

(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2007-537691**(P2007-537691A)**

(43) 公表日 平成19年12月27日(2007.12.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C O 8 4
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-509965 (P2006-509965)	(71) 出願人	596168317
(86) (22) 出願日	平成16年4月8日 (2004.4.8)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年1月4日 (2006.1.4)		GENENTECH, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/011338		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(87) 国際公開番号	W02004/096848		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開日	平成16年11月11日 (2004.11.11)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	60/466,612	(74) 代理人	100109726
(32) 優先日	平成15年4月29日 (2003.4.29)		弁理士 園田 吉隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101199
			弁理士 小林 義敦
		(72) 発明者	ボールドウィン, ダリル
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 947
			08, パークリー, ユークリッド ア
			ベニュー 1595
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 免疫不全の治療のための新規組成物と方法

(57) 【要約】

本発明は、抗原刺激に応答し、サイトカインを放出した主に T h 1 又は T h 2 細胞によって媒介されるものを含む、免疫関連疾患の治療及び診断のための方法及び組成物に関する。本発明は、更に、遺伝子 P R O 9 2 7 2 6、及びそのアゴニスト又はアンタゴニストの相対的発現レベルに基づく、T h 1 サブタイプ又は T h 2 サブタイプにおける T 細胞の分化を偏らせる方法に関する。本発明は、更に、T h 1 及び T h 2 媒介疾患を診断する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図 2（配列番号 2）に示す P R O 9 2 6 2 7 をコードするヌクレオチド配列に対して、少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 2】

図 1（配列番号 1）に示すヌクレオチド配列 D N A 3 4 2 1 8 8 に対して、少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 3】

図 1（配列番号 1）に示すヌクレオチド配列 D N A 3 4 2 1 8 8 の完全長コード化配列 10 に対して、少なくとも 8 0 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項 5】

ベクターで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結合している請求項 4 に記載のベクター。

【請求項 6】

請求項 4 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 7】

前記細胞が C H O 細胞、大腸菌、又は酵母細胞である、請求項 6 に記載の宿主細胞。 20

【請求項 8】

前記 P R O 9 2 6 2 7 ポリペプチドの発現に適した条件下で請求項 7 に記載の宿主細胞を培養し、細胞培養物から前記 P R O 9 2 6 2 7 ポリペプチドを回収することを含んでなる P R O 9 2 6 2 7 ポリペプチド製造方法。

【請求項 9】

図 2（配列番号 2）に示す P R O 9 2 6 2 7 ポリペプチドのアミノ酸配列に対して、少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを含む単離されたポリペプチド。

【請求項 10】

異種アミノ酸配列と融合した請求項 9 に記載のポリペプチドを含んでなるキメラ分子。 30

【請求項 11】

前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列又はイムノグロブリンの F c 領域である、請求項 10 に記載のキメラ分子。

【請求項 12】

請求項 9 に記載の P R O 9 2 6 2 7 ポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項 13】

前記抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 14】

T 細胞を有効量の P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチド又は P R O 0 9 2 7 2 6 アゴニストに接触させることを含む、T h 1 サブタイプではなく T h 2 サブタイプへの T 細胞の分化を促進、刺激又は増強する方法。 40

【請求項 15】

促進、刺激又は増強を哺乳動物で行い、有効量を治療的有效量とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

有効量の P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチド又はそのアゴニストを投与することを含む、T h 2 細胞障害の緩和方法。

【請求項 17】

Th 2 細胞障害が、アレルギー性脳脊髄炎、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、自己免疫性ぶどう膜網膜炎、炎症性腸疾患及び自己免疫性甲状腺疾患からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

アゴニストが小分子である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

アゴニストがモノクローナル抗体である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

抗体が非ヒト相補性決定領域 (CDR) 残基及びヒトフレームワーク領域 (FR) 残基である、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 21】

アゴニストが抗体断片又は一本鎖抗体である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

有効量の PRO92726 ポリペプチドアンタゴニストを投与することを含む、T 細胞の Th 2 サブタイプへの分化を防止、阻害又は減弱する方法。

【請求項 23】

防止、阻害又は減弱を哺乳動物で行い、有効量を治療的有效量とする、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

哺乳動物に治療的有效量の PRO92726 ポリペプチド又はアゴニストを投与することを含む、哺乳動物の Th 2 媒介性疾患治療法。

20

【請求項 25】

Th 2 媒介性疾患が、感染症及びアレルギー性障害からなる群から選択される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

感染症が、リーシュマニア、ライ菌、カンジダ白色体、トキソプラズマ原虫、呼吸器合胞体ウイルス及びヒト免疫不全ウイルスからなる群から選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

アレルギー性障害が、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎及び春季カタルからなる群から選択される、請求項 25 に記載の方法。

30

【請求項 28】

アゴニストが小分子である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 29】

アゴニストがモノクローナル抗体である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 30】

抗体が非ヒト相補性決定領域 (CDR) 残基及びヒトフレームワーク領域 (FR) 残基を有する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

アゴニストが抗体断片又は一本鎖抗体である、請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 32】

細胞を抗-PRO92726 抗体に接触させ、細胞に対する抗体の結合を測定することを含み、細胞に対する抗体の結合により PRO92726 ポリペプチドの存在が示される、細胞中の PRO92726 ポリペプチドの存在の決定方法。

【請求項 33】

哺乳動物における Th 1 媒介性又は Th 2 媒介性疾患の診断方法であって、(a) 哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料、及び (b) 同じ細胞種類の既知の正常組織細胞のコントロール試料において、PRO92726 ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含み、コントロール試料と比較して試験試料で発現レベルが低い場合に Th 2 媒介性障害の存在が示され、並びにコントロール試料と比較して試験試料で発

50

現レベルが高い場合に T h 1 媒介性疾患の存在が示される方法。

【請求項 3 4】

候補化合物と P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドとが相互作用するのに十分な条件及び時間のもとで、候補化合物と該ポリペプチドを接触させることを含む、P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチド発現の阻害能を有する化合物を同定する方法。

【請求項 3 5】

候補化合物を固体支持体上に固定化する、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

候補化合物に検出可能な標識を付す、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

候補化合物と P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドとが相互作用するのに十分な条件及び時間のもとで、候補化合物と該ポリペプチドを接触させることを含む、P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドの生物学的活性の抑制能を有する化合物を同定する方法。

【請求項 3 8】

候補化合物を固体支持体上に固定化する、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

候補化合物に検出可能な標識を付す、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

治療の必要を有する哺乳動物の B 細胞関連疾患の緩和方法であって、前記哺乳動物に対し、治療的有効量の (a) 請求項 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結合する抗体を投与することを含む方法。

【請求項 4 1】

B 細胞関連疾患が、全身性エリトマトーデス、X 染色体連鎖の乳児性低ガンマグロブリン症、多糖体抗原無応答性、選択性 I g A 欠乏、選択性 I g M 欠乏、I g G サブクラスの選択性欠乏、高 I g M を伴う免疫不全、一過性乳児期低ガンマグロブリン症、バーキットリンパ腫、中間リンパ腫、濾胞性リンパ腫、2 型過敏症、リウマチ様関節炎、自己免疫性溶血性貧血、重症筋無力症、低副腎皮質、糸球体腎炎、拡散性大細胞型リンパ腫、及び強直性脊椎炎である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

試料中の P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドの存在を決定する方法であって、該ポリペプチドを含むと思われる試料を、抗-P R O 9 2 7 2 6 抗体に曝露し、前記試料の成分に対する前記抗体の結合を決定することを含む方法。

【請求項 4 3】

哺乳動物の B 細胞関連疾患を診断する方法であって、(a) 哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料中、及び (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中における、P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含み、コントロール試料と比較して試験試料中における前記遺伝子の発現レベルが高いか又は低いことにより、試験組織細胞が採取された哺乳動物における B 細胞関連疾患の存在が示される方法。

【請求項 4 4】

哺乳動物の B 細胞関連疾患を診断する方法であって、(a) 前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料と、抗-P R O 9 2 7 2 6 抗体とを接触させ、(b) 抗体と試験試料中のポリペプチドの間の複合体形成を検出することを含んでなり、前記複合体形成により、試験組織細胞が採取され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 4 5】

治療の必要を有する哺乳動物の濾胞性リンパ腫の緩和方法であって、前記哺乳動物に対し、治療的有効量の (a) 請求項 9 に記載のポリペプチド、(b) 前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は (c) 前記ポリペプチドに結合する抗体を投与することを含む方法。

【請求項 4 6】

10

20

30

40

50

治療の必要を有する哺乳動物の拡散性大細胞型リンパ腫の緩和方法であって、前記哺乳動物に対し、治療的有效量の（a）請求項9に記載のポリペプチド、（b）前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は（c）前記ポリペプチドに結合する抗体を投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

発明の分野

本発明は、一般的に、新規なDNAの同定及び単離、新規なポリペプチドの組換え生産、並びに免疫関連疾患の診断及び治療に関する組成物及び方法、特にT細胞分化及びサイトカイン放出の特徴をTh1サブタイプ及びTh2サブタイプへ調節する方法、並びにサイトカインの放出によって示される疾患の宿主に関する。

【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先天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。

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と結合する抗原を認識する。抗原は抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片等の表面上の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】

体液性及び細胞性免疫応答の双方における中心的現象は、ヘルパーT細胞の活性化とクローン性増殖である。ヘルパーT細胞活性化は、抗原表示細胞の表面におけるT細胞レセプター（TCR）-CD3複合体と抗原-MHCの相互作用によってはじまる。該相互作用は、休止ヘルパーT細胞が細胞周期（G0からG1への移行）へ入ること、並びにIL-2及び時にはIL-4のための高親和性レセプターの発現が生じることを含む、生化学現象のカスケードを媒介する。活性化T細胞は、記憶細胞（免疫記憶細胞、メモリー細胞）又はエフェクター細胞へ増殖及び分化する周期を通して発達する。

哺乳動物の免疫系は、呼応して細菌、ウイルス、毒素及び非宿主基質の侵入から宿主細胞を防御することにおいて機能する多数の特異的な細胞から成る。該免疫系の特異性を主に担う細胞型はリンパ球と呼ばれており、B及びT細胞の二つの型がある。T細胞は胸腺で発達することから命名され、B細胞は骨髄で発達する。T細胞には幾つかのサブセット、例えばサブプレッサーT細胞、細胞障害性T細胞及びTヘルパー細胞がある。Tヘルパー細胞のサブセットは、免疫の二つの経路を明示する：Th1及びTh2である。CD4+細胞の機能的サブセットであるTh1細胞は、その細胞性免疫を高める能力によって特徴付けられる。Th1細胞は、サイトカインIL-2及びインターフェロン- γ を生産し、IL-10、IL-4、IL-5及びIL-6を有しないことによって同定される。

10

20

30

40

50

また、T h 2 細胞はC D 4 +細胞ではあるが、T h 1 細胞とは異なる。T h 2 細胞は、抗体生産を担い、サイトカインI l - 4、I l - 5、I l - 1 0 及びI l - 1 3 を生産する。これらのサイトカインは、T h 1 及びT h 2 の応答を互いに阻害的にすることに重要な役割を担う。T h 1 細胞によって生産されるインターフェロン- γ はT h 2 細胞の増殖を阻害する(図3)。

【0004】

T h - 1 及びT h - 2 細胞のサブタイプは、T h - 0 細胞と名付けられた共通の前駆体由来すると考えられている。T h - 1 及びT h - 2 サブタイプの完全に相互排除的なサイトカインの生産とは対照的に、T h - 0 細胞は殆ど又はすべてのこれらサイトカインを生産する。T h - 1 及びT h - 2 サブタイプの異なるサイトカインの放出に関する性質は、エフ
10
ェクターメカニズム及び細胞障害性細胞の選択において能動的な役割を担う。T h - 2 細胞によって分泌されるI l - 4、I l - 5、I l - 6 及びI l - 1 0 が、I g Eを含む抗体の生産を促進し細胞障害性細胞の機能を低下させるのみならず、好酸球及びマスト細胞の生産を増加させる一方で、T h - 1 細胞によって分泌されるI l - 2 及び γ -インターフェロンは、マクロファージ及び細胞障害性細胞を活性化する傾向にある。一度確立されると、T h - 1 又はT h - 2 応答パターンは、他のサブセットの生産を阻害するサイトカインの生産によって維持される。T h - 2 細胞によって生産されるI l - 1 0 がI l - 2 及び γ -インターフェロンのようなT h - 1 サイトカインの生産を阻害する一方で、T h - 1 細胞によって生産される γ -インターフェロンは、I l - 4 及びI l - 1 0 のようなT h - 2 サイトカインの生産を阻害する。
20

T h 1 及びT h 2 サブセットによって生産されるサイトカイン間の微妙なバランスの混乱は、宿主の疾患を引き起こす。例えば、T h 1 サイトカインの過剰生産は、自己免疫炎症性疾患、多発性硬化症及び炎症性腸疾患(例えば、クローン病、限局性腸炎、遠位回腸炎、肉芽腫性腸炎、限局性回腸炎、終末回腸炎)を引き起こす。同様に、T h 2 サイトカインの過剰生産は、アナフィラキシー性過敏症、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、春季カタル、湿疹、じんま疹及び食物アレルギーを含むアレルギー性疾患を引き起こす。Umetsuら., Soc. Exp. Biol. Med. 215:11-20(1997).

上述したように、T h 1 - T h 2 応答研究が進歩しているとはいえ、哺乳動物のT h 1 - T h 2 細胞媒介疾患を検知しこれらの疾患を効果的に軽減する能力を有する更なる診断及び治療薬に対する需要は大きい。従って、本発明の目的は、T h 1 - T h 2 応答に重要
30
なポリペプチドを同定することと、このようなポリペプチドとそのコード化核酸を使用すること、哺乳動物の免疫媒介疾患の診断的検出及び治療的処置に有用な組成物を製造することである。

【0005】

発明の概要

本発明は、ヒトを含む哺乳動物における免疫関連疾患、特にT h 1 サブタイプ又はT h 2 サブタイプへのT細胞分化経路における偏向に起因する生理現象(例えば、サイトカイン放出の特徴)及び疾患の診断及び治療方法に関する。本発明は、哺乳動物においてT h 2 サブタイプへのT細胞の分化を偏向させるP R O 9 2 7 2 6 をコードする遺伝子とアミノ酸配列の同定に基づいている。T h 1 又はT h 2 サブタイプへのT細胞の分化を抑制す
40
るか又は高めることによって、特定の免疫関連疾患を治療することができる。

更に、本発明は、P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチド又はP R O 9 2 7 2 6 アゴニストの有効量を投与することを含む、T h 1 サブタイプに代わってT h 2 サブタイプへのT細胞の分化を促進、刺激又は増強する方法に関する。場合によって、この方法は哺乳動物で行なわれ、有効量とは治療的有效量である。場合によって、P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドによって誘導されたT h 2 サブタイプ細胞へのT細胞の分化は、更に抗原刺激によってT h 2 サイトカイン放出を引き起こす(例えばI l - 4、I l - 5、I l - 1 0 及びI l - 1 3)。T h 1 サイトカインの過剰生産によって特徴付けられ、分化のT h 2 サブタイプによる刺激が有する平衡化効果、並びに生成サイトカインの放出特性に対して応答性の疾患は、自己免疫性炎症疾患(例えば、アレルギー性脳脊髄炎、多発性硬化症、インシュリン依存
50

性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎）、自己免疫性甲状腺疾患）及び同種移植の拒絶反応を含む。

【0006】

更に、本発明は、PRO92726ポリペプチド又はアゴニストの有効量を投与することを含む、Th2サブタイプへのT細胞の分化を妨げる、阻害する又は弱める方法に関する（すなわち、Th1サブタイプへの分化を起こす）。場合によって、該方法は哺乳動物で行なわれ、有効量とは治療的有效量である。場合によって、PRO92726ポリペプチド又はアゴニストによって誘導された分化は、抗原刺激によってTh1サイトカイン放出特性を引き起こす（例えば、 γ -インターフェロン）。Th2サイトカインの過剰生産（又はTh1サイトカインの不十分な生産）によって特徴付けられ、分化Th2サイトカイン過剰生産のTh1サブタイプによる刺激が持つ平衡化効果に対して応答性の疾患は、感染症（例えば、リーシュマニア、ライ菌、カンジダ白色体、トキソプラズマ原虫、呼吸器合胞体ウイルス及びヒト免疫不全ウイルス）及びアレルギー性疾患（喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、春季カタル）の治療において有効であることが期待される。

10

一実施形態では、本発明は、PRO92726ポリペプチドに結合する単離された抗体に関する（例えば、抗-PRO92726）。一態様では、該抗体はPRO92726ポリペプチドの活性を模倣するか（アゴニスト抗体）、又は逆に該抗体はPRO92726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）。別の態様では、該抗体はモノクローナル抗体であり、好ましくは非ヒト相補性決定領域（CDR）残基及びヒトフレームワーク領域（FR）残基を有する。該抗体を標識化し、個体支持体へ固定化することが可能である。更なる態様では、該抗体は抗体断片、一本鎖抗体、又は抗イディオタイプ抗体である。

20

【0007】

別の実施形態では、本発明は、上記に記載の用途を有する組成物又は薬剤を調製するための本発明のポリペプチド及び抗体の使用法に関する。

更なる実施形態では、本発明は、抗-PRO92726抗体をコードする核酸、及びそのような核酸を含んでなるベクターと組み換え宿主細胞に関する。更なる実施形態では、本発明は、該抗体が発現する条件下において、該抗体をコードする核酸で形質転換された宿主細胞を培養すること、及び細胞培地から該抗体を回収することによって該抗体を生産する方法に関する。

30

更に、本発明は、PRO92726ポリペプチドの一つ又は複数の機能又は活性を阻害するPRO92726ポリペプチドのアンタゴニストに関する。あるいは、本発明は、PRO92726ポリペプチドの一つ又は複数の機能又は活性を刺激するか又は高めるPRO92726アゴニストに関する。好ましくは、該アンタゴニスト及び／又はアゴニストは、PRO92726変異体、ペプチド断片、小分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド（DNA又はRNA）、又は抗体である（上述のモノクローナル、ヒト化、特異的、一本鎖、ヘテロ抱合又はそれらの断片）。

【0008】

更なる実施形態では、本発明は、PRO92726ポリペプチドをコードする核酸分子とハイブリダイゼーションする単離された核酸、又はその補体に関する。該核酸は、好ましくはDNAであり、ハイブリダイゼーションは好ましくはストリンジェントな条件下で起こる。このような核酸分子は、ここで同定された増幅遺伝子のアンチセンス分子として作用し、それぞれの増幅遺伝子の調節において、又は増幅反応におけるアンチセンスプライマーとして、使用法を見出すことができる。更には、このような配列は、リボザイム及び／又は三重らせん配列の一部として使用可能であり、さらには増幅遺伝子の制御に利用できる可能性がある。

40

別の実施形態では、本発明は、PRO92726ポリペプチドを含有すると思われる細胞へ抗-PRO92726抗体を曝露し、該細胞への抗体の結合を決定することを含む、PRO92726ポリペプチドの存在を決定する方法に関する。

50

【0009】

更に別の実施形態では、本発明は、(a) 哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、及び(b) 同じ細胞型の既知の正常組織細胞であるコントロール試料におけるPRO92726ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含む、哺乳動物におけるTh-1媒介又はTh-2媒介疾患の診断方法に関し、本方法では、コントロール試料と比較して試験試料における発現レベルが低い場合に、試験組織細胞が得られた哺乳動物においてTh-2媒介疾患の存在が示される。

別の実施形態では、本発明は、(a) 抗-PRO92726抗体を哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料と接触させること、及び(b) 該試験試料における、該抗体とPRO92726ポリペプチドとの複合体の形成を検出することを含む、哺乳動物における免疫疾患の診断方法に関する。該検出法は、定性的でも定量的でもよく、同じ細胞型の既知の正常組織細胞であるコントロール試料における該複合体の形成をモニターすることと比較して行うことができる。複合体の量が小さいことは、試験組織細胞が得られた哺乳動物のTh-2媒介疾患を示す。該抗体は、好ましくは検出可能な標識を有する。複合体の形成は、光学顕微鏡、フローサイトメトリ、蛍光定量法又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可能である。該試験試料は、通常は、免疫系の異常又は欠損を有すると思われる個体より得られる。

【0010】

別の実施形態では、本発明は、適切なパッケージ中に抗-PRO92726抗体及び担体(例えばバッファ)を含む、診断キットに関する。該キットは、好ましくは、PRO92726ポリペプチドの検出に抗体を利用するための指示書を含む。

更なる実施形態では、本発明は、

容器；

容器上のラベル；及び

容器内に収容される活性剤を含んでなる組成物

を含んでなる製造品に関し、該組成物は哺乳動物の免疫応答を刺激又は阻害するのに有効であり、該容器上のラベルは、該組成物が免疫関連疾患の治療に利用可能であることを示し、該組成物中の該活性剤は、PRO92726ポリペプチドの発現及び／又は活性を刺激又は阻害する薬剤である。好ましい態様では、該活性剤はPRO92726ポリペプチド又は抗-PRO92726抗体である。

更なる実施形態は、候補化合物とPRO92726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の下で、これら二つの化合物を接触させることによって、PRO92726ポリペプチドの発現及び／又は生物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。特別な態様では、該候補化合物又は該PRO92726ポリペプチドを固体支持体に固定化する。別の態様では、非固定化成分は検出可能な標識を有する。

【0011】

好ましい実施形態の詳細な説明

I. 定義

「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寛解効果を有するような疾患をも含む。この用語には、免疫媒介炎症誘発性疾患、非免疫媒介炎症誘発性疾患、感染性疾患、免疫不全性疾患、腫瘍形成等が含まれる。

「Th1媒介疾患」という用語は、T細胞のTh1サブタイプへの分化における過剰生産又は偏りに起因するものを含む、Th1サイトカインの過剰生産によって特徴付けられる疾患を意味する。このような疾患には、例えば、自己免疫性炎症疾患(例えば、アレルギー性筋痛性脳脊髄炎、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、自己免疫性ぶどう膜炎、甲状腺中毒症、強皮症、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、炎症性腸疾患(例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、限局性腸炎、末梢回腸炎、肉芽腫性腸炎、限局性回腸炎、終末回腸炎)、自己免疫性甲状腺疾患、悪性貧血)及び同種移植の拒絶反応が含

まれる。

「T h 2 媒介疾患」という用語は、T 細胞の T h 2 サブタイプへの分化における過剰生産又は偏りに起因するものを含む、T h 2 サイトカインの過剰生産によって特徴付けられる疾患を意味する。このような疾患には、例えば、感染症疾患による感染の悪化（例えば、リーシュマニア、ライ菌、カンジダ白色体、トキソプラズマ原虫、呼吸器合胞体ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス等）及びアレルギー性疾患、例えばアナフィラキシー性過敏症、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、春季カタル、湿疹、蕁麻疹及び食物アレルギー等を含む。

【0012】

本発明により治療可能で、そのいくつかはT細胞のT h 1 及びT h 2 サブタイプへの分化の影響（例えばサイトカイン放出特性）により媒介される、他の免疫疾患、免疫関連疾患及び炎症疾患の例には、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）、特発性炎症ミオパシー（皮膚筋炎、多発性筋炎）、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿）、自己免疫性血小板減少（特発性血小板減少性紫斑病、免疫仲介血小板減少）、甲状腺炎（グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、自己免疫炎症性疾患（例えば、アレルギー性筋痛性脳脊髄炎、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、自己免疫性ぶどう膜炎、甲状腺中毒症、強皮症、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、限局性腸炎、末梢回腸炎、肉芽腫性腸炎、限局性回腸炎、終末回腸炎）、自己免疫性甲状腺疾患、悪性貧血）及び同種移植の拒絶反応、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）、中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン-バレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、例えば感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎及び他の非肝親和性(nonhepatotropic)ウイルス）、自己免疫慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎；クローン病）、グルテン過敏性腸疾患、及びウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、アレルギー性疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば好球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患が含まれる。ウイルス性疾患、例えばAIDS（HIV感染）、A型、B型、C型、D型及びE型肝炎、ヘルペス等、細菌感染、真菌感染、原生動物感染、寄生虫感染等の感染症、並びに呼吸器合胞性ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス等、及びアレルギー疾患、例えばアナフィラキシー性過敏症、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、春季カタル、湿疹、じんま疹及び食物アレルギー等も含まれる。

「治療」とは、疾患の病理の進展阻止又は変更を行なう本発明により実施される介入である。従って、「治療」は治療的処置及び予防的又は保護的手段の両方を指し、標的である病理学的状態又は疾患を予防するか、又は進行を遅らせる（緩和）ことが目的である。治療が必要なものは、既に疾患に罹患しているもの並びに疾患が防止されるべきものを含む。免疫関連疾患（例えば、T h 1 媒介及びT h 2 媒介疾患）の治療において、治療薬は直接的に疾患の病理成分の応答の大きさを低下又は増加させることができるか、或いは他の治療剤、例えば抗生物質、抗真菌剤、抗炎症剤、化学療法剤等による治療に対する疾患の感受性を高めることができる。

【0013】

「有効量」とは、T h 1 サブタイプ又はT h 2 サブタイプへのT細胞の分化、及び／又はこれらT細胞サブタイプが分泌するサイトカイン放出特性における検出可能な偏りを起こす、誘導する又は招くPRO92726ポリペプチド、そのアゴニスト及び／又はアンタゴニストの最小濃度である。更に、「治療的有效量」とは、T h 1 媒介又はT h 2 媒介疾患を治療するのに有効なPRO92726ポリペプチド、そのアゴニスト及び／又はそのアンタゴニストの最小濃度（量）である。

「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。

免疫関連疾患の「病理」は、患者の良好な健康を含む全ての現象を含む。これには、限定されるものではないが、異常又は制御不能な細胞成長、抗体生産、自己抗体生産、補体の生産と活性化、正常に機能している隣接細胞への干渉、サイトカイン又は他の分泌物の異常なレベルでの放出、あらゆる炎症性又は免疫性応答の抑制又は悪化、炎症性細胞の組織空間への浸潤（好中球、好酸球、単球性、リンパ性）等が含まれる。

【0014】

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、ウマ、ネコ、ウシ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。

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、TWEENTM、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICSTMを含む。

【0015】

ここで用いられる「細胞毒性薬」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、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰及びRe¹⁸⁶）、化学治療薬、及び細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素又はその断片を意味する。

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、特にここで同定された任意の遺伝子を過剰発現する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期におけるそのような遺伝子の過剰発現細胞のパーセンテージを有意に低減させるものである。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）、タキソール、及びトポIIインヒビター、例えばドキシソルビン、エピルビン、ダウノルビン、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、メトトレキサート、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、癌の分子的基础（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。

【0016】

「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、リンフォカイン、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

10

20

30

40

50

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 ；ミューラー阻害物質；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 あるいは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 、 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等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ある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。

【0017】

ここで使用される際の「PRO92726ポリペプチド」、「PRO92726タンパク質」及び「PRO92726」という用語は、天然配列PRO92726ポリペプチド及びPRO92726ポリペプチド変異体を含む。PRO92726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。

「天然配列PRO92726ポリペプチド」は、天然由来のPRO92726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PRO92726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PRO92726ポリペプチド」という用語には、特に、PRO92726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）、自然に生じる切断形態（例えば、選択的にスプライシングされた形態）及び自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の一実施形態において、天然配列ヒトPRO92726ポリペプチドは、図2に示すアミノ酸1～355（配列番号2）を含む成熟又は完全長天然配列PRO92726ポリペプチドである。

【0018】

「PRO92726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PROポリペプチドと、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する活性PROポリペプチドを意味する。このようなPROポリペプチド変異体には、例えば、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PROポリペプチドが含まれる。通常、PROポリペプチド変異体は、ここに開示される完全長天然アミノ酸配列、又はここに開示された完全長PRO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、PRO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。

【0019】

ここに定義されるPRO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看不ないとした、PRO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テック社によって作成され、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。

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、「PRO」が対象となる仮説的PROポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」が対象となる「PRO」ポリペプチドが比較されているアミノ酸配列を表し、そして「X」、「Y」及び「Z」の各々が異なった仮説的アミノ酸残基を表し、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。

【0020】

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（表1）。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ＰＲＯポリペプチドから誘導された配列を有する対象とするＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドが比較されるＰＲＯポリペプチド変異体であってもよい配列）との間の、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ＰＲＯ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ＰＲＯポリペプチドのアミノ酸配列である。 10

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。 20

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。 30

【００２１】

「ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチド」又は「ＰＲＯ変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、以下に定義する活性ＰＲＯ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ＰＲＯ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く完全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを持つ又は持たないＰＲＯ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ＰＲＯ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％の核酸配列同一性を有するものを意味する。一般的に、ＰＲＯ変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する完全長天然配列ＰＲＯポリペプチド配列、又はここに開示する完全長ＰＲＯ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％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 40 50

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。

【0022】

通常は、PRO 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。 10

ここで同定される PRO コード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、PRO 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ムの 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成され、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 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。 20

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： 30

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、「PRO-DNA」が対象となる仮説的 PRO コード化核酸配列を表し、「比較 DNA」が対象となる「PRO-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」の各々が異なった仮説的アミノ酸残基を表し、表 4 及び 5 が「比較 DNA」と称される核酸配列の「PRO-DNA」と称される核酸配列に対する %核酸配列同一性の計算方法を示す。 40

【0023】

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 = B 50

LOSUM 62。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 PRO ポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とする PRO 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 PRO ポリペプチドコード化核酸分子が比較される PRO ポリペプチド変異体であってもよい配列）との間の、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 PRO 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 PRO ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

10

また、% 核酸配列同一性は、配列比較プログラム NCBI-BLAST 2 (Altschul 等, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)) を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST 2 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-BLAST 2 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 = LOSUM 62 を含む。

20

【0024】

核酸配列比較に NCBI-BLAST 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-BLAST 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 の長さが核酸配列 D の長さとは異なる場合、C の D に対する % 核酸配列同一性は、D の C に対する % 核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

他の実施形態では、PRO 変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性 PRO ポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリ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 PRO ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションする核酸分子である。PRO 変異体ポリペプチドは、PRO 変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

30

【0025】

本発明のポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子は、ポリペプチドコード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも 1 つの汚染核酸分子から同定されて、分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在するポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかしながら、本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異な

40

った染色体位置にある、本発明のポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるポリペプチドコード化核酸分子を含む。

PRO 92726 ポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子は、PRO 92726 ポリペプチドコード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも 1 つの汚染核酸分子から同定されて、分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸分子は、自然に結合する全ての成分と結合していない。単離された PRO 92726 ポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する PRO 92726 ポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかしながら、PRO 92726 ポリペプチドをコードする単

50

離された核酸分子は、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、PRO92726を通常発現する細胞に含まれるPRO92726ポリペプチドコード化核酸分子を含む。

【0026】

「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。

10

20

【0027】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェント」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トにするが、低い温度はストリンジェントを低下させる。更に、ストリンジェント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ト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。

30

ここで定義される「ストリンジェント条件」又は「高度のストリンジェント条件」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、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMのクエン酸ナトリウムを用いるもの；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ト洗浄を用いるものによって同定できる。

40

【0028】

「中程度のストリンジェント条件」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トが低い洗浄液及びハイブリダイゼーション条件 (例え

50

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ト条件は、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な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。

「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」に融合した本発明によるポリペプチド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を提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~約50のアミノ酸残基(好ましくは約10~約20の残基)を有する。

10

【0029】

本発明のポリペプチドの変異体に関し、「活性な」又は「活性」という表現は、天然又は天然発生PRO92726ポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性を保持する本発明のタンパク質の形態を意味し、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生PRO92726によって生ずる(阻害性又は刺激性の)生物学的機能であって、本発明の天然又は天然発生ポリペプチドが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力以外のものを意味する。同様に、「免疫学的」活性とは、本発明の天然又は天然発生ポリペプチドが有する抗原性エピトープに対する抗体の生成における抗原としての能力を意味する。

20

抗体、又はここに開示するスクリーニングアッセイで同定できる他の分子(例えば、有機又は無機小分子、ペプチドなど)に関し、「生物学的活性」という表現は、このような分子の炎症細胞の組織への浸潤を誘導又は阻害する能力、T細胞の増殖又は活性を刺激又は阻害する能力、並びに細胞によるサイトカイン放出を刺激又は阻害する能力を意味する。その他の好ましい活性は、増大した血管透過性又はその阻害である。最も好ましい活性は、Th1/Th2応答の調節である(例えば、Th1応答の低下及び／又はTh2応答の上昇、Th2応答の低下及び／又はTh1応答の上昇)。

「調節」又は「調節する」という用語は、Th1及びTh2サブセットへのT細胞の分化(例えば、サイトカイン放出特性)によって影響を受ける生理状態のアップレギュレーション、ダウンレギュレーション又は改変を意味する。この用語が意図する範囲内の細胞プロセスには、限定されないが、特定遺伝子の転写;代謝、増殖、分化、接着、シグナル伝達、アポトーシス及び生存などの正常な細胞機能、並びに、形質転換、分化及び転移の阻止といった異常な細胞プロセスを含みうる。

30

【0030】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した本発明の天然配列PRO92726ポリペプチドの生物学的活性(例えば、Th1/Th2細胞性機能の下方制御)を部分的又は完全に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を指す。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した本発明の天然配列PRO92726ポリペプチドの生物学的活性を模倣、亢進又は刺激する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、本発明の天然ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子、などを含む。PRO92726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、PRO92726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、PRO92726ポリペプチドに通常は関連している一又は複数の生物学的活性(例えば、Th1/Th2細胞性機能又は効果の上方制御/下方制御)の変化を測定することを含んでもよい。

40

「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、一般に有機化合物である。

50

【0031】

「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PRO92726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PRO92726抗体組成物、一本鎖抗PRO92726抗体、及び抗PRO92726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。抗体は、抗体が接触し得る本発明のポリペプチドのあらゆるドメインに結合できる。

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重及び軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

【0032】

「可変」という用語は、可変ドメインの特定の部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されるという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。それは、軽鎖及び重鎖の可変ドメイン両方の「高頻度可変領域」又は「相補性決定領域(CDR)」と呼ばれる3又は4のセグメントに集中している。CDRを決定する少なくとも二つ(2)の技術がある：(1)異種間配列可変性に基づく方法（すなわち、Kabatら、Sequences of proteins of immunological (National Institute of Health, Bethesda, MD 1987)；及び(2)抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づく方法（Chothia, C.ら., Nature 342: 877(1989)）。しかしながら、この二つの技術によって異なる残基が描写される限り、ハイブリッドCDRを明らかにするためにこれらの技術を組み合わせることができる。

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、 $(Fab')_2$ 、及びFv断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体（Zapataら、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。

【0033】

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原結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位、及び残基「Fc」断片を持ち、この名称は容易に結晶化する能力を反映している。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。

【0034】

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

10

20

30

40

50

する。ここで、F a b' -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F a b'を表す。F (a b')₂抗体断片は、最初はF a b'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。

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：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g M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I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A及びI g A 2に分類される。 10

【0035】

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。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対応する。更に、異なる決定基(エピトープ)に対応する異なる抗体を典型的に含む通常の(ポリクローナル)抗体とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に向く。特異性に加えて、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養によって合成されることで、モノクローナル抗体は有利である。「モノクローナル」との形容は、実質的に均一な抗体集団から得られたという抗体の性質を示し、特定の方法で抗体を生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerらによって最初にNature 256:495 (1975)に記載されたハイブリドーマ法によって作ることができるか、あるいは組換えDNA法(例えば米国特許第4,816,567号を参照)によって作ることができる。「モノクローナル抗体」は例えば Clacksonら, Nature 352:624-628 (1991) 及び Marksら, J.Mol.Biol. 222: 581-597 (1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離してもよい。また、ファージミッド及びファージベクターの利用による抗体の調製が記載されている米国特許第5,750,373号、5,571,698号、5,403,484号及び5,223,409号を参照のこと。 20

ここで、モノクローナル抗体は特に「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を含み、それは、重鎖又は軽鎖の一部が特定の種から誘導されたか又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であると同時に、鎖の残りの部分は他の種から誘導されたか又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である抗体、並びにそれらが所望の生物学的活性を示す限りにおいてそれらの抗体の断片である（米国特許第4,816,567号；Morrisonら,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 [1984]）。 30

【0036】

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F v、F a b、F a b'、F (a b')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。大抵は、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）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのF vフレームワーク領域（FR）残基は、特にそれら特定のFR残基が三次元空間において結合部位及び／又は抗体の高次構造に影響を与えるとき、対応する非ヒト残基によって置換される。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。これらの変更は、抗体の性能を更に洗練させ、最大化するために行なわれる。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配列のもの 40 50

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。さらなる詳細については、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)を参照されたい。ヒト化抗体は、場合によっては、抗体の抗原結合領域が、マカクザルを対象の抗原で免疫化することにより生成された抗体に由来している「霊長類化」抗体でもよい。旧世界ザル由来の残基を含む抗体は、例えば米国特許第5,658,570号、同第5,693,780号、同第5,681,722号、同第5,750,105号及び同第5,756,096号に記載されている。

本発明における抗体及びその断片は、1以上のCDR領域及び／又はフレームワーク領域のアミノ酸配列を変えるように抗体を変更することにより、抗体又はその断片の、結合先である抗原に対する親和性を変更した「親和性成熟」抗体も含む。親和性の成熟は、抗原に対する成熟抗体の親和性を、開始抗体に対して増大又は低下させる。通常、開始抗体は、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体又はマウス抗体であり、親和性成熟抗体は開始抗体より大きな親和性を有する。成熟プロセスの間に、CDR中又はフレームワーク領域中の1又は複数のアミノ酸残基を、任意の標準法を用いて異なる残基に変化させる。適切な方法には、既知のカセット突然変異誘発(Wells等、Gene, 34:315)又はオリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発法(Zoller等、1987、Nucleic Acids Res., 10:6487-6505)を用いた点突然変異が含まれる。親和性成熟は、多くの突然変異を生成し、抗原又はリガンドに対する親和性の向上に基づいて所望の親和性を有する突然変異を突然変異のプール又はライブラリから選択する既知の選択方法を使用しても実行することが出来る。既知のファージディスプレイ技術をこの方法に常套的に使用することが出来る。例えば、米国特許第5,750,373号及び5,223,409号等を参照のこと。

【0037】

ヒト抗体も本発明の抗体の範囲に含まれる。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む、従来技術に既知の様々な技術によって生成可能である(Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等、J. Mol. Biol., 222:581 (1991))。Cole等及びBoerner等の技術もヒトモノクローナル抗体の調整に使用できる(Cole等、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985); Boerner等、J. Immunol., 147(1):86-95 (1991); U.S.5,750,373)。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が部分的に又は完全に不活性化されたマウスに導入することによって作成できる。施行後、ヒト抗体生産を観察したところ、遺伝子再編成、組立て及び抗体レパートリーを含む全ての面においてヒトに見られるものと酷似していた。この方法は、例えば、米国特許第5,545,807号、5,545,806号、5,569,825号、5,625,126号、5,633,425号、5,661,016号、及び以下の科学文献に記載されている: 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 and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)。

「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が抗原結合に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, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

【0038】

「ダイアボディ」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され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; W093/11161; 及び Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) に、さらに詳しく記載されている。

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に「特異的に結合する」抗体、又は「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。

【0039】

「単離された」とは、本発明の種々のポリペプチドに言及するときは、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、その抗体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を含み得る。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、(1) ローリー (Lawry) 法による測定で化合物の 95 重量% よりも大きな割合まで、最適には 99 重量% よりも大きな割合まで、(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十分な程度まで、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。単離された化合物、例えば抗体又はポリペプチドには、化合物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化合物が含まれる。しかしながら、通常は、単離された化合物は少なくとも一つの精製工程により調製される。

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、「標識した」化合物が生成されるように、化合物、例えば抗体又はポリペプチドに直接又は間接的に抱合させた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。

【0040】

「固相」とは、本発明の化合物が付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに意図する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス (例えば、孔制御ガラス)、多糖類 (例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンから形成されたものを含む。一部の実施形態では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ; その他では精製カラム (例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム) とすることもできる。また、この用語は、米国特許第 4,275,149 号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

「リボソーム」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細胞であり、哺乳動物への薬物 (本明細書に開示する抗- ErbB2 抗体及び、場合によっては化学療法剤) の輸送に有用である。リボソームの成分は、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。

【0041】

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質 (「アドヘシン」) の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを併せ持つ抗体様分子を指す。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。

「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

10

20

30

40

50

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、免疫媒介炎症誘発性疾患、非免疫媒介炎症誘発性疾患、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。

【0042】

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

ここで用いられる「炎症細胞」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。

【0043】

10

20

30

表1

```

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

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

```

10

20

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

10

20

30

表1(続き)

```

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

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

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

main(ac, av)
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 */
}

```

10

20

30

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()
{
    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;
        }
    }
}

```

nw

10

20

30

表1(続き)

...HW

```

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
     */

```

10

20

30

表1(続き)

...nw

```

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

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[1]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

10

20

30

print

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);

```

10

20

30

表1(続き)

```

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

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

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

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

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

```

...getmat

10

20

pr_align

30

表1(続き)

```

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

        more++;

        if (pp[i].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()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

10

20

30

dumpblock

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)
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 == '\n')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i % 10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0) ? -i : i;
                for (px = pn; j != 10, px--)
                    *px = j % 10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            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)
int      ix;
{
    putline

```

10

20

30

表1(続き)

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

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

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

```

...putline

10

stars

20

30

表1(続き)

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
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));
}

```

stripname

40

表1(続き)

```

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

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

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

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                     cleanup
{
    int      i;

    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

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

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

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

```

10

20

30

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--)
                ;

```

10

20

30

表1(続き)

...readjumps

```

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

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

```

10

20

30

表 1 (続き)

```

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

    char      *mktemp();

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

```

10

【 0 0 4 4 】

表 2

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

20

% アミノ酸配列=

(ALIGN-2 によって決定された、二つのポリペプチド配列の間で一致したアミノ酸残基の数) ÷ (PRO
ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

5 ÷ 15 = 33.3%

30

表 3

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

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定された、二つのポリペプチド配列の間で一致したアミノ酸残基の数) ÷ (PRO
ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

5 ÷ 10 = 50%

40

表 4

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

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって決定された、二つの核酸配列の間で一致したヌクレオチドの数) ÷ (PRO - DNA
核酸配列のヌクレオチドの総数) =

6 ÷ 14 = 42.9%

表 5

PRO - DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(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 によって決定された、二つの核酸配列の間で一致したヌクレオチドの数) ÷ (PRO - DNA
核酸配列のヌクレオチドの総数) =

4 ÷ 12 = 33.3%

【 0 0 4 5 】

I I . 本発明の組成物と方法

A . 完全長 P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチド

本発明は、その一部で、T細胞のTh1及びTh2サブタイプへの分化を調節し、それにより多数の疾患を治療することを含む、P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドを用いた免疫関連疾患の新規治療法を提供する。特に、P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドをコードするc D N Aが同定されて単離されており、Th1-媒介及びTh2-媒介疾患の治療におけるそれらの使用について以下に詳述する。定義の部分で述べたように、P R O 9 2 7 2 6 が天然配列分子と変異体の両方を定義していることに注意されたい。しかしながら、単純化のために、本明細書においては、P R O 9 2 7 2 6 の上記定義の部分に含まれるD N A 3 4 2 1 8 8 (P R O 9 2 7 2 6) によってコードされるタンパク質並びに変異体は、それらの起源又は調製形式に関わらず、「P R O 9 2 7 2 6」と呼ぶ。

【 0 0 4 6 】

B . P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチド変異体

ここに記載した完全長天然配列P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドに加えて、P R O 9 2 7 2 6 変異体も調製できると考えられる。P R O 9 2 7 2 6 変異体は、P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドD N Aに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、或いは所望のP R O 9 2 7 2 6 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P R O 9 2 7 2 6 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P R O 9 2 7 2 6又はここに記載したP R O 9 2 7 2 6 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

10

20

30

40

50

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 P R O 9 2 7 2 6 と比較して P R O 9 2 7 2 6 のアミノ酸配列が変化する P R O 9 2 7 2 6 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 P R O 9 2 7 2 6 の一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、P R O 9 2 7 2 6 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

10

【0047】

本発明のポリペプチドの P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチド断片も、本発明の範囲内に含まれる。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、P R O 9 2 7 2 6 ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

P R O 9 2 7 2 6 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 P R O 9 2 7 2 6 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、ポリペプチド断片は、図2（配列番号2）に示すP R O 9 2 7 2 6 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。

20

特別の実施形態では、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。

30

【0048】

表6

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

10

20

本発明の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。

30

【0049】

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[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)]等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができ、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施して変異体DNAを作成することもできる。

40

また、隣接配列に沿って一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

50

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。

【0050】

C. PRO92726の修飾

PRO92726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、PRO92726ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、PRO92726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PRO92726を水不溶性支持体マトリクス或いは抗PRO92726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、グルタミル及びアスパラギン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ン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0051】

本発明の範囲内に含まれる本発明の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、天然配列ポリペプチド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。

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ポリペプチド（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。アミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、本ポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

【0052】

本発明の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日に発行されたW087/05330、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

本発明の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。

共有結合的修飾の別の型は、本発明のポリペプチドの、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、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PRO92726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本発明の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。

【0053】

一実施形態では、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本発明のポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には本発明の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。このような本発明の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本発明の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。例としては、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イルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210(1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]；α-チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397(1990)]を含む。

それに替わる実施形態では、キメラ分子は本発明のポリペプチド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本発明の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。特に好ましい実施形態では、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。

【0054】

D. PRO92726の調製

以下の説明は、主として、PRO92726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PRO92726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PRO92726を調製することができると考えられる。例えば、PRO92726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, 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。PRO92726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PRO92726を生産してもよい。

【0055】

1. 本発明のポリペプチドをコードするDNAの単離

PRO92726をコードするDNAは、PRO92726 mRNAを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリか

ら得ることができる。従って、ヒト P R O 9 2 7 2 6 D N A 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 c D N A ライブラリから簡便に得ることができる。また P R O 9 2 7 2 6 -コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又はオリゴヌクレオチド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（本発明のポリペプチド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 c D N A 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。本発明の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 P C R 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)]。

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、c D N A に逆転写されていない m R N A 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張法を使用して選択された c D N A 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。

【0056】

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 P R O 9 2 7 2 6 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、p H 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。

形質移入の方法、例えば、C a C l₂、C a P O₄、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、原核生物又は実質的な細胞壁の障壁を有する他の細胞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 W O 89/05859 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、D N A を細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。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。

【0057】

ここに記載のベクターに D N A 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 K 1 2 株 M M 2 9 4 (A T C C 3 1, 4 4 6) ; 大腸菌 X 1 7 7 6 (A T C C 3 1, 5 3 7) ; 大腸菌

株W3110 (ATCC 27, 325) 及びK5772 (ATCC 53, 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* K12株MM294 (ATCC31,446) ; *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli*株W3110 (ATCC 27,325)及びK5 772 (ATCC 53,635)、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 41 P)、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 10
 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 prt3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 prt3 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 20
 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連鎖反応が好ましい。

【0058】

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、PRO92726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・プロンプ (*Schizosaccharomyces pombe*) (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 (*Kluyveromyces 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 30
)、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. wickerhamii*) (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. drosophilum*) (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W091/00357) ; 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 40
 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 50

のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylootrophs, 269 (1982)に記載されている。

グリコシル化PRO92726ポリペプチド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及びHigh Five等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）及びCOS細胞を含む。より詳細な例は、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 CCL 51）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。

【0059】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

PRO92726をコードする核酸（例えば、cDNA又はゲノムDNA）は、クローニング又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一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成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

PRO92726は直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列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PRO92726-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、ペニシリンナーゼ、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・アルビカンズ(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W090/13646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イ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。

【0060】

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、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2μプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点（SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV）は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキ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。

【0061】

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本発明のポリペプチドをコードする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株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である [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、PRO92726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PRO92726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。

【0062】

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-ホスホグリセレートキナーゼ [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(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオ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。

【0063】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの本発明のポリペプチドのPRO92726転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス(1989年7月5日公開のUK2, 211,504)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(SV40)のようなウイ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PRO92726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、真核細胞ウイ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）、サイトメガロウイ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イルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、本発明のポリペプチドのPRO92726コード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0064】

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、真核生物又はウイルスの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、PRO92726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PRO92726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。

【0065】

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る。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PRO92726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、又は本発明のポリペプチドをコードするPRO92726 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。

【0066】

5. ポリペプチドの精製

PRO92726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（登録商標）-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。PRO92726ポリペプチド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。

PRO92726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；及び本発明のポリペプチド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, Metho

des 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PRO92726の性質に依存する。

【0067】

6. 組織分布

本発明のポリペプチド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、本発明の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。

10

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、本発明の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、或いは本発明の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ルを提供する。

20

【0068】

E. PRO92726の用途

CD4+T細胞は、応答に関与するすべての他の細胞型の補強、成長及び分化を促進することによって、アレルギー性炎症応答において重要な役割を担う。インターロイキン (IL-4) 及びIL-3を含む、B細胞におけるIgE合成の誘導、マスト細胞の成長、及びリンパ球、マスト細胞、及び炎症部分への好塩基球の補強を促進する幾つかのサイトカインを分泌することによって、CD4+細胞はこの機能を果たす。更には、CD4+T細胞は、好酸球及びB細胞の成長と分化を促進するIL-5、並びにマスト細胞の成長と分化を促進し、 γ -インターフェロンの生産を阻害するIL-10を生産する。IL-4、IL-5、IL-10及びIL-13の組み合わせは、Th2細胞と呼ばれているCD4+T細胞のサブセットによって生産され、この細胞はアレルギー症の個体において多量に増加して見出される。

30

Th1細胞は、マクロファージの活性化 (IFN- γ 、IL-2、腫瘍壊死因子- α (TNF- α))、並びに細胞性免疫を誘導するのに重要なサイトカインを分泌する。Th2細胞は、体液性免疫及びアレルギー性疾患において重要なサイトカインを分泌する (IL-4、IL-5及びIL-10)。Th1サイトカインがTh2サイトカインの生産を阻害する一方で、Th2サイトカインはTh1サイトカインの生産を阻害する。このネガティブフィードバックループは、免疫応答の間に分極化したサイトカインの生産特性を際立たせる。Th1サイトカインの過剰生産が自己免疫疾患と同種移植の拒絶反応を引き起こすことと思われることから、これら「対立する」サイトカインの生産の間の微妙なバランスの維持は重要である。これと同時に、Th2サイトカインの過剰生産は、喘息及びアレルギー性鼻炎、又は細胞内病原体に対する効果の無い免疫などのアレルギー性炎症疾患を引き起こす。

40

Umetsu及びDeKruyff, Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 215(1): 11-20(1997)は、感染の感

50

受性は免疫の欠如ではなく、むしろ不適切なサイトカイン特性を分泌するT細胞の発生として説明できることを提案している。非アレルギー性の個体は、IgE合成及びマスト細胞及び好酸球分化を阻害するTh1サイトカインを分泌するT細胞を発生させるので、無症候のままであるが、アレルギー性疾患は、Th2サイトカインを不適切に分泌するCD4+T細胞によって起こる。別の言い方をすると、アレルギー性鼻炎及び喘息は、病理的異常又は経口/粘膜耐性を表すことができ、正常には「Th2」制御/抑制細胞へ発達するT細胞が、代わってアレルギー性炎症を開始そして強める「Th2」細胞へ発達する。

【0069】

F. 抗体結合の研究

本発明のPRO92726ポリペプチドの活性は、組織細胞に対するPRO92726ポリペプチドの効果を阻害する抗PRO92726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 Antibodies: 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。

【0070】

G. 細胞ベースアッセイ

細胞ベースアッセイ及び免疫関連疾患の動物モデルを、ここで同定された遺伝子とポリペプチド、並びに免疫関連疾患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、ここに記載されたcDNAを特定の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形質移入し、これらのcDNAの免疫機能を刺激又は阻害する能力を分析する。適当な細胞は所望の遺伝子で形質移入し、そして免疫機能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株化細胞は、例えばT細胞の増殖又は炎症細胞の浸潤を調節する免疫機能を阻害又は刺激するポリマー又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の能力を試験するのに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、安定な株化細胞が好ましいが、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株化細胞を誘導する技術は、この分野で良く知られている（Small等, Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985]参照）。

【0071】

そのような好適な細胞ベースアッセイの例は、正常ヒトドナーから天然CD4 T細胞を単離し、IL-12及び抗IL-4抗体を加えた抗CD3及びCD28にてT細胞を刺激することによってTh1細胞を生成することである。Th2細胞は、同様にIL-4、抗IL-12及び抗IFN- γ 抗体を加えてTCR刺激することによって生成した。未分化T細胞は、TCRを刺激し、IL-12、IL-4及びIFN- γ の抗体を中和することによって生成した。一次活性化の3日目のT細胞を新鮮培地5ボリュームにて広げた。ついで、完全に分化したTh1及びTh2細胞を抗CD3及び抗CD28により再刺激し、ELISAアッセイを用いてそのサイトカイン特性を調べた。

PRO92726核酸の他の有用な断片には、標的PRO92726 mRNA (センス) 又はPRO92726 DNA (アンチセンス) 配列と結合できる一本鎖核酸配列 (RNA 又はDNA) を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明によると、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、PRO92726 DNA のコード化領域の断片を含む。そのような断片は、一般的には少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14から30ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードするcDNA配列に基づいて、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、Stein及びCohen Cancer Res. 48:2659 (1988) 及び van der Krol等, BioTechniques 6:958, (1988) に記載されている。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらす、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の未熟終止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、PRO92726タンパク質の発現を阻止するのに用いられる。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖-ホスホジエステル骨格 (又は他の糖結合、国際公開91/06629に記載のもの等) を有するオリゴヌクレオチドを更に含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが (つまり、酵素分解に耐えうるが)、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

【0072】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、国際公開第90/10048号に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。更にまた、エリプチシン等の挿入剤及びアルキル化剤又は金属錯体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの結合特異性を改変し、標的ヌクレオチド配列に対するアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの結合特性を改変してもよい。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO₄-媒介DNAトランスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLV由来のもの、N2 (M-MuLV由来のレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター (国際公開第90/13641号参照) を含む。

【0073】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開第91/04753号に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチ

ド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開第90/10448号に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

【0074】

本発明のPRO92726ポリペプチドをアッセイに使用して、結合相互作用に関連する他のタンパク質又は分子を同定することができる。そのような方法では、レセプター／リガンドの結合相互作用の阻害を同定する。そのような結合相互作用に参与するタンパク質を使用して、結合相互作用のペプチド又は分子インヒビター又はアゴニストをスクリーニングすることもできる。スクリーニングアッセイを使用して、天然PRO92726の生物活性を模倣するリード化合物を見つけることができる。そのようなスクリーニングアッセイは、キメラライブラリのハイスループットスクリーニングに従うアッセイを含み、よって小分子薬剤候補物の同定に特に適している。ここで考慮する小分子には、合成有機又は無機化合物が含まれる。アッセイは、従来技術において確立されているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ及び細胞に基づくアッセイを含む様々なフォーマットで行なうことができる。

10

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

20

【0075】

T細胞の増殖を阻害することが見出されたタンパク質の活性と拮抗するか又はそれを遮断することによって、免疫刺激性又は促進効果も達成される。化合物の阻害活性を打ち消すことは、正味の刺激性効果を生み出す。適切なアンタゴニスト／遮断化合物は、阻害性タンパク質を認識してそれと結合する抗体又はその断片であり、それにより、このタンパク質のレセプターとの効果的な相互作用を遮断して、レセプターによるシグナル伝達を阻害する。恐らくはCTLA-4の結合による阻害シグナルを除くことによって、T細胞の増殖を促進する抗-CTLA-4抗体を用いる実験において、この効果は確認されている (Walunas, T.L.ら, Immunity (1994) 1:405)。

30

他方、本発明のポリペプチド並びに本発明の他の化合物は、T2細胞増殖／分化、及び／又はリンホカイン分泌は、免疫反応を抑制するために直接使用することができる。これらの化合物は、免疫反応の程度を低減し、過剰活性、超最適(superoptimal)又は自己免疫反応により特徴付けられる免疫関連疾患の治療に有用である。本発明の化合物のこの用途は、レセプターB7に結合するCTLA-4がT細胞を脱活性化する上述の実験により実証することができる。本発明の直接の阻害化合物は類似した形で機能する。

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

40

【0076】

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

50

、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。これらのモデルのインビボ性質により、ヒト患者における反応を予測できる。免疫関連疾患の動物モデルは、非組換え及び組換え（トランスジェニック）動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植等により、細胞を同系マウスに導入することにより作成される。

移植片対宿主疾患は、免疫適格細胞が免疫抑制され又は耐性のある患者に移植された場合に生じる。ドナー細胞は宿主抗原を認識しそれに反応する。反応は生命に危険性のある重度の炎症から、下痢や体重の減少等の軽度のケースまで多様である。移植片対宿主疾患モデルはMHC抗原及び少量の移植抗原に対するT細胞反応性を評価する手段を提供する。適切な手順は上記のCurrent Protocols in Immunology, unit4.3.に詳細に記載されている。

10

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。適切な手順は上記の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。

20

【0077】

遅発型過敏症の動物モデルは、細胞媒介免疫機能のアッセイをまた提供する。遅発型過敏反応は、抗原投与後の経過した時間まで、ピークに達しない炎症により特徴付けられるT細胞媒介インビボ免疫反応である。これらの反応はまた組織特異的自己免疫疾患、例えば多発性硬化症(MS)及び実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE、MS用のモデル)で生じる。適切な手順は上記のCurrent Protocols in Immunology, unit4.5.に詳細に記載されている。

EAEは、T細胞及び単核細胞の炎症と、続いての中樞神経系における軸索の脱髄により特徴付けられるT細胞媒介自己免疫疾患である。EAEは、一般的にヒトにおけるMSの関連動物モデルであると考えられている。Bolton, C., Multiple Sclerosis (1995)1:143。急性及び再発性弛緩モデルの双方が開発されている。本発明の化合物は上記のCurrent Protocols in Immunology, unit15.1及び15.2.に記載されているプロトコールを使用して、免疫媒介脱髄疾患に対するT細胞刺激又は阻害活性を試験することができる。また、Duncan, I.D.等, Molec. Med. Today (1997) 554-561に記載されているようにして、オリゴデンドロサイト又はシュワン細胞が中樞神経系に移植されたミエリン疾患のモデルも参照されたい。

30

接触性過敏症は、細胞媒介免疫機能の単純な遅発型過敏インビボアッセイである。この手順において、遅発型過敏反応を生じさせる外因性ハプテンに皮膚を暴露し、反応を測定して定量する。接触過敏症は最初の感作段階に顕在化段階が続く。顕在化段階はTリンパ球が過去に接触したことがある抗原に遭遇したときに生じる。腫れと炎症が生じ、ヒトアレルギー性接触皮膚炎の優れたモデルが作成される。適切な手順は、Current Protocols in Immunology, J.E. Coligan, A.M.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。

40

【0078】

関節炎の動物モデルは、コラーゲン-誘発関節炎である。このモデルはヒト自己免疫慢性関節リウマチの臨床的、組織的及び免疫学的特徴を共有し、ヒト自己免疫関節炎の許容可能なモデルである。マウス及びラットモデルは滑膜炎、軟骨の腐食及び軟骨下(subchon

50

dral)骨により特徴付けられる。本発明の化合物は上掲のCurrent Protocols in Immunology, unit15.5.に記載されているプロトコールを使用し、自己免疫関節炎に対する活性を試験することができる。また、Issekutz, A.C.等, Immunology (1996) 88:569に記載されているCD18及びVLA-4インテグリンに対するモノクローナル抗体を使用するモデルも参照のこと。

抗原誘発性気道反応亢進、肺好酸球増加症及び炎症が卵白アルブミンで動物を感作させ、エアゾールにより送達される同様のタンパク質に動物を暴露することで誘発される喘息モデルが記載されている。いくつかの動物モデル（モルモット、ラット、非ヒト霊長類）では、エアゾール抗原への暴露時にヒトのアトピー性喘息に類似した徴候が示された。マウスモデルはヒト喘息の多くの特徴を有している。喘息治療における活性と有効性について本発明の化合物を試験するのに適した手順は、Wolyniec, W.W.等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (1998) 18:777とそこに引用されている文献に記載されている。 10

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

【0079】

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成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イルス媒介遺伝子転移（例えば、Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]）；胚性肝細胞での遺伝子標的化（Thompson等, Cell 56, 313-321 [1989]）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell Biol. 3, 1803-1814 [1983]）；精子媒介遺伝子転移（Lavitrano等, Cell 57, 717-73 [1989]）を含む。概説としては、例えば、米国特許第4,736,866号を参照のこと。 20 30

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。

【0080】

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。 40

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本発明の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。

PRO92726又はその修飾形態をコードする核酸を使用して、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物を生成することもでき、これは治療上有用な試薬の開発及びスクリーニングに有用である。「ノックアウト」という用語は、従来、内在性遺伝子が 50

、「ノックアウト」されたか、又は相同的組換えの使用に起因する場合に起こるように切断されたトランスジェニック動物を意味する。相同的組換えとは、内在性遺伝子と相同な標的ベクターの領域を指すために使用される技術用語である。これら相同な領域は互いにハイブリダイズし、宿主のゲノムに再結合し、その結果、宿主の内在性配列が、相同な領域によって規定される位置及び方向においてベクター挿入物の配列に置換される。「ノックアウト」されている内在性遺伝子は、動物の残りの細胞のいずれにも発現しない。特定の細胞を詳細に分析することにより、切断された遺伝子の機能を同定することができる。

【0081】

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、期間において「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态及びその病理的状态の発達に対する防御能力によって特徴付けられる。

トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNA作成物である。一実施形態では、PRO92726をコードするcDNAを使用して、確立された技術によってPRO92726をコードするゲノムDNAをクローン化し、そのゲノム配列をPRO92726をコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物の生成に用いた。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等の特定の動物を産生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4,736,866号や第4,870,009号に記述されている。典型的には、組織特異的エンハンサーを用いたPRO92726導入遺伝子の取り込みについて、特定の細胞を標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたPRO92726コード化導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物は、PRO92726をコードするDNAの発現増大の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

【0082】

I. 免疫アジュバント治療

一実施形態では、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細胞の同時刺激により、インビトロ及びインビボの双方において、腫瘍の退行及び抗腫瘍反応が誘発されることが示されている。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、細胞毒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、細胞毒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、細胞毒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。

10

【0083】

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PRO92726核酸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変異体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。ここで同定される候補薬スクリーニングアッセイのすべては、候補薬とPRO92726ポリペプチドと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共通点を有する。

20

30

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。PRO92726変異体、そのアンタゴニスト及び／又はそのアゴニストを含む候補薬を同定する目的にPRO92726断片を適切に用いることができる。特別な実施形態では、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。

40

【0084】

候補化合物が、ここに同定される特定のPRO92726タンパク質と相互作用するが結合しない場合、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

50

[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。2-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PRO92726ポリペプチド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、構成成分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。試験化合物の上記相互作用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、第三の反応混合物ヘブ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。

【0085】

K. 免疫関連疾患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（例えばTh1-及び/又はTh2媒介疾患）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又は刺激する。

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W097/33551（1997年9月18日発行）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W097/33551、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。

【0086】

ここに記載したPRO92726ポリペプチド、アゴニスト及びアンタゴニストは治療

薬として用いてもよい。本発明のPRO92726分子は、製薬的に有用な組成物を調製するのに知られた方法に従って製剤され、これにより、PRO92726分子は製薬的に許容される担体媒体と組み合わせられる。治療用製剤は、凍結乾燥された製剤又は水性溶液の形態で、任意的な製薬上許容可能な担体、賦形剤又は安定剤と、所望の精製度を有するPRO92726分子とを混合することにより(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16版, Osol. A. 編, (1980)), 調製され保管される。許容される担体、賦形剤又は安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸及び他の有機酸等の緩衝液; アスコルビン酸を含む抗酸化剤; 低分子量(残基数10個未満)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重合体; 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等のアミノ酸; グルコース、マンノース又はデキストリン等の単糖類、二糖類又は他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、マンニトール又はソルビトール等の糖類、ナトリウム等の塩形成対イオン; 及び/又はTWEEN(登録商標)、PLURONICS(登録商標)又はPEG等の非イオン性界面活性剤を含む。

10

インビボ投与に使用される製剤は滅菌されていなくてはならない。これは、凍結乾燥及び再構成の前又は後に、滅菌フィルター膜を通す濾過により容易に達成される。

ここで、本発明の製薬組成物は一般に、無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを持つ静脈内バッグ又はバイアル内に配される。

投与経路は周知の方法、例えば、静脈内、腹膜内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内又は病巣内経路での注射又は注入、局所投与、又は徐放系による。

20

本発明の製薬組成物の用量及び望ましい薬物濃度は、意図する特定の用途に応じて変化する。適切な用量又は投与経路の決定は、通常の内科医の技量の範囲内である。動物実験は、ヒト治療のための有効量の決定についての信頼できるガイダンスを提供する。有効量の種間スケールリングは、Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobiら, 編, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96のMordenti, J. 及びChappell, W. 「The use of interspecies scaling in toxicokinetics」に記載された原理に従って実施できる。

【0087】

PRO92726分子のインビボ投与が用いられる場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり1日に約10ng/kgから100mg/kgまで、好ましくは約1µg/kg/日から10mg/kg/日である。特定の用量及び輸送方法の指針は文献に与えられている; 例えば、米国特許第4657760号、第5206344号、又は第5225212号参照。異なる製剤が異なる治療及び異なる疾患に有効であること、及び特定の器官又は組織の治療を意図する投与には、他の器官又は組織とは異なる方式で輸送することが必要であることが予想される。

30

PRO92726分子の投与を必要とする任意の疾患又は疾病の治療に適した放出特性を持つ製剤でPRO92726分子の持続放出が望まれる場合、PRO92726分子のマイクロカプセル化が考えられる。持続放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン-α、-β、-γ(rhIFN-α、-β、-γ)、インターロイキン-2、及びMNrgp120で成功裏に実施されている。Johnsonら, Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Haraら, Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, 「Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polyactide Polyglycolide Microsphere Systems」 Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell 及び Newman編, (Plenum Press: New York, 1995), p.439-462; WO97/03692, WO96/40072, WO96/07399; 及び米国特許第5,654,010号。

40

PRO92726分子の持続放出製剤は、ポリ-乳酸-コグリコール酸(PLGA)、大きな生体適合性の強度及び広範囲の生分解特性を示すポリマーを用いて開発できる。PLGAの分解生成物である乳酸及びグリコール酸は、ヒト身体内で即座にクリアされる。さらに、このポリマーの分解性は、分子量及び組成に依存して数ヶ月から数年まで調節できる。さらなる情報として、Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lact

50

ide/glycolide polymer" in Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, M. C. hasin及び R. Langer (編), (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41.

【0088】

L. PRO92726のアゴニスト及びアンタゴニストの同定

本発明はまた、PRO92726ポリペプチド効果を模倣又は強化する（アゴニスト）か、又はPRO92726ポリペプチドの一以上の機能又は活性を阻害又は抑制するものを同定するための化合物のスクリーニング方法を提供する。好ましくは、そのようなアンタゴニスト及びアゴニストは、PRO92726変異体、ペプチド断片小分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド（DNA又はRNA）又は抗体（モノクローナル抗体、ヒト化抗体、特異性抗体、一本鎖抗体、異種抱合抗体又は前出の断片）である。

10

アンタゴニスト及び／又はアゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここに同定した遺伝子にコードされるPRO92726ポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものにすると、化学的ライブラリのハイスループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む。

該アッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、及び細胞ベースのアッセイで、この分野で知られたものを含む種々の方式で実施される。

【0089】

20

ここで考慮するアンタゴニストのスクリーニングアッセイは、候補薬とPRO92726ポリペプチドとが相互作用するのに十分な条件と時間の下でそれら2つの成分を接触させるプロセスを共通に有する。

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W097/33551 (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W097/33551, 上掲を参照。

30

これらの分子は上記で使用される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、及び／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】

M. PRO92726及び遺伝子治療

また、PRO92726ポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が細胞内に導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止するための治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている（Zamecnik等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]）。オリゴヌクレオチドは、例えばそれらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

40

生細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じ

50

て変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス（典型的にはレトロウイルス）ベクターでのトランスフェクション及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介トランスフェクションである（Dzau等, Trends in Biotechnology 11, 205-210(1993)）。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいてインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び／又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシス技術は、例えば、Wu等, J. Bio. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコルの概説については、Anderson等, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

10

【0091】

N. 抗PRO92726抗体

本発明は、更に抗PRO92726抗体を提供するものである。抗体の例には、T細胞増殖、好酸球浸潤等を阻害（アンタゴニスト）又は刺激（アゴニスト）することができる抗体断片を含む、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。

20

i. ポリクローナル抗体

抗PRO92726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、PRO92726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。免疫化プロトコルは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

30

【0092】

i i. モノクローナル抗体

或いは、抗PRO92726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。

40

免疫剤は、典型的には対象とするPRO92726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株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞

50

である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不活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HPR T)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、アミノプチ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。

【0093】

好ましい不活化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不活化株化細胞はマウス骨髓腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerや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髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫株化細胞も開示されている [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、PRO92726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培地が含まれる。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。

サブクローニング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。

【0094】

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成することができる。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る、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髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [米国特許第4,816,567号; Morrison等, 上掲]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、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。

抗体は好ましくは一価抗体である。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

10

20

30

40

50

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 F a b 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。

【0095】

i i i . ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗 P R O 9 2 7 2 6 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 F v、F a b、F a b'、F (a b')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（C D R）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 C D R 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 F v 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 C D R 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 C D R 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 F R 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（F c）、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 C D R 又は C D R 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 C D R 又は C D R 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、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体 (米国特許第 4,816,567 号) である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの C D R 残基及び場合によっては幾つかの F R 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。

【0096】

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成することもできる。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); Boerner 等, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991); 米国特許第 5,750,373 号]。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。

【0097】

i v. 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、結合特異性の一方は本発明のポリペプチドに対するものであり、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り得る。 10

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づく [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W093/08829、及びTraunecker等, EMBO J., 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

【0098】

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成するための更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。 20

W096/27011に記載された他の方法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第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。 30

【0099】

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)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断して $F(ab')_2$ 断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生された Fab' 断片はついでチオニトロベンゾアート（TNB）誘導体に転換される。生成される Fab' 断片の一つが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。 40

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 50

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 $F(a b')_2$ 分子の製造を記述している。各 $F a b'$ 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 $E r b B 2$ 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。

【0100】

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成し分離する様々な方法が既知である。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)。F o s 及び J u n 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 $F a b'$ 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成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 $F v (s F v)$ 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、所与の $P R O 9 2 7 2 6$ 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 $P R O 9 2 7 2 6$ ポリペプチドのアームは、特定の $P R O 9 2 7 2 6$ 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 $C D 2$ 、 $C D 3$ 、 $C D 2 8$ 、又は $B 7$ ）等の白血球上のトリガー分子又は $F c \gamma R I (C D 6 4)$ 、 $F c \gamma R I I (C D 3 2)$ 及び $F c \gamma R I I I (C D 1 6)$ 等の $I g G (F c \gamma R)$ に対する $F c$ 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 $P R O 9 2 7 2 6$ ポリペプチドを発現する細胞に細胞毒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 $P R O 9 2 7 2 6$ 結合アーム及び細胞毒性薬又は放射性ヌクレオチドキレート化剤、例えば $E O T U B E$ 、 $D P T A$ 、 $D O T A$ 、又は $T E T A$ 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 $P R O 9 2 7 2 6$ ポリペプチドに結合し、そして更に組織因子 ($T F$) に結合する。

【0101】

v. ヘテロコンジュゲート抗体

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 $H I V$ 感染の治療のために [W091/00360; W092/200373; 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、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-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。

【0102】

vi. 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、例えば免疫関連疾患の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 $F c$ 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－依存性細胞性細胞毒性（A D C C）を有する可能性がある。Caron等，J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. 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A D C C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。

【0103】

v i i . 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）などの細胞毒性薬、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。 10

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(sapao 20 naria 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、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、及び¹⁸⁶Reが含まれる。

【0104】

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、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- 30 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）、ジオソシアネート（トリエン2，6-ジオソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（1，5-ジフルオロ-2，4-ジニトロベンゼン等）を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta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りW094/11026に開示され、本特許文献をここで参照することにより本明細書に 包含する。

他の実施形態では、組織の予備標的化に使用するために、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 40 いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬（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。

【0105】

v i i i . 免疫リボソーム

また、ここに開示するタンパク質、抗体等は、免疫リボソームとして調製してもよい。抗体を含むリボソームは、Epsteinら，Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)；H wang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ボソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリボソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホ 50

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。

【0106】

i x. 抗PRO92726抗体の使用

本発明の抗PRO92726抗体は様々な有用性を有している。例えば、抗PRO92726抗体は、PRO92726の診断アッセイ、例えばその特定細胞、組織、又は血清での発現の検出に用いられる。競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドウィッチアッセイ及び不均一又は均一相で行われる免疫沈降アッセイ [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158] 等のこの分野で知られた種々の診断アッセイ技術が使用される。診断アッセイで用いられる抗体は、検出可能な部位で標識可能である。検出可能な部位は、直接又は間接に、検出可能なシグナルを発生しなければならない。例えば、検出可能な部位は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S又は¹²⁵I等の放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光又は化学発光化合物、あるいはアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってよい。抗体に検出可能な部位を結合させるためにこの分野で知られた任意の方法が用いられ、それにはHunter等 Nature, 144:945 (1962); David等, Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain等, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); 及びNygren, J. Histochem. Cytochem., 30:407 (1982)に記載された方法が含まれる。

また、抗PRO92726抗体は組換え細胞培養又は天然供給源からのPRO92726のアフィニティー精製にも有用である。この方法においては、PRO92726に対する抗体を、当該分野でよく知られている方法を使用して、セファデックス樹脂や濾紙のような適当な支持体に固定化する。次に、固定化された抗体を、精製するPRO92726を含む試料と接触させた後、固定化された抗体に結合したPRO92726以外の試料中の物質を実質的に全て除去する適当な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、PRO92726を抗体から脱離させる他の適当な溶媒で支持体を洗浄する。

【0107】

O. 製薬的組成物

本発明の活性分子、ポリペプチド、抗体、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。

細胞内にある間にPRO92726を標的とするために、内部移行抗体を使用できる。また、リポフェクション又はリポソームを使用して、細胞中に抗体、又は抗体断片を送達することができる。抗体断片が使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の抑制断片が好ましい。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し、及び／又は組換えDNA技術 (Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893 (1993)) により生産することができる。

【0108】

本発明の活性分子、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 Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液; 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。

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。

【0109】

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

【0110】

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。

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。徐放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸と γ -エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRO 9272652254N DEPOTTM（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100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。

【0111】

P. 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、増加又は減少した血管透過性又はその阻害によって特徴付けられるものを含む、T細胞媒介疾患のような種々の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と考えられている。

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

10

【0112】

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

20

リウマチ様関節炎（RA）は、主に複数の関節の滑膜に関連する慢性全身性自己免疫炎症疾患であり、結果として関節軟骨に傷害が生じる。病原はTリンパ球依存性であり、リウマチ因子、自己IgGに対する自己抗体の生成に付随し、結果として滑液及び血液において高レベルに達する免疫複合体を生成する。関節中のこれらの複合体は、滑膜中へのリンパ球及び単球の顕著な浸潤と、続いての顕著な滑膜変化を誘発し；多数の好中球の添加により同様の細胞で浸潤されるならば、関節空間／液でもしかりである。冒されている組織は、多くの場合対称的なパターンで、主に関節である。しかしながら、二つの主要な形態の関節外疾患もまた生じる。一形態は進行中の進行性関節疾患及び肺線維症の典型的病巣、血管炎、及び皮膚潰瘍を伴う関節外障害の発生である。関節外疾患の第二の形態はいわゆるフェルティー症候群であり、これは、RA疾患過程の末期、時には関節疾患が鎮静した後生じ、好中球減少、血小板減少及び脾肥大の存在に関与する。これには、梗塞、皮膚潰瘍及び壊疽の形成を伴う複数の器官において血管炎が付随する。多くの場合、患者には、発病している関節上にある皮下組織にリウマチ様小結節が発達し；その小結節は、末期には混合炎症細胞浸潤に包囲された壊死性中心を有する。RAにおいて生じる可能性のある他の徴候には：心外膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、肺線維症を伴う間質性肺炎、乾性角結膜炎、及びリウマチ様小結節が含まれる。

30

【0113】

若年性慢性関節炎は、多くの場合16歳未満で発症する慢性特発性炎症疾患である。その表現型はRAといくつかの類似点があり；リウマチ因子が陽性である患者の中には若年性リウマチ様関節炎に分類されるものもある。この疾患は三つの主要なカテゴリー：小関節(pauarticular)、多関節及び全身性に細分類される。関節炎は重度で典型的には破壊的であり、関節強直症及び遅延成長に至る。他の徴候には慢性前部ブドウ膜炎及び全身性アミロイド症が含まれる。

40

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

50

、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；炎症非対称性関節炎；H L A - B 2 7（クラス I M H C の H L A - B 座位にある血清学的に定義された対立遺伝子）との関連；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に関連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導に対する鍵として最も関わっている細胞は C D 8 + T リンパ球で、クラス I M H C 分子により提示される抗原を標的としている細胞である。C D 8 + T 細胞は、M H C クラス I 分子により発現された外来ペプチドであるかのように、クラス I M H C 対立遺伝子 H L A - B 2 7 に対して反応する。H L A - B 2 7 のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原性エピトープを模倣し、よって C D 8 + 細胞の反応を誘発すると仮定されている。

【0114】

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、I C A M - 1 が皮膚病巣の線維芽細胞の細胞表面でアップレギュレーションされ、これらの細胞との T 細胞の相互作用が疾患の病因においてある役割を担っていることが示唆される。関連する他の器官には：胃腸管：結果的に異常なぜん動／運動性となる平滑筋萎縮症及び線維症；腎臓：小弓形及び小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎皮質の血流が低下し、タンパク尿、高窒素血尿及び高血圧になる同心性内皮下内膜増殖；骨格筋：萎縮、間質性線維症；炎症：肺：間質性肺炎及び間質性線維症；及び心臓：収縮バンド壊死、瘢痕／線維症が含まれる。

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

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

【0115】

全身性血管炎症は一次病巣が炎症で、続いて血管にダメージを受け、結果として冒された脈管により供給される組織に虚血／壊死／変性が生じ、いくつかのケースでは最終的な末端器官機能障害になるといった疾患である。また、血管炎(vasculitides)は他の免疫炎症媒介疾患、例えばリウマチ様関節炎、全身性硬化症等、特に免疫複合体の生成に関連した疾患等の続発症として又は二次病変として生じる場合がある。原発性全身性血管炎症グループの疾患には：全身壊死性血管炎：多動脈炎結節(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。その他の血管炎には：粘膜皮膚リンパ節症候群(M L N S 又は川崎病)、隔離された C N S 血管炎、ベーチェット(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発病メカニズムは、主に脈管壁に免疫グロブリン複合体が付着し、続いて A D C C、補体活性又は双方を介して炎症反応が誘発されることによると考えられている。

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

自己免疫性溶血性貧血、免疫再生不良性貧血、及び発作性夜間血色素尿を含む自己免疫

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

【0116】

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

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

10

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

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

20

【0117】

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

30

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

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

40

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

【0118】

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

拒絶反応及び移植片対宿主疾患（G V H D）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は、限定するものではないがウ

50

ウイルス感染（限定するものではないがAIDS、A型、B型、C型、D型、E型肝炎及びヘルペス）、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染（T細胞増殖を刺激する分子（又は誘導体／アゴニスト）を治療に利用し、感染要因に対する免疫反応性を増強することができる）を含む感染疾患、治療に利用し、遺伝性、獲得性、感染誘発性（例えばHIV感染）の状態に対する免疫反応を増強するために治療上用いることが可能なT細胞増殖を刺激する免疫欠損疾患（分子／誘導体／アゴニスト）、又は医原性（即ち、化学療法からのもの）免疫欠損、及び異常増殖である。

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

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

【0119】

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。一実施形態では、本発明のポリペプチドを、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、続いて本発明の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、成長阻害剤と本発明の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。

【0120】

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

10

20

30

40

50

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 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $15 \text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1 - 20 \text{mg}/\text{kg}$) のポリペプチド又は抗体が、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $100 \text{mg}/\text{kg}$ 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。

10

【0121】

Q. 製造品

本発明のその他の実施形態では、上記の疾患の診断又は治療に有用な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。容器上の又は容器に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できることを示す。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ス溶液などの製薬的に許容される緩衝液を含む第二の容器を具備してもよい。更に、他の緩衝液、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。

20

【0122】

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。特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたような組換えDNA技術の標準的な手法を用いた：Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989; Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innisら, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlowら, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coliganら, Current Protocols in Immunology, 1991。

30

【0123】

実施例1: PRO92726の単離とクローニング

40

Th2細胞に特異的な発現を社内的マイクロアレイデータから同定するために、コンピュータアルゴリズムにより最初の検索を行ない、特定の実験条件下で発現するEST配列を発見した。公的(例えば、GenBank)及び私的(LIFESeqTM, Incyte Pharmaceuticals, Inc.)データベースを検索し、同様のESTを発見した。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2(Altshul等、Methods in Enzymology 266:460-480(1996))を用いて行なった。比較の結果、BLASTスコア70(場合によっては90)以上で且つ既知のタンパク質をコードしないものを、必要に応じて「phrap」プログラム(Phil Green, University of Washington/ワシントン州シアトル)を用いてクラスター形成し、コンセンサスDNA配列にアセンブルした。決定したコンセンサス配列をDNA338341と命名した。

50

DNA 338341 コンセンサス配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成することにより、1) PCRにより、対象とすべき配列を含むcDNAライブラリを同定し、2) PRO92726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PCRプライマーは通常20～30ヌクレオチドであり、長さ約100～1000bpのPCR産物を生じるように設計されていることが多い。プローブ配列の長さは通常40～55bpである。場合によっては、コンセンサス配列が約1～1.5kbpより大きいとき、追加のオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンについて複数のライブラリを検索するため、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology、上掲に従って、PCRプライマー対を用いたPCR増幅により、ライブラリから得られたDNAをスクリーニングした。次いでポジティブライブラリを使用し、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象の遺伝子をコード化するクローンを単離した。 10

【0124】

PCRプライマー（正方向及び逆方向）を合成した。

正方向PCRプライマー：5'－CACAGGCATCCTAGATCCTTGTAATCTACAGAGTATCC－3'（配列番号3）

逆方向PCRプライマー：5'－GCAGCACCTTGCACTCATTTTGCACTAAATG－3'（配列番号4）

加えて、以下のようなヌクレオチド配列を有するコンセンサスDNA 338341配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを構築した。 20

ハイブリダイゼーションプローブ

5'－GTCCTCTTCTGCAAGATGCGGCTGCTGGACG－3'（配列番号5）

種々の組織からの、50の異なるヒトcDNAライブラリのプールをクローニングに使用した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて標準的な方法によって作成した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライミングし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適切にサイズ分類し、そして適切なクローニングベクター（pRKB又はpRKD等；pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmes等、Science, 253:1278-1280 (1991)参照）の独特のXhoI及びNotI部位に所定の方向でクローニングした。 30

上記のように単離したクローンのDNA検索により、完全長PRO92726ポリペプチド（本明細書でDNA 342188 [図1、配列番号1]と命名する）、及びそのPRO92726ポリペプチドに得られるタンパク質配列の完全長DNA配列が得られた。

上記に同定された完全長クローンは、ヌクレオチド位置18～20に見かけ上の翻訳開始部位を、及びヌクレオチド位置1083～1085に停止シグナルを有する（図1、配列番号1）単一のオープンリーディングフレームを含んでいた。予測されるポリペプチド前駆体は355アミノ酸長であり、約38646.60ダルトンの計算上の分子量と約6.27の見積もりpIを持つ。図2（配列番号2）に示した完全長PRO92726配列の分析により、図2に示したように種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかになり、それらの重要なポリペプチドドメインに与えられた位置は概ね上記の通りである。 40

【0125】

実施例2：Th2細胞発達におけるPRO92726の発現

CD4 T細胞は、免疫系の調節に中心的な役割を担う。様々な病原体の攻撃の下で、CD4 T細胞は2つの異なるサブセットに分化し得る。Tヘルパー1（Th1）細胞はINF-γ、TNF-α及びLTを生成する。Th1細胞とTh1細胞が生成するサイトカインは、細胞免疫に重要であり、細胞内への病原体の侵入を排除するのに必須である。Th1細胞によって生成されるINF-γはまた、抗体のアイソタイプがIgG2aに変わるのを助ける。Th1細胞によって生成されたサイトカインはまた、マクロファージを活性化し、CTL反応を促進することができる。一方、Tヘルパー2（Th2）CD4細胞 50

胞は主に液性免疫を媒介する。T h 2 細胞は I L - 4、I L - 5、I L - 6、及び I L - 1 3 を分泌する。これらのサイトカインは好酸球の発達と肥満細胞の活性化の促進に中心的な役割を担う。T h 2 細胞はまた、B 細胞発達抗体アイソタイプが I g E 及び I g A に変わるのを助ける。T h 2 細胞とそのサイトカインは蠕虫の排除に必須である。T h 1 及び T h 2 細胞は免疫系が様々な病原菌の侵入と戦うのに必要であるが、T h 1 及び T h 2 の分化が制御されないと、多くの自己免疫疾患を引き起こす場合がある。例えば、T h 2 の分化の非制御は、即時過敏症、アレルギー性反応及び喘息に関与していることが判明している。T h 1 細胞は、糖尿病、M S、乾癬及びループスを生じることが示されている。よって、T h 1 及び T h 2 細胞の分化、機能、遊走、及び認識に関与する分子標的は、これらの疾患の治療に大きな可能性を秘めている。現在、I L - 1 2 及び I L - 4 が、それぞれ T h 1 細胞と T h 2 細胞の発達の開始の鍵となるサイトカインであることが判明している。そのレセプターに結合すると、I L - 1 2 は S t a t 4 を活性化し、次いでそれによりホモ二量体が形成され、核の内部へと遊走し、ダウンストリームの転写イベントを開始させて T h 1 を発達させる。I L - 4 は異なる S t a t 分子である S t a t 6 を活性化し、それにより転写因子 G A T A 3 の発現を誘発する。G A T A - 3 は、次いで T h 2 細胞のダウンストリームの分化を促す。T h 1 及び T h 2 細胞の分化は動的なプロセスである。各段階ではそれぞれ異なる分子イベントが起こり、遺伝子発現の特性が異なる。例えば、初期の段階において、天然 T 細胞は、サイトカイン及び同時刺激的シグナル等の環境刺激に感受性である。それらが T h 2 プライミングシグナルを受け取った場合、I L - 1 2 レセプター b 2 鎖の発現を素早く終了してさらなる T h 1 の発達を阻止する。しかしながら、T h 1 発達の後期では、T h 2 分化サイトカインを適用しても細胞を T h 2 表現型に変えることはできない。

これらの実験において、T h 1 及び T h 2 の発達の全プロセスにおける遺伝子発現の特性をマッピングした。天然 C D 4 + T 細胞を正常なヒトドナーから単離した。抗 - C D 3、抗 - C D 2 8 及び抗 I L - 4 抗体を I L - 1 2 と組み合わせて C D 4 + T 細胞を刺激することにより T h 1 細胞を生成した。同様の T C R 刺激に抗 - I L - 4、抗 - I L 1 2、及び抗 - I F N - g 抗体を加えることにより T h 2 細胞を生成した。T C R 刺激、及び I L - 1 2、I L - 4 及び I F N - γ の抗体の中和により、未分化 T 細胞を生成した。容積 5 の新鮮な培地を用いた一次活性化の 3 日目において、C D 4 + T 細胞の拡大が見られた。次いで、完全に分化した T h 1 及び T h 2 細胞を抗 - C D 3 及び抗 - C D 2 8 により再度刺激した。発現分析に基づく遺伝子チップのため、図 1 に示すように、T 細胞発達の異なる段階において R N A を精製した。遺伝子の発現特性を比較することにより、異なる段階で T h 1 又は T h 2 細胞に優先的に発現する遺伝子を同定することができた。これらの遺伝子は、T h 1 / T h 2 分化の開始、T h 1 / T h 2 表現型の維持、T h 1 / T h 2 細胞の活性化、及びエフェクター機能、例えばサイトカイン生成に重要な役割を担っていると考えられる。これらの遺伝子はまた、特定の T h 1 及び T h 2 サブセットを同定し、標的化するための分子マーカーとしても機能し得る。ゆえに、これらの遺伝子は多くの自己免疫疾患の潜在的治療用標的である。

【0126】

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、m R N A の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試料を、c D N A プローブ生成のために逆転写し、標識した。次いで c D N A 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した。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した。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メンバー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。試験試料（本実施例では、分化した T h 2 細胞）由来のプローブのハイブリッド形成シグナルが、コントロール試料（本実施例では、分化していない T h 2 細胞）由来のハイブリッド形成シグナルよりも大きい場合に、試験試

料に過剰発現する遺伝子又は複数の遺伝子を同定した。この結果の意味するところは、試験試料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はなく、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。

【0127】

本実験では、Rosette Separation (商標) (Stem Cell Technologies) により 1.3 ml 試薬 / 25 ml 血液の修飾を用いて 200 ml のロイコパックから CD4+T 細胞を単離した。T 細胞を PBS (0.5% BSA) で 2 回洗浄し、数を数えた。MACS (登録商標) 枯渇プログラムを用いた Miltenyi (登録商標) CD45RO ビーズ (Miltenyl Biotec) により未処理 CD4+ T 細胞を更に単離した。細胞の純度を FACS によって分析したところ、常に 90% を超える純度を示した。50 × 10⁶ 個の細胞に 0 時間の時点の RNA 精製を行なった。残りの細胞を、6 ウェルプレートに細胞 20 × 10⁶ 個 / T 細胞培地 8 ml / ウェルで結合させた抗-CD3 及び抗-CD28 抗体により刺激した。Th1 の実験条件では、IL-12 タンパク質、IFN-γ タンパク質及び抗-IL4 抗体を使用した。Th2 分化の条件には、IL-4 タンパク質抗-IL12、及び抗-IFN-γ 抗体を加えた。Th0 の条件には、抗-IL-12、抗-IL-4 及び抗-IFN-γ 抗体を加えた。2 日目、条件当たり 1 つのウェルから細胞を回収し、RNA 精製を行なって 48 時間の時点のポイントとした。3 日目、IL-2 を加えた新鮮な培地を添加することにより T 細胞を 4 倍に拡大させた。7 日目、T 細胞を洗浄して数を数え、サイトカイン特性を細胞内サイトカイン染色及び ELISA により試験して、適当な分化が行なわれていることを確認した。細胞の半数を回収し、RNA 精製を行なって休止状態 b とした。IL-4 及び IFN-γ 精製細胞を濃縮するため、Miltenyi サイトカインアッセイキット (登録商標) を使用した。上記の刺激条件と同じものを使用することにより、単離した IL-4 又は IFN-γ 精製細胞をさらに 2 週間拡大させた。再度刺激を行ってから 7 日目、T 細胞を回収して細胞内サイトカイン染色及び ELISA によりサイトカイン生成分析を行なった。残りの細胞を抗-CD3 及び抗-CD28 により刺激した。細胞を 12 時間目 (条件 c) 及び 48 時間目 (条件 d) に回収し、RNA 精製を行なった。全ての RNA は、オンカラム DNase I 型処理を用いる Qiagen RNA 単離キット (登録商標) によって単離した。

次いで、単離された RNA を標識し、Affimax (登録商標) (Affymetrix Inc. / カリフォルニア州サンタクララ) マイクロアレイチップ及び独自の Genentech マイクロアレイで分析を行った。これらの実験の結果は、本発明の PRO92726 ポリペプチドが、単離された Th1 細胞又は休止正常 T 細胞とは対照的に、単離された CD4+Th2 細胞に有意に過剰発現することを示す。上述したように、これらのデータは、本発明の PRO92726 ポリペプチドが、一又は複数の免疫障害の存在を示す診断マーカーとして有用であるだけでなく、それらの免疫障害の治療の治療標的としても役立つことを示す。これを図 4 のグラフに示す。

【0128】

実施例 3: B リンパ球における PRO92726 の発現

B リンパ球は、抗体産生細胞として体液性免疫反応において主要な役割を果たしている。B 細胞は、ほぼ全ての可能な抗原に反応性である高度に多様な抗体レパートリーを生じうる。骨髄内部における成熟化及びクローン選択の過程で、高度に多様な B 細胞集団が発達し、その各 B 細胞クローンは、抗原特異性細胞表面レセプターであり、B 細胞によってつくられる分泌抗体と同じ特異性を有する B 細胞レセプター (BCR) を発現する。これらの成熟細胞は、異物及び感染性病原体に対する免疫、並びに自己免疫に関与しており、これによって自己成分に対する自己抗体を産生する。成熟細胞上の BCR 複合体は、その細胞質尾部に 2 つの免疫レセプターチロシンベース活性化モチーフ (ITAM) を含む、

インバリアント I g α 及び I g β ヘテロ二量体に関連する膜 I g M 及び I g D 分子から構成される。成熟 B C R 担持 B 細胞は末梢血を播種し、リンパ節、脾臓、及び粘膜リンパ組織などの一次リンパ組織を再循環する。多価抗原による膜 I g の架橋は I g α 及び I g β ヘテロ二量体のクラスター形成を引き起こし、S R C ファミリータンパク質チロシンキナーゼ (P T K)、例えば L y n、F y n、B l k、及び L c k による I T A M のチロシンリン酸化を生じる。B C R 複合体は本来のキナーゼ活性を欠いており、膜の脂質ラフトから除外されていると考えられるため、オリゴマー化した B C R は脂質ラフトに転位置され、脂質ラフトの L y n 残基が、構成的に I T A M ドメインのチロシンリン酸化を媒介している。この B C R シグナル伝達過程は、P T K、アダプター又はリンカータンパク質、及びエフェクター酵素の原形質膜の原形質側への補充に関連している、レセプター誘導性構築機構に依存する。B L N K、B C A P、G A B、P A G、及び L A T などのリンカータンパク質は、酵素複合体が適切な細胞下部位に局在してシグナル伝達を行うのを補助する。これらのリンカータンパク質は細胞表面レセプターをエフェクター酵素に連結し、タンパク質-タンパク質又はタンパク質-脂質相互作用を媒介することによりシグナル伝達の調節を助ける。B 細胞と抗 C D 4 0 を連結することにより、B C R を介して B 細胞活性を模倣することができる。C D 4 0 連結は、B 細胞の成長、生存、分化、I g 転換、胚中心形成、及び B 細胞による抗原提示の増強を誘導することが示されている。C D 4 0 連結は、N F - κ B 活性化を介して P I M - 1、即ちセリン/スレオニンタンパク質キナーゼをコードするプロトオンコジーンの発現を増強するだけでなく、J N K、p 3 8 キナーゼ、及びタンパク質キナーゼ C に依存しない E R K 2 の活性化を刺激し、これは抗 I g M による B 細胞の刺激に類似している。C D 4 0 連結はまたチロシンキナーゼ L y n、F y n 及び S y k のリン酸化を誘導する。I L - 4 と抗 C D 4 0 刺激を組合せることにより、B 細胞の増殖と I g 分泌が増強される。従って、D N A マイクロアレイ実験を行って、抗 C D 4 0 と R N A の差次的発現を、また休止 B 細胞に対して I L - 4 刺激細胞を比較することにより、B 細胞活性化に関連する新規な遺伝子を明らかにすることができる。B 細胞活性化に関連する遺伝子産物は、自己免疫媒介炎症性疾患及び B 細胞悪性腫瘍の治療における治療薬開発の標的となり得るだけでなく、免疫不全疾患において欠陥を有する遺伝子の病識を提供するものである。治療分子は抗体、ペプチド又は小分子とすることができる。幹細胞技術 C D 8 細胞単離キット (商標) (RosetteSep) を用いたネガティブ選択によりロイコパックから抹消血 C D 8 細胞を単離し、さらに C D 8 細胞単離キットを用いた M A C S 磁性細胞選別システムにより精製し、C D 4 5 R O マイクロビーズを加えて C D 4 5 R O 細胞 (Miltenyi Biotec) を除去した。F A C S 分析のため、P E 抗 - C D 8 を用いて染色することにより細胞の純度を確認した。細胞調整の純度は 8 4 % (ドナー数 1) ~ 9 6 % (ドナー数 3) であった。

【0129】

B 細胞の精製

3 人の正常な男性ドナーから採取したロイコパックから抹消血 B 細胞を単離した。M A C S (登録商標) 磁性細胞選別システムに B 細胞単離キット (登録商標) (Miltenyi Biotec) を用いるネガティブ選択により B 細胞を単離した。抗 - C D 1 9 を用いた F A C S により染色した蛍光抗体により、アイソタイプ抗体のコントロール群と比較する形で細胞純度をチェックした。

B 細胞の活性化

1 0 % の F B S、2 m M の L - グルタミン、5 5 m M の 2 - M E、1 0 0 単位 / m L のペニシリン、1 0 0 m g / m L のストレプトマイシンを加えた R P M I 1 6 4 0 に、単離した細胞を懸濁した。6 ウェル式 F A L C O N (登録商標) ポリスチレン製組織培養プレートの 5 m L / ウェルに 3×10^5 個 / m L の密度で細胞を培養した。細胞の培養は、抗 - C D 4 0 (1 0 m g / m L) 及び I L - 4 (1 0 0 n g / m L) の存在下及び不在下で、3 7 °C で 2 3 時間に亘って行った。単離された B 細胞の、抗 - C D 4 0 + I L - 4 による刺激に応答する免疫能力を、抗 - C D 6 9 抗体による蛍光染色によって検出される C D 6 9 の細胞表面における発現誘発によって、t = 0 時間及び t = 2 3 時間 ± (抗 - C D 4

0 + I L - 4 刺激) においてモニターした。Q i a g e n R n e a s y M a x i キット (登録商標) を用いて $t = 0$ 時間と $t = 23$ 時間 ± (抗 - C D 4 0 + I L - 4 刺激) に培養した B 細胞から総 R N A を抽出した。R N A は、Q i a g e n プロトコルにしたがって、D N A s e I を用いて処理したカラムから抽出した。R N A は D E P C 処理水を用いて溶出した。

【0130】

次いで、実施例 2 で述べたようにして、単離した R N A を標識し、A f f i m a x (登録商標) (Affymetrix Inc./カリフォルニア州サンタクララ) マイクロアレイチップ及び本出願人独自の G e n e n t e c h マイクロアレイによる分析を行った。これら実験の結果により、P R O 9 2 7 2 6 が、正常休止 B 細胞とは対照的に活性 B 細胞で多く発現することが示された。これを図 5 に示す。上述のように、これらのデータは、P R O 9 2 7 2 6 が 1 以上の免疫障害の存在を示す診断マーカーとして有用であるだけでなく、それら免疫障害の治療上の標的としても役に立つことを示すものである。

P R O 9 2 7 2 6 はまた、癌に過剰発現する。図 7 は、正常な胚中心 B - 細胞と比較した場合に、P R O 9 2 7 2 6 が濾胞性リンパ腫及び散在性大細胞型リンパ腫に過剰発現することを示す。このデータの有用性は、P R O 9 2 7 2 6 のアンタゴニストが B 細胞型白血病の治療に有用であると思われることである。リトキサン (登録商標) は、非ホジキンリンパ腫の治療に使用される抗体療法である。P R O 9 2 7 2 6 アンタゴニストは、濾胞性リンパ腫又は拡散性大細胞型リンパ腫において同様に作用すると思われる。

【0131】

実施例 4 : C D 8 + 細胞における P R O 9 2 7 2 6 の発現

C D 8 + T 細胞は、細胞障害性 T 細胞 (T_C 細胞) である。病原体由来の抗原性ペプチドは、M H C 1 型分子により細胞表面上に現れ、次いで感染した細胞を死滅させる T_C 細胞に示される。ヒト身体の殆ど全ての有核細胞は 1 型 M H C 分子を発現するため、活性化された T_C 細胞は殆ど全ての変質細胞を認識して排除することが出来る。 T_C 細胞の反応は 2 つの相に分けることができ、第 1 相では T_C 細胞の活性化と機能エフェクター細胞への分化が起こる。第 2 相では、 T_C 細胞が標的細胞上の M H C 1 型分子を認識し、標的細胞の破壊を引き起こす一連のイベントが起こる。

休止 T_C 細胞は細胞毒性を有さず、 T_C 細胞が活性化されて初めて T_C 細胞は機能エフェクター T_C 細胞へと分化する。この分化の過程では、休止 T_C 細胞上の C D 8 と 1 型 M H C 分子によって標的細胞の表面に示される抗原性ペプチドとの間のシグナル、及び活性化 C D 4 + T 細胞によって放出されるサイトカインによって通常もたらされる第 2 シグナルが必要である。I L - 2 は T_C 細胞の分化に必要な主要なサイトカインであるが、I L - 4、I L - 6 及び I F N - γ もこの分化に参画していることが分かっている。I L - 2 ノックアウトマウスでは、I L - 2 の切除により T_C 細胞の細胞毒性が消滅する。

本実験群では、未処理の C D 8 T 細胞から T_C 細胞への分化が促進される条件下で未処理の C D 8 + T 細胞を培養した。異常 T_C 細胞が非特異性組織損傷、自己免疫及び移植片拒絶を引き起こし得るため、1 型 M H C 及び I L - 2 以外にどの分子がこの過程に関与しているかを分析した。 T_C 反応を止めるか、又は遅らせる発明が、これらの場合に有用であると思われる。

【0132】

C D 8 細胞培養

インビトロ培養の設定は、6 ウェルプレートにおいて培養物 5 m l / ウェル、 4×10^6 個 / m L 培地の細胞、R P M I 1 6 4 0、1 0 % 熱不活性化 F B S、1 0 0 単位 / 1 m L のペニシリン、1 0 m g / 1 m L のストレプトマイシン、2 m L の L - グルタミンであった (条件 N 1 及び T O X)。D M E M (高グルコース)、1 0 % 熱不活性化 F B S、1 0 0 単位 / 1 m L のペニシリン、1 0 0 m g / 1 m L のストレプトマイシン、2 m L の L - グルタミン、N E A A 及びピルビン酸ナトリウム。

実験の処理

0 時間目 (N 0) : 未処理 C D 8 (+) 細胞

16時間目 (T c 0 x) : 未処理の、3 mLの活性CD8細胞中の抗-CD3 (10 ug/mL) + 抗-CD28 (5 ug/mL) をFACSによりCD69及びCD25の細胞表面における発現についてモニターした。

T c 1. 抗-CD3及び抗-CD28、並びにIL-12及び抗IL4抗体によりCD8 T細胞を刺激した。

T c 0. サイトカイン又は中和抗体を加えずに抗-CD3及び抗-CD28によりCD8 T細胞を刺激した。

T c 2. 抗-CD3及び抗-CD28、並びにIL-4タンパク質、抗-IL12抗体及び抗IFN-γ抗体によりCD8 T細胞を刺激した。

48時間目 (T c 1 a、T c 0 a、及びT c 2 a) : 刺激の48時間後、RNAを回収した。 10

72時間目 : 8倍の新鮮な培地を加えることにより細胞を拡大した。

7日目 (T c 1 b、T c 0 b、及びT c 2 b) : 最初の活性化から7日後、RNAを回収した。

8日目 (T c 1 c、T c 0 c、及びT c 2 c) : 7日目、CD8細胞を回収、洗浄し、抗-CD3及び抗-CD28により再度刺激した。16時間後、RNAを回収した。

9日目 (T c 1 d、T c 0 d、及びT c 2 d) : 再刺激の48時間後、RNAを回収した。

全てのRNA単離は、1回目のRW1洗浄ステップの後にオンカラムDNase I消化を加え、マニュアル中の指示に従って、Qiagen Midi preps (登録商標) を用いて行った。RNaseを含まない水中にRNAを溶出し、次いでエタノール沈殿により濃縮した。沈殿させたRNAを、ヌクレアーゼを含まない水に取り、最終的に1マイクロリットル当たり0.5マイクログラムの最小濃度にした。 20

次いで実施例2に記載のようにRNAをマイクロアレイ分析にかけた。これら実験の結果により、正常休止CD8+細胞とは対照的に、PRO92726が活性化CD8+細胞に多く発現することが示された。これを図6のグラフに示す。

【0133】

実施例5：大腸菌におけるPRO92726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PRO92726の非グリコシル化型の調製を例証する。 30

まず、PRO92726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)、PRO92726コード領域、ラムダ転写集結因子及びargU遺伝子をコードする配列を含む。 40

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部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ross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 50

き、次いでこの溶解したPRO92726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。

【0134】

以下の手法を用いることにより、ポリ-Hisタグ形態でPRO92726を大腸菌で発現させることもできる。PRO92726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ヘライゲートさせ、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50 mg/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 (500 mL水中の3.57 gの(NH₄)₂SO₄、0.71 gのクエン酸ナトリウム・2H₂O、1.07 gのKCl、5.36 gのDifco酵母抽出物、5.36 gのSheffield hycase SF、並びに110 mMのMPO S、pH 7.3、0.55% (w/v)のグルコース及び7 mMのMgSO₄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。

0.5から1 Lの発酵 (6~10 g ペレット) からの大腸菌ペーストを、7 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 8 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0.1 M及び0.02 Mとし、溶液を4℃で終夜攪拌した。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40,000 rpm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 (6 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 7.4) 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5 mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに負荷した。カラムを50 mMのイミダゾール (Calbiochem, Utrol grade) を含む添加バッファー、pH 7.4で洗浄した。タンパク質を250 mM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280 nmにおけるその吸収により見積もった。

【0135】

試料を20 mMのトリス、pH 8.6、0.3 MのNaCl、2.5 Mの尿素、5 mMのシステイン、20 mMのグリシン及び1 mMのEDTAからなる新たに調製した再生バッファー中で徐々に希釈することによって、タンパク質を再生させた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50~100 µg/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時間ゆっくりと攪拌した。リフォールディング反応はTFAを採取濃度0.4% (約3のpH) 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で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。

所望の再生したPRO92726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G25 SuperfineTM (Pharmacia) 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14 Mの塩化ナトリウム及び4%のマニトールを含む20 mMのHepes、pH 6.8に調製した。

【0136】

実施例6：哺乳動物細胞におけるPRO92726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PRO92726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、PRO92726 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PRO92726 DNAを挿入させる。得られたベクターは、例えば、pRK5-PRO92726と呼ばれる。

一実施形態では、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10 µgのpRK5-PRO92726 DNAを約1 µgのVA RNA遺伝子コード化DNA [Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 µlの1 mM トリス-HCl、0.1 mM EDTA、0.227 M CaCl₂に溶解させた。この混合物に、滴状の500 µlの50 mM HEPES (pH 7.35)、280 mM NaCl、1.5 mM NaPO₄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、2 ml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200 µCi / ml ³⁵S-システイン及び200 µCi / ml ³⁵S-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、PRO92726 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。

【0137】

これに換わる技術において、PRO92726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、700 µgのpRK5-PRO92726 DNA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、5 µg / ml ウシインシュリン及び0.1 µg / 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PRO92726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。

他の実施形態では、PRO92726をCHO細胞で発現させることができる。pRK5-PRO92726は、CaPO₄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³⁵S-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。PRO92726の存在を同定した後、培地を無血清培

10

20

30

40

50

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PRO92726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。

【0138】

また、エピトープタグPRO92726は、宿主CHO細胞において発現させてもよい。PRO92726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イルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。次いで、ポリ-hisタグPRO92726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作用プロモーター／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作用プロモーター／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PRO92726を含む培地は、次いで濃縮し、 Ni^{2+} -キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

またPRO92726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、下記の手順を用いて実行することができる。タンパク質は、例えば、(1)それぞれのタンパク質の可溶化形態のコード配列（例えば、細胞外ドメイン）がヒンジCH2ドメインを含むIgG1定常領域配列に融合したIgG作成物（イムノアドヘシン）、及び／又は(2)ポリ-Hisタグ形態として発現させることができる。

【0139】

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成される。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)(Qiagen)、Dosper(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)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（0.2 μm 濾過PS20、5%の0.2 μm 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のスピナーを 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、細胞数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ジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion）をとった。生産を通

10

20

30

40

50

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0.22 μ m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。

【0140】

ポリ-Hisタグ作成物に関して、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%のマニトール、pH6.8を含む貯蔵バッファー中で25mlのG25 Superfine (Pharmacia) を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。 10

イムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を、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275 μ L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。 20

【0141】

実施例7：酵母菌でのPRO92726の発現

以下の方法は、酵母菌中でのPRO92726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PRO92726の細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。PRO92726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PRO92726の細胞内発現を指示する。分泌のために、PRO92726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PRO92726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) PRO92726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。 30

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PRO92726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。PRO92726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。 40

【0142】

実施例8：バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPRO92726の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるPRO92726の組換え発現を記載する。

PRO92726コードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。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、PRO92726又はPRO92726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 50

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ニングされる。

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウイルス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成される。28℃で4~5日インキュベートした後、放出されたウイルスを収集し、更なる増幅に用いた。ウイ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。 10

【0143】

次に、発現されたポリ-hisタグPRO92726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、ウイ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、0.45 μm 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。 20

溶離したHis₁₀-タグPRO92726を含む画分をプールして負荷バッファーで透析した。 30

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)PRO92726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。

【0144】

また別の方法として、本発明のPRO92726分子は、Hi-5細胞を用いた変形バキュロウイルス処置により発現させることができる。この処置では、PfU(Stratagene)等の適切なシステム、又はバキュロウイルス発現ベクター内部に含まれるエピトープタグの融合した上流(5')部を用いて所望の配列をコードするDNAを増幅する。このようなエピトープタグには、ポリ-Hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域のような)が含まれる。pIE-1(Novagen)等の市販されているプラスミドから得られるプラスミドを含め、様々なプラスミドを用いることができる。pIE-1及びpIE-2ベクターは、安定的に形質転換された昆虫細胞内のバキュロウイルスie1プロモーターからの組換えタンパク質の恒常的発現のために設計されている。プラスミドの唯一の違いは複数のクロニング部位の方向であり、これらプラスミドは、未感染の昆虫細胞におけるie1-媒介性遺伝子発現に重要であることが知られている全てのプロモーター配列、並びにhr5エンハンサー要素を含んでいる。pIE1-1及びpIE1-2は、ie1翻訳開始部位を含み、融合タンパク質の生成に使用することができる。簡単には、所望の配列、又はそのような配列の所望の部分(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)を、5'及び3'領域に相補的なプライマーを用いたPCRにより増 40

50

幅する。5'プライマーは、側方（選択された）制限酵素部位を含み得る。次いで、それら選択された制限酵素により生成物を消化し、発現ベクターにサブクロニングした。例えば、pIE1-1の派生物は、ヒトIgG（pb. PH. IgG）のFc領域又は所望の配列下流（3'）の8ヒスチジン（pb. PH. His）タグを含むことが出来る。好ましくは、確認のためにベクター構築物の配列決定を行う。

27℃、CO₂不在、ペニシリン／ストレプトマイシン不在という条件下でHi5細胞を集密度50%まで成長させた。150mmプレートにつき、本配列を含むpIEに基づくベクター30μgを1mlのEx-Cell培地（培地：Ex-Cell 401 + 1/100 L-Glu JRH Biosciences #14401-78P（注：この培地は光感受性である））と混合した。これとは別に、100μlのCell Fectin（CellFECTIN, Gibco BRL +10362-010, ボルテックスによる攪拌前）を1mlのEx-Cell培地と混合した。2つの溶液を組み合わせ、室温で15分間インキュベートした。8mlのEx-Cell培地を2mlのDNA／Cell FECTIN混合物に加え、これをEx-Cell培地で一度洗浄したHi5細胞上に層状に載せた。次いでプレートを暗所で1時間に亘り室温でインキュベートした。その後DNA／Cell FECTIN混合物を吸引し、Ex-Cellにより細胞を1度洗浄することにより余分なCell FECTINを除去した。30mlの新鮮なEx-Cell培地を加え、細胞を3日に亘り28℃でインキュベートした。上清を回収し、IgGタグ付きタンパク質のプロテイン-AセファロースCL-4Bビーズ（Pharmacia）のヒスチジンタグ付きタンパク質について1mlの上清を25mlのNi-NTAビーズに結合させるバッチ結合を行い、その後既知の濃度のタンパク質標準物と比較してクマシーブルー染色によるSDS-PAGE分析を行うことにより、バキュロウイルス発現ベクターにおける本配列の発現を決定した。

【0145】

形質移入した細胞から得た調整培地（3Lに対して0.5）を遠心分離により回収することにより細胞を取り除き、0.22ミクロンのフィルターに通した。ポリ-Hisタグ付き構築物について、本配列を含むタンパク質を、Ni-NTAカラム（Qiagen）を用いて精製した。精製前に、48℃で4～5ml／分の流量でイミダゾールを添加した。添加後、平衡バッファ及び0.25Mのイミダゾールを含む均衡バッファで溶出したタンパク質を加えてカラムを洗浄した。次いで、25mlのG25 Superfine（Pharmacia）カラムを用いて、10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマンニトールを含む保存バッファ（pH6.8）に、高度に精製されたタンパク質を脱塩し、-80℃で保存した。

イムノアドヘシン（Fc含有）構築物は、調整した培地から次のように精製することもできる。前もって20mMのリン酸ナトリウムバッファ（pH6.8）中で平衡化した5mlのプロテインAカラム（Pharmacia）に対し、調整培地をポンピングする。添加後、均衡バッファでカラムをよく洗浄してから100mMのクエン酸（pH3.5）で溶出する。溶出したタンパク質は、1mlの分画を275μlの1Mトリスバッファ（pH9）を含むチューブに回収して直ちに中和する。続いて高度に精製されたタンパク質を上述のようにして保存バッファに脱塩し、ポリ-Hisタグ付きのタンパク質にする。SDSポリアクリルアミドゲル、及びEdman分解によるN末端アミノ酸配列決定により均一性を評価する。

【0146】

実施例9：PRO92726に結合する抗体の調製

この実施例は、PRO92726に特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を示す。

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。用いられ得る免疫原は、精製PRO92726、PRO92726を含む融合タンパク質、細胞表面に組換えPRO92726を発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなく行うことができる。

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PRO92726免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント (Ribi Immunochemical Research, 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免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗PRO92726抗体の検出のためのELISAアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

【0147】

適当な抗体価が検出された後、抗体に「ポジティブ (陽性)」な動物に、PRO92726 静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。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髓腫株化細胞に融合させた。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、骨髓腫ハイブリッド、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、PRO92726に対する反応性についてのELISAでスクリーニングされる。PRO92726に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ (陽性)」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

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PRO92726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うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【0148】

実施例10：特異的抗体を用いたPRO92726ポリペプチドの精製

天然又は組換えPRO92726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-PRO92726ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-PRO92726ポリペプチドは、対象とするPRO92726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できる。一般に、免疫親和性カラムは抗PRO92726ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテインA (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.) での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインAでのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、CnBr-活性化セファロース (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PRO92726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PRO92726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PRO92726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PRO92726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PRO92726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/PRO92726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

10

20

30

40

50

又はチオシアン酸イオン等のカオトロップ)で溶離され、PRO92726ポリペプチドが収集される。

【0149】

実施例11：薬物スクリーニング

PRO92726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にとって特に有用な方法を使用することができる。そのような試験に用いられるPRO92726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、PRO92726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する。例えば、PRO92726ポリペプチド又はその断片と、試験される試薬と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PRO92726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。

10

従って、本発明は、PRO92726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PRO92726ポリペプチド又は断片に接触させ、(i)試薬とPRO92726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)PRO92726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、PRO92726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PRO92726ポリペプチド又はその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PRO92726ポリペプチドに結合する又はPRO92726ポリペプチド/細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

20

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。簡単には、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。PRO92726ポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はPRO92726ポリペプチドと反応して洗浄される。結合したPRO92726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PRO92726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。

30

また、本発明は、PRO92726ポリペプチドに結合可能な中和抗体がPRO92726結合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、PRO92726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。

40

【0150】

実施例12：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(例えば、PRO92726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、PRO92726ポリペプチドのより活性で安定な形態又はインビボでPRO92726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、PRO92726ポリペプチド、又はPRO92726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

50

より、最も典型的にはこれら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、PRO92726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、PRO92726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PRO92726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。

10

【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。本発明は、寄託された実施品が本発明のある態様の一つの例証として意図されているため、寄託された作成物により範囲が制限されるのではなく、機能的に均等であるあらゆる作成物は本発明の範囲内にある。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。

20

【図面の簡単な説明】

【0152】

【図1】 PRO92726をコードする核酸配列を示す（配列番号1）。

【図2】 PRO92726のアミノ酸配列を示す（配列番号2）。

【図3】 CD4+ T細胞のTh1及びTh2細胞への分化、分化をもたらす一次サイトカイン応答、抗原刺激により対応するサブセットの分化から放出される一次サイトカイン、及び放出されるサイトカインの特性によって媒介される物理的影響を示す図表である。

【図4】 Th2及びTh1細胞におけるPRO92726の発現レベルの差異を示す。

【図5】 B細胞におけるPRO92726の発現レベルの差異を示す。

【図6】 CD8細胞におけるPRO92726の発現レベルの差異を示す。

30

【図7】 正常な胚中心B細胞と比較した場合の、濾胞性リンパ腫及び散在性大細胞型リンパ腫におけるPRO92726の発現レベルの差異を示す。

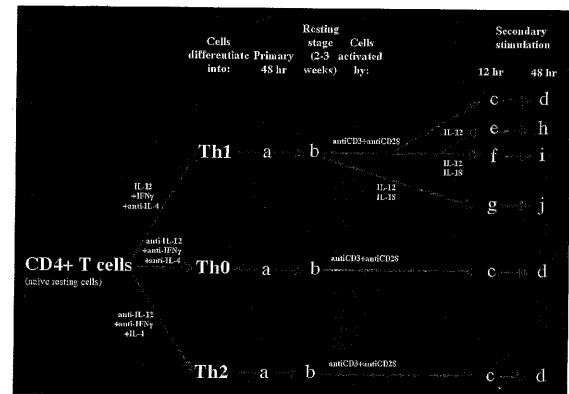
【 図 1 】

Figure 1

GGCGCTGGCTCTCAGCAGTATGAAGAAGAAGTTAAAGTTAAAGTGGACTTCGAGC
 TCGAGGAGCTCTCCTCAGTGCCTTCGTCAATGGGGTCTCTCTCGCAAGATGCGGCTGC
 TGGACGGCGGACGTTTACCCCGAGTCTCCAGGGAGGTGTTACAAGCAAACTGTGTTC
 GCTGGAGAAAGTTCTCATTATGTGCAAAATGAGTGAAGTCTGCCACAGGCATCC
 TAGATCTTGTCTACAGAGTATCGGTGAGGAAGGAATAAAAGTGGGAAAGCTTATG
 CAAAGCTGCGCTTTCAGATCTAACTCGGCGAGGTTTCTCGGATCAGGAAATACCACTC
 GCCCTGTTTACTGGAAGCTATGATACCAAAAATACAGAGGATTAATCCATCTTA
 AAGTTTTGATCAGTATGCACTGATGTCGTGACCCATGTTTAAAACGCTCCCTCCA
 CTTCATATGCTATACCAATTTGCTGTGTAATCTGAATCTTTCAGCAAGAGTAGAAAAGTGC
 GAGAGACTCTCAAAAGTCATCTTGAATAGCAGATCTTTCAGCAAGAGTCCCTCTGTTT
 CAGAGAACTTGGTGCCTGGACATCTAGAACATCAAGCTATGCAAGTCAGCAGTCAA
 AAGTATCAGGGTATAGCAAGTGCATCTCCGGTCTATGATTTCTCTGAGCTCTGCCACA
 GGAGAAATACCTCAGTGGGAAGCACATCAACAGGAGTGAAGATATCTAGAGCCATGTG
 ATGAAATGAGCAGAAAATCGTGAAGCAAACTTGTATACAGCTGATAAGAAAGATACAG
 CTTCAGAAAATCAGCAGATGCCAGTGAACAAAGATCTGTAGAAATCTCAGCTGAAGC
 GAGTTGATGACACAGGCTGATGAGATGACATCTGTAGAAAATATTCAGAAAGTCAAG
 ACTTCAGCTAGATCTCAGTCCGAGAGGAGAGGACTAAGGCTATTTGTGGTCTCTGGGG
 GAAGTACAACTTTGGCAGTCACTATCTTCCAAATAGTCCCTGGAAGCTCCTCTCTGC
 TTTGAGTGTGCCCGCTTCTGGATGGAACCAATGTACTCTTACATATATTGATTAAT
 GTCTCATGTCTCCCTAAATGTATAAAACAGAGTGTGCCCGGACCACTCTGAGTACATG
 TTGTCAGGACCTCTGAGACTGTGTCTATGGAGCGCTCTCTCAACTTGGCAAAATAAAC
 TTCTAAATTAGCTGAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAA
 AAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAAATGAAAAA

【 図 3 】

Figure 3



【 図 2 】

Figure 2

MMKKKFKFKVDFELEELSSVPFVNGVLFCKMRLLDGGSPFAESSREVQVANCVRWRKK
 FSPMCKMSASATGILPDCIYRVSRKELKGGKAYAKLGFADLNLAEPAGSGNTRCL
 LEGYDTKNTRQDNSILVLISMGLMDPCFKTPPSTMSIPIAGESESLQDRKGGET
 LKVLGLADLSAKSASVPDELGACGCHSTSSYASQSKVSGYSTCHSRSSFSSELCHRR
 NTSVSGSTGVESILEPCDELEQKIAEPMLDTADKEPTASEKLRCPCVQDSVESQLKR
 VDDTRVDADDIVEKILQSGDLSLSSABEGLLFLVGPGGSTTFGSHLPNSALEAPSL
 L

N-glycosylation site.
 112-115

237-240

cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site.
 58-61

235-238

N-myristoylation site.
 26-31

37-42

38-43

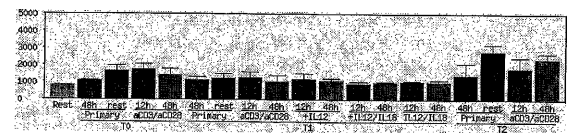
109-114

241-246

334-339

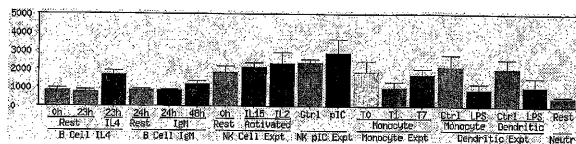
【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5



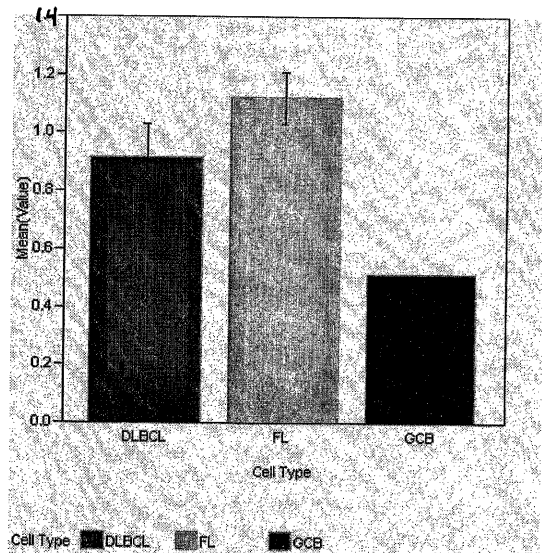
【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】

FIGURE 7



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	4 C 0 8 5	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	4 H 0 4 5	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68		A
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00		
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		N
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		D
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	31/00		
A 6 1 P	33/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
A 6 1 P	31/08	(2006.01)	A 6 1 P	33/02		
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/08		
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/10		
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/12		
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/18		
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/06		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/02		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	43/00		1 1 1
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/04		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/06		
A 6 1 P	5/38	(2006.01)	A 6 1 P	21/04		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	5/38		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	7/04		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	5/14		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/16		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/00		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		D
			C 1 2 P	21/08		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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 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, ノー ストリート 1
504
- (72)発明者 チウ, ヘンリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94116, サン フランシスコ, 20番 アベニュー
2334
- (72)発明者 フェドロビッチ, グラジーナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94401, フォスター シティ, ハーワード アベニュー
18, アパート 7
- (72)発明者 フォン, シャーマン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94502, アラミーダ, ベイシンサイド ウェイ 19
- (72)発明者 グリマルディ, ジェー., クリストファー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94122, サン フランシスコ, 36番 アベニュー 14
34
- (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, ガレー レーン 10
57
- (72)発明者 ウィリアムズ, ピー., ミッキー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94019, ハーフ ムーン ベイ, アルト アベニュー
509

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA20 DA02 DA06 DA12 EA02 EA04
GA11 GA13 HA14

4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ43 QQ91 QR32 QR77 QS33 QS34

4B064 AG01 AG27 CA05 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA26X AA72X AA90X AA93X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18
CA25 CA53 CA56 DC50 NA14 ZA02 ZA33 ZA34 ZA36 ZA51
ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB05
ZB08 ZB09 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZB31 ZB32 ZB33 ZB35
ZB38 ZC06 ZC08 ZC35 ZC42 ZC55

4C085 AA13 AA14 CC03 DD62

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	用于治疗免疫缺陷的新型组合物和方法		
公开(公告)号	JP2007537691A	公开(公告)日	2007-12-27
申请号	JP2006509965	申请日	2004-04-08
[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	ボールドウィンダリル クラークヒラリー チウヘンリー フェドロービッチグラジーナ フォンシャーマン グリマルディジェークリストファー オウヤングウェンジュン ウィリアムズピーミッキー		
发明人	ボールドウィン, ダリル クラーク, ヒラリー チウ, ヘンリー フェドロービッチ, グラジーナ フォン, シャーマン グリマルディ, ジェー., クリストファー オウヤング, ウェンジュン ウィリアムズ, ピー., ミッキー		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 C07K19/00 A61K38/00 A61K45/00 A61K39/395 A61P31/00 A61P37/08 A61P33/02 A61P31/08 A61P31/10 A61P31/ /12 A61P31/18 A61P11/06 A61P11/02 A61P17/00 A61P43/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P35/00 A61P19/02 A61P7/06 A61P21/04 A61P5/38 A61P13/12 A61P25/00 A61P29/00 A61P9/00 A61P7/04 A61P5/14 A61P3/10 A61P27/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/00 A61P17/06 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/08 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/ /18 A61P33/02 A61P35/00 C07K14/47 G01N33/56972 G01N33/6863 G01N2500/00 G01N2800/24		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.B C12P21/02.C C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68. A C07K19/00 A61K37/02 A61K45/00 A61K39/395.N A61K39/395.D A61P31/00 A61P37/08 A61P33/02 A61P31/08 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P11/06 A61P11/02 A61P17/00 A61P43/00.111 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P35/00 A61P19/02 A61P7/06 A61P21/04 A61P5/38 A61P13/12 A61P25/00 A61P29/00 A61P9/00 A61P7/04 A61P5/14 A61P3/10 A61P27/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/00 A61P17/06 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/ /DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QQ91 4B063/QR32 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/ /QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/ /AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA25 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA33 4C084/ /ZA34 4C084/ZA36 4C084/ZA51 4C084/ZA55 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA68 4C084/ZA75 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB05 4C084/ZB08 4C084/ZB09 4C084/		

21) 出願番号	特願2006-509965 (P2006-509965)	(71) 出願人	596168317
36) (22) 出願日	平成16年4月8日 (2004.4.8)		ジェネテック・インコーポレーテッド
35) 翻訳文提出日	平成18年1月4日 (2006.1.4)		GENETECH, INC.
36) 国際出願番号	PCT/US2004/011338		アメリカ合衆国カリフォルニア・
37) 国際公開番号	W02004/096848		オー４９０・サウス・サン・フランシスコ・ディヴィジョン・ウェル・
37) 国際公開日	平成16年11月11日 (2004.11.11)	(74) 代理人	100109726
31) 優先権主張番号	60/466, 612		弁理士 岡田 吉隆
32) 優先日	平成15年4月29日 (2003.4.29)	(74) 代理人	100101199
33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 義敦
		(72) 発明者	ボードウィン, ダリル
			アメリカ合衆国 カリフォルニア
			オー８, パークレー, ユークリ
			ベニュー 1595