(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2017-528129
(P2017-528129A)
(43)公表日　平成29年9月28日(2017.9.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B063
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B064
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4B065
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 103 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-510624 (P2017-510624)
(86)(22)出願日　平成27年8月21日 (2015.8.21)
(85)翻訳文提出日　平成29年4月18日 (2017.4.18)
(86)国際出願番号　PCT/CN2015/000602
(87)国際公開番号　WO2016/026258
(87)国際公開日　平成28年2月25日 (2016.2.25)
(31)優先権主張番号　201410418773.1
(32)優先日　平成26年8月22日 (2014.8.22)
(33)優先権主張国　中国(CN)

(71)出願人　512320593
インスティチュート・オブ・バイオフィジックス，チャイニーズ・アカデミー・オブ・サイエンシズ
中華人民共和国北京　１００１０１，チャオヤン・ディストリクト，ダータン・ロード　１５
(74)代理人　100107515
弁理士　廣田　浩一
(74)代理人　100107733
弁理士　流　良広
(74)代理人　100115347
弁理士　松田　奈緒子
(74)代理人　100163038
弁理士　山下　武志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】異常なレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための方法及び組成物

(57)【要約】
本発明は、異常に高いレベルのＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質（ＩＦＰ３５及びＮＭＩを含む）に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための方法及び組成物、異常に高いレベルのＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質（ＩＦＰ３５及びＮＭＩを含む）に関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングのための方法及び組成物、並びにＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質（ＩＦＰ３５及びＮＭＩを含む）の調節因子を同定するための方法及び組成物を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５（インターフェロン誘導タンパク質３５ｋＤ）及び／又はＮＭＩ（Ｎ－Ｍｙｃ相互作用タンパク質）に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防する方法であって、かかる治療及び／又は予防を必要としている被験体に、前記被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤を有効量投与することを含むことを特徴とする方法。
【請求項２】
前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、過剰な免疫応答に関連する請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、サイトカインストームに関連する請求項１から２のいずれかに記載の方法。
【請求項４】
前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、炎症、感染症、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択される請求項１から３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療するための方法である請求項１から４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を予防するための方法である請求項１から４のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
前記剤が、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの発現及び／又は活性を阻害又は低減する分子（例えば、低分子又はポリペプチド）を含む請求項１から６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
前記剤が、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの発現及び／又は活性を阻害又は低減する抗体又はその抗原結合断片を含む請求項１から７のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
前記剤が、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩをコードしている遺伝子を標的とするポリヌクレオチド（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、又はｍｉＲＮＡ）を含む請求項１から８のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
前記剤が、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩをコードしている遺伝子を標的とするアンチセンスＲＮＡを含む請求項１から９のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
前記剤が、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのオリゴマー化を阻害又は低減する分子を含む請求項１から１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
前記剤が、インターフェロンの発現及び／又は活性を阻害又は低減してＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの発現及び／又は活性を阻害又は低減する分子を含む請求項１から１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
前記剤が、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの分泌を阻害又は低減する分子を含む請求項１から１２のいずれかに記載の方法。
【請求項１４】
前記剤が、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩとＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの細胞受容体との間の相互作用を阻害又は低減する分子を含む請求項１から１３のいずれかに記載の方法。

【請求項１５】
前記剤が、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩとＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの細胞表面受容体との間の相互作用を阻害又は低減する分子を含む請求項１から１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性の防止又は低減によって、炎症因子の発現及び／又は活性の阻害又は低減、及び／又はＮＦ－κＢシグナル伝達の阻害又は低減が生じる請求項１から１５のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
前記炎症因子が、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、及び／又はＣＤ８６を含み、前記ＮＦ－κＢシグナル伝達が、ＴＬＲ４等のＴＬＲによって媒介される請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記剤が、ＩＦＰ３５に特異的に結合する抗体若しくは抗原結合断片及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体若しくは抗原結合断片を含む請求項１から１７のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
前記抗体又は抗原結合断片が、１以上のＮＩＤ（ＮＭＩ／ＩＦＰ３５ドメイン）に特異的に結合する請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
薬学的に許容し得る担体又は賦形剤を投与することを更に含む請求項１から１９のいずれかに記載の方法。
【請求項２１】
前記剤が、経口、経鼻、吸入、非経口、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、局所、又は直腸内経路を介して投与される請求項１から１９のいずれかに記載の方法。
【請求項２２】
前記剤が、前記被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を有しない同等の被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性のレベルと実質的に同一のレベルまで低減する量で投与される請求項１から２１のいずれかに記載の方法。
【請求項２３】
前記被験体が、哺乳類である請求項１から２２のいずれかに記載の方法。
【請求項２４】
前記哺乳類が、ヒト又は非ヒト哺乳類である請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬組成物であって、有効量の、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤と、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とを含むことを特徴とする医薬組成物。
【請求項２６】
有効量の、前記被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬を更に含む請求項２５に記載の医薬組成物。
【請求項２７】
前記被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬を製造するための、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤の有効量の使用。
【請求項２８】

前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、炎症、感染症、敗血症、臓器損傷、及び自己免疫疾患である請求項２７に記載の使用。

【請求項２９】

ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、配列番号２、配列番号４、配列番号６、又は配列番号８内のエピトープに特異的に結合することを特徴とする抗体又は抗原結合断片。

【請求項３０】

配列番号２のアミノ酸８１～１７０、１７７～２６８、又は１３６～２１６内のエピトープに特異的に結合する請求項２９に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項３１】

配列番号４のアミノ酸８１～１６８、１７５～２６６、又は１３４～２１４内のエピトープに特異的に結合する請求項２９に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項３２】

配列番号６のアミノ酸１０４～１９３、２０２～２９３、又は１５１～２５０内のエピトープに特異的に結合する請求項２９に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項３３】

配列番号８のアミノ酸１０３～１９２、２０１～２９２、又は１５１～２４０内のエピトープに特異的に結合する請求項２９に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項３４】

ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片であって、配列番号９に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含むことを特徴とする抗体又はその抗原結合断片。

【請求項３５】

配列番号９に記載の重鎖可変領域と、配列番号１０に記載の軽鎖可変領域とを含む請求項３４に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項３６】

前記断片が、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ□）２断片、Ｆｖ断片、又はｓｃＦｖ断片であり、前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又は二重特異性抗体である請求項２９から３５のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項３７】

ヒト重鎖定常領域とヒト軽鎖定常領域とを更に含む請求項２９から３６のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項３８】

前記抗体が、完全ヒト抗体又はヒト化抗体である請求項２９から３７のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項３９】

前記抗体が、組み換え的に産生される請求項２９から３８のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項４０】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性及び／又は活性のＩＦＰ３５（インターフェロン誘導タンパク質３５ｋＤ）及び／又はＮＭＩ（Ｎ－Ｍｙｃ相互作用タンパク質）に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防する方法であって、かかる治療及び／又は予防を必要としている被験体に、前記被験体における有効量の請求項２９から３９のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合断片を投与することを含むことを特徴とする方法。

【請求項４１】

前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、過剰な免疫応答に関連する請求項４０に記載の方法。

【請求項４２】
前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、サイトカインストームに関連する請求項４０から４１のいずれかに記載の方法。
【請求項４３】
前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、炎症、感染症、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択される請求項４０から４２のいずれかに記載の方法。
【請求項４４】
ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性の防止又は低減によって、炎症因子の発現及び／又は活性の阻害又は低減、及び／又はＮＦ－κＢシグナル伝達の阻害又は低減が生じる請求項４０から４３のいずれかに記載の方法。
【請求項４５】
前記炎症因子が、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、及び／又はＣＤ８６を含み、前記ＮＦ－κＢシグナル伝達が、ＴＬＲ４等のＴＬＲによって媒介される請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片をコードしている単離ポリヌクレオチドであって、前記抗体又はその抗原結合断片が、配列番号９に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含むことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。
【請求項４７】
前記抗体又はその抗原結合断片が、配列番号９に記載の重鎖可変領域と、配列番号１０に記載の軽鎖可変領域とを含む請求項４６に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４８】
請求項４６から４７のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする単離ベクター。
【請求項４９】
請求項４８に記載のベクターを含むことを特徴とする単離宿主細胞。
【請求項５０】
（ａ）抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドと、抗体又はその抗原結合断片の軽鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドとを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び
（ｂ）抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、抗体又はその抗原結合断片の軽鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターとで形質転換された宿主細胞
からなる群から選択され、
前記抗体又は断片が、配列番号９に記載の重鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなる相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含むことを特徴とする宿主細胞。
【請求項５１】
前記宿主細胞が、ＣＨＯ細胞等の真核細胞である請求項４９から５０のいずれかに記載の宿主細胞。
【請求項５２】
抗ＩＦＰ３５抗体若しくはその抗原結合断片及び／又は抗ＮＭＩ抗体若しくはその抗原結合断片を作製する方法であって、
ａ）前記抗体又は抗原結合断片をコードしているポリヌクレオチドの発現に好適な条件

下で請求項４９から５１のいずれかに記載の宿主細胞を培養することと、
ｂ）前記抗体又は抗原結合断片を単離すること
とを含むことを特徴とする方法。
【請求項５３】
請求項５２に記載の方法によって作製されることを特徴とする抗体又は抗原結合断片。
【請求項５４】
（１）配列番号２のアミノ酸８１～１７０、１７７～２６８、若しくは１３６～２１６に記載の配列、又は
（２）配列番号４のアミノ酸８１～１６８、１７５～２６６、若しくは１３４～２１４に記載の配列、又は
（３）配列番号６のアミノ酸１０４～１９３、２０２～２９３、若しくは１５１～２５０に記載の配列、又は
（４）配列番号８のアミノ酸１０３～１９２、２０１～２９２、若しくは１５１～２４０に記載の配列
を含む、から本質的になる、又はからなることを特徴とする単離ポリペプチド。
【請求項５５】
配列番号２のアミノ酸８１～１７０、１７７～２６８、又は１３６～２１６に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号２の１４５位、１４７位、１５０位、１５１位、１７２位、１７３位、１７５位、１７７位、１８２位、１８８位、１９２位、２１２位、１９９位、２０１位、２０７位、２０８位、２１０位、２１４位、及び２１６位のアミノ酸残基（Ｓｅｒ１４５、Ａｒｇ１４７、Ｇｌｕ１５０、Ｇｌｕ１５１，Ａｓｐ１７２、Ｖａｌ１７３、Ｇｌｕ１７５、Ｌｅｕ１７７、Ｍｅｔ１８２、Ａｓｐ１８８、Ｇｌｎ１９２、Ａｒｇ２１２、Ｇｌｎ１９９、Ｔｈｒ２０１、Ｇｌｎ２０７、Ｇｌｎ２０８、Ｐｒｏ２１０、Ｓｅｒ２１４、及びＴｙｒ２１６）のうちの１以上が変異及び／又は修飾されていることを特徴とする単離ポリペプチド。
【請求項５６】
前記変異が、ＩＦＰ３５受容体又はＩＦＰ３５に特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除する請求項５５に記載の単離ポリペプチド。
【請求項５７】
配列番号４のアミノ酸８１～１６８、１７５～２６６、又は１３４～２１４に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号４の１４３位、１４５位、１４８位、１４９位、１７０位、１７２位、１７３位、１７５位、１８０位、１８６位、１９０位、２１０位、１９７位、１９９位、２０４位、２０５位、２０６位、２０８位、２１２位、及び２１４位のアミノ酸残基（Ｓｅｒ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４８、Ｇｌｕ１４９、Ｇｌｕ１７０、Ａｒｇ１７２、Ｇｌｕ１７３、Ｌｅｕ１７５、Ｍｅｔ１８０、Ｇｌｕ１８６、Ｇｌｎ１９０、Ａｒｇ２１０、Ｇｌｎ１９７、Ａｒｇ１９９、Ａｒｇ２０４、Ｇｌｎ２０５、Ｇｌｎ２０６、Ｌｅｕ２０８、Ｓｅｒ２１２、及びＴｙｒ２１４）のうちの１以上が変異及び／又は修飾されていることを特徴とする単離ポリペプチド。
【請求項５８】
前記変異が、ＩＦＰ３５受容体又はＩＦＰ３５に特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除する請求項５７に記載の単離ポリペプチド。
【請求項５９】
配列番号６のアミノ酸１０４～１９３、２０２～２９３、又は１５１～２５０に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号６の１０７位、１１２位、１１７位、１５９位、１７２位、１７３位、１９２位、１９７位、２１５位、２５６位、２６７位、及び２９２位のアミノ酸残基（Ｌｅｕ１０７、Ｌｙｓ１１２、Ｇｌｎ１１７、Ｌｙｓ１５９、Ｇｌｕ１７２、Ｇｌｕ１７３、Ｇｌｕ１９２、Ａｓｐ１９７、Ａｓｐ２１５、Ｌｙｓ２５６、Ａｓｐ２６７、及びＧｌｕ２９２）のうちの１以上が変異及び／又は修飾されていることを特徴とする単離ポリペプチド。

【請求項６０】
前記変異が、ＮＭＩ受容体又はＮＭＩに特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除する請求項５９に記載の単離ポリペプチド。
【請求項６１】
配列番号８のアミノ酸１０３～１９２、２０１～２９２、又は１５１～２４０に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号８の１０６位、１１１位、１１６位、１５８位、１７１位、１７２位、１９１位、１９６位、２１４位、２５５位、２６６位、及び２９１位のアミノ酸残基（Ｌｅｕ１０６、Ｌｙｓ１１１、Ｇｌｎ１１６、Ｌｙｓ１５８、Ｇｌｕ１７１、Ａｓｐ１７２、Ａｓｐ１９１、Ａｓｐ１９６、Ａｓｐ２１４、Ａｒｇ２５５、Ａｓｐ２６６、及びＡｓｐ２９１）のうちの１以上が変異及び／又は修飾されていることを特徴とする単離ポリペプチド。
【請求項６２】
前記変異が、ＮＭＩ受容体又はＮＭＩに特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除する請求項６１に記載の単離ポリペプチド。
【請求項６３】
請求項５４から６２のいずれかに記載のポリペプチドと、任意で薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とを含むことを特徴とする医薬組成物。
【請求項６４】
被験体において免疫応答を刺激する方法であって、かかる刺激を必要としている被験体に、前記被験体における有効量の請求項５４から６２のいずれかに記載のポリペプチド又は請求項６３に記載の医薬組成物を投与することを含むことを特徴とする方法。
【請求項６５】
前記被験体が、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌を有する請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記増殖異常が、肉腫、扁平上皮癌、線維肉腫、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、ＣＮＳ癌、メラノーマ、卵巣癌、腎臓癌、前立腺癌、乳癌、肝臓癌、頭頸部癌、膵臓癌、膀胱癌、及び食道癌からなる群から選択される請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記免疫応答の刺激が、炎症因子の発現及び／又は活性、免疫細胞（例えば、好中球）の動員、及び／又はＮＦ－κＢシグナル伝達の刺激を含む請求項６４から６６のいずれかに記載の方法。
【請求項６８】
前記炎症因子が、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、及び／又はＣＤ８６を含み、前記ＮＦ－κＢシグナル伝達が、ＴＬＲ４等のＴＬＲによって媒介される請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記ＮＦ－κＢシグナル伝達の刺激が、リン酸化ＩκＢαの増加及び／又は全ＩκＢαの減少を含む請求項６７から６８のいずれかに記載の方法。
【請求項７０】
請求項５４から６２のいずれかに記載のポリペプチドを含むポリペプチドをコードしていることを特徴とする単離ポリヌクレオチド。
【請求項７１】
請求項７０に記載のポリヌクレオチドを含むことを特徴とする単離ベクター。
【請求項７２】
請求項７１に記載のベクターを含む単離宿主細胞であって、任意でＣＨＯ細胞等の真核細胞であることを特徴とする単離宿主細胞。
【請求項７３】
単離ポリヌクレオチドを作製する方法であって、
ａ）請求項５４から６２のいずれかに記載のポリペプチドを含むポリペプチドをコード

しているポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で請求項７２に記載の宿主細胞を培養することと、
ｂ）前記ポリペプチドを単離することと
を含むことを特徴とする方法。
【請求項７４】
被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングの方法であって、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性を評価することを含むことを特徴とする方法。
【請求項７５】
前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、過剰な免疫応答に関連する請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、サイトカインストームに関連する請求項７４から７５のいずれかに記載の方法。
【請求項７７】
前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、炎症、感染症、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択される請求項７４から７６のいずれかに記載の方法。
【請求項７８】
被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を診断するために用いられ、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性が、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害（例えば、炎症、感染症、敗血症、及び自己免疫疾患）を有しない同等の被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性よりも少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％高い場合、前記被験体が前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を有していることを示す請求項７４から７７のいずれかに記載の方法。
【請求項７９】
異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベルを評価することを含む請求項７４から７８のいずれかに記載の方法。
【請求項８０】
異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を評価することを含む請求項７４から７８のいずれかに記載の方法。
【請求項８１】
前記ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性が、ＤＮＡ、ＲＮＡ、及び／又はタンパク質のレベルで評価される請求項７４から８０のいずれかに記載の方法。
【請求項８２】
前記ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベルが、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ又はＲＮＡにおける少なくとも１０の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いてＤＮＡ及び／又はＲＮＡのレベルで評価される請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
前記ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベルが、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体を用いてタンパク質レベルで評価される請求項８１に記載の方法。
【請求項８４】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングのキットであって、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性を評価するための手段を含むことを特徴とするキット。

【請求項８５】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断の方法であって、前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態を決定することを含むことを特徴とする方法。

【請求項８６】

被験体における前記ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態が、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ又はＲＮＡにおける少なくとも１０の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いて決定される請求項８５に記載の方法。

【請求項８７】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断のキットであって、前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態を決定する手段を含むことを特徴とするキット。

【請求項８８】

ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの調節因子を同定する方法であって、

ａ）ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩを試験物質と接触させ、前記試験物質と接触したＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を評価することと、

ｂ）前記試験物質と接触していない前記ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を評価することと、

ｃ）工程ａ）及びｂ）で評価した前記ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を比較し、工程ａ）及びｂ）で評価した前記ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性が異なる場合、前記試験物質をＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの調節因子として同定すること

とを含むことを特徴とする方法。

【請求項８９】

前記試験物質が、低分子、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの変異体及び／又は断片を含むポリペプチドライブラリ、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体、ｓｉＲＮＡ、又はアンチセンスＲＮＡである請求項８８に記載の方法。

【請求項９０】

ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性の阻害剤を同定するために用いられる請求項８８から８９のいずれかに記載の方法。

【請求項９１】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬を同定するために用いられる請求項８８から９０のいずれかに記載の方法。

【請求項９２】

前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌である請求項９１に記載の方法。

【請求項９３】

請求項８８から９２のいずれかによって同定された医薬候補。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（関連出願の相互参照）
本願は、２０１４年８月２２日に出願された中国特許出願第２０１４１０４１８７７３．１号に対する優先権を主張し、その開示全文を全ての目的のために参照により本明細書に援用する。
【０００２】
幾つかの態様では、本開示は、異常なレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質（ＩＦＰ３５及びＮＭＩを含む）に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための方法及び組成物；異常なレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質に関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングのための方法及び組成物；並びにＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質の調節因子を同定するための方法及び組成物に関する。
【背景技術】
【０００３】
内因性危険信号は、炎症応答を誘発する壊死性細胞又はストレスを受けた細胞から放出される「損傷関連分子パターン」（ＤＡＭＰ）である。例えば、細胞は、感染又は傷害の後に免疫制御のために内因性ＤＡＭＰを産生する。非特許文献１～３を参照。公知のＤＡＭＰは、尿酸、コレステロール、及びＡＴＰ等の低分子だけではなく（非特許文献４～６を参照）、高移動度群ボックスタンパク質１（ＨＭＧＢ１）（非特許文献７及び８を参照）、熱ショックタンパク質（ＨＳＰ）（非特許文献９を参照）、インターロイキン－１α（ＩＬ－１α）（非特許文献１０を参照）、インターロイキン－３３（ＩＬ－３３）（非特許文献１１を参照）、ミエロイド関連タンパク質－８（Ｍｒｐ８）及びミエロイド関連タンパク質－１４（Ｍｒｐ１４）（非特許文献１２及び１３を参照）等のタンパク質も含む。ＤＡＭＰは、病原体の排除及び損傷修復において重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、ＤＡＭＰによって炎症が無秩序に活性化されると、有毒なサイトカインが持続的に過剰発現し、これは、敗血症ショック及び全身性炎症反応症候群の主な危険因子となる。非特許文献１４及び１５を参照。
【０００４】
何千ものサイトカインが免疫応答に関与している。サイトカインは、選択的に活性化又は抑制されることによって、複雑であるが、正確に制御されているネットワークを構成して、抗ウイルス機能又は免疫制御機能を果たしている。非特許文献１６を参照。更に、サイトカインは、他の細胞活性、例えば、腫瘍成長の抑制、生体消耗の促進、及びアポトーシス誘導等にも広く関与していると考えられている。非特許文献１７～２０を参照。しかし、これらタンパク質の機能機序は、殆ど不明である。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００５】
【非特許文献1】Ｇａｌｌｕｃｃｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １３，１１４－１１９（２００１）
【非特許文献2】Ｍａｔｚｉｎｇｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９６，３０１－３０５（２００２）
【非特許文献3】Ｈｉｒｓｉｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｄｉａｔｏｒｓ ｏｆ Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ，３１５９４１（２０１２）
【非特許文献4】Ｇｏｍｂａｕｌｔ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ３，４１４（２０１２）
【非特許文献5】Ｈｅｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉｅｎｃｅ ５，５７８（２０１４）
【非特許文献6】Ｓｈｉ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ １２０，１８０９－１８１１（２０１０）
【非特許文献7】Ｔｓｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２７６，４２５－４４３（２０１４）

【非特許文献８】Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８５，２４８－２５１（１９９９）
【非特許文献９】Ｔａｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ　４，８４１－８５２（２０１２）
【非特許文献１０】Ｄｉｎａｒｅｌｌｏ，Ａｎｎｕａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２７，５１９－５５０（２００９）
【非特許文献１１】Ｌｉｅｗ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１０，１０３－１１０（２０１０）
【非特許文献１２】Ｖｏｇｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　１３，１０４２－１０４９（２００７）
【非特許文献１３】Ａｕｓｔｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　９，２１１２－２１２３（２０１４）
【非特許文献１４】Ｓｒｉｋｒｉｓｈｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｅｏｐｌａｓｉａ　１１，６１５－６２８（２００９）
【非特許文献１５】Ｐｉｃｃｉｎｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｄｉａｔｏｒｓ　ｏｆ　Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ，ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１０／６７２３９５（２０１０）
【非特許文献１６】Ｄｉｎａｒｅｌｌｏ，Ｃｈｅｓｔ　１１８，５０３－５０８（２０００）
【非特許文献１７】Ｃｒｕｓｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｒｃｌｉｎｏｎｃ．２０１５．１０５（２０１５）
【非特許文献１８】Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓｉｇｎ，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｙ　９，２９４１－２９４６（２０１５）
【非特許文献１９】Ｖｉｌｌｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　４７７，９０－９４（２０１１）
【非特許文献２０】Ｅｃｋｈａｒｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　Ｄｉｓｅａｓｅ　５，ｅ１５６２（２０１４）

【発明の概要】

【０００６】

１つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５（インターフェロン誘導タンパク質３５ｋＤ）及び／又はＮＭＩ（Ｎ－Ｍｙｃ相互作用タンパク質）に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防する方法について本明細書に記載する。幾つかの実施形態では、前記方法は、かかる治療及び／又は予防を必要としている被験体に、前記被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤を有効量投与することを含む。

【０００７】

前述の実施形態のいずれかでは、前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害は、過剰な免疫応答に関連し得る。前述の実施形態のいずれかでは、前記疾患又は障害は、サイトカインストームに関連し得る。前述の実施形態のいずれかでは、前記疾患又は障害は、炎症、感染症、臓器損傷、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択することができる。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療するためのものであってよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を予防するためのものであってよい。

【０００８】

前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの発現及び／又は活性を阻害又は低減する分子（例えば、低分子又はポリペプチド）を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの発現及び／

又は活性を阻害又は低減する抗体又はその抗原結合断片を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩをコードしている遺伝子を標的とするポリヌクレオチド（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、又はｍｉＲＮＡ）を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩをコードしている遺伝子を標的とするアンチセンスポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスＲＮＡ）を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのオリゴマー化を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、インターフェロンの発現及び／又は活性を阻害又は低減してＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの発現及び／又は活性を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの分泌を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩとＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの細胞受容体との間の相互作用を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩとＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの細胞表面受容体との間の相互作用を阻害又は低減する分子を含んでいてよい。

【０００９】

前述の実施形態のいずれかでは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性の防止又は低減によって、炎症因子の発現及び／又は活性の阻害又は低減、及び／又はＮＦ－κＢシグナル伝達の阻害又は低減が生じ得る。１つの態様では、前記炎症因子は、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、及び／又はＣＤ８６を含み、前記ＮＦ－κＢシグナル伝達は、ＴＬＲ４等のＴＬＲによって媒介される。

【００１０】

前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、ＩＦＰ３５に特異的に結合する抗体若しくは抗原結合断片及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体若しくは抗原結合断片を含んでいてよい。１つの態様では、前記抗体又は抗原結合断片は、１以上のＮＩＤ（ＮＭＩ／ＩＦＰ３５ドメイン）に特異的に結合する。

【００１１】

前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤を投与することを更に含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、経口、経鼻、吸入、非経口（ｐａｒｅｎｔａｌ）、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、局所、又は直腸内経路を介して投与してよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、前記被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を有しない同等の被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性のレベルと実質的に同一のレベルまで低減する量で投与してよい。

【００１２】

前述の実施形態のいずれかでは、前記被験体は、哺乳類であってよい。幾つかの実施形態では、前記哺乳類は、ヒト又は非ヒト哺乳類であってよい。

【００１３】

別の態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬組成物について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記医薬組成物は、有効量の、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤と、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とを含む。前述の実施形態のいずれかでは、前記医薬組成物は、有効量の、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬を更に含んでいてよい。

【００１４】

更に別の態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬を製造するための、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減

する剤の有効量の使用について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害は、炎症、感染症、敗血症、臓器損傷、及び自己免疫疾患である。

【００１５】

更に別の態様では、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号２、配列番号４、配列番号６、又は配列番号８内のエピトープに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号２のアミノ酸８１～１７０、１７７～２６８、又は１３６～２１６内のエピトープに特異的に結合する。他の実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号４のアミノ酸８１～１６８、１７５～２６６、又は１３４～２１４内のエピトープに特異的に結合する。更に他の実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号６のアミノ酸１０４～１９３、２０２～２９３、又は１５１～２５０内のエピトープに特異的に結合する。他の実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号８のアミノ酸１０３～１９２、２０１～２９２、又は１５１～２４０内のエピトープに特異的に結合する。

【００１６】

別の態様では、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体又は抗原結合断片について本明細書に開示し、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含む。１つの実施形態では、前記抗体又は抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域と、配列番号１０に記載の軽鎖可変領域とを含む。

【００１７】

前述の実施形態のいずれかでは、前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、又は二重特異性抗体であってよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記抗原結合断片は、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ□）２断片、Ｆｖ断片、又はｓｃＦｖ断片であってよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記抗体又は抗原結合断片は、ヒト重鎖定常領域とヒト軽鎖定常領域とを更に含んでいてもよい。

【００１８】

前述の実施形態のいずれかでは、前記抗体又は抗原結合断片は、完全ヒト抗体若しくは抗原結合断片又はヒト化抗体若しくは抗原結合断片であってよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記抗体又は抗原結合断片は、組み換え的に産生してもよい。

【００１９】

１つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防する方法について本明細書に開示する。前記方法は、かかる治療及び／又は予防を必要としている被験体に、有効量の前述の実施形態のいずれかに係る抗体又は抗原結合断片を投与することを含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記疾患又は障害は、過剰な免疫応答に関連し得る。前述の実施形態のいずれかでは、前記疾患又は障害は、サイトカインストームに関連し得る。前述の実施形態のいずれかでは、前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害は、炎症、感染症、臓器損傷、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択してよい。前述の実施形態のいずれかでは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性の防止又は低減によって、炎症因子の発現及び／又は活性の阻害又は低減、及び／又はＮＦ－κＢシグナル伝達の阻害又は低減が生じ得る。１つの態様では、前記炎症因子は、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、及び／又はＣＤ８６を含み、前記ＮＦ－κＢシグナル伝達は、ＴＬＲ４等のＴＬＲによって媒介される。

【００２０】

１つの態様では、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体又はその抗原結

合断片をコードしている単離ポリヌクレオチドについて本明細書に開示する。幾つかの実施形態では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含む。幾つかの態様では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域と、配列番号１０に記載の軽鎖可変領域とを含む。

【００２１】

また、１つの態様では、前述の実施形態のいずれかに係るポリヌクレオチドを含む単離ベクターについて本明細書に開示する。また、別の態様では、前述の実施形態のいずれかに係るベクターを含む単離宿主細胞について本明細書に開示する。

【００２２】

別の態様では、以下からなる群から選択される宿主細胞について本明細書に開示する：（ａ）抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドと、抗体又はその抗原結合断片の軽鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドとを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び（ｂ）抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、抗体又はその抗原結合断片の軽鎖可変領域をコードしている配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターとで形質転換された宿主細胞。幾つかの実施形態では、前記抗体又は断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含む。前述の実施形態のいずれかでは、前記宿主細胞は、ＣＨＯ細胞等の真核細胞であってよい。

【００２３】

別の態様では、抗ＩＦＰ３５抗体若しくはその抗原結合断片及び／又は抗ＮＭＩ抗体若しくはその抗原結合断片を作製する方法について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記方法は、ａ）前記抗体又は抗原結合断片をコードしているポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で前述の実施形態のいずれか１つに記載の宿主細胞を培養することと、ｂ）前記抗体又は抗原結合断片を単離することとを含む。また、１つの態様では、前述の実施形態のいずれかに係る方法によって作製される抗体又は抗原結合断片について本明細書に開示する。

【００２４】

幾つかの実施形態では、（１）配列番号２のアミノ酸８１～１７０、１７７～２６８、若しくは１３６～２１６に記載の配列、又は（２）配列番号４のアミノ酸８１～１６８、１７５～２６６、若しくは１３４～２１４に記載の配列、又は（３）配列番号６のアミノ酸１０４～１９３、２０２～２９３、若しくは１５１～２５０に記載の配列、又は（４）配列番号８のアミノ酸１０３～１９２、２０１～２９２、若しくは１５１～２４０に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。

【００２５】

幾つかの実施形態では、配列番号２のアミノ酸８１～１７０、１７７～２６８、又は１３６～２１６に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号２の１４５位、１４７位、１５０位、１５１位、１７２位、１７３位、１７５位、１７７位、１８２位、１８８位、１９２位、２１２位、１９９位、２０１位、２０７位、２０８位、２１０位、２１４位、及び２１６位のアミノ酸残基（Ｓｅｒ１４５、Ａｒｇ１４７、Ｇｌｕ１５０、Ｇｌｕ１５１，Ａｓｐ１７２、Ｖａｌ１７３、Ｇｌｕ１７５、Ｌｅｕ１７７、Ｍｅｔ１８２、Ａｓｐ１８８、Ｇｌｎ１９２、Ａｒｇ２１２、Ｇｌｎ１９９、Ｔｈｒ２０１、Ｇｌｎ２０７、Ｇｌｎ２０８、Ｐｒｏ２１０、Ｓｅｒ２１４、及びＴｙｒ２１６）のうちの１以上が変異及び／又は修飾されている単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。幾つかの態様では、構造に基づく配列アラインメントによれ

ば、決定されたＩＦＰ３５　ＮＩＤ－Ｈドメイン構造の外側の左ＮＩＤドメインは、ＮＩＤ－Ｈに類似の構造を有する。配列番号２のＳｅｒ２３４、Ｌｅｕ２３６、Ａｒｇ１１０、Ａｒｇ１０８、Ａｒｇ２３３、Ｌｅｕ８２、Ｇｌｕ２６８、Ｔｈｒ２７１、Ｖａｌ２７３、Ｇｌｕ９２、Ａｓｐ８７、Ａｓｐ２４５、及びＧｌｙ２４６は、ＩＦＰ３５の決定されたＮＩＤドメイン構造における表面残基に対応する、左ＮＩＤドメインにおけるアミノ酸残基である。前述の実施形態のいずれかでは、前記変異は、ＩＦＰ３５受容体又はＩＦＰ３５に特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除することができる。

【００２６】

幾つかの実施形態では、配列番号４のアミノ酸８１～１６８、１７５～２６６、又は１３４～２１４に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号４の１４３位、１４５位、１４８位、１４９位、１７０位、１７２位、１７３位、１７５位、１８０位、１８６位、１９０位、２１０位、１９７位、１９９位、２０４位、２０５位、２０６位、２０８位、２１２位、及び２１４位のアミノ酸残基（Ｓｅｒ１４３、Ａｒｇ１４５、Ｇｌｕ１４８、Ｇｌｕ１４９、Ｇｌｕ１７０、Ａｒｇ１７２、Ｇｌｕ１７３、Ｌｅｕ１７５、Ｍｅｔ１８０、Ｇｌｕ１８６、Ｇｌｎ１９０、Ａｒｇ２１０、Ｇｌｎ１９７、Ａｒｇ１９９、Ａｒｇ２０４、Ｇｌｎ２０５、Ｇｌｎ２０６、Ｌｅｕ２０８、Ｓｅｒ２１２、及びＴｙｒ２１４）のうちの１以上が変異及び／又は修飾されている単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。前述の実施形態のいずれかでは、前記変異は、ＩＦＰ３５受容体又はＩＦＰ３５に特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除することができる。

【００２７】

幾つかの実施形態では、配列番号６のアミノ酸１０４～１９３、２０２～２９３、又は１５１～２５０に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号６の１０７位、１１２位、１１７位、１５９位、１７２位、１７３位、１９２位、１９７位、２１５位、２５６位、２６７位、及び２９２位のアミノ酸残基（Ｌｅｕ１０７、Ｌｙｓ１１２、Ｇｌｎ１１７、Ｌｙｓ１５９、Ｇｌｕ１７２、Ｇｌｕ１７３、Ｇｌｕ１９２、Ａｓｐ１９７、Ａｓｐ２１５、Ｌｙｓ２５６、Ａｓｐ２６７、及びＧｌｕ２９２）のうちの１以上が変異及び／又は修飾されている単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。前述の実施形態のいずれかでは、前記変異は、ＮＭＩ受容体又はＮＭＩに特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除することができる。

【００２８】

幾つかの実施形態では、配列番号８のアミノ酸１０３～１９２、２０１～２９２、又は１５１～２４０に記載の配列を含む、から本質的になる、又はからなる単離ポリペプチドであって、配列番号８の１０６位、１１１位、１１６位、１５８位、１７１位、１７２位、１９１位、１９６位、２１４位、２５５位、２６６位、及び２９１位のアミノ酸残基（Ｌｅｕ１０６、Ｌｙｓ１１１、Ｇｌｎ１１６、Ｌｙｓ１５８、Ｇｌｕ１７１、Ａｓｐ１７２、Ａｓｐ１９１、Ａｓｐ１９６、Ａｓｐ２１４、Ａｒｇ２５５、Ａｓｐ２６６、及びＡｓｐ２９１）のうちの１以上が変異及び／又は修飾されている単離ポリペプチドについて本明細書に開示する。前述の実施形態のいずれかでは、前記変異は、ＮＭＩ受容体又はＮＭＩに特異的な阻害抗体への前記ポリペプチドの結合を実質的に低減又は排除することができる。

【００２９】

１つの態様では、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリペプチドを含む医薬組成物について本明細書に開示する。幾つかの実施形態では、前記医薬組成物は、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤を含む。

【００３０】

１つの態様では、被験体において免疫応答を刺激する方法について本明細書に開示し、前記方法は、かかる刺激を必要としている被験体に、有効量の前述の実施形態のいずれか

１つに記載のポリペプチド又は医薬組成物を投与することを含む。１つの態様では、前記被験体は、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌を有する。別の態様では、前記増殖異常は、肉腫、扁平上皮癌、線維肉腫、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、ＣＮＳ癌、メラノーマ、卵巣癌、腎臓癌、前立腺癌、乳癌、肝臓癌、頭頸部癌、膵臓癌、膀胱癌、及び食道癌からなる群から選択される。前述の実施形態のいずれかでは、免疫反応応答の刺激は、炎症因子の発現及び／又は活性、免疫細胞（例えば、好中球）の動員、及び／又はＮＦ－κＢシグナル伝達の刺激を含んでいてよい。幾つかの態様では、炎症因子は、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、及び／又はＣＤ８６を含み、ＮＦ－κＢシグナル伝達は、ＴＬＲ４等のＴＬＲによって媒介される。前述の実施形態のいずれか１つでは、ＮＦ－κＢシグナル伝達の刺激は、リン酸化ＩκＢαの増加及び／又は全ＩκＢαの減少を含んでいてよい。

【００３１】

幾つかの態様では、被験体における免疫応答を活性化、促進、増大、及び／又は増強するための組成物及び方法を本明細書に提供する。本組成物及び方法を用いて、被験体における異常に低いレベルのＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質（例えば、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩ）に関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び／又は予防することができる。例えば、前記被験体における異常に低いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害は、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌であってよい。例示的な増殖異常としては、肉腫、扁平上皮癌、線維肉腫、子宮頸癌、胃癌、皮膚癌、白血病、リンパ腫、肺癌、例えば、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、結腸癌、ＣＮＳ癌、メラノーマ、卵巣癌、腎臓癌、前立腺癌、乳癌、肝臓癌、頭頸部癌、膵臓癌、膀胱癌、及び食道癌が挙げられる。

【００３２】

別の態様では、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリペプチドを含むポリペプチドをコードしている単離ポリヌクレオチドについて本明細書に開示する。更に別の態様では、前述の実施形態のいずれか１つに記載のポリヌクレオチドを含む単離ベクターについて本明細書に開示する。更に別の態様では、前述の実施形態のいずれか１つに記載のベクターを含む単離宿主細胞について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記宿主細胞は、ＣＨＯ細胞等の真核細胞である。幾つかの態様では、単離ポリヌクレオチドを作製する方法であって、ａ）前述の実施形態のいずれかに記載のポリペプチドを含むポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で前記宿主細胞を培養することと、ｂ）前記ポリペプチドを単離することとを含む方法について本明細書に開示する。

【００３３】

幾つかの態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングの方法について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記方法は、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性を評価することを含む。１つの実施形態では、前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害は、過剰な免疫応答に関連し得る。別の実施形態では、前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害は、サイトカインストームに関連する。前述の実施形態のいずれかでは、前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害は、炎症、感染症、臓器損傷、敗血症、及び自己免疫疾患からなる群から選択することができる。

【００３４】

前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を診断するために用いることができ、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性が、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害（

例えば、炎症、感染症、臓器損傷、敗血症、及び自己免疫疾患）を有しない同等の被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性よりも少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％高い場合、前記被験体が前記異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を有していることを示す。

【００３５】

前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベルを評価することを更に含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法は、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を評価することを含んでいてよい。前述の実施形態のいずれかでは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、及び／又はタンパク質のレベルで評価してよい。１つの態様では、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベルは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ又はＲＮＡにおける少なくとも１０の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いてＤＮＡ及び／又はＲＮＡのレベルで評価される。別の態様では、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベルは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体を用いてタンパク質レベルで評価される。

【００３６】

また、１つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングのキットについて本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記キットは、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性を評価するための手段を含む。

【００３７】

また、１つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断の方法について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記方法は、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態を決定することを含む。１つの態様では、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ又はＲＮＡにおける少なくとも１０の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いて決定される。

【００３８】

また、１つの態様では、被験体における異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断のキットについて本明細書に開示する。１つの態様では、前記キットは、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態を決定するための手段を含む。

【００３９】

１つの態様では、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの調節因子を同定する方法について本明細書に開示する。幾つかの態様では、前記方法は、ａ）ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩを試験物質と接触させ、前記試験物質と接触したＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を評価することと、ｂ）前記試験物質と接触していないＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を評価することと、ｃ）工程ａ）及びｂ）で評価したＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を比較し、工程ａ）及びｂ）で評価したＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性が異なる場合、前記試験物質をＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの調節因子として同定することとを含む。１つの

態様では、前記試験物質は、低分子、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの変異体及び／又は断片を含むポリペプチドライブラリ、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体、ポリヌクレオチド（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、又はアンチセンスＲＮＡ）である。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法を用いて、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性の阻害剤を同定することができる。前述の実施形態のいずれかでは、前記方法を用いて、被験体における異常なレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬を同定することができる。幾つかの態様では、前記異常なレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害は、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌である。幾つかの実施形態では、前記疾患又は障害（例えば、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌）は、異常に低いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質（例えば、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩ）に関連する。

【００４０】

また、幾つかの態様では、前述の実施形態のいずれか１つに記載の方法によって同定される医薬候補について本明細書に開示する。

【図面の簡単な説明】

【００４１】

【図１】図１は、ＮＩＤ－Ｈ（ヘテロ接合性ＮＩＤ）の結晶構造を示す。ａ．　ＩＦＰ３５のトランケート型及び推定ドメインを示し、配列中のドメイン間の境界に注釈をつける。ｂ．　ＩＦＰ３５二量体（閉構造二量体、ｃ－二量体）の構造、二次構造要素に注釈をつける。ｃ．　分子内相互作用に関与する残基を標識し、スティックで示す。明確性のために、相互作用の半分だけを示す。ｄ．　八量体の環構造、ここではモノマーを示す。ｅ．　ドメイン交換構造を有する二量体（開構造二量体、ｏ－二量体）を強調し、上方パネルにおける二次構造要素に注釈をつける。下方パネルに示す通りｃ－二量体由来のＮＩＤ－Ｈ分子をｏ－二量体に重ねる。

【図２】図２は、ＮＩＤ－Ｈの２つの安定凝集状態である二量体及び八量体を示す。ａ．　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ－２００（１６／６０又は１０／３０）カラム（ＧＥ）を用いたＮＩＤ－Ｈのサイズ排除クロマトグラフィー分析。２８０ｎｍにおけるＵＶ吸収を青色で示す。２つのピークの溶出体積は、７５ｍＬ及び９０ｍＬであり、これは、二量体及び八量体の形成を示唆する。ｂ．　八量体に重ねたｏ－二量体及びｃ－二量体。４つのｏ－二量体は、α１－α１相互作用を通じて互いに相互作用し、環様八量体構造を形成する。ｃ．　ＮＩＤ－ＨとＲＮＡ認識モチーフ（ＲＲＭ）との構造比較。これらの間のＲ．Ｍ．Ｓ．Ｄは、約１．３Åである。

【図３】図３は、ＮＩＤ－Ｈの開構造二量体（ｏ－二量体）が、免疫応答の刺激の原因であることを示す。ａ．　八量体ＮＩＤ－Ｈは、ＲＡＷ２６４．７細胞においてＴＮＦ－α及びＩＬ－１βの転写をアップレギュレートする。ＧＡＰＤＨを内部標準として用いて、ＲＴ－ＰＣＲによってＴＮＦ－α及びＩＬ－１βの細胞ｍＲＮＡを検出した。ｂ．　α１における二量体状態変異体であるＫ１５６Ｅ／Ｋ１６３Ｅ／Ｒ１６５Ｅは、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１βの転写を部分的にアップレギュレートする。ｃ．　Ｌ－ｚｉｐドメインを含まないＩＦＰ３５（ΔＮ）は、ＮＩＤ－Ｆ八量体よりも有効に免疫応答を刺激した。ｄ．　ＬＰＳと同様に、ΔＮは、ＲＡＷ２６４．７細胞のＴＮＦ－αの放出を有効に刺激することができた。４時間インキュベートした後の細胞培養物中のＴＮＦ－αレベルをＥＬＩＳＡによって決定した。

【図４】図４は、ヒト起源のＮＭＩタンパク質が、ＴＨＰ１細胞においてＴＮＦ－α及びＩＬ－１βの転写をアップレギュレートすることを示す。ＰＢＳバッファをネガティブコントロール（ＮＣ）として用いた。結果は、３つの独立した反復実験の平均として得た。エラーバーは、それらの間の標準偏差を示す。

【図５】図５は、ＩＦＰ３５が内因性ＤＡＭＰの特徴を有することを示す。ａ．　ＬＰＳで刺激されたＲＡＷ２６４．７細胞によって放出されたＩＦＰ３５。ＲＡＷ２６４．７マクロファージを１００ｎｇ／ｍＬのＬＰＳで前処理した。０時間、１時間、２時間、３時

間、５時間、９時間後の細胞溶解物及び上清をＩＦＰ３５、ＨＭＧＢ１、及びβ－アクチンのウエスタンブロットによって分析した。ｂ．　ＩＦＰ３５は、ＬＰＳ誘導性敗血症マウスの血清に蓄積される。ＬＰＳ注射の３時間後及び６時間後に、マウスにおけるＩＦＰ３５の血清濃度をＥＬＩＳＡによって測定した。ｃ．　ＩＦＰ３５は、敗血症患者の血清に蓄積される。このデータは、１２人の患者及び８人の正常個体の血清から得た。ｄ．　ＩｇＧ及びＩＦＰ３５モノクローナル抗体（抗ＮＩＤ－Ｈ）を投与した敗血症マウスの生存率を示す。マウスにＬＰＳを注射（ｉ．ｐ．）し、次いで、抗ＩＦＰ３５又はＩｇＧで処理した。動物の生存率を、ｎ＝１５頭／群で評価した。ｅ．　抗ＮＩＤ－Ｈの中和によって、ＥＬＩＳＡを用いて検出したＩＬ－６、ＴＮＦ－α、及びＩＬ－１β等の早期炎症性サイトカインの放出が減少した。ｆ．　ＬＰＳ及びＤ－ｇａｌで処理した野生型マウス（ｎ＝１２）及びＩＦＰ３５$^{-/-}$マウス（ｎ＝１２）の生存。ｇ．　ＩＦＰ３５ノックアウトマウスの血清における早期炎症性サイトカインの放出は、減少する。ＬＰＳ及びＤ－ｇａｌ注射の１時間後及び３時間後にＥＬＩＳＡによって測定したときのＩＦＰ３５$^{-/-}$マウス及び野生型マウスにおけるＩＬ－６、ＴＮＦ－α、及びＩＬ－１βの血清濃度。

【図６】図６は、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーが内因性ＤＡＭＰとして放出されることを示す。ａ．　１０ｎｇ／ｍＬのＩＮＦ－γで刺激されたＲＡＷ細胞によって放出されたＩＦＰ３５。ｂ．　サルモネラ菌（ＳＲ）で刺激されたＲＡＷ細胞によって放出されたＮＭＩ。ｃ及びｄ．　ＩＦＰ３５（パネルｃ）及びＮＭＩ（パネルｄ）の凝集状態を検出した。ＲＡＷ細胞をＳＲで刺激した後、細胞培養物を回収し、放出されたＩＦＰ３５ファミリーのメンバーをゲル濾過（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ－２００（１６／６０又は１０／３０）カラム、ＧＥ）及びウエスタンブロットによって検出した。ＩＦＰ３５の溶出体積は、パネルｃに示す通り、約９０ｍＬであり、これは、３５ｋＤのモノマーであることを示唆する。ＮＭＩは、ゲル濾過によって検出された複数の凝集状態を示した。その主な立体構造の溶出体積は、約７６ｍＬ～約８２ｍＬであり、これは、放出されたＮＭＩが溶液中で二量体として存在することを示す。ｅ．　ＬＰＳ注射の３時間後及び６時間後にＥＬＩＳＡによって測定したとき、ＮＭＩは、ＬＰＳ誘導性敗血症マウスの血清中に蓄積されている。ｆ．　ＮＭＩは、敗血症患者の血清中に蓄積される。８人の健常人及び１２人の敗血症患者から血清を得た。ＮＭＩの血清濃度は、ＥＬＩＳＡによって測定した。ｇ．　ＮＭＩノックアウトマウスは、ＬＰＳ曝露に対して耐性である。ＬＰＳを投与した野生型マウス（ＷＴ）（ｎ＝１４）及びＮｍｉ$^{-/-}$マウス（ＫＯ）（ｎ＝１４）の生存率を示す。ｈ．　Ｎｍｉ$^{-/-}$マウスの血清中のＩＬ－６、ＴＮＦ－α、及びＩＬ－１β等の炎症性サイトカインの放出は、減少する。ＷＴマウス及びＫＯマウスから得られた結果を、それぞれ、灰色及び黒色で示す。全ての結果は、独立に分析した複数の生物学的複製物によって確認された。

【図７】図７は、ＩＦＰ３５が、ＴＬＲ４／ＭＤ２／ＣＤ１４複合体に基づくサイトカインストームを刺激することを示す。ａ．　ＴＬＲ４、ＣＤ１４、ＭＤ２、及びＮＦ－κＢプロモータルシフェラーゼプラスミドでトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞株において、八量体ＮＩＤ－Ｈは、ＮＦ－κＢプロモータ活性を誘導した。トランスフェクトの２４時間後、（２５ｍｇ／ｍＬのポリミキシンＢの有り無しで）１０μｇ／ｍＬの八量体ＮＩＤ－Ｈ又は１００ｎｇ／ｍＬのＬＰＳで４時間細胞を刺激し、ルシフェラーゼ活性についてアッセイした。ＬＰＳによって誘発されるルシフェラーゼ活性は、グラム陰性菌感染症に対する有効な抗生物質であるポリミキシンＢによってブロックすることができる。ｂ．　精製ＩＦＰ３５（ΔＮ）、ＩＦＰ３５のＮ末端トランケート型、及びＬＰＳは、ＮＦ－κＢ及びＡＰ－１を誘導するが、ＩＲＦ３プロモータ活性は誘導しない。ルシフェラーゼ活性を有するＴＬＲ４、ＭＤ２、及びＣＤ１４、及びＮＦ－κＢプロモータ（又はＡＰ－１、ＩＲＦ３）の遺伝子をＨＥＫ２９３細胞に一過的にトランスフェクトした。ＩＦＰ３５は１μｇ／ｍＬで用い、一方、ポジティブコントロールとして１００ｎｇ／ｍＬのＬＰＳを投与した。

【図８】図８は、ＩＦＰ３５におけるタンデムＮＩＤドメインの構造モデルを示す。ａ及

びｂ．　ＡとＡ’及びＢとＢ’の二次構造要素及び配列アラインメントをパネルａに示す。同一残基を「＊」で標識し、一方、類似の特徴を有する残基を「：」又は「．」で標識する。パネルａにおいて四角で強調したＮＩＤ－Ｈ構造の疎水性コアにおける残基をパネルｂに示す。ｃ．　タンデムＮＩＤの二重バレル構造。Ｂ’部を緑色で示し、Ａ’部をシアン色で示す。ＮＩＤ－Ｈ構造を紫色で示す。

【図９】図９は、ＣｌｕｓｔａｌＷによって作成したＩＦＰ３５及びＮＭＩの配列アラインメントを示す。同一残基を「＊」で標識し、一方、類似の特徴を有する残基を「：」又は「．」で標識する。ＮＭＩの二次構造要素をＰｓｉＰｒｅｄによって予測する。α－ヘリックス及びβ－ストランドを、それぞれ、赤色及び黄色で示す。ＩＦＰ３５のＮＩＤドメインと平行な２つのＮＩＤドメインを標識し、四角で強調する。

【図１０】図１０は、ＩＦＰ３５タンパク質の精製プロセスを示す。

【図１１】図１１は、様々なオリゴマー状態のＩＦＰ３５を示す。

【図１２】図１２は、ＩＦＰ３５－ＮＩＤの結晶を示す。

【図１３】図１３は、二量体ＩＦＰ３５－ＮＩＤの構造を示す。

【図１４】図１４は、八量体ＩＦＰ３５－ＮＩＤの構造を示す。

【図１５】図１５は、ドメイン交換構造を有する二量体の構造を示す。

【図１６】図１６は、幾つかの領域の残基を示す。

【図１７】図１７は、組み換えＮＭＩの精製を示す。

【図１８】図１８は、サルモネラ菌によって刺激したときのＩＦＰ３５の発現レベルを明らかにする。

【図１９】図１９は、免疫蛍光法によって測定したとき、ＩＦＰ３５の量が経時的に変化したことを示す。

【図２０】図２０は、細胞にウイルスを感染させたとき、様々な期間に培地に分泌されたＩＦＰ３５の量を示す。

【図２１】図２１は、マウス腹膜炎モデルを示す。

【図２２】図２２は、炎症を刺激するプロセス中の様々なオリゴマー状態のＩＦＰ３５の寄与を示す。

【図２３】図２３は、フローサイトメトリー分析の結果を示し、これは、八量体ＩＦＰ３５－ｎｉｄが多量の好中性顆粒球を動員できることを示す。

【図２４】図２４は、外因性八量体ＩＦＰ３５－ＮＩＤが、マクロファージにおいてＮＦ－κＢ経路を刺激できることを示す。

【図２５】図２５は、ＩＦＰ３５がｍｙｄ８８シグナル伝達経路を介して炎症を刺激できることを示す。

【図２６】図２６は、ＩＦＰ３５によって誘導したとき、ＷＴマウス、ＴＬＲ９－／－マウス、及びＴＬＲ４－／－マウスにおけるＩＬ－１β及びＴＮＦのレベルを示す。

【図２７】図２７Ａは、敗血症マウスの血清中のＩＦＰ３５の量を示す。図２７Ｂは、ＩＦＰ３５モノクローナル抗体を投与したとき、敗血症マウスの生存率が上昇したことを示す。

【図２８】図２８は、マウスにおいて、ＩＦＰ３５をブロックすることによって、ＬＰＳによって誘導されるＩＬ－６の放出が減少したことを示す。

【図２９】図２９は、サルモネラ菌によって刺激したＴｈｐ１細胞の細胞溶解物及び上清中のＮＭＩの量を示す。

【図３０】図３０は、マウス起源のＮＭＩタンパク質がＴｈｐ１細胞におけるＴＨＦα及びＩＬ－１βの転写をアップレギュレートできることを証明する。

【図３１】図３１は、凝集状態のＮＭＩの検出を示す。

【図３２】図３２は、ヒトＩＦＰ３５の二次構造予測を示す。

【図３３Ａ】図３３Ａは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。

【図３３Ｂ】図３３Ｂは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。

【図３３Ｃ】図３３Ｃは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。

【図３３Ｄ】図３３Ｄは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。

【図３３Ｅ】図３３Ｅは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｆ】図３３Ｆは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｇ】図３３Ｇは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｈ】図３３Ｈは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｉ】図３３Ｉは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｊ】図３３Ｊは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｋ】図３３Ｋは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｌ】図３３Ｌは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｍ】図３３Ｍは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｎ】図３３Ｎは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｏ】図３３Ｏは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｐ】図３３Ｐは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｑ】図３３Ｑは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３３Ｒ】図３３Ｒは、ＮＩＤ－Ｈ二量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ａ】図３４Ａは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｂ】図３４Ｂは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｃ】図３４Ｃは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｄ】図３４Ｄは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｅ】図３４Ｅは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｆ】図３４Ｆは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｇ】図３４Ｇは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｈ】図３４Ｈは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｉ】図３４Ｉは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｊ】図３４Ｊは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｋ】図３４Ｋは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｌ】図３４Ｌは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｍ】図３４Ｍは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｎ】図３４Ｎは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｏ】図３４Ｏは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｐ】図３４Ｐは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｑ】図３４Ｑは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｒ】図３４Ｒは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｓ】図３４Ｓは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｔ】図３４Ｔは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｕ】図３４Ｕは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。
【図３４Ｖ】図３４Ｖは、ＮＩＤ－Ｈ八量体の結晶構造座標を示す。

【発明を実施するための形態】

【００４２】

Ａ．　一般技術

本発明の実施には、特に指定しない限り、分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、免疫学、及び薬理学の従来の技術を使用し、これらは、当技術分野における技能の範囲内である。かかる技術は、例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄ.（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ.，１９８９）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ，ｅｄ.，１９８４）；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ.，１９８７）；Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ.）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ.，ｅｄｓ.，１９８７，及び定期的最新版）；ＰＣＲ：Ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ（Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ.，ｅｄｓ.，１９９

４）；及びRemington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed.,（Lippincott, Williams & Wilkins ２００３）等の文献に十分説明されている。

【００４３】

定義

特に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者が一般的に理解しているのと同じ意味を有する。本明細書に引用する全ての特許、特許出願（公開又は未公開）、及び他の刊行物は、参照することによって全文が援用される。この項に記載する定義が、参照することによって本明細書に援用される特許、特許出願、公開された出願、及び他の刊行物に記載されている定義に反するか又はその他の点で一致しない場合、参照することによって本明細書に援用される定義よりもこの項に記載する定義が優先される。

【００４４】

本明細書で使用するとき、「ａ」又は「ａｎ」は、「少なくとも１つの」又は「１以上」を意味する。

【００４５】

用語「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書において互換的に用いられ、任意の長さのアミノ酸、例えば、少なくとも５アミノ酸、６アミノ酸、７アミノ酸、８アミノ酸、９アミノ酸、１０アミノ酸、２０アミノ酸、３０アミノ酸、４０アミノ酸、５０アミノ酸、１００アミノ酸、２００アミノ酸、３００アミノ酸、４００アミノ酸、５００アミノ酸、１，０００アミノ酸、又はそれ以上のアミノ酸のポリマーを指す。前記ポリマーは、直鎖状であっても分枝状であってもよく、修飾アミノ酸を含んでいてもよく、非アミノ酸が割り込んでいてもよい。また、前記用語は、天然に又は介入によって、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、又は標識成分とのコンジュゲーション等の任意の他の操作若しくは修飾によって修飾されているアミノ酸ポリマーも包含する。また、例えば、アミノ酸の１以上のアナログ（例えば、非天然アミノ酸等を含む）及び当技術分野において公知の他の修飾を含有するポリペプチドも本定義の範囲に含まれる。

【００４６】

本明細書で使用するとき、用語「変異体」は、親ポリペプチド配列とある程度のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドに関して用いられる。変異体は、親配列と類似しているが、そのアミノ酸配列中に、前記アミノ酸配列を親ポリペプチドの配列と異ならしめる少なくとも１つの置換、欠失、又は挿入を有する。更に、変異体は、親ポリペプチドの機能的特徴を保持し得る、例えば、親ポリペプチドの生物活性の少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、又は９９％を維持する。

【００４７】

「抗体」は、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも１つの抗原認識部位を通して標的（例えば、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド等）に特異的に結合することができる免疫グロブリン分子であり、任意のクラスの免疫グロブリン、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、及びＩｇＥであってよい。ニワトリ等の鳥類の種における主な抗体の種類であるＩｇＹもこの定義に含まれる。本明細書で使用するとき、この用語は、インタクトなポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体だけではなく、その断片（例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ）、単鎖（ＳｃＦｖ）、その変異体、自然界に存在する変異体、必要な特異性を有する抗原認識部位と共に抗体の一部を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、及び必要な特異性を有する抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾構造も包含する。

【００４８】

本明細書で使用するとき、用語「抗原」は、その抗原認識部位を通して抗体と特異的に結合する標的分子を指す。抗原は、一価であってもよく、多価であってもよい、即ち、１以上の抗体によって認識される１以上のエピトープを有していてもよい。抗体によって認

識され得る抗原の種類の例としては、ポリペプチド、オリゴ糖、糖タンパク質、ポリヌクレオチド、脂質等が挙げられる。

【００４９】

本明細書で使用するとき、用語「エピトープ」とは、抗原の一部、例えば、少なくとも約３～約５、好ましくは約５～約１０又は約１５、且つ約１，０００以下のアミノ酸（又はこれらの間の任意の整数）のペプチド配列等を指し、これは、単独で又はより大きな配列の一部として、かかる配列に応答して産生される抗体に結合する配列を規定する。断片の長さに臨界上限はなく、例えば、抗原配列の略全長、又は更には標的抗原由来の２以上のエピトープを含む融合タンパク質も含まれ得る。本発明において使用するためのエピトープは、それが由来する親タンパク質の一部の正確な配列を有するペプチドに限定されるものではなく、ネイティブ配列と同一の配列、並びに欠失、付加、及び置換等のネイティブ配列に対する修飾（自然界において保存的）も包含する。

【００５０】

本明細書で使用するとき、用語「特異的に結合する」とは、特定の結合対の結合特異性を指す。他の潜在的標的の存在下で特定の標的が抗体によって認識されることは、かかる結合の１つの特徴である。特異的結合には、２つの異なる分子が関与し、前記分子のうちの１つが化学的又は物理的な手段を介して第２の分子に特異的に結合する。前記２つの分子は、類似の特徴を有する他のアッセイ成分と結合パートナーとを区別することができるように互いに結合するという意味で関連している。結合成分対のメンバーは、リガンド及び受容体（抗リガンド）、特異的結合対（ＳＢＰ）メンバー及びＳＢＰパートナー等と称される。また、分子は、分子の凝集体についてのＳＢＰパートナーであってもよく、例えば、第２の抗体の免疫複合体に対する抗体及びその対応する抗原は、免疫複合体についてのＳＢＰメンバーであるとみなしてよい。

【００５１】

本明細書で使用するとき、「タグ」又は「エピトープタグ」とは、典型的にはポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に付加されるアミノ酸の配列を指す。ポリペプチドに融合しているタグを含むことによって、ポリペプチドの精製及び／又は検出を容易にすることができる。典型的には、タグ又はタグポリペプチドは、抗体によって認識されるエピトープを提供するのに十分な残基を有するか又は検出若しくは精製に役立ち得るが、それが結合しているキメラポリペプチドの活性には干渉しないように十分に短いポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、典型的には、十分に独特であるので、それに特異的に結合する抗体は、前記タグポリペプチドに結合しているポリペプチドにおけるエピトープとは実質的に交差反応しない。好適なタグポリペプチドは、一般的には、少なくとも５アミノ酸残基又は６アミノ酸残基、通常、約８アミノ酸残基～約５０アミノ酸残基、典型的には、９残基～３０残基を有する。タグは、多量体中の１以上のキメラポリペプチドに結合することができ、前記多量体の検出又はサンプル若しくは混合物からの回収を可能にすることができる。かかるタグは、周知であり、容易に合成及び設計することができる。例示的なタグポリペプチドとしては、アフィニティ精製に用いられるものが挙げられ、例えば、Ｈｉｓタグ、インフルエンザ血球凝集素（ＨＡ）タグポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５；ｃ－ｍｙｃタグ並びにそれに対する抗体８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７、及び９Ｅ１０；並びに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ及びその抗体が挙げられる。例えば、Ｆｉｅｌｄ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．８：２１５９－２１６５；Ｅｖａｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３６１０－３６１６；Ｐａｂｏｒｓｋｙ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ３：５４７－５５３を参照。

【００５２】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、本明細書において互換的に用いられ、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、ＤＮＡ及びＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド若しくは塩基、及び／又はこれらのアナログ、或いはＤＮＡ又はＲＮＡポリメラーゼによってポリマーに組み込むこと

ができる任意の基質であってよい。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチド及びそのアナログを含んでいてよい。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリ前又は後に付与してよい。ヌクレオチドの配列に非ヌクレオチド成分が割り込んでいてもよい。ポリヌクレオチドは、例えば、標識成分とのコンジュゲーション等によって、重合後に更に修飾されてもよい。他の種類の修飾としては、例えば、「キャップ」、天然ヌクレオチドのうちの１以上のアナログによる置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等）及び荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）を有するもの、ペンダント部分、例えば、タンパク質を含有するもの（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ｐｌｙ－Ｌ－リジン等）、介入物を有するもの（例えば、アクリジン、プソラレン等）、キレート剤を含有するもの（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等）、アルキル化剤を含有するもの、修飾結合を有するもの（例えば、アルファアノマー核酸等）、並びにポリヌクレオチドの非修飾形態が挙げられる。更に、糖中に通常存在するヒドロキシル基のいずれかを、例えば、ホスホン酸基、リン酸基で置換してもよく、標準的な保護基によって保護してもよく、活性化して更なるヌクレオチドに対する更なる結合を調製してもよく、固体支持体にコンジュゲートしてもよい。５’及び３’末端のＯＨは、リン酸化してもよく、アミン又は１個～２０個の炭素原子の有機キャッピング基部分で置換してもよい。他のヒドロキシルを標準的な保護基に誘導体化してもよい。また、ポリヌクレオチドは、例えば、２’－Ｏ－メチル－２’－Ｏ－アリル、２’－フルオロ－又は２’－アジド－リボース、炭素環式糖アナログ、α－アノマー糖、エピマー糖（例えば、アラビノース、キシロース、又はリキソース）、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、アクリルアナログ及び無塩基ヌクレオシドアナログ（例えば、メチルリボシド）を含む、当技術分野において一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖のアナログ形態を含有していてもよい。１以上のホスホジエステル結合を別の結合基によって置換してもよい。これら別の結合基としては、ホスフェートがＰ（Ｏ）Ｓ（「チオエート」）、Ｐ（Ｓ）Ｓ（「ジチオエート」）、「（Ｏ）ＮＲ２（「アミデート」）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ’、ＣＯ、又はＣＨ２（「ホルムアセタール」）（式中、各Ｒ又はＲ’は、独立して、Ｈ又は任意でエーテル（－－Ｏ－－）結合を含有する置換若しくは非置換のアルキル（１～２０Ｃ）、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、若しくはアラルジルである）によって置換されている実施形態が挙げられるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドにおける全ての結合が同一である必要はない。前述の記載は、ＲＮＡ及びＤＮＡを含む、本明細書において言及する全てのポリヌクレオチドに当てはまる。

【００５３】

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で使用するとき、一般的に、一般的に約２００ヌクレオチド長未満であるが必ずしもそうではない、短く、一般的に一本鎖の、一般的に合成のポリヌクレオチドを指す。用語「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、互いに排他的ではない。ポリヌクレオチドに関する上の記載は、オリゴヌクレオチドにも等しく且つ完全に適用可能である。

【００５４】

本明細書で使用するとき、用語「ホモログ」は、天然核酸に対する軽微な変更によって天然核酸（例えば、「プロトタイプ」又は「野生型」核酸）とは異なるが、天然形態の基本ヌクレオチド構造は維持している核酸を指すために用いられる。かかる変化としては、欠失（例えば、核酸のトランケートバージョン）、挿入、及び／又は置換を含む、１個又は数個のヌクレオチドの変化が挙げられるが、これらに限定されない。ホモログは、天然核酸と比べて強化された、低下した、又は実質的に同様の特性を有していてよい。ホモログは、天然核酸に対して相補的であってもよく、天然核酸と一致していてもよい。ホモログは、組み換えＤＮＡ技術、化学合成等を含むがこれらに限定されない、核酸を生成するための当技術分野において公知の技術を用いて生成することができる。

【００５５】

本明細書で使用するとき、「実質的に相補的であるか又は実質的に一致している」とは、２つの核酸配列が少なくとも９０％の配列同一性を有することを意味する。好ましくは、前記２つの核酸配列は、少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する。或いは、「実質的に相補的であるか又は実質的に一致している」とは、２つの核酸配列が高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得ることを意味する。

【００５６】

一般に、ハイブリッドの安定性は、イオン濃度及び温度の関数である。典型的には、ハイブリダイゼーション反応は、より低ストリンジェンシー条件下で実施され、次いで、様々であるが、より高ストリンジェンシーで洗浄される。中ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、プローブ等の核酸分子を相補的核酸分子に結合させることができる条件を指す。ハイブリダイズした核酸分子は、一般的に、少なくとも６０％の同一性（例えば、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、又は９５％の同一性のいずれか）を有する。中ストリンジェンシー条件は、４２℃にて５０％ホルムアミド、５×デンハルト液、５×ＳＳＰＥ、０．２％ＳＤＳ中でハイブリダイズさせ、次いで、４２℃にて０．２×ＳＳＰＥ、０．２％ＳＤＳ中で洗浄するのと等価な条件である。高ストリンジェンシー条件は、例えば、４２℃にて５０％ホルムアミド、５×デンハルト液、５×ＳＳＰＥ、０．２％ＳＤＳ中でハイブリダイズさせ、次いで、６５℃にて０．１×ＳＳＰＥ及び０．１％ＳＤＳ中で洗浄することによって提供され得る。低ストリンジェンシー条件は、２２℃にて１０％ホルムアミド、５×デンハルト液、６×ＳＳＰＥ、０．２％ＳＤＳ中でハイブリダイズさせ、次いで、３７℃にて１×ＳＳＰＥ、０．２％ＳＤＳ中で洗浄するのと等価な条件を指す。デンハルト液は、１％Ｆｉｃｏｌｌ、１％ポリビニルピロリドン、及び１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する。２０×ＳＳＰＥ（塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ））は、３M塩化ナトリウム、０．２Mリン酸ナトリウム、及び０．０２５M（ＥＤＴＡ）を含有する。他の好適な中ストリンジェンシー及び高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションバッファ及び条件は、当業者に周知である。

【００５７】

本明細書で使用するとき、用語「ＲＮＡ干渉」又は「ＲＮＡｉ」は、一般的に、二本鎖ＲＮＡ分子又はショートヘアピンＲＮＡ分子が、前記二本鎖ＲＮＡ分子又はショートヘアピンＲＮＡ分子と実質的に又は完全に相同性を共有している核酸配列の発現を低減又は阻害するプロセスを指す。用語「低分子干渉ＲＮＡ」又は「ｓｉＲＮＡ」又は「ＲＮＡｉ剤」は、ＲＮＡ干渉を誘発する約１０ヌクレオチド～約５０ヌクレオチド（又はヌクレオチドアナログ）を含むＲＮＡ（又はＲＮＡアナログ）配列を指す。Ｋｒｅｕｔｚｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、国際公開第００／４４８９５号パンフレット；Ｚｅｒｎｉｃｋａ－Ｇｏｅｔｚ　ｅｔ　ａｌ．、国際公開第０１／３６６４６号パンフレット；Ｆｉｒｅ、国際公開第９９／３２６１９号パンフレット；Ｍｅｌｌｏ　＆　Ｆｉｒｅ、国際公開第０１／２９０５８号パンフレットを参照。本明細書で使用するとき、ｓｉＲＮＡ分子は、化学的に修飾されたヌクレオチド及び非ヌクレオチドを包含するＲＮＡ分子を含む。用語「ｄｄＲＮＡｉ剤」は、外来ベクターから転写されるＤＮＡ指向性ＲＮＡｉ剤を指す。用語「ショートヘアピンＲＮＡ」又は「ｓｈＲＮＡ」は、二本鎖領域及びループ領域を有するＲＮＡ構造を指す。特定の実施形態では、ｄｄＲＮＡｉ剤は、最初にｓｈＲＮＡとして発現する。

【００５８】

本明細書で使用するとき、「ベクター（又はプラスミド）」は、異種ＤＮＡを発現又は複製するために前記異種ＤＮＡを細胞に導入するために用いられる分離したエレメントを指す。かかるビヒクルの選択及び使用は、当業者に周知である。発現ベクターとしては、ＤＮＡ断片を発現させることができる制御配列（例えば、プロモータ領域）と機能的に連結されているＤＮＡを発現させることができるベクターが挙げられる。したがって、発現ベクターは、プラスミド、ファージ、組み換えウイルス、又は適切な宿主細胞に導入された際にクローニングされたＤＮＡを発現させる他のベクター等の組み換えＤＮＡ又はＲＮ

Ａコンストラクトを指す。適切な発現ベクターは、当業者に周知であり、例えば、真核細胞及び／又は原核細胞において複製可能なもの、並びにエピソームが残存しているもの、又は宿主細胞のゲノムに組み込まれるものが挙げられる。

【００５９】

本明細書で使用するとき、「プロモータ領域又はプロモータエレメント」は、それが機能的に連結しているＤＮＡ又はＲＮＡの転写を制御するＤＮＡ又はＲＮＡのセグメントを指す。プロモータ領域は、ＲＮＡポリメラーゼを認識し、結合し、転写を開始させるのに十分な特異的配列を含む。プロモータ領域のこの部分は、プロモータと称される。更に、プロモータ領域は、ＲＮＡポリメラーゼの認識、結合、及び転写開始活性を調節する配列を含む。これら配列は、シス作用性であってもよく、トランス作用性因子に対して応答性であってもよい。プロモータは、制御の性質に依存して、構成的であっても制御されていてもよい。原核生物において使用することが企図される例示的なプロモータとしては、バクテリオファージＴ７及びＴ３プロモータ等が挙げられる。

【００６０】

本明細書で使用するとき、「機能的に連結しているか又は機能可能に結合している」とは、ＤＮＡとヌクレオチドの制御配列及びエフェクタ配列（例えば、プロモータ、エンハンサー、転写及び翻訳停止部位、並びに他のシグナル配列）との機能的関係を指す。例えば、ＤＮＡのプロモータへの機能的連結とは、かかるＤＮＡの転写が、前記ＤＮＡを特異的に認識し、結合し、転写するＲＮＡポリメラーゼによってプロモータから開始されるような、ＤＮＡとプロモータとの物理的及び機能的な関係を指す。発現及び／又はインビトロ転写を最適化するために、余分な潜在的に不適切な別の翻訳開始（即ち、読み始め）コドン又は転写若しくは翻訳のレベルで発現に干渉にし得るか若しくは発現を減少させ得る他の配列を除去するためにクローンの５’非翻訳部分を除去、付加、又は変更することが必要になる場合もある。或いは、コンセンサス部位を開始コドンの直ぐ５’側に挿入し、発現を増強してもよい。例えば、Ｋｏｚａｋ（１９９１）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６６：１９８６７－１９８７０を参照。かかる修飾の望ましさ（又は必要性）は、経験的に決定することができる。

【００６１】

「処置」又は「治療」又は「緩和」は、標的とする病状又は障害を治癒させることも前記病状の再発を予防することもないとしても、減速（軽減）を目的とする治療的処置を指す。治療量の治療剤が投与されたか又は処置を受けた後、被験体が特定の疾患の１以上の徴候及び症状の観察可能及び／又は測定可能な減少を示すか又は前記徴候及び症状がなくなった場合、被験体は成功裏に「治療」されている。疾患の徴候又は症状の減少は、患者も感じることができる。また、患者が不変を経験した場合、治療されたと考えられる。幾つかの実施形態では、治療剤による治療は、治療後３ヶ月間、好ましくは６ヶ月間、より好ましくは１年間、更により好ましくは治療後２年間以上、患者を無症候とするのに有効である。治療の成功及び疾患の改善を評価するためのこれらパラメータは、当技術分野において適切な技能を有する医師によく知られている常法によって容易に測定可能である。幾つかの実施形態では、「治療」は、病態、障害、又は疾患の症状が寛解するか又は他の点で有利に変化する任意の方法を意味する。また、治療は、本明細書における組成物の任意の薬学的使用も包含する。幾つかの実施形態では、特定の医薬組成物の投与による特定の障害の症状の「寛解」とは、前記組成物の投与に起因するか又は関連する任意の軽減（永続的であろうと一時的であろうと）を指す。

【００６２】

本明細書で用いられる用語「予測」又は「予後」は、患者が薬物又は薬物セットに対して好ましい又は好ましくない応答を示す可能性、或いは可能性のある疾患の転帰を指す。１つの実施形態では、予測は、これら応答又は転帰の程度に関する。１つの実施形態では、予測は、患者が、疾患が再発することなしに治療（例えば、特定の治療剤による治療）後特定の期間生存又は好転するかどうか及び／又はその可能性に関する。本発明の予測方法は、任意の特定の患者について最も適切な治療法を選択することによって治療決定を行

うために臨床的に使用することができる。本発明の予測方法は、患者が治療レジメン（例えば、所与の治療剤又は組み合わせ物の投与、外科的介入、ステロイド治療等を含む所与の治療レジメン）に対して好ましい応答を示す可能性があるかどうかを予測する有用なツールである。

【００６３】

本明細書で使用するとき、用語「薬学的に許容し得る担体」は、医薬投与に適合する任意の及び全ての溶媒、分散媒体、コーティング、等張剤、及び吸収遅延剤等を含むことを意図する。薬学的活性物質にかかる媒体及び剤を使用することは当技術分野において周知である。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ，Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２０ｔｈ ｅｄ．，（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ ２００３）を参照。任意の従来の媒体又は剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、前記組成物におけるかかる使用が企図される。

【００６４】

「薬学的に許容し得る塩」は、非毒性であり、生物学的に耐容性であるか又は他の点で被験体に投与するのに生物学的に適している、本明細書に記載する化合物の遊離酸又は塩基の塩を意味することを意図する。概要については、Ｂｅｒｇｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．，１９７７，６６，１－１９を参照。好ましい薬学的に許容し得る塩は、薬理学的に有効であり、且つ過度の毒性も刺激もアレルギー反応もなしに被験体の組織と接触させるのに好適なものである。本明細書に記載する化合物は、十分に酸性の基、十分に塩基性の基、両種の官能基、又は各種のうちの１超を有してよく、したがって、多数の無機又は有機塩基、並びに無機及び有機酸と反応して薬学的に許容し得る塩を形成することができる。

【００６５】

薬学的に許容し得る塩の例としては、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、リン酸塩、リン酸一水素塩、リン酸二水素塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソ酪酸塩、カプロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオン酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン－１，４－ジオエート、ヘキシン－１，６－ジオエート、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、スルホン酸塩、メチルスルホン酸塩、プロピルスルホン酸塩、ベシル酸塩、キシレンスルホン酸塩、ナフタレン－１－スルホン酸塩、ナフタレン－２－スルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、γ－ヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、及びマンデル酸塩が挙げられる。

【００６６】

本明細書で使用するとき、用語「治療有効量」又は「有効量」は、単独で又は更なる治療剤と併用して細胞、組織、又は被験体に投与したとき、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を予防するか又は寛解させるのに有効な治療剤の量を指す。治療有効用量は、更に、症状の寛解、例えば、関連する病状の治療、治癒、予防、又は寛解、或いは、かかる病状の治療、治癒、予防、又は寛解の速度増大に十分な治療剤の量を指す。単独で投与される個々の活性成分に適用するとき、治療有効用量は、その成分のみを指す。組み合わせ物に適用するとき、治療有効用量は、連続して併用投与しようと、同時に併用投与しようと、治療効果をもたらす活性成分の合計量を指す。幾つかの実施形態では、「特定の疾患を治療するための化合物の有効量」は、疾患に関連する症状を寛解させるか又は何らかの方法で低減するのに十分な量である。かかる量は、単回投与量として投与されてもよく、レジメンに従って投与されてもよく、それによって有効になる。前記量は、疾患を治癒させる場合もあるが、典型的には、疾患の症状を寛解させるために投与される。症状の所望の寛解を達成するために反復投与が必要になる場合もある。

【００６７】
用語「組み合わせ物」は、１つの単位剤形中の固定組み合わせ物を指すか、又は化合物及び組み合わせパートナー（例えば、「治療剤」又は「助剤」とも称される、以下に説明する別の薬物）を独立して同時に又は時間間隔内に別々に投与する場合、特に、これら時間間隔によって前記組み合わせパートナーが共同的効果、例えば、相乗効果を示すことができる場合、併用投与するためのキットオブパーツを指す。用語「同時投与」又は「併用投与」等は、本明細書で使用するとき、選択された組み合わせパートナーのそれを必要としている単一被験体（例えば、患者）への投与を包含することを意味し、必ずしも前記剤を同じ投与経路によって又は同時に投与しなくてもよい治療レジメンを含むことを意図する。用語「医薬組み合わせ物」は、本明細書で使用するとき、１超の活性成分を混合するか又は合わせることによって得られる生成物を意味し、活性成分の固定組み合わせ物及び非固定組み合わせ物の両方を含む。用語「固定組み合わせ物」は、活性成分、例えば、化合物及び組み合わせパートナーの両方を単一の実体又は剤形の形態で同時に患者に投与することを意味する。用語「非固定組み合わせ物」は、活性成分、例えば、化合物及び組み合わせパートナーの両方を、特に時間を限定することなしに同時に、一斉に、又は逐次別々の実体として患者に投与することであって、かかる投与によって、患者の体内において２つの化合物が治療有効レベルになることを意味する。また、後者は、カクテル療法、例えば、３以上の活性成分の投与にも適用される。

【００６８】
本明細書で使用するとき、「生物学的サンプル」とは、生体若しくはウイルス起源、又は巨大分子及び生体分子の他の起源から得られる任意のサンプルを指し、それから核酸又はタンパク質又は他の巨大分子を得ることができる被験体の任意の細胞型又は組織を含む。生物学的サンプルは、生物源から直接得られたサンプルであってもよく、加工されたサンプルであってもよい。例えば、増幅された単離核酸は、生物学的サンプルを構成する。生物学的サンプルとしては、動物及び植物由来の体液（例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿、及び汗）、組織、及び臓器のサンプル、並びにこれらに由来する加工サンプルが挙げられるが、これらに限定されない。

【００６９】
用語「レベル」は、標的、例えば、タンパク質又はポリヌクレオチドの存在又は量を指すために用いられ、定性的に又は定量的に決定することができる。標的、タンパク質、又はポリヌクレオチドのレベルにおける「定性的」変化は、正常コントロールから得られたサンプル中において検出不可能であるか又は存在する標的、タンパク質、又はポリヌクレオチドの出現又は消失を指す。１以上の標的、タンパク質、又はポリヌクレオチドのレベルにおける「定量的」変化は、健常コントロールと比較したときの、前記標的、タンパク質、又はポリヌクレオチドのレベルにおける測定可能な増加又は減少を指す。

【００７０】
「健常コントロール」又は「正常コントロール」は、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害に罹患していない個体から採取された生物学的サンプルである。「ネガティブコントロール」は、アッセイで検出されるように設計された特定のアナライトを全く含まないので、前記アッセイの参照ベースラインを与えるサンプルである。

【００７１】
本明細書で使用するとき、「哺乳類」は、哺乳類綱の種のいずれかを指す。多くの場合、用語「哺乳類」は、本明細書で使用するとき、ヒト、ヒト被験体、又はヒト患者を指す。また、「哺乳類」は、非ヒト哺乳類綱の種のいずれか、例えば、実験用、愛玩用、又は家畜用の非ヒト哺乳類を指す。例示的な非ヒト哺乳類としては、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サル、ゴリラ、及びチンパンジーが挙げられる。

【００７２】
本明細書で使用するとき、「組み換え手段による生成」とは、クローニングされた核酸

がコードしているタンパク質を発現させるための分子生物学の周知の方法に依存する組み換え核酸方法を用いる生成方法を指す。

【００７３】

本明細書で使用するとき、用語「被験体」は、特定の種又はサンプルの種類に限定されるものではない。例えば、用語「被験体」は、患者、多くの場合、ヒト患者を指し得る。しかし、この用語は、ヒトには限定されないので、様々な非ヒト動物又は哺乳類種を包含する。

【００７４】

本明細書で使用するとき、「プロドラッグ」は、インビボで投与された際、代謝されるか又は他の方法でその化合物の生物学的、薬学的、又は治療的活性型に変換される化合物である。プロドラッグを生成するために、薬学的活性化合物は、前記活性化合物が代謝プロセスによって再生するように修飾される。プロドラッグは、薬物の代謝安定性又は輸送特性を変化させたり、副作用又は毒性をマスクしたり、薬物の味を改善したり、薬物の他の特徴又は特性を変化させたりするように設計してよい。インビボにおける薬力学的プロセス及び薬物代謝に関する知見に基づいて、当業者は、一旦薬学的活性化合物が見出されたら、その化合物のプロドラッグを設計することができる（例えば、Ｎｏｇｒａｄｙ（１９８５）Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ａ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐａｇｅｓ ３８８－３９２を参照）。

【００７５】

本明細書で使用するとき、「試験物質（又は候補化合物）」は、本明細書に開示及び／又は請求する方法によってＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに対するその効果が求められる、化学的に定義されている化合物（例えば、有機分子、無機分子、有機／無機分子、タンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、多糖、糖、又は糖タンパク質等のこれら分子のハイブリッド）、又は化合物の混合物（例えば、試験化合物、天然抽出物、又は培養上清等のライブラリ）を指す。

【００７６】

本明細書で使用するとき、ハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）は、多数のサンプル、例えば、「ヒット」を同定するための疾患標的に対する多様な化学構造のサンプルを試験するプロセスである（例えば、Ｂｒｏａｃｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｈｉｇｈ ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｆｏｒ ｄｒｕｇ ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，Ｎａｔｕｒｅ，３８４：１４－１６（１９９６）；Ｊａｎｚｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｈｉｇｈ ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ａｓ ａ ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ｔｏｏｌ ｉｎ ｔｈｅ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ ｉｎｄｕｓｔｒｙ，Ｌａｂ Ｒｏｂｏｔｉｃｓ Ａｕｔｏｍａｔｉｏｎ：８２６１－２６５（１９９６）；Ｆｅｒｎａｎｄｅｓ，Ｐ．Ｂ．，Ｌｅｔｔｅｒ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ｓｏｃｉｅｔｙ ｐｒｅｓｉｄｅｎｔ，Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ，２：１（１９９７）；Ｂｕｒｂａｕｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ｆｏｒ ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，１：７２－７８（１９９７）を参照）。ＨＴＳ操作は、サンプル調製、アッセイ手順、及びその後の大量のデータ処理に対処するために高度に自動化及びコンピュータ化されている。

【００７７】

本明細書に記載する発明の態様及び実施形態は、「からなる」及び／又は「から本質的になる」態様及び実施形態を含むと理解される。

【００７８】

本開示全体を通して、本発明の様々な態様を範囲形式で表す。範囲形式による記載は単に便宜上簡潔にするためのものであると理解すべきであり、本発明の範囲を強く限定すると解釈すべきではない。したがって、範囲の記載は、具体的に開示されている全ての可能な部分範囲に加えてその範囲内の個々の数値も含むとみなすべきである。例えば、１～６等の範囲の記載は、具体的に開示されている部分範囲、例えば、１～３、１～４、１～５

、２～４、２～６、３～６等に加えて、その範囲内の個々の数値、例えば、１、２、３、４、５、及び６も含むとみなすべきである。これは、範囲の幅にかかわらず適用される。

【００７９】

本発明の他の目的、利点、及び特徴は、添付図面と合わせて以下の記載から明らかになるであろう。

【００８０】

Ｃ、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防する方法

ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質（ＩＦＰ３５及びＮＭＩを含む）は、多数の免疫細胞においてＩ型又はＩＩ型のインターフェロンによって速やかにアップレギュレートされ得る。Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ７，ｅ５０９３２（２０１２）；Ｄａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ８８，３１０３－３１１３（２０１４）；Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ９６，１２１－１３０（１９９９）；及びＬｅｂｒｕｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ ＆ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １８，７６７－７７１（１９９８）。ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーの機能は、明らかになっていない。ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーは、Ｎ末端におけるロイシンジッパー（Ｌ－ｚｉｐ）ドメインと、それに続く２つのタンデム構造及び機能的に未知であるＮＭＩ／ＩＦＰ３５ドメイン（ＮＩＤ）とからなると予測されている。初期の報告では、免疫蛍光顕微鏡法を用いて、ＩＦＰ３５及びＮＭＩが細胞質に位置することが見出された。Ｌｅｂｒｕｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ ＆ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １８，７６７－７７１（１９９８）。これらは、そのＮＩＤドメインによって媒介される高分子質量複合体（ＨＭＭＣ）にアセンブリされ、更に、機能的に未知であるスペックル様凝集体にアセンブリされ得る。Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，ＪＢＣ ２７５，２１３６４－２１３７１（２０００）；及びＣｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，ＪＢＣ ２７５，３６２７８－８４（２０００）。ＩＦＰ３５は、ウシ泡沫状ウイルス由来の特定のウイルス核酸を認識し、ウイルス転写を阻害できることが知られている。Ｔａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ８２，４２７５－４２８３（２００８）。しかし、最近の結果は、ＲＩＧ－１（レチノイン酸誘導性遺伝子Ｉ）と特異的に相互作用し、宿主の自然免疫応答を負に制御することによって、水疱性口内炎ウイルスの複製を支援し得ることが示唆した。Ｄａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ８８，３１０３－３１１３（２０１４）。ＮＭＩの研究は、複数のシグナル伝達経路を制御することによる、癌細胞の増殖及び転移に対する阻害効果に主に集中している。Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ Ｃｅｌｌ ２３，４６３５－４６４６（２０１２）；Ｆｉｌｌｍｏｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ １２５，５５６－６４（２００９）；及びＬｉ ｅｔ ａｌ．，ＪＢＣ ２７７，２０９６５－７３（２００２）。ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーの潜在的機能及び機序について更に調べるために、本発明者らは、ＩＦＰ３５におけるＮＩＤドメインのＸ線結晶構造解析による構造を決定した。ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、免疫調節のためのＤＡＭＰとして機能し得ることが見出された。一部のＤＡＭＰタンパク質は、ＭＤ２及び他の関連タンパク質の助けを借りて、特異的細胞表面受容体ＴＬＲ４によって認識されることが報告された。Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ １０７，１１９４２－１１９４７（２０１０）；Ｎａｇａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ３，６６７－６７２（２００２）；及びＺａｎｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １４７，８６８－８８０（２０１１）を参照。複雑なシグナルカスケードが誘発されて転写因子ＮＦ－κＢを活性化し、その結果、サイトカインが放出され、宿主の免疫応答が強化され得る。Ｍｅｙｌａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５，５０３－５０７（２００４）；Ｍｏｙｎａｇｈ，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２６，４６９－４７６（２００５）；及びＬｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ ４２，１４５－１５１（２００８）を参照。

【００８１】
幾つかの態様では、免疫応答を調節する剤の調製におけるトランケート型ＩＦＰ３５タンパク質（例えば、トランケート型タンパク質の八量体）又はトランケート型ＮＭＩタンパク質の使用について本明細書に開示する。幾つかの態様では、抗悪性腫瘍生成物の調製におけるトランケート型ＩＦＰ３５タンパク質（例えば、トランケート型タンパク質の八量体）又はトランケート型ＮＭＩタンパク質の使用について本明細書に開示する。幾つかの態様では、細胞又は体液中のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩを中和するためにＩＦＰ３５抗体及び／又はＮＭＩ抗体を用いることによって、ＩＦＰ３５又はＮＭＩのタンパク質の過剰発現によって誘導される過剰な免疫応答を有効に制御し、炎症作用を阻害し、炎症によって身体及び組織の損傷が生じるのを回避し、被験体（例えば、細菌若しくはウイルス感染症又は自己免疫疾患を有する被験体）の生存率を劇的に改善することができる。幾つかの実施形態では、被験体は、ウイルス感染症（例えば、インフルエンザウイルス、ＳＡＲＳ、ＭＥＲＳ、ＨＢＶ、ＨＣＶ）、細菌感染症（例えば、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ））、真菌感染症、及び／又は他の病原体によって引き起こされる感染症を有している。幾つかの態様では、前記感染症は、ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質の発現、例えば、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの発現を引き起こす。感染患者におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの過剰発現は、臓器及び身体における重篤な損傷につながる恐れがある。異常に高いレベルのＩＦＰ３５は、サイトカインストームの誘発に起因して、組織又は臓器の損傷につながる恐れがある。

【００８２】
したがって、本組成物及び／又は方法を用いて、多数の感染性疾患、感染状態、炎症、自己免疫疾患、移植片対宿主病、又は被験体の免疫系の過剰活性化に関連する病態を治療、寛解、及び／又は予防することができる。病原性ウイルスとしては、レトロウイルス科（例えば、ヒト免疫不全ウイルス、例えば、ＨＩＶ－１（ＨＴＬＶ－ＩＩＩ、ＬＡＶ、又はＨＴＬＶ－ＩＩＩ／ＬＡＶ、又はＨＩＶ－ＩＩＩとも称される）；及び他の単離菌、例えば、ＨＩＶ－ＬＰ；ピコルナウイルス科（例えば、ポリオウイルス、Ａ型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カリシウイルス科（例えば、胃腸炎を引き起こす株）；トガウイルス科（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（例えば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（例えば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、ＲＳウイルス）；オルトミクソウイルス科（例えば、インフルエンザウイルス）；ブニヤウイルス科（例えば、ハンターンウイルス、ブニヤウイルス、フレボウイルス、及びナイロウイルス）；アレナウイルス科（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（例えば、レオウイルス、オルビウイルス、及びロタウイルス）；ビマウイルス科（Ｂｉｍａｖｉｒｉｄａｅ）；ヘパドナウイルス科（Ｂ型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（パルボウイルス）；パポバウイルス科（乳頭腫ウイルス、ポリオームウイルス）；アデノウイルス科（大部分のアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）１型及び２型、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスウイルス）；ポクシーウイルス科（Ｐｏｘｙｉｒｉｄａｅ）（天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；及びイリドウイルス科（例えば、アフリカ豚コレラウイルス）；Ｃ型肝炎ウイルス；並びに未分類のウイルス（例えば、デルタ肝炎の病原因子（Ｂ型肝炎ウイルスの欠陥サテライトであると考えられる）、ノーウォーク及び関連ウイルス、並びにアストロウイルス）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８３】
病原性細菌としては、ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒｐｙｌｏｒｉｓ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｅｌｉａ　ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、マイコバクテリア属の種（例えば、結核菌（Ｍ．ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、マイコバクテリ

ウム・アビウム（M. avium）、マイコバクテリウム・イントラセルラーエ（M. intracellulare）、マイコバクテリウム・カンサシ（M. kansaii）、マイコバクテリウム・ゴルドネ（M. gordonae））、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、淋菌（Neisseria gonorrhoeae）、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）、リステリア・モノサイトゲネス（Listeria monocytogenes）、化膿レンサ球菌（Streptococcus pyrogenes）（A群レンサ球菌）、ストレプトコッカス・アガラクチア（Streptococcus agalactiae）（B群レンサ球菌）、ストレプトコッカス属（Streptococcus）（ビリダンス群）、大便連鎖球菌（Streptococcus faecalis）、ウシレンサ球菌（Streptococcus bovis）、ストレプトコッカス属（嫌気性種）、肺炎レンサ球菌（Streptococcus pneumoniae）、病原性カンピロバクター属（Campylobacter）の種、エンテロコッカス属（Enterococcus）の種、インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）、炭疽菌（Bacillus anthracis）、ジフテリア菌（Corynebacterium diphtheriae）、コリネバクテリウム属（Corynebacterium）の種、豚丹毒菌（Erysipelothrix rhusiopathiae）、ウェルシュ菌（Clostridium perfringens）、破傷風菌（Clostridium tetani）、エンテロバクター・アエロゲネス（Enterobacter aerogenes）、肺炎桿菌（Klebsiella pneumoniae）、パスツレラ・ムルトシダ（Pasturella multocida）、バクテロイデス属（Bacteroides）の種、フソバクテリウム・ヌクレアタム（Fusobacterium nucleatum）、大腸菌（Escherichia coli）の病原性株、ストレプトバチルス・モニリホルミス（Streptobacillus moniliformis）、梅毒トレポネーマ（Treponema pallidium）、トレポネーマ・ペルテニュ（Treponema pertenue）、レプトスピラ属（Leptospira）、及びアクチノマイセス・イスラエリー（Actinomyces israelli）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８４】

感染性真菌としては、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、コクシディオイデス・イミティス（Coccidioides immitis）、ブラストマイセス・デルマチチジス（Blastomyces dermatitidis）、クラミジア・トラコマチス（Chlamydia trachomatis）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８５】

感染性原生動物としては、マラリア原虫属（Plasmodium）の種、例えば、熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium falciparum）；トリパノソーマ属（Trypanosomes）、例えば、クルーズトリパノソーマ（Trypanosoma cruzi）；及びトキソプラズマ・ゴンヂ（Toxoplasma gondii）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８６】

アレルゲンとしては、花粉、昆虫毒、動物鱗屑粉塵、真菌胞子、及び薬物（例えば、ペニシリン）が挙げられるが、これらに限定されない。天然、動物、及び植物のアレルゲンの例としては、以下の属に対して特異的なタンパク質が挙げられる：イヌ属（イヌ（Canis familiaris））；ヒョウヒダニ属（例えば、コナヒョウヒダニ（Dermatophagoides farinae））；ネコ属（ネコ（Felis domesticus））；ブタクサ属（ブタクサ（Ambrosia artemiisf

ｏｌｉａ）；ドクムギ属（例えば、ホソムギ（Ｌｏｌｉｕｍ ｐｅｒｅｎｎｅ）又はネズミムギ（Ｌｏｌｉｕｍ ｍｕｌｔｉｆｌｏｒｕｍ））；スギ属（スギ（Ｃｒｙｐｔｏｍｅｒｉａ ｊａｐｏｎｉｃａ））；アルテルナリア属（アルテルナリア・アルテルナータ（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ））；ハンノキ；ハンノキ属（ヨーロッパハンノキ（Ａｌｎｕｓ ｇｕｌｔｉｎｏｓａ））；カバノキ属（シラカンバ（Ｂｅｔｕｌａ ｖｅｒｒｕｃｏｓａ））；コナラ属（アルバオーク（Ｑｕｅｒｃｕｓ ａｌｂａ））；オリーブ属（オリーブ（Ｏｌｅａ ｅｕｒｏｐａ））；ヨモギ属（オウシュウヨモギ（Ａｒｔｅｍｉｓｉａ ｖｕｌｇａｒｉｓ））；オオバコ属（例えば、ヘラオオバコ（Ｐｌａｎｔａｇｏ ｌａｎｃｅｏｌａｔａ））；ヒカゲミズ属（例えば、パリエタリア・オフィチナリス（Ｐａｒｉｅｔａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ）又はカベイラクサ（Ｐａｒｉｅｔａｒｉａ ｊｕｄａｉｃａ））；チャバネゴキブリ属（例えば、チャバネゴキブリ（Ｂｌａｔｔｅｌｌａ ｇｅｒｍａｎｉｃａ））；ミツバチ属（例えば、アピス・ムルティフロルム（Ａｐｉｓ ｍｕｌｔｉｆｌｏｒｕｍ））；イトスギ属（例えば、イタリアイトスギ（Ｃｕｐｒｅｓｓｕｓ ｓｅｍｐｅｒｖｉｒｅｎｓ）、アリゾナイトスギ（Ｃｕｐｒｅｓｓｕｓ ａｒｉｚｏｎｉｃａ）、及びモントレーイトスギ（Ｃｕｐｒｅｓｓｕｓ ｍａｃｒｏｃａｒｐａ））；ビャクシン属（例えば、ジュニペラス・サビオノイデス（Ｊｕｎｉｐｅｒｕｓ ｓａｂｉｎｏｉｄｅｓ）、エンピツビャクシン（Ｊｕｎｉｐｅｒｕｓ ｖｉｒｇｉｎｉａｎａ）、セイヨウネズ（Ｊｕｎｉｐｅｒｕｓ ｃｏｍｍｕｎｉｓ）、及びジュニペラス・アシェイ（Ｊｕｎｉｐｅｒｕｓ ａｓｈｅｉ）；クロベ属（例えば、コノテガシワ（Ｔｈｕｙａ ｏｒｉｅｎｔａｌｉｓ））；ヒノキ属（例えば、ヒノキ（Ｃｈａｍａｅｃｙｐａｒｉｓ ｏｂｔｕｓａ））；ゴキブリ属（例えば、ワモンゴキブリ（Ｐｅｒｉｐｌａｎｅｔａ ａｍｅｒｉｃａｎａ））；カモジグサ属（例えば、シバムギ（Ａｇｒｏｐｙｒｏｎ ｒｅｐｅｎｓ））；ライムギ属（例えば、ライムギ（Ｓｅｃａｌｅ ｃｅｒｅａｌｅ））；コムギ属（例えば、コムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ａｅｓｔｉｖｕｍ））；カモガヤ属（例えば、カモガヤ（Ｄａｃｔｙｌｉｓ ｇｌｏｍｅｒａｔａ））；ウシノケグサ属（例えば、ヒロハノウシノケグサ（Ｆｅｓｔｕｃａ ｅｌａｔｉｏｒ））；イチゴツナギ属（例えば、ナガハグサ（Ｐｏａ ｐｒａｔｅｎｓｉｓ）又はコイチゴツナギ（Ｐｏａ ｃｏｍｐｒｅｓｓａ））；カラスムギ属（例えば、マカラスムギ（Ａｖｅｎａ ｓａｔｉｖａ））；シラゲガヤ属（例えば、シラゲガヤ（Ｈｏｌｃｕｓ ｌａｎａｔｕｓ））；ハルガヤ属（例えば、ハルガヤ（Ａｎｔｈｏｘａｎｔｈｕｍ ｏｄｏｒａｔｕｍ））；オオカニツリ属（例えば、オオカニツリ（Ａｒｒｈｅｎａｔｈｅｒｕｍ ｅｌａｔｉｕｓ））；コヌカグサ属（例えば、コヌカグサ（Ａｇｒｏｓｔｉｓ ａｌｂａ））；アワガエリ属（例えば、オオアワガエリ（Ｐｈｌｅｕｍ ｐｒａｔｅｎｓｅ））；クサヨシ属（例えば、クサヨシ（Ｐｈａｌａｒｉｓ ａｒｕｎｄｉｎａｃｅａ））；スズメノヒエ属（例えば、バヒアグラス（Ｐａｓｐａｌｕｍ ｎｏｔａｔｕｍ））；モロコシ属（例えば、セイバンモロコシ（Ｓｏｒｇｈｕｍ ｈａｌｅｐｅｎｓｉｓ））；及びスズメノチャヒキ属（例えば、コスズメノチャヒキ（Ｂｒｏｍｕｓ ｉｎｅｒｍｉｓ））。抗体検出及び分析のために本方法において上記アレルゲン由来のエピトープを使用することも考えられる。

【００８７】

幾つかの態様では、本組成物及び／又は方法は、疾患に誘導される又は関連する被験体の免疫系の抑制、例えば、癌に誘導される又は関連する被験体の免疫系の抑制を緩和するために用いることもできる。例えば、ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質又はアナログ若しくは誘導体を投与することによって、疾患を引き起こすベクターの能力に打ち勝って免疫反応を回避するために、被験体の免疫応答を活性化及び／又は増強することができる。この治療アプローチは、それによって免疫系が抑制されることが証明されている疾患状態、例えば、細菌感染症、寄生虫感染症（マラリア及びトリパノソーマ症）、ウイルス感染症、消化管潰瘍、及び避妊と共にヘリコバクター・ピロリ感染に起因する胃癌に適用可能である。

【００８８】

幾つかの態様では、ＩＦＰ３５受容体又はＩＦＰ３５に対するアンタゴニスト抗体との結合に関与するアミノ酸残基を本明細書に提供する。１つの態様では、ドメイン交換二量体は、弧交差表面領域を形成し、前記二量体は、Ｓｅｒ１４５、Ａｓｐ１７２、Ｖａｌ１７３、Ｌｅｕ１７７、Ａｒｇ２１２、Ｇｌｎ１９９、Ｇｌｎ２０７、Ｇｌｎ２０８、Ｐｒｏ２１０、Ｓｅｒ２１４、Ｔｈｒ２０１、及びＴｙｒ２１６等の幾つかの残基を提供して、図１６Ａに示す大きな露出表面を形成する。残基の中でも、残基Ｇｌｕ１５０、Ｇｌｕ１７５、Ｌｅｕ１７７、Ｇｌｎ２０７、及びＧｌｎ２０８が、より重要な位置である（図１６Ａ）。したがって、これらは、受容体又は抗体に結合する可能性が高い。

【００８９】

幾つかの態様では、ＩＦＰ５－ＮＩＤ八量体によって形成される環構造の内面上の他の残基が、他のタンパク質との相互作用に関与している。これら残基は、Ｓｅｒ１４５、Ａｒｇ１４７、Ｇｌｕ１５０、Ｇｌｕ１５１、Ｖａｌ１７３、Ｇｌｙ２０６、Ｇｌｎ２０７、及びＧｌｎ２０８を含んでいてよい。幾つかの態様では、Ａｒｇ１４７、Ｇｌｎ２０７、Ｇｌｎ２０８、Ｇｌｕ１５０、及びＧｌｕ１５１は、八量体環構造の内面から突出している延長側鎖を提供する（図１６Ｂ）。

【００９０】

二量体又は八量体の構造に基づいて、単一の単量体又はドメイン交換単量体のβシートバレル様構造のアミノ末端及びカルボキシル末端の先端近傍の幾つかの比較的大きなアミノ酸残基が存在する。これら比較的大きなアミノ酸残基は、外向きに延在している。これら残基は、Ａｒｇ１８７、Ｇｌｕ１８８、Ｇｌｎ１９２、Ｇｌｎ１９６、Ａｒｇ２１２、及びＴｙｒ２１６を含んでいてよく、これらは距離が近接している。更に、幾つかのアミノ酸残基は、他のタンパク質、抗体、又は低分子との結合に関与し得る（図１６Ｃ）。

【００９１】

上記これら残基は、構造の表面上に位置する。幾つかの実施形態では、これら残基は、受容体又は抗体との結合に関与し、薬物阻害にとって鍵となる位置である。

【００９２】

幾つかの態様では、本発明者らは、ＩＦＰ３５及びＮＭＩを発現させ、精製し、結晶化し、また、ＩＦＰ３５の１つの断片の構造を決定した。ＩＦＰ３５の断片は、炎症応答を誘導することができ、更に、ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、細胞から分泌されて、激しい免疫応答を刺激することができる。ＩＦＰ３５抗体又はＮＭＩ抗体を用いて細胞溶液又は体液中のＩＦＰ３５又はＮＭＩを中和することを通してＩＦＰ３５又はＮＭＩの過剰な分泌発現によって引き起こされる過剰な免疫応答を制御することが有効であり得る。幾つかの態様では、本開示は、身体及び組織の損傷を避け、被験体の生存率を上昇させる。この結果は、ＩＦＰ３５及びＮＭＩの過剰発現に関連する疾患又は病態、例えば、細菌感染症、ウイルス侵入、自己免疫疾患、腫瘍、及び他の感染症を、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの濃度低減によって制御できることを示す。一方、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの発現及び／又は進行（例えば、分泌）の欠陥又は欠損によって引き起こされる疾患は、タンパク質の添加を通して改善することができる。

【００９３】

以下は、ＣＬＵＳＴＡＬ２．１多重配列アラインメントを用いた、ヒトＩＦＰ３５（ｈＩＦＰ）、マウスＩＦＰ３５（ｍＩＦＰ）、ヒトＮＭＩ（ｈＮＭＩ）、及びマウスＮＭＩ（ｍＮＭＩ）の配列アラインメントである。

【００９４】

【表１】

```
hNMI            MEADKDDTQQILKEHSPD-EFIKDEQNKGLIDEITKKNIQLKKEIQKLETELQEATKEFQ 59
mNMI            MDADKDNIKQACDERSAEMDDMRGEQSMGLVHEIMSENKELDEEIKKLEAELQSDAREFQ 60
hIFP            ----------------------MSAPLDAALHALQEEQARLKMRLWDLQQLRKELGDSPK 38
mIFP            ----------------------MSVTLQTVLYSLQEEQARLKMRLQELQQLKRERTGSPG 38
.      :  : .:: .*. .: .*:   :.   .
hNMI            IKEDIPETKMKFLSVETPENDSQLSNISCSFQVSSKVPYEIQKGQALITFEKEEVAQNVV 119
mNMI            IKENVPEKKLKLTSVESPKDGCHFSNSSCSFQVSSQILYELQEGQALITFEKEEVAQNVI 120
hIFP            DKVPFSVPKIPLVFRGHTQQDPEVPKSLVS---NLRIHCPLLAGSALITFDDPKVAEQVL 95
mIFP            AKIPFSVPEVPLVFQGQTKQGRQVPKFVVS---NLKVCCPLPEGSALVTFEDPKVVDRLL 95
*  ..  :: :     .::. ...:   *   . ::   :  *.**:**:. :*.:.::
hNMI            SMSKHHVQIKDVNLEVTAKPVPLNSGVRFQVY--VEVSKMKINVTEIPD--TLREDQMRD 175
mNMI            SMGNHVVQMEGTPVKVSAHPVPLNTGVRFQVH--VDISKMKINVTGIPD--ELSEEQTRD 176
hIFP            QQKEHTINMEECRLRVQVQPLELPMVTTIQVMMSSQLSGRRVLVTGFPASLRLSEEELLD 155
mIFP            QQKEHRVNLEDCRLRVQVQPLELPVVTNIQV--SSQPDNHRVLVSGFPAGLRLSEEELLD 153
.  :* ::::   :.* .:*: *   . :**    : .  :: *: :*    * *::  *
hNMI            KLELSFSKSRNGGGEVDRVDYDRQSGSAVITFVEIGVADKILKKKEYPLYINQTCHRVTV 235
mNMI            KLELSFCKSRNGGGEVESVDYDRKSRSAVITFVETGVVDKILKKKTYPLYMNQKCHSVAV 236
hIFP            KLEIFFGKTRNGGGDVDVR--ELLPGSVMLGFARDGVAQRLCQIGQFTVPLGGQQVPLRV 213
mIFP            KLEIFFGKAKNGGGDVETR--EMLQGTVMLGFADEEVAQHLCQIGQFRVPLDRQQVLLRV 211
***: * *::****:*:    :    :.:: *.   *.::: :   : : :.     : *
hNMI            SPYTEIHLKKYQIFSGTSKRTVLLTGMEGIQMDEEIVEDLINIHFQRAKNGGGEVDVVKC 295
mNMI            SPCIERCLEKYQVFSAVSKKTVLLTGLEGIPVDEETGEDLLNIHFQRKNNGGGEVEVVKC 296
hIFP            SPYVNGEIQKAEIRSQPVPRSVLVLNIPDI-LDGPELHDVLEIHFQKPTRGGGEVEALTV 272
mIFP            SPYVSGEIQKAEIKFQQAPHSVLVTNIPDV-MDAQELHDILEIHFQKPTRGGGEVEALTV 270
**  .  ::* ::      ::**: .: .: :*    .*:::****: ..*****:.:.
hNMI            S-LGQPHIAYFEE------ 307
mNMI            S-LDQSFAAYFKEEARETI 314
hIFP            VPQGQQGLAVFTSESG--- 288
mIFP            VPSGQQGLAIFTSESS--- 286
.*   * * .
```

【００９５】

幾つかの実施形態では、免疫応答の誘発においてＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質を用いる方法を本明細書に提供する。別の実施形態では、例えば、食品又は薬物によって、異常に高いレベルのＩＦＰ３５／ＮＭＩによって誘導される細菌、ウイルスの感染又は臓器の損傷によって、サイトカインストームを阻害するために、ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質、例えば、ＩＦＰ３５及びＮＭＩ等を阻害及び／又は低減する方法を本明細書に提供する。前記臓器は、肺、腎臓、肝臓、又は他の臓器を含んでいてよい。

【００９６】

幾つかの実施形態では、異常なレベルのＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質に関連するか又は引き起こされる疾患又は病態を治療又は予防するための、ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質のアンタゴニスト化合物、例えば、抗体又は低分子を本明細書に提供する。

【００９７】

他の実施形態では、抗体又は化合物を更に設計及び／又は選択するために結晶構造法を適用する方法を本明細書に提供する。１つの態様では、前記構造を用いて、薬物又は抗体がどのように標的タンパク質に結合するかを見出し、次いで、前記抗体又は化合物を更に修飾してよい。標的タンパク質／抗体共結晶構造から、標的タンパク質のエピトープを同定することもできる。

【００９８】

実施形態１：免疫応答及び炎症を引き起こすための試薬／製品の調製又は抗腫瘍製品の調製におけるトランケート型ＩＦＰ３５タンパク質の適用であって、前記トランケート型ＩＦＰ３５が、ヒトＩＦＰ３５又はマウスＩＦＰ３５であり、前記トランケート型ヒトＩＦＰ３５が、以下の１）又は２）であり：

１）配列番号２に記載の残基１３６～２１６を含むタンパク質；

２）１個～１０個の追加の残基が配列のアミノ及び／又はカルボキシル末端に付加され、配列相同性が１）の配列に対して少なくとも約９０％である、１）に記載のタンパク質配列；

前記トランケート型マウスＩＦＰ３５が、以下の３）又は４）である適用：

３）配列番号４に記載の残基１３４～２１６を含むタンパク質；

４）１個～１０個の追加の残基が配列のアミノ及び／又はカルボキシル末端に付加され、配列相同性が３）の配列に対して少なくとも約９０％である、３）に記載の前記タンパク質配列。

【００９９】

実施形態２：前記トランケート型ヒトＩＦＰ３５タンパク質が、配列番号２に示す残基１２４～２２０である実施形態１に記載の方法。

【０１００】

実施形態３：ＩＦＰ３５タンパク質による免疫応答／炎症を誘発するための製品の調製又は腫瘍／癌に対する製品の調製における方法であって、前記ＩＦＰ３５タンパク質の配列が、配列番号２又は配列番号４に示す通りである方法。

【０１０１】

実施形態４：ＩＦＰ３５変異型タンパク質による免疫応答／炎症を誘発するための製品の調製又は腫瘍／癌に対する製品の調製における方法であって、前記ＩＦＰ３５変異型タンパク質が、ＩＦＰ３５受容体又は阻害抗体との結合に関与している残基の少なくとも１つの変異及び／又は修飾を有し、前記変異及び／又は修飾によって、ＩＦＰ３５受容体又は阻害抗体に対するＩＦＰ３５の結合が低減するか又はなくなり、受容体結合／抗体結合に関与している前記残基が、Ｓｅｒ１４５、Ａｓｐ１７２、Ｖａｌ１７３、Ｌｅｕ１７７、Ａｒｇ２１２、Ｇｌｎ１９９、Ｇｌｎ２０７、Ｇｌｎ２０８、Ｐｒｏ２１０、Ｓｅｒ２１４、Ｔｈｒ２０１、Ｔｙｒ２１６、Ｇｌｕ１５０、Ｇｌｕ１７５、Ｇｌｎ２０８、Ａｒｇ１４７、Ｇｌｕ１５１、若しくはＧｌｙ２０６、又はこれらの任意の組み合わせである方法。構造比較結果に従って、他の起源のＩＦＰ３５及びＮＭＩに由来する配列中に存在する対応する位置の残基は、本開示の範囲内である。構造比較結果によれば、ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、いずれも２つのＮＩＤドメインを有し、これら２つのＮＩＤドメインは互いに相同であるので、構造決定されたＩＦＰ３５のＮＩＤドメインの外側のＩＦＰ３５及びＮＭＩの対応するＮＩＤ領域残基は、本開示の範囲内である。

【０１０２】

実施形態５：実施形態１から４のいずれかに記載の方法であって、前記方法が、免疫応答／炎症を誘導して、炎症因子の発現を増加させるか、好中性を動員するか、又はＮＦ－κＢ経路を刺激し、前記炎症因子が、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、又はＣＤ８６を含み、前記ＮＦ－κＢ経路の刺激が、ＩκＢαを増加させて、ＩκＢα全量を減少させることである方法。

【０１０３】

実施形態６：異常に多量のＩＦＰ３５によって誘導される過剰な免疫応答によって疾患を阻害する方法、又はＩＦＰ３５タンパク質を阻害して炎症因子の発現／反応を阻害する製品の適用。

【０１０４】

実施形態７：前記阻害製品又は試薬が、ＩＦＰ３５タンパク質活性を阻害するＩＦＰ３５抗体である、及び／又は前記抗体が、モノクローナル又はポリクローナルである、及び／又は前記疾患が、敗血症である、及び／又は前記炎症因子が、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、又はＣＤ８６を含む、実施形態６に記載の方法。

【０１０５】

実施形態８：免疫応答及び炎症を誘発するための試薬／製品の調製又は抗腫瘍製品の調製におけるトランケート型ＮＭＩタンパク質の使用であって、前記トランケート型ＮＭＩが、トランケート型のヒトＮＭＩ又はマウスＮＭＩであり、前記トランケート型ヒトＮＭＩタンパク質が、配列番号８に記載の配列の残基１５５～２４０を有し、前記トランケート型マウスＮＭＩタンパク質が、配列番号６に記載の配列の残基１５１～２５０を有する使用。

【０１０６】

実施形態９：ＮＭＩタンパク質によって免疫応答／炎症を誘発するための製品の調製、又は腫瘍／癌に対する製品の調製における方法であって、前記ＮＭＩタンパク質が、ヒト

又はマウスのＮＭＩタンパク質であり、前記ヒトＮＭＩの配列が、配列番号８に記載の配列であるか、又は前記マウスＩＦＰ３５の配列が、配列番号６に記載の配列である方法。

【０１０７】

実施形態１０：ＮＭＩ変異型タンパク質によって免疫応答／炎症を誘発するための製品の調製、又は腫瘍／癌に対する製品の調製における方法であって、前記ＮＭＩ変異型タンパク質が、含まれている残基が変異しており、それによって、ＮＭＩがＮＭＩ受容体又は阻害抗体に結合しなくなるタンパク質である方法。

【０１０８】

実施形態１１：前記免疫応答／炎症の誘発が、炎症因子の発現を刺激し及び／又はＮＦ－κＢ経路のシグナル伝達を刺激し、前記炎症因子が、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、又はＣＤ８６を含み、前記ＮＦ－κＢ経路の刺激が、ＩκＢαを増加させて、ＩκＢα全量を減少させることである実施形態８から１１のいずれかに記載の方法。

【０１０９】

実施形態１２：ＮＭＩタンパク質活性を阻害して、ＮＭＩの異常な高発現によって誘導される疾患を治療する製品、又はＮＭＩを阻害して、炎症因子の発現を阻害する製品を調製する方法。

【０１１０】

実施形態１３：前記製品が、ＮＭＩ抗体であり、任意で、前記抗体が、モノクローナル又はポリクローナル抗体であり、任意で、前記疾患が敗血症であり、任意で、前記炎症因子が、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ｉＮＯＳ、又はＣＤ８６を含む実施形態１２に記載の方法。

【０１１１】

実施形態１４：トランケート型ＩＦＰ３５タンパク質を過剰発現及び結晶化させる方法であって、

１）細菌細胞を用いて実施形態１に記載のトランケート型タンパク質を発現させることと、

２）前記トランケート型ＩＦＰ３５タンパク質を精製することと、

３）精製された前記トランケート型タンパク質を結晶化させることとを含む方法。

【０１１２】

実施形態１５：Ｎ末端ＧＳＴタグ付融合タンパク質（ＧＳＴ－ＩＦＰ３５－ＮＩＤ）を発現させるために前記トランケート型ＩＦＰ３５　ＮＩＤ断片遺伝子をベクター（例えば、ｐＧＥＸ－６ｐ－１ベクター）にクローニングし、次いで、ＩＰＴＧ誘導後、このプラスミドベクターを大腸菌細胞に形質転換し、次いで、精製のために細菌を回収することを更に含み、前記精製工程が、アフィニティクロマトグラフィー（グルタチオンカラム）工程、ＧＳＴ融合タグを酵素によって除去する工程、及び／又はイオン交換カラム工程、及び／又はゲル濾過カラム工程を含む実施形態１４に記載の方法。

【０１１３】

実施形態１６：ＮＭＩタンパク質又はそのトランケート型を結晶化する方法であって、

１）真核細胞において実施形態８に記載のＮＭＩトランケート型タンパク質を発現させることと、

２）これらトランケート型タンパク質を精製することと、

３）これらタンパク質を結晶化させることとを含む方法。

【０１１４】

実施形態１７：Ｎ末端ＧＳＴタグ付融合タンパク質（ＧＳＴ－ＮＭＩ－ＮＩＤ）を発現させるために前記トランケート型ＮＭＩ　ＮＩＤ断片遺伝子をベクター（例えば、ｐＧＥＸ－６ｐ－１ベクター）にクローニングし、次いで、ＩＰＴＧ誘導後、このプラスミドベクターを大腸菌細胞に形質転換し、次いで、精製のために細菌を回収することを更に含み、前記精製工程が、アフィニティクロマトグラフィー（グルタチオンカラム）工程、ＧＳＴ融合タグを酵素によって除去する工程、及び／又はイオン交換カラム工程、及び／又はゲル濾過カラム工程を含む実施形態１４に記載の方法。

【０１１５】
実施形態１８：疾患を治療するためにＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質を標的とすることによって、腫瘍、免疫不全疾患等を治療するために、ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質、例えば、ＩＦＰ３５及びＮＭＩを設計又は修飾する方法。
【０１１６】
実施形態１９：本明細書に開示するＩＦＰ３５－ＮＩＤ結晶構造の原子座標に従って、本明細書に開示するＩＦＰ３５－ＮＩＤ構造まで約１．５オンストローム未満のコア領域における平均平方根偏差（ＲＭＳＤ）を有する構造。
【０１１７】
実施形態２０：ＩＦＰ３５－ＮＩＤドメイン（残基１３６～２１６を含む）のコア領域まで１．５アストローム（ａｓｔｒｏｍ）未満の平均平方根偏差（ＲＭＳＤ）を有する原子レベル構造。
【０１１８】
実施形態２１：マウスにおいてヒトＩＦＰ３５に対して生成され、中国普通微生物菌種保蔵管理センター（ＣＧＭＣＣ）にＣＧＭＣＣ９５７３として寄託されているＩＦＰ３５抗体１Ｄ７。
【０１１９】
実施形態２２：ヒト又はマウス起源を有するＩＦＰ３５トランケート型タンパク質であって、前記ヒトＩＦＰ３５トランケート型が、
１）配列番号４に記載の残基１３４～２１６を含むタンパク質；
２）追加の１個～１０個の残基がそのアミノ及び／又はカルボキシル末端に付加されていることを除いて１）と同じ配列を有するタンパク質であって、１）に記載のタンパク質に対する相同性が少なくとも約９０％であるタンパク質。
【０１２０】
実施形態２３：受容体又は中和抗体に対するＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質の結合に関与する残基に変異を有するＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質であって、前記変異が、前記受容体又は中和抗体に対する結合を崩壊させるか又は低減し、前記残基が、配列番号２に記載のヒトＩＦＰのＳｅｒ１４５、Ａｓｐ１７２、Ｖａｌ１７３、Ｌｅｕ１７７、Ａｒｇ２１２、Ｇｌｎ１９９、Ｇｌｎ２０７、Ｇｌｎ２０８、Ｐｒｏ２１０、Ｓｅｒ２１４、Ｔｈｒ２０１、Ｔｙｒ２１６、Ｇｌｕ１５０、Ｇｌｕ１７５、Ｇｌｎ２０８、Ａｒｇ１４７、Ｇｌｕ１５１、及び／又はＧｌｙ２０６、又は配列番号２の上記残基に対応する前記ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質中の残基であるタンパク質。
【０１２１】
実施形態２５：（配列番号８に記載のヒトＮＭＩについては）残基１５５～２４０及び（配列番号６に記載のマウスＮＭＩについては）残基１５１～２５０のＮＭＩトランケート型タンパク質。
【０１２２】
Ｄ、異常に高いレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬組成物
別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬組成物であって、有効量の、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防ぐか又は低減する剤と、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。
【０１２３】
本医薬組成物を用いて、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び／又は予防することができる。
【０１２４】
幾つかの実施形態では、本医薬組成物を用いて、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療することができる。他の実施形態では、本医薬組成物を用いて、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障

害を予防することができる。

【０１２５】

任意の好適な剤は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び／又は予防するために、本医薬組成物中で用いてよい。例えば、好適な剤を用いて、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子のコピー数を低減する、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の複製をブロック又は低減する、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の転写をブロック又は低減する、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのｍＲＮＡの翻訳をブロック又は低減する、及び／又はＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの１つの、幾つかの、若しくは全ての活性を阻害することができる。幾つかの実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩをコードしている遺伝子を標的とするポリヌクレオチド（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、又はｍｉＲＮＡ）を含む。ｓｉＲＮＡは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。例えば、ｓｉＲＮＡは、１以上のＮＩＤをコードしているＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の一部を標的とし得る。他の実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩをコードしている遺伝子を標的とするアンチセンスＲＮＡを含む。アンチセンスＲＮＡは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。

【０１２６】

更に他の実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの転写を制御する核因子を阻害又は調節する。ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの転写を制御する核因子を阻害又は調節する任意の好適な剤を本方法で用いてよい。

【０１２７】

更に他の実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体を含む。前記抗体は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの任意の好適な部分に特異的に結合することができる。例えば、前記抗体は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの１以上のＮＩＤに特異的に結合することができる。別の例では、前記抗体は、細胞ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩ受容体と相互作用するＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの一部に特異的に結合することができる。

【０１２８】

幾つかの態様では、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片について本明細書に開示し、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含む。１つの実施形態では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域と、配列番号１０に記載の軽鎖可変領域とを含む。本明細書に開示する抗体のＣＤＲ及び／又はフレームワーク領域（ＦＲ）に保存的置換を導入してもよい。

【０１２９】

ＶＱＬＶＥＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＮＹＧＭＮＷＶＫＱＡＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＴＦＡＤＤＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＹＬＱＩＮＮＬＫＮＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＹＧＹＳＷＡＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳＳＡＳＴ（配列番号９）。

【０１３０】

ＤＩＶＭＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＰＩＴＦＧＡＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号１０）。

【０１３１】

１つの態様では、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片をコードしている単離ポリヌクレオチドについて本明細書に開示する。幾つかの実施形態では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域配列における相補性決定領域（ＣＤＲ）のアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む重鎖可変領域、及

び／又は配列番号１０に記載の軽鎖可変領域配列におけるＣＤＲのアミノ酸配列からなるＣＤＲを含む軽鎖可変領域を含む。幾つかの態様では、前記抗体又はその抗原結合断片は、配列番号９に記載の重鎖可変領域と、配列番号１０に記載の軽鎖可変領域とを含む。他の実施形態では、前記単離ポリヌクレオチドは、配列番号１１及び／又は配列番号１２に記載の核酸配列を含む。

【０１３２】

ＴＧＧＴＣＧＡＣＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＴＧＡＧＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＣＡＧＴＡＧＴＣＣＡＴＡＧＣＣＣＡＡＧＡＧＴＡＣＣＣＧＴＡＴＣＴＴＧＣＡＣＡＧＡＡＡＴＡＴＧＴＡＧＣＣＧＴＧＴＣＣＴＣＡＴＴＣＴＴＧＡＧＧＴＴＧＴＴＧＡＴＣＴＧＣＡＡＡＴＡＧＧＣＡＧＴＧＣＴＧＧＣＡＧＡＧＧＴＴＴＣＣＡＡＡＧＡＧＡＡＧＧＣＡＡＡＣＣＧＴＣＣＣＴＴＧＡＡＧＴＣＡＴＣＡＧＣＡＡＡＴＧＴＴＧＧＣＴＣＴＣＣＡＧＴＧＴＡＧＧＴＧＴＴＴＡＴＣＣＡＧＣＣＣＡＴＣＣＡＣＴＴＴＡＡＡＣＣＣＴＴＴＣＣＴＧＧＡＧＣＣＴＧＣＴＴＣＡＣＣＣＡＧＴＴＣＡＴＴＣＣＡＴＡＧＴＴＴＧＴＧＡＡＧＧＴＡＴＡＣＣＣＡＧＡＡＧＣＣＴＴＧＣＡＧＧＡＧＡＴＣＴＴＧＡＣＴＧＴＣＴＣＴＣＣＴＧＡＣＴＣＣＴＴＡＡＧＣＴＧＣＡＣＣＴ（配列番号１１）。

【０１３３】

ＧＡＣＡＴＴＧＴＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣＡＧＣＡＡＴＣＡＴＧＴＣＴＧＣＡＴＣＴＣＣＡＧＧＧＧＡＧＡＡＧＧＴＣＡＣＣＡＴＧＡＣＣＴＧＣＡＧＴＧＣＣＡＧＣＴＣＡＡＧＴＧＴＡＡＧＴＴＡＣＡＴＧＣＡＣＴＧＧＴＡＣＣＡＧＣＡＧＡＡＧＴＣＡＧＧＣＡＣＣＴＣＣＣＣＣＡＡＡＡＧＡＴＧＧＡＴＴＴＡＴＧＡＣＡＣＡＴＣＣＡＡＡＣＴＧＧＣＴＴＣＴＧＧＡＧＴＣＣＣＴＧＣＴＣＧＣＴＴＣＡＧＴＧＧＣＡＧＴＧＧＧＴＣＴＧＧＧＡＣＣＴＣＴＴＡＣＴＣＴＣＴＣＡＣＡＡＴＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＧＡＧＧＣＴＧＡＡＧＡＴＧＣＴＧＣＣＡＣＴＴＡＴＴＡＣＴＧＣＣＡＧＣＡＧＴＧＧＡＧＴＡＧＴＡＡＣＣＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＧＴＴＣＧＧＴＧＣＴＧＧＣＡＣＣＡＡＧＣＴＧＧＡＡＡＴＣＡＡＡ（配列番号１２）。

【０１３４】

用語「相補性決定領域」及び「ＣＤＲ」は、当技術分野において公知であり、抗原特異性及び結合親和性を付与する、抗体の可変領域内のアミノ酸の非連続配列を指す。一般的に、各重鎖可変領域に３つのＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）が存在し、各軽鎖可変領域に３つのＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）が存在する。

【０１３５】

所与のＣＤＲの正確なアミノ酸配列の境界は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（１９９１），“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，”５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（「Ｋａｂａｔ」付番スキーム）、Ａｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）ＪＭＢ ２７３，９２７－９４８（「Ｃｈｏｔｈｉａ」付番スキーム）、ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５（１９９６），“Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ａｎｔｉｇｅｎ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ：Ｃｏｎｔａｃｔ ａｎａｌｙｓｉｓ ａｎｄ ｂｉｎｄｉｎｇ ｓｉｔｅ ｔｏｐｏｇｒａｐｈｙ，”Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２，７３２－７４５．”（Ｃｏｎｔａｃｔ」付番スキーム）、Ｌｅｆｒａｎｃ ＭＰ ｅｔ ａｌ．，“ＩＭＧＴ ｕｎｉｑｕｅ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ａｎｄ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎｓ ａｎｄ Ｉｇ ｓｕｐｅｒｆａｍｉｌｙ Ｖ－ｌｉｋｅ ｄｏｍａｉｎｓ，”Ｄｅｖ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ，２００３ Ｊａｎ；２７（１）：５５－７７（「ＩＭＧＴ」付番スキーム）、及びＨｏｎｅｇｇｅｒ Ａ ａｎｄ Ｐｌｕｅｃｋｔｈｕｎ Ａ，“Ｙｅｔ ａｎｏｔｈｅｒ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｓｃｈｅｍｅ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎｓ：ａｎ ａｕｔｏｍａｔｉｃ ｍｏｄｅｌｉｎｇ ａｎｄ ａｎａｌｙｓｉｓ ｔｏｏｌ，

”Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２００１ Ｊｕｎ ８；３０９（３）：６５７－７０，（ＡＨｏ付番スキーム）に記載されているものを含む多数の周知のスキームのいずれかを用いて容易に決定することができる。

【０１３６】

所与のＣＤＲの境界は、同定に用いられるスキームに応じて変化し得る。例えば、Ｋａｂａｔスキームは、構造アラインメントに基づいているが、一方、Ｃｈｏｔｈｉａスキームは、構造情報に基づいている。Ｋａｂａｔ及びＣｈｏｔｈｉａの両スキームの付番は、最も一般的な抗体領域の配列長に基づいており、例えば、「３０ａ」等の挿入文字によって適応させる挿入、及び幾つかの抗体に存在する欠失を含む。２つのスキームは、異なる位置に特定の挿入及び欠失（「インデル」）を配置するので、付与される番号が異なる。Ｃｏｎｔａｃｔスキームは、複合結晶構造の分析に基づいており、多くの点でＣｈｏｔｈｉａ付番スキームと類似している。

【０１３７】

したがって、特に指定しない限り、所与の抗体又はその領域、例えば、可変領域の「ＣＤＲ」及び「相補性決定領域」という用語、並びに前記抗体又はその領域の個々のＣＤＲ（「ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２」は、本明細書に上記した公知のスキームのいずれかによって規定される相補性決定領域を包含すると理解すべきである。

【０１３８】

本明細書で使用するとき、用語「保存的置換」とは、当業者に公知のアミノ酸及び／又はアミノ酸配列の置換を指し、一般的に、得られる分子の生物活性を変化させることなしに行うことができる。当業者は、一般的に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換が生物活性を実質的に変化させないことを認識している（例えば、Ｗａｔｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ ＯＦ ＴＨＥ ＧＥＮＥ，Ｔｈｅ Ｂｅｎｊａｍｉｎ／Ｃｕｍｍｉｎｇｓ Ｐｕｂ．Ｃｏ．，ｐ．２２４（第４版 １９８７））。例えば、かかる変化としては、以下が挙げられる：イソロイシン（Ｉ）、バリン（Ｖ）、及びロイシン（Ｌ）のいずれかをこれら疎水性アミノ酸のうちのいずれか他のアミノ酸の代わりに用いる；アスパラギン酸（Ｄ）をグルタミン酸（Ｅ）の代わりに用いる、及びグルタミン酸（Ｅ）をアスパラギン酸（Ｄ）の代わりに用いる；グルタミン（Ｑ）をアスパラギン（Ｎ）の代わりに用いる、及びアスパラギン（Ｎ）をグルタミン（Ｑ）の代わりに用いる；並びにセリン（Ｓ）をトレオニン（Ｔ）の代わりに用いる、及びトレオニン（Ｔ）をセリン（Ｓ）の代わりに用いる。また、特定のアミノ酸の環境及びタンパク質の三次元構造におけるその役割に依存して、他の置換も保存的であると考えられる場合がある。例えば、グリシン（Ｇ）及びアラニン（Ａ）は、多くの場合、アラニン（Ａ）及びバリニン（Ｖ）と同様、互換的に用いることができる。比較的疎水性であるメチオニン（Ｍ）は、多くの場合、ロイシン及びイソロイシンと互換的に用いることができ、時に、バリンとも互換的に用いられる。リジン（Ｋ）及びアルギニン（Ｒ）は、多くの場合、アミノ酸残基の重要な特徴がその変化であり、且つこれら２つのアミノ酸残基のｐＫが異なることが重要ではない位置において互換的に用いられる。特定の環境においては、更に他の変化が「保存的」であると考えられる場合もある（ｐａｇｅｓ１３－１５“Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ”第２版．Ｌｕｂｅｒｔ Ｓｔｒｙｅｒ ｅｄ（Ｓｔａｎｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）；Ｈｅｎｉｋｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ １９９２ Ｖｏｌ ８９ １０９１５－１０９１９；Ｌｅｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ １９９５ Ｍａｙ １９；２７０（２０）：１１８８２－６を参照）。他の置換も許容可能であり、経験的に又は公知の保存的置換に従って決定することができる。

【０１３９】

更に他の実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの変異体形態を含んでいてよい。ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの任意の好適な変異体形態を本方法で用いることができる。例えば、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの変異体形態は、変異型ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩ、及び／又はＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの断片であってよい。

【０１４０】

前記医薬組成物は、任意の好適な経路を介して投与してよい。例えば、前記医薬組成物は、経口、経鼻、吸入、非経口、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、局所、又は直腸内経路を介して投与してよい。

【０１４１】

幾つかの実施形態では、本医薬組成物は、別の好適な治療又は予防用の物質又は処理を更に含んでいてよい。例えば、前記医薬組成物は、更に、被験体における増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌を治療又は予防するための薬物を有効量含んでいてよい。

【０１４２】

本医薬組成物は、任意の好適な量又は投与量で用いてよい。例えば、本医薬組成物は、前記被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を有しない同等の被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性のレベルと実質的に同一のレベルまで低減する量で投与してよい。

【０１４３】

本医薬組成物を用いて、任意の好適な被験体における疾患又は障害を治療及び／又は予防することができる。例えば、前記被験体は、哺乳類であってよい。幾つかの実施形態では、前記哺乳類は、ヒトである。他の実施形態では、前記被験体は、非ヒト動物又は非ヒト哺乳類、例えば、実験用、愛玩用、又は家畜用の非ヒト動物又は非ヒト哺乳類である。

【０１４４】

Ｅ、医薬を製造するための、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤の有効量の使用

更に別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬を製造するための、前記被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤の有効量の使用を提供する。

【０１４５】

被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤は、前記被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬を製造するために用いることができる。

【０１４６】

幾つかの実施形態では、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤は、前記被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する任意の好適な疾患又は障害を治療するための医薬を製造するために用いることができる。他の実施形態では、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を防止又は低減する剤は、前記被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する任意の好適な疾患又は障害を予防するための医薬を製造するために用いることができる。

【０１４７】

任意の好適な剤は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する任意の好適な疾患又は障害を治療するための医薬を製造するために用いることができる。例えば、好適な剤を用いて、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子のコピー数を低減し、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の複製をブロック又は低減し、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の転写をブロック又は低減し、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのｍＲＮＡの翻訳をブロック又は低減し、及び／又はＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの１つ、幾つか、若しくは全ての活性を阻害することができる。幾つかの実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩをコードしている遺伝子を標的とするｓｉＲＮＡを含む。ｓｉＲＮＡは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。例えば、ｓｉＲＮＡは、１以上のＮＩＤをコードしているＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の一部を標的とし得る。

【０１４８】
他の実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩをコードしている遺伝子を標的とするアンチセンスＲＮＡを含む。アンチセンスＲＮＡは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。例えば、１以上のＮＩＤをコードしているＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の一部を標的とし得る。
【０１４９】
更に他の実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの転写を制御する核因子を阻害又は調節する。ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの転写を制御する核因子を阻害又は調節する任意の好適な剤は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための医薬を製造するために用いることができる。
【０１５０】
更に他の実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体を含む。前記抗体は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの任意の好適な部分に特異的に結合することができる。例えば、前記抗体は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの１以上のＮＩＤドメインに特異的に結合することができる。別の例では、前記抗体は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＮＩＤドメインの一部に特異的に結合することができる。
【０１５１】
更に他の実施形態では、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの変異体形態を含んでいてよい。ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの任意の好適な変異体形態を本方法で用いることができる。例えば、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの変異体形態は、変異型ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩ、及び／又はＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの断片、例えば、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの１以上のＮＩＤドメインを含む断片又はＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＮＩＤドメインの一部を含む断片であってよい。また、前記剤は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの変異体形態と異種タンパク質（例えば、Ｆｃ部分）との融合タンパク質を含んでいてもよい。
【０１５２】
前記医薬は、任意の好適な経路を介して投与するように製造してよい。例えば、前記医薬は、経口、経鼻、吸入、非経口、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、局所、又は直腸内経路を介して投与してよい。
【０１５３】
幾つかの実施形態では、本医薬は、別の好適な治療又は予防用の物質又は処理を更に含んでいてよい。例えば、前記医薬は、更に、被験体における増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌を治療又は予防するための薬物を有効量含んでいてよい。
【０１５４】
本医薬は、任意の好適な量又は投与量で用いてよい。例えば、本医薬は、前記被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性を、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を有しない同等の被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの産生及び／又は活性のレベルと実質的に同一のレベルまで低減する量で投与してよい。
【０１５５】
本医薬を用いて、任意の好適な被験体における疾患又は障害を治療及び／又は予防することができる。例えば、前記被験体は、哺乳類であってよい。幾つかの実施形態では、前記哺乳類は、ヒトである。他の実施形態では、前記被験体は、非ヒト動物又は非ヒト哺乳類、例えば、実験用、愛玩用、又は家畜用の非ヒト動物又は非ヒト哺乳類である。
【０１５６】
本明細書に記載する化合物の任意の好適な製剤を調製することができる。概要については、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，（２０００）Ｈｏｏｖｅｒ，Ｊ．Ｅ．ｅｄｉｔｏｒ，第２０版，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ

，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，ｐａｇｅｓ　７８０－８５７を参照。製剤は、適切な投与経路に好適であるように選択される。一部の投与経路は、経口、非経口、吸入によって、局所、直腸、経鼻、頬側、膣、移植リザーバを介して、又は他の薬物投与法である。化合物が、安定な非毒性の酸又は塩基塩を形成するのに十分に塩基性又は酸性である場合、前記化合物を塩として投与することが適切であり得る。薬学的に許容し得る塩の例は、生理学的に許容し得るアニオンを形成する酸と形成される有機酸付加塩、例えば、トシル酸塩、メタンスルホン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、マロン酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、安息香酸塩、アスコルビン酸塩、α－ケトグルタル酸塩、及びα－グリセロリン酸塩である。塩化物、硫酸塩、硝酸塩、重炭酸塩、及び炭酸塩を含む好適な無機塩を形成してもよい。薬学的に許容し得る塩は、例えば、アミン等の十分に塩基性の化合物と生理学的に許容し得るアニオンが得られる好適な酸とによって、当技術分野において周知の標準的な手順を用いて得られる。カルボン酸のアルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウム、又はリチウム）又はアルカリ土類金属（例えば、カルシウム）塩も作製される。

【０１５７】

企図する化合物を医薬組成物で投与する場合、前記化合物を薬学的に許容し得る賦形剤及び／又は担体との混合物に配合することが企図される。例えば、企図する化合物は、中性化合物又は薬学的に許容し得る塩として経口投与してもよく、生理食塩水中で静脈投与してもよい。従来のバッファ、例えば、リン酸バッファ、重炭酸バッファ、又はクエン酸バッファをこの目的のために用いてよい。無論、当業者は、特定の投与経路用の多数の製剤を提供するために、本明細書の教示内で製剤を改変することができる。具体的には、企図する化合物を改変して、水又は他のビヒクルに対する可溶性を高めてもよく、これは、例えば、当技術分野における通常の技能の範囲内の軽微な改変（塩形成、エステル化等）で容易に達成することができる。また、患者において最大限の有益な効果を得るために本化合物の薬物動態を管理するために、特定の化合物の投与経路及び投与レジメンを改変することも当技術分野における通常の技能の範囲内である。

【０１５８】

本明細書に記載する剤は、一般的に、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル、エタノール、メタノール、イソプロパノール、アセトニトリル、グリセロール、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド等の有機溶媒に可溶性であってもよく、可溶性にしてもよい。１つの実施形態では、本発明は、剤を薬学的に許容し得る担体と混合することによって調製される製剤を提供する。１つの態様では、前記製剤は、ａ）水溶性有機溶媒、非イオン性溶媒、水溶性脂質、シクロデキストリン、ビタミン（例えば、トコフェロール）、脂肪酸、脂肪酸エステル、リン脂質、又はこれらの組み合わせに、記載する剤を溶解させて溶液を提供することと、ｂ）生理食塩水又は１～１０％炭水化物溶液を含有するバッファを添加することとを含む方法を用いて調製してよい。一例では、前記炭水化物は、デキストロースを含む。本方法を用いて得られる医薬組成物は、安定であり、動物及び臨床用途に有用である。

【０１５９】

本方法及び組成物で用いるための水溶性有機溶媒の例示的な例としては、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、アルコール、アセトニトリル、Ｎ－メチル－２－ピロリドン、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。アルコールの例としては、メタノール、エタノール、イソプロパノール、グリセロール、又はプロピレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６０】

本方法及び組成物で用いるための水溶性非イオン性界面活性剤の例示的な例としては、ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標）ＥＬ、ポリエチレングリコール修飾ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標）（ポリオキシエチレングリセロールトリリシノレート３５）、水素添加ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標）ＲＨ４０、水素添加ＣＲＥＭＯＰＨＯＲ（登録商標）ＲＨ６０、ＰＥＧ－コハク酸塩、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、ＳＯＬＵＴＯＬ（

登録商標）ＨＳ（ポリエチレングリコール６６０　１２－ヒドロキシステアレート）、モノオレイン酸ソルビタン、ポロキサマー、ＬＡＢＲＡＦＩＬ（登録商標）（エトキシ化杏仁油）、ＬＡＢＲＡＳＯＬ（登録商標）（カプリル－カプロイルマクロゴール－８－グリセリド）、ＧＥＬＵＣＩＲＥ（登録商標）（グリセロールエステル）、ＳＯＦＴＩＧＥＮ（登録商標）（ＰＥＧ６カプリル酸グリセリド）、グリセリン、グリコール－ポリソルベート、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６１】

本方法及び組成物で用いるための水溶性脂質の例示的な例としては、野菜油、トリグリセリド、植物油、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。脂質油の例としては、ヒマシ油、ポリオキシルヒマシ油、コーン油、オリーブ油、綿実油、ピーナッツ油、ペパーミント油、紅花油、ゴマ油、ダイズ油、水素添加野菜油、水素添加ダイズ油、ココヤシ油のトリグリセリド、パーム核油、及びこれらの水素添加形態、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６２】

本方法及び組成物で用いるための脂肪酸及び脂肪酸エステルの例示的な例としては、オレイン酸、モノグリセリド、ジグリセリド、ＰＥＧのモノ若しくはジ脂肪酸エステル、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６３】

本方法及び組成物で用いるためのシクロデキストリンの例示的な例としては、アルファ－シクロデキストリン、ベーター－シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル－ベーター－シクロデキストリン、又はスルホブチルエーテル－ベーター－シクロデキストリンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６４】

本方法において用いるためのリン脂質の例示的な例、シクロデキストリンとしては、ダイズホスファチジルコリン、又はジステアロイルホスファチジルグリセロール、及びこれらの水素添加形態、又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６５】

当業者は、特定の投与経路用の多数の製剤を提供するために、本明細書の教示内で製剤を改変することができる。具体的には、化合物を改変して、水又は他のビヒクルに対する可溶性を高めてもよい。また、患者において最大限の有益な効果を得るために本化合物の薬物動態を管理するために、特定の化合物の投与経路及び投与レジメンを改変することも当技術分野における通常の技能の範囲内である。

【０１６６】

Ｆ、診断、予後診断、又は治療モニタリングの方法

更に別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を診断、予後診断、又は治療モニタリングする方法であって、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性を評価することを含む方法を提供する。

【０１６７】

本方法は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する任意の好適な疾患又は障害を診断、予後診断、又は治療モニタリングするために用いることができる。

【０１６８】

幾つかの実施形態では、本方法は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の診断に用いられ、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性が、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害（例えば、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌）を有しない同等の被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性よりも少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％

、１５０％、２００％、３００％、４００％、又は５００％高い場合、前記被験体が前記異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を有していることを示す。

【０１６９】

幾つかの実施形態では、本方法は、被験体の更なる治療を調整する、例えば、投与量を増加若しくは減少させる、又は治療を延長、短縮、若しくは停止するために、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の治療モニタリングを行うために用いられる。

【０１７０】

幾つかの態様では、本方法は、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベルを評価することを含む。他の実施形態では、本方法は、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を評価することを含む。例えば、細胞受容体又は抗体に結合する任意の好適なＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩ活性を評価することができる。更に他の実施形態では、本方法は、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び活性を評価することを含む。

【０１７１】

ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性は、任意の好適なレベルで評価することができる。例えば、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、及び／又はタンパク質のレベルで評価することができる。ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ及び／又はＲＮＡのレベルは、任意の好適な手段又は方法を用いて評価することができる。例えば、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ及び／又はＲＮＡのレベルは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ及び／又はＲＮＡ中の少なくとも１０、１５、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、又はそれ以上の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いて評価することができる。ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのタンパク質のレベルは、任意の好適な手段又は方法を用いて評価することができる。例えば、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのタンパク質のレベルは、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体を用いて評価することができる。任意の好適な抗体を用いてよい。例えば、前記抗体は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＮＩＤドメインの一部、又は１以上のＮＩＤドメインに特異的に結合することができる。更に別の例では、抗体は、ポリクローナル抗体である。

【０１７２】

更に別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の診断、予後診断、又は治療モニタリングのキットであって、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害が疑われるか又は治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのレベル及び／又は活性を評価するための手段を含むキットを提供する。

【０１７３】

任意の好適な手段は、本キットで用いることができる。例えば、前記手段は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性の評価において用いることができる。別の例では、前記手段は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ及び／又はＲＮＡのレベルを評価するための、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ及び／又はＲＮＡ中の少なくとも１０、１５、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００、又はそれ以上の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドであってよい。更に別の例では、前記手段は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのタンパク質のレベルを評価するための、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体であってよい。前記好適な手段は、任意の好適な単一の又は

複数の容器、例えば、試験管、マイクロタイタープレート等に含まれていてよい。また、前記好適な手段は、任意の好適な単一の又は複数の表面、例えば、ビーズ、チップ、又はミクロ流体装置等に固定化されていてもよい。

【０１７４】

更に別の態様では、本開示は、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断の方法であって、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態を決定することを含む方法を提供する。

【０１７５】

被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態は、任意の好適な方法又は手段を用いて評価することができる。例えば、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ及び／又はＲＮＡ中の少なくとも１０、１５、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを用いて決定することができる。

【０１７６】

更に別の態様では、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害のコンパニオン診断のキットであって、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害の治療を受けている被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態を決定する手段を含むキットを提供する。

【０１７７】

本キットでは任意の好適な手段を用いてよい。例えば、本キットは、被験体におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの遺伝子の遺伝的状態を決定するための、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩのＤＮＡ及び／又はＲＮＡ中の少なくとも１０、１５、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１，０００の連続するヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含んでいてよい。前記好適な手段は、任意の好適な単一の又は複数の容器、例えば、試験管、マイクロタイタープレート等に含まれていてよい。また、前記好適な手段は、任意の好適な単一の又は複数の表面、例えば、ビーズ、チップ、又はミクロ流体装置等に固定化されていてもよい。

【０１７８】

本方法は、任意の好適な方式で実施してよい。例えば、本方法は、手動で実施してよい。別の例では、本方法は、半自動的又は自動的に実施してよい。本方法は、任意の好適な場所で実施してよい。例えば、本方法は、病院、診療所、診察室、臨床検査室、薬局、会社、又は家庭で実施してよい。本方法は、任意の好適な人によって実施してよい。例えば、本方法は、医師、看護士、検査技師、介護者、又は患者によって実施されてよい。

【０１７９】

本キットは、追加の好適な構成要素、例えば、被験体からサンプルを得るための手段、アッセイ標準、被験体及び／又は試験指導書の識別子等を含んでいてもよい。本キットは、スタンドアローンキットであってもよく、アッセイシステム、例えば、自動化アッセイシステムの一部であってもよい。

【０１８０】

Ｇ、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの調節因子を同定する方法

更に別の態様では、本開示は、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの調節因子を同定する方法であって、ａ）ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩを試験物質と接触させ、前記試験物質と接触したＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を評価することと、ｂ）前記試験物質と接触していないＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を評価することと、ｃ）工程ａ）及びｂ）で評価したＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性を比較し、工程ａ）及びｂ）で評価したＩＦＰ

３５及び／又はＮＭＩの活性が異なる場合、前記試験物質をＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの調節因子として同定することとを含む方法を提供する。

【０１８１】

本方法では任意の好適な試験物質を用いてよい。例えば、前記試験物質は、低分子、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの変異型及び／又は断片を含むポリペプチドライブラリ、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに特異的に結合する抗体、ｓｉＲＮＡ、又はアンチセンスＲＮＡであってよい。

【０１８２】

幾つかの実施形態では、本方法を用いて、ＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの活性の阻害剤を同定することができる。

【０１８３】

幾つかの実施形態では、本方法を用いて、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための薬物を同定することができる。本方法を用いて、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する任意の好適な疾患又は障害を治療及び／又は予防するための薬物を同定することができる。例えば、被験体における異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに関連する疾患又は障害は、増殖異常、新生物、腫瘍、又は癌であってよい。

【０１８４】

本方法は、任意の好適なアッセイフォーマットを用いて実施してよい。好ましくは、本方法は、ハイスループットアッセイフォーマットを用いて実施してよい。

【０１８５】

幾つかの実施形態では、本開示は、本方法によって同定されるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの調節因子、又は薬物候補を提供する。

【実施例】

【０１８６】

Ｈ、実施例

実施例１：早期内因性ＤＡＭＰとしてのＩＦＰ３５ファミリーのメンバー

要約

この実施例では、ＩＦＰ３５のハイブリッドＮＩＤドメイン（ＮＩＤ－Ｈ）の構造を決定した。ＮＩＤ－Ｈは、開構造又は閉構造に折り畳まれ得た。開構造のＮＩＤ－Ｈは、幾つかの早期炎症因子の発現のアップレギュレーションを特徴とする、マクロファージにおけるサイトカインカスケードを誘導することによって、マウスに対して高い病原性を示した。更に、ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、ＬＰＳ又はＩＦＮ－γによって刺激した１時間後に単球又はマクロファージの細胞培養培地に放出された。また、ＬＰＳショックを与えたマウス及び敗血症患者の血清中においてもＩＦＰ３５及びＮＭＩの蓄積が検出された。ＩＦＰ３５　ＮＩＤ－Ｈに対する中和抗体は、ＬＰＳ誘導性炎症応答を弱め、敗血症マウスの生存率を有効に改善した。それに加えて、ＩＦＰ３５又はＮＭＩノックアウトマウスは、ＬＰＳ曝露に対して耐性であった。公知の後期ＤＡＭＰであるＨＭＧＢ－１と比べて、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーは、ＴＬＲ４の内因性リガンドとして機能し、転写因子ＮＦ－κＢを活性化することができた。したがって、幾つかの態様では、ＩＦＰ３５及びＮＭＩを含む１以上のＮＩＤドメインを有するＩＦＰ３５ファミリーのメンバーは、早期内因性ＤＡＭＰとして機能することができた。幾つかの態様では、感染症及び傷害の診断及び／又は治療におけるＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩ又は結合パートナーの使用を提供する。

【０１８７】

結果

１．　ＮＩＤの構造から、その開構造及び閉構造が明らかになった。

配列解析によれば、ＩＦＰ３５は、そのＮ末端に最初の８０アミノ酸を含有するＬ－ｚｉｐドメインを有し、続いて、それぞれ８１～１７０アミノ酸及び１７７～２６８アミノ酸に及ぶ２つのタンデムＮＩＤドメインを有する（図１ａ）。二次構造予測に従ってトラ

ンケート型タンパク質コンストラクトを構築した。１２４番目～２２０番目のアミノ酸を含有するトランケート型ＩＦＰ３５タンパク質は、大腸菌で十分に発現した。このトランケート型ＩＦＰ３５タンパク質は２つの予測ＮＩＤドメインにまたがっているので、ＮＩＤ－Ｈ（ヘテロ接合性ＮＩＤ）と命名した（図１ａ）。精製プロセス中、ＮＩＤ－Ｈは、少なくとも２つの安定な凝集状態、二量体及び八量体で存在することが見出された（図２ａ）。

【０１８８】

二量体状態及び八量体状態の両方を有する十分に回折されたＮＩＤ－Ｈ結晶を得た。セレノ－Ｌ－メチオニン起源の二量体ＮＩＤ－Ｈの結晶は、２．２Åで回折した。構造は、単一波長異常分散（ＳＡＤ）法によって決定した（表１）。ＳＡＤ法は、Ｃｈａｙｅｎ & Ｓａｒｉｄａｋｉｓ，Ｎａｔｕｒｅ ｍｅｔｈｏｄｓ ５，１４７－１５３（２００８）に開示されている。ＮＩＤ－Ｈは、β１－α１－β２－β３－α２－β４－β５の順で互いに接続されている５本のβ鎖及び２つのα－ヘリックスによって形成されるバレル様構造に折り畳まれる（図１ｂ）。ヘリックスα１、及びα１とβ２とを接続する次のループ（Ｌ１）に存在する幾つかの対は、二量体形成に重要な役割を果たす。構造に基づいて、各モノマー由来のＩｌｅ１５９の側鎖間の疎水性相互作用、Ｌｙｓ１６３とＧｌｕ１５８との間及びＡｓｐ１５５とＬｙｓ１５６との間の電子的相互作用、Ａｓｐ１７０の側鎖とＴｈｒ１６４の骨格におけるアミノ基との間の相互作用、Ａｒｇ１６５の側鎖とＶａｌ１７１の骨格におけるカルボニル基との間の相互作用を含む、少なくとも５対の相互作用を観察することができた（図１ｃ）。

【０１８９】

【表２】

表１．　データ収集及び精密化の統計値

	二量体 (Se-Met)	**八量体（ﾈｲﾃｨﾌﾞ）**
データ収集		
ビームライン	BL17U1	BL17U1
波長 (Å)	0.9798	0.9792
分解能レンジ(Å)	40.0-2.3 (2.34-2.30)[a]	50.0-2.5 (2.54-2.50)
空間群	H3	$P2_1$
細胞寸法		
a, b, c (Å)	170.3, 170.3, 53.0	44.4, 125.3, 77.2
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.3, 90.0
全反射	25,256 (1,263)	29,326 (1,447)
独自反射	1,148	6,110
完全性 (%)	99.9 (100.0)	97.8 (99.9)
平均 I/σ	74.2 (21.3)	21.1 (5.4)
多重度	22.0 (22.5)	4.8 (5.4)
R_{sys} (%)	12.5 (69.9)	10.8 (57.9)
精密化		
分解能レンジ (Å)	32.38-2.30	36.71-2.50
R_{work}/R_{free} (%)	18.1/22.9	20.6/25.3
Rmsd 結合距離(Å)	0.002	0.003
Rmsd 結合角(°)	0.619	0.639
ラマチャンドランプロット		
最も好まれる (%)	98.2	97.6
追加の許容(%)	1.8	2.4
非許容 (%)	0.0	0.0
平均 B 因子 ($Å^2$)	29.0	55.0

[a] 括弧内の値は、最高分解能シェルの値である。

【０１９０】

次いで、ＮＩＤ－Ｈの八量体構造を、分子置換（ＭＲ）法によって２．８Åの分解能で決定した（図１ｄ、表１）。八量体構造では２つのモノマー間のドメイン交換構造を観察することができる。具体的には、一方のモノマー由来のβ１－α１－β２が別のモノマー由来のβ３－α２－β４－β５と相互作用し、バレル様構造に折り畳まれている（図１ｄ）。この場合、２つのモノマーが全体に亘って積み重ねられ、二量体において緊密に相互作用する。明確にするために、このドメイン交換二量体を開構造二量体（ｏ－二量体）と命名した。ドメイン交換しない二量体を閉構造二量体（ｃ－二量体）と呼ぶ。４つのｏ－二量体は、更に、ｃ－二量体に記載の通り、α１－α１相互作用を通じて互いに相互作用し、環様構造を形成する（図２ｂ）。ｏ－二量体における単量体は、ｃ－二量体における単量体とかなり類似している（図１ｅ）。これらの間の平均平方根偏差（ＲＭＳＤ）は、僅か約０．７Åである。主な違いは、β２とβ３とを接続するｃ－二量体におけるβ－ターン（Ｔ１）が、ｏ－二量体では真っ直ぐになっている点であり、この場合、それが、ループ（Ｌ２）を形成し、２つのバレル様構造を接続する。二量体構造及び八量体構造の結晶構造座標を、それぞれ、図３３及び図３４に提供する。

【０１９１】
強力な構造比較ツールであるＤａｌｉサーバを用いて、ＰＤＢにおける公知の構造をＮＩＤ－Ｈのバレル様構造と比較した。ＮＩＤ－Ｈ構造は、ＲＮＡ認識モチーフ（ＲＲＭ）と非常に類似していることが見出された（図２ｃ）。ＲＲＭは、様々な配列及び構造のＲＮＡを同定するために広く用いられている。しかし、ＮＩＤ－Ｈの構造には明らかなＲＮＡ結合部位は存在せず、これは、その表面電荷分布によって示されている。また、ＮＩＤ－Ｈ及び様々な配列を有するＲＮＡを用いてＥＭＳＡ実験を実施したところ、ＮＩＤ－Ｈと試験したＲＮＡ配列との間に相互作用はみられなかった（データ不図示）。
【０１９２】
２．　開構造のＩＦＰ３５　ＮＩＤ－Ｈは、免疫応答を刺激した。
ＩＦＰ３５を検出するために、マウスで産生されるポリクローナル抗体を刺激するための抗原としてＮＩＤ－Ｈドメインを用いた。ＮＩＤ－Ｈ八量体によって、用いた４頭のマウス全てにおいて死亡率が１００％になった。更に、全てのマウスが腹部膨満及び明らかな腹水増加を伴って死亡した。この現象は、ＮＩＤ－Ｈ八量体が細胞毒性を有している可能性を示す。ＩＦＰ３５は、典型的には、単球、マクロファージ、樹状細胞、及びリンパ球等の免疫細胞で特異的に発現するので、ＮＩＤ－Ｈ八量体は、炎症応答を刺激することができた。
【０１９３】
ＴＮＦ－α及びＩＬ－１β等の炎症促進因子の転写レベルは、マウスマクロファージ様ＲＡＷ２６４．７細胞においてＮＩＤ－Ｈ八量体の存在下でアップレギュレートされた（図３ａ）。この結果は、リポ多糖（ＬＰＳ）によって誘導される炎症性サイトカインの産生に類似していた。比較すると、ＮＩＤ－Ｈ二量体（ｃ－二量体）は、この作用を有していなかった。これら結果に基づいて、八量体構造のＮＩＤ－Ｈは、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１βに関連するサイトカインストームを誘導する傾向がある。
【０１９４】
ｃ－二量体自体は炎症を誘導することができなかったので、ＮＩＤ－Ｈ八量体におけるｏ－二量体が活性構造として機能した可能性がある。八量体骨格がその細胞毒性に必須であるかどうかを検証するために、図１ｃに示す通りα１ヘリックスに３点の変異Ｋ１５６Ｅ／Ｋ１６３Ｅ／Ｒ１６５Ｅを有する変異体を構築した。これら変異体は、ｃ－二量体の形成を部分的に破壊するはずであり、これは、八量体の脱重合につながる。したがって、幾つかの独立したｏ－二量体が生成されるはずである。結果は、変異型及び／又は改変型二量体がＴＮＦ－α及びＩＬ－１βの転写を部分的にアップレギュレートできることを示し（図３ｂ）、これは、独立したｏ－二量体の形成が原因であった可能性がある。結果は、ｏ－二量体がサイトカインストームを誘導するＮＩＤ－Ｈの活性状態であることを示した。
【０１９５】
ＮＩＤ－Ｈは、自然免疫応答を活性化することができるので、ＩＦＰ３５完全長タンパク質が発現した。しかし、ＩＦＰ３５は、真核細胞における収量が低く、恐らくそのＮ末端における疎水性Ｌ－ｚｉｐドメインが原因で大腸菌において封入体を形成した。Ｎ末端の３４アミノ酸が欠失しているトランケート型ＩＦＰ３５（ΔＮ）を構築し、原核発現系を用いて発現させた。可溶性ΔＮタンパク質が得られ、ΔＮタンパク質は、ＮＩＤ－Ｈ八量体よりも有効にＴＮＦ－α及びＩＬ－１βの転写を刺激した（図３ｃ）。ＮＩＤ－Ｈの有効用量（約１０μｇ／ｍＬ～約５０μｇ／ｍＬ）と比べて、ΔＮの有効用量は約１μｇ／ｍＬであり、これは、ＨＭＧＢ－１又はＭｒｐｓと同等であった。更に、ΔＮは、低用量でＴＮＦ－α等の炎症性サイトカインの放出を刺激する強力な効果を有している。ＥＬＩＳＡによって検出したところ、１μｇ／ｍＬのΔＮ又はＬＰＳによって刺激したＲＡＷ２６４．７細胞によって１００ｐｇ／ｍＬ～２００ｐｇ／ｍＬのＴＮＦ－αが培養物中に放出され得た（図３ｄ）。更に、組み換えｍＮＭＩタンパク質を用いてＲＡＷ２６４．７細胞を刺激したときも、同様の炎症応答が検出された（図４）。これら結果に基づいて、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーは、内因性ＤＡＭＰタンパク質として機能することがで

きる。

【０１９６】

ヒトＩＦＰ３５の二次構造予測を図３２に示す。この予測によれば、幾つかの態様では、ヒトＩＦＰ３５における最初の２０残基、２１残基、２２残基、２３残基、２４残基、２５残基、２６残基、２７残基、２８残基、２９残基、３０残基、３１残基、３２残基、３３残基、３４残基、３５残基、３６残基、３７残基、３８残基、３９残基、４０残基、４１残基、４２残基、４３残基、４４残基、４５残基、４６残基、４７残基、４８残基、４９残基、５０残基、５１残基、５２残基、５３残基、５４残基、５５残基、５６残基、５７残基、５８残基、５９残基、６０残基、６１残基、６２残基、６３残基、６４残基、６５残基、６６残基、６７残基、６８残基、６９残基、７０残基、７１残基、７２残基、７３残基、７４残基、７５残基、７６残基、７７残基、又は７８残基を除去することによって、この実施例で用いたΔＮと同様の結果が得られるであろう。

【０１９７】

３．　ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーは、内因性ＤＡＭＰの典型的な特徴を有する。

ＨＳＰ、ＨＭＧＢ－１、Ｍｒｐ８、及びＭｒｐ１４を含むＤＡＭＰは、細胞によって分泌され、次いで、細胞表面上のパターン認識受容体（ＰＲＲ）によって認識される。Ｋａｗａｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　３４，６３７－６５０（２０１１）；Ｗｕ　＆　Ｃｈｅｎ，Ａｎｎｕａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　３２，４６１－４８８（２０１４）；及びＺｈｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　４，３３３（２０１３）。ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、ＩＦＮ－γによってアップレギュレートされた後、細胞質に局在することが報告されている。しかし、この実施例では、ＩＦＮ－γによって刺激された後３時間以内又はＬＰＳ若しくはサルモネラ菌によって刺激された後１時間以内に、ＩＦＰ３５及びＮＭＩが分泌され、ＲＡＷ２６４．７細胞の培養上清において検出された（図５ａ、図６ａ、図６ｂ、及び図１８～２１）。その後数時間で、イムノブロットの結果によって明らかである通り、ＩＦＰ３５及びＮＭＩは時間依存的に培養物中に蓄積した。対照的に、内毒素血症の早期及び後期メディエータであるＴＮＦ－α及びＨＭＧＢ－１は、それぞれ、数分間及び６時間～８時間で放出された。Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８５，２４８－２５１（１９９９）；及びＴｒａｃｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３４，４７０－４７４（１９８６）。ＩＦＰ３５は、細胞中でＮＭＩと結合して、ＨＭＭＣ、更には、スペックル様凝集体を形成することが報告されている。Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＪＢＣ　２７５，３６２７８－８４（２０００）。サルモネラ菌ＳＲ－１１によって刺激されたＲＡＷ２６４．７細胞の培養物中に分泌されたＩＦＰ３５及びＮＭＩを、ゲル濾過及びウエスタンブロットを用いて分析した。結果は、溶液中において、分泌されたＩＦＰ３５が単量体として存在し、ＮＭＩが二量体として存在することを示した（図６ｃ及び図６ｄ）。ＨＭＧＢ－１及びＭｒｐｓと同様に、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーの配列中に明らかな膜貫通シグナルペプチドは存在しない。したがって、ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質は、早期ＤＡＭＰとして機能することができる。

【０１９８】

ＤＡＭＰは、感染及び傷害に密接に関連していることが報告されている。Ｈｉｒｓｉｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｄｉａｔｏｒｓ　ｏｆ　Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ，３１５９４１（２０１２）；及びＢｉａｎｃｈｉ，　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　８１，１－５（２００７）。ＨＭＧＢ－１及びＭｒｐｓ等の公知のＤＡＭＰの濃度は、敗血症患者の血清中で著しく増加する。Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８５，２４８－２５１（１９９９）；Ａｕｓｔｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　９，２１１２－２１２３（２０１４）；及びＳｕｎｄｅｎ－Ｃｕｌｌｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｃａｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　３３，５６４－５７３（２００５）。ＩＦＰ３５及びＮＭＩが感染中に血清に放出されるかどうかを判定するために、ＬＰＳにマウスを曝露し、敗血症マウスの血清中でそれらを検出した。ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、ＬＰＳ曝露後３時間以内に分泌された。コントロ

ール群と比較して、ＬＰＳを投与したマウスにおける血清ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、６時間以内に約１２０ｎｇ／ｍＬまで用量依存的に急激に増加した（図５ｂ及び図６ｅ）。更に、敗血症患者の血清を分析したところ、１２サンプルのうちの殆ど全てにおいてＩＦＰ３５の濃度が上昇していた。これら症例間には大きな偏差が存在しており、これは恐らく病原体及び健康状態が異なっていたためであるが、血清ＩＦＰ３５は、１ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬであると定量することができ、一方、正常個体の血清中では、前記タンパク質は僅かに検出可能であった（図５ｃ及び図６ｆ）。これら結果は、ＩＦＰ３５が感染中に血清に放出されることを証明した。

【０１９９】

ＨＭＧＢ－１とは異なり、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーは、ＬＰＳ刺激後最初の１時間以内に放出され得た。致死用量（LD_{100}）のＬＰＳに曝露する前にＮＩＤ－Ｈに対する抗体（抗ＮＩＤ－Ｈ）を投与すると、マウスに有効な保護を与えることができた。コントロールにおける生存率０％と比べて、抗ＮＩＤ－Ｈ処理マウスのうちの６０％超がＬＰＳ曝露後７日間生存した（図５ｄ）。ＬＰＳの毒性効果はＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、及びＩＬ－６等の炎症性サイトカインによって部分的に媒介されるので、ＬＰＳ及び抗ＩＦＰ３５モノクローナル抗体を投与した後の血清におけるこれらサイトカインの濃度を求めた。この現象と一致して、抗ＮＩＤ－Ｈの投与は、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、及びＩＬ－６等の幾つかの毒性炎症因子の敗血症マウスの血清への放出を約２０％～約５０％低減することができた（図５ｅ）。ＣＲＩＳＰＰＲ－Ｃａｓ９技術を用いてＩＦＰ３５及びＮＭＩノックアウトマウスを作製した。Ｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ８，２２８１－２３０８（２０１３）。ガラクトサミン（Ｄ－ｇａｌ）と併用した細菌ＬＰＳに対する反応は、炎症性サイトカインによって媒介されるマウスにおける内毒素ショックの十分に特徴付けられているモデルである。Ｖｏｇｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ １３，１０４２－１０４９（２００７）；及びＧａｌａｎｏｓ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ７６，５９３９－５９４３（１９７９）。ＬＰＳ及びＤ－ｇａｌを腹腔内注射した後、野生型動物は急性疾患の症状を示し、５時間～８時間以内に死亡した。対照的に、ＩＦＰ３５$^{-/-}$マウスは重篤度が低く、有意に長く生存した（図５ｆ）。マウスにＤ－ｇａｌなしに多量のＬＰＳを注射したときも、ＩＦＰ３５$^{-/-}$マウス及びＮＭＩ$^{-/-}$マウスのＬＰＳ誘導致死毒性に対する耐性が観察された。致死用量のＬＰＳを投与したときに致死率が略１００％である正常マウスと比べて、ＮＭＩノックアウトマウスの致死率は改善される（図６ｇ）。ＬＰＳ曝露中、公知の炎症促進因子の濃度は、これらノックアウトマウスの血清中で大きく減少した（図５ｇ及び図６ｈ）。したがって、これら結果は全て、ＩＦＰ３５がＤＡＭＰとして機能し、強い炎症応答を引き起こすことを証明した。

【０２００】

４．　ＩＦＰ３５は、ＴＬＲ４経路に基づいている可能性のあるサイトカインストームを刺激する。

これまでの報告に基づいて、ＨＭＧＢ－１及びＭｒｐｓは、ＴＬＲ４シグナル経路によってＮＦ－κＢの活性化を誘発することを通して免疫応答を誘導する。Ｖｏｇｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ １３，１０４２－１０４９（２００７）；Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ １０７，１１９４２－１１９４７（２０１０）；及びＹｕ ｅｔ ａｌ．，Ｓｈｏｃｋ ２６，１７４－１７９（２００６）。したがって、この経路における幾つかの鍵となる因子を検出し、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーによって誘導される免疫応答におけるその効果を分析した。先ず、ルシフェラーゼアッセイを用いてＮＩＤ－ＨによるＮＦ－κＢプロモータの活性化を検出した。ＮＦ－κＢプロモータに続いてＴＬＲ４、ＣＤ１４、ＭＤ２、及びルシフェラーゼ等を含むプラスミドでＨＥＫ２９３細胞を一過的にトランスフェクトした。トランスフェクトの２４時間後、細胞を１０μｇ／ｍＬの精製八量体ＮＩＤ－Ｈタンパク質と共にインキュベートした。ルシフェラーゼ活性は、転写因子であるリン酸化ＮＦ－κＢによるルシフェラーゼ遺伝子の転写レベルに依存するので、ＮＦ－κＢの活性化を表すために用いた。ＮＩＤ－Ｈによって誘発

されるルシフェラーゼ活性は、強くはないが、明らかであった（図７ａ）。ＬＰＳの活性は、グラム陰性菌感染症に対する有効な抗生物質であるポリミキシンＢによってブロックすることができる。しかし、ＮＩＤ－Ｈの活性は影響を受けなかった。ＩＦＰ３５のＮ末端がトランケートされているＩＦＰ３５（ΔＮ）は炎症応答を誘発する効率が高いので、転写因子を活性化する能力も検出された。この結果は、精製ΔＮが強力なＮＦ－κＢ及びＡＰ－１プロモータ活性を誘導したことを示す。対照的に、ＩＲＦ３プロモータには効果を有しない（図７ｂ）。これら結果は、ＩＦＰ３５がＮＦ－κＢ及びＡＰ－１は活性化するが、ＩＲＦ－３は活性化しないことを示唆し、これは、恐らく、Ｍｙｄ８８依存性経路を介したものであり、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーの機序は、公知のＤＡＭＰと類似しているはずである。インターフェロンによる刺激後、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーは、危険信号として放出され、次いで、ＴＬＲ４－ＭｙＤ８８－ＮＦ－κＢ／ＡＰ－１シグナル伝達経路を介してサイトカインストームを引き起こすことができる。

【０２０１】

考察

この実施例では、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーに特徴的なドメインであるＮＩＤドメインの構造を決定した。ＮＩＤ－Ｈの開構造は自然免疫応答を活性化できることが見出された。この結果は、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーが早期内因性ＤＡＭＰとして機能し、ＴＬＲ４経路を通して転写因子ＮＦ－κＢを活性化し、サイトカインストームを引き起こし得ることを示す。しかし、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーの構造及び機能については、更に考察及び説明する必要がある。

【０２０２】

１．　タンデムＮＩＤドメインの構造

ＩＦＰ３５及びＮＭＩの両方において２つのタンデムＮＩＤドメインが存在する。ＮＩＤ－Ｈの構造は、ＩＦＰ３５における２つの予測ＮＩＤドメインにまたがっている。それは、それぞれ配列中の１３１～１７９アミノ酸及び１８０～２２８アミノ酸に及ぶ２つの断片β１－α１－β２（「Ａ部」と命名）及びβ３－α２－β４－β５（「Ｂ部」と命名）に分けることができた。二次構造予測結果に基づいて、８０～１３０に及ぶ断片は、β－α－β－β二次構造要素を含み、Ｂ部に対して「Ｂ’部」と命名した。同様に、２２９～２７６に及ぶ「Ａ’部」は、β－α－β二次構造要素を含む。配列アラインメントによって、Ａ’部及びＢ’部をＡ部及びＢ部と比較することができる（図８ａ）。ＮＩＤ－Ｈ構造の疎水性コアに含まれる残基は、図８ｂに示す通りであることが分かった。これら残基は、これら２つの群ＡとＡ’及びＢとＢ’において略完全に保存されている（図８ａ）。したがって、同じ群のメンバーは互いに置き換えることができる。上述のドメイン予測に従って、Ａ及びＢ’は、第１のＮＩＤドメインに属し、一方、Ａ’及びＢは、第２のＮＩＳドメインに属する。ＮＩＤ－Ｈの構造に従って、ＩＦＰ３５における２つのタンデムＮＩＤドメインの構造を二重バレル構造に折り畳むことができた（図８ｃ）。

【０２０３】

このモデルでは、Ａ部及びＢ部からなるＮＩＤ－Ｈ領域は、開構造として存在する。タンデムＮＩＤモデル及びＮＩＤ－Ｈ　ｏ－二量体構造の骨格は、類似している。それにもかかわらず、これらには多くの相違点がある。例えば、Ａ’及びＢ’の表面残基は、Ａ及びＢの表面残基と正確に同じではない。更に、これら２つのＮＩＤの相対位置は融通が利くべきであることが合理的であり、受容体認識中に調整され得る。対照的に、ＮＩＤ－Ｈのｏ－二量体の立体配座は、八量体の環構造に固定されているので安定である。これらに基づいて、ＮＩＤ－Ｈ八量体は、ΔＮと比べて約５％～約１０％の活性しか有しないことが理解できる。ロングループ（ＬＬ）は、推定ＮＩＤドメインに存在するはずである。前記ロングループは、ＮＩＤドメインの２つの部分を接続し、前記ドメインは、β－α－β－β－ＬＬ－β－α－β構造に折り畳まれる。ＩＦＰ３５では、これら２つのロングループは、それぞれ、１１５～１３０アミノ酸及び２２０～２２８アミノ酸に及ぶ。これらアミノ酸の特徴は、これら２つのループが柔軟性であることを示す。したがって、これら２つのループは、細胞におけるＨＭＭＣ形成又は外膜における受容体認識に関与している可

能性がある。ＩＦＰ３５と相同なタンパク質であるＮＭＩの構造及び機能機序もＩＦＰ３５の構造から推測することができた（図９）。

【０２０４】

２．　ＩＦＰ３５とＴＬＲ４との間の認識

ＩＦＰ３５とＴＬＲ４との間の認識を検証するために、インビトロ結合アッセイを用いて、ＴＬＲ４、ＴＬＲ４／ＭＤ２、及びＴＬＲ４／ＭＤ２／ＣＤ１４複合体によってＩＦＰ３５をプルダウンした。バイトを６＊Ｈｉｓと融合させ、Ｎｉ－ＮＴＡビーズに固定化した。処理したビーズを用いて、精製ＮＩＤ－Ｈ八量体、ΔＮ、及びＲＡＷ細胞培養物中に放出されたＩＦＰ３５を含む完全長又はトランケート型のＩＦＰ３５タンパク質をプルダウンした。結果は、放出されたＩＦＰ３５のみが、ＣＤ１４の存在下でＴＬＲ４／ＭＤ２複合体によって捕捉され得ることを示した（データ不図示）。したがって、ＴＬＲ４、ＭＤ２、及びＣＤ１４は、ＩＦＰ３５の認識中に協働し得る。

【０２０５】

３．　ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーと公知のＤＡＭＰとの相違点

ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーは、公知の後期ＤＡＭＰと同様に、ＴＬＲ４経路を通してＮＦ－κＢを刺激することができるが、実は、これらはより多くの差を有していると予測される。早期ＤＡＭＰとして、ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、ＨＭＧＢ－１の６時間～８時間に対して、病原体によって細胞が刺激された後最初の１時間で放出される。免疫応答の早期状態において重要な役割を果たすので、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーは、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β等の公知の他の早期炎症因子とクロストークし得る。これら結果から、ＮＩＤ－Ｈの抗体は、これら炎症性サイトカインの発現をダウンレギュレートするのに有効であるので、ＬＰＳに曝露されたマウスに対してより効率的な保護を与えることができた。更に、患者の血清におけるこれらの濃度は、ＨＭＧＢ－１とは大きく異なるが、他のサイトカインとは同等であるので、これらは、エフェクタとしてではなくシグナル分子として機能する可能性がより高い。

【０２０６】

一方では、ＩＦＰ３５は、疎水性Ｌ－ｚｉｐドメインを含有するので凝集する傾向があるが、他方、２つのＮＩＤドメインの柔軟性に起因して容易に分解する。したがって、多くの発現系においてＩＦＰ３５タンパク質をうまく折り畳むことができなかった。免疫細胞によって放出されるＩＦＰ３５は、限定的であり、グリコシル化されている。活性八量体高次構造に折り畳まれるＮＩＤ－Ｈ断片は、大腸菌における収量が高い。活性高次構造は安定化されており、八量体構造において結合表面が露出しているので、ＮＩＤ－Ｈ八量体は、モノクローナル抗体をスクリーニングするための非常に強力なツールである。ＮＩＤ－Ｈのモノクローナル抗体は、ＩＦＰ３５を中和し、敗血症マウスに保護を与えた。更に、可溶性ΔＮを用いてモノクローナル抗体を調製することもできた。更なるエビデンスが依然として必要であるが、感染症及び傷害との戦いへの応用を期待することができる。

【０２０７】

これらデータは、ＩＦＰ３５ファミリーのメンバーが早期ＤＡＭＰの一種であることを証明した。前記メンバーは、免疫細胞が病原体又はインターフェロンによって刺激されたときに放出され、更に、ＴＬＲ４シグナル経路を介して免疫応答を増強する。ＮＩＤ－Ｈの構造によって、これら新規ＤＡＭＰの機序が解明された。この実施例の結果は、感染症及び傷害関連疾患の診断及び治療の方法を提供する。

【０２０８】

方法

プラスミドの構築。ＴＨＰ１細胞及びＲＡＷ２６４．７細胞（アクセッション番号：ＮＰ＿００５５２４．２及びＮＰ＿００１１３５４２１．１）から逆転写したｃＤＮＡからヒトＩＦＰ３５及びマウスＮＭＩのｃＤＮＡを増幅させた。プライマーの設計、ＰＣＲ増幅、切断、及び回収については標準的な方法を用いた。ヒトＩＰＦ３５タンパク質のアミノ酸１２４～２４０及び３５～２８９に対応するＤＮＡ配列（ＮＩＤ－Ｈ及びΔＮ）を、Ｎ末端のＧＳＴタグと共にＢａｍＨ　Ｉ部位及びＸｈｏ　Ｉ部位を用いてｐＧＥＸ－６ｐ

－１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に挿入した。また、マウスＮＭＩタンパク質のＤＮＡ配列を、ＢａｍＨ　Ｉ部位及びＸｈｏ　Ｉ部位を用いてＲＳＦＤｕｅｔベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ）に挿入した。全てのプラスミドをＤＮＡシークエンシングによって確認した。

【０２０９】

ＩＦＰ３５（ＮＩＤ－Ｈ及びΔＮ）の精製。大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）発現株（ネイティブタンパク質発現用）及び大腸菌Ｂ８３４（ＤＥ３）発現株（セレノメチオニン誘導体（Ｓｅ－Ｍｅｔ）発現用）に前記プラスミドを形質転換した。ネイティブタンパク質又はＳｅ－Ｍｅｔタンパク質を発現させるための細胞を、OD_{600}が０．８～１．０に達するまで３７℃でＬｅｎｏｘ　Ｂｒｏｔｈ培地又はＳｅｌｅｎｏＭｅｔ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｂａｓｅ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎｓ　Ｌｉｍｉｔｅｄ）中０．１ｇ／Ｌアンピシリンの存在下で培養し、次いで、３７℃で５時間、０．５ｍＭイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）で誘導した。

【０２１０】

過剰発現しているネイティブ又はＳｅ－Ｍｅｔ　ＩＦＰ３５（残基１２４～２２０）を含有する細胞を収集し、コールド１×ＰＢＳバッファ（１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ　ＫＣｌ、１０ｍＭ　Na_2HPO_4、１．８ｍＭ　KH_2PO_4、ｐＨ７．４）に再懸濁させ、それぞれ、５，０００ｐｓｉ及び１５，０００ｐｓｉのＥｍｕｌｓｉＦｌｅｘ－Ｃ５ホモジナイザ（Ａｖｅｓｔｉｎ）に細胞懸濁液を２回通すことによって溶解させた。細胞溶解物を３０，７００ｇ／４℃／４０分間遠心分離し、レジン１ｍＬ当たり上清１００ｍＬの比で、上清をＧｌｕｔａｔｈｉｏｎｅ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４Ｂレジン（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）と共に４℃で３０分間～６０分間インキュベートした。インキュベートした後、ＧＳＴレジンを１×ＰＢＳバッファで洗浄し、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０のバッファで平衡化した。組み換えタンパク質を２０ｍＭ　ＧＳＨで溶出し、４℃で一晩ＧＳＴタグをプレシジョンプロテアーゼ（ＰＰａｓｅ）によって切断した。切断後、組み換えタンパク質をＨｉＴｒａｐ　Ｑ　ＨＰ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）カラムで更に精製し、直線勾配の１５０ｍＭ～１，０００ｍＭ　ＮａＣｌで溶出した。１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０で平衡化したＨｉＬｏａｄ　１６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）カラム（プレップグレード）を最後の精製工程として用いた。溶出ピークから得られた各画分のタンパク質含量をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。標的タンパク質を含む２つのピークを別々にプールし、濃縮し、液体窒素で急速冷凍し、更に使用するまで－８０℃で保存した。

【０２１１】

ＮＭＩ、ＧＦＰ－ＮＩＤ－Ｈ、及びＧＦＰ－ＮＭＩの精製。前記プラスミドを大腸菌株ＢＬ２１（ＤＥ３）に形質転換した。１００ｍｇ／Ｌアンピシリンを含むＬＢ培地中３７℃にて細胞を培養した。ＯＤ６００が０．８～１．０に達したら、１６℃で２０時間、最終濃度が０．５ｍＭになるようにイソプロピル－チオ－Ｄ－ガラクトシダーゼ（ＩＰＴＧ）（Ｓｉｇｍａ）を添加することによって培養物を誘導した。５，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離することによって細胞を収集した。ペレットをＴｒｉｓバッファ（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）に再懸濁させ、超音波処理によって溶解させた。１６，０００ｒｐｍで３０分間遠心分離することによって溶解物を分離し、回収した上清をＮｉ－ＮＴＡアフィニティカラム（Ｑｉａｇｅｎ）に適用し、次いで、洗浄バッファ（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５０ｍＭイミダゾール)で激しく洗浄した。溶出バッファ（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５００ｍＭイミダゾール）を用いてＮｉ－ＮＴＡアフィニティカラムから組み換えタンパク質を溶出し、ＦＰＬＣタンパク質精製システムにおいて上記Ｔｒｉｓバッファを用いてＳｕｐｅｒｄｅｘ２００カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）でゲル濾過することによって更に精製した。

【０２１２】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後クマシーブルーで染色することによって全ての組み換えタンパク質の純度及び完全性を検証したところ、純度は主に＞９０％であった。全てのタンパク質製剤中のＬＰＳ含量は、Ｌｉｍｕｌｕｓアッセイによって測定したとき、検出不可能であるか又は＜１０ｐｇ／ｍｇ（タンパク質）である。

【０２１３】

結晶化及びデータ収集。ネイティブ及びＳｅ－Ｍｅｔ　ＩＦＰ３５断片はいずれもＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００カラムにおいて２つのオリゴマー状態、八量体及び二量体を示した。両形態のタンパク質を結晶化スクリーニングに用いた。最終的に、ネイティブＩＦＰ３５（残基１２４～２２０）は、１６℃で１４日間、６ｍｇ／ｍＬタンパク質１μＬ及びウェル溶液（０．２Ｍ　（NH_4）$_2SO_4$、０．１Ｍ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２０％［ｗ／ｖ］ＰＥＧ３３５０、ｐＨ５．４）１μＬからなるドロップを用いるハンギングドロップ法によって八量体形態で結晶化した。Ｓｅ－Ｍｅｔ　ＩＦＰ３５（残基１２４～２２０）の結晶は、１６℃で５０日間、１０ｍｇ／ｍＬタンパク質１μＬ及びウェル溶液（０．２Ｍ　（NH_4）$_2SO_4$、０．１Ｍ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２２％［ｗ／ｖ］ＰＥＧ３３５０、０．１Ｍ酒石酸カリウムナトリウム、ｐＨ５．５）１μＬからなる溶液からハンギングドロップ法によって二量体形態で成長した。

【０２１４】

データ収集まで、結晶を液体窒素で急速冷凍した。Ｓｅ－Ｍｅｔ結晶については、更なる２０％［ｖ／ｖ］グリセロールを凍結保護剤として用いた。ネイティブタンパク質及びＳｅ－Ｍｅｔタンパク質のＸ線回折データは、それぞれ、０．９７９８Å及び０．９７９２Åの波長で上海放射光施設（ＳＳＲＦ）においてビームラインＢＬ１７Ｕで収集した。収集したデータを積分し、ＨＫＬ－２０００（Ｏｔｗｉｎｏｗｓｋｉ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　２７６，３０７－３２６（１９９７））を用いてスケールし、ＣＣＰ４スイートのＳＨＥＬＸＤ（Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃａ，Ｓｅｃｔｉｏｎ　Ｄ，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ　５８，１７７２－１７７９（２００２）；及びＷｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃａ，Ｓｅｃｔｉｏｎ　Ｄ，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ　６７，２３５－２４２（２０１１））を用いてＳｅ－Ｍｅｔタンパク質におけるセレニウム標識位置を決定し、６つのセレン部位を見出した。

【０２１５】

構造の決定及び精密化。二量体形態のＩＦＰ３５の構造（残基１２４～２２０）をＰｈｅｎｉｘスイートのＳＡＤを用いて決定した。Ａｄａｍｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃａ，Ｓｅｃｔｉｏｎ　Ｄ，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ　６６，２１３－２２１（２０１０）。ＡｕｔｏＳｏｌを用いて初期位相を得た。モデルにおける欠損領域をＡｕｔｏＢｕｉｌｄ又はＣｏｏｔを用いて再構築した。Ｅｍｓｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃａ，Ｓｅｃｔｉｏｎ　Ｄ，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ　６６，４８６－５０１（２０１０）。前記モデルを、Ｒ値が収束するまで繰り返しｐｈｅｎｉｘ．ｒｅｆｉｎｅで更に精密化した。マシュー係数値が２．３９$Å^3$ Da^{-1}でありと計算された１つの非対称ユニットに６つの分子が見出され、溶媒含量は４８．６％であった。Ｍａｔｔｈｅｗｓ，Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　３３，４９１－４９７（１９６８）。

【０２１６】

Ｐｈａｓｅｒ－ＭＲ（Ａｄａｍｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃａ，Ｓｅｃｔｉｏｎ　Ｄ，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ　６６，２１３－２２１（２０１０））及び探索モデルとして二量体構造を用いて分子置換によって八量体形態の構造を解析した。このモデルをＣｏｏｔ（Ｅｍｓｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃａ，Ｓｅｃｔｉｏｎ　Ｄ，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ　６６，４８６－５０１（２０

１０））で再構築し、ｐｈｅｎｉｘ．ｒｅｆｉｎｅで精密化した。Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃａ， Ｓｅｃｔｉｏｎ Ｄ，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ ６６，２１３－２２１（２０１０）。最後の工程で、ＴＬＳ精密化を導入し、ＴＬＳＭＤサーバによってＴＬＳグループが提案された。Ｐａｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃａ，Ｓｅｃｔｉｏｎ Ｄ，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｙ ６２，４３９－４５０（２００６）。非対称ユニットにおいて８つの分子が見出された。計算したマシュー係数及び溶媒含量は、２．６１Å^{3} Ｄａ$^{-1}$及び５２．８％であった。Ｍａｔｔｈｅｗｓ，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３３，４９１－４９７（１９６８）。分子間相互作用をＰＩＳＡによって分析した。Ｋｒｉｓｓｉｎｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３７２，７７４－７９７（２００７）。全ての結晶構造に関連する図面は、ＰｙＭＯＬ（ｗｗｗ．ｐｙｍｏｌ．ｏｒｇ）で作製した。

【０２１７】

抗体及び試薬。抗ＩＦＰ３５抗体は、Ａｂｎｏｖａから入手した（Ｄ０１Ｐ）。抗ＨＭＧＢ１抗体は、Ａｂｃａｍから入手した（ａｂ７９８２３）。抗β－アクチン抗体は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから入手した（Ａ５４４１）。抗ＣＤ１１ｂ（Ｍ１／７０）及びＧｒ－１（ＲＢ６－８Ｃ５）抗体は、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから入手した。抗ＩｋＢａ抗体及びｐＩｋＢａ抗体は、Ａｂｃａｍから入手した。ＩＦＮγ、トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）、大腸菌０５５：５由来のリポ多糖（ＬＰＳ）、及びＤ－ガラクトサミン（Ｄ－ｇａｌ）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。ＭＣＳＦは、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈから購入した。

【０２１８】

細胞及び細胞培養条件。ＲＡＷ２６４．７マクロファージ（ＡＴＣＣから入手）は、３７℃で１０％ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中で培養した。Ｂ６／Ｃ５７マウス由来のｗｔ細胞、Ｔｌｒ３$^{-/-}$細胞、Ｔｌｒ４$^{-/-}$細胞、Ｔｌｒ７$^{-/-}$細胞、Ｔｌｒ９$^{-/-}$細胞、Ｍｙｄ８８$^{-/-}$ＢＭＤＭ細胞は、３７℃で１０％ウシ胎児血清及び２０ｎｇ／ｍＬのＭＣＳＦを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中で培養した。ＴＨＰ１細胞は、３７℃で１０％ウシ胎児血清を添加したＲＰＭＩ１６４０培地中で培養した。ＲＡＷ２６４．７マクロファージ、ＢＭＤＭ細胞、及びＴＨＰ１細胞を２×１０^{6}細胞／ウェルの密度で６ウェルプレートに播種し、一晩増殖させた。次いで、図のレジェンドに指定の通り様々な時間ＬＰＳ（１００ｎｇ／ｍＬ）、様々な濃度のサルモネラ菌ＳＲ－１１、ＩＦＮ－γ、精製組み換えタンパク質ＩＦＰ３５－ＮＩＤ又はＮＭＩで前記細胞を刺激した。

【０２１９】

ＲＮＡの単離及びｑ－ＰＣＲ。製造業者の指示書に従ってＴｒｉｚｏｌ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてＲＡＷ２６４．７細胞、ＴＨＰ１細胞、及びＢＭＤＭ細胞から全ＲＮＡを抽出した。ランダムプライマー及びＭＭＬＶ逆転写酵素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて全ＲＮＡ１μｇからｃＤＮＡの第１の鎖を合成した。ＳＹＢＲグリーンＰＣＲキット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いてリアルタイムＲＴ－ＰＣＲを実施し、ＣＦＸ９６ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いてリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応分析を実施した。各測定を二連で設定し、３回の独立した実験を実施した。プライマー配列は、以下の通りであった：

【０２２０】

マウス（ｍ）ＧＡＰＤＨ：センス、ＣＡＧＡＡＣＡＴＣＡＴＣＣＣＴＧＣＡＴＣ；アンチセンス、ＴＡＣＴＴＧＧＣＡＧＧＴＴＣＴＣＣＡＧ；

【０２２１】

ｍＴＮＦα：センス、ＣＣＡＧＴＧＴＧＧＧＡＡＧＣＴＧＴＣＴＴ；アンチセンス、ＡＡＧＣＡＡＡＡＧＡＧＧＡＧＧＣＡＡＣＡ；

【０２２２】

ｍＩＬ－１β：センス、ＡＡＧＧＡＧＡＡＣＣＡＡＧＣＡＡＣＧＡＣＡＡＡＡ；アンチ

センス、ＴＧＧＧＧＡＡＣＴＣＴＧＣＡＧＡＣＴＣＡＡＡＣＴ。

【０２２３】

ウエスタンブロット。ＲＡＷ２６４．７マクロファージ及びＴＨＰ１細胞を１００ｎｇ／ｍＬのＬＰＳ又はサルモネラ菌ＳＲ－１１で１時間、２時間、３時間、５時間、及び９時間前処理した。次いで、前記細胞を冷ＰＢＳで２回洗浄し、掻き取り、溶解バッファ（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５％ＮＰ－４０、１０％グリセロール、プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ））に回収した。細胞溶解物全体を４℃で４５分間インキュベートし、次いで、遠心分離した（１２，０００ｇ×１５分間、４℃）。細胞培養上清中の分泌タンパク質を、トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）／アセトン沈殿によって回収した。細胞培養上清に０．１１体積の氷冷１００％ＴＣＡを添加し、氷上に２時間置き、次いで、２０，０００ｇで３０分間遠心分離した。次いで、上清を慎重に取り除き、アセトン５００μＬを添加し、２０，０００ｇで１０分間遠心分離し、上清を慎重に取り除き、真空エバポレータでタンパク質のペレットを乾燥させた。タンパク質サンプルをＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、ＰＶＤＦ膜に転写し、ＩＦＰ３５、ＨＭＧＢ１、及びＮＭＩに対する特異的抗体でプロービングした。

【０２２４】

ＢＭＤＭ細胞を、精製組み換えタンパク質ＩＦＰ３５－ＮＩＤ又はＮＭＩで５分間、１５分間、３０分間、６０分間処理した。次いで、前記細胞を冷ＰＢＳで２回洗浄し、掻き取り、溶解バッファで回収した。細胞溶解物全体を４℃で４５分間インキュベートし、次いで、遠心分離した。ウエスタンブロット用のタンパク質サンプルを調製した。ＩｋＢａ、ｐＩｋＢａ、β－アクチンをＷＢによって検出した。

【０２２５】

ＬＰＳ誘導ショックモデル。大腸菌０５５：Ｂ５由来のＬＰＳ及びＤ－ｇａｌをパイロジェンフリー生理食塩水で希釈した。ＬＰＳ（体重１ｋｇ当たり５０μｇ）及びＤ－ｇａｌ（体重１ｋｇ当たり１．０ｇ）の組み合わせをＩＦＰ３５$^{-/-}$マウス、ＮＭＩ$^{-/-}$マウス、及び野生型マウスに腹腔内注射した。Ｄ－ｇａｌなしに多量のＬＰＳ（体重１ｋｇ当たり５０ｍｇ）をマウスに注射したときも、ＬＰＳ誘導致死毒性に対するＩＦＰ３５$^{-/-}$マウス及びＮＭＩ$^{-/-}$マウスの耐性が観察された。１週間マウスを観察し、死亡率を記録する。

【０２２６】

ＩＦＰ３５モノクローナル抗体は、ＬＰＳショックを受けたマウスを保護する。生存実験では、ＬＰＳ（体重１ｋｇ当たり５０ｍｇ）を注射する４時間前にＢ６／Ｃ５７マウスにＩＦＰ３５　ｍＡｂ及びＩｇＧ１（１０μｇ／マウス）を腹腔内注射した。ＬＰＳ注射の２時間後に追加用量（１０μｇ／マウス）を投与した。２４時間毎に４回、遅延用量（１０μｇ／マウス）を投与した。１週間マウスを観察し、死亡率を記録する。

【０２２７】

サイトカイン濃度の決定。ＥＬＩＳＡキット（ＣＵＳＡＢＩＯ）を用いてヒト及びマウスの血清中のＩＦＰ３５及びＮＭＩを測定した。培養上清又はマウス血清中のサイトカイン（ＩＬ－１β、ＩＬ－６、及びＴＮＦα）の放出をＥＬＩＳＡキット（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）によって測定した。

【０２２８】

ＩＦＰ３５$^{-/-}$マウスの作製。記載の通りＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムを用いてＩＦＰ３５のゲノム改変を行った。

【０２２９】

フローサイトメトリー。組み換えタンパク質ＩＦＰ３５　ＮＩＤ－Ｈ、ＮＭＩ、又はＰＢＳを、それぞれ、２４時間Ｂ６／Ｃ５７マウスに腹腔内注射した。マウスの腹水をＣＤ１１ｂ及びＧｒ－１に対する抗体と共にインキュベートし、次いで、ＦＩＴＣコンジュゲート二次抗体と共にインキュベートした。細胞をＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ　ｍａｃｈｉｎｅ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で分析して、腹腔好中球を検出し、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔＰｒｏソフトウェアを用いてデータを解析した。

【０２３０】
Ｂ６／Ｃ５７マウス由来の野生型細胞又はＴｌｒ４－／－細胞を、ＰＢＳバッファ（２％ＦＢＳを含有）中で１時間ＧＦＰ－ＮＩＤ－Ｈ及びＧＦＰ－ＮＭＩと共にインキュベートした。細胞をＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒ ｍａｃｈｉｎｅ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で分析し、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔＰｒｏソフトウェアを用いてデータを解析した。
【０２３１】
本明細書における刊行物又は文書の引用は、前述のいずれかが関連技術であることを認めることを意図するものではなく、これら刊行物又は文書の内容又はデータに関して何らかの承認を与えるものでもない。
【０２３２】
実施例２：ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質の使用
ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、インターフェロン（ＩＦＮ）によって速やかにアップレギュレートされ得る。細胞におけるＩＦＰ３５のタンパク質レベルは、ＩＦＮの誘導なしでは低い。ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、多数の免疫細胞においてＩ型又はＩＩ型のインターフェロン（ＩＦＮα／β／γ）によって誘導され得る。ＩＦＰ３５タンパク質の量及びｍＲＮＡレベルは、６時間ＩＦＮγで刺激した後に劇的に増加し、２４時間で最高レベルに達し、未処理と比べて２５倍増加することが明らかになった。大部分の細胞はＮＭＩを発現することができ、ＩＦＰ３５と同様に、ＮＭＩの発現はＩＦＮ処理後に２倍～２０倍増加する。
【０２３３】
ヒトＩＦＰ３５は、１７ｑ２１に位置し、ＮＣＢＩアクセッション番号はＮＰ＿００５５２４．２である。ｃＤＮＡ配列は、２８８アミノ酸のタンパク質をコードしており、推定分子量は３１．８ｋＤａである。１２８位のメチオニンが変異している及び／又はバリンに変化している（Ｍ１２８Ｖ）天然変異体が存在する。ヒトＮＭＩは、２番染色体に位置し、ＮＣＢＩアクセッション番号はＡＡＣ１２９４９．１であり、３０７アミノ酸を含む。
【０２３４】
ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、相同なタンパク質である。構造予測によれば、これらはいずれも２つのタンデムＮ－Ｍｙｃ結合タンパク質／ＩＦＰ３５ドメイン（Ｎｍｉ／ＩＦＰ３５ドメイン、ＮＩＤ）を含む。配列解析によれば、そのＮ末端に最初の８０アミノ酸を含有するＬ－ｚｉｐドメインを有し、続いて、それぞれ８１～１７０アミノ酸及び１７７～２６８アミノ酸に及ぶ２つのタンデムＮＩＤドメインを有する。
【０２３５】
ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、免疫蛍光顕微鏡技術によって、様々な細胞型の細胞質に共局在する。ＮＭＩ及びＩＦＰ３５タンパク質は、ネイティブゲル電気泳動及びゲル濾過によって決定したとき、ＮＩＤドメインを通じて３００ｋＤａ～４００ｋＤａの高分子質量複合体（ＨＭＭＣ）を形成することができ、これは、プロテアソームによるＩＦＰ３５の分解を抑制する。ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、ＩＦＮγで刺激した後にスペックル様凝集体を形成することができ、これは、ＮＭＩ／ＩＦＰ３５スペックル（ＮＩＳ）と呼ばれる。ＩＦＮγ処理されたアポトーシス細胞では、ＮＩＳは解離するが、高分子質量複合体は解離しない。
【０２３６】
ＩＦＰ３５は、抗ウイルスタンパク質とみなすことができ、ウシ泡沫状ウイルスの複製を阻害できることが報告されている。ＩＦＰ３５の第２のＮＩＤドメインがウシ泡沫状ウイルスの早期制御タンパク質ＢＴａｓ（ウシトランスアクチベータタンパク質）の長い末端反復配列に結合し、転写活性を阻害して、ウイルスが細胞に感染するのを抑制することができる。更に、ハイスループットスクリーニングによって、ＩＦＰ３５タンパク質がＲａｓ－ＭＡＰＫ／ＰＩ３Ｋ経路においてＣＬＥＣ４Ｇ（Ｃ型レクチンドメインファミリーメンバー４Ｇ）と相互作用できることが示された。
【０２３７】

ＮＭＩは、ＩＦＮによって誘導されるＪＡＫ－ＳＴＡＴ経路に関与し得る。ＮＭＩは、Ｓｔａｔ２を除く全てのＳＴＡＴと相互作用し、相互活性化因子ＣＢＰ／ｐ３００の会合を増強して、下流の遺伝子のＳＴＡＴ媒介転写レベルを増強する。

【０２３８】

悪性乳癌細胞株におけるＮＭＩのｍＲＮＡレベルは、正常乳房細胞と比べて２５倍～４５倍減少し、ＮＭＩのタンパク質レベルも正常乳房細胞よりも著しく低かった。連続テロメラーゼ活性は、癌の必須条件のうちの１つであると考えられ、ＮＭＩは、乳癌感受性タンパク質ＢＲＣＡ１（１型乳癌感受性タンパク質）及びｃ－Ｍｙｃに結合して三元複合体を形成し、人為的起源のテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子（ヒトテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子、ｈＴＥＲＴ）のプロモータ活性をダウンレギュレートすることができる。Ｆｌａｇ－Ｎｍｉ及びＨＡ－ＢＲＣＡ１を細胞にコトランスフェクトしたとき、ｈＴＥＲＴプロモータ活性は約７５％減少した。更に、Ｗｎｔ／β－カテニン経路においてタンパク質Ｄｋｋ１（Ｄｉｃｋｋｏｐｆ－１）が検出されたとき、データは、ＮＭＩの過剰発現がＤｋｋ１のアップレギュレートを介してＷｎｔ／β－カテニンシグナル伝達を阻害し、腫瘍の成長を遅らせることを示唆している。

【０２３９】

ＮＭＩは、ＴＧＦ／ＳＭＡＤβシグナル伝達経路におけるネガティブフィードバック制御因子ＳＭＡＤ７をアップレギュレートして、ＴＧＦ／ＳＭＡＤβシグナル伝達経路を阻害し、乳癌細胞の病原力及び可動性を低減することができる。ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、炎症シグナルに関連している。

【０２４０】

図１０は、ＩＦＰ３５タンパク質の精製プロセスを示す。（Ａ）ＩＦＰ３５－ＮＩＤのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析。左のレーン：分子マーカー。レーン１：アフィニティクロマトグラフィー精製後のＧＳＴタグ付ＩＦＰ３５－ＮＩＤ。レーン２：ＰＰａｓｅによる切断後のタンパク質の混合物。レーン３：ＧＳＴレジンカラムから溶出したＩＦＰ３５－ＮＩＤ。レーン４：サイズ排除クロマトグラフィー後に精製したＩＦＰ３５－ＮＩＤ。（Ｂ）サイズ排除クロマトグラフィー分析（ｓｕｐｅｒｄｅｘ－２００（１６／６０））。ピークの溶出体積は、タンパク質の凝集状態が二量体に近いことを示唆する。

【０２４１】

図１１は、様々なオリゴマー状態のＩＦＰ３５を示す。（Ａ）アニオン交換カラム分析。（Ｂ）サイズ排除クロマトグラフィー分析。２つのピークの溶出体積は、異なるオリゴマーの形成を示唆している。（Ｃ）精製プロセス全体についてのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析。レーン１：ＧＳＴタグ付ＩＦＰ３５。レーン２：ＧＳＴカラムから溶出したＩＦＰ３５。レーン３：ＰＰａｓｅによる切断後のＩＦＰ３５。レーン４：アニオン交換カラムに結合しているサンプル。レーン５：アニオン交換カラムに結合しなかったサンプル。レーン６：サイズ排除クロマトグラフィーｓｕｐｅｒｄｅｘ－２００から溶出したタンパク質（ピークの溶出体積は７２ｍＬ～７４ｍＬであった）。レーン７：サイズ排除クロマトグラフィーｓｕｐｅｒｄｅｘ－２００から溶出したタンパク質（ピークの溶出体積は９０ｍＬ～９２ｍＬであった）。

【０２４２】

図１２は、ＩＦＰ３５－ＮＩＤの結晶を示す。（Ａ）ネイティブな八量体結晶。０．２Ｍ硫酸アンモニウム、０．１Ｍ　Ｂｉｓ－ｔｒｉｓ、２５％［ｗ／ｖ］ＰＥＧ３３５０、ｐＨ５．５を含むリザーバ溶液中でタンパク質を結晶化させた。ドロップは、タンパク質１μＬ及びリザーバ溶液１μＬで構成されていた。温度２８９ｋで１４日間結晶を成長させた。（Ｂ）ネイティブな八量体結晶。ネイティブＩＦＰ３５－ＮＩＤ（残基１２４～２２０）は、１６℃で１日間～１４日間、タンパク質１μＬ及びウェル溶液（０．２Ｍ　$(NH_4)_2SO_4$、０．１Ｍ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２０％［ｗ／ｖ］ＰＥＧ３３５０、ｐＨ５．４）１μＬを含有し、添加剤として３０％［ｗ／ｖ］ｄ－グルコースを含むドロップを用いるハンギングドロップ法によって八量体形態で結晶化した。（Ｃ）Ｓｅ－Ｍｅｔ　ＩＦＰ３５－ＮＩＤ（残基１２４～２２０）の結晶は、１６℃で７日間、タン

パク質１μＬ及びウェル溶液（０．２Ｍ （ＮＨ４）$_2$ＳＯ$_4$、０．１Ｍ Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２２％［ｗ／ｖ］ＰＥＧ３３５０、ｐＨ５．４）１μＬからなる溶液からハンギングドロップ法を用いて二量体形態で成長した。スケールバー＝１００μｍ。（Ｄ）Ｓｅ－Ｍｅｔ ＩＦＰ３５（残基１２４～２２０）の結晶は、１６℃で３０日間、タンパク質１μＬ及びウェル溶液（０．２Ｍ （ＮＨ４）$_2$ＳＯ$_4$、０．１Ｍ Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２２％［ｗ／ｖ］ＰＥＧ３３５０、ｐＨ５．５）１μＬからなる溶液からハンギングドロップ法を用いて二量体形態で成長した。スケールバー＝２００μｍ。結晶を矢印で示す。

【０２４３】

図１３は、二量体ＩＦＰ３５－ＮＩＤの構造を示す。（Ａ）及び（Ｂ）は、異なる視点から見た全体構造である。（Ｃ）及び（Ｄ）は、異なる視点から見た分子間相互作用に関与する残基（スティックで示す）を示す。Ｈ１は、二量体形成に主に関与するα－ヘリックスを示す。１つの分子を赤色又は青色で示す。

【０２４４】

図１４は、八量体ＩＦＰ３５－ＮＩＤの構造を示す。モノマーを異なる色で示す。八量体は、二量体を形成する相互作用と同様に４つのドメイン交換二量体で形成された。分子Ａのアミノ末端及びカルボキシル末端をＡ－Ｎ及びＡ－Ｃで示す。

【０２４５】

図１５は、ドメイン交換構造を有する二量体の構造を示す。八量体のドメイン交換モデル。Ａ二量体及びＢ二量体を八量体から抽出する。赤色及び青色は、それぞれ、１分子を示す。２つの分子は、互いに結合することができる。二量体は、最終的に、１つの二量体の側面Ｈ１α－ヘリックスとそれに近接する二量体のＨ１α－ヘリックスとの間の相互作用を通じて八量体の環構造を形成する。

【０２４６】

図１６は、幾つかの領域の残基を示す。（Ａ）弧交差表面領域における残基（側鎖における原子を標識し、スティックで示し、主鎖における原子は標識しない）。（Ｂ）八量体環構造の内面における残基（側鎖における原子を標識し、スティックで示し、主鎖における原子は標識しない）。（Ｃ）二量体内のモノマーの頭部における残基（２つの分子から、側鎖における原子を標識し、スティックで示し、主鎖における原子は標識しない）。構造全体をリボンで示し、異なる色は、異なる分子を示す。

【０２４７】

図１７は、組み換えＮＭＩの精製を示す。（Ａ）マウスＮＭＩ－ＮＩＤ断片のＳＤＳ－ＰＡＧＥ。（Ｂ）ＮＭＩ－ＮＩＤのサイズ排除クロマトグラフィーの結果。（Ｃ）６＊Ｈｉｓタグの付いた完全長マウスＮＭＩのＳＤＳ－ＰＡＧＥ。（Ｄ）Ｎ末端に６＊Ｈｉｓタグの付いた完全長マウスＮＭＩのサイズ排除クロマトグラフィーの結果。

【０２４８】

図１８は、サルモネラ菌によって刺激したときのＩＦＰ３５及びＨＭＧＢ１（コントロールとして）の発現レベルを明らかにする。

【０２４９】

図１９は、サルモネラ菌によって刺激したとき、免疫蛍光法によって測定したときにＩＦＰ３５の量が経時的に変化したことを示す。

【０２５０】

図２０は、細胞にウイルスを感染させたとき、様々な期間に培地に分泌されたＩＦＰ３５の量を示す。（Ａ）細胞がＭＯＩの異なるＡ５９及びＭＨＶ６８に感染している間にウエスタンブロットによって測定した、様々な時点における分泌されたＩＦＰ３５の量。（Ｂ）細胞がＭＯＩの異なるＡ５９及びＭＨＶ６８に感染している間にウエスタンブロットによって測定した、様々な時点における分泌されたＨＭＧＢ１の量。

【０２５１】

図２１は、マウス腹膜炎モデルを示す。（Ａ）サルモネラ・チフィリウム（ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）ＳＲ－１１のマウス標準株によって誘導される腹

膜炎モデルにおいて、生菌ＳＲ－１１を前記モデルに注射したとき、ＩＦＰ３５が培地に放出された。（Ｂ）ＬＰＳ及びＡＴＰによってインフラマソームが刺激された場合、ＩＦＰ３５が媒体に放出される。

【０２５２】

図２２は、炎症を刺激するプロセス中の様々なオリゴマー状態のＩＦＰ３５の寄与を示す。幾つかの炎症因子の発現レベルは、図中に示す通り測定する。

【０２５３】

図２３は、フローサイトメトリー分析の結果を示し、これは、八量体ＩＦＰ３５－ｎｉｄが多量の好中性顆粒球を動員できることを示す。

【０２５４】

図２４は、外因性八量体ＩＦＰ３５－ＮＩＤが、マクロファージにおいてＮＦ－κＢ経路を刺激できることを示す。

【０２５５】

図２５は、ＩＦＰ３５がｍｙｄ８８シグナル伝達経路を介して炎症を刺激できることを示す。

【０２５６】

図２６は、ＩＦＰ３５によって誘導したとき、ＷＴマウス、ＴＬＲ９$^{-}$／$^{-}$マウス、及びＴＬＲ４$^{-}$／$^{-}$マウスにおけるＩＬ－１β及びＴＮＦのレベルを示す。

【０２５７】

図２７Ａは、敗血症マウスの血清中のＩＦＰ３５の量を示す。図２７Ｂは、ＩＦＰ３５モノクローナル抗体を投与したとき、敗血症マウスの生存率が上昇したことを示す。

【０２５８】

図２８は、マウスにおいて、ＩＦＰ３５をブロックすることによって、ＬＰＳによって誘導されるＩＬ－６の放出が減少したことを示す。

【０２５９】

図２９は、サルモネラ菌によって刺激したＴｈｐ１細胞の細胞溶解物及び上清中のＮＭＩの量を示す。

【０２６０】

図３０は、マウス起源のＮＭＩタンパク質がＴｈｐ１細胞におけるＴＨＦα及びＩＬ－１βの転写をアップレギュレートできることを証明する。

【０２６１】

図３１は、サイズ排除クロマトグラフィーを実行することによる凝集状態のＮＭＩのＳＤＳ－ＰＡＧＥ検出を示す。各タンパク質レーンに記載されている数字は、溶出体積を示す。持続性のＮＭＩ溶出プロファイルが存在しているので、結果は、ＮＭＩがマウス血清において異なるオリゴマーとして存在し得ることを示す。

【０２６２】

図３２は、ヒトＩＦＰ３５の二次構造予測を示す（ＰＳＩＰｒｅｄ（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆ．ｃｓ．ｕｃｌ．ａｃ．ｕｋ／ｐｓｉｐｒｅｄ／）によって実施）。

【０２６３】

以下のプロトコールで用いる実験方法は、特に指定しない限り、全て従来の方法である。以下のプロトコールで用いる材料及び試薬は全て、特に指定しない限り、商業的に入手することができる。以下のプロトコールにおけるＩＦＰ３５－ＮＩＤ１及びＩＦＰ３５－ＮＩＤ２の結果は、有意な差を有しない。

【０２６４】

ＩＦＰ３５及びＮＭＩの発現、精製、及び結晶化。

【０２６５】

１．　プラスミドの構築

ヒトＩＦＰ３５及びマウスＮＭＩのｃＤＮＡを、ＴＨＰ１細胞及びＲＡＷ２６４．７細胞（アクセッション番号：ＮＰ＿００５５２４．２及びＮＰ＿００１１３５４２１．１）から逆転写したＤＮＡから増幅させた。ＩＦＰ３５の配列は、ＤＮＡシークエンシングに

よってＭ１２８Ｖの野生型変異体であることが確認された。

【０２６６】

配列番号１は、ヒトＩＦＰ３５のｃＤＮＡ配列である。配列番号２は、ヒトＩＦＰ３５のアミノ酸配列である。１つの態様では、ＩＦＰ３５のＮＩＤは、配列番号１の核酸３７２～６６０（５’末端から）によってコードされており、前記核酸は、配列番号２のアミノ酸残基１２４～２２０（Ｎ末端から）をコードしている。１つの態様では、ＩＦＰ３５のＮＩＤは、配列番号１の核酸４０８～６４８（５’末端から）によってコードされており、前記核酸は、配列番号２のアミノ酸残基１３６～２１６（Ｎ末端から）をコードしている。

【０２６７】

配列番号３は、マウスＩＦＰ３５のｃＤＮＡ配列である。配列番号４は、マウスＩＦＰ３５のアミノ酸配列である。

【０２６８】

配列番号５は、マウスＮＭＩのｃＤＮＡ配列である。配列番号６は、マウスＮＭＩのアミノ酸配列である。ＮＭＩ－ＮＩＤは、配列番号５の核酸４５３～７５０（５’末端から）によってコードされており、前記核酸は、配列番号６のアミノ酸残基１５１～２５０（Ｎ末端から）をコードしている。

【０２６９】

配列番号７は、ヒトＮＭＩのｃＤＮＡ配列である。配列番号８は、ヒトＮＭＩのアミノ酸配列である。ＮＭＩ－ＮＩＤは、配列番号７の核酸４６５～７２０（５’末端から）によってコードされており、前記核酸は、配列番号８のアミノ酸残基１５５～２４０（Ｎ末端から）をコードしている。

【０２７０】

このプロトコールで用いたＰＣＲプライマーは、Ｂｅｉｊｉｎｇ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｓａｎｇｏｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ （Ｓｈａｎｇｈａｉ）Ｃｏ．，ＬＴＤ．によって合成されている。用いたスーパースターハイフィデリティＤＮＡポリメラーゼは、ＧｅｎＳｔａｒ Ｂｉｏｓｏｌｕｔｉｏｎｓ Ｃｏ．，Ｌｔｄ．から購入した。制限エンドヌクレアーゼは、Ｔａｋａｒａ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｄａｌｉａｎ）Ｃｏ．，ＬＴＤから購入した。アガロースは、Ｂｉｏｗｅｓｔ（ＵＳ）から購入した。迅速ゲル抽出キットは、Ｂｅｉｊｉｎｇ Ｔｒａｎｓｇｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｏ．，ＬＴＤ．から購入した。大腸菌発現ベクターｐＧＥＸ－６ｐ－１は、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ製である。ＤＨ５α，ＢＬ２１（ＤＥ３）ケミカルコンピテントセル及びＢ８３４ディフェクトコンピテントセルは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｍｐａｎｙから購入した。ＤＮＡシークエンシングは、Ｂｅｉｊｉｎｇ Ｌｉｕｈｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｏ．，ＬＴＤ．で行った。

【０２７１】

２．　タンパク質の発現及び精製

大腸菌を培養するために用いるトリプトン及び酵母抽出物は、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｏｘｏｉｄ（ＵＫ）から購入する。細胞を破砕するために用いる高圧ホモジナイゼーション細胞破砕機ＥｍｕｌｓｉＦｌｅｘ－Ｃ５は、Ａｖｅｓｔｉｎ （Ｃａｎａｄａ）から購入する。プレシジョンプロテアーゼ（Ｐｐａｓｅ）は、大腸菌株から精製する。ＧＳＴアフィニティカラム（Ｇｌｕｔａｔｈｉｏｎｅ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４Ｂ）、アニオン交換カラム（ＨｉＴｒａｐ＿Ｑ＿ＨＰ＿５ ｍｌ）、サイズ排除クロマトグラフィーカラム（ＨｉＬｏａｄ＿１６／６０＿ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００＿ｐｒｅｐ ｇｒａｄ及びＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００ １０／３００ ＧＬ、２４ｍＬ）、タンパク質精製システム（ＡＫＴＡｐｕｒｉｆｉｅｒ）は、ＧＥ ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ｌｉｆｅ ｓｃｉｅｎｃｅｓから購入する。濃度検出のために用いるＮａｎｏＤｒｏｐ ２０００分光光度計は、Ｔｈｅｒｍｏ（ＵＳ）から購入する。

【０２７２】

用いる他の生化学試薬は、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏｍｐａｎｙ又はＢｅｉｊｉｎｇ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｃｏｍｐａｎｙから購入する。

【０２７３】

３．　結晶化及びデータ収集

結晶化スクリーニングキット及びＳｅ－Ｍｅｔは、Ｈａｍｐｔｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎから購入する。Ｔｒｉｓベース、Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ、及びポリマーＰＥＧ３３５０を含むバッファは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（ＵＳ）から購入する。Ｈｏｍｅ　ＳｏｕｒｃｅＸ線回折計は、株式会社リガク（日本）から購入する。

【０２７４】

ＩＦＰ３５の発現、精製、及び結晶化

精製のために、６×ＨＩＳ、ＧＳＴ、又はＭＢＰ等の多くのタグを選択してよい。ＧＳＴタグ付タンパク質を例にとると、ヒトＩＦＰ３５タンパク質のアミノ酸１～２８８、１２８～２１６、及び１３６～２１６に対応するＤＮＡ配列を、Ｎ末端ＧＳＴタグと共にＢａｍＨ　Ｉ部位及びＸｈｏ　Ｉ部位を用いてｐＧＥＸ－６ｐ－１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に挿入した。全てのプラスミドをＤＮＡシークエンシングによって確認した。この方法で得られた組み換えタンパク質は、プレシジョンプロテアーゼ（ＰＰａｓｅ）によって切断することができる。完全長ＩＦＰ３５及び他の断片の組み換えプラスミドも同様に構築する。

【０２７５】

ｐＧＥＸ－６ｐ－１ベクターは、マルチクローニングサイトの前にＧＳＴタグ及びＰＰａｓｅ切断部位を有する。

【０２７６】

（１）．　プラスミドの構築

ＩＦＰ３５のｃＤＮＡ配列をテンプレートとし、ＰＣＲ増幅用のプライマー対を用いて、それぞれ、完全長ＩＦＰ３５タンパク質をコードしている遺伝子、ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１をコードしている遺伝子、ＩＦＰ３５　ＮＩＤ２をコードしている遺伝子を得、これらをＢａｍＨ１及びＥｃｏＲＩ制限エンドヌクレアーゼによって切断し、次いで、同じ制限酵素によって切断したベクターｐＧＥＸ－６ｐ－１にライゲーションした。ライゲーション反応後、ライゲーションされたプラスミドＤＮＡを、熱ショック法を用いて、大腸菌ＤＨ５α（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）等のコンピテントセルに形質転換した。安定した抗生物質耐性（１００μｇ／ｍＬアンピシリン）を有する細菌をプレート上に薄く広げ、プレートを３７℃で一晩インキュベートした。次の日、幾つかのコロニーをピックしてＬＢ培地２ｍＬに入れ、プラスミドを抽出してＤＮＡシークエンシングによって組み換えプラスミドの存在を確認するために、３７℃で１０時間培養した。インサートが適切な向きであり、正確に連結されていることが立証されたら、プラスミドをタンパク質発現のために用いる。

【０２７７】

ＤＮＡシークエンシングによって、プラスミド１は、ＢａｍＨ　Ｉ部位及びＸｈｏ　Ｉ部位を用いてｐＧＥＸ－６ｐ－１に挿入された配列番号１を含有するＧＳＴ－ＩＦＰ３５組み換えプラスミドである。プラスミド２は、配列番号１の５’末端から３７２～６６０のＤＮＡ配列を含有するＧＳＴ－ＩＦＰ３５－ＮＩＤ１組み換えプラスミドであり、前記ＤＮＡ配列は、ＢａｍＨ　Ｉ部位及びＸｈｏ　Ｉ部位を用いてｐＧＥＸ－６ｐ－１に挿入され、終止コドンが付加されていた。プラスミド３は、配列番号１の５’末端から４０８～６４８のＤＮＡ配列を含有するＧＳＴ－ＩＦＰ３５－ＮＩＤ２組み換えプラスミドであり、前記ＤＮＡ配列は、ＢａｍＨ　Ｉ部位及びＸｈｏ　Ｉ部位を用いてｐＧＥＸ－６ｐ－１に挿入され、終止コドンが付加されていた。

【０２７８】

完全長ＩＦＰ３５を増幅するためのプライマー：

上流プライマー：５’　ＧＧＴＡＧＡＴＣＴＡＴＧＴＣＡＧＣＣＣＣＡＣＴＧＧＡＴＧ３’

下流プライマー：５’ＧＧＴ　ＧＡＡＴＴＣＣＴＡＧＣＣＴＧＡＣＴＣＡＧＡＧＧＴＧＡＡＧＡＣＴ３’
ＩＦＰ３５－ＮＩＤ１を増幅するためのプライマー（配列番号２のアミノ酸１２４～２２０）：
上流プライマー：５’　ＧＧＴＧＧＡＴＣＣＣＣＡＧＧＴＧＡＴＧＡＴＧＴＣＣＡＧＣＣＡ３’
下流プライマー：５’ＧＧＴＧＡＡＴＴＣＴＴＡＣＴＣＣＣＣＧＴＴＣＡＣＡＴＡＣＧＧＡＧＡＧＡＣ３’
ＩＦＰ３５－ＮＩＤ２を増幅するためのプライマー（配列番号２のアミノ酸１３６～２１６）：
上流プライマー：５’　ＧＧＴＧＡＡＴＴＣＡＧＧＧＴＧＴＴＧＧＴＣＡＣＴＧＧＡＴＴＴＣＣＴ３’
下流プライマー：５’ＧＧＴＧＡＡＴＴＣＴＴＡＣＴＣＣＣＣＧＴＴＣＡＣＡＴＡＣＧＧＡＧＡＧＡＣ３’

【０２７９】

（２）．　タンパク質の発現

大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞を組み換えプラスミドで形質転換し、１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含有するＬＢ寒天平板培地で増殖させた。３７℃で一晩インキュベートした後、１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含有するＬＢブロス１００ｍＬにシングルコロニーを移し、振盪（２００ｒｅｖ／分）しながら３７℃で一晩増殖させた。１００μｇ／ｍＬアンピシリンを添加したＬＢブロス１Ｌの入ったフラスコにおいて細胞を１／４００希釈し、ＯＤ６００ｎｍが０．６に達するまで連続振盪（２００ｒｅｖ／分）しながら３７℃で培養した。次いで、前記細胞を１ｍＭ　ＩＰＴＧで処理して、組み換えタンパク質の発現を誘導した。連続振盪（２００ｒｅｖ／分）しながら３７℃で５時間インキュベートした後、４℃で３０分間４，０００ｒｅｖ／分で遠心分離することによって細胞を収集した。

【０２８０】

過剰発現しているタンパク質を含有する細胞を収集し、コールド１×ＰＢＳバッファ（１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ　ＫＣｌ、１０ｍＭ　Na_2HPO_4、１．８ｍＭ　ＫＨ２ＰＯ４、ｐＨ７．４）に１０／１を再懸濁させ、それぞれ、５，０００ｐｓｉ及び１５，０００ｐｓｉのＥｍｕｌｓｉＦｌｅｘ－Ｃ５ホモジナイザ（Ａｖｅｓｔｉｎ）に細胞懸濁液を２回通すことによって溶解させた。細胞溶解物を３０，７００ｇ／４℃／４０分間遠心分離し、上清を回収した。

【０２８１】

（３）．　タンパク質の精製

１）アフィニティクロマトグラフィー

遠心分離後、レジン１ｍＬ当たり上清１００ｍＬの比で、上清をＧｌｕｔａｔｈｉｏｎｅ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４Ｂレジン（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）と共に４℃で３０分間～６０分間インキュベートした。インキュベートした後、溶液混合物からレジンを分離するために、ＧＳＴレジンを重力カラムに添加し、次いで、レジンの約１０倍の体積の１×ＰＢＳバッファでカラムを洗浄して、ＧＳＴタグ付タンパク質をレジン上に結合させた。

【０２８２】

次に、ＧＳＴレジンを１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０のバッファで平衡化した。組み換えタンパク質を４℃で一晩プレシジョンプロテアーゼ（ＰＰａｓｅ）によって切断し、次いで、１ｍＬ／分の速度で３０分間、１５ｍＭ　ＧＳＨ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０を含有するカラムの２倍の体積のバッファで溶出する。切断及び溶出後、ＩＦＰ３５、ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１、及びＩＦＰ３５　ＮＩＤ２（全て溶出体積は、約５０ｍＬである）を得た。

【０２８３】

２）　アニオン交換クロマトグラフィー
　プロテアーゼＰＰａｓｅ酵素によって切断したタンパク質をアニオン交換カラム（ＨｉＴｒａｐ　Ｑ　ＨＰ＿５ｍＬ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ｃｏｍｐａｎｙ）に注入し、これをＦＰＬＣ精製装置（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に固定し、注入前に２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ＰＨ８．０）、５０ｍＭ　ＮａＣｌでバランスをとった。流速１ｍＬ／分及び溶出体積１００ｍＬで勾配溶出を実施するために溶出バッファ（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ＰＨ８．０）、１Ｍ　ＮａＣｌ）を用いて、２８０ｎｍ及び２６０ｎｍ紫外線吸収に従って、対応するタンパク質のサンプルを回収した。
【０２８４】
３）　サイズ排除クロマトグラフィー
　１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、５％ｇｌｙ、ｐＨ８．０で平衡化したＨｉＬｏａｄ　１６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）カラム（プレップグレード）を、アニオン交換クロマトグラフィー後の次の精製工程として用いた。同様にカラムをＦＰＬＣ精製装置（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に固定し、流速１ｍＬ／分で１２０分間溶出した。完全長ヒトＩＦＰ３５タンパク質及びＩＦＰ３５－ＮＩＤを、それぞれ、約４５ｍＬ及び９０ｍＬ～９２ｍＬの溶出体積で回収した。最後に、精製ＩＦＰ３５（溶出体積４５ｍＬ）、ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１（溶出体積９０ｍＬ～９２ｍＬ）、及びＩＦＰ３５　ＮＩＤ２（溶出体積９０ｍＬ～９２ｍＬ）を得た。
【０２８５】
　ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１及びＩＦＰ３５　ＮＩＤ２のサイズ排除クロマトグラフィーを図１０に示す。ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１サンプル及びＩＦＰ３５　ＮＩＤ２サンプルの溶出体積は９０ｍＬ～９２ｍＬであり、これは分子量１７ＫＤ～４３ＫＤに相当する。遠心分離分析及び結晶構造の結果は、ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１及びＩＦＰ３５　ＮＩＤ２が二量体であることを示した。
【０２８６】
　ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１及びＩＦＰ３５　ＮＩＤ２の精製中、溶出体積７２ｍＬ及び９０ｍＬ～９２ｍＬに対応する２つの異なるオリゴマー状態のタンパク質を得ることができる（図１１）。ＰＰａｓｅで切断する前にタンパク質をレジンカラムから溶出した場合、２つのピーク（一方は、体積７２ｍＬ、他方は、体積９０ｍＬ～９２ｍＬ）が観察された。体積７２ｍＬにおけるピークは、分子量７０ｋｄ～１００ｋｄに対応し、体積９０ｍＬ～９２ｍＬのピークは、二量体に対応する。ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１及びＩＦＰ３５　ＮＩＤ２の溶出体積のピークは、二量体及び八量体を示唆していた。
【０２８７】
ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１及びＩＦＰ３５　ＮＩＤ２のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析は、有意な差を有していなかった。
【０２８８】
４）Ｓｅ－Ｍｅｔ　ＩＦＰ３５－ＮＩＤ精製
　Ｓｅ－Ｍｅｔ　ＩＦＰ３５－ＮＩＤの精製は、ネイティブＩＦＰ３５－ＮＩＤと同様であった。相違点は、大腸菌Ｂ８３４（ＤＥ３）発現株（セレノメチオニン誘導体（Ｓｅ－Ｍｅｔ）発現用）及びＳｅ－Ｍｅｔを添加したＭ９培地を適用したことである。Ｍ９培地でｂ８３４によって発現されたタンパク質のメチオニンをＳｅ－Ｍｅｔに置き換えた。この方法で得られた結晶は、結晶相を決定するため、更には構造決定のために用いることができる。
【０２８９】
（４）．　タンパク質の結晶化
１）結晶化
　ネイティブ及びＳｅ－ＭｅｔのＩＦＰ３５－ｎｉｄ１及びＩＦＰ３５－ｎｉｄ２断片は、いずれもＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００カラムにおいて２つのオリゴマー状態、八量体及び二量体を示した。両形態のタンパク質を、市販のキット（Ｈａｍｐｔｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を用いて複数の条件で実施する結晶化スクリーニングのために用いた。精製タンパ

ク質を１４，０００ｒｐｍ／１０分間／４℃で遠心分離して、沈殿及び気泡を除去する。シッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を試み、シリコン処理したスライドガラス上でタンパク質サンプル１μＬを等体積のスクリーニング溶液と混合し、リザーバにおいて後者２００μＬで平衡化した。結晶は１６℃で成長させる。ＩＦＰ３５－ＮＩＤ１の結晶を図１２に示す。

【０２９０】

２）構造決定及び精密化

二量体ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１又はＩＦＰ３５　ＮＩＤ２の結晶構造（図１３）では、各非対称ユニット内に６つの分子が存在し、この６つのＩＦＰ３５　ＮＩＤ１又はＩＦＰ３５　ＮＩＤ２の分子の構造は同じである。電子密度チャートは、ＩＦＰ３５のアミノ酸１３６～２１６の残基を明瞭に示すことはできるが、結晶構造は、アミノ末端における残基（１２４～１３５）及びカルボキシル末端における残基（２１６～２２０）を明瞭且つ完全に示すことはできない。この現象は、ＩＦＰ３５－ＮＩＤドメイン構造のコアがアミノ酸１３６～２１６で主に構成されていることを示し、カルボキシル末端及びアミノ末端における個々の残基の増加又は減少は、構造全体にとって重要ではない。したがって、これら残基は、結晶構造解析及び結晶化実験において必ずしも必要ではない。ＩＦＰ３５－ＮＩＤ構造では、５つの逆平行ベータ片（それぞれ、配列順序に従ってＢ１～Ｂ５と命名）がバレル構造を構成しており、これがアルファヘリックス（Ｈ１）を取り囲んで完全なバレル構造を形成した（図１３Ａ及び図１３Ｂ）。

【０２９１】

水素結合及び疎水性相互作用、ファンデルワールス力等を通じてアルファヘリックス（Ｈ１）が位置する界面上にＩＦＰ３５－ＮＩＤ２二量体が形成された（図１３Ｃ及び図１３Ｄ）。ＰＩＳＡ（タンパク質界面、表面、及びアセンブリ）によって計算した相互作用表面のサイズは、約５８６．５平方Ａである。二量体形成に主に関与する残基は、アルファヘリックス（Ｈ１）におけるＧｌｕ１５０、Ｇｌｕ１５１、Ａｓｐ１５５、Ｌｙｓ１５８、Ｉｌｅ１５９、Ａｒｇ１６５、及びＡｓｐ１７２を含んでいた。

【０２９２】

８つのＮＩＤ－１又は２分子は、互いに相互作用し、環様構造を形成した。八量体における単量体は、５本のβ鎖及び２つのα－ヘリックスによって形成されるバレル様構造に折り畳まれる点で、二量体における単量体とかなり類似している。八量体構造のヘリックスα１における数対の残基が分子間の相互作用及び二量体形成の媒介に重要な役割を果たしており、これは、二量体構造と同じである。相違点については、二量体の逆平行β２及びβ３（１７７Ｌｕｅ－２１６Ｔｙｒ）が八量体では真っ直ぐになっており、近接するＮＩＤドメインの一部である隣接分子の構造に挿入されている。このように、２つの単量体が二量体に積み重ねられ、２つの単量体間でドメイン交換構造を形成し、この点で二量体とは異なる。

【０２９３】

明確にするために、このドメイン交換二量体を開構造二量体（ｏ－二量体）と命名した。それに対して、ドメイン交換しない上記二量体を閉構造二量体（ｃ－二量体）と呼ぶ。ｏ－二量体はｃ－二量体と同様に折り畳まれるので、交換ＮＩＤドメインの構造は、ｃ－二量体におけるモノマーと類似している（図１５）。隣接するｏ－二量体がｃ－二量体で用いられるのと同じＨ１αヘリックスを用いて相互作用するとき、４つのｏ－二量体から四角星状構造が形成された（図１４）。８つの単量体にＮ末端から始めて時計回りにＡ～Ｇと印を付けると、構造全体をそれぞれ４つのｏ－二量体対Ａ／Ｂ、Ｃ／Ｄ、Ｅ／Ｆ、及びＧ／Ｈに分けることができ、そのうち、Ａ／ＢとＥ／Ｆ又はＣ／ＤとＧ／Ｈの構造の詳細は類似しており、ループの構造の違いによってＡ／Ｂ及びＥ／ＦをＣ／Ｄ及びＧ／Ｈと区別した。四角星を形成した４つのドメイン交換二量体（ｏ－二量体）については、内孔の直径が３５Åであり、外側直径が８０Åである。八量体は２つの交換分子のクロスオーバーを通じて新規弧交差表面を形成するが、これは、ｃ－二量体には存在しない。八量体環構造にｃ－二量体は存在していなかった。構造の違いは、異なるオリゴマー状態間の機

能の違いに基づいている可能性がある。

【０２９４】

八量体構造に基づいて、一部の残基は構造形成に関与していることが観察され、他の残基は構造全体の表面上に主に露出していることが観察されるので、他のタンパク質と相互作用するはずである。これら外部残基は、主に、以下の通り３つの領域に分布している：

【０２９５】

ドメイン交換二量体は、大きな露出表面を形成するために幾つかの残基、例えば、Ｓｅｒ１４５、Ａｓｐ１７２、Ｖａｌ１７３、Ｌｅｕ１７７、Ａｒｇ２１２、Ｇｌｎ１９９、Ｇｌｎ２０７、Ｇｌｎ２０８、Ｐｒｏ２１０、Ｓｅｒ２１４、Ｔｈｒ２０１、及びＴｙｒ２１６等を前記二量体が提供する弧交差表面領域を形成する（図１６Ａ）。これらの中でも、残基Ｇｌｕ１５０、Ｇｌｕ１７５、Ｌｅｕ１７７、Ｇｌｎ２０７、及びＧｌｎ２０８が、より重要な位置である（図１６Ａ）。

【０２９６】

八量体ＩＦＰ５－ＮＩＤによって形成される環構造の内面上の他の残基は、他のタンパク質との相互作用に関与し得る。これら残基としては、Ｓｅｒ１４５、Ａｒｇ１４７、Ｇｌｕ１５０、Ｇｌｕ１５１、Ｖａｌ１７３、Ｇｌｙ２０６、Ｇｌｎ２０７、及びＧｌｎ２０８が挙げられる。幾つかの態様では、Ａｒｇ１４７、Ｇｌｎ２０７、Ｇｌｎ２０８、Ｇｌｕ１５０、及びＧｌｕ１５１は、八量体環構造の内面から突出している延伸側鎖を提供する（図１６Ｂ）。

【０２９７】

二量体又は八量体の構造に基づいて、単一の単量体又はドメイン交換単量体のβシートバレル様構造のアミノ末端及びカルボキシル末端の先端近傍に幾つかの比較的大きなアミノ酸残基が存在し；これら比較的大きなアミノ酸残基は、外向きに延在している。これら残基は、Ａｒｇ１８７、Ｇｌｕ１８８、Ｇｌｎ１９２、Ｇｌｎ１９６、Ａｒｇ２１２、及びＴｙｒ２１６を含んでいてよく、これらは距離が近接している。更に、幾つかのアミノ酸は、他のタンパク質、抗体、又は低分子との結合に関与し得る（図１６Ｃ）。

【０２９８】

３）データ収集及び構造決定

調製した結晶をＲｉｇａｋｕ－００７Ｘ線回折計で試験し、回折データを上海放射光施設（ＳＳＲＦ）においてビームラインＢＬ１７Ｕで収集した。ＨＫＬ２０００及びＭｏｓｆｌｍ等のデータ解析ソフトウェア、画像処理ソフトウェアｃｏｏｔ及びｐｙｍｏｌ、重原子解析ソフトウェアｓｈｅｌｘ、並びに構造精密化ソフトウェアＰｈｅｎｉｘ及びＣＣＰ４を含む既存の一般的な構造決定又は解析用のソフトウェア又はパッケージを用いてＸ線回折データを計算した。本明細書において主に用いる方法は、単一波長異常散乱及び分子置換である。

【０２９９】

Ｓｅ－ＭｅｔタンパクのＸ線回折データは、０．９７９Åの波長で、上海放射光施設（ＳＳＲＦ）においてビームラインＢＬ１７Ｕで収集した。１画像当たり回転範囲１ｏで７２０枚の画像を収集し、ＨＫＬ－２０００を用いて積分し、スケールした。計算後、解像力比は、２．３Åであり、空間群はＨ３であった。Ｓｅ－Ｍｅｔタンパクのセレン標識位置エレニウム標識位置をＳＡＤ　ＯＦ　ＳＨＥＬＸＤを用いて決定し、６つのセレン部位を見出した。ＡｕｔｏＳｏｌを用いて初期位相を得た。ＡｕｔｏＢｕｉｌｄを用いてモデルを再構築し、ｃｏｏｔ及びｐｈｅｎｉｘ．ｒｅｆｉｎｅを用いて更に精密化した。

【０３００】

同様に、上海放射光施設においてネイティブ八量体結晶の２．５Å　Ｘ線回折データを得た。ＰｈｅｎｉｘのＰｈａｓｅｒ－ＭＲ及び探索モデルとして二量体構造を用いて、前記八量体形態の構造を分子置換によって解析し、ｃｏｏｔ及びｐｈｅｎｉｘ．ｒｅｆｉｎｅを用いて更に精密化した。

【０３０１】

上記結果は全て、予測された完全長ＩＦＰ３５又はＮＩＤ断片が発現することができな

かったか又は高ポリマーとして発現したことを示し、これによって、均一な状態のタンパク質を得ることが困難になる。しかし、第１のＮＩＤドメインの第２の半分及び第２のＮＩＤドメインの第１の半分（残基１２４～２２０又は１３４～２１６、それぞれＩＦＰ３５－ＮＩＤ１及びＩＦＰ３５－ＮＩＤ２と命名、類似の精製結果を有することからＩＦＰ３５－ＮＩＤと総称する）は、発現し、うまく精製された。上記方法を用いて、特にＧＳＴに融合しているとき、大量の高純度可溶性ＩＦＰ３５－ＮＩＤを得ることができる。ＧＳＴ融合タンパク質は、ＧＳＴ－ＩＦＰ３５－ＮＩＤと称する。

【０３０２】

精製中、ＩＦＰ３５－ＮＩＤの２つの安定な凝集状態が存在し、両状態の十分に回折された結晶を得ることができる。

【０３０３】

ＮＭＩの発現及び精製

ＮＭＩのｃＤＮＡ配列をテンプレートとし、ＰＣＲ増幅用のプライマー対を用いて、それぞれ、完全長ヒトＮＭＩタンパク質をコードしている遺伝子（配列番号７の５’末端から１～９２４）、ヒトＮＭＩ－ＮＩＤ（アミノ酸残基１５５～２４０に対応する残基）をコードしている遺伝子（配列番号７の５’末端から４６５～７２０）、マウスＮＭＩをコードしている遺伝子（配列番号５の５’末端から１～９４５）、マウスＮＭＩ－ＮＩＤ（アミノ酸残基１５１～２５０に対応する残基）をコードしている遺伝子（配列番号５の５’末端から４５３～７５０）を得、これらをＢａｍＨ１及びＸｈｏＩ制限エンドヌクレアーゼによって切断し、次いで、同じ制限酵素によって切断したベクターｐＧＥＸ－６ｐ－１にライゲーションした。この方法で、３’末端に終止コドンが付加されたＧＳＴ－ヒト－ＮＭＩ、ＧＳＴ－ヒト－ＮＭＩ－ＮＩＤ、ＧＳＴ－マウス－ＮＭＩ、及びＧＳＴ－マウス－ＮＭＩ－ＮＩＤを発現する組み換えプラスミドが得られた。

【０３０４】

完全長ヒトＮＭＩを増幅するためのプライマー：

上流プライマー：５’ＧＧＴ　ＧＧＡＴＣＣ　ＡＴＧＧＡＡＧＣＴＧＡＴＡＡＡＧＡＴＧＡＣ　３’

下流プライマー：５’ＧＧＴ　ＣＴＣＧＡＧ　ＣＴＡＴＴＣＴＴＣＡＡＡＧＴＡＴＧＣＴＡＴＧＴＧ３’

【０３０５】

ヒトＮＭＩ（１５５～２４０）を増幅するためのプライマー：

上流プライマー：５’ＧＧＴ　ＧＧＡＴＣＣ　ＴＣＴＡＡＡＡＴＧＡＡＡＡＴＣＡＡＴＧＴＴＡＣ　３’

下流プライマー：５’ＧＧＴ　ＣＴＣＧＡＧ　ＴＴＡＴＴＣＴＧＴＧＴＡＴＧＧＡＧＡＡＡＣＡＧ　３

【０３０６】

完全長マウスＮＭＩを増幅するためのプライマー：

上流プライマー：５’ＣＧＣＧＧＡＴＣＣＡＴＧＧＡＴＧＣＴＧＡＴＡＡＡＧＡＣＡＡＣ　３’

下流プライマー：５’ＣＣＧＣＴＣＧＡＧＴＣＡＴＡＴＧＧＴＴＴＣＴＣＴＧＧＣＣＴＣ３’

【０３０７】

マウスＮＭＩ（１５１～２５０）を増幅するためのプライマー：

上流プライマー：５’ＣＧＣＧＧＡＴＣＣＧＴＴＣＡＴＧＴＧＧＡＣＡＴＴＴＣＴＡＡＡＡＴＧ３’

下流プライマー：５’ＣＣＧＣＴＣＧＡＧＴＣＡＡＡＡＣＡＣＣＴＧＧＴＡＣＴＴＴＴＣＴＡＡＧ３’

【０３０８】

大腸菌原核生物発現系を用いてマウス及びヒトの完全長又は断片のＮＭＩを発現させた。用いた試薬及び発現方法は、基本的にＩＦＰ３５タンパク質の発現と同様である。

【０３０９】
ＮＭＩを発現させるためのプロトコールは、ＩＦＰ３５と本質的に同様であった。ＮＭＩ精製のプロトコールは、ＩＦＰ３５と本質的に同様であった。精製は、４つの工程に分けられる：ＧＳＴ重力カラムアフィニティクロマトグラフィー、ＰＰａｓｅによるＧＳＴの切断、アニオン交換クロマトグラフィー、及びゲル濾過クロマトグラフィー。
【０３１０】
１）ＧＳＴアフィニティクロマトグラフィー
遠心分離後、レジン１ｍＬ当たり上清１００ｍＬの比で、上清をＧｌｕｔａｔｈｉｏｎｅ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４Ｂレジン（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）と共に４℃で１時間～２時間インキュベートした。インキュベートした後、溶液混合物からレジンを分離するために、ＧＳＴレジンを重力カラムに添加した。次いで、レジン上に雑多なタンパク質が存在しなくなるまで、１×ＰＢＳバッファでカラムを洗浄した。
【０３１１】
１０ｍＭ　ＧＳＨを含有する溶出バッファでＧＳＴタグ付ＮＭＩを溶出し、次いで、４℃で８時間ＰＰａｓｅによって切断した。切断及び溶出後、マウスＮＭＩ及びマウスＮＭＩ－ＮＩＤが得られた（溶出体積は、それぞれ約３０ｍＬであった）。タンパク質を、１０ｍＭ　ＧＳＨ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０を含有するバッファで、３０分間１ｍＬ／分の速度で溶出した。
【０３１２】
２）サイズ排除クロマトグラフィー
ＰＰａｓｅによって切断したタンパク質を、サイズ排除クロマトグラフィー（ＨｉＬｏａｄ＿１６／６０＿　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００＿プレップグレード及びＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００　１０／３００　ＧＬ、２４ｍＬ）によって更に精製した。１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、５％　ｇｌｙ、ｐＨ８．０でカラムのバランスをとり、流速１ｍＬ／分で１２０分溶出した。完全長マウスＮＭＩタンパク質及びＮＭＩ－ＮＩＤを、それぞれ、約３０ｍＬ及び約１２０ｍＬの溶出体積で回収した。最後に、精製ＮＭＩ（溶出体積３０ｍＬ）、ＮＭＩ　ＮＩＤ（溶出体積１２０ｍＬ）を得た。
【０３１３】
完全長及び断片マウスＮＭＩを大腸菌で発現させ、精製することはできるが、ＮＭＩ－ＮＩＤでは、ＩＦＰ３５－ＮＩＤと同様の異なるオリゴマー状態は観察されなかった。完全長ＮＭＩ及びＮＭＩ断片は、重合状態を示した。
【０３１４】
ヒトＮＭＩ及びＮＭＩ－ＮＩＤを、マウスＮＭＩ関連タンパク質と同様に精製した。
【０３１５】
この実施例は、ＩＦＰ３５－ＮＩＤの２つのオリゴマー状態：二量体及び八量体が存在することを示す。ＩＦＰ３５における２つのＮＩＤドメインは、恐らく、２つの独立したドメインではなく、２つの交換相互作用ドメインである。ＩＦＰ３５－ＮＩＤの２つのオリゴマー状態は、ＩＦＰ３５が細胞内で２つの異なるオリゴマー状態（機能に応じてである可能性が極めて高い）を有し得ることを示した。ＮＭＩは、ＩＦＰ３５と同様の機能を有しており、その構造も類似している可能性がある。しかし、ＮＭＩは、ＩＦＰ３５と比べて、異なるオリゴマー状態を有していなかった。細胞から分泌されたＮＭＩは、均質なポリマー状態であった。重量による推測に基づいて、分泌されたＮＭＩは、恐らく、二量体又は四量体であった。
【０３１６】
続いての機能実験では、八量体ＩＦＰ３５－ＮＩＤのみがＮＭＩと同様に炎症を誘導できることが見出され、これは、八量体ＩＦＰ３５－ＮＩＤが完全長ＩＦＰ３５と同じ構造的特徴を有することを示唆している。したがって、ＩＦＰ３５の受容体に対する結合に関与している八量体表面上のアミノ酸を見出し、前記結合をブロックすることによって、ＩＦＰ３５が正常に機能するのをブロックすることができる。同様に、ＩＦＰ３５とその細胞受容体との相互作用に関与しているアミノ酸残基を標的とするＩＦＰ３５及び／又はＮ

ＭＩの阻害抗体を開発することができる。
【０３１７】
実施例３　ＩＦＰ３５免疫機能の分析
ＩＦＰ３５は、過剰な免疫応答を引き起こす
ヒトのＩＦＰ３５－ＮＩＤ１、ＩＦＰ３５－ＮＩＤ２、又はＩＦＰ３５－ＮＩＤ－Ｈドメイン（二量体及び八量体）は、マウスの免疫応答を刺激するための抗原として用いることができる。各タンパク質につき４頭のマウスを用い、各マウスを４回免疫し、１頭当たりタンパク質０．２ｍｇをマウスに腹腔内注射した。次いで、最初の免疫後、１４日間毎に１回、合計４回マウスの免疫を強化した。
【０３１８】
免疫プロセスでは、マウスを免疫するためにヒトＩＦＰ３５－ＮＩＤ二量体を用いることによって、予想通り対応する抗体を得ることができ、ＮＩＤ－Ｈ八量体は、３回目の免疫までに腹部膨満を引き起し、４回目の免疫までに殆ど全てのマウスが腹部膨満を伴って死亡した。ＮＩＤ－Ｈ八量体は、免疫応答を刺激することができた。ＲＡＷ２６４．７マクロファージ（ＡＴＣＣから入手）を、１０％ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中３７℃で培養した。
【０３１９】
ＩＦＰ３５－ＮＩＤ１及びＩＦＰ３５－ＮＩＤ２は、有意な差を有していなかった。
【０３２０】
インビボにおけるＩＦＰ３５の免疫学的機能
ＢＭＤＭ細胞の培養：マウスの頸部を破壊することによってマウスを屠殺し、マウスの２本の後肢を外し、前記肢を７０％アルコールに１分間浸漬し、背骨の筋肉の除去を試み、骨髄腔をＰＢＳで洗い流す。次いで、４００ｇで１００分間遠心分離し、上清を慎重に取り除く。赤血球細胞を細胞溶解バッファに回収し、次いで、ＰＢＳ１０ｍＬを添加して前記細胞溶解バッファを中和する。１０％ウシ胎児血清、１％ペニシリン－ストレプトマイシン、１％Ｌ－グルタミン、及び２０ｎｇ／ｍＬのＭＣＳＦを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中３７℃でＢＭＤＭ細胞を培養した。
【０３２１】
ＲＡＷ２６４．７マクロファージ（ＡＴＣＣから入手）を、１０％ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中３７℃で培養した。
【０３２２】
１．　マクロファージ２６４．７及びＢＭＤＭにおけるサルモネラ菌感染は、ＩＦＰの放出を引き起こす
細胞を予熱ＰＢＳで３回洗浄した。Ｒａｗ２６４．７細胞及びＢＭＤＭ細胞を膵臓酵素で分解し、血球計数器でカウントして、全ての穴の細胞数を確認した。予熱ＤＭＥＭ１ｍＬを細胞培養皿に添加した。サルモネラ菌ＳＲ－１１を１２，０００ＲＰＭで１０分間遠心分離し、ＰＢＳで２回洗浄した。サルモネラ菌を懸濁させ、血球計数器でカウントした。感染多重度に従ってＲａｗ２６４．７細胞にサルモネラ菌を添加し（１：１００又は１：１０）、一方、感染多重度に従ってＢＭＤＭ細胞にも添加した（１：１０又は１：２）。細胞培養皿を室温で１０分間１，５００ＲＰＭで遠心分離したが、これは、細胞に細菌を吸着させるのに有益である。１時間Ｒａｗ２６４．７細胞をサルモネラ菌に感染させ、０．５時間ＢＭＤＭをサルモネラ菌に感染させたとき、細胞培養物中のサルモネラ菌を除去し、１００μｇ／ｍＬアミカシンＤＭＥＭを培地に添加した。３時間Ｒａｗ２６４．７細胞をサルモネラ菌に感染させ、１時間ＢＭＤＭ細胞をサルモネラ菌に感染させたとき、１０μｇ／ｍＬアミカシンＤＭＥＭを培地に添加した。それぞれ、１時間、３時間、５時間、９時間、又は０．５時間、１時間、２時間、４時間、Ｒａｗ２６４，７細胞及びＢＭＤＭ細胞をサルモネラ菌に感染させた後、細胞培養上清中の分泌タンパク質を回収した。
【０３２３】
細胞培養上清を濃縮し、細胞をサルモネラ菌に感染させた後の全細胞溶解物を抽出する：細胞培養上清の濃縮：（１）細胞培養上清に０．１体積の氷冷１００％ＴＣＡを添加し

、２時間氷上に置いた。（２）４℃で３０分間１２，０００ｇで遠心分離する。（３）前記上清を慎重に除去し、沈降物を冷アセトンで２回洗浄する。（４）４℃で１０分間１２，０００ｇで遠心分離する。（５）前記沈降物を、１×ＳＤＳ－ＰＡＧＥローディングバッファ３０μＬ中、９５℃で５分間加熱した。

【０３２４】

細胞にサルモネラ菌を感染させた後、全細胞溶解物を抽出する：（１）細胞の回収：細胞培養上清を除去し、ＰＢＳで２回洗浄し、ＰＢＳ１ｍＬを細胞培養皿に添加し、細胞スクラッチャーで細胞を掻き取り、細胞懸濁液を１．５ｍＬチューブにピペットで移し、１，５００ＲＰＭで５分間遠心分離し、上清を除去する。細胞沈降を用いて全タンパク質を抽出する。（２）細胞の溶解：適切な量のＲＩＰＡ溶解バッファをとり、最終濃度１ｍｍになるようにＰＭＳＦを溶解バッファに添加する、プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ）。ＲＩＰＡ溶解バッファ１５０μＬを細胞培養皿の各穴に添加し、細胞を氷上で１５分間分割する。（３）細胞溶解バッファの回収：細胞が完全に分割した後、４℃で５分間１２，０００ＲＰＭで遠心分離し、上清を新たなチューブに移す。（４）サンプルの煮沸：細胞溶解バッファを、２×ＳＤＳ－ＰＡＧＥローディングバッファ１５０μＬ中９５℃で５分間加熱した。

【０３２５】

図１８に示す通り、細胞培養上清中にＩＦＰ３５は全く又は殆ど存在しない。しかし、サルモネラ菌によって刺激した後１時間以内に、ＲＡＷ２６４．７細胞の培養上清中で、放出されたＩＦＰ３５を検出することができた。次の数時間では、ＩＦＰ３５が時間依存的に培養物中に蓄積した。対照的に、ＩＦＰ３５の放出時間は、公知の危険信号ＨＭＧＢ－１よりも早い。また、細胞内のＩＦＰ３５のタンパク質レベルは減少する（図１８Ａ）。ＢＭＤＭ細胞及びＰＢＤＭ細胞を用いたときも同じ結果が得られた（図１８Ｂ及び図１８Ｃ）。

【０３２６】

サルモネラ菌に感染した後の細胞内ＩＦＰ３５タンパク質含量の変化をよりよく観察するために、免疫蛍光法を用いてＩＦＰ３５タンパク質を検出した。図１９に示す通り、ＩＦＰ３５を赤色で染色し、ＤＡＰＩを青色で染色した。２つの異なる感染スキーム（細胞数のＭＯＩに対する比がそれぞれ１：２又は１：１０）を用いて、０時間～３時間のＩＦＰ３５タンパク質含量の変化を観察した。細胞内ＩＦＰ３５タンパク質含量は、時間が経つにつれて徐々に低下し、ＭＯＩのより高い感染細胞においてＩＦＰ３５がより速やかに減少することが見出された。感染によって誘導されたＩＦＰ３５の蓄積が細胞内部で生じたのではなく、主に細胞の外側に分泌されたことが更に証明された。この結果は、細胞内のＩＦＰタンパク質含量の変化についての上記試験と一致している。

【０３２７】

２．　ウイルス感染におけるＩＦＰ３５の放出

実験方法：感染多重度に従ってＲａｗ２６４．７細胞にウイルスを添加した。時間依存的に細胞培養上清を回収する。４℃で３０分間、２００ｇで遠心分離する。トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）によって上清を回収し、ウエスタンブロットする。

【０３２８】

インビトロでＲａｗ２６４．７に感染させたのがＤＮＡウイルス（ＭＨＶ６８）であろうとＲＮＡウイルス（Ａ５９）であろうと、感染多重度（ＭＯＩ）が０．２であるとき、感染の８時間後にＩＦＰ３５が放出される。同条件下で、ＨＭＧＢ１は放出されない。感染多重度を５に増大させると、２４時間感染させた後にＨＭＧＢ１が明らかに放出される。インビトロで細菌感染させた細胞と同様に、ＩＦＰ３５は、ＨＭＧＢ１よりも早く放出され、これは、ＩＦＰ３５が非常に重要な危険信号分子であることを示した。

【０３２９】

３．　マウス腹膜炎モデル

図２１Ａは、サルモネラ菌ＳＲ－１１の標準株によって引き起こされたマウス腹膜炎モデルにおいて、ＩＦＰ３５が放出され得たことを示す。サルモネラ菌の生菌（生菌ＳＲ－

１１）の注射によってマウス腹膜炎が引き起こされ、マウス腹水にＩＦＰ３５が放出され得た。一方、共生大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｓｔａｂｌｅ３）及びサルモネラ菌の熱死菌（ＨＫ　ＳＲ－１１、熱死ＳＲ－１１）を注射しても、炎症は引き起こされず、ＩＦＰ３５も検出できなかった。この結果は、ＩＦＰ３５が炎症応答と相関していることを示す。

【０３３０】

サルモネラ菌ＳＲ－１１の標準株の樹立によって、マウス腹膜炎モデルが得られた。２時間、４時間、８時間細菌を注射した後、マウスの腹水をＰＢＳ８ｍＬで洗浄し、腹水洗浄バッファ４ｍＬで抽出する。トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）沈殿し、ウエスタンブロットによってＩＦＰ３５を検出する。（１）Ｃ５７／Ｂ６マウス、雄、８週齢～１０週齢、体重約２０ｇ、４時間絶食。（２）各マウスに2×10^{5}個の細菌を注射する。（３）２時間、４時間、８時間細菌を注射した後、マウスの腹水をＰＢＳ８ｍＬで洗浄し、腹水洗浄バッファ４ｍＬで抽出する。（４）４℃で１０分間、２００ｇで遠心分離し、細胞培養物を回収し、トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）沈殿する。（５）ウエスタンブロットによってＩＦＰ３５を検出する。

【０３３１】

図２１Ｂに示す通り、ＬＰＳ、ＡＴＰがインフラマソームを活性化したとき、ＩＦＰ３５が放出され得た。実験方法：（１）Ｒａｗ２６４．７細胞をＬＰＳ（１μｇ／ｍＬ）で４時間刺激し；（２）ＡＴＰ（５ｍＭ）で１０分間、３０分間、６０分間、細胞を連続刺激し；（３）４℃で１０分間、２００ｇで遠心分離し、細胞培養物を回収し、トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）沈殿し；（４）ウエスタンブロットによってＩＦＰ３５を検出する。

【０３３２】

炎症応答におけるＩＦＰ３５

１．　ＩＦＰ３５は炎症性サイトカインの産生を誘導する

実験手順：実施例１におけるＩＦＰ３５の二量体及び八量体の内毒素を取り除き、それらをＢＭＤＭ細胞培養培地（最終濃度５μｇ／ｍＬ、２５μｇ／ｍＬ、５０μｇ／ｍＬ）に添加し、４時間刺激し、Ｑ－ＰＣＲ及び内部標準としてのＧＡＰＤＨを用いて公知の炎症促進因子ＴＮＦ－α及びＩＬ－１βを検出する。

【０３３３】

Ｑ－ＰＣＲ増幅プライマー：

ＩＬ－１β：

センス：５’ＡＡＧＧＡＧＡＡＣＣＡＡＧＣＡＡＣＧＡＣＡＡＡＡ　３’

アンチセンス：５’ＴＧＧＧＧＡＡＣＴＣＴＧＣＡＧＡＣＴＣＡＡＡＣＴ　３’

ＴＮＦ－α：

センス：５’ＣＣＡＧＴＧＴＧＧＧＡＡＧＣＴＧＴＣＴＴ　３’

アンチセンス：５’ＡＡＧＣＡＡＡＡＡＧＡＧＧＡＧＧＣＡＡＣＡ　３’

ＧＡＰＤＨ：

センス：５’ＡＧＧＴＣＧＧＴＧＴＧＡＡＣＧＧＡＴＴＴＧ　３’

アンチセンス：５’ＴＧＴＡＧＡＣＣＡＴＧＴＡＧＴＴＧＡＧＧＴＣＡ３’

【０３３４】

図２２に示す通り、公知の炎症促進因子ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ｉＮＯＳ、及びＣＤ８６は、ＢＭＤＭ細胞においてＮＩＤ－Ｈ八量体の存在下でアップレギュレートされ得るが、ＮＩＤ－Ｈ二量体は、この効果を有していなかった。この結果は、異なる凝集状態のＩＦＰ３５－ＮＩＤが異なる効果を有していることを証明した。

【０３３５】

ＩＦＰ３５　ＮＩＤ１及びＩＦＰ３５　ＮＩＤ２は、同じ方法を用い、その結果は、有意な差を有しない。

【０３３６】

２．　ＩＦＰ３５は、過剰な免疫応答につながる

ＩＦＰ３５－ＮＩＤの二量体及び八量体をマウスの腹腔に注射した。８時間後、ＩＦＰ３５－ＮＩＤ八量体は、好中球の蓄積によって顕在化する急性炎症応答を引き起こした。

この作用が、早期炎症応答におけるマウスの腹部膨満及び死亡の理由であるはずである。この結果は、ＩＦＰ３５－ＮＩＤ八量体が、インビトロでマクロファージを誘導して炎症因子を産生させるだけでなく、マウスにおける炎症応答を制御する能力を有することも証明した。

【０３３７】

３．　ＩＦＰ３５は、マクロファージにおけるＮＦ－κＢ経路を活性化する

ＩＦＰ３５－ＮＩＤ八量体によるＮＦ－κＢの活性化が観察された。ＮＦ－κＢ経路は、マクロファージ活性化の重要な経路である。検出方法：ＩＦＰ３５－ＮＩＤの二量体及び八量体の内毒素を含まないタンパク質をＲａｗ２６４．７細胞に添加し、１５分間、３０分間、及び６０分間刺激する。氷上で３０分間ＲＩＰＡ（プロテアーゼ阻害剤カクテル、Ｒｏｃｈｅ）バッファに細胞を回収した。４℃で１０分間１２，０００ｒｐｍで遠心分離する。上清を回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥローディングバッファ中９５℃で１０分間加熱する。サンプルを－７０度で保存する。ウエスタンブロットを用いて、ＮＦ－ｋＢシグナル伝達経路における抑制因子ＩｋＢαのリン酸化を検出した。ホスホＩｋＢα及びＩｋＢα抗体は、ＣＳＴから入手した。結果は、図２４に示す通り、原核生物で発現させた異なる重合状態の内毒素を含まないタンパク質を添加した後、ＩＦＰ３５－ＮＩＤ組み換えタンパク質の八量体の発現によって、ＩｋＢαのリン酸化が増加したが、全ＩｋＢαタンパク質レベルは低下した。ＩＦＰ３５－ＮＩＤ組み換えタンパク質の八量体は、ＮＦ－ｋＢシグナル伝達経路を活性化することが示唆された。まとめると、これら結果は、八量体は、ＮＦ－ｋＢシグナル伝達経路を活性化することによって、マクロファージ活性化を誘導して多数の炎症性サイトカインを産生させることができるが、二量体はできないことを示した。

【０３３８】

ＩＦＰ３５の細胞表面受容体

ＩＦＰ３５は、細胞外又は体液に分泌されることによって炎症応答を誘導したので、この実施例は、ＩＦＰ３５活性を媒介する細胞表面受容体を同定し、次いで、このプロセスにおけるＴＬＲ－Ｍｙｄ８８経路の生物学的機能を検出することを目的とする。

【０３３９】

ＢＭＤＭ細胞の培養：マウスの頸部を破壊することによってマウスを屠殺し、マウスの２本の後肢を外し、前記肢を７０％アルコールに１分間浸漬し、背骨の筋肉の除去を試み、骨髄腔をＰＢＳで洗い流す。次いで、４００ｇで１００分間遠心分離し、上清を慎重に取り除く。赤血球細胞を細胞溶解バッファに回収し、次いで、前記細胞溶解バッファを中和するためにＰＢＳ１０ｍＬを添加する。ＢＭＤＭ細胞を、１０％ウシ胎児血清、１％ペニシリン－ストレプトマイシン、１％Ｌ－グルタミン、及び２０ｎｇ／ｍＬのＭＣＳＦを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中３７℃で培養した。

【０３４０】

ＩＦＰ３５又はＮＭＩの刺激：ＩＦＰ３５－ＮＩＤの二量体、八量体、又はＮＭＩ（５μｇ／ｍＬ、２５μｇ／ｍＬ、又は５０μｇ／ｍＬ）を添加して、４時間ＢＭＤＭ細胞を刺激し、ＩＬ－１β及びＴＮＦ－αをＱ－ＰＣＲによって検出した。

【０３４１】

細胞の全ＲＮＡの抽出：ＫａｎｇＷｅｉ　Ｃｏｍｐａｎｙ（カタログ番号ＣＷ　０５９７）製のＲＮＡ抽出キットを用いてＢＭＤＭ細胞から全ＲＮＡを抽出した。Ｔｒｉｚｏｌ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてＲＡＷ２６４．７細胞から全ＲＮＡを抽出した。

【０３４２】

逆転写：ＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔ（商標）ＩＩ　１ｓｔ　Ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（カタログ番号６２１０Ａ）を用いて全ＲＮＡ１μｇからｃＤＮＡの第１の鎖を合成した。ＳＹＢＲ（登録商標）Ｐｒｅｍｉｘ　Ｅｘ　Ｔａｑ（商標）（Ｔｌｉ　ＲＮａｓｅＨ　Ｐｌｕｓ）及びＲＯＸ　ｐｌｕｓ　Ｑ－ＰＣＲキット（カタログ番号ＲＲ４２ＬＲ）を用いてリアルタイムＲＴ－ＰＣＲを実施した。図２５に示す通り、ＩＦＰ３５－ＮＩＤタンパク質を用いてＭｙｄ８８ノックアウトＢＭＤＭ細胞を処理し

たところ、これら細胞においてＮＩＤ－Ｈの活性が急激に低下し、ＩＦＰ３５－ＮＩＤによってＩＬ－１β（図２５Ａ）及びＴＮＦ－α（図２５Ｂ）を誘導することができなかった。ＩＦＰ３５は、細胞表面におけるＴＬＲ受容体に結合して、Ｍｙｄ８８依存性経路を通じてＮＦ－κＢを活性化し、炎症因子を産生させる傾向がある。

【０３４３】

ＴＬＲ－４及びＴＬＲ－９は、炎症応答を誘導することができる２つの主な細胞表面受容体タンパク質である。図２６に示す通り、ＴＬＲ４は、ＩＦＰ３５－ＮＩＤを通じてＩＬ－１β（図２６Ａ）及びＴＮＦ－α（図２６Ｂ）の増加を媒介する。ＮＩＤ－Ｈ八量体が野生型マウス、ＴＬＲ９－／－マウス、及びＴＬＲ４－／－マウスのＢＭＤＭ細胞においてＴＮＦ－α及びＩＬ－１βをアップレギュレートすることができたのに対して、ＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質は、直接又は間接的に、ＴＬＲ４によって同定することもできる。

【０３４４】

敗血症等の過剰な免疫応答によって引き起こされる疾患の治療におけるＩＦＰ３５モノクローナル抗体

ＩＦＰ３５－ＮＩＤは、マクロファージを活性化し、炎症応答を誘導することができるので、ＩＦＰ３５は、敗血症において何らかの役割を果たしている可能性があり、ＩＦＰ３５は、敗血症においてサイトカインストームを激化させ、マウスを死に至らしめることができる。

【０３４５】

１．　敗血症マウスにおけるＩＦＰ３５の発現

ＬＰＤ誘導性ショックモデルの樹立：（１）Ｂ６／Ｃ５７マウスを一晩絶食させ；（２）次の日の朝、ＬＰＳ（体重１ｋｇ当たり５ｍｇ及び１０ｍｇ）をマウスに腹腔内注射し；（３）注射の３時間後にキャピラリーを用いて採血し；（４）注射の６時間後にマウスの眼を摘出し、採血する。

【０３４６】

ＥＬＩＳＡを用いた、ＬＰＳ誘導性ショックモデルにおけるＩＦＰ３５の濃度検出。（１）抗体のコーティング：ＩＦＰ３５　１Ｄ７の精製モノクローナル抗体をＰＢＳで２ｍｇ／ｍＬに希釈し、１００ｍＬ／穴を酵素標識プレートに入れる、４℃で一晩；（２）洗浄：ＰＢＳＴ（０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）で３回洗浄する；（３）ブロッキング：振動テーブル上に２％ＢＳＡを含有するＰＢＳＴ（０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）を置き、室温で１時間退色させる；（４）希釈した標準及びサンプル１００μＬ／穴を添加する、４℃で一晩；（５）洗浄：ＰＢＳＴ（０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）で３回洗浄し、ｄｄH_2Oで２回洗浄する；（６）発色：各ウェルにＴＭＢ１００μＬを添加し、光を避け、振動テーブルに１０分間～２０分間置く。（７）反応の停止：２Ｍ　H_2SO_4　５０μＬを各ウェルに添加する；（８）酵素標識プレート、４５０ｎｍでＯＤをスキャンする。

【０３４７】

敗血症マウスモデルの血液中におけるＩＦＰ３５濃度の定量的検出は、ＬＰＳ誘導性敗血症マウスの血液中で高濃度のＩＦＰ３５を示し、これは、ナノグラムレベル（約８ｎｇ）に達する。しかし、ＨＭＧＢ１のレベルは、先行論文によればｐｇ６００～８００である。そして、それは、ＬＰＳ注射の時間又は用量に依存する（３時間及び６時間、体重１キログラム当たり５ｍｇ及び１０ミリグラムのＬＰＳ用量）。

【０３４８】

２．　ＩＦＰ３５モノクローナル抗体を注射することによる敗血症マウスの生存率上昇

ＩＦＰ３５モノクローナル抗体１Ｄ７をマウスに注射した。図２７に示す通り、ＩＦＰ３５モノクローナル抗体は、敗血症マウスの生存率を増大させることができた。この結果は、ＩＦＰ３５モノクローナル抗体１Ｄ７が細菌モデルにおいて有効にマウスを死から保護することができることを証明した。１Ｄ７で処理したマウス（ｎ＝１０）の中央致死時間は、１０７時間であったが、一方、コントロールは５０時間であった。

【０３４９】

３．　ＩＦＰ３５モノクローナル抗体を注射した後のマウスにおける炎症因子ＩＬ－６の発現の検出について、具体的な方法は、以下の通りであった：ＩＬ－６　ＥＬＩＳＡキットは、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから入手し、詳細な操作情報については、製品の仕様書を参照する。

【０３５０】

図２８に示す結果から、重篤な敗血症のマウスでは、ＩＦＰ３５抗体（１Ｄ７）を注射することによってマウスの体液中でＩＬ－６タンパク質が高度に発現したが、注射していないマウスでは発現しなかった。

【０３５１】

ＩＦＰ３５及び抗腫瘍治療

幾つかの腫瘍では、ＮＭＩのタンパク質レベルが低下する。ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、生物の炎症応答を促進する、免疫系を活性化する、及び炎症性サイトカインの放出を促進する等、生物学的進行における様々な機能を有することが強調されたので、精製ＩＦＰ３５又はＮＭＩを血液中に注射することによって、抗腫瘍治療を活性化及び／又は増強することができる。したがって、ＩＦＰ３５又はＮＭＩのタンパク質は、有望な抗癌薬であり得る。

【０３５２】

実施例４　ＮＭＩ免疫機能分析

ＮＭＩは、過剰な免疫応答を引き起こす

完全長ＮＭＩ及びＮＭＩ－ＮＩＤをマウスの免疫応答を刺激するための抗原として用いた。各タンパク質につき４頭のマウスを用い、各マウスを４回免疫し、マウス１頭当たりタンパク質０．２ｍｇをマウスの腹腔に注射した。次いで、最初の免疫後１４日間毎に１回、合計４回マウスの免疫を強化した。

【０３５３】

免疫プロセスでは、マウスを免疫するためにマウスＮＭＩ－ＮＩＤを用いることによって、３回目の免疫までに腹部膨満を引き起し、４回目の免疫までに殆ど全てのマウスが腹部膨満を伴って死亡した。したがって、マウスにおいて抗体を得ることは困難である。したがって、ＮＩＤ－Ｈ八量体は、免疫応答を刺激し得る。

【０３５４】

インビボにおけるＮＭＩの免疫学的機能研究

１．　細胞が細菌に感染したとき、ＮＭＩが細胞外空間に分泌される

ＮＭＩとＩＦＰ３５とは相同なタンパク質である。ＩＦＰ３５及びＮＭＩは、高分子質量複合体（ＨＭＭＣ）を構築し得る。この実施例では、ＮＭＩを検出した。

【０３５５】

ＢＭＤＭ細胞の培養：マウスの頸部を破壊することによってマウスを屠殺し、マウスの２本の後肢を外し、前記肢を７０％アルコールに１分間浸漬し、背骨の筋肉の除去を試み、骨髄腔をＰＢＳで洗い流す。次いで、４００ｇで１００分間遠心分離し、上清を慎重に取り除く。赤血球細胞を細胞溶解バッファに回収し、次いで、ＰＢＳ１０ｍＬを添加して前記細胞溶解バッファを中和する。ＢＭＤＭ細胞を、１０％ウシ胎児血清、１％ペニシリン－ストレプトマイシン、１％Ｌ－グルタミン、及び２０ｎｇ／ｍＬのＭＣＳＦを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中３７℃で培養した。

【０３５６】

ＲＡＷ２６４．７マクロファージ（ＡＴＣＣから入手）を、１０％ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中３７℃で培養した。

【０３５７】

２．　ＴＨＰ１細胞におけるサルモネラ菌による感染、並びに細胞の溶解物及び上清におけるＮＭＩのタンパク質レベルの検出

実験方法：１５ｍＬチューブにＴＨＰ１細胞を回収し、５００ｇで５分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を予熱ＰＢＳで洗浄し、５００ｇで５分間遠心分離し、上清を除去する。ＤＭＥＭに細胞を懸濁させ、血球計数器で細胞をカウントする。3×10^{5}細胞を全

ての穴に添加する。細胞培養皿に予熱ＤＭＥＭ１ｍＬを添加する。サルモネラ菌ＳＲ－１１を１２，０００ＲＰＭで１０分間遠心分離し、ＰＢＳで２回洗浄した。サルモネラ菌を懸濁させ、血球計数器でカウントした。感染多重度に従ってＴＨＰ１細胞にサルモネラ菌を添加した（１：１００又は１：１０）。細胞培養皿を室温で１０分間１，５００ＲＰＭで遠心分離したが、これは、細胞上に細菌を吸着させるのに有益である。１時間ＴＨＰ１細胞をサルモネラ菌に感染させた場合は、細胞培養物中のサルモネラ菌を除去し、１００μｇ／ｍＬアミカシンＤＭＥＭを培地に添加した。３時間ＴＨＰ１細胞をサルモネラ菌に感染させた場合は、１０μｇ／ｍＬアミカシンＤＭＥＭを培地に添加した。それぞれ、１時間、３時間、５時間、及び９時間、ＴＨＰ１細胞をサルモネラ菌に感染させた後、細胞培養上清中の分泌タンパク質を回収した。

【０３５８】

細胞培養上清を濃縮し、細胞をサルモネラ菌に感染させた後に全細胞溶解物を抽出する：細胞培養上清の濃縮：細胞培養上清に０．１体積の氷冷１００％ＴＣＡを添加し、氷上で２時間置いた。４℃で３０分間、１２，０００ｇで遠心分離する。前記上清を慎重に除去し、沈降物を冷アセトンで２回洗浄する。（４）４℃で１０分間、１２，０００ｇで遠心分離する。（５）前記沈降物を、１×ＳＤＳ－ＰＡＧＥローディングバッファ３０μＬ中、９５℃で５分間加熱した。

【０３５９】

細胞にサルモネラ菌を感染させた後、全細胞溶解物を抽出する：（１）細胞の回収：ＴＨＰ１細胞を１５ｍＬチューブに回収し、５００ｇで５分間遠心分離し、上清を除去し、予熱ＰＢＳで細胞を洗浄し、５００ｇで５分間遠心分離し、上清を除去する。細胞沈降を用いて全タンパク質を抽出する。（２）細胞溶解：適切な量のＲＩＰＡ溶解バッファをとり、ＰＭＳＦを最終濃度１ｍｍの溶解バッファ、プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ）に添加する。ＲＩＰＡ溶解バッファ１５０μＬを細胞培養皿の各穴に添加し、細胞を氷上で１５分間分割する。（３）細胞溶解バッファの回収：細胞が完全に分割した後、４℃で５分間１２，０００ＲＰＭで遠心分離し、上清を新たなチューブに移す。（４）サンプルの煮沸：細胞溶解バッファを、２×ＳＤＳ－ＰＡＧＥローディングバッファ１５０μＬ中９５℃で５分間加熱した。

【０３６０】

ＴＨＰ１細胞の培養：ＴＨＰ１細胞を、１０％ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中３７℃で培養した。

図２９に示す通り、細胞培養上清中にＮＭＩは全く又は殆ど存在しない。しかし、サルモネラ菌によって刺激した後１時間以内に、ＴＨＰ１細胞の培養上清中において、放出されたＮＭＩを検出することができた。一方、細胞内のＮＭＩは、それ程変化しない。この結果は、細菌に感染したとき、ＮＭＩが細胞外に分泌され得ることを示した。

【０３６１】

炎症応答におけるＮＭＩ

マウス完全長ＮＭＩをＴＨＰ１細胞培養培地（最終濃度５μｇ／ｍＬ、２５μｇ／ｍＬ、５０μｇ／ｍＬ）に添加し、４時間刺激し、公知の炎症促進因子ＴＮＦ－α及びＩＬ－１βを検出する。

【０３６２】

Ｒａｗ２６４．７細胞の培養：細胞を、１０％ウシ胎児血清を添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中３７℃で培養した。

【０３６３】

細胞の全ＲＮＡの抽出：ＫａｎｇＷｅｉ　Ｃｏｍｐａｎｙ（カタログ番号ＣＷ　０５９７）製のＲＮＡ抽出キットを用いてＢＭＤＭ細胞から全ＲＮＡを抽出した。Ｔｒｉｚｏｌ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてＲＡＷ２６４．７細胞から全ＲＮＡを抽出した。

【０３６４】

逆転写：ＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔ（商標）ＩＩ　１ｓｔ　Ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（カタログ番号６２１０Ａ）を用いて、全ＲＮＡ１μｇからｃ

ＤＮＡの第１の鎖を合成した。ＳＹＢＲ（登録商標）Ｐｒｅｍｉｘ Ｅｘ Ｔａｑ（商標）（Ｔｌｉ ＲＮａｓｅＨ Ｐｌｕｓ）及びＲＯＸ ｐｌｕｓ Ｑ－ＰＣＲキット（カタログ番号ＲＲ４２ＬＲ）を用いてリアルタイムＲＴ－ＰＣＲを実施した。

【０３６５】

図３０に示す通り、コントロール、ＬＰＳ、ＮＭＩタンパク質（５μｇ／ｍＬ、２５μｇ／ｍＬ、又は５０μｇ／ｍＬ）を添加すると、ＴＨＰ１細胞においてＮＭＩの存在下で公知の炎症促進因子ＴＮＦ－α及びＩＬ－１βがアップレギュレートされ得る。この結果は、ＩＦＰ３５と同様にＮＭＩも他の炎症因子を誘導し得ることを示した。

【０３６６】

同方法を用いてＮＭＩ－ＮＩＤ１及び完全長ＮＭＩを試験したところ、結果に有意な差はない。

【０３６７】

ＮＭＩタンパク質の凝集状態

細菌に感染した後の細胞によって分泌されたＮＭＩの凝集状態について試験した。ＴＨＰ１細胞をサルモネラ菌に感染させたとき、ＮＭＩが細胞培養培地に分泌され得る。図３１に示す通り、分泌されたＮＭＩを含有する細胞培養培地１０ｍＬを、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ濃縮チューブを用いて２ｍＬまで濃縮する。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ Ｓ－２００分子篩カラムを用いてクロマトグラフ分離によってサンプルを分離した。次いで、溶出サンプルをウエスタンによって試験し、ＮＭＩの溶出ピーク位置をＮＭＩ抗体によって試験した。図中の数字は、溶出バッファの体積である。これは、ＮＭＩ溶出ピークトップが主に７８ｍＬに存在することを示し、対応する分子量は７０ｋＤａ～１４０ｋＤａである。

【０３６８】

ＮＭＩの細胞表面受容体

ＮＭＩは細胞から体液に分泌されて炎症応答を誘導することができるので、この実施例は、ＮＭＩの細胞表面受容体を同定し、次いで、このプロセスにおけるＴＬＲ－Ｍｙｄ８８経路の生物学的機能を検出することを目的とする。

【０３６９】

ＢＭＤＭ細胞の培養：マウスの頸部を破壊することによってマウスを屠殺し、マウスの２本の後肢を外し、前記肢を７０％アルコールに１分間浸漬し、背骨の筋肉の除去を試み、骨髄腔をＰＢＳで洗い流す。次いで、４００ｇで１００分間遠心分離し、上清を慎重に取り除く。赤血球細胞を細胞溶解バッファに回収し、次いで、前記細胞溶解バッファを中和するためにＰＢＳ１０ｍＬを添加する。ＢＭＤＭ細胞を、１０％ウシ胎児血清、１％ペニシリン－ストレプトマイシン、１％Ｌ－グルタミン、及び２０ｎｇ／ｍＬのＭＣＳＦを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地中３７℃で培養した。

【０３７０】

細胞の全ＲＮＡの抽出：ＫａｎｇＷｅｉ Ｃｏｍｐａｎｙ（カタログ番号ＣＷ ０５９７）製のＲＮＡ抽出キットを用いてＢＭＤＭ細胞から全ＲＮＡを抽出した。Ｔｒｉｚｏｌ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてＲＡＷ２６４．７細胞から全ＲＮＡを抽出した。

【０３７１】

逆転写：ＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔ（商標）ＩＩ １ｓｔ Ｓｔｒａｎｄ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（カタログ番号６２１０Ａ）を用いて、全ＲＮＡ１μｇからｃＤＮＡの第１の鎖を合成した。ＳＹＢＲ（登録商標）Ｐｒｅｍｉｘ Ｅｘ Ｔａｑ（商標）（Ｔｌｉ ＲＮａｓｅＨ Ｐｌｕｓ）及びＲＯＸ ｐｌｕｓ Ｑ－ＰＣＲキット（カタログ番号ＲＲ４２ＬＲ）を用いてリアルタイムＲＴ－ＰＣＲを実施した。

【０３７２】

敗血症等の過剰な免疫応答によって引き起こされる疾患の治療におけるＮＭＩモノクローナル抗体

ＮＭＩの構造及び機能はＩＦＰ３５と非常に類似しており、これら２つのタンパク質は協働するので、ＮＭＩの阻害は、ＮＭＩによって誘導される過剰活性免疫応答を阻害するＩＦＰ３５と同じ効果を有し得る。したがって、ＮＭＩ阻害剤は、ＩＦＰ３５阻害剤と同

様に、敗血症、ウイルス感染誘導性ＮＭＩ過剰発現、及び自己免疫疾患を治療すると予測される。

【０３７３】

敗血症マウスにおけるＮＭＩの発現

ＬＰＤ誘導性ショックモデルの樹立：（１）Ｂ６／Ｃ５７マウスを一晩絶食させ；（２）次の日の朝、ＬＰＳ（体重１ｋｇ当たり５ｍｇ及び１０ｍｇ）をマウスに腹腔内注射し；（３）注射の３時間後にキャピラリーを用いて採血し；（４）注射の６時間後にマウスの眼を摘出し、採血する。

【０３７４】

ＥＬＩＳＡを用いた、ＬＰＳ誘導性ショックモデルにおけるＮＭＩの濃度検出。敗血症マウスモデルの血液中ＮＭＩ濃度の定量的検出は、ＬＰＳ誘導性敗血症マウスの血液中で高濃度のＮＭＩを示し、ナノグラムレベルに達することを示す。しかし、ＨＭＧＢ１のレベルは、先行論文によればｐｇ６００～８００である。そして、それは、ＬＰＳ注射の時間又は用量に依存する（３時間及び６時間、体重１キログラム当たり５ｍｇ及び１０ミリグラムのＬＰＳ用量）。ＮＭＩモノクローナル抗体は、敗血症マウスの生存率を増大させることができる。

【０３７５】

免疫応答の過剰反応

外因性原核生物系によって発現させた様々な長さの精製タンパク質を、内毒素を排出させた後、マウス１頭当たりタンパク質１００ｍｇでマウスの腹腔内に注射した。マウスの腹腔内におけるＩＦＰ３５及びＮＭＩによる幾つかの免疫細胞の動員（例えば、好中球）をフローサイトメトリーによって検出した。

【０３７６】

癌治療におけるＮＭＩ

本開示のＩＦＰ及びＮＭＩに基づいて、異常に高いレベルのＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの発現、分泌、及び／又は活性に関連する、敗血症、炎症ストーム、抗炎症疾患、及び他の疾患を治療するための薬物を開発することができる。幾つかの態様では、（１）ＩＦＰ３５及びＮＭＩの放出を阻害する小化合物又はペプチド；（２）ＩＦＰ３５及びＮＭＩの産生及び機能を抑制するＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩに対する抗体；（３）インビボにおけるＩＦＰ３５又はＮＭＩのポリマーの形成に干渉する低分子；（４）インターフェロンの分泌を阻害してＩＦＰ３５の産生を低減する剤；（５）ＩＦＰ３５及びＮＭＩとその細胞表面受容体との間の相互作用を阻害してＩＦＰ３５及び／又はＮＭＩの機能を抑制する剤；（６）ＩＦＰ３５及びＮＭＩとその受容体との間の相互作用を阻害して、その機能を抑制する剤を本明細書に提供する。同様に、腫瘍組織等の低免疫又は免疫抑制条件下では、ＩＦＰ３５又はＮＭＩを生物又はその一部に供給することによって免疫応答の機能を強化することができた。

【０３７７】

この目的を達成するための技術は、以下であってよい：（１）ＩＦＰ３５若しくはＮＭＩタンパク質又はその標的とする誘導体を生物に直接注射する；（２）ＩＦＰ３５若しくはＮＭＩ又はその標的とする誘導体によって誘導ペプチド又は低分子を直接与える。更に、敗血症及び炎症応答の診断の観点で、ＥＬＩＳＡキットを開発することができる。インビトロで発現及び結晶化させられるのはＩＦＰ３５の断片のみであるので、サイトカインストームを誘導する機能を実行するために完全長のＩＦＰ３５がポリマーを形成しなくてもよい。マウスでは、ＩＦＰ３５の中和モノクローナル抗体を用いることによって、サイトカインストームを阻害することができた。この結果は、ＩＦＰ３５がどんなポリマー状態で存在していようと、サイトカインストームを引き起こす要因であることを示唆している。したがって、ＩＦＰ３５は、サイトカインストームを引き起こす主な理由であり得、これによって、サイトカインストームを阻害するための標的となる。したがって、ＩＦＰ３５モノクローナル抗体又はＩＦＰ３５の他の阻害分子の適切な使用は、サイトカインストームを阻害するために有益であり得る。ＮＭＩの構造及び機能はＩＦＰ３５と非常に類

似しており、細胞の外側に分泌されるこれら２つのタンパク質は協働し、細胞の炎症因子の産生を誘導する等の機能を有するので、ＮＭＩはＩＦＰ３５と同じ又は類似の機能を有し得ることが示される。したがって、ＮＭＩの阻害も炎症を阻害し、また、過剰反応した炎症応答から動物を保護することもできる。したがって、幾つかの態様では、ＮＭＩの過剰産生又はＮＭＩが媒介する過剰免疫応答によって誘導される死亡又は傷害を避けることができる。幾つかの腫瘍ではＮＭＩがあまり発現しないので、ＮＭＩを補充することによって抗腫瘍機能が提供される。ＮＭＩとＩＦＰ３５との類似性は、２つの機能態様を示し、１つは、生物の免疫を増強して癌を阻害するか又は感染を回避することであり、２つ目は、これらが腫瘍治療の標的となって、その活性を阻害することにより過剰な免疫機能を抑制し、次いで、炎症の発生による生物の損傷を予防及び治療することである。まとめると、これら結果は、ＩＦＰ３５及びＮＭＩの発現によって炎症応答を誘導する重要な機能を示し、更に、医学におけるこれらの重大な価値を証明する。

【０３７８】

実施例５　ＩＦＰ３５抗体の産生

抗体における可変領域の配列をクローニングするために、６つのファミリーの軽鎖に従って軽鎖可変領域（ＶＬ）用の７対のＰＣＲプライマーを設計した。プライマーＰ１～Ｐ７は、ＦＷＲ１領域から始まる７つの上流プライマーであり、Ｐ８は、ＦＷＲ４領域の最後で終わる下流プライマーである。４つのファミリーの重鎖可変領域に従って、ＰＣＲ増幅用の５対の重鎖ＶＨプライマーを設計した。プライマーＰ９～Ｐ１２は、ＦＷＲ１領域から始まる上流プライマーであり；プライマー１３は、ＦＷＲ４の最後で終わる下流プライマーである。

【０３７９】

これらプライマーの配列を以下に示す：

Ｐ１　ＧＡＣＡＴＴＧＴＧＡＴＧＷＣＡＣＡＧＴＣＴＣＣ
Ｐ２　ＧＡＴＲＴＴＫＴＧＡＴＧＡＣＹＣＡＲＲＣＴＣＣ
Ｐ３　ＧＡＣＡＴＴＧＴＧＣＴＧＡＣＣＣＡＡＴＣＴＣＣ
Ｐ４　ＧＡＣＡＴＴＧＴＧＣＴＧＡＣＡＣＡＧＴＣＴＣＣ
Ｐ５　ＳＡＡＡＷＴＧＴＫＣＴＣＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣ
Ｐ６　ＧＡＹＡＴＹＭＡＧＡＴＧＡＣＭＣＡＧＷＣ
Ｐ７　ＧＡＹＡＴＴＧＴＧＡＴＧＡＣＭＣＡＧＷＣＴ
Ｐ８（ＶＬ－Ｒ）　ＴＴＴＢＡＫＹＴＣＣＡＧＣＴＴＧＧＴＳＣＣ
Ｐ９　ＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＫＭＡＧＧＡＧＴＣＡＧＧ
Ｐ１０　ＡＧＧＴＹＣＡＧＣＴＫＣＡＲＳＡＲＴＣＴ
Ｐ１１　ＡＧＧＴＣＣＡＲＣＴＧＣＡＧＣＡＧＹＣＴ
Ｐ１２　ＡＧＧＴＧＭＡＧＣＴＫＧＷＧＧＡＲＴＣＴＧＧ
Ｐ１３（ＶＨ－Ｒ）　ＴＧＧＴＣＧＡＣＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴ

【０３８０】

Ｔｒｉｚｏｌ試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．）を用いてＩＦＰ３５抗体ハイブリドーマ細胞を培養及び回収して、全ＲＮＡを抽出した。次いで、抽出したＲＮＡをテンプレートとして用いて、ｃＤＮＡ合成試薬キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．製）を用いることによってｃＤＮＡを合成した。軽鎖可変領域及び重鎖領域のＰＣＲ断片産物を寒天ゲルから回収し、次いで、Ｔ－ベクター（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にクローニングした。これらコンストラクトを大腸菌ＤＨ５αコンピテントセルに形質転換し、シングルクローンを選択し、配列を決定した。

【０３８１】

ＮＣＢＩ　ＢＬＡＳＴにおける配列と比較した本明細書の重鎖及び軽鎖の配列比較結果は、本明細書の配列がマウスＩｇＧと類似の特徴を有することを示す。

【０３８２】

ＧＡＣＡＴＴＧＴＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣＡＧＣＡＡＴＣＡＴＧＴＣＴＧＣＡＴ
ＣＴＣＣＡＧＧＧＧＡＧＡＡＧＧＴＣＡＣＣＡＴＧＡＣＣＴＧＣＡＧＴＧＣＣＡＧＣＴＣ

ＡＡＧＴＧＴＡＡＧＴＴＡＣＡＴＧＣＡＣＴＧＧＴＡＣＣＡＧＣＡＧＡＡＧＴＣＡＧＧＣ
ＡＣＣＴＣＣＣＣＣＡＡＡＡＧＡＴＧＧＡＴＴＴＡＴＧＡＣＡＣＡＴＣＣＡＡＡＣＴＧＧ
ＣＴＴＣＴＧＧＡＧＴＣＣＣＴＧＣＴＣＧＣＴＴＣＡＧＴＧＧＣＡＧＴＧＧＧＴＣＴＧＧ
ＧＡＣＣＴＣＴＴＡＣＴＣＴＣＴＣＡＣＡＡＴＣＡＧＣＡＧＣＡＴＧＧＡＧＧＣＴＧＡＡ
ＧＡＴＧＣＴＧＣＣＡＣＴＴＡＴＴＡＣＴＧＣＣＡＧＣＡＧＴＧＧＡＧＴＡＧＴＡＡＣＣ
ＣＡＣＣＣＡＴＣＡＣＧＴＴＣＧＧＧＴＧＣＴＧＧＣＡＣＣＡＡＧＣＴＧＧＡＡＡＴＣＡＡ
Ａ（配列番号１２）

【０３８３】

【表３】

マウス単離AIDKO-glmmB-1免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域遺伝子、部分配列

Sequence ID: gb|EF543888.1| Length: 444 Number of Matches: 1

Range 1: 31 to 329 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
547 bits(296)	3e-152	298/299(99%)	0/299(0%)	Plus/Plus

```
Query  16   CAGACTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCC  75
            ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  31   CAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCC  90

Query  76   AGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGA  135
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  91   AGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGA  150

Query  136  TGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGG  195
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  151  TGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGG  210

Query  196  TCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTAT  255
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  211  TCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTAT  270

Query  256  TACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGA  314
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  271  TACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGA  329
```

【０３８４】

ＴＧＧＴＣＧＡＣＧＣＴＧＡＧＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＴＧＡＧＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣ
ＣＣＡＧＴＡＧＴＣＣＡＴＡＧＣＣＣＡＡＧＡＧＴＡＣＣＣＧＴＡＴＣＴＴＧＣＡＣＡＧ
ＡＡＡＴＡＴＧＴＡＧＣＣＧＴＧＴＣＣＴＣＡＴＴＣＴＴＧＡＧＧＴＴＧＴＴＧＡＴＣＴ
ＧＣＡＡＡＴＡＧＧＣＡＧＴＧＣＴＧＧＣＡＧＡＧＧＴＴＴＣＣＡＡＡＧＡＧＡＡＧＧＣ
ＡＡＡＣＣＧＴＣＣＣＴＴＧＡＡＧＴＣＡＴＣＡＧＣＡＡＡＴＧＴＴＧＧＣＴＣＴＣＣＡ
ＧＴＧＴＡＧＧＴＧＴＴＴＡＴＣＣＡＧＣＣＣＡＴＣＣＡＣＴＴＴＡＡＡＣＣＣＴＴＴＣ
ＣＴＧＧＡＧＣＣＴＧＣＴＴＣＡＣＣＣＡＧＴＴＣＡＴＴＣＣＡＴＡＧＴＴＴＧＴＧＡＡ
ＧＧＴＡＴＡＣＣＣＡＧＡＡＧＣＣＴＴＧＣＡＧＧＡＧＡＴＣＴＴＧＡＣＴＧＴＣＴＣＴ
ＣＣＴＧＡＣＴＣＣＴＴＡＡＧＣＴＧＣＡＣＣＴ（配列番号１１）

【０３８５】

【表４】

マウスクローンnat28H免疫グロブリン重鎖可変領域mRNA、部分cds

Sequence ID: gb|HQ446555.1| Length: 331 Number of Matches: 1

Range 1: 8 to 331 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
518 bits(280)	3e-143	313/328(95%)	5/328(1%)	Plus/Minus

```
Query  10   CTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCCTTGACCCCAGTAGTCCATAGCCC-AAGAGTACCCG  68
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  |  | |   |
Sbjct  331  CTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCCTTGACCCCAGTAGTCCATAGCCCTCACGG-A---G  276

Query  69   TATCTTGCACAGAAATATGTAGCCGTGTCCTCATTCTTGAGGTTGTTGATCTGCAAATAG  128
            | ||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  275  TTTCTTGCACAGAAATATGTAGCCGTGTCCTCATTTTTGAGGTTGTTGATCTGCAAATAG  216

Query  129  GCAGTGCTGGCAGAGGTTTCCAAAGAGAAGGCAAACCGTCCCTTGAAGTCATCAGCAAAT  188
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  215  GCAGTGCTGGCAGAGGTTTCCAAAGAGAAGGCAAACCGTCCCTTGAAGTCATCAGCATAT  156

Query  189  GTTGGCTCTCCAGTGTAGGTGTTTATCCAGCCCATCCACTTTAAACCCTTTCCTGGAGCC  248
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  155  GTTGGCTCTCCAGTGTAGGTGTTTATCCAGCCCATCCACTTTAAACCCTTTCCTGGAGCC  96

Query  249  TGCTTCACCCAGTTCATTCCATAGTTTGTGAAGGTATACCCAGAAGCCTTGCAGGAGATC  308
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  95   TGCTTCACCCAGTTCATTCCATAGTTTGTGAAGGTATACCCAGAAGCCTTGCAGGAGATC  36

Query  309  TTGACTGTCTCTCCTGACTCCTTAAGCT  336
            |||||||||||||| | || ||| ||||
Sbjct  35   TTGACTGTCTCTCCAGGCTTCTTCAGCT  8
```

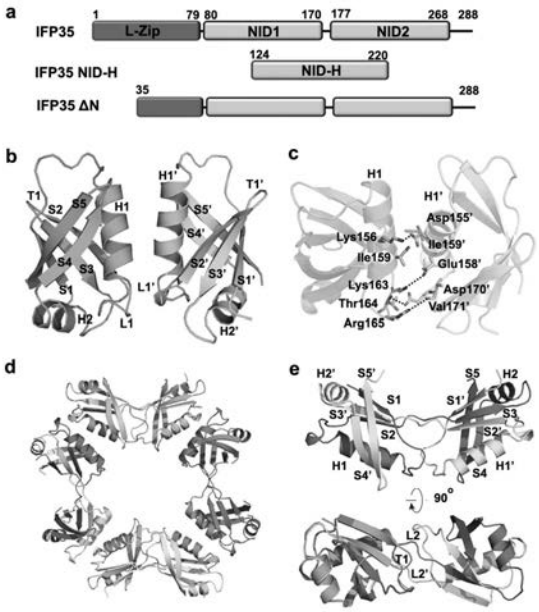
【０３８６】

ＤＮＡ配列に基づく翻訳された軽鎖タンパク質配列及び重鎖タンパク質配列：

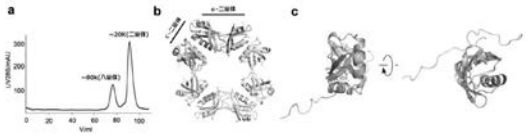
軽鎖：ＤＩＶＭＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＭＴＣＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨＷＹＱＱＫＳＧＴＳＰＫＲＷＩＹＤＴＳＫＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＳＭＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣＱＱＷＳＳＮＰＰＩＴＦＧＡＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号１０）；

重鎖：ＶＱＬＶＥＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＮＹＧＭＮＷＶＫＱＡＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＴＦＡＤＤＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＹＬＱＩＮＮＬＫＮＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＹＧＹＳＷＡＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳＳＡＳＴ（配列番号９）。

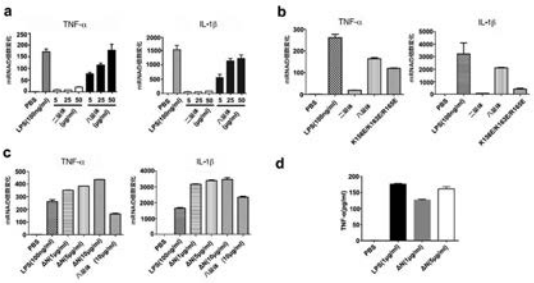
【図１】



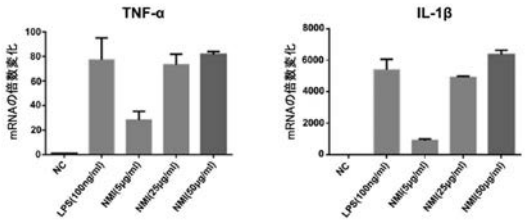
【図２】



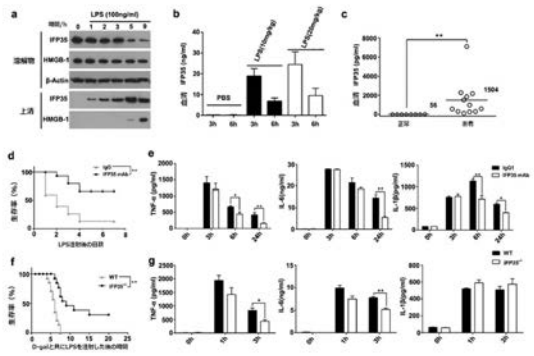
【図３】



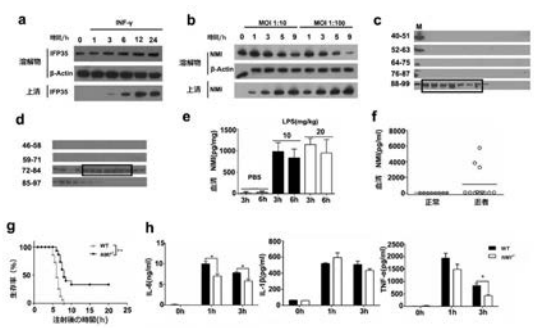
【図４】



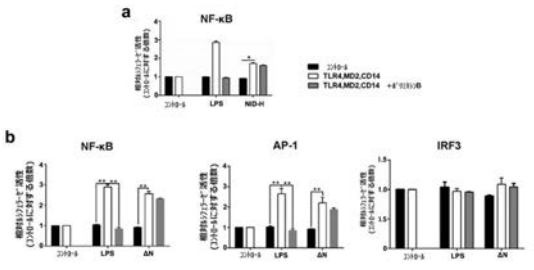
【図５】



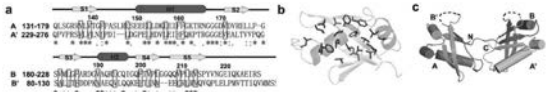
【図６】



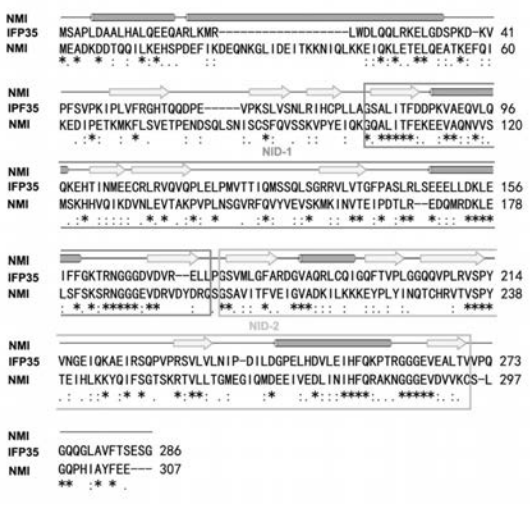
【図７】



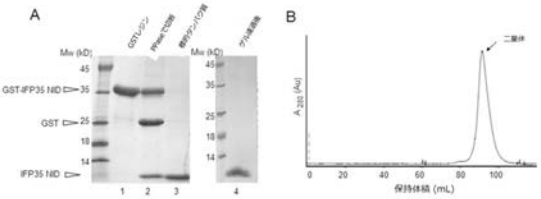
【図８】



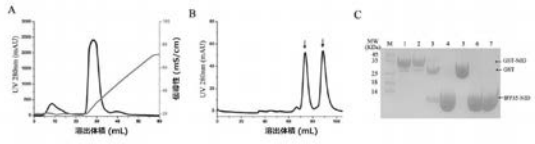
【図９】



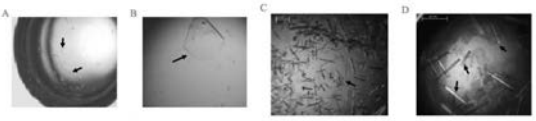
【図１０】



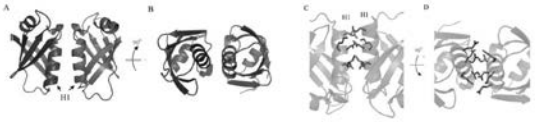
【図１１】



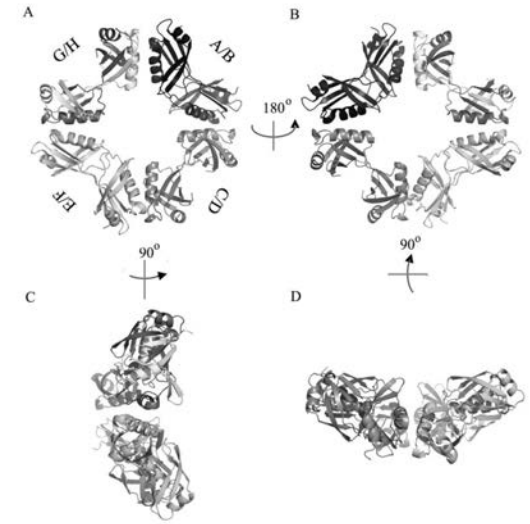
【図１２】



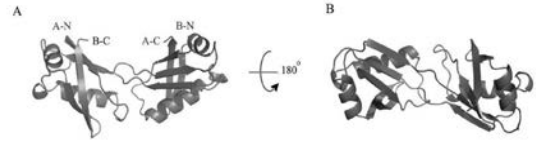
【図１３】



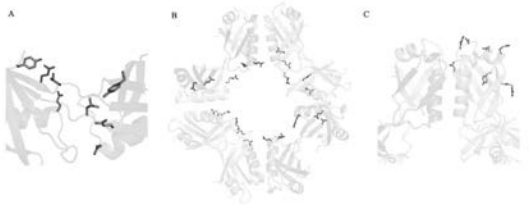
【図１４】



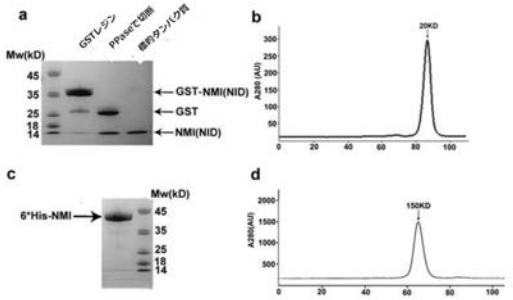
【図１５】



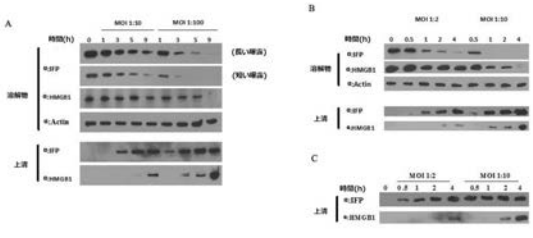
【図１６】



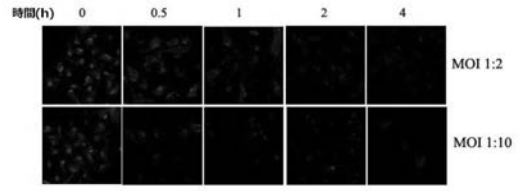
【図１７】



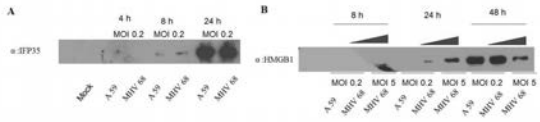
【図１８】



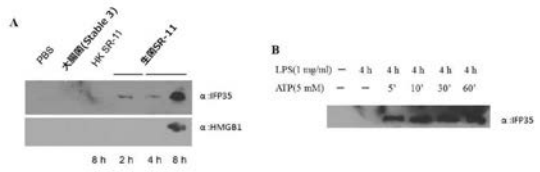
【図１９】



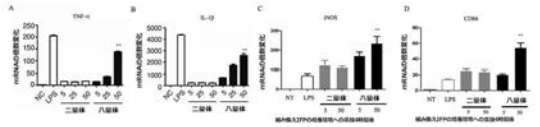
【図２０】



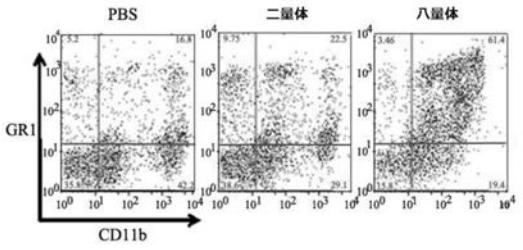
【図２１】



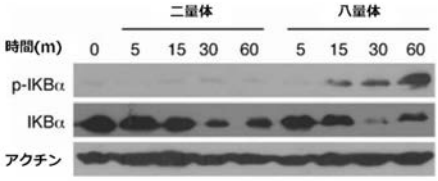
【図２２】



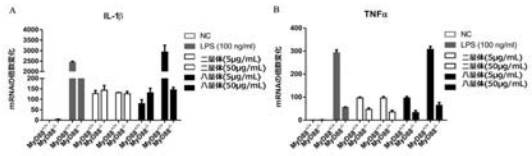
【図２３】



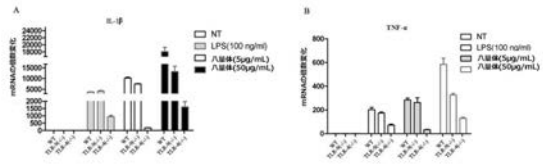
【図２４】



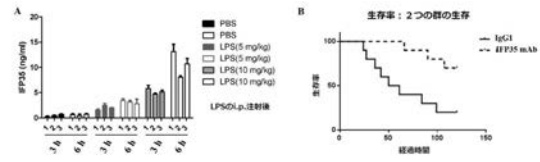
【図２５】



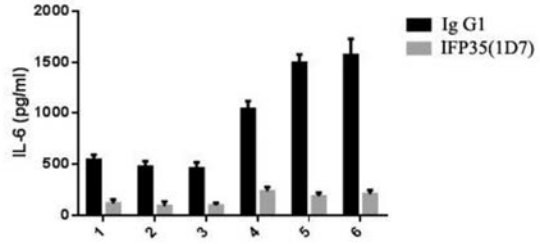
【図２６】



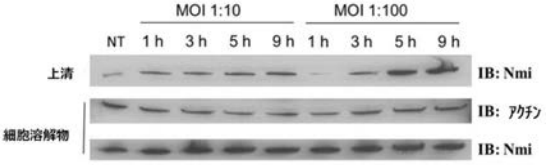
【図２７】



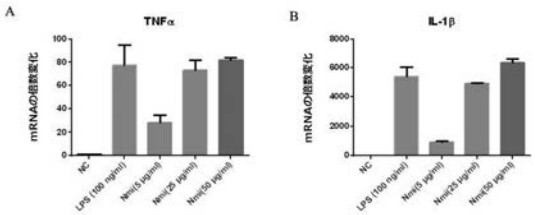
【図２８】



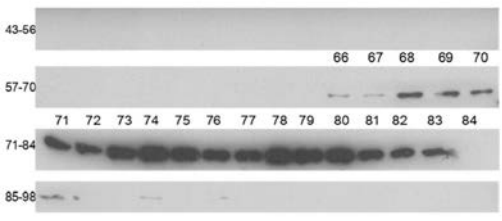
【図２９】



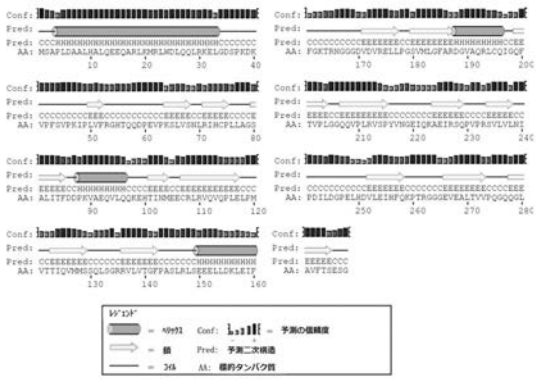
【図３０】



【図３１】

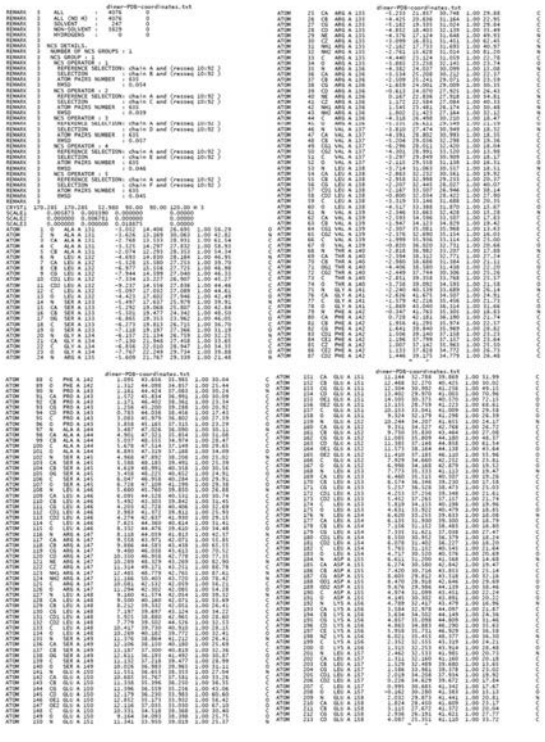


【図３２】

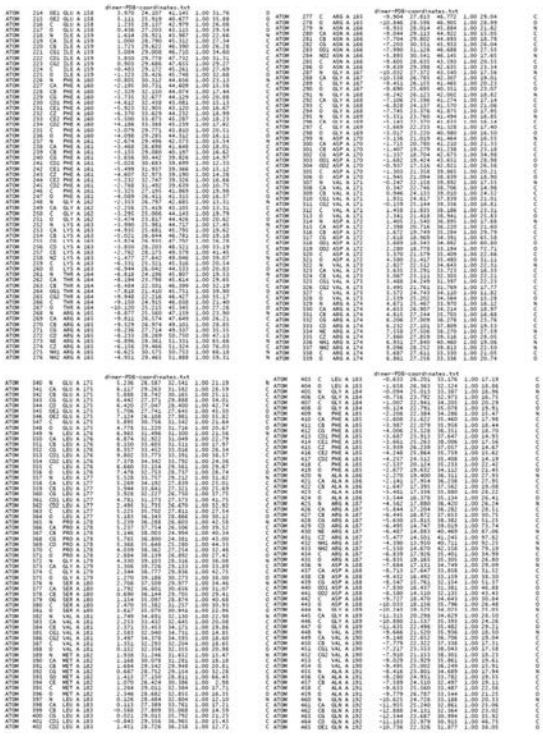


【図３３Ａ】

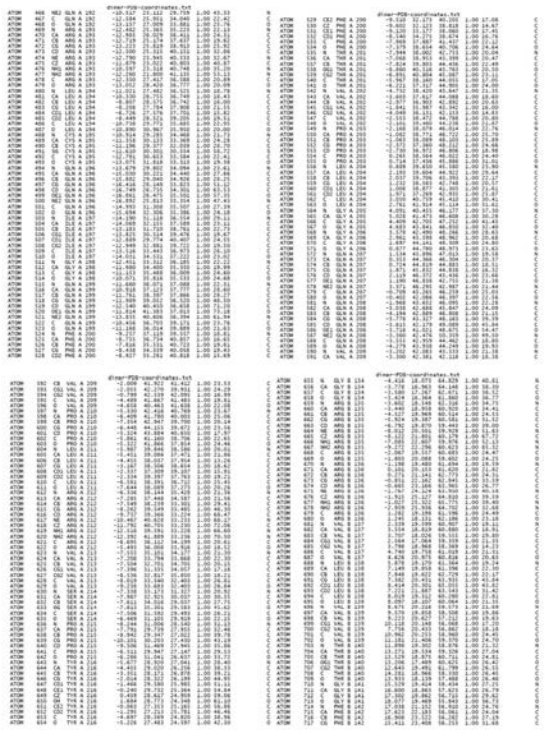
【図３３Ｂ】



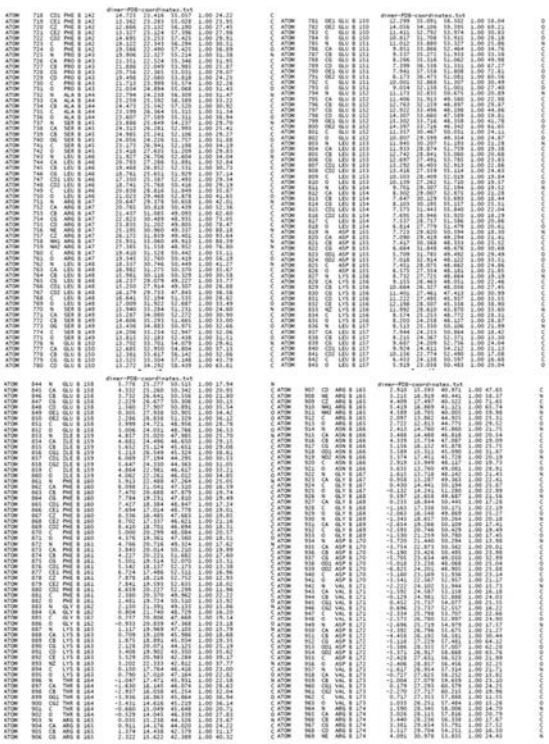
【図３３Ｃ】



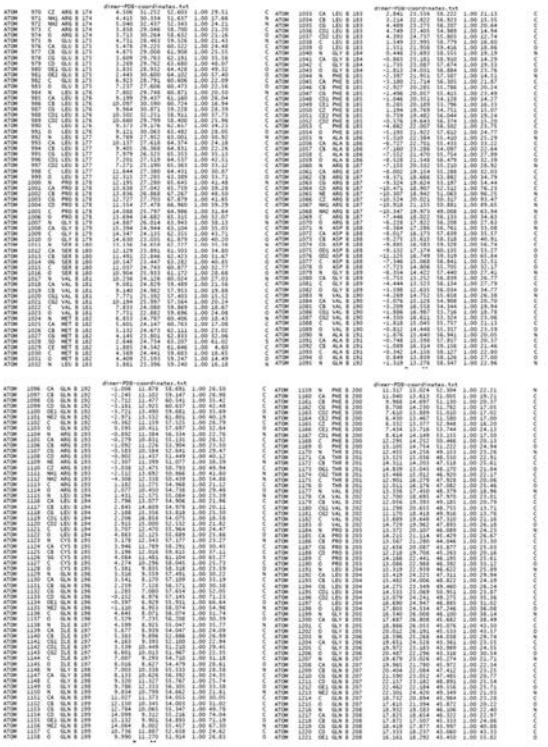
【図３３Ｄ】



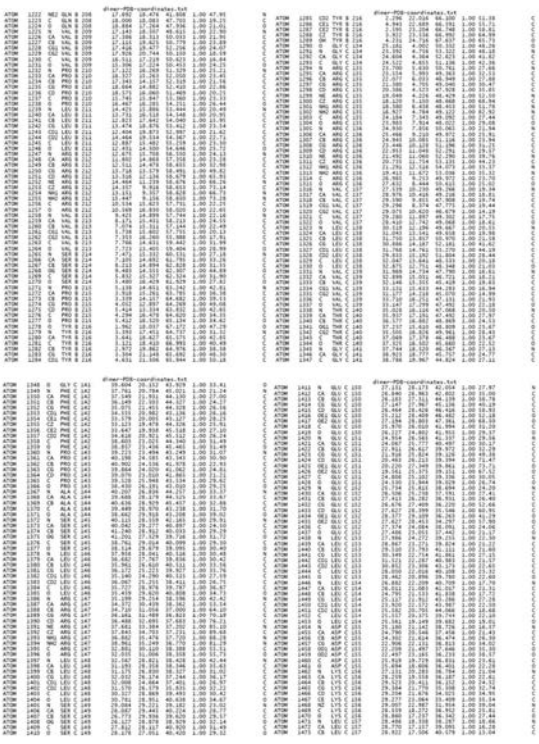
【図３３Ｅ】



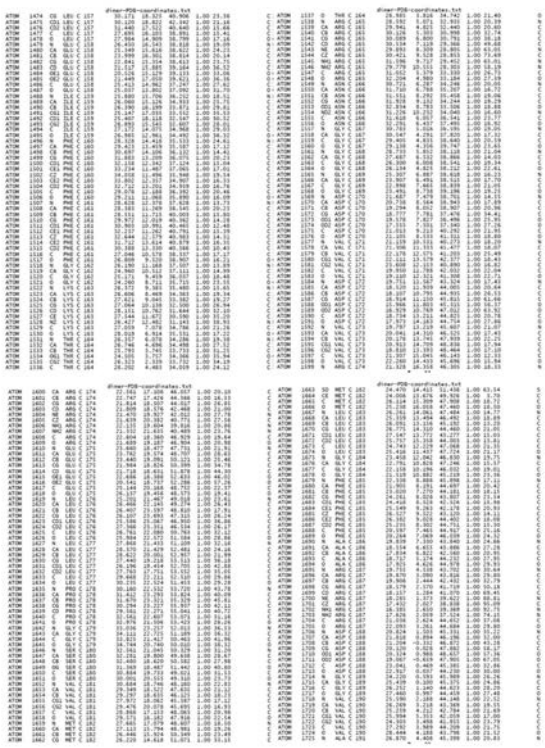
【図３３Ｆ】



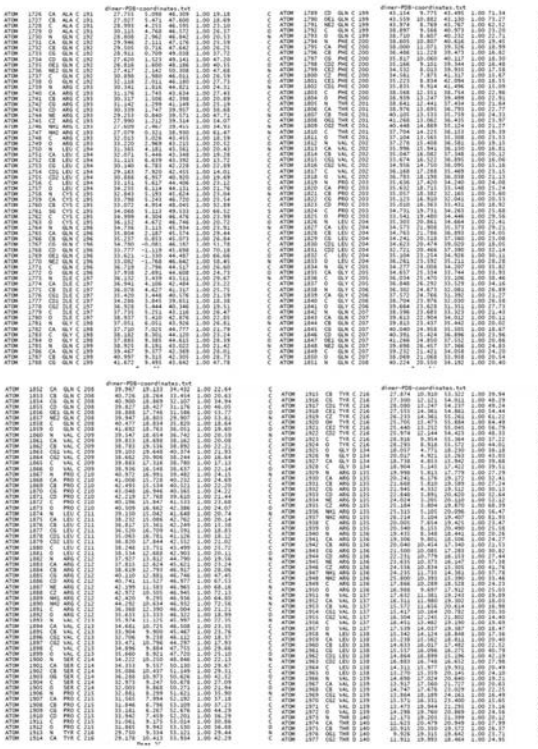
【図３３Ｇ】



【図３３Ｈ】

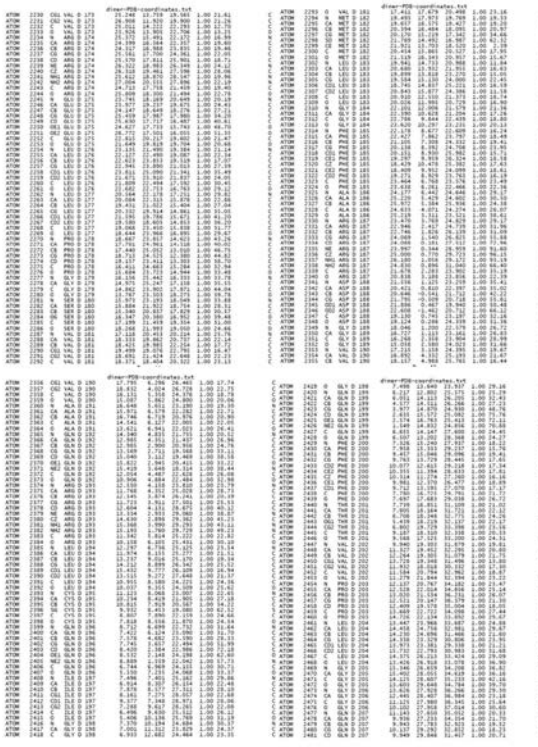


【図３３Ｉ】

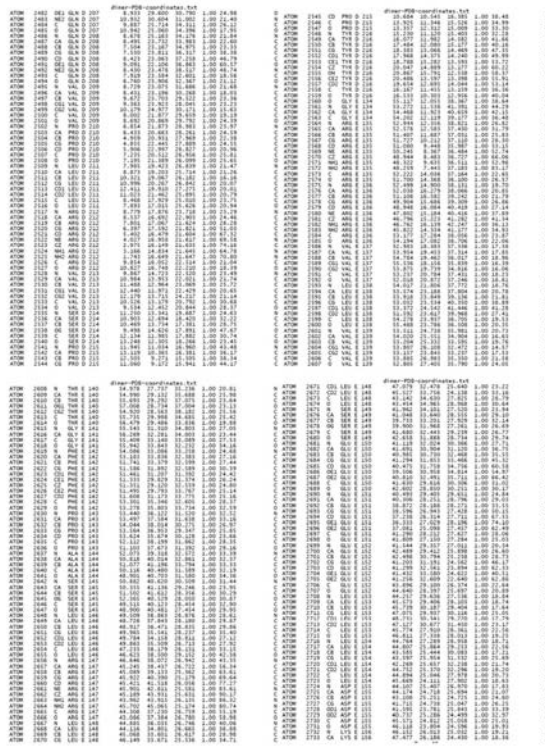


【図３３Ｊ】

【図３３Ｋ】

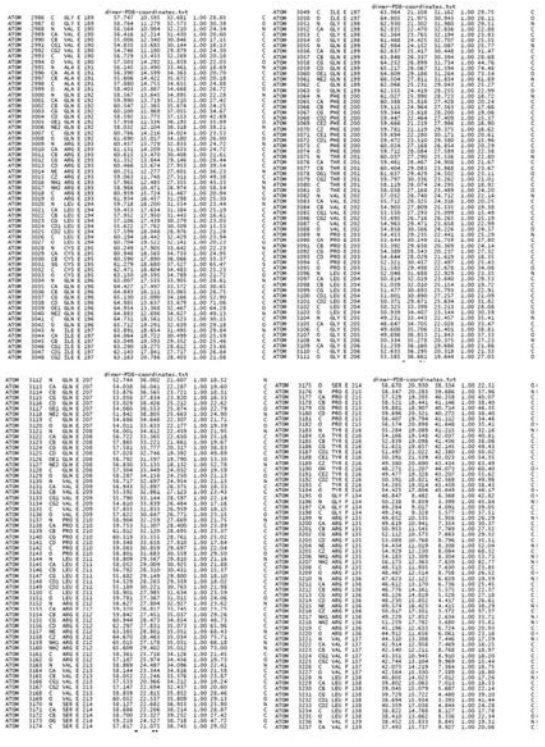


【図３３Ｌ】

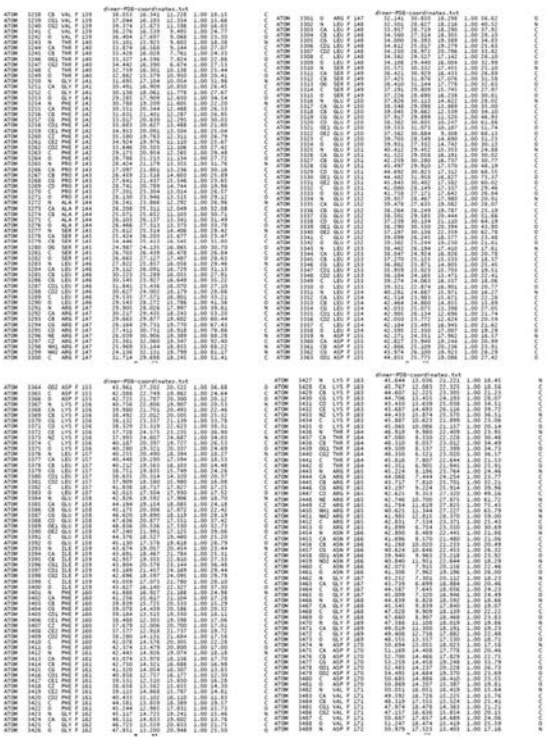


【図３３Ｍ】

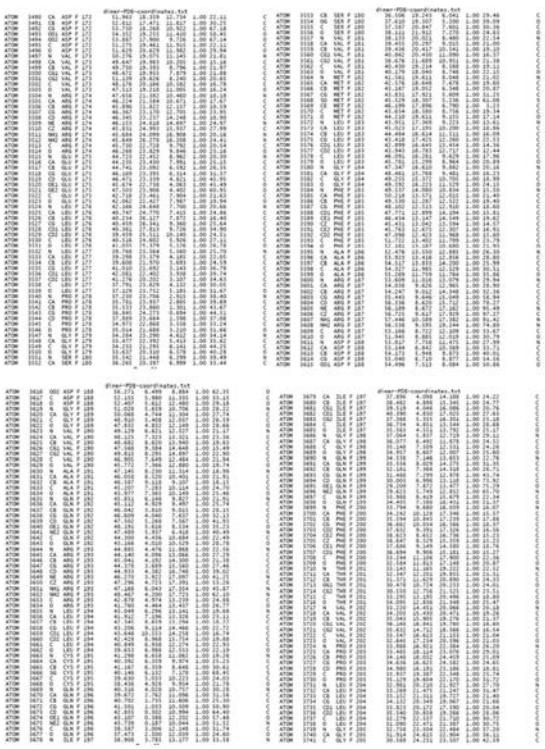
【図３３Ｎ】



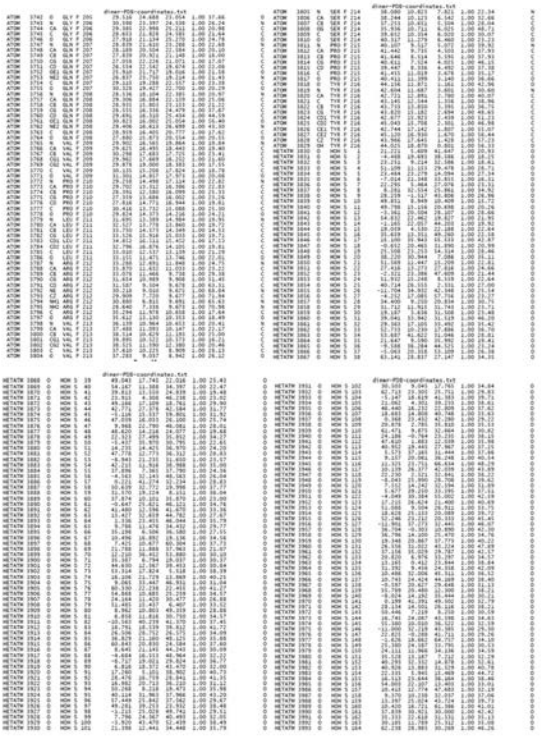
【図３３Ｏ】



【図３３Ｐ】

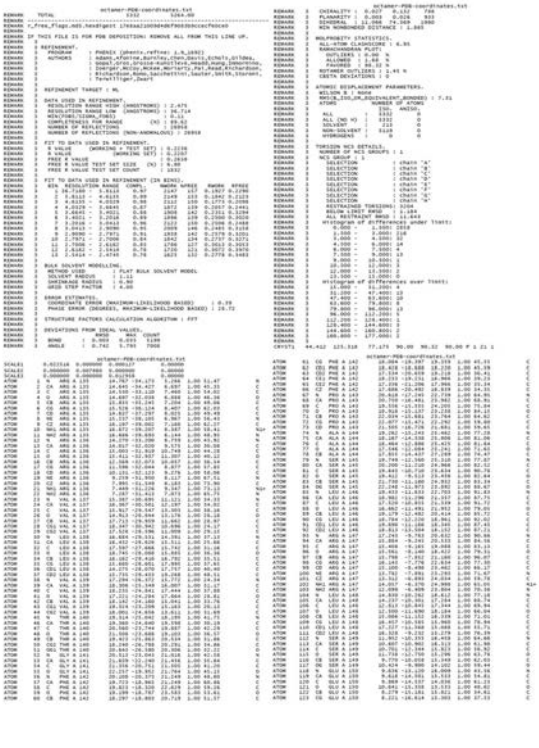


【図３３Ｑ】

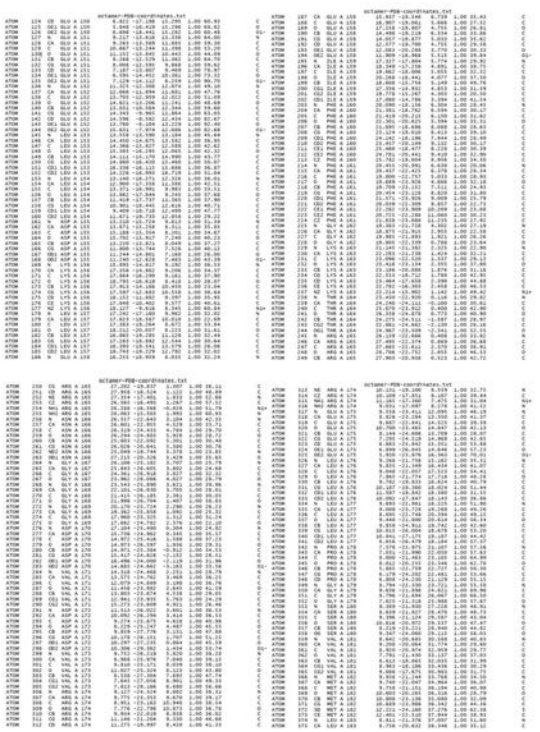


【図３３Ｒ】

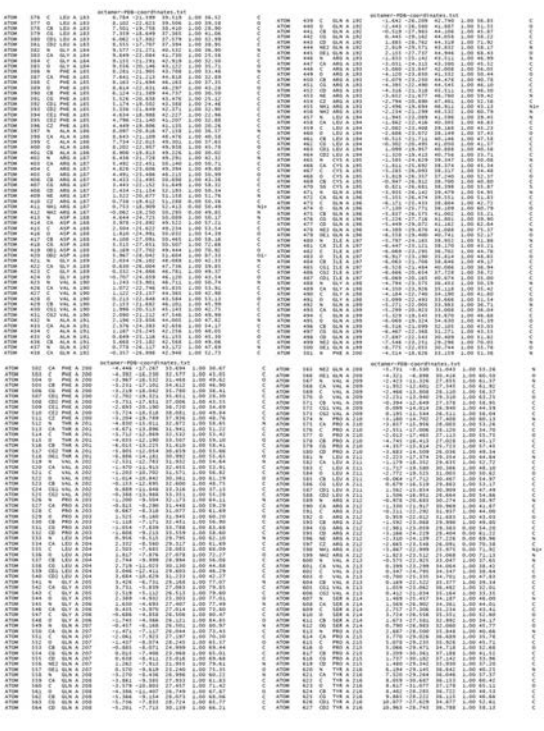
【図３４Ａ】



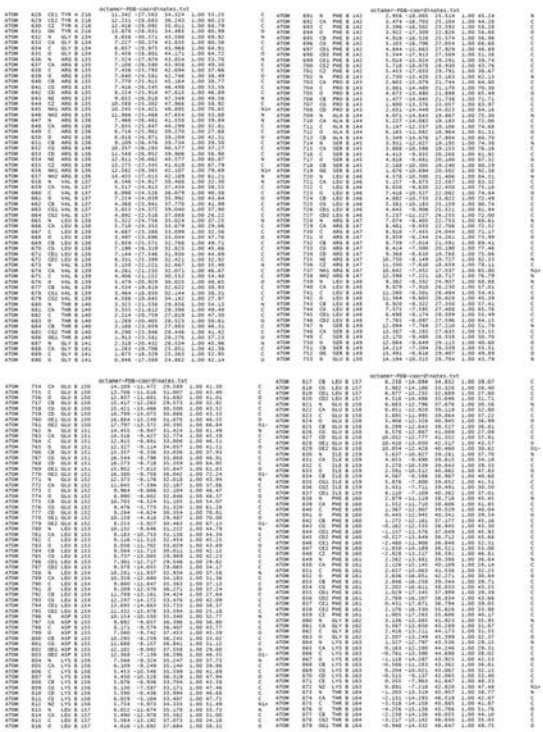
【図３４Ｂ】



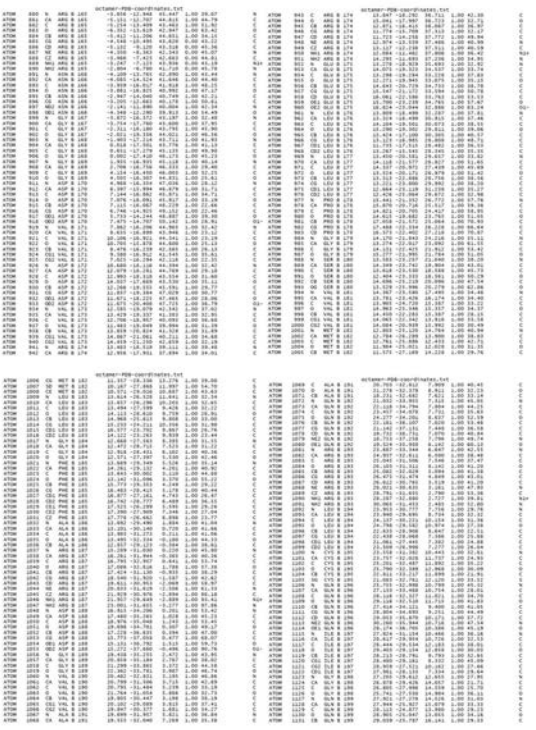
【図３４Ｃ】



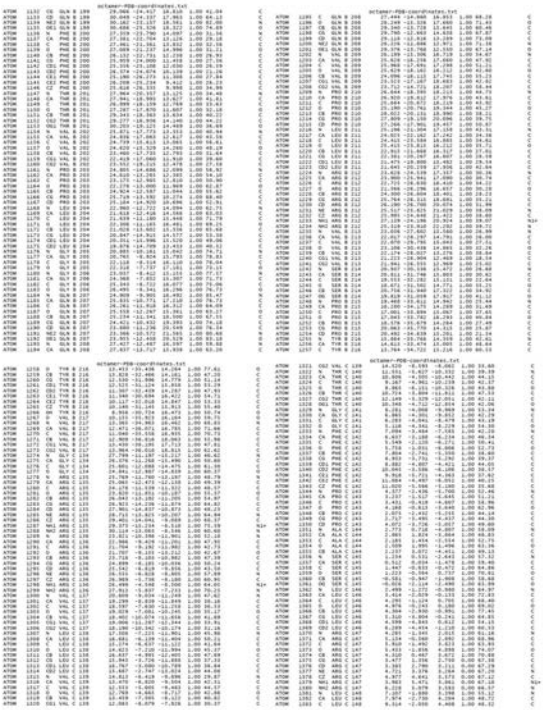
【図３４Ｄ】



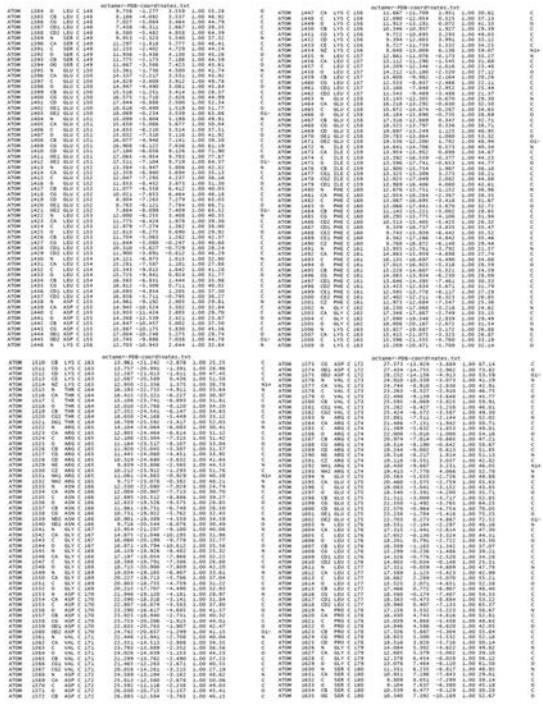
【図３４Ｅ】



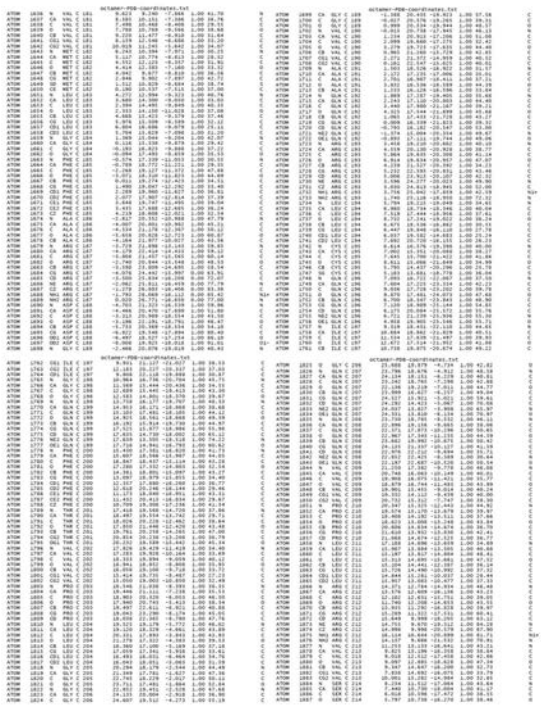
【図３４Ｆ】



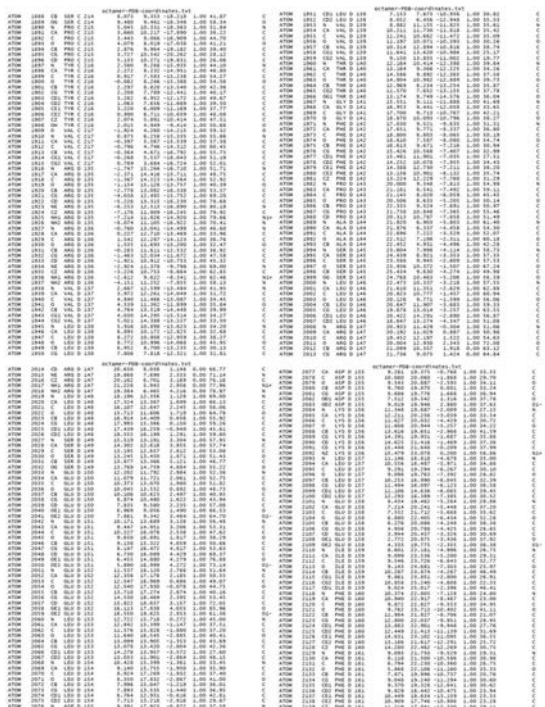
【図３４Ｇ】



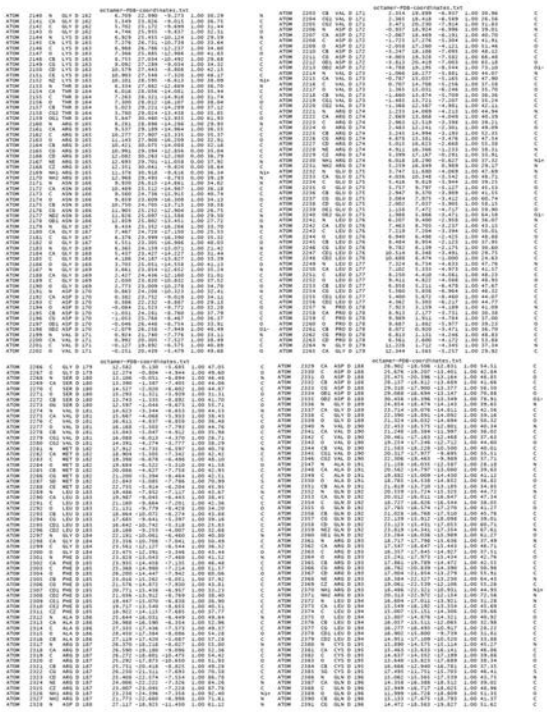
【図３４Ｈ】



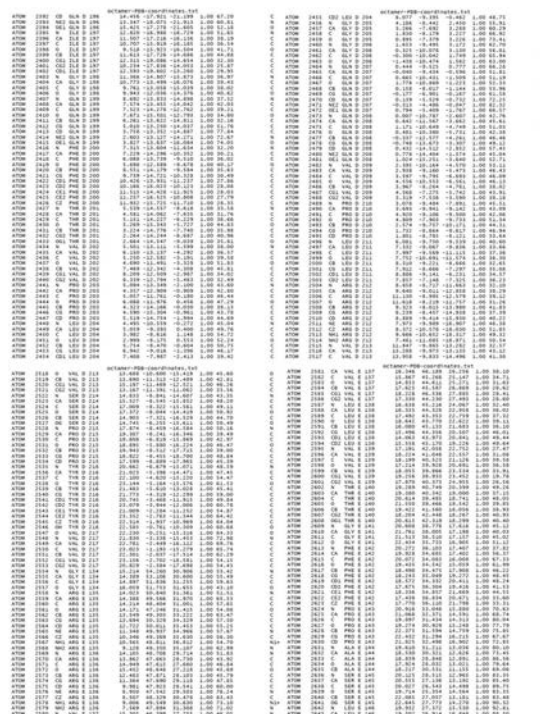
【図３４Ｉ】



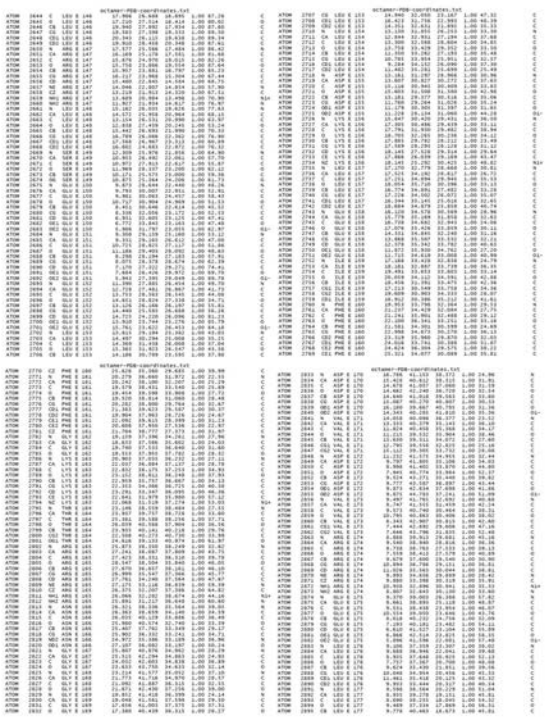
【図３４Ｊ】



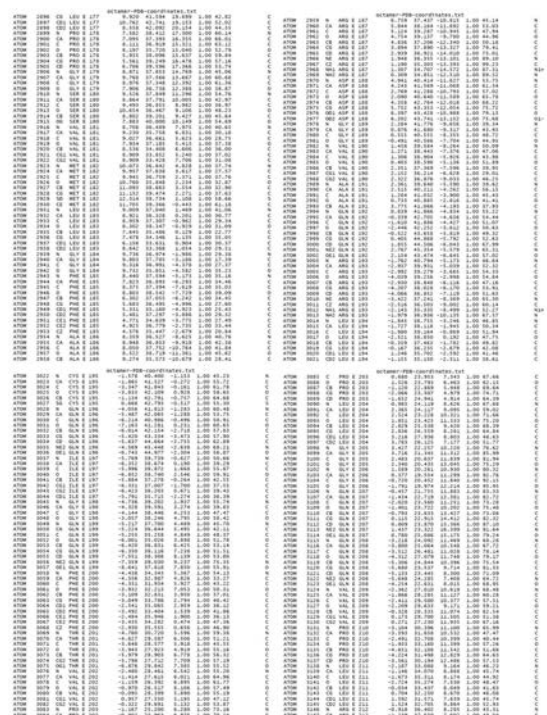
【図３４Ｋ】



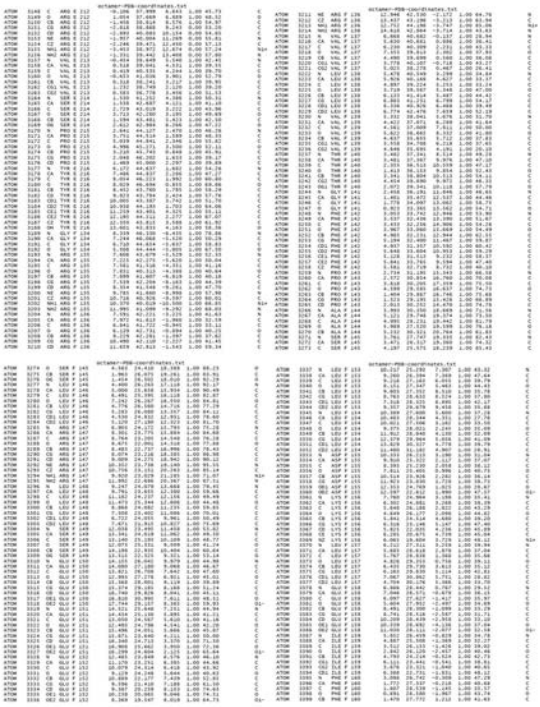
【図３４Ｌ】



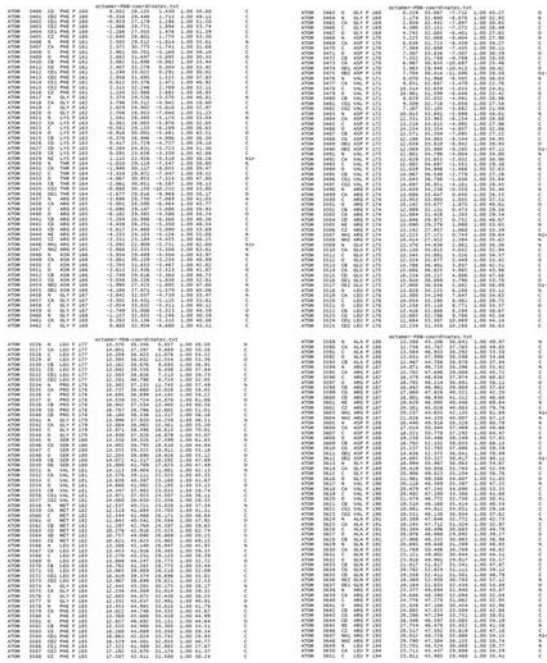
【図３４Ｍ】



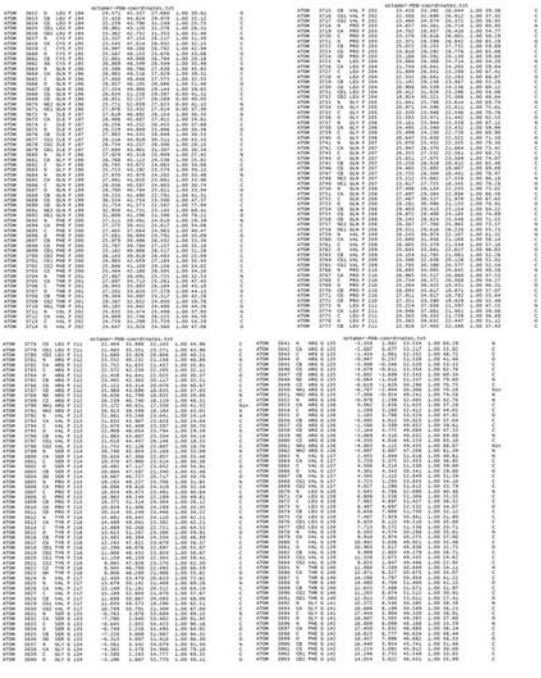
【図３４Ｎ】



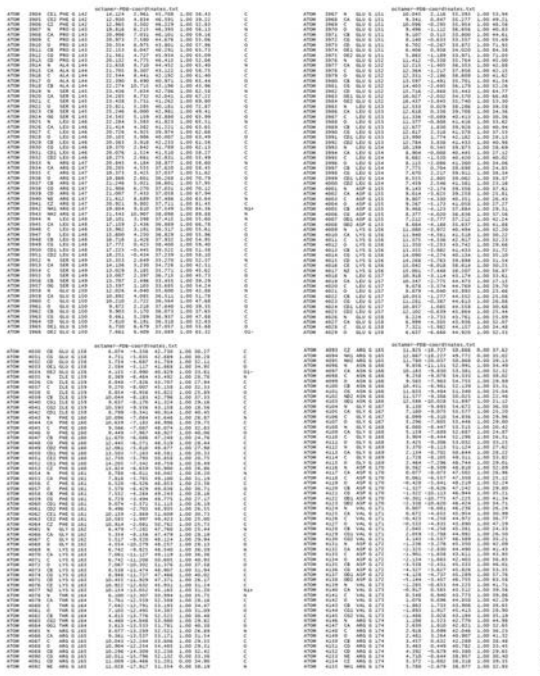
【図３４Ｏ】



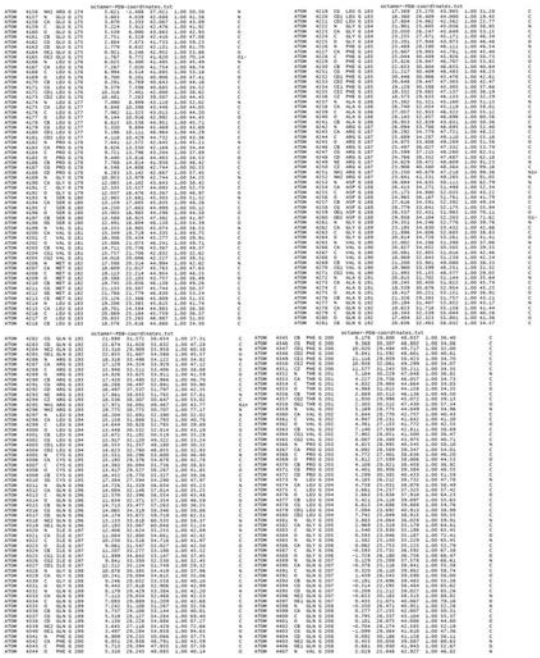
【図３４Ｐ】



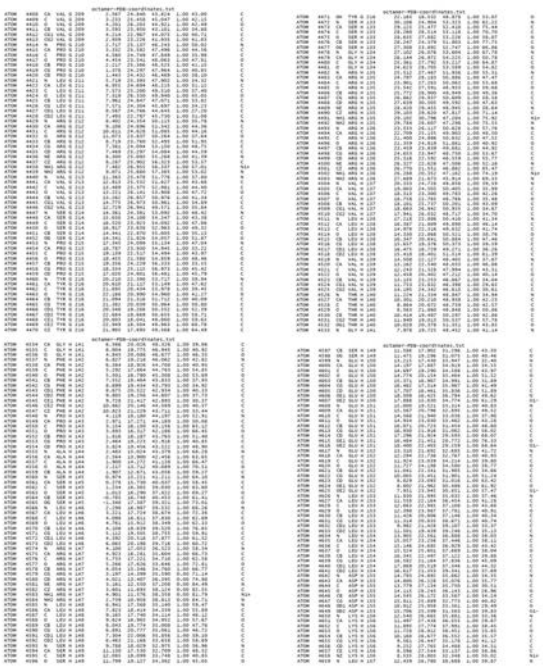
【図３４Ｑ】



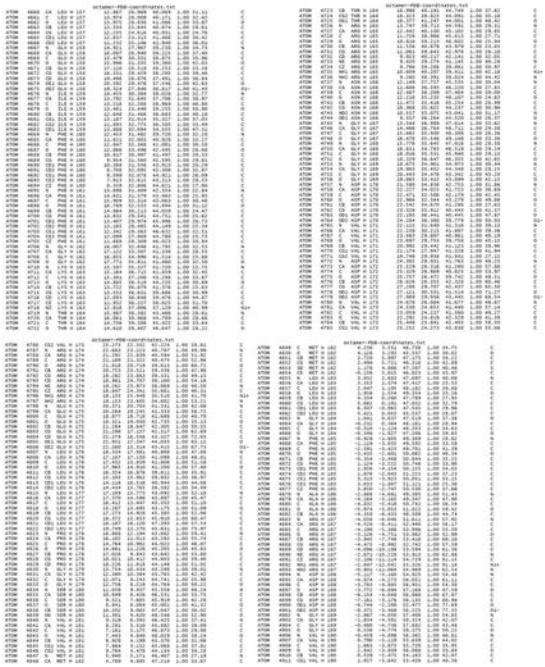
【図３４Ｒ】



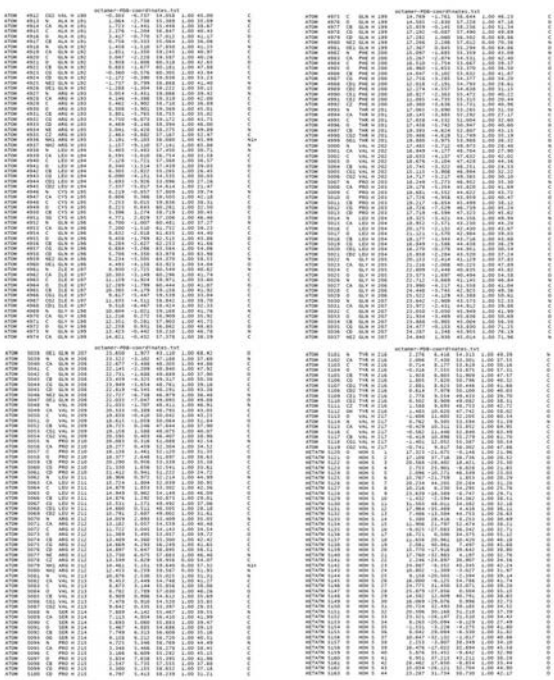
【図３４Ｓ】



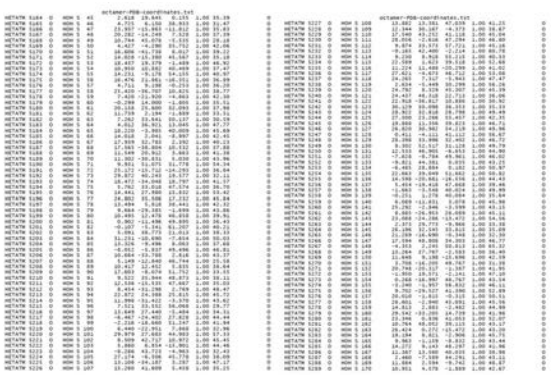
【図３４Ｔ】



【図３４Ｕ】



【図３４Ｖ】



【配列表】

2017528129000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/000602

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/06(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C07K 1/22(2006.01)i; C07K 1/18(2006.01)i; C07K 1/16(2006.01)i

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)

A61K; A61P; C12N; C07K

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)

DWPI,SIPOABS,CNABS,CNKI,Google scholar,Pubmed: IFP35, IFI35, NMI, interferon induc+, disease, disorder, high level, activity, highly expressed, modulat+, inhibit+, suppress+, stimulat+, antibody, siRNA, cytokine, immuno+, sequence search based on SEQ ID NOs: 9-12

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Anshuman Das et al. "Interferon-Inducible Protein IFI35 Negatively Regulates RIG-I Antiviral Signaling and Supports Vesicular Stomatitis Virus Replication" *Journal of Virology*, Vol. Volume 88, No. No.6, 31 March 2014 (2014-03-31), see the whole document	88-90
A	Anshuman Das et al. "Interferon-Inducible Protein IFI35 Negatively Regulates RIG-I Antiviral Signaling and Supports Vesicular Stomatitis Virus Replication" *Journal of Virology*, Vol. Volume 88, No. No.6, 31 March 2014 (2014-03-31), see the whole document	1-28, 34, 35, 36-45(part), 46-53, 74-87, 91-93
A	WO 9928460 A2 (LEADD BVET AL.) 10 June 1999 (1999-06-10) see the whole document	1-28, 34, 35, 36-45(part), 46-53, 74-93

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 November 2015	**25 November 2015**
Name and mailing address of the ISA/CN **STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA** **6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China**	Authorized officer **LI,Kangqi**
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No. **(86-10)62411034**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/000602

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Lingqiang Zhang et al. "The PH domain containing protein CKIP-1 binds to IFP35 and Nmi and is involved in cytokine signaling" *Cellular Signalling*, Vol. volume 19, 17 November 2006 (2006-11-17), see the whole document	1-28, 34, 35, 36-45(part), 46-53, 74-93

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/000602

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **1-24, 40-45, 64-69**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 1-24 relate to methods for treating or preventing diseases associated with abnormally high level or activity of IFP35 and/or NMI with an effective amount of agents that prevent or reduce production or an activity of IFP35 and/or NMI; claims 40-45 relate to methods for treating or preventing diseases associated with abnormally high level or activity of IFP35 and/or NMI with antibodies; claims 64-69 relate to methods for stimulating an immune response in a subject with polypeptides or pharmaceutical compositions.

[2] Thus claims 1-24, 40-45 and 64-69 may be excluded from international search according to Rule 39.1(iv).

[4] Claims 1-24 might be reasonably expected to be direct to the alleged uses of agents that prevent or reduce production or an activity of IFP35 and/or NMI for the manufacture of pharmaceutical compositions for treating or preventing diseases associated with abnormally high level or activity of IFP35 and/or NMI; claims 40-45 might be reasonably expected to be direct to the alleged uses of antibodies for the manufacture of pharmaceutical compositions for treating or preventing diseases associated with abnormally high level or activity of IFP35 and/or NMI; claims 64-69 might be reasonably expected to be direct to the alleged uses of polypeptides or pharmaceutical compositions for the manufacture of pharmaceutical compositions for stimulating an immune response in a subject.

[5] The international search is carried out on the basis of said condition.

2. ☑ Claims Nos.: **29-33, 36-45(part), 54-73**
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:

[1] The technical solutions of claims 29-33, 54-73, and the part of 36-45 citing claims 29-33, refer to sequences of SEQ ID NOs:2, 4, 6 and 8, which are not disclosed in the description. Either, there is not any form of sequence listing filed. Therefore, no meaningful international search on claims 29-33, 54-73, and the part of 36-45 citing claims 29-33 could be carried out.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/000602

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 9928460 A2	10 June 1999	NZ 504952 A	25 July 2003
		EP 0921192 A1	09 June 1999
		AU 761037 B2	29 May 2003
		AU 1446099 A	16 June 1999
		WO 9928460 A3	12 August 1999
		CA 2311611 A1	10 June 1999
		EP 1036171 A2	20 September 2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18		4C085
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46		4C086
C12Q	*1/68*	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A	4H045
C07K	*14/47*	*(2006.01)*	C07K	14/47		
C12N	*15/113*	*(2010.01)*	C12N	15/00	G	
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00		
A61P	*31/00*	*(2006.01)*	A61P	31/00		
A61P	*31/04*	*(2006.01)*	A61P	31/04		
A61P	*37/02*	*(2006.01)*	A61P	37/02		
A61K	*38/02*	*(2006.01)*	A61K	38/02		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61K	*31/713*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61K	*31/7105*	*(2006.01)*	A61K	31/713		
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	31/7105		
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61P	*35/02*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	A61P	35/02		
G01N	*33/68*	*(2006.01)*	G01N	33/50	P	
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/68		
G01N	*33/15*	*(2006.01)*	G01N	33/53	D	
			G01N	33/53	M	
			G01N	33/50	Z	
			G01N	33/15	Z	

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

(72)発明者 インファン・リウ
中華人民共和国 １００１０１ ベイジン チャオヤン ダータン ロード １５
(72)発明者 ヂーファ・リウ
中華人民共和国 １００１０１ ベイジン チャオヤン ダータン ロード １５
(72)発明者 ファンファン・リャン
中華人民共和国 １００１０１ ベイジン チャオヤン ダータン ロード １５
(72)発明者 ジュエン・シェン
中華人民共和国 １００１０１ ベイジン チャオヤン ダータン ロード １５
(72)発明者 ルイチン・イェン
中華人民共和国 １００１０１ ベイジン チャオヤン ダータン ロード １５
(72)発明者 ヂーカイ・シァホウ
中華人民共和国 １００１０１ ベイジン チャオヤン ダータン ロード １５

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CB01 DA14 DA36 FB02 FB03
4B063 QA01 QA19 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34 QS36 QX02

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA17 BA44 MA52 MA55 MA56 MA66 NA14 ZB071 ZB072
ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB321 ZB322 ZB351 ZB352
4C085 AA13 AA14 CC23 DD62 DD63 EE01 GG01 GG02 GG04 GG05
GG08
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA52 MA55 MA56 MA66 NA14
ZB07 ZB11 ZB26 ZB27 ZB32 ZB35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50
FA72 FA74

专利名称(译)	用于治疗和/或预防与异常水平相关的疾病或病症的方法和组合物和/		
公开(公告)号	JP2017528129A	公开(公告)日	2017-09-28
申请号	JP2017510624	申请日	2015-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院生物物理研究所		
申请(专利权)人(译)	生物物理研究所，中国中院院士科学		
[标]发明人	インファンリウ ヂーファリウ ファンファンリャン ジュエンシェン ルイチンイエン ヂーカイシァホウ		
发明人	インファン·リウ ヂーファ·リウ ファンファン·リャン ジュエン·シェン ルイチン·イエン ヂーカイ·シァホウ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/18 C07K16/46 C12Q1/68 C07K14/47 C12N15/113 A61K45/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P37/02 A61K38/02 A61K39/395 A61K31/713 A61K31/7105 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/15		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/24 C07K2317/76 A61K39/0011 C07K2317/565 C07K2317/567 C12N15/113 C12N2310/11 G01N33/68 G01N2500/04 G01N2500/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/18 C07K16/46 C12Q1/68.A C07K14/47 C12N15/00.G A61K45/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P37/02 A61K38/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K31/713 A61K31/7105 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/50.P G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C084/ZB321 4C084/ZB322 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA56 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB32 4C086/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	广田幸一 山下武		
优先权	201410418773.1 2014-08-22 CN		

其他公开文献	JP2017528129A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了用于治疗和/或预防与异常高水平的IFP35蛋白家族（包括IFP35和NMI），异常高水平的IFP35蛋白家族相关的疾病或病症的方法和组合物（ 用于诊断，预后或治疗性监测与之相关的疾病或病症（包括IFP35和NMI）的方法和组合物，以及鉴定IFP35蛋白质家族调节剂（包括IFP35和NMI）的方法。 并且提供了一种组合物。 [选择图]无

(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2017-528129
(P2017-528129A)
(43)公表日　平成29年9月28日(2017.9.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B063
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B064
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4B065
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 103 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-510624 (P2017-510624)
(86)(22)出願日　平成27年8月21日(2015.8.21)
(85)翻訳文提出日　平成29年4月18日(2017.4.18)
(86)国際出願番号　PCT/CN2015/000602
(87)国際公開番号　WO2016/026258
(87)国際公開日　平成28年2月25日(2016.2.25)
(31)優先権主張番号　201410418773.1
(32)優先日　平成26年8月22日(2014.8.22)
(33)優先権主張国　中国(CN)

(71)出願人　512320593
インスティチュート・オブ・バイオフィジックス，チャイニーズ・アカデミー・オブ・サイエンシズ
中華人民共和国北京　１００１０１，チャオヤン・ディストリクト，ダータン・ロード　１５
(74)代理人　100107515
弁理士　廣田　浩一
(74)代理人　100107733
弁理士　流　良広
(74)代理人　100115347
弁理士　松田　奈緒子
(74)代理人　100163038
弁理士　山下　武志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】異常なレベル及び／又は活性のＩＦＰ３５ファミリーのタンパク質に関連する疾患又は障害を治療及び／又は予防するための方法及び組成物