

(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)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 4
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)	(71) 出願人	512320593
(86) (22) 出願日	平成27年8月21日 (2015.8.21)		インスティテュート・オブ・バイオフィジ
(85) 翻訳文提出日	平成29年4月18日 (2017.4.18)		ックス, チャイニーズ・アカデミー・オブ
(86) 国際出願番号	PCT/CN2015/000602		・サイエンス
(87) 国際公開番号	W02016/026258		中華人民共和国北京 1 0 0 1 0 1, チャ
(87) 国際公開日	平成28年2月25日 (2016.2.25)		オヤン・ディストリクト, ダータン・ロー
(31) 優先権主張番号	201410418773.1		ド 1 5
(32) 優先日	平成26年8月22日 (2014.8.22)	(74) 代理人	100107515
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		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 I F P 3 5 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 I F P 3 5 ファミリーのタンパク質 (I F P 3 5 及び N M I 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 I F P 3 5 ファミリーのタンパク質 (I F P 3 5 及び N M I 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 I F P 3 5 ファミリーのタンパク質 (I F P 3 5 及び N M I 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 I F P 3 5（インターフェロン誘導タンパク質 3 5 k D）及び／又は N M I（N－M y c 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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。

10

【請求項 3】

前記異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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。

20

【請求項 6】

異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I 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。

30

【請求項 9】

前記剤が、I F P 3 5 及び／又は N M I 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、s i R N A、s h R N A、又は m i R N A）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、I F P 3 5 及び／又は N M I をコードしている遺伝子を標的とするアンチセンス R N A 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、I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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。

40

【請求項 13】

前記剤が、I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I と I F P 3 5 及び／又は N M I 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。

50

【請求項 15】

前記剤が、I F P 3 5 及び／又は N M I と I F P 3 5 及び／又は N M I 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 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

I F P 3 5 及び／又は N M I 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 N F - κ B シグナル伝達の阻害又は低減が生じる請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記炎症因子が、I L - 1 β 、T N F - α 、i N O S、及び／又は C D 8 6 を含み、前記 N F - κ B シグナル伝達が、T L R 4 等の T L R によって媒介される請求項 1 6 に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記剤が、I F P 3 5 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 N M I 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 1 7 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 N I D (N M I / I F P 3 5 ドメイン) に特異的に結合する請求項 1 8 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 1 9 のいずれかに記載の方法。

20

【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 1 9 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 2 1 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 23】

前記被験体が、哺乳類である請求項 1 から 2 2 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 2 3 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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。

40

【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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 2 5 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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】

50

前記異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 2 7 に記載の使用。

【請求項 2 9】

I F P 3 5 及び／又は N M I 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 3 0】

配列番号 2 のアミノ酸 8 1～1 7 0、1 7 7～2 6 8、又は 1 3 6～2 1 6 内のエピトープに特異的に結合する請求項 2 9 に記載の抗体又は抗原結合断片。

10

【請求項 3 1】

配列番号 4 のアミノ酸 8 1～1 6 8、1 7 5～2 6 6、又は 1 3 4～2 1 4 内のエピトープに特異的に結合する請求項 2 9 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 3 2】

配列番号 6 のアミノ酸 1 0 4～1 9 3、2 0 2～2 9 3、又は 1 5 1～2 5 0 内のエピトープに特異的に結合する請求項 2 9 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 3 3】

配列番号 8 のアミノ酸 1 0 3～1 9 2、2 0 1～2 9 2、又は 1 5 1～2 4 0 内のエピトープに特異的に結合する請求項 2 9 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 3 4】

I F P 3 5 及び／又は N M I 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 (C D R) のアミノ酸配列からなる C D R を含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号 1 0 に記載の軽鎖可変領域配列における C D R のアミノ酸配列からなる C D R 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。

20

【請求項 3 5】

配列番号 9 に記載の重鎖可変領域と、配列番号 1 0 に記載の軽鎖可変領域とを含む請求項 3 4 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 3 6】

前記断片が、F a b 断片、F (a b □) 2 断片、F v 断片、又は s c F v 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 2 9 から 3 5 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

30

【請求項 3 7】

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 2 9 から 3 6 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 3 8】

前記抗体が、完全ヒト抗体又はヒト化抗体である請求項 2 9 から 3 7 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 3 9】

前記抗体が、組み換え的に産生される請求項 2 9 から 3 8 のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

40

【請求項 4 0】

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 I F P 3 5 (インターフェロン誘導タンパク質 3 5 k D) 及び／又は N M I (N-M y c 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 2 9 から 3 9 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 4 1】

前記異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 4 0 に記載の方法。

50

【請求項 4 2】

前記異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 4 0 から 4 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 3】

前記異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 4 0 から 4 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 4】

I F P 3 5 及び／又は N M I 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 N F - κ B シグナル伝達の阻害又は低減が生じる請求項 4 0 から 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 5】

前記炎症因子が、I L - 1 β 、T N F - α 、i N O S、及び／又は C D 8 6 を含み、前記 N F - κ B シグナル伝達が、T L R 4 等の T L R によって媒介される請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

I F P 3 5 及び／又は N M I 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 (C D R) のアミノ酸配列からなる C D R を含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号 1 0 に記載の軽鎖可変領域配列における C D R のアミノ酸配列からなる C D R 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 4 7】

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 1 0 に記載の軽鎖可変領域とを含む請求項 4 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 8】

請求項 4 6 から 4 7 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 4 9】

請求項 4 8 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 5 0】

(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 C D R のアミノ酸配列からなる相補性決定領域 (C D R) を含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号 1 0 に記載の軽鎖可変領域配列における C D R のアミノ酸配列からなる C D R 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 5 1】

前記宿主細胞が、C H O 細胞等の真核細胞である請求項 4 9 から 5 0 のいずれかに記載の宿主細胞。

【請求項 5 2】

抗 I F P 3 5 抗体若しくはその抗原結合断片及び／又は抗 N M I 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

10

20

30

40

50

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。

10

20

30

40

50

【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。

10

【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。

20

【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、卵巢癌、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。

30

【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。

40

【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

50

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 7 2 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 7 4】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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。

10

【請求項 7 5】

前記異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 7 4 から 7 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 7】

前記異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 7 4 から 7 6 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7 8】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I のレベル及び／又は活性よりも少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 5 0 %、2 0 0 %、3 0 0 %、4 0 0 %、又は 5 0 0 % 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 7 4 から 7 7 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 7 9】

異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I のレベルを評価することを含む請求項 7 4 から 7 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 0】

異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の活性を評価することを含む請求項 7 4 から 7 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 1】

前記 I F P 3 5 及び／又は N M I のレベル及び／又は活性が、D N A、R N A、及び／又はタンパク質のレベルで評価される請求項 7 4 から 8 0 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 8 2】

前記 I F P 3 5 及び／又は N M I のレベルが、I F P 3 5 及び／又は N M I の D N A 又は R N A における少なくとも 1 0 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 D N A 及び／又は R N A のレベルで評価される請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記 I F P 3 5 及び／又は N M I のレベルが、I F P 3 5 及び／又は N M I 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 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

50

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 8 5】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态を決定することを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 8 6】

被験体における前記 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态が、I F P 3 5 及び／又は N M I の D N A 又は R N A における少なくとも 1 0 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 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态を決定する手段を含むことを特徴とするキット。

20

【請求項 8 8】

I F P 3 5 及び／又は N M I の調節因子を同定する方法であって、

a) I F P 3 5 及び／又は N M I を試験物質と接触させ、前記試験物質と接触した I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の活性を比較し、工程 a) 及び b) で評価した前記 I F P 3 5 及び／又は N M I の活性が異なる場合、前記試験物質を I F P 3 5 及び／又は N M I の調節因子として同定すること

30

とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 8 9】

前記試験物質が、低分子、I F P 3 5 及び／又は N M I の変異体及び／又は断片を含むポリペプチドライブラリ、I F P 3 5 及び／又は N M I に特異的に結合する抗体、s i R N A、又はアンチセンス R N A である請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

I F P 3 5 及び／又は N M I の活性の阻害剤を同定するために用いられる請求項 8 8 から 8 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 1】

被験体における異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 8 8 から 9 0 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 9 2】

前記異常に高いレベル及び／又は活性の I F P 3 5 及び／又は N M I 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 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

請求項 8 8 から 9 2 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】

【0 0 0 1】

50

(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。

10

【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。

20

【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。

30

【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)

40

【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)

50

【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／

10

20

30

40

50

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、I F P 3 5 及び／又はN M I 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、s i R N A、s h R N A、又はm i R N A）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、I F P 3 5 及び／又はN M I 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R N A）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、I F P 3 5 及び／又はN M I 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I F P 3 5 及び／又はN M I 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、I F P 3 5 及び／又はN M I 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、I F P 3 5 及び／又はN M I とI F P 3 5 及び／又はN M I 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、I F P 3 5 及び／又はN M I とI F P 3 5 及び／又はN M I 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。

10

【0009】

前述の実施形態のいずれかでは、I F P 3 5 及び／又はN M I 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N F - κ B 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、I L - 1 β 、T N F - α 、i N O S、及び／又はC D 8 6 を含み、前記N F - κ B シグナル伝達は、T L R 4 等のT L R によって媒介される。

20

【0010】

前述の実施形態のいずれかでは、前記剤は、I F P 3 5 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N M I 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N I D（N M I / I F P 3 5 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（p a r e n t a l）、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I F P 3 5 及び／又はN M I 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I F P 3 5 及び／又はN M I 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I F P 3 5 及び／又はN M I 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。

30

【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I F P 3 5 及び／又はN M I 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I F P 3 5 及び／又はN M I 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I F P 3 5 及び／又はN M I 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。

40

【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I F P 3 5 及び／又はN M I 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I F P 3 5 及び／又はN M I の産生及び／又は活性を防止又は低減

50

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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I 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 8 1 ~ 1 7 0、1 7 7 ~ 2 6 8、又は 1 3 6 ~ 2 1 6 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 8 1 ~ 1 6 8、1 7 5 ~ 2 6 6、又は 1 3 4 ~ 2 1 4 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 1 0 4 ~ 1 9 3、2 0 2 ~ 2 9 3、又は 1 5 1 ~ 2 5 0 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 1 0 3 ~ 1 9 2、2 0 1 ~ 2 9 2、又は 1 5 1 ~ 2 4 0 内のエピトープに特異的に結合する。

【0016】

別の態様では、I F P 3 5 及び／又は N M I 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 (C D R) のアミノ酸配列からなる C D R を含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号 1 0 に記載の軽鎖可変領域配列における C D R のアミノ酸配列からなる C D R 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 1 0 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、F a b 断片、F (a b □) 2 断片、F v 断片、又は s c F v 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I 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 N F - κ B 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、I L - 1 β、T N F - α、i N O S、及び／又は C D 8 6 を含み、前記 N F - κ B シグナル伝達は、T L R 4 等の T L R によって媒介される。

【0020】

1 つの態様では、I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 N I D-Hドメイン構造の外側の左 N I Dドメインは、N I D-Hに類似の構造を有する。配列番号 2 の S e r 2 3 4、L e u 2 3 6、A r g 1 1 0、A r g 1 0 8、A r g 2 3 3、L e u 8 2、G l u 2 6 8、T h r 2 7 1、V a l 2 7 3、G l u 9 2、A s p 8 7、A s p 2 4 5、及び G l y 2 4 6 は、I F P 3 5 の決定された N I Dドメイン構造における表面残基に対応する、左 N I D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、I F P 3 5 受容体又は I F P 3 5 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 8 1～1 6 8、1 7 5～2 6 6、又は 1 3 4～2 1 4 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 1 4 3 位、1 4 5 位、1 4 8 位、1 4 9 位、1 7 0 位、1 7 2 位、1 7 3 位、1 7 5 位、1 8 0 位、1 8 6 位、1 9 0 位、2 1 0 位、1 9 7 位、1 9 9 位、2 0 4 位、2 0 5 位、2 0 6 位、2 0 8 位、2 1 2 位、及び 2 1 4 位のアミノ酸残基（S e r 1 4 3、A r g 1 4 5、G l u 1 4 8、G l u 1 4 9、G l u 1 7 0、A r g 1 7 2、G l u 1 7 3、L e u 1 7 5、M e t 1 8 0、G l u 1 8 6、G l n 1 9 0、A r g 2 1 0、G l n 1 9 7、A r g 1 9 9、A r g 2 0 4、G l n 2 0 5、G l n 2 0 6、L e u 2 0 8、S e r 2 1 2、及び T y r 2 1 4）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、I F P 3 5 受容体又は I F P 3 5 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 1 0 4～1 9 3、2 0 2～2 9 3、又は 1 5 1～2 5 0 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 1 0 7 位、1 1 2 位、1 1 7 位、1 5 9 位、1 7 2 位、1 7 3 位、1 9 2 位、1 9 7 位、2 1 5 位、2 5 6 位、2 6 7 位、及び 2 9 2 位のアミノ酸残基（L e u 1 0 7、L y s 1 1 2、G l n 1 1 7、L y s 1 5 9、G l u 1 7 2、G l u 1 7 3、G l u 1 9 2、A s p 1 9 7、A s p 2 1 5、L y s 2 5 6、A s p 2 6 7、及び G l u 2 9 2）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、N M I 受容体又は N M I 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 1 0 3～1 9 2、2 0 1～2 9 2、又は 1 5 1～2 4 0 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 1 0 6 位、1 1 1 位、1 1 6 位、1 5 8 位、1 7 1 位、1 7 2 位、1 9 1 位、1 9 6 位、2 1 4 位、2 5 5 位、2 6 6 位、及び 2 9 1 位のアミノ酸残基（L e u 1 0 6、L y s 1 1 1、G l n 1 1 6、L y s 1 5 8、G l u 1 7 1、A s p 1 7 2、A s p 1 9 1、A s p 1 9 6、A s p 2 1 4、A r g 2 5 5、A s p 2 6 6、及び A s p 2 9 1）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、N M I 受容体又は N M I 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。

10

【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。

20

【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を含む方法について本明細書に開示する。

30

【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。

40

【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（

50

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 I F P 3 5 及び／又は N M I のレベル及び／又は活性よりも少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 5 0 %、2 0 0 %、3 0 0 %、4 0 0 %、又は 5 0 0 % 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I のレベルを評価することを更に含んでよい。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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の活性を評価することを含んでよい。前述の実施形態のいずれかでは、I F P 3 5 及び／又は N M I のレベル及び／又は活性は、D N A、R N A、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、I F P 3 5 及び／又は N M I のレベルは、I F P 3 5 及び／又は N M I の D N A 又は R N A における少なくとも 1 0 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 D N A 及び／又は R N A のレベルで評価される。別の態様では、I F P 3 5 及び／又は N M I のレベルは、I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态を決定することを含む。1つの態様では、被験体における I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态は、I F P 3 5 及び／又は N M I の D N A 又は R N A における少なくとも 1 0 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态を決定するための手段を含む。

【0039】

1つの態様では、I F P 3 5 及び／又は N M I 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) I F P 3 5 及び／又は N M I を試験物質と接触させ、前記試験物質と接触した I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の活性を評価することと、c) 工程 a) 及び b) で評価した I F P 3 5 及び／又は N M I の活性を比較し、工程 a) 及び b) で評価した I F P 3 5 及び／又は N M I の活性が異なる場合、前記試験物質を I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I の変異体及び／又は断片を含むポリペプチドライブラリ、I F P 3 5 及び／又は N M I に特異的に結合する抗体、ポリヌクレオチド（例えば、s i R N A、s h R N A、m i R N A、又はアンチセンス R N A）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、I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 ファミリーのタンパク質（例えば、I F P 3 5 及び／又は N M I）に関連する。

10

【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、N I D-H（ヘテロ接合性 N I D）の結晶構造を示す。a. I F P 3 5 の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. I F P 3 5 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. 分子内相互作用に關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 N I D-H 分子を o-二量体に重ねる。

20

【図2】図2は、N I D-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. S u p e r d e x - 2 0 0（16／60又は10／30）カラム（G E）を用いた N I D-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、 $\alpha 1-\alpha 1$ 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. N I D-H と R N A 認識モチーフ（R R M）との構造比較。これらの間の R. M. S. D は、約 1.3 Å である。

30

【図3】図3は、N I D-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 N I D-H は、R A W 2 6 4. 7 細胞において T N F- α 及び I L-1 β の転写をアップレギュレートする。G A P D H を内部標準として用いて、R T-P C R によって T N F- α 及び I L-1 β の細胞 m R N A を検出した。b. $\alpha 1$ における二量体状態変異体である K 1 5 6 E / K 1 6 3 E / R 1 6 5 E は、T N F- α 及び I L-1 β の転写を部分的にアップレギュレートする。c. L - z i p ドメインを含まない I F P 3 5 (Δ N) は、N I D-H 八量体よりも有効に免疫応答を刺激した。d. L P S と同様に、 Δ N は、R A W 2 6 4. 7 細胞の T N F- 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 T N F- α レベルを E L I S A によって決定した。

40

【図4】図4は、ヒト起源の N M I タンパク質が、T H P 1 細胞において T N F- α 及び I L-1 β の転写をアップレギュレートすることを示す。P B S バッファをネガティブコントロール（N C）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、I F P 3 5 が内因性 D A M P の特徴を有することを示す。a. L P S で刺激された R A W 2 6 4. 7 細胞によって放出された I F P 3 5。R A W 2 6 4. 7 マクロファージを 100 ng / mL の L P S で前処理した。0時間、1時間、2時間、3時

50

間、5時間、9時間後の細胞溶解物及び上清をI F P 3 5、H M G B 1、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. I F P 3 5は、L P S誘導性敗血症マウスの血清に蓄積される。L P S注射の3時間後及び6時間後に、マウスにおけるI F P 3 5の血清濃度をE L I S Aによって測定した。c. I F P 3 5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. I g G及びI F P 3 5モノクローナル抗体(抗N I D-H)を投与した敗血症マウスの生存率を示す。マウスにL P Sを注射(i. p.)し、次いで、抗I F P 3 5又はI g Gで処理した。動物の生存率を、 $n=15$ 頭/群で評価した。e. 抗N I D-Hの中和によって、E L I S Aを用いて検出したI L-6、T N F- α 、及びI L-1 β 等の早期炎症性サイトカインの放出が減少した。f. L P S及びD-g a lで処理した野生型マウス(10
($n=12$)及びI F P 3 5 $^{-/-}$ マウス($n=12$)の生存。g. I F P 3 5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。L P S及びD-g a l注射の1時間後及び3時間後にE L I S Aによって測定したときのI F P 3 5 $^{-/-}$ マウス及び野生型マウスにおけるI L-6、T N F- α 、及びI L-1 β の血清濃度。

【図6】図6は、I F P 3 5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. 10 ng/mLのI N F- γ で刺激されたR A W細胞によって放出されたI F P 3 5。b. サルモネラ菌(S R)で刺激されたR A W細胞によって放出されたN M I。c及びd. I F P 3 5(パネルc)及びN M I(パネルd)の凝集状態を検出した。R A W細胞をS Rで刺激した後、細胞培養物を回収し、放出されたI F P 3 5ファミリーのメンバーをゲル濾過(S u p e r d e x-200(16/60又は10/30)カラム、G E)及びウエスタンブロットによって検出した。I F P 3 5の溶出体積は、パネルcに示す通り、約90 mLであり、これは、35 kDのモノマーであることを示唆する。N M I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76 mL~約82 mLであり、これは、放出されたN M Iが溶液中で二量体として存在することを示す。e. L P S注射の3時間後及び6時間後にE L I S Aによって測定したとき、N M Iは、L P S誘導性敗血症マウスの血清中に蓄積されている。f. N M I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。N M Iの血清濃度は、E L I S Aによって測定した。g. N M Iノックアウトマウスは、L P S曝露に対して耐性である。L P Sを投与した野生型マウス(30
(W T)($n=14$)及びN m i $^{-/-}$ マウス(K O)($n=14$)の生存率を示す。h. N m i $^{-/-}$ マウスの血清中のI L-6、T N F- α 、及びI L-1 β 等の炎症性サイトカインの放出は、減少する。W Tマウス及びK O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、I F P 3 5が、T L R 4/M D 2/C D 1 4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. T L R 4、C D 1 4、M D 2、及びN F- κ B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H E K 2 9 3細胞株において、八量体N I D-Hは、N F- κ B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、(25 mg/mLのポリミキシンBの有無無しで)10 μ g/mLの八量体N I D-H又は100 ng/mLのL P S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。L P S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I F P 3 5(Δ N)、I F P 3 5のN末端ランケート型、及びL P Sは、N F- κ B及びA P-1を誘導するが、I R F 3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T L R 4、M D 2、及びC D 1 4、及びN F- κ Bプロモータ(又はA P-1、I R F 3)の遺伝子をH E K 2 9 3細胞に一過的にトランスフェクトした。I F P 3 5は1 μ g/mLで用い、一方、ポジティブコントロールとして100 ng/mLのL P Sを投与した。

【図8】図8は、I F P 3 5におけるタンデムN I Dドメインの構造モデルを示す。a及

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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- κ B経路を刺激できることを示す。

30

【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-ノーマウス、及びTLR4-ノーマウスにおけるIL-1 β 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。

40

【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THF α 及びIL-1 β 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。

50

【図 3 3 E】図 3 3 E は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 F】図 3 3 F は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 G】図 3 3 G は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 H】図 3 3 H は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 I】図 3 3 I は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 J】図 3 3 J は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 K】図 3 3 K は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 L】図 3 3 L は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 M】図 3 3 M は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 N】図 3 3 N は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 O】図 3 3 O は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 P】図 3 3 P は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 Q】図 3 3 Q は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 3 R】図 3 3 R は、N I D－H 二量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 A】図 3 4 A は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 B】図 3 4 B は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 C】図 3 4 C は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 D】図 3 4 D は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 E】図 3 4 E は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 F】図 3 4 F は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 G】図 3 4 G は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 H】図 3 4 H は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 I】図 3 4 I は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 J】図 3 4 J は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 K】図 3 4 K は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 L】図 3 4 L は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 M】図 3 4 M は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 N】図 3 4 N は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 O】図 3 4 O は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 P】図 3 4 P は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 Q】図 3 4 Q は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 R】図 3 4 R は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 S】図 3 4 S は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 T】図 3 4 T は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 U】図 3 4 U は、N I D－H 八量体の結晶構造座標を示す。
 【図 3 4 V】図 3 4 V は、N I D－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

10

20

30

40

50

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時、「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時、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時、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時、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時、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。

10

【0050】

本明細書で使用する時、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メンバーであるともみなしてよい。

20

【0051】

本明細書で使用する時、「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る、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。

30

40

【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

50

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*ーリジン等）、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-アシル、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。

10

20

30

【0053】

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で使用する時、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時、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もよい。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。

40

【0055】

50

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、様々な条件であるが、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。かかるベクターの選択及び使用は、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時、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。

10

【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。

20

【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。

30

【0066】

本明細書で使用する時、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。

40

50

【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時、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時、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によって、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。

10

【0068】

本明細書で使用する時、「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。

20

【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。

30

【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。

40

【0071】

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

50

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時、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もので、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時、「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時、「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時、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（Leucine Zipper）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, 36278-36284 (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-I（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された。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, 556-564 (2009); 及び Li et al., JBC 277, 20965-20973 (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- κ B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。

10

20

30

40

50

【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 I F P 3 5 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 N M I 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 I F P 3 5 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 N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I を中和するために I F P 3 5 抗体及び／又は N M I 抗体を用いることによって、I F P 3 5 又は N M I 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、S A R S、M E R S、H B V、H C V）、細菌感染症（例えば、結核菌（*M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s*））、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、I F P 3 5 ファミリーのタンパク質の発現、例えば、I F P 3 5 及び／又は N M I の発現を引き起こす。感染患者における I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 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。

10

【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、H I V - 1（H T L V - I I I、L A V、又は H T L V - I I I / L A V、又は H I V - I I Iとも称される）；及び他の単離菌、例えば、H I V - L P；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、R S 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（*B i m a v i r i d a e*）；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（H S V）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（C M V）、ヘルペスウイルス）；ポクシーウイルス科（*P o x y i r i d a e*）（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。

20

30

40

【0083】

病原性細菌としては、ヘリコバクター・ピロリ（*H e l i c o b a c t e r p y l o r i s*）、ボレリア・ブルグドルフェリ（*B o r e l i a b u r g d o r f e r i*）、レジオネラ・ニューモフィラ（*L e g i o n e l l a p n e u m o p h i l a*）、マイコバクテリア属の種（例えば、結核菌（*M. t u b e r c u l o s i s*）、マイコバクテリ

50

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. kansasii*)、マイコバクテリウム・ゴルドネ (*M. goodii*)、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 pyogenes*) (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 pallidum*)、トレポネーマ・ペルテニュー (*Treponema pertenuis*)、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 israelii*) 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・ネオフォルマンズ (*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 (*Trypanosoma*)、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 artemisiifolia*))；

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 sabinoide*s) 、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、疾患を引き起こすべく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、I F P 3 5 受容体又は I F P 3 5 に対するアンタゴニスト抗体との結合に關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、S e r 1 4 5、A s p 1 7 2、V a l 1 7 3、L e u 1 7 7、A r g 2 1 2、G l n 1 9 9、G l n 2 0 7、G l n 2 0 8、P r o 2 1 0、S e r 2 1 4、T h r 2 0 1、及び T y r 2 1 6 等の幾つかの残基を提供して、図 1 6 A に示す大きな露出表面を形成する。残基の中でも、残基 G l u 1 5 0、G l u 1 7 5、L e u 1 7 7、G l n 2 0 7、及び G l n 2 0 8 が、より重要な位置である（図 1 6 A）。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、I F P 5 - N I D 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關与している。これら残基は、S e r 1 4 5、A r g 1 4 7、G l u 1 5 0、G l u 1 5 1、V a l 1 7 3、G l y 2 0 6、G l n 2 0 7、及び G l n 2 0 8 を含んでいてよい。幾つかの態様では、A r g 1 4 7、G l n 2 0 7、G l n 2 0 8、G l u 1 5 0、及び G l u 1 5 1 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 1 6 B）。

【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シートパ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、A r g 1 8 7、G l u 1 8 8、G l n 1 9 2、G l n 1 9 6、A r g 2 1 2、及び T y r 2 1 6 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關与し得る（図 1 6 C）。

【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關与し、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、I F P 3 5 及び N M I を発現させ、精製し、結晶化し、また、I F P 3 5 の1つの断片の構造を決定した。I F P 3 5 の断片は、炎症応答を誘導することができ、更に、I F P 3 5 及び N M I 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。I F P 3 5 抗体又は N M I 抗体を用いて細胞溶液又は体液中の I F P 3 5 又は N M I を中和することを通して I F P 3 5 又は N M I 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、I F P 3 5 及び N M I の過剰発現に關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、I F P 3 5 及び／又は N M I の濃度低減によって制御できることを示す。一方、I F P 3 5 及び／又は N M I 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、C L U S T A L 2 . 1 多重配列アラインメントを用いた、ヒト I F P 3 5 (h I F P)、マウス I F P 3 5 (m I F P)、ヒト N M I (h N M I)、及びマウス N M I (m N M I) の配列アラインメントである。

【0094】

【表 1】

hNMI	MEADKDDTQQILKEHSPD-EFIKDEQNKLIDEITKKNIQLKKEIQKLETELQEATKEFQ	59
mNMI	MDADKDNKQACDERSAEMDDMRGEQSMGLVHEIMSENKELDEEIKKLEAELQSDAREFQ	60
hIFP	-----MSAPLDAALHALQEEQARLKMRLWDLQQLRKELGDSPK	38
mIFP	-----MSVTLQTVLYSLQEEQARLKMRLQELQQLKRERTGSPG	38
.	: : .: : .*: : .*	
hNMI	IKEDIPETKMKFLSVETPENDSQLSNISCSFQVSSKVPYEQKQALITFEKEEVAQNVV	119
mNMI	IKENVPEKKLKLTSVESPKDGCHFSNSSCSFQVSSQILYELQEGQALITFEKEEVAQNVI	120
hIFP	DKVPFSPVKIPLVFRGHTQQDPEVPKSLVS---NLRIHCPLLAGSALITFDDPKVAEQVL	95
mIFP	AKIPFSPVEVPLVFQGGTKQGRQVPKFVVS---NLKVCCPLPEGSALVTFEDPKVVDRL	95
*	.: : .: : *	
hNMI	SMKHHVQIKDVNLEVTAQPVPLNSGVRQVY--VEVSKMKINVTETIPD--TLREDQMRD	175
mNMI	SMGNHVVQMEGTPVKVSAHPVPLNTGVRQVH--VDISKMKINVTGIPD--ELSEEQTRD	176
hIFP	QQKEHTINMEECRLRVQVQPLELPMVTTIQVMSSQLSGRRVLVTGFPASLRLSEEELLD	155
mIFP	QQKEHRVNLEDCLRVQVQPLELPMVTTIQV--SSQPDNHRVLVSGFPAGLRLSEEELLD	153
.	:* :*: :* :*: :* :*: :* :*: :*	
hNMI	KLELSFSKSRNGGGEVDRVDYDRQSGSAVITFVEIGVADKILKKKEYPLYINQTCRVRTV	235
mNMI	KLELSFCKSRNGGGEVESVDYDRKSRSAVITFVETGVVDKILKKKTYPLYMNQKCHSVAV	236
hIFP	KLEIFFGKTRNGGGEVDVDR--ELLPGSVMLGFARDGVAQRLCQIGQFTVPLGGQVPLRV	213
mIFP	KLEIFFGKAKNGGGEVDVETR--EMLQGTVMLGFADEEVAQHLCQIGQFRVPLDRQVLLRV	211
***: *	:* :*: :* :*: :* :*: :* :*: :*	
hNMI	SPYTEIHLKKYQIFSGTSKRTVLLTGMEGIQMDEEIVEDLINIHQRAKNGGGEVDVVKC	295
mNMI	SPCIERCLEKYQVFSAVSKKTVLLTGLEGIPVDEETGEDLLNIHFQKKNNGGGEVEVVKC	296
hIFP	SPYVNGEIQKAEIRSQPVPRSVLVLNIPDI-LDGPELHDVLEIHFQKPTRGGGEVEALT	272
mIFP	SPYVSGEIQKAEIKFQQAPHSVLVTNIPDV-MDAQELHDILEIHFQKPTRGGGEVEALT	270
**	:* :*: :* :*: :* :*: :* :*: :*	
hNMI	S-LGQPHIAYFEE-----	307
mNMI	S-LDQSFAYFKEEARETI	314
hIFP	VPQGGQGLAVFTSESG---	288
mIFP	VPSGQGLAIFTSESS---	286
.	* * *	

10

20

【0095】

幾つかの実施形態では、免疫応答の誘発において I F P 3 5 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 I F P 3 5 / N M I 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、I F P 3 5 ファミリーのタンパク質、例えば、I F P 3 5 及び N M I 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よい。

【0096】

幾つかの実施形態では、異常なレベルの I F P 3 5 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、I F P 3 5 ファミリーのタンパク質のアнта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ランケート型 I F P 3 5 タンパク質の適用であって、前記ランケート型 I F P 3 5 が、ヒト I F P 3 5 又はマウス I F P 3 5 であり、前記ランケート型ヒト I F P 3 5 が、以下の 1) 又は 2) であり：

- 1) 配列番号 2 に記載の残基 1 3 6 ~ 2 1 6 を含むタンパク質；
- 2) 1 個 ~ 1 0 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 9 0 % である、1) に記載のタンパク質配列；

前記ランケート型マウス I F P 3 5 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 1 3 4 ~ 2 1 6 を含むタンパク質；

30

40

50

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ランケート型NMIタンパク質の使用であって、前記ランケート型NMIが、ランケート型のヒトNMI又はマウスNMIであり、前記ランケート型ヒト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

10

20

30

40

50

又はマウスのNM I タンパク質であり、前記ヒトNM I 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：NM I 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NM I 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、NM I がNM I 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：NM I タンパク質活性を阻害して、NM I 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NM I 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、NM I 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：NM I 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NM I 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-NM I -NID)を発現させるために前記トランケート型NM I 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オング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アングストローム(angstrom)未満の平均平方根偏差(RMSD)を有する原子レベル構造。

10

【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(CGMC)にCGMC9573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。

20

【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参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。

30

【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NMIT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。

40

【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

50

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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子のコピー数を低減する、I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の複製をブロック又は低減する、I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の転写をブロック又は低減する、I F P 3 5 及び／又は N M I の m R N A の翻訳をブロック又は低減する、及び／又は I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I 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、s i R N A、s h R N A、又は m i R N A）を含む。s i R N A は、I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。例えば、s i R N A は、1 以上の N I D をコードしている I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I をコードしている遺伝子を標的とするアンチセンス R N A を含む。アンチセンス R N A は、I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。

10

【0126】

更に他の実施形態では、前記剤は、I F P 3 5 及び／又は N M I の転写を制御する核因子を阻害又は調節する。I F P 3 5 及び／又は N M I 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。

20

【0127】

更に他の実施形態では、前記剤は、I F P 3 5 及び／又は N M I に特異的に結合する抗体を含む。前記抗体は、I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I の 1 以上の N I D 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 受容体と相互作用する I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I 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（C D R）のアミノ酸配列からなる C D R 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 C D R のアミノ酸配列からなる C D R 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 C D R 及び／又はフレームワーク領域（F R）に保存的置換を導入してもよい。

30

【0129】

V Q L V E S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A
P G K G L K W M G W I N T Y T G E P T F A D D F K G R F A F S L E T S A S T A Y
L Q I N N L K N E D T A T Y F C A R Y G Y S W A M D Y W G Q G T S V T V S S A S
T（配列番号 9）。

40

【0130】

D I V M T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S
G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A
E D A A T Y Y C Q Q W S S N P P I T F G A G T K L E I K（配列番号 10）。

【0131】

1 つの態様では、I F P 3 5 及び／又は N M I 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（C D R）のアミノ酸配列からなる C D R を含む重鎖可変領域、及

50

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】

TGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCTTTGAC
CCCAGTAGTCCATAGCCCCAAGAGTACCCGTATCTTTGCACA
GAAATATGTAGCCGTGTCTCTCATTTCTTTGAGGTTTGTGTGATC
TGCAAATAGGCAGTGTCTGGCAGAGGTTTTCCAAAGAGAAAGG
CAAACCGTCCCTTTGAAGTCAATCAGCAAATGTTTGGCTCTCC
AGTGTAGGTGTTTTATCCAGCCCCATCCACTTTTAAACCCCTTT
CCTGGAGCCTGTCTTCAACCCAGTTTCATTTCCATAGTTTGTGA
AGGTATACCCAGAAAGCCTTGCAGGAGATCTTTGACTGTCTC
TCCTGACTCCTTTAAGCTGCACCT (配列番号11)。

10

【0133】

GACATTTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAAATCATGTCTGCA
TCTCCAGGGGAGAAAGGTCAACCATGACCTGCAGTGCCAGCT
CAAGTGTAAAGTTACATGCACCTGGTACCAGCAGAAAGTCAGG
CACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTG
GCTTCTTGAGTCCCTGTCTCGCTTTCAGTGGCAGTGGGTCTG
GGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGCATGGAGGCTGA
AGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAAC
CCACCCCATCACGTTTCGGTGTCTGGCACCAAGCTGGAAATCA
AA (配列番号12)。

20

【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。

30

【0135】

所与のCDRの正確なアミノ酸配列の境界は、Kabata et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabata」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,"

40

50

” J Mol Biol, 2001 Jun 8; 309 (3): 657-70, (A H o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、K a b a tスキームは、構造アラインメントに基づいているが、一方、C h o t h i aスキームは、構造情報に基づいている。K a b a t及びC h o t h i a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。C o n t a c t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C h o t h i a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「C D R」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C D R（「C D R-H 1、C D R-H 2」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時、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、W a t s o n, 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p K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（pages 13-15 “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、I F P 3 5及び／又はN M Iの変異体形態を含んでいてよい。I F P 3 5及び／又はN M I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、I F P 3 5及び／又はN M Iの変異体形態は、変異型I F P 3 5及び／又はN M I、及び／又はI F P 3 5及び／又はN M I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 I F P 3 5 及び／又は N M I の産生及び／又は活性を、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子のコピー数を低減し、I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の複製をブロック又は低減し、I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の転写をブロック又は低減し、I F P 3 5 及び／又は N M I の mRNA の翻訳をブロック又は低減し、及び／又は I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又は N M I をコードしている遺伝子を標的とする s i R N A を含む。s i R N A は、I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の任意の好適な部分を標的とし得る。例えば、s i R N A は、1 以上の N I D をコードしている I F P 3 5 及び／又は N M I 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、I F P 3 5 及び／又はN M I 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、I F P 3 5 及び／又はN M I 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N I D をコードしているI F P 3 5 及び／又はN M I 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、I F P 3 5 及び／又はN M I の転写を制御する核因子を阻害又は調節する。I F P 3 5 及び／又はN M I 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I F P 3 5 及び／又はN M I 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。

10

【0150】

更に他の実施形態では、前記剤は、I F P 3 5 及び／又はN M I に特異的に結合する抗体を含む。前記抗体は、I F P 3 5 及び／又はN M I 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、I F P 3 5 及び／又はN M I の1 以上のN I D 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、I F P 3 5 及び／又はN M I のN I D 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、I F P 3 5 及び／又はN M I の変異体形態を含んでいてよい。I F P 3 5 及び／又はN M I 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、I F P 3 5 及び／又はN M I の変異体形態は、変異型I F P 3 5 及び／又はN M I 、及び／又はI F P 3 5 及び／又はN M I の断片、例えば、I F P 3 5 及び／又はN M I の1 以上のN I D ドメインを含む断片又はI F P 3 5 及び／又はN M I のN I D ドメインの一部を含む断片であってよい。また、前記剤は、I F P 3 5 及び／又はN M I の変異体形態と異種タンパク質（例えば、F c 部分）との融合タンパク質を含んでいてもよい。

20

【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。

30

【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I F P 3 5 及び／又はN M I の産生及び／又は活性を、異常に高いレベルのI F P 3 5 及び／又はN M I 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I F P 3 5 及び／又はN M I 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。

40

【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

50

， 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、膺、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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（

50

登録商標) H S (ポリエチレングリコール 6 6 0 1 2 -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、L A B R A F I L (登録商標) (エトキシ化杏仁油)、L A B R A S O L (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)、G E L U C I R E (登録商標) (グリセロールエステル)、S O F T I G E N (登録商標) (P E G 6 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。

10

【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、P E G 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-シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリン、又はスルホブチルエーテル-ベータ-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。

20

【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。

30

【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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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。

40

【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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I のレベル及び／又は活性が、異常に高いレベルの I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I のレベル及び／又は活性よりも少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %

50

、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、又はマイ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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态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 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态は、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 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态は、I F P 3 5 及び／又は N M I の D N A 及び／又は R N A 中の少なくとも 1 0、1 5、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0、1, 0 0 0 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态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 I F P 3 5 及び／又は N M I の遺伝子の遺伝的状态を決定するための、I F P 3 5 及び／又は N M I の D N A 及び／又は R N A 中の少なくとも 1 0、1 5、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0、1, 0 0 0 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、又はマイ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、看護師、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、I F P 3 5 及び／又は N M I の調節因子を同定する方法

更に別の態様では、本開示は、I F P 3 5 及び／又は N M I の調節因子を同定する方法であって、a) I F P 3 5 及び／又は N M I を試験物質と接触させ、前記試験物質と接触した I F P 3 5 及び／又は N M I 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 I F P 3 5 及び／又は N M I の活性を評価することと、c) 工程 a) 及び b) で評価した I F P 3 5 及び／又は N M I の活性を比較し、工程 a) 及び b) で評価した I F P

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- κ B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

10

20

30

40

50

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ため、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。セレノーL-メチオニン起源の二量体NID-Hの結晶は、2.2 Å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、 $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\beta 5$ 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 $\alpha 1$ 、及び $\alpha 1$ と $\beta 2$ 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】

10

20

【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 (セテイク)	
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)	10
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)	20
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	30
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、N I D-Hの八量体構造を、分子置換 (MR) 法によって2.8 Åの分解能で決定した (図1 d、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、パレル様構造に折り畳まれている (図1 d)。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2 b)。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1 e)。これらの間の平均平方根偏差 (RMSD) は、僅か約0.7 Å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つのパ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3 3及び図3 4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のパ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。

10

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-1 β 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-1 β 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。

20

【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 α 1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-1 β 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。

30

【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(Δ N)を構築し、原核発現系を用いて発現させた。可溶性 Δ Nタンパク質が得られ、 Δ Nタンパク質は、NID-H八量体よりも有効にTNF- α 及びIL-1 β の転写を刺激した(図3c)。NID-Hの有効用量(約10 μ g/mL~約50 μ g/mL)と比べて、 Δ Nの有効用量は約1 μ g/mLであり、これは、HMGB-1又はMrpsと同等であった。更に、 Δ N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、1 μ g/mLの Δ N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

40

50

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。

10

【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、RAW 264.7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RAW 264.7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。

20

30

【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

40

50

ール群と比較して、L P Sを投与したマウスにおける血清 I F P 3 5 及び N M I は、6 時間以内に約 1 2 0 n g / m L まで用量依存的に急激に増加した（図 5 b 及び図 6 e）。更に、敗血症患者の血清を分析したところ、1 2 サンプルのうちの殆ど全てにおいて I F P 3 5 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 I F P 3 5 は、1 n g / m L ~ 1 0 n g / m L 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 5 c 及び図 6 f）。これら結果は、I F P 3 5 が感染中に血清に放出されることを証明した。

【0199】

H M G B - 1 とは異なり、I F P 3 5 ファミリーのメンバーは、L P S 刺激後最初の 1 時間以内に放出され得た。致死用量（L D ₁₀₀）の L P S に曝露する前に N I D - H に対する抗体（抗 N I D - 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 N I D - H 処理マウスのうちの 6 0 % 超が L P S 曝露後 7 日間生存した（図 5 d）。L P S の毒性効果は T N F - α 、I L - 1 β 、及び I L - 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、L P S 及び抗 I F P 3 5 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 N I D - H の投与は、T N F - α 、I L - 1 β 、及び I L - 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 2 0 % ~ 約 5 0 % 低減することができた（図 5 e）。C R I S P P R - C a s 9 技術を用いて I F P 3 5 及び N M I ノックアウトマウスを作製した。R a n e t a l . , N a t u r e P r o t o c o l s 8 , 2 2 8 1 - 2 3 0 8 (2 0 1 3) 。ガラクトサミン（D - g a l）と併用した細菌 L P S 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。V o g l e t a l . , N a t u r e M e d i c i n e 1 3 , 1 0 4 2 - 1 0 4 9 (2 0 0 7) ; 及び G a l a n o s e t a l . , P N A S 7 6 , 5 9 3 9 - 5 9 4 3 (1 9 7 9) 。L P S 及び D - g a l 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、I F P 3 5 - / - マウスは重篤度が低く、有意に長く生存した（図 5 f）。マウスに D - g a l なしに多量の L P S を注射したときも、I F P 3 5 - / - マウス及び N M I - / - マウスの L P S 誘導致死毒性に対する耐性が観察された。致死用量の L P S を投与したときに致死率が略 1 0 0 % である正常マウスと比べて、N M I ノックアウトマウスの致死率は改善される（図 6 g）。L P S 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 5 g 及び図 6 h）。したがって、これら結果は全て、I F P 3 5 が D A M P 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. I F P 3 5 は、T L R 4 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、H M G B - 1 及び M r p s は、T L R 4 シグナル経路によって N F - κ B の活性化を誘発することを通して免疫応答を誘導する。V o g l e t a l . , N a t u r e M e d i c i n e 1 3 , 1 0 4 2 - 1 0 4 9 (2 0 0 7) ; Y a n g e t a l . , P N A S 1 0 7 , 1 1 9 4 2 - 1 1 9 4 7 (2 0 1 0) ; 及び Y u e t a l . , S h o c k 2 6 , 1 7 4 - 1 7 9 (2 0 0 6) 。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、I F P 3 5 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。まず、ルシフェラーゼアッセイを用いて N I D - H による N F - κ B プロモータの活性化を検出した。N F - κ B プロモータに続いて T L R 4、C D 1 4、M D 2、及びルシフェラーゼ等を含むプラスミドで H E K 2 9 3 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 2 4 時間後、細胞を 1 0 μ g / m L の精製八量体 N I D - 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 N F - κ B 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、N F - κ B の活性化を表すために用いた。N I D - 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ため、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- κ B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- κ B及びAP-1は活性化するが、IRF3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- κ B/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。

10

【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- κ B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。

20

【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 $\beta 1-\alpha 1-\beta 2$ （「A部」と命名）及び $\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\beta 5$ （「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、 $\beta-\alpha-\beta-\beta$ 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、 $\beta-\alpha-\beta$ 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NID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）。

30

【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 α -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 α -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、 $\beta-\alpha-\beta-\beta-LL-\beta-\alpha-\beta$ 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

40

50

能性がある。I F P 3 5 と相同なタンパク質である N M I の構造及び機能機序も I F P 3 5 の構造から推測することができた（図 9）。

【0204】

2. I F P 3 5 と T L R 4 との間の認識

I F P 3 5 と T L R 4 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、T L R 4、T L R 4 / M D 2、及び T L R 4 / M D 2 / C D 1 4 複合体によって I F P 3 5 をプルダウンした。バイトを 6 * H i s と融合させ、N i - N T A ビーズに固定化した。処理したビーズを用いて、精製 N I D - H 八量体、Δ N、及び R A W 細胞培養物中に放出された I F P 3 5 を含む完全長又はランケート型の I F P 3 5 タンパク質をプルダウンした。結果は、放出された I F P 3 5 のみが、C D 1 4 の存在下で T L R 4 / M D 2 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、T L R 4、M D 2、及び C D 1 4 は、I F P 3 5 の認識中に協働し得る。

10

【0205】

3. I F P 3 5 ファミリーのメンバーと公知の D A M P との相違点

I F P 3 5 ファミリーのメンバーは、公知の後期 D A M P と同様に、T L R 4 経路を通して N F - κ B 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 D A M P として、I F P 3 5 及び N M I は、H M G B - 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、I F P 3 5 ファミリーのメンバーは、T N F - α、I L - 1 β 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、N I D - 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、L P S 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、H M G B - 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。

20

【0206】

一方では、I F P 3 5 は、疎水性 L - z i p 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 N I D 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 I F P 3 5 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 I F P 3 5 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 N I D - 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、N I D - 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。N I D - H のモノクローナル抗体は、I F P 3 5 を中和し、敗血症マウスに保護を与えた。更に、可溶性 Δ N 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。

30

【0207】

これらデータは、I F P 3 5 ファミリーのメンバーが早期 D A M P 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、T L R 4 シグナル経路を介して免疫応答を増強する。N I D - H の構造によって、これら新規 D A M P 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。

40

【0208】

方法

プラスミドの構築。T H P 1 細胞及び R A W 2 6 4 . 7 細胞（アクセッション番号：N P _ 0 0 5 5 2 4 . 2 及び N P _ 0 0 1 1 3 5 4 2 1 . 1）から逆転写した c D N A からヒト I F P 3 5 及びマウス N M I の c D N A を増幅させた。プライマーの設計、P C R 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 I F P 3 5 タンパク質のアミノ酸 1 2 4 ~ 2 4 0 及び 3 5 ~ 2 8 9 に対応する D N A 配列（N I D - H 及び Δ N）を、N 末端の G S T タグと共に B a m H I 部位及び X h o I 部位を用いて p G E X - 6 p

50

ー1ベクター (Invitrogen) に挿入した。また、マウスNMITタンパク質のDNA配列を、BamHI部位及びXhoI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シーケ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、OD₆₀₀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イソプロピルー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 Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄、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タグをプレジ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ーチオー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Superdex 200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】

10

20

30

40

50

S D S - P A G E 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 L P S 含量は、L i m u l l u s 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 < 10 p g / m g (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 S e - M e t I F P 35 断片はいずれも S u p e r d e x 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 I F P 35 (残基124~220) は、16℃で14日間、6 m g / m L タンパク質 1 μ L 及びウェル溶液 (0.2 M (NH₄)₂SO₄、0.1 M B i s - T r i s - H C l、20 % [w/v] P E G 3350、pH 5.4) 1 μ L 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。S e - M e t I F P 35 (残基124~220) の結晶は、16℃で50日間、10 m g / m L タンパク質 1 μ L 及びウェル溶液 (0.2 M (NH₄)₂SO₄、0.1 M B i s - T r i s - H C l、22 % [w/v] P E G 3350、0.1 M 酒石酸カリウムナトリウム、pH 5.5) 1 μ L 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。S e - M e t 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 S e - M e t タンパク質のX線回折データは、それぞれ、0.9798 Å 及び 0.9792 Å の波長で上海放射光施設 (S S R F) においてビームライン B L 17 U で収集した。収集したデータを積分し、H K L - 2000 (O t w i n o w s k i, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 276, 307-326 (1997)) を用いてスケールし、C C P 4 スイートの S H E L X D (S c h n e i d e r e t a l., A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a, S e c t i o n D, B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 58, 1772-1779 (2002); 及び W i n n e t a l., A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a, S e c t i o n D, B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 67, 235-242 (2011)) を用いて S e - M e t タンパク質におけるセレン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 I F P 35 の構造 (残基124~220) を P h e n i x スイートの S A D を用いて決定した。A d a m s e t a l., A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a, S e c t i o n D, B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 66, 213-221 (2010)。A u t o S o l を用いて初期位相を得た。モデルにおける欠損領域を A u t o B u i l d 又は C o o t を用いて再構築した。E m s l e y e t a l., A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a, S e c t i o n D, B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 66, 486-501 (2010)。前記モデルを、R 値が収束するまで繰り返し p h e n i x . r e f i n e で更に精密化した。マシュー係数値が 2.39 Å³ D a⁻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。M a t t h e w s, J M o l B i o l 33, 491-497 (1968)。

【0216】

P h a s e r - M R (A d a m s e t a l., A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a, S e c t i o n D, B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 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 C o o t (E m s l e y e t a l., A c t a C r y s t a l l o g r a p h i c a, S e c t i o n D, B i o l o g i c a l C r y s t a l l o g r a p h y 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。計算したマッシュ係数及び溶媒含量は、 $2.61 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ 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HMGBl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。IFN γ 、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、一晚増殖させた。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RNA1 μ g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、TACTTGGCAGGTTTCTCCAG；

【0221】

mTNF α ：センス、CCAGTGTTGGGAAGCTGTCTT；アンチセンス、AGCAAAAGAGGAGGCAACA；

【0222】

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

10

20

30

40

50

センス、T G G G G A A C T C T G C A G A C T C A A A C T。

【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100 ng/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(20 mM Tris、pH 7.4、150 mM NaCl、5 mM 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(12,000 g×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、20,000 g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500 µLを添加し、20,000 g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。

10

【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。

20

【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1 kg当たり50 µg)及びD-gal(体重1 kg当たり1.0 g)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1 kg当たり50 mg)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1 kg当たり50 mg)を注射する4時間前にB6/C57マウスにIFP35 mAb及びIgG1(10 µg/マウス)を腹腔内注射した。LPS注射の2時間後に追加用量(10 µg/マウス)を投与した。24時間毎に4回、遅延用量(10 µg/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。

30

【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。

40

【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、CellQuestソフトウェアを用いてデータを解析した。

50

【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を含む）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、Cell Quest Pro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（IFN $\alpha/\beta/\gamma$ ）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IFN γ 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31.8 kDa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アミノ酸を含む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300 kDa～400 kDa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、IFN γ で刺激した後にスペckル様凝集体を形成することができ、これは、NMI/IFP35スペckル（NIS）と呼ばれる。IFN γ 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】

N M I は、I F N によって誘導される J A K - S T A T 経路に参与し得る。N M I は、S t a t 2 を除く全ての S T A T と相互作用し、相互活性化因子 C B P / p 3 0 0 の会合を増強して、下流の遺伝子の S T A T 媒介転写レベルを増強する。

【0238】

悪性乳癌細胞株における N M I の m R N A レベルは、正常乳房細胞と比べて 2 5 倍～4 5 倍減少し、N M I 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、N M I は、乳癌感受性タンパク質 B R C A 1 (1 型乳癌感受性タンパク質) 及び c - M y c 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、h T E R T) 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。F l a g - N m i 及び H A - B R C A 1 を細胞にコトランスフェクトしたとき、h T E R T プロモータ活性は約 7 5 % 減少した。更に、W n t / β -カテニン経路においてタンパク質 D k k 1 (D i c k k o p f - 1) が検出されたとき、データは、N M I の過剰発現が D k k 1 のアップレギュレートを介して W n t / 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】

N M I は、T G F / S M A D β 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 S M A D 7 をアップレギュレートして、T G F / S M A D β シグナル伝達経路を阻害し、乳癌細胞の病原性及び可動性を低減することができる。I F P 3 5 及び N M I は、炎症シグナルに関連している。

【0240】

図 1 0 は、I F P 3 5 タンパク質の精製プロセスを示す。(A) I F P 3 5 - N I D の S D S - P A G E 分析。左のレーン：分子マーカー。レーン 1：アフィニティークロマトグラフィー精製後の G S T タグ付 I F P 3 5 - N I D。レーン 2：P P a s e による切断後のタンパク質の混合物。レーン 3：G S T レジンカラムから溶出した I F P 3 5 - N I D。レーン 4：サイズ排除クロマトグラフィー後に精製した I F P 3 5 - N I D。(B) サイズ排除クロマトグラフィー分析 (s u p e r d e x - 2 0 0 (1 6 / 6 0))。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 1 1 は、様々なオリゴマー状態の I F P 3 5 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 S D S - P A G E 分析。レーン 1：G S T タグ付 I F P 3 5。レーン 2：G S T カラムから溶出した I F P 3 5。レーン 3：P P a s e による切断後の I F P 3 5。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 s u p e r d e x - 2 0 0 から溶出したタンパク質 (ピークの溶出体積は 7 2 m L ~ 7 4 m L であった)。レーン 7：サイズ排除クロマトグラフィー s u p e r d e x - 2 0 0 から溶出したタンパク質 (ピークの溶出体積は 9 0 m L ~ 9 2 m L であった)。

【0242】

図 1 2 は、I F P 3 5 - N I D の結晶を示す。(A) ネイティブな八量体結晶。0. 2 M 硫酸アンモニウム、0. 1 M B i s - t r i s、2 5 % [w / v] P E G 3 3 5 0、p H 5. 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 1 μ L 及びリザーバ溶液 1 μ L で構成されていた。温度 2 8 9 K で 1 4 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 I F P 3 5 - N I D (残基 1 2 4 ~ 2 2 0) は、1 6 $^{\circ}$ C で 1 日間 ~ 1 4 日間、タンパク質 1 μ L 及びウェル溶液 (0. 2 M (N H ₄) ₂ S O ₄、0. 1 M B i s - T r i s - H C l、2 0 % [w / v] P E G 3 3 5 0、p H 5. 4) 1 μ L を含有し、添加剤として 3 0 % [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) S e - M e t I F P 3 5 - N I D (残基 1 2 4 ~ 2 2 0) の結晶は、1 6 $^{\circ}$ C で 7 日間、タン

パク質 1 μ L 及びウェル溶液 (0.2 M (NH₄)₂SO₄、0.1 M Bis-Tris-HCl、22% [w/v] PEG 3350、pH 5.4) 1 μ L 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 = 100 μ m。(D) Se-Met IFP35 (残基 124 ~ 220) の結晶は、16 °C で 30 日間、タンパク質 1 μ L 及びウェル溶液 (0.2 M (NH₄)₂SO₄、0.1 M Bis-Tris-HCl、22% [w/v] PEG 3350、pH 5.5) 1 μ L 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 = 200 μ m。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。

10

【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 H1 α -ヘリックスとそれに近接する二量体の H1 α -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。

20

【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。

30

【0247】

図 17 は、組み換え NM I の精製を示す。(A) マウス NM I-NID 断片の SDS-PAGE。(B) NM I-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 NM I の SDS-PAGE。(D) N 末端に 6 * His タグの付いた完全長マウス NM I 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。

40

【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

50

膜炎モデルにおいて、生菌 S R - 1 1 を前記モデルに注射したとき、I F P 3 5 が培地に放出された。(B) L P S 及び A T P によってインフラマソームが刺激された場合、I F P 3 5 が媒体に放出される。

【0252】

図 2 2 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 I F P 3 5 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 2 3 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 I F P 3 5 - n i d が多量の好中性顆粒球を動員できることを示す。

【0254】

図 2 4 は、外因性八量体 I F P 3 5 - N I D が、マクロファージにおいて N F - κ B 経路を刺激できることを示す。

【0255】

図 2 5 は、I F P 3 5 が m y d 8 8 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 2 6 は、I F P 3 5 によって誘導したとき、W T マウス、T L R 9 - / - マウス、及び T L R 4 - / - マウスにおける I L - 1 β 及び T N F のレベルを示す。

【0257】

図 2 7 A は、敗血症マウスの血清中の I F P 3 5 の量を示す。図 2 7 B は、I F P 3 5 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 2 8 は、マウスにおいて、I F P 3 5 をブロックすることによって、L P S によって誘導される I L - 6 の放出が減少したことを示す。

【0259】

図 2 9 は、サルモネラ菌によって刺激した T h p 1 細胞の細胞溶解物及び上清中の N M I の量を示す。

【0260】

図 3 0 は、マウス起源の N M I タンパク質が T h p 1 細胞における T H F α 及び I L - 1 β 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 3 1 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 N M I の S D S - P A G E 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 N M I 溶出プロファイルが存在しているので、結果は、N M I 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 3 2 は、ヒト I F P 3 5 の二次構造予測を示す (P S I P r e d (h t t p : / / b i o i n f . c s . u c l . a c . u k / p s i p r e d /) によって実施)。

【0263】

以下のプロトコ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。以下のプロトコルにおける I F P 3 5 - N I D 1 及び I F P 3 5 - N I D 2 の結果は、有意な差を有しない。

【0264】

I F P 3 5 及び N M I の発現、精製、及び結晶化。

【0265】

1. プラスミドの構築

ヒト I F P 3 5 及びマウス N M I の c D N A を、T H P 1 細胞及び R A W 2 6 4 . 7 細胞 (アクセッション番号: N P _ 0 0 5 5 2 4 . 2 及び N P _ 0 0 1 1 3 5 4 2 1 . 1) から逆転写した D N A から増幅させた。I F P 3 5 の配列は、D N A シークエンシングに

10

20

30

40

50

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-6p1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シーケンシングは、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。細胞を破碎するために用いる高圧ホモジナイゼーション細胞破碎機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 Superdex 200 prep grad及びSuperdex 200 10/300 GL, 24mL)、タンパク質精製システム (AKTA purifier) 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 Source X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BamHI部位及びXhoI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シーケ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、プレジ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BamHI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 (100 µg/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シーケ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シーケンシングによって、プラスミド1は、BamHI部位及びXhoI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、BamHI部位及びXhoI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、BamHI部位及びXhoI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' GGTA GATCTATGTCAGCCCCACTGGATG3

10

20

30

40

50

下流プライマー：5' GGT GAATTCCTAGCCTGACTCAGAGGTGA
AGACT3'

I F P 3 5-N I D 1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' GGTGAATTCCTTACTCCCCGTTTCACATACGGA
GAGAC3'

I F P 3 5-N I D 2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' GGTGAATTCAGGGTGTTGGTCACTGGATT
TCCT3'

下流プライマー：5' GGTGAATTCCTTACTCCCCGTTTCACATACGGA
GAGAC3'

【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 Na₂HPO₄、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) アフィニティー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 P P a s e 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 (H i T r a p Q H P _ 5 m L、G E H e a l t h c a r e c o m p a n y) に注入し、これを F P L C 精製装置 (G E H e a l t h c a r e) に固定し、注入前に 20 m M T r i s - H C l (P H 8. 0)、50 m M N a C l でバランスをとった。流速 1 m L / 分及び溶出体積 100 m L で勾配溶出を実施するために溶出バッファ (20 m M T r i s - H C l (P H 8. 0)、1 M N a C l) を用いて、280 nm 及び 260 nm 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

150 m M N a C l、20 m M T r i s - H C l、5 % g l y、p H 8. 0 で平衡化した H i L o a d 16 / 60 S u p e r d e x 200 (G E H e a l t h c a r e) 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 F P L C 精製装置 (G E H e a l t h c a r e) に固定し、流速 1 m L / 分で 120 分間溶出した。完全長ヒト I F P 35 タンパク質及び I F P 35 - N I D を、それぞれ、約 45 m L 及び 90 m L ~ 92 m L の溶出体積で回収した。最後に、精製 I F P 35 (溶出体積 45 m L)、I F P 35 N I D 1 (溶出体積 90 m L ~ 92 m L)、及び I F P 35 N I D 2 (溶出体積 90 m L ~ 92 m L) を得た。

【0285】

I F P 35 N I D 1 及び I F P 35 N I D 2 のサイズ排除クロマトグラフィーを図 10 に示す。I F P 35 N I D 1 サンプル及び I F P 35 N I D 2 サンプルの溶出体積は 90 m L ~ 92 m L であり、これは分子量 17 K D ~ 43 K D に相当する。遠心分離分析及び結晶構造の結果は、I F P 35 N I D 1 及び I F P 35 N I D 2 が二量体であることを示した。

【0286】

I F P 35 N I D 1 及び I F P 35 N I D 2 の精製中、溶出体積 72 m L 及び 90 m L ~ 92 m L 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)。P P a s e 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 72 m L、他方は、体積 90 m L ~ 92 m L) が観察された。体積 72 m L におけるピークは、分子量 70 k d ~ 100 k d に対応し、体積 90 m L ~ 92 m L のピークは、二量体に対応する。I F P 35 N I D 1 及び I F P 35 N I D 2 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】

I F P 35 N I D 1 及び I F P 35 N I D 2 の S D S - P A G E 分析は、有意な差を有していなかった。

【0288】

4) S e - M e t I F P 35 - N I D 精製

S e - M e t I F P 35 - N I D の精製は、ネイティブ I F P 35 - N I D と同様であった。相違点は、大腸菌 B 834 (D E 3) 発現株 (セレノメチオニン誘導体 (S e - M e t) 発現用) 及び S e - M e t を添加した M 9 培地を適用したことである。M 9 培地で b 834 によって発現されたタンパク質のメチオニンを S e - M e t 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 S e - M e t の I F P 35 - n i d 1 及び I F P 35 - n i d 2 断片は、いずれも S u p e r d e x 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 (H a m p t o n R e s e a r c h) 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

10

20

30

40

50

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Å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-216Ty r)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）。

10

【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）。

20

【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。

30

【0299】

Se-Metタンパク質のX線回折データは、0.979 Å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10度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、2.3 Åであり、空間群はH3であった。Se-Metタンパク質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。

40

【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2.5 Å 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

50

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N I Dドメインの第2の半分及び第2のN I Dドメインの第1の半分（残基124～220又は134～216、それぞれI F P 35-N I D1及びI F P 35-N I D2と命名、類似の精製結果を有することからI F P 35-N I D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G S Tに融合しているとき、大量の高純度可溶性I F P 35-N I Dを得ることができる。G S T融合タンパク質は、G S T-I F P 35-N I Dと称する。

【0302】

精製中、I F P 35-N I D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】

N M Iの発現及び精製

N M Iのc D N A配列をテンプレートとし、P C R増幅用のプライマー対を用いて、それぞれ、完全長ヒトN M I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N M I-N I D（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N M I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N M I-N I D（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B a m H I及びX h o I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p G E X-6 p-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G S T-ヒト-N M I、G S T-ヒト-N M I-N I D、G S T-マウス-N M I、及びG S T-マウス-N M I-N I D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N M Iを増幅するためのプライマー：

上流プライマー：5' G G T G G A T C C A T G G A A G C T G A T A A A G A T G A C 3'

下流プライマー：5' G G T C T C G A G C T A T T C T T C A A A G T A T G C T A T G T G 3'

【0305】

ヒトN M I（155～240）を増幅するためのプライマー：

上流プライマー：5' G G T G G A T C C T C T A A A A T G A A A A T C A A T G T T A C 3'

下流プライマー：5' G G T C T C G A G T T A T T C T G T G T A T G G A G A A A C A G 3'

【0306】

完全長マウスN M Iを増幅するためのプライマー：

上流プライマー：5' C G C G G A T C C A T G G A T G C T G A T A A A G A C A A C 3'

下流プライマー：5' C C G C T C G A G T C A T A T G G T T T C T C T G G C C T C 3'

【0307】

マウスN M I（151～250）を増幅するためのプライマー：

上流プライマー：5' C G C G G A T C C G T T C A T G T G G A C A T T T C T A A A A T G 3'

下流プライマー：5' C C G C T C G A G T C A A A A C A C C T G G T A C T T T T C T A A G 3'

【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N M Iを発現させた。用いた試薬及び発現方法は、基本的にI F P 35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分離するために、GSTレジンに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。

10

【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 Superdex 200 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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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こし、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、骨髓腔を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%ペニシリンー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細胞を胰臓酵素で分解し、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

10

20

30

40

50

、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(Roc he)。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、ウェ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 I F P 3 5 が放出され得た。一方、共生大腸菌 (E. coli Stable 3) 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、I F P 3 5 も検出できなかった。この結果は、I F P 3 5 が炎症応答と関連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 P B S 8 m L で洗浄し、腹水洗浄バッファ 4 m L で抽出する。トリクロロ酢酸 (T C A) 沈殿し、ウエスタンブロットによって I F P 3 5 を検出する。(1) C 5 7 / B 6 マウス、雄、8 週齢～10 週齢、体重約 20 g、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 P B S 8 m L で洗浄し、腹水洗浄バッファ 4 m L で抽出する。(4) 4℃で 10 分間、200 g で遠心分離し、細胞培養物を回収し、トリクロロ酢酸 (T C A) 沈殿する。(5) ウエスタンブロットによって I F P 3 5 を検出する。

【0331】

図 21 B に示す通り、L P S、A T P がインフラマソームを活性化したとき、I F P 3 5 が放出され得た。実験方法：(1) R a w 2 6 4. 7 細胞を L P S ($1 \mu g / m L$) で 4 時間刺激し；(2) A T P (5 m M) で 10 分間、30 分間、60 分間、細胞を連続刺激し；(3) 4℃で 10 分間、200 g で遠心分離し、細胞培養物を回収し、トリクロロ酢酸 (T C A) 沈殿し；(4) ウエスタンブロットによって I F P 3 5 を検出する。

【0332】

炎症応答における I F P 3 5

1. I F P 3 5 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 I F P 3 5 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 $5 \mu g / m L$ 、 $25 \mu g / m L$ 、 $50 \mu g / m L$ ）に添加し、4 時間刺激し、Q-PCR 及び内部標準としての G A P D H を用いて公知の炎症促進因子 T N F- α 及び I L-1 β を検出する。

【0333】

Q-PCR 増幅プライマー：

I L-1 β ：

センス：5' A A G G A G A A C C A A G C A A C G A C A A A A 3'

アンチセンス：5' T G G G G A A C T C T G C A G A C T C A A A C T 3'

T N F- α ：

センス：5' C C A G T G T G G G A A G C T G T C T T 3'

アンチセンス：5' A A G C A A A A G A G G A G G C A A C A 3'

G A P D H：

センス：5' A G G T C G G T G T G A A C G G A T T T G 3'

アンチセンス：5' T G T A G A C C A T G T A G T T G A G G T C A 3'

【0334】

図 22 に示す通り、公知の炎症促進因子 T N F- α 、I L-1 β 、i N O S、及び C D 8 6 は、BMDM 細胞において N I D-H 八量体の存在下でアップレギュレートされ得るが、N I D-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 I F P 3 5-N I D が異なる効果を有していることを証明した。

【0335】

I F P 3 5-N I D 1 及び I F P 3 5-N I D 2 は、同じ方法を用い、その結果は、有意な差を有しない。

【0336】

2. I F P 3 5 は、過剰な免疫応答につながる

I F P 3 5-N I D 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、I F P 3 5-N I D 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、I F P 3 5 - N I D 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. I F P 3 5 は、マクロファージにおけるNF- κ B経路を活性化する

I F P 3 5 - N I D 八量体によるNF- κ Bの活性化が観察された。NF- κ B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：I F P 3 5 - N I D の二量体及び八量体の内毒素を含まないタンパク質をR a w 2 6 4 . 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R I P A (プロテアーゼ阻害剤カクテル、R o c h e) 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。ウェスタンブロットを用いて、NF- κ Bシグナル伝達経路における抑制因子I k B α のリン酸化を検出した。ホスホI k B α 及びI k B α 抗体は、C S T 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、I F P 3 5 - N I D 組み換えタンパク質の八量体の発現によって、I k B α のリン酸化が増加したが、全I k B α タンパク質レベルは低下した。I F P 3 5 - N I D 組み換えタンパク質の八量体は、NF- κ B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- κ B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】

I F P 3 5 の細胞表面受容体

I F P 3 5 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、I F P 3 5 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T L R - M y d 8 8 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、骨髓腔を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PBS 10mLを添加する。BMDM細胞を、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン-ストربت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】

I F P 3 5 又はN M I の刺激：I F P 3 5 - N I D の二量体、八量体、又はN M I (5 μ g/mL、25 μ g/mL、又は50 μ g/mL) を添加して、4時間BMDM細胞を刺激し、I L - 1 β 及びT N F - α をQ-PCRによって検出した。

【0341】

細胞の全RNAの抽出：K a n g W e i C o m p a n y (カタログ番号C W 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。T r i z o l 試薬 (I n v i t r o g e n) を用いてR A W 2 6 4 . 7 細胞から全RNAを抽出した。

【0342】

逆転写：P r i m e S c r i p t (商標) I I 1 s t S t r a n d c D N A S y n t h e s i s K i t (カタログ番号6210A) を用いて全RNA 1 μ g からcDNAの第1の鎖を合成した。S Y B R (登録商標) P r e m i x E x T a q (商標) (T l i R N a s e H P l u s) 及びR O X p l u s Q - P C R キット (カタログ番号R R 4 2 L R) を用いてリアルタイムRT-PCRを実施した。図25に示す通り、I F P 3 5 - N I D タンパク質を用いてM y d 8 8 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N I D-Hの活性が急激に低下し、I F P 3 5-N I DによってI L-1 β (図2 5 A) 及びT N F- α (図2 5 B) を誘導することができなかった。I F P 3 5は、細胞表面におけるT L R受容体に結合して、M y d 8 8依存性経路を通じてN F- κ Bを活性化し、炎症因子を産生させる傾向がある。

【0 3 4 3】

T L R-4及びT L R-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2 6に示す通り、T L R 4は、I F P 3 5-N I Dを通じてI L-1 β (図2 6 A) 及びT N F- α (図2 6 B) の増加を媒介する。N I D-H八量体が野生型マウス、T L R 9-/-マウス、及びT L R 4-/-マウスのBMDM細胞においてT N F- α 及びI L-1 β をアップレギュレートすることができたのに対して、I F P 3 5ファミリーのタンパク質は、直接又は間接的に、T L R 4によって同定することもできる。

10

【0 3 4 4】

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I F P 3 5モノクローナル抗体

I F P 3 5-N I D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、I F P 3 5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、I F P 3 5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。

【0 3 4 5】

20

1. 敗血症マウスにおけるI F P 3 5の発現

L P D誘導性ショックモデルの樹立：(1) B 6 / C 5 7マウスを一晩絶食させ；(2) 次の日の朝、L P S (体重1 k g当たり5 m g及び1 0 m g) 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。

【0 3 4 6】

E L I S Aを用いた、L P S誘導性ショックモデルにおけるI F P 3 5の濃度検出。(1) 抗体のコーティング：I F P 3 5 1 D 7の精製モノクローナル抗体をP B Sで2 m g / m Lに希釈し、1 0 0 m L / 穴を酵素標識プレートに入れる、4 $^{\circ}$ Cで一晩；(2) 洗浄：P B S T (0. 0 5 % T w e e n - 2 0) で3回洗浄する；(3) ブロッキング：振動テーブル上に2 % B S Aを含有するP B S T (0. 0 5 % T w e e n - 2 0) 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1 0 0 μ L / 穴を添加する、4 $^{\circ}$ Cで一晩；(5) 洗浄：P B S T (0. 0 5 % T w e e n - 2 0) で3回洗浄し、d d H ₂ Oで2回洗浄する；(6) 発色：各ウェルにT M B 1 0 0 μ Lを添加し、光を避け、振動テーブルに1 0 分間～2 0 分間置く。(7) 反応の停止：2 M H ₂ S O ₄ 5 0 μ Lを各ウェルに添加する；(8) 酵素標識プレート、4 5 0 n mでO Dをスキャンする。

30

【0 3 4 7】

敗血症マウスモデルの血液中におけるI F P 3 5濃度の定量的検出は、L P S誘導性敗血症マウスの血液で高濃度のI F P 3 5を示し、これは、ナノグラムレベル(約8 n g) に達する。しかし、H M G B 1のレベルは、先行論文によればp g 6 0 0 ~ 8 0 0である。そして、それは、L P S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5 m g及び1 0 ミリグラムのL P S用量)。

40

【0 3 4 8】

2. I F P 3 5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

I F P 3 5モノクローナル抗体1 D 7をマウスに注射した。図2 7に示す通り、I F P 3 5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、I F P 3 5モノクローナル抗体1 D 7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。1 D 7で処理したマウス(n = 1 0) の中央致死時間は、1 0 7時間であったが、一方、コントロールは5 0時間であった。

【0 3 4 9】

50

3. I F P 3 5 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 I L - 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：I L - 6 E L I S A キットは、B D B i o s c i e n c e s 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、I F P 3 5 抗体（1 D 7）を注射することによってマウスの体液中で I L - 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】

I F P 3 5 及び抗腫瘍治療

幾つかの腫瘍では、N M I のタンパク質レベルが低下する。I F P 3 5 及び N M I 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 I F P 3 5 又は N M I 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、I F P 3 5 又は N M I のタンパク質は、有望な抗癌薬であり得る。

【0352】

実施例4 N M I 免疫機能分析

N M I は、過剰な免疫応答を引き起こす

完全長 N M I 及び N M I - N I D 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 0.2 m g 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 N M I - N I D 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、N I D - H 八量体は、免疫応答を刺激し得る。

【0354】

インビボにおける N M I の免疫学的機能研究

1. 細胞が細菌に感染したとき、N M I が細胞外空間に分泌される

N M I と I F P 3 5 とは相同なタンパク質である。I F P 3 5 及び N M I は、高分子質量複合体（H M M C）を構築し得る。この実施例では、N M I を検出した。

【0355】

B M D M 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、骨髓腔を P B S で洗い流す。次いで、400 g 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、P B S 10 m L を添加して前記細胞溶解バッファを中和する。B M D M 細胞を、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリンーストレプトマイシン、1%L-グルタミン、及び20 n g / m L の M C S F 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】

R A W 2 6 4. 7 マクロファージ（A T C C 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. T H P 1 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 N M I のタンパク質レベルの検出

実験方法：15 m L チューブに T H P 1 細胞を回収し、500 g で5分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を予熱 P B S で洗浄し、500 g で5分間遠心分離し、上清を除去する。D M E M に細胞を懸濁させ、血球計数器で細胞をカウントする。3 × 10⁵ 細胞を全

10

20

30

40

50

ての穴に添加する。細胞培養皿に予熱DMEM 1 mLを添加する。サルモネラ菌SR-11を12,000 RPM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1,500 RPM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、100 µg/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、10 µg/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。

10

【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、12,000 g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、12,000 g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30 µL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15 mLチューブに回収し、500 g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、500 g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、PMSEを最終濃度1 mMの溶解バッファ、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Rocke)に添加する。RIPA溶解バッファ150 µL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12,000 RPM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150 µL中95℃で5分間加熱した。

20

【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。

30

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5 µg/mL、25 µg/mL、50 µg/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。

40

【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RNA 1 µgからc

50

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（5 µg/mL、25 µg/mL、又は50 µg/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。

10

【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10 mLを、Millipore濃縮チューブを用いて2 mL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78 mLに存在することを示し、対応する分子量は70 kDa~140 kDaである。

20

【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、骨髓腔をPBSで洗い流す。次いで、400 g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PBS 10 mL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20 ng/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。

30

【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RNA 1 µg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。

40

【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

50

様に、敗血症、ウイルス感染誘導性NM I 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NM I の発現

L P D 誘導性ショックモデルの樹立：（１）B 6 / C 5 7 マウスを一晩絶食させ；（２）次の日の朝、L P S （体重1 k g 当たり5 m g 及び1 0 m g ）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】

E L I S A を用いた、L P S 誘導性ショックモデルにおけるNM I の濃度検出。敗血症マウスモデルの血液中NM I 濃度の定量的検出は、L P S 誘導性敗血症マウスの血液で高濃度のNM I を示し、ナノグラムレベルに達することを示す。しかし、H M G B 1 のレベルは、先行論文によればp g 6 0 0 ~ 8 0 0 である。そして、それは、L P S 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5 m g 及び1 0 ミリグラムのL P S 用量）。NM I 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。

10

【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1 0 0 m g でマウスの腹腔内に注射した。マウスの腹腔内におけるI F P 3 5 及びNM I 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。

20

【0376】

癌治療におけるNM I

本開示のI F P 及びNM I に基づいて、異常に高いレベルのI F P 3 5 及び／又はNM I 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）I F P 3 5 及びNM I の放出を阻害する小化合物又はペプチド；（２）I F P 3 5 及びNM I の産生及び機能を抑制するI F P 3 5 及び／又はNM I に対する抗体；（３）インビボにおけるI F P 3 5 又はNM I 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I F P 3 5 の産生を低減する剤；（５）I F P 3 5 及びNM I とその細胞表面受容体との間の相互作用を阻害してI F P 3 5 及び／又はNM I の機能を抑制する剤；（６）I F P 3 5 及びNM I 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、I F P 3 5 又はNM I 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。

30

【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）I F P 3 5 若しくはNM I 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）I F P 3 5 若しくはNM I 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、E L I S A 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I F P 3 5 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I F P 3 5 がポリマーを形成しなくてもよい。マウスでは、I F P 3 5 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、I F P 3 5 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、I F P 3 5 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、I F P 3 5 モノクローナル抗体又はI F P 3 5 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。NM I の構造及び機能はI F P 3 5 と非常に類

40

50

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。

10

【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P13は、FWR4の最後で終わる下流プライマーである。

20

【0379】

これらプライマーの配列を以下に示す：

P1 GACATTGTGATGWCACAGTCTCC
P2 GATRITTKTGATGACYCARRCTCC
P3 GACATTGTGCTGACCCCAATCTCC
P4 GACATTGTGCTGACACAGTCTCC
P5 SAAAWTGTKCTCACCCAGTCTCC
P6 GAYATYMGATGACMCAGWC
P7 GAYATTGTGATGACMCAGWCT
P8 (VL-R) TTTBAKYTCCAGCTTGGTSCC
P9 AGGTGCAGCTKMGAGGAGTCAAG
P10 AGGTYCAGCTKCARSA RTCT
P11 AGGTCCARCTGCAGCAGYCT
P12 AGGTGMAGCTKGWGGARTCTGG
P13 (VH-R) TGGTCGACGCTGAGGAGACGGT

30

【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。

40

【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】

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA
CTCCAGGGGAGAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTC

50

A A G T G T A A G T T A C A T G C A C T G G T A C C A G C A G A A G T C A G G C
A C C T C C C C C A A A A G A T G G A T T T A T G A C A C A T C C A A A C T G G
C T T C T G G A G T C C C T G C T C G C T T C A G T G G C A G T G G G T C T G G
G A C C T C T T A C T C T C T C A C A A T C A G C A G C A T G G A G G C T G A A
G A T G C T G C C A C T T A T T A C T G C C A G C A G T G G A G T A G T A A C C
C A C C C A T C A C G T T C G G T G C T G G C A C C A A G C T G G A A A T C A A
A (配列番号 1 2)

【0383】

【表 3】

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

10

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	AGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGA	135			
Sbjct 91	AGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGA	150			
Query 136	TGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGG	195			
Sbjct 151	TGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGG	210			
Query 196	TCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTAT	255			
Sbjct 211	TCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTAT	270			
Query 256	TACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCATCAGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGA	314			
Sbjct 271	TACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCATCAGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGA	329			

20

【0384】

T G G T C G A C G C T G A G G A G A C G G T G A C T G A G G T T C C T T G A C C
C C A G T A G T C C A T A G C C C A A G A G T A C C C G T A T C T T G C A C A G
A A A T A T G T A G C C G T G T C C T C A T T C T T G A G G T T G T T G A T C T
G C A A A T A G G C A G T G C T G G C A G A G G T T T C C A A A G A G A A G G C
A A A C C G T C C C T T G A A G T C A T C A G C A A A T G T T G G C T C T C C A
G T G T A G G T G T T T A T C C A G C C C A T C C A C T T T A A A C C C T T T C
C T G G A G C C T G C T T C A C C C A G T T C A T T C C A T A G T T T G T G A A
G G T A T A C C C A G A A G C C T T G C A G G A G A T C T T G A C T G T C T C T
C C T G A C T C C T T A A G C T G C A C C T (配列番号 1 1)

30

【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	CTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTTCCTTGACCCAGTAGTCCATAGCCC-AAGAGTACCG	68			
Sbjct 331	CTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTTCCTTGACCCAGTAGTCCATAGCCCTCACGG-A---G	276			
Query 69	TATCTTGACAGAAATATGTAGCCGTGTCCTCATTCCTTGAGGTTGTTGATCTGCAAATAG	128			
Sbjct 275	TTTCTTGACAGAAATATGTAGCCGTGTCCTCATTTTGTAGGTTGTTGATCTGCAAATAG	216			
Query 129	GCAGTGCTGGCAGAGGTTTCCAAAGAGAAGGCAAACCGTCCCTTGAAGTCATCAGCAAAT	188			
Sbjct 215	GCAGTGCTGGCAGAGGTTTCCAAAGAGAAGGCAAACCGTCCCTTGAAGTCATCAGCATAT	156			
Query 189	GTTGGCTCTCCAGTGAGGTGTTTATCCAGCCCATCCACTTTAAACCCCTTTCCTGGAGCC	248			
Sbjct 155	GTTGGCTCTCCAGTGAGGTGTTTATCCAGCCCATCCACTTTAAACCCCTTTCCTGGAGCC	96			
Query 249	TGCTTCACCCAGTTTCATTCATAGTTTGTGAAGGTATACCCAGAAGCCTTGCAGGAGATC	308			
Sbjct 95	TGCTTCACCCAGTTTCATTCATAGTTTGTGAAGGTATACCCAGAAGCCTTGCAGGAGATC	36			
Query 309	TTGACTGTCTCTCCTGACTCCTTAAGCT	336			
Sbjct 35	TTGACTGTCTCTCAGGCTTCTTCAGCT	8			

10

20

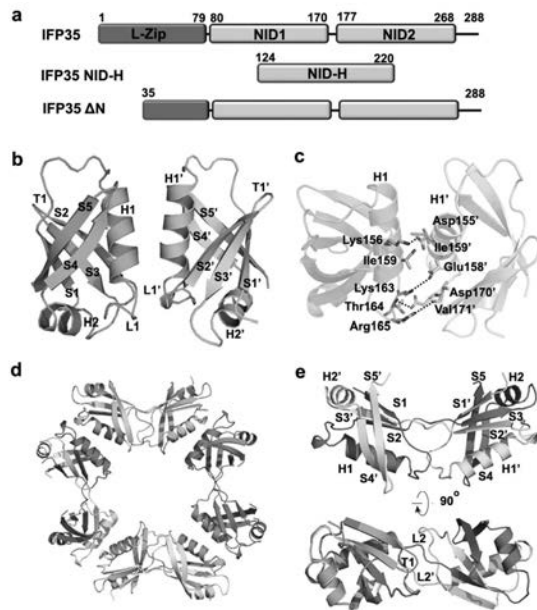
【 0 3 8 6 】

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：

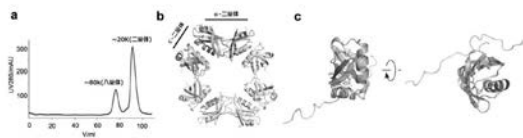
軽鎖：D I V M T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M H W Y Q Q
 K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M
 E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P P I T F G A G T K L E I K（配列番号10）；
 重鎖：V Q L V E S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K
 Q A P G K G L K W M G W I N T Y T G E P T F A D D F K G R F A F S L E T S A S T
 A Y L Q I N N L K N E D T A T Y F C A R Y G Y S W A M D Y W G Q G T S V T V S S
 A S T（配列番号9）。

30

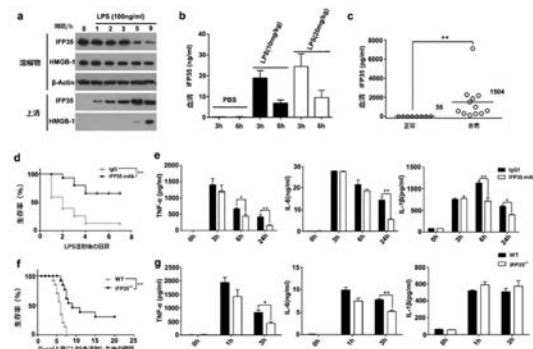
【図 1】



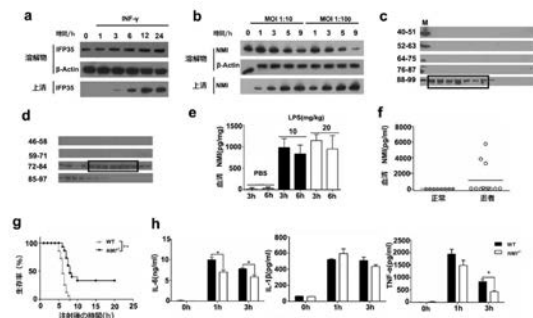
【図 2】



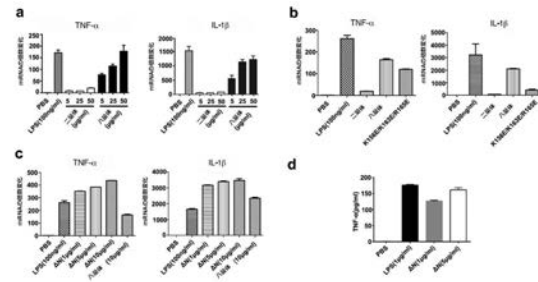
【図 5】



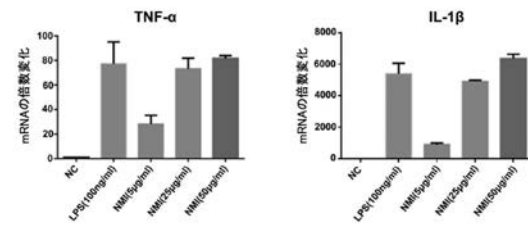
【図 6】



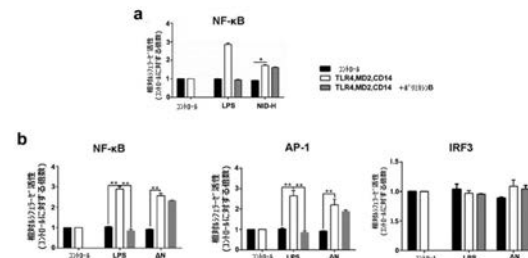
【図 3】



【図 4】



【図 7】



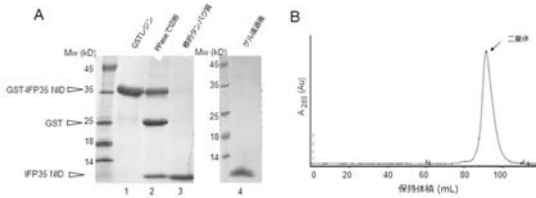
【図 8】



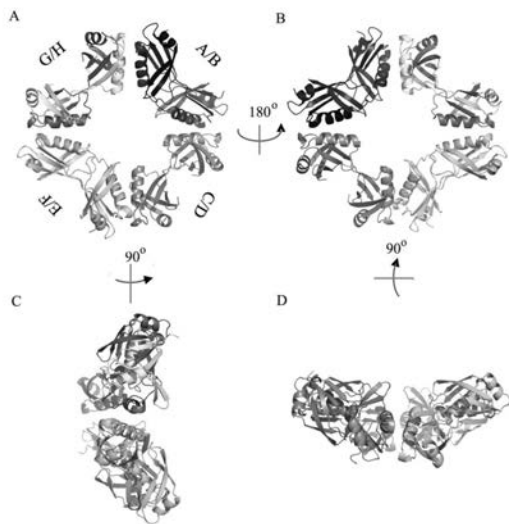
【図 9】



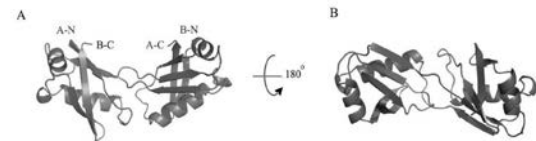
【図 10】



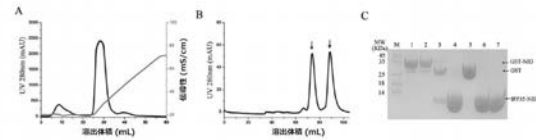
【図 14】



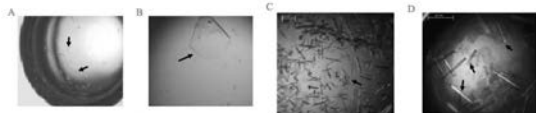
【図 15】



【図 11】



【図 12】



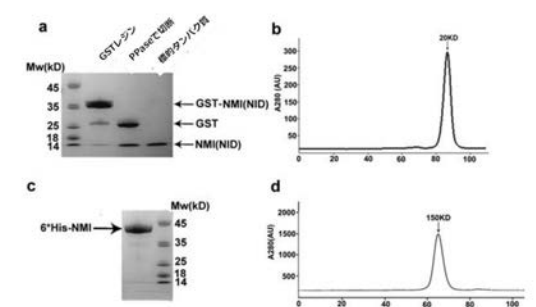
【図 13】



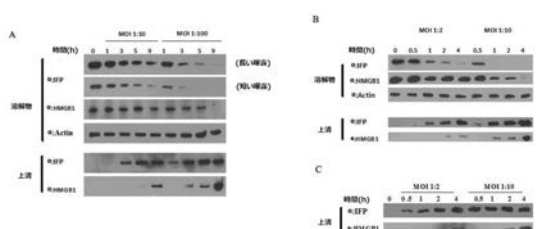
【図 16】



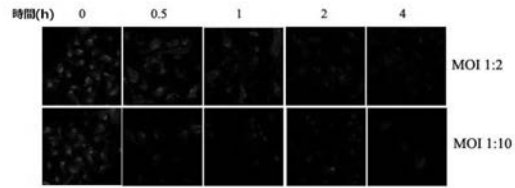
【図 17】



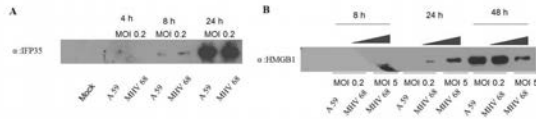
【図 18】



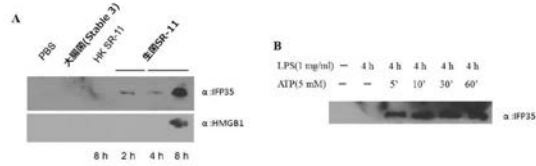
【図 19】



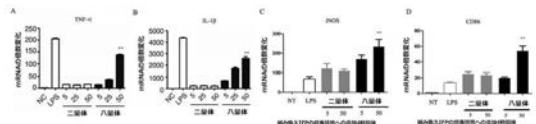
【図 20】



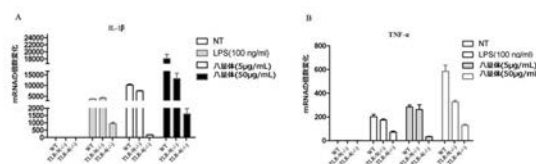
【図 21】



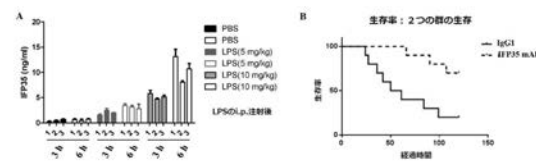
【図 22】



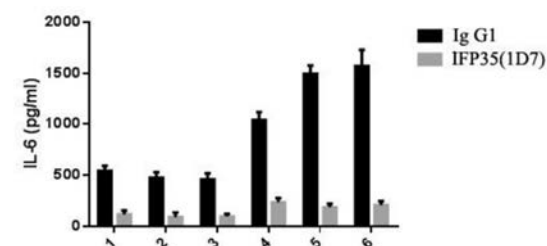
【図 26】



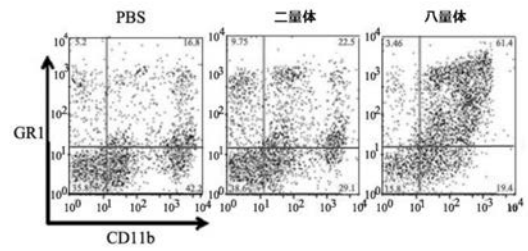
【図 27】



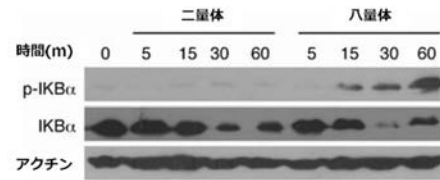
【図 28】



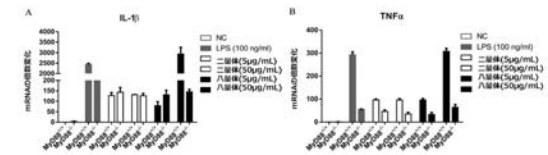
【図 23】



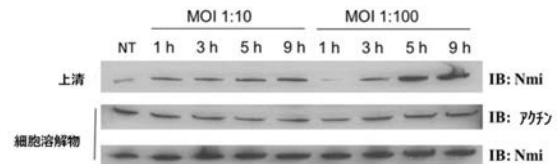
【図 24】



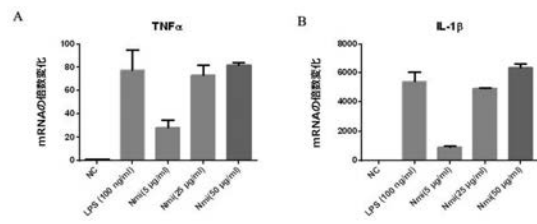
【図 25】



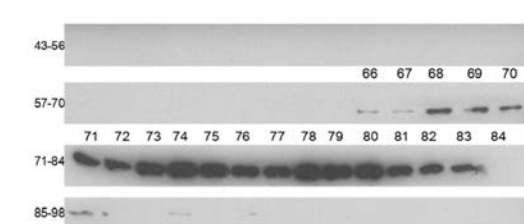
【図 29】



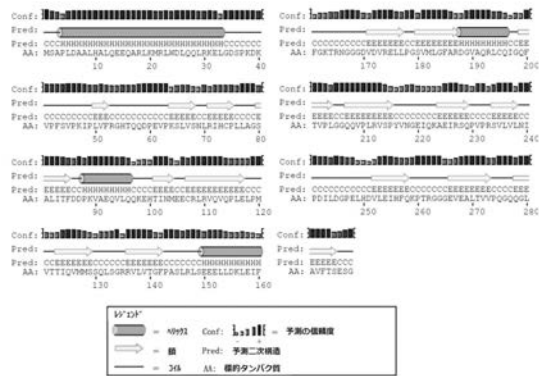
【図 30】



【図 31】



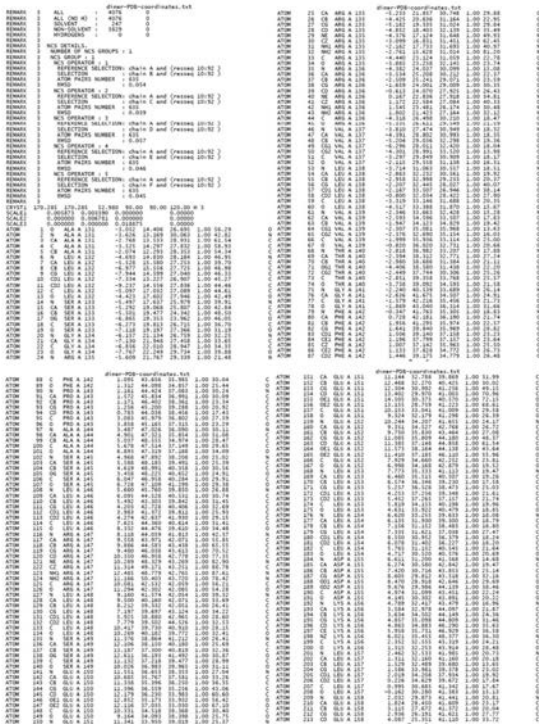
【図 3 2】



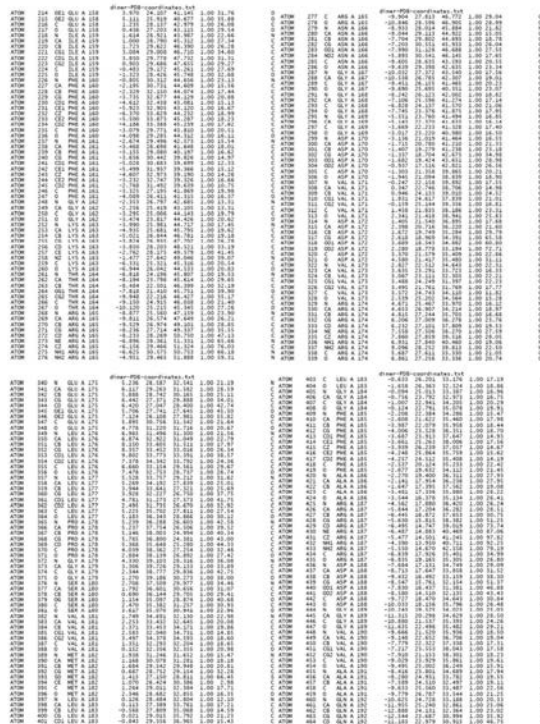
【図 3 3 A】



【図 3 3 B】



【図 3 3 C】



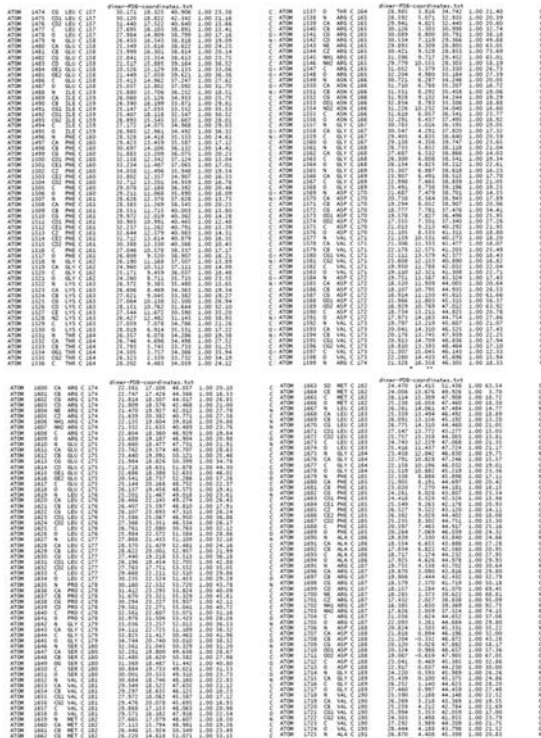
【图 3 3 E】

[illegible]

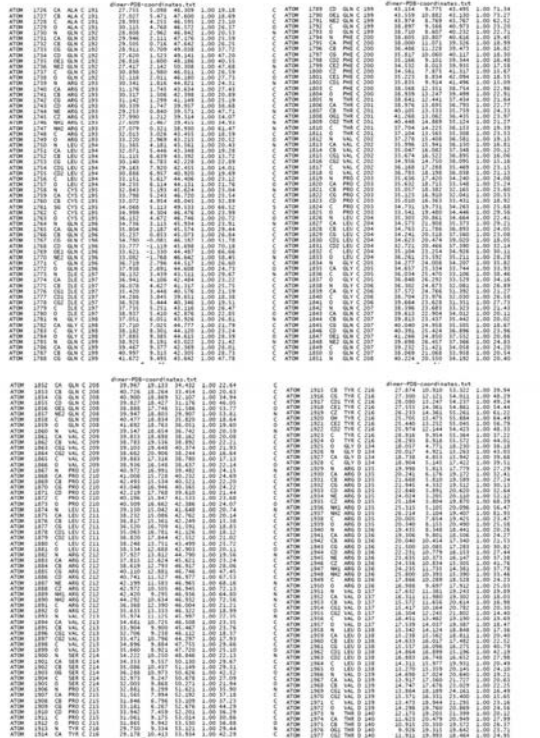
【图 3 3 G】

[illegible]

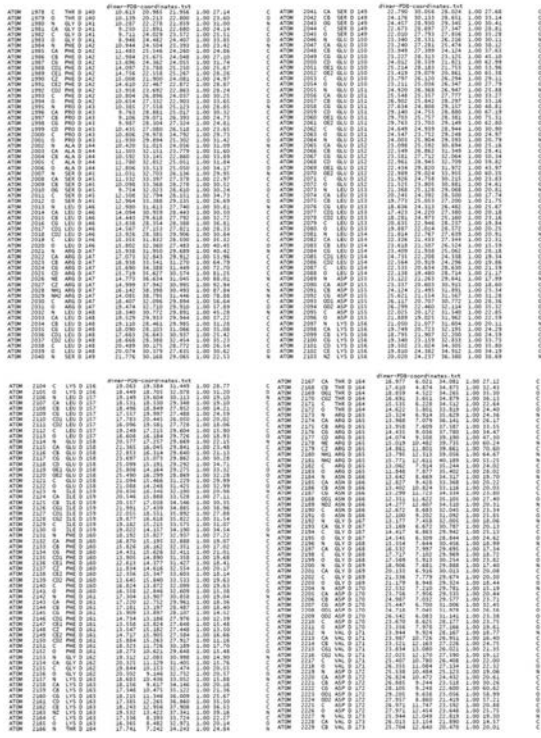
【図 3 3 H】



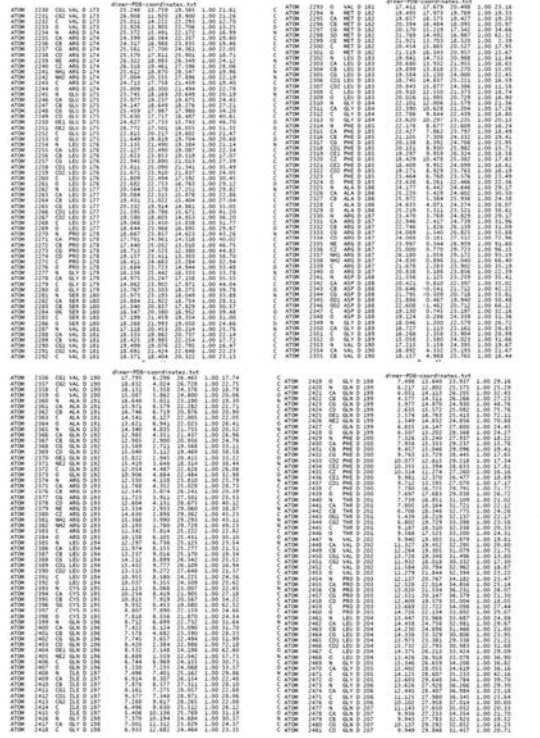
【図 3 3 I】



【図 3 3 J】



【図 3 3 K】



【图 3 3 M】

[illegible]

【 図 3 3 N 】

[illegible]

【图 3 3 0】

[illegible]

【図 3 3 Q】

[illegible][illegible]

【図 3 4 A】

[illegible][illegible]

【图 3 4 C】

[illegible]

【图 3 4 E】

[illegible]

【图 3 4 G】

BIOLOGICAL INFORMATION									
BIOLOGICAL INFORMATION									
1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010
1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020
1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030
1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040
1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050
1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060
1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070
1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080
1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090
1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100
1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110
1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120
1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130
1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140
1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150
1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160
1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170
1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180
1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190
1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200
1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210
1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220
1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230
1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240
1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250
1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260
1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270
1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280
1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290
1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300
1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310
1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320
1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330
1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340
1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350
1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360
1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370
1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380
1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390
1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400
1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410
1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420
1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430
1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440
1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450
1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460
1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470
1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480
1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490
1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500
1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510
1511	1512	1513	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520
1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530
1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540
1541	1542	1543	1544	1545	1546	1547	1548	1549	1550
1551	1552	1553	1554	1555	1556	1557	1558	1559	1560
1561	1562	1563	1564	1565	1566	1567	1568	1569	1570
1571	1572	1573	1574	1575	1576	1577	1578	1579	1580
1581	1582	1583	1584	1585	1586	1587	1588	1589	1590
1591	1592	1593	1594	1595	1596	1597	1598	1599	1600
1601	1602	1603	1604	1605	1606	1607	1608	1609	1610
1611	1612	1613	1614	1615	1616	1617	1618	1619	1620
1621	1622	1623	1624	1625	1626	1627	1628	1629	1630
1631	1632	1633	1634	1635	1636	1637	1638	1639	1640
1641	1642	1643	1644	1645	1646	1647	1648	1649	1650
1651	1652	1653	1654	1655	1656	1657	1658	1659	1660
1661	1662	1663	1664	1665	1666	1667	1668	1669	1670
1671	1672	1673	1674	1675	1676	1677	1678	1679	1680
1681	1682	1683	1684	1685	1686	1687	1688	1689	1690
1691	1692	1693	1694	1695	1696	1697	1698	1699	1700
1701	1702	1703	1704	1705	1706	1707	1708	1709	1710
1711	1712	1713	1714	1715	1716	1717	1718	1719	1720
1721	1722	1723	1724	1725	1726	1727	1728	1729	1730
1731	1732	1733	1734	1735	1736	1737	1738	1739	1740
1741	1742	1743	1744	1745	1746	1747	1748	1749	1750
1751	1752	1753	1754	1755	1756	1757	1758	1759	1760
1761	1762	1763	1764	1765	1766	1767	1768	1769	1770
1771	1772	1773	1774	1775	1776	1777	1778	1779	1780
1781	1782	1783	1784	1785	1786	1787	1788	1789	1790
1791	1792	1793	1794	1795	1796	1797	1798	1799	1800
1801	1802	1803	1804	1805	1806	1807	1808	1809	1810
1811	1812	1813	1814	1815	1816	1817	1818	1819	1820
1821	1822	1823	1824	1825	1826	1827	1828	1829	1830
1831	1832	1833	1834	1835	1836	1837	1838	1839	1840
1841	1842	1843	1844	1845	1846	1847	1848	1849	1850
1851	1852	1853	1854	1855	1856	1857	1858	1859	1860
1861	1862	1863	1864	1865	1866	1867	1868	1869	1870
1871	1872	1873	1874	1875	1876	1877	1878	1879	1880
1881	1882	1883	1884	1885	1886	1887	1888	1889	1890
1891	1892	1893	1894	1895	1896	1897	1898	1899	1900
1901	1902	1903	1904	1905	1906	1907	1908	1909	1910
1911	1912	1913	1914	1915	1916	1917	1918	1919	1920
1921	1922	1923	1924	1925	1926	1927	1928	1929	1930
1931	1932	1933	1934	1935	1936	1937	1938	1939	1940
1941	1942	1943	1944	1945	1946	1947	1948	1949	1950
1951	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960
1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970
1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980
1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990
1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030
2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040
2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050
2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060
2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070
2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080
2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090
2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100
2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110
2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120
2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130
2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140
2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150
2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160
2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170
2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180
2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190
2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200
2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210
2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220
2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230
2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240
2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250
2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260
2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270
2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280
2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288	2289	2290
2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297	2298	2299	2300
2301	2302	2303	2304	2305	2306	2307	2308	2309	2310
2311	2312	2313	2						

INTERPOLATED CONCENTRATIONS, T-1										INTERPOLATED CONCENTRATIONS, T-2													
STATION	DATE	TIME	WIND	TEMP	HUMID	WIND	TEMP	HUMID	WIND	STATION	DATE	TIME	WIND	TEMP	HUMID	WIND	TEMP	HUMID					
1000	1971	08	150	14.4	74	1000	1971	08	150	14.4	74	1000	1971	08	150	14.4	74	1000	1971	08	150	14.4	74
1001	1971	08	150	14.4	74	1001	1971	08	150	14.4	74	1001	1971	08	150	14.4	74	1001	1971	08	150	14.4	74
1002	1971	08	150	14.4	74	1002	1971	08	150	14.4	74	1002	1971	08	150	14.4	74	1002	1971	08	150	14.4	74
1003	1971	08	150	14.4	74	1003	1971	08	150	14.4	74	1003	1971	08	150	14.4	74	1003	1971	08	150	14.4	74
1004	1971	08	150	14.4	74	1004	1971	08	150	14.4	74	1004	1971	08	150	14.4	74	1004	1971	08	150	14.4	74
1005	1971	08	150	14.4	74	1005	1971	08	150	14.4	74	1005	1971	08	150	14.4	74	1005	1971	08	150	14.4	74
1006	1971	08	150	14.4	74	1006	1971	08	150	14.4	74	1006	1971	08	150	14.4	74	1006	1971	08	150	14.4	74
1007	1971	08	150	14.4	74	1007	1971	08	150	14.4	74	1007	1971	08	150	14.4	74	1007	1971	08	150	14.4	74
1008	1971	08	150	14.4	74	1008	1971	08	150	14.4	74	1008	1971	08	150	14.4	74	1008	1971	08	150	14.4	74
1009	1971	08	150	14.4	74	1009	1971	08	150	14.4	74	1009	1971	08	150	14.4	74	1009	1971	08	150	14.4	74
1010	1971	08	150	14.4	74	1010	1971	08	150	14.4	74	1010	1971	08	150	14.4	74	1010	1971	08	150	14.4	74
1011	1971	08	150	14.4	74	1011	1971	08	150	14.4	74	1011	1971	08	150	14.4	74	1011	1971	08	150	14.4	74
1012	1971	08	150	14.4	74	1012	1971	08	150	14.4	74	1012	1971	08	150	14.4	74	1012	1971	08	150	14.4	74
1013	1971	08	150	14.4	74	1013	1971	08	150	14.4	74	1013	1971	08	150	14.4	74	1013	1971	08	150	14.4	74
1014	1971	08	150	14.4	74	1014	1971	08	150	14.4	74	1014	1971	08	150	14.4	74	1014	1971	08	150	14.4	74
1015	1971	08	150	14.4	74	1015	1971	08	150	14.4	74	1015	1971	08	150	14.4	74	1015	1971	08	150	14.4	74
1016	1971	08	150	14.4	74	1016	1971	08	150	14.4	74	1016	1971	08	150	14.4	74	1016	1971	08	150	14.4	74
1017	1971	08	150	14.4	74	1017	1971	08	150	14.4	74	1017	1971	08	150	14.4	74	1017	1971	08	150	14.4	74
1018	1971	08	150	14.4	74	1018	1971	08	150	14.4	74	1018	1971	08	150	14.4	74	1018	1971	08	150	14.4	74
1019	1971	08	150	14.4	74	1019	1971	08	150	14.4	74	1019	1971	08	150	14.4	74	1019	1971	08	150	14.4	74
1020	1971	08	150	14.4	74	1020	1971	08	150	14.4	74	1020	1971	08	150	14.4	74	1020	1971	08	150	14.4	74
1021	1971	08	150	14.4	74	1021	1971	08	150	14.4	74	1021	1971	08	150	14.4	74	1021	1971	08	150	14.4	74
1022	1971	08	150	14.4	74	1022	1971	08	150	14.4	74	1022	1971	08	150	14.4	74	1022	1971	08	150	14.4	74
1023	1971	08	150	14.4	74	1023	1971	08	150	14.4	74	1023	1971	08	150	14.4	74	1023	1971	08	150	14.4	74
1024	1971	08	150	14.4	74	1024	1971	08	150	14.4	74	1024	1971	08	150	14.4	74	1024	1971	08	150	14.4	74
1025	1971	08	150	14.4	74	1025	1971	08	150	14.4	74	1025	1971	08	150	14.4	74	1025	1971	08	150	14.4	74
1026	1971	08	150	14.4	74	1026	1971	08	150	14.4	74	1026	1971	08	150	14.4	74	1026	1971	08	150	14.4	74
1027	1971	08	150	14.4	74	1027	1971	08	150	14.4	74	1027	1971	08	150	14.4	74	1027	1971	08	150	14.4	74
1028	1971	08	150	14.4	74	1028	1971	08	150	14.4	74	1028	1971	08	150	14.4	74	1028	1971	08	150	14.4	74
1029	1971	08	150	14.4	74	1029	1971	08	150	14.4	74	1029	1971	08	150	14.4	74	1029	1971	08	150	14.4	74
1030	1971	08	150	14.4	74	1030	1971	08	150	14.4	74	1030	1971	08	150	14.4	74	1030	1971	08	150	14.4	74
1031	1971	08	150	14.4	74	1031	1971	08	150	14.4	74	1031	1971	08	150	14.4	74	1031	1971	08	150	14.4	74
1032	1971	08	150	14.4	74	1032	1971	08	150	14.4	74	1032	1971	08	150	14.4	74	1032	1971	08	150	14.4	74
1033	1971	08	150	14.4	74	1033	1971	08	150	14.4	74	1033	1971	08	150	14.4	74	1033	1971	08	150	14.4	74
1034	1971	08	150	14.4	74	1034	1971	08	150	14.4	74	1034	1971	08	150	14.4	74	1034	1971	08	150	14.4	74
1035	1971	08	150	14.4	74	1035	1971	08	150	14.4	74	1035	1971	08	150	14.4	74	1035	1971	08	150	14.4	74
1036	1971	08	150	14.4	74	1036	1971	08	150	14.4	74	1036	1971	08	150	14.4	74	1036	1971	08	150	14.4	74
1037	1971	08	150	14.4	74	1037	1971	08	150	14.4	74	1037	1971	08	150	14.4	74	1037	1971	08	150	14.4	74
1038	1971	08	150	14.4	74	1038	1971	08	150	14.4	74	1038	1971	08	150	14.4	74	1038	1971	08	150	14.4	74
1039	1971	08	150	14.4	74	1039	1971	08	150	14.4	74	1039	1971	08	150	14.4	74	1039	1971	08	150	14.4	74
1040	1971	08	150	14.4	74	1040	1971	08	150	14.4	74	1040	1971	08	150	14.4	74	1040	1971	08	150	14.4	74
1041	1971	08	150	14.4	74	1041	1971	08	150	14.4	74	1041	1971	08	150	14.4	74	1041	1971	08	150	14.4	74
1042	1971	08	150	14.4	74	1042	1971	08	150	14.4	74	1042	1971	08	150	14.4	74	1042	1971	08	150	14.4	74
1043	1971	08	150	14.4	74	1043	1971	08	150	14.4	74	1043	1971	08	150	14.4	74	1043	1971	08	150	14.4	74
1044	1971	08	150	14.4	74	1044	1971	08	150	14.4	74	1044	1971	08	150	14.4	74	1044	1971	08	150	14.4	74
1045	1971	08	150	14.4	74	1045	1971	08	150	14.4	74	1045	1971	08	150	14.4	74	1045	1971	08	150	14.4	74
1046	1971	08	150	14.4	74	1046	1971	08	150	14.4	74	1046	1971	08	150	14.4	74	1046	1971	08	150	14.4	74
1047	1971	08	150	14.4	74	1047	1971	08	150	14.4	74	1047	1971	08	150	14.4	74	1047	1971	08	150	14.4	74
1048	1971	08	150	14.4	74	1048	1971	08	150	14.4	74	1048	1971	08	150	14.4	74	1048	1971	08	150	14.4	74
1049	1971	08	150	14.4	74	1049	1971	08	150	14.4	74	1049	1971	08	150	14.4	74	1049	1971	08	150	14.4	74
1050	1971	08	150	14.4	74	1050	1971	08	150	14.4	74	1050	1971	08	150	14.4	74	1050	1971	08	150	14.4	74
1051	1971	08	150	14.4	74	1051	1971	08	150	14.4	74	1051	1971	08	150	14.4	74	1051	1971	08	150	14.4	74
1052	1971	08	150	14.4	74	1052	1971	08	150	14.4	74	1052	1971	08	150	14.4	74	1052	1971	08	150	14.4	74
1053	1971	08	150	14.4	74	1053	1971	08	150	14.4	74	1053	1971	08	150	14.4	74	1053	1971	08	150	14.4	74
1054	1971	08	150	14.4	74	1054	1971	08	150	14.4	74	1054	1971	08	150	14.4	74	1054	1971	08	150	14.4	74
1055	1971	08	150	14.4	74	1055	1971	08	150	14.4	74	1055	1971	08	150	14.4	74	1055	1971	08	150	14.4	74
1056	1971	08	150	14.4	74	1056	1971	08	150	14.4	74	1056	1971	08	150	14.4	74	1056	1971	08	150	14.4	74
1057	1971	08	150	14.4	74	1057	1971	08	150	14.4	74	1057	1971	08	150	14.4	74	1057	1971	08	150	14.4	74
1058	1971	08	150	14.4	74	1058	1971	08	150	14.4	74	1058	1971	08	150	14.4	74	1058	1971	08	150	14.4	74
1059	1971	08	150	14.4	74	1059	1971	08	150	14.4	74	1059	1971	08	150	14.4	74	1059	1971	08	150	14.4	74
1060	1971	08	150	14.4	74	1060	1971	08	150	14.4	74	1060	1971	08	150	14.4	74	1060	1971	08	150	14.4	74
1061</																							

【図 3 4 I】

[illegible][illegible]

【図 3 4 J】

ATM	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180	2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200	2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270	2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280	2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288	2289	2290	2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297	2298	2299	2300	2301	2302	2303	2304	2305	2306	2307	2308	2309	2310	2311	2312	2313	2314	2315	2316	2317	2318	2319	2320	2321	2322	2323	2324	2325	2326	2327	2328	2329	2330	2331	2332	2333	2334	2335	2336	2337	2338	2339	2340	2341	2342	2343	2344	2345	2346	2347	2348	2349	2350	2351	2352	2353	2354	2355	2356	2357	2358	2359	2360	2361	2362	2363	2364	2365	2366	2367	2368	2369	2370	2371	2372	2373	2374	2375	2376	2377	2378	2379	2380	2381	2382	2383	2384	2385	2386	2387	2388	2389	2390	2391	2392	2393	2394	2395	2396	2397	2398	2399	2400	2401	2402	2403	2404	2405	2406	2407	2408	2409	2410	2411	2412	2413	2414	2415	2416	2417	2418	2419	2420	2421	2422	2423	2424	2425	2426	2427	2428	2429	2430	2431	2432	2433	2434	2435	2436	2437	2438	2439	2440	2441	2442	2443	2444	2445	2446	2447	2448	2449	2450	2451	2452	2453	2454	2455	2456	2457	2458	2459	2460	2461	2462	2463	2464	2465	2466	2467	2468	2469	2470	2471	2472	2473	2474	2475	2476	2477	2478	2479	2480	2481	2482	2483	2484	2485	2486	2487	2488	2489	2490	2491	2492	2493	2494	2495	2496	2497	2498	2499	2500	2501	2502	2503	2504	2505	2506	2507	2508	2509	2510	2511	2512	2513	2514	2515	2516	2517	2518	2519	2520	2521	2522	2523	2524	2525	2526	2527	2528	2529	2530	2531	2532	2533	2534	2535	2536	2537	2538	2539	2540	2541	2542	2543	2544	2545	2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557	2558	2559	2560	2561	2562	2563	2564	2565	2566	2567	2568	2569	2570	2571	2572	2573	2574	2575	2576	2577	2578	2579	2580	2581	2582	2583	2584	2585	2586	2587	2588	2589	2590	2591	2592	2593	2594	2595	2596	2597	2598	2599	2600	2601	2602	2603	2604	2605	2606	2607	2608	2609	2610	2611	2612	2613	2614	2615	2616	2617	2618	2619	2620	2621	2622	2623	2624	2625	2626	2627	2628	2629	2630	2631	2632	2633	2634	2635	2636	2637	2638	2639	2640	2641	2642	2643	2644	2645	2646	2647	2648	2649	2650	2651	2652	2653	2654	2655	2656	2657	2658	2659	2660	2661	2662	2663	2664	2665	2666	2667	2668	2669	2670	2671	2672	2673	2674	2675	2676	2677	2678	2679	2680	2681	2682	2683	2684	2685	2686	2687	2688	2689	2690	2691	2692	2693	2694	2695	2696	2697	2698	2699	2700	2701	2702	2703	2704	2705	2706	2707	2708	2709	2710	2711	2712	2713	2714	2715	2716	2717	2718	2719	2720	2721	2722	2723	2724	2725	2726	2727	2728	2729	2730	2731	2732	2733	2734	2735	2736	2737	2738	2739	2740	2741	2742	2743	2744	2745	2746	2747	2748	2749	2750	2751	2752	2753	2754	2755	2756	2757	2758	2759	2760	2761	2762	2763	2764	2765	2766	2767	2768	2769	2770	2771	2772	2773	2774	2775	2776	2777	2778	2779	2780	2781	2782	2783	2784	2785	2786	2787	2788	2789	2790	2791	2792	2793	2794	2795	2796	2797	2798	2799	2800	2801	2802	2803	2804	2805	2806	2807	2808	2809	2810	2811	2812	2813	2814	2815	2816	2817	2818	2819	2820	2821	2822	2823	2824	2825	2826	2827	2828	2829	2830	2831	2832	2833	2834	2835	2836	2837	2838	2839	2840	2841	2842	2843	2844	2845	2846	2847	2848	2849	2850	2851	2852	2853	2854	2855	2856	2857	2858	2859	2860	2861	2862	2863	2864	2865	2866	2867	2868	2869	2870	2871	2872	2873	2874	2875	2876	2877	2878	2879	2880	2881	2882	2883	2884	2885	2886	2887	2888	2889	2890	2891	2892	2893	2894	2895	2896	2897	2898	2899	2900	2901	2902	2903	2904	2905	2906	2907	2908	2909	2910	2911	2912	2913	2914	2915	2916	2917	2918	2919	2920	2921	2922	2923	2924	2925	2926	2927	2928	2929	2930	2931	2932	2933	2934	2935	2936	2937	2938	2939	2940	2941	2942	2943	2944	2945	2946	2947	2948	2949	2950	2951	2952	2953	2954	2955	2956	2957	2958	2959	2960	2961	2962	2963	2964	2965	2966	2967	2968	2969	2970	2971	2972	2973	2974	2975	2976	2977	2978	2979	2980	2981	2982	2983	2984	2985	2986	2987	2988	2989	2990	2991	2992	2993	2994	2995	2996	2997	2998	2999	3000	3001	3002	3003	3004	3005	3006	3007	3008	3009	3010	3011	3012	3013	3014	3015	3016	3017	3018	3019	3020	3021	3022	3023	3024	3025	3026	3027	3028	3029	3030	3031	3032	3033	3034	3035	3036	3037	3038	3039	3040	3041	3042	3043	3044	3045	3046	3047	3048	3049	3050	3051	3052	3053	3054	3055	3056	3057	3058	3059	3060	3061	3062	3063	3064	3065	3066	3067	3068	3069	3070	3071	3072	3073	3074	3075	3076	3077	3078	3079	3080	3081	3082	3083	3084	3085	3086	3087	3088	3089	3090	3091	3092	3093	3094	3095	3096	3097	3098	3099	3100	3101	3102	3103	3104	3105	3106	3107	3108	3109	3110	3111	3112	3113	3114	3115	3116	3117	3118	3119	3120	3121	3122	3123	3124	3125	3126	3127	3128	3129	3130	3131	3132	3133	3134	3135	3136	3137	3138	3139	3140	3141	3142	3143	3144	3145	3146	3147	3148	3149	3150	3151	3152	3153	3154	3155	3156	3157	3158	3159	3160	3161	3162	3163	3164	3165	3166	3167	3168	3169	3170	3171	3172	3173	3174	3175	3176	3177	3178	3179	3180	3181	3182	3183	3184	3185	3186	3187	3188	3189	3190	3191	3192	3193	3194	3195	3196	3197	3198	3199	3200	3201	3202	3203	3204	3205	3206	3207	3208	3209	3210	3211	3212	3213	3214	3215	3216	3217	3218	3219	3220	3221	3222	3223	3224	3225	3226	3227	3228	3229	3230	3231	3232	3233	3234	3235	3236	3237	3238	3239	3240	3241	3242	3243	3244	3245	3246	3247	3248	3249	3250	3251	3252	3253	3254	3255	3256	3257	3258	3259	3260	3261	3262	3263	3264	3265	3266	3267	3268	3269	3270	3271	3272	3273	3274	3275	3276	3277	3278	3279	3280	3281	3282	3283	3284	3285	3286	3287	3288	3289	3290	3291	3292	3293	3294	3295	3296	3297	3298	3299	3300	3301	3302	3303	3304	3305	3306	3307	3308	3309	3310	3311	3312	3313	3314	3315	3316	3317	3318	3319	3320	3321	3322	3323	3324	3325	3326	3327	3328	3329	3330	3331	3332	3333	3334	3335	3336	3337	3338	3339	3340	3341	3342	3343	3344	3345	3346	3347	3348	3349	3350	3351	3352	3353	3354	3355	3356	3357	3358	3359	3360	3361	3362	3363	3364	3365	3366	3367	3368	3369	3370	3371	3372	3373	3374
-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

【图 3 4 0】

[illegible]

【図 3 4 Q】

[illegible]

【図 3 4 R】

Figure 34R is a large table containing numerical data. It is organized into several sections, each with a header. The data is presented in a grid-like format with multiple columns and rows. The headers include various numerical values and some text labels. The data rows contain a mix of integers and floating-point numbers. The table is divided into sections by horizontal lines, and each section has its own set of headers. The overall structure is complex and detailed, typical of a technical data table in a patent document.

【図 3 4 S】

Figure 34S is a large table containing numerical data, similar in structure to Figure 34R. It also consists of multiple sections with headers and rows of data. The data is presented in a grid-like format with multiple columns and rows. The headers include various numerical values and some text labels. The data rows contain a mix of integers and floating-point numbers. The table is divided into sections by horizontal lines, and each section has its own set of headers. The overall structure is complex and detailed, typical of a technical data table in a patent document.

【図 3 4 T】

Figure 34T is a large table containing numerical data, similar in structure to Figure 34R and 34S. It also consists of multiple sections with headers and rows of data. The data is presented in a grid-like format with multiple columns and rows. The headers include various numerical values and some text labels. The data rows contain a mix of integers and floating-point numbers. The table is divided into sections by horizontal lines, and each section has its own set of headers. The overall structure is complex and detailed, typical of a technical data table in a patent document.

【図 3 4 U】

Figure 34U is a large table containing numerical data, similar in structure to Figure 34R and 34S. It also consists of multiple sections with headers and rows of data. The data is presented in a grid-like format with multiple columns and rows. The headers include various numerical values and some text labels. The data rows contain a mix of integers and floating-point numbers. The table is divided into sections by horizontal lines, and each section has its own set of headers. The overall structure is complex and detailed, typical of a technical data table in a patent document.

MCC-2019-2020										MCC-2020-2021									
Year	Month	Day	Time	Location	Activity	Duration	Cost	Revenue	Profit	Year	Month	Day	Time	Location	Activity	Duration	Cost	Revenue	Profit
2019	1	1	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	1	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	2	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	2	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	3	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	3	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	4	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	4	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	5	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	5	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	6	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	6	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	7	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	7	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	8	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	8	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	9	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	9	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	10	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	10	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	11	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	11	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	12	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	12	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	13	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	13	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	14	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	14	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	15	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	15	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	16	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	16	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	17	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	17	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	18	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	18	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	19	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	19	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	20	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	20	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	21	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	21	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	22	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	22	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	23	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	23	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	24	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100	2020	1	24	10:00	Room 101	Lecture	1.0	100	0	-100
2019	1	25	10:00																

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" <i>Journal of Virology</i> , 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" <i>Journal of Virology</i> , 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 13 November 2015		Date of mailing of the international search report 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 Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer LI, Kangqi Telephone No. (86-10)62411034

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" <i>Cellular Signalling</i> , Vol. volume 19, 17 November 2006 (2006-11-17), see the whole document	1-28, 34, 35, 36-45(part), 46-53, 74-93

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
.....							

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 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 1 0 0 1 0 1 ベイジン チャオヤン ダータン ロード 1 5
(72)発明者 ゴーファ・リウ
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 ベイジン チャオヤン ダータン ロード 1 5
(72)発明者 ファンファン・リャン
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 ベイジン チャオヤン ダータン ロード 1 5
(72)発明者 ジュエン・シェン
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 ベイジン チャオヤン ダータン ロード 1 5
(72)発明者 ルイチン・イェン
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 ベイジン チャオヤン ダータン ロード 1 5
(72)発明者 チーカイ・シアホウ
中華人民共和国 1 0 0 1 0 1 ベイジン チャオヤン ダータン ロード 1 5

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)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017528129A5	公开(公告)日	2018-10-04
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 ヂーカイシアハウ		
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 ヂーカイ・シアハウ		
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		

摘要(译)

本发明提供了用于治疗 and/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