

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-501862

(P2006-501862A)

(43) 公表日 平成18年1月19日(2006.1.19)

(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
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 4
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 138 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-500358 (P2005-500358)	(71) 出願人	596168317
(86) (22) 出願日	平成15年10月1日 (2003. 10. 1)		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17年5月27日 (2005. 5. 27)		GENENTECH, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/031207		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(87) 国際公開番号	W02004/031105		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開日	平成16年4月15日 (2004. 4. 15)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	10/265, 542	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成14年10月3日 (2002. 10. 3)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	10/633, 008		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成15年7月31日 (2003. 7. 31)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A 3 3 抗原および J A M - 1 T の使用

(57) 【要約】

本発明は、炎症性疾患および/または癌と関連する抗原の存在によって特徴付けられる障害を処置および診断する組成物および方法に関連する。一局面において、本発明は、一般に免疫関連疾患（哺乳動物（ヒトを含む）における炎症性疾患を含む）の診断および処置に有用な組成物および方法に関する。本発明は、一部、哺乳動物における免疫応答に関与する化合物（ポリペプチドおよび抗体が挙げられる）の同定に基づいている。一局面において、本発明は、哺乳動物の炎症性障害を処置する方法に関し、ネイティブの配列 S T I g M A ポリペプチド、P R O 3 0 1 ポリペプチド、P R O 3 6 2 ポリペプチドまたは P R O 2 4 5 ポリペプチドのアンタゴニストの治療的に有効量を、哺乳動物に投与する工程を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物における炎症性障害を処置する方法であって、該方法は、該哺乳動物にネイティブの配列 S T I g M A ポリペプチド、P R O 3 0 1 ポリペプチド、P R O 3 6 2 ポリペプチドまたは P R O 2 4 5 ポリペプチドのアンタゴニストの治療的に有効量を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

(1) 前記ネイティブの配列 S T I g M A ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 3 2、配列番号 3 3 および配列番号 3 4 のポリペプチドからなる群より選択されるか、(2) 前記 P R O 3 0 1 ポリペプチドは、配列番号 1 の配列を含むか、(3) 前記 P R O 3 6 2 ポリペプチドは、配列番号 2 の配列を含むか、または (4) 前記 P R O 2 4 5 ポリペプチドは、配列番号 9 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記アンタゴニストが抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体が非ヒト相補性決定領域 (C D R) 残基を有し、かつ、ヒトフレームワーク領域 (F R) 残基を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体が、薬学的に受容可能なキャリアもしくは賦形剤との混合物中の組成である、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記アンタゴニストがイムノアドヘシンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記イムノアドヘシンが、免疫グロブリン定常領域配列に融合した S T I g M A ポリペプチド、P R O 3 0 1 ポリペプチド、P R O 3 6 2 ポリペプチドまたは P R O 2 4 5 ポリペプチドの細胞外領域配列を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞外領域配列が本質的に膜貫通ドメイン配列を含まない、請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記免疫グロブリンが I g G である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 I g G が I g G 1 または I g G 3 である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記炎症性障害が、炎症性腸疾患；全身性エリテマトーデス；慢性関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身性硬化症、例えば、強皮症；特発性炎症性筋障害、例えば、皮膚筋炎、多発性筋炎；シェーグレン症候群；全身性脈管炎；サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、例えば、免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症；自己免疫性血小板減少症、例えば、特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症；甲状腺炎、例えば、グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎；糖尿病、免疫媒介性腎疾患、例えば、糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎；中枢神経系および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症）、特発性多発神経障害；肝胆道疾患（例えば、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、D 型肝炎、E 型肝炎および非肝親和性ウイルスなどの感染性肝炎；自己免疫性慢性活動性肝炎；原発性胆汁性肝硬変；肉芽腫性肝炎；および硬化性胆管炎；炎症性肺疾患および線維性肺疾患（例えば、嚢胞性線維症）；グルテン過敏性腸疾患；ホウィップル病；自己免疫性または免疫媒介性皮膚疾患（水疱性皮膚疾患、多形性紅斑および接触皮膚炎、乾癬が挙げられる）；肺のアレルギー性疾患（好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）、移植関連疾患（移植片拒絶および移植片対宿主

40

50

病)からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記炎症性疾患が慢性関節リウマチである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記哺乳動物がヒトである、請求項12または請求項13に記載の方法。

【請求項15】

哺乳動物における炎症性障害を診断する方法であって、該方法は、(a)該哺乳動物から入手した細胞の試験サンプル中、および(b)同一細胞型の既知の正常細胞のコントロールサンプル中のSTIgMAポリペプチド、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチドまたはPRO245ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを決定する工程を包含し、ここで、該コントロールサンプルと比較して、該試験サンプル中のより高いレベルの該遺伝子の発現は、該試験組織細胞が入手された該哺乳動物における免疫関連障害の存在を示す、方法。

10

【請求項16】

(1)前記STIgMAポリペプチドが、配列番号2、配列番号32、配列番号33および配列番号34のポリペプチドからなる群より選択されるか、(2)前記PRO301ポリペプチドが配列番号1の配列を含むか、(3)前記PRO362ポリペプチドが配列番号2の配列を含むか、または(4)前記PRO245ポリペプチドが配列番号9の配列を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

哺乳動物における免疫性障害を診断する方法であって、該方法は、(a)抗STIgMA抗体、抗PRO301抗体、抗PRO362抗体または抗PRO245抗体を該哺乳動物から入手した細胞の試験サンプルと接触させる工程、および(b)該試験サンプル中の該抗体とSTIgMAポリペプチド、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチドまたはPRO245ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出する工程を包含し、該複合体の形成が、該哺乳動物における炎症性障害の存在を示す、方法。

20

【請求項18】

哺乳動物において腫瘍の存在を検出する方法であって、該方法は、(a)該哺乳動物から採取した細胞の試験サンプル中のPRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドまたはPRO1868ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルと(b)同一細胞型の既知の正常細胞のコントロールサンプル中のPRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドまたはPRO1868ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルとを比較する工程を包含し、ここで、該コントロールサンプルと比較して、該試験サンプル中の該ポリペプチドのより高い発現レベルは、該哺乳動物の腫瘍における存在を示す、方法。

30

【請求項19】

哺乳動物における腫瘍を診断する方法であって、該方法は、(a)抗PRO301抗体、抗PRO362抗体、抗PRO245抗体および抗PRO1868抗体からなる群より選択される抗体を、該哺乳動物から入手した細胞の試験サンプルと接触させる工程、および(b)該試験サンプル中の抗PRO301抗体、抗PRO362抗体、抗PRO245抗体または抗PRO1868抗体それぞれと、PRO301ペプチド、PRO362ペプチド、PRO245ペプチドまたはPRO1868ペプチドそれぞれとの間の複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、該哺乳動物における腫瘍の存在を示す、方法。

40

【請求項20】

前記試験サンプルが、新生物の細胞成長または細胞増殖を有することが疑われる哺乳動物から入手される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記哺乳動物が、結腸癌、精巣癌、肺癌および乳癌からなる群より選択される疾患および障害に関する新生物の細胞成長または細胞増殖を有することが疑われる、請求項20に記

50

載の方法。

【請求項 22】

前記哺乳動物に、治療的に有効量の PRO1868 アゴニストを投与する工程を包含する、哺乳動物の骨および/または軟骨関連障害を処置する方法。

【請求項 23】

STIGMA ポリペプチド、PRO301 ポリペプチド、PRO362 ポリペプチド、PRO245 ポリペプチドまたは PRO1868 ポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の抗体であって、該抗体は、(1) 該 STIGMA ポリペプチドが配列番号 2、配列番号 32、配列番号 33 および配列番号 34 のポリペプチドからなる群より選択されるか、(2) 該 PRO301 ポリペプチドが配列番号 1 の配列を含むか、(3) 該 PRO362 ポリペプチドが配列番号 2 の配列を含むか、または、(4) 該 PRO245 ポリペプチドが配列番号 9 の配列を含む、抗体。

10

【請求項 25】

モノクローナル抗体である、請求項 23 または請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 26】

非ヒト相補性決定領域 (CDR) 残基およびヒトフレームワーク領域 (FR) 残基を含む、請求項 25 に記載の抗体。

【請求項 27】

標識される、請求項 26 に記載の抗体。

20

【請求項 28】

固体支持体上に固定される、請求項 27 に記載の抗体。

【請求項 29】

抗体フラグメント、単鎖抗体、または抗イディオタイプ抗体である、請求項 23 または請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の抗体を、薬学的に受容可能なキャリアと混合して含有する組成物。

【請求項 31】

二次抗体または細胞毒性剤または化学療法剤を、さらに含有する、請求項 30 に記載の組成物。

30

【請求項 32】

単離された核酸分子であって、該核酸分子は、配列番号 32 のアミノ酸 21 ~ 276、配列番号 33 のアミノ酸 21 ~ 182、配列番号 34 のアミノ酸 21 ~ 180、または配列番号 31 のアミノ酸 1 ~ 310 のアミノ酸配列と少なくとも約 80% の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む、核酸分子。

【請求項 33】

前記配列同一性が少なくとも約 85% である、請求項 32 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 34】

(a) 図 22 (配列番号 31) のアミノ酸残基 1 ~ 310 の配列を含む PRO1868 ポリペプチドをコードする DNA 分子、または (b) (a) の DNA 分子の相補体に対して少なくとも 80% の配列同一性を有する DNA を含む、単離された核酸。

40

【請求項 35】

図 22 (配列番号 31) のアミノ酸残基 1 ~ 310 を有する PRO1868 ポリペプチドをコードする DNA を含む、請求項 34 に記載の単離された核酸。

【請求項 36】

ATCC 受託番号 203553 の下で寄託された cDNA の全長コード配列に対して、少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する、単離された核酸。

【請求項 37】

配列番号 32 のアミノ酸 21 ~ 399、配列番号 33 のアミノ酸 21 ~ 305、および配

50

列番号 34 のアミノ酸 21 ~ 280 からなる群より選択されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 38】

請求項 32 ~ 請求項 37 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 39】

前記ベクターを用いて形質転換された宿主細胞によって識別される制御配列に、作動可能に結合した、請求項 38 に記載のベクター。

【請求項 40】

請求項 38 または請求項 39 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 41】

前記宿主細胞が、CHO 細胞、E. coli、酵母細胞およびバキュロウイルス感染昆虫細胞からなる群より選択される、請求項 40 に記載の宿主細胞。

【請求項 42】

PRO1868 ポリペプチドの発現に適した条件下で、請求項 41 に記載の宿主細胞を培養する工程、および該培養物から該ポリペプチドを回収する工程を包含する、PRO1868 ポリペプチドを産生するためのプロセス。

【請求項 43】

配列番号 32 のアミノ酸 21 ~ 276、配列番号 33 のアミノ酸 21 ~ 182、配列番号 34 のアミノ酸 21 ~ 180、配列番号 31 のアミノ酸 1 ~ 310、および配列番号アミノ酸 1 ~ X からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、X は、アミノ酸 237 ~ 247 のいずれか一つである、ポリペプチド。

【請求項 44】

ATCC 受託番号 203553 の下で寄託された cDNA の全長コード配列によってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 45】

異種アミノ酸配列に融合した、請求項 43 または請求項 44 に記載のポリペプチドを含む、キメラ分子。

【請求項 46】

前記異種アミノ酸配列が、エピトープタグまたは免疫グロブリンの Fc 領域である、請求項 45 に記載のキメラ分子。

【請求項 47】

免疫グロブリンの定常領域配列に融合した、配列番号 32 のアミノ酸 1 もしくは約 21 ~ 約 276、または配列番号 33 のアミノ酸 1 または約 21 ~ 約 182、配列番号 34 のアミノ酸 1 または約 21 ~ 約 180 を含む、イムノアドヘシン。

【請求項 48】

前記定常領域配列が、免疫グロブリン重鎖定常領域の配列である、請求項 47 に記載のイムノアドヘシン。

【請求項 49】

請求項 43 または 44 に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項 50】

前記抗体が、任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、前記ポリペプチドに特異的に結合するか、または該ポリペプチド上のエピトープに特異的に結合する、請求項 49 に記載の抗体。

【請求項 51】

モノクローナル抗体、ヒト化抗体または単鎖抗体である、請求項 50 に記載の単離された抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、一般に、存在が炎症性疾患（炎症関連抗原）および/または癌に関連する新規 DNA および新規ポリペプチドの同定、単離および組換え生成、ならびにこのような抗原によって特徴付けられる状態の診断および処置のための組成物および方法に関連する。

【背景技術】

【0002】

(関連技術の記述)

炎症性反応は、複雑であり、肥満細胞活性化、神経終末活性化、血小板活性化、白血球活性化および補体活性化によって局所的に産生される種々のシグナル分子によって媒介される。特定のこれらのシグナル分子は、内皮細胞の内面をより、多孔性にし、そして/または、特異的な炭水化物識別を介して、白血球を識別し、そして、誘引する細胞表面分子として作用する選択されたシグナル分子を発現させる。より強い白血球結合は、インテグリンによって媒介され、これは、内皮を介した白血球の移動を媒介する。さらなるシグナル分子は、化学誘引物質として作用し、結合した白血球を誘引物質の表面に向かって移動させる。他のシグナル分子は、炎症反応の過程で生成され、血液に流出し、骨髄を刺激し、より多くの白血球を生成させ、それらを血流中に放出する。

10

【0003】

炎症は、代表的に抗原によって惹起され、これは、実質的に免疫応答を惹起し得る任意の分子であり得る。正常な生理学的条件下で、これらは、外来の分子であるが、器官自体によって生成された分子は、触媒として機能し得、そして、このことは、種々の疾患状態で生じることが知られている。

20

【0004】

混合白血球培養または混合白血球反応（MLR）におけるT細胞増殖は、化合物の免疫系を刺激する能力の確立された徴候である。免疫応答において、応答する白血球は、好中性球性、好酸球性、単球性、またはリンパ球性であり得る。感染した組織の組織学的試験は、免疫刺激応答または免疫障害応答の証拠を提供する。Current Protocols in Immunology、John E. Coligan編、1994、John Wiley and Sons, Incを参照のこと。

【0005】

炎症性腸疾患（IBD）は、腸疾患（潰瘍性大腸炎（UC）およびクローン病の両方を含み、これらは、両方とも別個の疾患として分類されるが、共通の特徴を共有し、共通の症状も共有するようである）を集合的に記載するために使用される用語である。診断基準の共通性は、患者が二つの疾患のどちらを有するかを正確に決定することを困難にするが、それぞれの病変の型および位置は、代表的に異なっている。UC病変は、特徴的に粘膜の表在性潰瘍であり、大腸、直腸の近位に出現する。CD病変は、特徴的に広範囲の線状の裂溝であり、腸のどこにでも出現し、時には、胃、食道、および十二指腸にも出現する。

30

【0006】

IBDに対する従来処置は、通常、抗炎症剤または免疫抑制剤（例えば、スルファサラジン、コルチコステロイド、6-メルカプトプリン/アザチオプリン、またはサイクロスポリンが挙げられ、これらは全て、罹患した患者に部分的軽減をもたらす）の投与を含む。しかし、抗炎症/免疫抑制治療がうまくいかない場合、大腸切除術は、最後の防衛線である。外科手術は、診断後の一年以内に約30%のCD患者に必要であり、従って、手術手順は、年に約5%増加しているようである。残念ながら、CDはまた、高い割合の再発性を有し、約5%の患者が最初の年の後、次の外科手術を必要とする。UC患者はさらに、実質的に大腸直腸癌を発症する危険性が増加する。おそらくこれは、再増殖後の上皮に対する傷害の再発周期のためであり、これは、継続的に、新生物形成の危険性を増加する。

40

【0007】

50

最近、発見されたジャンクション接着分子 (J u n c t i o n a l A d h e s i o n M o l e c u l e (J A M)) として知られる免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは、種々の起源の内皮細胞および上皮細胞の細胞内接合部で選択的に濃縮されるものとして同定された。Martin-Padura, I.ら、J. Cell Biol. 142 (1) : 117 - 27 (1998)。JAMは、二つのV型の細胞外、鎖内ジスルフィド環を有するI型内在性膜タンパク質である。JAMは、A33抗原と実質的に相同性を有する (図1または図18)。JAMに関するモノクローナル抗体は、インビトロで、内皮細胞単層を通る自発性およびケモカイン誘導性単球移動を阻害することが見出されている。Martin-Padura、前出。JAM発現が、大腸炎を有するCRF2-4-/-マウスの大腸で増加することが最近発見された。CRF2-4-/- (IL-10Rサブユニットノックアウトマウス) は、リンパ球、単球および好中球によって媒介される自発性大腸炎を発症する。数匹のこの動物は、大腸腺癌も発症する。結果として、本明細書中に開示されるポリペプチドは、ヒト疾患 (例えば、炎症性腸疾患、他の腸の炎症性疾患ならびに大腸癌) において、またはヒト疾患と関連する他の場所において、発現レベルが上昇するようである。

【0008】

JAMおよび本明細書中に開示されるポリペプチドは、A33抗原 (大腸直腸癌結合マーカーとして公知である) に対して顕著な相同性を有する。A33抗原は、初期大腸癌または転移性大腸癌ならびに正常大腸上皮の90%より多くで発現している。大腸粘膜に起因する癌において、A33抗原は、全ての症例の95%より多くで、均質に発現する。しかし、A33抗原は、広範な他の正常な組織では、検出されなかった。すなわち、その発現は、器官特異的であるようである。従って、A33抗原は、大腸癌の誘発において、重要な役割を果たすようである。

【0009】

大腸癌は、広範な疾患であるので、初期診断および初期処置が重要な医学的目的である。大腸癌の診断および処置は、特異的なモノクローナル抗体 (m A b s) (蛍光タグ、磁性タグ、または放射活性タグを有する) を用いて実施され得る。放射活性遺伝子、毒素および/または薬物標識したmAbは、最小限の患者の性状を備えるインサイチュの処置のために使用され得る。mAbはまた、大腸癌の診断および処置の間の診断に使用され得る。例えば、A33抗原の血清レベルが患者で上昇している場合、その外科手術後のそのレベルの降下は、腫瘍切除が成功したことを示している。他方で、外科手術後の血清A33抗原のその後の上昇は、元の腫瘍の転移が生じている可能性、または新規の初期腫瘍が出現している可能性を示している。

【0010】

このようなモノクローナル抗体は、外科手術および/もしくは他の化学療法の代わりに、または外科手術および/もしくは他の化学療法と組み合わせて使用され得る。例えば、A33に対するmAbを用いた大腸癌に感染した患者の前臨床分析および局在化研究は、Weltら、J. Clin. Oncol. 8 : 1894 - 1906 (1990) およびWeltら、J. Clin. Oncol. 12 : 1561 - 1571 (1994) 中に記載されるが、U.S.P. 4,579,827およびU.S.S.N. 424,991 (E . P . 199,141) は、モノクローナル抗体の治療的投与に関し、後者は、抗A33mAbの適用に関する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

(発明の要旨)

一局面において、本発明は、一般に免疫関連疾患 (哺乳動物 (ヒトを含む) における炎症性疾患を含む) の診断および処置に有用な組成物および方法に関する。本発明は、一部、哺乳動物における免疫応答に關与する化合物 (ポリペプチドおよび抗体が挙げられる) の同定に基づいている。

【0012】

一局面において、本発明は、哺乳動物の炎症性障害を処置する方法に関し、ネイティブの配列STIGMAポリペプチド、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチドまたはPRO245ポリペプチドのアンタゴニストの治療的に有効量を、哺乳動物に投与する工程を包含する。

【0013】

一実施形態において、STIGMAポリペプチドは、配列番号2、配列番号32、配列番号33および配列番号34のポリペプチドからなる群より選択される。PRO301ポリペプチドは、配列番号1の配列を含む。PRO362ポリペプチドは、配列番号2の配列を含む。PRO245ポリペプチドは、配列番号9の配列を含む。

10

【0014】

別の実施形態において、アンタゴニストは、抗体（例えば、モノクローナル抗体）であり、その抗体は、非ヒト相補性決定領域（CDR）残基を有し、ヒトフレームワーク領域（FR）残基を含む。モノクローナル抗体は、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤との混合物中の組成であり得る。

【0015】

さらなる実施形態において、アンタゴニストは、イムノアドヘシンであって、これは、免疫グロブリン定常領域配列に融合したSTIGMAポリペプチド、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチドまたはPRO245ポリペプチドの細胞外領域配列を含む。

20

【0016】

別の実施形態において、炎症性障害は、炎症性腸疾患；全身性エリテマトーデス；慢性関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身性硬化症、例えば、強皮症；特発性炎症性筋障害、例えば、皮膚筋炎、多発性筋炎；シェーグレン症候群；全身性脈管炎；サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、例えば、免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症；自己免疫性血小板減少症、例えば、特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介性血小板減少症；甲状腺炎、例えば、グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎；糖尿病、免疫媒介性腎疾患、例えば、糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎；中枢神経系および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症）、特発性多発神経障害；肝胆道疾患（例えば、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎および非肝親和性ウイルスなどの感染性肝炎；自己免疫性慢性活動性肝炎；原発性胆汁性肝硬変；肉芽腫性肝炎；および硬化性胆管炎；炎症性肺疾患および線維性肺疾患（例えば、嚢胞性線維症）；グルテン過敏性腸疾患；ホウィップル病；自己免疫性または免疫媒介性皮膚疾患（水疱性皮膚疾患、多形性紅斑および接触皮膚炎、乾癬が挙げられる）；肺のアレルギー性疾患（好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）、移植関連疾患（移植片拒絶および移植片対宿主病）からなる群より選択される。

30

【0017】

別の局面において、本発明は、治療的に有効量のPRO362アンタゴニストを投与する工程を包含する哺乳動物における炎症性障害を処置する方法を提供する。炎症性障害は、好ましくは、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、慢性肝炎、肺炎、慢性喘息および気管支炎からなる群より選択される。

40

【0018】

別の局面において、本発明は、哺乳動物における炎症性障害を処置する方法を提供し、この方法は、治療的に有効量のPRO245アンタゴニストを投与する工程を包含する。炎症性障害は、好ましくは、肺炎、乾癬、腎炎、虫垂炎、およびアテローム性硬化症からなる群より選択される。

【0019】

異なる局面において、本発明は、哺乳動物における炎症性疾患を診断する方法に関し、上記方法は、（a）上記哺乳動物から入手した細胞の試験サンプル中、および（b）同一細胞型の既知の正常細胞のコントロールサンプル中のSTIGMAポリペプチド、PRO

50

301ポリペプチド、PRO362ポリペプチドまたはPRO245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工程を包含し、ここで、上記コントロールサンプルと比較して、上記試験サンプル中のより高いレベルの上記遺伝子の発現は、上記試験組織細胞が入手された上記哺乳動物における免疫関連障害の存在を示す。

【0020】

さらなる局面において、本発明は、哺乳動物の炎症性障害を診断する方法に関し、上記方法は、(a)抗STIGMA抗体、抗PRO301抗体、抗PRO362抗体または抗PRO245抗体を上記哺乳動物から入手した細胞の試験サンプルと接触させる工程、および(b)試験サンプル中の上記抗体とSTIGMAポリペプチド、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチドまたはPRO245ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出する工程を包含し、上記複合体の形成は、上記哺乳動物の炎症性障害の存在を示す。上記抗体は、検出可能な標識を有する。複合体形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、または当該分野で公知の他の技術によってモニタリングされ得る。

10

【0021】

なお別の局面において、本発明は、哺乳動物における腫瘍の存在を検出する方法を提供し、この方法は、(a)哺乳動物から採取した細胞の試験サンプル中のPRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドまたはPRO1868ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを、(b)同一細胞型の既知の正常細胞のコントロールサンプル中のPRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドまたはPRO1868ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルと比較する工程を包含し、ここで、上記コントロールサンプルと比較して、上記試験サンプル中の高い発現レベルは、試験組織細胞を入手した哺乳動物中の腫瘍の存在を示す。

20

【0022】

別の局面において、本発明は、哺乳動物において腫瘍を診断する方法を提供し、本方法は、以下：(a)抗PRO301抗体、抗PRO362抗体、抗PRO245抗体、および抗PRO1868抗体からなる群から選択される抗体を哺乳動物から得られた細胞の試験サンプルと接触させる工程、ならびに(b)試験サンプルにおいて、それぞれ抗PRO301抗体、抗PRO362抗体、抗PRO245抗体もしくは抗PRO1868抗体とPRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドとの間の複合体形成を検出する工程、を包含する。この複合体形成は、哺乳動物における腫瘍の存在を示す。この抗体は、好ましくは、検出可能な標識を保有する。複合体形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、もしくは他の当該分野で公知の技術によってモニタリングされ得る。好ましくは、試験サンプルは、新生物細胞(例えば、癌細胞)の成長もしくは増殖を有することが疑われる哺乳動物から得られる。新生物細胞の成長もしくは増殖は、例えば、結腸癌、睾丸癌、肺癌、および乳癌からなる群から選択される疾患もしくは障害に関連し得る。

30

【0023】

別の局面において、本発明は、哺乳動物において障害に関連する骨および/もしくは軟骨を処置する方法を提供する。本方法は、この哺乳動物に、治療的に有効量のPRO1868アゴニストを投与する工程を包含する。

40

【0024】

本発明は、STIGMAポリペプチド、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチド、もしくはPRO1868ポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体にさらに関連する。この抗体は、例えば、非ヒト相補性決定領域(CDR)残基およびヒトフレームワーク領域(FR)残基をさらに含み得る、抗体フラグメント、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、もしくはモノクローナル抗体であり得る。一つの実施形態において、この抗体は標識される。さらなる実施形態において、この抗体は、固体支持体に固定化され得る。

50

【 0 0 2 5 】

別の実施形態において、本発明は、薬学的に受容可能なキャリアもしくは賦形剤と混合された、S T I g M Aポリペプチド、P R O 3 0 1ポリペプチド、P R O 3 6 2ポリペプチド、P R O 2 4 5ポリペプチドもしくはP R O 1 8 6 8ポリペプチド、またはS T I g M A抗体、P R O 3 0 1抗体、P R O 3 6 2抗体、P R O 2 4 5抗体もしくはP R O 1 8 6 8抗体を含む組成物を提供する。一つの局面において、この組成物は、さらなる活性成分を含む。この活性成分は、例えば、さらなる抗体、または細胞障害性剤もしくは化学療法剤であり得る。

【 0 0 2 6 】

異なる局面において、本発明は、単離された核酸分子に関する。この核酸分子は、配列番号32のアミノ酸21~276、もしくは配列番号33のアミノ酸21~182、もしくは配列番号34のアミノ酸21~180のアミノ酸配列と、少なくとも約80%、もしくは少なくとも約85%、もしくは少なくとも約90%、もしくは少なくとも約95%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 2 7 】

別の局面において、本発明は、単離された核酸分子を提供する。この核酸分子は、配列番号32のアミノ酸21~399、配列番号33のアミノ酸21~305、および配列番号34のアミノ酸21~280からなる群から選択されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【 0 0 2 8 】

別の局面において、本発明は、単離された核酸分子を提供する。この核酸分子は、以下：(a)図22(配列番号31)のアミノ酸1~310の配列を含むP R O 1 8 6 8ポリペプチドをコードする、DNA分子、または(b)(a)のDNA分子の相補体、に対して、少なくとも約80%の配列同一性を有するDNAを含む。この配列同一性は、好ましくは約85%、より好ましくは約90%、最も好ましくは約95%である。一つの実施形態において、この単離された核酸は、図22(配列番号31)のアミノ酸残基1~310を有するP R O 1 8 6 8ポリペプチドをコードするDNAを含む。

【 0 0 2 9 】

別の局面において、本発明は、A T C C受託番号(A T C C e x p r e s s i o n n u m b e r) 2 0 3 5 5 3として保管されるcDNAの全長をコードする配列と、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する、単離された核酸を提供する。

30

【 0 0 3 0 】

本発明は、本発明の核酸を含むベクターおよび細胞に、さらに関する。一つの実施形態において、このベクターは、宿主細胞によって認識されてベクターによって形質転換される制御配列に、操作可能に連結され得る。このようなベクターを含む宿主細胞も、また提供され得る。例えば、この宿主細胞は、C H O、E . c o l i、酵母、もしくはバキュロウイルス感染昆虫細胞であり得る。P R O 1 8 6 8ポリペプチドを生成するためのプロセスがさらに提供され、このプロセスは、このポリペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養する工程、およびこの細胞培養物からこのポリペプチドを回収する工程を包含する。

40

【 0 0 3 1 】

別の局面において、本発明は、配列番号32のアミノ酸21~276、配列番号33のアミノ酸21~182、および配列番号34のアミノ酸21~180からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチドに関する。

【 0 0 3 2 】

なお別の局面において、本発明は、単離されたP R O 1 8 6 8ポリペプチドを提供する。特に、一つの実施形態において、本発明は、図22(配列番号31)の残基1~310を含むアミノ酸配列を含む、単離されたネイティブ配列P R O 1 8 6 8を提供する。本発明のさらなる実施形態は、図22(配列番号31)のアミノ酸1~Xを含む単離されたP

50

PRO1868ポリペプチドに指向する(ここで、Xは、アミノ酸237~247のいずれか一つである(any one or amino acids 237 to 247))。

【0033】

なお別の局面において、本発明は、ATCC受託番号203553で保管されるcDNAの全長をコードする配列にコードされるアミノ酸配列と、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する、単離されたポリペプチドを提供する。

【0034】

なお別の実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドもしくは異種アミノ酸配列に融合したPRO1868ポリペプチドを含む、キメラ分子を提供する。一つの実施形態において、このキメラ分子は、エピトープタグ配列もしくは免疫グロブリンのFc領域に融合したPRO1868ポリペプチドを含む。

10

【0035】

なお別の局面において、本発明は、イムノアドヘシンに関する。このイムノアドヘシンは、免疫グロブリン定常領域配列に融合した、配列番号32のアミノ酸1もしくは約21~約276、または配列番号33のアミノ酸1もしくは約21~約182、または配列番号34のアミノ酸1もしくは約21~約180を含む。

【0036】

別の実施形態において、本発明は、単離された抗体を提供する。この単離された抗体は、以下からなる群から選択されるポリペプチドに特異的に結合する：図2(配列番号1)のアミノ酸残基28~235、図2(配列番号1)のアミノ酸残基28~約258、図2(配列番号1)のアミノ酸残基28~299、もしくは図2(配列番号1)のアミノ酸残基1~299を含む、単離されたPRO301ポリペプチド；図3(配列番号2)のアミノ酸残基1~321、もしくは図3(配列番号2)で示されるアミノ酸配列のアミノ酸1~X(ここで、Xは、アミノ酸271~280のいずれか一つである)を含む、単離されたPRO562ポリペプチド；図22(配列番号31)のアミノ酸残基1~310、もしくは図22(配列番号31)で示されたアミノ酸配列のアミノ酸残基1~X(ここで、Xは、アミノ酸237~247のいずれか一つ)を含む、単離されたネイティブ配列PRO1868ポリペプチド；および、配列番号9のアミノ酸1~312を含む、単離されたPRO245ポリペプチド。一つの実施形態において、この単離された抗体は、他のポリペプチドもしくはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、このポリペプチドに特異的に結合するか、またはこのポリペプチド上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態において、この抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、もしくは単鎖抗体である。

20

30

【0037】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

(I. 定義)

本明細書中で使用される場合、用語「PRO301」、「PRO362」、「PRO245」、「PRO1868」または「PRO301ポリペプチド」、「PRO362ポリペプチド」、「PRO245ポリペプチド」、「PRO1868ポリペプチド」、および「癌関連抗原」は、ネイティブ配列PRO301、PRO362、PRO245、もしくはPRO1868のそれぞれ、およびそれらの改変体(これらは、本明細書中でさらに定義される)を含む。加えて、用語「PRO301」および「JAM-1」は、用語「PRO362」、「JAM4」、「STIGMA」、および「STIGMA」のように、交換可能に使用される。さらに、用語「PRO245」、「JAM-IT」および「JAM-2」は、用語「PRO1868」、「SHATR」および「JAM-3」のように、交換可能に使用される。PRO301、PRO362、PRO245、もしくはPRO1868ポリペプチドは、種々の供給源から(例えば、ヒト組織型からかもしくは他の供給源から)単離され得るか、または組み換え法もしくは合成法によって調製され得る。上記のように、列挙した名称は、それぞれのネイティブ配列分子およびそれらの改変体を参照する

40

50

ために使用される。

【0038】

したがって、例えば、STIGMAとしては、以下を含むポリペプチドが挙げられる：配列番号2のアミノ酸1～321；配列番号2のアミノ酸1～X（ここで、Xは、アミノ酸271～280のいずれか）；配列番号2のアミノ酸21～321；配列番号2のアミノ酸21～X（ここで、Xは、アミノ酸271～280のいずれか）；配列番号32のアミノ酸1～399；配列番号32のアミノ酸21～399；配列番号33のアミノ酸1～305；配列番号33のアミノ酸21～305；配列番号34のアミノ酸1～280；配列番号34のアミノ酸21～280；細胞外ドメイン、ならびに一部および全ての膜貫通ドメインが、欠失させられたかもしくは不活性化されている改変体。

10

【0039】

用語「炎症性疾患」および「炎症性障害」は、交換可能に使用されて、哺乳動物の免疫系の構成要素が、その哺乳動物における病的状態の原因となる炎症反応を引き起こすか、媒介するか、さもなくばその炎症反応の原因となる疾患もしくは障害を意味する。疾患における炎症反応の軽減がその疾患の進行の軽減効果を有する疾患も、また含まれる。自己免疫疾患を含む免疫介在性炎症反応は、この用語に含まれる。

【0040】

用語「T細胞介在性」疾患とは、T細胞が直接もしくは間接的に、哺乳動物における病的状態を媒介するかさもなくばその病的状態の原因となる疾患を意味する。T細胞介在性疾患は、細胞介在性効果、リンフォカイン介在性効果などに関連し得、かつ、B細胞が、T細胞に分泌されたリンフォカインによって刺激される場合、B細胞に関連する効果にさえ関連し得る。

20

【0041】

免疫関連疾患および炎症性疾患の例（そのいくつかは、T細胞介在性である）としては、限定ではなく、以下が挙げられる：炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症（強皮症）、特発性炎症性ミオパシー（皮膚筋炎、多発性筋炎）、シェーグレン症候群、全身性脈管炎（*vasculitis*）、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫性、汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症、自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫介在性血小板減少症）、甲状腺炎（グレーブズ病、橋本甲状腺炎、リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、真性糖尿病、免疫介在性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）、中枢および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、多発性神経障害、肝胆道疾患（例えば、感染性肝炎（肝炎A、B、C、D、Eおよび他の非肝親和性（*nonhepatotropic*）ウイルス、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、および硬化性胆管炎）、炎症性および線維性肺疾患（例えば、嚢胞性線維症）、グルテン過敏性腸症、ホウィップル病、自己免疫性もしくは免疫介在性皮膚疾患（水疱性皮膚疾患、多形性紅斑および接触皮膚炎を含む）、乾癬、肺のアレルギー性疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎、移植関連疾患（移植片拒絶および対宿主性移植片病を含む）。

30

【0042】

本明細書中で使用される場合、「腫瘍」とは、悪性であろうと良性であろうと、全ての新生物細胞の成長および増殖、ならびに全ての前癌性細胞および前癌性組織を指す。

40

【0043】

用語「癌」および「癌性」とは、無秩序な細胞成長によって代表的に特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態を指すかもしくは説明する。癌の例としては、限定することなく、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、および白血病が挙げられる。さらに具体的には、このような癌の例としては、以下が挙げられる：乳癌、前立腺癌、結腸癌、扁平上皮細胞癌、小細胞性肺癌、非小細胞性細胞肺癌、胃腸管系の癌、膵臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーム、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、ならびに種々の型の頭部および頸部の癌。

50

【0044】

「処置」とは、疾患の病理の発生を予防するかもしくは疾患の病理を変化させる意図で行われる介入である。したがって、「処置」とは、治療的処置と予防的 (prophylactic) もしくは予防的 (preventative) 手段との両方を指す。処置を必要とする人々としては、既に障害を有する人々およびその障害が予防されるべき人々が挙げられる。免疫関連疾患に処置において、治療剤は、免疫応答の構成要素の反応の大きさを直接的に変化させ得るか、または疾患を、他の治療剤 (例えば、抗生剤、抗菌剤、抗炎症剤、化学療法剤など) による処置に対してより感受性にさせ得る。

【0045】

免疫関連疾患の「病理」とは、患者の健康状態を損なう全ての現象を含む。これには、限定ではなく、以下が挙げられる：異常もしくは制御できない細胞成長 (好中球、好酸球、単球、リンパ球細胞)、抗体産生、自己抗体産生、補体産生、近隣細胞の正常機能の妨害、サイトカインもしくは他の分泌産生物の異常なレベルでの放出、炎症反応もしくは免疫応答の抑制もしくは悪化、炎症細胞 (好中球、好酸球、単球、リンパ球) の細胞間隙への浸潤、など。

【0046】

本明細書中で使用される場合、用語「哺乳動物」とは、哺乳動物に分類される任意の動物を指し、これには、限定ではなく、ヒト、家畜 (domestic animal) および家畜 (farm animal)、ならびに動物園の動物、競技用動物もしくは愛玩動物 (例えば、ウマ、ブタ、ウシ、イヌ、ネコ、およびフェレットなど) が挙げられる。本発明の好ましい実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。

【0047】

一種類以上の治療剤と「組み合わせ」での投与とは、同時 (simultaneous) (同時 (concurrent)) および任意の順番での連続的な投与を含む。

【0048】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞傷害剤」とは、細胞の機能を阻害するかもしくは妨害する物質、および/または細胞を死滅させる物質を指す。この用語は、放射性同位体 (例えば、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} および Re^{186})、化学療法剤、ならびに毒素 (例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の、酵素学的に活性な毒素、またはそれらのフラグメント) を含むことを意図される。

【0049】

「化学療法剤」とは、癌の処置に有用な化合物である。化学療法剤の例としては、以下が挙げられる：アドリアマイシン、ドキソルピシン、エピルピシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド (「Ara-C」)、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソイド (例えば、パクリタキセル (Taxol (登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) およびドキセタキセル (Taxotere (登録商標)、Rhône-Poulenc Roher, Antony, France)、トキシテレ (toxotere)、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ピンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ピンクリスチン (ロークリスチン (Loucristine))、ピノレルピン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン (米国特許第4,675,187号を参照のこと)、メルファランならびに他の関連するナイトロジェンマスタード。この定義にはまた、腫瘍におけるホルモン作用を調節もしくは阻害するように作用するホルモン剤 (例えば、タモキシフェンおよびオナプリストン) が含まれる。

【0050】

本明細書中で使用される場合、「成長阻害剤」とは、細胞 (特に本明細書中で同定される任意の遺伝子を、インビトロもしくはインビボで発現もしくは過剰発現する癌細胞) の成長を阻害する化合物もしくは組成物を指す。したがって、成長阻害剤とは、S期にこの

10

20

30

40

50

ような遺伝子を発現もしくは過剰発現する細胞のパーセンテージを有意に減少させる薬剤である。成長阻害剤の例としては、細胞周期の進行をS期以外で)ブロックする薬剤(例えば、G1期停止およびM期停止を誘導する薬剤)が挙げられる。古典的M期ブロッカーとしては、以下が挙げられる:ピンカアルカロイド(ピンクリスチンおよびピンブラスチン)、タキソール、およびトポIIインヒビター(例えば、ドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、およびブレオマイシン)。G1を停止させるこれらの薬剤はまた、S期停止に及ぶ(例えば、DNAアルキル化剤(例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、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、およびara-C))。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer、MendelsohnおよびIsrael(編) 10、第1章、Murakamiら(WB Saunders、Philadelphia、1995)による、表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(特に13ページ)、に見出され得る。

【0051】

用語「サイトカイン」は、一細胞集団によって放出されて、別の細胞で細胞間メディエータとして作用するタンパク質についての総称である。このようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、および伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインとして挙げられものは、以下である:成長ホルモン(例えば、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモン)、副甲状腺ホルモン、サイロキシン、インシュリン、プロインシュリン、レラキシン、プロレラキシン、糖タンパク質ホルモン(例えば、卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、および黄体形成ホルモン(LH))、肝成長ホルモン、線維芽細胞成長因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、腫瘍壊死因子- および、ミューラー阻害物質、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、インヒピン、アクチピン、血管内皮成長因子、インテグリン、トロンボポエチン(TPO)、神経成長因子(例えば、NGF-)、血小板成長因子、トランスフォーミング成長因子(TGF)(例えば、TGF- およびTGF-)、インシュリン様成長因子IおよびII、エリスロポエチン(EPO)、骨誘導性因子、インターフェロン(例えば、インターフェロン-、-、および-;コロニー刺激因子(CSF)(例えば、マクロファージ-CSF(M-CSF)、顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)、および顆粒球-CSF(G-CSF)、インターロイキン(IL)(例えば、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12)、腫瘍壊死因子(例えば、TNF- およびTNF-)、ならびに、LIFおよびキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子。本明細書中で使用される場合、用語サイトカインは、天然供給源由来もしくは組み換え細胞培養物のタンパク質、およびネイティブ配列サイトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

【0052】

「治療的有効量」とは、活性PRO301アンタゴニスト、活性PRO362アンタゴニスト、活性PRO245アンタゴニストもしくは活性PRO1868アンタゴニスト、または活性PRO301アゴニスト、活性PRO362アゴニスト、活性PRO245アゴニストもしくは活性PRO1868アゴニストの量であり、これは、おそらく、炎症反応の場合のように、測定可能な阻害もしくは刺激を達成するのに必要とされる。

【0053】

「ネイティブ配列PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868」は、天然由来のPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868とそれぞれ同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。このようなネイティブ配列PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868は、自然から単離されるかまたは組み換え法もしくは合成法によって作製され得る。「ネイティブ配列PRO301」、「ネイティブ配列PRO362」、「ネイティブ配列PRO245」および「ネ 50

イティブ配列「PRO1868」は、天然に存在する、切断もしくは分泌された形態のPRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868のそれぞれ（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然に存在する改変体形態（あるいは、スプライシングされた形態）、および天然に存在する対立遺伝子改変体のPRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868のそれぞれ、を特異的に含む。

【0054】

一つの実施形態において、ネイティブ配列PRO301は、成熟または全長ネイティブ配列PRO301であって、図2（配列番号1）のアミノ酸1～299を含む（これは、N末端シグナル配列を含むかまたは含まず、1位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約236位～約258位に潜在的膜貫通ドメインを含むかまたは含まず、約259位～約299位に細胞内ドメインを含むかまたは含まない）。

10

【0055】

別の実施形態において、ネイティブ配列STIGMAポリペプチドは、成熟または全長ネイティブ配列PRO362であって、図3（配列番号2）のアミノ酸1～321を含む（これは、N末端シグナル配列を含むかまたは含まず、1位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約276位～約306位に潜在的膜貫通ドメインのいずれかもしくは全てを含むかまたは含まず、約307位～約321位に細胞内ドメインを含むかまたは含まない）。一つの実施形態において、ネイティブ配列STIGMAポリペプチドは、成熟または全長ポリペプチドであって、配列番号32（huSTIGMA）のアミノ酸1～399を含む（これは、N末端シグナル配列を含むかまたは含まず、1位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約277位～約300位に潜在的膜貫通ドメインのいずれかもしくは全てを含むかまたは含まない）。なおさらなる実施形態において、ネイティブ配列STIGMAポリペプチドは、成熟または全長ポリペプチドであって、配列番号33（huSTIGMA short）のアミノ酸1～305を含む（これは、N末端シグナル配列を含むかまたは含まず、1位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約183位～約206位に潜在的膜貫通ドメインのいずれかもしくは全てを含むかまたは含まない）。異なる実施形態において、ネイティブ配列STIGMAポリペプチドは、成熟または全長ポリペプチドであって、配列番号34（muSTIGMA）のアミノ酸1～280を含む（これは、N末端シグナル配列を含むかまたは含まず、1位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約181位～約204位に潜在的膜貫通ドメインのいずれかもしくは全てを含むかまたは含まない）。

20

30

【0056】

なお別の実施形態において、ネイティブ配列PRO245ポリペプチドは、成熟または全長ネイティブ配列PRO245ポリペプチドであって、図11（配列番号9）のアミノ酸1～312を含む（これは、N末端シグナル配列を含むかまたは含まず、1位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、潜在的膜貫通ドメインを含むかまたは含まず、細胞内ドメインを含むかまたは含まない）。

【0057】

なお別の実施形態において、ネイティブ配列PRO1868ポリペプチドは、成熟または全長ネイティブ配列PRO1868ポリペプチドであって、図22（配列番号31）のアミノ酸1～310を含む（これは、N末端シグナル配列を含むかまたは含まず、1位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約242位～約266位に潜在的膜貫通ドメインを含むかまたは含まず、約267位～約310位に細胞内ドメインを含むかまたは含まない）。

40

【0058】

「PRO301、PRO362（STIGMA）、PRO245もしくはPRO1868細胞外ドメイン」、または「PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868 ECD」とは、それぞれ、PRO301ポリペプチド、PRO362（STIGMA）ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドの形態を指す。この形態は、本質的に、それぞれの全長分子の膜貫通ドメインおよび細

50

胞質内ドメインを含まない。通常、PRO301 ECD、PRO362 (STIGMA) ECD、PRO245 ECDもしくはPRO1868 ECDは、このような膜貫通ドメインおよび/もしくは細胞質内ドメインを1%以上有さず、そして好ましくは、このようなドメインを0.5%以上有さない。

【0059】

必要に応じて、PRO301ポリペプチドECDは、アミノ酸残基1もしくは約28~Xを含む(ここで、Xは、図2(配列番号1)のアミノ酸231~アミノ酸241に由来する任意のアミノ酸である)。

【0060】

必要に応じて、PRO362 (STIGMA)ポリペプチドECDは、図3(配列番号2)もしくは配列番号32のアミノ酸残基1もしくは約21~Xを含む(ここで、Xは、アミノ酸271~アミノ酸281に由来する任意のアミノ酸である)か、または配列番号33のアミノ酸残基1もしくは約21~Xを含む(ここで、Xは、アミノ酸178~アミノ酸186に由来する任意のアミノ酸である)か、または配列番号34のアミノ酸残基1もしくは約21~Xを含む(ここで、Xは、配列番号34のアミノ酸176~アミノ酸184に由来する任意のアミノ酸である)。

10

【0061】

必要に応じて、PRO245ポリペプチドECDは、アミノ酸残基1もしくは約29~Xを含む(ここで、Xは、配列番号34のアミノ酸232~アミノ酸242に由来する任意のアミノ酸である)。

20

【0062】

必要に応じて、PRO1868ポリペプチドECDは、アミノ酸残基1もしくは約31~Xを含む(ここで、Xは、配列番号34のアミノ酸237~アミノ酸247に由来する任意のアミノ酸である)。

【0063】

本発明のPRO301、PRO362 (STIGMA)、PRO245もしくはPRO1868ポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインが、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野で慣習的に利用される基準に応じて同定されることが、理解される。膜貫通ドメインの正確な境界は変動し得る。しかし変動はたいがい、最初に同定されたようなドメインのいずれかの端で、約5アミノ酸までである。

30

【0064】

「PRO301改変体」とは、後述で定義されるような活性PRO301を意味し、以下に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する：(a)PRO301ポリペプチドをコードするDNA分子(ここで、そのネイティブシグナル配列を含むかもしくは含まず、開始メチオニンを含むかもしくは含まず、潜在的膜貫通ドメインを含むかもしくは含まず、そして細胞内ドメインを含むかもしくは含まない)、または(b)(a)のDNA分子の相補体。特定の実施形態において、PRO301改変体は、全長ネイティブ配列PRO301に関して図1(配列番号1)に示される推定アミノ酸配列を有するPRO301と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。このようなPRO301改変体としては、例えば、図2(配列番号1)の配列のN末端もしくはC末端において一つ以上のアミノ酸残基が付加されるかもしくは欠失させられたPRO301ポリペプチドが挙げられる。好ましくは、この核酸もしくはアミノ酸配列同一性は、少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、そしてなおより好ましくは少なくとも約95%である。好ましくは、最も高度な配列同一性は、細胞外ドメイン(図2、配列番号1のアミノ酸28~235)内で生じる。

40

【0065】

「PRO245改変体」とは、後述で定義されるような活性PRO245を意味し、以下に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する：(a)PRO245ポリペプチドをコードするDNA分子(ここで、そのネイティブシグナル配列を含むかもしくは含まず、開始メチオニンを含むかもしくは含まず、潜在的膜貫通ドメインを含むかもし

50

くは含まず、そして細胞内ドメインを含むかもしくは含まない)、または(b)(a)のDNA分子の相補体。特定の実施形態において、PRO245変体は、全長ネイティブ配列PRO245に関して図1(配列番号9)に示される推定アミノ酸配列を有するPRO245と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。このようなPRO245変体としては、例えば、配列番号9の配列のN末端もしくはC末端において一つ以上のアミノ酸残基が付加されるかもしくは欠失させられたPRO245ポリペプチドが挙げられる。好ましくは、この核酸もしくはアミノ酸配列同一性は、少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、そしてなおより好ましくは少なくとも約95%である。

【0066】

「PRO362変体」とは、後述で定義されるような活性PRO362を意味し、以下に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する:(a)PRO362ポリペプチドをコードするDNA分子(ここで、そのネイティブシグナル配列を含むかもしくは含まず、開始メチオニンを含むかもしくは含まず、潜在的膜貫通ドメインを含むかもしくは含まず、そして細胞内ドメインを含むかもしくは含まない)、または(b)(a)のDNA分子の相補体。特定の実施形態において、PRO362変体は、全長ネイティブ配列PRO362に関して図3(配列番号2)に示される推定アミノ酸配列を有するPRO362と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。このようなPRO362ポリペプチド変体としては、例えば、図3(配列番号2)の配列のN末端もしくはC末端において、一つ以上のアミノ酸残基が付加されるかもしくは欠失させられた、PRO362ポリペプチドが挙げられる。通常、PRO362ポリペプチド変体は、図3(配列番号2)のアミノ酸配列と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、そしてなおより好ましくは、約95%のアミノ酸配列同一性を有する。好ましくは、最も高度な配列同一性は、細胞外ドメイン(図3、配列番号2のアミノ酸1~X、ここでXは、アミノ酸残基271~281のいずれか)内で生じる。

【0067】

「STIGMA変体」は、上記で定義されたPRO362変体を(配列番号32、33、および34の変体ともに)、特に含む。特に、STIGMA変体は、以下で定義されるような活性STIGMAポリペプチドを特に含み、以下に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する:(a)配列番号32、33もしくは34のポリペプチドをコードするDNA分子(ここで、そのネイティブシグナル配列を含むかもしくは含まず、開始メチオニンを含むかもしくは含まず、潜在的膜貫通ドメインの一部もしくは全てを含むかまたは含まず、そして細胞内ドメインを含むかもしくは含まない)、または(b)(a)のDNA分子の相補体。特定の実施形態において、STIGMA変体は、配列番号32、33もしくは34の推定アミノ酸配列を有するSTIGMA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。このようなSTIGMA変体としては、例えば、配列番号32、33もしくは34の配列のN末端もしくはC末端において、一つ以上のアミノ酸残基が付加されるかもしくは欠失させられた、STIGMAポリペプチドが挙げられる。通常、STIGMAポリペプチド変体は、配列番号32、33もしくは34のアミノ酸配列と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、そしてなおより好ましくは、約95%のアミノ酸配列同一性を有する。好ましくは、最も高度な配列同一性は、細胞外ドメイン内で生じる。

【0068】

「PRO1868変体」とは、後述で定義されるような活性PRO1868を意味し、以下に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する:(a)PRO1868ポリペプチドをコードするDNA分子(ここで、そのネイティブシグナル配列を含むかもしくは含まず、開始メチオニンを含むかもしくは含まず、潜在的膜貫通ドメインを含むかもしくは含まず、そして細胞内ドメインを含むかもしくは含まない)、または(b)(

10

20

30

40

50

a) のDNA分子の相補体。特定の実施形態において、PRO1868 変体は、全長ネイティブ配列PRO1868をコードする配列番号31に示される推定アミノ酸配列を有するPRO1868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。このようなPRO1868ポリペプチド変体としては、例えば、配列番号31の配列のN末端もしくはC末端において、一つ以上のアミノ酸残基が付加されるかもしくは欠失させられた、PRO1868ポリペプチドが挙げられる。通常、PRO1868ポリペプチド変体は、配列番号31のアミノ酸配列と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、そしてなおより好ましくは、約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

10

【0069】

本明細書中で同定されるPRO301配列、PRO362(STIGMA)配列、PRO245配列もしくはPRO1868配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、必要な場合ギャップを導入して、最大のパーセント配列同一性を達成した後で、および保存的置換を配列同一性の一部として考慮することなしに、PRO301配列、PRO362(STIGMA)配列、PRO245配列もしくはPRO1868配列中のアミノ酸残基とそれぞれ同一な、候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。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(alignment)は、当該分野の技術範囲内の種々の方法で、例えば、公に利用可能なコンピュータソフトウェア(例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNもしくはMegalign(DNA STAR)ソフトウェア)を用いて、達成され得る。当業者は、アラインメント測定のための適切なパラメータ(比較されるべき配列の全長にわたっ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)を決定し得る。

20

【0070】

本明細書中で同定される、PRO301、PRO362(STIGMA)、PRO245もしくはPRO1868をコードする配列(例えば、DNA40628、DNA45416、DNA35638、DNA77624)に関する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、必要な場合ギャップを導入して、最大のパーセント配列同一性を達成した後、PRO301、PRO362(STIGMA)、PRO245もしくはPRO1868をコードする配列とそれぞれ同一な、候補配列中のヌクレオチドのパーセンテージとして定義される。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、当該分野の技術範囲内の種々の方法で、例えば、公に利用可能なコンピュータソフトウェア(例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNもしくはMegalign(DNA STAR)ソフトウェア)を用いて、達成され得る。当業者は、アラインメント測定のための適切なパラメータ(比較されるべき配列の全長にわたっ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)を決定し得る。

30

【0071】

「単離された」核酸分子とは、核酸の天然供給源に通常関連する、少なくとも一つの夾雑核酸分子から同定および分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、天然に見出される形態もしくは環境とは異なる形態もしくは環境にある。したがって、単離された核酸分子は、天然の細胞に存在するような核酸分子から区別される。しかし、単離された核酸分子は、コードされたポリペプチドを通常発現する細胞に含まれる核酸分子を含む(例えば、この核酸分子は、天然の細胞とは異なる染色体位置にある)。

40

【0072】

「単離された」PRO301ポリペプチド、PRO362(STIGMA)ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドをコードする核酸分子とは、PRO301ポリペプチド、PRO362(STIGMA)ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドをコードする核酸の天然供給源に通常関連する、少なくとも一つの夾雑核酸分子から同定および分離された核酸分子で

50

ある。単離されたPRO301ポリペプチド、PRO362(STIGMA)ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドをコードする核酸分子は、天然に見出される形態もしくは条件とは異なる。したがって、単離されたPRO301ポリペプチド、PRO362(STIGMA)ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドをコードする核酸分子は、天然の細胞に存在するようなDNA40628、DNA45416、DNA35638もしくはDNA77624核酸分子のそれぞれから区別される。しかし、単離されたPRO301ポリペプチド、PRO362(STIGMA)ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドをコードする核酸分子は、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるPRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドをコードする核酸分子を含む(例えば、この核酸分子は、天然の細胞とは異なる染色体位置にある)。

10

【0073】

用語「制御配列」とは、特定の宿主生物体における、操作可能に連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列を指す。例えば、原核生物に適切な制御配列としては、プロモーター、必要に応じてオペレーター配列、そしてリボソーム結合部位が挙げられる。真核生物がプロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することは、公知である。

【0074】

核酸は、それが別の核酸配列と機能的な関係に配置される場合、「操作可能に連結される」。例えば、ポリペプチドが、そのポリペプチドの分泌に関与するプレタンパクとして発現される場合、プレ配列(presequence)または分泌リーダーに関するDNAは、そのポリペプチドに関するDNAに操作可能に連結される;プロモーターもしくはエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響を及ぼす場合、そのコード配列に操作可能に連結される;または、リボソーム結合領域は、それが配置されて翻訳を促進する場合、コード配列に操作可能に連結される。一般的に、「操作可能に連結される」とは、連結されるべきDNA配列が隣接していること、そして分泌リーダーの場合、隣接し、かつリーディング相(reading phase)にあることを意味する。しかし、エンハンサーは、隣接している必要はない。連結は、都合よい制限酵素切断部位でのライゲーションによって、達成される。もしこのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターもしくはオリゴヌクレオチドリンカーが、従来の方法に従って使用される。

20

30

【0075】

用語「抗体」とは、広範な意味で使用され、特に、以下を網羅する(限定ではない):単独の抗PRO301、抗PRO362(抗STIGMA)、抗PRO245もしくは抗PRO1868モノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、および中和抗体を含む)、および多エピトープ(polyepitopic)特異性を有する抗PRO301、抗PRO362、抗PRO245もしくは抗PRO1868抗体組成物。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す(すなわち、その集団を含む個別の抗体は、少量で存在し得る、天然に起こり得る突然変異を除いて、同一である)。

40

【0076】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして一般的に、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存する経験的な算出である。一般に、より長いプローブは、適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、一方、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がそれらの融解温度以下の環境に存在する場合に、変性したDNAが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ズ可能な配列との間の所望される相同性の程度がより高い場合、より高い相対温度が使用され得る。結果として、このことは、より高い相対温度が反応条件をよりストリンジェントにさせ、一方より

50

低い温度が反応条件をよりストリンジェントでなくすることにつながる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーについてのさらなる詳細および説明に関しては、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley Interscience Publishers、(1995)を参照のこと。

【0077】

本明細書中で定義される、「ストリンジェント条件」もしくは「高ストリンジェンシー条件」は、以下によって同定され得る：(1)洗浄のための低イオン強度および高温の利用(例えば、0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%硫酸ドデシルナトリウム、50)；(2)ハイブリダイゼーション中での変性剤の利用(例えば、750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを含むホルムアミド(例えば、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液含有50%(v/v)ホルムアミド、pH6.5)、42C)；または(3)50%ホルムアミド、5xSSC(0.75NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5xDenhardt's溶液、超音波処理されたサケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、および10%硫酸デキストランの42での利用、ならびに42での0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)および55での50%ホルムアミド中、続いて高ストリンジェンシー洗浄条件(EDTA含有0.1xSSC、55からなる)による洗浄。

10

20

【0078】

「中ストリンジェント条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、New York: Cold Spring Harbor Press、1989)によって同定され得、かつ上記よりもよりストリンジェントでない洗浄条件およびハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度、および%SDS)の使用を包含する。中ストリンジェント条件の例は、以下である：20%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xDenhardt's溶液、10%硫酸デキストラン、および20mg/mL変性剪断サケ精子(sheared salmon sperm)を含む溶液中での37で一晩のインキュベーション、続いて、約37~50での、1xSSC中でのフィルターの洗浄。当業者は、プローブ長などのような因子を適応させる必要性に従って、温度、イオン強度などをどのように調整するかを認識する。

30

【0079】

本明細書中で使用される場合、用語「エピトープタグ化された」とは、「タグポリペプチド」に融合された本発明のポリペプチドを含む、キメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、作製され得る抗体にエピトープを提供するのに十分な残基を有するが、融合されるポリペプチドの活性を妨害しないように、十分に短い。タグポリペプチドはまた、好ましくは、ほとんど独特であり、抗体は、他のエピトープと実質的に交差反応しない。適切なタグポリペプチドは、一般的に、少なくとも6アミノ酸残基を有し、そして通常約8と約50との間のアミノ酸残基(好ましくは、約10と約20との間のアミノ酸残基)を有する。

40

【0080】

本発明のポリペプチドの改変体に関する「活性な」もしくは「活性」とは、本発明のネイティブポリペプチドもしくは天然に存在するポリペプチドの生物学的および/また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指す。

【0081】

本明細書中で開示されたスクリーニングアッセイによって同定されたポリペプチド分子もしくは別の分子(例えば、有機もしくは無機低分子、ペプチドなど)に関する「生物学的活性」とは、部分的に、このような分子の、炎症性細胞の組織への浸潤を変化させる能

50

力、T細胞増殖を変化させる能力、および細胞によるリンフォカイン放出を変化させる能力を指す。別の好ましい活性は、血管透過性への影響である。

【0082】

用語「アンタゴニスト」は、広範な意味で使用され、そして本明細書中で開示された本発明のネイティブポリペプチドの生物学的活性を、部分的もしくは完全にブロック、阻害、もしくは中和させるあらゆる分子を含む。同様の様式において、用語「アゴニスト」は、広範な意味で使用され、そして本明細書中で開示された本発明のネイティブポリペプチドの生物学的活性を、模倣もしくは刺激するあらゆる分子を含む。適切なアゴニストもしくはアンタゴニスト分子は、アゴニストもしくはアンタゴニスト抗体またはアゴニストもしくはアンタゴニスト抗体フラグメント、本発明のネイティブポリペプチドのフラグメントもしくはアミノ酸配列改変体、ペプチド、低分子（低有機分子）などを特に含む。

10

【0083】

「低分子」は、約600ダルトン以下の分子量を有することであると、本明細書中では定義される。

【0084】

「抗体」(Abs)および「免疫グロブリン」(Ig)は、同じ構造特性を有する糖タンパク質である。抗体が、特定の抗原への結合特性を示す一方で、免疫グロブリンは、抗原特性を欠く抗体および他の抗体様分子を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系で低レベルで産生され、そして骨髄腫によって高められたレベルで産生される。用語「抗体」は、広範な意味で使用され、特に（限定ではなく）、インタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および、それらが所望の生物学的活性を示す限り、抗体フラグメントを網羅する。

20

【0085】

「ネイティブ抗体」および「ネイティブ免疫グロブリン」は、通常、2つの同一な軽(L)鎖および2つの同一な重(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(disulfide bond)によって重鎖に結合し、一方ジスルフィド連結(disulfide linkage)の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で異なる。各重鎖および軽鎖は、規則正しく間隔を空けた鎖内のジスルフィド架橋(disulfide bridge)をまた有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン(V_H)を有し、これに多くの定常ドメインが続く。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を有し、そのもう一方の端に定常ドメインを有する；軽鎖定常ドメインは、重鎖の第一の定常ドメインに並び、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインに並ぶ。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている。

30

【0086】

用語「可変」とは、可変ドメインの特定の部位が、抗体間の配列によって大きく異なり、そして各特定の抗体の、その特定の抗原に対する結合および特異性に使用されるという事実を指す。しかし、この可変性は、抗体の可変ドメイン全体を通して均等に分布されていない。それは、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメイン両方で、相補性決定領域(CDR)もしくは超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中されている。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク(FR)と呼ばれる。ネイティブ重鎖および軽鎖可変ドメインの各々は、4つのFR領域を含む。FR領域は、主にシート構造をとり、3つのCDRに結合される。これらはループ結合を形成し、このループ構造は、シート構造に結合する（いくつかの場合においてはシート構造の一部を形成する）。各鎖のCDRは、FR領域によって互いに非常に近接して保持され、そして、他の鎖由来のCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabatら、N.I.H. Publ. No. 91-3242、Vol. I、647-669ページ(1991)を参照のこと)。定常ドメインは、抗原への抗体の結合に直接には関与しないが、種々のエフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞毒性への抗体の関与）を示す。

40

50

【0087】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部を、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域もしくは可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント；diabody；直鎖抗体（Zapataら、Protein Eng. 8(10)：1057-1062[1995]）；単鎖抗体分子；および、抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体抗体、が挙げられる。

【0088】

抗体のパイン消化は、2つの同一な抗原結合フラグメント（「Fab」フラグメントと呼ばれる）を生成する。各々は、単一の抗原結合部位、および残りの「Fc」フラグメントを有する。名称「Fc」は、容易に結晶化する能力を反映する。ペプシン処理は、F(ab')₂フラグメントをもたらす。これは2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋し得る。

10

【0089】

「Fv」は、最小抗体フラグメントであり、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む。この領域は、一つの重鎖可変ドメインと一つの軽鎖可変ドメインとの堅固な非共有結合性のダイマーからなる。この構造中で、3つのCDRの各可変ドメインが相互作用し、V_H-V_Lダイマーの表面上に抗原結合部位を規定する。集合的に、6つのCDRは、抗体に対して6つの抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン（もしくは、抗原に対して3つのCDR特異性のみを含む、Fvの半分）は、抗原を認識して結合する能力をなお有する。しかし結合部位全体よりは親和性が低い。

20

【0090】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常ドメイン（CH1）を含む。Fab'フラグメントは、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域由来の一つ以上のシステインを含むいくつかの残基を付加することによって、Fabフラグメントと異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を生成するFab'についての、本明細書中での名称である。F(ab')₂抗体フラグメントは、本来、Fab'フラグメントの対であって、その対の間にヒンジシステインを有するフラグメントとして産生された。抗体フラグメントの他の化学結合もまた、公知である。

30

【0091】

任意の脊椎動物種由来の抗体（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の基づいて、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる2つの明らかに異なるの型の一つに割当てられ得る。

【0092】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、異なるクラスに分けられ得る。5つの主な免疫グロブリンのクラスがある：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMであり、そしてこれらのいくつかは、さらにサブクラス（アイソタイプ）に分けられ得る（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2）。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、および μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および3次元構造は、周知である。

40

【0093】

本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体集団（すなわち、その集団を構成する個別の抗体は、少量で存在し得る、天然に起こり得る突然変異を除いて、同一である）から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して指向する。さらに、代表的に、異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を含む、従来（ポリクローナル）抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらがハイブリドーマ培養物によっ

50

て合成され、他の免疫グロブリンにより汚染されないことにおいて、有利である。修飾語句「モノクローナル」とは、実質的に均一な抗体集団から得られるものとして、抗体の特性を示し、そして任意の特定の方法による抗体産生を必要とするものとして解釈されない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature、256:495 [1975]によって最初に記載された、ハイブリドーマ法によって作製され得るか、または組み換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）によって作製され得る。「モノクローナル抗体」はまた、Clacksonら、Nature、352:624-628 [1991]、および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され得る（例えば、米国特許第5,750,373号、同第5,571,698号、同第5,403,484号、および同第5,223,09号もまた参照のこと、これらは、ファージミドおよびファージベクターを用いた抗体の調製を記載する）。

【0094】

本明細書中において、モノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を包含する。この「キメラ」抗体では、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における、対応する配列と同一または相同であり、一方その鎖の残りは、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における、対応する配列と同一または相同である。同様に、モノクローナル抗体は、所望の生物学的活性を示す限り、このような抗体のフラグメントを包含する（米国特許第4,816,567号；Morrissonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:6851-6855 [1984]）。

【0095】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最低限の配列を含む、キメラ免疫グロブリン、キメラ免疫グロブリン鎖、またはそれらのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、もしくは抗体の、他の抗原結合下位配列）である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、このヒト化抗体では、レシピエントの相補性決定領域（CDR）由来のいくつかもしくは全ての残基は、非ヒト種（ドナー抗体；例えば、所望の特異性、親和性、もしくは能力を有するマウス、ラットもしくはウサギ）のCDR由来の残基によって置換される。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンの特定のFvフレームワーク領域（FR）の残基は、対応する非ヒト残基によって置換され得る。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも取り込まれた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み得る。これらの修飾がなされて、抗体の性能をさらに純化および最大化する。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、および代表的に2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、その中で、全てもしくは実質的に全てのCDR領域が、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、そして全てもしくは実質的に全てのFR領域が、ヒト免疫グロブリン配列のFR領域である。ヒト化抗体は、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域（Fc）（代表的に、ヒト免疫グロブリン定常領域）の少なくとも一部をまた含む。詳細については、Jonesら、Nature、321:522-525 (1986)；Reichmannら、Nature、332:323-329 [1988]；およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol.、2:593-596 (1992)を参照のこと。ヒト化抗体は、「霊長類化（primatized）」抗体を含む。この抗体の抗原結合領域は、目的の抗原によって免疫化されたマカクザルによって産生された抗体に由来する。旧世界ザル由来の残基を含む抗体もまた、本発明の範囲内であり得る。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；および同第5,756,096号を参照のこと。

【0096】

「単鎖Fv」もしくは「sFv」抗体フラグメントは、抗体のV_HおよびV_Lドメイン

を含む。ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、 V_H ドメインと V_L ドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このリンカーは、sFvに抗原結合のために望ましい構造を形成させ得る。Fvの総説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、vol. 113、RosenburgおよびMoore(編)、Springer-Verlag、New York、269~315ページ(1994)のPluckthunを参照のこと。

【0097】

用語「diabody」とは、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを指す。このフラグメントは、同じポリペプチド鎖中に軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む(V_H-V_L)。非常に短く、同じ鎖上の2つのドメイン間を組み合わせることができないリンカーを用いることによって、ドメインは別の鎖の相補性ドメインと強制的に組み合わせられて、2つの抗原結合部位を作製する。Diabodyは、例えば、EP404,097;WO93/11161;およびHollingerら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、90:6444-6448(1993)により十分に記載される。

10

【0098】

「単離された」ポリペプチド(単離された抗体を含む)は、その天然環境の成分から特定されて、分離および/または回収されたポリペプチドである。その天然環境の夾雑成分は、その抗体の診断もしくは治療用途を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性もしくは非タンパク質性溶液を含み得る。好ましい実施形態において、ポリペプチドは、(1)ローリー法によって決定されるような、その化合物の95重量%を超えるまで、より好ましくは99重量%を超えるまで、(2)スピニングカップシークエネーター(spinning cup sequenator)の使用によって少なくとも15残基のN-末端もしくは内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで、または(3)クーマシーブルー染色もしくは、好ましくは銀染色を用いた還元もしくは非還元条件下での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、抗体もしくは他のポリペプチドは、組み換え細胞内におけるインサイチュでのこの化合物を含む。なぜなら、この化合物の天然環境での少なくとも一つの成分は存在しないからである。しかし通常、単離された化合物は、少なくとも一つの精製工程によって調製される。

20

30

【0099】

本明細書中で使用される場合、語句「標識」とは、化合物(例えば、抗体もしくはポリペプチド)に直接的もしくは間接的に結合されて「標識された」化合物を生成する、検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自身で検出され得る(例えば、放射性同位体標識もしくは蛍光標識)か、または、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物もしくは組成物の化学変化を触媒し得る。

【0100】

「固相」とは、本発明の化合物が付着する非水性マトリックスを意味する。本明細書で包含される固相の例としては、ガラス(例えば、規定された孔のあるガラス(controlled pore glass))、多糖体(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、およびシリコンから部分的もしくは全体的に形成されるものが挙げられる。特定の実施形態においては、状況に依存して、固相は、アッセイプレートのウェルを含み得る;他の状況においては、これは精製カラム(例えば、アフィニティークロマトグラフィーカラム)である。この用語はまた、別個の粒子の不連続な固相(例えば、米国特許第4,275,149号に記載されたもの)を含む。

40

【0101】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物(例えば、本明細書中で開示される抗ErbB2抗体、および必要に応じて化学療法剤)の送達に有用な、種々の型の脂質、リン脂質および/もしくはサーファクタントからなる小胞である。リポソームの成分は、一般的に、生物学的な膜の配置と同様に、二重層形態で配置される。

50

【0102】

本明細書中で使用される場合、用語「イムノアドヘシン」とは、異種タンパク質の結合特異性（「アドヘシン」）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組み合わせ、抗体様分子を指す。構造的に、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識部位および抗原結合部位以外（すなわち、「異種」）の、所望の結合特異性を有する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は、代表的に、少なくともレセプターもしくはリガンドの結合部位を含む、近接するアミノ酸配列である。イムノアドヘシン中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン（例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3もしくはIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1およびIgA-2を含む）、IgE、IgD、またはIgM）から得られ得る。 10

【0103】

（II．本発明の組成物および方法）

（A．PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868ポリペプチドの調製）

（1．全長PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868ポリペプチド）

本発明は、本出願でPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868と呼ばれるポリペプチドをコードする、新たに同定され、単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、出願人は、以下の実施例でさらに詳細に開示されるように、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868ポリペプチドをコードするcDNAを同定し、単離した。BLASTおよびFASTA配列整列化コンピュータプログラムを用いて、出願人は、全長ネイティブ配列PRO301（図2、配列番号1）、PRO362（図3、配列番号3）、PRO245（図11、配列番号9）、およびPRO1868（配列番号31）が、A33抗原およびJAMの両方と有意な相同性を有することを見出した（図1、12～18を参照のこと）。したがって、本出願で開示されたPRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868が、A33抗原タンパク質ファミリーの新たに同定されたメンバーであり、そして炎症性障害（例えば、炎症性腸疾患および結腸直腸癌のようなヒト新生物性疾患）に関連し得ると、現在考えられる。 20

【0104】

（2．PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868改変体）

本明細書中で記載される、全長ネイティブ配列PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868に加えて、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の改変体が調製され得ることが、検討される。PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868改変体は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868 DNAに、それぞれ適切なヌクレオチドを導入することによってか、または所望のPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868ポリペプチドの合成によって調製され得る。当業者は、アミノ酸の変化が、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の翻訳後プロセスを変更し得ること（例えば、グリコシル化部位の数もしくは位置を変化することか、または膜結合特性を変更すること）を理解する。 40

【0105】

本明細書中で記載される、ネイティブ全長配列PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の改変、またはPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の種々のドメインの改変は、例えば、保存的および非保存的突然変異のための任意の技術および指針（例えば、米国特許第5,364,934号に示される）を用いて作製され得る。改変は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードする一つ以上のコドンの置換、欠失もしくは挿入であり得、結果として、ネイティブ配列PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868と比較して、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868 50

のアミノ酸配列の変化をもたらす。必要に応じて、この改変は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の一つ以上のドメインにおける、少なくとも一つのアミノ酸の、任意の他のアミノ酸による置換によってである。どのアミノ酸残基が、所望の活性に有害な影響を及ぼすことなく挿入、置換もしくは欠失され得るかを決定する指針は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の配列を相同な公知のタンパク質分子の配列と比較することによって、および高相同性の領域で作製されるアミノ酸配列の変化の数を最小化することによって見出され得る。アミノ酸置換は、一つのアミノ酸を、同様の構造的および/もしくは化学的特性を有する別のアミノ酸に置き換える結果（例えば、ロイシンのセリンとの置換（すなわち、保存的アミノ酸置換））となり得る。挿入もしくは欠失は、必要に応じて、1～5アミノ酸の範囲であり得る。許容される改変は、配列中にアミノ酸の挿入、欠失もしくは置換を系統的に作製し、得られた改変体を、下記の実施例に記載されるインビトロアッセイで活性について試験することによって、決定され得る。

10

【0106】

改変は、当該分野で公知の方法（例えば、オリゴヌクレオチド介在性（部位指向性）突然変異誘発、アラニン走査、およびPCR突然変異誘発）を用いて作製され得る。部位指向性突然変異誘発 [Carterら、Nucl. Acids Res.、13:4331 (1986) ; Zollerら、Nucl. Acids Res.、10:6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wellsら、Gene、34:315 (1985)]、制限選択突然変異誘発 (restriction selection mutagenesis) [Wellsら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A、317:415 (1986)]、または他の公知技術が、クローン化されたDNAに実施されて、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868改変体DNAを生成し得る。

20

【0107】

走査アミノ酸分析もまた、隣接する配列に沿って変動し得る一つ以上のアミノ酸を同定するために利用され得る。好ましい走査アミノ酸の一つは、比較的小さな、中性アミノ酸である。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインが上げられる。アラニンは、代表的に、この群の中で好ましい走査アミノ酸である。なぜなら、これは、炭素の先で側鎖をなくしており、改変体の主鎖構造を変更する可能性がより低いからである。アラニンはまた、最も一般的なアミノ酸であることから、代表的に好ましい。さらに、これは、覆い隠された位置および露出された位置の両方において頻繁に見出される [Creighton、The proteins、(W. H. Freeman & Co.、N. Y.) ; Chothia、J. Mol. Biol.、150:1 (1976)]。アラニン置換が適切な量の改変体をもたらさない場合、等配電子 (isotERIC) アミノ酸が使用され得る。

30

【0108】

(3. PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の改変)
PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の共有結合改変は、この発明の範囲に含まれる。共有結合改変の一つの型は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の標的されたアミノ酸残基と、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の選択された側鎖またはN末端残基もしくはC末端残基と反応し得る有機誘導体化剤 (derivatizing agent) とを反応させることを含む。二機能性の薬剤による誘導体化が有用である（例えば、抗PRO301抗体、抗PRO362抗体、抗PRO245抗体もしくは抗PRO1868抗体それぞれを精製するための方法で使用するための水不溶性の支持マトリックスまたは表面にPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868を架橋するため、およびその逆のため）。一般的に使用される架橋剤としては、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-ヒドロキシスクシニミドエステル（例えば、4-アジドサリチル酸を含むエステル）、ホモ二官能性イミド

40

50

エステル(3,3'-ジチオビス(スクシニミジルピロピオネート)のようなジスクシニミジルエステルを含む)、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタンのような二官能性マレイミド、およびメチル-3-[(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデートのような薬剤、が挙げられる。

【0109】

他の改変としては、グルタミニル残基およびアスパラギニル残基の、それぞれ対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基への脱アミド化、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルもしくはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のアミノ基のメチル化 [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 79~86ページ(1983)]、アミンN末端のアセチル化、任意のC末端カルボキシル基のアミド化、が挙げられる。

10

【0110】

本発明の範囲に含まれるPRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドの共有結合改変の別の型は、ポリペプチドのネイティブグリコシル化パターンを変更することを含む。

「ネイティブグリコシル化パターンを変更する」は、ネイティブ配列PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868中に見られる一つ以上の炭水化物部分を欠失すること、ならびに/またはネイティブ配列PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868に存在しない一つ以上のグリコシル化部位を付加すること、ならびに/またはグリコシル化部位に結合された糖残基の比率および/もしくは組成を変更することを意味する、本明細書中における目的のために意図される。

20

【0111】

PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を変更することによって達成され得る。この変更は、例えば、ネイティブ配列PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868(O-結合されたグリコシル化部位に対して)への、一つ以上のセリンもしくはスレオニン残基の付加または一つ以上のセリンもしくはスレオニン残基による置換によって、なされ得る。PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868のアミノ酸配列は、DNAレベルでの変化を通して、特に、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868ポリペプチドをコードするDNAを、予め選択された塩基で突然変異させて所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成することによって、必要に応じて変更され得る。

30

【0112】

PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチド上で炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学結合もしくは酵素結合によってである。このような方法は、当該分野で、例えば、1987年9月11日公開のWO87/05330、およびApplinおよびWriston、CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306ページ(1981)に記載される。

40

【0113】

PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的もしくは酵素的に達成され得るか、またはグリコシル化の標的として働くアミノ酸残基をコードするコドンの突然変異置換によって達成され得る。化学的脱グリコシル化技術は、当該分野で公知であり、そして、例えば、Hakimuddinら、Arch Biochem. Biophys., 259:52(1987)およびEdgeら、Anal. Biochem., 118:131(1981)によって記載される。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素切断は、Thotakuraら、Meth. Enzymol., 138:350(

50

1987)によって記載されるように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。

【0114】

PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の共有結合修飾の別の型は、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドを種々の非タンパク質性ポリマー（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、もしくはポリオキシアルキレン）の一つに、例えば、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号、または同第4,179,337号に示された様式で結合することを含む。

10

【0115】

本発明のPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868はまた、別の、異種ポリペプチドもしくはアミノ酸配列に融合されたPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868を含むキメラ分子を形成するように改変され得る。一つの実施形態において、このようなキメラ分子は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868と、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合物を含む。エピトープタグは、一般的に、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868のアミノもしくはカルボキシル末端に配置される。このようなPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868のエピトープタグ化形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出され得る。また、エピトープタグの供給は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868を、抗タグ抗体もしくはエピトープタグに結合する別の型のアフィニティマトリックスを用いたアフィニティ精製によって、容易に精製させ得る。代替の実施形態において、キメラ分子は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868と免疫グロブリンもしくは免疫グロブリンの特定の領域との融合物を含み得る。キメラ分子の二価形態については、このような融合物は、IgG分子のFc領域に対してであり得る。

20

【0116】

種々のタグポリペプチドおよびそれらのそれぞれの抗体は、当該分野で周知である。例としては、ポリ-ヒスチジン（ポリ-his）タグもしくはポリ-ヒスチジン-グリシン（ポリ-his-gly）タグ；flu HAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5 [Fieldら、Mol. Cell. Biol.、8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグおよびそれらに対する8F9抗体、3C7抗体、6E10抗体、G4抗体、B7抗体および9E10抗体 [Evanら、Molecular and Cellular Biology、5:3610-3616 (1985)]；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグおよびその抗体 [Paborskyら、Protein Engineering、3(6):547-553 (1990)]が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、Flag-ペプチド [Hoppら、Biotechnology、6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martinら、Science、255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド [Skinnerら、J. Biol. Chem.、266:15163-15166 (1991)]；およびT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuthら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87:6393-6397 (1990)]が挙げられる。

30

40

【0117】

(4. PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の生成および単離)

以下の記述は、PRO301核酸、PRO362核酸、PRO245核酸もしくはPRO1868核酸を含むベクターによって形質転換されたかもしくはトランスフェクトされた細胞を培養することによる、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPR

50

PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868を調製し得ることが考えられる。例えば、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868配列、またはそれらの一部分は、固相技術を用いた直接的なペプチド合成によって生成され得る[例えば、Stewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis、W.H. Freeman Co.、San Francisco、CA(1969); Merrifield、J: Am. Chem. Soc.、85: 2149-2154(1963)を参照のこと]。インビトロタンパク質合成は、手動技術を用いてかまたは自動操作によって実施され得る。自動化合成は、例えば、Applied Biosystems Peptide-Synthesizer (Foster City、CA)を用いて、製造者の指示書を用いて、達成され得る。PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の種々の部分は、化学的に別個に合成されて、化学的方法もしくは酵素的方法を用いて組み合わせられ、全長hPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868を生成し得る。

10

【0118】

(a. PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードするDNAの単離)

PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードするDNAは、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868 mRNAを有し、検出可能なレベルでそれを発現すると考えられる組織から調製されるcDNAライブラリから得られ得る。したがって、ヒトPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868 DNAは、例えば、実施例に記載されるような、ヒト組織から調製されるcDNAライブラリから都合よく得られ得る、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードする遺伝子はまた、ゲノムライブラリからかもしくはオリゴヌクレオチド合成によって得られ得る。

20

【0119】

ライブラリは、目的の遺伝子もしくはそれにコードされたタンパク質を同定するように設計されたプローブ(例えば、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868への抗体、または少なくとも約20~80塩基のオリゴヌクレオチド)によってスクリーニングされ得る。cDNAもしくはゲノムライブラリの選択されたプローブによるスクリーニングは、標準的手順(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)に記載される)を用いて実施され得る。PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードする遺伝子を単離するための代替手段は、PCR方法論[Sambrookら、上記; Dieffenbachら、PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press、1995)]を用いることである。

30

【0120】

以下の例は、cDNAライブラリをスクリーニングする技術を記載する。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、かつ偽陽性が最小化されるように十分に明瞭であるべきである。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、標識化されて、スクリーニングされているライブラリのDNAに対するハイブリダイゼーションで検出され得る。標識化の方法は、当該分野で周知であり、³²P-標識ATPのような放射性標識、ビオチン化もしくは酵素標識の使用を含む。ハイブリダイゼーション条件(中ストリンジェンシーおよび高ストリンジェンシーを含む)は、Sambrookら(上記)に提供される。

40

【0121】

このようなライブラリスクリーニング法で同定される配列は、公共のデータベース(例えば、GenBankもしくは他の私有の配列データベース)に保存されかつ利用可能な

50

他の公知の配列と比較され、整列化され得る。この分子の規定の領域内もしくは全長にわたる配列同一性（アミノ酸レベルもしくはヌクレオチドレベルのいずれか）は、配列アラインメントを通して、相同性を測定するための種々のアルゴリズムを利用するコンピュータソフトウェアプログラム例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、DNASTar、およびINHERIT）を用いて決定され得る。

【0122】

タンパク質をコードする配列を有する核酸は、初めに、本明細書中で開示される推定されるアミノ酸配列を用いて、そして必要な場合、Sambrookら（上記）に記載されるような従来のプライマー伸長手順を用いて前駆体を検出してcDNAに逆転写されていない可能性のあるmRNAの中間体を処理することで、選択されたcDNAもしく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、得られ得る。

10

【0123】

（b. 宿主細胞の選択および形質転換）

宿主細胞は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868生成のため、本明細書中に記載される発現ベクターもしくはクローニングベクターによってトランスフェクトされるかもしくは形質転換されて、プロモーターを誘導するか、形質転換体を選択するか、もしくは所望の配列をコードする遺伝子を複製するのに適切に改変された従来の栄養培地中で培養される。培養条件（例えば、培地、温度、pHなど）は、過度に実験を行うことなく、当業者によって選択され得る。一般的に、細胞培養物の生産性を最大化するための原理、プロトコル、および実際の技術は、Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach、M. Butler（編）（IRL Press、1991）およびSambrookら（上記）に見出され得る。

20

【0124】

トランスフェクションの方法は、当業者に公知である。例えば、CaPO₄および電気穿孔法である。使用される宿主細胞に依存して、形質転換は、このような細胞に適切な標準技術を用いて行われる。Sambrookら（上記）に記載されるような塩化カルシウムを用いたカルシウム処理、または電気穿孔法は、原核生物細胞もしくは実質的な細胞壁障壁を含む他の細胞に一般的に使用される。Agrobacterium tumefaciensによる感染は、Shawら、Gene、23:315（1983）、および1989年6月29日公開のWO89/05859によって記載されるように、特定の植物細胞の形質転換に使用される。このような細胞壁のない哺乳動物細胞については、Grahamおよびvan der Eb、Virology、52:456-457（1978）のリン酸カルシウム沈殿法が利用され得る。哺乳動物細胞宿主システム形質転換の一般的な局面は、米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母への形質転換は、代表的に、Van Solingenら、J. Bact.、130:946（1977）およびHsiaoら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、76:3829（1979）の方法に従って実行される。しかし、DNAを細胞に導入するための他の方法、例えば、核への微量注入、電気穿孔法、インタクト細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリカチオン（例えば、ポリブレン、ポリオルニチン）もまた使用され得る。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ら、Methods in Enzymology、185:527-537（1990）およびMansourら、Nature、336:348-352（1988）を参照のこと。

30

40

【0125】

本明細書中において、ベクター中でDNAをクローニングもしくは発現させるのに適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母もしくはより高等な真核生物細胞が挙げられる。適切な原核生物としては、限定ではないが、グラム陰性生物もしくはグラム陽性生物のような真正細菌（例えば、E. coliのような腸内細菌科）が挙げられる。種々のE. coli株が、公的に入手可能である。例えば、E. coli K12株MM294（ATCC 31,446）；E. coli X1776（ATCC 31,537）；E. co

50

1株W3110(ATCC 27,325)およびK5 772(ATCC 53,635)である。

【0126】

原核生物に加えて、真核生物の微生物(糸状菌もしくは酵母)は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードするベクターのための、適切なクローニング宿主および発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae*は、一般的に使用される下等真核生物宿主微生物体である。

【0127】

グリコシル化されたPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の発現のための適切な宿主細胞は、多細胞生物体に由来する。無脊椎細胞の例としては、昆虫細胞(例えば、*Drosophila S2*および*Spodoptera Sf9*)、ならびに植物細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)およびCOS細胞が挙げられる。より具体的な例としては、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1細胞(COS-7、ATCC CRL 1651);ヒト胚性腎細胞(293細胞もしくは浮遊培養での増殖のためのサブクローニングされた293細胞、Grahamら、*J. Gen. Virol.*、36:59(1977));チャイニーズハムスター卵巣ノ-DHFR(CHO、UrlaubおよびChasin、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、77:4216(1980));マウスセルトリー細胞(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);およびマウス乳腺腫瘍細胞(MMT 060562、ATCC CCL 51)が挙げられる。適切な宿主細胞の選択は、当該分野の技術の範囲内であると判断される。

【0128】

(c.複製可能なベクターの選択と使用)

PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードする核酸(例えば、cDNAもしくはゲノムDNA)は、クローニングのためおよび発現のため、複製可能なベクターに挿入され得る。種々のベクターが、公的に入手可能である。このベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列は、種々の手順によってベクターに挿入され得る。一般的に、DNAは、当該分野で公知の技術を用いて、適切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、一般的に、しかし限定ではなく、一つ以上のシグナル配列、複製起点、一つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列が挙げられる。これらの成分の一つ以上を含む適切なベクターの作製には、当業者に公知の標準的ライゲーション技術を用いる。

【0129】

PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868は、直接的にだけでなく、異種ポリペプチド(成熟タンパク質もしくは成熟ポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有するシグナル配列もしくは他のポリペプチドであり得る)との融合ポリペプチドとしても、組み換えで生成され得る。一般的に、シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはこれは、ベクターに挿入されるPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868 DNAの一部であり得る。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、また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、原核生物のシグナル配列であり得る。酵母分泌のため、シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー(*Saccharomyces*および*Kluyveromyces* - 因子リーダーを含む、後者は、米国特許第5,010,182号に記載される)、または酸性ホスファターゼリーダー、*C. albicans* glucosylaseリーダー(1990年4月4日公開のEP 362,179)、または1990年11月15日公開のWO 90/13646に記載されたシグナルであり得る。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列は、タンパ

ク質の分泌を導くために使用され得る（例えば、同じもしくは近縁の種の分泌ポリペプチドからのシグナル配列、およびウイルス分泌リーダー）。

【0130】

発現ベクターおよびクローニングベクターの両方は、一種類以上の選択された宿主細胞でベクターを複製し得る核酸配列を含む。このような配列は、種々の細菌、酵母、およびウイルスにおいて、公知である。プラスミド pBR322 由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に対して適切であり、2：プラスミド起源は、酵母に適切であり、そして種々のウイルス起源（SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV もしくは BPV）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに対して有用である。

【0131】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的に、選択遺伝子（選択マーカーとも呼ばれる）を含む。代表的な選択遺伝子は、（a）抗生物質もしくは他の毒素（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートもしくはテトラサイクリン）への抵抗性を与えるか、（b）栄養要求性の欠損を補完するか、または（c）複合培地からは得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする（例えば、バチルス属について、D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）。

【0132】

哺乳動物細胞についての適切な選択マーカーの例は、細胞コンピテントを同定して、PRO301 核酸、PRO362 核酸、PRO245 核酸もしくは PRO1868 核酸を取り出すことを可能にするマーカーである（例えば、DHFR もしくはチミジンキナーゼ）。適切な宿主細胞は、野生型 DHFR が利用される場合、DHFR 活性を欠損した CHO 細胞株である。これは、Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4216 (1980) に記載されるように、調製および増殖させられる。酵母での使用のための適切な選択遺伝は、酵母プラスミド YRp7 中に存在する trp1 遺伝子である [Stinchcombら、Nature、282:39 (1979); Kingmanら、Gene、7:141 (1979); Tschemperら、Gene、10:157 (1980)]。trp1 遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異体株（例えば、ATCC 番号 44076 もしくは PEP4-1 [Jones、Genetics、85:12 (1977)]）に対する選択マーカーを提供する。

【0133】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、通常、PRO301、PRO362、PRO245 もしくは PRO1868 の核酸配列に操作可能に連結されて mRNA 合成を導くプロモーターを含む。種々の潜在的宿主細胞によって認識されるプロモーターが周知である。原核生物宿主とともに使用するのに適切なプロモーターとしては、-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーターシステム [Changら、Nature、275:615 (1978); Goeddelら、Nature、281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーターシステム [Goeddel、Nucleic Acids Res.、8:4057 (1980); EP36、776]、およびハイブリッドプロモーター（例えば、tac プロモーター [deBoerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80:21-25 (1983)]）が挙げられる。細菌系での使用のためのプロモーターはまた、PRO301、PRO362、PRO245 もしくは PRO1868 をコードする DNA に操作可能に連結された、Shine-Dalgarno (S.D.) 配列を含む。

【0134】

酵母宿主とともに使用するのに適切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に関するプロモーター [Hitzemanら、J. Biol. Chem.、255:2073 (1980)] または他の解糖酵素 [Hessら、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-

10

20

30

40

50

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、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼ)が挙げられる。

【0135】

他の酵母プロモーターは、増殖条件によって制御される転写についてのさらなる利点を有する誘導性プロモーターであり、アルコール脱水素酵素2、イソチトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、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、およびマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素に関するプロモーター領域である。酵母発現で使用されるのに適切なベクターおよびプロモーターは、EP73, 657にさらに記載される。

10

【0136】

哺乳動物宿主細胞における、ベクターからのPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の転写は、例えば、ウイルス(例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス(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)、ウシパピローマウイルス、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、およびシミアンウイルス40(SV40))のゲノムから得られたプロモーター、異種哺乳動物プロモーター(例えば、アクチンプロモーターもしくは免疫グロブリンプロモーター)から得られたプロモーター、ならびに熱ショックプロモーターから得られたプロモーターによって制御される。提供されるこのようなプロモーターは、宿主細胞システムに適合する。

20

【0137】

より高等な真核生物によるPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードするDNAの転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増加され得る。エンハンサーは、DNAのシス作用性エレメントであり、通常約10~約300bpであって、プロモーター上で働いて、その転写を増加させる。多くのエンハンサー配列が、哺乳動物遺伝子(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインシュリン)から現在公知である。しかし代表的に、人々は、真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー(bp100~270)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。エンハンサーは、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードする配列に対して5'位もしくは3'位で、ベクター中へと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'部位に配置される。

30

【0138】

真核生物宿主細胞(酵母、真菌類、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物体由来の有核細胞)で使用される発現ベクターはまた、転写の終結のためおよびmRNAを安定化するために必要な配列を含む。このような配列は、一般的に、真核生物もしくはウイルスDNAまたはcDNAの5'、および時には3'非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868をコードするmRNAの非翻訳部分に、ポリアデニル化されたフラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

40

【0139】

脊椎動物細胞培養物におけるPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の合成への適応のために適切な、さらに他の方法、ベクターおよび宿主細胞は、Gettlingら、Nature、293:620-625(1981); Mantelら、Nature、281:40-46(1979); EP117、060; およびEP117、058に記載される。

(d. 遺伝子増幅/発現の検出)

遺伝子増幅および/または発現は、サンプル中で直接的に(例えば、mRNAの転写を

50

定量するための、従来のサザンブロットリング、ノザンブロットリング [Thomas、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77: 5201-5205 (1980)]、ドットブロットリング (DNA分析)、または、本明細書中で提供された配列に基づいて適切に標識されたプローブを用いたインサイチュハイブリダイゼーションによって)測定され得る。あるいは、特定の二重鎖 (DNA二重鎖、RNA二重鎖およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖、またはDNA-タンパク質二重鎖を含む)を認識する抗体が利用され得る。抗体もやはり標識され得、そしてアッセイが実行され得、ここで二重鎖が表面に結合して、表面上の二重鎖形成物上で、その二重鎖に結合した抗体の存在が検出され得る。

【0140】

あるいは、遺伝子発現が、免疫学的方法 (例えば、細胞または組織切片の免疫組織化学染色、および細胞培養物または体液のアッセイ)によって測定されて、遺伝子産物の発現を直接的に定量し得る。免疫組織化学染色および/またはサンプル流体のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであり得、そして任意の哺乳動物中で調製され得る。都合のよいことに、抗体は、ネイティブ配列 PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドに対してか、または本明細書中で提供されるDNA配列に基づく合成ペプチドに対してか、またはPRO301 DN、PRO362 DN、PRO245 DNもしくはPRO1868 DNAに融合されて特定の抗体エピトープをコードする外来性の配列に対して、調製され得る。

【0141】

(e. ポリペプチドの精製)

PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の形態は、培養培地もしくは宿主細胞溶解物から回収され得る。膜に結合している場合、適切な界面活性剤溶液 (例えば、Triton-X 100)を用いて、または酵素切断によって、膜から放出され得る。PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の発現に利用される細胞は、種々の物理的もしくは化学的手段 (例えば、凍結-融解循環、超音波、機械的分断、または細胞溶解剤)によって分断され得る。

【0142】

組み換え細胞タンパク質もしくはポリペプチドからPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868を精製することが、所望され得る。以下の手順は、適切な精製手順の例示である: イオン交換カラム上での分画; エタノール沈殿; 逆相HPLC; シリカ上もしくは陽イオン交換樹脂 (例えば、DEAE)上でのクロマトグラフィー; 等電点電気泳動; SDS-PAGE; 硫酸塩析; 例えばSephadex G-75を用いた、ゲル濾過; プロテインAセファロースカラムによる共雑物 (例えば、IgG)の除去; および、金属キレートカラムによる、エピトープタグ化形態のPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の結合、による手順。タンパク質精製の種々の方法が利用され得、そしてこのような方法は、当該分野で公知であり、例えば、Deutscher、Methods in Enzymology、182 (1990); Scopes、Proteins Purification: Principles and Practice、Springer-Verlag、New York (1982)に記載される。選択される精製工程は、例えば、使用される生成プロセスの性質、および生成される特定のPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868に依存する。

【0143】

(f. 細胞相互作用の検出)

本発明のポリペプチドが、輸送分子もしくは細胞接着分子であるかどうかを決定するため、多くのインビトロアッセイが実施され得る。

【0144】

(1) フローサイトメトリー/FACS分析)

PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868間での、特定の細胞型との相互作用を調べるため、ビオチン化ヒトIgG融合タンパク質（例えば、PRO301-ヒトIgG融合物、PRO362-ヒトIgG融合物、PRO245-ヒトIgG融合物もしくはPRO1868-ヒトIgG融合物）が生成され得る。ビオチン化融合タンパク質と相互作用する細胞は、ストレプトアビジンが結合した磁気ビーズを用いて単離され得る。ビオチン化融合タンパク質と相互作用する細胞は、フローサイトメトリーおよび/もしくはFACSソーティングによって、表面CD-Ag発現についてさらに特徴付けられ、分析され得る。ビオチン化PRO301-ヒトIgG融合物、PRO362-ヒトIgG融合物、PRO245-ヒトIgG融合物もしくはPRO1868-ヒトIgG融合物との相互作用について調べられる細胞としては、例えば、末梢血液細胞（NK細胞、NK/T細胞もしくは細胞溶解性T細胞、およびより具体的には、精製されたB細胞、好中球、単球もしくは樹状細胞）が挙げられ得る。

10

【0145】

PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の間の、特定の細胞との相互作用の阻害が、阻害分析、特に、抗体（例えば、抗PRO301、抗PRO245、抗PRO362もしくは抗PRO1868）がこのような細胞相互作用を阻害する能力、によってさらに特徴付けられ得る。

【0146】

(2) 免疫共沈降)

PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868-と相互作用する細胞の同定に関して、さらなる分析が行われ、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868との相互作用を担う特定のレセプターを同定し得る。例えば、免疫共沈降分析が行われて、PRO245-を同定する細胞上のレセプターを同定し得る。PRO245に対する抗体が、PRO245-を同定する細胞とともにインキュベートされ得る。次いで、免疫共沈降が、SDS-PAGE、およびに可能性のあるレセプターに対する抗体とのイムノプロットングによって分析され得る。PRO245に関するレセプターがタンパク質のJAMファミリーに属するタンパク質であるかどうかを決定するために、イムノプロットングのために使用される抗体は、抗PRO301、抗PRO362、もしくは抗PRO1868を含み得る。このような分析は、結果として、接着分子A33/JAMファミリーに属する、相互作用しているタンパク質の対を同定し得る。

20

30

【0147】

(5. 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、例えば、種々のヒト組織におけるmRNA発現もしくはタンパク質発現を決定することによって同定され得る。このような遺伝子の位置は、本発明のポリペプチドの刺激活性および阻害活性によってどの組織が最も影響されやすいか、についての情報を提供する。特定の組織中の遺伝子の位置はまた、以下で議論される活性プロッキングアッセイのためのサンプル組織を提供する。

【0148】

種々の組織における遺伝子発現は、mRNAの転写を定量するための、従来のサザンプロットング、ノザンプロットング、(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980])、ドットプロットング(DNA分析)、または配列本明細書中で提供された配列に基づいて適切に標識されたプローブを用いたインサイチュハイブリダイゼーションによって測定され得る。あるいは、特定の二重鎖(DNA二重鎖、RNA二重鎖およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖、またはDNA-タンパク質二重鎖を含む)を認識する抗体が利用され得る。

40

【0149】

あるいは、種々の組織における遺伝子発現は、免疫学的方法（例えば、組織切片の免疫組織化学染色および細胞培養物もしくは体液のアッセイ）によって測定されて、遺伝子産物の発現を直接的に定量し得る。免疫組織化学染色および/もしくはサンプル流体のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであり得、任意の

50

哺乳動物中で調製され得る。都合の良いことに、この抗体は、本発明のポリペプチドのネイティブ配列に対してか、または本発明のポリペプチドをコードする合成DNAに対してか、または本発明のポリペプチドをコードするDNAに融合され、かつ特異的抗体エピトープをコードする外来性配列に対して、調製され得る。抗体を産生するための一般的技術、およびノザンプロットングおよびインサイチュハイブリダイゼーションのための特定のプロトコールは、以下に提供される。

【0150】

(6. 抗体結合研究)

本発明のポリペプチドの活性は、抗体結合研究によってさらに確認され得る。この研究では、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドもしくはPRO1868ポリペプチドの組織細胞に対する作用を阻害する、抗PRO301抗体、抗PRO362抗体、抗PRO245抗体もしくは抗PRO1868抗体の能力が、試験される。例示的抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、および異種結合抗体が挙げられ、これらの調製は、本明細書中において以下に記載される。

10

【0151】

抗体結合研究は、任意の公知のアッセイ法（例えば、競合結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ）で実行され得る。Zola、Monoclonal Antibody: A Manual of Techniques、147-158ページ（CRC Press、Inc.、1987）。

20

【0152】

競合結合アッセイは、標識された標準が、限定された量の抗体との結合に関して試験サンプル分析物と競合する能力に依存する。試験サンプル中の標的タンパク質の量は、抗体に結合した標準の量に逆比例する。結合した標準の量の決定を容易にするため、抗体は、好ましくは競合の前または後に不溶化され、これによって抗体に結合する標準および分析物は、結合しないままの標準および分析物から都合よく分離され得る。

【0153】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用に関する。各抗体は、検出されるべきタンパク質の異なる免疫原性部分、もしくはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイでは、試験サンプル分析物は、固体支持体上に固定化された第一の抗体に結合され、その後、第二の抗体がこの分析物に結合して、不溶性の3部分複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第二の抗体は、検出可能部分でそれ自身が標識され得る（直接サンドイッチアッセイ）か、また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され得る（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの一つの型はELISAアッセイであり、この場合、検出可能部分は酵素である。

30

【0154】

免疫組織化学に関しては、組織サンプルは、例えば、新鮮であり得るか、または凍結され得るか、またはパラフィン中に包埋されてホルマリンのような保存剤で固定され得る。

【0155】

(7. 細胞ベースのアッセイ)

遺伝子と、本明細書中で同定されるポリペプチドと、免疫関連疾患の発症および病因との間の関係をさらに理解するために、細胞ベースのアッセイおよび免疫関連疾患の動物モデルが使用され得る。

40

【0156】

異なるアプローチでは、特定の免疫関連疾患への関与が公知である細胞型の細胞が、本明細書中に記載されるcDNAでトランスフェクトされて、それらのcDNAの、免疫機能を変化させる能力が分析される。適切な細胞が、所望の遺伝子でトランスフェクトされて、免疫機能活性に関してモニタリングされ得る。次いで、このようなトランスフェクトされた細胞株は、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体または抗体組成物の、免疫

50

機能を変化させる（例えば、T細胞増殖もしくは炎症細胞の浸潤を調節する）能力を試験するために使用され得る。本明細書中で同定される遺伝子のコード配列でトランスフェクトされた細胞は、免疫関連疾患の処置に関する薬物の候補を同定するために、さらに使用され得る。

【0157】

加えて、本明細書中における細胞ベースアッセイに、トランスジェニック動物（以下に記載される）に由来する初代培養が使用され得る（しかし、安定した細胞株が好ましい）。トランスジェニック動物から連続継代細胞株を誘導する技術は、当該分野で公知である（例えば、Smallら、Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985]を参照のこと）。

【0158】

一つの適切な細胞ベースアッセイは、リンパ球混合反応（mixed lymphocyte reaction; MLR）である（Current Protocols in Immunology, unit 3.12; J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober 編集、National Institutes of Health, John Wiley & Sons, Incにより出版）。このアッセイでは、試験化合物の、活性化T細胞の増殖を刺激する能力が、アッセイされる。応答（responder）T細胞の懸濁液が、同種異系刺激性細胞とともに培養され、T細胞の増殖が、トリチウム化チミジンの取り込みによって測定される。このアッセイは、T細胞反応性の一般的な測定法である。大多数のT細胞は活性化状態で反応してIL-2を産生するため、このアッセイにおける応答性の違いは、反応する細胞によるIL-2産生の違いを部分的に反映する。MLRの結果は、標準的リンフォカイン（IL-2）検出アッセイによって検証され得る。Current Protocols in Immunology（上記）、3.15、6.3。

【0159】

MLRアッセイにおける増殖性T細胞応答は、細胞分裂誘起反応に起因し得るか、またはT細胞による刺激反応に起因し得る。本発明のポリペプチドのT細胞刺激性活性のさらなる検証は、同時刺激アッセイ（costimulation assay）によって得られ得る。T細胞活性化は、主要組織適合複合体（MHC）を通して媒介される抗原特異的シグナル、および二次リガンド結合性相互作用（例えば、B7（CD80、CD86）/CD28結合性相互作用）を通して媒介される同時刺激シグナルを必要とする。CD28架橋結合は、活性化T細胞によるリンフォカイン分泌を増加させる。T細胞活性化は、ネガティブ効果もしくはポジティブ効果を有するリガンドの結合を通して、ネガティブおよびポジティブコントロールの両方を有する。CD28およびCTLA-4は、B7に結合するIgスーパーファミリーの糖タンパク質に関連する。B7へのCD28の結合は、T細胞活性化というポジティブな同時刺激効果を有し；反対に、B7へのCTLA-4の結合は、ネガティブなT細胞不活性化効果を有する。Chambers, C. A. および Allison, J. P., Curr. Opin. Immunol (1997) 9: 396. Schwartz, R. H., Cell (1992) 71: 1065; Linsley, P. S. および Ledbetter, J. A., Annu. Rev. Immunol. (1993) 11: 191; June, C. H. ら、Immunol. Today (1994) 15: 321; Jenkins, M. K., Immunity (1994) 1: 443-446。

【0160】

例えばMLRアッセイによって決定されるような、T細胞増殖を刺激（同時刺激）する本発明のポリペプチドおよび本発明の他の化合物は、免疫関連疾患（乏しい、最適以下の、または不適切な免疫機能によって特徴付けられる）の処置に有用である。これらの疾患は、T細胞（およびT細胞介在性免疫）の増殖および活性を刺激すること、および刺激性化合物（例えば、本発明の刺激性ポリペプチド）の投与を通じて哺乳動物における免疫応

10

20

30

40

50

答を増強することによって処置される。刺激性ポリペプチドは、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868ポリペプチド、またはそれらに対するアゴニスト抗体であり得る。腫瘍を処置するためのイムノアジュバント(Immunoadjuvant)治療(以下でより詳細に記載される)は、本発明の刺激性化合物のこの用途の一例である。阻害性ポリペプチドに結合する抗体は、阻害性ポリペプチドの阻害効果を除去することによって免疫応答を増強するように働く。この効果は、(おそらく、CTLA-4結合によって引き起こされる阻害性シグナルの除去によって)T細胞増殖を増強する抗CTLA-4抗体を用いた実験において見られる。Walunas, T.L.ら、Immunity(1994)1:405。この用途はまた、4-1BB糖タンパク質(初回刺激を受けた(primed)T細胞上で発現されてT細胞の活性化および増殖のシグナルを出すリガンド(4-1BBL)に結合する、腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバー)を用いた実験で検証される。Alderson, M.E.ら、J.Immunol.(1994)24:2219。抗4-1BB抗体を用いた処置による4-1BBの結合の阻害は、対宿主性移植片病を悪化させ、そしてこれは、腫瘍を根絶するために使用され得る。HellstromおよびHellstrom, K.E., Crit.Rev.Immunol.(1998)18:1。

10

【0161】

一方で、本発明のポリペプチド(例えば、アンタゴニスト抗体)および本発明の他の化合物(これらは、T細胞増殖/活性化および/またはリンフォカイン分泌のインヒビターである)が、免疫応答を抑制するために、直接的に使用され得る。これらの化合物は、免疫応答の程度を減少させて、機能亢進性応答、最適以上の応答、もしくは自己免疫性応答によって特徴付けられる免疫関連疾患を処置するのに有用である。あるいは、本発明の刺激性ポリペプチドに結合して、これらの分子の刺激性効果をブロックする抗体が、T細胞増殖/活性化および/またはリンフォカイン分泌を阻害することによってT細胞介在性免疫応答を抑制するために、使用され得る。このポリペプチドの刺激性効果のブロックは、哺乳動物の免疫応答を抑制する。

20

【0162】

(8.動物モデル)

細胞ベースのインビトロアッセイの結果は、インビボで動物モデルおよびT細胞機能に関するアッセイを用いて、さらに検証され得る。本明細書中で同定された遺伝子の免疫関連疾患の発症および病因における役割をさらに理解するため、および候補治療剤(抗体、および低分子アンタゴニストを含む他のネイティブポリペプチドのアンタゴニストを含む)の効力を試験するために、種々の周知の動物モデルが使用され得る。このようなモデルのインビボでの性質によって、それらのヒト患者での反応が、特に予測される。免疫関連疾患の動物モデルとしては、非組み換え動物および組み換え(トランスジェニック)動物の両方が挙げられる。非組み換え動物モデルとしては、例えば、げっ歯類(例えば、マウスモデル)が挙げられる。このようなモデルは、標準的技術(例えば、皮下注入、尾静脈注入、脾臓移植、腹腔内移植、腎臓被膜(renal capsule)下での移植など)を用いて同系のマウスに細胞を導入することによって作製され得る。

30

【0163】

接触過敏症は、細胞介在性免疫機能の単純なインビボアッセイである。この手順では、表皮細胞が、遅延型過敏反応を引き起こす外来性ハプテンに曝され、この遅延型過敏反応が測定および定量される。接触過敏症は、初期感作期(initial sensitizing phase)、続いて誘発期(elicitation phase)に関与する。この誘発期は、表皮細胞が、以前に接触した抗原に接触する場合に生じる。膨張および炎症が生じ、これは、ヒトアレルギー性接触皮膚炎に優れたモデルとなる。適切な手順は、Current Protocols in Immunology(編)J.E.Cologan, A.M.Kruisbeek, D.H.Margulies, E.M.ShevachおよびW.Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unit 4.2に記載される。Grabbe, S.およびSchwarz

40

50

、T、Immun. Today 19(1):37-44(1998)もまた参照のこと。

【0164】

対宿主性移植片病は、免疫抑制されたかまたは免疫寛容の患者に免疫応答性細胞が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、それに応答する。この応答は、生命を脅かす重篤な炎症から下痢および体重減少という軽度な場合まで変動し得る。対宿主性移植片病モデルは、MHC抗原および少数の移植片抗原に対するT細胞の反応性を評価する手段を提供する。適切な手順は、Current Protocols in Immunology(上記)unit 4.3に詳細に記載される。

【0165】

皮膚の同種移植拒絶の動物モデルは、T細胞の、インビボでの組織破壊を媒介する能力を試験する手段であり、抗ウイルスおよび腫瘍免疫におけるそれらの役割を示す、その測定法である。最も一般的かつ認められたモデルは、マウスの尾の皮膚の移植片を使用する。度重なる実験は、皮膚の同種移植片拒絶が、T細胞、ヘルパーT細胞およびキラー効果器T細胞によって媒介され、抗体によって媒介されないことを示した。Auchincloss、H. Jr. および Sachs、D. H.、Fundamental Immunology(第二版)、W. E. Paul ed.、Raven Press、NY、1989、889-992。適切な手順は、Current Protocols in Immunology(上記)unit 4.4に詳細に記載される。本発明の化合物を試験するために使用され得る他の移植拒絶モデルは、Tanabe、M.ら、Transplantation(1994)58:23およびTinubu、S. A.ら、7: Immunol.(1994)4330-4338によって記載される同種異系心臓移植モデルである。

【0166】

遅延型過敏症の動物モデルはまた、細胞介在性免疫機能のアッセイを提供する。遅延型過敏反応は、T細胞介在性のインビボ免疫応答であり、抗原による惹起の後、所定の時間が経過するまでピークに達しない炎症によって特徴付けられる。これらの反応はまた、組織特異的自己免疫性疾患(例えば、多発性硬化症(MS)および実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE、MSのモデル)を引き起こす。適切な手順は、Current Protocols in Immunology(上記)unit 4.5に詳細に記載される。

【0167】

EAEは、T細胞および単核細胞性の炎症、およびその後の中枢神経系における軸索の脱髓化によって特徴付けられる、T細胞介在性自己免疫疾患である。EAEは、一般的に、ヒトのMSに関係する動物モデルと考えられる。Bolton、C.、Multiple Sclerosis(1995)1:143。急性モデルおよび再発性-寛解化(relapsing-remitting)モデルの両方が、開発されてきた。本発明の化合物は、Current Protocols in Immunology(上記)units 15.1および15.2に記載されるプロトコルを用いて、免疫介在性脱髓疾患に対するT細胞刺激性もしくは阻害性活性について試験され得る。ミエリン疾患に関するモデル(このモデルでは、Duncan、I. D.ら、Molec. Affied. Today(1997)554-561に記載されるように、中枢神経系に希突起神経膠細胞もしくはシュワン細胞が移植される)もまた参照のこと。

【0168】

関節炎に関する動物モデルは、コラーゲン誘発性関節炎である。このモデルは、ヒト自己免疫性慢性関節リウマチ慢性関節リウマチの臨床的、組織学的、および免疫学的特性を共有し、ヒト自己免疫性関節炎の容認できるモデルである。マウスおよびラットのモデルは、滑膜炎、軟骨性骨および助軟骨下の骨のびらんによって特徴付けられる。本発明の化合物は、Current Protocols in Immunology(上記)u

10

20

30

40

50

n i t s 1 5 . 5 に記載されたプロトコルを用いて、自己免疫性関節炎に対する活性に関して試験され得る。I s s e k u t z、A . C . ら、I m m u n o l o g y (1 9 9 6) 8 8 : 5 6 9 に記載される、C D 1 8 および V L A - 4 インテグリンに対するモノクローナル抗体を用いたモデルもまた参照のこと。

【 0 1 6 9 】

喘息のモデルが、記載されており、ここでは、動物をアルブミンに感作し、次いでエアロゾルによって送達される同じタンパク質でその動物を惹起することによって、抗原 - 誘発性の気道の過剰反応、肺の好酸球増加および炎症が、誘発される。いくつかの動物モデル（モルモット、ラット、非ヒト霊長類）が、エアロゾル抗原による惹起でヒトのアトピー性喘息と同様の症状を示す。マウスモデルは、ヒト喘息の特徴の多くを有する。喘息の処置における活性および有効性について本発明の化合物を試験するための適切な手順は、W o l y n i e c、W . W . ら、A m . J . R e s p i r . C e l l M o l . B i o l . (1 9 9 8) 1 8 : 7 7 7 およびそこで引用される参考文献によって記載される。

10

【 0 1 7 0 】

加えて、本発明の化合物が、乾癬様疾患についての動物モデルにおいて試験され得る。証拠は、乾癬に対するT細胞の病原性を示唆する。本発明の化合物は、S c h o n、M . P . ら、N a t . M e d . (1 9 9 7) 3 : 1 8 3 によって記載される s c i d / s c i d マウスモデルにおいて試験され得る。このモデルでは、マウスは、乾癬に似た組織病理学的皮膚損傷を示す。別の適切なモデルは、N i c k o l o f f、B . J . ら、A m . J . P a t l z . (1 9 9 5) 1 4 6 : 5 8 0 に記載されたように調製される、ヒト皮膚 / s c i d マウスキメラである。

20

【 0 1 7 1 】

組み換え（トランスジェニック）動物モデルは、トランスジェニック動物を作製するための標準的技術を用いて、目的の動物のゲノムに本明細書中で同定される遺伝子のコーディング部分を導入することによって、操作され得る。トランスジェニック操作のための標的として働き得る動物としては、限定ではなく、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、および非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、チンパンジーおよびサル）が挙げられる。導入遺伝子をこのような動物に導入するための当該分野で公知の技術としては、前核への微量注入（H o p p e および W a n g e r、米国特許第 4 , 8 7 3 , 1 9 1 号）；生殖系列へのレトロウイルス介在性遺伝子導入（例えば、V a n d e r P u t t e n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 2、6 1 4 8 - 6 1 5 [1 9 8 5] ）；肺性幹細胞への遺伝子ターゲティング（T h o m p s o n ら、C e l l 5 6、3 1 3 - 3 2 1 [1 9 8 9] ）；胚への電気穿孔（L o、M o l、C e l l . B i o l . 3、1 8 0 3 - 1 8 1 4 [1 9 8 3] ）；精子介在性遺伝子導入（L a v i t r a n o ら、C e l l 5 7、7 1 7 - 7 3 [1 9 8 9] ）が挙げられる。概説として、例えば、米国特許第 4 , 7 3 6 , 8 6 6 号を参照のこと。

30

【 0 1 7 2 】

本発明の目的として、トランスジェニック動物は、導入遺伝子をそれらの細胞の一部のみに保有する動物（「モザイク動物」）を含む。これらの導入遺伝子は、単一の導入遺伝子またはコンカテマー（例えば、頭 - 頭（h e a d - t o - h e a d ）タンデムもしくは頭 - 尾（h e a d - t o - t a i l ）タンデム）のいずれかとして組込まれ得る。特定の細胞型への導入遺伝子の選択的導入はまた、以下、例えば、L a s k o ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9、6 2 3 - 6 3 6 (1 9 9 2) の技術、によって可能である

40

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リングされ得る。例えば、サザンブロット分析もしくは P C R 増幅が、その導入遺伝子の組込みを検証するために使用され得る。次いで、インサイチュハイブリダイゼーション、ノザンブロット分析、P C R、または免疫細胞化学のような技術を用いて、m R N A 発現のレベルが分析され得る。

【 0 1 7 3 】

50

動物は、例えば、特定組織への免疫細胞の浸潤を決定するための組織学的検査によって、免疫疾患病態の徴候についてさらに検査され得る。ブロック試験も、また実施され得る。この試験では、トランスジェニック動物は、本発明の化合物によって処置され、T細胞増殖への効果の範囲を決定される。この実験では、本発明のポリペプチドに結合するブロック抗体（上記に記載されるように調製される）が動物に投与されて、その免疫機能への効果が決定される。

【0174】

あるいは、「ノックアウト」動物が構築され得る。この動物は、ポリペプチドをコードする内在遺伝子と、その動物の胚細胞に導入された、同じポリペプチドをコードする変化されたゲノムDNA相同組み換えの結果として、本明細書中で同定されたポリペプチドをコードする遺伝子の欠損もしくは変更を有する。例えば、特定のポリペプチドをコードするcDNAが、そのポリペプチドをコードするゲノムDNAを確立された技術に従ってクローニングするために、使用され得る。特定のポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部は、別の遺伝子（例えば、組み込みをモニタリングするために使用され得る選択マーカーをコードする遺伝子）によって欠失もしくは置換され得る。代表的に、数千ベースの、変更されていない、（5'末端および3'末端の両方で）隣接するDNAが、ベクターに含まれる[相同組み換えベクターについての記載に関しては、ThomasおよびCapecci、Cell、51:503(1987)を参照のこと]。ベクターは、胚性幹細胞株に（例えば、電気穿孔法によって）導入され、そして導入されたDNAが内在DNAと相同性に組み換えられた細胞が選択される[例えば、Liら、Cell、69:915(1992)を参照のこと]。次いで、選択された細胞が、動物（例えば、マウスもしくはラット）の胚盤胞に注入されて、凝集キメラを形成する[例えば、Bradley、Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach、E. J. Robertson(編)(IRL、Oxford、1987)、113~152ページを参照のこと]。次いで、キメラ胚が、適切な偽妊娠雌仮親に移植され得、そしてこの胚が、出産時期に至り、「ノックアウト動物」を産生する。相同性に組み換えられたDNAをそれらの生殖細胞中に含む子孫が、標準的技術によって同定され得、繁殖用動物として使用され得る。ここで、この動物の全ての細胞は、相同的に組み換えられたDNAを有する。ノックアウト動物は、例えば、特定の病的状態に対して防衛するそれらの能力に関して、およびそれらの、ポリペプチドの非存在に起因する病的状態の発症に関して特徴付けられる。

【0175】

(9. イムノアジュバント治療)

一つの実施形態において、免疫刺激効果を有する本発明の化合物が、腫瘍（癌）の処置のためのイムノアジュバント治療に使用され得る。T細胞がヒト腫瘍特異的抗原を認識することが、今ではよく証明されている。腫瘍抗原の一つの群（遺伝子のMAGE、BAGEおよびGAGEファミリーによってコードされる）は、全ての成人正常組織でサイレントであるが、腫瘍（例えば、黒色腫、肺腫瘍、頭部および頸部の腫瘍、ならびに膀胱癌）においてはかなりの量で発現される。Desmet、C.ら、(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93:7149。T細胞の同時刺激が、インビトロおよびインビボの両方で、腫瘍の退化および抗腫瘍反応を誘発することが示された。Melero、I.ら、Nature Medicine(1997)3:682; Kwon、E. D.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1997)94:8099; Lynch、D. H.ら、Nature Medicine(1997)3:625; Finn、O. J.およびLotze、M. T.、J. Immunol.(1998)21:114。本発明の刺激性化合物は、アジュバントとして、単独でか、または成長調節剤、細胞傷害剤もしくは化学療法剤と組み合わせて投与され、T細胞増殖/活性化ならびに腫瘍抗原への抗腫瘍応答を刺激し得る。成長調節剤、細胞障害剤もしくは化学療法剤は、公知の投与レジメンを用いて、従来量で投与され得る。本発明の化合物による免疫刺激活性は、成長調節剤、細胞障害剤もしくは化学療法剤の量を減少させ、それによっ

て患者に対するその毒性を低下させる可能性がある。

【0176】

癌は、増殖して腫瘍塊を形成する、正常組織に由来する異常な細胞もしくは新生物細胞の数の増加、これらの新生物細胞による隣接する組織への浸潤、ならびに最終的に血液もしくはリンパ系を介して領域のリンパ節および離れた部位へと広がる悪性細胞の生成（転移）によって特徴付けられる。癌の状態では、細胞は、正常細胞が成長しない状況下で増殖する。癌は、種々の程度の浸潤性および攻撃性によって特徴付けられる多様な形態になる。

【0177】

遺伝子発現の変化は、癌の一般的特徴である制御されない細胞成長および脱分化と緊密に関係する。特定によく研究された腫瘍のゲノムが、通常は腫瘍抑制遺伝子（これは、普段は悪性の細胞成長を防止するように機能する）と呼ばれる劣性遺伝子の発現の減少、および/または特定の優性遺伝子（例えば、癌遺伝子、これは悪性成長を増強するように作用する）の過剰発現を示すことが見出された。これらの遺伝子の変化の各々は、全体で新生物の全表現型を表すいくつかの形質の取り込みの原因であると見える（Hunter、Cell 64、1129 [1991]；Bishop、Cell 64、235-248 [1991]）。

【0178】

癌細胞における遺伝子（例えば、癌遺伝子）の過剰発現の周知の機構は、遺伝子の増幅である。これは、先祖細胞の染色体において特定の遺伝子の複数のコピーが生成されるプロセスである。このプロセスは、この遺伝子を含む染色体領域の不定期の複製と、これに続いてこの複製されたセグメントが組み換えられてこの染色体内に戻ることに関与する（Alitaloら、Adv. Cancer Res. 47、235-281 [1986]）。この遺伝子の過剰発現は、遺伝子の増幅に並行する（すなわち、作成されたコピー数に比例する）と考えられている。

【0179】

成長因子および成長因子レセプターをコードする原癌遺伝子は、種々のヒト悪性腫瘍（乳癌を含む）の病原性に重要な役割を果たすことが確認されている。例えば、185kd膜貫通糖タンパク質レセプター（p185^{HER2}；HER2）をコードするヒトErbB2遺伝子（erbB2、her2もしくはc-erbB-2としても公知）が、上皮成長因子レセプター（EGFR）に関与し、ヒト乳癌の約25%～30%で過剰発現されることが見出されている。（Slamonら、Science 235：177-182 [1987]；Slamonら、Science 244：707-712 [1989]）。

【0180】

原癌遺伝子の遺伝子増幅が、代表的に、癌のより悪性の形態に関与し、そして臨床的結果の予測因子として作用し得る現象であることが報告されている（Schwabら、Genes Chromosomes Cancer 1、181-193 [1990]；Alitaloら、上記）。したがって、erbB2の過剰発現は、一般的に、特に腋窩リンパ節に関する原疾患を有する患者における、悪い予後の予測因子として認められており（Slamonら、[1987]および[1989]、上記；RavdinおよびChamness、Gene 159：19-27 [1995]；ならびにHynesおよびStern、Biochim Biophys Acta 1198：165-184 [1994]）、そしてホルモン治療ならびに化学療法レジメン（CMF（シクロホスファミド、メトトレキサート、およびフルオロウラシル）ならびにアントラサイクリンを含む）への感受性および/または抵抗性に結び付けられている（Baselgaら、Oncology 11(3 Suppl 1)：43-48 [1997]）。しかし、erbB2過剰発現と悪い予後との関連にもかかわらず、タキサンによる処置へ臨床的に反応するHER2-陽性患者の確率は、HER2-陰性患者の確率よりも三倍高い（同書）。組み換えヒト化抗erbB2（抗HER2）モノクローナル抗体（マウス抗erbB2抗体4D

10

20

30

40

50

5 のヒト化型、r h u M A b H E R 2 もしくはハーセプチン7と呼ばれる)は、広範な既存の抗癌治療を受けているE r b B 2 - 過剰発現性悪性乳癌を有する患者において、臨床的に活性であった。(B a s e l g a ら、J . C l i n . O n c o l . 1 4 : 7 3 7 - 7 4 4 [1 9 9 6])。

【 0 1 8 1 】

(1 0 . 薬物候補についてのスクリーニングアッセイ)

薬物候補についてのスクリーニングアッセイは、本明細書中で同定される遺伝子によってコードされるポリペプチドもしくはそれらの生物学的に活性なフラグメントと結合または複合体化するか、本明細書中で同定される遺伝子によってコードされるポリペプチドの発現および/もしくは活性、またはこのコードされるポリペプチドと他の細胞のタンパク質と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る。このようなスクリーニングアッセイは、化学物質ライブラリのハイスループットスクリーニングへと改変可能なアッセイを含み、このことは、これらのアッセイを、低分子の薬物候補の同定に特に適するようにさせる。検討される低分子としては、合成有機もしくは無機化合物が挙げられ、これには、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、および、特に、抗体が挙げられる。この抗体としては、限定ではなく、ポリクローナルおよびモノクローナルな抗体および抗体フラグメント、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、ならびにこのような抗体もしくはフラグメントのキメラもしくはヒト化型、そしてヒト抗体および抗体フラグメントが挙げられる。このアッセイは、種々の形式(当該分野でよく特徴付けられた、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、イムノアッセイおよび細胞ベースのアッセイを含む)で実施され得る。

10

20

【 0 1 8 2 】

全てのアッセイは、それらが、薬物候補と本明細書中で同定される核酸によってコードされるポリペプチドとが、これら2つの化合物が相互作用することを可能にするに十分な条件および時間の下で接触することを求めるという点で、共通である。

【 0 1 8 3 】

結合アッセイにおいては、その相互作用は結合であり、形成された複合体は、単離され得るかまたは反応混合物中で検出され得る。特定の実施形態において、本明細書中で同定される遺伝子によってコードされるポリペプチドもしくは薬物候補は、固相上(例えば、マイクロタイタープレート上)に、共有結合もしくは非共有結合によって固定化される。非共有結合は、一般的に、固体表面をポリペプチド溶液でコーティングし、そして乾燥させることによって達成される。あるいは、固定化された抗体、例えば、固定化されたポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体が、それを固体表面に固定するために使用され得る。このアッセイは、非固定成分(検出可能な標識によって標識され得る)を、固定化された成分(例えば、固定された成分をコーティングされた表面)に添加することによって実施される。反応が完了した場合、未反応成分が、例えば洗浄によって除去されて、固体表面に固定された複合体が検出される。非固定成分が検出可能な標識を最初に有する場合、表面上に固定化された標識の検出は、複合体化が生じたことを示す。非固定成分が検出可能な標識を最初に有さない場合、複合体化は、例えば、固定された複合体に特異的に結合する標識抗体を用いることによって検出され得る。

30

40

【 0 1 8 4 】

候補化合物が、遺伝子本明細書中で同定される遺伝子によってコードされる特定のタンパク質と相互作用するが、それに結合しない場合、このタンパク質とのその相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用の検出のための周知の方法によってアッセイされ得る。このようなアッセイは、伝統的アプローチ(例えば、架橋結合、免疫共沈降、および勾配もしくはクロマトグラフィーカラムを通じた同時精製)を含む。加えて、タンパク質-タンパク質相互作用は、F i e l d s および共同研究者によって記載された酵母ベースの遺伝子系[F i e l d s およびS o n g、N a t u r e (L o n d o n) 3 4 0、2 4 5 - 2 4 6 (1 9 8 9) ; C h i e n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8、9 5 7 8 - 9 5 8 2 (1 9 9 1)]を用いることによって、C h e v r a y およびN a t

50

hans [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)] によって開示されるように、モニタリングされ得る。多くの転写活性因子（例えば、酵母 GAL4）は、2つの物理的に分離した分子ドメインからなり、これは一方は DNA 結合ドメインとして働き、もう一方は転写活性化ドメインとして働く。前術の刊行物に記載される酵母発現系（一般的に「ツ-ハイブリッドシステム」と呼ばれる）は、この性質を利用して、ツ-ハイブリッドタンパク質を用いる。このタンパク質の一方は、GAL4 の DNA 結合ドメインに融合され、もう一方では、候補活性タンパク質が、この活性化ドメインに融合される。GAL4 に活性化されるプロモーターの制御下での GAL1-lacZ レポーター遺伝子の発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介した GAL4 活性の再構築に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、色素生産性基質 - ガラクトシダーゼによって検出される。ツ-ハイブリッド技術を用いて2つの特定の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 (MATCHMAKERTM) が、Clontech から市販されている。この系はまた、特定のタンパク質相互作用に関与するタンパク質ドメインをマッピングするため、およびこれらの相互作用にとって重要なアミノ酸残基を特定するために、拡張され得る。

10

【0185】

本明細書中で同定される遺伝子と、試験され得る他の細胞内もしくは細胞外成分との相互作用を妨害する化合物を見つけるため、反応混合物は、通常、その遺伝子の産物および細胞内もしくは細胞外成分を含んで、この2つの産物が相互作用し、結合することを可能にする条件および時間の下で、調製される。結合を阻害する試験化合物の能力を試験するため、反応は、試験化合物の非存在下および存在下で実行される。加えて、第三の反応混合物にブラシボが添加され、ポジティブコントロールとして働き得る。混合物中に存在する試験化合物と細胞内もしくは細胞外成分との間の結合（複合体形成）は、上記のようにモニタリングされる。コントロール反応中では複合体が形成されるが、試験化合物を含む反応混合物中では複合体が形成されないことは、試験化合物がこの試験化合物とその反応相手との相互作用を妨害することを示す。

20

【0186】

（11. 免疫関連疾患の処置のための組成物および方法）

免疫関連疾患の処置において有用な組成物としては、非限定で、処置されるべき疾患に依存して、免疫機能（例えば、T細胞増殖/活性化、リンホカイン放出、または免疫細胞浸潤）を阻害するかまたは刺激する、抗体、有機低分子、無機低分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンス分子およびリボザイム分子、三重らせん分子などが挙げられる。

30

【0187】

例えば、アンチセンス RNA および RNA 分子は、標的 mRNA にハイブリダイズして mRNA の転写を直接ブロックし、タンパク質翻訳を妨げるように作用する。アンチセンス DNA が使用される場合、翻訳開始部位（例えば、標的遺伝子ヌクレオチド配列の -10 位と +10 位との間）に由来するオリゴデオキシリボヌクレオチドが、好ましい。

【0188】

リボザイムは、RNA の特異的切断を触媒可能な酵素的 RNA 分子である。リボザイムは、相補的標的 RNA に対する配列特異的ハイブリダイゼーションによって作用し、その後、エンドヌクレアーゼ切断が続く。潜在的 RNA 標的の範囲内の特異的リボザイム切断部位は、公知の技術によって同定され得る。さらなる詳細については、例えば、Rossi, Current Biology 4, 469-471 (1994) および PCT 出願番号 WO97/33551 (1997年9月18日公開) を参照のこと。

40

【0189】

転写を阻害するために使用される三重らせん核酸分子編成の核酸は、一本鎖であるべきであり、デオキシヌクレオチドで構成されるべきである。これらのオリゴヌクレオチドの塩基性組成物は、Hoogsteen 塩基対形成法則 (Hoogsteen base pairing rule) を介して三重らせん形成を促進するように設計され、これは、二重鎖の一本鎖上のプリンまたはピリミジンのかなり大きな進展が、一般に必須である

50

。さらなる詳細については、例えば、PCT出願番号WO97/33551(前出)を参照のこと。

【0190】

これらの分子は、上で考察した任意のスクリーニングアッセイまたはスクリーニングアッセイの任意の組み合わせおよび/または当業者に周知の任意の他のスクリーニング技術によって同定され得る。

【0191】

(12. 抗体)

本発明に従う、中でも最も有望な薬物候補は、T細胞増殖、白血球浸潤などを阻害し得るか(アンタゴニスト)または刺激し得る(アゴニスト)、抗体および抗体フラグメントである。例示的な抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、二種特異性抗体およびヘテロ結合体抗体が挙げられる。

10

【0192】

(a. ポリクローナル抗体)

ポリクローナル抗体を調製するための方法は、当業者に公知である。ポリクローナル抗体は、哺乳動物内で、例えば免疫剤および(所望される場合)アジュバントの1以上の注射によって惹起される。代表的に、免疫剤および/またはアジュバントは、哺乳動物において、多重皮下注射または多重腹腔内注射によって、注射される。免疫剤としては、本発明のPRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドまたはPRO1868ポリペプチド、またはそれらのフラグメントもしくは融合タンパク質が挙げられる。免疫化される哺乳動物において免疫原性であることが公知のタンパク質に免疫剤を結合することが、有用であり得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシニアン、血清アルブミン、ウシサイログロブリンおよび大豆トリブシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントの例としては、Freund完全アジュバントおよびMPL-TDMアジュバント(モノホスホリルリピッドA、合成トレハロースジコリノミコレート(dicorynomycolate))が挙げられ得る。免疫化プロトコールは、過度の実験をすることなく当業者によって選択され得る。

20

【0193】

(b. モノクローナル抗体)

本発明のポリペプチドを認識しこれに結合する抗体、またはこれに対するアンタゴニストとして作用する抗体は、あるいは、モノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein, Nature, 256:495(1975)によって記載されるようなハイブリドーマ方法を用いて調製され得る。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物は、代表的に免疫化剤で免疫化され、免疫化剤に特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生し得るリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化され得る。

30

【0194】

免疫化剤としては、代表的に、本発明のPRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチド、PRO245ポリペプチドまたはPRO1868ポリペプチド、それらの抗原性フラグメント、またはそれらの融合タンパク質が挙げられる。一般に、ヒト起源の細胞が所望される場合に、抹消血白血球(「PBL」)が使用されるか、または非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合に、リンパ節細胞が使用される。次いで、リンパ球は、好適な融合剤(例えば、ポリエチレングリコール)を用いて、不死化細胞株と融合され、ハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986)59~103頁]。不死化細胞株は、通常、形質転換した哺乳動物細胞であり、特に、げっ歯類、ウシおよびヒトの起源の骨髄腫細胞である。通常、ラットまたはマウス骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合不死化細胞の増殖および生存を阻害する1以上の物質を含有する、好適な培養培地中で培養され得る

40

50

。例えば、親細胞が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酵素（HGPRTまたはHPRT）を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的に、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含有し（「HAT培地」）、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の増殖を妨げる。

【0195】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合する細胞株であり、選択された抗体産生細胞による抗体の高レベルの発現を支持し、そしてHAT培地のような培地に感受性である。より好ましい不死化細胞株は、マウス骨髄腫株であり、これは、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CaliforniaおよびAmerican Type Culture Collection, Rockville, Marylandから入手し得る。ヒト骨髄腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体産生について記載されている[Kozbor, J. Immunol, 133:3001(1984); Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)51~63頁]。

10

【0196】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、本発明のポリペプチドを指向するかまたは本発明のポリペプチドと類似の活性を有するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（PIA）または酵素結合免疫吸着剤アッセイ（ELISA））によって決定される。このような技術は、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキッチャード分析によって決定され得る。

20

【0197】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは、限界希釈手順によってサブクローニングされ、標準的方法によって増殖される[Goding(前出)]。この目的のために好適な培養培地としては、例えば、Dulbecco改変Eagle培地およびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、インビボ（哺乳動物の腹水）で増殖され得る。

30

【0198】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、培養培地または腹水から、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィー）によって単離され得る。

【0199】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,567号に記載される）によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来手順を使用して容易に単離され、配列決定され得る（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる）。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一旦単離してから、DNAを、発現ベクター内に入れ、次いで、これを他に免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞（例えば、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞または骨髄腫細胞）内にトランスフェクトし、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得られる。DNAはまた、コード配列をマウス配列と相同なヒト重鎖および軽鎖定常ドメインと置換すること[米国特許第4,816,567号; Morrisonら, 前出]または非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列の全てもしくは一部免疫グロブリンコード配列に共有結合することにより、改変され得る。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

40

50

ドメインと置換されるか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインと置換されて、キメラ二価抗体を作製し得る。

【0200】

抗体は、好ましくは一価抗体である。一価抗体を調製するための方法は、当該分野で周知である。例えば、1つの方法は、免疫グロブリン軽鎖および改変重鎖の組換え発現を包含する。重鎖は、一般に、重鎖交叉を防止するために、Fc領域の任意の点で短縮される。あるいは、関連するシステイン残基が、別のアミノ酸残基と置換されるか、または欠失されて、交叉を防ぐ。

【0201】

インビトロ方法もまた、一価抗体を調製するために好適である。抗体を消化し、そのフラグメント（特にFabフラグメント）を産生することは、当該分野で公知の慣用技術を使用して、達成され得る。

【0202】

（c. ヒト抗体およびヒト化抗体）

本発明の抗体は、ヒト化抗体およびヒト抗体をさらに含み得る。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合配列）であり、これは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含み、ここで、レシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基は、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラットまたはウサギ）のCDR（ドナー抗体）からの残基によって置換される。幾つかの場合、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても移入されたCDRまたはフレームワーク配列においても見出されない残基も、含み得る。一般に、ヒト化抗体は、実質的に全ての少なくとも1つの、代表的に2つの可変ドメインを含み、ここで、全てまたは実質的に全てのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、そして全てまたは実質的に全てのFR領域は、ヒト免疫グロブリン定常配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域（Fc）を含み、代表的には、ヒト免疫グロブリンのFcを含む [Jonesら, Nature, 321: 522 - 525 (1986); Riechmannら, Nature, 332: 323 - 329 (1988)、および Presta, Curr. Opin. Struct. Biol., 2: 593 - 596 (1992)]。

【0203】

非ヒト抗体のヒト化のための方法は、当該分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からヒト化抗体へ導入された、1以上のアミノ酸残基を有する。非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「移入」残基と呼ばれ、これは、代表的には、「移入」可変ドメインをいう。ヒト化は、Winterおよび共同研究者らの方法 [Jonesら, Nature, 321: 522 - 525 (1986); Riechmannら, Nature, 332: 323 - 327 (1988); Alerhoeyenら, Science, 239: 1534 - 1536 (1988)] に従い、げっ歯類CDRまたはCDR配列を、対応するヒト抗体の配列と置換することにより、本質的に実施され得る。従って、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり（米国特許第4,816,567号）、ここで、実質的にインタクトなヒト化可変ドメイン未満が、非ヒト種からの対応する配列によって置換されている。実施において、ヒト化抗体は、代表的にヒト抗体であり、ここで、幾つかのCDR残基および場合により幾つかのFR残基は、げっ歯類抗体の相似部位からの残基によって置換される。

【0204】

ヒト化抗体はまた、当該分野で公知の種々の技術を用いて産生され得、これらの技術としては、ファージディスプレイライブラリー [HoogenboomおよびWinter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marksら, J. Mol. B

10

20

30

40

50

iol., 222:581(1991)]が挙げられる。ColeらおよびBoernerらの技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製を可能にし得る[Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77頁(1985); Boernerら, 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遺伝子座をトランスジェニック動物(例えば、マウス)内に導入することによって作製され得、ここで、内在性免疫グロブリン遺伝子は、部分的にまたは完全に非活性化される。誘発の際に、ヒト抗体産生が観察され、これは、あらゆる局面(遺伝子再編成、遺伝子アセンブリ、および抗体レパートリーを含む)で、ヒトにおいて見られる抗体と非常に類似する。このアプローチは、例えば、以下において記載される: 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、ならびに以下の科学刊行物: Marksら, Bio/Technology 10, 779-783(1992); Lonbergら, Nature 368 856-859(1994); Morrison, Nature 368, 812-13(1994); Fishwildら, Nature Biotechnology 14, 845-51(1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826(1996); LonbergおよびHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93(1995)。

【0205】

(d. 二種特異性抗体)

二種特異性抗体は、モノクローナルの、好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体であり、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有する。本発明の場合、結合特異性の1つは、本発明のポリペプチドに対するものであり得、他の1つは、任意の他の抗原に対するもの、好ましくは細胞表面タンパク質またはレセプターもしくはレセプターサブユニットに対するものであり得る。

【0206】

二種特異性抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。従来、二種特異性抗体の組換え産生は、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づき、ここで、2つの重鎖は、異なる特異性を有する(MilsteinおよびCuello, Nature, 305:537-539[1983])。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダム分類ゆえに、これらのハイブリドーマ(クアドローマ(quadroma))は、潜在的に10の異なる抗体分子の混合物を産生し、これの1つのみが正しい二種特異性構造を有する。正しい分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順が、WO93/08829(1993年5月13日公開)およびTraunekerら, EMBOJ, 10:3655-3659(1991)において開示される。

【0207】

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は、免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合され得る。融合は、好ましくは、免疫グロブリン重鎖定常ドメインと行われ、この重鎖定常ドメインは、ヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域の少なくとも一部を含む。第1重鎖定常領域(CH1)を有することが好ましく、このCH1は、融合の少なくとも1つに存在する軽鎖結合に必須の部位を含む。免疫グロブリン重鎖融合体、および所望の場合免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別々の発現ベクター内に挿入され、そして好適な宿主生物体内に同時トランスフェクトされる。二種特異性抗体の詳細については、例えば、Sureshら, Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照のこと。

【0208】

(e. 異種結合抗体)

異種結合抗体は、2つの共有結合した抗体から構成される。このような抗体は、例えば

、不要な細胞に対して（米国特許第4,676,980号）およびHIV感染の処置のために（WO91/00360；WO92/200373；EP03089）、免疫系細胞を標的することが提唱されている。抗体は、合成タンパク質化学において公知の方法（架橋剤に関する方法を含む）を使用してインビトロで調製され得ることが、企図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド変換反応を使用するか、またはチオエーテル結合を形成することにより、構築され得る。この目的のために好適な試薬としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート、ならびに米国特許第4,676,980号において記載される試薬が挙げられる。

【0209】

（f. エフェクター機能操作）

エフェクター機能の点で本発明の抗体を改変し、例えば免疫関連疾患の処置における抗体の有効性を増強することが望ましい。例えば、システイン残基が、Fc領域内に導入され、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能にし得る。このように産生されたホモダイマー抗体は、内在化能力を改善してもよく、そして/または補体媒介性細胞殺傷および抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）を増加してもよい。Caronら、*J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) および Shopes, B., *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992) を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体がまた、Wolfら *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993) に記載のように、ヘテロ二機能性架橋剤を用いて調製され得る。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有し、それにより、増強された補体溶解能力およびADCC能力を有するように操作され得る。Stevensonら、*Anti-Cancer Drug Design.*, 3:219-230 (1989) を参照のこと。

【0210】

（g. 免疫結合体）

本発明はまた、細胞毒性剤（例えば、化学療法剤、毒素（例えば、細菌起源、真菌起源、植物起源または動物起源の酵素的活性毒素もしくはそれらのフラグメント）、または放射活性アイソトープ（すなわち、放射結合体（radioconjugate）））に結合する抗体を含む免疫結合体に関する。

【0211】

このような免疫結合体の産生において有用な化学療法剤は、上述されている。使用され得る酵素的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、エキソトキシンA鎖（*Pseudomonas aeruginosa*由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、-サルシン（sarcin）、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチン（dianthin）タンパク質、Phytolacca americanaタンパク質（PAPI、PAPIIおよびPAP-S）、ゴーヤ（*Momordica charantia*）インヒビター、クルシン（curcin）、クロシン（crotin）、サボンソウ（*Saponaire officinalis*）インヒビター、ゲロニン（gelonin）、マイトジェリン（mitogellin）、レストリコシン（restrictocin）、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）およびトリコテセン（tricothecene）が挙げられる。種々の放射性核種が、放射結合抗体の産生のために利用し得る。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y および ^{186}Re が挙げられる。

【0212】

抗体および細胞毒性剤の結合体は、種々の二機能性タンパク質カップリング剤を使用して作製され得る。これらのカップリング剤としては、例えば、以下が挙げられる：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）、イミノチオレン（IT）、イミドエステルの二機能性誘導体（例えば、ジメチルアジピイミデートHCL）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベリン酸塩）、アルデヒド（

10

20

30

40

50

例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス-活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら, Science 238:1098(1987)に記載のように調製され得る。炭素-14-標識化1-イソチオシアネートベンジル1-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)は、放射性核種の抗体への結合に対する例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照。

【0213】

別の実施形態において、抗体は、組織前標的化における利用のために「レセプター」(例えば、ストレプトアビジン)と結合され得、ここで、抗体-レセプター結合体は、患者に投与され得、その後、未結合の結合体が、清澄剤(clearing agent)を用いて循環から除去され、次いで、細胞毒性剤(例えば、放射性核種)と結合した「リガンド」(例えば、アビジン)が投与される。

【0214】

(h. 免疫リポソーム)

本明細書中で開示されるタンパク質などは、免疫リポソームとして処方され得る。抗体を含むリポソームは、当該分野で公知の技術(例えば、Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688(1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); および米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号に記載される)によって調製される。延長された循環時間を有するリポソームが、米国特許第5,013,556号に開示される。

【0215】

特に有用なリポソームが、脂質組成物(ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE))を用いた逆相蒸発方法によって産生され得る。リポソームは、規定された大きさの穴のフィルターを通して押し出されて、所望の直径を有するリポソームを生じる。本発明の抗体のFab'フラグメントが、Martinら, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載のように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに結合され得る。化学療法剤(例えば、ドキシソルピシン)が、必要に応じて、リポソーム内に含まれる。Gabizonら, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照のこと。

【0216】

(13. 薬学的組成物)

本発明の活性分子(ポリペプチドおよび抗体を含む)および上で開示したスクリーニングアッセイによって同定された他の分子が、薬学的組成物の形態で、炎症性疾患の処置のために投与され得る。

【0217】

活性分子(PRO301タンパク質、PRO362タンパク質、PRO245タンパク質もしくはPRO1868タンパク質、または本発明の抗体)の治療処方物は、所望の純度を有する活性分子を最適な薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences(第16版)Osol, A.(編集)[1980])と混合することによって、凍結乾燥処方物または水溶液の形状で、保存のために調製される。受容可能なキャリア、賦形剤または安定剤は、使用される用量および濃度でレシピエントに対し非毒性であり、以下を含み得る:例えばリン酸、クエン酸および他の有機酸の緩衝液;アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤;保存剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド;ヘキサメチオニウムクロリド;ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド;フェノール

10

20

30

40

50

アルコール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；例えばメチルまたはプロピルパラベンのようなアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；3 - ペンタノール；および m - クレゾール）；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、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（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、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン）；単糖類、二糖類、および他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリンが挙げられる）；EDTA のようなキレート剤；糖（例えばショ糖、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール）；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn - タンパク質錯体）；ならびに非イオン性界面活性剤（例えば、TWEEN^{T M}、PLURONICS^{T M}、またはポリエチレングリコール（PEG）。

10

【0218】

本発明のスクリーニングアッセイによって同定される化合物は、類似の様式で、当該分野で周知の標準的技術を用いて、処方され得る。

【0219】

リポフェクションおよびリポソームはまた、ポリペプチド、抗体または抗体フラグメントを細胞内に送達するためにも使用され得る。抗体フラグメントが使用される場合、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フラグメントが、好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づき、ペプチド分子は、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するように設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得、そして/または組換え DNA 技術によって産生され得る（例えば、Marascoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889 - 7893 [1993]）。

20

【0220】

本明細書中の処方物はまた、処置される特定の徴候に必須の 1 を超える活性化化合物（好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない補完的な活性を有する化合物）を含み得る。あるいは、またはさらに、この組成物は、細胞毒性剤、サイトカインまたは増殖阻害剤を含有し得る。このような分子は、意図される目的のために有効な量で、組み合わせることで適切に存在する。

【0221】

活性分子はまた、例えば、封入（coascervation）技術または界面重合体化によって（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセルまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）、コロイド性薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマイクロエマルジョンにおいて、調製された微小カプセル内に取り込まれ得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences（第16版）Osol, A.（編集）（1980）に開示される。

30

【0222】

インピボ投与のために使用される処方物は、滅菌されなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過によって、容易に達成され得る。

40

【0223】

徐放性調製物が、調製され得る。徐放性調製物の好適な例としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、造形品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリックスの例としては、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）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第 3,773,919 号）、L - グルタミン酸およびエチル - L - グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン - ビニルアセテート、LUPRON DEPOSIT^{T M}（乳酸 - グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射可能ミクロスフェア）のような分解性乳酸 - グリコール酸コポリマー、ならびにポリ - D - (-) - 3 - ヒドロキシブチル酸が挙げられる。エ

50

チレン - 酢酸ビニルおよび乳酸 - グリコール酸のようなポリマーは、100日にわたって分子を放出し得、特定のヒドロゲルは、より短い期間タンパク質を放出する。カプセルに封入した抗体が、体内に長期間残る場合、これらは、37 で湿度に曝された結果として変性し得るかまたは凝集し得、生物学的活性の低下をもたらし、免疫原性を変化し得る。安定化のために、関連の機構に基づいて合理的戦略が工夫され得る。凝集機構が、チオ - ジスルフィド交換を介した分子間S - S結合形成であることが見出される場合、安定化は、スルフヒドリル残基を改変し、酸性溶液を凍結乾燥し、水分含量を制御し、適切な付加剤を用い、そして特定のポリマーマトリックス組成物を開発することにより、達成され得る。

【0224】

(14. 処置の方法)

本発明のポリペプチド、抗体および他の活性化合物が、種々の炎症性疾患および炎症性状態（例えば、白血球の組織への浸潤、T細胞増殖の刺激、T細胞増殖の阻害、血管浸透性もしくはその阻害の増加または減少により特徴付けられる、T細胞媒介性疾患）を処置するために使用され得ることが企図される。

【0225】

ここで、PRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868は、A33抗原への相同性によって特徴付けられるタンパク質ファミリーの新規のメンバーをコードする。これらのポリペプチドの前炎症性の性質は、以下で記載されるインビトロアッセイにおいて示される。従って、これらのポリペプチドのアンタゴニストは、炎症性疾患を処

【0226】

PRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868（それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号9および配列番号31）は、接合部接着分子（JAM）に対する相同性を共有する（Martin - Paduraら, J Cell Biol. 1998 142(1): 117 - 27）。最も重要な同一性は、DNA40628（配列番号1）によってコードされるPRO301タンパク質により、67%で共有される。JAMは、インビボでMCP - 1、MCP - 3およびLPSに応答した単球の漸増に関連する。JAMに対する抗体は、インビボで単球遊出をブロックする。JAMは、マウス上皮および内皮に、単球遊出のための結合部接着分子として局在する。他の白血球もまた、JAM

【0227】

本発明のPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868のポリペプチド、抗体および他の化合物のアンタゴニストで処置される例示的な状態または疾患としては、炎症性腸疾患（すなわち、潰瘍性大腸炎、クローン病）、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症（強皮症）、突発性炎症性ミオパシー（皮膚筋炎、多発性筋炎）、ショーグレン症候群、全身性脈管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）、自己免疫性血小板減少（突発性血小板減少紫斑病、免疫媒介性血小板減少）、甲状腺炎（グレーブズ病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、アトピー性甲状腺炎）、真性糖尿病、免疫媒介性腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）、中枢神経系および末梢神経系の脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、突発性脱髄多発性神経障害またはギヤン - バレー症候群、および慢性炎症性脱髄多発性神経障害）、感染性肝炎（A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、および他の非肝親和性（non - hepatotropic）ウイルス）のような肝胆道疾患、自己免疫慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、および硬化性胆管炎、炎症性および線維性肺疾患（例えば、嚢胞性線維症、グルテン感受性腸症、およびハウィップル病）、自己免疫性または免疫媒介性皮膚疾患（水疱性皮膚炎、多形紅斑および接触性皮膚炎）、乾癬、アレルギー性疾患（例えば、喘息

10

20

30

40

50

、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹)、突発性肺線維症および過敏性肺炎、移植関連疾患(移植片拒絶および移植片対宿主病を含む)が、挙げられる。

【0228】

全身性エリテマトーデスにおいて、疾患の主なメディエータは、自己タンパク質/組織に対する自己反応性抗体の産生およびその後の免疫媒介性炎症の産生である。抗体は、組織障害を直接的または間接的のどちらかで媒介する。Tリンパ球は、組織損傷に直接かわらないと考えられているが、Tリンパ球は、自己反応性抗体の発生に必須である。従って、疾患の発症は、Tリンパ球依存性である。多数の器官および系が、臨床的に影響を受け、これらの器官としては、腎臓、肺、筋骨格系、粘膜皮膚、目、中枢神経系、心臓血管系、胃腸管、骨髄および血液が挙げられる。

10

【0229】

慢性関節リウマチ(RA)は、慢性全身性自己免疫炎症性疾患であり、これは、結果として関節軟骨への損傷を伴う、多数の関節の滑膜に主に関する。病因は、Tリンパ球依存性であり、リウマチ因子、自己IgGを指向する自己抗体の産生に関連し、結果として生じる免疫複合体(関節の体液および血液中の高いレベルを達成する)の形成を伴う。関節におけるこれらの複合体は、著しい白血球および単球の、滑膜への浸潤、ならびにその後の著しい滑膜変化を誘導する;関節腔/体液は、多くの好中球を伴う類似の細胞によって浸潤される。冒された組織は、主に関節であり、しばしば、左右対称のパターンである。しかし、関節外疾患はまた、2つの主な形態で生じる。1つの形態は、進行性関節疾患および肺線維症の代表的病変、脈管炎、ならびに皮膚潰瘍を伴う、関節外病変の発症である。関節外疾患の第2の形態は、いわゆるフェルティ症候群であり、これは、RA疾患の経過の後期に発生し、時々、関節疾患後に休止し、そして好中球減少症、血小板減少症および巨脾腫の存在を含む。これは、梗塞;皮膚潰瘍および壊疽の形成を伴う多数の器官における脈管炎によって達成される。患者はまた、冒された関節を覆う皮下組織において、しばしばリウマチ小節を発症する;後期段階の小節は、炎症性細胞浸潤の混合に取り巻かれた壊疽中心を有する。RAを生じる他の徴候としては、以下が挙げられる:心膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、肺線維症を伴う間質性肺炎、乾性角結膜炎およびリウマチ小節。

20

【0230】

若年性慢性関節炎は、慢性突発性炎症性疾患であり、これは、しばしば、16歳未満で始まる。この表現型は、RAと幾つかの類似を有する;リウマチ因子ポジティブである幾人かの患者は、若年性慢性関節リウマチと分類される。疾患は、3つの主要なカテゴリーにさらに分類される性:小関節、多関節性、および全身性。関節炎は、重篤であり得、代表的に破壊的であり、そして関節強直および成長遅延をもたらす。他の徴候としては、慢性前部ブドウ膜炎および全身性アミロイドーシスを含み得る。

30

【0231】

脊椎関節症は、幾つかの共通する臨床特徴およびHLA-B27遺伝子産物の発現に対する共通の関連を有する障害の群である。障害は、以下を含む:強直性骨増殖症、ライター症候群(反応性関節炎)、炎症成長疾患に関連する関節炎、乾癬に関連する脊椎炎、若年性発症脊椎関節症および未分化脊椎関節症。顕著な特徴としては、脊椎炎を伴うかまたは伴わない仙腸骨炎(sacroiliitis);炎症性非対称性関節炎;HLA-B27関連(I型MHCのHLA-B遺伝子座の血清学的に規定された対立遺伝子);目の炎症、および他のリウマチ様疾患に関連する自己抗体の非存在。疾患の誘導の鍵として最も関係する細胞は、CD8+Tリンパ球であり、これは、I型MHC分子によって存在する抗原を標的する細胞である。CD8+細胞は、I型MHC対立遺伝子HLA-B27に対して、MHC I型分子によって発現される異種ペプチドであるかのように反応し得る。HLA-B27のエピトープは、細菌抗原性エピトープまたは他の微生物抗原性エピトープを模倣し得、従って、CD8+T細胞応答を誘導する。

40

【0232】

全身性硬化症(強皮症)は、未知の病因を有する。疾患の特徴は、皮膚の硬化である;

50

おそらくこれは、活性な炎症性プロセスによって誘導される。強皮症は、局所性または全身性であり得る；血管病変は、共通であり、微小血管系における上皮性の細胞の損傷は、全身性硬化症の発達における初期の重要な事象である；血管損傷は、免疫媒介性であり得る。免疫原性原理は、多くの患者において、皮膚反応病変における単核細胞浸潤の存在および抗核抗体の存在によって暗示される。ICAM-1は、しばしば皮膚病片における線維芽細胞の細胞表面上でアップレギュレートされ、これらの細胞とのT細胞相互作用が、疾患の病院において役割を有し得ることを示唆する。関連する他の器官としては、以下が挙げられる：胃腸管：異常ぜん動/運動をもたらす平滑筋萎縮および線維症；腎臓：腎皮質血流の減少を引き起こす小弓状動脈および小葉間動脈に影響する同心性内皮下内膜増殖（蛋白尿、窒素血症および高血圧を生じる）；骨格筋：萎縮、間質線維症；炎症；肺：間質肺炎および間質線維症；および心臓：収縮性帯壊死、癒痕/線維症。

10

【0233】

突発性炎症性ミオパシーとしては、皮膚筋炎、多発性筋炎が挙げられ、他は、筋衰弱を生じる未知の病因の慢性筋肉炎症の障害である。筋肉損傷/炎症は、しばしば左右対称であり、進行性である。自己抗体は、殆どの形態に関連する。これらの筋炎特異的自己抗体は、構成要素であるタンパク質およびRNAの機能を指向しかつこれを阻害し、タンパク質合成に関連する。

【0234】

ショーグレン症候群は、免疫媒介性炎症およびその後の涙腺および唾液腺の機能的破壊に起因する。疾患は、炎症性結合組織疾患に関連し得るか、またはこれに伴い得る。疾患は、Ro抗原およびLa抗原に対して産生される自己抗体に関連し、これらは両方とも、小RNA-タンパク質複合体に関連する。病変は、他の特徴または関連（胆汁性肝硬変（biliary cirrhosis）、抹消神経障害または感覚神経障害、および明確な紫斑）を有する、乾性角結膜炎、口腔乾燥症を生じる。

20

【0235】

全身性脈管炎としては、一次病変が炎症であり、その後血管を損傷して、冒された血管によって供給される組織に虚血/壊死/退化を生じ、そして幾つかの場合、最終的に末端器官不全を生じる。血管炎（vasculitides）もまた、他の免疫炎症性媒介性疾患（例えば、慢性関節リウマチ、全身性硬化症など、特に免疫複合体の形成にもまた関連する疾患）の二次病変または後発症として起こり得る。原発性全身性脈管炎における疾患としては、いかが挙げられる：全身性壊死性脈管炎：結節性多発動脈炎、アレルギー性血管炎および肉芽腫症、多発性血管炎；ウェーゲナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症；および巨細胞性動脈炎。種々の血管炎としては、以下が挙げられる：粘膜皮膚リンパ節症候群（MLNSまたは川崎病）、孤立性CNS脈管炎、Behet's病、閉塞性血栓血管炎（パーガー病）および皮膚壊死性脈管炎。列挙した脈管炎の殆どの種類の病原性機構は、血管における免疫グロブリン複合体の堆積、およびその後のADCC、補体活性化、またはその両方を介した炎症性応答の誘導に主に起因すると考えられる。

30

【0236】

サルコイドーシスは、体内のほぼ任意の組織における類上皮肉芽腫の存在によって特徴付けられる未知の病因の状態である；肺の関連は、最も一般的である。病因は、疾患の部位における活性化マクロファージおよびリンパ系細胞の持続性に関連し、この疾患は、慢性続発症（その後の局所的および全身的活性産物の放出によって生じ、この産物は、これらの細胞型から放出される）を有する。

40

【0237】

自己免疫溶血性貧血としては、自己免疫溶血性貧血、免疫汎血球減少症、および発作性夜間ヘモグロビン血症が挙げられ、これらは、赤血球細胞（そして幾つかの場合、血小板を含む他の血液細胞も同様である）の表面上で発現する抗原に反応する抗体の産生の結果であり、そして補体媒介性溶解および/またはADCC/Fc-レセプター-媒介性機構を介した、細胞をコートするこれらの抗体の除去の反映である。

【0238】

50

突発性血小板減少性紫斑病および他の臨床設定においては免疫媒介性血小板減少を含む自己免疫血小板減少において、血小板破壊/除去が、血小板に付着する抗体または補体および補体溶解、ADCCまたはFC-レセプター-媒介性機構によるその後の除去の結果として起こる。

【0239】

グレーブズ病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球甲状腺炎、および萎縮性甲状腺炎が挙げられる甲状腺炎は、甲状腺抗原に应答する自己免疫の結果であり、甲状腺に存在し、しばしば甲状腺に特異的であるタンパク質に反応する抗体の産生を伴う。存在する実験モデルとしては、以下が挙げられる：自発的モデル：ラット（BUFおよびBBラット）ならびにニワトリ（肥満ニワトリ系統）；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）のいずれかで免疫化した動物。

10

【0240】

I型真性糖尿病またはインスリン依存性糖尿病は、膵臓小島細胞の自己免疫破壊である；この破壊は、自己抗体および自己反応性T細胞によって媒介される。インスリンまたはインスリンレセプターに対する抗体もまた、インスリン非应答性の表現型を発現し得る。

【0241】

糸球体腎炎および尿細管間質性腎炎を含む免疫媒介性腎疾患は、腎臓組織に対する抗体またはTリンパ球媒介性損傷の結果であり、これは、腎臓抗原に対する自己反応性の抗体もしくはT細胞の産生の結果としての直接的結果、または他の非腎臓抗原に対して反応性の腎臓における抗体および/または免疫複合体の堆積の結果としての間接的結果のどちらかである。従って、免疫複合体の形成を生じる他の免疫媒介性疾患はまた、間接的続発症として、免疫媒介性腎疾患を誘導し得る。直接免疫機構および間接免疫機構の両方は、炎症性应答を生じ、これは、腎臓組織において病変を産生/誘導し、これは、結果として、器官機能不全および、幾つかの場合、腎不全への進行を伴う。体液性および細胞性免疫機構の両方は、病変の病因に関連し得る。

20

【0242】

中枢神経系および末梢神経系の脱髄性疾患としては、多発性硬化症；突発性脱髄性多発神経障害またはギラン-バレー症候群；ならびに慢性炎症性脱髄性多発神経障害が挙げられ、これらは、自己免疫原理を有すると考えられ、そして希突起膠細胞また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、神経脱髄を生じる。MSにおいて、疾患誘導および進行が、Tリンパ球依存性であることを示唆する証拠が存在する。多発性硬化症は、Tリンパ球依存性かつ再発性-軽減の経過または慢性進行性経過のいずれかを有する、脱髄疾患である。病因は、未知である；しかし、ウイルス感染、遺伝性素因、環境、および自己免疫性は、全て寄与する。病変は、主にTリンパ球媒介性の浸潤、小グリア細胞、およびマクロファージの浸潤を含む；CD4+Tリンパ球は、病変において優勢な細胞型である。希突起膠細胞死およびその後の脱髄の機構は、非常によく知られるが、Tリンパ球誘導される可能性が高い。

30

【0243】

炎症性かつ線維性の肺疾患としては、好酸球性肺炎、突発性肺線維症および過敏性肺炎が挙げられ、これらは、制御不能な免疫炎症应答を含み得る。この反応の阻害は、治療的に有益である。

40

【0244】

自己免疫性または免疫媒介性皮膚疾患としては、水疱性皮膚炎、多形紅班、および接触性皮膚炎が挙げられ、これらは、自己抗体によって媒介され、その発生は、Tリンパ球依存性である。

【0245】

乾癬は、Tリンパ球媒介性炎症性疾患である。病変は、Tリンパ球、マクロファージおよび抗原産生細胞、ならびに幾らかの好中球の浸潤を含む。

【0246】

アレルギー性疾患としては、喘息；アレルギー性鼻炎；アトピー性皮膚炎；食物過敏症

50

；および蕁麻疹が挙げられ、これらは、Tリンパ球依存性である。これらの疾患は、主にTリンパ球誘導性炎症、I g E 媒介性炎症またはこの両方の組み合わせによって媒介される。

【0247】

移植関連疾患としては、移植片拒絶および移植片対宿主病（GVHD）が挙げられ、これらは、Tリンパ球媒介性である；Tリンパ球機能の阻害は、寛解性である。

【0248】

他の疾患に罹患する患者は、免疫および/または炎症性応答の増大から利益を得うる。このような疾患としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ウイルス感染（AIDS、A、B、C、D、E型肝炎が挙げられるが、これらに限定されない）、細菌感染、真菌感染、ならびに原虫および寄生虫感染（MLRを刺激する分子または誘導体/アゴニストが、感染因子に対する免疫応答を増強するために治療的に使用され得る）、免疫不全性疾患（先天性および後天性、（HIV感染におけるような）感染誘導性、または抗原性（すなわち、化学治療由来として）の免疫不全を含む）、および新形成。

10

【0249】

ある種のヒト癌患者は、新形成細胞上の抗原に対して抗体および/またはTリンパ球応答を発症することが実証されている。また、新形成の動物モデルにおいても、免疫応答の増強は、特定の新生物の拒絶または抗体をもたらし得ることが、示されている。MLRにおいてTリンパ球応答に影響する分子は、新形成に対する免疫応答をインビボで変えることにおいて有用性を有する。

20

【0250】

前炎症性特性を有する分子の阻害はまた、再灌流傷害；卒中；心筋梗塞；アテローム硬化症；急性肺傷害；出血性ショック；変性関節疾患および膵炎において、治療利益を有し得る。

【0251】

PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチドおよびPRO245ポリペプチドは、刺激Tリンパ球の増殖の刺激剤として活性である（実施例5）；従って、PRO301、PRO362およびPRO245のアンタゴニストは、PRO301ポリペプチド、PRO362ポリペプチドおよびPRO245ポリペプチドの促進作用を阻害することにより、免疫応答性疾患（特に、炎症性障害）の処置において有用である。

30

【0252】

本発明のPRO1868ポリペプチドは、軟骨細胞の再分化を誘導した（実施例19）。従って、PRO1868およびPRO1868のアンタゴニストは、種々の骨および/または軟骨関連疾患の処置において使用され得る。

【0253】

本発明のPRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868のポリペプチド、抗体および他の化合物は、哺乳動物（好ましくはヒト）に、公知の方法に従って投与され、これらの方法は、例えば、ボラスでの静脈内投与、または一定時間にわたる連続的な輸液（筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内、くも膜下腔内、経口、局所的、または吸入（鼻腔内、肺内）経路による）である。ポリペプチドおよび抗体の、静脈内投与または吸入投与が好ましい。

40

【0254】

免疫アジュバント治療において、他の治療レジメン（例えば、抗癌剤の投与）が、本発明のタンパク質、抗体または化合物の投与と組み合わせられ得る。例えば、本発明の免疫アジュバントで処置される患者はまた、抗癌剤（化学療法剤）または放射線治療をも受け得る。このような化学療法剤の調製および用量計画は、製造業者の指示に従い得るか、または熟練した医師により、経験的に決定され得る。このような化学療法剤の調製および用量計画はまた、Chemotherapy Service, M. C. Perry（編集）、Williams & Wilkins, Baltimore, MD（1992）にも記載される。化学療法剤は、免疫アジュバントの投与に先行しても続いてもよく、また

50

はこれらと同時に与えられてもよい。さらに、抗エストロゲン化合物（例えば、タモキシフェン）または抗プロゲステロン（例えば、オナプリストン（onapristone）（EP 6 1 6 8 1 2 参照）が、このような分子について公知の用量で与えられ得る。

【0255】

他の免疫疾患関連抗原または腫瘍関連抗原に対する抗体を投与することもまた、所望され得る。これらの抗体としては、CD 20、CD 11a、CD 18、ErbB 2、EGFR、ErbB 3、ErbB 4、または血管上皮因子（VEGF）に結合する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、またはさらに、同じ抗原または2以上の異なる抗原に結合する2以上の抗体が、本明細書中で開示され、患者に同時投与され得る。時々、1以上のサイトカインを患者に投与することもまた、有益であり得る。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドまたは他の化合物は、増殖阻害剤と共に投与される。例えば、増殖阻害剤が最初に投与され、その後、本発明のポリペプチドまたは他の化合物が投与され得る。しかし、同時投与または最初の投与もまた、企図される。増殖阻害剤の好適な用量は、現在使用される用量であり、増殖阻害剤と本発明のポリペプチドまたは他の化合物との総合作用（相乗作用）に起因して、より低くてもよい。

10

【0256】

重症の免疫関連疾患の処置または軽減のために、適切な用量の本発明の化合物が、（上で定義したような）処置されるべき疾患の型、疾患の重症度および経過、薬剤が予防目的であるか治療目的であるか、以前の治療、患者の臨床履歴および化合物への反応、ならびに主治医の裁量に依存する。この化合物は、患者に、1度にまたは一連の処置にわたって、好適に投与される。好ましくは、ヒトにおいて試験する前に、用量依存曲線および薬学的組成物を、最初はインビトロで、次いで有用な動物モデルで決定することが所望される。

20

【0257】

例えば、疾患の型および重症度に依存して、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 15 \text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1 \sim 20 \text{mg}/\text{kg}$ ）のポリペプチドまたは抗体が、例えば、1以上の別々の投与または連続輸液による患者への投与のための最初の候補用量である。代表的な1日用量は、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であり得、上述の因子に依存する。数日以上にわたる反復投与のために、状態に依存して、処置は、疾患症状の所望の抑制が起きるまで、持続される。しかし、他の用量レジメンもまた、有用であり得る。この治療の進行は、従来技術およびアッセイによって、容易にモニターされ得る。

30

【0258】

（15．製造品）

本発明の別の実施形態において、上述の障害の診断または処置に有用な物質を含む製造品が、提供される。製造品は、容器とラベルとを含む。好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジおよび試験管が挙げられる。容器は、種々の物質（例えば、ガラスまたはプラスチック）から形成され得る。容器は、状態の診断または処置のために有用な組成物を保持し、そして滅菌アクセスポートを有する（例えば、容器は、皮下注射針によって穴をあけ得る栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであり得る）。粗製物中の活性剤は、通常、本発明のポリペプチドまたは抗体である。容器上、または容器に伴うラベルは、この組成物が、最適な状態（特に、免疫関連状態）の診断または処置のために使用されることを示す。製造品は、薬学的に受容可能な緩衝液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水、リンガー溶液およびデキストロース溶液）を含む第2の容器をさらに含み得る。これは、市場でまたは使用者の視点で望ましい他の物質（他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用指示を有するパッケージ挿入物）をさらに含み得る。

40

【0259】

（16．疾患の診断および予後）

細胞表面タンパク質（例えば、特定の免疫関連疾患において過剰発現するタンパク質）は、薬物候補または疾患処置の優れた標的である。免疫関連疾患状態において増幅された遺伝子によってコードされる分泌タンパク質と同じタンパク質は、これらの疾患の診断お

50

よび予後にさらなる使用を見出す。例えば、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、または他の免疫関連疾患において増幅された遺伝子のタンパク質産物を指向する抗体が、診断または予後として使用され得る。このような抗体およびキャリア（例えば、緩衝液）が、タンパク質産物を検出するための抗体の使用のための指示に沿った好適なパッケージ内の、診断キットに含まれ得る。

【0260】

PRO1868ポリペプチドは、種々のヒト腫瘍組織（例えば、肺腫瘍および胸部腫瘍）において、有意に過剰発現される（実施例20）。従って、PRO1868抗体は、患者において腫瘍を診断するために使用され得る。

【0261】

PRO362ポリペプチドの発現は、新形成および炎症性疾患に関連する組織において有意に増大することが見出された。PRO245ポリペプチドの発現もまた、慢性炎症性疾患および新生物を有する組織において有意に増大した。従って、PRO362抗体およびPRO245抗体は、炎症性組織および新生物を診断する。

【0262】

例えば、抗体（抗体フラグメントを含む）が、過剰発現されるかまたは高度に発現される遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を、定性的または定量的に検出するため使用され得る。好ましくは、抗体は、検出可能な（例えば蛍光の）標識を備え、そしてこの結合は、光学顕微鏡、フローサイトメトリ、または当該分野で公知の他の技術によってモニターされ得る。これらの技術は、過剰発現遺伝子が細胞表面タンパク質をコードする場合に、特に好適である。このような結合アッセイは、当該分野で周知であり、本質的に上述のように実施され得る。

【0263】

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイチュ検出は、例えば、免疫蛍光または免疫電子顕微鏡によって実施され得る。この目的のために、組織学的生検が、患者から採取され、そして標識化抗体が、好ましくは抗体を生物学的サンプル上に被せることにより、これに適用される。この手順はまた、試験組織内でマーカー遺伝子産物の分布を決定することを可能にする。インサイチュ検出について、組織学的方法の種々の改変が容易に使用可能であることが、当業者に明らかである。

【0264】

以下の実施例は、例示的目的のみで提供され、本発明の範囲を限定することを、多少なりとも意図しない。

【0265】

本明細書中に挙げた全ての特許および参考文献は、その全体が本明細書により参考として援用される。

【実施例】

【0266】

本実施例で参照される市販の試薬は、他に示されない限り製造業者の指示書従って使用した。以下の実施例、および本明細書全体にわたって、ATCC受託番号によって同定されるこれらの細胞の供給源は、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209である。

【0267】

（実施例1）

（ヒトPRO301をコードするcDNAの単離）

Swiss-Protの公式データベースに由来する約950個の公知の分泌タンパク質由来の細胞外ドメイン（ECD）配列（存在する場合、分泌シグナル配列を含む）を、ESTデータベースを検索するために使用した。ESTデータベースとしては、公式ESTデータベース（例えば、GenBank）、独自のESTデータベース（LIFESEQ（登録商標）、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto

10

20

30

40

50

、C A) が挙げられる。検索を、E S T 配列の 6 フレームまでの翻訳に対する E C D タンパク質配列の対照として、コンピュータプログラム B L A S T または B L A S T 2 [A l t s c h u l r , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 (1 9 9 6)] を使用して実施した。公知のタンパク質をコードしなかった 7 0 (もしくはいくつかの事例では、9 0) あるいはそれ以上の B L A S T スコアを生じるこれらの対照を、クラスター形成し、そしてプログラム「p h r a p」(P h i l G r e e n , U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n , S e a t t l e , W a s h i n g t o n) を用いて共通 D N A 配列に集めた。

【 0 2 6 8 】

D N A 3 5 9 3 6 をコードする共通 D N A 配列を、p h r a p を使用して集めた。いくつかの実施形態において、共通 D N A 配列を、その共通配列を上記に列挙した E S T 配列の 3 つの供給源を使用して可能な限り長く伸長させるために、b l a s t および p h r a p の繰り返しサイクルを使用して伸長させた。

【 0 2 6 9 】

この共通配列に基づいて、オリゴヌクレオチドを合成した：1) P C R によって、目的の配列を含む c D N A ライブラリーを同定し、そして 2) プローブとして使用するために、全長コード配列のクローンを単離する。順方向 P C R プライマーおよび逆方向 P C R プライマー(それぞれ、* . f および * . r と表記される)は、2 0 ~ 3 0 ヌクレオチドの範囲であり得、そして長さが 1 0 0 ~ 1 0 0 0 b p の P C R 産物を得るように設計される。いくつかの事例において、共通配列が 1 ~ 1 . 5 k b p よりも大きい場合に、さらなるオリゴヌクレオチドが合成される。いくつかのライブラリーを全長クローンの供給源についてスクリーニングするために、A u s u b e l r , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y のように、P C R プライマー対を用いて、ライブラリー由来の D N A を P C R 増幅によってスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを使用して、プローブオリゴヌクレオチドと P C R プライマーの一方を必要とするインビボクローニング手順によって、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

【 0 2 7 0 】

いくつかのライブラリーを全長クローンの供給源についてスクリーニングするために、ライブラリー由来の D N A を、上記の P C R プライマー対を用いて、P C R 増幅によってスクリーニングした。次いでポジティブライブラリーを使用して、P R O 3 0 1 遺伝子をコードするクローンを、プローブオリゴヌクレオチドと P C R プライマーの一方を使用して単離した。

【 0 2 7 1 】

c D N A ライブラリーの構築のための R N A を、ヒト胎児腎臓から単離した。c D N A クローンを単離するために使用される c D N A ライブラリーを、市販の試薬(例えば、I n v i t r o g e n , S a n D i e g o , C A ; C l o n t e c h など)を使用する標準的な方法によって構築した c D N A を、N o t I 部位を含むオリゴ d T でプライミングし、S a l I ヘミキナーゼアダプターに対して平滑部で連結し、N o t I で切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズを合わせ、そして固有の X h o I 部位および N o t I 部位において規定した配向で適切なクローニングベクター(例えば、p R K B または p R K D ; p K R 5 B は、S f i I 部位を含まない p R K 5 D の前駆体である；H o l m e s r , S c i e n c e , 2 5 3 : 1 2 7 8 - 1 2 8 0 (1 9 9 1) を参照のこと)にクローン化した。

【 0 2 7 2 】

c D N A クローンを完全に配列決定した。天然の配列 D N A 4 0 6 2 8 の全長オリゴヌクレオチド配列は、図 5 に示される(配列番 1 1)。クローン D N A 4 0 6 2 8 は、ヌクレオチド位置 5 2 ~ 5 4 で明らかな翻訳開始部位を有する単一のオープンリーディングフレームを含む(図 5 ; 配列番号 1 1)。予測ポリペプチド前駆体は、予測分子量 3 2 5 8 3 ダルトンおよび p I 8 . 2 9 を有する 2 9 9 個のアミノ酸長である。クローン D N A 4 0 6 2 8 は、A T C C に寄託され、A T C C 受託番号 2 0 9 4 3 2 が割り当てられている

10

20

30

40

50

。

【 0 2 7 3 】

全長配列の B L A S T および F a s t A 配列アラインメント分析に基づいて、D N A 4 0 6 2 8 によってコードされる P R O 3 0 1 は、A 3 3 抗原前駆体に対するアミノ酸配列同一性 (3 0 %)、ならびにコクサッキーおよびアデノウイルスレセプタードメインに対するアミノ酸配列同一性 (2 9 %) を示す。

【 0 2 7 4 】

上記の手順で使用されるオリゴヌクレオチドは、以下の通りであった：

【 0 2 7 5 】

【 化 1 】

OLI2162 (35936.f1)(配列番号 12)
TCGCGGAGCTGTGTTCTGTTTCCC

OLI2163 (35936.p1)(配列番号 13)
TGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAAACTGTTGTGCCT

OLI2164 (35936.f2)(配列番号 14)
ACACCTGGTTCAAAGATGGG

OLI2165 (35936.r1)(配列番号 15)
TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG

OLI2166 (35936.f3)(配列番号 16)
TTGCCTTACTCAGGTGCTAC

OLI2167 (35936.r2)(配列番号 17)
ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG

(実施例 2)

(ヒト P R O 3 6 2 をコードする c D A N の単離)

S w i s s - P r o t の公式データベースに由来する約 9 5 0 個の公知の分泌タンパク質由来の細胞外ドメイン (E C D) 配列 (存在する場合、分泌シグナル配列を含む) を、発現配列タグ (E S T) データベースを検索するために使用した。E S T データベースとしては、公式 E S T データベース (例えば、G e n B a n k)、独自の E S T D N A データベース (L I F E S E Q (登録商標)、I n c y t e P h a r m a c e u t i c a l s、P a l o A l t o、C A) が挙げられる。検索を、E S T 配列の 6 フレームまでの翻訳に対する E C D タンパク質配列の対照として、コンピュータプログラム B L A S T または B L A S T 2 [A l t s c h u l r、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y、2 6 6 : 4 6 0 - 4 8 0 (1 9 9 6)] を使用して実施した。公知のタンパク質をコードしなかった 7 0 (もしくはいくつかの事例では、9 0) あるいはそれ以上の B L A S T スコアを生じるこれらの対照を、クラスター形成し、そしてプログラム「p h r a p」(P h i l G r e e n、U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n、S e a t t l e、W a s h i n g t o n) を用いて共通 D N A 配列に集めた。

【 0 2 7 6 】

共通 D N A 配列を、p h r a p を使用して、他の E S T 配列に関して集めた。この共通配列を、本明細書中で D N A 4 2 2 7 5 (配列番号 5) と指定する (図 4 C を参照のこと)。図 4 C に示される D N A 4 2 2 7 5 (配列番号 5) 共通配列に基づいて、オリゴヌクレオチドを合成した：1) P C R によって、目的の配列を含む c D N A ライブラリーを同定し、そして 2) プローブとして使用するために、P R O 3 6 2 についての全長コード配列のクローンを単離する。順方向 P C R プライマーおよび逆方向 P C R プライマーは、一般的に、2 0 ~ 3 0 ヌクレオチドの範囲であり得、そして多くの場合、長さが約 1 0 0 ~

10

20

30

40

50

1000bpのPCR産物を得るように設計される。プローブ配列は、代表的には、長さが45~55bpである。いくつかの事例において、共通配列が約1~1.5kbpよりも大きい場合、さらなるオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリー由来のDNAを、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biologyのように、PCRプライマー対を用いて、ライブラリー由来のDNAをPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを使用して、プローブオリゴヌクレオチドとPCRプライマーの一方を必要とするインビボクローニング手順によって、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

【0277】

PCRプライマー（順方向および逆方向）を合成した：

【0278】

【化2】

順方向PCRプライマー 1 (42257.f1) 5'-TATCCCTCCAATTGAGCACCTGG-3' (配列番号 18)

順方向PCRプライマー 2 (42257.f2) 5'-GTCGGAAGACATCCCAACAAG-3' (配列番号 19)

逆方向PCRプライマー 1 (42257.r1) 5'-CTTCACAATGTCGCTGTGCTGCTC-3' (配列番号 20)

逆方向PCRプライマー 2 (42257.r2) 5'-AGCCAAATCCAGCAGCTGGCTTAC-3' (配列番号 21)

さらに、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、以下のヌクレオチド配列を有する共通DNA 42257配列から構築した：

ハイブリダイゼーションプローブ (42257.p1)

【0279】

【化3】

5'-TGGATGACCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGAT-3'

(配列番号 22)

全長クローンの供給源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリー由来のDNAを、上記で同定したPCRプライマー対を用いるPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを使用して、PRO362遺伝子をコードするクローンを、プローブオリゴヌクレオチドおよびPCRプライマーの一方を使用して単離した。

【0280】

cDNAライブラリーの構築のためのRNAを、ヒト胎児脳組織 (LIB153) から単離した。cDNAクローンを単離するために使用されるcDNAライブラリーを、市販の試薬 (例えば、Invitrogen (San Diego, CA) 製の試薬) を使用する標準的な方法によって構築した。このcDNAを、NotI部位を含むオリゴdTを用いてプライミングし、SalIヘミキナーゼアダプターに対して平滑部で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズを合わせ、そして固有のXhoI部位およびNotI部位において規定した配向で適切なクローニングベクター (例えば、pRKBまたはpRKD; pKR5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である; Holmesら、Science、253:1278-1280 (1991) を参照のこと) にクローン化した。

【0281】

記載されたように単離したクローンのDNA配列決定から、PRO362についての全長DNA配列が得られた (本明細書中で、UNQ317 (DNA45416-1251 (配列番号7) と指定される))。

【0282】

10

20

30

40

50

UNQ317 (DNA45416-1251)の完全ヌクレオチド配列は、図6に示されている(配列番号7)。クローンUNQ367 (DNA45416-1251)(配列番号7)は、ヌクレオチド位置1082~1084で明らかな翻訳開始部位を有する単一のオープンリーディングフレームを含む(図6;配列番号7)。予測ポリヌクレオチド前駆体は、321個のアミノ酸長である(図3;配列番号2)。図3に示される全長PRO362タンパク質は、約35,544ダルトンの推定分子量、および約8.51のpIを有する。図3に示されるような全長PRO362ポリペプチド(配列番号2)の分析は、約アミノ酸149~約アミノ酸152でのグリコサミノグリカン付着部位、および約アミノ酸276~約アミノ酸306の膜貫通ドメインの存在を証明する。クローンUNQ317 (DNA45416-1251)は、ATCC受託番号:209620で受託されている。 10

【0283】

(実施例3)

(ヒトPRO245をコードするcDNAクローンの単離)

Swiss-Protの公式タンパク質データベースに由来する約950個の公知の分泌タンパク質由来の細胞外ドメイン(ECD)配列(存在する場合、分泌シグナルを含む)を、発現配列タグ(EST)データベースを検索するために使用した。ESTデータベースとしては、公式ESTデータベース(例えば、GenBank)、独自のEST DNAデータベース(LIFESEQ(登録商標)、Incyte Pharmaceuticals、Palo Alto、CA)が挙げられる。検索を、EST配列の6フレームまでの翻訳に対するECDタンパク質配列の対照として、コンピュータプログラムBLASTまたはBLAST2[Altschulら、Methods in Enzymology、266:460-480(1996)]を使用して実施した。公知のタンパク質をコードしなかった70(もしくはいくつかの事例では、90)あるいはそれ以上のBLASTスコアを生じるこれらの対照を、クラスター形成し、そしてプログラム「phrap」(Phil Green、University of Washington、Seattle、Washington)を用いて共通DNA配列に集めた。 20

【0284】

共通DNA配列を他のEST配列に関して集め、ここで、この共通配列は、本明細書中でDNA30954(配列番号27)と指定される。DNA30954共通配列に基づいて、オリゴヌクレオチドを合成して、目的の配列を含むcDNAをPCRによって同定し、そしてプローブとして使用するために、PRO245についての配列をコードする全長のクローンを単離した。 30

【0285】

PCRプライマーの対(順方向および逆方向)を合成した:

【0286】

【化4】

順方向PCRプライマー 5'-ATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCC-3'(配列番号28)

逆方向PCRプライマー 5'-ACCTGCGATATCCAACAGAATTG-3'(配列番号29) 40

順方向PCRプライマーおよび逆方向PCRプライマーは、一般的に、20~30ヌクレオチドの範囲であり、そして多くの場合、長さが約100~1000bpのPCR産物を得るように設計される。プローブ配列は、代表的には、長さが40~55bpである。いくつかの事例において、共通配列が約1~1.5kbpよりも大きい場合に、さらなるオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biologyのように、PCRプライマー対を用いて、PCR増幅によってスクリーニングした。

【0287】

さらに、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、以下のヌクレオ 50

チド配列を有する共通DNA30954配列から構築した：

ハイブリダイゼーションプローブ：

【0288】

【化5】

5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCC-3'

(配列番号 30)

全長クローンの供給源についていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のDNAを、上記で規定したPCRプライマーを用いるPCR増幅によってスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを使用して、PRO245遺伝子をコードするクローンを、プローブオリゴヌクレオチドおよび一方のPCRプライマーを使用して単離した。

10

【0289】

cDNAライブラリーの構築のためのRNAを、ヒト胎児肝臓組織から単離した。cDNAクローンを単離するために使用されるcDNAライブラリーを、市販の試薬（例えば、Invitrogen (San Diego, CA) 製の試薬）を使用する標準的な方法によって構築した。このcDNAを、NotI部位を含むオリゴdTを用いてプライミングし、SalIヘミキナーゼアダプターに対して平滑部で連結し、NotIで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズを合わせ、そして固有のXhoI部位およびNotI部位において規定した配向で適切なクローニングベクター（例えば、pRKBまたはpRKD；pKR5Bは、SfiI部位を含まないpRK5Dの前駆体である；Holmesら、Science、253：1278-1280 (1991)を参照のこと）にクローン化した。

20

【0290】

上記のように単離されたクローンのDNA配列決定によって、天然の配列PRO245についての全長DNA配列 [本明細書中で、UNQ219 (DNA35638) (配列番号8) と指定される]、および由来するタンパク質配列 (配列番号9) が得られた。

【0291】

UNQ219 (DNA35638) の完全ヌクレオチド配列は、図7に示されている (配列番号8)。クローンUNQ219 (DNA35638) (配列番号8) は、ヌクレオチド位置89~91で明らかな翻訳開始部位を有する単一のオープンリーディングフレーム (Kozakら、前出)、およびヌクレオチド位置1025~1027での終止コドンにて末端を有する (図7、配列番号8)。予測ポリペプチド前駆体は、312個のアミノ酸長である (図11) (配列番号9)。クローンUNQ219 (DNA35638) は、1997年9月17日にATCCに寄託されており、ATCC受託番号2095265で譲渡されている。

30

【0292】

(実施例4)

(上皮細胞増殖に関するVEGF刺激増殖の障害)

40

ウシ副腎皮質血管内皮 (ACE) 細胞 (初期培養物由来、最大12~14継代) を、3 ng/mL VEGFが補充された低グルコースDMEM、10%子ウシ血清、2 mM グルタミン、1 x pen / strep およびファンギゾン (fungizone) 中の100 μL 当たり500細胞/ウェルの密度で、96ウェルのマイクロタイタープレート (Amersham Life Science) にプレートした。コントロールを、同じ様式であるがいくつかはVEGFを含まずにプレートした。PRO301およびPRO245ポリペプチドの試験サンプルを、200 μLの最終容積に対する100 μL容積中に添加した。細胞を、37 °C で6~7日間インキュベートした。培地を吸引し、そして細胞をPBSで1回洗浄した。酸ホスファターゼ反応混合物 (100 μL、0.1 M 酢酸ナトリウム、pH 5.5、0.1% Triton-100、10 mM リン酸 p-ニトロフェ

50

ニル)を添加した。37 で2時間のインキュベーションの後、反応を10mLの1N NaOHの添加によって停止させた。ODを、マイクロタイタープレートリーダー上で405nmにて測定した。コントロールは、細胞なし、細胞単独、細胞+FGF(5ng/mL)、細胞+VEGF(3ng/mL)、細胞+VEGF(3ng/mL)+TGF-(1ng/mL)、および細胞+VEGF(3ng/mL)+LIF(5ng/mL)であった。(1ng/mLでのTGF-濃度は、VEGF刺激細胞増殖の70~90%をブロックすることが公知である)。

【0293】

結果を、VEGF(3ng/mL)刺激細胞増殖の阻害%を算出することによって評価し、これは、OD_{405nm}での、(1)刺激なしの細胞に対する酸ホスファターゼ活性、および(2)VEGF刺激活性の参照TGF-阻害に対する酸ホスファターゼ活性を測定することによって決定した。表1に示される結果は、細胞増殖の阻害(特に、癌治療、そして具体的には、腫瘍血管新生の阻害)におけるPRO301およびPRO245ポリペプチドの有用性を示している。

【0294】

(表1)

【0295】

【表1-1】

試験した化合物	濃度	コントロールに対する増殖%
DNA40628 タンパク質 (配列番号1)	7.0 nM	1.02
DNA40628 タンパク質 (配列番号1)	70.0 nM	0.88
DNA40628 タンパク質 (配列番号1)	700.0 nM	0.44
DNA40628 タンパク質 (配列番号1)	0.01%	0.92
DNA40628 タンパク質 (配列番号1)	0.1%	0.85
DNA40628 タンパク質 (配列番号1)	1.0%	0.68
DNA35638 タンパク質 (配列番号9)	0.01%	0.76

【0296】

【表1-2】

DNA35638 タンパク質 (配列番号9)	0.1%	0.35
DNA35638 タンパク質 (配列番号9)	1.0%	0.11
DNA35638 タンパク質 (配列番号9)	0.48 nM	1.03
DNA35638 タンパク質 (配列番号9)	4.8 nM	0.95
DNA35638 タンパク質 (配列番号9)	48.0 nM	0.49

(実施例5)

(混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおける刺激活性)

以下に、PRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868ポリペプチドが、刺激T-リンパ球の増殖を刺激し得るか否かを決定するためのアッセイを記載する。リンパ球の増殖を刺激する化合物は、治療的に有用であり、炎症応答の増強(例えば、新生物形成に対する免疫応答の増強)が有益である。リンパ球の増殖を刺激するこのよう

な化合物に対するアンタゴニストは、治療的に有用であり、炎症応答における低下が有益である。治療剤は、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの形態（例えば、ポリペプチドに対するマウス - ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体）を取り得る。

【0297】

このアッセイについての基本的なプロトコルは、Current Protocol in Immunology, Unit 3.12, J. E. Coligan, A. M. Krubisbeek, D. H. Marlies, E. M. Shevach および W. Strober 編、National Institute of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc に記載されている。

10

【0298】

より具体的には、1つのアッセイ改変において、末梢血単核細胞（PBMC）が、哺乳類個体（例えば、ヒト志願者）から、ロイコフェレシス（leukopheresis）（一方のドナーが刺激性PBMCを供給し、他方のドナーが応答性PBMCを供給する）によって単離される。所望の場合、細胞を、単離後にウシ胎仔血清およびDMSO中で凍結させる。凍結細胞は、アッセイ培地（37、5%CO₂）中で一晩解凍され得、次いで、洗浄され、3 × 10⁶ 細胞/mlのアッセイ培地（RPMI；10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルビン酸）に再懸濁される。

【0299】

刺激物質PBMCは、細胞を照射（約3000Rad）することによって調製される。アッセイは、三連のウェル中に以下の混合物をプレートすることによって準備される：1%～0.1%に希釈された100μlの試験サンプル；50μlの照射された刺激細胞、および50μlの応答性PBMC細胞。100μlの細胞培養または100mlのCD4-IgGを、コントロールとして使用する。次いで、ウェルを、37、5%CO₂で4日間インキュベートする。5日目に、各々のウェルをトリチウム化したチミジン（1.0mCi/ウェル；Amersham）でパルスする。細胞を3回洗浄し、次いで、標識の取り込みを評価する。

20

【0300】

PRO301、PRO362、およびPRO245ポリペプチドを、アッセイの別の改変において試験した。この改変アッセイにおいて、PBMCは、BALB/cマウスおよびC57B6マウスの脾臓から単離した。この細胞を、アッセイ培地（RPMI；10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%グルタミン、1%HEPES、1%非必須アミノ酸、1%ピルビン酸）中の新たに収集した脾臓から引き出し、そしてPBMCを、Lympholyte M（Organon Teknika）上にこれらの細胞をオーバーレイし、2000rpmで20分間遠心分離し、回収し、アッセイ培地中で単核細胞層を洗浄し、そして細胞を1 × 10⁷ 細胞/mlのアッセイ培地に再懸濁することによって単離した。次いで、アッセイを上記のように行った。

30

【0301】

以下の表2に示される結果は、本発明のPRO301、PRO362およびPRO245ポリペプチドが、刺激T細胞の増殖の刺激物質として活性であることを示す。コントロールを上回るポジティブな増大は、好ましい180%以上の増大がポジティブであると考えられる。しかし、コントロールよりも大きいいずれの値も、試験タンパク質についての刺激性効果を示す。

40

【0302】

（表2）

【0303】

【表 2】

化合物	濃度	コントロールに対する増加%
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	0.1%	181.7
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	1.0%	187.3
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	0.1%	193.4
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	1.0%	204.1
DNA45416 タンパク質 (配列番号 2)	0.1%	87.4
DNA45416 タンパク質 (配列番号 2)	1.0%	180.2
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	0.1%	189.7
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	0.1%	193.7
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	1.0%	212.5
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	1.0%	300.5

10

(実施例 6)

(モルモット皮膚への炎症細胞浸潤)

以下の実施例は、本発明のポリペプチドが、それらがモルモット皮膚への炎症細胞浸潤 (すなわち、好中球、好酸球、単球、またはリンパ球) を刺激することにおいて炎症誘発性であることを示す。本明細書中で記載されるアッセイは、各々のタンパク質がモルモットの皮膚への炎症細胞浸潤を誘導する能力をモニターする。炎症性浸潤を刺激する化合物は、治療的に有用であり、炎症応答の増強が有益である。リンパ球の増殖を阻害する化合物は、治療的に有用であり、炎症応答の抑制が有益である。治療剤は、本発明のポリペプチドのアンタゴニスト (例えば、ポリペプチドに対するマウス - ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体) の形態を取り得る。

20

30

【0304】

350グラム以上の体重を有する無毛のモルモット (Charles River Lab) を、ケタミン (75 ~ 80 mg / kg 体重) およびキシラジン (5 mg / kg 体重) を用いて筋肉内注射で麻酔した。PRO301、PRO362 および PRO245 のタンパク質サンプルおよびコントロールタンパク質を、各々の動物の背中に、1つの注射部位当たり 100 μ l の容積で皮内注射した。1匹の動物当たり約 16 ~ 24 箇所の注射部位が存在した。1 mL のエバンスブルー色素 (生理的に緩衝化した生理食塩水中の 1%) を心内注射した。動物を 6 時間後に安楽死させ、そして各々の皮膚注射部位の生検を行い、ホルマリン中に固定した。この皮膚を、組織病理学的評価用に調製した。各々の部位を、皮膚への炎症細胞浸潤について評価した。可視的な炎症細胞を有する部位を、ポジティブとして記録した。炎症細胞浸潤を含むサンプルを、炎症誘導性物質として記録した。

40

【0305】

(表 3)

【0306】

【表 3】

化合物	炎症誘発活性
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	+
DNA45416 タンパク質 (配列番号 2)	+
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	+
ネガティブコントロール	-

これらの結果に基づいて、PRO1868 (配列番号 31) もまた、炎症誘導性活性を有するようである。 10

【0307】

(実施例 7)

(ヒト好中球との相互作用)

以下の実施例は、本発明のポリペプチドが、炎症および炎症応答に関連する分子であるヒト好中球に結合する能力を示す。

【0308】

ヒトドナーの血液から単離された好中球 (PMN) を、Scan. J. Clin. Lab Invest. Suppl. 97: 51-76 (1968) に記載されるように、DNA40628 によってコードされるタンパク質の Ig-融合 (以下の実施例で記載されるように調製した)、またはネガティブコントロールであるヒト化抗体と共にインキュベートした。 20

【0309】

PMN を、微量遠心管中の PBS 中に、1 条件当たり 2×10^6 細胞当量の密度で再懸濁させた。細胞を、氷冷 PBS で 2 回洗浄し、そして洗浄の間で $400 \times g$ にてペレット状にした。PMN 細胞を、PBS 中の 0.5% BSA (遮断剤) で 4 にて 1 時間ブロック化した。インキュベーションの後、細胞を、遮断剤でさらに 2 回洗浄した。PMN は、最後の洗浄後にペレット状にし、そして DNA40628 タンパク質およびコントロール抗体の両方において、 $0.1 \mu g/ml$ にて 1 ml の遮断緩衝液中に再懸濁させた。インキュベーションを、4 で 2 時間行った。PMN 細胞は、氷の上で 15 分毎に徐々に懸濁させ、その後遮断剤で洗浄しそして 5 回ペレット化し、各洗浄は 4 で 5 回続け、ペレット化は $400 \times g$ で行った。その後、遮断緩衝液中で特異的にアルカリホスファターゼ結合体化するヤギ IgG Fc と抗ヒト IgG Fc の 1:1000 希釈物を、PMN 細胞に適用した。PMN 細胞を、氷の上で 15 分毎に穏やかに混合しながら、4 で 1 時間インキュベートした。その後、PMN 細胞を、遮断緩衝液で 5 回洗浄し、アルカリホスファターゼについて適切な物質中に再懸濁させ、そしてマイクロタイタープレート上へ 4 当量の $100 \mu l$ アリコート中で分配した。着色は O.D. 405 で読み取った。この結果は図 21 に示される。 30

【0310】

(実施例 8)

(ドットプロット組織ハイブリダイゼーション)

ヒト RNA マスタープロット (Clontech) を、製造業者の指示のように、DNA406268 cDNA プロブ (配列番号 7) で標識したソラレンビオチンを用いて、EXPRESSHYB (登録商標) 緩衝液 (Clontech) 中で、65 にてハイブリダイズさせた。ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼを使用して、ビオチン化プロブを検出した。そのプロットを、CDP スター基板 (Ambion) 上に展開し、Biomax フィルム (Kodak) 上で様々な時間の間曝露した。ヒト組織の cDNA ハイブリダイゼーション分析は、DNA40628 mRNA が、広範な組織中に発現されるが、小脳および脊髄中では発現されないことを示す (図 19)。DNA40628 mRNA は、結腸、前立腺、胃、卵巣、唾液腺、腎臓、肺、気管および胎盤中で高度に発 40 50

現される。

【0311】

(実施例9)

(遺伝子産物過剰発現)

本実施例は、図20に示される種々のタンパク質をコードする遺伝子が、CRF 2-4 - / - 「ロックアウト」マウスの結腸炎の結腸中で過剰発現されることを示す。治療剤は、示された遺伝子産物のアンタゴニスト(例えば、マウス-ヒトキメラ抗体に対するアンタゴニスト、ヒト化抗体に対するアンタゴニスト、またはヒト抗体に対するアンタゴニスト)の形態を取り得る。

【0312】

CRF 2-4 - / - マウス(Spencerら、J. Exp. Med. 187、571-578(1998))は、除去されたIL-10レセプターをコードする遺伝子のサブユニットを有するIL-10レセプターロックアウト動物である。このマウスは、マクロファージ活性化についてのIL-10のダウンレギュレート機能に対して非応答性であり、そしてマクロファージTNF-分泌のリポ多糖類誘発に対する応答をダウンレギュレートし得ない。このマウスは、結腸腺癌を導き得る慢性結腸炎を進展させる。突発性結腸炎は、リンパ球、単球および好中球によって媒介される。IL-10は、特定の炎症性サイトカインの発現を調節することによって炎症応答を抑制する。

【0313】

図20に示されるタンパク質についてのプローブは、示された遺伝子産物についてのmRNAテンプレートから生成され、そして5'-ヌクレアーゼアッセイ(例えば、TaqMANTM)およびリアルタイム定量的PCR(例えば、ABI PRIZM 7700 SEQUENCE DETECTION SYSTEMTM(PerkinElmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA))で使用される。その結果はCT単位で記録される。1単位は、1PCRサイクルまたは標準に対して約2倍の増幅に相当し、2単位は4倍に相当し、3単位は8倍に相当する、などである。定量化は、プライマーおよび図20に示される試験した炎症関連遺伝子産物由来のTaqMANTM蛍光タグ化mRNAを使用して達成される。独特の核酸配列を含む可能性が最も高く、少なくともイントロンからスプライスされていると考えられる示された遺伝子産物の領域は、プライマー派生(例えば、3'-非翻訳領域)が好ましい。

【0314】

5'-ヌクレアーゼアッセイ反応は、リアルタイムで増幅をモニターするためにTaq DNAポリメラーゼ酵素5'-エキソヌクレアーゼ活性を使用する蛍光PCRベースの技術である。2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、PCR反応に典型的なアンプリコンを生成する。第3のヌクレオチド、またはプローブは、2つのプライマー間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計される。プローブは、Taq DNAポリメラーゼによって伸長不可能であり、そしてレポーター蛍光色素およびクエンチャー蛍光色素で標識される。レーザーで励起されるレポーター色素からの発光は、2つの色素がプローブ上にあるように一緒に近接して位置する場合に、クエンチング色素によってクエンチされる。増幅反応の間、プローブは、テンプレート依存性の様式でTaq DNAポリメラーゼ酵素によって切断される。生じるプローブフラグメントは、溶液中で解離し、放出レポーター色素由来のシグナルが、第2のフルオロフォアのクエンチング効果から解放される。レポーター色素の1分子は、合成された各々の新しい分子から解放され、そしてクエンチされていないレポーター色素の検出が、データの定量的解釈に基づいて提供される。

【0315】

5'-ヌクレアーゼ手順は、リアルタイム定量的PCR装置(例えば、ABI Prism 7700TM Sequence Detection)上で行われる。このシステムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子(CCD)カメラおよびコンピュー

10

20

30

40

50

タからなる。このシステムは、サーモサイクラーにおける96ウェル形式でサンプルを増幅する。増幅の間、レーザーで誘導される蛍光シグナルが、96ウェルに対して光ファイバーケーブルを通してリアルタイムで収集され、CCDで検出される。このシステムは、機器を作動させデータを分析するためのソフトウェアを備える。

【0316】

5'-ヌクレアーゼアクセイデータは、最初にCtまたは閾値サイクルとして表される。これは、蛍光のバックグラウンドレベルを超えるレポーターシグナルが集積するサイクルとして規定される。Ct値は、核酸サンプル中の特定の標的配列の開始コピーの相対数に関する定量的測定として使用される。

【0317】

mRNA増幅の結果は、図20に示される。野生型動物における発現を、参照標準としてアクチンを有するCRF2-4 - / - KO動物と比較した。4匹の動物を、各群で測定した。4匹すべての動物が、結腸炎を有すると診断され、さらに、これらのうち3匹が、結腸腺癌を有していた。

【0318】

図20は、JAM mRNAが、結腸炎を有するCRF2-4 - / - マウスの結腸において3.3倍に増加されていることを示す。

【0319】

結果として、PRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868はまた、炎症性ヒト疾患（例えば、炎症性腸疾患、および他の腸の炎症性疾患）における増大した発現を有する可能性を有する。

【0320】

（実施例10）

（上皮細胞アポトーシスの誘導）

本発明のポリペプチドが上皮細胞においてアポトーシスを誘導する能力を、ヒト静脈臍静脈上皮細胞（HUVEC、Cell Systems）において試験した。1日目に、細胞を、10%血清（CSG-培地、Cell Systems）中、総容積100 μ lの1ウェル当たり 2×10^4 細胞の密度で、96ウェルのマイクロタイタープレート（Amersham Life Science、サイトスター-Tシンチレーションマイクロプレート、RPNQ160、滅菌、組織培養処理、個別包装）にプレートした。2日目に、それぞれDNA40628およびDNA35638によってコードされるPRO301およびPRO245ポリペプチドを、1%、0.33%および0.11%の希釈にて三連で添加した。3日目に、PRO301およびPRO245ポリペプチドがアポトーシスを誘導する能力を、市販のキットであるアポトーシス検出キット（R&D Systems、Minnesota）を使用して決定した。このキットでは、カルシウム結合タンパク質およびリン脂質結合タンパク質のメンバーであるアネキシンVが、アポトーシスを検出するために使用され、製造業者によって以下のプロトコルが推奨されている。蛍光標識したアネキシンVおよびヨウ化プロピジウムを細胞に添加した。488nmでの励起光を放射するシングルレーザーを備えるサイトメーターを用いて、分析を行った。この試験において、生存細胞はいずれの蛍光色素でも染色されず、壊死細胞は両方の蛍光色素で染色され、そしてアポトーシスに罹患している細胞はアネキシンV-FITC試薬でのみ染色される。アネキシンV-FITCで生じるシグナルは、FITCシグナル検出器で検出される。結果は、以下の表4に示されている。

【0321】

（表4）

【0322】

10

20

30

40

【表 4】

試験した化合物	濃度	バックグラウンドの蛍光に対する%
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	0.11%	115.8
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	0.33%	199.3
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	1.0%	335.6
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	0.11%	77.6
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	0.33%	143.7
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	1.0%	146.0
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	6.82 nM	67.2
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	20.46 nM	102.6
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	62.0 nM	118.8

10

本発明のタンパク質化合物が上皮細胞アポトーシスを誘導する能力は、特に実施例 4 で示されるような細胞接合形成の破壊と組み合わせて、この化合物が、細胞接着および遊出における役割を果たすことを示している。マウス J A M と同様に、この化合物は、上皮および内皮における細胞接合分子であり、このことは、それらの広範な組織分布を説明している。上皮細胞アポトーシスの誘導は、細胞増殖およびアポトーシスにおける役割を示す

20

【0323】

(実施例 11)

(インビトロ抗腫瘍アッセイ)

本発明の PRO301 および PRO362 ポリペプチドの抗増殖性を、本質的に Skehan ら、J. Natl. Cancer Inst. 82: 1107-1112 (1990) によって記載されるようなスルホローダミン B (SRB) 色素結合アッセイを使用する、米国立癌研究所 (NCI) の治験疾患指向性インビトロ抗腫瘍剤発見アッセイで決定した。本研究 (「NCI パネル」) で利用した 60 個の腫瘍細胞株、ならびにその維持のための条件およびインビトロでの培養は Monks ら、J. Natl. Cancer Inst. 83: 757-766 (1991) によって記載されている。本スクリーニングの目的は、様々な型の腫瘍に対する試験化合物の細胞傷害活性および/または細胞増殖抑制活性を最初に評価することである (Monks ら、前出、Boyd Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update 3 (10): 1-12 (1989))。

30

【0324】

約 60 個のヒト腫瘍細胞株に由来する細胞を、トリプシン / EDTA (Gibco) で収集し、1 回洗浄し、MEM 中に再懸濁させ、そしてそれらの生存度を決定した。細胞懸濁液を、ピペット (100 μ L 容積) によって、別個の 96 ウェルマイクロタイタープレートに添加した。6 日間のインキュベーション用の細胞密度は、過成長を予防するために 2 日間のインキュベーション用よりも低かった。播種をして、安定化のために、37 での 24 時間の予備インキュベーションをした。2 倍に希釈した目的の試験化合物を、時間ゼロにてマイクロタイタープレートウェルに対して 100 ml アリコート中に添加した (1:2 希釈)。試験化合物を、所定の半対数希釈 (1000 ~ 100, 000 倍) にて評価した。インキュベーションを、2 日間行い、そして 5% CO₂ 雰囲気および 100% 湿度において 6 日間行った。

40

【0325】

インキュベーションの後、培地を取り出し、そして細胞を 40 で 0.1 ml の 10% トリクロロ酢酸中に固定した。そのプレートを脱イオン水で 5 回リンスし、乾燥させ、1% 酢酸に溶解させた 0.1 ml の 0.4% スルホローダミン B 色素 (Sigma) で 30

50

分間染色し、1%酢酸で4回リンスして未結合の色素を除去し、乾燥させ、そして染色物を0.1mlの10mMトリス塩基[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン](pH 10.5)で5回抽出した。492nmでのスルホローダミンBの吸光度(OD)を、コンピュータインターフェースの96ウェルマイクロタイタープレートリーダーを使用して測定した。

【0326】

試験サンプルは、そのサンプルが1以上の濃度で少なくとも50%の増殖阻害効果を示した場合に、ポジティブであるとみなした。ポジティブな結果は、以下の表に示されており、ここで、略語は以下の通りである：

N S C L = 非小肺癌

C N S = 中枢神経系

L e u k = 白血病

(表5)

【0327】

【表 5 - 1】

試験化合物	濃度	アッセイの長さ	腫瘍細胞株	
			型	表記
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	0.075 nM	6	結腸 黒色腫	HCC-2998 M14
DNA40638 タンパク質 (配列番号 1)	700 nM	6	黒色腫	M14
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	152 nM	6	結腸 黒色腫	SR LOX IMVI
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	15.2 nM	6	黒色腫	LOX IMVI
DNA40628 タンパク質 (配列番号 1)	0.85 nM	6	NSCL 卵巣 前立腺	HOP62 OVCAR-3 PC3
DNA45416 タンパク質 (配列番号 2)	15 nM	2	卵巣	SK-OV-3
DNA45416 タンパク質 (配列番号 2)	15 nM	6	NSCL 前立腺	NCI-H322M PC-3
DNA45416 タンパク質 (配列番号 2)	4.7 nM	6	黒色腫	LOX IMVI
DNA45416 タンパク質 (配列番号 2)	47 nM	6	NSCL 結腸	NCI-H322M Colo 205
DNA45416 タンパク質 (配列番号 2)	152 nM	2	CNS 乳房	SR-295 T047D
DNA45416 タンパク質 (配列番号 2)	152 nM	6	Leuk NSCL 結腸 CNS 黒色腫	SR, HL-60 (TB), MOLT-4, K-562 NCI-H23, EKVX HCC-2998 U251 UACC-62, UACC-257, LOX IMVI
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	0.35 nM	2	NSCL 卵巣	HOP92 OVCAR-4
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	0.35 nM	2	Leuk	SR
DNA35638 タンパク質 (配列番号 9)	0.35 nM	6	結腸	HCC-2998

10

20

30

40

【 0 3 2 8 】

【表 5 - 2】

DNA35638 タンパク質 (配列番号9)	3.5 nM	6	Leuk 結腸	SR SW-620
DNA35638 タンパク質 (配列番号9)	6.2 nM	6	結腸	HCT-116
DNA35638 タンパク質 (配列番号9)	6.2 nM	6	Leuk	RPMI-8226

10

(実施例 1 2)

(ハイブリダイゼーションプローブとしての PRO 3 0 1、PRO 3 6 2、PRO 2 4 5 または PRO 1 8 6 8 の使用)

以下の方法は、ハイブリダイゼーションプローブとして PRO 3 0 1、PRO 3 6 2、PRO 2 4 5 または PRO 1 8 6 8 をコードするヌクレオチド配列の使用を記載する。

【0329】

天然の配列 PRO 3 0 1、PRO 3 6 2、PRO 2 4 5 または PRO 1 8 6 8 (図 5 ~ 7 に示されるような配列、配列番号 1 1、7、8 および 3 1) のコード配列を含む DNA を、それぞれ、プローブとして使用して、ヒト組織 cDNA ライブラリーまたはヒト組織ゲノムライブラリーにおける相同 DNA (例えば、それぞれ、天然に存在する PRO 3 0 1、PRO 3 6 2、PRO 2 4 5 または PRO 1 8 6 8 の改変体をコードする相同 DNA) についてスクリーニングした。

20

【0330】

cDNA ライブラリー DNA またはゲノムライブラリー DNA のいずれかを含むフィルターのハイブリダイゼーションおよび洗浄を、以下の高ストリンジェンシー条件下で行う。フィルターに対して、放射標識した PRO 3 0 1 由来のプローブ、PRO 3 6 2 由来のプローブ、PRO 2 4 5 由来のプローブ、または PRO 1 8 6 8 由来のプローブのハイブリダイゼーションを、50%ホルムアミド、5×SSC、0.1%SDS、0.1%ピロホスフェートナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH 6.8、2×デンハート溶液、および 10%硫酸デキストランの溶液中で、42℃にて 20 分間行う。フィルターの洗浄を 0.1×SSC および 0.1%SDS の水溶液中で、42℃にて行う。

30

【0331】

次いで、全長の天然の配列 PRO 3 0 1、PRO 3 6 2、PRO 2 4 5 または PRO 1 8 6 8 をコードする DNA を有する所望の配列同一性を有する DNA を、当該分野で公知の標準的な技術を使用して同定する。

【0332】

(実施例 1 3)

(E. coli における PRO 3 0 1、PRO 3 6 2、PRO 2 4 5 または PRO 1 8 6 8 の発現)

本実施例は、E. coli における組換え発現による、非グリコシル化形態の PRO 3 0 1、PRO 3 6 2、PRO 2 4 5 または PRO 1 8 6 8 の調製を示す。

40

【0333】

PRO 3 0 1、PRO 3 6 2、PRO 2 4 5 または PRO 1 8 6 8 をコードする DNA 配列は、最初は、選択した PCR プライマーを使用して増幅する。そのプライマーは、選択した発現ベクターにおける制限酵素部位に相当する制限酵素部位を含むべきである。種々の発現ベクターが、使用され得る。適切なベクターの例は、pBR322 (E. coli に由来する; Bolivar ら、Gene、2:95 (1977) を参照のこと) であり、これは、アンプリシリン (amplicillin) およびテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含む。このベクターを、制限酵素で分解して、脱リン酸化する。その後、PCR 増幅した配列を、ベクターに連結させる。ベクターは、好ましくは、抗生物質耐

50

性遺伝子、trpプロモーター、ポリhisリーダー（初めの6つのSTIIコドン、ポリhis配列、およびエンテロキナーゼ切断部位が挙げられる）、PRO301コード領域、PRO362コード領域、PRO245コード領域もしくはPRO1868コード領域、転写終結区、およびargU遺伝子についてコードする配列を含む。

【0334】

次いで、Sambrookら（前出）に記載される方法を使用して選択したE.coli株を形質転換するために、連結混合物を使用する。形質転換体を、それらのLBプレートにおける増殖能力によって同定し、その後、抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAは、制限分析およびDNA配列決定によって単離されかつ確認され得る。

【0335】

選択したクローンを、液体培養培地（例えば、抗生物質を補充したLBブロス）中で一晚増殖させる。その後、この一晚培養物を、より大スケールの培養物を播種するために使用する。次いで、この細胞を、発現プロモーターが作動する間、所望の光学密度まで増殖させる。

【0336】

細胞をさらに数時間培養した後、その細胞を遠心分離によって収集する。遠心分離によって得られる細胞ペレットは、当該分野で公知の種々の薬剤を使用して可溶化し得、そして可溶化したPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868タンパク質を、例えば、タンパク質の強固な結合を可能にする条件下で金属キレートカラムを使用して精製する。

【0337】

PRO301は、以下の手順を使用して、E.coliにおいてポリHisタグ化形態で発現した。PRO301をコードするDNAを、最初に、選択したPCRプライマーを使用して増幅した。このプライマーは、選択した発現ベクターにおける制限酵素部位に相当する制限酵素部位、ならびに効率的かつ信頼性のある転写開始、金属キレートカラムにおける高速精製、およびエンテロキナーゼによるタンパク質分解除去を提供する他の有用な配列を含む。次いで、PCR増幅したポリHisタグ化配列を、発現ベクターに連結し、これを使用して、株52（W3110 fuhA(tonA)lon galE rp oHts(htpRts)clpP(lacIq)）に基づくE.coli宿主を形質転換した。形質転換体を、まず、50mg/mlカルベニシリンを含むLB中で、3~5のO.D.500が達成されるまで30で振盪して増殖させた。次いで、培養物を、CRAP培地（3.57gの(NH₄)₂SO₄、0.71gのクエン酸ナトリウムA₂H₂O、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母抽出物、500mL水中の5.36g Sheffieldハイカーゼ(hycase)SF、ならびに110mM MP OS、pH 7.3、0.55% (w/v) グルコースおよび7mMのMgSO₄を混合することによって調製される)へ50~100倍に希釈し、そして30にて約20~30時間浸透して増殖させた。SDS-PAGE発現を確認するためにサンプルを取り出し、そしてバルク培養物を遠心分離して、細胞をペレットにした。細胞ペレットを精製およびリホールディングするまで冷凍した。

【0338】

0.5~1L発酵物（6~10gのペレット）に由来するE.coliペーストを、7Mグアニジン、20mMトリス、pH8緩衝液中の10容積(w/v)に再懸濁させた。固体の亜硫酸ナトリウムテトラチオネートを添加して、それぞれ、0.1Mおよび0.02Mの最終濃度にし、この溶液を4で一晩攪拌した。この工程は、亜硫酸化によってブロックされたシステイン残基を有する変性タンパク質を生じる。この溶液を、Beckman Ultracentrifugeで40,000rpmにて30分間遠心分離した。上清を3~5容積の金属キレートカラム緩衝液（6Mグアニジン、20mMトリス、pH7.4）で希釈し、そして0.22ミクロンのフィルターを通して濾過し、清澄にした。得られた清澄抽出物を、金属キレートカラム緩衝液中で平衡化した5mLのQiage n Ni-NTA金属キレートカラムにロードした。このカラムを、さらに50mMイミ

10

20

30

40

50

ダゾール (Calbiochem, Utrol grade) (pH 7.4) を含む緩衝液で洗浄した。タンパク質を、250 mM イミダゾールを含む緩衝液で溶出した。所望のタンパク質を含む画分をプールし、そして4 で保存した。タンパク質濃度を、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を使用して280 nmでの吸光度によって推定した。

【0339】

タンパク質を、20 mM トリス (pH 8.6)、0.3 M NaCl、2.5 M 尿素、5 mM システイン、20 mM グリシンおよび1 mM EDTA からなる、新たに調製したリホールディング緩衝液中にゆっくりとサンプルを希釈することによってリホールディングした。リホールディング容積は、最終タンパク質濃度が50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間であるように選択した。リホールディング溶液を、4 で12 ~ 36時間穏やかに攪拌した。このリホールディング反応を、TFAを0.4%の最終濃度 (pH 約3) まで添加することによってクエンチした。タンパク質のさらなる精製の前に、この溶液を0.22 μm のフィルタを通して濾過し、そしてアセトニトリルを2 ~ 10%の最終濃度まで添加した。リホールディングしたタンパク質を、10 ~ 80%のアセトニトリルの希釈勾配0.1% TFAの移動緩衝液を使用して、Poros R1/H逆相カラムでクロマトグラフした。A280吸光度を有する画分のアリコートをし、SDSポリアクリルアミドゲルで分析し、同種のリホールディングタンパク質を含む画分をプールした。一般的に、ほとんどのタンパク質のうち適切にリホールディングされた種は、これらの種が逆相樹脂との相互作用から遮断された疎水性の内部を有して最もコンパクトであるので、最も低い濃度のアセトニトリルで溶出される。凝集した種は、通常は、より高いアセトニトリル濃度で溶出される。所望の形態からタンパク質の誤ってホールディングされた形態を解消することに加えて、逆相工程はまたサンプルからエンドトキシンを除去する。

10

20

【0340】

所望のホールディングされたPRO301タンパク質を含む画分を、それぞれ、プールし、そして溶液に指向された窒素の穏やかな流動を使用してアセトニトリルを除去した。タンパク質を、0.14 M 塩化ナトリウムおよび4% マンニトールを含む20 mM HEPES (pH 6.8) 中に、透析によってか、または処方緩衝液中で平衡化し滅菌濾過したG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂を使用するゲル濾過によって処方した。

30

【0341】

(実施例14)

(哺乳動物細胞におけるPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868の発現)

本実施例は、哺乳動物細胞における組換え発現によるグリコシル化形態のPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868の調製を示す。

【0342】

ベクターpRK5 (1989年3月15日に公開されたEP307, 247を参照のこと) を、発現ベクターとして使用する。必要に応じて、PRO301 DNA、PRO362 DNA、PRO245 DNAまたはPRO1868 DNAを、選択した制限酵素でpRK5に連結し、Sambrookら (前出) に記載されるような連結方法を使用するPRO301 DNA、PRO362 DNA、PRO245 DNAまたはPRO1868 DNAの挿入を可能にする。得られたベクターを、それぞれ、pRK5-PRO301、pRK5-PRO362、pRK5-PRO245またはpRK5-PRO1868と称する。

40

【0343】

1つの実施形態において、選択した宿主細胞は、293細胞であり得る。ヒト293細胞 (ATCC 1573) は、培地 (例えば、ウシ胎仔血清ならびに必要なに応じて栄養成分および/または抗生物質を補充したDMEM) 中の組織培養プレートにおいてコンフルエンスに増殖する。約10 μg のpRK5-PRO301、pRK5-PRO362、pRK5-PRO245またはpRK5-PRO1868を、VA RNA遺伝子 (Th

50

immappayaら、Cell、31:543(1982))をコードする約1 μ gのDNAと混合し、そして500 μ lの1mMトリス-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl₂中に溶解させる。この混合物に、500 μ lの50mM HEPES(pH7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄を滴下し、25で10分間沈殿物を形成させる。この沈殿物を懸濁させ、そして293細胞に加え、37で約4時間安定させる。この培養培地を吸引し、そしてPBS中の2ml 20%グリセロールを30秒間添加する。次いで、293細胞を無血清培地で洗浄し、新たな培地を加え、細胞を5日間インキュベートする。

【0344】

トランスフェクションの約24時間後、培養培地を取り出し、培養培地(単独)か、または200 μ Ci/mlの³⁵S-システインおよび200 μ Ci/mlの³⁵S-メチオニンを含む培養培地と交換する。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、そして15%SDSゲルにロードする。処理されたゲルは、PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868ポリペプチドの存在を確認するために、選択した時間の間、乾燥させてもフィルムに曝露してもよい。トランスフェクト細胞を含む培養物は、(無血清培地において)さらにインキュベーションし得、そしてその培地を選択したバイオアッセイで試験する。

【0345】

代替的な技術において、PRO301DNA、PRO362DNA、PRO245DNAまたはPRO1868DNAは、Somparyracら、Proc.Natl.Acad.Sci、12:7575(1981)によって記載される硫酸デキストラン法を使用して一過性に293細胞に誘導され得る。293細胞を、スピナーフラスコ中で最大密度まで増殖し、そしてpRK5-PRO301DNA、pRK5-PRO362DNA、pRK5-PRO245DNAまたはpRK5-PRO1868DNAを添加する。細胞を、まず、スピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、そしてPBSで洗浄する。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する。この細胞を、20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、そして組織培養培地、5 μ g/mlウシインスリンおよび0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再導入する。約4日後、この条件培地を濃縮し、そして濾過して細胞および細片を除去する。その後、発現したPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868を含む細胞を濃縮し、そして任意の選択した方法(例えば、透析および/またはカラムクロマトグラフィー)によって精製し得る。

【0346】

別の実施形態において、PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868は、CHO細胞において発現され得る。pRK5-PRO301、pRK5-PRO362、pRK5-PRO245またはpRK5-PRO1868は、公知の試薬(例えば、CaPO₄またはCEAE-デキストラン)を使用して、CHO細胞中にトランスフェクトされ得る。上記のように、細胞培養物は、インキュベートされ得、そして培地は、培養培地(単独)か、または放射標識(例えば、³⁵S-メチオニン)を含む培地と交換される。PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868ポリペプチドの存在の決定後、培養培地は、無血清培地と交換され得る。好ましくは、培養物は、約6日間インキュベートされ、その後、この条件培地が収集される。発現したPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868を含む培地は、その後、濃縮され得、そして任意の選択した方法によって精製される。

【0347】

エピトプタグ化PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868はまた、宿主CHO細胞で発現され得る。PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868は、pRK5ベクターからサブクローン化され得る。サブクローン挿入は、インフレームで選択したエピトプタグ(例えば、ポリhisタグ)を用いてバキュロウイルス発現ベクターへ融合するためのPCRを行い得る。その後、ポリhisタグ化

PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868挿入物は、安定な区論の選択のためのセレクションマーカー（例えば、DHFR）を含むSV40駆動（driven）ベクターにサブクローン化され得る。最後に、CHO細胞が、SV40駆動ベクターと共に（上記のように）トランスフェクトされ得る。標識化は、発現を確認するために、上記のように行われ得る。その後、発現したポリヒスタグ化PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868を含む培養培地は、濃縮され得、そして任意の選択した方法（例えば、Ni²⁺キレートアフィニティクロマトグラフィー）によって精製される。

【0348】

PRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868を、一過性の発現手順および安定な発現手順の両方を使用してCHO細胞中で発現させた。 10

【0349】

CHO細胞における安定な発現を、以下の手順を使用して行った。タンパク質を、それぞれのタンパク質の可溶性形態（例えば、細胞外ドメイン）についてのコード配列が、ヒンジ、CH2およびCH2ドメインを含むIgG1構築領域配列に融合される、IgG構築物（免疫接着）として、ならびに/あるいはポリヒスタグ化形態として発現させた。

【0350】

PCR増幅によって、それぞれのDNAを、Ausubelら、Current Protocols of Molecular Biology、Unit 3.16、John Wiley 案d Sons（1997）を使用して、CHO発現ベクターにサブクローン化した。CHO発現ベクターは、一般的に、目的のDNAに関して適合性の制限部位5'および3'を有して、従来のcDNAのシャトルを可能にするように構築される。VHO細胞における発現のために本明細書中で使用されるベクターは、Lucasら、Nucleic Acids Res. 24:9（1774-1779（1996））に記載され、そしてSV40初期プロモーター/エンハンサーを使用して、目的のcDNAの発現およびジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）を駆動する。DHFR発現は、トランスフェクション後のプラスミドの安定な維持についての選択を可能にする。 20

【0351】

12 μgの所望のプラスミドDNAを、市販のトランスフェクション試薬Superfect⁷（Qiagen）、Dospers⁷、またはFugene⁷（Boehringer Mannheim）を使用して、約100万個のCHO細胞に導入した。その細胞を、Lucasら（前出）に記載されるように増殖させた。約3 × 10⁷細胞を、さらなる増殖および産生のために、以下に記載されるようにアンプル中で凍結させた。 30

【0352】

プラスミドDNAを含むアンプルを、水浴中に置くことによって解凍し、ボルテックスにより混合した。この内容物を、10 mLの培地を含む遠心管にピペットし、そして1000 rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引し、そして細胞を10 mLの選択培地（5% 0.2:m ダイアフィルター処理したウシ胎仔血清）を含む、0.2:m フィルター処理したPS20）に再懸濁させた。その後、細胞を、90 mLの選択培地を含む100 mLスピナーにアリコーした。1~2日後、細胞を、150 mLの選択増殖培地で充填された250 mLスピナーに移し、37 °Cでインキュベートした。さらに2~3日後、250 mL、500 mL、および200 mLのスピナーを、3 × 10⁵細胞/mLで播種した。この細胞培地を、遠心分離および産生培地中への再懸濁によって新しい培地と交換した。任意の適切なCHO培地が利用され得るが、実際には、1992年6月16日発行の米国特許第5,122,469号に記載される産生培地を使用した。0日目に、3 L産生スピナーを、1.2 × 10⁶細胞/mLにて播種し、そして細胞数およびpHを決定する。1日目に、スピナーからサンプル採取し、そしてフィルター処理した空気との散布を開始した。2日目に、スピナーからサンプルを採取し、温度を33 °Cにシフトさせ、そして30 mLの500 g/Lグルコースおよび0.6 mLの10%消泡剤（例えば、35%ポリジメチルシロキサン乳濁液、Dow Corning 365 Medical 40 50

Grade Emulsion)。産生の全体にわたって、pHが7.2付近に保たれるように調節した。10日後、または生存度が70%未満に低下した場合に、細胞培養物を、遠心分離によって収集し、そして0.22:μmフィルターを通して濾過した。濾液は、4ECで保存するか、または精製用カラムに即座にロードした。

【0353】

ポリヒスタグ化構築物について、タンパク質を、Ni-NTAカラム(Qiagen)を使用して精製した。精製前に、イミダゾールを5mMの濃度まで、条件培地に添加した。この条件培地を、20mM HEPES (pH 7.4)、3M NaClおよび5mM イミダゾールを含む緩衝液で平衡化した6ml Ni-TNAカラムで、4~5ml/分の流速で、4ECにて供給した。ロード後、カラムをさらに平衡緩衝液で洗浄し、そしてタンパク質を、0.25M イミダゾールを含む平衡緩衝液で溶出した。その後、高度に精製したタンパク質を、10mM HEPES、0.14M NaCl、および4% マンニトールを含む保存緩衝液(pH 6.8)中で、25ml G25 Superfine (Pharmacia) 脱塩カラムを用いて脱塩し、-80ECで保存した。

10

【0354】

タンパク質のイムノアドヘシン(Fc含有)構築物を、条件培地から以下のように精製した。条件培地を、20mM リン酸Na緩衝液(pH 6.8)中で平衡化した、5ml プロテインAカラム(Pharmacia)上でポンピングした。ロード後、このカラムを、100mM クエン酸(pH 3.5)での溶出前に、平衡緩衝液で十分に洗浄した。溶出したタンパク質を、1ml画分を275:1の1M トリス緩衝液(pH 9)を含む管に回収することによって、すぐに中和した。その後、高度に精製したタンパク質を、ポリヒスタグ化タンパク質について上記のように保存緩衝液中で脱塩した。同質性を、SDS ポリアクリルアミドゲルおよびエドマン分解によるN末端アミノ酸配列決定によって評価した。

20

【0355】

PRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868は、COS細胞における一過性の発現によっても産生される。

【0356】

(実施例15)

(酵母におけるPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868の発現)

30

以下の方法は、酵母におけるPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868の組換え発現を記載する。

【0357】

はじめに、酵母の発現ベクターを、ADH2/GAPDHプロモーターからのPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868の細胞内産生または分泌のために構築する。PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868、選択されたシグナルペプチドおよびプロモーターをコードするDNAを、PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868の細胞内の発現を指向するために選択したプラスミド内の適切な制限酵素部位へ挿入する。PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868をコードするDNAを、PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868の発現のために、ADH2/GAPDHプロモーター、酵母-因子分泌シグナル/リーダー配列、および(必要な場合)リンカー配列をコードするDNAと共に、分泌のために、選択されたプラスミドへクローン化され得る。

40

【0358】

次いで酵母細胞(例えば、酵母株AB110)を、上記の発現プラスミドを用いて形質転換し得、そして選択した発酵培地中で培養し得る。形質転換した酵母の上清を、10% トリクロロ酢酸を用いた沈降により分析し得、そしてSDS-PAGEにより分離し、続いてクマシーブルー染色を用いてゲルを染色することにより分析し得る。

【0359】

50

続いて組換えPRO301、組換えPRO362、組換えPRO245または組換えPRO1868を、遠心分離法により発酵培地から酵母細胞を除去することにより、単離および精製し得、そして次いで選択されたカートリッジフィルターを使用してこの培地を濃縮する。PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868を含有する濃縮物を、選択したカラムクロマトグラフィー樹脂を使用してさらに精製し得る。

【0360】

(実施例16)

(バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるPRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868の発現)

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるPRO301、PRO362またはPRO245の組換え発現を記載する。 10

【0361】

PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868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する。このようなエピトープタグとしては、ポリ-Hisタグおよび免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域様)が挙げられる。種々のプラスミド(pVL1393(Novagen)のような市販されるプラスミドに由来するプラスミドを含有する)を、使用し得る。簡単にいうと、PRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868、またはPRO301、PRO362、PRO245もしくはPRO1868の所望の部分(例えば、細胞外ドメインをコードする配列)を、5'領域および3'領域に相補的なプライマーを用いたPCRにより増幅する。5'プライマーは、側方の(選択された)制限酵素部位を組み入れ得る。次いで、この生成物を、選択されたこれらの制限酵素を用いて消化し、そして発現ベクター内へサブクローン化する。 20

【0362】

組換えバキュロウイルスは、リポフェクチン(GIBCO-BRLから市販される)を使用して*Spodoptera frugiperda*(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)内へ上記プラスミドおよびBACULOGOLDTMウイルスDNA(Pharmingen)を同時トランスフェクトすることにより産生される。28度の4~5日間のインキュベーションの後、放出されたウイルスを、収集し、そしてさらなる増幅のために使用する。ウイルス感染およびタンパク質発現を、O'Reillyら 30、*Baculovirus expression vectors: A laboratory manual*, Oxford: Oxford University Press (1994)により記載されるとおりに実施される。

【0363】

次いで、発現されたポリHisタグ化PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868を、例えば、以下のとおりにNi²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製し得る。抽出物を、組換えウイルス感染Sf9細胞から、Rupertら、*Nature*, 362: 175-179(1993)により記載されるように調製する。簡単にいうと、Sf9細胞を洗浄し、音波破碎緩衝液(25mL HEPES、pH 7.9; 12.5mM MgCl₂; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1% NP-40; 0.4M KCl)に再懸濁し、そして氷上で20秒間で2回、超音波処理する。超音波処理物を、遠心分離法により清澄にし、そして上清を、ローディング緩衝液(50mMリン酸塩、300mM NaCl、10%グリセロール、pH 7.8)に50倍に希釈し、そして0.45Fmフィルターをとおして濾過される。Ni²⁺-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販される)を、総容積5mLで調製し、25mLの水で洗浄しそして25mLのローディング緩衝液で平衡化する。濾過した細胞抽出物を、0.5mL/分でカラム上へロードする。このカラムを、ローディング緩衝液を用いて基線A₂₈₀まで洗浄し、この時点で画分の回収を、開始する。次に、このカラムを、第二の洗浄緩衝液(50mMリン酸塩; 300mM NaCl、10%グリセロール、pH 6.0)を用いて洗浄し、この緩衝液は、非特異的に結合したタンパク質 50

を溶出する。A₂₈₀の基線に再び達した後、このカラムを、第二の洗浄緩衝液中で0～500mMのイミダゾールの勾配を用いて進展させた。1mLの画分を、収集し、そしてSDS-PAGEおよび銀染色またはアルカリホスファターゼ(Qiagen)に結合したNi²⁺-NTAを用いたウェスタンブロットにより分析した。溶出されたHis₁₀タグ化PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868を含有する画分は、プールし、そしてローディング緩衝液に対して透析する。

【0364】

あるいは、IgGタグ化(もしくはFcタグ化)PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868の精製を、公知のクロマトグラフィー技術(例えば、プロテインAカラムもしくはプロテインGカラムクロマトグラフィーを含有する)を使用して実施し得る。

10

【0365】

PRO301、PRO362およびPRO245を、バキュロウイルス感染Sf9昆虫細胞中で発現した。この発現は実際に、0.5～2Lの規模で実施したが、より大きな(例えば、8L)調製に容易にスケールアップし得る。このタンパク質は、IgG構築物(イムノアドヘシン)として発現され、ここでこのタンパク質の細胞外領域を、ヒンジ、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含有するIgG1定常領域配列ならびに/またはポリ-Hisタグ化形態内に融合した。

【0366】

PCR増幅に続いて、それぞれのコード配列を、バキュロウイルス発現ベクター(IgG融合体についてのpb.PH.IgGおよびポリ-Hisタグ化タンパク質についてのpb.PH.His.c)内へサブクローン化し、そしてこのベクターおよびBACULOGOLDTMバキュロウイルスDNA(Pharmingen)を、105 Spodoptera frugiperda(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)内へ同時トランスフェクト(Lipofectin(Gibco BRL)を使用する)された。pb.PH.IgGおよびpb.PH.Hisは、市販されるバキュロウイルス発現ベクターpVL1393(Pharmingen)の改変体であり、Hisタグ配列またはFcタグ配列を含有するために改変されたポリリンカー領域を有する。この細胞を、10%FBS(Hyclone)を補充したHink's TNM-FH培地内で増殖させた。細胞を、28℃で5日間インキュベートした。この上清を、収集し、そして続いて、10%FBSを補充したHink's TNM-FH培地中で、およそ10の多重感染度(multiplicity of infection(MOI))でSf9細胞を感染させることによる第一のウィルス増幅のために使用した。細胞を、28℃で3日間インキュベートした。この上清を、収集し、そしてバキュロウイルス発現ベクター中の構築物の発現を、25mLのNi-NTAビーズ(QIAGEN)ヒスチジンタグ化タンパク質についてまたはProtein-A Sepharose CL-4Bビーズ(Pharmacia)(IgGタグ化タンパク質について)に対する1mLの上清のバッチバインディング、続くクマシーブルー染色により既知濃度のタンパク質標準物質と比較する、SDS-PAGE分析により測定した。

20

30

【0367】

第一のウィルス増幅物上清を、使用し、ESF-921培地(Expression Systems LLC)中で増殖させたSf9細胞の攪拌培養物(500ml)におよそ0.1のMOIで感染させた。細胞を、28℃で3日間インキュベートした。この上清を、収集し、および濾過した。バッチバインディングおよびSDS-PAGE分析を、攪拌培養物の発現が確認されるまで、(必要な場合)繰り返した。

40

【0368】

トランスフェクトした細胞に由来する条件培地(0.5～3L)を、遠心分離法により収集して、細胞を除去し、0.22ミクロンフィルターをとおして濾過した。ポリ-Hisタグ化構築物について、このタンパク質の構築物を、Ni-NTAカラム(Qiagen)を使用して精製した。精製前に、イミダゾールを、5mMの濃度になるまで条件培地

50

に添加した。条件培地を、4 で4 ~ 5 ml /分の流速で、20 mM H e p e s (p H 7 . 4) 緩衝液 (0 . 3 M N a C l および 5 m M イミダゾール含有) で平衡化した中の 6 ml の N i - N T A カラム上にポンプ注入した。ローディングの後、このカラムを、さらなる平衡緩衝液を用いて洗浄し、そしてこのタンパク質を、0 . 2 5 M イミダゾールを含有する平衡緩衝液を用いて溶出した。高度に精製したタンパク質を続いて、25 ml の G 2 5 S u p e r f i n e (P h a r m a c i a) カラムを用いて、保存緩衝液 (1 0 m M H e p e s , 0 . 1 4 M N a C l および 4 % マンニトールを含有、p H 6 . 8) 中で脱塩し、そして - 8 0 で保存した。

【 0 3 6 9 】

タンパク質のイムノアドヘシン (F c 含有) 構築物を、以下のように条件培地から精製した。この条件培地を、5 ml の P r o t e i n A カラム (P h a r m a c i a) 上へポンプ注入した (このカラムは、20 mM N a リン酸塩緩衝液 (p H 6 . 8) で平衡化している) 。ローディングの後、このカラムを、100 mM クエン酸 (p H 3 . 5) を用いて溶出する前に、平衡緩衝液を用いて徹底的に洗浄した。溶出されたタンパク質をすぐに、1 ml の画分をチューブ (275 ml の 1 M T r i s 緩衝液 (p H 9) を含有する) 中へ収集することにより中和化した。高度に精製したタンパク質を続いて、ポリ - H i s タグ化タンパク質についての上述したように保存緩衝液中で脱塩した。このタンパク質の均一性を、S D S ポリアクリルアミドゲル (P E G) 電気泳動および E d m a n 分解法による N - 末端のアミノ酸配列決定により実証した。

【 0 3 7 0 】

P R O 3 0 1、P R O 3 6 2 および P R O 2 4 5 もまた、類似の手順を使用してバキュロウイルスに感染した H i g h - 5 細胞内で発現された。H i g h - 5 細胞を、27 で 50 % コンフルエンスになるまで増殖させた (C O ₂ 無し、ペニシリン無しおよびストレプトマイシン無し) 。各 150 mm プレートについて、P R O 3 0 1、P R O 3 6 2 または P R O 2 4 5 を含有する 30 μ g の p I E ベースのベクターを、1 ml の E x - C e l l 培地 (培地 : E x - c e l l 4 0 1 , 1 / 1 0 0 L - G l u J R H B i o s c i e n c e s , 番号 1 4 4 0 1 - 7 8 P , 注 : 培地は光感応性) と混合され、そして別々のチューブにおいて、100 μ l の C E L L F E C T I N ^{T N} (G i b c o B R L 番号 1 0 3 6 2 - 0 1 0) を、1 ml の E c - C e l l 培地と混合した。p I E 1 - 1 ベクターおよび p I E 1 - 2 ベクターを、安定に形質転換した昆虫細胞におけるバキュロウイルス i e 1 プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計する (C a r t i e r , J . L . 5 , J . V i r o l . 6 8 , 7 7 2 8 - 7 7 3 7) (1 9 9 4) 。このプラスミドは、マルチクロニングサイトの向きについてのみ異なり、そして未感染昆虫細胞における i e 1 媒介性の遺伝子発現に重要であることが公知である全てのプロモーター配列および h r 5 エンハンサーエレメントを含有する。p I E 1 - 1 および p I E 1 - 2 は、i e 1 翻訳開始点を含み、融合タンパク質を産生するために使用され得る。

【 0 3 7 1 】

この二つの溶液を、混合しそして室温で 15 分間インキュベートした。8 ml の E x - C e l l 培地を、2 ml の D N A / C E L L F E C T I N ^{T M} 混合液に添加し、そして E x - C e l l 培地により予め洗浄された H i g h - 5 細胞上に重ねる。このプレートを、室温で 1 時間、暗所でインキュベートした。D N A / C E L L F E C T I N ^{T M} 混合液を、吸引し、そしてこの細胞を、E x - C e l l により 1 回洗浄し、過剰な C E L L F E C T I N ^{T M} を除去した。新たに E x - C e l l 培地 (30 ml) を、添加し、そしてこの細胞を、28 で 3 日間インキュベートした。この上清を、収集し、そして P R O 3 0 1、P R O 3 6 2 または P R O 2 4 5 の発現を、S f 9 細胞について記載した様式と同一の様式でバッチバイディングにより決定した。

【 0 3 7 2 】

(実施例 17)

(P R O 3 0 1、P R O 3 6 2、P R O 2 4 5 および P R O 1 8 6 8 に結合する抗体の調製)

10

20

30

40

50

この実施例は、モノクローナル抗体の調製を例示し、この抗体は、PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868に特異的に結合し得る。

【0373】

モノクローナル抗体を産生するための技術は、当該分野において公知であり、および例えば、Goding（前出）において記載される。使用され得る免疫原としては、精製されたPRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868、PRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868を含有する融合タンパク質、ならびに細胞表面上に組換えのPRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868を発現する細胞が挙げられる。免疫原の選択は、過度の実験なしで当業者によりなされ得る。

10

【0374】

マウス（例えばBALB/c）を、完全フロイントアジュバント中に乳化させたPRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868の免疫原を用いて免疫化し、そして1~100 μ gの量で皮下または腹腔内に注射する。あるいは、この免疫原を、MPL-TDMアジュバント（Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT）中に乳化し、そして動物の後ろ足の肉球に注射する。次いでこの免疫化マウスを、選択されたアジュバント中に乳化したさらなる免疫原を用いて、10日~12日後に追加免疫する。その後また、数週間、このマウスを、さらなる免疫化注射により追加免疫し得る。血清サンプルを、ELISAアッセイにおいて試験するため、眼窩後方の採血によりこのマウスから定期的に得て、PRO301抗体、PRO362抗体、PRO245抗体およびPRO1868抗体を検出し得る。

20

【0375】

適切な抗体力価を、検出した後、抗体について「ポジティブ」の動物を、PRO301、PRO362、PRO245およびPRO1868の最終の静脈注射により注射し得る。3日~4日後、このマウスを、屠殺し、そして脾臓細胞を、収集する。この脾臓細胞を次いで、選択したマウスの骨髓腫細胞株（例えば、P3X63AgU.1（ATCCから入手可能、番号CRL1597））に融合する（35%ポリエチレングリコールを使用する）。この融合は、ハイブリドーマ細胞を生じ、これは次いで、HAT（ヒポキサチン、アミノプテリン、およびチミジン）培地を含有する96ウェルの組織培養プレートにプレート培養し得、非融合細胞、骨髓腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害し得る。

30

【0376】

このハイブリドーマ細胞を、PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868に対する反応性についてELISAにおいて選別する。PRO301、PRO362、PRO245またはPRO1868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」ハイブリドーマ細胞の決定は、当該分野の技術範囲内である。

【0377】

このポジティブハイブリドーマ細胞を、同系のBALB/cマウスへ、腹腔内注射し、そして抗PRO301、抗PRO362、抗PRO245または抗PRO1868モノクローナル抗体を含有する腹水を産生させ得る。あるいは、このハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコまたはローラーボトル内で増殖させ得る。腹水内に産生されたモノクローナル抗体の精製を、硫酸塩析およびその後のゲル排除クロマトグラフィーを使用して達成し得る。あるいは、プロテインAまたはプロテインGに対する抗体の結合に基づくアフィニティクロマトグラフィーを、使用し得る。

40

【0378】

ヒトPRO245およびPRO1868のcDNAを、コロニーハイブリダイゼーションにより、ヒト結腸のcDNAライブラリーから単離した。PRO245のヒトIgG1Fc融合タンパク質（イムノアドヘシン）（PRO245.Fc、JAM-IT.FcまたはJAM2.Fcとまた称される）およびPRO1868（PRO1868.FcまたはJAM3.Fc）を、Ashkenaziら、Curr. Opin. Immun. 9:

50

195 (1997)に記載されるように調製し、そしてプロテインAカラム (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA)で精製した。同一性を、N-末端の配列分析により証明した。

【0379】

BALB/cメスを、免疫化しそして足の肉球への注射を介して10 μ gのPRO245-Fcまたは8XHis-タグ化PRO1868を用いて追加免疫した。一つのクローンをPRO245-FcまたはXHis-タグ化PRO1868に対して選別した。選択したクローンを、A33/JAMファミリーメンバーおよびヒトIgG Fcに対する交叉反応性について試験した。クローンを、単一の細胞密度まで滴定し、そして再選別した。クローン12D10.2F9は、JAM2 (PRO245)に対して選択的に反応することが見出され、JAMまたはJAM3に対しては見出されなかった。クローンMaJIR1は、JAM3に対し選択的に反応することが見出され、JAMまたはJAM2に対しては見出されなかった。両クローンを、単離し、そして腹水の産生のために使用した。抗体を、プロテインGカラムで精製した。

10

【0380】

抗PRO245抗体12D10.2F9は、PRO245発現CHO細胞との相互作用に対して特異的であり、ヒトPRO301発現CHO細胞 (図58)との相互作用に対しては特異的ではなかった。簡単にいうと、PRO245のcDNAを、コード配列の5'末端および3'末端に特異的なプライマーを使用してヒト結腸cDNAライブラリー (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA)からPCRにより増幅した。このフラグメントを、精製し、そしてpSD5発現ベクター内へライゲーションし、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)細胞にトランスフェクトし、そしてLucasら、Nuc. Acids Res. 24:1774 (1996)に記載されるとおりに選別された。安定な細胞クローンを、抗体反応性について選別した。図58に見られ得るように、抗PRO245抗体 (12D10.2F9)は、huJAM発現CHOトランスフェクト体CuL8rに結合しなかった。CuL8rは、抗huJAM抗体10A5と相互作用する。

20

【0381】

(実施例18)

(発現クローニングによるヒトPRO1868をコードするcDNAクローンの単離)

30

PRO1868の同定を、ガラスチェンバースライドで増殖したCOS細胞内に分泌性タンパク質および膜貫通型タンパク質をコードするプールされたcDNAライブラリーを一過的にトランスフェクトすることにより行った。トランスフェクションの24時間後、PRO245融合体またはPRO245-Fc融合体を、添加し(0.5 μ g/ml)、そして30分間インキュベートした。PRO245/PRO245-Fc融合体の結合を、測定した(Kleinら、Nature, 387:717および392:210 (1998))。PRO245/PRO245-Fc融合体に対して結合する能力についてポジティブであったクローンを、さらなる特徴付けのために選別した。

【0382】

(実施例19)

(軟骨細胞再分化の誘導)

40

本発明のポリペプチドの再分化を誘導する能力を、軟骨細胞において試験した。軟骨細胞の再分化を誘導する能力を有するタンパク質は、種々の骨および/または軟骨の障害 (例えば、スポーツでの損傷および関節炎)の処置に有用である。

【0383】

ブタの軟骨細胞を、4~6月齢の雌ブタの中手指節関節の関節軟骨を一晩コラゲナーゼ消化することにより単離した。次いでこの単離細胞を、10% FBSおよび4 μ g/ml ゲンタマイシンを含有するHamF-12に25,000細胞/cm²で接種された。この培養培地は、3日ごとに交換し、次いでこの細胞を、100 μ lの同じ培地 (血清なし)中に5,000細胞/ウェルで96ウェルプレートに接種し、そして100 μ lの試験

50

PRO1868ポリペプチド、5 nMスタウロスポリン（ポジティブコントロール）または培地のみ（ネガティブコントロール）を、最終容量200 μl / ウェルとなるように添加した。37 °C で5日間のインキュベーションの後、各ウェルの写真が、撮影されそしてこの軟骨細胞の分化状態を、決定した。アッセイにおけるポジティブな結果は、軟骨細胞の再分化がネガティブコントロールよりもポジティブコントロールにより類似したてイルと決定された場合に生じた（決定された場合）。

【0384】

試験されたPRO1868のポリペプチドは、軟骨細胞の再分化を誘導する能力についてポジティブである。

【0385】

（実施例20）

（癌性腫瘍におけるPRO1868ポリペプチドの過剰発現）

本実施例において、癌性組織におけるPRO1868ポリペプチドの発現レベルを、試験した。癌性腫瘍において過剰発現されるポリペプチドは、一以上の癌性腫瘍の存在についての診断マーカーとして有用であり得るだけでなく、これらの腫瘍の処置のための治療標的として役立つ。

【0386】

PRO1868ポリペプチドの過剰発現の検出のために、核酸マイクロアレイを、疾患組織において差次的に発現した遺伝子を同定するために使用した（正常な対照物と比較として）。核酸マイクロアレイを使用して、試験組織サンプルおよびコントロール組織サンプルに由来する試験mRNAサンプルおよびコントロールmRNAサンプルを、逆転写し、そして標識して、cDNAプローブを生じた。次いでcDNAプローブを、固体支持体上に固定化した核酸のアレイに対してハイブリダイズする。このアレイを、アレイの各メンバーの配列および位置が分かるように構成する。例えば、特定の疾患状態において発現されることが公知である遺伝子の選択物を、固体支持体上に配列し得る。特定のアレイメンバーとの標識化プローブのハイブリダイゼーションは、プローブの由来するサンプルが、その遺伝子を発現することを示す。試験（疾患組織）サンプルに由来するプローブのハイブリダイゼーションシグナルが、コントロール（正常組織）サンプルに由来するプローブのハイブリダイゼーションシグナルよりも大きい場合、この疾患組織において過剰発現される遺伝子または遺伝子群が、同定される。この結果の意味は、疾患組織において過剰発現されるタンパク質は、疾患状態の存在についての診断マーカーとして有用なだけでなく、病的状態の処置のための治療標的としても有用であることである。核酸のハイブリダイゼーションおよびマイクロアレイ技術の方法論は、当該分野において周知である。

【0387】

本実施例において、種々のヒト組織に由来する癌性腫瘍を、PRO1868ポリペプチド（癌性腫瘍において過剰発現される）を同定する意図で非癌性ヒト組織に関連する、PRO1868ポリペプチドをコードする遺伝子発現について調べられた。ハイブリダイゼーションおよびプローブについての核酸、スライド、ならびにハイブリダイゼーション条件の特定の調製は、米国仮特許出願第60/193,767号（2000年3月31日出願）において全て詳細に記載され、本明細書中に参考として援用される。2セットの実験データが、生じた。一つのセットにおいて、癌性ヒト結腸腫瘍組織および同じ患者からの対応する非癌性ヒト結腸腫瘍組織（「対応結腸コントロール」）を、得、そして上記のマイクロアレイ技術を使用して、PRO1868ポリペプチドの発現について分析した。第二のセットのデータにおいて、種々の異なるヒト腫瘍（肺腫瘍および胸部腫瘍を含有する）に由来する癌性ヒト腫瘍組織を得、そして上皮起源の非癌性ヒト組織（肝臓、腎臓、および肺を含有する）をプールすることにより調製した「普遍的な」上皮コントロールサンプルと比較した。このプールされた組織から単離されたmRNAは、これら異なる組織由来の発現遺伝子産物の混合物を示す。このプールされたコントロールサンプルを使用するマイクロアレイのハイブリダイゼーション実験は、2色分析において一次のプロットを生じた。次いで2色分析において生じたこの線の傾斜を、使用し、各実験における（試験：

10

20

30

40

50

コントロールの検出)の比率を基準化した。次いで種々の実験に由来する基準化された比率を、比較し、遺伝子発現のクラスターを同定するために使用した。従って、プールされた「普遍的なコントロール」サンプルは、単純な2サンプルの比較において相対的な遺伝子発現の決定を有効にするだけでなく、多くの実験にわたる多サンプルの比較も可能にする。

【0388】

本明細書中に記載されるPRO1868ポリペプチドをコードする核酸配列に由来する核酸プローブを、マイクロアレイの作製に使用し、上に挙げた腫瘍組織に由来するRNAを、プローブに対するハイブリダイゼーションに使用した。基準化された比率：実験の比率に基づく値を、「カットオフ(cutoff)比率」と呼んだ。このカットオフ比率を超えた値のみを、有意であると決定した。本発明のPRO1868ポリペプチドを、非癌性ヒト組織コントロールと比較した場合、種々のヒト腫瘍組織(例えば、肺腫瘍および胸部腫瘍)において有意に過剰発現される。

10

【0389】

これらのデータは、本発明のPROポリペプチドが、診断マーカーおよび腫瘍の処置のための治療標的の両方として有用であることを示す。

【0390】

(実施例21)

(細胞増殖の誘導)

(A. 内皮細胞の増殖)

20

本発明のポリペプチドの内皮細胞に増殖を誘導する能力を、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC, Cell Systems)において試験した。内皮細胞の増殖を誘導する能力を有するポリペプチドは、有用な増殖因子として機能する。

【0391】

0日目において、プールされたヒト臍静脈内皮細胞(最大12~14回継代の細胞株に由来する)を、100 μ lごとに1000細胞/ウェルで96ウェルプレートにプレート培養しそして完全培地[補給物:ヒト内皮増殖因子(hEGF)、ウシ脳抽出物(BBE)、ヒドロコルチゾン、GA-1000、およびウシ胎児血清(FBS, Clonetics)]を加えた内皮細胞増殖培地(EGM, Clonetics)内で一晩インキュベートした。一日目において、完全培地を、基本培地[1%FBSを加えたEGM]により交換し、そして1%、0.1%および0.01%でPRO1868ポリペプチドを添加した。7日目において、細胞増殖の評価を、ALAMAR BLUETMアッセイ、続くクリスタルバイオレットにより実施した。結果を、コントロール緩衝液を用いて観察された細胞増殖に対する%として表した。

30

【0392】

試験したPRO1868ポリペプチドはこのアッセイにおいて、培養物内のプールされたヒト臍静脈内皮細胞の増殖を誘導する能力についてポジティブ、結果として、有用な増殖因子として機能する能力についてポジティブである。

【0393】

(B. ヒト冠状動脈の平滑筋細胞の増殖)

40

本発明のポリペプチドの細胞増殖を誘導する能力を、培養物内のヒト冠状動脈の平滑筋細胞において試験した。細胞増殖を誘導する能力を有する本発明のポリペプチドは、増殖因子として有用である。

【0394】

0日目において、ヒト冠状動脈の平滑筋細胞(最大12~14回継代の細胞株に由来する)を、100 μ lごとに1000細胞/ウェルで96ウェルプレートにプレート培養し、完全培地[補給物:インシュリン、ヒト内皮増殖因子(hEGF)、ヒト線維芽細胞増殖因子(hFGF)、GA-1000、およびウシ胎児血清(FBS, Clonetics)]を加えた平滑筋増殖培地(SmGM, Clonetics)内で一晩インキュベートした。一日目において、完全培地を、基本培地[1%FBSを加えたSmGM]より交

50

換し、そして1%、0.1%および0.01%でPRO1868ポリペプチドを添加した。7日目において、細胞増殖の評価を、ALAMAR BLUETMアッセイ、続くクリスタルバイオレットにより実施した。結果を、コントロール緩衝液を用いて観察された細胞増殖に対する%として表した。

【0395】

試験されたPRO1868ポリペプチドはこのアッセイにおいて、培養物内のヒト冠動脈の平滑筋細胞の増殖を誘導する能力について、および有用な増殖因子として機能する能力について、ポジティブである。

【0396】

(実施例22)

(PRO mRNAおよびポリペプチドの発現)

(A. インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学)

PRO362 mRNA、PRO245 mRNAおよびPRO1868 mRNAの発現を、種々の型の組織において、インサイチュハイブリダイゼーション、免疫組織化学およびRT-PCRにより評価した。

【0397】

インサイチュハイブリダイゼーションのために、組織を固定し(4%ホルマリン)、パラフィン包埋し、切り出し(3~5 μmの厚さ)、脱パラフィンし、プロテイナーゼK(20 μg/ml)を用いて脱タンパク質化(37 °Cで15分間)し、そしてインサイチュハイブリダイゼーションのために処理する。本発明のポリペプチドに対するプローブを、PCRにより産生した。プライマーは、増幅生成物からセンスプローブまたはアンチセンスプローブのインビトロ転写を可能とするために、T7ポリメラーゼ開始部位またはT3 RNAポリメラーゼ開始部位を含んだ。³³P-UTP標識化センスプローブおよびアンチセンスプローブを、一晚ハイブリダイズ(55 °C)し、洗浄(55 °Cで2時間0.1 × SSC)し、NBT2核探知(nuclear track)エマルジョン(Eastman Kodak, Rochester, NY)に浸漬し、露光し(4 °Cで4~6週間)その後現像し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンを用いて対比染色した。代表的な一対の明イメージおよび暗イメージを、代表的に示す。

【0398】

免疫組織化学染色を、DAKO Autostainerを使用して5mmの厚さの凍結切片上で実施した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、Kirkegaard and Perryブロッキング溶液(1:10)を用いてブロッキングした(20 °Cで4分間)。TBS/0.05% Tween-20(DAKO)中の10%NGSを、希釈およびブロッキングに使用した。MAb 4F722.2抗STIGMA(抗PRO362)またはマウスIgGを、0.13 mg/mlで使用した。ビオチン化ヤギ抗マウスIgG(Vector Labs, Burlingame, CA)を、1:200で使用し、Vector Labs Standard ABC Elite Kit(Vector Labs, Burlingame, CA)を用いて検出した。スライドを、Pierce金属増強ジアミノベンジン(metal-enhanced diaminobenzidine)(Pierce Chemicals, Rockford, IL)を使用して現像した。PRO362(STIGMA)およびCD68の発現についての二重免疫組織化学を、マクロファージへのSTIGMA発現の局在を示すために凍結切片上で実施した。mAb 4F7.22.2抗STIGMAおよび抗CD68 mAb KP-1(DAKO製)を、使用し、そしてフェコエリトリンおよびFITCマーカーによりそれぞれ検出した。

【0399】

(1. 検査した組織)

発現を、ヒトおよび他の哺乳動物に由来する広範な種々の組織および細胞型において調べた。

【0400】

10

20

30

40

50

(a . 正常組織)

調べた正常なヒト成体組織としては、扁桃腺、リンパ節、脾臓、腎臓、膀胱、肺、心臓、大動脈、冠状動脈、肝臓、胆嚢、前立腺、胃、小腸、結腸、膵臓、甲状腺、皮膚、副腎、胎盤、子宮、卵巣、精巣、網膜および脳（小脳、脳幹、大脳皮質）が挙げられた。正常なヒト胎児組織（E12～E16週齢の脳、脾臓、腸および甲状腺を含有する）をまた試験した。さらに、発現を、マウスの肝臓において調べた。

【0401】

(b . 炎症性組織)

インサイチュハイブリダイゼーションにより調べられた炎症性の組織としては、例えば、慢性的な喘息、慢性気管支肺炎、慢性気管支炎/慢性閉塞性肺疾患を伴う肺、慢性リンパ性間質性腎炎を伴う腎臓ならびに慢性炎症および肝硬変（慢性C型肝炎感染、自己免疫性肝炎またはアルコール性肝硬変に起因する）を伴う肝臓のような慢性炎症性疾患を伴う組織が挙げられた。

10

【0402】

(c . 原発性新生物)

PRO362、PRO245およびPRO1868の発現についてインサイチュハイブリダイゼーションにより調べられた原発性ヒト新生物としては、乳癌、肺扁平上皮細胞癌、肺性腺癌、前立腺性腺癌、および結腸腺癌が挙げられた。

【0403】

(2 . 結果)

20

(a . PRO362の発現)

PRO362は、マウスの肝臓の凍結切片（図23）、ヒトの肝臓の凍結切片（図24）および多数の組織マクロファージ様細胞（結腸マクロファージ（図25A）、クップファー細胞（図25B）、副腎マクロファージ（図25C）、ホーフバウアー細胞（図25D）、滑膜細胞（図26）、肺胞マクロファージ、腸固有層における常在マクロファージおよび多くの組織における間隙性マクロファージを含有する）において発現されることが見出された。PRO362はまた、脳の小膠細胞において顕著に発現された。PRO362の発現は新形成または炎症性疾患（リウマチ様関節炎（図27）、炎症性腸疾患、慢性肝炎（図28）、肺炎、慢性喘息（図29）、神経膠腫（図30）および気管支炎を含有する）の存在により活性化された場合、これらの組織において有意に増加した。

30

【0404】

PRO362の発現をさらに調べるために、免疫組織化学染色を、種々の組織型について実施した。組織マクロファージ（副腎のマクロファージを含有する、肝臓のクップファー細胞、脳の小膠細胞、および胎盤のホーフバウアー細胞）上で実施されたPRO362およびCD68についての二重免疫組織化学染色を、PRO362およびCD68が、同一の組織において発現されるか否かを決定するために実施した。

【0405】

PRO362は、副腎のマクロファージ（図35）、肝臓のクップファー細胞（図36）、脳の小膠細胞（図37）、および胎盤のホーフバウアー細胞（図38）上においてCD68と同時発現することを見出した。

40

【0406】

(b . PRO245の発現)

PRO245は、上皮組織および炎症性組織に顕著に局在化していることを見出した。

【0407】

(i) 正常組織

正常成体ヒト組織におけるPRO245 mRNAの発現は、扁桃およびリンパ節（図31）における高内皮小静脈（HEV）、精巣の精細管における上皮の精子形成細胞（図32IおよびJ）、ならびに胎盤の中間型栄養膜において顕著であった。

【0408】

正常ヒト胎児組織におけるPRO245 mRNAの発現は、内皮細胞において顕著で

50

あったが、より具体的には、小血管および大血管（毛細血管を除く）の血管内皮、腸間膜の血管、腸壁の壁在性血管、ならびに発生段階の腸間膜リンパ節および甲状腺の小血管において見出された。

【0409】

PRO245の発現は、脾臓、正常皮膚または包皮、正常肺、甲状腺、正常腸、正常心臓組織または副腎においては有意ではなかった。

【0410】

(ii) 炎症性組織

PRO245の発現は、慢性炎症性疾患を伴う組織においてより広範であった。慢性気管支肺炎を伴う肺の生検において、PRO245 mRNAは、リンパ球性炎症の病巣内またはすぐ横に存在する小径の小動脈（図32AおよびB）、中径の小動脈（図32CおよびD）、ならびに大径の小動脈（図32EおよびF）の内皮細胞において発現した。PRO245 mRNAは、正常肺組織（図32GおよびH）においては観察されなかった。さらにPRO245は、以下：小動脈、慢性間質性肺炎に関連する組織に由来する静脈および毛細血管、乾癬に関連する組織に由来する乾癬性皮膚の表在性真皮性血管、慢性硬化性腎炎に関連する組織に由来する小動脈、虫垂炎に関連する組織に由来する炎症性の病巣における血管内皮および毛細血管、多数の血管の内皮細胞、HEV、毛細血管、扁桃および毛包周囲の洞に関連する組織に由来する小さな小動脈および静脈、ならびに大動脈およびアテローム硬化症に関連する大動脈における動脈周囲の間質組織における毛細血管の活動性炎症または慢性炎症における血管内皮において有意に発現されることが見出された。PRO245は、大動脈の最も内部においては顕著に発現しなかった。

【0411】

慢性リンパ球性間質性腎炎を伴う腎臓および慢性リンパ球性肝炎を伴う肝臓の生検において、PRO245の発現は、リンパ球性炎症部位内および隣接部における小動脈の内皮細胞において顕著であった。PRO245の発現は、慢性的に炎症性の肝臓または肝硬変の肝臓においては顕著ではなかった。

【0412】

慢性的な炎症および肝硬変を伴う肝臓の生検において、PRO245は、顕著に発現しなかった。

【0413】

PRO245の発現は、炎症性の大腸または髄膜炎を伴う脳において顕著に発現しなかった。

【0414】

(iii) 新生物の組織

PRO245の発現は、多数の原発性新生物（結腸腺癌、精巣癌（図33AおよびB）、肺性腺癌（図33CおよびD）、乳癌（図33EおよびF）を含有する）において、ならびに顕著に前立腺癌および結腸腺癌においては、顕著に小径ならびに中径の小動脈の内皮細胞で観察された。PRO245 mRNAは、乳癌においては発現することが見出されなかった（図34）。しかし、PRO245は、正常な胸部組織の隣接部においては顕著に発現しなかった（図33GおよびHに示され、ここで乳癌は、星印で示されそして正常な胸部組織は矢印で示される）。PRO245の発現は、腫瘍（矢頭）に隣接する血管に特有に観察されるが、正常な組織に観察されない。

【0415】

PRO245の発現は、精巣上体の血管内皮および精巣癌または精上皮腫における慢性リンパ球性炎症部位内、肺腺癌の慢性リンパ球性炎症部位内の腫瘍病巣の血管内皮細胞、肺扁平上皮細胞癌における慢性リンパ球性炎症部位内の腫瘍病巣における血管内皮細胞、乳癌の慢性リンパ球性炎症の腫瘍病巣に隣接する血管内皮細胞およびその炎症部位内の血管内皮細胞内、ならびに小動脈、静脈、および軟骨肉腫における毛細血管の血管内皮細胞内に隣接する部位において見出された。

【0416】

10

20

30

40

50

(c . P R O 1 8 6 8 の 発 現)

P R O 1 8 6 8 は、 N K 細胞、 C D 8 + T 細胞および樹状細胞上に発現されることが見出された。

【 0 4 1 7 】

(B . 逆 転 写 - ポ リ メ ラ ー ゼ 連 鎖 反 応 (R T - P C R))

逆 転 写 - ポ リ メ ラ ー ゼ 連 鎖 反 応 (R T - P C R) は、 逆 転 写 に よ る R N A か ら の c D N A 合 成 か ら な る m R N A の 検 出 お よ び 定 量 の た め の 高 感 度 技 術 で あ る 。 P R O 1 8 6 8 の 発 現 を 検 出 す る た め に、 P R O 1 8 6 8 m R N A の 存 在 を、 R T - P C R に よ り 検 出 し た。

【 0 4 1 8 】

P R O 1 8 6 8 m R N A を T 細胞株 (J 4 5 お よ び M o l t 5) に お い て 逆 転 写 P C R (R T - P C R) に よ り 有 意 に 検 出 し た が、 B 細胞株 (J Y、 R P M I 8 8 6 6 お よ び R A M O S) に お い て は 有 意 に 検 出 し な か っ た (図 3 9) 。

【 0 4 1 9 】

(実 施 例 2 2)

(特 定 の 細胞 型 と の P R O 2 4 5 の 相 互 作 用)

フ ロー サ イ ト メ ト リ ー に よ り 決 定 さ れ る と お り、 末 梢 血 細胞 は、 顕 著 に P R O 2 4 5 を 発 現 し な い (表 6、 上 半 分)。 P R O 2 4 5 が 末 梢 血 細胞 の 別 個 の 一 部 分 と 相 互 作 用 す る か 否 か を 決 定 す る た め に、 多 数 の P R O 2 4 5 - 細胞 ア ッ セ イ を 実 施 し た。 こ れ ら は、 P R O 2 4 5 と 相 互 作 用 す る 細胞 の 磁 性 選 別 ま た は F A C S 選 別 を 含 ん だ。 末 梢 血 を、 以 下

【 0 4 2 0 】

(A . 磁 性 選 別 お よ び フ ロー サ イ ト メ ト リ ー)

末 梢 血 白 血 球 と P R O 2 4 5 が 相 互 作 用 す る か 否 か を 決 定 す る た め に、 ビ オ チ ン 化 P R O 2 4 5 - ヒ ト I g G 融 合 タ ン パ ク 質 を、 以 下 に 記 載 さ れ る と お り に 生 成 し た。 P R O 2 4 5 と 相 互 作 用 す る 末 梢 血 白 血 球 を、 ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン 結 合 体 化 磁 性 ビ ーズ を 使 用 し て 単 離 し た。 次 い で 単 離 細胞 を、 表 面 の C D - A g の 発 現 に つ い て 調 べ た。 ビ オ チ ン 化 P R O 2 4 5 ヒ ト I g G 融 合 体 を 使 用 し て 得 ら れ た 結 果 を、 ビ オ チ ン 化 ヒ ト I g G を 使 用 す る 結 果 と 比 較 し た。

【 0 4 2 1 】

ビ オ チ ン 化 P R O 2 4 5 ヒ ト I g G 融 合 タ ン パ ク 質 ま た は ヒ ト I g G 1 タ ン パ ク 質 を、 S e r F 緩 衝 液 (フ ェ ノ ール レ ッ ド ま た は 1 0 m M H E P E S (L i f e T e c h n o l o g i e s) で 緩 衝 し た 重 炭 酸 ナ ト リ ウ ム (H B S S + ; L i f e T e c h n o l o g i e s) を 含 ま な い H B S S 中 0 . 1 % N a N 3 (w / v ; S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O) を 添 加 し た 1 0 % F B S (v / v ; L i f e T e c h n o l o g i e s)、 p H 7 . 4) 中 で、 P B M C (1 0 μ g / 1 0 ⁷) と 共 に 4 で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。 細胞 を、 S e r F 緩 衝 液 中 で 洗 浄 し、 そ し て 8 0 μ l / 1 0 ⁷ 細胞 で 再 懸 濁 し た。 ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン 磁 性 ビ ーズ (M i l t e n y i B i o t e c) を、 2 0 μ l / 1 0 ⁷ 細胞 で 添 加 し、 そ し て 4 で 1 5 分 間 イ ン キュ ベ ー ト し、 S e r F 緩 衝 液 で 洗 浄 し、 5 0 0 m l / 1 0 ⁸ 細胞 に 再 懸 濁 し、 そ し て ポ ジ テ ィ ブ 選 択 を 行

【 0 4 2 2 】

(1 . タ ン パ ク 質 結 合)

P R O 2 4 5 - ヒ ト I g G 融 合 体、 ヒ ト I g G 1、 ま た は P R O 3 6 2 - ヒ ト I g G 融 合 体 を、 室 温 で 3 0 分 間、 P B S 中 1 m g の タ ン パ ク 質 ご と に 2 0 0 μ g の E Z - L i n k ス ル ホ - N H S - L C - ビ オ チ ン (P i e r c e) を 用 い て ビ オ チ ン 化 し た。 ビ オ チ ン

10

20

30

40

50

化は、(終濃度) 200 mM Tris、(pH 8)の添加によりクエンチされ、そして室温で30分間インキュベートした。次いでビオチン化タンパク質を、PBSに対して大量に透析し、そしてCentricon-10マイクロコンセンレーター(Millipore, Bedford, MA)を用いて2 mg/mlの濃度まで濃縮した。

【0423】

Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR)タンパク質結合キットを、PRO245-ヒトIgG融合体またはヒトIgG1上へのAlexa-488の結合についての製造者の指示書どおりに使用した。

【0424】

(2. フローサイトメトリー)

フローサイトメトリーの分析に使用される細胞を、SerF緩衝液を用いて4で30分間ブロッキングし、そしてCD3、CD4、CD8、CD14、CD19またはCD56に対する抗体(FITC、PEもしくはCyChrome (BD Pharmingen, San Diego, CA)のいずれかに結合する)を用いて染色した。

【0425】

(3. 結果)

末梢血白血球の以下：T細胞(CD3+)、CD8+細胞、B細胞(CD19+)およびNK細胞(CD56+)の4つの細胞群が、PRO245と顕著に相互作用することを見出した。単一の実験においてPRO245と相互作用することが可能であった細胞の割合は、以下：CD3+細胞について20.99%、CD8+細胞について6.68%、CD19+細胞について9.66%、およびCD56+細胞について36.89%のとおりであった。ヒトIgGコントロールと相互作用することが可能であった細胞の割合は、以下：CD3+細胞について2.39%、CD8+細胞について1.78%、CD19+細胞について4.42%、およびCD56+細胞について6.69%のとおりであった。

【0426】

(B. FACS選別およびフローサイトメトリー)

PRO245-ヒトIgG融合タンパク質に結合する末梢血細胞を、FACS選別により選別した。

【0427】

FACS選別のために、細胞を、改変されたSerF緩衝液(5 µg/mlの抗CD16抗体3G8 (BD Pharmingen)および20 µg/mlのヒトIgG1 (Caltbiochem, San Diego, CA)を含有するSerF緩衝液)においてAlexa-488-結合体化ヒトIgG1またはPRO245-ヒトIgG融合タンパク質(10 µg/10⁶細胞)と共にインキュベートし(4で30分間)、洗浄し、そしてElite ESP (Beckman Coulter, Miami, FL)で選別した。これらの条件において、Alexa-488-結合体化PRO245またはヒトIgGは、バックグラウンドとして使用した。競合アッセイにおいて、コンペティター(20 µg/10⁶細胞)を、Alexa-488-結合体化PRO245-ヒトIgG融合タンパク質またはヒトIgGが導入される前に、SerF緩衝液中で室温で20分間、細胞と混合した。次いでこの細胞を、洗浄し、そして上記のとおりフローサイトメトリーにより分析した。

【0428】

PRO245-ヒトIgG融合タンパク質(JAM-IT, Fc)と相互作用する細胞の、12.5%は、CD3+T細胞であり、32.4%は、CD8+T細胞であり、そして50.4%は、CD56+NK細胞であった。CD19+B細胞は、FACS選別アッセイにおいては検出されなかった。CD56+NK細胞の、22.4%は、CD3を発現しそして40.2%は、CD8を発現した。CD8+T細胞の、23.5%は、CD3を発現し、そして73.2%は、CD56を発現した(図40)。

【0429】

10

20

30

40

【表 6】

表 6：末梢血細胞における PRO 2 4 5 の発現および PRO 2 4 5 に対する末梢血細胞の結合

一次染色	二次染色						
	CD3	CD4	CD8	CD14	CD19	CD56	PMN
抗-PRO245 ポジティブ	0.2%	0.1%	0.1%	0.7%	0.1%	0.3%	0.9%
抗-PRO301 ポジティブ	76.7%	73.9%	80.4%	99%	90%	85%	98.7%
抗-マウスIgG ポジティブ	0.25	0.1%	0.1%	0.7%	0.1%	0.3%	0.9%
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
総 PRO245 の割合	12.6%	1.1%	32.4%	0.3%	0.4%	50.4%	NA
結合細胞							
PRO245 結合の割合	22.4%	0.2%	40.2%	0.5%	0.4%		NA
CD56 ポジティブ細胞							
PRO245 結合の割合	23.5%	0.1%		0.6%	0.3%	73.2%	NA
CD8 ポジティブ細胞							

10

20

(C . 精製した細胞への結合)

精製した B 細胞、好中球、CD 1 4 + 単球、末梢血樹状細胞 (P B D C) (C l o n e t i c s (S a n D i e g o , C A) 製)、ネガティブ選択により得られた末梢血 CD 5 6 + N K 細胞、および J 4 5 (C D 3 + T 細胞株) を、フローサイトメトリーにより、A l e x a - 4 8 8 - 結合体化 P R O 2 4 5 ヒト I g G 融合タンパク質と相互作用するこれらの能力について分析した。A l e x a - 4 8 8 - 結合体化ヒト I g G 1 タンパク質と相互作用する能力を、コントロールと同時に分析した。

【 0 4 3 0 】

血液を、静脈の穿刺により健康な成人の志願者から入手し、そして製造者の指示書どおりに F i c o l l - P l a q u e P L U S (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を使用して分離した。P B M C を、その界面から入手し、冷 P B S 中で洗浄し、必要に応じて溶解し (3 0 秒間 0 . 2 % N a C l を用いて、そして 1 . 6 % N a C l を用いて中和化)、計数し、そして使用するまで 5×10^7 細胞 / m l で氷上に維持した。フローサイトメトリー分析により、混入のない血小板を、精製した P B M C 画分に観察した。好中球を、混入する R B C の溶解の後、ペレットから入手した。好中球を、冷 P B S 中で洗浄し、計数し、そして使用されるまで氷上で 5×10^7 細胞 / m l で維持した。末梢血の一部を単離するために、「非接触 (u n t o u c h e d) 」 M A C S キット (M i l t e n y i B i o t e c , A u b u r n , C A) を、製造者の指示書に従って

30

40

【 0 4 3 1 】

精製した B 細胞、好中球および CD 1 4 + 単核球は、フローサイトメトリーにより検出されような P R O 2 4 5 - ヒト I g G 融合タンパク質と相互作用しなかった。しかし、多数の他の細胞型は、P R O 2 4 5 . F c と相互作用することを見出した。図 4 1 は、CD 5 6 + N K 細胞と相互作用する P R O 2 4 5 . F c を示す。この相互作用は、抗 P R O 2 4 5 抗体の添加によりブロッキングされるように特異的であった。P R O 1 8 6 8 (また 7 7 6 2 4 、 J A M 3 および S H A T r と称される) が、P R O 2 4 5 と CD 5 6 + N K 細胞との相互作用をブロッキングすることを見出した (図 4 6 の下および図 5 3 の右下) 。非標識化に加え、H i s タグ化 P R O 1 8 6 8 (J A M 3) は、P R O 2 4 5 . F c の

50

添加により観察される蛍光の偏位をブロッキングした。一方、図53(右上)に見られ得るとおり、PRO301の添加は、PRO245とNK細胞との相互作用をブロッキングしない。

【0432】

末梢血樹状細胞(PBDC)はまた、PRO245と相互作用するが、PRO245は発現しない(図42)。PBDCは、Cloneticsより得られた。図41Iは、PRO245-Fc(実線)が、ヒトIgG1(陰影をつけたヒストグラム)に比べてPBDCと強く相互作用することを示す。しかし、PBDSは、PRO245を発現することが観察されなかった(図41II; マウスIgG-塗りつぶしたヒストグラム; 抗PRO245抗体12D10、2F9-実線)。

10

【0433】

さらに、J45 T細胞(これは検出可能なPRO245の表面の発現を有さない)が、PRO245と相互作用することを見出した(図43および44)。Alexa-488結合体化PRO245-Fc融合タンパク質とJ45細胞との間の相互作用を、結合体化ヒトIgG1(図44)と比較した場合蛍光のピークの偏位により検出した。この偏位を、抗PRO245抗体の添加によりブロッキングした(図44)。Alexa-488結合体化PRO245-Fc融合タンパク質とJ45細胞との間のこの相互作用をまた、非標識化PRO1868(His-PRO1868タンパク質)により阻害した(図45)。さらに、抗PRO1868抗体(MAJIR1)が、PRO245依存性J45接着を阻害することを見出したが、マウスIgGは、接着に影響を及ぼさなかった(図52)

20

【0434】

従って、PRO245と相互作用する細胞型は、以下: CD56+細胞(CD56+NK細胞を含有する)、CD56+CD3+NK/T細胞、CD56+CD3+CD8+細胞溶解性T細胞、PBDCおよびJ45 T細胞であった。さらに、過剰なPRO1868タンパク質は、J45およびCD56+NK細胞に結合するPRO245を阻害し、そして抗PRO1868抗体は、CD56+NK細胞に結合するPRO245を阻害した。

【0435】

(D. プレートベースの接着アッセイ)

PRO245と相互作用することが可能である細胞のプレートベースの分析のために、マイクロタイターウェル(NUNC Maxisor 96-ウェルプレート; VWR, Scientific Products, Brisbane, CA)を、50 μ l/ウェル(HBSS+内に)、10 μ l/mlを室温で2時間(特に断りのない限り)の条件でコーティングした。接着アッセイのために、50 μ l(10 μ g/ml)のヤギ抗ヒトIgGFc特異的抗体(例えば、PRO245-ヒトIgG融合タンパク質)を初めにコーティングし、そしてさらなるコーティングの条件の付加の前に室温で1時間、結合/ブロッキング緩衝液(BBB; 10%(v/v)FBS含有するHBSS+)中において条件の付加前にブロッキングした。細胞(BBB中5 \times 10⁶細胞/ml)を、5mg/mlの2',7'-ビス-(2-カルボキシエチル)-5(および-6)-カルボキシフルオレセイン、アセチオキシメチルエステル(BCFCF AM)(Molecular Probes)で処理し(5%CO₂を用いて37 $^{\circ}$ Cで10分間)、洗浄し、そして37 $^{\circ}$ C/5%CO₂において1時間コートされたウェル(BBB中に2 \times 10⁵細胞/ウェル)に接着させた。

30

40

【0436】

プレートを、適用された全ての蛍光についてSpectraMax蛍光プレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)上で読みとり、3回穏やかに洗浄し(28-ゲージの針を用いた吸引により)、そして全ての付着性の蛍光を読みとった。付着の割合を、以下の式: ((付着性の総蛍光)/(適用された総蛍光)) \times 100を使用して計算した。BBBでコートされたウェルから構成されるブランクのウェルを、BCFCF AM-標識化J45細胞に曝した。このブランクのウェルから

50

得た値（付着の割合）を、最終値を誘導するために全ての実験条件から差し引いた。

【0437】

プレートベースの接着アッセイを使用して、J45T細胞が、PRO245-ヒトIgG融合体（VJ2.Fc）でコートされたウェルに接着することを見出した（図47）。抗PRO245抗体（マウスIgGではない）が、PRO245-ヒトIgG1融合タンパク質へのJ45細胞の接着を阻害したことは、この相互作用が特異的であることを示す（図47）。

【0438】

（実施例23）

（PRO245のためのレセプターの同定）

この相互作用の原因となるPRO245と相互作用する細胞におけるタンパク質を同定するために、免疫沈降の研究を実施した。

【0439】

（A.CD56+NK細胞およびJ45細胞）

PRO245に対するJ45またはNK細胞上の細胞表面レセプターを単離するために、PRO245と相互作用する細胞を、ビオチン化し、次いで溶解した。この溶解した細胞に由来する上清を、Fc架橋化PRO245-ヒトIgG融合プロテインAマトリックスを用いて免疫沈降に供した。この沈殿物を、ウェスタンブロットにより分析した。

【0440】

（1.ビオチン化）

ビオチン化する条件について、細胞を初めに、4℃で30分間、スルホ-NHC-LC-ビオチンを用いてビオチン化する（ $200\mu\text{g}/10^6$ 細胞）前にHBSS+内で洗浄した。細胞を、このビオチン化をクエンチするために4℃で30分間、TBSを用いて洗浄した。

【0441】

（2.溶解）

細胞を、4℃で30分間、溶解緩衝液（7mlの溶解緩衝液あたり1% Triton X-100および1個のComplete-Mini EDTAフリープロテアーゼインヒビター錠（Roche Biochemicals, Indianapolis, IN）を含有するHBSS+）を用いて溶解した（ 10^8 細胞/ml）。溶解産物を、4℃で1時間、 $22,000\times g$ で回転させ、そして $0.2\mu\text{m}$ で濾過した。溶解産物を、4℃で2時間、 $5\mu\text{l}/10^6$ 細胞の組換えプロテインAビーズ（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて予め浄化した。

【0442】

（3.免疫沈降）

浄化した溶解産物を、 $0.2\mu\text{m}$ で濾過し、そして $5\mu\text{g}/10^6$ 細胞のPRO245-ヒトIgG融合タンパク質またはヒトIgG1（ImmunoPure Protein A IgG Plus Orientationキット（Pierce）を使用してプロテインAマトリックスに結合されたもの）のいずれかと共に4℃で2時間インキュベートした。ビーズを、ペレット化し、そして溶解緩衝液を用いて洗浄し、そして $15\mu\text{l}/10^6$ 細胞の非還元性のSDSサンプル緩衝液（2mMヨードアセトアミドを含有する、DTTまたは2-メルカプトエタノールを含有しない標準サンプル緩衝液）の添加により変性し、そして100℃で3分間、煮沸した。

【0443】

（4.ウェスタンブロットティング）

$15\mu\text{l}$ /レーンの濃度でサンプルを、4~20%のBio-Rad Tris-HCl Ready Gel（Bio-Rad、Hercules、CA）上で分離し、そして4℃で2時間100mAで、 $0.2\mu\text{m}$ のProtranニトロセルロース膜（Schleicher & Schuell, Keene, NH）上へ移した。ブロットを、Blotto（5%無脂肪乳および0.05%TWEEN^TM 20；Bio-Radを含有

10

20

30

40

50

するTBS)内で1時間、ブロッキングした。ビオチン化されたサンプルについては、HRP-結合体化ストレプトアビジン(Pierce)を、室温で30分間、0.5 μ g/mlで使用した。非ビオチン化であるサンプルについては、抗PRO1868抗体(MAJIR1)を、Blotto内10 μ g/mlで使用し、そして室温で30分間、Blotto内1 μ g/mlのHRP-結合体化ヤギ抗マウスIgG(Caltag Laboratories, Burlingame, CA)の適用前に、25で1時間インキュベートした。プロットを、TTBS(0.05%Tween20を含有するTBS)を用いて全体的に洗浄した(そしてECL Plus試薬(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて現像した(Kodak BioMax MLフィルム上への感光およびKodak M35A X-OMAT Film Processor(Eastman Kodak)用いた現像の前に)。

【0444】

(5. 結果)

Fc架橋化PRO245-ヒトIgG融合プロテインAマトリックスを用いたビオチン化サンプルの免疫沈降およびウェスタンブロットングによる分析は、PRO245-ヒトIgG融合体(図48)と相互作用する約40kDaの単一のストレプトアビジン-反応性のバンドの同定を可能とした。この40kDaのバンドは、Fc架橋化ヒトIgGプロテインAマトリックスを用いて実施した免疫沈降、および非-PRO245-結合Ramos/HH B細胞株においてFc架橋化ヒトIgGプロテインAマトリックスを用いて実施したPRO245-免疫沈降内には存在しなかった。

【0445】

この40kDaのバンドが、PRO1868を示すか否かを決定するために、免疫沈降を、PRO245-ヒトIgG融合プロテインAマトリックスを用いて、Ramos/HH細胞(PRO245と相互作用しない)、MOLT4細胞(PRO245が結合する)およびPBMC(PRO245が結合する)に由来する非ビオチン化サンプル上で実施した。この沈殿物を、抗PRO1868抗体を用いた免疫プロット法により分析した。この免疫プロット法は、この40kDaのPRO245と相互作用するバンドが、PRO1868を示したことを実証した(図49)。

【0446】

(6. ELISAによるPRO245とPRO1868との間の結合の確認)

抗PRO1868抗体、精製したPRO245およびPRO1868融合タンパク質を使用して、PRO245とPRO1868との間の相互作用を、プレートベースのアッセイにおいて確認した。プレートに結合したPRO1868-Fc融合タンパク質(JAM3-Fc)またはコントロールのヒトPRO301-Fc融合タンパク質(huJAM-Fc)を、0.25 μ g/ウェルのマウスIgGまたは抗PRO1868抗体の存在下において、ビオチン化PRO245-Fc融合タンパク質に曝した(図50)。ストレプトアビジンHRPを、PRO245-Fcビオチンに対するPRO1868-Fc融合タンパク質でコートされたウェルとの間の結合を検出するために使用した。あるいは、PRO245-Fc融合体を、プレート上に捕捉し、そしてビオチン化PRO1868-Fc融合体を、PRO245-PRO1868の相互作用を検査するために特異的な濃度で使用した(図51)。さらに、抗PRO1868抗体および抗-PRO245抗体によるPRO245とPRO1868との間のこのようなプレートベースの相互作用の阻害を、試験した。

【0447】

ELISAのために、このプレートを、室温で30分間、BBBを用いてコートティングする条件の後ブロッキングし、そして室温で1時間、結合する条件を用いてインキュベートした。EDTAを必要とする条件については、改変されたBBB(標準HBSS+の代わりにEDTAを含有し、カルシウムおよびマグネシウムを含まないHBSS)を、この実験をとおして使用した。プレートを、3回洗浄し、室温で30分間、1 μ g/mlのストレプトアビジンHRP(Pierce)と共にインキュベートし、そしてテトラメチ

10

20

30

40

50

ルベンジジン基質 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を使用して呈色現像を介して評価し、そして ThermoMax Microplate Reader (Molecular Devices) 上で読みとった。

【0448】

PRO245 と PRO1868 との間の相互作用を、プレートベースのアッセイを介して同定した (図50および51)。図50は、PRO1868-Fc (JAM3-Fc) でコートされたウェルが、PRO245-Fc の結合を示すのに対して、PRO301-Fc でコートされたウェルは、結合を示さなかったことを示す。マウス IgG (MIgG) は、結合に影響を及ぼさないが、抗PRO1868抗体 (MaJIR1) は、PRO245 の結合を阻害した。PRO245-Fc が、このプレートに結合した場合 (図51)、PRO245-Fc と PRO1868-Fc との相互作用が再び観察された。さらに、抗PRO1868抗体 MaJIR1 は再び、この相互作用を阻害することが可能であったが、マウス IgG は、影響を及ぼさなかった。

10

【0449】

(B. 潜在的なレセプターのパネル)

PRO245ポリペプチドを、レセプター/リガンドの相互作用を同定する目的で、潜在的なレセプター分子のパネルと共にインキュベートした。公知のレセプターに対するリガンド、公知のリガンドに対するレセプターまたは新規のレセプター/リガンドのペアの同定は、種々の適用 (例えば、レセプターまたはリガンドを発現する公知の細胞に対し生物学的に活性な分子 (リガンドもしくはレセプターに連結する) のターゲティング、同一のものを含むと推測される組成物 (ここでこの組成物は、リガンドまたはレセプターを発現すると推測される細胞を含み得る) におけるリガンドまたはレセプターの存在を検出するための試薬としてのレセプターまたはリガンドの使用、レセプターまたはリガンドを発現するもしくはレセプターまたはリガンドに反応する公知の細胞の増殖または別の生物学的なもしくは免疫学的な活性の調節、レセプターまたはリガンドを発現する細胞の、またはそれらの細胞に対する免疫応答の改変、アゴニストの調製を可能とする、レセプターまたはリガンドに対して指向されるアンタゴニストおよび/または抗体 (これらはレセプターまたはリガンドを発現する細胞の増殖または生物学的なもしくは免疫学的な活性を調節する)、および種々の他の適用 (当業者にとって容易に理解される) を含む) に有用である。

20

30

【0450】

レセプターに対するリガンドであると推測される本発明のPRO245ポリペプチドは、ヒトIgGのFcドメインを含む融合タンパク質 (免疫アドヘシン) として発現される。レセプター-リガンドの結合は、候補レセプター (PRO1868ポリペプチドレセプターを含む) を発現する細胞 (例えば、COS細胞) とPRO245免疫アドヘシンポリペプチドとの相互作用を可能とし、そして、Fc融合ドメインに対して指向された蛍光試薬との結合化免疫アドヘシンの視覚化、そして顕微鏡による検査により検出される。候補レセプターを発現する細胞を、一過性のトランスフェクションにより産生し、同時に、レセプター分子として機能し得るcDNA発現ベクター (例えば、PRO1868ポリペプチドをコードする) のライブラリーの一部を規定する。次いで細胞を、可能なレセプター結合について試験されるPRO245ポリペプチド免疫アドヘシンの存在下において、1時間インキュベートする。次いでこの細胞を、洗浄し、そしてパラホルムアルデヒドにより固定する。次いでこの細胞を、PRO245ポリペプチド免疫アドヘシンのFc部分に対して指向される蛍光結合化抗体 (例えば、FITC結合化ヤギ抗ヒトFc抗体) と共にインキュベートする。次いでこの細胞を、再び洗浄し、そして顕微鏡により検査する。ポジティブの相互作用を、特定のPRO1868ポリペプチドレセプターまたはレセプターのプールをコードするcDNAを用いてトランスフェクトされた細胞の蛍光標識の存在、および他のcDNAまたはcDNAのプールを用いてトランスフェクトされた同様に調製された細胞の類似の蛍光標識が存在しないことにより判断する。cDNA発現ベ

40

50

クターの規定されたプールが、PRO245ポリペプチド免疫アドヘシンの相互作用についてポジティブであると判断される場合、このプールを含有する個々のcDNA種を、PRO245ポリペプチド免疫アドヘシンの相互作用し得るレセプターをコードする特定のcDNAを決定するためにそれぞれ試験する(このプールは「分析される」)。

【0451】

このアッセイの別の実施形態において、エピトープ標識化された潜在的なリガンドのPRO245ポリペプチド(例えば、8個のヒスチジン「HIS」タグ)は、ヒトIgGのFcドメインを有する融合体(免疫アドヘシン)として発現された潜在的なレセプターポリペプチド分子のパネルと相互作用することが可能である。エピトープ標識化されたPRO245ポリペプチドと共に1時間の同時インキュベーションに続いて、この候補レセプターをプロテインAビーズを用いて、それぞれ免疫沈降し、そしてこのビーズを洗浄した。潜在的なリガンドの相互作用を、このエピトープ標識に対して指向された抗体を用いて、この免疫沈降した複合体のウェスタンブロット分析により決定する。相互作用が、エピトープ標識化されたタンパク質の予期された分子量のバンドが、候補レセプターを用いたウェスタンブロット分析において観察される(しかし、このバンドは潜在的なレセプターのパネルの他のメンバーを用いると生じることが観察されない)場合、生じることが判断される。

【0452】

これらのアッセイを使用して、以下のレセプター/リガンド相互作用は本明細書中において同定された: PRO245(DNA35638-1141)は、PRO1868(DNA77624-2515)に結合する。

【0453】

(C.JAMファミリータンパク質)

フローサイトメトリー分析を、JAMタンパク質ファミリーのメンバーの相互作用をさらに調べるために実施した。PRO245は、実施例14に記載されるとおりCHO細胞に発現した。次いでこのPRO245発現CHO細胞は、Hisタグ化JAMタンパク質(PRO245、PRO301、およびPRO1868を含有する)と共にインキュベートした。PRO245発現CHO細胞に対するHisタグ化PRO362タンパク質、PRO1868タンパク質またはPRO301タンパク質の結合を、フローサイトメトリーにより分析した。

【0454】

PRO245発現CHO細胞に対するPRO1868の結合のために、5 μ g/mlのPRO1868His(SHATr.His)タグ化タンパク質を、PRO245発現CHO細胞と共にインキュベートした。PRO1868(SHATr.His)は、PRO245発現CHO細胞と相互作用することが可能であった(図54)。異なる競合タンパク質を、PRO245に対するPRO1868の結合を阻害する能力について調べた。PRO1868タンパク質(SHATr.His)および抗PRO245抗体(12D10.2F9)は、CHO細胞表面におけるPRO245の結合についてPRO1868Hisタグ化タンパク質と競合することが可能であった(図54)。これに対して、PRO301.Fc、PRO362.Fc、マウスIgGおよびHisコントロールは、結合を阻害し得なかった(図54)。

【0455】

上記の結果に基づき、PRO245は、PRO1868と相互作用する。

【0456】

(実施例24)

(慢性炎におけるSTIGMA(PRO362)の関与)

A33抗原およびJAM1に対する類似性を伴う新規のマクロファージ関連レセプターを、実施例2および以下に記載されるとおりクローン化し、そして単一膜貫通型Igスーパーファミリーメンバーのマクロファージ関連(STIGMAまたはPRO362またはJAM4)と同定した。

10

20

30

40

50

【0457】

STIGMAは、二つのスプライシングされた改変体として発現され、一つはN末端IgV様ドメインおよびC末端IgC2様ドメインを含み、そしてスプライシングされた形態は、C末端ドメインを欠如する。両レセプターは、単一膜貫通型ドメインおよびチロシン残基（これは、インビトロにおけるマクロファージにおいて恒常的にリン酸化される）を含有する細胞質ドメインを有する。

【0458】

本研究は、STIGMAが、組織常在マクロファージの一部上に選択的に発現され、そして慢性炎と関連することを示す。

【0459】

（材料および方法）

（細胞）

血液を、静脈の穿刺により健康な成人の志願者から得、そして製造者の指示書どおりにFicoll-Plus (Amersham Pharmacia Biotech) を使用して分離した。PBMCを、界面から得、冷PBS中で洗浄し、30秒間0.2% NaClを用いて溶解し、そして1.6% NaClを用いて中和化した。細胞を、計数し、そして使用するまで氷上に維持した。末梢血の一部を単離するために、MACSキット (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を、製造者の指示に従って使用した。分化したマクロファージを培養するために、ネガティブ選択された単球を、20%胎児ウシ血清および10%ヒト血清を含有するHGDMEMの6ウェルに培養皿に移動した。培地を、5日で交換した。フローサイトメトリー分析のために、細胞を、氷冷した細胞解離溶液 (Sigma) を使用して培養皿から解離した。ウエスタンブロット分析のための溶解産物を、ウェルの直接0.5mlの溶解緩衝液を添加することにより調製した。溶解産物を、SDSおよびβ-メルカプトエタノールを含有するサンプル緩衝液と混合し、Tris-グリシンゲル上で泳動し、そしてニトロセルロース膜へ転移した。

【0460】

（フローサイトメトリー）

フローサイトメトリー分析に使用するための細胞を、2%胎児ウシ血清および5μg/mlのヒトIgG (Calbiochem, San Diego, CA) を含有するPBSを用いて4℃で30分間、ブロックした。次に、細胞を、3C9、抗STIGMA (抗PRO362) モノクローナル抗体と共にインキュベートした。PBS内で洗浄した後、細胞を、CD11b、CD14、CD163、CD15、CD68に対するフィコエリトリン (PE) - 結合体化抗体 (Pharmingenから入手した) を用いて染色した。

【0461】

（細胞-細胞接着研究）

全長STIGMAを含有するpRK発現ベクターは、他に記載されたとおりネオマイシン選択およびオートクローン選別を使用して、ヒトジャーカットT細胞株において安定して発現した。細胞を、蛍光色素BCECF (Molecular Probes, Oregon) を用いて予め負荷し、そして10ng/mlのTNFを用いてかまたは用いずに処理した単層のヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) でコートティングした96ウェルMaxisorbプレート (CORNINGTM) に添加した。細胞を、インキュベーション緩衝液 (10mM CaCl₂、10mM マグネシウムおよび1.5mM NaClを含有するHBSS) を用いてこのウェルを負荷し、続いてブロッキング紙の薄片上でこのプレートを逆さにすることにより穏やかに洗浄した。3回の洗浄の後、蛍光を、蛍光分光計において計数した。蛍光の読み出し情報は、HUVEC細胞に接着し続ける細胞の数を表す。

【0462】

（ノーザンブロット分析）

10

20

30

40

50

複数の組織のノーザンブロット (CLONTECH) を、製造者の推奨に従って Ambion キットを使用してランダムにスプライシングした全長 STIGMA cDNA の^{3 2} P 標識化プローブを用いて精査した。ブロットを、phosphorimaging スクリーンに露光され、そして Storm phosphorimager を用いて分析した。

【0463】

(リアルタイム R t P C R 分析)

定量的な P C R 分析 (T A Q M A N^{T M}) のために、ヒト組織または原発細胞 (100 ng) に由来する総 m R N A が、S T I g M A のコード配列に基づくプライマーと共に推奨された (P e r k i n E l m e r L i f e S c i e n c e s)。

10

【0464】

(F c - 融合タンパク質および H i s - 融合タンパク質産生)

ヒト S T I g M A を、バキュロウイルス発現ベクター p H I F (P h a r m i n g e n) へクローン化した。この H i s - タグ化 S T I g M A 融合タンパク質は、8 個のヒスチジンに融合した S T I g M A の細胞外ドメインから構成された。H i s タグ化融合タンパク質を、ニッケルアフィニティ樹脂を使用して懸濁液中において増殖したバキュロウイルス感染昆虫細胞の上清から精製した。

【0465】

(モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の産生)

B A L B c の雌を、前述のように免疫化し、そして肉球への注射を介した 10 μ g の S T I g M A - H i s 8 を用いて追加免疫した。単一のクローンを、E L I S A により S T I g M A (P R O 3 6 2) - H i s に対して選別した。スクリーニングしたクローンを、J A M ファミリーメンバーおよびヒト I g G F c に対して試験した。クローンを、単一の細胞密度まで滴定しそして再スクリーニングした。クローン 3 C 9 (I g G 1) を、S T I g M A に対して選択的に反応することを見出した。クローンを、腹水の産生のために使用し、そしてプロテイン G (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) 上に精製した；タンパク質の濃度を、P i e r c e B C A 試薬 (P i e r c e , R o c k f o r d , I L) を使用して決定した。

20

【0466】

ポリクローナル抗体を、ニュージーランドウサギに 150 μ g の S T I g M A - H i s を注射することにより産生した。血清の力価を、E L I S A により決定した。血清を、循環する I g G レベルのピークで回収し、そしてプロテイン A カラム上で精製した。

30

【0467】

(インサイチュハイブリダイゼーション)

P C R プライマー (上流 5' - T C T C T G T C T C C A A G C C C A C A G (配列番号 35) および下流 5' - C T T T G A G G A G T C T T T G A C C (配列番号 36)) を、h u J A M 4 の 700 b p のフラグメントを増幅するために設計した。プライマーは、増幅生成物に由来するセンスプローブまたはアンチセンスプローブ各々のインビトロ転写を可能にする T 7 R N A ポリメラーゼ開始点または T 3 R N A ポリメラーゼ開始点を含んだ。正常なヒト組織としては、扁桃腺、リンパ節、脾臓、腎臓、肺および心臓が挙げられた。慢性炎症疾患を伴う組織としては、慢性喘息、慢性気管支炎を伴う肺、慢性炎症および慢性 C 型肝炎感染による硬変を伴う肝臓が挙げられた。組織を、4%ホルマリン中で固定し、パラフィン包埋し、切り出し (3 ~ 5 μ m の厚さ)、脱パラフィンし、20 μ g / m l のプロテイン A を用いて脱タンパク質化し (37 °C で 15 分間)、そして他に記載されるとおりインサイチュハイブリダイゼーションのためにプロセスした。

40

【0468】

(免疫組織化学)

免疫組織化学染色を、D A K O A u t o s t a i n e r を使用して 5 μ m の厚さの凍結切片上で実施した。内在性のペルオキシダーゼ活性を、K i r k e g a a r d a n d P e r r y ブロッキング溶液 (1 : 10) によりブロッキングした (20 °C で 4 分間)

50

。TBS / 0.05% Tween - 20 中 10% の正常ヤギ血清 (NGS) を、希釈およびブロッキングに使用した。Mab 3C9 を、1 μ g/ml で使用した。スライドを、金属増強ジアミノベンジジン (Pierce Chemicals) を使用して現像した。切片の免疫蛍光染色のために、切片を、PBS / 10% NGS を用いてブロッキングし、そして 20 で 1 時間、mAb 3C9 と共にインキュベートした。FITC に対して結合化するウサギ - 抗マウス FITC 標識化二次抗体を、検出試薬として使用した。二重染色の手順のために、続いて切片を、ヒト CD68 に対する PE - 結合体化モノクローナル抗体を用いて染色した。

【0469】

(結果)

10

(ヒト STIgMA の分子クローニング)

HuSTIgMA を、ヒト JAM1 の保存された Ig ドメインを認識するディジェネレートプライマーを使用してヒト胎児 cDNA ライブラリーからクローン化した。いくつかのクローンの配列決定は、400 個のアミノ酸のオープンリーディングフレームを明らかにした。Blast 検索は、Z39 Ig (I 型膜貫通型タンパク質 (Langnaeseら、Biochim Biophys Acta 1492 (2000) 522 - 525) との類似性を確固たるものとした。STIgMA の細胞外領域を、2 個の Ig 様ドメイン (N 末端 V セットドメインおよび C 末端 C2 セットドメインを含む) から構成された。3' プライマーおよび 5' プライマーを使用して、STIgMA のスプライシング改変体 (短 STIgMA (膜近位の Ig C ドメインを欠き、そして 50 個のアミノ酸短い)) を、クローン化した。

20

【0470】

(マウスの STIgMA のクローニングおよびヒト STIgMA との配列比較)

マウスの発現された配列タグ (EST) のデータベースを、huSTIgMA (PRO362) の全長オープンリーディングフレームおよび tblastn アルゴリズムを使用して検索した。3 個のプライマーの DNA 配列決定は、280 個のアミノ酸の同一の完全オープンリーディングフレームを生じた。3 個のプライマー領域に対するプライマーを、マウスの脾臓のライブラリーに由来する全長の転写産物をクローン化するために使用した。このマウスのクローンは、huSTIgMA のスプライシングされた形態 (これは C 末端の Ig 様ドメインを欠いた) に類似していた。この細胞外 Ig V ドメインは、ヒトレセプターとマウスレセプターとの間で 93% の同一性を伴ってよく保存されていた。このマウスの細胞質ドメインは、ヒトの対応物よりも、20 アミノ酸分短い低い保存性であり、そして 40% 同一であった。

30

【0471】

(STIgMA は、多様な組織における常在マクロファージの一部上に発現し、そしてこの発現は、炎症において増加する)

huSTIgMA のノーザンプロット分析は、副腎、肺および胎盤において最も高い発現ならびに心臓、脊髄、甲状腺、乳腺およびリンパ節においてより低い発現を伴う 1.8 kb および 2.2 kb の二つの転写産物 (図 57) を示した。全ての組織において、この 2.2 kb の転写産物は、最も豊富に発現された転写産物であって、おそらく、STIgMA の長い形態をコードする。

40

【0472】

(TAQMANTM のリアルタイム PCR 分析)

STIgMA を発現する特定の細胞株を同定するために、リアルタイム定量的 PCR および N 末端 Ig ドメインに特異的なプライマー/プローブを、使用した。少ないが検出可能な mRNA の発現は、PMA で処理された骨髄性細胞株の HL-60 および単球株の THP-1 において見出された。発現は、B 細胞株および T 細胞株には存在しなかった (図 58A)。

【0473】

(STIgMA (PRO362) は、分化した単球上に発現する)

50

いつSTIgMAが、分化している単球/マクロファージに発現するかについて詳細を確立するために、出願人は、ヒトの自己の血清の存在下において分化誘導された非接着性の単球および接着性の単球におけるSTIgMA mRNAレベルを測定した。STIgMA mRNAレベルは、長時間をかけて徐々に増加し、そしてプレート培養の後7日で最高レベルに達した(図58B)。この分化段階において、mRNAレベルは、未分化の単球におけるmRNAレベルと比較して100倍高かった。

【0474】

単球/マクロファージの溶解物のウェスタンブロッティングは、STIgMAタンパク質発現(図58C)の増加、同時にSTIgMA mRNA発現の増加を示した。これは、マクロファージを形成するために単球が分化した場合、STIgMAが発現されたことを示している。48kDaのバンドおよび40kDaのバンドが、このプロット上に現れた。これは、おそらくヒトSTIgMAの長形態および短形態を示している。

10

【0475】

(STIgMA(PRO362)の分子的な特徴付け)

STIgMAを、還元条件および非還元条件下において同様に移動した。これはSTIgMAが、モノマーとして発現したことを示している(図59A)。STIgMAが、PNGase Fを使用して脱グリコシル化された場合、移動パターンにわずかな変化のみが、観察された。これは、些細なN-グリコシル化を示している。STIgMAは、ペルバナデイト(per vanadate)を用いて処理された場合、リン酸化されたSTIgMA過剰発現細胞が、(図59B)。リン酸化されたSTIgMAは、わずかに大きい分子量のタンパク質(55kDa)と同じように移動した。ヒトHEK293細胞において、チロシン-リン酸化STIgMA細胞内ドメインは、Sykキナーゼを補充しない(結果は示さず)。

20

【0476】

(末梢血の単球上におけるSTIgMA発現のフローサイトメトリー分析)

循環白血球におけるSTIgMAの発現パターンを決定するために、フローサイトメトリー分析を、ALEXATM 488に直接的に結合体化したモノクローナル抗ヒトSTIgMA抗体3C9を使用して、健康なドナーに由来する血液から単離されたリンパ球で実施した。対染色を、いくつかの免疫細胞の表面抗原に対するPE結合抗体を用いて実施した。STIgMAは、全ての白血球(B細胞-T細胞-Nk細胞、単球および顆粒球を含有する)の表面上で非存在であった(図60)。STIgMAはしかし、マクロファージの分化培地において7日間培養された単球上に発現した。

30

【0477】

(単球におけるSTIgMA発現の調節)

STIgMAの発現の調節を研究するために、7日目のマクロファージを、種々の前炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの存在下において培養し、そしてSTIgMA発現レベルを、リアルタイムPCRまたはフロー分析により測定した。STIgMA mRNAの発現は、IL-10およびTGF- β を用いた2日間のマクロファージの処理後増加し、そしてIL-4、IL-13およびLPSによりダウンレギュレートされた(図61A)。デキサメタゾンを用いた処理は、コントロールの未処理のマクロファージと比較して5倍発現を増加させた。細胞表面に発現されたSTIgMAの調節を測定するために、フローサイトメトリーを、種々のサイトカインおよびデキサメタゾンを用いて5日間処理した末梢血単球で実施した。STIgMAを、ALEXATM 488に結合体化したモノクローナル抗体クローン3C9を使用して検出した。細胞を、抗CD-14抗体を用いて同時染色した。STIgMAの表面の増加した発現が、IL-10およびLPSを用いた5日間の単球処理の後見出された(図61B)。表面のSTIgMAの発現の劇的な増加は、デキサメタゾンを用いた処理後見出された。

40

【0478】

(STIgMAの部分細胞の分布)

STIgMAの部分細胞の分布を研究するために、MDMを、15日間培養内に保持し

50

、その後固定し、そして、モノクローナル抗体（クローン 3 C 9）またはポリクローナルウサギ抗体 4 F 7、続いて F I T C 結合体化二次抗体および P E 標識化抗 C D 6 3 抗体を用いて染色した。共焦点顕微鏡観察は、核周囲の細胞質における S T I g M A の高発現（リソソーム膜タンパク質 C D 6 3 の発現と重なる）を示した（図 6 3 A , B）。S T I g M A はまた、先端および後端のマクローファージにおいて発現され、この染色パターンは、C D 6 3 の染色パターンとは重なっていなかった。

【 0 4 7 9 】

（正常組織および疾患組織における S T I g M A の発現）

組織常在のマクローファージにおける S T I g M A の発現および慢性炎症疾患を有する組織における S T I g M A の発現の変化を、研究した。インサイチュハイブリダイゼーションを使用して、S T I g M A の m R N A の発現を、パラホルムアルデヒド固定したヒト組織のパネル上で決定した。高い発現レベルが、肺炎または慢性の喘息患者の肺の剖検から得られた肺胞のマクローファージにおいて見出された（図 6 3 A - D）。m R N A の高発現が、慢性肝炎患者の肝臓におけるクッパー細胞に見出された（図 6 3 E , F）。

10

【 0 4 8 0 】

これまでの研究（Walker, Biochimica et Biophysica Acta 1574 (2002) 387-390）において、およびライブラリーのインターネットのスクリーニングにおいて、S T I g M A m R N A の高発現が、リウマチ様関節炎患者の滑膜に見出された。従って、リウマチ様関節炎、変形性関節症および変性性疾患の患者から得られた滑膜における S T I g M A の発現パターンを、研究した。S T I g M A m R N A の高発現は、変形性関節症の患者から得られた滑膜細胞に見出された（図 6 4 A - D）。表層の滑膜細胞は、S T I g M A の高発現を有した（図 6 4 D）。さらに、ポリクローナル抗体 6 F 1 を、リウマチ様関節炎の患者から得られたヒト滑膜の凍結切片における S T I g M A の発現の研究に使用した。S T I g M A は、滑膜細胞の一部において発現し（20% ~ 40%）、そして滑膜における組織マクローファージにおいて発現した（図 6 5 A - C）。これら細胞は多くの場合、A 型マクローファージ様滑膜細胞であった。染色は、コントロールの滑膜には存在しなかった（図 6 5 D）。

20

【 0 4 8 1 】

S T I g M A タンパク質の発現が、多数の異なる組織におけるマクローファージに見出された。S T I g M A が安定して発現している C H O 細胞から調製された凍結切片は、S T I g M A の膜局在を示す（図 6 6 A）。S T I g M A タンパク質は肺胞のマクローファージ（図 6 6 B）、小腸の粘膜固有層における組織球（図 6 6 C）、胎盤のホーフバウアー細胞（図 6 6 D）、副腎におけるマクローファージ（図 6 6 E）および肝臓におけるクッパー細胞（図 6 6 F）に見出された。

30

【 0 4 8 2 】

アテローム硬化症のプラークは、多数のマクローファージまたはマクローファージ形態の細胞（大動脈の管腔壁にしっかりと接着する）を含んだ。マクローファージ - 内皮接着における S T I g M A の役割を考慮して、アテローム硬化症のプラークにおける S T I g M A の発現を、研究した。プラークの連続切片を、抗 C D 6 3（図 6 7 A および B）または抗 S T I g M A（図 6 7 C および D）を用いて染色した。抗 C D 6 3 および抗 S T I g M A の部分的に重なり合う染色パターンが、血管壁を並べる泡沫細胞に見出され、このことはアテローム硬化症における S T I g M A の役割を示す。

40

【 0 4 8 3 】

S T I g M A が、マクローファージに選択的に発現されたか否かを決定するために、免疫蛍光の二重染色を、心臓の間隙性マクローファージで実施した（図 6 8）。オーバーレイに示されるとおり（図 6 8 C）、S T I g M A にポジティブのほとんどの間隙性マクローファージはまた、C D 6 8 に対してポジティブであった。全ての C D 6 8 ポジティブマクローファージが、S T I g M A に対してポジティブではなかった。このことは、後者が、組織常在のマクローファージの一部に特異的であったことを示す。

【 0 4 8 4 】

50

炎症性腸疾患 (I B D) 症候群における m R N A の発現レベルを量的に測定するために、m R N A を、潰瘍性大腸炎、クローン病の患者から、または I B D の発現のない患者から得た結腸組織から抽出した。リアルタイム P C R を、相対的な発現レベルを測定するために、S T I g M A に特異的なプライマーを使用して実施した。発現レベルは、コントロール組織と比較した場合、潰瘍性大腸炎患者において 1 6 倍高く、そしてクローン病患者において 5 倍高かった (図 6 9 A) 。同様に、相対的な R N A 等量が、肺組織において決定され、これは慢性的な閉塞性肺疾患 (C O P D) の患者に由来する組織において最大であることが見出され (正常の 1 4 倍を越える) 、そして喘息の患者においては正常と有意に異なることはなかった (図 6 9 B) 。

【 0 4 8 5 】

I g スーパーファミリーの分子が、細胞表面の認識および細胞 - 細胞接着を媒介することは周知である。S T I g M A 発現は、血管に並ぶ間隙性マクロファージにおいて高かったため、マクロファージ - 内皮細胞の接着への S T I g M A の関与を、研究した。全長 S T I g M A - 長を用いて安定してトランスフェクトしたジャーカット細胞株 (図 7 0 A) を、蛍光色素 B C E C F を用いて負荷し、そして 9 6 ウェルの m a x i s o r b プレート (単層の H U V E C 細胞が、培養された) のウェルに添加した。接着を、3 回の穏やかな洗浄の後、保持された蛍光の量により測定した。S T I g M A を発現するジャーカット細胞は、コントロールのプラスミドを安定してトランスフェクトしたジャーカット細胞と比較した場合、コントロール内皮および T N F 刺激された内皮の両者に、より多く接着した (図 7 0 B) 。

【 0 4 8 6 】

(考察)

この研究は、最初に新規 I g スーパーファミリーメンバーの S T I g M A / Z 3 9 I g の組織分布、発現調節および分子的な特徴付けを記載し、そして組織常在のマクロファージにおけるその選択的な発現を確認した。

【 0 4 8 7 】

S T I g M A の発現は、常在マクロファージに見出され、この常在マクロファージは、完全に分化した表現型を有した。S T I g M A の発現は、慢性炎様、リウマチ様関節炎および炎症性腸疾患を伴う組織において増加した。これらの疾患 (多くの場合、T h 2 型疾患として特徴付けられた) における S T I g M A 発現の増加は、インビトロにおける T h 2 サイトカインによる S T I g M A の発現調節を伴う系であり得る。この増加した発現が、S T I g M A ポジティブマクロファージの増加した存在によるものであるのかまたは炎症性マクロファージにおける増加した発現によるものであるのかは、まだ決定されていない。

【 0 4 8 8 】

S T I g M A は、ヒトマクロファージの一つのエフェクター機能を媒介し得、このエフェクター機能としては、細菌の認識、食作用、抗原提示およびサイトカインの放出が挙げられる。しかし今までのところ、任意のこれらプロセスにおける S T I g M A の役割について証拠が、見出されなかった。S T I g M A は、その細胞質ドメインに 3 つのチロシン残基を含み、このチロシン残基は、チロシンキナーゼによりリン酸化され得る。従って S T I g M A は、レセプターとして機能し得る。これまでに、S T I g M A に対するリガンドは見出されなかった。

【 0 4 8 9 】

これらの結果は、血管の内皮細胞壁へのマクロファージの接着およびおそらく移動性における S T I g M A の役割を示した。

【 0 4 9 0 】

S T I g M A 発現は、非微生物の炎症性疾患様の潰瘍性大腸炎および慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) において増加したが、L P S または他の細菌性細胞壁の構成要素様のリポタイコ酸および細菌性リポタンパク質で処理された単離マクロファージにおいてはダウンレギュレートされた。L P S による長期の処理 (2 日間を越える) は、S T I g M A の発現

10

20

30

40

50

の増加を引き起こした。これは、L P S 刺激されたマクロファージにより分泌された I L - 1 0 の自己分泌作用によるものであり得た。S T I g M A の著しいアップレギュレーション (m R N A レベルおよびタンパク質レベルの両方で) は、デキサメタゾンによる単球またはマクロファージの処理において観察された。わずかな単球 / マクロファージの表面レセプターは、デキサメタゾン処理を受けた発現において増加することが見出された。一つの例が、C D 1 6 3 であるが、デキサメタゾンにより誘導された C D 1 6 3 は、著しく少ない。抗炎症性サイトカイン I L 1 0 および T G F による S T I g M A のアップレギュレーションは、かなり興味深いものであった。これは S T I g M A が、グルココルチコステロイドの抗炎症性の役割を媒介し得ることを示す。

【 0 4 9 1 】

本明細書中に記載されるとおり、S T I g M A は、C D 6 8 ポジティブマクロファージの一部に発現された。これは活性化マクロファージを示し得る。S T I g M A および S T I g M A - F c 融合タンパク質に対するブロック抗体および活性化抗体を使用して、マクロファージのエフェクター機能、接着および移動における S T I g M A の役割ならびに慢性炎症疾患における S T I g M A の役割を調べ、そして実施例 2 5 に記載する。

【 0 4 9 2 】

わずかな細胞表面マーカーのみが、分化したマクロファージに特異的に発現された (C D 6 8 および C D 1 6 3)。C D 6 8 は、全てのヒトマクロファージ群に明白に発現したが、この抗原はまた、他の骨髄性細胞およびまた特定の非骨髄性細胞に検出され得た。従って、S T I g M A は、間隙性の成熟マクロファージの一部に選択的に発現した第一の細胞表面抗原を示した。

【 0 4 9 3 】

(実施例 2 5)

(D B A - 1 J マウスのコラーゲン誘導関節炎 (C I A) における S T I g M A 融合タンパク質)

この実験は、疾患の発生および C I A (コラーゲン誘導関節炎、リウマチ様関節炎の実験動物モデル系) の進行におけるコントロールのマウス I g G 1 と S T I g M A 融合タンパク質とを比較することを目的とした。

【 0 4 9 4 】

実施例 2 4 において議論したように、S T I g M A は、マクロファージの一部上に高くかつ特異的に発現し、そして慢性炎を伴う組織においては増加する。マウス S T I g M A は、コラーゲン誘導関節炎のマウスの炎症した関節におけるマクロファージおよび滑膜に高発現する。インビトロにおける研究は、S T I g M A が、内皮に対するマクロファージの接着に関与することを示した。S T I g M A - F c 融合タンパク質は、自己免疫性疾患の過程に影響を及ぼし、この場合マウスにおけるコラーゲン誘導関節炎は、組織のマクロファージの特性に影響をおよぼすか、または他の細胞 (例えば、T 細胞、B 細胞、上皮細胞、内皮細胞) の免疫反応に影響をおよぼすことによる。これは、関節における炎症、腫脹および長期の骨侵食の緩和を生じ得る。

動物モデル種 : マウス

系統 : D A B - 1 J

業者 : J A C K S O N

年齢幅 : 7 ~ 8 週齢

痛みのカテゴリ : 3 - これらの手順は、わずかなもしくは一過的な痛みおよび / または苦痛を生じるだけでなく、この研究に悪影響を与えることなく麻酔薬、鎮痛剤または精神安定剤を使用しては実施し得ない。

【 0 4 9 5 】

このマウスは、C I A の研究のための種として選ばれた。なぜならば C I A は、ヒト R A (リウマチ様関節炎) と類似した臨床的特徴および病理学的特徴を伴う炎症性の多発関節炎である。この動物モデルは、多くの研究所により使用され、C I A の組織病理学は、滑膜の増殖を伴う R A (パンヌス形成、軟骨の変質 / 破壊および後に関節の変形を伴う辺

10

20

30

40

50

縁の骨の侵食まで進行する)において見られる組織病理学に類似している。またマウスは、系統発生的に最も低い哺乳類である。

【0496】

また、複雑な、多因子性のRA(リウマチ様関節炎)の病原を模倣するために利用可能なインビトロのモデルは存在しない。

【0497】

(実験設計)

(処置群)

1)7週間にわたり1週間あたり3回、皮下(SC)に200 μ l生理食塩水中のmIgG1アイソタイプ(6mg/kg)(n=8)。

10

【0498】

2)7週間にわたり1週間あたり3回、SCの100 μ l生理食塩水中にmuSTIGMA(PRO362)4mg/kg(n=8)。

【0499】

マウスを、CFS(Difco)に乳化したウシCII(100 μ g, Sigma, St Louis)により皮膚間を介して免疫化した。マウスを、21日後にIFA(Difco)中CIIを用いて追加免疫した。開始から24日目に、マウスの一つの群(n=7)は、6週間にわたり1週間あたり3回、100 μ gのmuSTIGMA(PRO362)Fcが与えられ、そして第二の群(n=8)は、コントロールとして100 μ gのマウスIgG1を受けた。マウスを、関節の炎症の兆候について毎日調べ、そして以下のとおり評点された:0、正常;1、足根関節に限定された紅斑および軽い腫脹;2、足根関節から中足骨関節および中手骨関節にまで及ぶ紅斑および軽い腫脹;3、足根関節から中足骨関節または中手骨関節にまで及ぶ紅斑および中程度の腫脹。4、足根関節から指にまで及ぶ紅斑および重症の腫脹。足につき関節炎の最大のスコアは、4であり、そしてマウスにつき最大のスコアは、16であった(図71)。

20

【0500】

全てのマウスを、0日目に100 μ lのフロイント完全アジュバント(CFA)中100 μ gのウシII型コラーゲンにより免疫化した。CFA中のII型コラーゲンを、尾の基部の右側に皮膚間を介して注射した。21日目に、100 μ lのフロイント不完全アジュバント中100 μ gのウシII型コラーゲンによる二回目の免疫化を、尾の左側に皮膚間を介して与えた。動物を、調査スタッフにより毎日チェックした(M-F)。ネストレット(Nestlet)を、富化装置として、および動物に余分なパディングを与えるために使用した。必要な場合、湿らせた食物を、ケージの底に提供した。衰弱した動物は、獣医スタッフによる診察後に屠殺された。Terminal faxitron X-RayおよびマイクロCTを、研究の終わりに使用し、そして関節の損傷/侵食を、評価した。さらに、動物を、処置前および終了時に計量した。

30

【0501】

研究の35日目および終結時に、グループ1~8のマウスを、血清pKのため、および抗II型コラーゲン抗体の力価を決定するために採血した(100 μ lの眼窩の採血)。

【0502】

70日目に全てのマウスを、終末ヘモグラム、差次的白血球計数および血清pK(G3)の評価のために3%イソフルランの下、最終的に心臓内採血した。

40

【0503】

このマウスを、関節炎の誘導後70日で安楽死させた。全ての四肢を、X線写真、5CTおよび組織病理学のために収集した。

【0504】

(動物の収容および食事)

綿パッドおよび湿らせた飼料を、飼料に近付くことを促すためにおよび快適性のためにケージの床に提供した。

【0505】

50

(拘束のために使用された薬物)

作用させるためのイソフルレン - 吸息

(安楽死の方法:) 麻酔下で心臓の穿刺(経皮的)による失血

作用させるためのイソフルレン - 吸息

(結果)

コラーゲン誘導関節炎マウス(リウマチ様関節炎の動物モデル)へのSTIgMA融合タンパク質、muSTIgMA-Fcの全身性の注射は、IgG1を受けたコントロール群のマウス(円)に対するSTIgMA融合タンパク質を受けた試験群のマウス(四角)におけるCIAの進行に有意な(図71を参照のこと: p値=0.0004)減少を示した。

10

【0506】

(物質の寄託)

以下の物質は、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA(ATCC)により寄託された。

【0507】

【表7】

名称	ATCC寄託番号	寄託日
pRK5-ベースのプラスミド DNA40628-1216	209432	1997年11月7日
DNA45416-1251	209620	1998年2月5日
DNA35638-1141	209265	1997年9月16日
DNA77624-2515	203553	1998年12月22日

20

これら寄託は、the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty)の条項の下、行われた。これは、寄託の日から30年間、寄託物の実行可能な培養の維持を保障する。この寄託物を、Budapest Treatyの規約の下、およびGenentech, Inc.とATCCとの間の同意に従いATCCにより利用可能にする。これは、国民に、適切な米国特許の発行または米国特許出願もしくは外国の特許出願のいずれかの公表により寄託の培養の子孫の永久のかつ非制限的な利用可能性を保障し、そして35 USC '122およびこれに準拠する委員会規則(8860G638への特定の言及を伴う37CFRセクション1.14を含有する)に従って権利を付与されることが米国特許商標局長官により決定された寄託物の培養の子孫の利用可能性を保障する。

30

【0508】

本出願の譲受人は、寄託における培養の物質が、死ぬかまたは失われるかもしくは破壊された場合(適切な条件の下で培養された時)、この物質は、別の同じ物質による届出により直ちに交換されることに同意した。寄託物質の利用可能性は、その国の特許法に従い、いずれかの政府の当局により付与された権利に違反して本発明を実施するための許可証として解釈されるべきではない。

40

【0509】

前述の明細書は、当業者が本発明を実施し得る程度に十分なものであるとみなされる。本発明は、寄託された構築物により範囲が限定されるべきではない。なぜならばこの寄託された実施形態は、本発明の特定の局面の一つの例として意図され、そして機能的に等価である任意の構築物は、本発明の範囲内である。本明細書中の物質の寄託は、それは本明

50

細書中に含まれる書面による明細は、本発明の任意の局面（本発明の最良形態を含有する）の実施を可能とするには十分ではなく、そして特許請求の範囲を特定の例（その範囲が示す）に限定するものとして解釈されることの承認を構成しない。実際、本明細書中に示され、そして記載された改変体に加え本発明の種々の改変体は、前述の記載から当業者に明白となり、そして添付された特許請求の範囲内に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0510】

【図1A】図1は、A33抗原（配列番号6）と、DNA40628（配列番号1）と、DNA45416（配列番号2）と、DNA35638（配列番号9）と、JAM（配列番号10）とによってコードされるポリペプチドの間での比較を示す。

10

【図1B】図1は、A33抗原（配列番号6）と、DNA40628（配列番号1）と、DNA45416（配列番号2）と、DNA35638（配列番号9）と、JAM（配列番号10）とによってコードされるポリペプチドの間での比較を示す。

【図2】図2は、ネイティブ配列PRO301ポリペプチドに由来するアミノ酸配列（配列番号1）を示す。このポリペプチドは、299アミノ酸長であり、残基1～27に単一配列を、残基28～約235に細胞外ドメインを、残基94～235にIgスーパーファミリー相同性を、残基236～約258に潜在的膜貫通ドメインを、そして約残基259～299に細胞内ドメインを有する。

【図3】図3は、図6Aおよび6B（DNA45416、配列番号7）に示されたヌクレオチド配列のヌクレオチド119～1081に由来するアミノ酸配列（配列番号2）を示す。図3に下線で示されているのはまた、グリコサミノグリカン（glycosaminoglycan）部位および膜貫通ドメインの位置である。

20

【図4A-B】図4Aは、コンセンサスアセンブリDNA35936（配列番号3）を示し、そして図4Bは、consen01（配列番号4）を示す。これらの両方は、DNA40628（配列番号11）の単離に用いられる。

【図4C】図4Cは、consen02（DNA42257）（配列番号5）を示す。これは、DNA45416（配列番号7）の単離に用いられる。

【図5】図5は、ネイティブ配列DNA40628 cDNA（配列番号11）のヌクレオチド配列を示す。これは、「UNQ264」および/もしくは「DNA40628-1216」としても規定されたネイティブ配列PRO301 cDNAである。

30

【図6A】図6Aおよび図6Bは、ヌクレオチド配列DNA45416（配列番号7）を示す。これは、「UNQ317」および/もしくは「DNA45416-1251」としても規定されたネイティブ配列PRO362 cDNAである。開始メチオニンおよび全長PRO362ポリペプチド（配列番号2）のタンパク質翻訳を、また示す。

【図6B】図6Aおよび図6Bは、ヌクレオチド配列DNA45416（配列番号7）を示す。これは、「UNQ317」および/もしくは「DNA45416-1251」としても規定されたネイティブ配列PRO362 cDNAである。開始メチオニンおよび全長PRO362ポリペプチド（配列番号2）のタンパク質翻訳を、また示す。

【図7】図7は、ネイティブ配列PRO245 cDNAのヌクレオチド配列（配列番号8）を示す。ここで、このヌクレオチド配列は、「UNQ219」および/もしくは「DNA35638」としても規定される。

40

【図8】図8は、オリゴヌクレオチド配列OLI2162（35936.f1）（配列番号12）、OLI2163（35936.p1）（配列番号13）、OLI2164（35936.f2）（配列番号14）、OLI2165（35936.r1）（配列番号15）、OLI2166（35936.f3）（配列番号16）、OLI2167（35936.r2）（配列番号17）を示す。これらは、DNA40628の単離に用いられる。

【図9A】図9Aおよび図9Bは、5個のオリゴヌクレオチドプライマーの配置とともに（下線で示される）、DNA42257（consen02）（配列番号5）の二本鎖表現を示す。これらは、全てDNA45416（配列番号7）の単離に使用される。図示さ

50

れるオリゴヌクレオチドは、以下である：4 2 2 5 7 . f 1 (配列番号 1 8)、4 2 2 5 7 . f 2 (配列番号 1 9)、4 2 2 5 7 . r 1 (配列番号 2 0)、4 2 2 5 7 . r 2 (配列番号 2 1)、および 4 2 2 5 7 . p 1 (配列番号 2 2)。

【図 9 B】図 9 A および図 9 B は、5 個のオリゴヌクレオチドプライマーの配置とともに (下線で示される)、DNA 4 2 2 5 7 (c o n s e n 0 2) (配列番号 5) の二本鎖表現を示す。これらは、全て DNA 4 5 4 1 6 (配列番号 7) の単離に使用される。図示されるオリゴヌクレオチドは、以下である：4 2 2 5 7 . f 1 (配列番号 1 8)、4 2 2 5 7 . f 2 (配列番号 1 9)、4 2 2 5 7 . r 1 (配列番号 2 0)、4 2 2 5 7 . r 2 (配列番号 2 1)、および 4 2 2 5 7 . p 1 (配列番号 2 2)。

【図 1 0 A】図 1 0 A および図 1 0 B は、2 つの重なったフラグメント、DNA 4 0 6 2 8 と A 3 3 H U M A N (ヒト A 3 3 抗原前駆体) との間の、B l a s t スコア、マッチおよびパーセント同一性アラインメントを示す。それぞれ、図 1 0 A は、DNA 4 0 6 2 8 (配列番号 2 3) のコードされた残基 2 4 ~ 2 8 3 と、A 3 3 H U M A N (配列番号 2 4) のコードされた残基 1 7 ~ 2 8 4 とを比較し、図 1 0 B は、DNA 4 0 6 2 8 (配列番号 2 5) のコードされた残基 2 1 ~ 2 3 9 と、A 3 3 H U M A N (配列番号 2 6) のコードされた残基とを比較する。

【図 1 0 B】図 1 0 A および図 1 0 B は、2 つの重なったフラグメント、DNA 4 0 6 2 8 と A 3 3 H U M A N (ヒト A 3 3 抗原前駆体) との間の、B l a s t スコア、マッチおよびパーセント同一性アラインメントを示す。それぞれ、図 1 0 A は、DNA 4 0 6 2 8 (配列番号 2 3) のコードされた残基 2 4 ~ 2 8 3 と、A 3 3 H U M A N (配列番号 2 4) のコードされた残基 1 7 ~ 2 8 4 とを比較し、図 1 0 B は、DNA 4 0 6 2 8 (配列番号 2 5) のコードされた残基 2 1 ~ 2 3 9 と、A 3 3 H U M A N (配列番号 2 6) のコードされた残基とを比較する。

【図 1 1】図 1 1 は、図 7 (DNA 3 5 6 3 8 、配列番号 8) のヌクレオチド配列によってコードされるネイティブ配列 P R O 2 4 5 ポリペプチド (配列番号 9) に由来するアミノ酸配列を示す。このポリペプチドは、長さ 3 1 2 アミノ酸であり、残基 1 ~ 2 8 に単一配列を、そして約残基 2 3 7 ~ 約 2 5 9 に潜在的膜貫通ドメインを有する。

【図 1 2】図 1 2 は、DNA 4 0 6 2 8 (配列番号 1) によってコードされるアミノ酸配列と A 3 3 抗原 (配列番号 6) によってコードされるアミノ酸配列との間に、2 5 . 3 % の同一性を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、DNA 4 5 4 1 6 (配列番号 2) によってコードされるアミノ酸配列と A 3 3 抗原 (配列番号 6) によってコードされるアミノ酸配列との間に、2 0 . 8 % の同一性を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、DNA 3 5 6 3 8 (配列番号 9) によってコードされるアミノ酸配列と A 3 3 抗原 (配列番号 6) によってコードされるアミノ酸配列との間に、2 4 . 3 % の同一性を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、DNA 4 0 6 2 8 (配列番号 1) によってコードされるアミノ酸配列と J A M (配列番号 1 0) によってコードされるアミノ酸配列との間に、6 7 . 6 % の同一性を示す。

【図 1 6】図 1 6 は、DNA 4 5 4 1 6 (配列番号 2) によってコードされるアミノ酸配列と J A M (配列番号 1 0) によってコードされるアミノ酸配列との間に、2 3 . 3 % の同一性を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、DNA 3 5 6 3 8 (配列番号 2 9) によってコードされるアミノ酸配列と J A M (配列番号 1 0) によってコードされるアミノ酸配列との間に、3 4 . 2 % の同一性を示す。

【図 1 8】図 1 8 は、A 3 3 抗原 (配列番号 6) によってコードされるアミノ酸配列と J A M (配列番号 1 0) によってコードされるアミノ酸配列との間に、2 6 % の同一性を示す。

【図 1 9】図 1 9 は、実施例 8 に記載されるドットプロットハイブリダイゼーション法の結果を示す。

【図20】図20は、実施例9に記載されるT A Q M A N^{T M} mRNA発現アッセイの結果を示す。

【図21】図21は、実施例7に記載されるような、DNA40628によってコードされるタンパク質の、ヒト好中球への結合を示す。

【図22】図22は、PRO1868のアミノ酸配列(配列番号31)を示す。ここで、逆三角は、推定上の単一切断部位を表し、丸は、保存細胞外シスチンを表し、膜貫通ドメインは、下線を引かれ、そして点線の付加は、潜在的なN-グリコシル化部位を表す。このポリペプチドは、長さ310アミノ酸であり、残基1~30に単一配列を、そして約残基242~約266に潜在的膜貫通ドメインを有する。

【図23】図23は、マウス肝臓凍結切片における、PRO362のインサイチュハイブリダイゼーションを示す。 10

【図24】図24は、ヒト肝臓凍結切片における、PRO362のインサイチュハイブリダイゼーションを示す。

【図25】図25は、活性化された肺胞マクロファージおよびクップファー細胞における、PRO362のインサイチュハイブリダイゼーションを示す。

【図26】図26は、胎盤ホーフバウアー細胞における、PRO362 mRNAのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。

【図27】図27は、A型滑膜細胞における、PRO362 mRNAのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。

【図28】図28は、脳の小グリア細胞における、PRO362 mRNAのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。 20

【図29】図29は、ヒト喘息組織からの細胞における、PRO362 mRNAのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。

【図30】図30は、慢性肝炎組織からの細胞における、PRO362 mRNAのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。

【図31】図31は、正常ヒト組織のリンパ節細胞および扁桃高内皮性細静脈(HEV)細胞における、PRO245 mRNAのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。

【図32】図32は、炎症性および正常なヒト肺組織の細動脈内皮においての、ならびに精巣の正常輸精管における精子形成細胞においての、PRO245 mRNAのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。 30

【図33】図33は、ヒト睾丸癌組織、肺癌組織、および乳癌組織における、PRO245 mRNAのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。

【図34】図34は、ヒト乳癌における、PRO245 mRNAのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。

【図35】図35は、マクロファージにおける、PRO362の免疫組織化学的分析を示す。

【図36】図36は、クップファー細胞における、PRO362の免疫組織化学的分析を示す。

【図37】図37は、小グリア細胞における、PRO362の免疫組織化学的分析を示す。 40

【図38】図38は、ホーフバウアー細胞ににおける、PRO362の免疫組織化学的分析を示す。

【図39】図39は、T細胞J45株およびMolt4株、ならびにB細胞JY株、RPMI8866株およびRAMOS株における、逆転写酵素PCR(RT-PCR)によって検出された、PRO1868 mRNAのSDS-PAGE分析を示す。

【図40】図40は、細胞溶解性T細胞、NK-T細胞およびNK細胞によるPRO245結合をまとめた模式図を示す。

【図41】図41は、NK(CD56+)細胞とPRO245-Fc融合タンパク質との間の結合についての、フローサイトメトリーの結果を示す。

【図42】図42は、末梢血液樹状細胞細胞(PBDCs)とPRO245-Fc融合タ 50

ンパク質との間の結合についての、フローサイトメトリーの結果を示す。

【図43】図43は、J45 T細胞とPRO245-Fc融合タンパク質との間の結合についての、フローサイトメトリーの結果を表すグラフを示す。

【図44】図44は、J45 T細胞とPRO245-Fc融合タンパク質との間の結合についての、フローサイトメトリーの結果を示す。

【図45】図45は、過剰Hisタグ化-PRO1868の、PRO245-Fc融合タンパク質へのJ45細胞の付着をブロックする能力を示す、フローサイトメトリーの結果のグラフを示す。

【図46】図46は、NK(CD56+)細胞へのPRO245-Fc融合タンパク質をブロックする能力についての、フローサイトメトリーの結果を示す。

10

【図47】図47は、種々の濃度のPRO245でコーティングされたウェルへの、標識J45細胞のパーセント付着を表すグラフを示す。

【図48】図48は、Fcが交差結合したPRO245-Fc融合プロテインAマトリックスへの、ビオチン化J45細胞の免疫沈降を示す。

【図49】図49は、PRO245-Fc融合タンパク質が交差結合したプロテインAマトリックスを用いた、J45細胞およびPBMC細胞からのPRO1868の免疫沈降を示す。

【図50】図50は、PRO1868でコーティングされたウェルへのビオチン化PRO245の結合を表すグラフを示す。

【図51】図51は、PRO245-Fcでコーティングされたウェルへのビオチン化PRO1868の結合を表すグラフを示す。

20

【図52】図52は、抗PRO1868抗体による、PRO245-Fc融合タンパク質へのJ45細胞の付着の阻害を表すデータを示す。データは、3つの異なる実験を表す；エラーバーは、n=6でのSDを表す。

【図53】図53は、6xHisタグ化PRO1868タンパク質の、CD56+NK細胞とPRO245-Fc融合タンパク質との間の結合と競合する能力を示すフローサイトメトリーの結果を示す。

【図54】図54は、種々の条件下での、PRO245発現CHO細胞へのPRO1868の結合を示す。

【図55】図55は、PRO245発現CHO細胞(CuL8r)への抗PRO1868抗体の特異的結合を示す。

30

【図56】図56は、ヒトSTIGMA(hSTIGMA；配列番号32)およびヒトSTIGMA short(hSTIGMA short；配列番号33)のアミノ酸配列、ならびにマウスSTIGMA(配列番号34)とのアラインメントを示す。疎水性リーダ配列、膜貫通領域、および潜在的N-連結グリコシル化部位が示される。ヒトSTIGMA遺伝子のエキソン-イントロン境界から推定される、Igドメイン境界が示される。

【図57】胎盤、肺、心臓、肝臓、および副腎でのヒトSTIGMA発現を示すノザンブロット分析(A)。ヒト組織が発現するSTIGMAには、1.5kbおよび1.8kbの2つの転写物が存在した。

40

【図58】(A)骨髄単球細胞株HL60およびTHP-1ならびに分化したマクロファージにおける、ヒトSTIGMAの発現増加を示すTAQMANTM PCR分析。低レベルの発現が、ジャーカット細胞株、MOLT3株、MOLT4株、およびRAMOS B-細胞株において見られた。(B)インビトロでの単球分化の間での、STIGMA mRNAの発現増加。ヒト末梢血液から単離された単球を、7日間にわたるプラスチックへの付着によって分化させた。全RNAを、分化の異なる時点で抽出した。(C)単球からマクロファージへの分化の間での、STIGMAタンパク質の発現増加。単球を(B)に示したように処理し、全細胞溶解物をゲルに流し、ニトロセルロース膜へと移した。この膜を、ヒトSTIGMAへのポリクローナル抗体(4F7)とともにインキュベートした。このポリクローナル抗体は、48kDaバンドおよび38kDaバンド(おそ

50

らく、STIgMAのlongの形態とshortの形態とを表す)を認識した。

【図59】細胞株における、huSTIgMAタンパク質の分子的特徴化。(A)HuSTIgMA-gdを、293E細胞において一過性に発現させ、抗gdとともに免疫沈降し、そしてプロットを、抗gdもしくはSTIgMAの細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体とともにインキュベートした。(B)293細胞で発現されるhuSTIgMAは、単量体N-グリコシル化タンパク質である。STIgMAは、ナトリウム浸透気化法によるHEK293細胞の処理でチロシンリン酸化されるが、Sykキナーゼを補充しない。リン酸化STIgMAは、非リン酸化STIgMAと比較して、わずかに大きい分子量に移動した。

【図60】ヒト単球由来マクロファージにおける、STIgMAの選択的発現。末梢血液単核細胞を、B細胞、T細胞、NK細胞、単球に特異的な抗体、およびSTIgMAに対するモノクローナル抗体(3C9)に結合されたALEXA^TM A488で染色した。末梢血液白血球の全ておよび単球由来樹状細胞では、発現がなかったが、インビトロで分化されたマクロファージでは、発現があった。

【図61A】STIgMAのmRNAおよびタンパク質の発現は、IL-10およびデキサメタゾンによって増加した。(A)リアルタイムPCRは、IL-10、TGFBでの処理に続くSTIgMA mRNAの発現増加を示し、そしてSTIgMA mRNAの発現増加が、デキサメタゾンによって強く誘導され、しかしLPS、IFN、およびTNFでの処理によってダウンレギュレートされたことを示す。

【図61B】STIgMAのmRNAおよびタンパク質の発現は、IL-10およびデキサメタゾンによって増加した。B)Ficollで分離した末梢血液単核細胞を、種々のサイトカインおよびデキサメタゾンによって、5日間処理し、抗CD14および抗STIgMAによって、二重染色した。フロー分析は、デキサメタゾンによって処理された、およびIL-10およびLPSによって処理された後の単球表面における、STIgMA発現の劇的な増加を示した。

【図62】単球由来マクロファージにおける、STIgMAの細胞下配置。単球を、マクロファージ分化培地中で7日間培養し、アセトンで固定し、ポリクローナル抗STIgMA抗体6F1もしくはCD63、および二次ヤギ抗ウサギFITCで染色した。細胞を、共焦点顕微鏡で調べた。STIgMAは、細胞質内に見出され、リソソーム膜タンパク質CD63とともに共局在する。STIgMAはまた、マクロファージの後縁および前縁に、F-アクチンのパターンと同様のパターンで発現される。スケールバー=10μm。

【図63】慢性炎症性疾患におけるSTIgMA mRNAの局在。インサイチュハイブリダイゼーションは、肺炎を有する患者(A、B)、または慢性喘息を有する患者(C、D)の組織から得られた肺胞マクロファージにおける、STIgMA mRNAの存在を示した。STIgMA mRNAはまた、慢性肝炎を有する患者の肝臓生検から得られる組織において、肝臓クップファー細胞で発現された(E、F)。

【図64】STIgMA mRNA発現は、炎症性滑膜で増加した。STIgMA mRNAは、関節炎を有しない患者の膝置換術(knee replacement)から得られた関節の滑膜では、少ないかもしくは存在しない(A、C)が、変形性関節症を有する患者のパンヌスの細胞(潜在的には、滑膜細胞もしくは滑膜マクロファージ)においては、非常に多い(B、D)。

【図65】変形性関節症を有する患者の滑膜を内張りする細胞における、ポリクローナル抗体6F1を有するSTIgMAタンパク質の検出(A、B、C)。STIgMAの免疫組織化学的検出は、コントロール滑膜では見られなかった(D)。

【図66】STIgMAタンパク質は、組織常在性マクロファージのサブタイプで発現され、その発現は、慢性炎症性疾患で増加する。(A)STIgMAは、STIgMAを安定に発現するCHO細胞の膜で発現される。STIgMAタンパク質の高発現は、慢性喘息を有する患者から得られた組織の肺胞マクロファージ(B)において見出される。(C)ヒト小腸の組織球におけるSTIgMAの発現。切片を、外科手術で切除された、新生物を含み得る組織から得た。(D)ヒト早期胎盤のホープバウアー細胞におけるSTIg

10

20

30

40

50

MAタンパク質の発現。マクロファージにおけるSTIgMAタンパク質の高発現は、副腎(E)およびヒト肝臓のクップファー細胞(F)に存在した。色素原としてDABを用いて、5 μ m厚のアセトン固定された切片上で、染色を行った。画像を、20倍および40倍の倍率で撮影した。

【図67】アテローム性動脈硬化症を有する患者から得られた血管性プラーク(vascular plaque)におけるCD68およびTIgMAの免疫組織化学的染色。連続切片を固定し、ヒトCD68に対するモノクローナル抗体(A、B)、およびヒトSTIgMAに対して惹起されたポリクローナル抗体6F1(C、D)で染色した。STIgMAは、アテローム性動脈硬化症プラークに存在するマクロファージ集団とphoam細胞とに出現し、連続切片上の染色から判断されるように、CD68陽性マクロファージと重複している。倍率：10倍(A、C)および20倍(B、D)。

【図68】心臓間質性マクロファージにおけるSTIgMAおよびCD68の共染色。5 μ mの切片を、ヒト心臓(剖検)から得て、STIgMA(3C9)に対するモノクローナル抗体および二次抗マウスFITC-標識抗体で染色した。CD68を、CD68に対するPE-標識モノクローナル抗体で染色することによって検出した。倍率：20倍。

【図69】STIgMA mRNAは、潰瘍性大腸炎、クローン病、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、および喘息を有する患者から得られた結腸組織で、有意に増加した。種々の組織から抽出した全RNAで、リアルタイムPCRを行った。STIgMAのmRNAは、潰瘍性大腸炎、クローン病、およびCOPDを有する患者から得られた組織で有意に増加した。マン-ホイットニーのU-検定を用いて、統計学的解析を行った。

【図70】ヒトSTIgMAを発現する細胞は、ヒト内皮細胞への付着性の増加を示した。(A)ヒトジャーカットT-細胞株で安定に発現される(B)細胞を、蛍光色素BCECF(Molecular Probes, Oregon)で前処理し、単層のヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)(10ng/mlのTNFで処理されたかもしくは処理なし)でコーティングされた、96ウェルプレートに添加した。3回の洗浄後、分光蛍光光度計で、HUVEC細胞に付着した状態の細胞の数を示した蛍光をカウントした。グラフは、4つの独立した実験を示す。

【図71】muSTIgMA IgG-Fc融合タンパク質による、コラーゲン誘導性関節炎(CIA)マウスモデルの進行の阻害。3回/週で6週間、(CIA)マウス(n=7)の群に100 μ gのofmuSTIgMA IgG-Fc融合タンパク質(四角)を与え、一方CIAマウスコントロール群(n=8)は、100 μ gのマウスIgG1(丸)を受容した。マウスを、炎症の徴候について毎日検査して、0-16のスケールで採点し(詳細は、実施例25に記載)、その結果をグラフにプロットした(平均 \pm SD、ステューデントT検定、コントロールIgG1対試験muSTIgMAタンパク質について、p値=0.0004)。

【 図 4 A - B 】

配列番号:3
DNA35936

CTTCTTGCCA ACTGGTATCA CCTTCAAGTC CGTGACACGG GAAGACACTG 50
GGACATACAC TTGTATGTC TCTGAGGAAG GCGGCAACAG CTATGGGGAG 100
GTCAAGGTCA AGCTCATCGT GCTTGTGCTT CCATCAACAG CTACAGITAA 150
CATCCOCTCT TCTGCCACCA TTGGGAACCG GGCAGTGTGT ACATGCTCAG 200
AACAAAGATGG TTCCCAACTC TCTGAATACA CTTGGTTCAA AGATGGGATA 250
GTGATGCCTA CGAATCCCAA AAGCACCCGT GCCTTCAGCA ACTCTTCTTA 300
TGTCTGAAT CCCACACAG GAGAGCTGGT CTTTGTATCCC CTGTACGCTT 350
CTGACTACTGG AGAATACAGC TGTGAGGCAC GGAATGGGTA 390

FIG. 4A

配列番号:4
consen01

TCTCAGTCCC CTCGCTGAG TCGCGGAGCT GTTGTCTGTT TCCCAGGAGG 50
CCTTCCGGCG CTGTGTGTCT CAGGTGCGCC TGATCGSAT GGGACAAAAG 100
GGCCAAAGCT GAGAGGAAAC TGTGTGCTCT CTTCAATATT GCGATCCTGT 150
TGTCTCCTCC GGCATTGGGC AGTGTGTACAG TTGCACTTCT CTGAACTGCA 200
AGTCAGAATT CCGTGAATA ATCCTGTGAA GTTGTCTGTT GCTACTCTGG 250
GCTTCTCTTC TCCCCTGTGT GAGTGAAGT TTGACCAAGG AGACACCACC 300
AGACTGTTT GCTATAATA CAAGATCACA GCTTCTTAT AGGACCGGGT 350
GACCTTCTTG CCAACTGGTA TCAACCTTCAA GTCCGTGACA CGGGAAGACA 400
CTGGGACATA CACTTGTATG GTCTCTGAGG AAGCGGCGCA CAGCTATGG 450
GAGGTCAAAG TCAAGCTCAT CGTCTTGTGT CCTCAATCCA AGCTACAGT 500
TAACATCCCC TCCTCTGCCA CCAATTGGGA CCGGCGAATG CTGACATGCT 550
CAGAAACAAG TGGTCCCCA CCTTCTGAAT ACACCTGGTT CAAAGATGG 600
ATAGTGTCTG CTACGAATCC CAAAAGCACC CGTGCCTTCA GCAACTCTTC 650
CTATGTCTCG AATCCACAAA CAGGAGAGCT GGTCCTTGT CCCTGTCTAG 700
CCCTCTGATC TGGAGAATAC AACTGCT 726

FIG. 4B

【 図 4 C 】

配列番号:5
consen02

GCAGGCAAAG TACCAGGGCC GCCTGCATGT GAGCCACAAG GTTCCAAGG 50
ATGTATOCCT CCAATTGAGC ACCCTGGAGA TGGATGACCG GAGCCACTAC 100
ACGTGTGAAG TCACTGGCA GACTCCTGAT GGCAACCAAG TGTGTAGAGA 150
TAAGATTACT GAGCTCCGTG TCCAGAAACT CTCTGTCTCC AAGCCACAG 200
TGCAACTGCG CAGCGGTTAT GGCCTCAOAG TGCCCCAGGG AATGAGGATT 250
AGCCTTCAAT GCCAGGGTTC GGGGTTCTCC TCCATCAGT TATATTGGT 300
ATAAGCAACA GACTAATAAC CAGGGAACCC ATCAAAGTAG CAACCCTAAG 350
TACCTTACTT TTAAGCCCTG CGGTGATAGC GCACTCAGGC TCCTATTCT 400
GCACTGCCAA GGGCCAGGTT GGCTCTGAGC AGCACAAGCA CATTGTGGA 450
TTTGTGGTCA AAGACTCCTC AAAGCTACTC AAGACAAGA CTGAGGCACC 500
TACAACCATG ACATACCCTT TGAAGCAAC ATCTACAGTG AAGCAGTCT 550
GGGACTGGAC CACTGCATGT GATGGCTACC TTGGAGAGC CAGTGTCTGG 600
CCAGGAAGA GCTCGCTGT CTTTGCCTAT ATCTCATCA TCTCTTGTG 650
CTGTATGGTG GTTTTACCA TGGCTATAT CATGCTCTGT CGGAAGACAT 700
CCCAACAAGA GCATGTCTAC GAAGCAAGCA GGCACATGC CAGAGAGGCT 750
AACGACTGTG GAGAAACCAT GAGGTTGGCC ATCTTGGCAA GTGCTGTCT 800
CAGTGATGAG CCAACTTCCC AGAATCTGGG GCAACAATA CTCTGATGAG 850
CCCTGCATAG GACGAGGATA CCAGATCATC GCCCAGATCA ATGGCAACTA 900
CGCCCGCTG CTGGACAAG TTCTCTGGA TTATAGTATT CTGGCCACTG 950
AGGGCAAAA TGTCTGTAA AATGCCCCA TTAGCCCAAG ATCTGTGTAC 1000
ATAATTGCTT AGTCAAGTCT TGCTTCTGC ATGGCTTCTT TCCTGTCTAC 1050
CTCTTCTCT GATAGGCCA AAGTGTCCGC CTACCAACAG TGGAGCCGCT 1100
GGGAGTCACT GCTTTGGCC TGAATTTGCT CAGATGCATC TCAAGTAGC 1150
CAGCTCTGAG ATTTGGCTCT GGGCCCTTCT AGTATCTCTG CCGGGGCTT 1200
CTGTACTTCC TCTTAAATA CCAGAGGGAA GATGCCATA GCACATGAGC 1250
TTGGTCACTA TGCTACAGA CACTATTCAA CTTTGGCATC TTGCCACCAG 1300
AAGACCAGG GGGAGGCTCA GCTCTGCCAG CTCAGAGGAC CAGCTATATC 1350
CAGGATCATT TCTCTTCTT CAGGCCCAGA CAGCTTTTAA TTGAAATTGT 1400
TATTTACAG GCCAGGGTTC AGTCTGCTC CTCCACTATA AGTCTAATGT 1450
TCTGACTCT TCTGTGTGCT CAATAAATAT CTAATCATAA CAGCAAAAA 1500

FIG. 4C

【 図 5 】

配列番号:11

TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 100
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 200
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 300
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 400
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 500
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 600
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 700
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 800
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 900
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1000
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1100
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1200
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1300
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1400
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1500
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1600
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1700
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1800
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 1900
TGGGATCCT GTTGTCTCC CTGGATATCG GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC GATGCTGATCC 2000

FIG. 5

【 図 6 A 】

配列番号:7

1 GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 100
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 200
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 300
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 400
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 500
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 600
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 700
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 800
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 900
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1000
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1100
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1200
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1300
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1400
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1500
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1600
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1700
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1800
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 1900
GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC GCGAGGCTC 2000

FIG. 6A

【 9 B 】

配列番号: 5
 100 GGGATCACT GCGTTGGCC TGGAAATTCG CAGATGATC TCAAGTAAAC CAGCTGCTGG ATTGGGCTT GGGCCCTTCT AGATGCTG CCGGGGCTT
 CCTCAAGTGA CCGAAGGCG ACCTTAAAG GTCTAAGTAG AGTCAATTCG GTGACAGACC TAAACCGA CCGCGGAAGA CCGCGGAGAG TATAGAGAC GGGCCCGA
 201 CTGGTACTC TCTTAATAA CAGAGGGGA GATGCCATA GCACTAGAC TTGTCATCA TGCCTAGGA GACTATACA CTTTGGGTC TTGCGACAG
 GACCTAGG AGAATTTAT GGTCTGCTT CACGGGAT CAGATCTG ACCAGTAG ACGATGCTT GGTATGCTT GAGACGATG GAGACGATG ACGATGCTT
 300 AAGACCGAG GGGAGGCTA GCTCTCCAG CTCAGAGAC CAGCATATC CAGATCAT TCTCTTCT CAGGGCAGA CAGCTTTAA TTGAATTT
 TTCTGGCTC CCTCCGAGT CGAGAGGTC GACTCTGCT GTGATATAG GTCTAGTAA AGAAGAAG GTCCGGCTT GTGGAATTT AACTTTAACA
 400 TATTTACAG GCGAGGCTC AGTTGGCT CCACTATA AGCTATGCT TGTGACTC TCTGCTCT CATATAAT CMTATATA CAGCAGAAA
 ATAAAGTGC CAGTCCAG TCAAGCAG GAGGTGAT TCAATTACA AGACTAGAG AGACAGGGA GTTATTATA GATAGATG GTGTTTTT
 500 AAA
 TTT

FIG. 9B

【 1 0 A 】

A33_human A33 前駆配列 - ホモサピエンス プレーム スコア マッチ パーセント
 +1 246 81 30
 A33_human~A33 前駆配列 - ホモサピエンス
 A33_human~A33 前駆配列 - ホモサピエンス (319 aa)
 スコア = 246 (86.6 ビット), 予測 = 2.8e-19, P = 2.8e-19
 同一性 = 81/268 (30%), 断片 = 131/268 (48%)(121, 17 において), プレーム = +1
 DNA4028 121 LAIGSVTVHSSSEPEVRI PENNPVKLSCAVSGFSR...-VW-KFDQDITRLYC--YNN
 A33_human 17 VTVDAISVETTPQDVERASQKSVTLPCVHTSTSSREGLIQDKLLLTHTEKVIWPFPSN
 配列番号: 23
 DNA4028 283 K--ITAS-YEDRVTEL-----PTGITFKSVTREDTGTTCWWS---EEGNSVGEVKV
 A33_human 77 KNYIHGELYKRVYSISNNAEQSDASITIDQLTMDAGNTEGCVSLMSDLEGN--KSRVR
 DNA4028 427 LTVLPFSKPTVNIPISSATIIGNRAVLTCSEQDQSPPSFEYTWFKDGIWMPNPKSTRAFSN
 A33_human 135 LLVLPFSKPCGIGHETIIGNNIQLTCSQKSGSPTPQYSWKRYNLLNQEQP-----
 DNA4028 607 SSYLVNFTTGLV-FDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPTMSNAVRMEAVERNVGV---IVA
 A33_human 187 ---LAQFASQQRVSLKNISTDTSQYICTSNEBGTQPCNITVAVRSPSMVALYVGIAY
 DNA4028 775 AVLVTLLGLIVGIVWFAYSRGHDRF--KKGTSSKKVLYSQP
 A33_human 244 GVAALLIIGIITIIY---CCCKGKDDNTEKEDARPNREAYEEP

FIG. 10A

【 1 0 B 】

スコア = 245 (86.2 ビット), 予測 = 3.6e-19, P = 3.6e-19
 同一性 = 83/273 (30%), 断片 = 131/273 (47%)(112, 12 において), プレーム = +1
 DNA4028 112 LCSL--ALGSVTVHSSSEPEVRI PENNPVKLSCAVSGFSR...-VW-KFDQDITRLYC
 SEQ ID NO: 25 * * * * *
 A33_human 12 LCAVRVTVDAISVETTPQDVERASQKSVTLPCVHTSTSSREGLIQDKLLLTHTEKVI
 SEQ ID NO: 24 * * * * *
 DNA4028 274 --YNNK--ITAS-YEDRVTEL-----PTGITFKSVTREDTGTTCWWS---EEGNSVGEVK
 A33_human 72 WPFNSKNRYIHGELYKRVYSISNNAEQSDASITIDQLTMDAGNTEGCVSLMS-DLHGNTK
 DNA4028 421 --VKLLVLPFSKPTVNIPISSATIIGNRAVLTCSEQDQSPPSFEYTWFKDGIWMPNPKSTR
 A33_human 131 SKVRLVLPFSKPCGIGHETIIGNNIQLTCSQKSGSPTPQYSWKRYNLLNQEQP-----
 DNA4028 595 AFSNSVYLVNFTTGLV-FDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPTMSNAVRMEAVERNVGV--
 A33_human 187 -----LAQFASQQRVSLKNISTDTSQYICTSNEBGTQPCNITVAVRSPSMVALYV
 DNA4028 766 -TVAAVLVTLLGLIVGIVWFAYSRGHDRF--KKGTSSKKVLYSQP
 A33_human 240 GVAAGVVAALLIIGIITIIY---CCCKGKDDNTEKEDARPNREAYEEP

FIG. 10B

【 1 1 】

配列番号: 9
 MARSRRLRLLLRLLVVALGYKAYGFSAPKQVTVAYEQEAILLACKTPKTYSSR
 LEWEKLRGSRVSYFYQOTLQDFKRNKRAIDENIRIKNVTSDAGYRCVSAPEEQGN
 LEBDTVLEVLVAPVPSCEVPSALSGTVVLELRCQDKGNPAPBYTWFKDGIIRLLENPR
 LGSOSTNSYTMNTKTGTLOPNTVSKLDTGYSCEARNVGVYRCFGRKMGVDLNLISGI
 IAAVYVVALVLSVGLGVYAKRKGYSKETSFKQSNSSSKATIMSENVQWLTPTVIFALW
 KAAAGSRSRQEP

FIG. 11

【 図 1 2 】

配列番号: 6 A33_hum 1MYGKMPVYVWTCVAVRYVDASVETPQDVIRASQKSVTFC
 配列番号: 1 40628 1 MGRKAQVREKLLCLFILAILLS--LALGSYVHSSEPEVYIPENNPKL

A33_hum 42 PCHTSTSSREGLICQVPECLLLTHTTRVWVWPFSSKRYVTHGETKRNRYSI
 40628 49 SCVAVSGFSPR...VEMVDFDQQRITRELVFC--YNNKX-LIFAS-VDEEVJTF

A33_hum 92 SNAEQSDASITIDQVIMADNQTVEQSVLSMSDLEGTKSRVPLVIVYVP
 40628 90LPTGLTFKSYVREDTYVQVNSVEGG-NSYGEVYKVLIVLVYVP

A33_hum 142 SKPECCGTEGETTIGNIQFTCSKSEKSPPTQVSNKRYNPLNGEQV-----
 40628 133 SKZPVYVIFSSATHQNKAVLTCSEQDRESEFPTWPKDGLVYVFTNPKSTRA

A33_hum 187LAQVLSQVPSLKNITDTSQVYVICTSSEVQFCNITVAVRS
 40628 183 FSNSSVYLVNITQGE-LVFDPIASADQVQVDFEAFAGVQVPMFMSNAVRMEA

A33_hum 231 PSMKVALYGVVAVAKIIGIIVYCC-CGRKDDNTEDDADARNRE
 40628 232 VENKGV...VAAVVLVLLGLVFGIWFAYSGRHFDRVKGTSSEKY

A33_hum 280 AVHEPPEOLRSLREREEDDYRQEQRSTGRESPDHLDO
 40628 279 LKQVSAKSEGEFKQTSSELY

FIG. 12

【 図 1 3 】

配列番号: 6 A33_hum 1 MVEKMPVYVWTCVAVRYVDASVETPQDVIRASQKSVTFCSTST
 配列番号: 2 45416 1 MGLLGLLLOHLLTVDFGRPIIIVQVSEVIGPWPVGLDNLFCITDPLQV

A33_hum 51 SREGVQVQKELTHTTRVWV-PFSNKNVTHGELVKNRYVSNNAEQSD
 45416 49 YTVQVYVYV-LVQVGSDDVPLFVLRSSGDFLQQAQVQVGLHSHKV-PGE

A33_hum 100 ASITIDQVIMADNQTVEQSVLSMSDLEGTKSRV-----RCLVYVPS
 45416 96 VSIQLSVEVDFDQQRITRELVFC--YNNKX-LIFAS-VDEEVJTF

A33_hum 143 KPECCGTEGETTIGNIQFTCSKSEKSPPTQVSNKRYNPLNGEQV-----
 45416 146 TTSQVSGVFTVQVNSVEGG-NSYGEVYKVLIVLVYVP

A33_hum 193 QVPSLKNITDTSQVYVICTSSEVQFCNITVAVRS
 45416 195 LSTLLKPKAVIADVSGVYVCTSSNEEHTQFCNITVAVRS
 45416 241 IAVGVVAALIIIGIIVYCCCKRDKDTEKEDRNRREAYEPEPQLRE
 45416 243 APTTMTYVVKATSTVQSWDWTDMDEYLGFTSAGPKSLPVFAILLIS

A33_hum 291 EREVEEDDYRQEQRSTGRESPDHLDO
 45416 293 LCCVVVFTMAVIMLCRKTSCQEHVYEAR

FIG. 13

【 図 1 4 】

配列番号: 6 A33_hum 1MYGKMPVYVWTCVAVRYVDASVETPQDVIRASQKSVTFC
 配列番号: 9 35638 1 MARRSRRLQLLILKYLWVALGYHKAYGFSAPKDDQVYVYVYQEAALV

A33_hum 44 TYHTSTSSREGLICQVPECLLLTHTTRVWVWPFSSKRYVTHGETKRNRYSI
 35638 51KDPKKTYSRLRMLKJL-----QDSVLSFYVQQT-LQGD-PEKNS-----

A33_hum 94 MRSQSDASITIDQVIMADNQTVEQSVLSMSDLEGTKSRVPLVIVYVP
 35638 87LPTGLTFKSYVREDTYVQVNSVEGG-NSYGEVYKVLIVLVYVP

A33_hum 143 KPECCGTEGETTIGNIQFTCSKSEKSPPTQVSNKRYNPLNGEQV-----
 35638 136 VEPSEVPSALSGVYVLCQVQVNSVEGG-NSYGEVYKVLIVLVYVP

A33_hum 193 QVPSLKNITDTSQVYVICTSSEVQFCNITVAVRS
 35638 185 TNSSYTMNITQGE-LVFDPIASADQVQVDFEAFAGVQVPMFMSNAVRMEA

A33_hum 240 GIAYGVVAALIIIGIIVYCC-CGRKDDNTEDDADARNREAYEPEP
 35638 235 LNIISGIIIAAVVVALVLSMGLGVYQVSGEFTSFKSSNSKATT

A33_hum 287 QRELSR-ERREEDDYRQEQRSTGRESPDHLDO
 35638 285 MSENVQWLPYVIPALWKAAGGSRQGEF

FIG. 14

【 図 1 5 】

配列番号: 10 jam 1 MGTGEGKAGKLLPLFT-SMILVQVQKGVYTAQSDVQVPEPESIKITC
 配列番号: 1 40628 1 MGTGAGVREKLLCLFILAILLS--LALGSYVHSSEPEVYIPENNPKL

jam 40628 50 TVSGFSSPRVWVWTCVAVRYVDASVETPQDVIRASQKSVTFCSTST
 51 AVSGFSSPRVWVWTCVAVRYVDASVETPQDVIRASQKSVTFCSTST

jam 40628 94 RNDVGHVYTCMVSBEQGNVGRVSIHIVLVPSKPTISVFSVFTIGNRAY
 97 RFDVGHVYTCMVSBEQGNVGRVSIHIVLVPSKPTISVFSVFTIGNRAY

jam 40628 150 LTCSEHDDGSPFSEVWFKDGLVMTADAKRTRAKNSFTIIPKQVDF
 151 LTCSEHDDGSPFSEVWFKDGLVMTADAKRTRAKNSFTIIPKQVDF

jam 40628 200 DPVYVAFDSGTYVQVNSVEGG-NSYGEVYKVLIVLVYVP
 200 DPLSASDTEGEVYKVLIVLVYVP

jam 40628 250 LGLVFGIWFAYSGRHFDRVKGTSSEKY
 250 LGLVFGIWFAYSGRHFDRVKGTSSEKY

jam 300 V
 40628 299 V

FIG. 15

【 図 2 0 】

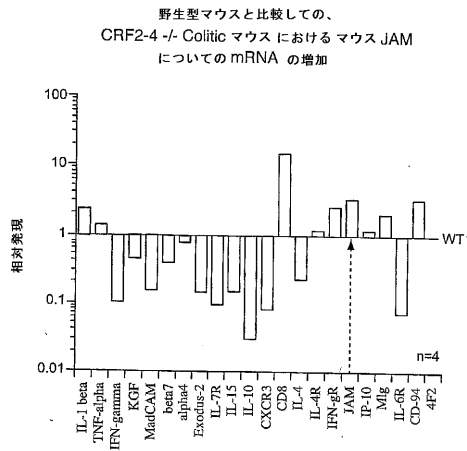


FIG. 20

【 図 2 1 】

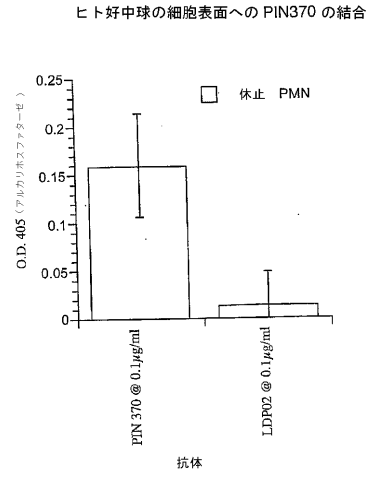


FIG. 21

【 図 2 2 】

FIG. 22

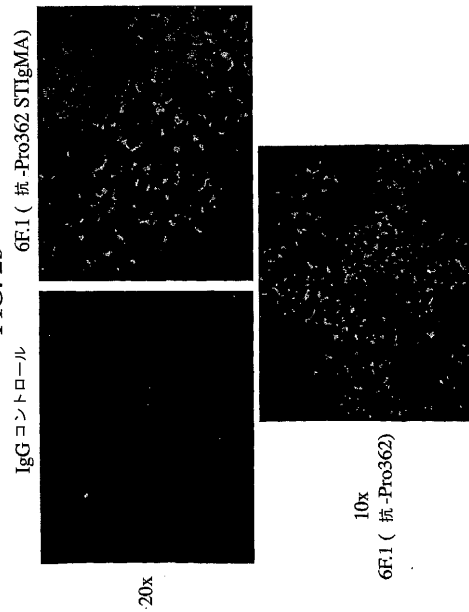
```

1  MALRRPRLRLCARLDFDFLLFRGCLIGAVNLKSSNTPVYQEFESVELSCIIITDSQT
61  SDPRI EWKKIQDEQTYTFEDNKIQDLAGRAEILGKTSLSKIYVNVTRRDSALYCEWAR
121 NDREEIDEIVLELTVQKVPVPCRYPKAVPVGKMATLHCQSEGHPRPHYSWRNDVPL
181 PTDSRANPRFRNSSFHLNSETGLTVFAVHKDDSGQYYICIASNDAGSARCBEQEMEVYDL
241 NIGGIIGGVLYVLAVLALITLIGICCAVRRGVFINNKQGESYKNPGKPDGVNXYIRTDDEG
301 DFRHKSSFVI

```

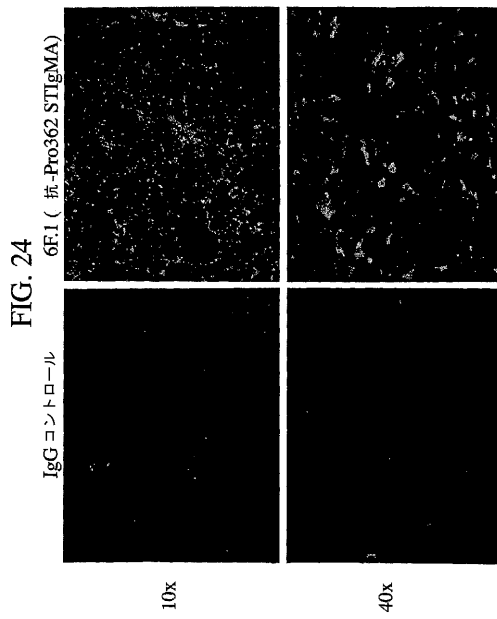
【 図 2 3 】

FIG. 23

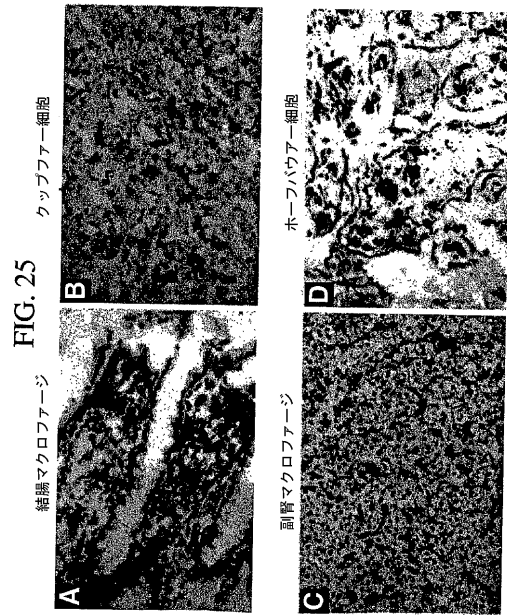


10x
6F.1 (抗-Pro362)

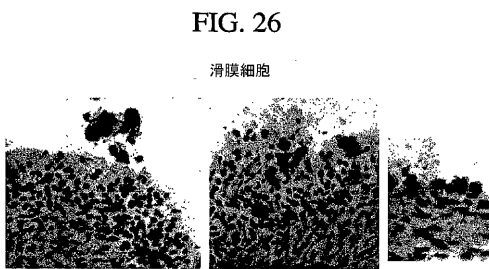
【 図 2 4 】



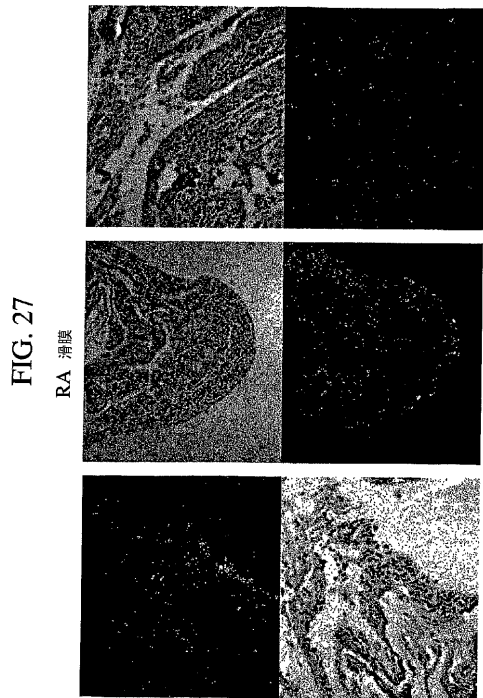
【 図 2 5 】



【 図 2 6 】

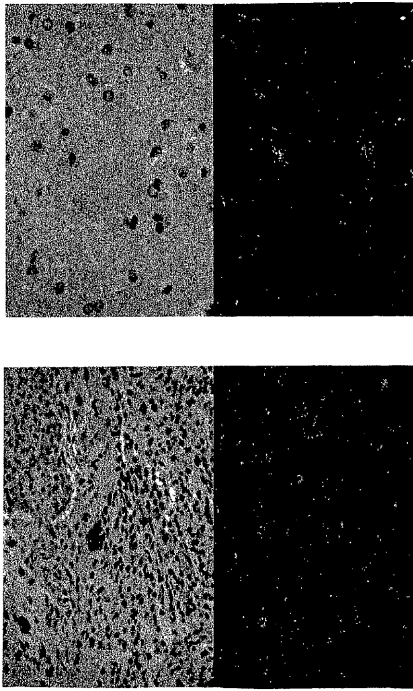


【 図 2 7 】



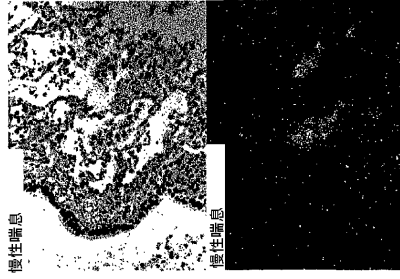
【 図 2 8 】

FIG. 28
脳 小グリア細胞



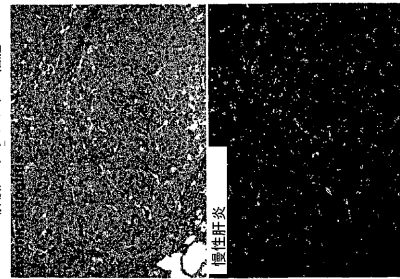
【 図 2 9 】

FIG. 29
肺 肺マクロファージ



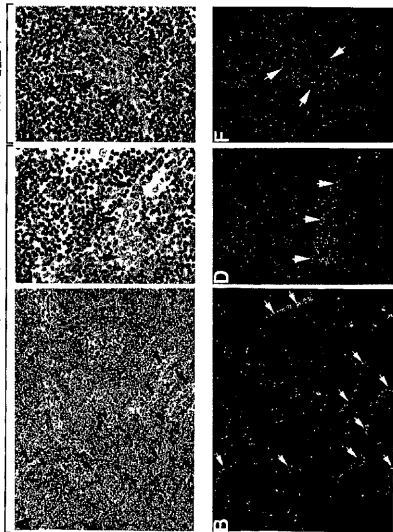
【 図 3 0 】

FIG. 30
肝臓 クップファー細胞



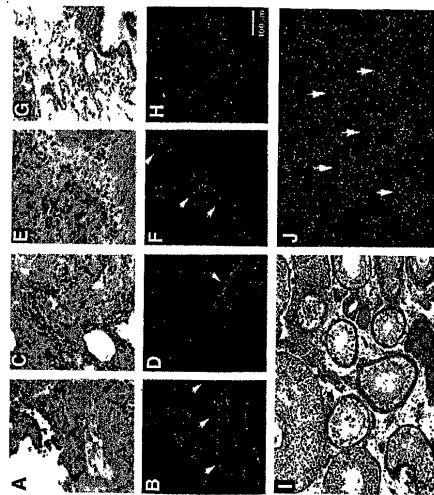
【 図 3 1 】

FIG. 31
リンパ節 HEV
扁桃 HEV

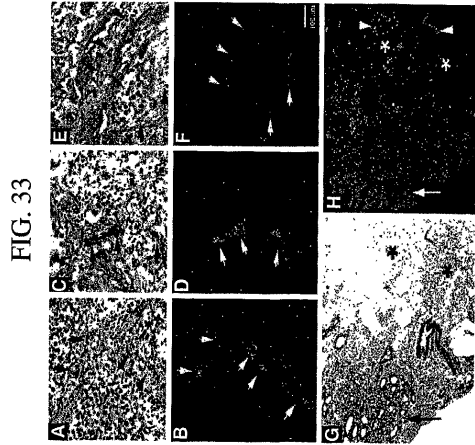


【 図 3 2 】

FIG. 32

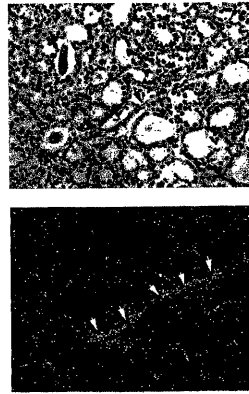


【 図 3 3 】



【 図 3 4 】

FIG. 34



【 図 3 5 】

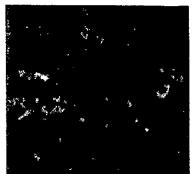
FIG. 35

二重 STIgMA-CD68 IHC

副腎マクロファージ



副腎-STIgMA



副腎-CD68

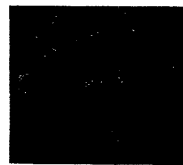


副腎-STIgMA/CD68

【 図 3 6 】

FIG. 36

肝臓クッパー細胞



肝臓-STIgMA



肝臓-CD68

【 図 3 7 】

FIG. 37

脳小グリア細胞



脳-STIgMA



脳-CD68

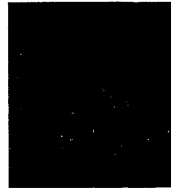


脳-STIgMA/CD68

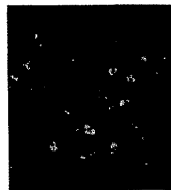
【 図 3 8 】

FIG. 38

胎盤ホーフバウアー細胞



胎盤-STIgMA



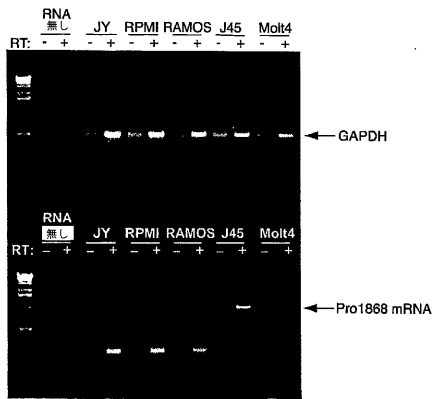
胎盤-CD68



胎盤-STIgMA/CD68

【 図 3 9 】

FIG. 39



【 図 4 0 】

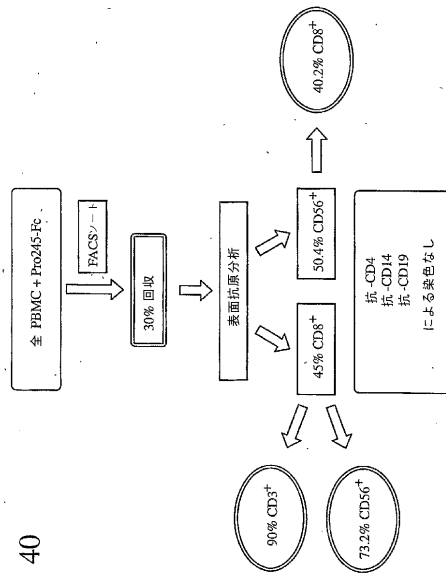
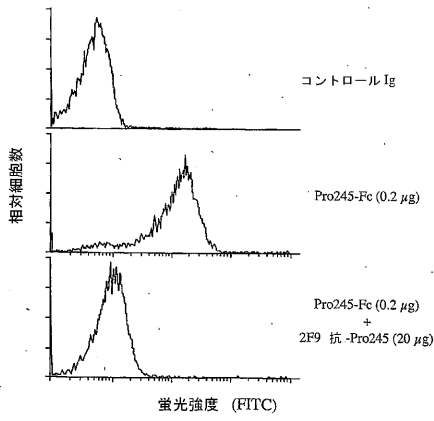


FIG. 40

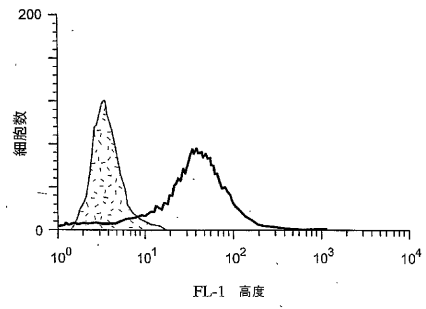
【 図 4 1 】

FIG. 41



【 図 4 2 】

I



II

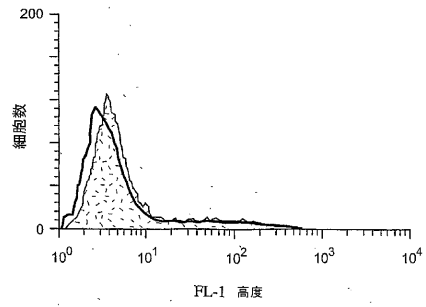
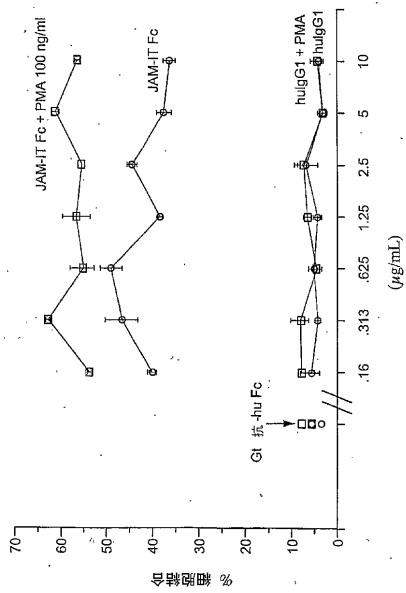


FIG. 42

【 図 4 3 】

FIG. 43



【 図 4 4 】

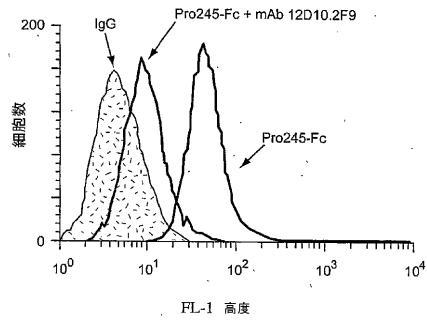


FIG. 44

【 図 4 5 】

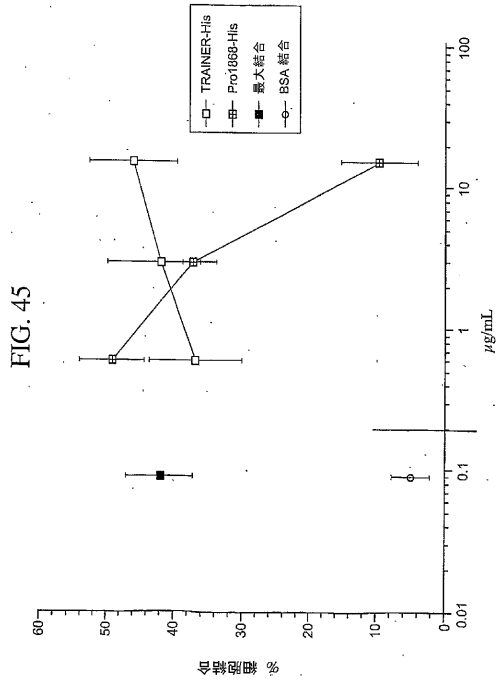


FIG. 45

【 図 4 6 】

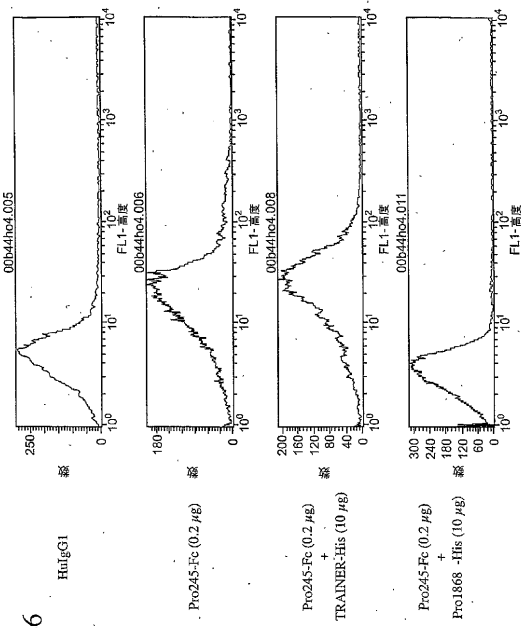


FIG. 46

【 図 4 7 】

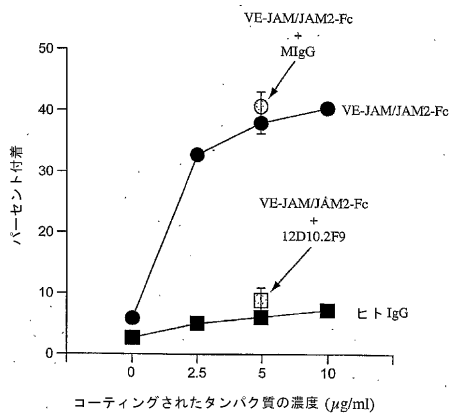


FIG. 47

【 図 4 8 】

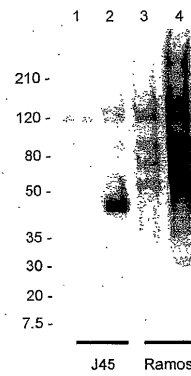


FIG. 48

【 図 4 9 】

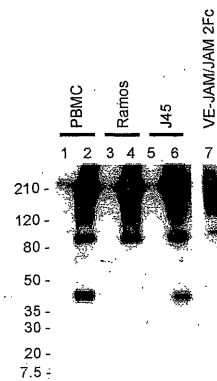


FIG. 49

【 図 5 0 】

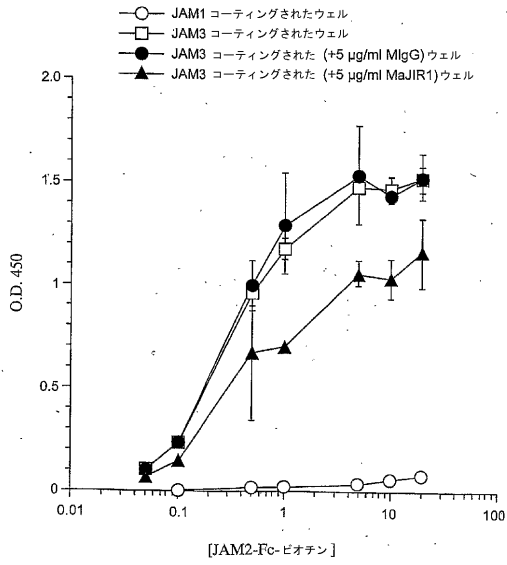


FIG. 50

【 図 5 1 】

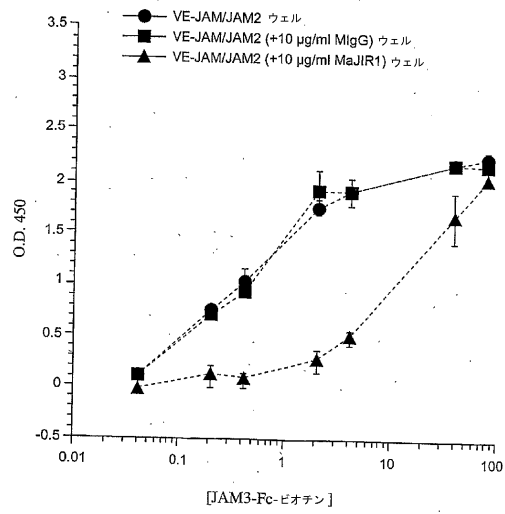


FIG. 51

【 図 5 2 】

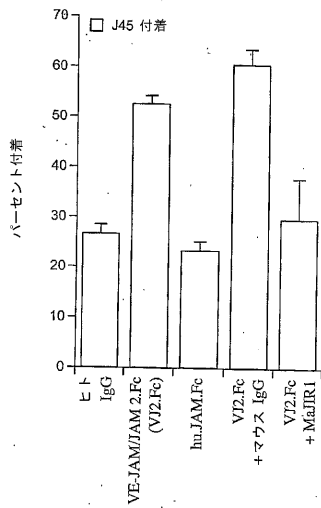


FIG. 52

【 図 5 3 】

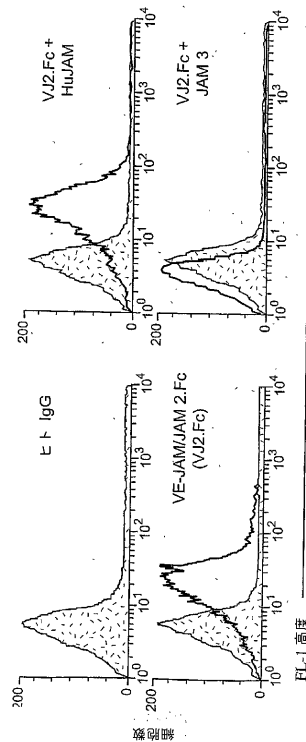


FIG. 53

【 図 5 8 】

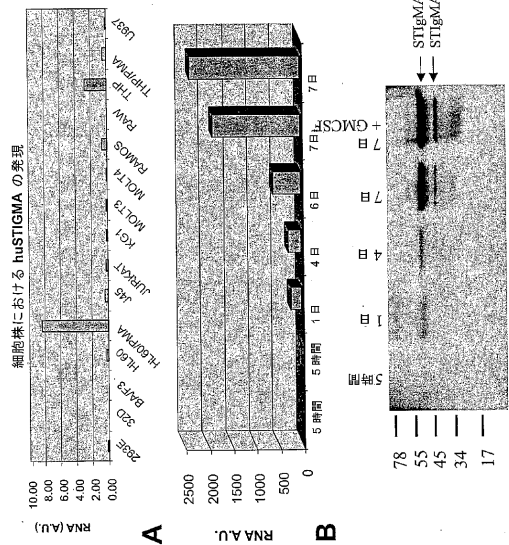


Fig. 58

【 図 5 9 】

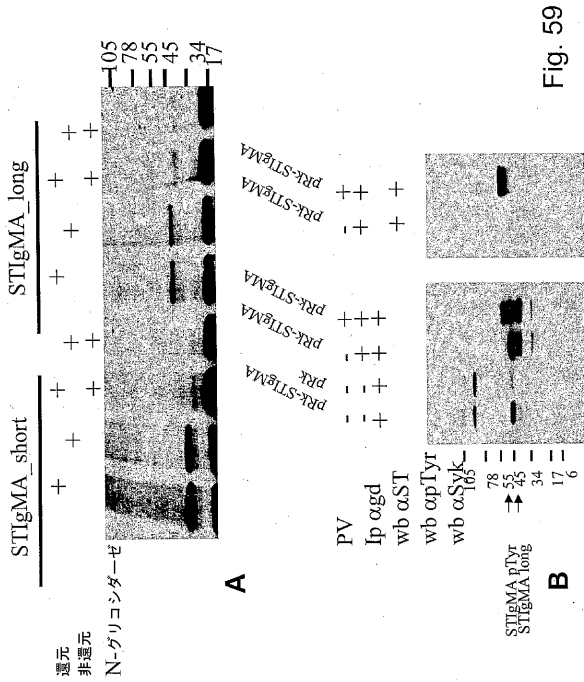


Fig. 59

【 図 6 0 】

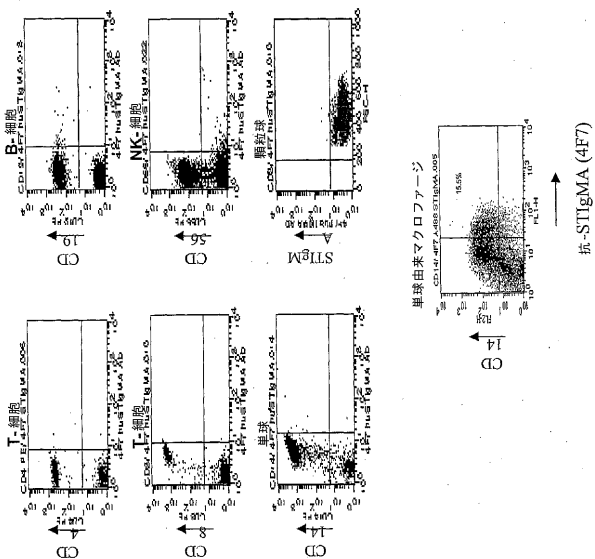


Fig. 60

【 図 6 1 A 】

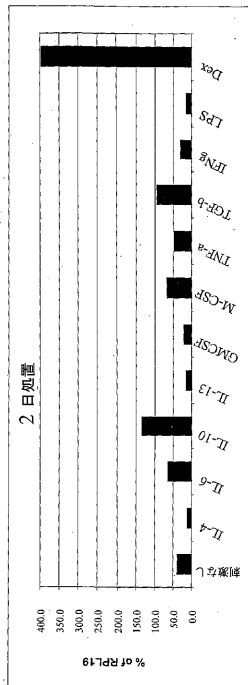


Fig. 61A

【 図 6 1 B 】

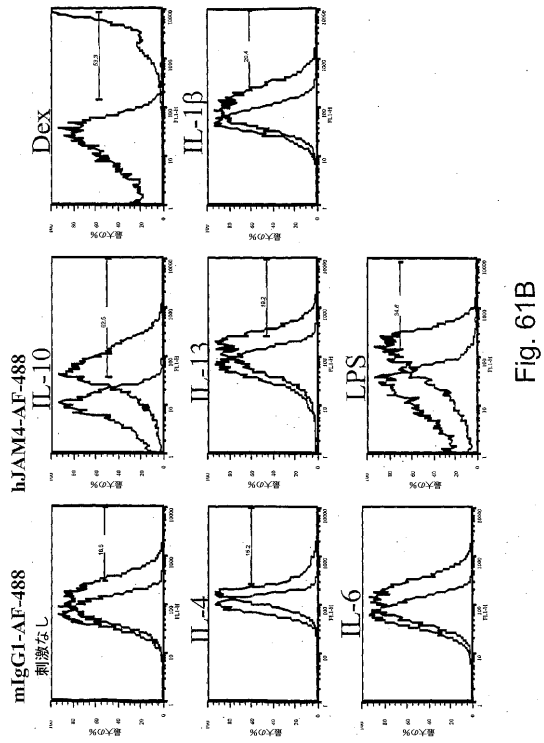


Fig. 61B

【 図 6 2 】

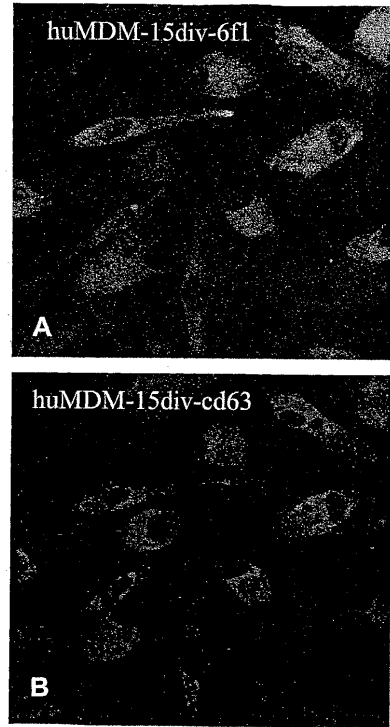


Fig.62

【 図 6 3 】

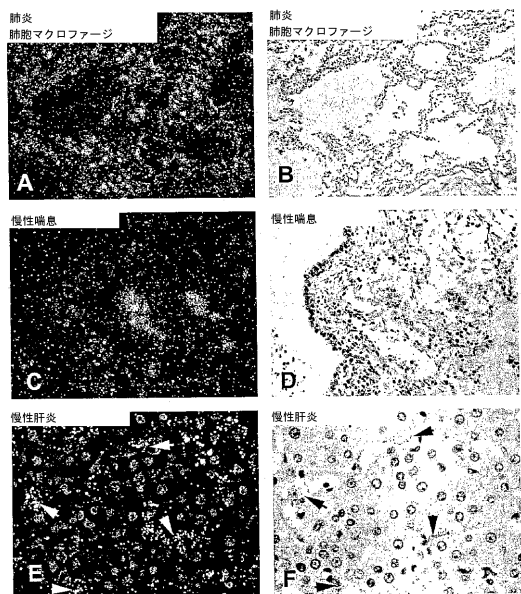


Fig. 63

【 図 6 4 】

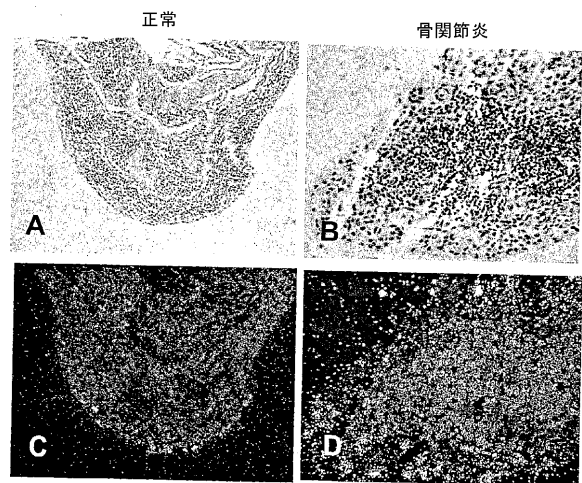


Fig. 64

【 図 6 5 】

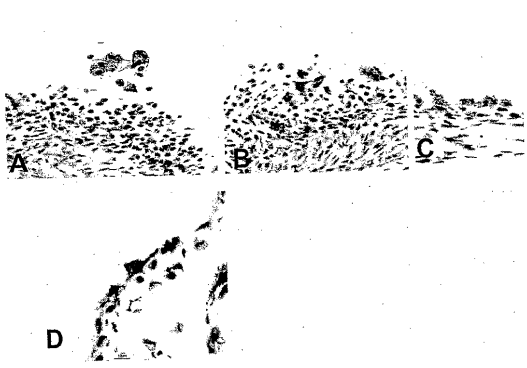


Fig. 65

【 図 6 6 】

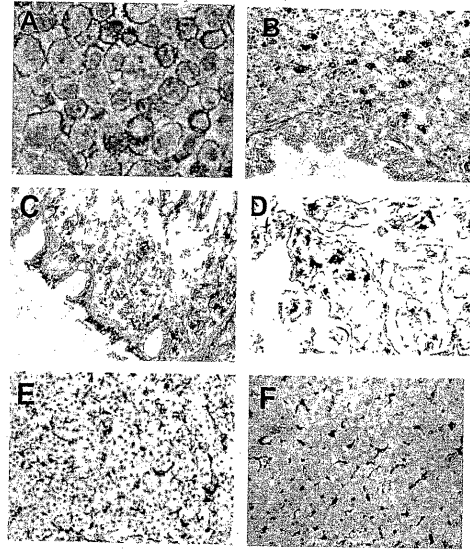


Fig. 66

【 図 6 7 】

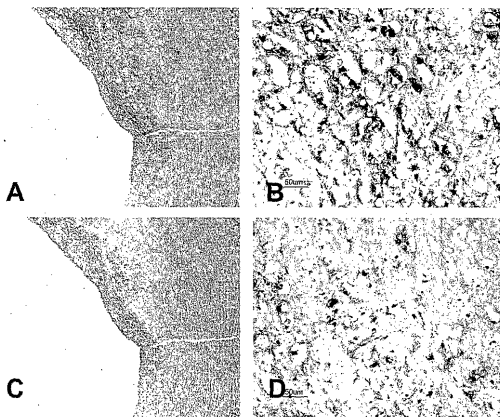


Fig. 67

【 図 6 8 】

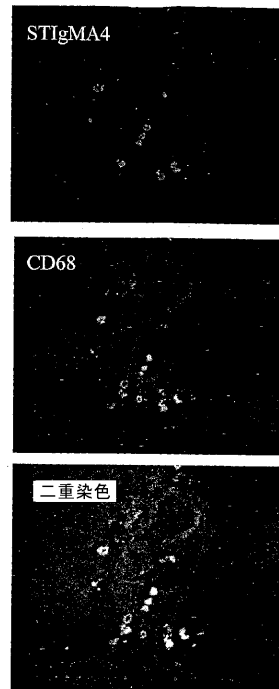


Fig. 68

【 図 6 9 】

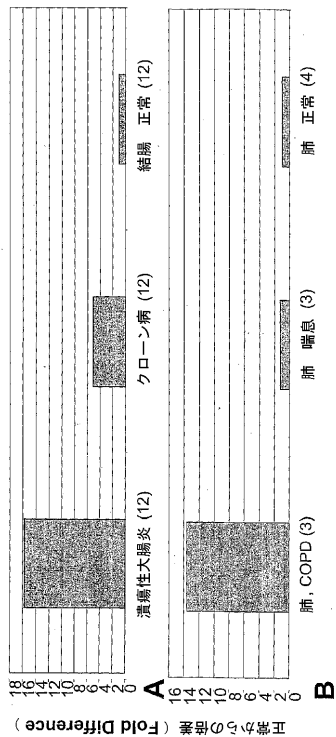


Fig 69

【 図 7 0 】

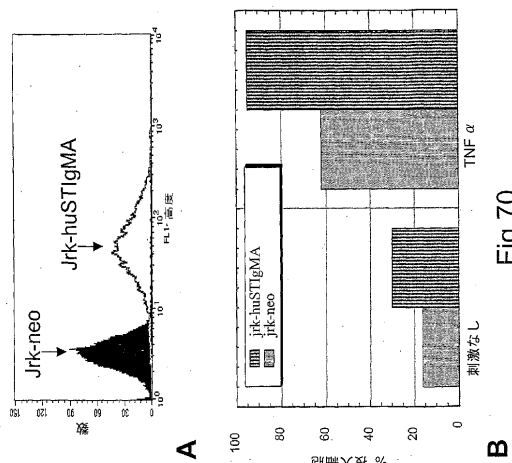
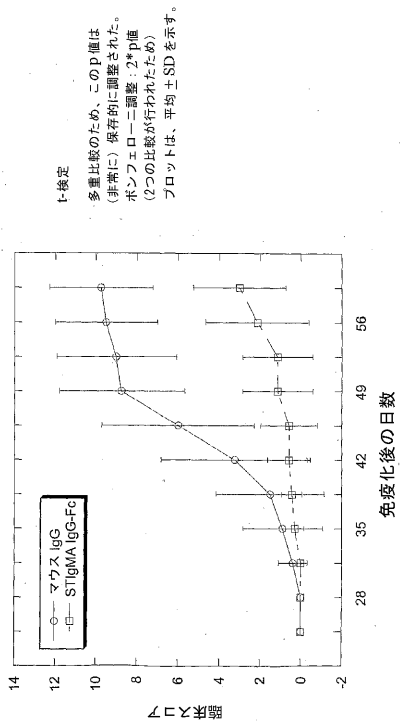


Fig 70

【 図 7 1 】

Figure 71: CIAの進行に対する muSTIgMA-Fcの全身性注入の効果



【配列表】

2006501862000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年6月3日(2005.6.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

図22(配列番号31)のアミノ酸残基1~310のアミノ酸配列と少なくとも約80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項2】

図22(配列番号31)のアミノ酸残基1~310のアミノ酸配列と少なくとも約85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】

図22(配列番号31)のアミノ酸残基1~310のアミノ酸配列と少なくとも約90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項4】

図22(配列番号31)のアミノ酸残基1~310のアミノ酸配列と少なくとも約95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項5】

図22(配列番号31)に示されるアミノ酸残基31~310を含む、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項6】

図22(配列番号31)に示されるアミノ酸残基31~241を含む、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項7】

配列番号31のアミノ酸1~Xを含む単離されたポリペプチドであって、Xが、アミノ酸237~247のいずれか一つである、ポリペプチド。

【請求項8】

異種アミノ酸配列に融合した、請求項1~7のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む、キメラ分子。

【請求項9】

前記異種アミノ酸配列が、エプITO-プタグまたは免疫グロブリンのFc領域である、請求項8に記載のキメラ分子。

【請求項10】

単離された核酸分子であって、該核酸分子は、配列番号31のアミノ酸残基1~310のアミノ酸配列と少なくとも約80%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項11】

請求項10に記載の単離された核酸分子であって、該核酸分子は、配列番号31のアミノ酸残基1~310のアミノ酸配列と少なくとも約85%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項12】

請求項10に記載の単離された核酸分子であって、該核酸分子は、配列番号31のアミノ酸残基1~310のアミノ酸配列と少なくとも約90%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項13】

請求項 10 に記載の単離された核酸分子であって、該核酸分子は、配列番号 31 のアミノ酸残基 1 ~ 310 のアミノ酸配列と少なくとも約 95 % の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 14】

配列番号 31 のアミノ酸残基 1 ~ 310 をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 10 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 15】

(a) 図 11 のアミノ酸残基 1 ~ 310 の配列を含む PRO1868 ポリペプチドをコードする DNA 分子、または (b) (a) の DNA 分子の相補体に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する DNA を含む、単離された核酸。

【請求項 16】

請求項 10 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 17】

前記核酸が、前記ベクターを用いて形質転換された宿主細胞によって識別される制御配列に、作動可能に結合した、請求項 16 に記載のベクター。

【請求項 18】

請求項 17 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 19】

前記宿主細胞が、CHO 細胞、E. coli 細胞、酵母細胞またはバキュロウイルス感染昆虫細胞である、請求項 18 に記載の宿主細胞。

【請求項 20】

PRO1868 ポリペプチドの発現に適した条件下で、請求項 18 または 19 に記載の宿主細胞を培養する工程、および該ポリペプチドを回収する工程を包含する、PRO1868 ポリペプチドを産生するためのプロセス。

【請求項 21】

図 22 (配列番号 31) に示されるポリペプチド配列のアミノ酸残基 31 ~ 241 に特異的に結合する、抗体。

【請求項 22】

モノクローナル抗体である、請求項 21 に記載の抗体。

【請求項 23】

非ヒト相補性決定領域 (CDR) 残基およびヒトフレームワーク領域 (FR) 残基を含む、請求項 22 に記載の抗体。

【請求項 24】

標識される、請求項 22 に記載の抗体。

【請求項 25】

固体支持体上に固定される、請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 26】

抗体フラグメント、単鎖抗体、または抗イディオタイプ抗体である、請求項 21 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 27】

請求項 21 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の抗体を、薬学的に受容可能なキャリアと混合して含有する組成物。

【請求項 28】

哺乳動物における腫瘍を診断するための方法であって、該方法は、(a) 配列番号 31 のポリペプチドのアミノ酸残基 31 ~ 241 に特異的に結合する抗体を、該哺乳動物から入手した細胞の試験サンプルと接触させる工程、および (b) 該試験サンプル中の該抗体と該ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出する工程であって、該複合体の形成が、該哺乳動物中の腫瘍の存在を示す、工程を包含する、方法。

【請求項 29】

前記試験サンプルが、新生物の細胞成長または細胞増殖を有することが疑われる哺乳動物

から入手される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記哺乳動物が、結腸癌、精巣癌、肺癌および乳癌からなる群より選択される疾患または障害に関する新生物の細胞成長または細胞増殖を有することが疑われる、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

腫瘍を処置するための方法であって、該方法は、配列番号 31 のポリペプチドを過剰発現する腫瘍を有すると診断された患者に、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 32】

前記哺乳動物に、治療的に有効量の配列番号 31 のポリペプチドまたはそのアゴニストを投与する工程を包含する、哺乳動物の骨および/または軟骨関連障害を処置する方法。

【請求項 33】

十分に分化したマクロファージが組織中の内皮細胞に付着するのを阻害するための方法であって、該方法は、該組織を、配列番号 2 のポリペプチド、配列番号 32 のポリペプチドおよび配列番号 33 のポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインを含むイムノアドヘシンと接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 34】

哺乳動物における慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を処置するための方法であって、該方法は、該哺乳動物に、配列番号 2 のポリペプチド、配列番号 32 のポリペプチドおよび配列番号 33 のポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドの細胞外ドメインを含むイムノアドヘシンの有効量を投与する工程を包含する、方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/31207															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53; A61K 39/395, 39/00 US CL : 424/145.1, 155.1, 158.1, 185.1; 435/6, 7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/145.1, 155.1, 158.1, 185.1; 435/6, 7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, STN, WEST																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category *</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X ---</td> <td>MARTIN-PADURA et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. J. Cell Biol. 13 Jul 1998, Vol. 142, No. 1, pages 117-127, see abstract.</td> <td style="text-align: center;">1-6 ----- 7-21 and 23-31</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>OZAKI et al. Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. J. Immunol. 15 July 1999, Vol. 163, No. 2, pages 553-557.</td> <td style="text-align: center;">1-51</td> </tr> <tr> <td>X ---</td> <td>WO 00/29583 A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 25 May 2000 (25.05.2000), page 4, lines 11-18.</td> <td style="text-align: center;">1-6 ----- 7-21 and 23-31</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,410,708 B1 (ASHKEAZI et al.) 25 June 2002 (25.06.2002), entire document.</td> <td style="text-align: center;">1-51</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X ---	MARTIN-PADURA et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. J. Cell Biol. 13 Jul 1998, Vol. 142, No. 1, pages 117-127, see abstract.	1-6 ----- 7-21 and 23-31	Y	OZAKI et al. Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. J. Immunol. 15 July 1999, Vol. 163, No. 2, pages 553-557.	1-51	X ---	WO 00/29583 A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 25 May 2000 (25.05.2000), page 4, lines 11-18.	1-6 ----- 7-21 and 23-31	Y	US 6,410,708 B1 (ASHKEAZI et al.) 25 June 2002 (25.06.2002), entire document.	1-51
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X ---	MARTIN-PADURA et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. J. Cell Biol. 13 Jul 1998, Vol. 142, No. 1, pages 117-127, see abstract.	1-6 ----- 7-21 and 23-31															
Y	OZAKI et al. Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. J. Immunol. 15 July 1999, Vol. 163, No. 2, pages 553-557.	1-51															
X ---	WO 00/29583 A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 25 May 2000 (25.05.2000), page 4, lines 11-18.	1-6 ----- 7-21 and 23-31															
Y	US 6,410,708 B1 (ASHKEAZI et al.) 25 June 2002 (25.06.2002), entire document.	1-51															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																
Date of the actual completion of the international search 16 August 2004 (16.08.2004)		Date of mailing of the international search report 16 FEB 2005															
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Maher M. Haddad <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/31207

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

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

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

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

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/31207

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group I, claims 1-21 and 23-31, drawn to methods involving, antibodies that bind, fusion proteins comprising and nucleic acids encoding the individual polypeptides as identified by individual SEQ ID NO: 1.

Group II, claims 1-21 and 23-31, drawn to methods involving, antibodies that bind, fusion proteins comprising and nucleic acids encoding the individual polypeptides as identified by individual SEQ ID NO: 2.

Group III, claims 1-21 and 23-31, drawn to methods involving, antibodies that bind, fusion proteins comprising and nucleic acids encoding the individual polypeptides as identified by individual SEQ ID NO: 9.

Group IV, claims 18-23, 32-36, 38-39, 43-46 and 49-51, drawn to methods involving, antibodies that bind, fusion proteins comprising and nucleic acids encoding the individual polypeptides as identified by individual SEQ ID NO: 31.

Group V, claims 1-17, 23-33, 37-39, 43, 45-51, drawn to methods involving, antibodies that bind, fusion proteins comprising and nucleic acids encoding the individual polypeptides as identified by individual SEQ ID NO: 32.

Group VI, claims 1-17, 23-33, 37-39, 43, 45-51, drawn to methods involving, antibodies that bind, fusion proteins comprising and nucleic acids encoding the individual polypeptides as identified by individual SEQ ID NO: 33.

Group VII, claims 1-17, 23-33, 37-39, 43, 45-51, drawn to methods involving, antibodies that bind, fusion proteins comprising and nucleic acids encoding the individual polypeptides as identified by individual SEQ ID NO: 34.

The inventions listed as Groups I-VII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: there does not appear to be a shared common structural relationship among the nucleic acids or among the proteins; therefore the individual SEQ ID NOS do not share a corresponding special technical feature with one another.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	4 H 0 4 5
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 16/42 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 0 7 K 16/42	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, 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 アシュケナジ, アビ ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, サン マテオ, タリータウン ストリート 1 4 5 6

(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 9 4 5 0 2, アラメダ, バシンサイド ウェイ 1 9

(72) 発明者 ゴッダード, オードリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1, サン フランシスコ, コンゴ ストリート 1 1 0

(72) 発明者 ガーニー, オースティン エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2, ベルモント, デビー レーン 1

- (72)発明者 ナピアー, マリー エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, ハイน์ ロード 1015
- (72)発明者 トゥマス, ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94563, オリンダ, ラエ アベニュー 3
- (72)発明者 バン ロッケレン, メノ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94127, サン フランシスコ, モリモ ドライブ 261
- (72)発明者 ウッド, ウィリアム アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズボロー, サウスダウン コート 35
- F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA31 CA04 DA02 DA06 DA12 EA04 GA11
GA12
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ43 QQ58 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34
QX02
4B064 AG01 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA05
DA13 DA14
4B065 AA26X AA72X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA03 AA17 BA44 NA14 ZA022 ZA512 ZA552 ZA592
ZA662 ZA682 ZA752 ZA892 ZA942 ZA962 ZB072 ZB082 ZB132 ZB152
ZC062
4C085 AA13 AA14
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA75 DA86 EA28 EA50
EA51 FA74

专利名称(译)	使用A33抗原和JAM-IT		
公开(公告)号	JP2006501862A	公开(公告)日	2006-01-19
申请号	JP2005500358	申请日	2003-10-01
[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	アシュケナジアビジェイ フォンシャーマン ゴッダードオードリー ガーニーオースティンエル ナビアーマリーエー トゥマスダニエル バンロツケレンメノ ウッドウィリアムアイ		
发明人	アシュケナジ, アビ ジェイ. フォン, シャーマン ゴッダード, オードリー ガーニー, オースティン エル. ナビアー, マリー エー. トゥマス, ダニエル バン ロツケレン, メノ ウッド, ウィリアム アイ.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/06 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P37 /02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/42 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1 /68 G01N33/53 G01N33/574 C12N5/10 A61K38/00 C12P21/08 A61K38/17 A61K39/00 C07B C07B63 /00 C07H21/04 C07K16/28 C07K19/00 C12N15/12 G01N33/564		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17 /06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/2803 C07K2317/56 C07K2319/30 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/564 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/57407 G01N33/57492 G01N33/6893 G01N2333/705 G01N2800/065 G01N2800 /102 G01N2800/122 G01N2800/127 G01N2800/24		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/06 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/42 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/574.A C12N5/00.B A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024 /DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064 /AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084 /AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA512 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA892 4C084/ZA942		

4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZC062 4C085/AA13
 4C085/AA14 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045
 /DA75 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA74

代理人(译)	夏木森下
優先権	10/265542 2002-10-03 US 10/633008 2003-07-31 US
其他公开文献	JP2006501862A5 JP5319051B2
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明涉及用于治疗 and 诊断以与癌症相关的炎性疾病和/或抗原的存在为特征的疾病的组合物和方法。一方面，本发明一般涉及用于诊断和治疗免疫相关疾病的组合物和方法，包括哺乳动物（包括人）的炎性疾病。本发明部分基于鉴定涉及哺乳动物免疫应答的化合物（包括多肽和抗体）。一方面，本发明涉及治疗哺乳动物炎性疾病的方法，其中将治疗有效量的天然序列STIgMA多肽，PRO301多肽，PRO362多肽或PRO245多肽拮抗剂给予哺乳动物。或其药学上可接受的盐。

								特表2006-50186A (P2006-50186A) (43) 公表日 平成18年1月19日(2006.1.19)	
(51) Int. Cl.		F I							テーマコード(参考)
C12N	15/09 (2006.01)	C12N	15/00	ZNAA					4B024
A61K	39/395 (2006.01)	A61K	39/395	D					4B063
A61K	45/00 (2006.01)	A61K	39/395	N					4B064
A61P	1/00 (2006.01)	A61K	45/00						4B065
A61P	1/04 (2006.01)	A61P	1/00						4C084
		審査請求 未請求		予備審査請求 未請求		(全 138 頁)		最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2005-500358 (P2005-500358)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・94080 0-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌイー・ウェイ・1						
(86) (22) 出願日	平成15年10月1日(2003.10.1)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀兼						
(85) 翻訳文提出日	平成17年5月27日(2005.5.27)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明						
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/031207	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹						
(87) 国際公開番号	W02004/031105								
(87) 国際公開日	平成16年4月15日(2004.4.15)								
(31) 優先権主張番号	10/265,542								
(32) 優先日	平成14年10月3日(2002.10.3)								
(33) 優先権主張国	米国 (US)								
(31) 優先権主張番号	10/633,008								
(32) 優先日	平成15年7月31日(2003.7.31)								
(33) 優先権主張国	米国 (US)								