

(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2005-519590

(P2005-519590A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-556018 (P2003-556018)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月30日 (2002. 7. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年5月6日 (2004. 5. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/024252
 (87) 国際公開番号 W02003/055440
 (87) 国際公開日 平成15年7月10日 (2003. 7. 10)
 (31) 優先権主張番号 PTS/US01/27099
 (32) 優先日 平成13年8月29日 (2001. 8. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10/136, 574
 (32) 優先日 平成14年4月29日 (2002. 4. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 グレウォル, イクバル
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
 55, フレモント, カンディス コー
 ト 34802

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫関連疾患の治療のための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、免疫関連疾患の診断及び治療のための、新規なタンパク質を含有する組成物及び方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 図 2 (配列番号：2) に示したポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 (b) 図 2 (配列番号：2) に示したポリペプチドをコードし、その関連シグナルペプチドを欠くヌクレオチド配列；
 (c) 図 2 (配列番号：2) に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードし、その関連シグナルペプチドを伴うヌクレオチド配列；又は
 (d) 図 2 (配列番号：2) に示したポリペプチドの細胞外ドメインをコードし、その関連シグナルペプチドを欠くヌクレオチド配列；
 と少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

10

【請求項 2】

図 1 (配列番号：1) に示したヌクレオチド配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項 3】

図 1 (配列番号：1) に示したヌクレオチド配列の完全長コード配列からなるヌクレオチド配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項 4】

A T C C 受託番号 P T A - 1 7 3 1 で寄託された D N A の完全長コード配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の核酸を含んでなるベクター。

20

【請求項 6】

ベクターで形質転換される宿主細胞に認識されるコントロール配列に作用可能に結合した請求項 5 に記載のベクター。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 8】

前記細胞が C H O 細胞、大腸菌又は酵母細胞である請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドの製造方法であって、請求項 7 に記載の宿主細胞を、前記 P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から前記 P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドを回収することを含んでなる方法。

30

【請求項 10】

- (a) 図 2 (配列番号：2) に示されたポリペプチドのアミノ酸配列；
 (b) 図 2 (配列番号：2) に示され、その関連シグナルペプチドを欠くポリペプチドのアミノ酸配列；
 (c) 図 2 (配列番号：2) に示され、その関連シグナルペプチドを伴うポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列；又は
 (d) 図 2 (配列番号：2) に示され、その関連シグナルペプチドを欠くポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列；
 と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

40

【請求項 11】

A T C C 受託番号 P T A - 1 7 3 1 で寄託された D N A の完全長コード配列によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも 80% のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項 12】

異種アミノ酸配列に融合した請求項 10 に記載のポリペプチドを含んでなるキメラ分子。

【請求項 13】

前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列又は免疫グロブリンの F c 領域である請求

50

項 1 2 に記載のキメラ分子。

【請求項 1 4】

請求項 1 0 に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 1 5】

前記抗体がモノクローナル抗体、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

(a) 請求項 1 0 に記載のポリペプチド、(b) 上記ポリペプチドのアゴニスト、(c) 上記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は(d) 上記ポリペプチドに結合する抗体を、担体と組み合わせて含有する、組成物。

【請求項 1 7】

上記担体が製薬的に許容可能な担体である、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

治療的に有効な量の(a)、(b)、(c)又は(d)を含有する、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

容器；

上記容器上のラベル；及び

上記容器内に収容された、(a) 請求項 1 0 に記載のポリペプチド、(b) 上記ポリペプチドのアゴニスト、(c) 上記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は(d) 上記ポリペプチドに結合する抗体を含有する組成物とを具備し、上記容器上のラベルが、上記組成物を免疫関連疾患の治療に使用できることを表示している、製造品。

【請求項 2 0】

治療を必要とする哺乳動物に対して免疫関連疾患を治療する方法において、治療の有効量の(a) 請求項 1 0 に記載のポリペプチド、(b) 前記ポリペプチドのアゴニスト、(c) 前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は(d) 前記ポリペプチドに結合する抗体を前記哺乳動物に投与することを含んでなる方法。

【請求項 2 1】

免疫関連疾患が、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、骨関節症、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症ミオパシー、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患、中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害、ギラン-バレー症候群、慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝胆汁性疾患、感染性又は自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸疾患、ウィップル病、自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑、接触性皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、肺の免疫疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、過敏性肺炎、移植関連疾患、拒絶反応又は移植片対宿主疾患である請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

PRO20080ポリペプチドを含有すると推測される試料中の前記ポリペプチドの存在を測定する方法であって、前記試料を抗PRO20080抗体に暴露し、前記抗体の前記試料中の成分への結合を測定することを含んでなる方法。

【請求項 2 3】

哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法において、(a) 哺乳動物から得た組織細胞の試験試料中と、(b) 同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中とにおけるPRO20080ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含んでなり、試験試料中におけるコントロール試料と比較して高い又は低い前記遺伝子の発現レベルが、試験組織細胞を得た哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す方法。

【請求項 2 4】

10

20

30

40

50

哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法において、(a)抗PRO20080抗体を前記哺乳動物から得た組織細胞の試験試料と接触させ、(b)試験試料中での抗体とポリペプチドとの間の複合体形成を検出することを含んでなり、前記複合体の形成が、試験組織細胞を得た哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す方法。

【請求項25】

PRO20080ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法において、前記ポリペプチドに正常では反応する細胞を、(a)前記ポリペプチドと(b)候補化合物に接触させ、(a)に対する前記細胞の反応性の欠如を決定することを含んでなる方法。

【請求項26】

PRO20080ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害する化合物を同定する方法において、前記ポリペプチドを正常では発現する細胞を候補化合物に接触させ、前記遺伝子の発現の欠如を決定することを含んでなる方法。

【請求項27】

前記候補化合物がアンチセンス核酸である請求項26に記載の方法。

【請求項28】

PRO20080ポリペプチドの活性を模倣する化合物を同定する方法において、前記ポリペプチドに正常では反応する細胞を候補化合物に接触させ、前記候補化合物に対する前記細胞の反応性を決定することを含んでなる方法。

【請求項29】

哺乳動物における炎症性免疫応答を刺激する方法において、有効量の(a)PRO20080ポリペプチド又は(b)(a)のアゴニストを前記哺乳動物に投与し、該炎症性免疫応答を刺激することを含んでなる方法。

【請求項30】

哺乳動物における炎症性免疫応答を阻害する方法において、有効量のPRO20080ポリペプチドのアнтаゴニストを前記哺乳動物に投与し、該炎症性免疫応答を誘導することを含んでなる方法。

【請求項31】

哺乳動物におけるT細胞の増殖を刺激する方法において、有効量の(a)PRO20080ポリペプチド又は(b)(a)のアゴニストを前記哺乳動物に投与し、該T細胞増殖を刺激することを含んでなる方法。

【請求項32】

哺乳動物におけるT細胞の増殖を阻害する方法において、有効量の(a)PRO20080ポリペプチドアンタゴニストを前記哺乳動物に投与し、該T細胞増殖を阻害することを含んでなる方法。

【請求項33】

哺乳動物におけるINF- γ の産生を刺激する方法において、有効量の(a)PRO20080ポリペプチド又は(b)(a)のアゴニストを前記哺乳動物に投与し、該INF- γ の産生を刺激することを含んでなる方法。

【請求項34】

哺乳動物におけるINF- γ の産生を阻害する方法において、有効量の(a)PRO20080ポリペプチドアンタゴニストを前記哺乳動物に投与し、該INF- γ の産生を阻害することを含んでなる方法。

【請求項35】

哺乳動物における遅延型過敏反応を阻害する方法において、有効量のPRO20080ポリペプチドアンタゴニストを前記哺乳動物に投与し、該遅延型過敏反応を阻害することを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

10

20

30

40

50

本発明は免疫関連疾患の診断と治療のための組成物と方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

免疫関連及び炎症疾患は、正常な生理機能では、発作又は傷害に反応して、発作又は傷害から修復を開始し、外来生物体に対する生得及び後天的防御を開始するのに重要な、かなり複雑で、多くの場合は多重に相互関連した生物学的経路の現れ又は結果である。疾患又は病理は、これらの正常な生理学的経路が、反応の強さに直接関連してか、異常な調節又は過度な刺激の結果として、自己に対する反応として、又はこれらの組合せとして、更なる発作又は傷害を引き起こすときに生じる。

これらの疾患の発生は、多くの場合、多段階経路及びしばしば多数の異なった生物学的システム/経路に関与しているが、一又は複数のこれらの経路の重要な点における介在により改善又は治療効果を有し得る。治療的介在は有害なプロセス/経路の拮抗作用又は有益なプロセス/経路の刺激の何れかにより生じる。

多くの免疫関連疾患が知られており、広範囲にわたって研究されている。このような疾患には、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染疾患、免疫欠損症、異常増殖等が含まれる。

Tリンパ球(T細胞)は哺乳動物の免疫反応の重要な成分である。T細胞は主要組織適合性複合体(MHC)内の遺伝子によりコードされる自己分子と結合する抗原を認識する。抗原は抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片等の表面上のMHC分子と共に提示され得る。T細胞系は宿主哺乳動物の健康を脅かすこれらの改変細胞を除去するものである。T細胞はヘルパーT細胞及び細胞障害性T細胞を含む。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体の認識に続いて広範囲に増殖する。またヘルパーT細胞は種々のサイトカイン、例えばリンホカインを分泌し、これはB細胞、細胞障害性T細胞、及び免疫反応に寄与している種々の他の細胞の活性化において中心的な役割を担っている。

【0003】

体液及び細胞媒介性の免疫反応の双方における中心的事象は、ヘルパーT細胞の活性化及びクローン増殖である。ヘルパーT細胞の活性化は、抗原提示細胞の表面におけるT細胞レセプター(TCR)-CD28複合体と抗原-MHCとの相互作用により開始される。この相互作用は休止ヘルパーT細胞が細胞サイクル(G0からG1転移)に入るのを誘発する生化学的事象のカスケードを媒介し、結果として、IL-2と、時々IL-4とに対する高親和性レセプターが発現する。活性化されたT細胞は増殖及び記憶細胞又はエフェクター細胞への分化のサイクルを経て進行する。

CD28を通して媒介されたシグナルに加えて[Carreno等, (2002) Annu Rev Immunol 20:29-53]、SLAM分子はまた増殖に必要なT細胞の同時刺激のための第二のシグナルを提供することができる[Aversa等, (1997) J Immunol 158(9): 4036-4044, Aversa等, (1997) Immunol Cell Biol 75(2): 202-205]。SLAMは細胞外Ig様反復を含み、モチーフT x Y x x V / Iによって特徴付けられるSAP細胞内結合部位をまた含む分子ファミリーの一員である。このモチーフのシロシンリン酸化はSLAMとのSAPの結合を大きく増大させる。SAPはX連鎖リンパ増殖性疾患に関連しているため、SAP/SLAM相互作用の理解が増大することはこの疾患の治療に対する更なる識見をもたらさう[Howie等, (2002) Blood 99(3): 957-965, Latour等, 2001, Nat Immunol 2(8): 681-690, Morra等 2001 J Biol Chem 276(39): 36809-36816, Nichols等, 2001 Nat Immunol 2(8): 665-666]。

SLAMはTh1細胞応答に関連していたが、これは、この分子が炎症及び自己免疫疾患において役割を担っている可能性があることを示唆している[Cocks等, (1995) Nature 376 (6537): 260-263, Aversa等, (1997) Immunol Cell Bio 75(2): 202-205]。T細胞表面上でのSLAMとCD3の架橋はT細胞の増殖とインターフェロンガンマ(IFN-)の産生の増加を誘導する。上の理由によりSLAMファミリーの新規メンバーであるPRO20080を探索し発見した。ここでは、PRO20080はSLAMと相同性を有

10

20

30

40

50

し、S L A Mと同様に、B細胞、T細胞及び記憶T細胞中で発現することが示される。P R O 2 0 0 8 0は活性化されたT細胞でアップレギュレートされ、ホモタイプな結合を示し、S A P結合モチーフを含み、T細胞中のS A Pと相互作用する。P R O 2 0 0 8 0とC D 3の同時刺激はT細胞の増殖を誘導し、I F N - の生産と分泌を増大させる。T h 1媒介遅延型過敏反応におけるP R O 2 0 0 8 0についてもまた証拠が示され、よって、P R O 2 0 0 8 0を炎症及びT h 1媒介自己免疫疾患の治療のための潜在的な標的にする。

【 0 0 0 4 】

(発明の概要)

A . 実施態様

本発明は、ヒトを含む哺乳動物における免疫関連疾患の診断と治療のために有用な組成物と方法に関する。本発明は、哺乳動物における免疫反応を刺激又は阻害するP R O 2 0 0 8 0 (アゴニスト及びアンタゴニスト抗体を含む)の同定に基づく。免疫関連疾患は免疫反応を抑制又は増強することで治療することができる。免疫反応を促進する分子は、抗原に対する免疫反応を促進又は増強する。免疫反応の増強が有益である場合には、免疫反応を刺激する分子が治療に使用可能である。あるいは、免疫反応の抑制が重要である場合(例えば炎症)には、免疫反応を抑制し、抗原に対する免疫応答を軽減又は減少させる分子(例えば中和抗体)を治療に使用することができる。従って、P R O 2 0 0 8 0ポリペプチド、そのアゴニスト及びアンタゴニストはまた免疫関連及び炎症疾患の治療のための医薬及び薬剤を調製するのに役立つ。特定の側面では、かかる医薬及び薬剤は製薬的に許容可能な担体と共に、治療的有効量のP R O 2 0 0 8 0ポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニストを含有する。好ましくは混合物は無菌である。

更なる実施態様では、本発明は、P R O 2 0 0 8 0ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法であって、P R O 2 0 0 8 0ポリペプチドを候補分子と接触させ、上記P R O 2 0 0 8 0ポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターすることを含む方法に関する。好ましくは、P R O 2 0 0 8 0ポリペプチドは天然配列P R O 2 0 0 8 0ポリペプチドである。特定の側面では、P R O 2 0 0 8 0アゴニストもしくはアンタゴニストは抗P R O 2 0 0 8 0抗体である。

【 0 0 0 5 】

他の実施態様では、本発明はP R O 2 0 0 8 0ポリペプチド又は該ポリペプチドに結合するアゴニスト又はアンタゴニスト抗体を、担体又は賦形剤と組み合わせて含有する物質の組成物に関する。一側面では、組成物は、治療的に有効な量のポリペプチド又は抗体を含有する。他の側面では、組成物が免疫刺激分子を含有する場合、組成物は、(a)それを必要とする哺乳動物において免疫応答を刺激し又は増強し、(b)抗原に反応して、それを必要とする哺乳動物においてTリンパ球の増殖を増大させ、(c)Tリンパ球の活性を刺激し、(d)I N F - を産生するために、有用である。他の側面では、組成物は、例えば更なる抗体又は細胞毒性又は化学療法剤であってもよい更なる活性成分を含有する。好ましくは組成物は滅菌されている。

他の実施態様では、治療を必要とする哺乳動物に対して免疫関連疾患を治療する方法において、有効量のP R O 2 0 0 8 0ポリペプチド、そのアゴニスト、又はそれに対するアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含んでなる方法に関する。好適な側面では、免疫関連疾患は、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、骨関節症、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症ミオパシー、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患、中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン-バレー症候群及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、胆汁性疾患、感染症又は自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎王帯硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸疾患、ウィップル病、自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑、接触性皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば

10

20

30

40

50

好酸球性肺炎、特発性肺線維症、過敏性肺炎、移植関連疾患、拒絶反応又は移植片対宿主疾患からなる群から選択される。

【0006】

他の実施態様では、本発明は上記又は下記のポリペプチドの任意のものに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。一側面では、本発明はPRO20080ポリペプチドに結合する単離された抗体に関する。他の側面では、抗体はPRO20080ポリペプチドの活性を模倣し（アゴニスト抗体）又は逆に抗体はPRO20080ポリペプチドの活性を阻害又は中和する（アンタゴニスト抗体）。他の側面では、抗体はモノクローナル抗体であり、好ましくは非ヒト相補性決定領域（CDR）残基とヒトフレームワーク領域（FR）残基を有している。抗体は標識することができ、固体支持体に固定することができる。更なる側面では、抗体は、抗体断片、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、又は抗イディオタイプ抗体である。

10

更に他の実施態様では、本発明は、PRO20080抗体を製薬的に許容可能な担体と組み合わせて含有する組成物を提供する。一側面では、組成物は治療的有効量の抗体を含有する。好ましくは、組成物は無菌である。組成物は液体医薬製剤の形態で投与ことができ、それは長期の保存安定性を達成するように保存することができる。あるいは、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である。

更なる実施態様では、本発明は、

(a) PRO20080ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含有する組成物；

20

(b) 上記組成物を含む容器；及び

(c) 上記容器に固定されたラベル又は上記容器内に収容されたパッケージ挿入物で、上記PRO20080ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの免疫関連疾患の治療における使用に言及するもの；

を含んでなる製造物品に関する。組成物は治療的有効量のPRO20080ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストを含みうる。

【0007】

更に他の実施態様では、本発明は、哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法において、(a) 哺乳動物から得た組織細胞の試験試料中と、(b) 同じ細胞型の知られた正常細胞のコントロール試料中におけるPRO20080ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含んでなり、コントロール試料と比較した場合の試験試料中のより高い又はより低い発現レベルが、試験組織細胞を得た哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す方法に関する。

30

他の実施態様では、本発明は哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法において、(a) 抗PRO20080抗体を哺乳動物から得た組織細胞の試験試料と接触させ、(b) 試験試料中の抗体とPRO20080ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出することを含んでなる方法に関し、該複合体の形成は上記疾患の有無を示す。検出は、定性的でも定量的でもよく、同じ細胞型の知られた正常組織細胞のコントロール試料における複合体形成のモニターとの比較において実施されうる。試験試料中で形成された複合体量が多いことは、試験組織細胞を得た哺乳動物における免疫疾患の存在又は不存在を示す。抗体は、好ましくは検出可能な標識を担持する。複合体形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又はこの分野で知られた他の技術によってモニターできる。試験試料は、通常は免疫系の不全又は異常を有すると推定される個体から得られる。

40

他の実施態様では、本発明は、PRO20080ポリペプチドを含むと推測される試験試料中のPRO20080ポリペプチドの存在を決定する方法であって、抗PRO20080ポリペプチド抗体に、上記PRO20080ポリペプチドを含むと推測される試験試料を暴露し、前記細胞試料中の前記抗体の結合を決定することを含んでなる方法を提供する。特定の態様では、試料はPRO20080ポリペプチドを含んでいると推測される細胞を含み、抗体は細胞に結合する。抗体は好ましくは検出可能に標識され、及び/又は固

50

体支持体に結合される。

【0008】

他の実施態様では、本発明は、抗PRO20080抗体及び担体を適切な包装体を含んでなる、免疫関連疾患診断用キットに関する。このキットは、好ましくは、PRO20080ポリペプチドの存在を検出するために抗体を用いるための指示書を含む。好ましくは、担体は製薬的に許容可能である。

他の実施態様では、本発明は、適切な包装体に含まれる抗PRO20080抗体を含む診断用キットに関する。キットは、好ましくは、この抗体をPRO20080ポリペプチドを検出するために用いるための指示書を含む。

他の実施態様では、本発明は、上記哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料中におけるPRO20080ポリペプチドの存在又は不存在を検出することを含む、哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法を提供し、前記試験試料中におけるPRO20080ポリペプチドの有無が、前記哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す。

他の実施態様では、本発明はPRO20080ポリペプチドのアゴニストを同定する方法であって、

(a) 正常にPRO20080ポリペプチドによって誘導される細胞応答の誘導のために適した条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させ；

(b) 試験化合物が有効なアゴニストであるかどうかを確定するために前記細胞応答の誘導を測定し、前記細胞応答の誘導が、前記試験化合物が有効なアゴニストであることを示す方法に関する。

【0009】

他の実施態様では、本発明は、候補化合物をPRO20080ポリペプチドに、これら二つの成分が相互作用することを可能にする条件下及び十分な時間にわたって接触させ、PRO20080ポリペプチドの活性が阻害されるかどうかを測定することを含んでなる、PRO20080ポリペプチドの活性を阻害することが可能な化合物を同定する方法に関する。特定の側面では、候補化合物又はPRO20080ポリペプチドのいずれかが固持体上に固定される。他の側面では、非固定化成分は検出可能な標識を有する。好ましい側面では、この方法は：

(a) 正常にはPRO20080ポリペプチドによって誘導される細胞応答の誘導のために適した条件下でPRO20080ポリペプチドの存在下においてスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させ；及び

(b) 試験化合物が有効なアンタゴニストであるかどうかを確定するために、前記細胞応答の誘導を測定する工程を含む。

他の実施態様では、本発明は、細胞を試験化合物と接触させて、PRO20080ポリペプチドの発現が阻害されるかどうかを確定することを含む、正常にはポリペプチドを発現する細胞において、PRO20080ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法を提供する。好ましい側面では、この方法は：

(a) PRO20080ポリペプチドの発現を可能にするために適した条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させ、(b) 前記ポリペプチドの発現の阻害を測定する工程を含む。

【0010】

更に他の実施態様では、本発明は、(a) PRO20080ポリペプチド、(b) PRO20080ポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PRO20080ポリペプチドのアンタゴニストのいずれかをコードする核酸分子を哺乳動物へ投与することを含んでなる、免疫関連疾患を患っている哺乳動物においてこの疾患を治療する方法に関し、上記アゴニスト及びアンタゴニストは抗PRO20080抗体であってもよい。好ましい実施態様では、哺乳動物はヒトである。他の好ましい実施態様では、核酸はエキソピボ(生体外)遺伝子治療を経由して投与される。更なる好ましい実施態様では、この核酸は、ベクター、より好ましくはアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス又はレトロウイルスベクター内に含まれる。

10

20

30

40

50

更に他の側面では、本発明は、プロモーター、(a) PRO20080ポリペプチド、(b) PRO20080ポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(c) PRO20080ポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸、並びにポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的に構成されるウイルスベクターを含んでなる組換えウイルス粒子を提供し、ここで、ウイルスベクターはウイルス構造タンパク質に関連している。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然PRO20080ポリペプチド由来のものである。

【0011】

また更なる実施態様では、本発明は、レトロウイルス構造タンパク質を発現する核酸作成物を含んでなるエキソピボ産生細胞に関し、プロモーター、(a) PRO20080ポリペプチド、(b) PRO20080ポリペプチドのアゴニストポリペプチド、又は(c) PRO20080ポリペプチドのアンタゴニストポリペプチドをコードする核酸、並びにポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列から本質的に構成されるレトロウイルスベクターをも含み、ここで、前記産生細胞は、組換えレトロウイルス粒子を産生するように、構造タンパク質と関連するレトロウイルスベクターを包み込んでいる。

また更なる実施態様では、本発明は、(a) PRO20080ポリペプチド、(b) PRO20080ポリペプチドのアゴニストを前記哺乳動物へ投与することを含み、哺乳動物におけるTリンパ球の活性が増大する、哺乳動物においてTリンパ球の活性を増大させる方法を提供する。

また更なる実施態様では、本発明は、PRO20080ポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物へ投与することを含み、哺乳動物におけるTリンパ球の活性が低減させられる、哺乳動物においてTリンパ球の活性を減少させる方法を提供する。

また更なる実施態様では、本発明は、(a) PRO20080ポリペプチド、(b) PRO20080ポリペプチドのアゴニストを前記哺乳動物へ投与することを含み、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖が増大する、哺乳動物においてTリンパ球の増殖を増大させる方法を提供する。

また更なる実施態様では、本発明は、PRO20080ポリペプチドのアンタゴニストを前記哺乳動物へ投与することを含み、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖が低減させられる、哺乳動物においてTリンパ球の増殖を減少させる方法を提供する。

また更なる実施態様では、本発明は、PRO20080ポリペプチドのアンタゴニストを前記哺乳動物へ投与することを含み、Th1媒介遅延型過敏反応が低減させられる、哺乳動物においてTh1媒介遅延型過敏反応を減少させる方法を提供する。

また更なる実施態様では、本発明は、レポーター作成物を含むT細胞株をそのPRO20080アンタゴニストと接触させることを含む炎症性免疫反応を阻害する方法であって、上記炎症性免疫反応が阻害され測定される方法を提供する。

【0012】

B. 更なる実施態様

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここに記載するポリペプチドの任意のものをコードするDNAを含むベクターを提供する。そのようなベクターの任意のものを含む宿主細胞も提供される。例を挙げると、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母であってよい。ここに記載するポリペプチドの任意のもの製造方法がさらに提供され、それは、宿主細胞を、所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から所望のポリペプチドを回収することを含む。

他の実施態様では、本発明は、異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合した、ここに記載する任意のポリペプチドを含んでなるキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例は、エピトプタグ配列又は免疫グロブリンのFc領域に融合したここに記載の任意のポリペプチドを含む。

他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの任意のものに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。

10

20

30

40

50

さらに他の実施態様では、本発明は、ゲノム及びcDNAヌクレオチド配列又はアンチセンスプローブのような単離に有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、それらのプローブは上記又は下記に記載のヌクレオチド配列の任意のものから誘導されうる。

一実施態様では、本発明はPRO20080ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

一態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された完全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示された膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示された完全長アミノ酸配列の任意の他の特に定まった断片を有するPRO20080ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる。

【0013】

他の態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された完全長PRO20080ポリペプチドcDNAのコード配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くPRO20080ポリペプチドのコード配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示した膜貫通PRO20080ポリペプチドの細胞外ドメインのコード配列、又はここに開示された完全長アミノ酸配列の任意の他の特に定められた断片のコード配列を含むDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる。

さらなる態様では、本発明は、(a)ここに開示されたATCCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの任意のものによりコードされる同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列

同一性、あるいは少なくとも約 92% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 93% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 94% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 95% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 96% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 97% の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 98% の核酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約 99% の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子に関する。

【0014】

本発明の他の態様は、膜貫通ドメインが欠失されているか膜貫通ドメインが不活性化されている PRO20080 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、またはそのようなコード化ヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子を提供し、ここでそのようなポリペプチドの膜貫通ドメインがここに開示される。従って、ここに記載された PRO20080 ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考慮される。

他の実施態様は、PRO20080 ポリペプチドコード配列の断片、又はその相補鎖を対象とし、それらは、例えば、場合によっては抗 PRO20080 抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードする PRO20080 ポリペプチドの断片をコードする、ハイブリダイゼーションプローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされる。そのような核酸断片は通常少なくとも約 20 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 30 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 40 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 50 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 60 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 70 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 80 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 90 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 100 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 110 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 120 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 130 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 140 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 150 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 160 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 170 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 180 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 190 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 200 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 250 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 300 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 350 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 400 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 450 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 500 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 600 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 700 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 800 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 900 のヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1000 のヌクレオチド長であり、ここで、「約」という用語は、その参照長のプラス又はマイナス 10% の参照ヌクレオチド配列長を意味する。PRO20080 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くのよく知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを使用して、PRO20080 ポリペプチドコードヌクレオチド配列を他の既知のヌクレオチド配列にアラインメントさせ、どの PRO20080 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片(類)が新規であるかを決定することにより常套的に決定することができることに留意される。そのような PRO20080 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の全てがここで考慮される。また考慮されるものは、これらのヌクレオチド分子断片によりコードされる PRO20080 ポリペプチド断片、好ましくは抗 PRO20080 抗体に対する結合部位を含んでなるその PRO20080 ポリペプチド断片である。

【0015】

他の実施態様では、本発明は、上記で同定された単離された核酸配列の任意のものにコードされる単離された PRO20080 ポリペプチドを提供する。

ある態様では、本発明は、ここに開示された完全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを伴うか伴わない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、又はここに開示された完全長アミノ酸配列の任意

10

20

30

40

50

の他の特に定められた断片を有するPRO20080ポリペプチドに対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を含んでなる単離されたPRO20080ポリペプチドに関する。

10

さらなる態様では、本発明は、ここに開示されたATCCに寄託されたヒトタンパク質cDNAの任意のものによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を含んでなる単離されたPRO20080ポリペプチドに関する。

20

【0016】

特定の態様では、本発明は、N末端シグナル配列及び/又は開始メチオニンを持たない単離されたPRO20080ポリペプチドを提供し、それは上述したそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされる。これを生産する方法もまたここに記載され、ここで、これらの方法はPRO20080ポリペプチドの発現に適した条件下で適当なコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培養物からPRO20080ポリペプチドを回収することを含んでなる。

30

他の態様では、本発明は、膜貫通ドメインの欠失した又は膜貫通ドメインが不活性化された、単離されたPRO20080ポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞をPRO20080ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培養物からPRO20080ポリペプチドを回収することを含む。

さらに他の実施態様では、本発明は、ここで特定される天然PRO20080ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特定の態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗PRO20080抗体又は小分子である。

40

さらなる実施態様では、本発明は、PRO20080ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関し、それは、PRO20080ポリペプチドを候補分子と接触させ、前記PRO20080ポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターすることを含む。好ましくは、PRO20080ポリペプチドは天然PRO20080ポリペプチドである。

またさらなる実施態様では、本発明は、PRO20080ポリペプチド、又はここに記載するPRO20080ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗PRO20080抗体を、担体と組み合わせて含有する物質の組成物に関する。場合によっては、

50

担体は製薬的に許容される担体である。

本発明の他の実施態様は、PRO20080ポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗PRO20080抗体の、PRO20080ポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗PRO20080抗体に反応する状態の治療において有用な医薬の調製のための使用を対象とする。

【0017】

好ましい実施態様の詳細な説明

I. 定義

ここで使用される際の「PRO20080ポリペプチド」及び「PRO20080」という用語は、天然配列ポリペプチド及びポリペプチド変異体(ここで更に詳細に定義する)を含む。ここに記載されるPRO20080ポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。「PRO20080ポリペプチド」なる用語は、ここで記載する個々のPRO20080/数字ポリペプチドを意味する。「PRO20080ポリペプチド」に言及するこの明細書中の全ての開示は、ポリペプチドのそれぞれを個々に又は併せて意味する。例えば、調製、精製、誘導、抗体生成、投与、それを含有する組成物、それによる病気の治療などが、本発明の各ポリペプチドにそれぞれ関与している。また「PRO20080ポリペプチド」なる用語には、ここに開示されるPRO20080ポリペプチドの変異体も含まれる。

「天然配列PRO20080ポリペプチド」は、天然由来の対応するPRO20080ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列PRO20080ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列PRO20080ポリペプチド」という用語には、特に、特定のPRO20080ポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異体型(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の種々の実施態様において、天然配列PRO20080ポリペプチドは、添付図に示される完全長アミノ酸配列を含む成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び停止コドンは、図において太字及び下線で示した。しかし、添付図に開示したPRO20080ポリペプチドは、図面におけるアミノ酸位置1としてここに命名されるメチオニン残基で始まるように示されているが、図面におけるアミノ酸位置1の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をPRO20080ポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし可能でもある。

PRO20080ポリペプチド「細胞外ドメイン」又は「ECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを実質的に有しないPRO20080ポリペプチドの形態を意味する。通常、PRO20080ポリペプチドECDは、そのような膜貫通及び/又は細胞質ドメインを1%未満、好ましくはそのようなドメインを0.5%未満しか持たない。本発明のPRO20080ポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用されている基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、ここで最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、PRO20080ポリペプチドの細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又は明細書で同定されるように膜貫通ドメイン/細胞外ドメインの境界のいずれかの側から約5を越えないアミノ酸を含んでもよく、シグナルペプチドを伴う又は伴わない、そのようなポリペプチド、及びそれらをコードする核酸が本発明で考慮される。

【0018】

ここに開示する種々のPRO20080ポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書及び/又は添付図面に示す。しかし、注記するように、シグナルペプチドのC末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC末端境界のいずれかの側で約5アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC末

端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうる(例えば、Nielsen等, Prot. Eng. 10: 1-6 (1997)及びvon Heinje等, Nuc l. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986))。さらに、所定の場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、結果として一以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここで同定されるシグナルペプチドのC末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチドと、それらをコードするポリヌクレオチドが、本発明で考慮される。

「PRO20080ポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される完全長天然配列PRO20080ポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列PRO20080ポリペプチド配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示されたPRO20080の細胞外ドメイン、又はここに開示された全長PRO20080ポリペプチドの任意の他の断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する活性PRO20080ポリペプチドを意味する。このようなPRO20080ポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN又はC末端において一又は複数のアミノ酸残基が付加もしくは欠失されたPRO20080ポリペプチドが含まれる。通常、PRO20080ポリペプチド変異体は、ここに開示される完全長天然配列PRO20080ポリペプチド配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くPRO20080ポリペプチド配列、シグナルペプチドを伴うか伴わないここに開示されたPRO20080ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示された完全長PRO20080ポリペプチド配列の他の任意の特に定められた断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして又は少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、PRO20080変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、又は少なくとも約20アミノ酸長、又は少なくとも約30アミノ酸長、又は少なくとも約40アミノ酸長、又は少なくとも約50アミノ酸長、又は少なくとも約60アミノ酸長、又は少なくとも約70アミノ酸長、又は少なくとも約80アミノ酸長、又は少なくとも約90アミノ酸長、又は少なくとも約100アミノ酸長、又は少なくとも約150アミノ酸長、又は少なくとも約200アミノ酸長、又は少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0019】

ここに同定されるPRO20080ポリペプチド配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる同類置換も配列同一性の一部と考えないとした、特定のPRO20080ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下の

表 1 に与えられている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって著作され、表 1 に示したソースコードは米国著作権庁, Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、また表 1 に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【 0 0 2 0 】

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

分率 X / Y の 1 0 0 倍

ここで、 X は配列アラインメントプログラムALIGN-2の A 及び B のプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、A の B に対する % アミノ酸配列同一性は、B の A に対する % アミノ酸配列同一性とは異なると認識されるであろう。 % アミノ酸配列同一性の計算の例として、表 2 及び 3 は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO20080」と称されるアミノ酸配列に対する % アミノ酸配列同一性の計算方法を示し、ここで「PRO20080」は対象の仮定 PRO20080 ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」は対象の「PRO20080」ポリペプチドと比較され、これに対するポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」は、それぞれ異なる仮定アミノ酸残基を表す。

特に断らない限りは、ここで使用される全ての % アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2 コンピュータプログラムを用いて直ぐ上の段落に記載されるようにして得られる。しかしながら、 % アミノ酸配列同一性は、WU-BLAST-2 コンピュータプログラム(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用い、以下に記載するようにしても得られる。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータはデフォルト値に設定される。デフォルト値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値(T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。WU-BLAST-2を使用する場合、 % アミノ酸配列同一性値は、(a)天然 PRO20080 ポリペプチドから誘導された配列を有する対象 PRO20080 ポリペプチドのアミノ酸配列と、対象比較アミノ酸配列(つまり、対象 PRO20080 ポリペプチドが比較される PRO20080 ポリペプチド変異体であってもよい配列)との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、(b)対象の PRO20080 ポリペプチドのアミノ酸残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列 B に対して少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列 A を含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列 A が対象比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列 B が対象 PRO20080 ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 2 1 】

また、パーセントアミノ酸配列同一性は配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードするか、又は国立衛生研究所, Bethesda, MD. から得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全てはデフォルト値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e - 値 = 0.0

10

20

30

40

50

1、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

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

分率 X/Y の100倍

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

【0022】

「PRO20080変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO20080変異体核酸配列」は、以下に定義するような活性なPRO20080ポリペプチドをコードする核酸分子を意味し、ここに開示する完全長天然配列PRO20080ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列PRO20080ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチド有り又は無しのPRO20080ポリペプチド細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長PRO20080ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する。通常は、PRO20080変異体ポリヌクレオチドは、ここに開示する完全長天然配列PRO20080ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列PRO20080ポリペプチド配列、ここに開示するシグナル配列有り又は無しのPRO20080ポリペプチド細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長PRO20080ポリペプチド配列の任意の他の断片をコードする核酸配列と少なくとも約80%の核酸配列同一性、又は少なくとも約81%の核酸配列同一性、又は少なくとも約82%の核酸配列同一性、又は少なくとも約83%の核酸配列同一性、又は少なくとも約84%の核酸配列同一性、又は少なくとも約85%の核酸配列同一性、又は少なくとも約86%の核酸配列同一性、又は少なくとも約87%の核酸配列同一性、又は少なくとも約88%の核酸配列同一性、又は少なくとも約89%の核酸配列同一性、又は少なくとも約90%の核酸配列同一性、又は少なくとも約91%の核酸配列同一性、又は少なくとも約92%の核酸配列同一性、又は少なくとも約93%の核酸配列同一性、又は少なくとも約94%の核酸配列同一性、又は少なくとも約95%の核酸配列同一性、又は少なくとも約96%の核酸配列同一性、又は少なくとも約97%の核酸配列同一性、又は少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして又は少なくとも約99%の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然のヌクレオチド配列を包含しない。

通常は、PRO20080変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約30ヌクレオチド長、又は少なくとも約60ヌクレオチド長、又は少なくとも約90ヌクレオチド長、又は少なくとも約120ヌクレオチド長、又は少なくとも約150ヌクレオチド長、又は少なくとも約180ヌクレオチド長、又は少なくとも約210ヌクレオチド長、又は少なくとも約240ヌクレオチド長、又は少なくとも約270ヌクレオチド長、又は少なくとも約300ヌクレオチド長、又は少なくとも約450ヌクレオチド長、又は少なくとも約600ヌクレオチド長、又は少なくとも約900ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【0023】

ここに同定されるPRO20080ポリペプチドコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象のPRO20080核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えば

BLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。しかし、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、以下に記載するように、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表1に与えられている配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表1に示したソースコードは米国著作権庁、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能であり、また表1に与えたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0024】

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

分率 W/Z の100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なると評価されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、表4及び5は、「比較DNA」と称される核酸配列の「PRO20080-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示しており、ここで「PRO20080-DNA」は対象の仮定PRO20080コード化核酸配列を表し、「比較DNA」は対象の「PRO20080-DNA」核酸分子と比較され、これに対する核酸分子のヌクレオチド配列を表し、「N」、「L」及び「V」は、それぞれ異なる仮定ヌクレオチドを表す。

特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は直ぐ上の段落の上記のようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用い、以下に記載するようにしても得られる。殆どのWU-BLAST-2検索パラメータはデフォルト値に設定される。デフォルト値に設定されない、つまり調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値(T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。WU-BLAST-2を使用する場合、%核酸配列同一性値は、(a)天然配列PRO20080ポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象のPRO20080ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と、対象の比較核酸配列(即ち、対象のPRO20080ポリペプチドコード化核酸配列が比較される変異体PRO20080ポリペプチドであってもよい配列)との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一ヌクレオチドの数を、(b)対象のPRO20080ポリペプチドコード化核酸分子のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bに対して少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Aを含んでなる単離された核酸分子」という表現では、核酸配列Aが対象の比較核酸配列であり、核酸配列Bが対象のPRO20080ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

【0025】

また、パーセント核酸配列同一性を配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschul等, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードするか、又は国立衛生研究所、Bethesda, MD.から得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用

し、それら検索パラメータの全てはデフォルト値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

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

分率 W/Z の 100 倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なると評価されるであろう。

他の実施態様では、PRO20080変異体ポリヌクレオチドは、活性なPRO20080ポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに開示する完全長PRO20080ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズする核酸分子である。PRO20080変異体ポリペプチドは、PRO20080変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

【0026】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用する場合は、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、PRO20080ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツ(in situ)のポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一つの精製工程により調製される。

「単離された」PRO20080ポリペプチドコード化核酸又は他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、PROポリペプチドコード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、天然の細胞中に存在する特定のポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるポリペプチドコード化核酸分子を含む。

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

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような

10

20

30

40

50

位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位での連結により達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0027】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗PRO20080モノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、多エピトープ特異性を持つ抗PRO20080抗体組成物、一本鎖抗PRO20080抗体、及び抗PRO20080抗体の断片(下記参照)を包含している。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を意味する。

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

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；又は(3)42における50%ホルムアミド、5xSSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハート液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%の硫酸デキストランと、42における0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中の洗浄及び55での50%ホルムアミド、ついで55におけるEDTAを含む0.1xSSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって特定される。

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているように特定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度及び%SDS)の使用を含む。中程度の緊縮性条件の例は、20%ホルムアミド、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハート液、10%硫酸デキストラン、及び20mg/mlの変性切断サケ精子DNAを含む溶液中の37での終夜インキュベーション、ついで1xSSC中37-50でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

【0028】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したPRO20080ポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリ

ペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するに十分な残基を有しているが、その長さはそれが融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようになり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~50のアミノ酸残基(好ましくは約10~20のアミノ酸残基)を有する。

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

ここで目的としている「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然に生じるPRO20080の生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するPRO20080ポリペプチドの形態を称し、「生物学的」活性とは、天然又は天然に生じるPRO20080によって生ずる(阻害性又は刺激性の)生物学的機能であって、天然又は天然に生じるPRO20080が有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を除くものを意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然に生じるPRO20080が有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を称する。

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PRO20080ポリペプチドの生物学的活性を部分的もしくは完全に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。同様に「アゴニスト」なる用語も最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PRO20080ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然PRO20080ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機小分子等を含む。PRO20080ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、PRO20080ポリペプチドを候補アンタゴニスト又はアゴニストと接触させ、PRO20080ポリペプチドに通常付随する一又は複数の生物学的活性の検出可能な変化を測定することを含みうる。

【0029】

「治療」とは、目的が標的とする病理状態又は疾患を防止又は遅延(軽減)することにある、治癒的処置及び予防的又は防止的処置の両方を意味する。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患に罹りやすいもの又は疾患が防止されるべきものを含む。

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

治療の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び畜産用動物、及び動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギ等を含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

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

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピ

10

20

30

40

50

ロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN^{T M}、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICS^{T M}を含む。

【0030】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、(Fab')₂、及びFv断片；ダイアボディ(diabodies)；線形抗体(Zapata等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995])；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

10

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理は(Fab')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変ドメインの二量体からなる。この配置において各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してV_H-V_L二量体の表面に抗原結合部位を決定する。集合的には、6つのCDRは抗体に対して抗原結合特異性をもたらす。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

20

またFab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。ここで、Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つFab'を表す。(Fab')₂抗体断片は、最初はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

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

30

【0031】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンには5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらの幾つかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分類される。

「一本鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、FvポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはsFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

40

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖(V_H-V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、EP 404,097; WO 93/11161; 及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)に十分に記載されている。

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び/又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物

50

質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリ法(Lowry method)で測定した場合95重量%を超える抗体、最も好ましくは99重量%を超えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一になるまで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【0032】

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

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、抗体に直接又は間接的に抱合して「標識」抗体を生成する検出可能な化合物又は組成物を称する。標識は、それ自身検出可能でもよく(例えば、放射性標識又は蛍光標識)、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変化を触媒してもよい。

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに包含する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス(例えば、孔調整ガラス)、多糖類(例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンから形成されたものを含む。ある種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ;その他では精製カラム(例えばアフィニティークロマトグラフィーカラム)とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4275149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

「リボソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物(PRO20080ポリペプチド又はその抗体など)の送達に有用である。リボソームの成分は、通常は生体膜の脂質配置に類似する二層構造に配置される。

「小分子」とは、ここでは約500ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

【0033】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫システムの成分が、哺乳動物の病的状態を引き起こし、媒介し又は寄与等するものである疾患を意味する。また、免疫反応の刺激又は介在により疾患の進行に改善された効果が付与される疾患も含まれる。この用語に含まれるものは、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染症、免疫不全症、異常増殖等である。

「T細胞媒介疾患」という用語は、T細胞が直接的又は間接的に哺乳動物の病的状態を媒介するか寄与等する疾患を意味する。T細胞媒介疾患は細胞媒介効果、リンホカイン媒介効果等を伴い、例えばT細胞により分泌されるリンホカインによりB細胞が刺激されている場合はB細胞に関連した効果を伴う。

本発明で治療可能で、そのいくつかは免疫又はT細胞媒介性である免疫関連及び炎症疾患の例には、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症(強皮症)、特発性炎症ミオパシー(皮膚筋炎、多発性筋炎)、シェーグレン症候群、全身性血管炎症(systemic vasculitis)、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血(免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿)、自己免疫性血小板減少(特発性血小板減少性紫斑病、免疫仲介血小板減少)、甲状腺炎(グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患(糸球体腎炎、尿管間質性腎炎)、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン-バレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、伝染性肝炎(A型、B型、C型、D型、E型肝炎及び他の非肝炎性(nonhepatotropic)ウイルス)

10

20

30

40

50

、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎のような肝疾患、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎：クローン病)、グルテン過敏性腸疾患、ウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹等のアレルギー性疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎のような肺の免疫疾患、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患が含まれる。ウイルス性疾患、例えばAIDS(例えばHIV感染)、A型、B型、C型、D型及びE型肝炎、ヘルペス等、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染等の感染症も含まれる。

【0034】

「有効量」という用語は、特定の述べた目的を達成することになるPRO20080ポリペプチド及び/又はアゴニスト/アンタゴニストの濃度又は量である。PRO20080ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストの「有効量」は経験的に決定することができる。更に、「治療的有效量」は述べられた治療効果を達成するのに効果的なPRO20080ポリペプチド及び/又はアゴニスト/アンタゴニストの濃度又は量である。

ここで用いられる「細胞障害薬」なる用語は、細胞の機能を阻害又は抑制する及び/又は細胞破壊を生ずる物質を称する。この用語は、放射性同位体(例えば、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 及び Re^{186})、化学療法剤、及び細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素的活性毒素といった毒素、又はその断片を含むとされる。

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例は、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド(「Ara-C」)、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソイド類、例えばパクリタキセル(Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)及びドキシセタキセル(Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)、トキソテール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ピンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォスファミド、マイトマイシンC、マイトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン(米国特許第4,675,187号を参照のこと)、メルファラン、及び他の関連するナイトロジェンマスタードを含む。また、この定義に含まれるのは、タモキシフェン及びオナプリストン等の腫瘍へのホルモン作用を調節又は阻害するように作用するホルモン様薬剤である。

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞、特にここで同定される任意の遺伝子を過剰発現する癌細胞の成長を、インビトロ又はインビボで阻害する化合物又は組成物を称する。即ち、成長阻害剤は、S相でそのような遺伝子を過剰発現する細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S相以外の位置で)ブロックする薬剤、例えばG1停止又はM相停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM相ブロッカーは、ピンカス(ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキソール、及びトポIIインヒビター、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。G1停止させるこれらの薬剤は、S相停止にも溢流し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

【0035】

「サイトカイン」なる用語は、1つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエータとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュ

リン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体化ホルモン(LH)；肝臓成長因子；線維芽成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-及び-；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF-等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF-及びTGF-等のトランスフォーミング成長因子(TGF)；インシュリン様成長因子-I及びII；エリスロポエチン(EPO)；骨誘発因子；インターフェロン-、-、及び-等のインターフェロン；コロニー刺激因子(CSFs)、例えばマクロファージ-CSF(M-CSF)；顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)；及び顆粒球-CSF(G-CSF)；インターロイキン(ILs)、例えばIL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12；腫瘍壊死因子、例えばTNF-及びTNF-；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子である。ここで用いられる場合、サイトカインという用語は、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的な活性な均等物を含む。

10

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

20

ここで用いられる「炎症細胞」という用語は、単核細胞、好酸球、マクロファージ、及び多形核好中球(PMN)のような炎症反応を亢進する細胞を意味する。

ここで用いられる「遅延型過敏」又は「DTH」という用語は抗原によって引き起こされる免疫反応であり、免疫系の細胞成分、特に記憶T細胞によって媒介される。特徴的DTH応答は硬化、膨潤、浮腫及び24から72時間以内の病巣部位への単球の浸潤である。DTHはCoombs及びGell [Gell等, (1968) *Clinical Aspects in Immunology*. Blackwell, Oxford]によってIV型過敏と分類されている。

30

【0036】

【表 1】

表 1

```

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

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

```

10

20

30

表 1 (続き)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

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

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

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

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

    endgaps = 0;
    ofile = "align.out";
    nw();
    readjumps();
    print();
    cleanup(0);
}

```

10

20

main

30

40

表 1 (続き)

```

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

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

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

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

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

```

表 1 (続き)

```

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

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

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

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

```

...nw

10

20

30

表 1 (続き)

```

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

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[ ]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */
10

#include "nw.h"

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

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

print()
{
    print
20
    {
        int     lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
            cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
            pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
            ly -= pp[0].spc;
30
        }
        else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
            pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
            lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
            lastgap = len0 - dmax0 - 1;
            lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
            lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
            ly -= lastgap;
40
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
        pr_align();
    }
}

```

表 1 (続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int      lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;                                /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;                                     10

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

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

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

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

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

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

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

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

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

```

...getmat

10

20

30

pr_align

40

表 1 (続き)

```

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

        more++;

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

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

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

```


表 1 (続き)

<pre> int i; register char *px; for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != '!'; px++, i++) (void) putc(*px, fx); for (; i < lmax+P_SPC; i++) (void) putc(' ', fx); /* these count from 1: * ni[] is current element (from 1) * nc[] is number at start of current line */ for (px = out[ix]; *px; px++) (void) putc(*px&0x7F, fx); (void) putc('\n', fx); } /* * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock() */ static stars() { int i; register char *p0, *p1, cx, *px; if (!*out[0] (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') !*out[1] (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' ')) return; px = star; for (i = lmax+P_SPC; i; i--) *px++ = ' '; for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) { if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) { if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) { cx = '*'; nm++; } else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0) cx = '!'; else cx = ' '; } else cx = ' '; *px++ = cx; } *px++ = '\n'; *px = '\0'; } </pre>	<p>...putline</p> <p>10</p> <p>stars</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
---	--

表 1 (続き)

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

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

表 1 (続き)

```

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

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXXX";      /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;                               10

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

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

    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}                                           20

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

    char    line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;                                           30

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

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

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

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

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

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

/*
 * get final jmps from dx[ ] or tmp file, set pp[ ], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

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

```

...getseq

10

20

30

40

g_alloc

readjmps

表 1 (続き)

...readjumps

```

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

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

```

10

20

30

40

表 1 (続き)

```

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

```

【 0 0 3 7 】

【 表 2 】

10

20

表 2

PRO20080	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYYYY	(長さ = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(2つのポリペプチド間において、ALIGN-2によって決定された同一に一致するアミノ酸残基の数) ÷
 (PRO20080 ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

30

5 ÷ 15 = 33.3%

【 表 3 】

表 3

PRO20080	XXXXXXXXXXX	(長さ = 10 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYYZZYZ	(長さ = 15 アミノ酸)

40

% アミノ酸配列同一性=

(2つのポリペプチド間において、ALIGN-2によって決定された同一に一致するアミノ酸残基の数) ÷
 (PRO20080 ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

5 ÷ 10 = 50%

【表 4】

表 4

PRO20080-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(長さ = 14 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(長さ = 16 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性=

(2つの核酸配列間において、ALIGN-2によって決定された同一に一致するヌクレオチド残基の数) ÷
(PRO20080 核酸配列のヌクレオチド酸残基の総数) =

6 ÷ 14 = 42.9%

10

【表 5】

表 5

PRO20080-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNLLLVV	(長さ = 9 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性=

(2つの核酸配列間において、ALIGN-2によって決定された同一に一致するヌクレオチド残基の数) ÷
(PRO20080 核酸配列のヌクレオチド酸残基の総数) =

4 ÷ 12 = 33.3%

20

【0038】

30

II . 本発明の組成物と方法

A . 完全長 PRO20080 ポリペプチド

本発明は、本出願で PRO20080 ポリペプチドと称されるポリペプチドをコードする新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、種々の PRO20080 ポリペプチドをコードする cDNA が同定され単離された。別々の発現ラウンドで生成されたタンパク質には異なる PRO20080 番号が与えられるが、UNQ 番号は全ての与えられた DNA 及びコード化タンパク質に独特であり、変わることはないことを記しておく。しかしながら、単純化のために、本明細書において、ここに開示した完全長天然核酸分子にコードされるタンパク質並びに上記の PRO20080 の定義に含まれる更なる天然相同体及び変異体は、それらの起源又は調製方式に関わらず、「PRO20080 / 番号」で呼称する。

40

下記の実施例に開示するように、種々の cDNA クローンが ATCC に寄託されている。これらのクローンの正確なヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載した PRO20080 ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

【0039】

B . PRO20080 ポリペプチド変異体

ここに記載した完全長天然配列 PRO20080 ポリペプチドに加えて、PRO200

50

80変異体を調製できると考えられる。PRO20080変異体は、PRO20080DNAに適切なヌクレオチド変化を導入することにより、あるいは所望のPRO20080ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者であれば、グリコシル化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化がPRO20080の翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

天然完全長配列PRO20080又はここに記載したPRO20080の種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5364934号に記載されている保存的及び非保存的変異についての技術及び指針の任意のものを用いてなすことができる。変異は、天然配列PRO20080と比較してPRO20080のアミノ酸配列が変化することになるPRO20080をコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも一つのアミノ酸のPRO20080の一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換による。どのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、PRO20080の配列を、相同性な既知のタンパク質分子のものと比較し、相同性の高い領域になされるアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては約1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体について完全長又は成熟天然配列が示す活性を試験することにより決定される。

10

20

【0040】

PRO20080ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、完全長天然タンパク質と比較した際に、N末端又はC末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。ある種の断片は、PRO20080ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

PRO20080断片は、多くの一般的な技術の任意のものによって調製されうる。所望のペプチド断片は化学合成されてもよい。代替方法は、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって定められる部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによるPRO断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することを含む。DNA断片の所望の末端を定めるオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、PRO20080ポリペプチド断片は、ここに開示した天然PRO20080ポリペプチドと少なくとも一つの生物学的及び/又は免疫学的活性を共有する。

30

特定の実施態様では、対象の保存的置換を、好ましい置換との表題で表6に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表6に置換例と命名され、又は以下にアミノ酸分類に関してさらに記載されるような、より実質的な変化が導入され、生成物がスクリーニングされる。

【0041】

40

【表 6】

表 6

元の残基	例示的置換	好ましい置換	
Ala (A)	val; leu; ile	val	
Arg (R)	lys; gln; asn	lys	
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln	
Asp (D)	glu	glu	
Cys (C)	ser	ser	
Gln (Q)	asn	asn	
Glu (E)	asp	asp	
Gly (G)	pro; ala	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu	10
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	
Met (M)	leu; phe; ile	leu	
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	
Pro (P)	ala	ala	
Ser (S)	thr	thr	
Thr (T)	ser	ser	
Trp (W)	tyr; phe	tyr	
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu	20

【 0 0 4 2 】

PRO20080ポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の高を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループ分けすることができる：

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

30

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

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発等の当該分野において公知の技術を使用して作成することができる。部位特異的突然変異誘発 [Carter等, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wells等, Gene, 34: 315 (1985)]、制限選択突然変異誘発 [Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415 (1986)] 又は他の周知の技術が、PRO20080変異体DNAを製造するために、クローン化されたDNAに実施できる。

40

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であ

50

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

【0043】

C . P R O 2 0 0 8 0 の修飾

P R O 2 0 0 8 0 の共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の1型は、P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、P R O 2 0 0 8 0 の選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることを含む。二官能性試薬での誘導体化が、例えばP R O 2 0 0 8 0 を水不溶性支持体マトリクスあるいは抗P R O 2 0 0 8 0 抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

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

本発明の範囲内に含まれるP R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、この目的で意図されるのは、天然配列P R O 2 0 0 8 0 に見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失(存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる)、及び/又は天然配列P R O 2 0 0 8 0 に存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、一又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列P R O 2 0 0 8 0 (O-結合グリコシル化部位)への付加、又は置換によってなされてもよい。P R O 2 0 0 8 0 アミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通じて変更されてもよい。

【0044】

P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に公開されたW O 8 7 / 0 5 3 3 0、及びApI n及びWriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)に記載されている。

P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグリコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddin等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)により、及びEdge等, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

P R O 2 0 0 8 0 の共有結合的修飾の他の型は、P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドの、種

10

20

30

40

50

々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法での結合を含む。

また、本発明のPRO20080は、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したPRO20080を含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとPRO20080との融合を含む。エピトープタグは、一般的にはPRO20080のアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなPRO20080のエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってPRO20080を容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(poly-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field等, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan等, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD)タグ及びその抗体 [Paborsky等, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hopp等, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin等, Science, 255:192-194 (1992)]； α -チューブリンエピトープペプチド [Skinner等, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]を含む。

それに換わる実施態様では、キメラ分子はPRO20080の免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘンシ」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも一つの可変領域に換えてPROポリペプチドの可溶化(膜貫通ドメイン欠失又は不活性化)形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5428130号を参照のこと。

【0045】

D. PRO20080の調製

以下の説明は、主として、PRO20080核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりPRO20080を生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてPRO20080を調製することができると考えられる。例えば、PRO20080配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい [例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)；Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照]。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機(Foster City, CA)を用いて、製造者の指示により実施してもよい。PRO20080の種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的な方法を用いて結合させて完全長PRO20080を生産してもよい。

【0046】

1. PRO20080をコードするDNAの単離

PRO20080をコードするDNAは、PRO20080 mRNAを保有してそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができる。従って、ヒトPRO20080 DNAは、実施例に記載されるよ

10

20

30

40

50

うに、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリーから簡便に得ることができる。またPRO20080-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリーから又は公知の合成方法(例えば、自動化核酸合成)により得ることもできる。

ライブラリーは、対象の遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(PRO20080に対する抗体又は少なくとも約20-80塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。PRO20080ポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR法を使用するものである [Sambrook等, 上掲; Dieffenbach等, PCR Primer: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

10

【0047】

下記の実施例には、cDNAライブラリーのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、疑陽性が最小化されるよう十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³²P標識されたATPのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrook等に与えられている。

20

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、GenBank等の公共データベース又は他の個人の配列データベースに寄託され利用可能とされている他の周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は完全長にわたっての(アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれかでの)配列同一性は、この分野で知られた、そしてここに記載した方法を用いて決定することができる。

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

30

【0048】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したPRO20080生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及びSambrook等, 上掲に見出すことができる。

40

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質転換の方法、例えば、CaCl₂、CaPO₄、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shaw等, Gene, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開のWO89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法を使用することができる。哺乳動物細胞の宿主系形質移入の一般的な態様は米国特許第4399216号に記載されている。酵

50

母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keown等, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及び Mansour等, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

【0049】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31,446); 大腸菌X1776 (ATCC31,537); 大腸菌株W3110 (ATCC27,325)及びK5772 (ATCC53,635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、*E. coli*、エンテロバクター、エルビニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス (*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスプテリス (*B. subtilis*)及びバシリリチェニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD266710に記載されたバシリリチェニフォルミス41P)、シュドモナス、例えば緑膿筋及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有する大腸菌W3110株1A2; 完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌W3110株9E4; 完全な遺伝子型 *tonA prt3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r* を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55,244); 完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac)169 degP ompT rbs7ilvG kan^r* を有する大腸菌W3110株37D6; 非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4; 及び1990年8月7日発行の米国特許第4946783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0050】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、PRO20080コード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセスプロンプ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日公開のEP139383); クルベロミセスホスツ (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号; Fleer等, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばケー・ラクチス (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, J. Bacteriol. 154(2): 737-742 [1983])、ケー・フラギリス (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、ケー・ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、ケー・ウイケラミイ (*K. wickeramii*) (ATCC 24,178)、ケー・ワルチイ (*K. waltii*) (ATCC 56,500)、ケー・ドロソフィラルム (*K. drosophilum*) (ATCC 36,906; Van den Berg等, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、ケー・テモトレランス (*K. thermotolerans*) 及びケー・マルキシアナス (*K. marxianus*); ヤロウィア (*Yarrowia*) (EP 402,226); ピッチャパストリス (*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sheekrishna等, J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); カンジダ; トリコデルマレーシア (*Trichoderma reesei*) (EP 244,234); アカパンカピ (Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]);

シュワニオマイセス (*schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス (*occidentalis*) (1990年10月31日公開のEP 394,538)；及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム (*Tolyocladium*) (1991年1月10日公開のWO 91/00357)；及びコウジ菌、例えば偽巢性コウジ菌 (Ballance等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn等, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984])及びクロカビ (Kelly及びHynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985])が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック (*methylotropic*) 酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ (*Hansenula*)、カンジダ、クロエケラ (*Kloeckera*)、ピチア (*Pichia*)、サッカロミセス、トルロプシス (*Torulopsis*)、及びロドトルラ (*Rhodotorula*) からなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)に記載されている。

10

【0051】

グリコシル化PRO20080の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスペラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 及びCOS細胞を含む。多くの特異的な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株 (COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株 (293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -D H F R (CHO, Urlaub及びChasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)) ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

20

【0052】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

PRO20080をコードする核酸 (例えば、cDNA又はゲノムDNA) は、クローニング (DNAの増幅) 又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

30

PRO20080は直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるPRO20080-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリンナーゼ、lppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インペルターゼリーダー、因子リーダー (酵母菌属 (*Saccharomyces*) 及びクルイベロマイシス (*Kluyveromyces*) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、白体 (*C. albicans*) グルコアミラーゼリーダー (1990年4月4日公開のEP 362179)、又は1990年11月15日に公開されたWO 90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

40

50

【 0 0 5 3 】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点 (S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V 又は B P V) は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

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

哺乳動物細胞に適切な選択性マーカーの例は、D H F R あるいはチミジンキナーゼのように、P R O 2 0 0 8 0 -コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することのできるものである。野生型 D H F R を用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub 等により、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980) に記載されているようにして調製され増殖された D H F R 活性に欠陥のある C H O 株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミド Y R p 7 に存在する t r p 1 遺伝子である [Stinchcomb 等, Nature, 282:39(1979); Kingman 等, Gene, 7:141(1979); Tschemper 等, Gene, 10:157(1980)]。t r p 1 遺伝子は、例えば、A T C C 番号 4 4 0 7 6 あるいは P E P 4 - 1 のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

【 0 0 5 4 】

発現及びクローニングベクターは、通常、P R O 2 0 0 8 0 -コード化核酸配列に作用可能に結合し、m R N A 合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Cahng 等, Nature, 275:615 (1978); Goeddel 等, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えば t a c プロモーター [deBoer 等, Proc. Natl. Acad. S 30
ci. USA, 80:21-25 (1983)] を含む。細菌系で使用するプロモーターもまた P R O 2 0 0 8 0 をコードする D N A と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ (S.D.) 配列を有する。

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman 等, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess 等, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセラートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクロム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは E P 7 3 6 5 7 に更に記載されている。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの P R O 2 0 0 8 0 の転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス (1989年7月5日公開の U K 2 2 1 1 5 0 4)、アデノウイルス (例えばアデノウイルス 2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス及びサルウイルス 4 0 (SV40) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例 50

えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

【0055】

より高等の真核生物によるPRO20080をコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、PRO20080コード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、PRO20080をコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのPRO20080の合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; 及びEP 117,058に記載されている。

【0056】

4. 遺伝子増幅/発現の検出

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

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列PRO20080ポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はPRO20080DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【0057】

5. ポリペプチドの精製

PRO20080の形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X100)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。PRO20080の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

PRO20080を、組換え細胞タンパク質又はポリペプチドから精製することが望ま

しい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相 H P L C；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えば D E A E によるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；S D S - P A G E；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックス G - 7 5 を用いるゲル濾過；I g G のような汚染物を除くプロテイン A セファロースカラム；及び P R O 2 0 0 8 0 のエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定の P R O 2 0 0 8 0 の性質に依存する。

10

【 0 0 5 8 】

E . 組織分布

P R O 2 0 0 8 0 を発現する組織の位置は、種々のヒト組織での m R N A の発現を測定することにより同定可能である。このような遺伝子の位置により、P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドの活性の刺激又は阻害の影響を最も受けていると思われる組織の情報が提供される。また、特異的組織における遺伝子の位置により、以下で検討される活性阻止アッセイについての試料組織も提供される。

上記したように、種々の組織における遺伝子発現は、従来の、m R N A の転写の定量化のためのノーザンプロット (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 [1980])、サザンプロット、ドットプロット (D N A 分析)、又はインサイツハイブリダイゼーションにより、ここに提供する配列にもとづいて適切な標識プローブを用いて測定できる。あるいは、D N A 二重鎖、R N A 二重鎖、及び D N A - R N A ハイブリッド二重鎖又は D N A - タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識可能な抗体を用いてもよい。

20

あるいは、種々の組織における遺伝子発現は、遺伝子産物の発現を直接定量化するための、組織断片の免疫組織化学的染色、及び細胞培地又は体液のアッセイ等の免疫学的方法によっても測定できる。免疫組織化学的染色及び / 又は試料液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物から調製される。簡便には、抗体は天然配列 P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドに対して、又は P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドをコードする D N A 配列に基づく合成ペプチドに対して、又は特異的抗体エピトープをコードし、P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドをコードする D N A に融合した外因性配列に対して調製され得る。抗体を生成する一般的技術、及びノーザンプロット及びインサイツハイブリダイゼーションの特定のプロトコールは以下に提供する。

30

【 0 0 5 9 】

F . 抗体結合性の研究

P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドの活性は、組織細胞上での P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドの効果を阻害する抗 P R O 2 0 0 8 0 抗体の能力が試験される抗体結合性の研究によって更に証明できる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロ抱合体抗体を含み、その調製は以下に記載する。

抗体結合性の研究は、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイなどの既知のアッセイ法で実施してよい。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

40

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

サンドイッチアッセイは 2 つの抗体の使用を含み、各々、検出されるタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドイッチアッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第 1 の抗体に結合し、その後第 2 の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の 3 成分複合体が形成される。例えば米国特許第 4 3 7 6 1 1 0 号参

50

照。第2の抗体は検出可能部分で標識され(直接サンドイッチアッセイ)、あるいは検出可能部分で標識された抗-免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい(間接サンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの一形態はE L I S Aアッセイであり、この場合の検出可能部分は酵素である。

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

【0060】

G. 細胞ベースアッセイ

細胞ベースアッセイ及び免疫関連疾患の動物モデルは、ここで同定されたポリペプチドと遺伝子との関係、及び免疫関連疾患の進行及び病理との関係をさらに理解するために使用することができる。 10

異なる方法では、特定の免疫関連疾患に含まれることが知られた細胞型の細胞をここに記載のcDNAで形質移入し、これらのcDNAの免疫機能を刺激又は阻害する能力を分析する。適当な細胞を所望の遺伝子で形質移入し、免疫機能活性を監視できる。このような形質移入株化細胞は、次いで、例えばT細胞増殖又は炎症細胞の侵入を調節するといった、免疫機能を刺激又は阻害するポリ-又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の能力を試験するのに使用できる。ここに同定した遺伝子のコード化配列で形質移入した細胞は、さらに、免疫関連疾患治療用の候補薬の同定に使用できる。

さらに、(下記のような)トランスジェニック動物から誘導された一次培地は、ここでの細胞ベースアッセイに使用できるが、安定な株化細胞が好ましい。トランスジェニック動物から連続株化細胞を誘導する技術はこの分野で良く知られている(Small等, Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985]参照)。 20

【0061】

一つの適切な細胞ベースアッセイは混合リンパ球反応(MLR)である。Current Protocols in Immunology, unit3.12; J.E. Coligan, A.M.Kruisbeek, D.H.Marglies, E. M. Shevach, W.Strober編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Incから出版。このアッセイでは、試験化合物が活性化したT細胞の増殖を刺激又は阻害する能力をアッセイする。レスポンダーT細胞の懸濁液を同種刺激細胞で培養し、トリチウム標識化チミジンの取込によりT細胞の増殖度合いを測定する。このアッセイはT細胞反応性の一般的な測定法である。多くのT細胞が応答し、IL-2の活性化をもたらすため、このアッセイにおける応答性の差異は、応答細胞によるIL-2生産の差異に部分的に反映する。MLRの結果を、標準的なリンホカイン(IL-2)検出アッセイにより証明することができる。上掲のCurrent Protocols in Immunology, 3.15.6.3.。 30

MLRアッセイにおける増殖性T細胞応答は、アッセイされる分子の直接的な有糸分裂促進特性又は外的な抗原誘発活性化による可能性がある。PRO20080ポリペプチドのT細胞刺激活性のさらなる証明は、同時刺激アッセイにより得ることができる。T細胞活性化にはT細胞レセプター(TCR)を通して媒介される抗原に特異的なシグナル、及び第2のリガンド結合相互作用、例えばB7(CD80、CD86)/CD28結合相互作用を通して媒介される同時刺激シグナルが必要である。CD28の架橋により、活性化T細胞によるリンホカインの分泌が増加する。T細胞活性化はネガティブ又はポジティブ効果を有するリガンドの結合を通してネガティブ及びポジティブコントロールの双方を有する。CD28及びCTLA-4はB7に結合するIgスーパーファミリーの糖タンパク質に関連している。B7に結合するCD28は、ポジティブなT細胞活性化同時刺激効果を有し;逆にB7に結合するCTLA-4はT細胞非活性化効果を有する。Chambers. C.A. 及び Allison. J.P., Curr. Opin. Immunol. (1997)9: 396. Schwartz, R.H., Cell(1992)71: 1065; Linsey, P.S. 及び Ledbetter. J.A. Annu. Rev. Immunol.(1993)11: 191; June, C.H.等 Immunol. Today(1994)15: 321; Jenkins. M.K., Immunity(1994)1: 405. 同時刺激アッセイにおいて、PRO20080ポリペプチドはT細胞同時刺激又は阻害活性をアッセイするものである。 40

【0062】

本発明のPRO20080ポリペプチド、並びにT細胞の増殖の刺激剤(同時刺激剤)である本発明の他の化合物及びアゴニスト、例えばアゴニスト抗体で、例えばMLR及び同時刺激アッセイで決定されるようなものは、免疫機能の貧弱さ、最適下限又は不適切さに特徴付けられる免疫関連疾患の治療に有用である。これらの疾患はT細胞(及びT細胞媒介免疫性)の増殖及び活性化を刺激し、刺激化合物、例えば刺激性PROポリペプチドの投与により哺乳動物における免疫反応を増強することにより治療される。刺激性ポリペプチドは、例えばPRO20080ポリペプチド又はそのアゴニスト抗体であり得る。

本発明の刺激化合物の直接的用途は、プライムされたT細胞上で発現するリガンド(4-1BB)に結合し、T細胞活性化及び成長の信号を発する腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーである4-1BB糖タンパク質を用いる実験において確認されている。Anderson, M.E.等, J.Immunol.(1994)24:2219。 10

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

さらに、免疫刺激又は増強効果はMLRアッセイにおいて阻害することが見出されたPRO20080の活性に拮抗又はこれをブロックすることにより達成することができる。化合物の阻害活性を無効にすることで、真の刺激効果が生じる。適切なアンタゴニスト/ブロック化合物は阻害タンパク質を認識し、これに結合する抗体及びその断片であり、それにより該タンパク質とそのレセプターとの効果的な相互作用がブロックされ、レセプターを通じたシグナル化が阻害される。この効果は、おそらくCTLA-4結合による阻害シグナルの除去することにより、T細胞増殖を増強する抗CTLA-4抗体を使用する実験で確認されている。Walunas, T.L.等, Immunity(1994)1:405。 20

【0063】

他方、T細胞増殖/活性化又はリンホカイン分泌の直接阻害剤であるPRO20080ポリペプチド並びに本発明の他の化合物は、免疫反応の抑制に直接使用することができる。これらの化合物は、過剰活性、最適上限(superoptimal)又は自己免疫反応により特徴付けられる免疫関連疾患の治療、及び免疫反応の程度を低減するのに有用である。本発明の化合物のこの用途は、レセプターB7に結合するCTLA-4がT細胞を非活性化するという上述の実験により確認されている。本発明の直接阻害化合物は類似した方法で機能する。血管透過性を抑制する化合物の用途は炎症を低減することが期待される。このような用途は過度の炎症に関連した病状の治療に有益である。 30

あるいは、刺激PRO20080ポリペプチドに結合し、これらの分子の刺激効果をブロックする化合物、例えば抗体により、真の阻害効果が生じ、T細胞の増殖/活性化及び/又はリンホカイン分泌を阻害することにより、T細胞媒介免疫反応を抑制するために使用することができる。ポリペプチドの刺激効果をブロックすると、哺乳動物の免疫反応が抑制される。この用途は抗-IL2抗体を使用する実験において確認されている。これらの実験において、抗体はIL2に結合し、そのレセプターへのIL2の結合が阻害され、よってT細胞阻害効果が達成される。

【0064】

H. 動物モデル

さらに、インビトロにおける細胞ベースアッセイの結果は、インビボ動物モデルを使用し、T細胞機能アッセイにより証明することができる。免疫関連疾患の進行及び病因におけるここに同定される遺伝子の役割を更に理解するために、そして抗体、及び小分子アンタゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアンタゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。これらのモデルのインビボ性質により、特にヒト患者における反応を予測できる。免疫関連疾患の動物モデルは、非組換え及び組換え(トランスジェニック)動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植等により、細胞を同系マ 50

ウスに導入することにより作成される。

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

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

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

【0065】

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

接触性過敏は、細胞媒介免疫機能の単純遅延型過敏インビボアッセイである。この手順において、遅延型過敏反応が生じている外因性ハプテンに皮膚を暴露し、測定して定量する。接触性過敏は最初に敏感相、続いて顕現相を含む。顕現相はTリンパ球が以前接触したことのある抗原に遭遇したときに生じる。腫脹及び炎症が生じ、ヒトアレルギー性接触皮膚炎の優れたモデルが作成される。適切な手順は、Current Protocols in Immunology, ; J.E. Coligan, A.M.Kruisbeek, D.H.Marglies, E. M.Shevach, 及びW.Strober編, John Wiley & Sons, Inc, unit4.2に詳細に記載されている。また、Grabbe, S.及びSchwarz, T. Immun. Today 19(1):37-44(1998)を参照のこと。

関節炎用の動物モデルは、コラーゲン-誘発関節炎である。このモデルはヒト自己免疫慢性関節リウマチの臨床的、組織的及び免疫学的特徴を共有し、ヒト自己免疫関節炎用の許容可能なモデルである。マウス及びラットモデルは滑膜炎、軟骨の腐食及び肋軟骨下(subchondral)骨により特徴付けられる。本発明の化合物は上掲のCurrent Protocols in Immunology unit15.5.に記載されているプロトコールを使用し、自己免疫関節炎に対する活性を試験することができる。また、Issekutz, A.C.等, Immunology(1996)88:569に記載されているCD18及びVLA-4インテグリンに対するモノクローナル抗体を使用するモデルも参照のこと。

喘息モデルでは、抗原誘発気道反応性亢進、肺好球菌増加症及び炎症が卵白アルブミン

10

20

30

40

50

で動物を感作させることで誘発され、ついで、エアロゾルにより送達された同様のタンパク質で動物を攻撃する、と記載されている。いくつかの動物モデル(モルモット、ラット、非ヒト霊長類)では、エアロゾル抗原で攻撃されたヒトにおけるアトピー性喘息に類似した徴候が示された。本発明の化合物の、喘息治療における活性及び有効性を試験するのに適した手順は、Wolyniec, W.W.等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.(1998)18:777とそこに引用された文献に記載されている。

【0066】

さらに、本発明の化合物は乾癬用疾患用の動物モデルにおいて試験することができる。T細胞が乾癬の病原である証拠も示唆されている。本発明の化合物はSchon, M.P.等, Nat. Med.(1997)3:183により記載されているscid/scidマウスモデルにおいて試験することができ、マウスは組織病理学的皮膚傷害に類似した乾癬を示す。他の適切なモデルはNickoloff, B.J.等, Am. J. Path.(1995)146:580に記載されているようにして調製されたヒト皮膚/scidマウスキメラである。

組換え(トランスジェニック)動物モデルは、ここで同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作成のための標準的技術を用いて、対象の動物のゲノムに導入することにより加工できる。トランスジェニック操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルを含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、前核マイクロインジェクション(Hoppe及びWanger, 米国特許第4,873,191号); 胚系列へのレトロウイルス媒介遺伝子転移(例えば、Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); 胚幹細胞での遺伝子標的化(Thompson等, Cell 56, 313-321 [1989]); 胚のエレクトロポレーション(Lo, Mol. Cell Biol. 3, 1803-1814 [1983]); 精子媒介遺伝子転移(Lavitrano等, Cell 57, 717-73 [1989])を含む。概説のためには、例えば、米国特許第4736866号を参照のこと。

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

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

【0067】

さらに、特定組織中への免疫細胞の浸潤を測定するために、動物を、例えば組織学的検査により免疫疾患の病原の徴候について検査してもよい。またブロック実験も実施することができ、ここでトランスジェニック動物は本発明の化合物で処理され、化合物のT細胞増殖刺激又は阻害の度合いが測定される。これらの実験において、上述のようにして調製したPRO20080ポリペプチドに結合するブロック抗体は動物に投与され、免疫機能における効果が測定される。

あるいは、動物の胚性細胞に導入されたポリペプチドをコードする変更ゲノムDNAと、その同じポリペプチドをコードする内在性遺伝子との間の相同組換えの結果、ここに同定するポリペプチドをコードする欠陥又は変更遺伝子を有する「ノックアウト」動物を作成することができる。例えば、特定のポリペプチドをコードするcDNAは、確立された技術に従って当該ポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。特定のポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数千ベース含む[例えば、相同組換えベクターの記述についてはThomas及びCapecchi, Cell, 51: 503 (1987)を参照のこと]。ベクターは胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレー

10

20

30

40

50

ションによって)導入され、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Li等, Cell, 69:915 (1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照]。その後、キメラ胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、胚が「ノックアウト」動物を作ると言われる。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、ポリペプチドが存在しないことによるある種の病理的状態及び病理的状態の進行に対して防御する能力によって特徴付けられる。

10

【0068】

I. 免疫アジュバント治療

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

20

【0069】

J. 候補薬についてのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定される遺伝子にコードされるポリペプチド、又はその生物学的に活性な断片と結合又は抱合する化合物、あるいはコード化ポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、特に小分子候補薬の同定に適したものにす、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含む。考慮される小分子とは、合成有機又は無機化合物を含み、それらは、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、(ポリ)ペプチド-免疫グロブリン融合体、特に、限定されないが、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、単鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びそれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。アッセイは、種々の形式で実施でき、この分野で良く特徴付けられたタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ及び細胞ベースのアッセイを含む。全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

30

40

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるポリペプチド、即ち候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタプレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、そのペプチドを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可

50

能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

【0070】

候補化合物がここで同定される遺伝子にコードされる特定のタンパク質と相互作用するが結合しない場合、そのタンパク質との相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)に開示されているようにして、Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chien等, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)] に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより監視することができる。酵母菌 GAL 4 などの多くの転写活性化因子は、2つの物理的に別個のモジュールドメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系(一般に「二重ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL 4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL 1-lacZリポーター遺伝子のGAL 4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL 4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、 β -ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。二重ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKERTM)は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

ここで同定される遺伝子と他の細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験することができる：通常は、遺伝子の生成物及び細胞内又は外成分を含む反応混合物を、条件下で2つの生成物が相互作用及び結合する時間に渡って調製する。試験化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物有り又は無しで実施する。さらに、第3の反応混合物にプラシーボを添加してポジティブ対照としてもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は外成分との結合(複合体形成)は上記のように監視する。対照反応において複合体が形成され、試験化合物を含む反応混合物ではしないことは、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【0071】

K. 免疫関連疾患の治療のための組成物及び方法

免疫関連疾患の治療に有用な組成物は、限定するものではないが、例えば、T細胞の増殖/活性化、リンホカインの放出、又は免疫細胞の浸潤等の免疫機能を阻害又は刺激するタンパク質、抗体、有機小分子、ペプチド、リンペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、三重螺旋分子を含む。

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

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

10

20

30

40

50

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

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

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの任意のもの又は任意の組合せにより、及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【0072】

L. 抗PRO20080抗体

本発明は、さらに抗PRO20080抗体を提供する。このような抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロ抱合体抗体が含まれる。

【0073】

1. ポリクローナル抗体

抗PRO20080抗体はポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、一又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、PRO20080ポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に抱合させるのが有用である。このような免疫原性タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンベットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、完全フロイントアジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

【0074】

2. モノクローナル抗体

あるいは、抗PRO20080抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, *Nature*, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫化剤は、典型的にはPRO20080ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化細胞株は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髓腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培養培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培養培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプテリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質が

10

20

30

40

50

H G P R T 欠乏性細胞の増殖を阻止する。

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

【 0 0 7 5 】

ついでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、P R O 2 0 0 8 0 に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ (R I A) や酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) 等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において既知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば Munson 及び Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) によるスキッチャード分析法によって測定することができる。

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させることができる [上掲の Goding]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの変法イーグル培地及び R P M I - 1 6 4 0 培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

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

また、モノクローナル抗体は、組換え D N A 法、例えば米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードする D N A は、常套的な方法を用いて (例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのような D N A の好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、D N A は発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサルの C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、D N A は、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [米国特許第 4,816,567号; Morrison 等, 上掲]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の 1 つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

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

一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、その断片、特に F a b 断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。

【 0 0 7 6 】

3 . ヒト及びヒト化抗体

10

20

30

40

50

本発明の抗PRO20080抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含みうる。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる [Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

10

【0077】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯類のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(Winter)及び共同研究者 [Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

20

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリ [Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)] を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる [Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77(1985); Boerner等, J. Immunol., 147(1): 86-95(1991)]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化してマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5545807号; 同第5545806号; 同第5569825号; 同第5625126号; 同第5633425号; 同第5661016号、及び次の科学文献: Marks等, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

30

40

また、抗体は上述した既知の選択及び/又は突然変異誘発法を使用し、親和成熟させてもよい。好ましい親和成熟抗体は、成熟抗体が調製される(一般的にマウス、ヒト化又はヒトの)出発抗体のものよりも、5倍、より好ましくは10倍、さらに好ましくは20又は30倍の親和性を有する。

【0078】

4. 二重特異性抗体

50

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本ケースにおいて、結合特異性の一方はPRO20080に対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく(Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539[1983])。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO93/08829、及びTraunecker等, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

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

【0079】

WO96/27011に記載された他のアプローチによれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」は、大きなアミノ酸側鎖が小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えられた第2の抗体分子の界面に作り出される。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

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

【0080】

大腸菌から Fab' 断片を直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(ab')_2$ 分子の製造を記述している。各 Fab' 断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞及びErbb2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記

10

20

30

40

50

述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体の F a b '部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

10

【0081】

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J. Immunol. 147:60(1991)。

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられたPRO20080ポリペプチドの2つの異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗PRO20080ポリペプチドアームは、特定のPRO20080ポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T細胞レセプター分子(例えばCD2、CD3、CD28、又はB7)等の白血球上のトリガー分子又はFcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFcレセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定のPRO20080ポリペプチドを発現する細胞に細胞障害薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はPRO20080結合アーム及び細胞障害薬又は放射性キレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETAと結合するアームを有する。対象の他の二重特異性抗体はPRO20080ポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合する。

20

【0082】

5. ヘテロ抱合体抗体

ヘテロ抱合体抗体は2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4676980号]及びHIV感染の治療のために[W091/00360; W092/200373; EP03089]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート(mercaptobutyrimidate)、及び例えば米国特許第4676980号に開示されているものが含まれる。

30

【0083】

6. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば免疫関連疾患の治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した相補鎖媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を有しうる。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体はまた、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより相補鎖溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参

40

50

照。

【0084】

7. 免疫複合体

本発明はまた、化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害薬、あるいは放射性同位体(即ち、放射性抱合)に抱合された抗体を含む免疫複合体にも関する。

このような免疫抱合体の生成に有用な化学療法剤は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(Phytolaca americana)タンパク質(P A P I、P A P I I、及びP A P - S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(saponaaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelolin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合抗体の生成に利用可能である。例として、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re を含む。

抗体及び細胞障害薬の抱合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートH C L等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されたように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(M X - D T P A)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。W O 9 4 / 1 1 0 2 6 参照。

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

【0085】

8. 免疫リポソーム

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

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

【0086】

M. 製薬組成物

10

20

30

40

50

本発明の活性な P R O 2 0 0 8 0 分子(例えば P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチド、抗 P R O 2 0 0 8 0 抗体、及び/又はその変異体)、並びに上述のスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、免疫関連疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

本発明の活性な P R O 2 0 0 8 0 分子、好ましくはポリペプチド又は抗体の治療用製剤は、所望される程度の純度を持つ活性分子を、親凍結乾燥化製剤又は水性溶液の形態で、任意の製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される(Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンズアルコニウムクロリド；ベンズエトニウムクロリド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及び m-クレゾールなど)；低分子量(約 10 残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；E D T A 等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Z n-タンパク質錯体)；及び/又はトウイーン(TWEEN)^{T M}、プルロニクス(PLURONICS)^{T M}、及びポリエチレングリコール(P E G)等の非イオン性界面活性剤を含む。

ここで開示されたスクリーニングアッセイで同定された化合物は、同様の方式でこの分野で知られた標準技術を用いて製剤することができる。

リポフェクション又はリポソームも P R O 2 0 0 8 0 分子を細胞に導入するのに使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、又は組換え D N A 技術によって生成できる。(例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993]を参照のこと)。

【 0 0 8 7 】

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に 1 以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞障害薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性 P R O 2 0 0 8 0 分子は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

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

徐放性製剤又は P R O 2 0 0 8 0 分子を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸と -エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT

10

20

30

40

50

^{T M} (乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37%の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通じた分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

【0088】

N. 治療方法

本発明のポリペプチド、抗体及び他の活性物質は、組織への炎症細胞の浸潤、T細胞の増殖の刺激、T細胞の増殖の阻害、血管透過性の増加又は低減又はそれらの阻害によって特徴付けられるものを含む、T細胞媒介疾患等の種々の免疫関連疾患及び病状を治療するために使用できると考えられる。

本発明のポリペプチド、抗体及び他の化合物で治療される病状又は疾患の例には、限定するものではないが、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ様関節炎、若年性慢性関節炎、骨関節症、脊椎関節症、全身性硬化症(強皮症)、特発性炎症ミオパシー(皮膚筋炎、多発性筋炎)、シェーグレン症候群、全身性血管炎症症(systemic vasculitis)、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血(免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿)、自己免疫性血小板減少(特発性血小板減少性紫斑病、免疫仲介血小板減少)、甲状腺炎(グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)、真性糖尿病、免疫仲介腎疾患(糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎)、例えば多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン-バレー症候群、及び慢性炎症脱髄性多発神経障害、肝疾患、例えば伝染性肝炎(A型、B型、C型、D型、E型肝炎及び他の非肝炎性(nonhepatotropic)ウイルス)、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎;クローン病)、グルテン過敏性腸疾患、ウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹等のアレルギー性疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎のような肺の免疫疾患、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患が含まれる。

全身性紅斑性狼瘡において、疾患の中心媒介物は自己タンパク質/組織に対する自己反応性抗体の産出であり、続いて、免疫媒介炎症が生じる。抗体は直接的又は間接的に組織傷害を媒介する。しかし、Tリンパ球は組織ダメージに直接関与しないことが示されており、Tリンパ球は自己反応性抗体の発育に必要である。よって、疾患の発生はTリンパ球に依存している。腎臓、肺、筋骨格、皮膚粘膜、眼、中枢神経系、心臓血管系、胃腸管、骨髄及び血液を含む複数の器官及び系が臨床的な影響を受ける。

【0089】

リウマチ様関節炎(RA)は、主に複数の関節の滑膜に係る慢性全身性自己免疫疾患であり、結果として関節軟骨に傷害が生じる。病原はTリンパ球依存であり、リウマチ因子、自己IgGに指向する自己抗体の生成を付随し、結果として関節体液及び血液において高レベルに達する免疫複合体が形成される。関節におけるこれらの複合体は、滑膜へのリンパ球及び単球の顕著な浸潤と、続いての顕著な滑膜変化を誘発しうる;多数の好中球の添加により同様の細胞で浸潤されるならば関節空間/体液でもである。影響を受けている組織は、多くの場合対照的なパターンで主に関節である。しかしながら、2つの主要な形態の関節外疾患も生じる。一方の形態は進行中の進行性関節疾患及び肺線維症の局部的障害、血管炎、及び皮膚潰瘍を伴う関節外障害の発達である。関節外疾患の第2の形態はいわゆる

るフェルティール症候群であり、RA疾患経路の末期、時々関節疾患が鎮静した後に生じ、好中球減少、血小板減少及び脾肥大の存在に關与する。これは、梗塞、皮膚潰瘍及び壊疽の形成を伴う多数の器官及び血管炎に付随する。多くの場合、患者では、発病している関節上にある皮下組織にリウマチ様小結節が発達し；小結節は、混合炎症細胞浸潤に包圍された壊死性中心を有する。RAで生じる可能性のある他の徴候には：心外膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、肺線維症を伴う間質性肺炎、乾性角結膜炎、及びリウマチ様小結節が含まれる。

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

【0090】

脊椎関節症は、一般的にHLA-B27遺伝子生成物の発現に關連した、いくつかの共通した臨床的特徴を有する疾患のグループである。疾患には：強直性脊椎炎(spondylitis)、ライター症候群(反応性関節炎)、炎症性大腸疾患に關連した関節炎、乾癬に關連した脊椎炎、若年発症脊椎関節症及び未分化脊椎関節症が含まれる。区別する特徴には、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；HLA-B27(血清学的には、クラスI MHCのHLA-B座位にある定義された対立遺伝子)を伴う炎症非対称性関節炎；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に關連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導における鍵として関わるほとんどの細胞はCD8+Tリンパ球であり、クラスI MHC分子により付与される抗原を標的としている細胞である。CD8+T細胞は、MHCクラスI分子により発現した外来ペプチドであるかのように、クラスI MHC対立遺伝子HLA-B27と反応する。HLA-B27のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原エピトープを模倣し、よってCD8+T細胞の反応が誘発されると仮定されている。

全身性硬化症(強皮症)は病因がよく知られていない。疾患の特徴は皮膚の硬化であり；これは活性化炎症プロセスにより誘発される。強皮症は局部的又は全身的であり；血管障害が一般的で、微小血管系における内皮細胞傷害は全身性硬化症の発達における初期の重要な事象であり；血管傷害は免疫媒介されうる。免疫学的基準では、皮膚障害における単核細胞浸潤の存在、多くの患者において抗細胞核抗体の存在を意味する。多くの場合、ICAM-1は皮膚障害における線維芽細胞の細胞表面をアップレギュレーションし、これらの細胞と相互作用するT細胞が疾患の病因における役割を担っていることが示唆される。關連する他の器官には：胃腸管：萎縮症及び線維症があり、結果として異常なぜん動/運動性となっている平滑筋；腎臓：小弓形及び小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎皮質の血流が低下し、タンパク尿、高窒素血症及び高血圧になる同心性内皮下内膜増殖；骨格筋：萎縮、間質性線維症；炎症：肺：間質性肺炎及び間質性線維症；及び心臓：収縮バンド壊死、癍痕/線維症が含まれる。

【0091】

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

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

全身性血管炎症症は主な障害が炎症で、続いて血管にダメージを受け、結果として影響

10

20

30

40

50

を受けた脈管により供給される組織に虚血/壊死/変性が生じ、最終的な末端器官ではいくつかのケースで機能障害になるといった疾患である。また、第2の障害として血管炎(vasculitides)、又は他の免疫炎症媒介疾患、例えばリウマチ様関節炎、全身性硬化症等、特に免疫複合体の形成に関連した疾患等の続発症が生じるおそれがある。主な全身性血管炎症症グループの疾患には：全身壊死性血管炎：多動脈炎結節(polyarteritis nodosa)、アレルギー性脈管炎、及び肉芽腫症、多脈管炎：ヴェゲナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症：及び巨細胞動脈炎が含まれる。種々の血管炎には：粘膜皮膚リンパ節症候群(MLN S又は川崎病)、単離したCNS血管炎、ベヘット(Behet's)病、閉塞性血栓性血管炎(バージャー病)及び皮膚壊死性細静脈炎(venulitis)が含まれる。列挙した血管炎のほとんどの種類の病原メカニズムは、主に脈管壁に免疫グロブリン複合体が付着し、続いてADC C、相補鎖活性又は双方を介して炎症反応が誘発されることによると考えられている。 10

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

自己免疫性溶血性貧血、免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿を含む自己免疫性溶血性貧血は、赤血球細胞(いくつかのケースにおいては、血小板を含む他の血液細胞)表面で発現する抗原と反応する抗体が産出される結果によるものであり、相補鎖媒介溶解及び/又はADC C/Fc-レセプター-媒介メカニズムを介して、その抗体被覆細胞の除去に反映される。 20

【0092】

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

グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎を含む甲状腺炎は、甲状腺内に多くの場合特異的に存在するタンパク質と反応する抗体の産出を伴う、甲状腺抗原に対する自己免疫反応の結果によるものである。実験用モデルには：内在的モデルラット(BUF及びBBラット)及びチキン(肥満チキン種)；誘導性モデル：チログロブリン、甲状腺ミクロソーム抗原(甲状腺ペルオキシダーゼ)を用いた動物の免疫化が含まれる。 30

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

糸球体腎炎及び尿細管間質性腎炎を含む免疫仲介腎疾患は、腎抗原に対する自己反応性抗体又はT細胞が産出される結果により直接的に、又は他の非腎抗原に対して反応する、腎臓における抗体及び/又は免疫複合体の沈着の結果により間接的に、腎組織に抗体又はT細胞媒介傷害が生じることによるものである。よって、免疫複合体の形成の結果生じる他の免疫媒介疾患により、間接的続発症等の免疫媒介腎疾患が誘発される。直接的及び間接的免疫メカニズムの双方により、結果として腎組織における障害発達が産出/誘発されるといった炎症反応が生じ、器官機能が損なわれ、いくつかのケースでは腎臓機能不全が進行する。体液及び細胞免疫メカニズムに双方が障害の病原に関与している。 40

多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン-バレー症候群；及び慢性炎症脱髄性多発神経障害は、自己免疫基準であり、神経脱髄が生じて、オリゴデンドロサイト又はミエリンに直接的に起因するダメージの結果によるものと考えられている。MSにおいて、疾患の誘発及び進行はTリンパ球に依存すると示唆される証拠がある。多発性硬化症は、Tリンパ球依存性であり、再発性弛緩経路又は慢性進行経路のいずれかを有する脱髄疾患である。病因はよく知られていないが、ウイルス感染、遺伝的素因、環境及び自己免疫性の全てが寄与している。障害はT細胞媒介 50

小膠細胞の優先的湿潤、及びマイクロファージの浸潤を含み；CD4 + Tリンパ球は障害において優先的な細胞型であった。オリゴデンドロサイトの細胞死及び続く脱髄のメカニズムはよく知られていないが、Tリンパ球の駆動によると思われる。

好酸球性肺炎；特発性肺線維症及び過敏性肺炎を含む炎症及び線維症の肺疾患には、調節されない免疫炎症反応が関連している。反応を阻害することは治療的に有益なことである。

水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患は自己抗体により媒介され、Tリンパ球に依存して発生する。

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

【0093】

喘息；アレルギー性鼻炎；アトピー性皮膚炎；食物過敏症及び蕁麻疹等を含むアレルギー性疾患はT細胞依存性である。この疾患は炎症により誘発されるTリンパ球、及びIGE媒介炎症、又は双方の組合せにより主に媒介される。

拒絶反応及び移植片対宿主疾患(GVHD)を含む移植関連疾患はTリンパ球依存性であり；Tリンパ球の機能を阻害することで改善される。免疫及び/又は炎症反応への介在が有益である他の疾患には、限定するものではないがウイルス感染(限定するものではないがAIDS、A型、B型、C型、D型及びE型肝炎、ヘルペス)、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染(T細胞を刺激する分子(又は誘導体/アゴニスト)を治療に利用し、感染要因に対する免疫反応性を増強することができる)、T細胞を刺激する(分子/誘導体/アゴニスト)を治療に利用し、受け継ぎ、獲得し、感染誘発された(例えばHIV感染)又は医原性(例えば化学療法)免疫欠損疾患の病状に対する免疫反応増強することができる免疫欠損疾患、及び腫瘍症が含まれる。

ヒト癌患者の中には、腫瘍細胞上の抗原に反応する抗体及び/又はTリンパ球が発育しているものもいることが示されている。また、腫瘍症のある動物モデルにおいても、免疫反応を増強することで、特定の腫瘍症が拒絶又は退行する結果になることが示されている。Tリンパ球反応を増強する分子は、腫瘍症に対する免疫反応を増強するインビボでの有用性を有する。Tリンパ球増殖反応を増強する分子(又は拮抗方式で同様のレセプターに影響を及ぼす小分子アゴニスト又は抗体)は、癌の治療に治療的に使用することができる。

【0094】

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

本発明の化合物、例えばポリペプチド又は抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入(鼻孔内、肺内)経路などにより投与される。抗体の静脈内又は吸入投与が好ましい。

免疫アジュバント治療、他の治療的養生法において、抗癌剤を、本発明のタンパク質、抗体又は化合物の投与と組み合わせて投与してもよい。例えば、本発明の免疫アジュバントで治療される患者は、抗癌剤(化学療法剤)又は放射線治療を受けてもよい。このような化学療法剤の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学療法に対する調製法及び服薬スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学療法剤は、免疫アジュバントの投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。加えて、タモキシフェン等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン(EP616812参照)を、それらの分子について知られた用量で付与してもよい。

また、他の免疫疾患に関連した、又は腫瘍に関連した抗原に対する抗体、例えばCD20、CD11a、CD18、ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4、又は血管

10

20

30

40

50

内皮因子(VEGF)に結合する抗体を投与することも好ましい。別に、あるいは加えて、同一のもの又はここに開示した二又はそれ以上の異なる抗原に結合する二又はそれ以上の抗体を患者に同時投与してもよい。ときどきは、患者に一又は複数のサイトカインを投与することも有利である。

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

例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1-20\text{mg}/\text{kg}$)のポリペプチド又は抗体が、例えば、一又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のいずれにしても、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ の範囲又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

10

【0095】

O. 製造品

本発明の他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質を含む(例えばPRO20080分子を含む)製造品が提供される。この製造品は容器と使用説明書とを含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの種々の材料から形成されてよい。容器は、状態を診断し治療するのに有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の活性剤は通常、本発明のポリペプチド又は抗体である。容器上又は添付される使用説明書又はラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品はさらに、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容されるバッファーを含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

20

30

【0096】

P. 免疫関連疾患の診断及び予後診断

ある種の免疫関連疾患で過剰発現されるタンパク質等の細胞表面タンパク質は候補薬剤又は疾患治療の優れた標的である。同じタンパク質は免疫関連疾患で増幅された遺伝子にコードされる分泌タンパク質とともに、これらの疾患の診断及び予知における用途が見出される。例えば、多発性硬化症、リウマチ様関節炎、又は他の免疫関連疾患で増幅された遺伝子のタンパク質産物に対する抗体は診断又は予知として使用できる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅又は過剰発現された遺伝子にコードされるタンパク質(「マーカー遺伝子産物」)の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、フルオロメトリー、又はこの分野で知られた他の技術によって監視できる。これらの技術は、過剰発現した遺伝子が細胞表面タンパク質をコードする場合に特に適切である。このような結合アッセイは、本質的に上述したように実施される。

40

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。この手法はまた、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布も決定できるようにする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

50

以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【実施例】

【0097】

実施例で言及されている市販試薬は、特に別の説明をしていない場合には製造者の使用説明に従って使用した。ATCC受託番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションである。

実施例1：ヒトPRO20080をコードするcDNAクローンの単離

Swiss-Prot公的データベースからの約950の既知の分泌タンパク質からの細胞外ドメイン(ECD)配列(あれば、分泌シグナル配列を含む)を配列データベースの検索に使用した。データベースは、公的データベース(例えば、GenBank)を含んでいた。この例では、GenBankのゲノムDNA配列を、スタンフォード大学からライセンスを受けた遺伝子予測(prediction)プログラムGENSCANを用いて解析した。GENSCANは遺伝子コード領域を予測し、ECD検索を実施できる配列を生じる。検索は、コンピュータプログラムBLAST又はBLAST2[Altschul等, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)]を用いて、ECDタンパク質配列の、配列の6フレーム翻訳との比較として実施した。既知のタンパク質をコードせず、BLASTスコア70(90の場合もある)又はそれ以上を持つ比較物を、必要ならばプログラム「phrap」(Phil Green, ワシントン大学, シアトル, ワシントン)で集団化してコンセンサスDNA配列に構築した。

コンセンサス配列はここでDNA145436と命名する。

【0098】

DNA145436コンセンサス配列に基づいて、1)PCRにより対象とする配列を含むcDNAライブラリーを同定するため、また2)PRO20080の完全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドを合成した。正方向及び逆方向PCRプライマーは一般的に20から30ヌクレオチドの範囲であり、しばしば約100-1000bp長のPCR産物を生じるように設計される。プローブ配列は典型的には40-55bp長である。所定の場合には、コンセンサス配列が約1-1.5kbより大きな場合に更なるオリゴヌクレオチドを合成する。完全長クローンに対して幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリーからのDNAを上掲のAusubel等, Current Protocols in Molecular Biologyに従って、PCRプライマー対でのPCR増幅によりスクリーニングした。ついでポジティブライブラリーを、プローブオリゴヌクレオチド及びプライマー対の一方を用いて対象の遺伝子をコードするクローンの単離に使用した。

PCRプライマー(正方向及び逆方向)を合成した:

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

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

更に、以下のヌクレオチド配列を有していたコンセンサスDNA145436配列から合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを作成した:

ハイブリダイゼーションプローブ:

5'-CTTACCCAGTCCTACTCCCTGCAACTCAGCAACCTGAAGATGGAAGACA-3'(配列番号: 5)

【0099】

様々な組織からの50の異なったヒトcDNAライブラリーのプールをクローニングに使用した。cDNAクローンの単離に用いたcDNAライブラリーは、Invitrogen, San Diego, CAからのもの等の市販試薬を用いて常法によって構築した。cDNAは、NotI部位を含むオリゴdTでプライムし、平滑末端でSalIヘミキナーゼアダプターに結合させ、NotIで切断し、ゲル電気泳動でおよそのサイズ分類し、適切なクローニングベクター(pRKB又はpRKD等; pRK5BはSfiI部位を含まないpRK5Dの

10

20

30

40

50

前駆体である；Holmes等，Science，253：1278-1280（1991）参照）に、独特のX h o I及びN o t I部位において、所定の方向でクローニングした。

上記のようにして単離したクローンのDNA配列決定により、完全長PRO20080ポリペプチドの完全長DNA配列[ここでDNA161000-2896と呼ぶ]（図1、配列番号：1）とPRO20080ポリペプチドの誘導タンパク質配列が得られた。

上で同定された完全長クローンは、ヌクレオチド位置62-64に見かけの翻訳開始部位を、ヌクレオチド位置1058-1060に停止シグナルを持つ単一のオープンリーディングフレームを含む（図1、配列番号：1）。予測されるポリペプチド前駆体は332アミノ酸長で、およそ37345ダルトンの算定分子量とおよそ6.72の推定pIを有している。図2（配列番号：2）に示された完全長PRO20080配列の分析により、図2に示されるように様々な重要なポリペプチドドメインが存在していることが証明され、その重要なポリペプチドドメインに与えられた位置はおおよそ上述の通りである。PRO20080アミノ酸配列はCD84と22%の同一性、SLAMと14%の同一性、2B4と11%の同一性を有している。

ついでDNA161000-2896を米国バージニア州20110-2209マナッス、ユニバーシティ通り10801のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションにブタペスト条約の条項に従って寄託した。クローンDNA161000-2896は2000年4月18日にATCCに寄託し、ATCC寄託番号PTA-1731が付与された。

【0100】

実施例2：複数のヒト組織中でのPRO20080の発現

クローンテック（Palo Alto, CA）から複数の組織ノーザンブロットを得た。これらのブロットを、³²P-ATP標識で標識したランダムプライマーによって作製された完全長PRO20080 cDNAに対応するプローブでハイブリダイズした。ブロットを2XSSC/0.2%SDSで3X、42にて0.2XSSC/0.1%SDSで1X、洗浄した。ついでブロットを、一晚、増感スクリーンを用いてX-OMATフィルムに現像した。結果を図3に示す。これは、PRO20080レセプターが脾臓とリンパ節に高度に発現される一方、PRO20080の低レベルの発現が胸腺と骨髄で観察され、胎児肝臓には僅かな発現があることを示している。脳、心臓、大腸又は肺では発現は検出されなかった。

【0101】

実施例3：複数のヒト細胞株中でのPRO20080の発現

PRO20080の細胞表面発現解析を、1%FBS/PBS中で 1×10^6 細胞を洗浄することにより実施した。PRO20080の細胞外ドメインに対して得られたALEXA-488標識モノクローナル抗体を用いて、百万細胞当たり1ugの濃度で細胞株上の表面染色を検出した。ついで細胞を再び洗浄してフローサイトメトリーによって分析した。Jurkat、MOLT3及びMOLT4のようなT細胞誘導株の全てがPRO20080の細胞表面染色に対して陽性であった。PRO20080の発現試験で陽性であったB細胞株はRaji、Ramos及びDauidi株であり、残りのB細胞株ではPRO20080は検出されなかった。これは図4に示されている。

【0102】

実施例4：刺激によるPRO20080の発現の増加

細胞表面の発現が、図5に示すように、単離されたヒト末梢T細胞についてのFACS分析によって検出された。ヒトT細胞は皿結合抗CD3抗体（0.1ug/mlで被覆；Pharminen）及び抗CD28抗体（1ug/mlで被覆；Pharminen）を用いて活性化させた。ウェル当たり 0.5×10^6 細胞を蒔いた。休止T細胞と活性化T細胞の両方についてフローサイトメトリーにより24時間と48時間におけるPRO20080又はCD69の発現を分析した。PRO20080の発現は、実施例3に記載されているように、PRO20080の細胞外ドメインに対して得られたALEXA-488標識モノクローナル抗体を用いて検出した。活性化マーカーであるCD69は、FITC標識抗体（Phar

10

20

30

40

50

mingen) を用いてフローサイトメトリーにより検出した。抗CD3及び抗CD28抗体での単離T細胞の同時刺激により、同時刺激後24時間で(データは示さず)FACS分析によって測定して細胞表面上でのPRO20080の発現が増加し、48時間では更に大きく増加した(図5a)。同時刺激のない場合のCD4+CD45RO+記憶T細胞の表面上のPRO20080の高度な発現も決定した(図5b)

【0103】

実施例5: PRO20080のホモタイプな結合

PRO20080がSLAMと同様にPRO20080-PRO20080会合の形でそれ自身と相互作用するかどうかを決定するために、ELISAアッセイを実施した。精製PRO20080-Fc融合タンパク質を2µgの濃度で標準的なNunc Maxisorb ELISAプレート上にコートし、増加濃度のビオチン標識PRO20080をインキュベートした後、洗浄した。ビオチン標識タンパク質の結合をストレプトアビジン-HRP複合体を用いて検出した。ビオチン標識PRO20080が結合PRO20080ポリペプチドに結合できるが適当なタンパク質コントロールには結合できないことを決定した(図6)。

PRO20080のECDが細胞表面上の野生型PRO20080と相互作用できるかどうかを決定するために、COS7細胞に、コントロールとして用いるIgドメインを含むヒトCD4又は野生型PRO20080を形質移入した。形質移入後48時間経ったところで、形質移入細胞を洗浄し、5µg/mlの精製PRO20080ECD-Fc融合タンパク質プラス5%の通常のヤギ血清と共にインキュベートした。処理細胞を洗浄し、15分間、4%パラホルムアルデヒド中に固定した後、1:400の希釈でビオチン標識ヤギ抗ヒトFc抗体(Jackson Immunoresearch)を用いてプローブした。30分のインキュベーション後、固定細胞を洗浄し、続いて検出のために1:400希釈のCy3結合ストレプトアビジン標識(Jackson Immunoresearch)でプローブした。蛍光はPRO20080を形質移入したCOS7細胞においてのみ検出され、CD4を形質移入したCOS7細胞には検出されなかったが、これは、Igドメイン反復をまた含むレセプターのCD4を形質移入した細胞では染色は検出されないの、可溶性PRO20080が特異的な形で細胞結合PRO20080に結合できることを実証している。これは図7に示されている。

【0104】

最後に、BIAcore(登録商標)アッセイを実施してHisタグPRO20080がそれ自身と結合するかどうかを決定した。結合割合は、複合体の形成を時間の関数として観察できる任意の方法によって決定することができる。BIAcore(登録商標)分析では、バイオセンサー表面に固定されたタンパク質とのタンパク質の結合を測定する(Rich及びMyszka, Curr. Opin. Biotechnol. 11:54-61 (2000)による概説)。HisタグPRO20080のホモタイプ相互作用は、BIAcore評価ソフトウェアのバージョン3を使用して計算し、100µMより大きいKdの弱い相互作用であることが見出された。これは、HisタグPRO20080がCD40コントロールタンパク質と結合しなかったので特異的相互作用であった。このアッセイによって定量されて決定されたKdは、200µMと過去に報告されている[Mavaddat等, (2000) J Biol Chem 275(36): 28100-28109]SLAMのホモタイプ相互作用と同じオーダーである。

併せて考えると、これらのアッセイからの結論は、SLAMと同様に、PRO20080は自己相互作用を有しているということである。

【0105】

実施例6: PRO20080-CD3同時刺激はT細胞の増殖と増加したINF-の産生を誘導する。

T細胞上でのSLAMとCD3の架橋は同時刺激効果を有しており、T細胞の増殖とINF-の産生を増加させる。PRO20080が同様の効果を有しているかどうかを決定するために、ヒト末梢T細胞を単離し、抗PRO20080抗体と抗CD3抗体の最適以下の用量で同時刺激した。Nunc Maxisorpの96ウェルのプレートを0.

10

20

30

40

50

1 $\mu\text{g/ml}$ の抗 CD 3 抗体 (Pharmingen)、1 $\mu\text{g/ml}$ の抗 CD 2 8 (Pharmingen)、又は PRO 2 0 0 8 0 の細胞外ドメインに対して産生された 1 $\mu\text{g/ml}$ の抗 PRO 2 0 0 8 0 抗体で一晩コートした。PRO 2 0 0 8 0 -FC 融合タンパク質を 5 $\mu\text{g/ml}$ でコートした。ヒト CD 4 + T 細胞を抗 CD 4 ビーズ及び全血からの AutoMACS ソーティングを使用して精製した。同時刺激アッセイに対してはウェル当たり 0.5×10^6 T 細胞を 3 組蒔いた。3 日目の同時刺激後に、上清を INF- 又は IL-4 のサイトカイン分析 (ELISA 又は LumineX-(Upstate Biotechnology)) のために除去し、細胞に [3H]チミジンを 16 時間パルスして増殖を測定した。この同時刺激は、抗 CD 3 及び抗 CD 2 8 処理の同時刺激によって誘導される増殖の増加に匹敵する増殖の大幅な増加を誘導した。抗 PRO 2 0 0 8 0 抗体処理だけでは増殖を誘導しなかった。抗 CD 3 抗体処理だけでは増殖を誘導しなかった。これは図 8 a に示されている。 10

除かれた上清中の INF- の産生が測定され、未処理細胞又は抗 PRO 2 0 0 8 0 抗体又は抗 CD 3 抗体だけで処理された細胞に対して有意に増加することが見出された。抗 PRO 2 0 0 8 0 抗体及び抗 CD 3 抗体での同時刺激による INF- の産生の増加は、抗 CD 3 抗体及び抗 CD 2 8 抗体での同時刺激によって得られる INF- の産生の増加に匹敵していた。抗 PRO 2 0 0 8 0 抗体だけでは INF- の産生の如何なる検出可能な増加も誘導しなかった。これは図 8 b に示されている。

夾雑物による増殖の非特異的な誘導は、煮沸抗 PRO 2 0 0 8 0 及び PRO 2 0 0 8 0 調製物の使用によって除外した。T 細胞の増殖はこれらの条件下では観察されなかった (データは示さず)。 20

【0106】

実施例 7 : PRO 2 0 0 8 0 は SAP と相互作用する。

SLAM ファミリーメンバーは、x がアミノ酸であるコンセンサス (T x Y x x V / I) の 2 ないし 4 の SAP 結合モチーフを含む。SAP は SLAM の非リン酸化及びリン酸化形態に結合するが、SLAM がリン酸化されている場合により多くの量の SAP 結合が見られる。SLAM はまた細胞内タンパク質 SHP 1 及び SHP 2 に結合し、また SAP に結合する [Castro 等, (1999) J. Immunol. 163(11): 5860-5870, Lewis 等, (2001 Clin Immunol 100(1): 15-23, Shlapatska 等, (2001) J. Immunol. 166(9): 5480-5487]。PRO 2 0 0 8 0 は分子の細胞内ドメイン中に 2 つの SAP 結合モチーフを含み (図 2)、SAP、SHP 1 及び SHP 2 が PRO 2 0 0 8 0 に結合するかどうかを決定するために、 10^7 の Jurkat T 細胞を 37 で 15 分間ペルバナジン酸塩で処理し、1% NP-40 及びプロテアーゼ及びホスファターゼインヒビターを伴う RIPA バッファーに溶解させた。可溶化液を 10 $\mu\text{g/ml}$ の IgG 1 及びプロテイン G で事前に清澄にした; その後、PRO 2 0 0 8 0 の細胞外ドメインに対する 10 μg の IgG 1 モノクローナル抗体混合物を使用して免疫沈降させた。ついで、全ての試料を 4 - 20% の SDS-PAGE ゲル (Novagen Madison, WI) に流した。SAP の結合を、ウサギにおいて完全長 SAP に対して得た抗体 (Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA) を使用してウェスタンブロットにより検出した。SAP を 5% の粉乳に希釈した 2 $\mu\text{g/ml}$ の抗体を用いて検出した。PRO 2 0 0 8 0 のウェスタンブロットのこれらの結果は図 9 a に示す。未処理細胞では PRO 2 0 0 8 0 は SAP に結合しなかった。PRO 2 0 0 8 0 はペルバナジン酸塩処理細胞で SAP と結合したが、これはリン酸化依存性相互作用を意味にしている。SHP 1 と SHP 2 は Jurkat 細胞に発現されるが、PRO 2 0 0 8 0 との相互作用は試験された如何なる条件下でも検出されなかった。従って、PRO 2 0 0 8 0 は SAP と相互作用するが SHP 1 又は SHP 2 とは相互作用せず、PRO 2 0 0 8 0 のシグナル伝達経路を SLAM のものとは有意に異なるものとしている。 30 40

【0107】

実施例 8 : 同時刺激による PRO 2 0 0 8 0 のリン酸化

同時刺激の間に PRO 2 0 0 8 0 を取り巻くシグナル伝達事象を調べるためにリン酸化の時間的経過の実験を実施した。Jurkat の時間的経過では、細胞を先ず 10^6 細胞当たり 0.5 μg で抗 CD 3 及び抗 PRO 2 0 0 8 0 抗体 (Pharmingen) と共にインキュ 50

ベートした。ついで細胞を洗浄し、PBS中に放置した後、レセプターを架橋するために 10^6 細胞当たり $0.1\mu\text{g}$ のヤギ抗マウスFc抗体(Jackson Immunoresearch)で刺激した。架橋時間は最小30秒から最大10分までで始まった。PRO20080は30秒以内にリン酸化されることが見出された(図9b)。

単離されたヒトT細胞においてPRO20080のリン酸化をまた調べた。ヒトT細胞をCD4陽性細胞のAutoMACSソーティングによって単離した。条件当たり4億の細胞を用いた。Jurkat細胞に用いた同様の条件で、PRO20080は、PRO20080の免疫沈降と続く抗ホスホチロシン抗体でのウェスタンブロッティングによって示されるように、CD3及びPRO20080架橋時にリン酸化される。SAPの検出では、SAPは未処理ヒトT細胞中でPRO20080と結合しないが、リン酸化PRO20080には結合することが分かった。Jurkat細胞株におけるように、SHP1及びSHP2は、SHP1及びSHP2の両方が発現されるが、PRO20080と結合しない(図9c)。これらの結果は、SLAMとは異なる、SAP依存であるがSHP1/SHP2独立経路を示唆している。

10

【0108】

実施例9：PRO20080及び遅延型過敏反応

これまでに述べられているように、SLAMはTh1細胞応答に所定の役割を担っている。PRO20080もまたTh1細胞応答に所定の役割を担っているかどうかを決定するために、PRO20080のマウス相同体をクローニングし、遅延型過敏(DTH)を試験するインビボ実験で使用した。マウス実験では、CD4+T細胞をAutoMacSソーティングにより脾臓から単離し、1、5、及び $10\mu\text{g/ml}$ のマウスPRO20080を刺激のために使用した。ヒトアッセイについては抗マウスCD3抗体と抗マウスCD28抗体を同様の濃度で使用した($0.1\mu\text{g/ml}$ -1; $1\mu\text{g/ml}$ -1; Pharmingen)。細胞を3日間刺激し、上清のフラクションをウェルから取り除いてサイトカインの発現を試験し、増殖レベルを決定するために培養の最後の16時間に[3H]チミジンを細胞にパルスした。マウスPRO20080-Fc融合タンパク質とヒトPRO20080を含む同時刺激で同様の結果が見出された。

20

マウスの足蹠にCFA中1:1の $100\mu\text{g}$ のキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を注射した。 $100\mu\text{g}$ のマウスPRO20080-Fc又は生理食塩水を一日おきにマウスにIP注射した。9日目に排出リンパ節をマウスから収集し、細胞をKLHと共にインキュベートした。3日目にサイトカインの分析のために上清を取り除き、増殖を測定するために細胞に[3H]チミジンをパルスした。この結果は図10a(増殖)及び図10b(INF-の増加)に示されている。マウスPRO20080-Fc処理マウスのリンパ球はKLH暴露に应答して増殖を増加させた。INF-の生産もまた2-4倍増加した。

30

INF-の増加はTh1応答、おそらくはDTHに対するT細胞応答を変化させることが提案される。DTH実験では、マウスの尾の基部に $100\mu\text{g}$ のKLH(CFAとの1:1混合物)を注射した。0、2、5、6、及び7日目に $100\mu\text{g}$ のマウスPRO20080-Fc又は生理食塩水をIP注射した。6日目にマウスの左の耳に $150\mu\text{g}$ のKLHを、右の耳に生理食塩水($25\mu\text{l}$ 容積)を注射した。8日目の耳への注射後48時間で耳の膨潤を測定した。左の耳と右の耳のサイズの差をプロットし、図10cに示す。これらの結果は、マウスPRO20080がDTH、Th1応答に関与していることを示唆している。

40

【0109】

実施例10：PRO20080に結合する抗体の調製

この実施例は、PRO20080に特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。この例では、抗体は、図2[配列番号:2]の約アミノ酸13から約アミノ酸228までのPRO20080のECDに対して産生された。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上掲のGodingに記載されている。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくすこと

50

ができる。

B a l b / c 等のマウスを、完全フロイントアジュバントに乳化して皮下又は腹腔内に 1 - 100 マイクログラムで注入した P R O 2 0 0 8 0 免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原を M P L - T D M アジュバント (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで 10 から 12 日後に、選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗 P R O 2 0 0 8 0 抗体の検出のための E L I S A アッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物に、P R O 2 0 0 8 0 の静脈内注射の最後の注入をすることができる。3 から 4 日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を (35% ポリエチレングリコールを用いて)、A T C C から番号 C R L 1 5 9 7 で入手可能な P 3 X 6 3 A g U . 1 等の選択されたマウス骨髄腫細胞株に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、H A T (ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン) 培地を含む 96 ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、P R O 2 0 0 8 0 に対する反応性についての E L I S A でスクリーニングされる。P R O 2 0 0 8 0 に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ(陽性)」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

陽性ハイブリドーマ細胞を同系の B a l b / c マウスに腹腔内注入し、抗 P R O 2 0 0 8 0 モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィ-を用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテイン A 又はプロテイン G への親和性に基づくアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。これらの抗体は細胞発現分析、E L I S A 及びウェスタンブロットティングでの P R O 2 0 0 8 0 の同定において有用であった。

【0110】

実施例 11 : P R O 2 0 0 8 0 のハイブリダイゼーションプローブとしての使用 30

以下の方法は、P R O 2 0 0 8 0 をコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用を記載する。

ここに開示した完全長又は成熟 P R O 2 0 0 8 0 のコード化配列を含んでなる D N A を、ヒト組織 c D N A ライブラリー又はヒト組織ゲノムライブラリーにおける相同的な D N A (例えば、P R O 2 0 0 8 0 の天然に生じる変異体をコードするもの) のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

いずれかのライブラリー D N A を含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄は、以下の高緊縮性条件で実施した。放射標識 P R O 2 0 0 8 0 誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは、50% ホルムアルデヒド、5 x S S C、0.1% S D S、0.1% ピロリン酸ナトリウム、50 m M リン酸ナトリウム、p H 6.8、2 x デンハ- 40
ード溶液、及び 10% 硫酸デキストランの溶液中で、42 において 20 時間行った。フィルターの洗浄は、0.1 x S S C 及び 0.1% S D S の水溶液中、42 で行った。

ついで、完全長天然配列 P R O 2 0 0 8 0 をコードする D N A と所望の配列同一性を有する D N A は、この分野で知られた標準的な方法を用いて同定できる。

【0111】

実施例 12 : 大腸菌中での P R O 2 0 0 8 0 の発現

この実施例は、大腸菌中での組換え発現による P R O 2 0 0 8 0 の非グリコシル化形態の調製を例証する。

P R O 2 0 0 8 0 ポリペプチドをコードする D N A 配列は、選択された P C R プライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対 50

応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、pBR322（大腸菌由来のもの；Bolivar等，Gene，2:95（1977）参照）であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され、脱リン酸される。PCR増幅した配列は、次いで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリ-Hisリーダー（最初の6つのSTIIコドン、ポリ-His配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む）、PROコードする領域、ラムダ転写ターミネーター、及びargU遺伝子を含む。

ライゲーション混合物は、ついで、上掲のSambrook等に記載された方法を用いた選択した大腸菌の形質転換に使用される。形質転換体は、それらのLBプレートで成長する能力により同定され、次いで抗生物質耐性クローンが選択される。プラスミドDNAが単離され、制限分析及びDNA配列分析で確認される。

選択されたクローンは、抗生物質を添加したLBブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培地は、続いて大規模培地の播種に用いられる。次に細胞を最適光学密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

数時間の培養の後、遠心分離による集菌が可能である。遠心分離で得られた細胞ペレットは、この分野で知られた種々の試薬を用いて可溶化され、次いで可溶化PROタンパク質を、タンパク質が強く結合する条件下で金属キレート化カラムを用いて精製した。

【0112】

以下の手法を用いて、ポリ-His（ポリ-ヒス）タグ形態でPRO20080を大腸菌で発現させてもよい。PRO20080をコードするDNAを選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅した。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いでPCR増幅された、ポリ-Hisタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株52（W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)）に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体は、最初に50 mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中、30 で振盪しながら3 - 5のOD₆₀₀に達するまで成長させた。ついで培地をCRAP培地（3.57gの(NH₄)₂SO₄、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H₂O、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母抽出物、500 mL水中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110 mMのMPO₅、pH7.3、0.55% (w/v)のグルコース及び7 mMのMgSO₄の混合で調製）中に50 - 100倍希釈し、30 で振盪させながら約20 - 30時間成長させた。試料を取り出してSDS-PAGEにより発現を確認し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとした。細胞ペレットを精製及び再折りたたみまで凍結させた。

0.5から1 Lの発酵（6 - 10 gペレット）からの大腸菌ペーストを、7 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH8バッファー中で10容量(w/v)で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1 M及び0.02 Mとし、溶液を4 で終夜攪拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質がもたらされた。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000 rpmで30分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー（6Mのグアニジン、20mMのトリス、pH7.4）の3 - 5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルターを通して濾過して透明化した。透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5 mlのQiagen Ni+2-NTA金属キレートカラムに負荷した。カラムを50 mMのイミダゾール（Calbiochem, Utrol grade）を含む添加バッファー、pH7.4で洗浄した。タンパク質を250 mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、4 で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて280 nmにおけるその吸収により見積もった。

【0113】

試料を、20 mMのトリス、pH8.6、0.3 MのNaCl、2.5 Mの尿素、5 mMの

10

20

30

40

50

システイン、20 mMのグリシン及び1 mMのEDTAからなる新たに調製した再生バッファ中に徐々に希釈することによりタンパク質を再生させた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50～100マイクログラム/mlとなるように選択した。リフォールディング溶液を4で12～36時間ゆっくり攪拌した。リフォールディング反応はTFAを採取濃度0.4% (約3のpH)で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2～10で添加した。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1% TFAの移動バッファと10～80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。A280吸収を持つ画分のアリコートにSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

10

所望の折り畳んだPRO20080ポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファで平衡化したG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14 Mの塩化ナトリウム及び4%のマニトールを含む20 mMのHepes、pH 6.8に調製した。

20

ここで記載されるPRO20080ポリペプチドの多くが、上記されるようにして成功裏に発現された。

【0114】

実施例13：哺乳動物細胞中でのPRO20080の発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現によるPRO20080のグリコシル化形態の調製を例示する。

発現ベクターとしてpRK5 (1989年3月15日発行のEP30247を参照のこと)を用いた。場合によっては、PRO20080 DNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてPRO20080 DNAを挿入させる。得られたベクターは、各々pRK5-PRO20080と呼ばれる。

30

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができる。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び/又は抗生物質を添加したDMEMなどの媒質中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約10 µgのpRK5-PRO DNAを、VARN A遺伝子をコードする約1 µgのDNAと混合し[Thimmappaya等, Cell, 31:543(1982)]、約1 µgのVARN A遺伝子コード化DNA[Thimmappaya等, Cell, 31:543(1982)]と混合し、500 µlの1 mM トリス-HCl、0.1 mM EDTA、0.227 M CaCl₂に溶解させた。この混合物に、滴状の、500 µlの50 mM HEPES (pH 7.35)、280 mMのNaCl、1.5 mMのNaPO₄を添加し、25で10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37で約4時間定着させた。培養培地を吸引し、2 mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

40

形質移入の約24時間後、培養培地を除去し、培養培地(単独)又は200 µCi/ml³⁵S-システイン及び200 µCi/ml³⁵S-メチオニンを含む培養培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15% SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、PRO20080ポリペプチドの存在を現すとして選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地は、更なるインキュベーションを施し(無血清培地で)、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

50

【0115】

これに換わる技術において、PRO20080は、Sompanyac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 μ gのpRK5-PRO20080DNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄した。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5 μ g/mlウシインシュリン及び0.1 μ g/mlウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現されたPRO20080を含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製した。 10

他の実施態様では、PRO20080をCHO細胞で発現させることができる。pRK5-PRO20080ベクターは、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(単独)又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。PRO20080ポリペプチドの存在を同定した後、培養培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、ついで条件培地を収集する。ついで、発現されたPRO20080を含む培地を濃縮して、選択した方法によって精製することができる。 20

【0116】

また、エピトープタグPRO20080は、宿主CHO細胞において発現させてもよい。PRO20080は、pRK5ベクターからサブクローニングした。サブクローン挿入物は、ついで、PCRを施してパキウウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-HisタグPRO20080挿入物は、ついで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで(上記のように)形質移入した。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-HisタグPROを含む培養培地は、次いで濃縮し、Ni²⁺-キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。 30

また、PRO20080は、一過性発現法によって、CHO及び/又はCOS細胞中で、あるいは他の安定な発現法によってCHO細胞中で発現させることもできる。 30

CHO細胞における安定な発現は、以下の方法を用いて実施することが可能である。タンパク質を、各タンパク質の可溶性のコード化配列(例えば、細胞外ドメイン)がIgG1のヒンジ、CH2及びCH2ドメインを含む定常領域配列に融合したIgG作成物(イムノアドヘシン)及び/又はポリ-Hisタグ形態として発現する。

PCR増幅に続いて、それぞれのDNAを、Ausubel等, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてCHO発現ベクターにサブクローニングした。CHO発現ベクターは、対象とするDNAの5'及び3'に適合する制限部位を有し、cDNAの便利なシャトル化ができるように作成される。ベクターは、Lucas等, Nucl. Acids res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにCHO細胞での発現を用い、対象とするcDNA及びジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)の発現の制御にSV40初期プロモーター/エンハンサーを用いる。DHFR発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。 40

所望のプラスミドDNAの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen), Dospoer(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)約一千万のCHO細胞に導入した。細胞は、上掲のLucas等に記載されているように成長させた。約3 \times 10⁻⁷細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

【0117】

プラスミドDNAを含むアンブルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を10mLの媒質を含む遠心管にピペットして、1000rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を10mLの選択培地(0.2 μ m濾過PS20、5%の0.2 μ m透析濾過ウシ胎児血清を添加)中に懸濁させた。次いで細胞を90mLの選択培地を含む100mlスピナーに分けた1-2日後、細胞を150mLの選択培地を満たした250mLスピナーに移し、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。さらに2-3日後、250mL、500mL及び2000mLのスピナーを3 \times 10⁵細胞/mLで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なCHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5122469号に記載された生産培地を使用した。3Lの生産スピナーを1.2 \times 10⁶細胞/mLで播種した。0日目に、細胞数とpHを測定した。1日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施した。2日目に、スピナーをサンプルし、温度を33 $^{\circ}$ Cに変え、500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)の30mLとした。生産を通して、pHは7.2近傍に調節し維持した。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して0.22 μ mフィルターを通して濾過した。濾過物は、4 $^{\circ}$ Cで貯蔵するか、即座に精製用カラムに負荷した。

10

ポリ-Hisタグ作成物について、タンパク質はNi²⁺-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes、pH7.4バッファで平衡化した6mlのNi-NTAカラムに4-5ml/分の流速で4 $^{\circ}$ Cにおいてポンプ供給した。負荷後、カラムをさらに平衡バッファで洗浄し、タンパク質を0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマニトール、pH6.8を含む貯蔵バッファ中で25mlのG25 Superfine(Pharmacia)を用いて脱塩し、-80 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

20

イムノアドヘシン(Fc含有)作成物を以下のようにして条件培地から精製した。条件培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファ、pH6.8で平衡化した5mlのプロテインAカラム(Pharmacia)に負荷した。負荷後、カラムを平衡バッファで強く洗浄した後、100mMのクエン酸、pH3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1mlの画分を275 μ lの1Mトリスバッファ、pH9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファ中で脱塩した。均一性はSDSポリアクリルアミドゲルで試験し、エドマン(Edman)分解によりN末端アミノ酸配列決定した。

30

ここに開示されるPRO20080ポリペプチドの多くは、上述のように成功裏に発現された。

【0118】

実施例14：酵母中でのPRO20080の発現

以下の方法は、酵母中でのPRO20080の組換え発現を記述する。

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのPRO20080の細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。PRO20080をコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してPRO20080の細胞内発現を指示する。分泌のために、PRO20080をコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然PRO20080シグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌アルファ因子分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)PRO20080の発現のためのリンカー配列と共にクローニングすることができる。

40

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

50

することができる。

続いて組換えPRO20080は、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。PROを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

ここに開示されるPRO20080ポリペプチドの多くは、上述のようにして成功裏に発現された。

【0119】

実施例15：バキュロウイルス感染昆虫細胞中でのPRO20080の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるPRO20080の組換え発現を示す。 10

PRO20080をコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-Hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域など)を含む。pVL1393(Navogen)などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単に述べると、PRO20080コード化配列、又はPRO20080のコード化配列の所望する部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列が、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、ついで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。 20

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold^{T M} ウイルスDNA(Pharmingen)を、Spodoptera frugiperda(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)中にリポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて同時形質移入することにより作成される。28で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

【0120】

次に、発現されたポリ-hisタグPRO20080は、例えばNi²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupert等, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製した。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mMのHepe s、pH7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mMのEDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー(50mMリン酸塩、300mMのNaCl、10%グリセロール、pH7.8)で50倍希釈し、0.45µmフィルターで濾過した。Ni²⁺-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5mLの総容積で調製し、25mLの水で洗浄し、25mLの負荷バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mLでカラムに負荷した。カラムを、分画回収が始まる点であるA₂₈₀のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50mMリン酸塩; 300mMのNaCl、10%グリセロール、pH6.0)で洗浄した。A₂₈₀のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファー中で0から500mMイミダゾール勾配で展開した。1mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に複合したNi²⁺-NTAでのウェスタンブロットで分析した。溶離したHis₁₀-タグPRO20080を含む画分をプールして負荷バッファーで透析した。 40

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)PRO20080の精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

ここに開示されるPRO20080ポリペプチドの多くは、上述のように成功裏に発現された。

【0121】

実施例16：特異的抗体を用いたPRO20080ポリペプチドの精製

天然又は組換えPRO20080ポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ-PRO20080ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-PRO20080ポリペプチドは、対象のPRO20080ポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗PRO20080ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

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

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のPRO20080ポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによるPRO20080ポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化PRO20080ポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有用な量で分泌される。

可溶化PRO20080ポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムはPROポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下(例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー)で洗浄される。ついで、カラムは、抗体/PRO20080ポリペプチド結合を分解する条件下(例えば、約2-3といった低pH、高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロップ)で溶離され、PRO20080ポリペプチドが回収される。

【0122】

実施例17：薬物スクリーニング

本発明は、PRO20080ポリペプチド又はその結合断片を種々の薬物スクリーニング技術において使用することによる化合物のスクリーニングに特に有用である。そのような試験に用いられるPRO20080ポリペプチド又は断片は、溶液中の遊離状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、細胞内に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの一つの方法は、PRO20080ポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定に形質移入される真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのような形質移入細胞に対して、競合的結合アッセイにおいてスクリーニングされる。そのような細胞は、生存可能又は固定化形態のいずれかにおいて、標準的な結合アッセイに使用できる。例えば、PRO20080ポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体の形成を測定してよい。あるいは、試験する試薬によって生ずるPRO20080ポリペプチドとその標的細胞との間の複合体形成における減少を試験することもできる。

しかして、本発明は、PRO20080ポリペプチド関連疾患又は障害に影響を与えうる薬剤又は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、その試薬をPROポリペプチド又は断片に接触させ、(i)試薬とPRO20080ポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は(ii)PRO20080ポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について、当該技術でよく知られた方法でアッセイすることを含む。これらの競合結合アッセイでは、PRO20080ポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、フリーのPRO20080ポリペ

10

20

30

40

50

プチド又は断片を結合形態のものから分離し、自由又は未複合の標識の量が、特定の試薬がPRO20080ポリペプチドに結合する又はPRO20080ポリペプチド/細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についての高スループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に公開されたWO84/03564に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。PROポリペプチド20080に適用すると、ペプチド試験化合物はPRO20080ポリペプチドと反応して洗浄される。結合したPRO20080ポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製したPRO20080ポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することもできる。さらに、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。

10

また、本発明は、PRO20080ポリペプチドに結合可能な中和抗体がPRO20080ポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイも考慮する。このようにして、抗体は、PRO20080ポリペプチドで、一又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

【0123】

実施例18：合理的薬物設計

合理的薬物設計の目的は、対象の生物学的活性ポリペプチド(例えば、PRO20080ポリペプチド)又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例の任意のものが、PRO20080ポリペプチドのより活性で安定な形態又はインビボでPRO20080ポリペプチドの機能を向上又は阻害する薬物の創作に使用できる(参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991))。

20

一つのアプローチ法において、PRO20080ポリペプチド、又はPRO20080ポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造が、X線結晶学により、コンピュータモデル化により、最も典型的には2つの方法の組み合わせにより決定される。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、PRO20080ポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、PRO20080ポリペプチドの構造に関する有用な情報が相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることもある。両方の場合において、関連する構造情報は、類似PRO20080ポリペプチド様分子の設計又は効果的なインヒビターの同定に使用される。合理的な薬剤設計の有用な例は、Braxton及びWells, Biochemistry, 31: 7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、又はAthauda等, J. Biochem., 113: 742-746 (1993)に示されているような天然ペプチドのインヒビター、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する分子を含む。

30

また、上記のような機能アッセイによって選択された標的特異的な抗体を単離しその結晶構造を解明することもできる。この方法は、原理的には、それに続く薬剤設計が基礎をおくことのできるファーマコア(pharmacore)を生成する。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体(抗-ids)を生成することにより、タンパク質結晶学をバイパスすることができる。鏡像の鏡像として、抗-idsの結合部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。抗-idは、ついで、化学的又は生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するのに使用できる。単離されたペプチドは、ファーマコアとして機能するであろう。

40

本発明により、十分な量のPRO20080ポリペプチドがX線結晶学などの分析実験を実施するために入手可能である。さらに、ここに提供したPRO20080ポリペプチドアミノ酸配列の知識は、X線結晶学に換える、又はそれに加えるコンピュータモデル化技術で用いられる指針を提供する。

【0124】

50

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

10

【0125】

【図1】天然配列PRO20080 cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：1）を示し、配列番号：1は、ここで「DNA161000-2896」と命名されるクローンである。

【図2】図1に示した配列番号：1のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列（配列番号：2）を示す。

【図3】PRO20080の発現のノーザンブロット分析を示す。

【図4】細胞株パネルにおけるPRO20080の発現を示す。

【図5】図5aはヒト末梢T細胞におけるPRO20080の発現を示す。図5bはCD4 + CD45RO + 記憶T細胞の高度な発現を示す。

20

【図6】標識PRO20080が結合PRO20080に結合できることを示すエライザアッセイを示す。

【図7】免疫蛍光法による細胞表面でのPRO20080のホモタイプな結合を示す。

【図8】図8aは、T細胞が抗PRO20080抗体及び抗CD3抗体で刺激された場合のT細胞の増殖及びINF- γ の産生を示す。図8bは、T細胞がPRO20080-Fc融合分子で刺激された場合のT細胞の増殖及びINF- γ の産生を示す。

【図9】図9aはPRO20080のリン酸化状態とSAPとのその結合を示す。図9bは同時刺激処置を行い架橋抗体を添加した際のPRO20080のリン酸化の時間過程を示す。図9cはPRO20080のリン酸化状態と同時刺激の際のSAPとのその結合を示す。

30

【図10】図10aはインビボでのT細胞増殖に対するPRO20080マウス相同体の効果を示す。図10bはインビボでのINF- γ の産生に対するPRO20080マウス相同体の効果を示す。図10cは耳の膨潤により測定した遅延型過敏反応におけるPRO20080マウス相同体の効果を示す。

【 図 1 】

図1

```

CAGAAGGCGAAAAACATTGACTGCTCAAGGCTCAAGCACCAGTCTCCACCGGSAAG
CAGTGTGTGGCTGTCCAAATGCTCTGTTGTCTTCTGCTTTGGCCAGGGAAATGATG
TTCCACAAGCAGCTTAACCCATTGATGGTAAACGGGATCTGGGGAGTCAGTAACTGT
TCCCTGGAGTTCTCTGAGGAGGAGAGGTCAGTCTCAGCTTGGCTTTTCAATGAAGAC
ATCTTCTGCTCAATGATCCCATTAACCCAAATCCGAAATTCAGTGGCTAAATCC
GAACAGGGAAAGGAGTCACTGACCTCACCAGTCTCTCTCCCTGCACTCAGCAAGCTTGA
GATGGAGACACAGGCTTTACAGACCCAGATATCCACAAGAGCTTCCACAAGCTGTCC
CAGTTACACTCTGAGGATATTAAAGCACTGAGGACATACAGTACCACATCAGAGTCA
GCTATTTCAGAAIATGACCTGTGAGCTCCATCTGACTTGTCTGTGGAGATGCAGATGA
CAATGCTCAATTCAGATGGAGGCTTGGGAAAGAGCTTTCAAGTCAAGCCAAAGCTCAC
TGTCTCCTGGGCCCCAGATTTCCAGTAAAGAGGATCAGCTGCAATAGCAGAAATGG
TGTCAATTAATTATCCCTCTCTGCTGCTGCTGCGCAGAGCTTTGCCAAGATGTTAAATTC
ATATACAGATACCAAAATGATCTGTTTATGTTTCTGGGATATGCAATGCTTGGTGT
CATCATACTGCTGTACTGTTTGGAGAAAAGAGAGATTCCCTATCTTGTCTACTCA
GGAAACACAGGCCCCGAGAGTCCGCAAGAGACCTAGAGTATGTTTCAGTGTCTCCAAC
GACACAGCTGTGTATGCTTCAGTCACTCATTCAGACAGGAAACAGAAATCTGGACACC
TAGAGAAAATGATACTATACAAATTTACTCCGCAATTAATGATTCGAGAGAGTAAAC
CACTTTTCCAGGCACTGCCCTTGAATGTGGTAACTGCTGAAAGGCTCAGAG
GAATTTGGGAAATGACACGCTCTCTGATCCATGAGACAGAAACAGAAACAGGAGGTTGG
TTCTGTGTCTCTGCAACAGAAATTTGATATCTAGAGATAGGATGATCACTCCAGTCC
TTGGAGTTAAAGCTGGCTACTCTGAGTCAAGACCTAAGGATAACATCATTTCCAGCATG
TGGTTCANATATATTTCCATCTGCTTCCAGGCAAAAGTCTAAGATACACACAGCA
GCACATGACTCTCTTTGATTAACAAAGAAATGAAATTAATGTTGACAGAGAGTTTAT
GATCCAGAAACACACCACTCTCTCTCTTTTGAAGAGCAGGATGACTATTGAGAAA
TAATGCACTGTGTGGTACATGTGTAGTCTCTGGAGTTGATGGGCCATCCTGATACA
AGTTGAGCATCCCTTGTCTGAATGCTTGGGATTAGAAATGTTTCAGATTCATTTTTT
TTCAGATTTGAAATATTTGCAATTTTATTTAGGCTTGGATCCAAATCCAAATTCCTCA
AAATTCAAATGCTCCAAATGAAATTTCCCTGAGTTTATGATTTGATTTGATTTGATTTG
AAAATTCAGATTTGGAGCATTTGGATATGGATTTTGGATTTGGGATGCTCAACTT
GTACATGTTTATAGACACATCTCTCCGACACTCTGCTCACTTTGGAGGCTTAGT
CTCCAGACTGAAAAGGAGGATGATATACATCAGCTCCATTTGTTGGAGCAAGAA
TCTAAGTC

```

【 図 2 】

図2

```

MLMLFQSLLEVEFCFGPMVMSQSSLTPIMVNGILGESVTLPLEFPAGEKVNFTWLENET
SLAFTVPHETKSPFHVITNPKQGRKLNFTQSYSLQLSLNLMEDTGSYRAGISTKTSAKLS
SYTELRLQLLMIQVTHNSQLFQNMTCLEHLPCVSDADDMVSFRHEALNTLSQPNLT
VSWDRPSSSQDYTCIAREANVSNLFSVQKLEQVKTQTFWRLFMVSGICIVFQF
IILLLLRLNRKRSLSLSTORTGFAESARNLEYVSVSTNTNTVYASVTHSNRETEIWP
RENDITIIYSTINHSKESKPTFSRATALDNVV

```

シグナルペプチド:
1-13

膜貫通ドメイン:
228-247

N-グルコシル化部位:
58-62
87-91
137-141
144-148
161-165
178-182
203-207
281-285
303-307
313-317

cAMP- 及び cGMP- 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位:
251-255

チロシンキナーゼリン酸化部位:
100-108
186-194

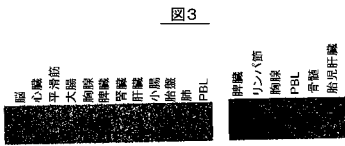
N-ミリスチル化部位:
17-23
105-111
170-176

アミド化部位:
82-86

イムノグロブリンドメイン
35-111
146-197

SAP モチーフ
283-288
307-312

【 図 3 】

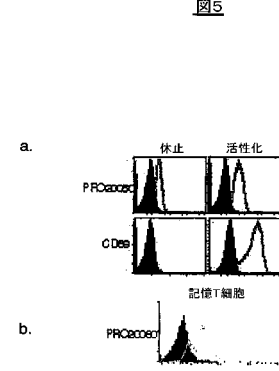


【 図 4 】

図4

細胞株	細胞型	発現
Jurkat	T細胞白血病	++
MOLT3	T細胞白血病	+
MOLT4	T細胞白血病	+
Raj	パーキット型リンパ腫	++
Ramos	パーキット型リンパ腫	++
Daud	パーキット型リンパ腫	++
VM12	Bリンパ球	+/-
U937	B細胞白血病	-
RPM18888	B細胞白血病	-
HL60	骨髄球性白血病	-
IM9	多発性骨髄腫 (Bリンパ芽球)	+/-
OPM2	多発性骨髄腫	-
U288	多発性骨髄腫	++
MDA231	胸腺癌	-
THP-1	単核白血球	-
HCT116	大腸癌	-
DU145	前立腺癌	-
L8174T	大腸腺癌	-
293	腎臓上皮	-
SW620	大腸腺癌	-
A873	横紋筋肉腫	-
LOVO	大腸腺癌	-

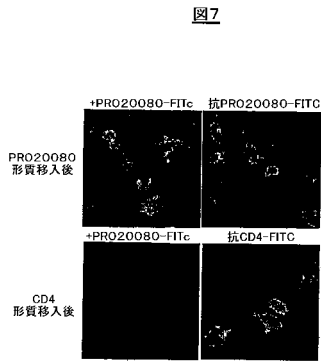
【 図 5 】



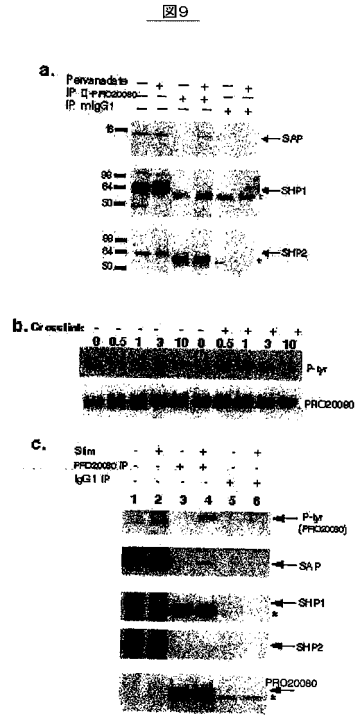
【 図 6 】



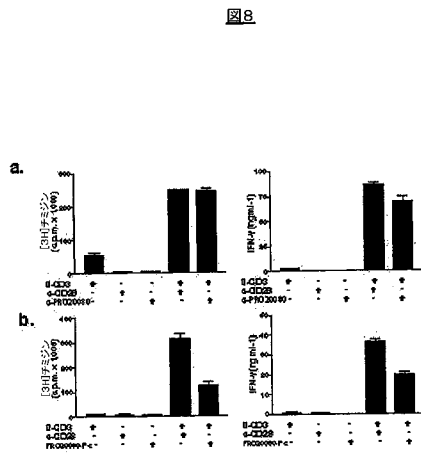
【 図 7 】



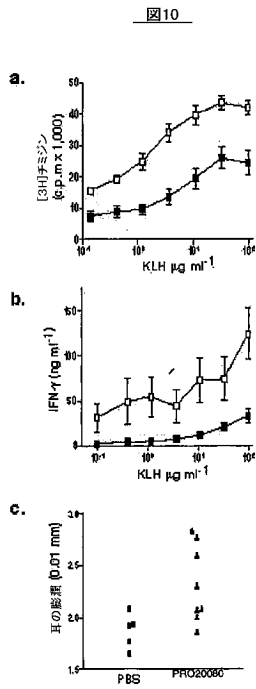
【 図 9 】



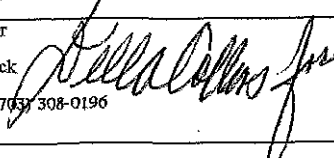
【 図 8 】



【 図 10 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/24252
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07K 1/00; C07H 21/04; C12N 1/20; C12P 21/06; G01N 33/566 US CL : 530/350, 388.22; 536/23.5; 436/501; 435/6, 7.21, 69.1, 252.3, 320.1; 514/2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/350, 388.22; 536/23.5; 436/501; 435/6, 7.21, 69.1, 252.3, 320.1; 514/2		
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) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/55336-A2 (HYSEQ INC) 02 August 2001, see figure 2, protein is 100% identical to the instant SEQ ID 2, see the entire document for methods.	1-35
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	
"F" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 21 May 2004 (21.05.2004)	Date of mailing of the international search report 02 JUN 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Michael Brannock Telephone No. (703) 308-0196 	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/24252

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

USPTO Sequence databases

STN: MEDLINE, BIOSIS

search terms: CD84, T-cell, SLAM, CD28, CD3, costimulate, Natural Killer cells

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 5/14	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/04	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/00	C 0 7 K 16/00	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ガーニー, オースティン エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2, ベルモント, デビーレーン 1

(72)発明者 ヴァンデズ, パトリシア エー.

アメリカ合衆国 カルフォルニア 9 4 1 1 4, サン フランシスコ, グランドビュー アベニュー 2 7 7

Fターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03 FB05 FB08
4B024 AA01 AA15 BA44 BA63 CA01 CA04 CA07 CA09 DA02 DA06
DA12 HA12 HA15

4B063	QA18	QA19	QQ08	QQ53	QQ79	QR32	QR55	QS33	QS34	
4B064	AG20	AG27	CA02	CA06	CA10	CA19	CA20	CC24	DA01	DA08
		DA13								
4B065	AA26X	AA72X	AA90X	AA93Y	AB01	AB05	AC14	BA01	BA08	CA24
	CA25	CA44	CA46							
4C084	AA02	AA06	AA17	BA01	BA08	BA22	BA23	CA53	NA14	ZA01
	ZA36	ZA51	ZA55	ZA59	ZA68	ZA75	ZA81	ZA89	ZA96	ZB02
	ZB11	ZB13	ZB15	ZC06	ZC35					
4C085	AA13	AA14	BB17	DD88	EE01					
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA40	DA50	DA76	EA22
	EA54	FA72	FA74							

专利名称(译)	用于治疗免疫相关疾病的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2005519590A	公开(公告)日	2005-07-07
申请号	JP2003556018	申请日	2002-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	グレウォルイクバル ガーニーオースティンエル ヴァンデズパトリシアエー		
发明人	グレウォル, イクバル ガーニー, オースティン エル. ヴァンデズ, パトリシア エー.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/00 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/63 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/705 C07K16/00 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D A61K37/02 C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA15 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA08 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA36 4C084/ZA51 4C084/ZA55 4C084/ZA59 4C084/ZA68 4C084/ZA75 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB02 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB15 4C084/ZC06 4C084/ZC35 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA54 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	PTS/US01/27099 2001-08-29 US 10/136574 2002-04-29 US		
其他公开文献	JP2005519590A5		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本発明涉及含有新型蛋白質の組合物，以及使用這些組合物診斷和治療免疫相關疾病的方法。

特表2005-519590

(P2005-519590A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(5) Int. Cl. ⁷		F I		テマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K	39/00	A 6 1 K	39/395	D	4 B O 2 4
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395	N	4 B O 6 3
A 6 1 K	45/00	A 6 1 K	45/00		4 B O 6 4
A 6 1 P	1/04	A 6 1 P	1/04		4 B O 6 5
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 90 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2003-556018 (P2003-556018)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・94080-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌイー・ウェイ・1		
(86) (22) 出願日	平成14年7月30日 (2002.7.30)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆		
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月6日 (2004.5.6)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教		
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/024252	(72) 発明者	グレイウォル, イクハル アメリカ合衆国 カリフォルニア 94555, フレモント, カンディス コート 34802		
(87) 国際公開番号	W02003/055440				
(87) 国際公開日	平成15年7月10日 (2003.7.10)				
(31) 優先権主張番号	FIS/US01/27099				
(32) 優先日	平成13年8月29日 (2001.8.29)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)				
(31) 優先権主張番号	10/136,574				
(32) 優先日	平成14年4月29日 (2002.4.29)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)				
最終頁に続く					