1(6):475~82. 40
38. Vilcek J, Feldmann M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends in pharmacological sciences*. 2004;25(4):201~9.
39. Feldmann M. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(11):3533~6. 50

40. Nakamura RM (1983) Monoclonal antibodies: methods and clinical laboratory applications. Clin Physiol Biochem 1: 160~172.
41. Leenaars M, Hendriksen CF (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. ILAR J 46:269~279.
42. Tomita M, Tsumoto K (2011) Hybridoma technologies for antibody production. Immunotherapy 3:371~380. 10
43. Siegel DL (2002) Recombinant monoclonal antibody technology. Transfus Clin Biol 9:15~22.
44. Glassy MC (1993) Production methods for generating human monoclonal antibodies. Hum Antibodies Hybridomas 4:154~165.
45. Butler M, Meneses-Acosta A (2012) Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. Appl Microbiol Biotechnol 96:885~894. 20
46. Rasmussen SK, Naested H, Muller C, Tolstrup AB, Frandsen TP (2012) Recombinant antibody mixtures: production strategies and cost considerations. Arch Biochem Biophys 526: 139~145.
47. Marichal-Gallardo PA, Alvarez MM (2012) State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: process trends in design and validation. Biotechnol Prog 28:899~916. 30
48. Chon JH, Zarbis-Papastoitsis G (2011) Advances in the production and downstream processing of antibodies. N Biotechnol 28:458~463.
49. DiFede G, Bronte G, Rizzo S, Rolfo Cervetto C, Coccorullo G, et al. (2011) Monoclonal antibodies and antibody fragments: state of the art and future perspectives in the treatment of non-haematological tumors. Expert Opin Biol Ther 11:1433~1445. 40
50. Chiarella P (2011) Production, novel assay development and clinical applications of monoclonal antibodies. Recent Pat Anticancer Drug Discov 6:258~267.
51. Kaneko E, Niwa R (2011) Optimizing therapeutic antibody function: progress with Fc domain engineering. BioDrugs 25:1~1 50

1。

52. Sczakiel G (2000) Theoretical and experimental approaches to design effective antisense oligonucleotides. *Front Biosci* 5: D194~201。

53. Far RK, Leppert J, Frank K, Sczakiel G (2005) Technical improvements in the computational target search for antisense oligonucleotides. *Oligonucleotides* 15: 223~233。

54. Pascal, L.E., et al, *BMC Genomics* 2008, 9:246。

55. Gry, M. et al, *BMC Genomics* 2009, 10:365。

56. Bakhtiyari S, Haghani K, Basati G, Karimfar MH (2013) siRNA therapeutics in the treatment of diseases. *Ther Deliv* 4:45~57。

57. Peek AS, Behlke MA (2007) Design of active small interfering RNAs. *Curr Opin Mol Ther* 9:110~118。

58. Baranova A, Bode J, Manyam G, Emelianenko M (2011) An efficient algorithm for systematic analysis of nucleotide strings suitable for siRNA design. *BMC Res Notes* 4: 168。

59. Juliano, R. et al., *Nucleic Acids Res.* 2008 July; 36(12):4158-4171。

【0116】

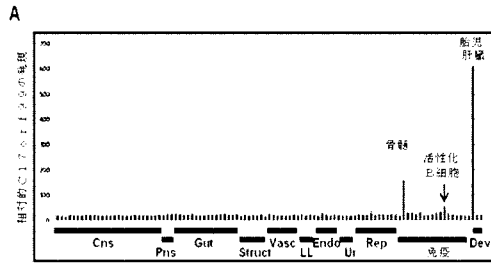
本発明は、好ましい実施態様に関連して記載してきか、当業者が速やかに理解するように、本発明の原理及び範囲を逸脱することなく変化形態及び変形形態を利用し得ることを理解すべきである。したがって、こうした変化形態は、本発明及び次の請求項の範囲内で実施され得る。

10

20

30

【図 1 A】



【図 1 B】

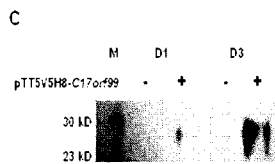
B

```

MELPDLFQANLASSSESDFEET
EVVSHAVYELFFDQKALTCQ
AFQPPPTLSGATGKVAIKM
TRPAPRNLYLTISSFLTYFC
VASSYDARHDSARLDMHAEVLS
LFLSELPAFTLCPGACPPVEMIC
QASSSFFTHSLDLSQVLDGDF
FCHEQWAFPLFDQSCMFLCA
ALNAQVHSAITVPPSDQVMEC
VQDFLESLALPLVDTPLGSEDF
GGFFNLSGFCRVAAM
(配列番号1)

```

【図 1 C】



【図 3】

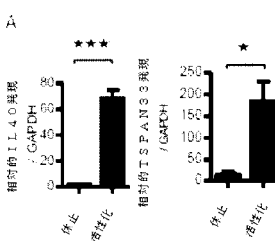
ヒト 23 EEITPVVSIAYKLVLEVPKRWLITCCAPQPEPPITYSLOGTRNIKVAKVVKTHEPAS 82
 EE T ++IAYKLVLEVP+ R VLITC AP+ PITYSL ++ I VAKVVK PAS
 マウス 19 EEQTGEGITAYKLVLEVPQSRVLIITCDAPASQPIITYSLLASRGILVAKVVDHSDVPAS 78

ヒト 85 FNLNVLKSSPDLLTYFCWASSTSGAHVDSARLQMHWELWSKPYSELANFTLQDRGAGP 142
 FN+N+T+KSSPDLLTY C A+S SG + S+RLQM+ ELW+KPYV+L+A+F L+ +GP
 マウス 79 FNINITIKSSPDLLTYSCQRTSNSTGTPSSKLMQIQELMAKPYVQLQADFVLRHGDSPG 138

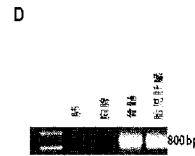
ヒト 143 RVEMICQASSGSPPIITNSLIGKDGQVHLQRFPCRQFANFSEFLPQSQTSDFWFCQAANNM 202
 VE+ C ASSGSEPI T L+G G+V QQRH H +EANFS SQT+ WF C+A N+
 マウス 139 TWELSCCLASSGSPPIITVGVNGGRVLAQQRPLHAKFANFSLPLSQTIGWFQCEAENDYG 198

ヒト 203 VQHSALTWVF 212 (配列番号2)
 V SA +P (配列番号4)
 マウス 199 VDSSARIPLF 208 (配列番号3)

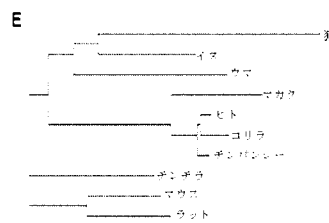
【図 4 A】



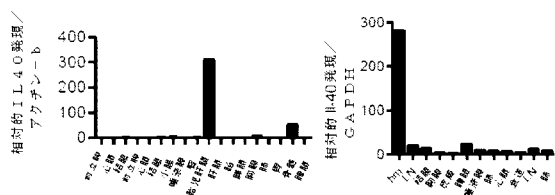
【図 1 D】



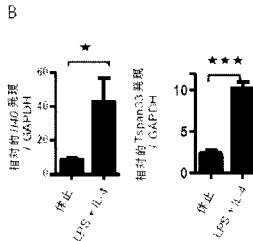
【図 1 E】



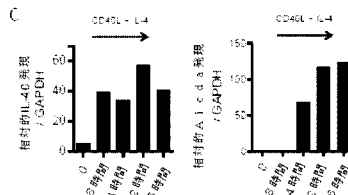
【図 2】



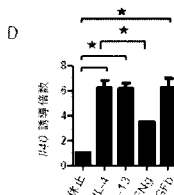
【図 4 B】



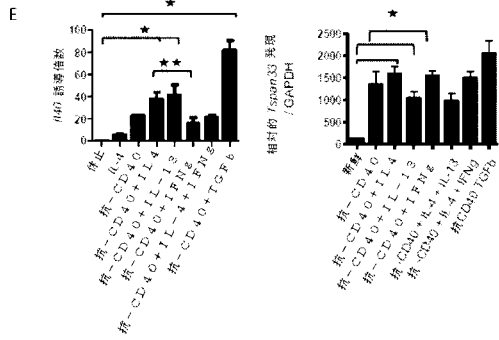
【図 4 C】



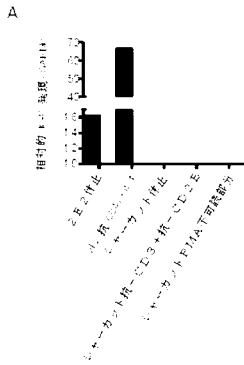
【図 4 D】



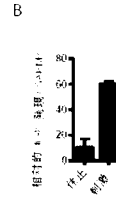
【 図 4 E 】



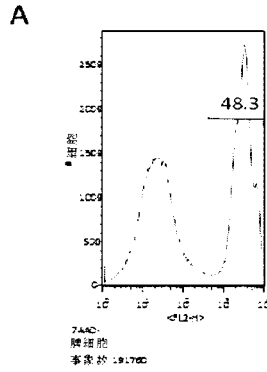
【 図 5 A 】



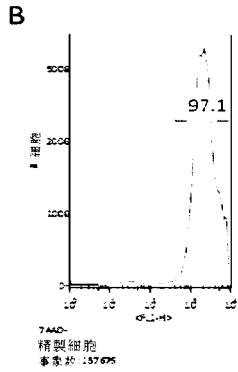
【 図 5 B 】



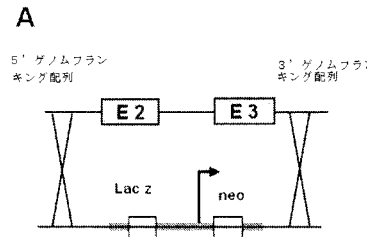
【 図 6 A 】



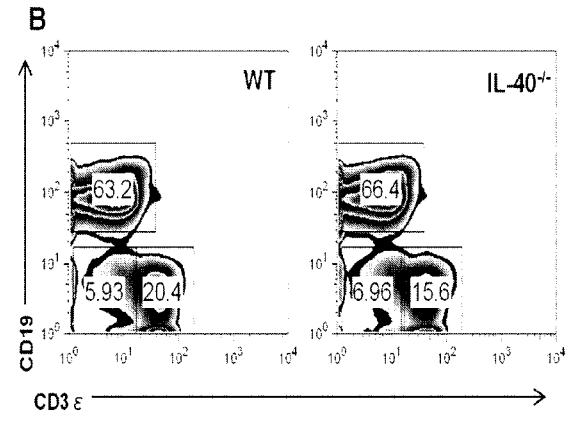
【 図 6 B 】



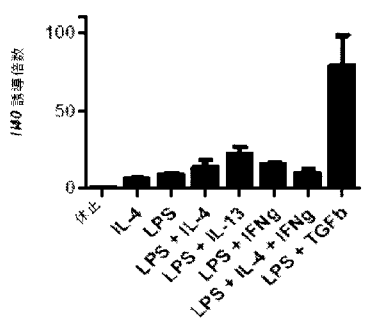
【 図 8 A 】



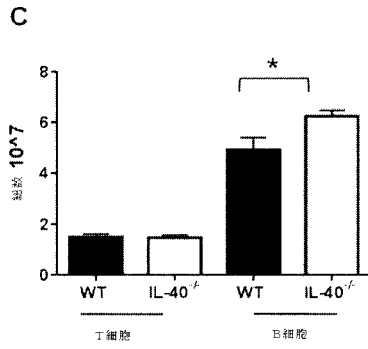
【 図 8 B 】



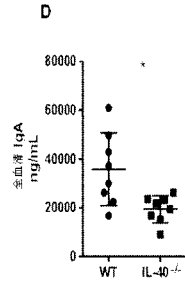
【 図 7 】



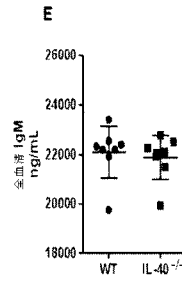
【 図 8 C 】



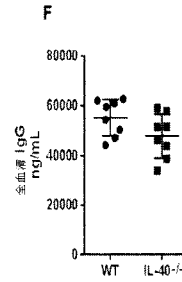
【 図 8 D 】



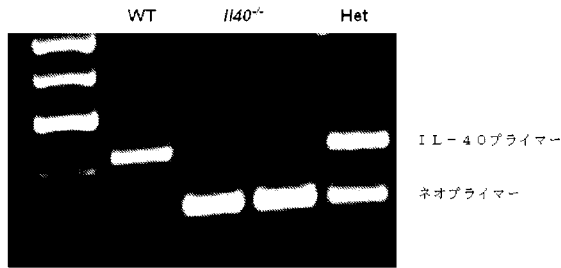
【 図 8 E 】



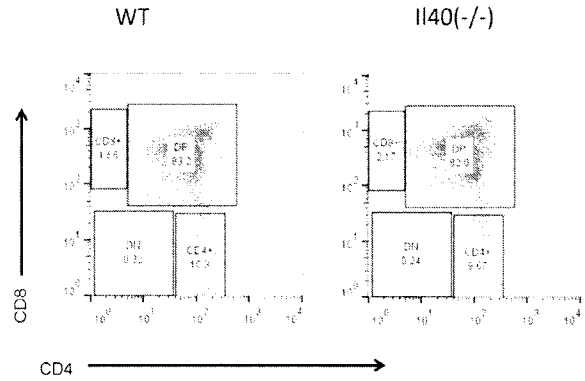
【 図 8 F 】



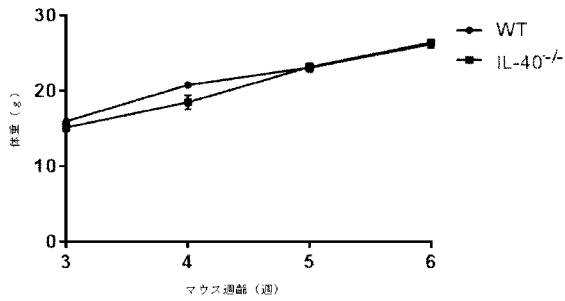
【 図 9 】



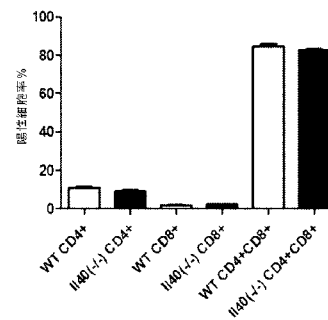
【 図 11 A 】



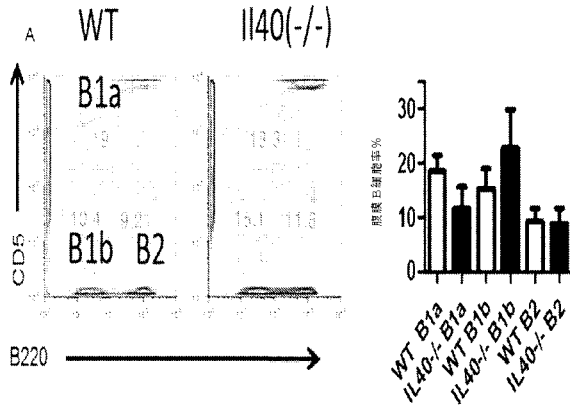
【 図 10 】



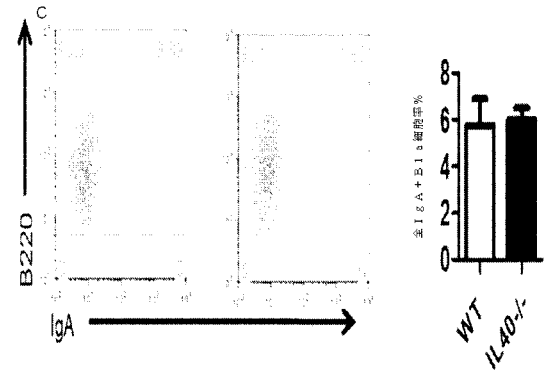
【 図 11 B 】



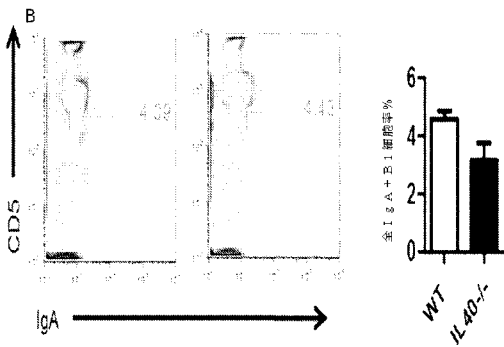
【図 1 2 A】



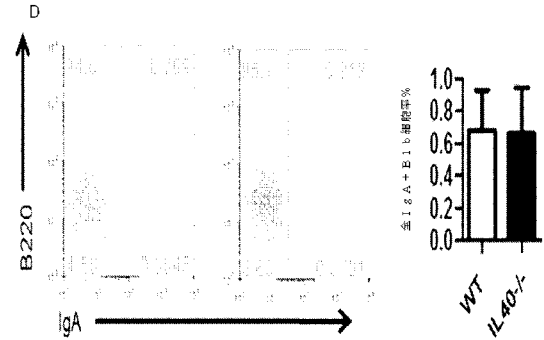
【図 1 2 C】



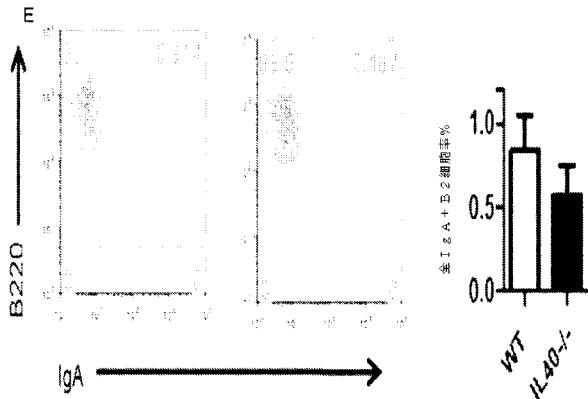
【図 1 2 B】



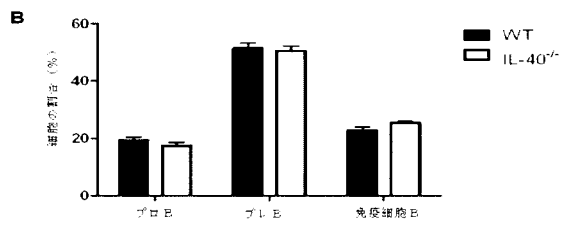
【図 1 2 D】



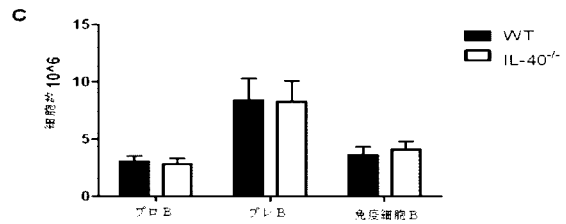
【図 1 2 E】



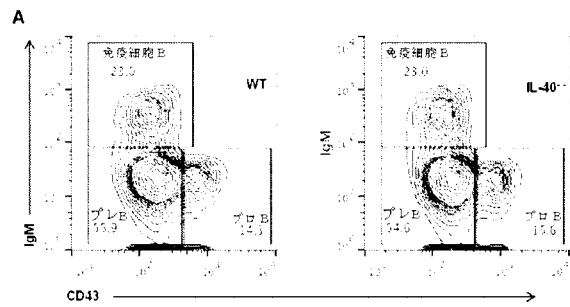
【図 1 3 B】



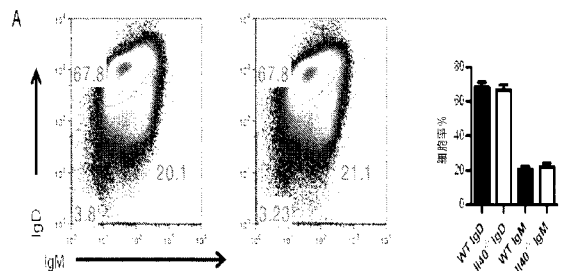
【図 1 3 C】



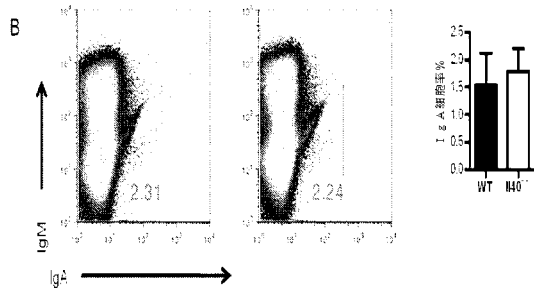
【図 1 3 A】



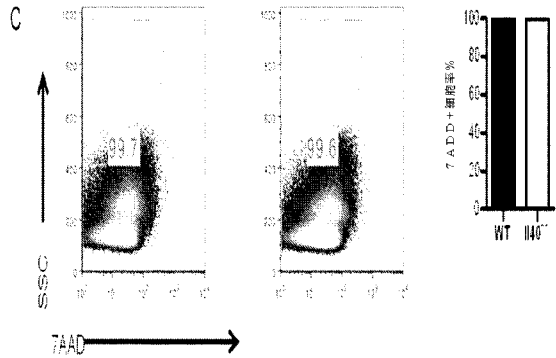
【図 1 4 A】



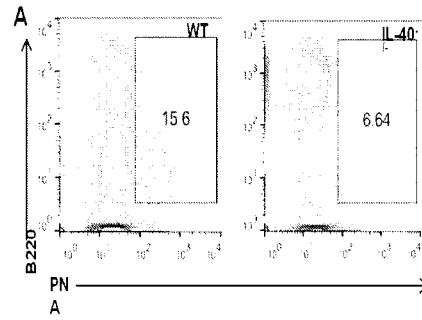
【 図 1 4 B 】



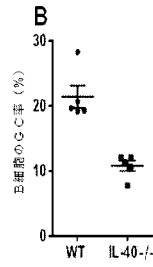
【 図 1 4 C 】



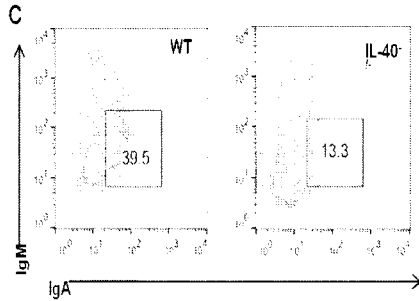
【 図 1 5 A 】



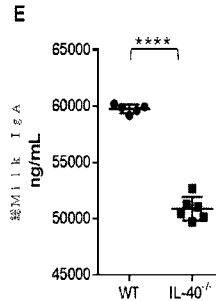
【 図 1 5 B 】



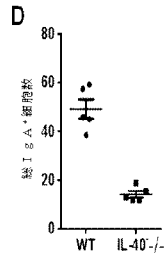
【 図 1 5 C 】



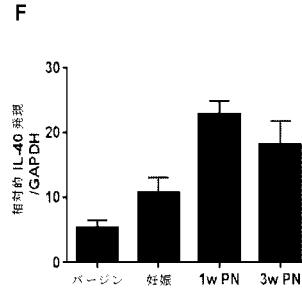
【 図 1 5 E 】



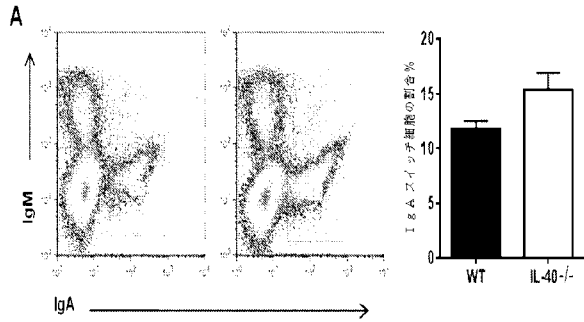
【 図 1 5 D 】



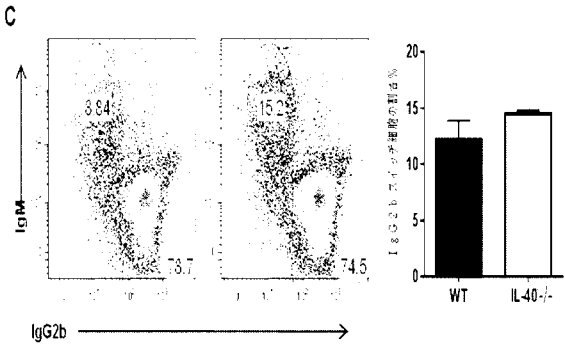
【 図 1 5 F 】



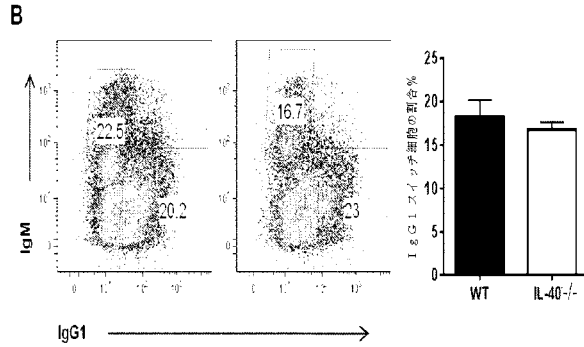
【図 16 A】



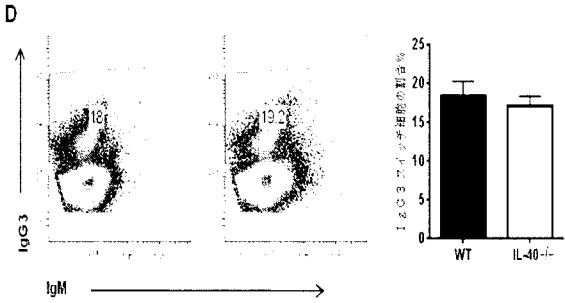
【図 16 C】



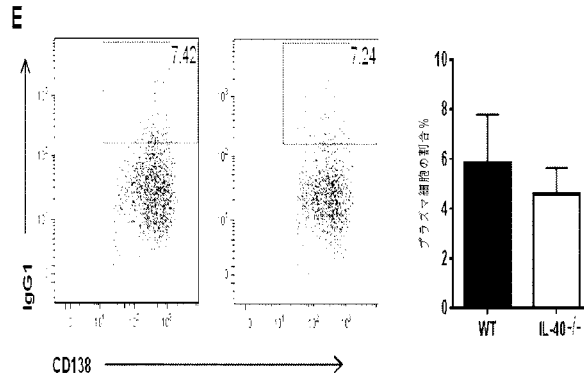
【図 16 B】



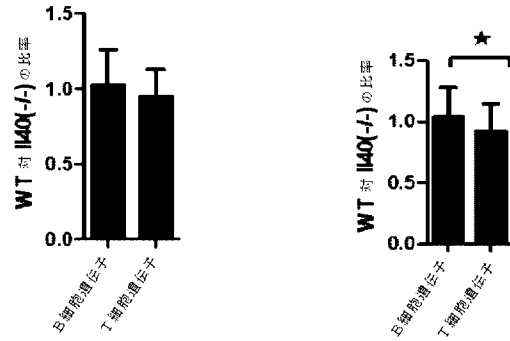
【図 16 D】



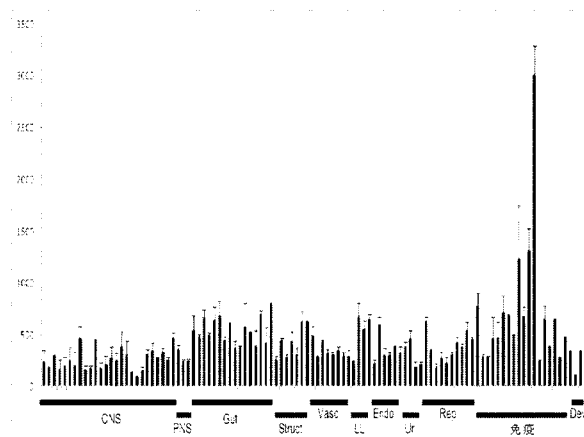
【図 16 E】



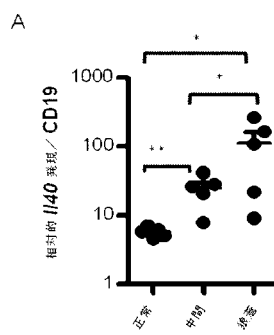
【図 18】



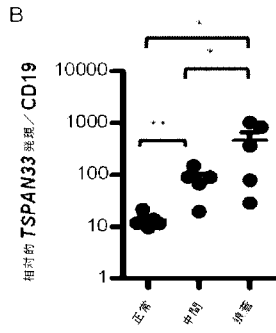
【図 17】



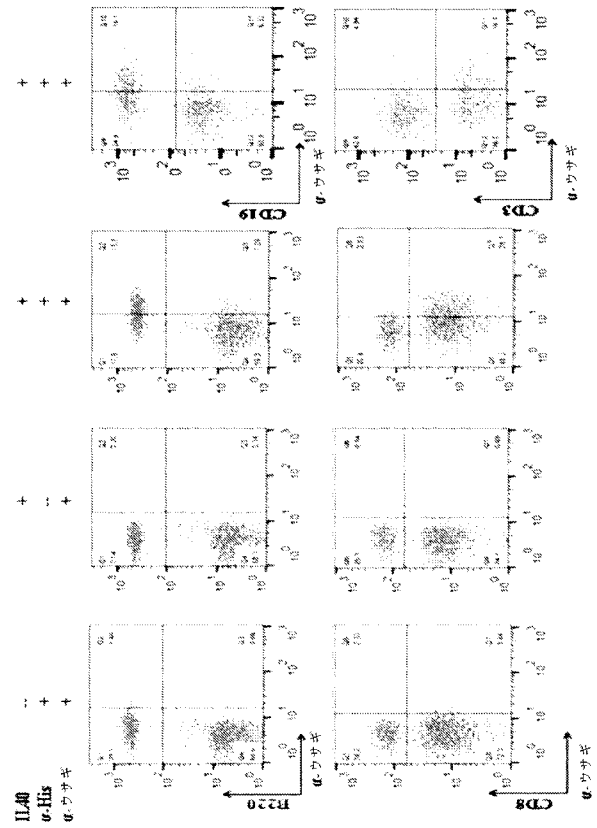
【図 19 A】



【図 19 B】



【図 20】



【図 21】

```

ATGGGGCTACCTGGGCTGTTCTGGTTGGCCGDTGTGGCTGCCAGCAGCTTCTCCA
AGRCAGGGGAGGAAGAAATTAACCTGTGGTCTCATTGCCTACAAAGTCTGG
AAGTTTTCCTCAAAGGGCNGCTGGGTGCTCATAACCTGCTGTGCACCCAGCCACC
ACGAGCCATCAGCTATTCCCTCTGTGGAAATCAAGAACATCAAGGTGGCCAAAGAA
GGTGGTGAAGACCTACGAGCCGGCTCTTTAACTTCAAGTCAACAATCAAGTC
AGTCCAGACCTGCTCACTACTTGTGCTGGGGGTCTTCACTCAAGGTGCCCATG
TGGACAGTGCAGGCTACAGATGCACTGGGAGCTGTGGTCCAAAGCAGTGTCTG
AGCTGGGGCCAACTTCACTTGTGAGGACAGAGGGGCAGGCTCCAGGGTGGAGA
TGATCTGCCAGGCGTCTCGGGCAGCCCACTATCACCACAGGCTGATCGGGAA
GGATGGGCAGGTCCACTGTCAGCAGAGACATGCCACAGGCAGGCTGCCAACTT
CTCTTTCTGCTGAGCCAGACATGGACTGGTCTGGTGCAGGGCTGCAAAACAAC
GCCAATGTCACGACAGGGCCCTACAGTGGTCTCCCAAGGTGTGACAGAGAAG
ATGACAGACTGGCAGGCTCCCTGGAGAGCCCATCTTGCCTTGCCTCTACA
GGAGCCCTCCAGTCTGAGTGAAGAGGAGTTTGGGGGTTTAGGATAGGGAATG
GGGAGGTCAAGAGGACCAAGCCAGCAGCCATGTAG (配列番号5)

```

【配列表】

2016540506000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/66712
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395, C07K 16/00 (2015.01) CPC - A61K 2039/505, A61K 38/00, C07K 2316/96, C07K 2319/00, C07K 2317/24, C07K 2317/92 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) CPC- A61K 2039/505, A61K 38/00, C07K 2316/96, C07K 2319/00, C07K 2317/24, C07K 2317/92 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC- C07K 16/18, C07K 16/241 USPC- 424/130.1, 424/145.1, 424/158.1, 530/387.1, 530/388.23 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google/Scholar: HEVEZI, Peter; Interleukin 40; IL40 C17orf99, antibody, C17 open reading frame 99 GenCore 6.4.1: SEQ ID NO:2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Atlas Antibodies Anti-C17orf99 (December 2012) [Retrieved from the Internet 22 January 2015: < https://atlasantibodies.com/print_datasheet/R28782 >]; pg 1	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 May 2015 (05.05.2015)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">04 JUN 2015</div>
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. 571-273-8300		Authorized officer: <div style="text-align: center;">Lee W. Young</div> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/66712

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims 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. Claims Nos.: 54-59
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
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.

Group I: claims 1, drawn to an antibody against the C17orf99 polypeptide gene product (IL40).

Group II: claims 2, 3, 6-8, 17, 18, 39-45, 49-50 [in part], 51-53, drawn to a method of detecting IL40 in a sample using the antibody of claim 1 as a detection agent.

Group III: claims 4, 5, 46-48 [in part], drawn to a method of treating a disease by administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody of claim 1 to neutralize IL40.

..... See Supplemental Sheet to continue

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AUS 14/86712

***** Supplemental Sheet *****

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group IV: claims 9-16, 21-25, drawn to an IL40 peptide, and a method of using said peptide.

Group V: claims 19, 20, drawn to a cell producing the antibody of claim 1.

Group VI: claims 26-38, 46-50 [in part], drawn to a nucleic acid encoding IL40.

The inventions listed as Groups I-VI 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:

Special Technical Features

The inventions of Groups I-V do not include the shared or common technical feature of a nucleic acid encoding IL40, as required by Group VI.

The inventions of Group VI do not include the shared or common technical feature of an anti-IL40 antibody, as required by Groups I-III and V, or an IL40 peptide, as required by Group IV.

The inventions of Groups I, III, V, and some invention of Group II do not include the shared or common technical feature of an IL40 peptide, as required by Group IV.

The inventions of Group IV do not include the shared or common technical feature of an anti-IL40 antibody, as required by Groups I-III and V.

The inventions of Group I do not include the shared or common technical feature of a method of using the antibody of claim 1 as a detection agent, as required by Group II, or a method of treating a disease by administering an antibody of claim 1, as required by Group III, or a cell producing the antibody of claim 1, as required by Group V.

The inventions of Group II do not include the shared or common technical feature of a method of treating a disease by administering an antibody of claim 1, as required by Group III, or a cell producing the antibody of claim 1, as required by Group V.

The inventions of Groups III and IV do not include the shared or common technical feature of using the antibody of claim 1 as a detection agent, as required by Group II.

The inventions of Group III do not include the shared or common technical feature of a cell producing the antibody of claim 1, as required by Group V.

The inventions of Group V do not include the shared or common technical feature of a method of treating a disease by administering an antibody of claim 1, as required by Group III.

Common Technical Features

The inventions of Groups I-III and V share the technical feature of an antibody against the C17orf99 polypeptide gene product (IL40). However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by a publication titled "Anti-C17orf99" (December 2012) [Retrieved from the Internet 22 January 2015: <https://atlasantibodies.com/print_datasheet/R28782>] (hereinafter "Anti-C17orf99") disclosing Polyclonal Isotype IgG antibody specifically binding the C17orf99 polypeptide wherein the antibody is an IgG (pg 1, "Anti-C17orf99... Gene Description chromosome 17 open reading frame 99... Clonality Polyclonal... Isotype IgG... Antigen Sequence Recombinant Protein Epitope Signature Tag (PrEST) antigen sequence... Purification Method Affinity purified using the PrEST antigen as affinity ligand... Specificity Specific reactivity against target PrEST antigen validated on protein array with 384 randomly selected antigens"). As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

Some inventions of Group II, and the inventions of Groups IV and VI share the technical feature of the C17orf99 (IL-40) polypeptide. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by a UniProt Submission Q6UX52 (16 October 2013) [Retrieved from the Internet 22 January 2015: <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6UX52.txt?version=64>>] (hereinafter "UniProt") disclosing the C17orf99 polypeptide (pg 1, "Full=Uncharacterized protein C17orf99"; pg 2, amino acid sequence). As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I-VI therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 7
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 7 5
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
A 6 1 K 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	1 0 5
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
	A 6 1 K 45/00	
	A 6 1 K 35/76	
	A 6 1 K 31/7088	
	A 6 1 K 31/7105	
	A 6 1 K 9/107	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ズロトニク, アルバート
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サンディエゴ, ドレークウッド テラス 4 8
 6 3

(72)発明者 ヘヴェジ, ピーター
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 2 4 エンシニータス, コテージ グレン コート
 1 6 7 3

(72)発明者 ルー, ヴァン, フィ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 7 8 0 タスティン, ホルト アベニュー 1 4 4 6 2
 , ユニット エー

(72)発明者 ブルクハルト, アマンダ, エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 90802 ロングビーチ, ウェストシーサイドウェイ 411, #1403

(72)発明者 ウシャチ, イリーナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92663 ニューポートビーチ, シックスティーンズストリート 2120, アパートメントアール - 304

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA72X AA90X AA90Y AB01 AB02 AC14 BA01 BA08 BD32
CA24 CA25 CA44
4C076 AA17 AA19 AA94 AA95 CC04 CC07 CC15 CC16 CC18 CC27
CC47 FF31
4C084 AA13 AA19 MA22 MA24 NA14 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA681
ZA682 ZA751 ZA752 ZA761 ZA762 ZB071 ZB072 ZB111 ZB112 ZB151
ZB152 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C085 AA13 AA14 CC22 CC23 DD62 EE01 EE03
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA22 MA24 NA14
ZA66 ZA68 ZA75 ZA76 ZA89 ZB07 ZB15 ZB26 ZB27
4C087 BC83 MA22 MA24 NA14 ZA66 ZA68 ZA75 ZA76 ZA89 ZB07
ZB15 ZB26 ZB27
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA02 DA75 DA76 EA20
FA74

专利名称(译)	鉴定新的B细胞细胞因子		
公开(公告)号	JP2016540506A	公开(公告)日	2016-12-28
申请号	JP2016533639	申请日	2014-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	ズロトニクアルバート ヘヴェジピーター ルーヴァンフィ ブルクハルトアマンダエム ウシャチイリーナ		
发明人	ズロトニク,アルバート ヘヴェジ,ピーター ルー,ヴァン,フィ ブルクハルト,アマンダ,エム. ウシャチ,イリーナ		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/24 C07K14/54 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/19 C07K19/00 A01K67/027 G01N33/53 G01N33/543 A61K39/395 A61K9/127 A61K9/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P29/00 A61P35/02 A61P35/00 A61P37/02 A61K48/00 A61K45/00 A61K35/76 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K9/107		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 C07K14/54 C07K16/244 G01N33/56972 G01N33/6869 C07K2317/76 C12N15/1136 C12N2310/14 C12N2320/30 G01N2333/54		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.C C07K16/24 C07K14/54 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/19 C07K19/00 A01K67/027 G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/543.575 G01N33/543.541.B A61K39/395.D A61K39/395.U A61K9/127 A61K9/00 A61P1/04 A61P1/16.105 A61P1/16 A61P11/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P29/00.101 A61P29/00 A61P35/02 A61P35/00 A61P37/02 A61K48/00 A61K45/00 A61K35/76 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K9/107		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/BD32 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/AA17 4C076/AA19 4C076/AA94 4C076/AA95 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC15 4C076/CC16 4C076/CC18 4C076/CC27 4C076/CC47 4C076/FF31 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/MA22 4C084/MA24 4C084/NA14 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA681 4C084/ZA682 4C084/ZA751 4C084/ZA752 4C084/ZA761 4C084/ZA762 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA22 4C086/MA24 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA75 4C086/ZA76 4C086/ZA89 4C086/ZB07 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C087/BC83 4C087/MA22 4C087/MA24 4C087/NA14 4C087/ZA66 4C087/ZA68 4C087/ZA75 4C087/ZA76 4C087/ZA89 4C087/ZB07 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	藤本登 日东真嗣		
优先权	61/906855 2013-11-20 US		

外部链接

Espacenet

摘要(译)

提供了包括IL40的组合物和方法，IL40是由活化的B细胞产生的新型细胞因子。该组合物包括：a) 抗IL40抗体，IL40肽和IL40蛋白；b) 编码IL40基因和cDNA序列的核酸；和c) 其药物组合物。所述方法包括治疗方法，诊断方法和分离方法。[选择图]图2

大静脈	24.6
気管	17.6
気管支	19.3
肝	18.3
高野皮質	15.5
脾臓	24.7
L 亜体腺	19.8
中状腺	16.6
腎臓	19.0
腎臓皮質	17.1
腎臓髄質	19.5
尿管	16.4
卵巣	16.1
精巣	16.5
子宮	22.5
子宮筋層	20.7
子宮内膜	18.9
頰部	26.2
頰	19.9
腺	21.5
外陰	20.4
乳腺	18.7
乳腺断面	22.7
陰莖	20.3
前立腺	15.3
骨髄	156.0
胸腺	27.5
リンパ節	26.0
脾臓	21.5
扁桃	28.2
扁桃	18.4
PBMC 培地 BB	20.0
PBMC PMA+イソマイシン	20.0
単球休止-30 時間	22.4
単球 LPS+IFNγ-30 時間	26.8
B 細胞休止-30 時間	31.9
B 細胞抗 CD40+IL4-30 時間	52.0
T 細胞休止-30 時間	23.6
T 細胞抗 CD3-30 時間	19.1
CD4+	20.3
CD4+抗 CD3+抗 CD28	19.5
CD8+	19.8
CD8+抗 CD3+抗 CD28	17.6
胎児 肝臓	608.7
胎児 脳	18.7
胎盤	20.6

組織及び臓器系にしたがって作製された B