(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2008-519599
(P2008-519599A)
(43)公表日　平成20年6月12日(2008.6.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B024
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B064
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B	4B065
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	4C084

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 104 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-541149 (P2007-541149)
(86)(22)出願日　平成16年11月12日 (2004.11.12)
(85)翻訳文提出日　平成19年7月17日 (2007.7.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/037612
(87)国際公開番号　WO2006/054961
(87)国際公開日　平成18年5月26日 (2006.5.26)

(71)出願人　596168317
ジェネンテック・インコーポレーテッド
ＧＥＮＥＮＴＥＣＨ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフオルニア・９４０８０－４９９０・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・１
(74)代理人　100109726
弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　100101199
弁理士　小林　義教
(72)発明者　クラーク，　ヒラリー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１３１，　サン　フランシスコ，　ノエ　ストリート　１５０４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫関連疾患の治療のための新規組成物と方法

(57)【要約】
本発明は、配列番号７に示すヌクレオチド配列のコード配列を含んでなる単離された核酸及びこの配列に相同な核酸によりコードされる新規のポリペプチドを含有してなる組成物と、免疫関連疾患、リンパ腫、炎症性腸疾患及び移植細胞拒絶反応などの診断及び治療のための該組成物の使用方法に関する。さらに、本発明は、哺乳動物において抗原に対する免疫応答を増強ないしは減弱することを目的とした、前記ポリペプチド並びにそのアゴニスト及びアンタゴニストの使用方法に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
図１（配列番号１）に示すヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列に対して少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する、単離された核酸。
【請求項２】
図２（配列番号２）に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する、単離された核酸。
【請求項３】
図１（配列番号１）に示すヌクレオチド配列の完全長コード配列からなる、単離された核酸。
【請求項４】
図７（配列番号７）に示すヌクレオチド配列のコード配列からなる、単離された核酸。
【請求項５】
図９（配列番号９）に示すヌクレオチド配列のコード配列からなる、単離された核酸。
【請求項６】
請求項１に記載の核酸を含むベクター。
【請求項７】
前記ベクターを用いて形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能にリンクする、請求項６に記載のベクター。
【請求項８】
請求項７に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項９】
ＣＨＯ細胞、大腸菌細胞又は酵母細胞である、請求項８に記載の宿主細胞。
【請求項１０】
請求項９に記載の宿主細胞を、前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを回収することを含む、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの製造方法。
【請求項１１】
図２（配列番号２）に示すポリペプチドのアミノ酸配列に対し、少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有する、単離されたポリペプチド。
【請求項１２】
図８（配列番号８）に示すポリペプチドのアミノ酸配列に対し、少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有する、単離されたポリペプチド。
【請求項１３】
図１０（配列番号１０）に示すポリペプチドのアミノ酸配列からなる、単離されたポリペプチド。
【請求項１４】
異種アミノ酸配列に融合した請求項１１に記載のポリペプチドを含む、キメラ分子。
【請求項１５】
前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列であるか、又は免疫グロブリンのＦｃ領域である、請求項１４に記載のキメラ分子。
【請求項１６】
図２（配列番号２）に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに特異的に結合する抗体。
【請求項１７】
図２（配列番号２）に示すＰＲＯ８７２９９のアミノ酸１－１５５に特異的に結合する抗体。
【請求項１８】
図８（配列番号８）に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有するＰＲＯ８７２９９変異体に特異的に結合する抗体。

【請求項１９】
図１０（配列番号１０）に示すＰＲＯ８７２９９変異体に特異的に結合する抗体。
【請求項２０】
ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合し、ＨＶＥＭ（配列番号４）の相互作用を遮断するが、ＬＩＧＨＴ（配列番号６）の相互作用を遮断しない抗体。
【請求項２１】
ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合し、ＬＩＧＨＴ（配列番号６）の相互作用を遮断するが、ＨＶＥＭ（配列番号４）の相互作用を遮断しない抗体。
【請求項２２】
ＰＲＯ８７２９９アゴニストである、請求項１６に記載の抗体。
【請求項２３】
ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を抑制する、請求項１６に記載の抗体。
【請求項２４】
リンパ腫細胞の増殖を抑制する、請求項１６に記載の抗体。
【請求項２５】
ＮＫ細胞の増殖を抑制する、請求項１６に記載の抗体。
【請求項２６】
モノクローナル抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である、請求項１６に記載の抗体。
【請求項２７】
ハイブリドーマＢｔｉｇ５Ｆ５．１（ＡＴＣＣ寄託番号　　）又はハイブリドーマＢｔｉｇ３Ｂ１．９（ＡＴＣＣ寄託番号　　）によって生成される、単離された抗体。
【請求項２８】
ハイブリドーマＢｔｉｇ５Ｆ５．１（ＡＴＣＣ寄託番号　　）又はハイブリドーマＢｔｉｇ３Ｂ１．９（ＡＴＣＣ寄託番号　　）によって生成された抗体の生物学的活性を有し、生物学的活性が、ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を抑制することである、単離された抗体。
【請求項２９】
抗体断片である、請求項１６に記載の抗体。
【請求項３０】
キメラ又はヒト化抗体である、請求項１６に記載の抗体。
【請求項３１】
成長阻害剤に抱合された、請求項１６に記載の抗体。
【請求項３２】
細胞障害性薬に抱合された、請求項１６に記載の抗体。
【請求項３３】
細胞障害性薬が、抗生物質、放射性同位元素及び核溶解性酵素からなる群より選択される、請求項３２に記載の抗体。
【請求項３４】
細胞障害性薬が毒素である、請求項３２に記載の抗体。
【請求項３５】
毒素が、アウリスタチン、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群より選択される、請求項３４に記載の抗体。
【請求項３６】
毒素が、ＭＭＡＥ（モノメチルアウリスタチンＥ）、ＭＭＡＦ、ＭＭＡＦ－ＤＭＡＥＡ、（ＭＭＡＦ－ジメチルアミノエチルアミン）、ＭＭＡＦ－ＴＥＧ（ＭＭＡＦ－テトラエチレングリコール）、ＭＭＡＦ－ＮｔＢｕ、及びＡＥＶＢ（アウリスタチンＥバレリルベンジルヒドラゾン）、及びＡＦＰ（アウリスタチンＦフェニレンジアミン）からなる群より選択される、請求項３４に記載の抗体。
【請求項３７】
毒素がリンカーによって抗体に共有結合性に付着している、請求項３４に記載の抗体。
【請求項３８】

リンカーが、マレイミドカプロイル（maleimidocaproyl）（ＭＣ）、バリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔ，ｖｃ）、シトルリン（２－アミノ－５－ウレイドペンタン酸）、ＰＡＢ（ｐ－アミノベンジルカルバモイル）、Ｍｅ（Ｎ－メチル－バリンシトルリン）、ＭＣ（ＰＥＧ）６－ＯＨ（マレイミドカプロイル－ポリエチレングリコール）、ＳＰＰ（Ｎ－サクシニミジル４－（２－ピリジルチオ）ペンタン酸）、ＳＭＣＣ（Ｎ－サクシニミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボン酸）、及びＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢからなる群より選択される、請求項３４に記載の抗体。

【請求項３９】

細菌中で生成される、請求項１６に記載の抗体。

【請求項４０】

ＣＨＯ細胞中で生成される、請求項１６に記載の抗体。

【請求項４１】

検出可能に標識される、請求項１６に記載の抗体。

【請求項４２】

製薬的に許容可能な担体と組み合わせた、請求項１６に記載の抗体を含む物質からなる組成物。

【請求項４３】

担体と組み合わせた、（ａ）請求項１１に記載のポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアゴニスト、（ｃ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｄ）前記ポリペプチドに結合する抗体を含む物質からなる組成物。

【請求項４４】

治療的に有効な量の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）を含む、請求項４３に記載の組成物。

【請求項４５】

容器、

前記容器に貼付されたラベル、及び

前記容器に含まれた、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに結合する抗体を含む物質からなる組成物

を備えた製造品であって、前記容器上のラベルが、前記組成物を使用して免疫関連疾患、リンパ腫又は炎症性腸疾患を治療できることを示す、製造品。

【請求項４６】

哺乳動物の免疫応答を刺激する方法であって、前記哺乳動物に対し、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する抗体の有効量を投与し、前記免疫応答を刺激する方法。

【請求項４７】

それを必要とする哺乳動物の免疫関連疾患を軽減する方法であって、前記哺乳動物に対し、治療的有効量の：

（ａ）ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する抗体、

（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、

（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片、或いは

（ｄ）ＰＲＯ８７２９９.の小分子アゴニスト

を投与する方法。

【請求項４８】

免疫関連疾患が、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、変形性関節症、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症性筋疾患、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫性腎臓疾患、中枢及び末梢神経系の脱髄性疾患、特発性脱髄性多発神経障害、ギランバレー症候群、慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、感染性又は自己免疫慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン感受性腸疾患、フィップル疾患、自己免疫性又は免疫媒介性皮膚疾患、水泡性皮膚疾患、多形滲出性紅斑、接触皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、喘息、アレルギ

ー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、肺の免疫学的疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、高感受性間質性肺炎、移植関連疾患、移植片拒絶又は移植片対宿主病である、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを含むと思われる試料における前記ポリペプチドの存在を決定する方法であって、前記試料を：

（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、

（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは、

（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片

に曝し、ＰＲＯ８７２９９に対する結合を決定する方法。

【請求項５０】

哺乳動物における免疫関連疾患の診断方法であって、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する

（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、

（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは、

（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片

を、前記哺乳動物から採取した組織細胞からなる試験試料に接触させ、（ａ）、（ｂ）、又は（ｃ）と、試験試料中のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドとの複合体の形成を判断し、前記複合体が形成される場合に、試験組織細胞を採取した哺乳動物における免疫関連疾患の存在が示される方法。

【請求項５１】

哺乳動物における炎症性免疫応答の診断方法であって、哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料、及び同じ細胞種類の既知の正常な組織細胞からなるコントロール試料における

（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、

（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは

（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片

を含むＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現レベルを決定し、試験試料中の前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現レベルが、コントロール試料より高いか又は低い場合に、試験組織細胞を採取した哺乳動物における炎症性免疫応答の存在が示される方法。

【請求項５２】

哺乳動物におけるリンパ腫の診断方法であって、哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料、及び同じ細胞種類の既知の正常な組織細胞からなるコントロール試料における

（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、

（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは

（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片

を含むＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現レベルを決定し、試験試料中の前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現レベルが、コントロール試料より高いか又は低い場合に、試験組織細胞を採取した哺乳動物におけるリンパ腫の存在が示される方法。

【請求項５３】

それを必要とする哺乳動物のリンパ腫を軽減する方法であって、前記哺乳動物に対し、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに特異的に結合する治療的有効量の：

（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、

（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは

（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片

を投与する方法。

【請求項５４】

哺乳動物における炎症性腸疾患の診断方法であって、哺乳動物から採取した組織細胞からなる試験試料、及び同じ細胞種類の既知の正常な組織細胞からなるコントロール試料における

（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、
（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは
（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片
を含むＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現レベルを決定し、試験試料中の前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現レベルが、コントロール試料より高いか又は低い場合に、試験組織細胞を採取した哺乳動物における炎症性腸疾患の存在が示される方法。
【請求項５５】
それを必要とする哺乳動物の炎症性腸疾患を軽減する方法であって、前記哺乳動物に対し、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する、治療的有効量の：
（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、
（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは
（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片
を投与する方法。
【請求項５６】
ＰＲＯ８７２９９を調節する候補化合物のスクリーニング方法であって、
ＰＲＯ８７２９９と
（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、
（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは
（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片
と、候補化合物との混合物を、候補化合物が存在しなければＰＲＯ８７２９９が（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）に基準親和性で結合する条件下でインキュベートする工程、及び
候補化合物に対するＰＲＯ８７２９９の結合親和性を検出し、候補化合物親和性を決定する工程、
を含み、基準親和性と候補化合物親和性との間に差異がある場合、候補化合物がＰＲＯ８７２９９を調節することが示される方法。
【請求項５７】
ＰＲＯ８７２９９を調節する候補化合物のスクリーニング方法であって、
ＰＲＯ８７２９９を用いて細胞に形質移入する工程、
候補化合物にＰＲＯ８７２９９で形質移入された細胞を接触させる工程、
形質移入された細胞の増殖を低減させる手段として、
（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、
（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは
（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片
をＰＲＯ８７２９９で形質移入された細胞に接触させる工程、
候補化合物に接触させたＰＲＯ８７２９９で形質移入された細胞の増殖の低減を、（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）に接触させたＰＲＯ８７２９９で形質移入された細胞の場合と比較し、ＰＲＯ８７２９９で形質移入した細胞の増殖が低減していた場合、候補化合物がＰＲＯ８７２９９を調節することが示される方法。
【請求項５８】
ＰＲＯ８７２９９を調節する候補化合物のスクリーニング方法であって、
（ａ）ＣＤ４＋Ｔ細胞を単離する工程、
（ｂ）候補化合物に単離されたＣＤ４＋Ｔ細胞を接触させる工程、
（ｃ）ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を低減させる手段として、抗ＰＲＯ８７２９９抗体、ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いはＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片を、単離されたＣＤ４＋Ｔ細胞に接触させる工程、及び
（ｄ）（ｂ）の場合の細胞増殖の低減と、（ｃ）の場合とを比較し、ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖が低減している場合、候補化合物がＰＲＯ８７２９９を調節することが示される方法。
【請求項５９】

哺乳動物における移植組織の拒絶を軽減する方法であって、有効量の：
（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、
（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは
（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片；
を投与して、移植組織の拒絶を軽減する方法。
【請求項６０】
哺乳動物における移植細胞の拒絶を軽減する方法であって、有効量の：
（ａ）抗ＰＲＯ８７２９９抗体、
（ｂ）ＨＶＥＭ（配列番号４）、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、或いは
（ｃ）ＬＩＧＨＴ（配列番号６）、ＬＩＧＨＴ－Ｆｃ、又はその断片；
を投与して、移植細胞の拒絶を軽減する方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の開示】
【０００１】
発明の分野
本発明は免疫関連疾患の診断と治療のための組成物と方法に関する。
【０００２】
発明の背景
免疫関連及び炎症疾患は、正常な生理機能では、発作又は傷害に反応して、発作又は傷害からの修復を開始し、外来生物体に対する生得的及び後天的防御を開始するのに重要な、かなり複雑で、多くの場合は多重に相互関連した生物学的経路の現れ又は結果である。疾患又は病理は、これらの正常な生理学的経路が、反応の強さに直接関連してか、異常な調節又は過度な刺激の結果として、自己に対する反応として、又はこれらの組合せとして、更なる発作又は傷害を引き起こすときに生じる。
これらの疾患の発生は、多くの場合、多段階経路及びしばしば多数の異なった生物学的システム／経路に関与しているが、一又は複数のこれら経路の重要な点における介在により改善又は治療効果を有し得る。治療的介在は有害なプロセス／経路の拮抗作用又は有益なプロセス／経路の刺激のいずれかにより生じる。
多くの免疫関連疾患が知られており、広範囲にわたって研究されている。このような疾患には、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染疾患、免疫欠損症、異常増殖等が含まれる。
Ｔリンパ球（Ｔ細胞）は哺乳動物の免疫反応の重要な成分である。Ｔ細胞は主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）内の遺伝子によりコードされる自己分子に関連する抗原を認識する。抗原は抗原提示細胞、ウィルス感染細胞、癌細胞、移植片等の表面上のＭＨＣ分子と共に提示され得る。Ｔ細胞系は宿主哺乳動物の健康を脅かすこれらの改変細胞を除去するものである。Ｔ細胞はヘルパーＴ細胞及び細胞障害性Ｔ細胞を含む。ヘルパーＴ細胞は、抗原提示細胞上の抗原-ＭＨＣ複合体の認識に続いて広範囲に増殖する。またヘルパーＴ細胞は種々のサイトカイン、例えばリンホカインを分泌し、これはＢ細胞、細胞障害性Ｔ細胞、及び免疫反応に寄与している種々の他の細胞の活性化において中心的な役割を担っている。
【０００３】
免疫関連疾患は、免疫応答を抑制することにより治療することができる。免疫刺激性の活性を有する分子を阻害する中和抗体の使用が、免疫関連疾患及び炎症性疾患の治療に効果的である。免疫応答を阻害する分子を利用して（タンパク質を直接使用するか、又は抗体アゴニストを使用することにより）、免疫応答を抑制することができ、従って免疫関連疾患を寛解させることができる。
ＣＤ４＋Ｔ細胞は、炎症の重要な制御因子として知られている。本発明では、ＣＤ４＋Ｔ細胞を活性化させ、活性化によって差次的に発現した遺伝子のプロファイルを分析した。このようにして、活性化に特異的な遺伝子を治療標的の候補とすることができた。生産的な免疫増殖性応答には、インビボでの同時刺激が必要である。同時刺激性分子のリスト

は非常に広範なもので、いずれの同時刺激性分子が異なる種類及び段階の炎症において重要な役割を担っているかは明らかになっていない。

炎症性腸疾患（「ＩＢＤ」）という用語は、腸管（腸）に炎症を起こし、時に反復性の腹痛又は下痢を起こす原因不明の慢性炎症性障害の一群を意味する。米国におけるＩＢＤの罹患率は、人口１０万人あたり約２００人と推定されている。ＩＢＤ患者は、潰瘍性大腸炎（「ＵＣ」）を伴うグループ、及びクローン病（「ＣＤ」）を伴うグループの、２つの主要グループに分けられる。

【０００４】

ＵＣ患者には、主に結腸粘膜の炎症性反応が見られる。通常炎症は均一且つ連続的で、部分的にしろ途中に正常粘膜は見られない。陰窩上皮および粘膜下、並びに表面の粘膜細胞に、好中球の浸潤による炎症反応が起こっている。通常最終的にこのような状況は上皮の損傷へと進行し、上皮細胞が失われてその結果複数の潰瘍形成、繊維症、異形成、及び縦方向の大腸退縮が起こる。

ＣＤは、炎症が腸壁の全ての層に亘る点でＵＣとは異なり、またリンパ節だけでなく腸管壁にも炎症が起こる。ＣＤは、口から肛門までに亘る、消化管のいずれの部分にも起こり得る。この疾病は不連続性であることが多く、つまり腸の重症部分と明らかに疾病を有さない領域とが分離している。ＣＤではまた、腸壁が厚くなり、閉塞に繋がることがあり得る。加えて、瘻孔及び亀裂が珍しくない。

【０００５】

臨床的に、ＩＢＤは、慢性の予測不能な経過に繋がることが多い多様な症状を特徴とする。観血的な下痢、及び腹痛は、多くの場合発熱と体重減少を伴う。重度の疲労感と同様に貧血も多い。関節痛から急性関節炎に亘る関節症状や、肝機能の異常も一般にＩＢＤと関連しているとされる。また、ＩＢＤ患者が大腸癌にかかる危険は平均より大きい。ＩＢＤの急性の「発作」が起こっている間は、仕事やその他の日常活動は通常不可能であり、患者が入院することも多い。

ＩＢＤの原因は依然として不明であるが、遺伝、感染、及び免疫的感受性等の複数の要因が関係していると思われている。ＩＢＤは白人に多く、特にユダヤ系の白人に多い。症状が慢性的炎症性の性質であることにより、感染的原因の可能性に対する熱心な調査が急ぎ行われた。急性炎症を刺激する薬剤が見つかったものの、ＩＢＤに関連して慢性的炎症の原因となるものは見つかっていない。ＩＢＤが自己免疫性疾患であるという仮説は、関節炎など前述したようにＩＢＤが腸以外に症状を有すること、並びに、免疫反応を抑制することが知られている副腎性グルココルチコイド、シクロスポリン及びアザチオプリン等の治療薬によりＩＢＤにポジティブな反応が見られることが既知であることにより支持されている。加えて、胃腸管は、身体の他のどの器官よりも、連続的に食物由来のタンパク質、細菌性副産物（ＬＰＳ）等の抗原性物質の可能性に曝されている。

【０００６】

さらに、重度の潰瘍性大腸炎を持つ患者では、特に疾病が複数年に亘る場合、大腸癌の危険が大きく上昇する。大量出血、慢性的衰弱性の病気、大腸の穿孔、又は癌の危険のため、約２０～２５％のＩＢＤ患者に最終的に大腸切除手術が必要になる。他の形態の医学的処置が失敗した場合、或いは、ステロイドの副作用や他の薬物適用により患者の健康が脅かされる場合にも手術が行われる場合がある。手術は浸潤性であり、劇的に人生を変えるので、あまり望ましい治療方式ではなく、通常は最後の処置である。この疾病に対する理解を深め、治療を可能にするための実験を行い、正常組織と比較した場合にＣＤとＵＣの両方において遺伝子が上方制御されることが確認された。

上述したように免疫異常の研究が進歩しているとはいえ、哺乳動物の免疫異常の存在を検知し、且つ効果的にこれらの異常を低減する能力を有する更なる診断薬及び治療薬に対する需要は大きい。したがって、本発明の目的は、種々の免疫異常に関与する種々の免疫細胞に過剰発現するポリペプチドを同定して特徴付けること、及び、哺乳動物の免疫異常の診断的検出及び治療的処置に有用な物質の成分を生産するためにポリペプチド及びコード化核酸を使用することである。

【０００７】
発明の概要
Ａ．実施態様
本発明は、ヒトを含む哺乳動物における免疫関連疾患の診断及び治療にとって有用な組成物及び方法に関する。本発明は、哺乳動物の免疫応答の刺激の結果として生じるタンパク質（アゴニスト及びアンタゴニスト抗体を含む）の同定に基づいている。免疫関連疾患は、免疫反応を抑制又は高めることによって治療することができる。免疫反応を高める分子は、抗原に対する免疫反応を刺激又は増強する。免疫反応の向上が有益である場合には、免疫反応を刺激する分子は治療的に用いることができる。或いは、免疫反応の減弱が有益である場合には（例えば炎症）、抗原に対する免疫反応を和らげる又は減じる免疫反応を抑制する分子（例えば中和抗体）を治療的に用いることができる。従って、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、そのアゴニスト及びアンタゴニストもまた、免疫関連疾患及び炎症性疾患の治療のための医薬及び薬剤を調製するために有用である。特定の態様では、そのような医薬及び薬剤は、製薬的に許容可能な担体と共に、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含む。好ましくは、混合物は無菌である。
更なる実施態様では、本発明では、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドと候補化合物を接触させ、前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドによって媒介される生物活性をモニタリングすることを含む、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト又はＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに対するアンタゴニストを同定する方法に関する。好ましくは、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドである。特定の態様では、ＰＲＯ８７２９９アゴニスト又はアンタゴニストは、抗ＰＲＯ８７２９９抗体である。
【０００８】
その他の態様では、本発明は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、或いはポリペプチドと結合するアゴニスト又はアンタゴニスト抗体を、担体又は賦形剤と混合して含有する組成物に関する。一態様では、組成物は治療的有効量のポリペプチド又は抗体を含有する。別の態様では、組成物が免疫刺激性分子を含む場合、この組成物は、（ａ）それを必要とする哺乳動物の組織への炎症性細胞の浸潤を増大させ、（ｂ）それを必要とする哺乳動物において免疫応答を刺激又は亢進し、（ｃ）抗原に対する応答としてそれを必要とする哺乳動物の免疫細胞の増殖を増大させ、（ｄ）免疫細胞の活性を刺激し、又は（ｅ）血管透過性を増大させるために有用である。更なる態様では、この組成物が免疫阻害分子を含む場合には、組成物は、（ａ）それを必要とする哺乳動物の組織への炎症性細胞の浸潤を減少させ、（ｂ）それを必要とする哺乳動物での自己免疫反応を阻害するか又は減少させ、（ｃ）免疫細胞の活性を減少させ、又は（ｄ）抗原に対する応答としてそれを必要とする哺乳動物の免疫細胞の増殖を減少させるために、有用である。その他の態様では、この組成物は更なる活性成分を含み、それは、例えば、更なる抗体、或いは細胞障害性又は化学療法剤でありうる。好ましくは、この組成物は無菌である。
他の実施態様では、本発明は有効量のＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、そのアゴニスト又はそのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、それを必要とする哺乳動物における免疫関連異常を治療する方法に関する。好ましい態様では、免疫関連異常は、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、変形性関節症、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症性筋疾患、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫性腎臓疾患、中枢及び末梢神経系の脱髄性疾患、特発性脱髄性多発神経障害、ギランバレー症候群、慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、感染性又は自己免疫慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン感受性腸疾患、フィップル疾患、自己免疫性又は免疫媒介性皮膚疾患、水泡性皮膚疾患、多形滲出性紅斑、接触皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、肺の免疫学的疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、高感受性間質性肺炎、移植関連疾患、移植片拒絶又は移植片対宿主病からなる群から選択される

。

【０００９】

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、この抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。一態様では、本発明は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドと結合する単離された抗体に関する。その他の態様では、抗体はＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの活性を模倣するか（アゴニスト抗体）、或いは逆に抗体はＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの活性を阻害又は中和する（アンタゴニスト抗体）。その他の態様では、この抗体はモノクローナル抗体であり、それは好ましくは非ヒトの相補性決定領域（ＣＤＲ）残基及びヒトフレームワーク領域（ＦＲ）残基を有する。抗体は標識されてもよいし、固体支持体へ固定されてもよい。更なる態様では、抗体は抗体断片、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、又は抗イディオタイプ抗体である。

更なるその他の実施態様では、本発明は、製薬的に許容可能な担体と混合して抗ＰＲＯ８７２９９抗体を含有する組成物を提供する。一態様では、この組成物は治療的に有効量の抗体を含む。好ましくは、この組成物は無菌である。この組成物は、保存料を添加して長期の貯蔵安定性を達成してもよい液体医薬製剤の形で投与されうる。或いは、この抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。

【００１０】

更なる実施態様では、本発明は：

(ａ)ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含む物質の組成物；

(ｂ)前記組成物を収容する容器；並びに

(ｃ)免疫関連疾患の治療における前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの使用を記した前記容器に含まれる包装挿入物、又は前記容器に添付されるラベルを含んでなる製造品に関する。この組成物は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含みうる。

その他の実施態様では、本発明は、（ａ）哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、並びに（ｂ）同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料においてＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなる、哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法に関し、この方法では、コントロール試料と比較して試験試料でのより高い又は低い発現レベルが、試験組織細胞が得られた哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す。

【００１１】

その他の実施態様では、本発明は、試験試料において、（ａ）哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料と抗ＰＲＯ８７２９９抗体を接触せしめ、（ｂ）この抗体とＰＲＯ８７２９９ポリペプチド間の複合体の形成を検出することを含んでなる、哺乳動物における免疫疾患を診断する方法に関し、この方法では、前記複合体の形成が、前記疾患の存在の有無を示す。検出は定性的又は定量的であってもよく、同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料における複合体の形成をモニターし比較して行われる。試験試料において多量の複合体が形成されたことは、試験組織細胞が得られた哺乳動物における免疫疾患の存在の有無を示す。抗体は、好ましくは検出可能なラベルを有する。複合体の形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、或いは当該分野で知られている他の技術によってモニターすることができる。試験試料は、通常、免疫系の欠損又は異常を有することが疑われる個体から得る。

その他の実施態様では、本発明は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを含有すると思われる細胞の試験試料を抗ＰＲＯ８７２９９抗体へ曝露し、前記抗体の前記細胞試料への結合を測定することを含んでなる、試料中のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの存在を測定する方法を提供する。特定の態様では、この試料はＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを含有すると思われる細胞を含み、抗体は細胞へ結合する。この抗体は、好ましくは検出可能に標識され及び／又は固体支持体へ結合している。

【００１２】
その他の実施態様では、本発明は、抗ＰＲＯ８７２９９抗体と担体を適切な包装体に含んでなる、免疫関連疾患診断用キットに関する。このキットは、好ましくは、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを検出するために抗体を用いるための指示書を含む。好ましくは、この担体は製薬的に許容可能である。
その他の実施態様では、本発明は、適切な包装体に抗ＰＲＯ８７２９９抗体を含む診断用キットに関する。このキットは、好ましくは、この抗体をＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを検出するために用いるための指示書を含む。
その他の実施態様では、本発明は、哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料におけるＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの存在又は不存在を検出することを含む、哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法を提供し、前記試験試料中のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの存否を検出することが、前記哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す。
その他の実施態様では、本発明は：
（ａ）通常は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドによって誘導される細胞応答の誘導のために適した条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させ；
（ｂ）前記細胞応答の誘導を測定して試験化合物が有効アゴニストであるかどうかを確定することを含み、前記細胞応答の誘導により、前記試験化合物が有効なアゴニストであることが示される、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニストを同定する方法に関する。
【００１３】
その他の実施態様では、本発明は、候補化合物とＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの相互作用を可能にするのに十分な条件と時間にわたってこの二つの成分を接触させ、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの活性が阻害されるかどうかを測定することを含んでなる、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの活性を阻害することが可能な化合物を同定する方法に関する。特定の態様では、候補化合物又はＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのいずれかが固体支持体上に固定される。その他の態様では、非固定化成分が検出可能なラベルを有する。好ましい態様では、この方法は：
（ａ）通常は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドによって誘導される細胞応答に適した条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させること；並びに
（ｂ）試験化合物が有効アンタゴニストであるかどうかを確定するために、前記細胞応答の誘導を測定する段階を含む。
その他の実施態様では、本発明は、通常はポリペプチドを発現する細胞においてＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法において、細胞を試験化合物と接触せしめて、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現が阻害されるかどうかを確定することを含む方法を提供する。好ましい態様では、この方法は：
（ａ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現を可能にする好適な条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させ；
（ｂ）前記ポリペプチドの発現の阻害を測定する段階を含む。
【００１４】
更に別の実施態様では、本発明は、（ａ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアンタゴニストのいずれかをコードする核酸分子を哺乳動物へ投与することを含んでなる、免疫関連異常を患っている哺乳動物においてこの異常を治療する方法に関し、ここで、アゴニスト又はアンタゴニストは抗ＰＲＯ８７２９９抗体であってもよい。好ましい実施態様では、この哺乳動物はヒトである。その他の好ましい実施態様では、この核酸はエキソビボ（生体外）遺伝子治療によって投与される。更なる好ましい実施態様では、核酸は、ベクター、より好ましくはアデノウィルス、アデノ随伴ウィルス、レンチウィルス又はレトロウィルスベクターである。
更にその他の態様では、本発明は、プロモーター、（ａ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアンタゴニストをコードする核酸、並びにポリペプチドの細胞分泌のための

シグナル配列から本質的になるウィルスベクターを含んでなる組換えウィルス粒子を提供し、ここで、ウィルスベクターがウィルス構造タンパク質に関連する。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドからのものである。

より更なる実施態様では、本発明は、レトロウィルス構造タンパク質を発現する核酸コンストラクトを含んでなるエキソビボ産生細胞に関し、またプロモーター、（ａ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアンタゴニストをコードする核酸、並びにポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的になるレトロウィルスベクターを含み、前記産生細胞は、組換えレトロウィルス粒子を生産するように、構造タンパク質と関連するレトロウィルスベクターを包み込んでいる。

【００１５】

また別の実施形態では、本発明は、哺乳動物の免疫細胞の活性を増大させる方法を提供し、本方法では、前記哺乳動物に対し、（ａ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアンタゴニストを投与することにより、哺乳動物の免疫細胞の活性を増大させる。

また別の実施形態では、本発明は、哺乳動物の免疫細胞の増殖を増大させる方法を提供し、本方法では、前記哺乳動物に対し、（ａ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアンタゴニストを投与することにより、哺乳動物の免疫細胞の増殖を増大させる。

また別の実施形態では、本発明は、哺乳動物の免疫細胞の増殖を減少させる方法を提供し、本方法では、前記哺乳動物に対し、（ａ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、（ｂ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト、又は（ｃ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアンタゴニストを投与することにより、哺乳動物の免疫細胞の増殖を減少させる。

【００１６】

Ｂ．更なる実施態様

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここに開示されるポリペプチドのいずれかをコードするＤＮＡを含むベクターを提供する。また、そのようなベクターを含む宿主細胞が提供される。例として、宿主細胞はＣＨＯ細胞、大腸菌、又は酵母である。ここに開示されるポリペプチドのいずれかを生産する方法が更に提供され、該方法は、所望のポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物から所望のポリペプチドを回収することを含む。

他の実施態様では、本発明は、異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したここに開示されるポリペプチドのいずれかを含むキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例には、免疫グロブリンのＦｃ領域又はエピトープタグ配列に融合したここに開示のポリペプチドのいずれかを含むキメラ分子が含まれる。

別の実施態様では、本発明は上述又は後述のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。

また別の実施態様では、本発明は、アンチセンスプローブとして又はゲノム及びｃＤＮＡヌクレオチド配列の単離に有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、それらのプローブは前述又は後述のヌクレオチド配列のいずれかから得られる。

他の実施態様では、本発明は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

【００１７】

一態様では、単離された核酸分子は、（ａ）ここに開示された完全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示された膜貫通タンパク質の細胞外ドメインでシグナルペプチドを有する又は有しないもの、或いはここに開示された完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片を有するＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子、或いは（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、

或いは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含む。

【００１８】

別の態様では、単離された核酸分子は、（ａ）ここに開示された完全長ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドｃＤＮＡのコード配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのコード配列、ここに開示された膜貫通タンパク質の細胞外ドメインのコード配列でシグナルペプチドを有する又は有しないもの、或いはここに開示された完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片のコード配列を含んでなるＤＮＡ分子、或いは（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補鎖に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含む。

【００１９】

更なる態様では、本発明は、図２（配列番号２）に示すものと同じ成熟ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子に対して、少なくとも約８０％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９０％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子に関する。

【００２０】

別の態様では、本発明は、膜貫通ドメイン欠損又は膜貫通ドメイン不活性化のいずれかであるＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を含むか、或いはそのようなコード化ヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子を提供する。そのようなポリペプチドの膜貫通ドメインはここに開示される。従って、ここに開示されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考察されている。

他の実施態様は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのコード配列の断片、又はその相補鎖に関し、それらは、例えば、場合によっては抗ＰＲＯ８７２９９抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのコード化断片のハイブリダイゼーションプローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされ得る。このような核酸断片は、通常は少なくとも約２０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約３０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約４０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約６０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約７０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約８０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約９０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１１０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１２０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１３０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１４０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１６０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１７０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１８０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１９０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約３００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約３５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約４００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約４５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約５００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約６００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約７００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約８００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約９００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１０００ヌクレオチド長であり、ここで「約」という語の内容は参照する長さのプラス又はマイナス１０％のヌクレオチド配列長を指すことを意味する。ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くの良く知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを用いてＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれのＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、日常的な手法で同定してもよい。このようなＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の全ては、ここで考慮される。また、これらのヌクレオチド分子断片、好ましくは抗ＰＲＯ８７２９９抗体に対する結合部位を含むＰＲＯ８７２９９ポリペプチド断片によってコードされるＰＲＯ８７２９９ポリペプチド断片も考慮される。

【００２１】

他の実施態様では、本発明は、上記で特定された単離された核酸配列のいずれかによってコードされる単離されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを提供する。

或る態様では、本発明は、ここに開示した完全長アミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを有するか又は有しない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、或いはここに開示した完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片を有するＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに対して、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、或いはは少なくとも約８１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％のアミノ酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに関する。

更なる態様では、本発明は、図２（配列番号２）に示すアミノ酸配列に対して、少なく

とも約８０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％のアミノ酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに関する。

【００２２】

特定の態様では、本発明は、Ｎ-末端シグナル配列及び／又は開始メチオニンを有しない、上記したようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる単離されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適したコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞をＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物からＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを回収することを含む。

本発明の他の態様では、膜貫通ドメインの欠失した或いは膜貫通ドメインが不活性化している単離されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適したコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞をＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物からＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを回収することを含む。

更に他の実施態様では、本発明は、ここで定義される天然ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特別な実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗ＰＲＯ８７２９９抗体或いは小分子である。

更なる実施態様では、本発明は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関し、それは、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを候補分子と接触させ、前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターすることを含む。好ましくは、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは天然ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドである。

また更なる実施態様では、本発明は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、或いはここに記載したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗ＰＲＯ８７２９９抗体を、担体と組み合わせて含有する組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体である。

本発明のその他の実施態様は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗ＰＲＯ８７２９９抗体を、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗ＰＲＯ８７２９９抗体に対して反応性である症状の治療に有用な医薬の調製のために用いることに関する。

【００２３】

好ましい実施態様の詳細な説明

Ｉ．定義

ここで記載されているＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。「ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド」を指すこの明細書中の全ての開示は、各ポリペプチドを個別にも組み合わせとしても言及する。例えば、調製の、精製の、誘導の、抗体の形成、投与の、含有する組成物、疾患の治療、などの記述は、本発明の各ポリペプチドに個別に関係する。また、「ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド」という用語は、ここに開示されて

いるＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの変異体を含む。

「天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド」は、天然由来の対応するＰＲＯ８７２９９ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド」という用語には、特に、特定のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態（例えば、細胞外ドメイン配列）、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の種々の実施態様において、ここに開示されている天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、関連する図に示されている完全長アミノ酸配列を含有する成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び終止コドンは、太い書体及び下線で図中に示さている。しかし、関連する図に開示されているＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、該図においてアミノ酸位置１と称されているメチオニン残基で開始することが示されている一方で、図のアミノ酸位置１より上流又は下流のいずれかに位置する他のメチオニン残基が、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いられることも考えられるし可能である。

【００２４】

ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ＥＣＤ」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの形態を意味する。通常、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドＥＣＤは、それらの膜貫通及び／又は細胞質ドメインを１％未満、好ましくはそのようなドメインを０．５％未満しか持たない。本発明のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約５アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又明細書おいてに同定された膜貫通ドメインのいずれかの末端から約５を越えないアミノ酸を含みうるし、付着のシグナルペプチドを有する又は有しないそのようなポリペプチド及びそれらをコードする核酸は、本発明において考慮される。

【００２５】

「ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される完全長天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたＰＲＯ８７２９９の細胞外ドメイン又はここに開示された完全長ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの他の断片と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する活性ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを意味する。このようなＰＲＯ８７２９９ポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のＮ-又はＣ-末端において一つ又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドが含まれる。通常、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド変異体は、ここに開示される完全長天然アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示されたＰＲＯ８７２９９の細胞外ドメイン又はここに開示された完全長ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの特に同定された他の断片と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％

のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％のアミノ酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約９９％のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、ＰＲＯ８７２９９変異体ポリペプチドは、少なくとも約１０アミノ酸長、或いは少なくとも約２０アミノ酸長、或いは少なくとも約３０アミノ酸長、或いは少なくとも約４０アミノ酸長、或いは少なくとも約５０アミノ酸長、或いは少なくとも約６０アミノ酸長、或いは少なくとも約７０アミノ酸長、或いは少なくとも約８０アミノ酸長、或いは少なくとも約９０アミノ酸長、或いは少なくとも約１００アミノ酸長、或いは少なくとも約１５０アミノ酸長、或いは少なくとも約２００アミノ酸長、或いは少なくとも約３００アミノ酸長、又はそれ以上である。

ここに定義されるＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに対してここで同定されている「パーセント（％）アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性値は、ＡＬＩＧＮ-２プログラム用の完全なソースコードが下記の表１に提供されている配列比較プログラムＡＬＩＧＮ-２を使用することによって得られる。ＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作製され、下記の表１に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンＤ．Ｃ．，２０５５９に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７の下で登録されている。ＡＬＩＧＮ-２はジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表１に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ＡＬＩＧＮ-２プログラムは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ（登録商標）Ｖ４．０Ｄでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ-２プログラムによって設定され変動しない。

【００２６】

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

分率Ｘ／Ｙの１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ-２のＡ及びＢのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、ＹはＢの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと異なる場合、ＡのＢに対する％アミノ酸配列同一性は、ＢのＡに対する％アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた％アミノ酸配列同一性の計算の例として、表２及び３に、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「ＰＲＯ８７２９９」と称されるアミノ酸配列に対する％アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。「ＰＲＯ８７２９９」は対象となる仮説的ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象となる「ＰＲＯ８７２９９」ポリペプチドが比較されているポリペプチドのアミノ酸配列を表し、そして「Ｘ」、「Ｙ」及び「Ｚ」の各々は異なった仮説的アミノ酸残基を表している。

特に断らない限りは、ここでの全ての％アミノ酸配列同一性値は上記のようにＡＬＩＧ

N-２配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、％アミノ酸配列同一性値は、ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２コンピュータプログラム（Altschul等, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)）を用いて決定してもよい。更に、殆どのＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン＝１、オーバーラップフラクション＝０．１２５、ワード閾値（Ｔ）＝１１、及びスコアリングマトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２。ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２が用いられた場合には、％アミノ酸配列同一性値は、（ａ）天然ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドから誘導された配列を有する対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアミノ酸配列と、対象とする比較アミノ酸配列（即ち、対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドが比較されるＰＲＯ８７２９９ポリペプチド変異体であってもよい配列）との間の、ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、（ｂ）対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列Ｂに対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列Ａを含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列Ａが対象である比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Ｂが対象であるＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【００２７】

また、％アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２（Altschul等, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)）を用いて決定してもよい。ＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２配列比較プログラムは、http://www.ncbi.nlm.nih.govからダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。ＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask＝可、鎖＝全て、予測される発生＝１０、最小低複合長＝１５／５、マルチパスｅ-値＝０．０１、マルチパスの定数＝２５、最終ギャップアラインメントのドロップオフ＝２５、及びスコアリングマトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２を含む。

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

分率Ｘ／Ｙの１００倍

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

【００２８】

「ＰＲＯ８７２９９変異体ポリヌクレオチド」又は「ＰＲＯ８７２９９変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードする核酸分子であり、ここに開示する完全長天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列と少なくとも約８０％の核酸配列同一性、好ましくは或いは少なくとも約８１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８８％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約８９％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９０％の

核酸配列同一性、或いは少なくとも約９１％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９２％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９３％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９４％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９５％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９６％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９７％の核酸配列同一性、或いは少なくとも約９８％の核酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約９９％の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

通常は、ＰＲＯ８７２９９変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約３０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約６０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約９０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１２０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約１８０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２１０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２４０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約２７０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約３００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約４５０ヌクレオチド長、或いは少なくとも約６００ヌクレオチド長、或いは少なくとも約９００ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【００２９】

ここで同定されるＰＲＯ８７２９９コード化核酸配列に対する「パーセント(％)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、ＰＲＯ８７２９９配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ-２、ＡＬＩＧＮ、又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性値は、ＡＬＩＧＮ-２プログラム用の完全なソースコードが下記の表１に提供されている配列比較プログラＡＬＩＧＮ-２を使用することによって得られる。ＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作製され、下記の表１に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンＤ．Ｃ．，２０５５９に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７の下で登録されている。ＡＬＩＧＮ-２はジェネンテック社、サウス サン フランシスコ，カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表１に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ＡＬＩＧＮ-２プログラムは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルＵＮＩＸ（登録商標） Ｖ４．０Ｄでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ-２プログラムによって設定され変動しない。

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

分率Ｗ／Ｚの１００倍

ここで、Ｗは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ-２のＣ及びＤのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ＺはＤの全核酸残基数である。核酸配列Ｃの長さがアミノ酸配列Ｄの長さと異なる場合、ＣのＤに対する％核酸配列同一性は、ＤのＣに対する％核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた％核酸配列同一性の計算の例として、表４及び５に「比較ＤＮＡ」と称される核酸配列の「ＰＲＯ８７２９９-ＤＮＡ」と称される核酸配列に対する％核酸配列同一性の計算方法を示す。「ＰＲＯ８７２９９-ＤＮＡ」は対象となる仮説的ＰＲＯ８７２９９コード化核酸配列を表し、「比較ＤＮＡ」は対象となる「ＰＲＯ８７２９９-ＤＮＡ」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「Ｎ」、「Ｌ」及び「Ｖ」の各々は異なった仮説的アミノ酸残基を表している。

【００３０】

特に断らない限りは、ここでの全ての％核酸配列同一性値は、直上のパラグラフに示し

たようにＡＬＩＧＮ-２配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、％核酸配列同一性値は、ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２コンピュータプログラム（Altschul等, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)）を用いて決定してもよい。更に、殆どのＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン＝１、オーバーラップフラクション＝０．１２５、ワード閾値（Ｔ）＝１１、及びスコアリングマトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２。ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２が用いられた場合、％核酸配列同一性値は、（ａ）天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と、対象とする比較核酸配列（即ち、対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸分子が比較されるＰＲＯ８７２９９ポリペプチド変異体であってもよい配列）との間の、ＷＵ-ＢＬＡＳＴ-２によって決定した一致する同一核酸残基の数を、（ｂ）対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸分子のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Ｂに対して少なくとも８０％の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Ａを含んでなるポリペプチド」という表現では、核酸配列Ａが対象とする比較核酸配列であり、核酸配列Ｂが対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

また、％核酸配列同一性は、配列比較プログラムＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２（Altschul等, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)）を用いて決定してもよい。ＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２配列比較プログラムは、http://www.ncbi.nlm.nih.govからダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。ＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask＝可、鎖＝全て、予測される発生＝１０、最小低複合長＝１５／５、マルチパスｅ-値＝０．０１、マルチパスの定数＝２５、最終ギャップアラインメントのドロップオフ＝２５、及びスコアリングマトリクス＝ＢＬＯＳＵＭ６２を含む。

【００３１】

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

分率Ｗ／Ｚの１００倍

ここで、Ｗは配列アラインメントプログラムＮＣＢＩ-ＢＬＡＳＴ２のＣ及びＤのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ＺはＤの全核酸残基数である。核酸配列Ｃの長さが核酸配列Ｄの長さと異なる場合、ＣのＤに対する％核酸配列同一性は、ＤのＣに対する％核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

他の実施態様では、ＰＲＯ８７２９９変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードし、好ましくはストリンジェンシーハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに開示する完全長ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションする核酸分子である。ＰＲＯ８７２９９変異体ポリペプチドは、ＰＲＯ８７２９９変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

【００３２】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、（１）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５残基のＮ末端或いは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、或いは、（２）クーマシーブルー或いは好ましくは銀染

色を用いた非還元或いは還元条件下でのＳＤＳ-ＰＡＧＥによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

「単離された」ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸は、同定され、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される形態或いは設定以外のものである。ゆえに、単離されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸分子は、天然の細胞中に存在するＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるＰＲＯ８７２９９ポリペプチド核酸分子を含む。

【００３３】

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

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

【００３４】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、多エピトープ特異性を持つ抗ＰＲＯ８７２９９抗体組成物、一本鎖抗ＰＲＯ８７２９９抗体、及び抗ＰＲＯ８７２９９抗体の断片を包含している（下記参照）。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を称する。

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補的鎖がその融点に近いがそれより低い環境に存在する場合における変性ＤＮＡの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェンシーにするが、低い温度はストリンジェンシーを低下させる。更に、ストリンジェンシーは塩濃度に逆比例する。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明は、Ausubel等, Current protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

【００３５】
ここで定義される「ストリンジェンシー条件」又は「高度のストリンジェンシー条件」は、（１）洗浄のために低イオン強度及び高温度を用いるもの、例えば、５０℃において０．０１５Ｍの塩化ナトリウム／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１％のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；（２）ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いるもの、例えば、４２℃において５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミド、０．１％ウシ血清アルブミン／０．１％フィコール／０．１％のポリビニルピロリドン／５０ｍＭのｐＨ６．５のリン酸ナトリウムバッファーに７５０ｍＭの塩化ナトリウム、７５ｍＭのクエン酸ナトリウムを添加したもの；又は（３）４２℃において５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５×デンハード液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳ、及び１０％のデキストラン硫酸を用い、４２℃において０．２×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中で、５５℃において５０％ホルムアミド中で洗浄した後、５５℃においてＥＤＴＡを含む０．１×ＳＳＣからなる高ストリンジェンシー洗浄を用いるものによって同定できる。

【００３６】
「中程度のストリンジェンシー条件」は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているように特定され、上記のものよりストリンジェンシーが低い洗浄液及びハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、イオン強度及び％ＳＤＳ）の使用を含む。中程度のストリンジェンシー条件は、２０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハード液、１０％デキストラン硫酸、及び２０ｍｇ／ｍＬの変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中の３７℃での終夜インキュベーション後に、３７～５０℃にて１×ＳＳＣ中でフィルター洗浄を行うという条件である。プローブ長などの因子に必要に応じて適合させるには、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかは当業者であれば分かるであろう。

【００３７】
「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、又はそれらのドメイン配列を含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープ、又は幾つかの他の試薬によって同定できるエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようにかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも６のアミノ酸残基、通常は約８～約５０のアミノ酸残基(好ましくは約１０～約２０の残基)を有する。

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である（即ち「異種の」）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、ＩｇＧ-１、ＩｇＧ-２、ＩｇＧ-３又はＩｇＧ-４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ-１及びＩｇＡ-２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ又はＩｇＭなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

【００３８】
ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるＰＲＯ８７２９９の生物学的及び／又は免疫学的活性を保持するＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの形態を意味し、ここで、「生物学的」活性とは、天然又は天然に生じるＰＲＯ８７２９９が

保持する抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘発する能力以外の、天然又は天然に生じるＰＲＯ８７２９９によって引き起こされる生物機能（阻害又は刺激）を意味し、「免疫」活性とは、天然又は天然に生じるＰＲＯ８７２９９が保持する抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘発する能力を意味する。

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの生物学的活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を指す。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を指す。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機小分子、などを含む。ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを候補アンタゴニスト又はアゴニストと接触させ、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに正常に関連している一又は複数の生物学的活性の変化を測定することを含んでもよい。

【００３９】

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

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

治療の対象のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ウサギなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

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

【００４０】

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

「抗体断片」は、原型の抗体の一部、好ましくは原型の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、及びＦｖ断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体（Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]）；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【００４１】

抗体のパパイン消化は、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる二つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Ｆｃ」断片と命名される。ペプシン処理はＦ（ａｂ’）$_2$断片を生じ、それは二つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Ｆｖ」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した１本の重鎖と１本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置に

おいて各ドメインの三つのＣＤＲが相互作用してV_H－V_Lに量体の表面に抗原結合部位を決定する。正しくは、６つのＣＤＲが抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な三つのＣＤＲのみを含んでなるＦｖの半分）でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

【００４２】

またＦａｂ断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一の定常ドメイン（ＣＨ１）も含む。Ｆａｂ断片は、抗体ヒンジ領域からの一つ又は複数のシステインを含む重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりＦａｂ’断片と相違する。ここで、Ｆａｂ’-ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つＦａｂ’を表す。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体断片は、最初はＦａｂ’断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる二つの明らかに異なる型の一方に分類される。

【００４３】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンの五つの主要なクラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭがあり、それらの幾つかは更にサブクラス（アイソタイプ）、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ及びＩｇＡ２に分類される。

「一本鎖Ｆｖ」又は「ｓＦｖ」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含む抗体断片を含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、Ｆｖポリペプチドは、ｓＦｖが抗原結合とって望ましい構造の形成を可能にする、V_H及びV_Lドメイン間のポリペプチドリンカーを更に含む。ｓＦｖの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

【００４４】

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖（V_H-V_L）内で軽鎖可変ドメイン（V_L）に結合した重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、EP404,097；WO93/11161；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)に、より十分に記載されている。

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び／又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、（１）ローリー法で測定した場合９５％を越える抗体、最も好ましくは９９重量％を越えるまで、（２）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも１５残基のＮ末端或いは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、或いは、（３）クーマシーブルー或いは好ましくは銀染色を用いた非還元或いは還元条件下でのＳＤＳ-ＰＡＧＥによる均一性まで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【００４５】

「特異的に結合する」抗体、又は特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ特異的な抗体とは、他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープとは実質的に結合せずに、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ結合するもの

である。

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

【００４６】

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

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物（ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又はその抗体など）の輸送に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

「小分子」とは、ここで、約５００ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

【００４７】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫系の構成成分が哺乳動物の病的状態を引き起こし、媒介し、或いは寄与する疾患を意味する。また、免疫反応の刺激又は処置が、疾患の進行に対して改善的な効果を有するような疾患をも含む。この用語には、免疫媒介炎症性疾患、非免疫媒介炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全性疾患、腫瘍形成等が含まれる。

「Ｔ細胞媒介疾患」という用語は、Ｔ細胞が哺乳動物の病的状態を直接、又は間接に媒介する、或いは寄与する疾患を意味する。Ｔ細胞媒介疾患は、細胞媒介効果、リンホカイン媒介効果等、そして例えば、Ｔ細胞によって分泌されたリンホカインによってＢ細胞が刺激された場合に、Ｂ細胞と関連している効果にさえも関連している。

【００４８】

免疫関連疾患及び炎症性疾患は、免疫又はＴ細胞媒介性のものを含み、本発明により治療可能である。それらの疾患には、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症（強皮症）、特発性炎症性筋疾患（皮膚筋炎、多発性筋炎）、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿）、自己免疫性血小板減少症（特発的血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症）、甲状腺炎（グレーブ疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、真性糖尿病、免疫性腎臓疾患（糸状体腎炎、尿細管間質性腎炎）、中枢及び末梢神経系の脱髄性疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害、又はギランバレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、例えば感染性肝炎（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ型肝炎及びその他の非肝性ウィルス）、自己免疫慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎：クローン病）、グルテン感受性腸疾患、フィップル疾患、自己免疫性又は免疫媒介性皮膚疾患、水泡性皮膚疾患、多形滲出性紅斑、接触皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、肺の免疫学的疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、高感受性間質性肺炎、移植関連疾患、移植片拒絶又は移植片対宿主病、並びに、ＡＩＤＳ（ＨＩＶ感染）、Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、及びＥ型肝炎等、細菌感染症、真菌感染症、原生動物感染症、及び寄生虫感染症といったウィルス性疾患を含む炎症性疾患が含まれる。

「有効量」とは、特に定まった目的を達成することを引き起こすＰＲＯ８７２９９ポリペプチド及び／又はアゴニスト／アンタゴニストの濃度又は量である。更には、「治療的有効量」とは、定まった治療的有効量を達成するために効果的なＰＲＯ８７２９９ポリペ

プチド及び／又はアゴニスト／アンタゴニストの濃度又は量である。また、この量は実験的に確定してもよい。

【００４９】

ここで用いられる「細胞障害性薬」は、細胞の機能を阻害又は抑制し、及び／又は細胞破壊を起こす物質を意味する。この用語は、放射性同位元素（例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}及びＬｕの放射性同位元素）、化学治療薬、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン又はその他の挿入剤、核溶解性酵素等の酵素及びその断片、抗体、断片及び／又はその変異体を含む、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素又は小分子毒素等の毒素、並びに後述する様々な抗腫瘍又は抗癌剤を意味する。その他の細胞障害性薬は後述する。殺腫瘍性の薬剤は腫瘍細胞を破壊する。細胞毒を抗体に共有結合性に付着させることにより、本発明で対象とする、抗原を発現する特定の細胞を毒素の標的とすることができる。有用な細胞毒及びそれらのリンカーは、限定するものではないが、以下を含む。

リンカー

ＭＣ＝マレイミドカプロイル(maleimidocaproyl)

Ｖａｌ　Ｃｉｔ＝バリン－シトルリン，プロテアーゼ切断可能リンカーのジペプチド部位

シトルリン＝２－アミノ－５－ウレイド－ペンタン酸

ＰＡＢ＝ｐ－アミノベンジルカルバモイル（リンカーの「自壊的」タンパク質）

Ｍｅ＝カテプシンＢによる切断を防ぐようにリンカーとペプチドの結合を修飾したＮ－メチル－バリンシトルリン

ＭＣ（ＰＥＧ）６－ＯＨ＝抗体システインに付着させたマレイミドカプロイル－ポリペチレングリコール

ＳＰＰ＝Ｎ－サクシニミジル　４－（２－ピリジルチオ）ペンタン酸

ＳＭＣＣ＝Ｎ－サクシニミジル　４－（Ｎ－マレイミドカプロイル）シクロヘキサン－１カルボン酸塩

細胞障害性薬物

ＭＭＡＥ＝モノメチルアウリスタチン(auristatin)　Ｅ（ＭＷ７１８）

ＭＭＡＦ＝薬物のC末端にフェニルアラニンを有するアウリスタチン　Ｅ（MMAE）の変異体（ＭＷ７３１．５）

ＭＭＡＦ－ＤＭＡＥＡ＝Ｃ末端フェニルアラニンにアミド連鎖するＤＭＡＥＡ（ジメチルアミノエチルアミン）を有するＭＭＡＦ（ＭＷ８１０．５）

ＭＭＡＦ－ＴＥＧ＝フェニルアラニンにエステル化されたテトラエチレングリコールを有するＭＭＡＦ

ＭＭＡＦ－ＮｔＢｕ＝ＭＭＡＦのＣ末端にアミドとして付着されたＮ－ｔ－ブチル

ＡＥＶＢ＝ＡＥのＣ末端を介する酸不安定性リンカーであるアウリスタチン　Eバレリル(valeryl)ベンジルヒドラゾン（ＭＷ７３２）

ＡＦＰ＝アウリスタチン　Fフェニレンジアミン（フェニレンジアミンスペーサーを介してＣ末端により抗体にリンクしているフェニルアラニン変異体）（ＭＷ７３２）

【００５０】

ここで使用される場合の「成長阻害剤」とは、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて、細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を指すものである。よって、成長阻害剤とは、Ｓ期における細胞のパーセンテージを有意に低減させるものであり得る。成長阻害剤の例には、細胞分裂周期の進行をブロックする薬剤（Ｓ期以外の場所において）、例えばＧ１停止及びM期停止を誘発する薬剤が含まれる。伝統的なM期ブロッカーには、ビンカ（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン、及びトポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンが含まれる。Ｇ１を停止させるこれらの薬剤、例えばＤＮＡアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキ

セート、５-フルオロウラシル、及びａｒａ-ＣがＳ期停止へ波及する。更なる情報は、Murakami等により「細胞分裂周期の調節、オンコジーン、及び抗新生物薬（Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs）」と題された、癌の分子的基礎（The Molecular Basis of Cancer）、Mendelsohn及びIsrael編、第一章（WB Saunders; Philadelphia, 1995）、特に１３頁に見出すことができる。タキサン（パクリタキセル及びドキタキセル）は、どちらもイチイの木から得られる抗癌剤である。ヨーロッパイチイから得られるドキタキセル（タキソテール（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer）は、パクリタキセルの半合成類似物である（タキソール（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）。パクリタキセル及びドキタキセルは、チューブリン二量体由来の微小管の組み立てを促進し、脱重合を防止することにより微小管を安定させる。この結果、細胞内の有糸分裂が抑制される。

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、５-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ａｒａ-Ｃ」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、タキソイド類、例えばパクリタキセル（タキソール(Taxol), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドキセタキセル(doxetaxel)（タキソテール(Taxotere), Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）、トキソテール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン(vinorelbine)、カルボプラチン、テニポシド(teniposide)、ダウノマイシン、カルミノマイシン(carminomycin)、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン(esperamicins)（米国特許第4,675,187号参照）、メルファラン、及び他の関連したナイトロジェンマスタードが含まれる。またこの定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働くホルモン剤、例えばタモキシフェン及びオナプリストン(onapristone)も含まれる。

【００５１】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、Ｎ-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、及び黄体形成ホルモン（ＬＨ）；肝臓成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-α及び-β；ミュラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（ＴＰＯ）；ＮＧＦ-β等の神経成長因子；血小板成長因子；ＴＧＦ-α及びＴＧＦ-βのような形質転換成長因子（ＴＧＦ）；インスリン様成長因子-Ｉ及び-II；エリスロポイエチン（ＥＰＯ）；オステオインダクティブ因子；インターフェロン-α、-β、及び-γのようなインターフェロン；マクロファージＣＳＦ（M-ＣＳＦ）のようなコロニー刺激因子（ＣＳＦ）；顆粒球マクロファージＣＳＦ（ＧM-ＣＳＦ）及び顆粒球ＣＳＦ（G-ＣＳＦ）；ＩＬ-1、ＩＬ-1ａ、ＩＬ-2、ＩＬ-3、ＩＬ-4、ＩＬ-5、ＩＬ-6、ＩＬ-7、ＩＬ-8、ＩＬ-9、ＩＬ-１１、ＩＬ-１２のインターロイキン（ＩＬ）；腫瘍壊死因子、例えばＴＮＦ-α又はＴＮＦ-β；及びＬＩＦ及びキットリガンド（ＫＬ）を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来或いは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である（即ち「異種の」）アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を

含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、ＩｇＧ-１、ＩｇＧ-２、ＩｇＧ-３又はＩｇＧ-４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ-１及びＩｇＡ-２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ又はＩｇＭなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

ここで用いられる「炎症性細胞」という用語は、単核細胞、好酸球、マクロファージ、及び多形核球好中球（ＰＭＮ）等の炎症性反応を増強する細胞を意味する。

【００５２】

表１

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

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

表１（続き）

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

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

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

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

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

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

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

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

表１（続き）

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

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

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

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

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

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

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

表１（続き）

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

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

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

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

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

表１（続き）

...nw

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

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

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

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

表１（続き）

...nw

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

表１（続き）

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

表１（続き）

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

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

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

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

表１（続き）

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

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

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

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

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

表１（続き）

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

                        more++;

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

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

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

表１（続き）

...dumpblock

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

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

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

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

表１（続き）

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

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

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


/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
```

stars

```
{
        int             i;
        register char   *p0, *p1, cx, *px;

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

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

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

表１（続き）

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

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

}
```

表１（続き）

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

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

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

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

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                       getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;

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

表１（続き）

...getseq

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

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

char    *
g_calloc(msg, nx, sz)
```

g_calloc

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

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

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

readjmps

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

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

表１（続き）

...readjmps

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

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

表１（続き）

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

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

【００５３】

表２

PRO87299	**XXXXXXXXXXXXXXX**	**(長さ = 15 アミノ酸)**
比較タンパク質	**XXXXXYYYYYYY**	**(長さ = 12 アミノ酸)**

% アミノ酸配列同一性 =

（**ALIGN-2** によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数）

÷（**PRO87299** ポリペプチドの全アミノ酸残基の総数）＝

5 ÷ 15 = 33.3%

表３

PRO87299	**XXXXXXXXXX**	**(長さ = 10 アミノ酸)**
比較タンパク質	**XXXXXYYYYYYZZYZ**	**(長さ = 15 アミノ酸)**

% アミノ酸配列同一性 =

（**ALIGN-2** によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数）

÷（**PRO87299** ポリペプチドの全アミノ酸残基の総数）＝

5 ÷ 10 = 50%

表４

PRO87299-DNA	**NNNNNNNNNNNNN**	**(長さ = 14 ヌクレオチド)**
比較 **DNA**	**NNNNNNLLLLLLLLL**	**(長さ = 16 ヌクレオチド)**

% 核酸配列同一性 =

（**ALIGN-2** によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数）
÷（**PRO87299-DNA** 核酸配列の全ヌクレオチドの総数）＝
6 ÷ 14 = 42.9%

表５

PRO87299-DNA	**NNNNNNNNNNN**	**(長さ = 12 ヌクレオチド)**
比較 **DNA**	**NNNNLLLVV**	**(長さ = 9 ヌクレオチド)**

%核酸配列同一性 =

（**ALIGN-2** によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数）
÷（**PRO87299-DNA** 核酸配列の全ヌクレオチドの総数）＝
4 ÷ 12 = 33.3%

【００５４】
ＩＩ．本発明の組成物と方法
Ａ．完全長ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド
本発明は、本出願でＰＲＯ８７２９９ポリペプチドと呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例で更に詳細に説明するように、種々のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードするｃＤＮＡが同定され単離された。
そのようなクローンの実際のヌクレオチド配列は、当業者であれば、従来技術において常套的な方法を用いることにより寄託されたクローンの配列決定を行うことにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載したＰＲＯ８７２９９ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。
【００５５】
Ｂ．ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド変異体
ここに記載した完全長天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに加えて、ＰＲＯ８７２９９変異体も調製できると考えられる。ＰＲＯ８７２９９変異体は、ＰＲＯ８７２９９ＤＮＡに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び／或いは所望のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシル化部位の数又は位置の変化或いは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化がＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。
天然完全長配列ＰＲＯ８７２９９又はここに記載したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの

種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列ＰＲＯ８７２９９と比較してＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアミノ酸配列が変化するＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも一のアミノ酸のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び／又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては１から５のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作製し、得られた変異体を完全長又は成熟天然タンパク質によって提示された活性について試験することにより決定される。

【００５６】

ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、完全長天然タンパク質と比較した際に、Ｎ-末端又はＣ-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

ＰＲＯ８７２９９断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法は、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、或いは適当な制限酵素でＤＮＡを消化して所望の断片を単離することによるＰＲＯ８７２９９断片の生成を含む。更に他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、所望のポリペプチド断片をコードするＤＮＡ断片を単離し増幅することを含む。ＤＮＡ断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲの５’及び３’プライマーで用いられる。好ましくは、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド断片は、ここに開示した天然ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドと少なくとも一の生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

特別の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換と題して表６に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表６に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類で更に記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【００５７】

表６

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

ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの機能及び免疫学的同一性の実質的修飾は、（ａ）置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、（ｂ）標的部位の電荷又は疎水性、又は（ｃ）側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

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

【００５８】

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

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びＰＣＲ突然変異誘発といったこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発［Carter等，Nucl. Acids Res.，13:4331 (1986)；Zoller等，Nucl. Acids Res.，10:6487 (1987)］、カセット突然変異誘発［Wells等，Gene，34:315 (1985)］、制限的選択突然変異誘発［Wells等，Philos. Trans. R. Soc. London SerA，317:415 (1986)］又は他の知られた技術をクローニングしたＤＮＡに実施してＰＲＯ８７２９９変異体ＤＮＡを作製することもできる。

【００５９】

また、隣接配列に沿って一つ又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である［Cunningham及び

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

【００６０】

Ｃ．ＰＲＯ８７２９９の修飾

ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一つの型は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、ＰＲＯ８７２９９の選択された側鎖又はＮ又はＣ末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばＰＲＯ８７２９９を水不溶性支持体マトリクス或いは抗ＰＲＯ８７２９９抗体の精製方法、及びその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、１，１-ビス(ジアゾアセチル)-２-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば４-アジドサリチル酸とのエステル、３，３’-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-Ｎ-マレイミド-１，８-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-３-[(ｐ-アジドフェニル)-ジチオ］プロピオイミダート等の試薬を含む。

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular ＰＲＯ８７２９９perties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、Ｎ末端アミンのアセチル化、及び任意のＣ末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【００６１】

本発明の範囲内に含まれるＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列ＰＲＯ８７２９９に見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び／又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる）、及び／又は天然配列ＰＲＯ８７２９９に存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加をここでは意味する。更に、この語句は、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含み、そこには、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化も含まれる。

ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、一又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列ＰＲＯ８７２９９（Ｏ-結合グリコシル化部位）への付加、又は置換によってなされてもよい。ＰＲＯ８７２９９アミノ酸配列は、場合によっては、ＤＮＡレベルでの変化、特に、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードするＤＮＡを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸を翻訳するようにコドンを生成することによって変更されてもよい。

【００６２】

ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に公開されたWO87/05330、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、或いはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddi等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)により、及びEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されている

ように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。
本発明のＰＲＯ８７２９９の共有結合的修飾の他の型は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。
また、本発明のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【００６３】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとＰＲＯ８７２９９ポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。実施例は、ポリ－ヒスチジン（ポリ-ｈｉｓ）又はポリ－ヒスチジン－グリシン（ｐｏｌｙ-ｈｉｓ-ｇｌｙ）タグ；ｆｌｕ ＨＡタグポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５［Fieldら, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)］；c-mycタグ及びそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７及び９Ｅ１０抗体［Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)］；及び単純ヘルペスウィルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ及びその抗体［Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)］を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド［Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210(1988)］；ＫＴ３エピトープペプチド［Martin等, Science, 255:192-194 (1992)］；α-チューブリンエピトープペプチド［Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)］；及びＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397(1990)］を含む。

それに代わる実施態様では、キメラ分子はＰＲＯ８７２９９の免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はＩｇＧ分子のＦｃ領域であり得る。Ｉｇ融合体は、好ましくはＩｇ分子内の少なくとも一つの可変領域に換えてＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、ＩｇＧ１分子のヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３、又はヒンジ、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【００６４】

Ｄ．ＰＲＯ８７２９９の調製

以下の説明は、主として、ＰＲＯ８７２９９核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりＰＲＯ８７２９９を生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてＰＲＯ８７２９９を調製することができると考えられる。例えば、ＰＲＯ８７２９９配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい［例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., サン フランシスコ, カリフォルニア (1969)；Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照］。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機（フォスターシティー, カリフォルニア）を用いて、製造者の指示により実施してもよい。ＰＲＯ８７２９９の種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて完全長ＰＲＯ８７２９９を生産してもよい。

【００６５】

１．ＰＲＯ８７２９９をコードするＤＮＡの単離

ＰＲＯ８７２９９をコードするＤＮＡは、ＰＲＯ８７２９９ｍＲＮＡを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから得ることができる。従って、ヒトＰＲＯ８７２９９ＤＮＡは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから簡便に得ることができる。またＰＲＯ８７２９９-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又は公知の合成方法（例えば、自動化核酸合成）により得ることもできる。

ライブラリは、対象となる遺伝子或いはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ（ＰＲＯ８７２９９に対する抗体又は少なくとも約２０－８０塩基のオリゴヌクレオチド等）によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるｃＤＮＡ又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。所望のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法はＰＣＲ法を使用するものである［Sambrook等,上掲；Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)］。

下記の実施例には、ｃＤＮＡライブラリのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、充分な長さで、疑陽性が最小化されるよう充分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリ内のＤＮＡとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、^{32}Ｐ標識されたＡＴＰのような放射線標識、ビオチン化或いは酵素標識の使用が含まれる。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrook等,に示されている。

このようなライブラリスクリーニング法において同定された配列は、Genbank等,の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は完全長に渡っての（アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの）配列同一性は、当該分野で知られた、及びここに記載した方法を用いて決定することができる。

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

【００６６】

２．宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したＰＲＯ８７２９９生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、ｐＨ等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M.Butler編（IRL Press, 1991）及びSambrook等, 上掲に見出すことができる。

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質移入の方法、例えば、$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等,に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)による感染が、Shaw等, Gene, 23:315 (1983)及

び1989年6月29日公開のＷＯ89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、ＤＮＡを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、未処理の細胞、又はポリブレン、ポリオルニチン等のポリカチオンを用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及び Mansour等, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

【００６７】

ここに記載のベクターにＤＮＡをクローニング或いは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌Ｋ１２株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ３１，４４６）；大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ３１，５３７）；大腸菌株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ２７，３２５）及びＫ５７７２（ＡＴＣＣ５３，６３５）である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E. coli、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス(Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・スブチルス(B. subtilis)及びバチルス・リチェニフォルミス(B. licheniformis)（例えば、1989年4月12日発行のDD266,710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス４１Ｐ）、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株Ｗ３１１０は、組換えＤＮＡ生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株Ｗ３１１０は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌Ｗ３１１０株１Ａ２；完全な遺伝子型tonA ptr3を有する大腸菌Ｗ３１１０株９Ｅ４；完全な遺伝子型tonA prt3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ　５５，２４４）；完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株３７Ｄ６；非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を持つ３７Ｄ６株である大腸菌Ｗ３１１０株４０Ｂ４；及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。或いは、クローニングのインビトロ法、例えばＰＣＲ又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【００６８】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、ＰＲＯ８７２９９コード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・プロンブ(Schizosaccharomyces Prombe)（Beach及びNurse, Nature, 290:140 [1981]；1985年5月2日発行のEP139,383）；クルベロミセス宿主(Kluveromyces hosts)（米国特許第4,943,529号；Fleer等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)）、例えばクルベロミセスラクチス(K. lactis)（MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvencourt等, J. Bacteriol.154(2):737-742 [1983]）、クルベロミセス・フラギリス(K. fragilis)（ＡＴＣＣ　１２，４２４）、クルベロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus)（ＡＴＣＣ　１６，０４５）、クルベロミセス・ウィケラミイ(K. wickeramii)（ＡＴＣＣ　２４,１７８）、クルベロミセスワルチイ(K. waltii)（ＡＴＣＣ　５６，５００）、クルベロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilarum)（ＡＴＣＣ　３６，９０６；Van den Berg等, Bio/Technology, 8:135

(1990))、クルベロミセス・テモトレランス(K. thermotolerans)及びクルベロミセス・マルキシアナス(K. marxianus)；ヤロウィア(yarrowia)（EP402,226）；ピチア・パストリス(Pichia pastoris)（EP183,070；Sreekrishna等, J. Basic Microbiol, 28:265-278 [1988]）；カンジダ；トリコデル・マレーシア(Trichoderma reesia)（EP244,234）；アカパンカビ（Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]）；シュワニオマイセス(Schwanniomyces)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(Schwanniomyces occidentalis)（1990年10月31日発行のEP394,538）；及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(Tolypocladium)（1991年1月10日発行のWO91/00357）；及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス（Balance等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]；Tilburn等, Gene, 26:205-221 [1983]；Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]）、及びアスペルギルス・ニガー（Kelly及びHynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]）が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(Ｃ１化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピチア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記載されている。

グリコシル化ＰＲＯ８７２９９の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエＳ２及びスポドスペラＳｆ９等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）及びＣＯＳ細胞を含む。より詳細な例は、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ-７, ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）；ヒト胚腎臓株（２９３又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された２９３細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-ＤＨＦＲ（CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)）；マウスのセルトリ細胞（ＴＭ４, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)）ヒト肺細胞（Ｗ１３８, ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７５）；ヒト肝細胞 （Ｈｅｐ Ｇ２, ＨＢ ８０６５）；及びマウス乳房腫瘍細胞（ＭＭＴ ０６０５６２, ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１）を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【００６９】

３．複製可能なベクターの選択及び使用

ＰＲＯ８７２９９をコードする核酸（例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ）は、クローニング（ＤＮＡの増幅）又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウィルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、ＤＮＡはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、一つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一つ又は複数を含む適当なベクターの作製には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

ＰＲＯ８７２９９は直接的に組換え手法によって生産されるだけではなく、シグナル配列或いは成熟タンパク質或いはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるＰＲＯ８７２９９-コード化ＤＮＡの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐ或いは熱安定性エンテロトキシンＩＩリーダーの群から選択された原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（サッカロミセス(Saccharomyces)及びクルイベロマ

イシス(Kluyveromyces)α因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている）、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日発行のEP362179）、又は1990年11月15日に公開されたWO90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一或いは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウィルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【００７０】

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

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

【００７１】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの例は、ＤＨＦＲ或いはチミジンキナーゼのようにＰＲＯ８７２９９-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分の同定を可能にするものである。野生型ＤＨＦＲを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub等により Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているように調製され増殖された、ＤＨＦＲ活性に欠陥のあるＣＨＯ細胞株である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドＹＲｐ７に存在するｔｒｐ１遺伝子である［Stinchcomb等, Nature, 282:39 (1979)；Kingsman等, Gene, 7:141 (1979)；Tschemper等, Gene, 10:157 (1980)］。ｔｒｐ１遺伝子は、例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６或いはＰＥＰ４-１のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する［Jones, Genetics, 85:12 (1977)］。

発現及びクローニングベクターは、通常、ＰＲＯ８７２９９コード化核酸配列に作用可能に結合し、ｍＲＮＡ合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターはβ-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系［Chang等, Nature, 275:615 (1978)； Goeddel等, Nature, 281:544 (1979)］、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系［Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776］、及びハイブリッドプロモーター、例えばｔａｃプロモーター［deBoer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)］を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたＰＲＯ８７２９９をコードするＤＮＡと作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ(Ｓ．Ｄ．)配列を有する。

【００７２】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、３-ホスホグリセラートキナーゼ［Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)］又は他の糖分解酵素［Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)；Holland, Biochemistry, 17:4900(1987)］、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-６-リン酸イソメラーゼ、３-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソチトクロムＣ、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒ

ド-３-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターはEP73,657に更に記載されている。

【００７３】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのＰＲＯ８７２９９転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス（1989年7月5日公開のUK2,211,504）、アデノウィルス（例えばアデノウィルス２）、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、Ｂ型肝炎ウィルス及びサルウィルス４０（ＳＶ４０）のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による所望のＰＲＯ８７２９９をコードするＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約１０から３００塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するＤＮＡのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン）。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー（１００－２７０塩基対）、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、ＰＲＯ８７２９９コード配列の５’又は３’位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから５’位に位置している。

【００７４】

また、真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞）に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのＤＮＡ又はｃＤＮＡの通常は５’、時には３’の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、ＰＲＯ８７２９９をコードするｍＲＮＡの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのＰＲＯ８７２９９の合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981)；Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979)；EP117,060；及びEP117,058に記載されている。

【００７５】

４．遺伝子増幅／発現の検出

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

或いは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに対して、又はここで提供されるＤＮＡ配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はＰＲＯ８７２９９ ＤＮＡに

融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【００７６】

５．ポリペプチドの精製

ＰＲＯ８７２９９の形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液（例えばトリトン-Ｘ１００）又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。ＰＲＯ８７２９９の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

ＰＲＯ８７２９９を、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばＤＥＡＥによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ-ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスＧ-７５を用いるゲル濾過；ＩｇＧのような汚染物を除くプロテインＡセファロースカラム；及びＰＲＯ８７２９９のエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, Methodes in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のＰＲＯ８７２９９の性質に依存する。

【００７７】

Ｅ．組織分布

本発明のＰＲＯ８７２９９を発現する組織の位置は、種々のヒト組織でのｍＲＮＡ発現の測定により確認できる。そのような遺伝子の位置は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの活性の刺激及び阻害によって最も影響を受けやすい組織に関する情報を提供する。また、特定の組織中の遺伝子の位置は、下記において論じる活性遮断アッセイのための試料組織を提供する。

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

或いは、種々の組織における遺伝子発現は、遺伝子産物を直接定量化するための、組織断片及び細胞培地又は体液の免疫組織学的染色などの免疫的方法によっても測定できる。免疫組織学的染色又は試料液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の動物から調製される。都合良く、抗体は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの天然配列に対して、又は本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列に基づく合成ペプチドに対して、或いはＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをコードし、特異的抗体エピトープをコードするＤＮＡと融合した外来配列に対して調製してもよい。下記に、抗体を生成するための一般的な技術、並びにノーザンブロット及びインサイツハイブリダイゼーションのプロトコールを提供する。

【００７８】

Ｆ．抗体結合の研究

本発明のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの活性は、組織細胞に対するＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの効果を阻害する抗ＰＲＯ８７２９９抗体の能力が試験される抗体結合の研究によって更に確認できる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロコンジュゲート抗体を含み、その調製は以下に記載する。

抗体結合の研究は、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイなどの既知のアッセイ法で実施してよい。Zola, Monoclonal Antibodie

s: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

競合的結合アッセイは、標識標準物の、限られた量の抗体との結合について試験分析物と競合する能力による。試験試料中の（腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる）標的タンパク質の量は、抗体に結合し始める標準物の量に逆比例する。結合し始める標準物の量の測定を促進するために、抗体は好ましくは競合の前又は後に固定化し、抗体に結合した標準品及び分析物が未結合で残っている標準物及び分析物から容易に分離できるようにする。

サンドウィッチアッセイは二つの抗体の使用を含み、各々が検出すべきタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチアッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第一の抗体に結合し、その後第二の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の３成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第二の抗体は検出可能部分で標識され（直接サンドウィッチアッセイ）、或いは検出可能部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接サンドウィッチアッセイ）。例えば、サンドウィッチアッセイの一形態はＥＬＩＳＡアッセイであり、この場合の検出可能部分は酵素である。

免疫組織学のためには、腫瘍試料は新鮮でも凍結したものでもよく、パラフィンに包埋して、例えばホルマリン等の保存剤で固定してもよい。

【００７９】

Ｇ．細胞ベースアッセイ

細胞ベースアッセイ及び乾癬等の免疫関連疾患の動物モデルを、ここで同定された遺伝子とポリペプチド、並びに乾癬の発達と病原性との関係を更に理解するのに用いることができる。

異なる方法では、免疫関連疾患に関与することが知られている或る細胞型の細胞へここに記載されたｃＤＮＡを形質移入し、これらのｃＤＮＡの免疫関連疾患を刺激又は阻害する能力を分析する。適当な細胞は所望の遺伝子で形質移入し、そしてそのような機能活性をモニターすることができる。このような形質移入された細胞株は、乾癬を阻害又は刺激するポリ－又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の能力を試験するのに用いることができる。ここに同定した遺伝子のコード化配列で形質移入した細胞は、更に、免疫関連疾患の治療の候補薬の同定に用いることができる。

更には、安定な細胞株が好ましいが、トランスジェニック動物から誘導された一次培地を（下記のような）、ここでの細胞ベースアッセイに使用することができる。トランスジェニック動物から連続細胞株を誘導する技術は、この分野で良く知られている（Small等, Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985]参照）。

【００８０】

一つの適切な細胞ベースアッセイは、混合リンパ球反応(ＭＬＲ)である。Current Protocols in Immunology, unit3.12；Ｊ Ｅ Coligan, Ａ Ｍ Kruisbeek, Ｄ Ｈ Marglies, Ｅ Ｍ Shevach, Ｗ Strober編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Inc。このアッセイでは、活性Ｔ細胞の増殖を刺激又は阻害する試験化合物の能力が評価される。レスポンダーＴ細胞の懸濁液を同種刺激細胞と培養し、Ｔ細胞の増殖をトリチウム化チミジンの取り込みによって測定する。このアッセイは、Ｔ細胞反応性の一般的な測定法である。活性化によって、Ｔ細胞の大多数がＩＬ-２へ応答し、ＩＬ-２を生産することから、このアッセイでの応答性の相違の一部は、応答細胞によるＩＬ-２生産の違いを反映する。ＭＬＲの結果は、標準的なリンフォカイン（ＩＬ-２）検出アッセイによって確かめられる。Current Protocols in Immunology, 上掲, ３．１５, ６．３。

ＭＬＲアッセイにおける増殖性のＴ細胞応答は、アッセイされた分子の直接的な分裂促進特性又は外来性の抗原誘導活性化に起因する。Ｔ細胞活性化には、Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）を通して媒介される抗原特異性シグナルと二番目のリガンド結合による相互作用を通して媒介される同時刺激シグナル、例えばＢ７（ＣＤ８０, ＣＤ８６）／ＣＤ２８結合相互作用が必要される。ＣＤ２８架橋は、活性化Ｔ細胞によるリンフォカインの分泌を増加させる。Ｔ細胞活性化は、ネガティブ又はポジティブ効果のあるリガンド結合を通し

て、ネガティブ及びポジティブコントロールの両方を有する。ＣＤ２８及びＣＴＬＡ-４はＢ７と結合するＩｇスーパーファミリーの関連する糖タンパク質である。Ｂ７へのＣＤ２８の結合には、Ｔ細胞活性化のポジティブ同時刺激効果がある；逆を言えば、Ｂ７へのＣＴＬＡ-４の結合には、Ｔ細胞非活性化効果がある。Chambers, C.A.及びAllison, J.P., Curr. Opin. Immunol.(1997) 9:396；Schwartz, R.H., Cell(1992) 71: １０65；Linsey, P.S.及びLedbetter, J.A., Annu. Rev. Immunol.(1993) 11:191；June, C.H.ら., Immunol. Today(1994) 15:321；Jenkins, M.K., Immunity(1994) 1:４０５。同時刺激アッセイでは、Ｔ細胞同時刺激性又は阻害活性についてＰＲＯ８７２９９ポリペプチドをアッセイする。

本発明におけるような刺激化合物の直接的用途は、初期Ｔ細胞上に発現するリガンド（４-１ＢＢＬ）と結合し、Ｔ細胞活性化と成長の信号を伝達する、腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーである４-１ＢＢ糖タンパク質をともなう実験において確かめられている。Alderson, M.E.ら., J. Immunol. (1994) 24:2219。

アゴニスト刺激性化合物の用途も実験的に確かめられている。アゴニスト抗-４-１ＢＢ抗体による治療での４-１ＢＢの活性化は、腫瘍の根絶を促進する。Hellstrom, I.及びHellstrom, K.E., Crit. Rev. Immunol. (1998) 18:1。下記により詳しく記載されている免疫吸着剤療法による腫瘍の治療は、本発明の刺激性化合物の用途のもう一つの例である。

あるいは、免疫刺激又は増強効果は、また、血管透過性を高める特性を有するＰＲＯ８７２９９の投与によって達成することができる。高まった血管透過性は、免疫細胞（例えば、単球、好酸球、ＰＭＮ）の局所的な浸潤によって和らげることが可能な疾患に対して有益である。

一方では、Ｔ細胞増殖／活性化、リンフォカイン分泌、及び／又は血管透過性の直接的阻害剤である本発明の他の化合物と同様にＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、免疫応答を抑制へ直接に用いることができる。これらの化合物は、免疫応答の程度を減じること、並びに異常に活発な、並外れに最適な、又は自己免疫性の応答によって特徴付けられる免疫関連疾患を治療するのに有用である。本発明のこの化合物の用途は、レセプターＢ７へのＣＴＬＡ-４の結合がＴ細胞を不活性化させる上記に記載の実験によって確認されている。本発明の直接的阻害性化合物は、類似の方法で機能する。血管透過性を抑制する化合物の用途は、炎症を減じることが期待できる。そのような用途は、過度の炎症に関連する症状を治療するのに有益である。

あるいは、例えば、本発明の刺激ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドと結合し、これら分子の刺激効果を遮断する抗体は、正味の阻害性効果を生成し、Ｔ細胞増殖／活性化及び／又はリンフォカイン分泌を阻害することによってＴ細胞性免疫応答を抑制することに用いることができる。このポリペプチドの刺激効果を遮断することは、哺乳動物の免疫応答を抑制する。この用途は、抗-ＩＬ２抗体を用いる実験において確認されている。これらの実験では、抗体はＩＬ２と結合し、ＩＬ２のそのレセプターとの結合を遮断することでＴ細胞阻害効果を達成する。

【００８１】

Ｈ．動物モデル

更に、インビトロにおける細胞ベースアッセイの結果は、インビボ動物モデル及びＴ細胞機能のアッセイにより証明することができる。免疫関連疾患の進行及び病因におけるここに同定される遺伝子の役割を更に理解するために、そして抗体、及び小分子アンタゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。これらのモデルのインビボ性質により、ヒト患者における反応を予測できる。免疫関連疾患の動物モデルは、非組換え及び組換え（トランスジェニック）動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植等により、細胞を同系マウスに導入することにより作製される。

移植片対宿主病は、免疫適格細胞が免疫抑制され又は耐性のある患者に移植された場合

に生じる。ドナー細胞は宿主抗原を認識しそれに反応する。反応は生命に危険性のある重度の炎症から、下痢や体重の減少等の軽度のケースまで多様である。移植片対宿主病モデルはＭＨＣ抗原及び少量の移植抗原に対するＴ細胞反応性を評価する手段を提供する。適切な手順は上記のCurrent protocols in Immunology, unit4.3.に詳細に記載されている。

皮膚同種移植片拒絶のための動物モデルは、Ｔ細胞がインビボで組織の破壊を媒介する能力を試験する手段であり、移植拒絶におけるそれらの役割の指標である。最も一般的で容認されているモデルではマウスの尾の皮膚の移植片が使用される。繰り返し実験により、皮膚同種移植片拒絶がＴ細胞、ヘルパーＴ細胞及びキラー-エフェクターＴ細胞により媒介されるが、抗体では媒介されないことが分かった。Auchincloss, H. Jr.及びSachs, D.H., Fundamental Immunology, 2nd ed., W.E.Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992。適切な手順は上掲のCurrent protocols in Immunology, unit4.4.に詳細に記載されている。本発明の化合物の試験に使用可能な他の移植拒絶モデルは、Tanabe, M.等, Transplantation (1994) 58:23及びTinubu, S.A.等, J. Immunol. (1994) 4330-4338により記載されている同種心臓移植片モデルである。

【００８２】

遅延型過敏症の動物モデルは、同様に細胞媒介免疫機能のアッセイ法を提供する。詳細な型の過敏症反応は、抗原負荷後時間が経過するまでピークに達しない炎症を特徴とするＴ細胞媒介免疫反応である。これらの反応はまた、組織特異的自己免疫疾患、例えば多発性硬化症（ＭＳ）及び実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ、ＭＳのモデル）を起こす。好適な手法は、上記のCurrent Protocols in Immunology, unit 4.5に詳細に記載されている。

ＥＡＥは、Ｔ細胞及び単核球炎症、及びその結果生じた中枢神経系の軸索の脱髄によって特徴付けられるＴ細胞性自己免疫疾患である。ＥＡＥは、一般的には、ヒトのＭＳの関連する動物モデルであると考えられる。Bolton, C., Multiple Sclerosis(1995) 1: 143。急性及び再発性軽減モデルの両方が開発されている。Current Protocols in Immunology, unit 15.1及び15.2に記載のプロトコールを用いて、本発明の化合物は、免疫性脱髄疾患に対するＴ細胞刺激性又は阻害性活性について試験することができる。Duncan, I.D.ら, Molec. Med. Today(1997) 554-561に記載されている、オリゴデンドログリア又はシュワン細胞が中枢神経系へ移植されるミエリン疾患のモデルも参照のこと。

【００８３】

接触性過敏症は、細胞媒介免疫機能の単純な遅発型過敏インビボアッセイである。この手順において、遅発型過敏反応を生じさせる外因性ハプテンに皮膚を暴露し、反応を測定して定量する。接触過敏症は最初の感作段階に顕在化段階が続く。顕在化段階はＴリンパ球が過去に接触したことのある抗原に遭遇したときに生じる。腫れと炎症が生じ、ヒトアレルギー性接触皮膚炎の優れたモデルが作製される。適切な手順は、Current protocols in Immunology, J.E. Coligan, A.M.Kruisbeek, D.H.Marglies, E. M.Shevach, 及びW.Strober編, John Wiley & Sons, Inc, unit4.2に詳細に記載されている。また、Grabbe, S.及びSchwarz, T. Immun. Today 19(1):37-44(1998)も参照のこと。

関節炎の動物モデルはコラーゲン誘発関節炎である。このモデルは、ヒトの自己免疫性慢性関節リウマチと臨床的、組織学的及び免疫学的特徴を共有し、ヒトの自己免疫性関節炎の許容されるモデルである。マウス及びラットモデルは、滑膜炎、軟骨及び肋軟骨下骨の浸食を特徴とする。本発明の化合物は、上記のCurrent Protocols in Immunology, unit 15.5に記載されているプロトコールを用いて、自己免疫性関節炎に対する活性について試験できる。また、Issekutz, A.C.ら, Immunology 88: 569 (1996)に記載されているＣＤ１８及びＶＬＡ-４インテグリンに対するモノクローナル抗体を用いたモデルも参照のこと。

喘息のモデルは記載され、そこでは抗原誘発気道過剰反応性、肺性好酸球増加症及び炎症が、動物をオボアルブミンで感作し、次いで動物にエアロゾルで運ばれる同じタンパク質を負荷することにより誘発される。幾つかの動物モデル（モルモット、ラット、非ヒト

霊長類）は、エアロゾル抗原で負荷した際にヒトのアトピー性喘息に似た徴候を示す。マウスモデルは、ヒト喘息の多くの特徴を持つ。本発明の化合物の喘息治療における活性及び有効性を試験するための好適な方法は、Wolyniec, W.W.ら, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 18: 777(1998) 及びその引用文献に記載されている。

【００８４】

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

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

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

【００８５】

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

例えば免疫細胞の特定の細胞への浸潤を確定するための組織学的検査によって、免疫疾患病理の兆候に関してこの動物を更に調べてもよい。本発明の化合物によるＴ細胞増殖の刺激又は阻害の程度を確定するために、この化合物で処理したトランスジェニック動物で遮断実験をも行うことができる。これらの実験では、上記に記載のようにして調製したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドと結合する遮断抗体が動物へ投与され、そして免疫機能への影響が測定される。

或いは、「ノックアウト」動物は、ここで同定されたポリペプチドをコードする内在性の遺伝子と、動物の胚性細胞へ導入されたそのポリペプチドをコードする改変ゲノムＤＮＡとの間の相同組換えの結果として、ここで同定されたポリペプチドをコードする欠陥又は改変遺伝子を有するものとして構築することができる。例えば、ある特定ポリペプチドをコードするｃＤＮＡは、確立されている技術によって、そのポリペプチドをコードするゲノムＤＮＡのクローニングに利用できる。ある特定のポリペプチドをコードするゲノムＤＮＡの一部は、その他の遺伝子、例えば組み込みをモニターするために利用できる選択可能なマーカーをコードする遺伝子によって置き換え又は除去できる。概して、ベクターは無変化のフランキングＤＮＡ（５'と３'末端の両方）を数キロベース含む［例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503 (1987)を参照のこと］。ベクターを胚性幹細胞へ（例えば電気穿孔法等によって）導入し、導入されたＤＮＡ

が内在性ＤＮＡと相同的に組換えられた細胞を選択する［例えば、Li等, Cell, 69:915 (1992)参照］。選択された細胞は次に動物（例えばマウス又はラット）の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する［例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照］。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたＤＮＡを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたＤＮＡを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、例えば腫瘍の発達を含む、ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状態及びその病理的状態の発達に対する防御能力によって特徴付けられる。

【００８６】

Ｉ．免疫アジュバント治療

一実施態様では、本発明の免疫刺激化合物は腫瘍（癌）治療における免疫アジュバント治療に使用することができる。Ｔ細胞がヒト腫瘍特異的抗原を認識することは十分に確立されている。遺伝子のＭＡＧＥ、ＢＡＧＥ及びＧＡＧＥファミリーによりコードされる腫瘍抗原の一グループは全ての成人の正常組織においてサイレントであるが、腫瘍、例えばメラノーマ、肺腫瘍、頭部及び頸部の腫瘍、膀胱癌においては有意の量で発現している。DeSmet. C.等, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci.93:7149。Ｔ細胞の共刺激により、インビトロ及びインビボの双方において、腫瘍の退行及び抗腫瘍反応が誘発されることが示されている。Melero. I.等, Nature Medicine (1997) 3:682；Kwon. E.D.等, Proc. Natl. Acad. Sci.USA (1997) 94:8099；Lynch. D.H.等, Nature Medicine (1997) 3:625；Finn. O.J.及びLotze. M.T., J. Immunol. (1998) 21:114。本発明の刺激化合物はアジュバントとして単独で又は成長調節剤、細胞障害性薬又は化学療法剤と共に投与することができ、Ｔ細胞増殖／活性化及び腫瘍抗原に対する抗腫瘍反応を刺激する。成長調節剤、細胞障害性薬又は化学療法剤は既知の投与方法で使用されている従来からの量で投与することができる。本発明の化合物による免疫刺激活性により、成長調節剤、細胞障害性薬又は化学療法剤の量を減らすことができ、よって、潜在的に患者に対する毒性を低下させることができる。

【００８７】

Ｊ．候補薬ためのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされているポリペプチド、或いはその生物活性断片と結合又は複合化する化合物、或いはそうでなければコードされているポリペプチドと他の細胞性タンパク質の相互作用を妨害する化合物を同定するように設計されている。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含み、特に、小分子候補薬の同定に適している。考えられる小分子には、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、（ポリ）ペプチド-免疫グロブリン融合物を含む合成有機又は無機化合物を含み、そして特に限定することなく、ヒト抗体及び抗体断片と並んで、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、及びそのような抗体又は断片のキメラ又はヒト化異形を含む抗体を含む。このアッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質－タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。すべてのアッセイは、候補薬とここで同定された核酸によってコードされているポリペプチドの相互作用を可能にする条件下及び十分な時間に渡って、これら二つの分子を接触させることを必要とするという点で共通である。

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、或いは反応混合物中で検出することができる。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。或いは、固定化すべきペプチドに特

異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、そのペプチドを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

【００８８】

候補化合物が相互作用するが特定のタンパク質に結合しない場合、そのレセプターとの相互作用は、タンパク質－タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィーカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。更に、タンパク質－タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者等［Fiels及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989)；Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)］に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより、Chevray及びNathans［Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)］に開示されているようにモニターすることができる。酵母菌ＧＡＬ４などの多くの転写活性化剤は、二つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はＤＮＡ結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「ツーハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、二つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がＧＡＬ４のＤＮＡ結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。ＧＡＬ１-ｌａｃＺリポーター遺伝子のＧＡＬ４活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したＧＡＬ４活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、β-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。ツーハイブリッド技術を用いた二つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER(商品名)）は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

ここで同定された遺伝子の相互作用を妨害する化合物と、試験が可能な他の細胞内又は細胞外成分を見出すために、二つの産物の相互作用と結合を可能にする条件と時間の下で、遺伝子の生産物、並びに細胞内又は細胞外成分を含有するように、反応混合物は、通常は調製される。試験化合物の結合を阻害する能力を試験するためには、反応を試験化合物が存在する場合と存在しない場合で実施する。更に、第三の反応混合物へプラシーボを添加してポジティブコントロールとしてもよい。コントロール反応において複合体の形成があり、試験化合物を含有しない反応混合物では複合体の形成がないことは、試験化合物が、試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【００８９】

Ｋ．免疫関連疾患の治療のための組成物及び方法

免疫関連疾患の治療に有用な組成物は、限定されないが、タンパク質、抗体、小有機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、三重螺旋分子などを含み、免疫機能、例えばＴ細胞増殖／活性化、リンホカイン放出、又は免疫細胞の浸潤を阻害する。

例えば、アンチセンスＲＮＡ及びＲＮＡ分子は、標的ｍＲＮＡにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を防止することによりｍＲＮＡの翻訳を直接阻止する。アンチセンスＤＮＡが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の－１０から＋１０位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

リボザイムは、ＲＮＡの特異的切断を触媒できる酵素的ＲＮＡ分子である。リボザイムは、相補的標的ＲＮＡへの配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切

断的切断により作用する。潜在的ＲＮＡ標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4:469-471 (1994)及びＰＣＴ公報番号WO97/33551（1997年9月18日公開）を参照。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。更なる詳細は、例えば、ＰＣＴ公報番号WO97/33551, 上掲を参照。

これらの分子は上記のスクリーニングアッセイの任意のもの又は任意の組み合わせにより、又は当業者に知られた他のスクリーニング技術により同定できる。

【００９０】

Ｌ．抗ＰＲＯ８７２９９抗体

本発明は、更に抗ＰＲＯ８７２９９抗体を提供するものである。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。

１．ポリクローナル抗体

抗ＰＲＯ８７２９９抗体はポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫剤及び／又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫剤は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びＭＰＬ-ＴＤＭアジュバント（モノホスホリル脂質Ａ、合成トレハロースジコリノミコラート）が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

【００９１】

２．モノクローナル抗体

或いは、抗ＰＲＯ８７２９９抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫剤により免疫化することで、免疫剤に特異的に結合する抗体を生成するか或いは生成可能なリンパ球を誘発する。或いは、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫剤は、典型的には対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球（「ＰＢＬ」）が使用され、或いは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する［Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103］。不死化細胞株は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(ＨＧＰＲＴ又はＨＰＲＴ)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプテリン及びチミジンを含み（「ＨＡＴ培地」）、この物質がＨＧＰＲＴ欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【００９２】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、ＨＡＴ培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化細胞株はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやメリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫細胞株も開示されている［Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63］。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、ＰＲＯ８７２９９に対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(ＲＩＡ)や酵素結合免疫測定法(ＥＬＩＳＡ)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキャッチャード解析法によって測定することができる。

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

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインＡ－セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

【００９３】

また、モノクローナル抗体は、組換えＤＮＡ法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作製することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、常套的な方法を用いて（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して）、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなＤＮＡの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、ＤＮＡは発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、或いは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、ＤＮＡは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより［米国特許第4,816,567号；Morrison等, 上掲］、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、或いは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られている。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにＦｃ領域の任意の点で切断される。或いは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

一価抗体の調製には、同じくインビトロ法が適している。抗体の消化による、その断片、特にＦａｂ断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成が可能である。

【００９４】

３．ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗ＰＲＯ８７２９９抗体は、更にヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト（例

えばマウス）抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖或いはその断片（例えばＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$或いは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）のＣＤＲの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたＣＤＲもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全て或いはほとんど全てのＣＤＲ領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全て或いはほとんど全てのＦＲ領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Ｆｃ)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる［Jones等，Nature，321:522-525 (1986)；Riechmann等，Nature，332:323-329 (1988)；及びPresta，Curr. Op Struct. Biol.，2:593-596 (1992)］。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のＣＤＲ又はＣＤＲ配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(Winter)及び共同研究者［Jonesら，Nature，321:522-525 (1986)；Riechmannら，Nature，332:323-327 (1988)；Verhoeyenら，Science，239:1534-1536 (1988)］の方法に従って、齧歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、原型のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのＣＤＲ残基及び場合によっては幾つかのＦＲ残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリ［Hoogenboom及びWinter，J. Mol. Biol.，227:381(1991)；Marks等，J. Mol. Biol.，222:381 (1991)］を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作製することもできる。また、Cole等及びBoerner等の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる［Cole等，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy，Alan R. Liss. p.77 (1985)及びBoerner等，J. Immunol.，147(1):86-95 (1991)］。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科学文献：Marks等，Bio/Technology 10，779-783 (1992)；Lonberg等，Nature 368 856-859 (1994)；Morrison，Nature 368，812-13 (1994)；Fishwild等，Nature Biotechnology 14，845-51 (1996)；Neuberger，Nature Biotechnology 14，826 (1996)；Lonberg及びHuszar，Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

また、抗体は、上記に記載のような既知の選択及び／又は突然変異誘発法を利用して親和的に成熟している。好ましい親和性成熟抗体は、５倍、より好ましくは１０倍、更により好ましくは２０又は３０倍も成熟抗体の調製の元である出発抗体（一般的には、マウス、ヒト化又はヒト）より高い親和性を有する。

【００９５】

４．二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合においては、結合

特異性の一方はＰＲＯ８７２９９に対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作製する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づく［Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)］。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ（クアドローマ）は１０種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO93/08829、及びTraunecker等, EMBO J.,10:3655-3656 (1991)に開示されている。

【００９６】

所望の結合特異性（抗体-抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、ＣＨ２及びＣＨ３領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域（ＣＨ１）が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするＤＮＡ、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作製するための更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

WO96/27011に記載された他の方法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのＣＨ３領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第一抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖（例えばチロシン又はトリプトファン）と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）と置き換えることにより第二の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【００９７】

二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$二重特異性抗体）として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229:81 (1985) は原型の抗体をタンパク分解性に切断してＦ（ａｂ’）$_2$断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜砒酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたＦａｂ’断片はついでチオニトロベンゾアート（ＴＮＢ）誘導体に転換される。Ｆａｂ’-ＴＮＢ誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりＦａｂ’-チオールに再転換し、他のＦａｂ’-ＴＮＢ誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

大腸菌からＦａｂ’フラグメントを直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子の製造を記述している。各Ｆａｂ’フラグメントは大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトＴ細胞及びＥｒｂＢ２レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【００９８】

また、組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作製し分離する様々な方法が記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny等, J.Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。Ｆｏｓ及びＪｕｎタンパク質から

のロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のＦａｂ’部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の二つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、二つの抗原結合部位を形成する。単鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J.Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等, J.Immunol. 147:60 (1991)。

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの二つの異なるエピトープに結合しうる。或いは、抗ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアームは、特定のＰＲＯ８７２９９ポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、Ｔ細胞レセプター分子（例えばＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ２８、又はＢ７）等の白血球上のトリガー分子又はＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲII（ＣＤ３２）及びＦｃγＲIII（ＣＤ１６）等のＩｇＧ（ＦｃγＲ）に対するＦｃレセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを発現する細胞に細胞障害性薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はＰＲＯ８７２９９結合アーム及び細胞障害性薬又は放射性キレート化剤、例えばＥＯＴＵＢＥ、ＤＰＴＡ、ＤＯＴＡ、又はＴＥＴＡと結合するアームを有する。興味の対象となる他の二重特異性抗体はＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに結合し、そして更に組織因子（ＴＦ）に結合する。

【００９９】

５．ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、二つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため［米国特許第4,676,980号］及びＨＩＶ感染の治療のために［WO91/00360；WO92/200373；EP03089］提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作製することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-４-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されたものが含まれる。

【０１００】

６．エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させることが望ましい。例えば、システイン残基をＦｃ領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体－依存性細胞性細胞障害性（ＡＤＣＣ）を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。或いは、抗体は、二つのＦｃ領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びＡＤＣＣ能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

【０１０１】

７．免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活

性毒素、又はその断片）などの細胞障害性薬、或いは放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシン(modeccin)Ａ鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria oficinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ、及び^{186}Ｒｅが含まれる。

抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、Ｎ-スクシンイミジル-３-(２-ピリジルジチオール)プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートＨＣＬ等）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレート等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス(ｐ-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-(ｐ-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トリエン２，６-ジイソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（１，５-ジフルオロ-２，４-ジニトロベンゼン等）を用いて作製できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら，Science 238:1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-１４-標識１-イソチオシアナトベンジル-３-メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ-ＤＴＰＡ）は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。WO94/11026参照。

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

【０１０２】

８．免疫リポソーム

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

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

【０１０３】

Ｍ．製薬的組成物

本発明の活性ＰＲＯ８７２９９分子（例えば、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、抗ＰＲＯ８７２９９抗体、及び／又は各変異体）並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、免疫関連疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

本発明の活性ＰＲＯ８７２９９分子、好ましくはポリペプチド又は抗体の治療製剤は、所望される程度の純度を持つ活性成分を、凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]）。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物、ＥＤＴＡ等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ-タンパク質錯体）及び／又はトゥイーン（TWEEN(商品名)）、プルロニクス（PLURONICS(商品名)）、及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【０１０４】

本発明のスクリーニングアッセイによって同定された化合物は、当該分野において良く知られた技術を用いて、類似の方法で製剤化することができる。

また、リポフェクション又はリポソームを、ＰＲＯ８７２９９分子を細胞に導入するために利用することができる。抗体断片が用いられる場合には、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成でき及び／又は組換えＤＮＡ技術によって生成できる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に一つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。或いは、又はそれに加えて、組成物は、細胞障害性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性ＰＲＯ８７２９９分子は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルション中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

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

【０１０５】

ＰＲＯ８７２９９分子の徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。除放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(２-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、Ｌ-グルタミン酸とγ-エチル-Ｌ-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商品名）（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドからなる注射可能なマイクロスフェア）等の分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(Ｄ)-３-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を１０

０日に亘って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは３７℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間Ｓ-Ｓ結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【０１０６】

Ｎ．治療方法

本発明のポリペプチド、抗体及び他の活性化合物は、組織への炎症細胞の浸潤、Ｔ細胞増殖の刺激、Ｔ細胞増殖の阻害、又は血管透過性の増大又は低下、或いはその阻害によって特徴付けられるものを含め、Ｔ細胞媒介疾患などの様々な免疫関連疾患及び症状を治療するのに利用することが可能である。

本発明のポリペプチド、抗体及びその他の化合物を用いて治療される病体又は異常の例には、限定するものではないが、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、若年性慢性関節炎、変形性関節症、脊椎関節症、全身性硬化症（強皮症）、特発性炎症性筋疾患（皮膚筋炎、多発性筋炎）、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿）、自己免疫性血小板減少症（特発的血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症）、甲状腺炎（グレーブ疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、真性糖尿病、免疫性腎臓疾患（糸状体腎炎、尿細管間質性腎炎）、中枢及び末梢神経系の脱髄性疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害、又はギランバレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、例えば感染性肝炎（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ型肝炎及びその他の非肝性ウィルス）、自己免疫慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎：クローン病）、グルテン感受性腸疾患、フィップル疾患、自己免疫性又は免疫媒介性皮膚疾患、水泡性皮膚疾患、多形滲出性紅斑、接触皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、肺の免疫学的疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、高感受性間質性肺炎、移植関連疾患、移植片拒絶又は移植片対宿主病が含まれる。

【０１０７】

全身性エリテマトーデスでは、疾患の中心媒介物は自己タンパク質／組織に対する自己反応性抗体の生成、及び引き続き起こる免疫媒介炎症である。抗体は、直接又は間接的のいずれかによって組織傷害を媒介する。Ｔリンパ球が直接に組織傷害へ関与していることは示されていないが、Ｔリンパ球は自己反応性抗体の発生において必須である。従って、疾患の発生はＴリンパ球へ依存する。腎臓、肺、筋骨格系、粘膜皮膚、眼、中枢神経系、心臓血管系、胃腸管、骨髄及び血液を含む多臓器及び系が、臨床的に病気で冒される。

慢性関節リュウマチ(ＲＡ)は、主に複数の関節の滑膜に係る慢性全身性自己免疫疾患であり、結果として関節軟骨に傷害が生じる。病原はＴリンパ球依存であり、リウマチ因子、自己ＩｇＧに指向する自己抗体の生成を付随し、結果として関節体液及び血液において高レベルに達する免疫複合体が形成される。関節におけるこれらの複合体は、滑膜へのリンパ球及び単球の顕著な浸潤と、続いての顕著な滑膜変化を誘発しうる；多数の好中球の添加により同様の細胞で浸潤されるならば関節空間／体液でもである。影響を受けている組織は、多くの場合対称的なパターンで主に関節である。しかしながら、２つの主な形態の関節外疾患も生じる。一方の形態は進行中の進行性関節疾患及び肺線維症の局部的障害、血管炎、及び皮膚潰瘍を伴う関節外障害の発達である。関節外疾患の第２の形態はいわゆるフェルティー症候群であり、ＲＡ疾患経路の末期、時々は関節疾患が鎮静した後に生じ、好中球減少、血小板減少及び脾肥大の存在に関与する。これは、梗塞、皮膚潰瘍及び壊疽の形成を伴う多数の器官及び血管炎に付随する。多くの場合、患者では、発病している関節上にある皮下組織にリウマチ様小結節が発達し；小結節は、混合炎症細胞浸潤に包

囲された壊死性中心を有する。ＲＡで生じる可能性のある他の徴候には：心外膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、肺線維症を伴う間質性肺炎、乾性角結膜炎、及びリウマチ様小結節が含まれる。

若年性慢性関節炎は、多くの場合１６才以下で発症する慢性特発性炎症疾患である。その表現型はＲＡといくつかの類似点があり；リウマチ因子がポジティブである患者の中には若年性リウマチ様関節炎に分類されるものもいる。この疾患は主な３つのカテゴリー：小関節(pauciarticular)、多関節(polyarticular)及び全身性ものに亜分類される。関節炎は重度で局所的な破壊が生じ、関節強直症及び遅延成長に至るおそれもある。他の徴候には慢性前ブドウ膜炎及び全身性アミロイド症が含まれる。

【０１０８】

脊椎関節症は、いくつかの共通した臨床的特徴とＨＬＡ-Ｂ２７遺伝子産物の発現との共通の関連性を持つ疾患のグループである。該疾患には：Bechterew氏病(ankylosing spondylitis)、ライター症候群（反応性関節炎）、炎症性大腸疾患に関連した関節炎、乾癬に関連した脊椎炎、若年発生脊椎関節症及び未分化脊椎関節症が含まれる。顕著な特徴には、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；炎症非対称性関節炎；ＨＬＡ-Ｂ２７（クラスＩＭＨＣのＨＬＡ-Ｂ座位にある血清学的に定義された対立遺伝子）との関連；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に関連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導に対する鍵として最も関わっている細胞はＣＤ８＋Ｔリンパ球で、クラスＩ ＭＨＣ分子により提示される抗原を標的としている細胞である。ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＭＨＣクラスＩ分子により発現された外来ペプチドであるかのように、クラスＩ ＭＨＣ対立遺伝子ＨＬＡ-Ｂ２７に対して反応する。ＨＬＡ-Ｂ２７のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原性エピトープを模倣し、よってＣＤ８＋細胞の反応を誘発すると仮定されている。

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

【０１０９】

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

シェーグレン症候群は、免疫媒介炎症、続く涙腺及び唾液腺の機能破壊によるものである。この疾患は炎症結合組織疾患を伴うか又は伴わない。この疾患は、双方ともが小ＲＮＡ-タンパク質複合体であるＲｏ及びＬａ抗原に対する抗体産出に関連している。障害により、結果として乾性角結膜炎、bilary硬変を含む他の徴候又は会合を伴う口内乾燥、末梢又は感覚ニューロパシー、及び明白な紫斑病に至る。

全身性血管炎症症は主な障害が炎症で、続いて血管にダメージを受け、結果として影響を受けた脈管により供給される組織に虚血／壊死／変性が生じ、最終的な末端器官ではいくつかのケースで機能障害になるといった疾患である。また、第２の障害として血管炎(vasculitides)、又は他の免疫炎症媒介疾患、例えばリウマチ様関節炎、全身性硬化症等、特に免疫複合体の形成に関連した疾患等の続発症が生じるおそれがある。主な全身性血管

炎症症グループの疾患には：全身壊死性血管炎：多動脈炎結節(polyarteritis nodosa)、アレルギー性脈管炎、及び肉芽腫症、多脈管炎：ヴェゲナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症：及び巨細胞動脈炎が含まれる。種々の血管炎には：粘膜皮膚リンパ節症候群(ＭＬＮＳ又は川崎病)、単離したＣＮＳ血管炎、ベヘット(Behet's)病、閉塞性血栓性血管炎(バージャー病)及び皮膚壊死性細静脈炎(venulitis)が含まれる。列挙した血管炎のほとんどの種類の病原メカニズムは、主に脈管壁に免疫グロブリン複合体が付着し、続いてＡＤＣＣ、補体活性又は双方を介して炎症反応が誘発されることによると考えられている。

【０１１０】

サルコイドーシスは、体内のほとんど任意の組織中に類上皮細胞肉芽腫が存在し、肺ではほとんど一般的に包含されることにより特徴付けられる、病因がよく知られていない病状である。病原には疾患部位に活性マクロファージ及びリンパ球が残留していることに関連しており、続いてこれらの細胞種より放出される局部的又は全身的活性物質の放出の結果として慢性続発症が生じる。

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

他の臨床的セッティング(setting)における血小板減少性紫斑病及び免疫仲介血小板減少を含む自己免疫性血小板減少では、抗体又は補体が血小板に接合し、続いて補体溶解、ＡＤＣＣ又はＦｃ-レセプター-媒介メカニズムによる除去の結果として生じる。

【０１１１】

グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎を含む甲状腺炎は、甲状腺内に多くの場合特異的に存在するタンパク質と反応する抗体の産出を伴う、甲状腺抗原に対する自己免疫反応の結果によるものである。実験用モデルには：内在的モデルラット(ＢＵＦ及びＢＢラット)及びチキン(肥満チキン種)；誘導性モデル：チログロブリン、甲状腺ミクロソーム抗原(甲状腺ペルオキシダーゼ)を用いた動物の免疫化が含まれる。

Ｉ型真性糖尿病又はインシュリン依存性糖尿病は膵島β細胞の自己免疫破壊であり；この破壊は自己抗体及び自己反応性Ｔ細胞により媒介される。また、インシュリン又はインシュリンレセプターに対する抗体は、インシュリン-非-反応性の表現型を産出することができる。

糸球体腎炎及び尿細管間質性腎炎を含む免疫仲介腎疾患は、腎抗原に対する自己反応性抗体又はＴ細胞が産出される結果により直接的に、又は他の非腎抗原に対して反応する、腎臓における抗体及び／又は免疫複合体の沈着の結果により間接的に、腎組織に抗体又はＴ細胞媒介傷害が生じることによるものである。よって、免疫複合体の形成の結果生じる他の免疫媒介疾患により、間接的続発症等の免疫媒介腎疾患が誘発される。直接的及び間接的免疫メカニズムの双方により、結果として腎組織における障害発達が産出／誘発されるといった炎症反応が生じ、器官機能が損なわれ、いくつかのケースでは腎臓機能不全が進行する。体液及び細胞免疫メカニズムに双方が障害の病原に関与している。

【０１１２】

多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン-バレー症候群；及び慢性炎症脱髄性多発神経障害は、自己免疫基準であり、神経脱髄が生じて、オリゴデンドロサイト又はミエリンに直接的に起因するダメージの結果によるものと考えられている。ＭＳにおいて、疾患の誘発及び進行はＴリンパ球に依存すると示唆される証拠がある。多発性硬化症は、Ｔリンパ球依存性であり、再発性弛緩経路又は慢性進行経路のいずれかを有する脱髄疾患である。病因はよく知られていないが、ウイルス感染、遺伝的素因、環境及び自己免疫性の全てが寄与している。障害はＴ細胞媒介小膠細胞の優先的湿潤、及びマクロファージの浸潤を含み；ＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球は障害において優先的な細胞型であった。オリゴデンドロサイトの細胞死及び続く脱髄のメカニズ

ムはよく知られていないが、Ｔリンパ球の駆動によると思われる。
好球性肺炎；特発性肺線維症及び過敏性肺炎のような炎症及び線維症の肺疾患には、調節されない免疫炎症反応が関連している。反応を阻害することは治療的に有益なことである。
【０１１３】
水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患は自己抗体により媒介され、その発病はＴリンパ球依存性である。
乾癬はＴリンパ球媒介炎症疾患である。病巣にはＴリンパ球、マクロファージ及び抗原プロセシング細胞及びある種の好中球の浸潤が含まれる。
喘息；アレルギー性鼻炎；アトピー性皮膚炎；食物過敏症及び蕁麻疹等を含むアレルギー性疾患はＴ細胞依存性である。この疾患は炎症により誘発されるＴリンパ球、及びＩｇＥ媒介炎症、又は双方の組合せにより主に媒介される。
【０１１４】
拒絶反応及び移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を含む移植関連疾患はＴリンパ球依存性であり；Ｔリンパ球の機能を阻害することで改善される。
免疫及び／又は炎症反応への介在が有益である他の疾患には、限定するものではないがウイルス感染(限定するものではないがＡＩＤＳ、Ａ型、Ｂ型、Ｃ型、Ｄ型及びＥ型肝炎、ヘルペス)、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染(ＭＬＲを刺激する分子(又は誘導体／アゴニスト)を治療に利用し、感染要因に対する免疫反応性を増強することができる)、ＭＬＲを刺激する(分子／誘導体／アゴニスト)を治療に利用し、受け継ぎ、獲得し、感染誘発された(例えばＨＩＶ感染)又は医原性(例えば化学療法)免疫欠損疾患の病状に対する免疫反応を増強することができる免疫欠損疾患、及び異常増殖が含まれる。
幾つかのヒト癌患者において、腫瘍性細胞上の抗原に対する抗体及び／又はＴリンパ球が発生することが示されている。また、免疫応答の増加によって、その特定の腫瘍の拒絶又は退行を引き起こすことができることが、腫瘍形成の動物モデルにおいて示されている。ＭＬＲにおけるＴリンパ球の応答を高める分子（又はアゴニストの方法で同じレセプターへ影響を与える小分子アゴニスト又は抗体）を、癌治療へ治療的に用いることができる。また、ＭＬＲにおいてリンパ球の応答を阻害する分子は、腫瘍形成の間に、インビボにおいて腫瘍に対する免疫応答を抑制する；このような分子は、腫瘍性細胞そのものによって発現されるか、或いは他の細胞の腫瘍がその発現を誘導できる。このような分子の拮抗効果（抗体、小分子又は他の手段の何れかとともに）は、免疫性腫瘍拒絶反応を高める。
その上に、炎症性特性を有する分子の阻害作用は、再潅流傷害；発作；心筋梗塞；アテローム性動脈硬化症；急性肺障害；出血性ショック；火傷；敗血症／敗血性ショック；急性腎尿細管壊死；子宮内膜症；変形性関節疾患及び膵炎にとって治療的に有益である。
【０１１５】
本発明の化合物、例えばポリペプチド又は抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入（鼻腔内、肺内の）経路などにより投与される。ポリペプチド及び抗体の静脈内又は吸入投与が好ましい。
免疫アジュバンド療法では、抗癌剤の投与のような他の治療的養生法を本発明のタンパク質、抗体又は化合物の投与と組み合わせてもよい。また、本発明の免疫アジュバンドで治療される患者は、抗癌剤（化学療法剤）又は放射線治療を受けてもよい。このような化学治療剤の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学治療剤は、免疫アジュバンドの投与に先立って、又は続いて投与してもよく、或いはそれらと同時に投与してもよい。その上に、抗エストロゲン化合物、例えばタモキシフェン等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン（EP 616812参照）を、これらの分子について知られた用量で与えてもよ

い。

また、他の免疫疾患関連又は腫瘍関連抗原に対する抗体、例えばＣＤ２０、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１８、ＥｒｂＢ２、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、又は血管内皮因子（ＶＥＧＦ）に結合する抗体を投与することも好ましい。或いは、又はその上に、ここで開示される同じ又は二つ以上の異なる抗原と結合する二つ以上の抗体を、患者へ同時投与してもよい。時折、患者にサイトカインを投与することも有利である。一実施態様では、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを、成長阻害剤と同時投与する。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いてＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを投与する。しかしながら、同時投与、又は最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は、現在用いられている量であり、成長阻害剤とＰＲＯ８７２９９ポリペプチドとの組み合わせ（相乗）効果により減少させてもよい。

【０１１６】

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

例えば、一又はそれ以上の別々の投与或いは連続注入のどちらでも、例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約１μｇ／ｋｇから１５ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．１－２０ｍｇ／ｋｇ）のポリペプチド又は抗体が、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な１日の用量は、上記の要因に応じて、約１μｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇ又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。従来の技術及びアッセイによって、この治療の進行は容易にモニターされる。

【０１１７】

Ｏ．製造品

本発明のその他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質(例えばＰＲＯ８７２９９分子を含んでなる物質)を含む製造品が提供される。この製造品は容器とラベルとを含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの材料から形成されてよい。容器は、状態を診断し治療するのに有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤は本発明のポリペプチド又は抗体である。容器上又は添付されるラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品は更に、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容されるバッファーを含む第二の容器を具備してもよい。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【０１１８】

Ｐ．免疫関連疾患の診断及び予後

細胞表層タンパク質、例えば一部の免疫関連疾患において過剰発現するタンパク質は、候補薬や疾患療法にとって優れた標的である。免疫関連疾患の病態において増幅される遺伝子によってコードされている分泌タンパク質に加えて、これと同じタンパク質には、これら疾患の診断及び予後において更なる用途があることが見出されている。例えば、多発性硬化症、リウマチ様関節炎、又は別の免疫関連疾患において増幅される遺伝子のタンパク質生産物に対する抗体は、診断上に又は予後兆候として利用できる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅又は過剰発現した遺伝子（「マーカー遺伝子産物」）によってコードされたタンパク質の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又はこの分野で知られた他の技術によってモニターできる。過剰発現している遺伝子が細胞表層タンパク質をコードする場合には、これらの技術は

特に適している。このような結合アッセイは、上記に記載のように原則的に実施される。
マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。また、この手法によって、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布の決定を可能にする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

【０１１９】

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

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

【０１２０】

実施例

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

【０１２１】

実施例１：ＰＲＯ８７２９９のクローニング

発現した配列タグ（ＥＳＴ）のＤＮＡデータベース（Merck/Washington University）をサーチして、対象のドメイン、特に免疫グロブリン（Ｉｇ）ドメイン及び免疫チロシン抑制モチーフ（ＩＴＩＭ）を含むＥＳＴを同定した。サーチは、配列の６フレーム翻訳と対象のドメインとの比較としてコンピュータプログラムBLAST又はBLAST2[Altshul等, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)]を使用して行った。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコアが７０（場合によっては９０）以上になったそれら比較物をクラスター化し、必要であれば、「phrap」プログラム（Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington）でコンセンサスＤＮＡ配列を集積した。

上述の配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、１）対象の配列を含むｃＤＮＡライブラリをＰＣＲによって同定し、２）ＰＲＯ８７２９９の完全長コード化配列のクローンを単離するためのプローブとして使用した。正方向及び逆方向のＰＣＲプライマーは通常２０～３０ヌクレオチドに亘り、且つ約１００～１０００ｂｐ長のＰＣＲ産物を産生するように構成される場合が多い。プローブ配列は一般に４０～５５ｂｐ長である。場合によって、コンセンサス配列が約１～１．５ｋｂｐより大きいときは、追加のオリゴヌクレオチドを合成した。複数のライブラリから完全長クローンをサーチするために、上掲のAusubel等、Current Protocols in Molecular Biologyに従って、ＰＣＲプライマー対により、ライブラリ由来のＤＮＡをＰＣＲ増殖によりスクリーニングした。次いで、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の１つを用いて対象の遺伝子をコードするクローンを単離するために、ポジティブなライブラリを使用した。

使用したオリゴヌクレオチドプローブは以下の通りである。

正方向プライマー：hBTig.EcoRI.F2　5' TTGAATTCATGAAGACATTGCCTGCCATGC 3'（配列番号１１）

逆方向プライマー：hBTig.BamHI.R2　5' TTGGATCCTTAACTCCTCACACATATGGATGCATATTC 3’（配列番号１２）

ヒト血液ｃＤＮＡライブラリをクローニングに使用した。Invitrogen（カリフォルニア州サンディエゴ）社による市販の試薬を用いて標準的な方法によりｃＤＮＡクローンを単離するために、ｃＤＮＡライブラリを使用した。ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴを用いてｃＤＮＡを刺激し、平滑末端でＳａｌＩへミキナーゼアダプターにリンクさせ、ＮｏｔＩを用いて切断し、ゲル電気泳動により大きさにより大別し、特定のＸｈｏＩ及びＮｏｔＩ部位において、適切なクローニングベクターに所定の方向でクローニングした（例えばｐ

ＲＫＢ又はｐＲＫＤ；ｐＲＫ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Holmes等, Science 253:1278-1280 (1991)を参照されたい）。

クローンのヌクレオチド配列全体を本明細書ではＤＮＡ３３２４６７と命名し、図１（配列番号１）に示す。ＤＮＡ３３２４６７クローンは、ヌクレオチド位置２４－２６に見かけ上の翻訳開始部位を、及びヌクレオチド位置８９１－８９３に終止信号を有する単一のオープンリーディングフレームを含む（図１、配列番号１）。予想されるポリペプチド前駆体は２８９アミノ酸長であり、その分子量は約３２７８１ダルトンと計算され、予想ｐＩは約６．２７である。図２（配列番号２）に示す完全長ＰＲＯ８７２９９配列の分析により、図２に示すような種々の重要なポリペプチドドメインの存在が証明され、これらのポリペプチドドメインに判明した位置は概ね前述の通りである。

図２（配列番号２）に示す完全長配列のALIGN-2配列アラインメント分析を用いた現行のタンパク質データベースの解析により、ＰＲＯ８７２９９アミノ酸配列と配列同一性を有する既知のタンパク質は存在しないことが判明した。

【０１２２】

実施例２：ＰＲＯ８７２９９変異体のクローニング

１６人の異なるドナー由来のＢ細胞ＲＮＡ上の配列変異体についてＰＲＯ８７２９９をスクリーニングした。このＲＮＡに対してＲＴ－ＰＣＲを実行し、完全長ＰＲＯ８７２９９を生成した。ハイスループット配列決定が可能なベクターにＰＣＲ産物をクローニングし、ダブルパス配列決定により分析した。複数のＰＲＯ８７２９９変異体に最小限の変異が見られた（図１１Ａ－Ｆ）。しかしながら、膜貫通ドメインを削除するエクソン３が削除された切断型が見られた（図７、配列番号７）。切断型は新規タンパク質の核酸４０３－５４７から削除されており、その結果、僅か２４１アミノ酸長の変異ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド（図８、配列番号８）が得られ、一方新規ＰＲＯ８７２９９は２８９アミノ酸長を有していた。膜貫通ドメインの欠損は、このＰＲＯ８７２９９変異体が分泌型であり得ることを意味する。

エクソン３の５’末端に１８のヌクレオチド塩基対が挿入された別のＰＲＯ８７２９９変異体が発見された（図９、配列番号９）。この１８の塩基対挿入部は、別の６アミノ酸（ＡＦＴＮＩＰ）をコード化し、フレーム内で核酸をコードするＰＲＯ８７２９９に挿入されると、２９５アミノ酸長を有する変異ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド（図１０、配列番号１０）が得られる。短い形態及びＡＦＴＮＩＰ形態の両方を、他の変異体と共に図１２Ａ－Ｂに示す。

ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのアミノ酸５１－１１７に見られるＩｇＧドメインは、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの機能にとって重要である可能性がある。

【０１２３】

実施例３：刺激されたＴ細胞のマイクロアレイ分析

多くの場合何千もの遺伝子配列を含む核酸マイクロアレイは、正常な相対物と比較して疾患組織に異なって発現する遺伝子の同定に有用である。核酸マイクロアレイを使用することによって、試験及びコントロール組織試料由来の試験及びコントロールｍＲＮＡ試料を、ｃＤＮＡプローブ生成のために逆転写し、標識する。次いでｃＤＮＡプローブを、固体支持体に固定化された核酸アレイにハイブリダイズさせる。アレイの各部位の配列と位置がわかるようにアレイを構築する。例えば、特定の疾患状態において発現されることが知られている選択された遺伝子を、固体支持体にアレイすることができる。標識されたプローブと特定のアレイ部位とのハイブリッド形成は、そのプローブが生成された試料がその遺伝子を発現することを示す。試験（この場合、活性化されたＣＤ４＋Ｔ細胞）試料由来のプローブのハイブリッド形成シグナルが、コントロール（この場合、刺激されていないＣＤ４＋Ｔ細胞）試料由来のプローブのハイブリッド形成シグナルよりも大きい場合に、試験組織に過剰発現する遺伝子又は複数の遺伝子が同定される。この結果の意味するところは、試験組織に過剰発現するタンパク質が疾患状態の診断マーカーとしてのみでなく、疾患状態の治療の治療標的としても有用だということである。

核酸ハイブリッド形成の方法論及びマイクロアレイ技術は当該技術者に周知である。一

例として、ハイブリッド形成及びプローブのための核酸の特異的調整、スライド、及びハイブリッド形成状態はすべて、2001年3月30日出願のPCT/US01/10482に詳述されており、出典明示によりこの明細書に包含する。

本実施例では、単離されたＣＤ４＋Ｔ細胞の集団を生成するために使用される抗ＣＤ８、抗ＣＤ１６、抗ＣＤ１９、抗ＣＤ３６及び抗ＣＤ５６抗体を含むRosseteSep（登録商標）（Stem Cell Technologies／ブリティッシュコロンビア州バンクーバー）を用いて、単一のドナーからＣＤ４＋Ｔ細胞を精製した。単離されたＣＤ４＋Ｔ細胞を、ＩＣＡＭ－１又は抗ＣＤ２８抗体と共に、抗ＣＤ３抗体を（増殖を刺激しない程度の濃度で）用いて活性化した。２４又は７２時間目に細胞を回収し、ＲＮＡを抽出してAffimax（登録商標）（Affymetrix Inc.／カリフォルニア州サンタクララ）マイクロアレイ上で分析を行った。刺激していない（休止）細胞は、精製後直ちに回収して同じ分析を行った。活性化された細胞と休止細胞との間で、２つの時点のいずれかで発現が上方制御されていた遺伝子を比較した。

これら実験の結果、単離された休止ＣＤ４＋Ｔ細胞と比較して、抗ＣＤ３／ＩＣＡＭ－１及び抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８により活性化した単離されたＣＤ４＋Ｔ細胞には、本発明のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドが有意に過剰発現した。上述のように、これらのデータは、本発明のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドが、一又は複数の免疫異常の存在の診断マーカーとして有用であるばかりでなく、これら免疫異常の治療の治療上の標的としても機能することを示唆するものである。

【０１２４】

実施例４：リンパ腫におけるＰＲＯ８７２９９

リンパ腫は、米国において６番目に悪性度が高い。米国で１９９０年にリンパ腫に新規に罹患した人の数は４３，０００人と推定された。非ホジキンリンパ腫が一番多く、ホジキンリンパ腫はそれよりずっと少ない。非ホジキンリンパ腫の罹患率は、年齢と共に次第に増大する。しかし、ホジキン病の場合、２０～３０歳の患者が多く、３０～５５歳には罹患率の増大はなく、患者数は５５歳以降に再び増大する。ホジキン病及び非ホジキン病共に、女性より男性の方が罹患する危険が高い。悪性リンパ腫の臨床上の徴候は、リンパ節の腫れ及び発熱、倦怠感、並びに体重減少を含む症状である。リンパ腫の主な部位には、一般に、鎖骨上、腋窩、縦隔、大動脈周囲、子宮頚部、及び鼠径部のリンパ節が含まれる。また、リンパ腫は他の器官に転移する可能性がある。

ホジキン病は、１９８２年にThomas Hodgkinによって最初に発表された。ホジキン病はリンパ球系細胞の無制限な増殖であり、これが拡大すると蒼白い細胞質が大量に増え、大きな核小体を含む２つ以上の卵の分葉した核が生じる。このような外観の細胞は、リード・シュテルンベルク細胞として知られている。リード・シュテルンベルク細胞は、ホジキン病の診断に重要であるが、その存在だけでは診断に十分でない。ホジキン病は非ホジキンリンパ腫と細胞の種類、リンパ節の組織学、及び発熱等の総体症状が異なっている。ホジキン病は一般に、末梢リンパ節の単一の組の拡大を呈し、近接した節を有することがあるが、稀に結節外である。ホジキン病の原因は不明であるが、エプスタイン・バーウィルスへの感染歴、及びｂｃｌ－２の転位置がホジキン病の進行に関連付けられている。

非ホジキンリンパ腫は、リンパ節に生じる免疫系の新生物であるが、ホジキン病とは細胞種類及び患者が呈する総体症状が異なっている。多くの非ホジキンリンパ腫はＢ細胞表現型のものであり、ＣＤ１９及びＣＤ２０のマーカーに反応する。それより少数であるが、Ｔ細胞リンパ腫が存在し、これはＣＤ２及びＣＤ３のマーカーに反応する。

遺伝子発現情報を含む専有データベース（GeneExpress（登録商標）、Gene Logic Inc.／メリーランド州ゲティスバーグ）を分析し、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド（及びそのコード化核酸）が、正常なリンパ組織と比較した場合にリンパ腫において有意に上方制御されるかどうかの同定を試みた。具体的には、GeneExpress（登録商標）データベースの分析は、GeneExpress（登録商標）データベースに使用できるGene Logic Inc.、メリーランド州ゲティスバーグから入手可能なソフトウェアか、又はGeneExpress（登録商標）データベースに使用するために本出願人が設計及び開発した専有ソフトウェアを用いて行わ

れた。分析においてポジティブにカウントするかどうかの評価は、組織特異性、腫瘍特異性、及び正常な基本的組織及び／又は正常な増殖組織における発現レベル等、複数の基準に基づいて行った。この結果、他の腫瘍組織及び正常組織と比べて、リンパ腫におけるＰＲＯ８７２９９の発現が大きいことが証明された。

【０１２５】

実施例５：炎症性腸疾患におけるＰＲＯ８７２９９

この実験では、正常な腸組織と比較してＩＢＤに過剰発現する遺伝子を見出すのにマイクロアレイアッセイを用いた。ＩＢＤ患者の組織診を行った。発現パターンの比較精度を上げるため、各ＩＢＤ患者について、疾病（ＵＣまたはクローン病）組織と健常な腸から試料を採取した。ＲＮＡ単離の準備が整うまで全ての試料を－７０℃で保存した。生検を６００ｕｌのＲＬＴバッファー（＋ＢＭＥ）中でホモジナイズし、製造者のガイドラインに従ってオンカラムＤＮase処理したQiagen（登録商標）Rneasy Miniカラムを用いてＲＮＡを単離した。ＲＮＡ単離の後、製造者のガイドラインに従ってRiboGreen（登録商標）（Molecular Probes）を用いてＲＮＡを定量化し、アガロースゲル上で完全性をチェックした。適量のＲＮＡをマイクロアレイ分析用に標識し、専有のGenetechマイクロアレイ及びAffymetrics（登録商標）マイクロアレイ上で試料を分析した。同じ患者の正常な腸組織とＩＢＤ組織から採取した生検を対応させ、ＩＢＤ組織で発現が上方制御された遺伝子を正常な腸と比較した。この実験の結果、ＰＲＯ８７２９９が、正常な腸組織と比較してクローン病の試料に有意に過剰発現することが同定された。

【０１２６】

実施例６：ＮＫ細胞におけるＰＲＯ８７２９９の発現

ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、自然免疫系の重要なエフェクター細胞である。これらは、ウィルス又は寄生虫に感染しているか、或いは癌性となった宿主細胞を特異的に死滅させる効果を有する。表現型的には、ＮＫ細胞は、循環リンパ球数の２％以下を構成する大きな顆粒状のリンパ球である。それらは一般に、細胞表面上におけるＣＤ５６及びＣＤ１６の発現によって同定される。それらは、Ｔ細胞と共有するＣＤ３４＋前駆体細胞由来の骨髄中で成熟する。成熟ＮＫ細胞は、ＣＤ８の発現、細胞溶解性機構、及び一部のＫＩＲをＴ細胞と共有するが、ＣＤ３及びＴ細胞レセプターの欠損によりＴ細胞とは区別される。細胞障害性のＴ細胞と同様に、ＮＫ細胞は、ポア形成タンパク質、細胞毒、セリンエステラーゼ及び標的細胞の溶解を媒介するプロテオグリカンで満たされた顆粒を含む。細胞障害性のＴ細胞及びＮＫ細胞は共に、その標的に結合させて、化学薬品の致死的バーストを送り込んで標的細胞の膜に穴を開けることにより、接触により死滅を引き起こす。細胞障害性のＴ細胞とは異なり、ＮＫ細胞は、溶解を開始させる前に特定の抗原を認識する必要がない。むしろ、ＮＫ細胞の活性化は、成長因子及びサイトカインによって（特に、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、及びＩＬ－１５は増殖活性及び細胞障害性の活性を倍加することが示されている）、又は一方は細胞を活性化し、他方は細胞を抑制するような２種類のＮＫ細胞レセプターを微妙にバランスさせることにより、媒介することができる。キラーＩｇ様レセプター（ＫＩＲ）は、細胞表面上で１型のＭＨＣ分子と遭遇すると抑制シグナルを伝達するＮＫ細胞レセプターである。これは、癌性細胞及びウィルス感染細胞の両方を死滅させるのに重要である。ウィルスは、多くの場合、それが感染した細胞における１型ＭＨＣの発現を抑制するので、ウィルス感染細胞はＮＫ細胞による死滅の対象になり易い。同様に、癌細胞が減少するか、又は１型ＭＨＣの発現が無くなり、それらもＮＫ細胞による死滅の対象になり易い。天然細胞障害性レセプター（ＮＣＲ）はＮＫ細胞上のレセプターを活性化する１ファミリーを構成する。一部のエフェクター－標的系では、ＮＣＲの表面密度はＮＫ細胞の細胞溶解性活性と相関しており、他の系では、死滅には、ＮＣＲ、別の活性化レセプターＮＫＧ２Ｄ及びそのアダプターポリペプチドであるＤＡＰ１０間の協力が必要である。加えて、シグナルの強度は、２Ｂ４及びＮＴＢ－Ａ等のコレセプターの結合の影響を受ける場合がある。ＮＣＲ及びＮＫＧ２ｄのリガンド、ヘモグルタミン及びＭＩＣＡ、ＭＩＣＢはそれぞれ、殆どの正常細胞で発現しないが、大部分の主要細胞系において誘発される。腫瘍細胞によるリガンドの発現は劇的な免疫応答を引き起こし、

よって腫瘍細胞が拒絶される。ＩＬ１５又はＩＬ－１２によるＮＫ細胞の活性化は、細胞障害性及び増殖性の影響の両方を誘発することが示された。接合部の接着分子２（ＪＡＭ２）は、ＮＫ細胞に結合することが示され、炎症部位へのリンパ球の細胞外遊走において重要な役割を果たしていると仮定された。

従って、休止ＮＫ細胞と対比させて活性化のそれら３モードに由来する遺伝子の発現差異を比較するＤＮＡマイクロアレイの実験は、新規遺伝子又はＮＫ細胞の活性との新規遺伝子の関連性を明らかにする可能性を有している。治療的抗体、ペプチド又は小分子を開発し、これらのマイクロアレイによって明らかになった特定の遺伝子をその標的とすることにより、免疫媒介性炎症性疾患及び悪性腫瘍を治療することができる。ＭＡＣＳ（登録商標）磁気細胞選別システム（Miltenyi Biotec）と共にＮＫ細胞単離キットを使用したネガティブ選択により、ロイコパックから末梢血ＮＫ細胞を単離した。ＦＡＣＳ分析のために、ＰＥ抗ＣＤ５６を用いた染色により細胞純度を確認した。細胞調製の純度は８９％～９６％であった。細胞培養物：６ウェルプレートにおいて、５ｍｌ培養物／ウェルでインビトロ培養を設定した。培地：ＲＰＭＩ　１６４０、１０％の熱失活したＦＢＳ、１００ユニット／ｍＬのペニシリン、１００ｍｇ／ｍＬのストレプトマイシン、２ｍＭのＬグルタミン、及び５．５ｘ１０－５βメルカプトエタノール。実験処理：０時間、未処理のＣＤ５６（＋）細胞。１６時間目、未処理、ＩＬ２（１０ｎＭ）、ＩＬ１５（１０ｎＭ）、ＪＡＮ－ＩＴ（１０ｎＭ）による刺激。ＦＡＣＳにより、ＣＤ５６及びＣＤ６９の細胞表面発現についてＮＫ細胞の活性化をモニタリングした。このような一連の実験において、正常な休止ＮＫ細胞と比較した場合、ＣＤ５６＋ＮＫ細胞にＰＲＯ８７２９９が発現することが判明した。

【０１２７】

実施例７：ハイブリダイゼーションプローブとしてのＰＲＯ８７２９９の利用

以下の方法は、ＰＲＯ８７２９９をコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての利用を示している。

ここに開示されている完全長又は成熟ＰＲＯ８７２９９をコード化配列を含むＤＮＡは、ヒト組織ｃＤＮＡライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリの相同的なＤＮＡ（ＰＲＯ８７２９９の天然発生変異体をコードするもの等）のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

ハイブリダイゼーション及びいずれかのライブラリＤＮＡを含有するフィルターの洗浄を、次の高ストリンジェンシー条件下において実施する。放射標識ＰＲＯ８７２９９誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションを、５０％ホルムアミド、５ｘＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８、２ｘデンハード液、及び１０％デキストラン硫酸の溶液中において４２℃で２０時間に渡って実施する。フィルターの洗浄は、０．１ｘＳＳＣ及び０．１％ＳＤＳ水溶液中において４２℃で実施する。

次いで、完全長天然配列ＰＲＯ８７２９９をコードするＤＮＡと所望の配列同一性を有するＤＮＡは、この分野で知られている標準的技術を用いて同定することができる。

【０１２８】

実施例８：大腸菌におけるＰＲＯ８７２９９の発現

この実施例は、大腸菌中における組換え発現によるＰＲＯ８７２９９の非グリコシル化型の調製を例証する。

まず、ＰＲＯ８７２９９をコード化するＤＮＡ配列を選択されたＰＣＲプライマーを利用して増幅した。このプライマーは、選択された発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含まなければならない。様々な発現ベクターを使用することができる。適したベクターの例としては、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性に対する遺伝子を含むｐＢＲ３２２（大腸菌由来；Bolivar等, Gene, 2:95 (1977)を参照のこと）がある。ベクターを制限酵素によって消化し、脱リン酸化した。次いで、ＰＣＲ増幅配列をベクターにライゲーションした。ベクターは好ましくは抗生物質耐性遺伝子、ｔｒｐプロモーター、ポリＨｉｓリーダー（最初の６つのＳＴＩＩコドン、ポリＨｉｓリーダー、及びエン

テロキナーゼ切断部位を含む）、ＰＲＯ８７２９９コード領域、ラムダ転写終末因子及びａｒｇＵ遺伝子をコードする配列を含む。

次いで、Sambrook等（上掲）に記載されている方法を用いて選択された大腸菌株を形質転換するために、このライゲーション混合物を利用した。形質転換体をＬＢプレート上でのその成長能力によって同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択した。プラスミドＤＮＡを単離し、それを制限分析及びＤＮＡ配列決定によって確認することができた。

選択されたクローンを、抗生物質が補填されたＬＢブロスのような液体培地で一晩かけて成長させることができた。この一晩の培養を、次により大きなスケールでの培養を播種するために使用してもよい。そして細胞を所望の光学密度になるまで成長させ、その間に発現プロモーターが作用し始める。

更に数時間細胞を培養した後に、遠心分離によって細胞を収集することができる。遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当該分野で公知の様々な薬剤を使用して可溶化でき、次いでこの溶解したＰＲＯ８７２９９タンパク質を、タンパク質の堅固な結合を可能にする条件下において金属キレート化カラムを用いて精製することが可能である。

【０１２９】

以下の手法を用いて、ポリ-Ｈｉｓタグ形態でＰＲＯ８７２９９を大腸菌で発現させてもよい。ＰＲＯ８７２９９をコードするＤＮＡを、選択したＰＣＲプライマーを用いて最初に増幅した。このプライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いで、ＰＣＲ増幅されたポリ-Ｈｉｓタグ配列を発現ベクターへライゲートさせ、これを株５２（W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)）に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体を、最初に５０ｍｇ／ｍｌのカルベニシリンを含有するＬＢ中で、３０℃で振盪しながら３～５のＯ．Ｄ．６００に達するまで成長させた。ついで培養液をＣＲＡＰ培地（３．５７ｇの（NH_4）$_2SO_4$、０．７１ｇのクエン酸ナトリウム・２Ｈ２Ｏ、１．０７ｇのＫＣｌ、５．３６ｇのＤｉｆｃｏ酵母抽出物、５００ｍＬ水中の５．３６ｇのSheffield hycase SF、並びに１１０ｍＭのＭＰＯＳ、ｐＨ７．３、０．５５％（ｗ／ｖ）のグルコース及び７ｍＭのＭｇSO_4の混合で調製）中にて５０～１００倍希釈し、３０℃で振盪によって約２０～３０時間成長させた。ＳＤＳ-ＰＡＧＥにより発現を確認するために試料を取り出し、細胞がペレットとなるようにバルク培地を遠心分離した。精製及びリフォールディング（再折り畳み）まで、細胞ペレットを凍結させた。

【０１３０】

０．５から１Ｌの発酵（６～１０ｇペレット）からの大腸菌ペーストを、７Ｍのグアニジン、２０ｍＭのトリス、ｐＨ８バッファー中で１０容量（ｗ／ｖ）で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々０．１Ｍ及び０．０２Ｍとし、溶液を４℃で終夜撹拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質が生じる。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で４０，０００ｒｐｍで３０分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー（６Ｍのグアニジン、２０ｍＭのトリス、ｐＨ７．４）の３－５容量で希釈し、透明にするために０．２２ミクロンフィルターを通して濾過する。透明抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた５ｍｌのQiagen Ｎｉ-ＮＴＡ金属キレートカラムに負荷した。カラムを５０ｍＭのイミダゾール（Calbiochem, Utrol grade）を含む添加バッファー、ｐＨ７．４で洗浄した。タンパク質を２５０ｍＭのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、４℃で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて２８０ｎｍにおけるその吸収により見積もった。

試料を２０ｍＭのトリス、ｐＨ８．６、０．３ＭのＮａＣｌ、２．５Ｍの尿素、５ｍＭのシステイン、２０ｍＭのグリシン及び１ｍＭのＥＤＴＡからなる新たに調製した再ホールド（refold）バッファー中で徐々に希釈することによって、タンパク質を再ホールドさ

せた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が５０～１００μｇ／ｍｌとなるように選択した。リフォールディング溶液を４℃で１２～３６時間ゆっくりと撹拌した。リフォールディング反応はＴＦＡを採取濃度０．４％（約ｐＨ３）で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を０．２２ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度２－１０％で添加した。再生したタンパク質を、Ｐｏｒｏｓ R1／H逆相カラムで、０．１％ＴＦＡの移動バッファーと１０～８０％のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。Ａ２８０吸収を持つ画分のアリコートをＳＤＳポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の再ホールドしたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化したＧ２５Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅ（Pharmacia）樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、０．１４Ｍの塩化ナトリウム及び４％のマンニトールを含む２０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ６．８に調製した。

ここで開示されたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、上記の方法によって成功裏に発現した。

【０１３１】

実施例９：哺乳動物細胞におけるＰＲＯ８７２９９の発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組換え発現による潜在的にグリコシル化した形態のＰＲＯ８７２９９の調製を例証する。

発現ベクターとしてベクターｐＲＫ５（1989年3月15日公開のEP307,247参照）を用いた。場合によっては、ＰＲＯ８７２９９ ＤＮＡを選択した制限酵素を持つｐＲＫ５に結合させ、上記のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてＰＲＯ８７２９９ＤＮＡを挿入させる。得られたベクターは、ｐＲＫ５-ＰＲＯ８７２９９と呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は２９３細胞とすることができる。ヒト２９３細胞（ATCC CCL 1573）は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び／又は抗生物質を添加したＤＭＥＭなどの培地中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約１０μｇのｐＲＫ５-ＰＲＯ８７２９９ＤＮＡを約１μｇのＶＡ ＲＮＡ遺伝子コード化ＤＮＡ［Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982))］と混合し、５００μｌの１ｍＭ トリス-ＨＣｌ、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、０．２２７Ｍ $CaCl_2$ に溶解させた。この混合物に、滴状の５００μｌの５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３５）、２８０ｍＭ ＮａＣｌ、１．５ｍＭ $NaPO_4$ を添加し、２５℃で１０分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、２９３細胞に加えて３７℃で約４時間定着させた。培地を吸引し、２ｍｌのＰＢＳ中２０％グリセロールを３０秒間添加した。２９３細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約５日間インキュベートした。

トランスフェクションの約２４時間後、培地を除去し、培地（のみ）又は２００μＣｉ／ｍｌ ^{35}Ｓ-システイン及び２００μＣｉ／ｍｌ ^{35}Ｓ-メチオニンを含む培地で置換した。１２時間のインキュベーションの後、条件培地を収集し、スピンフィルターで濃縮し、１５％ＳＤＳゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し（無血清培地で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【０１３２】

これに換わる技術において、ＰＲＯ８７２９９は、Somparyac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて２９３細胞に一過的に導入される。２９３細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、７００μｇのｐ

ＲＫ５-ＰＲＯ８７２９９ＤＮＡを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、ＰＢＳで洗浄した。ＤＮＡ-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で４時間インキュベートした。細胞を２０％グリセロールで９０秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、５μｇ／ｍｌウシインシュリン及び０．１μｇ／ｍｌウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約４日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現ＰＲＯ８７２９９を含む試料を、透析及び／又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって濃縮し精製することが可能である。

他の実施態様では、ＰＲＯ８７２９９をＣＨＯ細胞で発現させることができる。ｐＲＫ５-ＰＲＯ８７２９９は、$CaPO_4$又はＤＥＡＥ－デキストランなどの公知の試薬を用いてＣＨＯ細胞にトランスフェクションすることができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（のみ）又は^{35}Ｓ-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの存在を同定した後、培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約６日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現ＰＲＯ８７２９９を含む培地を、任意の選択した方法によって濃縮し精製することができる。

また、エピトープタグＰＲＯ８７２９９は、宿主ＣＨＯ細胞において発現させてもよい。ＰＲＯ８７２９９はｐＲＫ５ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物は、ＰＣＲを施してバキュロウィルス発現ベクター中のポリ-ｈｉｓタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。次いで、ポリ-ｈｉｓタグＰＲＯ８７２９９挿入物は、安定なクローンの選択のためのＤＨＦＲ等の選択マーカーを含むＳＶ４０プロモーター／エンハンサー含有ベクターにサブクローニングできる。最後に、ＣＨＯ細胞をＳＶ４０プロモーター／エンハンサー含有ベクターで（上記のように）トランスフェクションした。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-ｈｉｓタグＰＲＯ８７２９９を含む培地は、次いで濃縮し、Ni^{2+}-キレートアフィニティークロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

またＰＲＯ８７２９９は、一過性発現法によりＣＨＯ及び／又はＣＯＳ細胞で、他の安定な発現方法によりＣＨＯ細胞で発現させてもよい。

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

【０１３３】

ＰＣＲ増幅に続いて、対応するＤＮＡを、Ausubel等, Current protocols of Molecular Biology, Unit 3.26, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてＣＨＯ発現ベクターにサブクローニングした。ＣＨＯ発現ベクターは、対象とするＤＮＡの５’及び３’に適合する制限部位を有し、ｃＤＮＡの便利なシャトル化ができるように作製される。ベクターは、Lucas等, Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにＣＨＯ細胞での発現を用い、対象とするｃＤＮＡ及びジヒドロフォレートレダクターゼ（ＤＨＦＲ）の発現の制御にＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーを用いる。ＤＨＦＲ発現は、トランスフェクションに続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドＤＮＡの１２マイクログラムを、市販のトランスフェクション試薬Superfect(登録商標)（Quiagen）、Dosper(登録商標)及びFugene(登録商標)（Boehringer Mannheim）を用いて約１千万のＣＨＯ細胞に導入する。細胞は、上記のLucas等に記載されているように成長させた。約３×１０^{7}細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

プラスミドＤＮＡを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を１０ｍＬの媒質を含む遠心管にピペットして、１０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を１０ｍＬの選択培地（０．２μｍ濾過ＰＳ２０、５％の０

．２μｍ透析濾過ウシ胎児血清を添加）中に懸濁させた。次いで細胞を９０ｍＬの選択培地を含む１００ｍＬスピナーに分ける。１～２日後、細胞を１５０ｍＬの選択培地を満たした２５０ｍＬスピナーに移し、３７℃でインキュベートする。さらに２～３日後、２５０ｍＬ、５００ｍＬ及び２０００ｍＬのスピナーに3×10^{5}細胞／ｍＬで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なＣＨＯ培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5,122,469号に記載された生産培地を使用した。３Ｌの生産スピナーを1.2×10^{6}細胞／ｍＬで播種した。０日目に、ｐＨを測定した。１日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施した。２日目に、スピナーをサンプルし、温度を３３℃に変え、３０ｍＬの５００ｇ／Ｌのグルコース及び０．６ｍＬの１０％消泡剤（例えば３５％ポリジメチルシロキサンエマルション、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion）をとった。生産を通して、ｐＨは７．２近傍に調節し維持した。１０日後、又は生存率が７０％を下回るまで、細胞培地を遠心分離で収集して０．２２μｍフィルターを通して濾過した。濾過物は、４℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

【０１３４】

ポリ-Ｈｉｓタグ作製物に関して、タンパク質をＮｉ-ＮＴＡカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に５ｍＭの濃度まで添加した。条件培地を、０．３ＭのＮａＣｌ及び５ｍＭイミダゾールを含む２０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．４バッファーで平衡化した６ｍｌのＮｉ－ＮＴＡカラムへ４－５ｍｌ／分の流速によって４℃でポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を０．２５Ｍイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて１０ｍＭのHepes、０．１４ＭのＮａＣｌ及び４％のマンニトール，ｐＨ６．８を含む貯蔵バッファー中で２５ｍｌのＧ２５Superfine（Pharmacia）を用いて脱塩し、－８０℃で貯蔵した。

イムノアドヘシン（Ｆｃ含有）作製物を、以下通りに条件培地から精製した。条件培地を、２０ｍＭのリン酸ナトリウムバッファー、ｐＨ６．８で平衡化した５ｍｌのプロテインＡカラム（Pharmacia）へポンプ注入した。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、１００ｍＭのクエン酸，ｐＨ３．５で溶離した。溶離したタンパク質は、１ｍｌの画分を２７５μＬの１Ｍトリスバッファー，ｐＨ９を含む管に収集することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Ｈｉｓタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はＳＤＳポリアクリルアミドゲルとエドマン（Edman）分解によるＮ-末端アミノ酸配列決定により評価した。

ここに開示したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【０１３５】

実施例１０：酵母菌でのＰＲＯ８７２９９の発現

以下の方法は、酵母菌中でのＰＲＯ８７２９９の組換え発現を記載する。

第一に、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターからのＰＲＯ８７２９９の細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作製する。ＰＲＯ８７２９９をコードするＤＮＡ及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してＰＲＯ８７２９９の細胞内発現を指示する。分泌のために、ＰＲＯ８７２９９をコードするＤＮＡを選択したプラスミドに、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターをコードするＤＮＡ、天然ＰＲＯ８７２９９シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌α因子又はインベルターゼ分泌シグナル／リーダー配列、及び（必要ならば）ＰＲＯ８７２９９の発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

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

続いて組換えＰＲＯ８７２９９は、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、

次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。ＰＲＯ８７２９９を含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

ここに開示したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【０１３６】

実施例１１：バキュロウィルス感染昆虫細胞でのＰＲＯ８７２９９の発現

以下の方法は、バキュロウィルス感染昆虫細胞中におけるＰＲＯ８７２９９の組換え発現を記載する。

ＰＲＯ８７２９９コードする配列を、バキュロウィルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-ｈｉｓタグ及び免疫グロブリンタグ（ＩｇＧのＦｃ領域など）を含む。ｐＶＬ１３９３（Navagen）などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、ＰＲＯ８７２９９又はＰＲＯ８７２９９コード配列の所定部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列などが、５’及び３’領域に相補的なプライマーでのＰＣＲにより増幅される。５’プライマーは、隣接する（選択された）制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

組換えバキュロウィルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウィルスＤＮＡ（Pharmingen）を、Spodoptera frugiperda（「Ｓｆ９」）細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １７１１）中にリポフェクチン（GIBCO-BRLから市販）を用いて同時トランスフェクションすることにより作製される。２８℃で４～５日インキュベートした後、放出されたウィルスを収集し、更なる増幅に用いた。ウィルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

【０１３７】

次に、発現されたポリ-ｈｉｓタグＰＲＯ８７２９９は、例えばNi^{2+}-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupert等, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウィルス感染した組換えＳｆ９細胞から調製した。簡単には、Ｓｆ９細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー（２５ｍＬのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．９；１２．５ｍＭの$MgCl_2$；０．１ｍＭ ＥＤＴＡ；１０％グリセロール；０．１％のＮＰ－４０；０．４ＭのＫＣｌ）中に再懸濁し、氷上で２回２０秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー（５０ｍＭリン酸塩、３００ｍＭのＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ７．８）で５０倍希釈し、０．４５μｍフィルターで濾過した。Ni^{2+}-ＮＴＡアガロースカラム（Qiagenから市販）を５ｍＬの総容積で調製し、２５ｍＬの水で洗浄し、２５ｍＬの負荷バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分０．５ｍＬでカラムに負荷した。カラムを、分画収集が始まる点であるA_{280}のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー（５０ｍＭリン酸塩；３００ｍＭのＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ６．０）で洗浄した。A_{280}のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で０から５００ｍＭイミダゾール勾配で展開した。１ｍＬの分画を収集し、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ及び銀染色又はアルカリホスファターゼ（Qiagen）に複合したNi^{2+}-ＮＴＡでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis_{10}-タグＰＲＯ８７２９９を含む画分をプールして負荷バッファーで透析した。

あるいは、ＩｇＧタグ（又はＦｃタグ）ＰＲＯ８７２９９の精製は、例えば、プロテインＡ又はプロテインＧカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

ここに開示したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現

された。

【０１３８】

実施例１２：ＰＲＯ８７２９９に結合する抗体の調製

ＰＲＯ８７２９９－Ｆｃコンストラクトを用いてマウスを免疫化することにより、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する抗体を生成した。このコンストラクトは、ＰＲＯ８７２９９の細胞外ドメインをコードする領域（アミノ酸１－１５５）を、ヒトＦｃドメインを含むプラスミドに連結させて、ＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃキメラを作成することにより作成した。このタンパク質を作製及び精製し、マウスの足蹠に注入した。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上記のGodingに記載されている。Ｂａｌｂ／ｃ等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に１－１００マイクログラムで注入したＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃキメラで免疫化した。あるいは、免疫原をＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（Ribi Immunochemical Researh，ハミルトン，モンタナ）に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで１０から１２日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的ＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃキメラで追加免疫した。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗ＰＲＯ８７２９９抗体の検出を検出するためにＥＬＩＳＡアッセイで試験するために、後眼窩から採取した血清試料をマウスから定期的に採取した。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ（陽性）」な動物に、ＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃキメラの最後の静脈内注射を行った。３から４日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を（３５％ポリエチレングリコールを用いて）、ＡＣＴＴから番号ＣＲＬ１５９７で入手可能なＰ３Ｘ６３ＡｇＵ．１等の選択されたマウス骨髄腫細胞株に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン）培地を含む９６ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、ＰＲＯ８７２９９に対する反応性についてＥＬＩＳＡでスクリーニングした。ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する９つの抗体が生成された。陽性ハイブリドーマ細胞を同系のＢａｌｂ／ｃマウスに腹腔内注入し、抗ＰＲＯ８７２９９モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行った。あるいは、抗体のプロテインＡ又はプロテインＧへの親和性に基づくアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。

【０１３９】

前述のように、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する九（９）つの抗体を生成した。これら９つのうち、５Ｆ５．１と命名された抗体をアゴニスト抗体と決定した。アゴニスト活性は、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖の抑制により決定した。実施例２に記載のようにして、ＣＤ４＋Ｔ細胞をヒトの血液から単離し、架橋プレートに結合させた抗体を用いて培養した。濃度１０μｇ／ｍｌのヤギ－抗マウスＩｇＧを３７℃で一晩インキュベートし、ＰＢＳにより洗浄して余剰分を除去することにより、９６ウェルプレートを調製した。抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８抗体を、それだけで、又は抗ＰＲＯ８７２９９抗体と併せて、ＩｇＧでコーティングしたプレートに添加した。抗ＣＤ３（０．１μｇ／ｍｌ）と抗ＣＤ２８（０．２５μｇ／ｍｌ）の組み合わせはＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を刺激し、抗ＰＲＯ８７２９９抗体の添加はチミジン取り込みによる測定において増殖を５分の１に低減させた（図１３）。抗ＣＤ３抗体だけでは増殖は見られず、コントロール抗体も増殖を示さなかった。５Ｆ５．１抗ＰＲＯ８７２９９抗体のアゴニスト抗体は熱不活性化によって反応を止めた。５Ｆ５．１ハイブリドーマ系は、ブダペスト条約の下にＡＴＣＣに寄託されている（実施例１９参照）。

可溶性の抗体を用いて第２の実験を行った。抗ＣＤ３（１０μｇ／ｍｌ）及び抗ＣＤ２

８（５μｇ／ｍｌ）を細胞培養培地に加えたときも、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖に増大が見られた。２つの刺激性抗体を含む細胞培養培地に抗ＰＲＯ８７２９９抗体を添加したところ、ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖が５０％まで抑制された。使用された抗ＰＲＯ９７２９９抗体は５－２００μｇ／ｍｌであり、この範囲内において、ＣＤ４＋細胞増殖の抑制は用量に比例していた。

ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合するが、アゴニスト効果を持たない抗体は、５Ｅ１０である。この抗体が、一次Ｂ細胞及びＣＤ４＋Ｔ細胞上のＰＲＯ８７２９９を認識することが示された。この抗体は、ＦＡＣＳ分析を使用してＰＲＯ８７２９９を移入された細胞も認識することができた。５Ｅ１０抗体は一貫してアゴニスト効果を持たなかった。

従って、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する抗体が生成された。抗ＰＲＯ８７２９９アンタゴニスト抗体は、免疫欠損の治療及び病原による感染の予防に有用であると思われる、免疫応答を刺激するという用途を有する。抗ＰＲＯ８７２９９アゴニスト抗体は、ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を低減させることにより、免疫応答を低下させることができるので、自己免疫疾患、リンパ腫及び炎症性腸疾患の治療に有用であると思われる。

【０１４０】

実施例１３：特異的抗体を用いたＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの精製

天然又は組換えＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ-ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、対象とするＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作製される。

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

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによるＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有用な量で分泌される。

可溶化ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下（例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー）で洗浄される。次いで、カラムは、抗体／ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド結合を分解する条件下（例えば、約２～３といった低ｐＨ、高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロープ）で溶離され、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドが収集される。

【０１４１】

実施例１４：薬物スクリーニング

本発明は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又はその結合断片を種々の薬物スクリーニング技術において使用することによる化合物のスクリーニングとって特に有用である。そのような試験に用いられるＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又は断片は、溶液中の自由状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、或いは細胞内に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの一つの方法では、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定にトランスフェクションされる真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのようなトランスフェクション細胞に対して、競合的結合

アッセイによってスクリーニングされる。生存可能又は固定化形態のいずれかによって、このような細胞は標準的な結合アッセイで使用できる。例えば、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体の形成を測定してよい。あるいは、試験する試薬によって生ずるＰＲＯ８７２９９ポリペプチドとその標的細胞との間の複合体形成における減少を試験することもできる。

従って、本発明は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド関連疾患又は障害に影響を与えうる薬剤又は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、その試薬をＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又は断片に接触させ、（ｉ）試薬とＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は（ｉｉ）ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について、検定することを含む。これらの競合結合アッセイでは、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、自由なＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、自由又は未複合の標識の量が、特定の試薬がＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに結合する又はＰＲＯ８７２９９ポリペプチド／細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についての高スループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に公開されたＷＯ84/03564に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はＰＲＯ８７２９９ポリペプチドと反応して洗浄される。結合したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。さらに、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。

また、本発明は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに結合可能な中和抗体がＰＲＯ８７２９９ポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイも考慮する。この方法において、抗体は、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドで、一つ又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

【０１４２】

実施例１５：合理的薬物設計

合理的薬物設計の目的は、対象とする生物学的活性ポリペプチド（すなわち、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド）又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例の任意のものが、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドのより活性で安定な形態又はインビボでＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに機能を促進又は阻害する薬物の創作に使用できる（参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)）。

一つの方法において、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド、又はＰＲＯ８７２９９ポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造が、Ｘ線結晶学により、コンピュータモデル化により、最も典型的には二つの方法の組み合わせにより決定される。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの構造に関する有用な情報が相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることもある。両方の場合において、関連する構造情報は、類似ＰＲＯ８７２９９ポリペプチド様分子の設計又は効果的なインヒビターの同定に使用される。合理的な薬剤設計の有用な例は、Braxton及びWells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、又はAthauda等, J. Biochem., 113:742-746 (1993)に示されているような天然ペプチドのインヒビター、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する分子を含む。

また、上記のような機能アッセイによって選択された標的特異的な抗体を単離しその結晶構造を解明することもできる。この方法は、原理的には、それに続く薬剤設計が基礎を

おくことのできるファーマコア(pharmacore)を生成する。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体（抗-ｉｄｓ）を生成することにより、タンパク質結晶学をバイパスすることができる。鏡像の鏡像として、抗-ｉｄｓの結合部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。抗-ｉｄは、次いで、化学的又は生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するのに使用できる。単離されたペプチドは、ファーマコアとして機能するであろう。

本発明によって、Ｘ線結晶学などの分析実験を実施するために十分な量のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドが入手可能である。さらに、ここに提供したＰＲＯ８７２９９ポリペプチドアミノ酸配列の知識は、Ｘ線結晶学に代わる又はそれに加わるコンピュータモデル化技術で用いられるガイダンスを提供する。

【０１４３】

実施例１６：ＨＶＥＭに特異的に結合するＰＲＯ８７２９９

タンパク質ライブラリのスクリーニングにより、ＰＲＯ８７２９９がＨＶＥＭに特異的に結合することが決定された。ＰＲＯ８７２９９の細胞外ドメインをヒトＦｃに融合させてＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃを生成した。この融合タンパク質を、概ねChen, Y.等、J. Mol Biol 293:865-881 (1999)に記載されているようにして、約９０００の応答単位でBiacore（登録商標）（BIA core, Inc.、ニュージャージー州Piscataway）ＣＭ５センサーチップにアミン結合させた。簡単には、供給元の支持に従ってＮ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）及びＮ－ヒドロキシサクシニミド（ＮＨＳ）を用いてカルボキシメチル化されたデキストランバイオセンサーチップ（ＣＭ５、BIAcore（登録商標） Inc.）を活性化した。ＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃを希釈し、結合タンパク質の約９０００応答単位（ＲＵ）を達成する流速で注入した。同じチップ上の第２のフローセルにおいて、コントロールタンパク質としてヒトＰＲＯ４３４６－Ｆｃ（Genbank寄託番号ＡＫ０５７０９７）を、約１８５００応答単位でアミン結合した。１Ｍのエタノールアミンを注入して無反応グループをブロックした。約２０００のタンパク質から構成されているＳＰＤＩタンパク質ライブラリから得られた個々のタンパク質を２μｇ／ｍｌの濃度で注入し、時間の経過に伴う応答単位の変化により評価した。ＨＶＥＭはＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃに結合することが判明したが、コントロールＰＲＯ４３４６－Ｆｃは結合しなかった。図１４に示すように、ＰＲＯ８７２９９とＨＶＥＭとの結合により、コントロールに比べ、１２００応答単位に相当する有意な増大が見られた。単純な１対１のラングミュア結合モデル（BIAcore（登録商標）評価ソフトウェア、バージョン３．２）を用いて、結合及び解離センサーグラムを同時に適合させることにより、結合速度（k_{on}）及び解離速度（k_{off}）を計算した。平衡解離定数（Ｋｄ）をk_{off}/k_{on}として計算した。

図１５に示すように、ＰＲＯ８７２９９は選択的にＨＶＥＭに結合する。この実験では、ＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃ及びＣＤ２８ファミリーメンバーであるｈＣＴＬＡ４－Ｆｃ、ｈＰＤ－１－Ｆｃ、ｈＩＣＯＳ－Ｆｃ又はｈＣＤ２８－Ｆｃを、約８０００応答単位でBiacore（登録商標）ＣＭ５チップにアミン結合させた。次いで各々をＨＶＥＭに対する結合能についてアッセイした。ＨＶＥＭ－Ｆｃタンパク質は、ＨＶＥＭのアミノ酸１－１９９をコードする核酸をＦｃに連結することによって作成され、これはＨＶＥＭ－Ｆｃ融合タンパク質となる。このＨＶＥＭ－Ｆｃを、ＣＨＯ細胞に安定に形質移入すると融合タンパク質を生成する発現ベクターにクローニングした。プロテインＡセファロース（登録商標）（Amersham）を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、全てのＦｃ－タグ付きタンパク質を、９０％を超える純度に精製した。この結果、５μｌ／分の速度で注入された２μｇ／ｍｌのＨＶＥＭ－ＦｃはＰＲＯ８７２９９に選択的に結合し、試験したＣＤ２８ファミリーの他のメンバーには結合しなかった。各ＣＤ２８ファミリーメンバーの活性が、それらの既知のリガンドに対する結合応答を試験することによりポジティブであることを確認した（データは示さない）（ＣＤ２８ファミリーメンバー及びリガンドはR&D systemから購入した）。

【０１４４】

ＨＶＥＭに対するＰＲＯ８７２９９の結合はｐＨに比例するが、ＮａＣｌ濃度とは無関係である。上述のようにBiacore（登録商標）アッセイを使用したところ、ＨＶＥＭ－Ｆｃの２つの独立した精製物はBiacore（登録商標）ＣＭ５チップにアミン結合したＰＲＯ８７２９９に結合した。図１６に示すように、結合は、２．５ＭのＮａＣｌで処理しても壊れなかったが、ｐＨ３．０の１０ｍＭのグリシンによってＰＲＯ８７２９９／ＨＶＥＭ複合体は解離した。

ＰＲＯ８７２９９／ＨＶＥＭの相互作用はＰＲＯ８７２９９に対する抗体によって遮断できる。この実験では、ＨＶＥＭ－ＦｃをBiacore（登録商標）CM５センサーチップに約７５００応答単位でアミン結合させた。ＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃの注入は、５μｌ／分の流速で２分行った。注入後１０５秒応答単位（ＲＵ）を記録した。ＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃ（８ｎＭ）により、１００ＲＵの応答が生じた。濃度を漸次増大させながら、各抗体をＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃ（８ｎＭ）と事前に混合し、１時間に亘ってインキュベートした。次いで、各試料の結合を無作為な順番で二通り測定し、１０ｍＭのグリシン（ｐＨ２．５）を用いて各注入後の結合表面を再現した。図１８に示すように、抗ＰＲＯ８７２９９抗体５Ｅ１０及び３Ｂ１．９は、ＨＶＥＭに対するＰＲＯ８７２９９の結合を遮断し、その作用の強さは濃度に比例していた。一方、アゴニスト抗体５Ｆ５．１は遮断効果を持たなかった。抗体だけを注入した場合、固定したＨＶＥＭに対する結合は見られなかった（データは示さない）。ＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃ（５５ｋＤａ）の分子量の見かけ上の減少及び１５０ｋＤａの抗体質量に基づいて濃度を計算した。

【０１４５】

細胞に基づくアッセイにおいて、ＰＲＯ８７２９９はＨＶＥＭに結合した。この実験では、組織培養プレート中においてコンフルエンスまでヒト２９３細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１５７３）を成長させた。培養プレートの培地は、ウシ胎仔血清及び随意で栄養成分及び／又は抗生物質を補ったＤＭＥＭであった。約１０μｇのｐＲＫ５－ＨＶＥＭ　ＤＮＡを約１μｇのＤＮＡコード化ＶＡ　ＲＮＡ遺伝子と混合し[Thimmappaya等、Cell, 31:543 (1982)]、１ｍＭのトリス－ＨＣｌ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ、０．２２７ＭのＣａＣｌ$_2$からなる５００μｌに溶解させた。この混合物に対し、液滴で、５００μｌの５０ｍＭＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３５）、２８０ｍＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭのＮａＰＯ$_4$を加え、２５℃で１０分間沈降させた。沈殿物を懸濁し、２９３細胞に加え、３７℃で約４時間に亘り定着させた。培養培地を吸引し、ＰＢＳ中２０％のグリセリン２ｍｌを３０秒間に亘って加えた。次いで２９３細胞を無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を加えて細胞を約５日間インキュベートした。或いは、約１０μｇのｐＲＫ５－ＨＶＥＭ　ＤＮＡをリポフェクタミン（登録商標）（Gibco/BRL、メリーランド州ゲティスバーグ）試薬と混合し、製造者の指示に従って形質移入を行った。ＨＶＥＭにより２９３細胞を形質移入した後、I^{125}放射標識したＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃとともにそれらをインキュベートし、結合を起こした。次いで、放射標識したＰＲＯ８７２９９を、標識していないＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃと競合させ、スキャッチャード分析により予想される結合部位の合計数及び解離定数（Ｋｄ）を決定した。図１７（Ａ）はスキャッチャードの図であり、図１７（Ｂ）は、ＨＶＥＭを過渡的に形質移入した細胞に対するＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃの結合を示す別の図である。このデータは、ＰＲＯ８７２９９のＫｄが約２５ｎＭであることを示す。偽形質移入した２９３ＨＥＫ細胞に対する放射標識したＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃの全結合は、ＨＶＥＭ形質移入細胞の２．５％であった（データは示さない）。この方法論を用いて、ＨＶＥＭ／ＬＩＧＨＴ／ＰＲＯ８７２９９の相互作用の親和性を決定した。これを以下の表７に示す。

表７

発現したタンパク質	リガンド	Kd (nM)
HVEM	I-125-PRO87299-Fc	25
HVEM	I-125-LIGHT-FLAG	2.5
PRO87299	I-125-HVEM-Fc	5.5
LIGHT	I-125-HVEM-Fc	7
PRO87299/LIGHT	I-125-HVEM-Fc	0.5

本実施例において前述のように、抗ＰＲＯ８７２９９抗体（３Ｂ１．９）は、ＨＶＥＭに結合するＰＲＯ８７２９９（ＥＣＤ）－Ｆｃと用量依存的に競合した。

総合すると、このデータは、タンパク質－タンパク質相互作用、タンパク質－抗体遮断及びインビボでの分析によりアッセイした結果確認されたように、ＰＲＯ８７２９９がＨＶＥＭに特異的に結合することを示す。

【０１４６】

実施例１７：ＰＲＯ８７２９９とＬＩＧＨＴのＨＶＥＭに対する同時結合能

複数の文献により、ＬＩＧＨＴ（GenBank寄託番号ＮＭ＿１７２０１４、配列番号５、配列番号６）が、ＨＶＥＭに結合できることが示されている（Marsters, S.A等、Curr. Biol. 8 (9), 525-528 (1998)；Mauri D.N.等、Immunity (8), 21-30, (1998)）。ＬＩＧＨＴとＰＲＯ８７２９９が同時にＨＶＥＭに結合できることを確認するため、本発明者らは同時結合実験を実施した。ＨＶＥＭ－ＦｃをBiacore（登録商標）ＣＭ５センサーチップに１５０応答単位以下でアミン結合させた。ＰＲＯ８７２９９－Ｆｃの結合を飽和に近づけるために、少量の固定したＨＶＥＭ－Ｆｃが重要であった。図１９はＬＩＧＨＴ（２５ｎＭ）及びＰＲＯ８７２９９－Ｆｃ（１７ｎＭ）をそれぞれ個別に５μ／分で１２００秒間注入した場合を示している（下方の２本の曲線）。次いで、同じ最終濃度のＬＩＧＨＴ及びＰＲＯ８７２９９－Ｆｃの混合物を同じ方法で注入した（一番上の曲線）。個別に注入したＬＩＧＨＴとＰＲＯ８７２９９－Ｆｃセンサーグラムの合算値（上から二番目の曲線）は、実験データとほぼ一致し、ＬＩＧＨＴとＰＲＯ８７２９９が同時にＨＶＥＭに結合できることが確認された。濃度は、分子量２５ｋＤａのＬＩＧＨＴモノマー及び減少したＰＲＯ８７２９９－ＦＣ（５５ｋＤａ）の分子量に基づいて決定した。

ＬＩＧＨＴはＨＶＥＭに対するＰＲＯ８７２９９の相互作用を遮断しなかった。ＰＲＯ８７２９９－Ｆｃを、９８００より小さい応答単位でBiacore（登録商標）ＣＭ５センサーチップにアミン結合させた。ＬＩＧＨＴ（Alexis（登録商標）から購入、カタログ番号５５２－０１８－Ｃ０１０）を、濃度を増大させながら、４ｎＭのＨＶＥＭを用いて１時間に亘りインキュベートした。図２０に示すように、ＰＲＯ８７２９９－Ｆｃ／ＨＶＥＭ結合は、ＬＩＧＨＴの濃度を徐々に高めて最終濃度を３００ｎＭとしても遮断されなかった。ＣＭ５センサーチップ上に固定化したＨＶＥＭ－Ｆｃへの結合により、ＬＩＧＨＴの活性を確認した（データは示さない）。ＬＩＧＨＴだけでは固定化したＰＲＯ８７２９９－Ｆｃに結合しなかった（データは示さない）。全ての結合センサーグラムを、無作為な順序で、２回実行した。５μｌ／分で行った２分間に亘る注入の終了前の１５秒と、ベースラインとの差異として応答単位を記録した。濃度は、ＬＩＧＨＴモノマーの分子量を２５ｋＤａ、モノマーＨＶＥＭの分子量を５５ｋＤａとして決定した。このデータは、ＬＩＧＨＴがＨＶＥＭのＰＲＯ８７２９９に対する結合を遮断しないことを示している。

【０１４７】

ＨＶＥＭは、最初に、細胞へ単純ヘルペスウィルス１（ＨＳＶ－１）を侵入させる細胞レセプターとして同定されたものであり、ＨＳＶ－１の糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）（Mongomery等、Cell 87:427-436 (1996)）に結合することが示されている。ＨＶＥＭは３つのシ

ステインリッチドメイン（ＣＲＤ）を含み、これは全てのＴＮＦＲファミリーのメンバーに共通する構造的特徴である。ＨＶＥＭと複合させたｇＤタンパク質の結晶構造の分解により、ＨＶＥＭの１番目のＣＲＤがｇＤタンパク質に結合し、ＨＶＥＭの２番目のＣＲＤが１番目のＣＲＤの構造的な支持となることが示された（Carfi等、Mol. Cell 8: 169-179 (2001)）。結果として、ＰＲＯ８７２９９がＬＩＧＨＴと相互作用し、ＨＶＥＭ結合について競合しないことから、ＰＲＯ８７２９９がＨＶＥＭ／ＬＩＧＨＴ複合体の外表面と相互作用するという仮定が導かれる。この仮定を検証するために、ファージから得た、ヘルペスグリコプロテインＤ（ｇＤ）に対するＨＶＥＭの結合を遮断することができるが、ＬＩＧＨＴについてはできないペプチド（ＢＰ－２）を生成した（Sarrias等、Mol. Immuno. 37:665-673: (2000)）。ｇＤ結合を阻害する濃度で、ＢＰ－２は、ＨＶＥＭに対するＰＲＯ８７２９９の結合を阻害した（図２１Ａ）。直接的な比較では、組換えｇＤタンパク質（Δ290-299形態、Milne等、J Virology. 77:8962-8972 (2003)）も、ＰＲＯ８７２９９に対するＨＶＥＭの結合を阻害した（図２１Ｂ）。この結果は細胞結合アッセイにおいて繰り返され、このアッセイにより、組換えｇＤ（Δ290-299)が、ＨＶＥＭ又はＰＲＯ８７２９９を発現する２９３細胞に対する可溶性ＰＲＯ８７２９９－Ｆｃ及びＨＶＥＭ－Ｆｃの結合を阻害することが示された（それぞれ図２１Ｃ及びＤ）。これらの結果は、ＬＩＧＨＴ結合部位とは異なる部位で、ＰＲＯ８７２９９がＨＶＥＭの１番目のＣＤＲと相互作用することを示すものである。ＰＲＯ８７２９９がＬＩＧＨＴ及びＨＶＥＭの両方と相互作用するという発見により、ＰＲＯ８７２９９／ＬＩＧＨＴ相互作用を破壊することなくＰＲＯ８７２９９／ＨＶＥＭ相互作用を選択的に阻害することができる、ＨＶＥＭに対する抗体又は小分子の生成が可能になるであろう。この発見によって考えられる別の種類の抗体又は小分子は、ＰＲＯ８７２９９／ＨＶＥＭ相互作用とＰＲＯ８７２９９／ＬＩＧＨＴ相互作用の両方を遮断する抗体又は小分子である。これら２つの異なる分類の分子は、異なる治療効果を持つことができる。

【０１４８】

実施例１８：ＰＲＯ８７２９９によるＴ細胞活性の阻害

実施例１で述べたように、ＰＲＯ８７２９９をクローニングし、タンパク質を含むＩＴＩＭドメインの更なる研究に使用した。ＰＲＯ８７２９９の細胞内ドメインは、誘導的にリン酸化された２つのＩＴＩＭドメインを含み、これによってＳＨＰ－１とＳＨＰ－２の補充と結合が可能になる。これはＰＲＯ８７２９９の機能が阻害的なものであることを示している（Watanabe N.等、Nature Immuno. 1-10 (2003)）。この実験では、一次ＣＤ４＋Ｔ細胞を異なる濃度の固定化した抗ＣＤ３抗体で刺激した。Ｆｃタグを付けたコントロールタンパク質の、ＨＶＥＭ－Ｆｃ又はＤｃＲ３－Ｆｃも、前もってコーティングした抗Ｆｃ抗体を用いることにより、プレート上に架橋した。ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を、７２時間に亘るインキュベーションの後で、Ｈ３チミジン取り込みにより測定した。この実験を三つ一組みのウェルで実行し、阻害を平均値で示した（図２２A）。仮定として、HVEMは、それがＬＩＧＨＴを遮断することにより、Ｔ細胞の増殖を阻害するとされていた。この実験により、Ｔ細胞の増殖を低減させるのは、ＨＶＥＭ／ＬＩＧＨＴ抑制ではなく、HVEMがPRO87299を活性化することによるものであることが示された。

ＰＲＯ８７２９９がＴ細胞増殖を阻害することを更に示すために行った上述の実験には、阻害性の抗ＰＲＯ８７２９９抗体３Ｂ１．９が含まれた。３Ｂ１．９抗体は、ＨＶＥＭに対するＰＲＯ８７２９９の結合を遮断することが示された（実施例１６参照）。ＣＤ４＋Ｔ細胞を、プレートに固定した抗ＣＤ３及び＋／－ＨＶＥＭにより刺激した。次いで３Ｂ１．９抗体及びコントロール抗体を培地に加えた。データは、３Ｂ１．９抗体がＰＲＯ８７２９９／ＨＶＥＭの相互作用を妨害することができ、よって細胞から阻害シグナルを取り除くことができることを示している。結果として、３Ｂ１．９処理した細胞は、未処理の細胞と同じ速さで増殖した（図２２Ｂ）。高い濃度のＨＶＥＭを使用した場合だけ、３Ｂ１．９抗体には効果が無かった。このようなデータにより、ＰＲＯ８７２９９又はアゴニスト抗体が、Ｔ細胞に関連する免疫疾患の抑制に有用であること、又は逆に、３Ｂ１．９等のアンタゴニスト抗体が、Ｔ細胞を刺激し、病原体による感染の予防に有用である

ことが示された。

【０１４９】

実施例１９：移植片対宿主病

移植片対宿主病は、免疫適格細胞が免疫抑制されたか又は耐性のある患者に移植された場合に生じる。ドナーＴ細胞は宿主抗原を認識し、活性化し、サイトカインを分泌し、増殖し、エフェクター細胞に分化する。このような反応は、移植片対宿主反応（ＧＶＨＲ）として知られている。ＧＶＨＲ反応は、多臓器症候群を含み、その影響は、生命に危険性のある重度の炎症から、下痢や体重の減少等の軽度のケースまで多様である。マウスの移植片対宿主病モデルは、骨髄移植及び自己免疫疾患後に起こる急性及び慢性ＧＶＨＲの臨床的異常をモデル化するために使用されてきた。一般的な手順は、上掲のCurrent Protocols in Immunology, unit 4.3に詳細に記されている。この場合、フィコール勾配により、正常なドナーのロイコパックからヒトＰＢＭＣを精製した。ＭＡＣＳ　ＣＤ８及びＮＫ細胞枯渇キットを用いてＣＤ８及びＮＫ細胞を枯渇させた。生後８から１０週のメスのＳＣＩＤベージュマウスに４０ｘ１０ｅ６細胞を注入し、これを０日目とした。１００μｇのＨＶＥＭ－Ｆｃ又はコントロールタンパク質を０、２、４、６、８、１０日目に静脈内注入した。図２３に示すように、ＧＶＨＲモデルにおけるＨＶＥＭ－ＦｃによるＰＲＯ８７２９９の活性化により、生存期間が有意に延びた。ＨＶＥＭ－Ｆｃで処理していないマウスは、再構成後１３日目までに１００％が死亡した。ＨＶＥＭ－Ｆｃで処理したマウスは、一回は再構成後１９日目まで、別の回では３０日目まで生存した。この結果は、アゴニストによるＰＲＯ８７２９９の活性化が組織移植に有用であることを示しており、ＰＲＯ８７２９９アゴニストの投与により、宿主による移植組織の拒絶を防止又は軽減した。

【０１５０】

実施例２０：材料の寄託

次のハイブリドーマ細胞株をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション，１０８０１　ユニバーシティ　ブルバード　マナッサス、ヴァージニア、２０１１０－２２０９米国(ＡＴＣＣ)に寄託した：

ハイブリドーマ／抗体名	ＡＴＣＣ　Ｎｏ．	寄託日
Ｂｔｉｇ５Ｆ５．１	ＰＴＡ－未決定	２００４年１１月１０日
Ｂｔｉｇ３Ｂ１．９	ＰＴＡ－未決定	２００４年１１月１０日

この寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から３０年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。細胞株は、ブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテク社とＡＴＣＣとの間の合意に従い、ＡＴＣＣから入手することができ、（ａ）米国特許法第１２２条及び米国特許法施行規則第１．１４条に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に、本特許出願の継続期間中、子孫を入手可能とすること、及び（ｂ）特許が許可された場合には、寄託された培養物の公的利用可能性に対する全ての制限が不可逆的に取り消されることを保証するものである。本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていたときに死亡、損失又は破壊された場合、通知により、同一培養物の生存可能な検体に即座に取り替えることに同意する。寄託された細胞株の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

【０１５１】

上記の文書による明細書は、当業者による本発明の実施を十分可能にするものであると考えられる。寄託された実施品は、本発明の一態様の一つの例証として意図されており、よって本発明の範囲が寄託された材料により制限されることはなく、機能的に均等であるあらゆる作製物は本発明の範囲に含まれる。本明細書中の材料の寄託は、本明細書内に記載された説明が、その最良の態様を含む本発明の任意の態様の実施を可能にするのに不十分なことを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して特許請求の範囲を制限するものであると解釈するべきではない。実際に、本明細書で示され記載されたものに加えて、本発明の様々な変更が、上記の説明により当業者には明白であり、添付の特許請求

の範囲に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【０１５２】

本特許出願は少なくとも１つのカラー図面を含む。カラー図面を含む本特許出願の複写は、必要な料金を支払って申し込めば米国特許商標庁から入手可能である。

【図１】天然配列ＰＲＯ８７２９９ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号１）を示し、配列番号１は本明細書で「ＤＮＡ３３２４６７」と命名されたクローンである。

【図２】図１に示される配列番号１のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号２）を示す。

【図３】天然配列ＨＶＥＭ　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号３）を示し、配列番号３は本明細書で「ＨＶＥＭ」と命名されたクローンである。

【図４】図３に示される配列番号３のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号４）を示す。

【図５】天然配列ＬＩＧＨＴのヌクレオチド配列（配列番号５）を示し、配列番号５は本明細書で「ＬＩＧＨＴ」と命名されたクローンである。

【図６】図５に示される配列番号５のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号６）を示す。

【図７】変異体配列ＰＲＯ８７２９９のヌクレオチド配列（配列番号７）を示し、配列番号７は本明細書で「ＰＲＯ８７２９９．ｓｈｏｒｔ」と命名されたクローンである。

【図８】図７に示される配列番号７のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号８）を示す。

【図９】変異体配列ＰＲＯ８７２９９のヌクレオチド配列（配列番号９）を示し、配列番号９は本明細書で「ＰＲＯ８７２９９．ＡＦＴＮＩＰ」と命名されたクローンである。

【図１０】図９に示される配列番号９のコード配列に由来するアミノ酸配列（配列番号１０）を示す。

【図１１Ａ】ＰＲＯ８７２９９ｃＤＮＡの核酸変異体を示す。

【図１１Ｂ】ＰＲＯ８７２９９ｃＤＮＡの核酸変異体を示す。

【図１１Ｃ】ＰＲＯ８７２９９ｃＤＮＡの核酸変異体を示す。

【図１１Ｄ】ＰＲＯ８７２９９ｃＤＮＡの核酸変異体を示す。

【図１１Ｅ】ＰＲＯ８７２９９ｃＤＮＡの核酸変異体を示す。

【図１１Ｆ】ＰＲＯ８７２９９ｃＤＮＡの核酸変異体を示す。

【図１２Ａ】ＰＲＯ８７２９９変異体のポリペプチドの翻訳を示す。

【図１２Ｂ】ＰＲＯ８７２９９変異体のポリペプチドの翻訳を示す。

【図１３】アゴニスト抗体によるＣＤ４＋Ｔ細胞増殖の抑制を示す。

【図１４】ＨＶＥＭに対するＰＲＯ８７２９９の特異的な結合を示す。

【図１５】ＰＲＯ８７２９９の、ＨＶＥＭに対する結合と、他のファミリーメンバーに対する結合の対比を示す。

【図１６】ＨＶＥＭに対するＰＲＯ８７２９９の結合にｐＨが影響することを示す。

【図１７】ＨＶＥＭで形質移入した細胞上でのＨＶＥＭに対するＰＲＯ８７２９９の結合を示す。

【図１８】ＰＲＯ８７２９９の抗体が、ＨＶＥＭとの相互作用の遮断能を有することを示す。

【図１９】ＰＲＯ８７２９９とＬＩＧＨＴとがＨＶＥＭに同時に結合できることを示す。

【図２０】ＰＲＯ８７２９９が、ＬＩＧＨＴとＨＶＥＭとの相互作用によって遮断されないことを示す。

【図２１】ＰＲＯ８７２９９／ＨＶＥＭ相互作用を遮断するＢＰ－２ペプチドとｇＤとを示す。

【図２２】ＣＤ４＋Ｔ細胞に対するＰＲＯ８７２９９抑制効果を示す。

【図２３】ＨＶＥＭ－ＦｃによるＰＲＯ８７２９９の活性化がＧＶＨＲモデルにおける生存を助長することを示す。

【図１】

CCTCGGTTCTATCGATTGAATTCATGAAGACATTGCCTGCCATGCTTGGAACTGGGAAAT
TATTTTGGGGTCTTCTTCTTAATCCCATATCTGGACATCTGGAACATCCATGGGAAAGAAT
CATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCCATCTTAGCAGGAGATC
CCTTTGAACTAGAATGCCCTGTGAAATACTGTGCTAACAGGCCTCATGTGACTTGGTGCA
AGCTCAATGGAACAACATGTGTAAAACTTGAAGATAGACAAACAAGTTGGAAGGAAGAGA
AGAACATTTCATTTTTCATTCTACATTTGAACCAGTGCTTCCTAATGACAATGGGTCAT
ACCGCTGTTCTGCAAATTTTCAGTCTAATCTCATTGAAAGCCACTCAACAACTCTTTATG
TGACAGATGTAAAAAGTGCTTCAGAACGACCCTCCAAGGACGAAATGGCAAGCAGACCCT
GGCTCCTGTATAGTTTACTTCCTTTGGGGGGATTGCCTCTACTCATCACTACCTGTTTCT
GCCTGTTCTGCTGCCTGAGAAGGCACCAAGGAAAGCAAAATGAACTCTCTGACACAGCAG
GAAGGGAAATTAACCTGGTTGATGCTCACCTTAAGAGTGAGCAAACAGAACCAAGCACCA
GGCAAAATTCCCAAGTACTGCTATCAGAACTGGAATTTATGATAATGACCCTGACCTTT
GTTTCAGAATGCAGGAAGGGTCTGAAGTTTATTCTAATCCATGCCTGGAAGAAAACAAAC
CAGGCATTGTTTATGCTTCCCTGAACCATTCTGTCATTGGACTGAACTCAAGACTGGCAA
GAAATGTAAAAGAAGCACCAACAGAATATGCATCCATATGTGTGAGGAGTTAAGGATCCT
CTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAA
GTGTTACAAATAAACAAATAATATTTCTCAATTTGAGAATTTTTACTTTAGAAATGTTCA
TGTTAGTGCTTGGGTCTGAAGGGTCCATAGGACAAATGATTAAAAT

【図２】

MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNIHGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPPELECPV
KYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQ
SNLIESHSTTLYVTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRR
HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGS
EVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGLNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
153-173

N グリコシル化部位.
75-78
94-97
110-113
261-264

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位.
41-44

チロシンキナーゼリン酸化部位.
31-39

N ミリストイル化部位.
111-116
224-229
254-259

ITIM ドメイン
255-260

ITISM ドメイン
280-285

免疫グロブリンドメイン
51-117

【図３】

GCCGCAGCAATGGCGCTGAGTTCCTCTGCTGGAGTTCATCCTGCTAGCTGGGTTCCCGAG
CTGCCGGTCTGAGCCTGAGGCATGGAGCCTCCTGGAGACTGGGGGCCTCCTCCCTGGAGA
TCCACCCCCAGAACCGACGTCTTGAGGCTGGTGCTGTATCTCACCTTCCTGGGAGCCCCC
TGCTACGCCCCAGCTCTGCCGTCCTGCAAGGAGGACGAGTACCCAGTGGGCTCCGAGTGC
TGCCCCAAGTGCAGTCCAGGTTATCGTGTGAAGGAGGCCTGCGGGGAGCTGACGGGCACA
GTGTGTGAACCCTGCCCTCCAGGCACCTACATTGCCCACCTCAATGGCCTAAGCAAGTGT
CTGCAGTGCCAAATGTGTGACCCAGCCATGGGCCTGCGCGCGAGCCGGAACTGCTCCAGG
ACAGAGAACGCCGTGTGTGGCTGCAGCCCAGGCCACTTCTGCATCGTCCAGGACGGGGAC
CACTGCGCCGCGTGCCGCGCTTACGCCACCTCCAGCCCGGGCCAGAGGGTGCAGAAGGGA
GGCACCGAGAGTCAGGACACCCTGTGTCAGAACTGCCCCCCGGGACCTTCTCCCCAAT
GGGACCCTGGAGGAATGTCAGCACCAGACCAAGTGCAGCTGGCTGGTGACGAAGGCCGGA
GCTGGGACCAGCAGCTCCCACTGGGTATGGTGGTTCTCTCAGGGAGCCTCGTCATCGTC
ATTGTTTGCTCCACAGTTGGCCTAATCATATGTGTGAAAAGAAGAAAGCCAAGGGGTGAT
CTAGTCAAGGTGATCGTCTCCGTCCAGCGGAAAAGACAGGAGGCAGAAGGTGAGGCCACA
GTCATTGAGGCCCTGCAGGCCCCTCCGGACGTCACCACGGTGGCCGTGGAGGAGACAATA
CCCTCATTCACGGGGAGGAGCCCAAACCACTGACCCACAGACTCTGCACCCCGACGCCAG
AGATACCTGGAGCGACGGCTGCTGAAAGAGGCTGTCCACCTGGCGAAACCACCGGAGCCC
GCAGGCTTGGGGGCTCCGCCCTGGGCTGG

【図４】

MEPPGDWGPPPWRSTPRTDVLRLVLYLTFLGAPCYAPALPSCKEDEYPVGSECCPKCSPG
YRVKEACGELTGTVCEPCPPGTYIAHLNGLSKCLQCQMCDPAMGLRASRNCSRTENAVCG
CSPGHFCIVQDGDHCAACRAYATSSPGQRVQKGTESQDTLCQNCPPGTFSPNGTLEECQ
HQTKCSWLVTKAGAGTSSSHWVWWFLSGSLVIVIVCSTVGLIICVKRRKPRGDVVKVIVS
VQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH

シグナル配列
1-36

膜貫通ドメイン
201-221

N グリコシル化部位.
110-114
173-177

N ミリストイル化部位.
81-87
89-95
104-110
120-126
153-159
193-199
195-201
220-226

細胞接着配列.
231-234

TNFR/NGFR システインリッチ領域
42-75
78-119

【図５】

GGTTTCCTCTGAGGTTGAAGGACCCAGGCGTGTCAGCCCTGCTCCAGACACCTTGGGCATG
GAGGAGAGTGTCGTACGGCCCTCAGTGTTTGTGGTGGATGGACAGACCGACATCCCATT
CACGAGGCTGGGACGAAGCCACCGGAGACAGTCGTGCAGTGTGGCCCGGGTGGGTCTGGG
TCTCTTGCTGTTGCTGATGGGGGCCGGGCTGGCCGTCCAAGGCTGGTTCCTCCTGCAGCT
GCACTGGCGTCTAGGAGAGATGGTCACCCGCCTGCCTGACGGACCTGCAGGCTCCTGGGA
GCAGCTGATACAAGAGCGAAGGTCTCACGAGGTCAACCCAGCAGCGCATCTCACAGGGGC
CAACTCCAGCTTGACCGGCAGCGGGGGGCCGCTGTTATGGGAGACTCAGCTGGGCCTGGC
CTTCCTGAGGGGCCTCAGCTACCACGATGGGCCCTTGTCGTCACCAAGCTGGCTACTA
CTACATCTACTCCAAGGTGCAGCTGGGCGGTGTGGGCTGCCCGCTGGGCCTGGCCAGCAC
CATCACCCACGGCCTCTACAAGCGCACACCCCGCTACCCCGAGGAGCTGGAGCTGTTGGT
CAGCCAGCAGTCACCCTGCGGACGGGCCACCAGCAGCTCCCGGGTCTGGTGGGACAGCAG
CTTCCTGGGTGGTGTGGTACACCTGGAGGCTGGGGAGGAGGTGGTCGTCCGTGTGCTGGA
TGAACGCCTGGTTCGACTGCGTGATGGTACCCGGTCTTACTTCGGGGCTTTCATGGTGTG
AAGGAAGGAGCGTGGTGCATTGGACATGGGTCTGACACGTGGAGAACTCAGAGGGTGCCT
CAGGGGAAAGAAAACTCACGAAGCAGAGGCTGGGCGTGGTGGCTCTCGCCTGTAATCCCA
GCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGG
CTAACATGGCAAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGACGTGGTGGTGC
CTGCCTGTAATCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGATAATTTTGCTTAAACCCGGGAG
GCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACACCACTGCACTCCAACCTGGGAAACGCAGTGAG
ACTGTGCCTCAAAAAAAAG

【図６】

MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVARVGLGLLLLLMGAGLAVQGWFLLQ
LHWRLGEMVTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGL
AFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELL
VSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N グリコシル化部位.
102-106

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位.
29-33

N ミリストイル化部位.
48-54
100-106
153-159
157-163

ロイシンジッパー パターン
44-66
51-73

【図７】

ATGAAGACATTGCCTGCCATGCTTGGAACTGGGAAATTATTTTGGGTCTTCTTCTTAATCCCATATCTGGAC
ATCTGGAACATCCATGGGAAAGAATCATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCCATC
TTAGCAGGAGATCCCTTTGAACTAGAATGCCCTGTGAAATACTGTGCTAACAGGCCTCATGTGACTTGGTGC
AAGCTCAATGGAACAACATGTGTAAAACTTGAAGATAGACAAACAAGTTGGAAGGAAGAGAAGAACATTTCA
TTTTTCATTCTACATTTGAACCAGTGCTTCCTAATGACAATGGGTCATACCGCTGTTCTGCAAATTTTCAG
TCTAATCTCATTGAAAGCCACTCAACAACTCTTTATGTGACAGGAAGCAAAATGAACTCTCTGACACAGCA
GGAAGGGAAATTAACCTGGTTGATGCTCACCTTAAGAGTGAGCAAACAGAAGCAAGCACCAGGCAAAATTCC
CAAGTACTGCTATCAGAAACTGGAATTTATGATAATGACCCTGACCTTTGTTTCAGGATGCAGGAAGGGTCT
GAAGTTTATTCTAATCCATGCCTGGAAGAAAACAAACCAGGCATTGTTTATGCTTCCCTGAACCATTCTGTC
ATTGGACTGAACTCAAGACTGGCAAGAAATGTAAAAGAAGCACCAACAGAATATGCATCCATATGTGTGAGG
AGTTAA

【図８】

MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNIHGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPPELECPVKYCANR
PHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLY
VTGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNP
CLEENKPGIVYASLNHSVIGLNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
無し

N グリコシル化部位.
75-79
94-98
110-114
213-217

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位.
41-45

チロシンキナーゼリン酸化部位.
31-40

N ミリストイル化部位.
111-117
176-182
206-212

免疫グロブリンドメイン
51-117

ITIM ドメイン
207-212

ITISM ドメイン
232-237

【図９】

ATGAAGACATTGCCTGCCATGCTTGGAACTGGGAAATTATTTTGGGTCTTCTTCTTAATCCCATATCTGGAC
ATCTGGAACATCCATGGGAAAGAATCATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCCATC
TTAGCAGGAGATCCCTTTGAACTAGAATGCCTGTCAAATACTGTGCTACAGGCCTCATGTGACTTGGTGC
AAGCTCAATGGAACAACATGTCTAAAACTTGAAGATAGACAAACAAGTTGGAAGGAAGAGAAGAACATTTCA
TTTTTCATTCTACATTTGAACCAGTGCTTCCTAATGACAATGGGTCATACCGCTGTTCTGCAAATTTTCAG
TCTTATCTCATTGAAAGCCACTCAACAACTCTTTATGTGACAGCATTTACTAACATTCCAGATGTAAAAAGT
GCCTCAGAACGACCCTCCAAGGACGAAATGGCAAGCAGACCCTGGCTCCTGTATAGTTTACTTCCTTTGGGG
GGATTGCCTCTACTCATCACTACCTGTTTCTGCCTGTTCTGCTGCCTGAGAAGGCACCAAGCAAAGCAAAAT
GAACTCTCTGACACAGCAGGAAGGGAAATTAACCTGGTTGATGCTCACCTTAAGAGTGAGCAAACAGAAGCA
AGCACCAGGCAAAATTCCCAAGTACTGCTATCAGAAACTGGAATTTATGATAATGACCCTGACCTTTGTTTC
AGGATGCAGGAAGGGTCTGAAGTTTATTCTAATCCATGCCTGGAAGAAAACAACCAGGCATTGTTTATGCT
TCCCTGAACCATTCTGTCATTGGACTGAACTCAAGACTGGCAAGAAATGTAAAAGAAGCACCAACAGAATAT
GCATCCATATGTGTGAGGAGTTAA

【図１０】

MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNIHGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWC
KLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTAFTNIPDVKS
ASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEA
STRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGLNSRLARNVKEAPTEY
ASICVRS

シグナル配列
無し

膜貫通ドメイン
158-178

N グリコシル化部位.
75-79
94-98
110-114
267-271

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位.
41-45

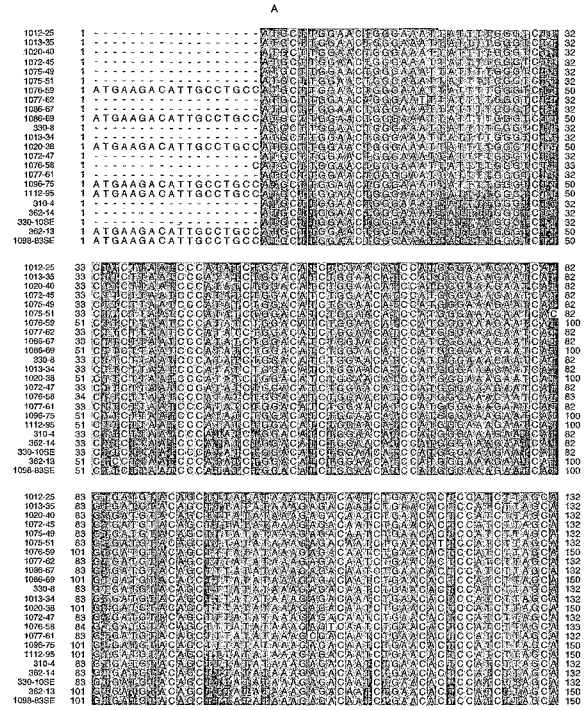
チロシンキナーゼリン酸化部位.
31-40

N ミリストイル化部位
111-117
230-236
260-266

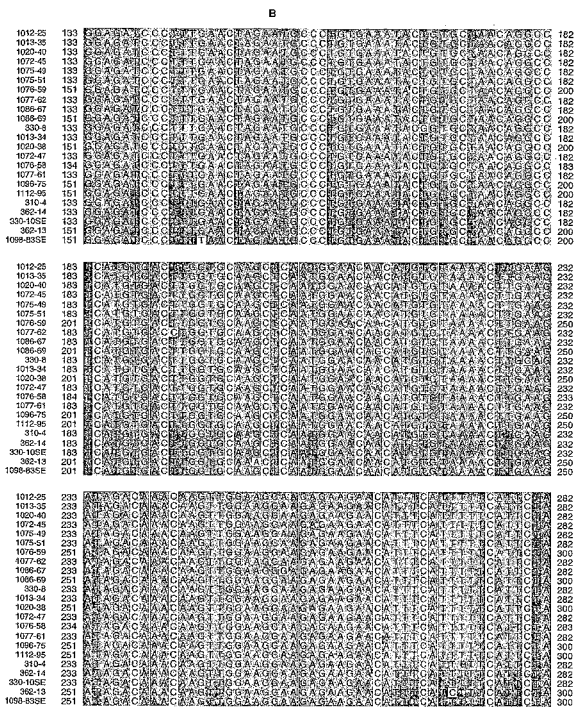
ITIM ドメイン
261-266

ITISM ドメイン
286-291

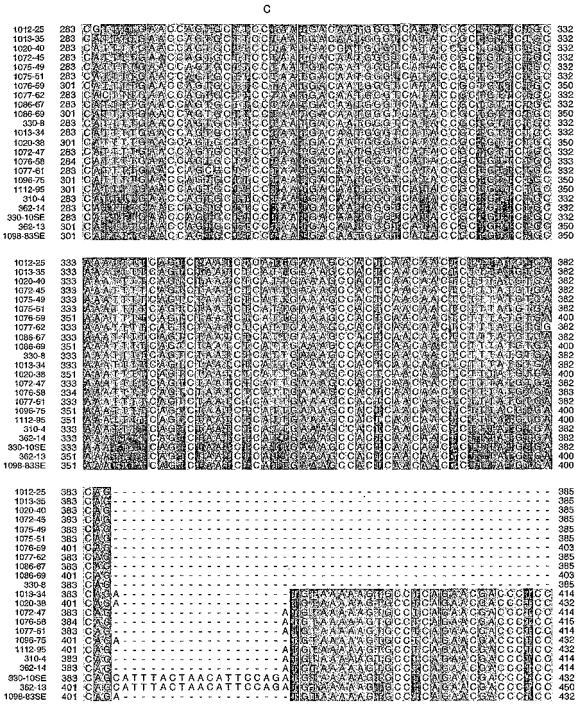
【図１１Ａ】



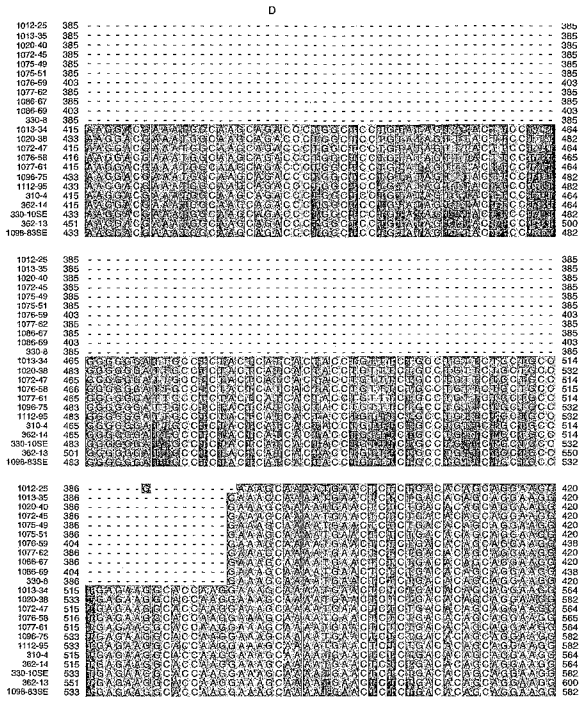
【図１１Ｂ】



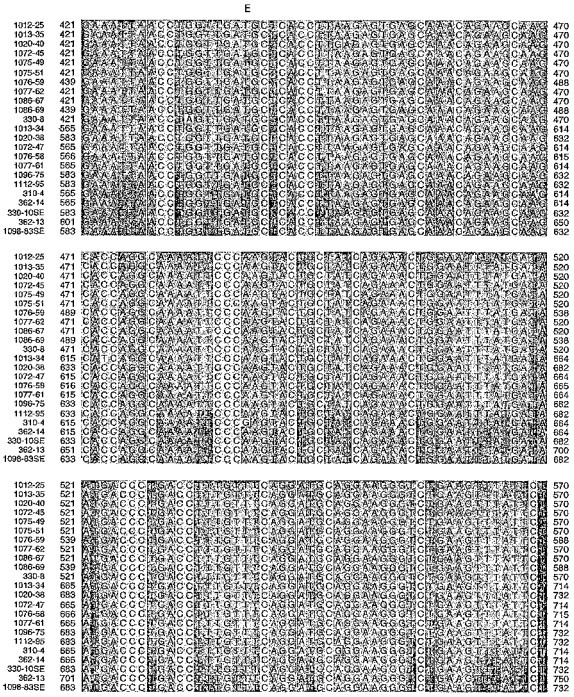
【図１１Ｃ】



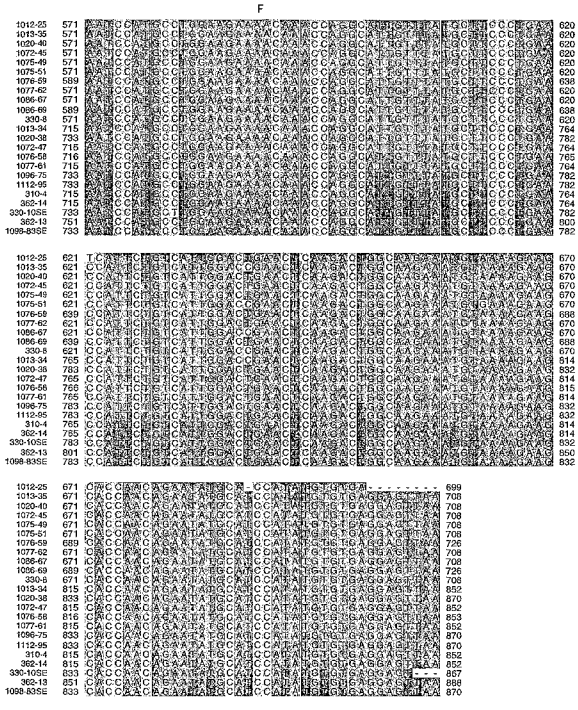
【図１１Ｄ】



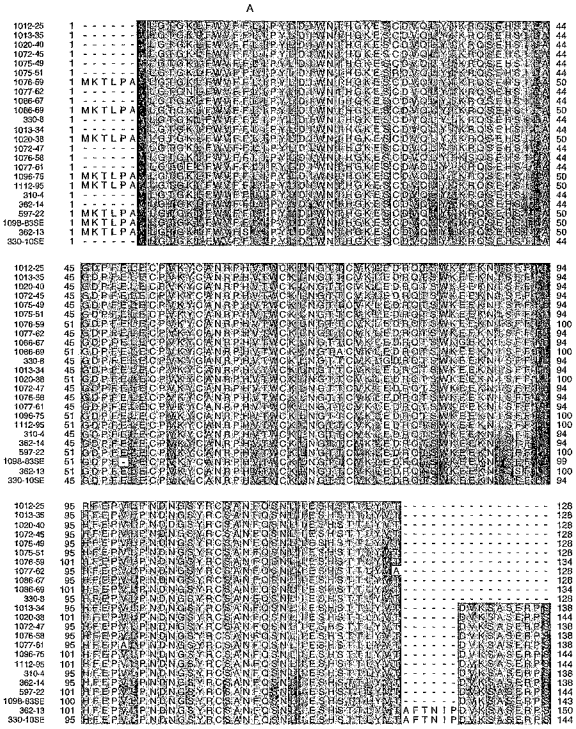
【図１１Ｅ】



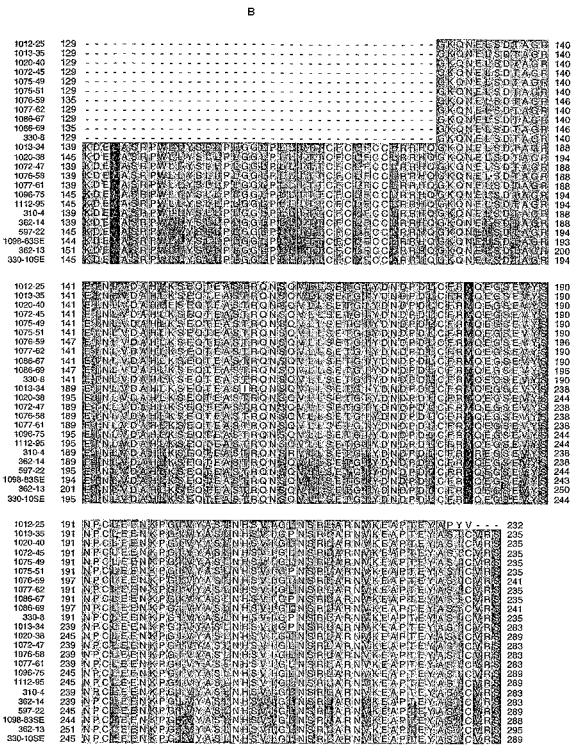
【図１１Ｆ】



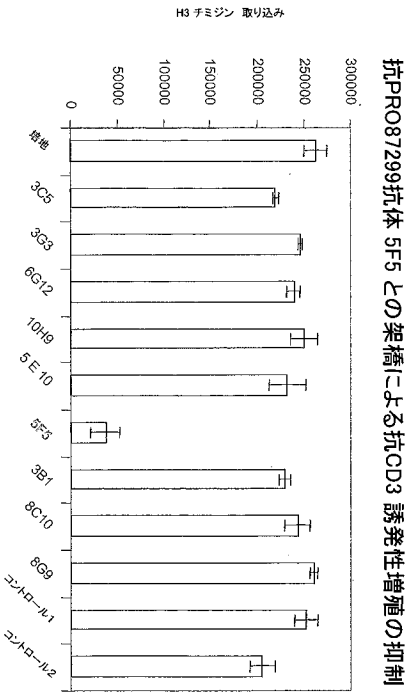
【図１２Ａ】



【図１２Ｂ】

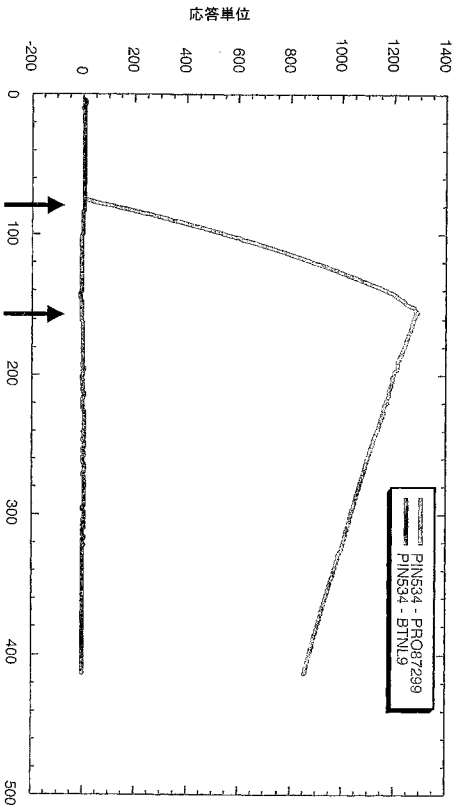


【図１３】



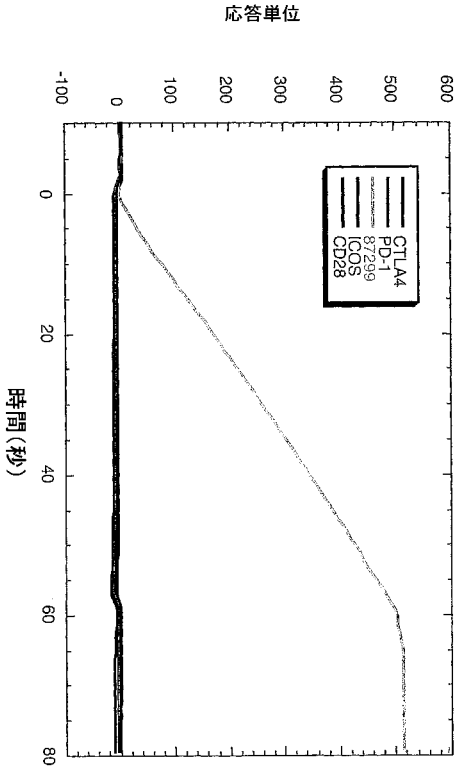
抗PRO87299抗体 5F5 との架橋による抗CD3 誘発性増殖の抑制

【図１４】



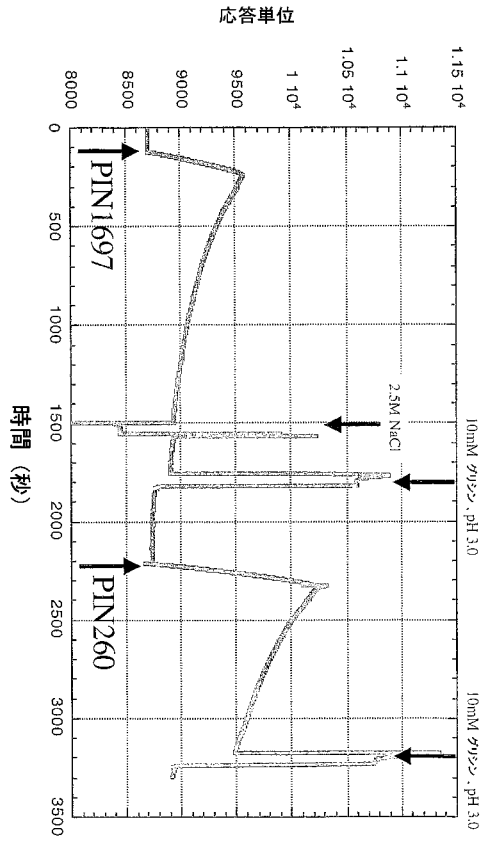
PRO87299 に対するPIN534 (HVEM) の結合

【図１５】



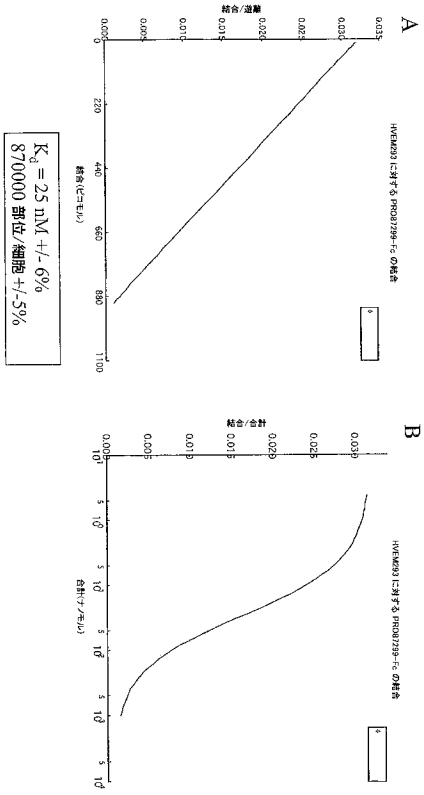
HVEM の PRO87299 に対する選択的結合

【図１６】

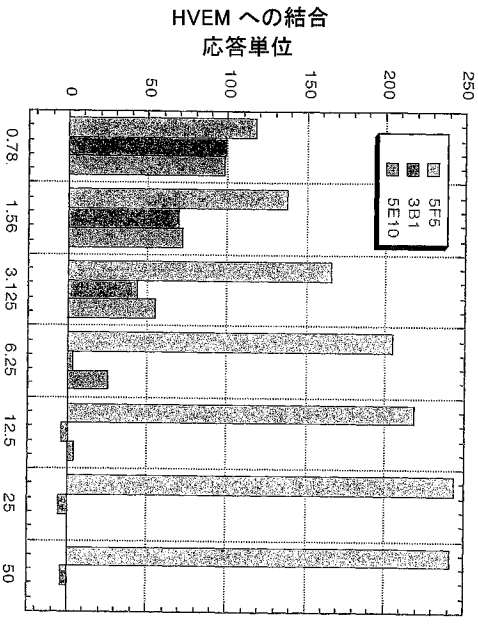


HVEM と PRO87299 との結合に対する二つの独立した精製物の使用
（結合は塩化物に耐性であったが、 pHの影響を受けた）

【図１７】

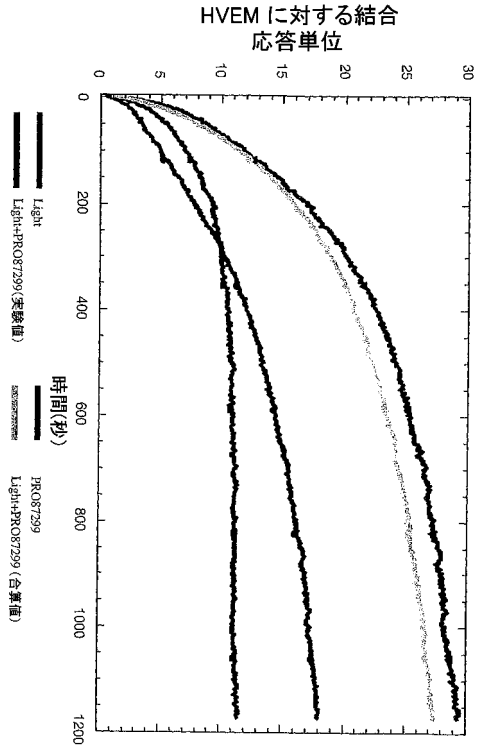


【図１８】



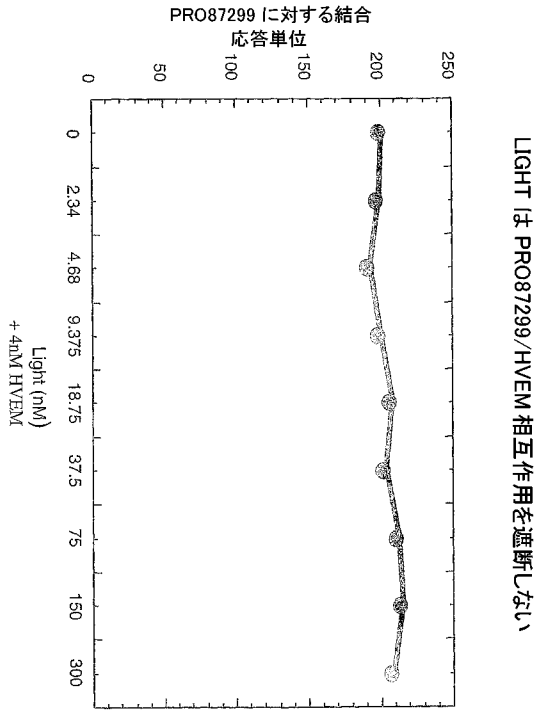
PRO87299 抗体 5E10 & 3B1によるHVEM との結合の遮断
5F5 は遮断効果を持たない

【図１９】

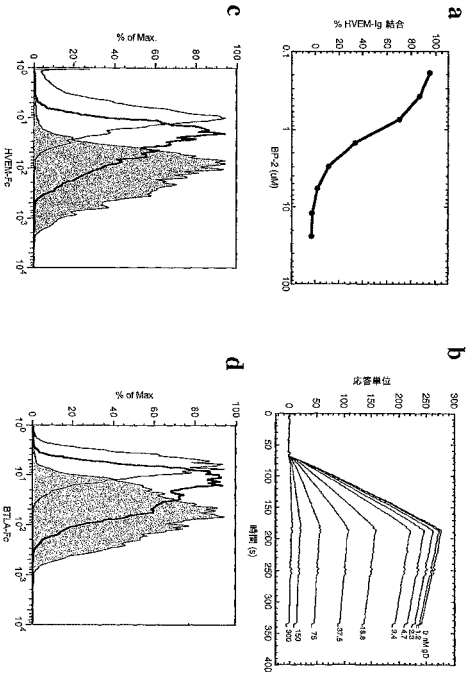


LIGHT と PRO87299 の HVEM に対する同時結合能

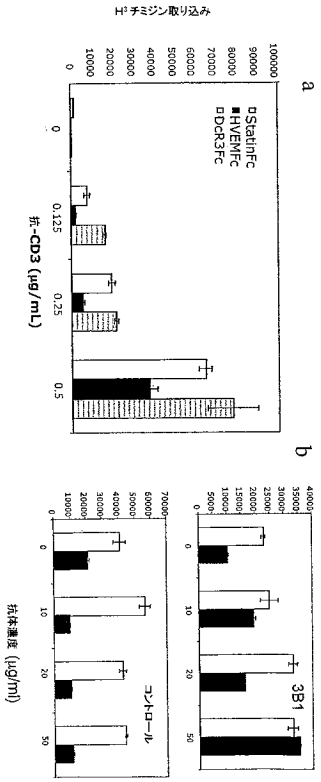
【図２０】



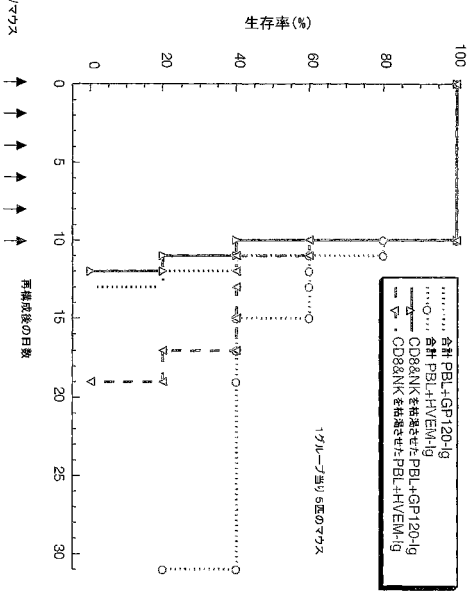
【図２１】



【図２２】



【図２３】



【手続補正書】
【提出日】平成19年10月2日(2007.10.2)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
図７（配列番号７）に示すヌクレオチド配列のコード配列を含んでなる、単離された核酸。
【請求項２】
図９（配列番号９）に示すヌクレオチド配列のコード配列を含んでなる、単離された核酸。
【請求項３】
請求項１又は２に記載の核酸を含むベクター。
【請求項４】
前記ベクターを用いて形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能にリンクする、請求項３に記載のベクター。
【請求項５】
請求項４に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項６】
ＣＨＯ細胞、大腸菌細胞又は酵母細胞である、請求項５に記載の宿主細胞。
【請求項７】
請求項６に記載の宿主細胞を、前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から前記ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを回収することを含む、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドの製造方法。
【請求項８】
図８（配列番号８）に示すポリペプチドのアミノ酸配列に対し、少なくとも８５％のアミノ酸配列同一性を有する、単離されたポリペプチド。
【請求項９】
図１０（配列番号１０）に示すポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。
【請求項１０】
異種アミノ酸配列に融合した請求項８又は９に記載のポリペプチドを含んでなる、キメラ分子。
【請求項１１】
前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列であるか、又は免疫グロブリンのＦｃ領域である、請求項１０に記載のキメラ分子。
【請求項１２】
図８（配列番号８）に示すＰＲＯ８７２９９変異体に特異的に結合する抗体。
【請求項１３】
図１０（配列番号１０）に示すＰＲＯ８７２９９変異体に特異的に結合する抗体。
【請求項１４】
ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合し、ＨＶＥＭの相互作用を遮断する抗体。
【請求項１５】
ＰＲＯ８７２９９アゴニストである、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する抗体。
【請求項１６】
ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を抑制する、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する抗体。
【請求項１７】

リンパ腫細胞の増殖を抑制する、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する抗体。
【請求項１８】
ＮＫ細胞の増殖を抑制する、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する抗体。
【請求項１９】
モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である、請求項１２ないし１８の何れか一に記載の抗体。
【請求項２０】
ハイブリドーマＢｔｉｇ５Ｆ５．１（ＡＴＣＣ寄託番号６３０２）又はハイブリドーマＢｔｉｇ３Ｂ１．９（ＡＴＣＣ寄託番号６３０１）によって生成される、単離された抗体。
【請求項２１】
ハイブリドーマＢｔｉｇ５Ｆ５．１（ＡＴＣＣ寄託番号６３０２）によって生成された抗体の生物学的活性を有し、該生物学的活性が、ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を抑制する、単離された抗体。
【請求項２２】
アウリスタチン、メイタンシノイド及びカリケアマイシンからなる群より選択される毒素にコンジュゲートされる、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する抗体。
【請求項２３】
毒素が、ＭＭＡＥ（モノメチルアウリスタチンＥ）、ＭＭＡＦ、ＭＭＡＦ－ＤＭＡＥＡ、（ＭＭＡＦ－ジメチルアミノエチルアミン）、ＭＭＡＦ－ＴＥＧ（ＭＭＡＦ－テトラエチレングリコール）、ＭＭＡＦ－ＮｔＢｕ、及びＡＥＶＢ（アウリスタチンＥバレリルベンジルヒドラゾン）、及びＡＦＰ（アウリスタチンＦフェニレンジアミン）からなる群より選択される、請求項２２に記載の抗体。
【請求項２４】
毒素がリンカーによって抗体に共有結合性に付着している、請求項２２に記載の抗体。
【請求項２５】
リンカーが、マレイミドカプロイル（maleimidocaproyl）（ＭＣ）、バリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔ，ｖｃ）、シトルリン（２－アミノ－５－ウレイドペンタン酸）、ＰＡＢ（ｐ－アミノベンジルカルバモイル）、Ｍｅ（Ｎ－メチル－バリンシトルリン）、ＭＣ（ＰＥＧ）６－ＯＨ（マレイミドカプロイル－ポリエチレングリコール）、ＳＰＰ（Ｎ－サクシニミジル４－（２－ピリジルチオ）ペンタン酸）、ＳＭＣＣ（Ｎ－サクシニミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボン酸）、及びＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢからなる群より選択される、請求項２４に記載の抗体。
【請求項２６】
製薬的に許容可能な担体と組み合わせた、請求項１２ないし１８及び２０ないし２２の何れか一に記載の抗体を含んでなる組成物。
【請求項２７】
担体と組み合わせた、（ａ）請求項８又は９に記載のポリペプチド、（ｂ）前記ポリペプチドのアゴニスト、（ｃ）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（ｄ）前記ポリペプチドに特異的に結合する抗体を含んでなる組成物。
【請求項２８】
治療的に有効な量の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）又は（ｄ）を含む、請求項２７に記載の組成物。
【請求項２９】
容器、
前記容器に貼付されたラベル、及び
前記容器に含まれた、請求項１２ないし１８及び２０ないし２２の何れか一に記載の抗体を含んでなる組成物
を備えた製造品であって、前記容器上のラベルが、前記組成物を使用して免疫関連疾患、リンパ腫又は炎症性腸疾患を治療できることを示す、製造品。

【請求項３０】
必要とする哺乳動物の免疫関連疾患を軽減するための医薬であって、治療的有効量の：
（ａ）請求項１２ないし１８及び２０ないし２２の何れか一に記載の抗体、
（ｂ）ＨＶＥＭ、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片、又は
（ｃ）ＰＲＯ８７２９９のアゴニスト
を含んでなる医薬。
【請求項３１】
免疫関連疾患が、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、変形性関節症、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症性筋疾患、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫性腎臓疾患、中枢及び末梢神経系の脱髄性疾患、特発性脱髄性多発神経障害、ギランバレー症候群、慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、感染性又は自己免疫慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン感受性腸疾患、フィップル疾患、自己免疫性又は免疫媒介性皮膚疾患、水泡性皮膚疾患、多形滲出性紅斑、接触皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、肺の免疫学的疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、高感受性間質性肺炎、移植関連疾患、移植片拒絶又は移植片対宿主病である、請求項３０に記載の医薬。
【請求項３２】
ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドを含むと思われる試料における前記ポリペプチドの存在を決定する方法であって、前記試料を：
（ａ）請求項１２ないし１８及び２０ないし２２の何れか一に記載の抗ＰＲＯ８７２９９抗体、又は
（ｂ）ＨＶＥＭ、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片
に曝して、ＰＲＯ８７２９９に対する（ａ）又は（ｂ）の結合を決定する方法。
【請求項３３】
哺乳動物における免疫関連疾患の診断方法であって、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する
（ａ）請求項１２ないし１８及び２０ないし２２の何れか一に記載の抗ＰＲＯ８７２９９抗体、又は
（ｂ）ＨＶＥＭ、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片
を、前記哺乳動物から採取した組織細胞からなる試験試料に接触させ、（ａ）又は（ｂ）と、試験試料中のＰＲＯ８７２９９ポリペプチドとの複合体の形成を判断して、前記複合体が形成される場合に、試験組織細胞を採取した哺乳動物における免疫関連疾患の存在が示される方法。
【請求項３４】
必要とする哺乳動物のリンパ腫を軽減するための医薬であって、ＰＲＯ８７２９９ポリペプチドに特異的に結合する、治療的有効量の：
（ａ）請求項１２ないし１８及び２０ないし２２の何れか一に記載の抗ＰＲＯ８７２９９抗体、又は
（ｂ）ＨＶＥＭ、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片
を含んでなる医薬。
【請求項３５】
必要とする哺乳動物の炎症性腸疾患を軽減するための医薬であって、ＰＲＯ８７２９９に特異的に結合する、治療的有効量の：
（ａ）請求項１２ないし１８及び２０ないし２２の何れか一に記載の抗ＰＲＯ８７２９９抗体、又は
（ｂ）ＨＶＥＭ、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片
を含んでなる医薬。
【請求項３６】

哺乳動物における移植細胞の拒絶を軽減するための医薬であって、有効量の：
（ａ）請求項１２ないし１８及び２０ないし２２の何れか一に記載の抗ＰＲＯ８７２９９抗体、又は
（ｂ）ＨＶＥＭ、ＨＶＥＭ－Ｆｃ、又はその断片
を含んでなり、移植細胞の拒絶を軽減する医薬。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		４Ｃ０８５
Ｃ０７Ｋ	*16/18*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/18		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*38/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｋ	*39/385*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/385		
Ａ６１Ｐ	*19/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｐ	*19/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ	*21/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/08		
Ａ６１Ｐ	*21/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00		
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/02		
Ａ６１Ｐ	*7/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｐ	*7/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		
Ａ６１Ｐ	*5/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/06		
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04		
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/14		
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12		
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ	*1/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16		
Ａ６１Ｐ	*17/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*37/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/00		
Ａ６１Ｐ	*11/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06		
Ａ６１Ｐ	*27/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08		
Ａ６１Ｐ	*17/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06		
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/16		
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/04		
Ｇ０１Ｎ	*33/50*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ｇ０１Ｎ	*33/15*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/50	Ｚ	
			Ｇ０１Ｎ	33/15	Ｚ	
			Ｃ１２Ｐ	21/08		

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

(72)発明者 イートン, ダニエル エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４９０１, サン ラファエル, インヴァーネス ドライブ ４５
(72)発明者 ラニック, バーンド

アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サン　フランシスコ，　スプルース　アヴェニュー　２１１，　２号室
(72)発明者　オウヤング，　ウェンジュン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４４０４，　フォスター　シティ，　ガレイ　レーン　１０５７
(72)発明者　ゴンザレス，　リノ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９５０２３，　ホリスター，　アカシア　コート　３１
(72)発明者　ロイェット，　ケリー　エム．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４６１８，　オークランド，　ブロードウェイ　テラス　＃３　５２４１

Ｆターム(参考)　2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36
4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA04 CA07 DA02 DA06 DA12 EA04 GA11 HA03
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA05 DA08 DA13
4B065 AA26X AA72X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 MA01 NA14 ZA012 ZA342 ZA362 ZA512 ZA532 ZA552 ZA592 ZA612 ZA662 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZB072 ZB112 ZB132 ZB152 ZB222 ZB262 ZC062 ZC352
4C085 AA13 AA14 AA37 BA07 DD88 EE01 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86 EA22 EA28 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	用于治疗免疫相关疾病的新型组合物和方法		
公开(公告)号	JP2008519599A	公开(公告)日	2008-06-12
申请号	JP2007541149	申请日	2004-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	クラークヒラリー イートンダニエルエル ラニックバーンド オウヤングウェンジュン ゴンザレスリノ ロイェットケリーエム		
发明人	クラーク, ヒラリー イートン, ダニエル エル. ラニック, バーンド オウヤング, ウェンジュン ゴンザレス, リノ ロイェット, ケリー エム.		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 C12P21/02 C07K19/00 C07K16/18 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K39/385 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P19/08 A61P21/00 A61P21/02 A61P9/00 A61P7/06 A61P7/04 A61P5/14 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/00 A61P37/02 A61P1/16 A61P35/00 A61P1/00 A61P17/06 A61P37/08 A61P11/06 A61P27/16 A61P17/04 A61P11/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/00 A61P21/02 A61P25/00 A61P27/16 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/2818 C12N2799/026		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/21 C12N1/19 C12N5/00.B C12P21/02.C C07K19/00 C07K16/18 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K39/385 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P19/08 A61P21/00 A61P21/02 A61P29/00 A61P9/00 A61P7/06 A61P7/04 A61P5/14 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/00 A61P37/02 A61P1/16 A61P35/00 A61P1/00 A61P17/06 A61P37/08 A61P11/06 A61P27/16 A61P17/04 A61P11/00 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA08 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA342 4C084/ZA362 4C084/ZA512 4C084/ZA532 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA612 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB222 4C084/ZB262 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA37 4C085/BA07 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
其他公开文献	JP2008519599A5		

	JP4901747B2
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本申请提供了与PRO87299（BTLA）有关的核酸和多肽序列。 此外，提供了包括此类核酸序列的载体，以及包括此类载体的宿主细胞。 提供了一种生产PRO87299多肽的方法。 该方法包括在适合于表达PRO87299多肽的条件下培养宿主细胞，并从细胞培养物中回收PRO87299多肽。

発現したタンパク質	リガンド	Kd (nM)
HVEM	I-125-PRO87299-Fc	25
HVEM	I-125-LIGHT-FLAG	2.5
PRO87299	I-125-HVEM-Fc	5.5
LIGHT	I-125-HVEM-Fc	7
PRO87299/LIGHT	I-125-HVEM-Fc	0.5