

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-521082

(P2006-521082A)

(43) 公表日 平成18年9月21日(2006.9.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 4
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-536419 (P2004-536419)	(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
(86) (22) 出願日	平成15年9月10日 (2003.9.10)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成17年5月11日 (2005.5.11)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/028317	(72) 発明者	ボーダリー, サラ シー, アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 66, パロ アルト, サンド ヒル ロード 1520, 205号室
(87) 国際公開番号	W02004/024072		
(87) 国際公開日	平成16年3月25日 (2004.3.25)		
(31) 優先権主張番号	60/410,340		
(32) 優先日	平成14年9月11日 (2002.9.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

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新規組成物と方法

(57) 【要約】

本発明は、新規のタンパク質を含む組成物と、免疫関連疾患の診断と治療のためのそのような組成物の使用法とに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 図 2 (配列番号 2)、図 5 (配列番号 5)、図 7 (配列番号 7)、図 9 (配列番号 9)、図 11 (配列番号 11)、図 13 (配列番号 13)、図 17 (配列番号 17)、図 20 (配列番号 20)、図 22 (配列番号 22)、図 24 (配列番号 24)、図 27 (配列番号 27)、図 29 (配列番号 29)、図 31 (配列番号 31)、図 33 (配列番号 33)、図 35 (配列番号 35)、図 37 (配列番号 37)、図 39 (配列番号 39)、図 41 (配列番号 41)、図 43 (配列番号 43)、図 45 (配列番号 45)、図 48 (配列番号 48)、図 50 (配列番号 50)、図 53 (配列番号 53)、図 55 (配列番号 55)、図 57 (配列番号 57)、図 59 (配列番号 59)、図 61 (配列番号 61)、図 63 (配列番号 63)、図 65 (配列番号 65)、図 67 (配列番号 67)、図 70 (配列番号 70)、図 72 (配列番号 72)、図 74 (配列番号 74)、図 78 (配列番号 78)、図 81 (配列番号 81)、図 83 (配列番号 83)、図 85 (配列番号 85)、図 88 (配列番号 88)、図 90 (配列番号 90)、図 92 (配列番号 92)、図 94 (配列番号 94)、又は図 100 (配列番号 100) に示すポリペプチドをコードする核酸配列に対して、少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

10

【請求項 2】

図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6)、図 8 (配列番号 8)、図 10 (配列番号 10)、図 12 (配列番号 12)、図 14 (配列番号 14)、図 15 (配列番号 15)、図 16 (配列番号 16)、図 18 (配列番号 18)、図 19 (配列番号 19)、図 21 (配列番号 21)、図 23 (配列番号 23)、図 25 (配列番号 25)、図 26 (配列番号 26)、図 28 (配列番号 28)、図 30 (配列番号 30)、図 32 A - B (配列番号 32)、図 34 (配列番号 34)、図 36 (配列番号 36)、図 38 A - B (配列番号 38)、図 40 (配列番号 40)、図 42 (配列番号 42)、図 44 (配列番号 44)、図 46 (配列番号 46)、図 47 (配列番号 47)、図 49 (配列番号 49)、図 51 (配列番号 51)、図 52 (配列番号 52)、図 54 (配列番号 54)、図 56 (配列番号 56)、図 58 (配列番号 58)、図 60 (配列番号 60)、図 62 (配列番号 62)、図 64 (配列番号 64)、図 66 (配列番号 66)、図 68 (配列番号 68)、図 69 (配列番号 69)、図 71 (配列番号 71)、図 73 (配列番号 73)、図 75 (配列番号 75)、図 76 (配列番号 76)、図 77 (配列番号 77)、図 79 (配列番号 79)、図 80 (配列番号 80)、図 82 (配列番号 82)、図 84 (配列番号 84)、図 86 (配列番号 86)、図 87 (配列番号 87)、図 89 (配列番号 89)、図 91 (配列番号 91)、図 93 (配列番号 93)、図 95 (配列番号 95)、図 96 (配列番号 96)、図 97 (配列番号 97)、図 98 (配列番号 98)、図 99 (配列番号 99)、図 101 (配列番号 101)、及び図 102 (配列番号 102) に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されたヌクレオチド配列に対して、少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

20

30

【請求項 3】

図 1 (配列番号 1)、図 3 (配列番号 3)、図 4 (配列番号 4)、図 6 (配列番号 6)、図 8 (配列番号 8)、図 10 (配列番号 10)、図 12 (配列番号 12)、図 14 (配列番号 14)、図 15 (配列番号 15)、図 16 (配列番号 16)、図 18 (配列番号 18)、図 19 (配列番号 19)、図 21 (配列番号 21)、図 23 (配列番号 23)、図 25 (配列番号 25)、図 26 (配列番号 26)、図 28 (配列番号 28)、図 30 (配列番号 30)、図 32 A - B (配列番号 32)、図 34 (配列番号 34)、図 36 (配列番号 36)、図 38 A - B (配列番号 38)、図 40 (配列番号 40)、図 42 (配列番号 42)、図 44 (配列番号 44)、図 46 (配列番号 46)、図 47 (配列番号 47)、図 49 (配列番号 49)、図 51 (配列番号 51)、図 52 (配列番号 52)、図 54 (配列番号 54)、図 56 (配列番号 56)、図 58 (配列番号 58)、図 60 (配列番号 60)、図 62 (配列番号 62)、図 64 (配列番号 64)、図 66 (配列番号 66)、図 68 (配列番号 68)、図 69 (配列番号 69)、図 71 (配列番号 71)、図 73

40

50

(配列番号73)、図75(配列番号75)、図76(配列番号76)、図77(配列番号77)、図79(配列番号79)、図80(配列番号80)、図82(配列番号82)、図84(配列番号84)、図86(配列番号86)、図87(配列番号87)、図89(配列番号89)、図91(配列番号91)、図93(配列番号93)、図95(配列番号95)、図96(配列番号96)、図97(配列番号97)、図98(配列番号98)、図99(配列番号99)、図101(配列番号101)、及び図102(配列番号102)に示すヌクレオチド配列の完全長コード化配列からなる群から選択されたヌクレオチド配列に対して、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸。

【請求項5】

請求項1に記載の核酸を含んでなるベクター。

10

【請求項6】

ベクターを用いて形質転換された宿主細胞によって認識される制御配列に作用可能に連結する請求項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CHO細胞、大腸菌細胞、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】

PROポリペプチドの製造方法において、前記PROポリペプチドの発現に適した条件下で請求項7に記載の宿主細胞を培養し、細胞培養物から前記PROポリペプチドを回収することを含んでなる方法。

20

【請求項10】

(a)図2(配列番号2)、図5(配列番号5)、図7(配列番号7)、図9(配列番号9)、図11(配列番号11)、図13(配列番号13)、図17(配列番号17)、図20(配列番号20)、図22(配列番号22)、図24(配列番号24)、図27(配列番号27)、図29(配列番号29)、図31(配列番号31)、図33(配列番号33)、図35(配列番号35)、図37(配列番号37)、図39(配列番号39)、図41(配列番号41)、図43(配列番号43)、図45(配列番号45)、図48(配列番号48)、図50(配列番号50)、図53(配列番号53)、図55(配列番号55)、図57(配列番号57)、図59(配列番号59)、図61(配列番号61)、図63(配列番号63)、図65(配列番号65)、図67(配列番号67)、図70(配列番号70)、図72(配列番号72)、図74(配列番号74)、図78(配列番号78)、図81(配列番号81)、図83(配列番号83)、図85(配列番号85)、図88(配列番号88)、図90(配列番号90)、図92(配列番号92)、図94(配列番号94)、又は図100(配列番号100)に示すポリペプチドのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

30

【請求項12】

異種アミノ酸配列と融合した請求項10に記載のポリペプチドを含むキメラ分子。

【請求項13】

前記異種アミノ酸配列がエプイプタグ配列又はイムノグロブリンのFc領域である、請求項12に記載のキメラ分子。

40

【請求項14】

請求項10に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項15】

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14に記載の抗体。

【請求項16】

担体と組み合わせて、(a)請求項10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、或いは(d)前記ポリペ

50

チドと結合する抗体を含有してなる組成物。

【請求項 17】

前記担体が製薬的に許容可能な担体である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

(a)、(b)、(c)又は(d)の治療的有効量を含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 19】

容器；

前記容器上のラベル；並びに

(a) 請求項 10 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、或いは(d) 前記ポリペプチドと結合する抗体を含有し、前記容器に収容される組成物を含む製造品であって、前記容器上のラベルによって組成物が免疫関連疾患の治療に用いることが可能であることが示される、製造品。

10

【請求項 20】

治療の必要がある哺乳動物の免疫関連疾患を治療する方法において、(a) 請求項 10 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、の治療的有効量を前記哺乳動物へ投与することを含んでなる方法。

【請求項 21】

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、中枢又は末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髓性多発神経障害、ギラン-バレー症候群、慢性炎症脱髓性多発神経障害、肝胆汁性疾患、感染性又は自己免疫性慢性活動性肝炎、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 20 に記載の方法。

20

30

【請求項 22】

PROポリペプチドを含むと思われる試料中のPROポリペプチドの存在を決定する方法であって、前記試料を、抗PRO71202、抗PRO53256、抗PRO52254、抗PRO71203、抗PRO52892、抗PRO71204、抗PRO71205、抗PRO71206、抗PRO52174、抗PRO71207、抗PRO71208、抗PRO71209、抗PRO71210、抗PRO69553、抗PRO52268、抗PRO52633、抗PRO69458、抗PRO71211、抗PRO51927、抗PRO69903、抗PRO71212、抗PRO71213、抗PRO71214、抗PRO69531、抗PRO71215、抗PRO71216、抗PRO71217、抗PRO35770、抗PRO71218、抗PRO66272、抗PRO52338、抗PRO51950、抗PRO71219、抗PRO71220、抗PRO71222、抗PRO52035、抗PRO52650、抗PRO23781、抗PRO71224、抗PRO70559、抗PRO71225又は抗PRO47351抗体に曝露し、前記試料の成分に対する前記抗体の結合を決定することを含んでなる方法。

40

【請求項 23】

哺乳動物の免疫関連疾患を診断する方法において、(a) 哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料中、及び(b) 同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中における、PRO71202、PRO53256、PRO52254、PRO71203、PRO52892、PRO71204、PRO71205、PRO71206、PRO52174、PRO71207、PRO71208、PRO71209、PRO71210、

50

PRO69553、PRO52268、PRO52633、PRO69458、PRO71211、PRO51927、PRO69903、PRO71212、PRO71213、PRO71214、PRO69531、PRO71215、PRO71216、PRO71217、PRO35770、PRO71218、PRO66272、PRO52338、PRO51950、PRO71219、PRO71220、PRO71222、PRO52035、PRO52650、PRO23781、PRO71224、PRO70559、PRO71225、又はPRO47351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て試験試料中における前記遺伝子の発現レベルが高いか又は低いことにより、試験組織細胞が採取された哺乳動物における免疫関連疾患の存在が示される方法。

10

【請求項24】

哺乳動物の免疫関連疾患を診断する方法において、(a)前記哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料と、抗PRO71202、抗PRO53256、抗PRO52254、抗PRO71203、抗PRO52892、抗PRO71204、抗PRO71205、抗PRO71206、抗PRO52174、抗PRO71207、抗PRO71208、抗PRO71209、抗PRO71210、抗PRO69553、抗PRO52268、抗PRO52633、抗PRO69458、抗PRO71211、抗PRO51927、抗PRO69903、抗PRO71212、抗PRO71213、抗PRO71214、抗PRO69531、抗PRO71215、抗PRO71216、抗PRO71217、抗PRO35770、抗PRO71218、抗PRO66272、抗PRO52338、抗PRO51950、抗PRO71219、抗PRO71220、抗PRO71222、抗PRO52035、抗PRO52650、抗PRO23781、抗PRO71224、抗PRO70559、抗PRO71225、又は抗PRO47351抗体を接触させ、(b)抗体と試験試料中のポリペプチドの間の複合体形成を検出することを含んでなり、前記複合体形成により、試験組織細胞が採取された哺乳動物における免疫関連疾患の存在が示される方法。

20

【請求項25】

PRO71202、PRO53256、PRO52254、PRO71203、PRO52892、PRO71204、PRO71205、PRO71206、PRO71207、PRO71208、PRO71209、PRO71210、PRO69553、PRO52268、PRO52633、PRO69458、PRO71211、PRO51927、PRO69903、PRO71212、PRO71213、PRO71214、PRO69531、PRO71215、PRO71216、PRO71217、PRO35770、PRO71218、PRO66272、PRO52338、PRO51950、PRO71219、PRO71220、PRO71222、PRO52035、PRO52650、PRO23781、PRO71224、PRO70559、PRO71225、又はPRO47351ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法であって、前記ポリペプチドへ通常は応答する細胞を(a)前記ポリペプチドと(b)候補化合物とに接触させ、前記細胞の(a)に対する応答性の欠如を測定することを含んでなる方法。

30

40

【請求項26】

PRO71202、PRO53256、PRO52254、PRO71203、PRO52892、PRO71204、PRO71205、PRO71206、PRO52174、PRO71207、PRO71208、PRO71209、PRO71210、PRO69553、PRO52268、PRO52633、PRO69458、PRO71211、PRO51927、PRO69903、PRO71212、PRO71213、PRO71214、PRO69531、PRO71215、PRO71216、PRO71217、PRO35770、PRO71218、PRO66272、PRO52338、PRO51950、PRO71219、PRO71220、PRO71222、PRO52035、PRO52650、PRO23781、PRO71224、PRO70559

50

、PRO71225、又はPRO47351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であって、前記ポリペプチドを通常は発現する細胞を候補化合物と接触させ、前記遺伝子の発現の欠如を測定する方法。

【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】

PRO71202、PRO53256、PRO52254、PRO71203、PRO52892、PRO71204、PRO71205、PRO71206、PRO52174、PRO71207、PRO71208、PRO71209、PRO71210、PRO69553、PRO52268、PRO52633、PRO69458、PRO71211、PRO51927、PRO69903、PRO71212、PRO71213、PRO71214、PRO69531、PRO71215、PRO71216、PRO71217、PRO35770、PRO71218、PRO66272、PRO52338、PRO51950、PRO71219、PRO71220、PRO71222、PRO52035、PRO52650、PRO23781、PRO71224、PRO70559、PRO71225、又はPRO47351ポリペプチドの活性を模倣する化合物を同定する方法であって、前記ポリペプチドへ通常は応答する細胞を候補化合物と接触させ、前記細胞による前記候補化合物への応答性を測定することを含んでなる方法。

【請求項31】

哺乳動物の免疫反応を刺激する方法であって、前記哺乳動物に対し、PRO71202、PRO53256、PRO52254、PRO71203、PRO52892、PRO71204、PRO71205、PRO71206、PRO52174、PRO71207、PRO71208、PRO71209、PRO71210、PRO69553、PRO52268、PRO52633、PRO69458、PRO71211、PRO51927、PRO69903、PRO71212、PRO71213、PRO71214、PRO69531、PRO71215、PRO71216、PRO71217、PRO35770、PRO71218、PRO66272、PRO52338、PRO51950、PRO71219、PRO71220、PRO71222、PRO52035、PRO52650、PRO23781、PRO71224、PRO70559、PRO71225、又はPRO47351ポリペプチドアンタゴニストの有効量を投与することによって前記免疫反応を刺激する方法。

【請求項32】

哺乳動物の炎症性免疫反応の診断方法において、(a)哺乳動物から採取した組織細胞の試験試料中、及び(b)同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料中における、PRO71202、PRO53256、PRO52254、PRO71203、PRO52892、PRO71204、PRO71205、PRO71206、PRO52174、PRO71207、PRO71208、PRO71209、PRO71210、PRO69553、PRO52268、PRO52633、PRO69458、PRO71211、PRO51927、PRO69903、PRO71212、PRO71213、PRO71214、PRO69531、PRO71215、PRO71216、PRO71217、PRO35770、PRO71218、PRO66272、PRO52338、PRO51950、PRO71219、PRO71220、PRO71222、PRO52035、PRO52650、PRO23781、PRO71224、PRO70559、PRO71225、又はPRO47351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て試験試料中における前記遺伝子の発現レベルが高いか又は低いことにより、試験組織細胞が採取された哺乳動物における炎症性免疫反応の存在が示される方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

[発明の分野]

本発明は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。

【 0 0 0 2 】

[発明の背景]

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

10

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

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、ウィルス感染細胞、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。

20

【 0 0 0 3 】

免疫関連疾患は免疫反応を抑えることにより治療される。中和抗体の使用により分子の免疫刺激活動を抑制することは、免疫介在疾患及び炎症性疾患においては有益である。免疫反応を抑制する分子は、(タンパク質を直接又は抗体アゴニストの使用により)免疫を抑制し、それによって免疫関連疾患を回復させるのに利用可能である。

30

CD4+T細胞は炎症の重要な制御因子であることが知られている。ここで、CD4+T細胞を活性化させ、活性化に伴い差次的に発現する遺伝子のプロフィールを分析した。したがって、活性化に特異的な遺伝子は、潜在的な治療ターゲットであろう。生産的な免疫増殖反応には、インビボでの同時刺激が必要である。同時刺激分子のリストはかなりの広範囲にわたるので、炎症の様々なタイプと段階においてどの同時刺激分子が重要な役割を果たすのか、まだ明確になっていない。本出願では、抗CD3/ICAM、又は抗CD3/抗CD28による刺激により特異的に上方制御又は下方制御され、これら異なる分子と関連する炎症プロセスのターゲティングに有用であり得る遺伝子に焦点を当てる。

上述したようにT細胞研究が進歩しているとはいえ、哺乳動物のT細胞媒介疾患を検知しこれらの疾患を効果的に軽減する能力を有する更なる診断及び治療薬に対する需要は大きい。従って、本発明の目的は、休止T細胞と比較して活性化T細胞に過剰発現するポリペプチドを同定することと、このようなポリペプチドとそのコード化核酸を使用して、哺乳動物のT細胞媒介疾患の診断的検出及び治療的処置に有用な物質の組成物を製造することである。

40

【 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及び治療にとって有用な組成物及び方法に関する。本発明は、哺乳動物の免疫反応を刺激した結果として得られる

50

タンパク質（アゴニスト及びアンタゴニスト抗体を含む）の同定に基づいている。免疫関連疾患は、免疫反応を抑制し又は高めることによって治療することができる。免疫反応を高める分子は、抗原に対する免疫反応を刺激し又は増強する。免疫反応の向上が有益である場合には、免疫反応を刺激する分子は治療的に用いることができる。或いは、免疫反応の緩和が有益である場合には（例えば炎症）、抗原に対する免疫反応を和らげる又は減じる免疫反応を抑制する分子（例えば中和抗体）を治療的に用いることができる。従って、PROポリペプチド、そのアゴニスト及びアンタゴニストもまた、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ために有用である。特別な態様では、そのような医薬及び薬剤は、製薬的に許容可能な担体と共に、PROポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニストの治療的有効量を含む。好ましくは、混合物は無菌である。

10

更なる実施態様では、本発明は、PROポリペプチドと候補化合物を接触させ、前記PROポリペプチドによって媒介される生物活性をモニタリングすることを含む、PROポリペプチドのアゴニスト又はPROポリペプチドに対するアンタゴニストを同定する方法に関する。好ましくは、PROポリペプチドは、天然配列PROポリペプチドである。特別な態様では、PROアゴニスト又はアンタゴニストは、抗PRO抗体である。

【0005】

その他の態様では、本発明は、PROポリペプチド、或いはポリペプチドと結合するアゴニスト又はアンタゴニスト抗体を、担体又は賦形剤と混合して含有する組成物に関する。一態様では、組成物は治療的有効量のポリペプチド又は抗体を含有する。他の態様では、組成物が免疫刺激分子を含む場合には、組成物は、（a）それを必要とする哺乳動物への炎症細胞の浸潤を増加させ、（b）それを必要とする哺乳動物での免疫反応を刺激し又は高め、（c）抗原に应答して、それを必要とする哺乳動物でのTリンパ球の増殖を増加させ、（d）Tリンパ球の活性を刺激し、又は（e）血管透過性を増加させるために、有用である。更なる態様では、この組成物が免疫阻害分子を含む場合には、組成物は、（a）それを必要とする哺乳動物への炎症細胞の浸潤を減少させ、（b）それを必要とする哺乳動物での免疫反応を阻害し又は減じ、（c）Tリンパ球の活性を低下させ、又は（d）抗原に应答して、それを必要とする哺乳動物でのTリンパ球の増殖を低下させるために、有用である。その他の態様では、この組成物は更なる活性成分を含み、それは、例えば、更なる抗体、或いは細胞毒性又は化学療法剤でありうる。好ましくは、この組成物は無菌である。

20

30

他の実施態様では、本発明は有効量のPROポリペプチド、そのアゴニスト又はそのアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、その必要とする哺乳動物における免疫関連疾患を治療する方法に関する。好ましい態様では、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、特発性炎症性腸病、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、及び慢性炎症性脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、例えば感染性、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変症、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸疾患、及びウィップル病、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、乾癬、アレルギー性疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患、例えば好球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患からなる群から選択される。

40

【0006】

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、この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。一態様では、本発明は、PROポリペプチドと結合する単離された抗体に関する。その他の態様では、抗体はPROポリペプチドの活性を模倣するか（アゴニスト抗体）、或いは逆に抗体はPROポリペプチドの活性を阻害又は中和

50

する（アンタゴニスト抗体）。その他の態様では、この抗体はモノクローナル抗体であり、それは好ましくは非ヒトの相補性決定領域（CDR）残基及びヒトフレームワーク領域（FR）残基を有する。抗体は標識されてもよいし、固体支持体へ固定されてもよい。更なる態様では、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。

更なるその他の実施態様では、本発明は、製薬的に許容可能な担体と混合して抗PRO抗体を含有する組成物を提供する。一態様では、この組成物は治療的に有効量の抗体を含む。好ましくは、この組成物は無菌である。この組成物は、保存料を添加して長期の貯蔵安定性を達成してもよい液体医薬製剤の形で投与されうる。或いは、この抗体は、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。

10

【0007】

更なる実施態様では、本発明は：

- (a) PRO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む物質の組成物；
- (b) 前記組成物を収容する容器；並びに
- (c) 免疫関連疾患の治療における前記PRO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使用を記した前記容器に含まれる包装挿入物、又は前記容器に添付されるラベルを含んでなる製造品に関する。この組成物は、PROポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストの治療の有効量を含みうる。

その他の実施態様では、本発明は、(a) 哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、並びに(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においてPROポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなる、哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法に関し、この方法では、コントロール試料と比較して試験試料でのより高い又は低い発現レベルが、試験組織細胞が得られた哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す。

20

【0008】

その他の実施態様では、本発明は、試験試料において、(a) 哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料と抗PRO抗体を接触せしめ、(b) この抗体とPROポリペプチド間の複合体の形成を検出することを含んでなる、哺乳動物における免疫疾患を診断する方法に関し、この方法では、前記複合体の形成が、前記疾患の存在の有無を示す。検出は定性的又は定量的であってもよく、同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料における複合体の形成をモニターし比較して行われる。試験試料における多量の形成された複合体は、試験組織細胞が得られた哺乳動物における免疫疾患の存在の有無を示す。抗体は、好ましくは検出可能なラベルを有する。複合体の形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、或いは当該分野で知られている他の技術によってモニターすることができる。試験試料は、通常は、免疫系に欠損又は異常を有する個体から得られる。

30

その他の実施態様では、本発明は、PROポリペプチドを含有すると思われる細胞の試験試料を抗PRO抗体へ曝露し、前記抗体の前記細胞試料への結合を測定することを含んでなる、試料中のPROポリペプチドの存在を測定する方法を提供する。特定の態様では、この試料はPROポリペプチドを含有すると思われる細胞を含み、抗体は細胞へ結合する。この抗体は、好ましくは検出可能に標識され及び/又は固体支持体へ結合している。

40

【0009】

その他の実施態様では、本発明は、抗PRO抗体と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、PROポリペプチド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、この担体は製薬的に許容可能である。

その他の実施態様では、本発明は、適切な包装体に抗PRO抗体を含む診断用キットに関する。このキットは、好ましくは、この抗体をPRO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。

その他の実施態様では、本発明は、哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料中におけ

50

る P R O 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、前記試験試料中の P R O ポリペプチドの存否を検出することが、前記哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す。

その他の実施態様では、本発明は：

(a) 通常は、 P R O 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) 前記細胞応答の誘導を測定して、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ことを含み、前記細胞応答の誘導により、前記試験化合物が有効なアゴニストであることが示される、 P R O ポリペプチドのアゴニストを同定する方法に関する。

【 0 0 1 0 】

その他の実施態様では、本発明は、候補化合物と P R O ポリペプチドの相互作用を可能にするのに十分な条件と時間にわたってこの二つの成分を接触させ、 P R O 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、 P R O 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。特定の態様では、候補化合物又は P R O ポリペプチドのいずれかが固体支持体上に固定される。その他の態様では、非固定化成分が検出可能なラベルを有する。好ましい態様では、この方法は：

(a) P R O ポリペプチドによって通常は誘導される細胞応答の誘導に適した条件下、 P R O ポリペプチドの存在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段階を含む。

その他の実施態様では、本発明は、通常はポリペプチドを発現する細胞において P R O ポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法において、細胞を試験化合物と接触せしめて、 P R O 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方法を提供する。好ましい態様では、この方法は：

(a) P R O ポリペプチドの発現を可能にする好適な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段階を含む。

【 0 0 1 1 】

更にその他の実施態様では、本発明は、(a) P R O ポリペプチド、(b) P R O ポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R O 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、ここで、アゴニスト及びアンタゴニストは抗 P R O ポリペプチドであってもよい。好ましい実施態様では、この哺乳動物はヒトである。その他の好ましい実施態様では、この核酸はエキソピボ(生体外)遺伝子治療によって投与される。更なる好ましい実施態様では、核酸は、ベクター、より好ましくはアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス又はレトロウイルスベクターである。

更にその他の態様では、本発明は、プロモーター、(a) P R O ポリペプチド、(b) P R O ポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R O ポリペプチドのアンタゴニストをコードする核酸、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な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する。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然 P R O ポリペプチドからのものである。

より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、またプロモーター、(a) P R O ポリペプチド、(b) P R O ポリペプチドのアゴニスト、又は(c) P R O ポリペプチドのアンタゴニストをコードする核酸、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なるレトロウイルスベクターを含み、前記産生細胞は、組換えレトロウイルス粒子を生産するように、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。

【 0 0 1 2 】

10

20

30

40

50

より更なる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PRO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んでなる、哺乳動物におけるTリンパ球の活性を増加させる方法を提供し、ここで、哺乳動物におけるTリンパ球の活性が増加する。

より更なる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PRO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んでなる、哺乳動物におけるTリンパ球の活性を減少させる方法を提供し、ここで、哺乳動物におけるTリンパ球の活性が減少する。

より更なる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PRO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んでなる、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖を増加させる方法を提供し、ここで、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖が増加する。 10

より更なる実施態様では、本発明は、(a) PROポリペプチド、(b) PROポリペプチドのアゴニスト、又は(c) PRO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んでなる、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖を減少させる方法を提供し、ここで、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖が減少する。

【0013】

B. 更なる実施態様

本発明の他の実施態様では、本発明は、ここに開示されるポリペプチドのいずれかをコードするDNAを含むベクターを提供する。また、そのようなベクターを含む宿主細胞が提供される。例として、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母である。ここに開示されるポリペプチドのいずれかを生産する方法が更に提供され、該方法は、所望のポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、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。 20

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開示されるポリペプチドのいずれかを含むキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例には、免疫グロブリンのFc領域又はエピトープタグ配列に融合したここに開示のポリペプチドのいずれかを含むキメラ分子が含まれる。

別の実施態様では、本発明は上述又は後述のポリペプチドのいずれか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。 30

また別の実施態様では、本発明は、アンチセンスプローブとして又はゲノム及びcDNAヌクレオチド配列の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前述又は後述のヌクレオチド配列のいずれかから得られる。

他の実施態様では、本発明は、PRO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。

【0014】

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、ここに開示された膜貫通タンパク質の細胞外ドメインでシグナルペプチドを有する又は有しないもの、或いはここに開示された完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片を有するPROポリペプチドをコードするDNA分子、或いは(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、或いは少なくとも約81%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約82%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約83%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約84%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約85%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約86%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約87%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約88%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約89%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約90%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約91%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約92%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約93%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約94%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約95% 40 50

の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 96% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 97% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 98% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 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む。

【0015】

別の態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された完全長PRO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PROポリペプチドのコード配列、ここに開示された膜貫通タンパク質の細胞外ドメインのコード配列でシグナルペプチドを有する又は有しないもの、或いはここに開示された完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片のコード配列を含んでなるDNA分子、或いは(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、或いは少なくとも約81%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約82%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約83%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約84%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約85%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約86%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約87%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約88%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約89%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約90%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約91%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約92%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約93%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約94%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約95%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約96%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約97%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約98%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約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む。

10

20

【0016】

更なる態様では、本発明は、(a)ここに開示したヒトタンパク質cDNAのいずれかによってコードされているのと同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子、或いは(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、或いは少なくとも約81%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約82%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約83%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約84%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約85%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約86%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約87%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約88%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約89%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約90%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約91%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約92%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約93%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約94%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約95%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約96%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約97%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約98%の核酸配列同一性、更に或いは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有す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。

30

【0017】

別の態様では、本発明は、膜貫通ドメイン欠損又は膜貫通ドメイン不活性化のいずれかであるPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を含むか、或いはそのようなコード化ヌクレオチド配列に対して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、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、ここに開示されたPROポリペプチドの可溶性細胞外ドメインが考察されている。

40

他の実施態様は、PROポリペプチドのコード配列の断片、又はその相補鎖に関し、それらは、例えば、場合によっては抗PRO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PROポリペプチドのコード化断片の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得る。このような核酸断片は、通常は少なくとも約20ヌクレオチド長、或いは少なくとも約30ヌクレオチド長、或いは少なくとも約40ヌクレオチド長、或いは少なくとも約50ヌクレオチド長、或いは少なくとも約60ヌクレオチド長、或いは少なくとも約70ヌクレオチド長

50

、或いは少なくとも約 80ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 90ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 100ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 110ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 120ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 130ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 140ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 150ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 160ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 170ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 180ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 190ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 200ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 250ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 300ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 350ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 400ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 450ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 500ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 600ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 700ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 800ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 900ヌクレオチド長、或いは少なくとも約 1000ヌクレオチド長であり、ここで「約」という語の内容は参照する長さのプラス又はマイナス 10%のヌクレオチド配列長を指すことを意味する。PRO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、多くの良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用いてPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれのPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、日常的な手法で同定してもよい。このようなPROポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の全ては、ここで考慮される。また、これらのヌクレオチド分子断片、好ましくは抗PRO抗体に対する結合部位を含むPROポリペプチド断片によってコードされるPROポリペプチド断片も考慮される。

【0018】

他の実施態様では、本発明は、上記で特定された単離された核酸配列のいずれかによってコードされる単離されたPROポリペプチドを提供する。

或る態様では、本発明は、ここに開示した完全長アミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを有するか又は有しない膜貫通タンパク質の細胞外ドメイン、或いはここに開示した完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片を有するPRO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、或いはは少なくとも約 81%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 82%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 83%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 84%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 85%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 86%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 87%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 88%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 89%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 90%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 91%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 92%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 93%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 94%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 95%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 96%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 97%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 98%のアミノ酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約 99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたPROポリペプチドに関する。

更なる態様では、本発明は、ここに開示したヒトタンパク質cDNAのいずれかによってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約 80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 81%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 82%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 83%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 84%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 85%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 86%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 87%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 88%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 89%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 90%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 91%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 92%のアミノ酸配列同一性、或いは少なく

とも約 93% のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 94% のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 95% のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 96% のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 97% のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約 98% のアミノ酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約 99% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離された PRO ポリペプチドに関する。

【0019】

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有しない、上記した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ってコードされる単離された PRO 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、適した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 PRO 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 PRO ポリペプチドを回収することを含む。

10

他の態様では、本発明は、膜貫通ドメインの欠失した或いは膜貫通ドメインが不活性化している単離された PRO 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、適した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 PRO 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 PRO ポリペプチドを回収することを含む。

更に他の実施態様では、本発明は、ここで定義される天然 PRO 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 PRO 抗体或いは小分子である。

20

更なる実施態様では、本発明は、PRO 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、PRO ポリペプチドを候補分子と接触させ、前記 PRO 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、PRO ポリペプチドは天然 PRO ポリペプチドである。

また更なる実施態様では、本発明は、PRO ポリペプチド、或いはここに記載した PRO ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗 PRO 抗体を、担体と組み合わせて含有する組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体である。

本発明のその他の実施態様は、PRO 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 PRO 抗体を、PRO 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 PRO 抗体に対して反応性である症状の治療に有用な医薬の調製のために用いることに関する。

30

【0020】

[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「PRO ポリペプチド」及び「PRO」という用語は、直後に数値符号がある場合に種々のポリペプチドを指し、完全な符号(例えば、PRO/番号)は、ここに記載する特定のポリペプチド配列を意味する。「数字」がここで使用される実際の数値符号である、ここで使用される「PRO/番号ポリペプチド」及び「PRO/番号」という用語は、天然配列ポリペプチド及び変異体(ここで更に詳細に定義する)を含む。ここで記載されている PRO 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。「PRO ポリペプチド」という用語は、ここで開示されている各個々の PRO/番号ポリペプチドに指す。「PRO ポリペプチド」を指すこの明細書中の全ての開示は、各ポリペプチドを個別にも組み合わせとしても言及する。例えば、調製の、精製の、誘導の、抗体の形成、投与の、含有する組成物、疾患の治療、などの記述は、本発明の各ポリペプチドに個別に関係する。また、「PRO ポリペプチド」という用語は、ここに開示されている PRO/番号ポリペプチドの変異体を含む。

40

「天然配列 PRO ポリペプチド」は、天然由来の対応する PRO 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 PRO 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

50

る。「天然配列PROポリペプチド」という用語には、特に、特定のPRO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）、自然に生じる変異形態（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、ここに開示されている天然配列PROポリペプチドは、関連する図に示されている完全長アミノ酸配列を含有する成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び終止コドンは、太い書体及び下線で図中に示している。しかし、関連する図に開示されているPROポリペプチドは、該図においてアミノ酸位置1と称されているメチオニン残基で開始することが示されている一方で、図のアミノ酸位置1より上流又は下流のいずれかに位置する他のメチオニン残基が、PROポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いられることも考えられるし可能である。

10

【0021】

PRO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PROポリペプチドの形態を意味する。通常、PROポリペプチドECDは、それらの膜貫通及び/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PRO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、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、PROポリペプチド細胞外ドメインは、場合によっては、実施例又明細書において同定された膜貫通ドメインのいずれかの末端から約5を越えないアミノ酸を含みうるし、付着のシグナルペプチドを有する又は有し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は、本発明において考慮される。

20

ここに開示する種々のPROポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書と添付の図面に示される。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, Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)）。更に、幾つかの場合には、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、一つ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に定義されるシグナルペプチドのC-末端境界のいずれかの側の約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、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

30

【0022】

「PROポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される完全長天然配列PROポリペプチド、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PROポリペプチド配列、シグナルペプチド有無のここに開示されたPROの細胞外ドメイン又はここに開示された完全長PROポリペプチドの他の断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する活性PROポリペプチドを意味する。このようなPROポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN-又はC-末端において一つ又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたPROポリペプチドが含まれる。通常、PROポリペプチド変異体は、ここに開示される完全長天然アミノ酸配列、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PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示されたPROの細胞外ドメイン又はここに開示された完全長PROポリペプチドの特に同定された他の断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約8

40

50

7%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、PRO変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、或いは少なくとも約20アミノ酸長、或いは少なくとも約30アミノ酸長、或いは少なくとも約40アミノ酸長、或いは少なくとも約50アミノ酸長、或いは少なくとも約60アミノ酸長、或いは少なくとも約70アミノ酸長、或いは少なくとも約80アミノ酸長、或いは少なくとも約90アミノ酸長、或いは少なくとも約100アミノ酸長、或いは少なくとも約150アミノ酸長、或いは少なくとも約200アミノ酸長、或いは少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

ここに定義されるPROポリペプチドに対してここで同定されている「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、PROポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較プログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0D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。

【0023】

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

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、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ことは理解されるであろう。この方法を用いた%アミノ酸配列同一性の計算の例として、「PRO」が対象となる仮説的PROポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」が対象となる「比較」タンパク質が比較されているアミノ酸配列を表し、そして「X」、「Y」及び「Z」の各々が異なった仮説的アミノ酸残基を表し、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸

配列同一性の計算方法を示す。

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

10

【0024】

また、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschul等, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

20

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

30

分率 X/Y の100倍

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

【0025】

「PRO変異体ポリヌクレオチド」又は「PRO変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性PROポリペプチドをコードする核酸分子であり、ここに開示する完全長天然配列PROポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列PROポリペプチド配列、シグナルペプチドを有する又は有しないここに開示するPROポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長PROポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列と少なくとも約80%の核酸配列同一性、好ましくは或いは少なくとも約81%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約82%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約83%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約84%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約85%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約86%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約87%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約88%の核酸配列同一性、或いは少なくとも約89%の核酸配列同一性、或いは少なくとも

40

50

約 90% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 91% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 92% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 93% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 94% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 95% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 96% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 97% の核酸配列同一性、或いは少なくとも約 98% の核酸配列同一性、そして、或いは少なくとも約 99% の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

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

【0026】

ここで同定される PRO コード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、PRO 配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えば BLAST、BLAST-2、ALIGN、又は Megalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2 プログラム用の完全なソースコードが下記の表 1 に提供されている配列比較プログラム ALIGN-2 を使用することによって得られる。ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表 1 に示したソースコードは米国著作権庁、ワシントン D.C., 20559 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 TXU510087 の下で登録されている。ALIGN-2 はジェネンテック社、サウス・サンフランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表 1 に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2 プログラムは、UNIX (登録商標) オペレーティングシステム、好ましくはデジタル UNIX (登録商標) V4.0D 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。

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

分率 W/Z の 100 倍

ここで、W は配列アラインメントプログラム ALIGN-2 の C 及び D のアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、Z は D の全核酸残基数である。核酸配列 C の長さがアミノ酸配列 D の長さとは異なる場合、C の D に対する %核酸配列同一性は、D の C に対する %核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた %核酸配列同一性の計算の例として、「PRO-DNA」が対象となる仮説的 PRO コード化核酸配列を表し、「比較 DNA」が対象となる「PRO-DNA」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮説的アミノ酸残基を表し、表 4 及び 5 が「比較 DNA」と称される核酸配列の「PRO-DNA」と称される核酸配列に対する %核酸配列同一性の計算方法を示す。

【0027】

特に断らない限りは、ここでの全ての %核酸配列同一性値は、直上のパラグラフに示したように ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2 コンピュータプログラム (Altschul 等、

10

20

30

40

50

Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)) を用いて決定してもよい。更に、殆どの W U - B L A S T - 2 検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値 (T) = 11、及びスコアリングマトリクス = B L O S U M 6 2。W U - B L A S T - 2 が用いられた場合、% 核酸配列同一性値は、(a) 天然配列 P R O ポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とする P R O ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と、対象とする比較核酸配列 (即ち、対象とする P R O ポリペプチドコード化核酸分子が比較される P R O ポリペプチド変異体であってもよい配列) との間の、W U - B L A S T - 2 によって決定した一致する同一核酸残基の数を、(b) 対象とする P R O ポリペプチドコード化核酸分子のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列 B に対して少なくとも 80% の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列 A を含んでなるポリペプチド」という表現では、核酸配列 A が対象とする比較核酸配列であり、核酸配列 B が対象とする P R O ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

10

また、% 核酸配列同一性は、配列比較プログラム N C B I - B L A S T 2 (Altschul 等, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)) を用いて決定してもよい。N C B I - B L A S T 2 配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> からダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。N C B I - B L A S T 2 は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e - 値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = B L O S U M 6 2 を含む。

20

【0028】

核酸配列比較に N C B I - B L A S T 2 が用いられる状況では、与えられた核酸配列 C の、与えられた核酸配列 D との、又はそれに対する % 核酸配列同一性 (或いは、与えられた核酸配列 D と、又はそれに対して或る程度の % 核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列 C と言うこともできる) は次のように計算される：

分率 W / Z の 100 倍

ここで、W は配列アラインメントプログラム N C B I - B L A S T 2 の C 及び D のアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、Z は D の全核酸残基数である。核酸配列 C の長さが核酸配列 D の長さとは異なる場合、C の D に対する % 核酸配列同一性は、D の C に対する % 核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

30

他の実施態様では、P R O 変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性 P R O 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 P R O ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションする核酸分子である。P R O 変異体ポリペプチドは、P R O 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。

【0029】

「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ときは、その自然環境の成分から同定され分離され及び / 又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、その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。好ましい実施態様において、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 末端或いは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、或いは、(2) クーマシーブルー或いは好ましくは銀染色を用いた非還元或いは還元条件下での S D S - P A G E 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、P R O 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のタンパク質が含まれる。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。

40

50

「単離された」P R Oポリペプチドコード化核酸は、同定され、P R Oポリペプチドをコードする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P R O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或いは設定以外のものである。ゆえに、単離されたP R O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P R O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P R O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P R Oポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるP R Oポリペプチド核酸分子を含む。

【0030】

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

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列或いは分泌リーダーのD N A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D N Aに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したD N A配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプター或いはリンカーが使用される。

【0031】

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

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D N Aの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。更に、緊縮性は塩濃度に逆比例する。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。

【0032】

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度を用いるもの、例えば、50 において0.015 Mの塩化ナトリウム/0.0015 Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いるもの、例えば、42 において50% (v/v)ホルムアミド、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50 mMのpH 6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750 mMの塩化ナトリウム、75 mMのクエン酸ナトリウムを

用いるもの；又は(3)42において50%ホルムアミド、5×SSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸を用い、42において0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中で、55において50%ホルムアミド中で洗浄した後、55においてEDTAを含む0.1×SSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定できる。

【0033】

「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、上記のものより緊縮性が低い洗浄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は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37での終夜インキュベーション後に、37~50にて1×SSC中でフィルター洗浄を行うという条件である。プローブ長などの因子に必要な応じて適合させるには、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかは当業者であれば分かるであろう。

【0034】

「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PROポリペプチド、又はそれらのドメイン配列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、又は幾つかの他の試薬によって同定できるエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは対象とするPROポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~約50のアミノ酸残基(好ましくは約10~約20の残基)を有する。

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(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。

【0035】

ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるPROの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するPROポリペプチドの形態を意味し、ここで、「生物学的」活性とは、天然又は天然に生じるPROが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘発する能力以外の、天然又は天然に生じるPROによって引き起こされる生物機能(阻害又は刺激)を意味し、「免疫」活性とは、天然又は天然に生じるPROが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘発する能力を意味する。

「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PROポリペプチドの生物学的活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を指す。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然PROポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を指す。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PROポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子、などを含む。PRO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、PROポリペプチドを候補アンタゴニスト又

10

20

30

40

50

はアゴニストと接触させ、PROポリペプチドに通常は関連している一又は複数の生物学的活性の変化を測定することを含んでもよい。

【0036】

「治療」とは、治癒的処置、予防的療法及び防止的療法の両方を意味し、患者は標的とする病理学的状態又は疾患を防止又は低下（減少）させられる。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ているものを含む。

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

治療の対象のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ウサギなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

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

【0037】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又は祖ルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN(商品名)、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICS(商品名)を含む。

「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'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体(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。

【0038】

抗体のパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる二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F(ab')₂断片を生じ、それは二つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置において各ドメインの三つのCDRが相互作用してV_H-V_Lに量体の表面に抗原結合部位を決定する。正しくは、6つのCDRが抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な三つのCDRのみを含んでなるFvの半分）でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

【0039】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一の定常ドメイン(CH1)も含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの一つ又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab'断片と相違する。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。F(ab')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

10

20

30

40

50

。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。

【0040】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンの五つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G 及び I g M があり、それらの幾つかは更にサブクラス（アイソタイプ）、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 及び I g A 2 に分類される。

「一本鎖 F v」又は「s F v」抗体断片は、抗体の V_H 及び V_L ドメインを含む抗体断片を含み、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、F v ポリペプチドは、s F v が抗原結合にとって望ましい構造の形成を可能にする、V_H 及び V_L ドメイン間のポリペプチドリンカーを更に含む。s F v 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。

10

【0041】

「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、EP404,097; W093/11161; 及び Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) に、より十分に記載されている。

20

「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) ローリー法で測定した場合 95% を越える抗体、最も好ましくは 99 重量% を越えるまで、(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 末端或いは内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、或いは、(3) クーマシーブルー或いは好ましくは銀染色を用いた非還元或いは還元条件下での SDS-PAGE による均一性まで精製される。単離された抗体には、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。

30

【0042】

「特異的に結合する」抗体、又は特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピートープへ特異的な抗体とは、他のポリペプチド又はポリペプチドエピー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ー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、「標識」抗体が生成されるように、抗体に直接又は間接的に抱合している検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識は、それ自身検出可能でもよく（例えば、放射性標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。

40

【0043】

「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。ここに意図する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス（例えば、孔制御ガラス）、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコンから形成されたものを含む。或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

50

特許第4,275,149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

「リポソーム」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（PROポリペプチド又はその抗体など）の輸送に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

「小分子」とは、ここで、約500ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

【0044】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫系の構成成分が哺乳動物の病的状態を引き起こし、媒介し、或いは寄与する疾患を意味する。また、免疫反応の刺激又は処置が、疾患の進行に対して改善的な効果を有するような疾患をも含む。この用語には、免疫媒介炎症誘発性疾患、非免疫媒介炎症誘発性疾患、感染性疾患、免疫不全性疾患、腫瘍形成等が含まれる。

10

「T細胞媒介疾患」という用語は、T細胞が哺乳動物の病的状態を直接、又は間接に媒介する、或いは寄与する疾患を意味する。T細胞媒介疾患は、細胞媒介効果、リンホカイン媒介効果等、そして例えば、T細胞によって分泌されたリンホカインによってB細胞が刺激された場合に、B細胞と関連している効果にさえも関連している。

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

20

30

【0045】

「有効量」とは、特に定まった目的を達成することを引き起こすPRO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。更には、「治療的有效量」とは、定まった治療的有效量を達成するために効果的なPRO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。また、この量は実験的に確定してもよい。

ここで用いられる「細胞毒性薬」は、細胞の機能を阻害又は抑制し、及び/又は細胞破壊を起こす物質を意味する。この用語は、放射性同位元素（例えば、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 及び Re^{186} ）、化学治療薬、及び細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素又はその断片を意味する。

40

【0046】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、アドリアマイシン、ドキソルピシン、エピルピシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、タキソイド類、例えばパクリタキセル（タキソール(Taxol), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドキシタキセル(doxetaxel)（タキソテール(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、ビンブラスチン、プレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミ

50

トキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルピン(vinorelbine)、カルボプラチン、テニポシド(teniposide)、ダウノマイシン、カルミノマイシン(carminomycin)、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン(esperamicins)(米国特許第4,675,187号参照)、メルファラン、及び他の関連したナイトロジェンマスタードが含まれる。またこの定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働くホルモン剤、例えばタモキシフェン及びオナプリストン(onapristone)も含まれる。

ここで使用される場合の「成長阻害剤」とは、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて、特にここで同定された任意の遺伝子を過剰発現する細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を指すものである。よって、成長阻害剤とは、S期におけるそのような遺伝子の過剰発現細胞のパーセンテージを有意に低減させるものである。成長阻害剤の例には、細胞分裂周期の進行をブロックする薬剤(S期以外の場所において)、例えばG1停止及びM期停止を誘発する薬剤が含まれる。伝統的なM期ブロッカーには、ピンカ(ピンクリスチン及びピンラスチン)、タキソール、及びトポIIインヒビター、例えばドキシソルピシン、エビルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンが含まれる。G1を停止させるこれらの薬剤、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-CがS期停止へ波及する。更なる情報は、Murakami等により「細胞分裂周期の調節、オンコジーン、及び抗新生物薬(Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs)」と題された、癌の分子的基础(The Molecular Basis of Cancer)、Mendelsohn及びIsrael編、第一章(WB Saunders; Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

10

20

【0047】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、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；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)；肝臓成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラク トゲン；腫瘍壊死因子-及び-；ミユラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；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- 或いはTGF- のような形質転換成長因子(TGF)；インスリン様成長因子-I及び-II；エリスロポイエチン(EPO)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン-、-、及び- のようなインターフェロン；マクロファージCSF(M-CSF)のようなコロニー刺激因子(CSF)；顆粒球マクロファージCSF(GM-CSF)及び顆粒球CSF(G-CSF)；IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、又はIL-17等のインターロイキン(IL)；腫瘍壊死因子、例えばTNF- 又はTNF- ；及びLIF及びキットリグンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来或いは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

30

40

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(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、Ig

50

A (I g A - 1 及び I g A - 2 を含む)、 I g E、 I g D 又は I g M などの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

ここで用いられる「炎症細胞」という用語は、単核細胞、好酸球、マクロファージ、及び多形核球好中球 (P M N) 等の炎症性反応を増強する細胞を意味する。

【 0 0 4 8 】

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, 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, _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, 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, 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}
};

```

表 1 (続き)

```

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

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

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

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

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

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

char             *ofile;          /* output file name */
char             *namex[2];       /* seq names: getseqs() */
char             *prog;           /* prog name for err msgs */
char             *seqx[2];        /* seqs: getseqs() */
int              dmax;            /* best diag: nw() */
int              dmax0;           /* final diag */
int              dna;             /* set if dna: main() */
int              endgaps;         /* set if penalizing end gaps */
int              gapx, gapy;       /* total gaps in seqs */
int              len0, len1;       /* seq lens */
int              ngapx, ngapy;     /* total size of gaps */
int              smax;            /* max score: nw() */
int              *xbm;            /* bitmap for matching */
long             offset;          /* current offset in jmp file */
struct           diag            *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)
    main
    int      ac;
    char     *av[ ];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";       /* output file */

    nw();                       /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();                 /* get the actual jmps */
    print();                     /* print stats, alignment */

    cleanup(0);                 /* unlink any tmp files */
}

```

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()
{
    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)

...nw

```

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
   */

```

表 1 (続き)

```

...nw
id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[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) {
            writejmps(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 {
    coll[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) {
            writejmps(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)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

```

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

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

```

表 1 (続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
{
    int      lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;                                /* leading trailing overlap */

    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

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

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

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

```

10

20

30

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 char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

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

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(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; ) {
    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()
    dumpblock
    {
        register i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
            *po[i]-- = '\0';
    }
}

```

...pr_align

10

20

30

40

表 1 (続き)

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;        /* index in out[ ] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                putline
    int    ix;        {

```

表 1 (続き)

...putline

```

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()
{
    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';
    }
}

```

10

20

30

40

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/homgXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

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

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)
char *file; /* file name */
int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

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

```

cleanup

10

20

getseq

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()
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

g_alloc

20

30

40

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;
}
}

```

表 1 (続き)

```

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

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

```

10

【 0 0 4 9 】

表 2

20

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

% アミノ酸配列=

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

30

5 ÷ 15 = 33.3%

表 3

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

% アミノ酸配列同一性 =

40

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

5 ÷ 10 = 50%

表 4

PRO - 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 =

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

6 ÷ 14 = 42.9%

10

表 5

PRO - 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 =

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

4 ÷ 12 = 33.3%

20

【 0 0 5 0 】

I I . 本発明の組成物と方法

30

A . 完全長 P R O ポリペプチド

本発明は、本出願で P R O ポリペプチドと呼ば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核酸配列を提供する。特に下記の実施例で更に詳細に説明するように、種々の P R O ポリペプチドをコードする c D N A が同定され単離された。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 P R O 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形式に関わらず、「P R O / 番号」で呼称する。

下記の実施例に開示するように、種々の c D N A クローンが開示されている。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 P R O 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。

40

【 0 0 5 1 】

B . P R O ポリペプチド変異体

ここに記載した完全長天然配列 P R O ポリペプチドに加えて、P R O 変異体も調製できると考えられる。P R O 変異体は、P R O ポリペプチド D N A に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、或いは所望の P R O ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシル化部位の数又は位置の変化或いは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化が P R O ポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

50

天然完全長配列 P R O 又はここに記載した P R O ポリペプチドの種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第 5,364,934 号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列 P R O と比較して P R O ポリペプチドのアミノ酸配列が変化する P R O ポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも一のアミノ酸の P R O ポリペプチドの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、P R O ポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては 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、得られた変異体を完全長又は成熟天然タンパク質によって提示された活性について試験することにより決定される。

10

【 0 0 5 2 】

P R O 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。或る種の断片は、P R O 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。

20

P R O 断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法是、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、或いは適当な制限酵素で D N A を消化して所望の断片を単離することによる P R O 断片の生成を含む。更に他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により、所望のポリペプチド断片をコードする D N A 断片を単離し増幅することを含む。D N A 断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、P C R の 5 ' 及び 3 ' プライマーで用いられる。好ましくは、P R O ポリペプチド断片は、ここに開示した天然 P R O ポリペプチドと少なくとも一の生物学的及び/又は免疫学的活性を共有する。

特別の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換と題して表 6 に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表 6 に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類で更に記載するように、より実質的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

30

【 0 0 5 3 】

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	10
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu	
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg	
Met (M)	leu; phe; ile	leu	
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	
Pro (P)	ala	ala	
Ser (S)	thr	thr	
Thr (T)	ser	ser	
Trp (W)	tyr; phe	tyr	
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe	20
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu	

【0054】

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

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

30

【0055】

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

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発[Carter等, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)]、カセット突然変異誘発[Wells等, Gene, 34:315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発[Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)]等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができ、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施してPRO変異体DNAを作成することもできる。

40

【0056】

また、隣接配列に沿って一つ又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステイン

50

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

【0057】

C . P R Oの修飾

P R Oポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一つの型は、P R Oポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、P R Oの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばP R Oを水不溶性支持体マトリクス或いは抗P R O抗体の精製方法、及びその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1, 1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

他の修飾は、グルタミル及びアスパラギン残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の - 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。

【0058】

本発明の範囲内に含まれるP R Oポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、天然配列P R O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に存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加をここでは意味する。更に、この語句は、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含み、そこには、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化も含まれる。

P R O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(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ポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

【0059】

P R Oポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に発行されたW087/05330、及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

P R Oポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、或いはグ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、Hakimuddi等, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)により、及びEdge等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素

的切断は、Thotakura等, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

本発明のPROの共有結合的修飾の他の型は、PROポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。

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

【0060】

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

それに替わる実施態様では、キメラ分子はPROの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも一つの可変領域に換えて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5,428,130号を参照のこと。

【0061】

D. PROの調製

以下の説明は、主として、PRO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PRO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PROを調製することができると考えられる。例えば、PRO配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい [例えば、Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., サンフランシスコ, カリフォルニア (1969)；Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照]。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機(フォスターシティー, カリフォルニア)を用いて、製造者の指示により実施してもよい。PRO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PROを生産してもよい。

【0062】

1. PROをコードするDNAの単離

PROをコードするDNAは、PRO 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ライブラリから得ることができる。従って、ヒトPRO DNAは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリから簡便に得ることができる。またPRO-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリ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。

ライブラリは、対象となる遺伝子或いはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ（PRO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。所望のPRO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)]。

下記の実施例には、cDNAライブラリ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、ビオチン化或いは酵素標識の使用が含まれる。中程度の緊縮性及び高度の緊縮性を含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrook等に示されている。

このようなライブラリ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個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている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渡っての（アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの）配列同一性は、当該分野で知られた、及びここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されていない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て選択されたcDNA又はゲノムライブラリをスクリーニングすることによって得られる。

【0063】

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PRO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。

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質移入の方法、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(Agrobacterium tumefaciens)による感染が、Shaw等, Gene, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開のWO 89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan

der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingen等, *J. Bact.*, 130:946 (1977)及びHsiao等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、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。

【0064】

ここに記載のベクターにDNAをクローニング或いは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌 K 1 2 株 M M 2 9 4 (A T C C 3 1 , 4 4 6) ; 大腸菌 X 1 7 7 6 (A T C C 3 1 , 5 3 7) ; 大腸菌株 W 3 1 1 0 (A T C C 2 7 , 3 2 5) 及び K 5 7 7 2 (A T C C 5 3 , 6 3 5) 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、例えばバチルス・サブチリス(*B. subtilis*)及びバチルス・リチェニフォルミス(*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD266,710に記載されたバチルス・リチェニフォルミス 4 1 P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株 W 3 1 1 0 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 W 3 1 1 0 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 W 3 1 1 0 株 1 A 2 ; 完全な遺伝子型 tonA ptr3 を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 9 E 4 ; 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 W 3 1 1 0 株 2 7 C 7 (A T C C 5 5 , 2 4 4) ; 完全な遺伝子型 tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r を有する大腸菌 W 3 1 1 0 株 3 7 D 6 ; 非カナマイシン耐性 deg P 欠失変異を持つ 3 7 D 6 株である大腸菌 W 3 1 1 0 株 4 0 B 4 ; 及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783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。或いは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0065】

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、PRO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・セレヴィシヤは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・プロンプ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290:140 [1981]; 1985年5月2日発行のEP139,383); クルベロミセス宿主(*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号; Fleer等, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991))、例えばクルベロミセスラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, *J. Bacteriol.* 154(2):737-742 [1983])、クルベロミセス・フラギリリス(*K. fragilis*) (A T C C 1 2 , 4 2 4)、クルベロミセス・ブルガリクス(*K. bulgaricus*) (A T C C 1 6 , 0 4 5)、クルベロミセス・ウイケラミイ(*K. wickerhamii*) (A T C C 2 4 , 1 7 8)、クルベロミセスワルチイ(*K. waltii*) (A T C C 5 6 , 5 0 0)、クルベロミセス・ドロソフィラルム(*K. drosophilarum*) (A T C C 3 6 , 9 0 6 ; Van den Berg等, *Bio/Technology*, 8:135 (1990))、クルベロミセス・テモトレランス(*K. thermotolerans*)及びクルベロミセス・マルキシヤナス(*K. marxianus*); ヤロウィア(*yarrowia*) (EP402,226); ピチア・パストリス(*Pichia p*

10

20

30

40

50

astoris) (EP183,070; Sreekrishna等, J. Basic Microbiol, 28:265-278 [1988]); カンジダ; トリコデル・マレーシア (*Trichoderma reesia*) (EP244,234); アカパンカビ (Case等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); シュワニオマイセス (*Schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*) (1990年10月31日発行のEP394,538); 及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム (*Tolyocladium*) (1991年1月10日発行のW091/00357); 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス (Balance等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn等, Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984])、及びアスペルギルス・ニガー (Kelly及びHynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック (C1化合物資化性、Methylotropic) 酵母は、これらに限られないが、ハンセンヌラ (*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たメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982) に記載されている。

10

グリコシル化PRO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。より詳細な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株 (COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株 (293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -DHFR (CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)) ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL 51) を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

20

【0066】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

PRO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、ウィルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、一つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一つ又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

30

PROは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列或いは成熟タンパク質或いはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるPRO-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp或いは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択された原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー (サッカロミセス (*Saccharomyces*) 及びクлуйベロマイシス (*Kluyveromyces*)

40

因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス (*C.albicans*) グルコアミラーゼリーダー (1990年4月4日発行のEP362179)、又は1990年11月15日に公開されたW090/13646に記載され

50

ているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一或いは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウィ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。

【0067】

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

10

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

【0068】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの例は、DHFR 或いはチミジンキナーゼのように PRO-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分の同定を可能にするものである。野生型 DHFR を用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaub 等により Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980) に記載されているように調製され増殖された、DHFR 20
活性に欠陥のある CHO 株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミド YRp7 に存在する trp1 遺伝子である [Stinchcomb 等, Nature, 282:39 (1979); Kingsman 等, Gene, 7:141 (1979); Tschemper 等, Gene, 10:157 (1980)]。trp1 遺伝子は、例えば、ATCC 番号 44076 或いは PEP4-1 のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

20

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

30

【0069】

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 (1987)]、
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。

40

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターは EP73,657 に更に記載されている。

【0070】

50

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのP R O転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス（1989年7月5日公開のUK2,211,504）、アデノウィルス（例えばアデノウィルス2）、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40（SV40）のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による所望のP R OをコードするD N A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D N Aのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン）。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィ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）、サイトメガロウィ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ィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、P R O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。

【0071】

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m R N Aの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのD N A又はc D N A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、P R Oをコードするm R N A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P R Oの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gething等、Nature, 293:620-625 (1981); Mantei等、Nature, 281:40-46 (1979); EP117,060; 及びEP117,058に記載されている。

【0072】

4. 遺伝子増幅/発現の検出

遺伝子の増幅及び/又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンプロット法、m R N Aの転写を定量化するノーザンプロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットプロット法（D N A分析）、又はインサイトハイブリダイゼーション法によって、直接的に試料中で測定することができる。或いは、D N A二本鎖、R N A二本鎖及びD N A-R N Aハイブリッド二本鎖又はD N A-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができる。ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

或いは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列P R Oポリペプチドに対して、又はここで提供されるD N A配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はP R O D N A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。

【0073】

5. ポリペプチドの精製

P R O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-X 100）又は酵素的切断を用いて膜から引

10

20

30

40

50

き離すことができる。P R O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。

P R Oを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相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のエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, *Methodes 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の性質に依存する。

【 0 0 7 4 】

E . 組織分布

本発明のP R Oを発現する組織の位置は、種々のヒト組織でのm R N A発現の測定により確認できる。そのような遺伝子の位置は、P R Oポリペプチドの活性の刺激及び阻害によって最も影響を受けやすい組織に関する情報を提供する。また、特定の組織中の遺伝子の位置は、下記において論じる活性遮断アッセイのための試料組織を提供する。

上記したように、種々の組織における遺伝子増幅又は遺伝子発現は、m R N Aの転写の定量化のための従来のサザンプロット、ノーザンプロット(Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 [1980])、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って、ここに提供する配列に基づき、適切な標識プローブを用いて測定できる。或いは、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する抗体を用いてもよい。

或いは、種々の組織における遺伝子発現は、遺伝子産物を直接定量化するための、組織断片及び細胞培地又は体液の免疫組織学的染色などの免疫的方法によっても測定できる。免疫組織学的染色又は試料液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の動物から調製される。都合良く、抗体は、P R Oポリペプチドの天然配列に対して、又は本発明のポリペプチドをコードするD N A配列に基づく合成ペプチドに対して、或いはP R Oポリペプチドをコードし、特異的抗体エピトープをコードするD N Aと融合した外来配列に対して調製してもよい。下記に、抗体を生成するための一般的な技術、並びにノーザンプロット及びインサイツハイブリダイゼーションのプロトコールを提供する。

【 0 0 7 5 】

F . 抗体結合の研究

本発明のP R Oポリペプチドの活性は、組織細胞に対するP R Oポリペプチドの効果を阻害する抗P R O抗体の能力が試験される抗体結合の研究によって更に確認できる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロコンジュゲート抗体を含み、その調製は以下に記載する。

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

競合的結合アッセイは、標識標準物の、限られた量の抗体との結合について試験分析物と競合する能力による。試験試料中の(腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる)標的タンパク質の量は、抗体に結合し始める標準物の量に逆比例する。結合し始める標準物の量の測定を促進するために、抗体は好ましくは競合の前又は後に固定化し、抗体に結合した標準品及び分析物が未結合で残っている標準物及び分析物から容易に分離できるよう

にする。

サンドウィッチアッセイは二つの抗体の使用を含み、各々が検出すべきタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチアッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第一の抗体に結合し、その後第二の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の3成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第二の抗体は検出可能部分で標識され(直接サンドウィッチアッセイ)、或いは検出可能部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい(間接サンドウィッチアッセイ)。例えば、サンドウィッチアッセイの一形態は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は、腫瘍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。 10

【0076】

G. 細胞ベースアッセイ

細胞ベースアッセイ及び免疫関連疾患の動物モデルを、ここで同定された遺伝子とポリペプチド、並びに免疫関連疾患の発達と病原性との関係を更に理解するのに用いることができる。

異なる方法では、ここに記載されたcDNAを特定の免疫関連疾患に関与することが知られている或る細胞型の細胞へ形質移入し、これらのcDNAの免疫機能を刺激又は阻害する能力を分析する。適当な細胞は所望の遺伝子で形質移入し、そして免疫機能をモニターすることができる。このような形質移入された株化細胞は、例えばT細胞の増殖又は炎症細胞の浸潤を調節する免疫機能を阻害又は刺激するポリ-又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の能力を試験するのに用いることができる。ここに同定した遺伝子のコード化配列で形質移入した細胞は、更に、免疫関連疾患の治療の候補薬の同定に用いることができる。 20

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

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と共に培養し、トリチウム化チミジンの取込によりT細胞の増殖能を測定する。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、活性化してIL-2が産出されるため、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生成の差異を部分的に反映する。MLRの結果は、標準的なリンホカイン(IL-2)検出アッセイにより確認することができる。上掲のCurrent Protocols in Immunology, 3.15.6.3.を参照。 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分裂促進特性又は外的抗原が誘発した活性化による。PROポリペプチドのT細胞刺激活性の更なる証明は、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特異的シグナル、及び第二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な又はポジティブな効果を有するリガンドの結合を通してネガティブとポジティブの双方のコントロールを有する。CD28及びCTLA-4はB7に結合するIgスーパーファミリーの関連糖タンパク質である。B7に結合するCD28は、T細胞活性化のポジティブな同時刺激効果を有し;逆にB7に結合するCTLA-4はネガティブなT細胞脱活性化効果を有する。Chambers. C.A. and Allison. J.P., Curr. Opin. Immunol. (1997) 9:396. Schwartz, R.H., Cell (1992) 71:1065 40 50

; Linsey, P.S. and 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。同時刺激アッセイでは、P R OポリペプチドはT細胞同時刺激又は阻害活性についてアッセイされる。

【0077】

本発明におけるような刺激化合物の直接の使用は、4-1BB糖タンパク質、すなわちプライムT細胞上で発現されるリガンド(4-1BBL)に結合しT細胞の活性化と成長をシグナル伝達する腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーを用いる実験において実証された。Alderson, M.E.等, *J. Immunol.* (1994) 24:2219。

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

別法として、免疫刺激又は増強効果は、血管透過性増強特性を有するP R Oの投与により達成することもできる。増強された血管透過性は炎症と免疫細胞(例えば単球、好酸球、PMN)の局部的浸潤により緩和可能な疾患に有益であろう。

他方、P R Oポリペプチド並びに本発明の他の化合物は、T細胞増殖/活性化、リンホカイン分泌、及び/又は血管透過性の直接の阻害剤であるが、免疫反応を抑制するために直接使用することができる。これらの化合物は、免疫反応の程度を低減し、過剰活性、超最適(superoptimal)又は自己免疫反応により特徴付けられる免疫関連疾患の治療に有用である。本発明の化合物のこの用途は、レセプターB7に結合するCTLA-4がT細胞を脱活性化する上述の実験により実証されている。本発明の直接の阻害化合物は類似した形で機能する。血管浸透性を抑制する化合物の使用は炎症を低減することが予想される。このような使用は過度の炎症を伴う病状の治療に有益である。

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

【0078】

H. 動物モデル

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

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

皮膚同種移植片拒絶のための動物モデルは、T細胞がインビボで組織の破壊を媒介する

能力を試験する手段であり、移植拒絶におけるそれらの役割の指標である。最も一般的で容認されているモデルではマウスの尾の皮膚の移植片が使用される。繰り返し実験により、皮膚同種移植片拒絶がT細胞、ヘルパーT細胞及びキラー-EフェクターT細胞により媒介されるが、抗体では媒介されないことが分かった。Auchincloss, H. Jr.及びSachs, D.H., *Fundamental Immunology*, 2nd ed., W.E.Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992。適切な手順は上掲の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モデルは、Tanabe, M.等, *Transplantation* (1994) 58:23及びTinubu, S.A.等, *J. Immunol.* (1994) 4330-4338により記載されている同種心臓移植片モデルである。

【0079】

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

EAEは、T細胞及び単核細胞の炎症と、続いての中樞神経系における軸索の脱髄により特徴付けられるT細胞媒介自己免疫疾患である。EAEは、一般的にヒトにおけるMSの関連動物モデルであると考えられている。Bolton, C., *Multiple Sclerosis* (1995)1:1-43。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樞神経系に移植されたミエリン疾患のモデルも参照されたい。

接触性過敏症は、細胞媒介免疫機能の単純な遅発型過敏インビボアッセイである。この手順において、遅発型過敏反応を生じさせる外因性ハプテンに皮膚を暴露し、反応を測定して定量する。接触過敏症は最初の感作段階に顕在化段階が続く。顕在化段階はTリンパ球が過去に接触したことがある抗原に遭遇したときに生じる。腫れと炎症が生じ、ヒトアレルギー性接触皮膚炎の優れたモデルが作成される。適切な手順は、Current Protocols in Immunology, J.E. Coligan, A.M.Kruisbeek, D.H.Marglies, E. M.Shevach, 及びW.Strober編, John Wiley & Sons, Inc, unit4.2に詳細に記載されている。また、Grabbe, S. 及びSchwarz, T. *Immun. Today* 19(1):37-44(1998)も参照のこと。

【0080】

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

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

更に、本発明の化合物は乾癬用疾患の動物モデルにおいて試験することができる。ある

10

20

30

40

50

証拠によりT細胞が乾癬の病原であることを示唆されている。本発明の化合物は、Schon. M.P.等, Nat. Med. (1997) 3:183により記載されているscid/scidマウスモデルにおいて試験することができ、そのモデルではマウスは乾癬に類似した組織病理学的皮膚病巣を示す。他の適切なモデルはNickoloff, B.J.等, Am. J. Path. (1995) 146:580に記載されているようにして調製されたヒトskin/scidマウスキメラである。

【0081】

組換え(トランスジェニック)動物モデルは、ここに同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作成のための標準的技術を用いて、対象とする動物のゲノムに導入することにより加工できる。トランスジェニック操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非-ヒト霊長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルを含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、全核マイクロインジェクション(Hoppe及びWanger, 米国特許第4,873,191号); 胚系列へのレトロウイルス媒介遺伝子転移(例えば、Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); 胚性肝細胞での遺伝子標的化(Thompson等, Cell 56, 313-321 [1989]); 胚のエレクトロポレーション(Lo, Mol. Cel. Biol. 3, 1803-1814 [1983]); 精子媒介遺伝子転移(Lavitrano等, Cell 57, 717-73 [1989])を含む。概説としては、例えば、米国特許第4,736,866号を参照のこと。

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

【0082】

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

例えば免疫細胞の特定の細胞への浸潤を確定するための組織学的検査によって、免疫疾患病理の兆候に関してこの動物を更に調べてもよい。本発明の化合物によるT細胞増殖の刺激又は阻害の程度を確定するために、この化合物で処理したトランスジェニック動物で遮断実験をも行うことができる。これらの実験では、上記に記載のようにして調製した本発明のポリペプチドと結合する遮断抗体が動物へ投与され、そして免疫機能への影響が測定される。

【0083】

或いは、「ノックアウト」動物は、ここで同定されたポリペプチドをコードする内在性の遺伝子と、動物の胚性細胞へ導入されたそのポリペプチドをコードする改変ゲノムDNAとの間の相同組換えの結果として、ここで同定されたポリペプチドをコードする欠陥又は改変遺伝子を有するものとして構築することができる。例えば、ある特定ポリペプチドをコードするcDNAは、確立されている技術によって、そのポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに利用できる。ある特定のポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部は、その他の遺伝子、例えば組み込みをモニターするために利用できる選択可能なマーカーをコードする遺伝子によって置き換え又は除去できる。概して、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数千ベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503 (1987)を参照のこと]。ベクターを胚性幹細胞へ(例えば電気穿孔法等によって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Li等, Cell, 69:915 (1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-

10

20

30

40

50

152参照]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間において「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、例えば腫瘍の発達を含む、ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状態及びその病理的状態の発達に対する防御能力によって特徴付けられる。

【0084】

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においてサイレントであるが、腫瘍、例えばメラノーマ、肺腫瘍、頭部及び頸部の腫瘍、膀胱癌においては有意の量で発現している。DeSmet, C.等, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:7149。T細胞の同時刺激により、インビトロ及びインビボの双方において、腫瘍の退行及び抗腫瘍反応が誘発されることが示されている。Melero, I.等, Nature Medicine (1997) 3:682; Kwon, E.D.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:8099; Lynch, D.H.等, Nature Medicine (1997) 3:625; Finn, O.J.及びLotze, M.T., J. Immunol. (1998) 21:114。本発明の刺激化合物はアジュバントとして単独で又は成長調節剤、細胞毒性薬又は化学療法剤と共に投与することができ、T細胞増殖/活性化及び腫瘍抗原に対する抗腫瘍反応を刺激する。成長調節剤、細胞毒性薬又は化学療法剤は既知の投与方法で使用されている従来からの量で投与することができる。本発明の化合物による免疫刺激活性により、成長調節剤、細胞毒性薬又は化学療法剤の量を減らすことができ、よって、潜在的に患者に対する毒性を低下させることができる。

10

20

【0085】

J. 候補薬ためのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされているポリペプチド、或いはその生物活性断片と結合又は複合化する化合物、或いはそうでなければコードされているポリペプチドと他の細胞性タンパク質の相互作用を妨害する化合物を同定するように設計されている。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含み、特に、小分子候補薬の同定に適している。考えられる小分子には、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、（ポリ）ペプチド-免疫グロブリン融合物を含む合成有機又は無機化合物を含み、そして特に限定することなく、ヒト抗体及び抗体断片と並んで、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、及びそのような抗体又は断片のキメラ又はヒト化異形を含む抗体を含む。このアッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。すべてのアッセイは、候補薬とここで同定された核酸によってコードされているポリペプチドの相互作用を可能にする条件下及び十分な時間に渡って、これら二つの分子を接触させることを必要とするという点で共通である。

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、或いは反応混合物中で検出することができる。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又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイプレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。或いは、固定化すべきペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、そのペプチドを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合

50

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。

【0086】

候補化合物が相互作用するが特定のタンパク質に結合しない場合、そのレセプターとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。更に、タンパク質-タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者等 [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、Chevray及びNathans [Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)] に開示されているようにモニターすることができる。酵母菌 G A L 4 などの多くの転写活性化剤は、二つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方は D N A 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「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、二つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質が G A L 4 の D N A 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。G A L 1 - 1 a c Z リポーター遺伝子の G A L 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 G A L 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、-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた二つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット (MATCHMAKER(商品名)) は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

ここで同定された遺伝子の相互作用を妨害する化合物と、試験が可能な他の細胞内又は細胞外成分を見出すために、二つの産物の相互作用と結合を可能にする条件と時間の下で、遺伝子の生産物、並びに細胞内又は細胞外成分を含有するように、反応混合物は、通常は調製される。試験化合物の結合を阻害する能力を試験するためには、反応が試験化合物が存在する場合と存在しない場合で実施する。更に、第三の反応混合物ヘブラシーボを添加してポジティブコントロールとしてもよい。コントロール反応において複合体の形成があり、試験化合物を含有しない反応混合物では複合体の形成がないことは、試験化合物が、試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【0087】

K. 免疫関連疾患治療のための組成物及び方法

免疫関連疾患の治療に有用な組成物は、限定されないが、タンパク質、抗体、小有機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、三重螺旋分子などを含み、免疫機能、例えば T 細胞増殖/活性化、リンホカイン放出、又は免疫細胞の浸潤を阻害又は刺激する。

例えば、アンチセンス R N A 及び R N A 分子は、標的 m R N A にハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を防止することにより m R N A の翻訳を直接阻止する。アンチセンス D N A 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 - 1 0 から + 1 0 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、R N A の特異的切断を触媒できる酵素的 R N A 分子である。リボザイムは、相補的標的 R N A への配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的 R N A 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 P C T 公報番号 W097/33551 (1997年9月18日発行) を参照。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチド

10

20

30

40

50

からなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。更なる詳細は、例えば、PCT公報番号W097/33551、上掲を参照。

これらの分子は上記のスクリーニングアッセイの任意のもの又は任意の組み合わせにより、又は当業者に知られた他のスクリーニング技術により同定できる。

【0088】

L. 抗PRO抗体

本発明は、更に抗PRO抗体を提供するものである。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コンジュゲート抗体が含まれる。

1. ポリクローナル抗体

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

【0089】

2. モノクローナル抗体

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

免疫剤は、典型的には対象とするPRO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(「PBLs」)が使用され、或いは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不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地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【0090】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞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やメリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を

生成するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫株化細胞も開示されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、P R Oに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ (R I A) や酵素結合免疫測定法 (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、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば Munson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキヤッチャード解析法によって測定することができる。

10

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

サブクロー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。

【0091】

20

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて (例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができる、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、或いは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [米国特許第4, 816,567号; Morrison等, 上掲]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、或いは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

30

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Fc領域の任意の点で切断される。或いは、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、同じくインビトロ法が適している。抗体の消化による、その断片、特にFab断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成が可能である。

40

【0092】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗P R O抗体は、更にヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト (例えばマウス) 抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖或いはその断片 (例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或いは抗体の他の抗原結合サブ配列) であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域 (C D R) の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種 (ドナー抗体) のC D Rの残基によって置換され

50

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、全て或いはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全て或いはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(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

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物の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ら, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmannら, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, *Science*, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合

20

【0093】

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリ [Hoogenboom及びWinter, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:381 (1991)] を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる [Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss. p.77 (1985)及び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されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,661,016号、及び次の科学文献: Marks等, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg等, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)に記載されている。

30

また、抗体は、上記に記載のような既知の選択及び/又は突然変異誘発法を利用して親和的に成熟している。好ましい親和性成熟抗体は、5倍、より好ましくは10倍、更により好ましくは20又は30倍も成熟抗体の調製の元である出発抗体(一般的には、マウス、ヒト化又はヒト)より高い親和性を有する。

40

【0094】

4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合においては、結合特異性の一方はPRO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

50

ノ軽鎖対の同時発現に基づく [Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のW093/08829、及びTraunecker等, EMBO J., 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

【0095】

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。

W096/27011に記載された他の方法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH₃領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第一抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(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「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第二の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0096】

二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')₂二重特異性抗体)として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF(ab')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。F(ab')-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F(ab')-チオールに再転換し、他のF(ab')-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。

大腸菌からF(ab')フラグメントを直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性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F(ab')フラグメントは大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞及び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。

【0097】

また、組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法が記述されている。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)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF(ab')部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)によ

り記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の二つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、二つの抗原結合部位を形成する。単鎖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。

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PROポリペプチドの二つの異なるエピトープに結合しうる。或いは、抗PROポリペプチドのアームは、特定のPRO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PROポリペプチドを発現する細胞に細胞毒性薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はPRO結合アーム及び細胞毒性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。興味の対象となる他の二重特異性抗体はPROポリペプチドに結合し、そして更に組織因子(TF)に結合する。

【0098】

5. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、二つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4,676,980号]及び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、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されたものが含まれる。

【0099】

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、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させることが望ましい。例えば、システイン残基を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するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolf等, Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。或いは、抗体は、二つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及び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)参照。

【0100】

7. 免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞毒性薬、或いは放射性同位体(即ち、放射性コンジュゲート)と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる

10

20

30

40

50

酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapao naria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、 ^{2}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、及び ^{186}Re が含まれる。

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPD P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-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ら、Science 238:1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。W094/11026参照。

他の実施態様では、腫瘍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-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬(例えば、放射性ヌクレオチド等)に抱合された「リガンド」(アビジン等)を投与する。

【0101】

8. 免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、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ら、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PEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martin等、J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬(ドキソルビシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等、J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

【0102】

M. 製薬的組成物

本発明の活性PRO分子(例えば、PROポリペプチド、抗PRO抗体、及び/又は各変異体)並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、免疫関連疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

本発明の活性PRO分子、好ましくはポリペプチド又は抗体の治療製剤は、所望される程度の純度を持つ活性成分を、凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される(Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])。許容される担体、賦形

剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）及び/又はトウイーン（TWEEN(商品名)）、プルロニクス（PLURONICS(商品名)）、及びポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0103】

本発明のスクリーニングアッセイによって同定された化合物は、当該分野において良く知られた技術を用いて、類似の方法で製剤化することができる。

また、リポフェクション又はリポソームを、PRO分子を細胞に導入するために利用することができる。抗体断片が用いられる場合には、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するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成でき及び/又は組換えDNA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)参照。

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に一つ以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。或いは、又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性PRO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。

【0104】

徐放性製剤又はPRO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)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸と-D-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、LUPRO52254N DEPOTTM（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドからなる注射可能なマイクロスフェア）等の分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に亘って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37%の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫すること

ができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通じた分子間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。

【0105】

N. 治療方法

本発明のポリペプチド、抗体及び他の活性化合物は、組織への炎症細胞の浸潤、T細胞増殖の刺激、T細胞増殖の阻害、増加又は減少した血管透過性又はその阻害によって特徴付けられるものを含む、T細胞媒介疾患のような種々の免疫関連疾患及び症状を治療するのに利用することが可能であると考えられている。

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

【0106】

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

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

【0107】

10

20

30

40

50

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

脊椎関節症は、いくつかの共通した臨床的特徴とHLA-B27遺伝子産物の発現との共通の関連性を持つ疾患のグループである。該疾患には：Bechterew氏病(ankylosing spondylitis)、ライター症候群(反応性関節炎)、炎症性大腸疾患に関連した関節炎、乾癬に関連した脊椎炎、若年発生脊椎関節症及び未分化脊椎関節症が含まれる。顕著な特徴には、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；炎症非対称性関節炎；HLA-B27(クラスI MHCのHLA-B座位にある血清学的に定義された対立遺伝子)との関連；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に関連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導に対する鍵として最も関わっている細胞はCD8+Tリンパ球で、クラスI MHC分子により提示される抗原を標的としている細胞である。CD8+T細胞は、MHCクラスI分子により発現された外来ペプチドであるかのように、クラスI MHC対立遺伝子HLA-B27に対して反応する。HLA-B27のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原性エピトープを模倣し、よってCD8+細胞の反応を誘発すると仮定されている。

【0108】

全身性硬化症(強皮症)は病因がよく知られていない。疾患の顕著な特徴は皮膚の硬結であり；これは活性な炎症プロセスにより誘発されると思われる。強皮症は局所的又は全身性であり；血管病巣が共通しており、微小血管系における内皮細胞傷害が全身性硬化症の発達における初期の重要な事象であり；血管傷害は免疫媒介されうる。免疫学的基準は、皮膚病巣における単核細胞浸潤の存在と、多くの患者において抗細胞核抗体の存在によって導かれる。多くの場合、ICAM-1が皮膚病巣の線維芽細胞の細胞表面でアップレギュレーションされ、これらの細胞とのT細胞の相互作用が疾患の病因においてある役割を担っていることが示唆される。関連する他の器官には：胃腸管：結果的に異常なぜん動/運動性となる平滑筋萎縮症及び線維症；腎臓：小弓形及び小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎皮質の血流が低下し、タンパク尿、高窒素血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、瘢痕/線維症が含まれる。

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

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

【0109】

全身性血管炎症は一次病巣が炎症で、続いて血管にダメージを受け、結果として冒された脈管により供給される組織に虚血/壊死/変性が生じ、いくつかのケースでは最終的な末端器官機能障害になるといった疾患である。また、血管炎(vasculitides)は他の免疫炎症媒介疾患、例えばリウマチ様関節炎、全身性硬化症等、特に免疫複合体の生成に関連した疾患等の続発症として又は二次病変として生じる場合がある。原発性全身性血管炎症グループの疾患には：全身壊死性血管炎：多動脈炎結節(polyarteritis nodosa)、アレルギー性脈管炎及び肉芽腫症、多脈管炎：ヴェゲナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症：及び巨細胞動脈炎が含まれる。その他の血管炎には：粘膜皮膚リンパ節症候群(MLNS又は川

10

20

30

40

50

崎病)、隔離された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発病メカニズムは、主に脈管壁に免疫グロブリン複合体が付着し、続いてADCC、補体活性又は双方を介して炎症反応が誘発されることによると考えられている。

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

自己免疫性溶血性貧血、免疫再生不良性貧血、及び発作性夜間血色素尿を含む自己免疫性溶血性貧血は、赤血球(いくつかの場合においては血小板もまた含む他の血液細胞)表面で発現した抗原と反応する抗体が産出される結果によるものであり、補体媒介溶解及び/又はADCC/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。

【0110】

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

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

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

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

【0111】

多発性硬化症;特発性脱髄性多発神経障害又はギラン-バレー症候群;及び慢性炎症脱髄性多発神経障害を含む中枢及び末梢神経系の脱髄疾患は、自己免疫に原因を有し、オリゴデンドロサイト又はミエリンに直接的に引き起こされる損傷の結果として神経脱髄が生じると考えられている。MSにおいては、疾患の誘発及び進行がTリンパ球に依存することを示唆する証拠がある。多発性硬化症は、Tリンパ球依存性であり、再発性弛緩経路又は慢性進行経路のいずれかを有する脱髄疾患である。病因はよく知られていないが、ウィルス感染、遺伝的素因、環境及び自己免疫性の全てが寄与している。病巣は優勢なT細胞媒介小膠細胞の湿潤と、浸潤しているマクロファージを含み;CD4+Tリンパ球は病巣における優勢な細胞型である。オリゴデンドロサイトの細胞死と続く脱髄のメカニズムはよく知られていないが、Tリンパ球により推進されていると思われる。

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

水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患は

自己抗体により媒介され、その発病はTリンパ球依存性である。

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

【0112】

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

拒絶反応及び移植片対宿主疾患（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、E型肝炎及びヘルペス）、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染（MLRを刺激する分子（又は誘導体/アゴニスト）を治療に利用し、感染要因に対する免疫反応性を増強することができる）を含む感染疾患、MLRを刺激し、治療に利用し、遺伝子し、獲得し、感染誘発された（例えばHIV感染）状態に対する免疫反応を増強するために治療上用いることが可能な免疫欠損疾患（分子/誘導体/アゴニスト）又は医原性（即ち、化学療法からのもの）免疫欠損、及び異常増殖である。

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

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

【0113】

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（鼻腔内、肺内の）経路などにより投与される。ポリペプチド及び抗体の静脈内又は吸入投与が好ましい。

免疫アジュバンド療法では、抗癌剤の投与のような他の治療的養生法を本発明のタンパク質、抗体又は化合物の投与と組み合わせてもよい。また、本発明の免疫アジュバンドで治療される患者は、抗癌剤（化学療法剤）又は放射線治療を受けてもよい。このような化学治療剤の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学治療剤は、免疫アジュバンドの投与に先立って、又は続いて投与してもよく、或いはそれらと同時に投与してもよい。その上に、抗エストロゲン化合物、例えばタモキシフェン等の抗エストロゲン化合物又はオナプリストンなどの抗プロゲステロン（EP 616812参照）を、これらの分子について知られた用量で与えてもよい。

また、他の免疫疾患関連又は腫瘍関連抗原に対する抗体、例えばCD20、CD11a

、CD18、ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4、又は血管内皮因子（VEGF）に結合する抗体を投与することも好ましい。或いは、又はその上に、ここで開示される同じ又は二つ以上の異なる抗原と結合する二つ以上の抗体を、患者へ同時投与してもよい。時折、患者にサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、本発明のポリペプチドを、成長阻害剤と同時投与する。例えば、まず成長阻害剤を投与し、続いて本発明のポリペプチドを投与する。しかしながら、同時投与、又は最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は、現在用いられている量であり、成長阻害剤と本発明のポリペプチドとの組み合わせ（相乗）効果により減少させてもよい。

【0114】

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

例えば、一又はそれ以上の別々の投与或いは連続注入のどちらでも、例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約1 µg/kgから15 mg/kg（例えば、0.1 - 20 mg/kg）のポリペプチド又は抗体が、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約1 µg/kgから100 mg/kg又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることも

【0115】

O. 製造品

本発明のそ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製造品が提供される。この製造品は容器とラベルとを含んでなる。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの材料から形成されてよい。容器は、状態を診断し治療するのに有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤は本発明のポリペプチド又は抗体である。容器上又は添付されるラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品は更に、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロス溶液などの製薬的に許容される緩衝液を含む第二の容器を具備してもよい。更に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【0116】

P. 免疫関連疾患の診断及び予後

細胞表面タンパク質、例えばある免疫関連疾患において過剰発現するタンパク質は、候補薬や疾患療法にとって優れた標的である。免疫関連疾患で増幅した遺伝子によってコードされている分泌タンパク質に加えて、これと同じタンパク質には、これら疾患の診断及び予後において更なる用途があることが見出されている。例えば、多発性硬化症、リュウマチ関節炎、又はその他の免疫関連疾患において増幅した遺伝子のタンパク質生産物に対する抗体は、診断上に又は予後兆候として利用できる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅又は過剰発現した遺伝子（「マーカー遺伝子産物」）によってコードされたタンパク質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、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。過剰発現している遺伝子が細胞表面タンパク質をコードする場合には、これらの技術は特に適している。このような結合アッセイは、上記に記載のように原則的に実施される。

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

10

20

30

40

50

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。また、この手法によって、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布の決定を可能にする。当業者には、インサイト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。

【0117】

以下の実施例は例示目的の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は、その全体を出典明示によりここに取り込む。

【0118】

[実施例]

実施例で言及されている全ての他の市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【0119】

実施例1：刺激されたT細胞のマイクロアレイ分析

多くの場合何千もの遺伝子配列を含む核酸マイクロアレイは、正常な相対物と比較して疾患状態にある細胞から、様々に発現する遺伝子の同定に有用である。核酸マイクロアレイを使用することによって、mRNAの試験及び対照組織試料由来の試験及び対照細胞試料を、cDNAプローブ生成のために逆転写し、標識した。次いでcDNAプローブを、固体支持体に固定化された核酸アレイにハイブリダイズした。アレイの各部位の配列と位置がわかるようにアレイを構築した。例えば、特定の疾患状態において発現されることが知られている選択された遺伝子が、固体支持体にアレイすることができる。標識されたプローブと特定のアレイメンバー部位のハイブリッド形成は、そのプローブが生成された試料がその遺伝子を発現することを示す。試験試料（本実施例では、活性CD4+T細胞）由来のプローブのハイブリッド形成シグナルが、対照試料（本実施例では、刺激していないCD4+T細胞）由来のハイブリッド形成シグナルよりも大きければ、試験試料に過剰発現する遺伝子又は複数の遺伝子が同定された。この結果の意味するところは、試験試料に過剰発現するタンパク質は疾患状態の診断のマーカーとしてのみではなく、疾患状態の

治療の治療標的としても有用だということである。

核酸ハイブリッド形成の方法論及びマイクロアレイ技術は当該技術者に周知である。一例として、ハイブリッド形成及びプローブのための核酸の特異的調整、スライド、及びハイブリッド形成状態はすべて、2001年3月30日出願のPCT/US01/10482に詳述されており、出典明示によりこの明細書に包含する。

本実験では、単離したCD4+T細胞集団の作成に用いられる抗CD8、抗CD16、抗CD19、抗CD36及び抗CD56抗体を含むCD4+T細胞を、RossetteSepTMプロトコル（Stem Cell Technologies, Vancouver, BC）を用いて単一のドナーから精製した。単離したCD4+T細胞を、抗CD3抗体（増殖を刺激しない濃度で使用）と、ICAM-1又は抗CD28抗体のいずれかで活性化した。24又は72時間で細胞を収集し、RNAを抽出し、AffimaxTM（Affymetrix Inc. Santa Clara, CA）マイクロアレイチップ上で分析を行った。刺激していない（静止）細胞を精製後すぐに収集し、同じ分析を行った。何の発現が、活性細胞と静止細胞の二つの時点のいずれで上方制御されたか、遺伝子を比較した。

下記のこれらの実験の結果は、本発明の様々なPROポリペプチドが、単離された静止CD4+T細胞と比較して、抗CD3/ICAM-1又は抗CD3/抗CD28によって活性化された単離CD4+T細胞において有意に過剰発現されることを示すものである。上述したように、これらのデータは、本発明のPROポリペプチドが、一又は複数の免疫障害の存在を示す診断マーカーとして有用であるだけでなく、それらの免疫障害の治療の治療標的としても役立つことを示す。

10

20

30

40

50

【0120】

実験の結果、図1（配列番号1）、図3（配列番号3）、図4（配列番号4）、図6（配列番号6）、図8（配列番号8）、図10（配列番号10）、図12（配列番号12）、図14（配列番号14）、図15（配列番号15）、図16（配列番号16）、図18（配列番号18）、図19（配列番号19）、図21（配列番号21）、図23（配列番号23）、図25（配列番号25）、図26（配列番号26）、図28（配列番号28）、図30（配列番号30）、図32A-B（配列番号32）、図34（配列番号34）、図36（配列番号36）、図38A-B（配列番号38）、図40（配列番号40）、図42（配列番号42）、図44（配列番号44）、図46（配列番号46）、図47（配列番号47）、図49（配列番号49）、図51（配列番号51）、図52（配列番号52）、図54（配列番号54）、図56（配列番号56）、図58（配列番号58）、図60（配列番号60）、図62（配列番号62）、図64（配列番号64）、図66（配列番号66）、図68（配列番号68）、図69（配列番号69）、図71（配列番号71）、図73（配列番号73）、図75（配列番号75）、図76（配列番号76）、図77（配列番号77）、図79（配列番号79）、図80（配列番号80）、図82（配列番号82）、図84（配列番号84）、図86（配列番号86）、図87（配列番号87）、図89（配列番号89）、図91（配列番号91）、図93（配列番号93）、図95（配列番号95）、図96（配列番号96）、図97（配列番号97）、図98（配列番号98）、図99（配列番号99）、図101（配列番号101）、及び図102（配列番号102）が、抗CD3ICAM-1による刺激で発現の増加を示し、抗CD3/抗CD28による刺激でも発現の増加を示した。

【0121】

実施例2：ハイブリダイゼーションプローブとしてのPROの用途

以下の方法は、PRO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利用を示している。

ここに開示されている完全長又は成熟PROをコードする配列を含むDNAは、ヒト組織cDNAライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリの相対的なDNA（PROの天然に生じる変異体をコードするもの等）のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

ハイブリダイゼーション及びいずれかのライブラリDNAを含有するフィルターの洗浄を、次の高緊縮性条件下において実施した。放射標識PRO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を、50%ホルムアミド、5xSSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2xデンハード液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中において42°Cで20時間に亘って実施した。フィルターの洗浄は、0.1xSSC及び0.1%SDS水溶液中において42°Cで実施した。

次いで、完全長天然配列をコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAを、この分野で知られている標準的技術を用いて同定することができた。

【0122】

実施例3：大腸菌におけるPROの発現

この実施例は、大腸菌中における組換え発現によるPROの非グリコシル化型の調製を例証する。

まず、PROをコード化するDNA配列を選択されたPCRプライマーを利用して増幅した。このプライマーは、選択された発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含まなければならない。様々な発現ベクターを使用することができる。適したベクターの例としては、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性に対する遺伝子を含むpBR322（大腸菌由来；Bolivar等，Gene，2:95（1977）を参照のこと）がある。ベクターを制限酵素によって消化し、脱リン酸化した。次いで、PCR増幅配列をベクターにライゲーションした。ベクターは好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリHisリーダー（最初の6つのSTIIコドン、ポリHisリーダー、及びエンテロキナー

ぜ切断部位を含む)、PROコード領域、ラムダ転写集結因子及びargU遺伝子をコードする配列を含む。

次いで、Sambrook等(上掲)に記載されている方法を用いて選択された大腸菌株を形質転換するために、このライゲーション混合物を利用した。形質転換体をLB部レート上でのその成長能力によって同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択した。プラスミドDNAを単離し、それを制限分析及びDNA配列決定によって確認することができた。

選択されたクローンを、抗生物質が補填されたLBブrossのような液体培地で一晩かけて成長させることができた。この一晩の培養を、次により大きなスケールでの培養を播種するために使用してもよい。そして細胞を所望の光学密度になるまで成長させ、その間に発現プロモーターが作用し始める。

更に数時間細胞を培養した後に、遠心分離によって細胞を収集することができる。遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当該分野で公知の様々な薬剤を使用して可溶化でき、次いでこの溶解したPROタンパク質を、タンパク質の堅固な結合を可能にする条件下において金属キレート化カラムを用いて精製することが可能である。

【0123】

以下の手法を用いて、ポリ-Hisタグ形態でPROを大腸菌で発現させてもよい。PROをコードするDNAを、選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅した。このプライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いで、PCR増幅されたポリ-Hisタグ配列を発現ベクターヘライゲートさせ、これを株52(W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq))に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体を、最初に50mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中で、30で振盪しながら3~5のOD600に達するまで成長させた。ついで培養液を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、500mL水中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110mMのMPOS、pH7.3、0.55%(w/v)のグルコース及び7mMのMgSO₄の混合で調製)中にて50~100倍希釈し、30

で振盪によって約20~30時間成長させた。SDS-PAGEにより発現を確認するために試料を取り出し、細胞がペレットとなるようにバルク培地を遠心分離した。精製及びリフォールディング(再折り畳み)まで、細胞ペレットを凍結させた。

【0124】

0.5から1Lの発酵(6~10gペレット)からの大腸菌ペーストを、7Mのグアニジン、20mM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0.1M及び0.02Mとし、溶液を4で終夜攪拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質が生じる。溶液をBeckman Ultracentrifuge中で40,000rpm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、透明にするために0.22ミクロンフィルターを通して濾過する。透明抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに負荷した。カラムを50mM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250mM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280nmにおけるその吸収により見積もった。

試料を20mMのトリス、pH8.6、0.3MのNaCl、2.5Mの尿素、5mMのシステイン、20mMのグリシン及び1mMのEDTAからなる新たに調製した再生バッファー中で徐々に希釈することによって、タンパク質を再生させた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50~100µg/mlとなるように選択した。リ

10

20

30

40

50

フォールディング溶液を4 で12~36時間ゆっくりと攪拌した。リフォールディング反応はTFAを採取濃度0.4% (約3のpH)で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度2-10%で添加した。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、0.1% TFAの移動バッファーと10~80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。A280吸収を持つ画分のアリコートに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。

所望の再生したPRO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ーで平衡化したg25Superfine (Pharmacia)樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、0.14Mの塩化ナトリウム及び4%のマンニトールを含む20mMのHepes、pH6.8に調製した。

ここで開示された多くのPROポリペプチドは、上記の方法によって成功裏に発現した。

【0125】

実施例4：哺乳動物細胞におけるPROの発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組換え発現による潜在的にグリコシル化した形態のPROの調製を例証する。

発現ベクターとしてベクターpRK5 (1989年3月15日公開のEP307,247参照)を用いた。場合によっては、PRO DNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、上記のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてPRO DNAを挿入させる。得られたベクターは、pRK5-PROと呼ばれる。

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などの培地中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約10 μ gのpRK5-PRO DNAを約1 μ gのVA RNA遺伝子コード化DNA [Thimmappaya等, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 μ lの1mM トリス-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl₂に溶解させた。この混合物に、滴状の500 μ lの50mM HEPES (pH7.35)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄を添加し、25 で10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37 で約4時間定着させた。培地を吸引し、2mlのPBS中20%グリセロールを30秒間添加した。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートした。

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

【0126】

これに換わる技術において、PROは、Somparyac等, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。

293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700 μ gのpRK5-PRO DNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、P

B Sで洗淨した。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートした。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培地で洗淨し、組織培地、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PROを含む試料を、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって濃縮し精製することが可能である。

他の実施態様では、PROをCHO細胞で発現させることができる。pRK5-PROは、CaPO₄又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞にトランスフェクションすることができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地(のみ)又は³⁵S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。PROポリペプチドの存在を同定した後、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、次いで条件培地を収集する。次いで、発現PROを含む培地を、任意の選択した方法によって濃縮し精製することができる。

また、エピトープタグPROは、宿主CHO細胞において発現させてもよい。PROはpRK5ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物は、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。次いで、ポリ-hisタグPRO挿入物は、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカを含むSV40プロモーター/エンハンサー含有ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40プロモーター/エンハンサー含有ベクターで(上記のように)トランスフェクションした。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-hisタグPROを含む培地は、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。

またPROは、一過性発現法によりCHO及び/又はCOS細胞で、他の安定な発現方法によりCHO細胞で発現させてもよい。

CHO細胞における安定な発現は以下の方法を用いて実施された。タンパク質は、それぞれのタンパク質の可溶化形態のコード配列(例えば、細胞外ドメイン)が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)、又はポリ-Hisタグ形態として発現された。

【0127】

PCR増幅に続いて、対応するDNAを、Ausubel等、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.26, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いてCHO発現ベクターにサブクローニングした。CHO発現ベクターは、対象とするDNAの5'及び3'に適合する制限部位を有し、cDNAの便利なシャトル化ができるように作成される。ベクターは、Lucas等、Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにCHO細胞での発現を用い、対象とするcDNA及びジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)の発現の制御にSV40初期プロモーター/エンハンサーを用いる。DHFR発現は、トランスフェクションに続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミドDNAの12マイクログラムを、市販のトランスフェクション試薬Superfect(登録商標)(Qiagen)、Dospo(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)約1千万のCHO細胞に導入する。細胞は、上記のLucas等に記載されているように成長させた。約 3×10^7 細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

プラスミドDNAを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を10mLの媒質を含む遠心管にピペットして、1000rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を10mLの選択培地(0.2 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スピナーに分ける。1~2日後、細胞を150mLの選択培地を満たした250mLスピナーに移し、37°Cでインキュベートする。さらに2~3日後、25

10

20

30

40

50

0 mL、500 mL及び2000 mLのスピナーを 3×10^5 細胞/mLで播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切なCHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5,122,469号に記載された生産培地を使用した。3 Lの生産スピナーを 1.2×10^6 細胞/mLで播種した。0日目に、pHを測定した。1日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施した。2日目に、スピナーをサンプルし、温度を33℃に変え、30 mLの500 g/Lのグルコース及び0.6 mLの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)をとった。生産を通して、pHは7.2近傍に調節し維持した。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で収集して0.22 µmフィルターを通して濾過した。濾過物は、4℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

10

【0128】

ポリ-Hisタグ作成物に関して、タンパク質をNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に5 mMの濃度まで添加した。条件培地を、0.3 MのNaCl及び5 mMイミダゾールを含む20 mMのHepes、pH 7.4バッファーで平衡化した6 mLのNi-NTAカラムへ4-5 mL/分の流速によって4℃でポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を0.25 Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10 mMのHepes、0.14 MのNaCl及び4%のマニトール、pH 6.8を含む貯蔵バッファー中で25 mLのG25 Superfine(Pharmacia)を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵した。

20

イムノアドヘシン(Fc含有)作成物を、以下通りに条件培地から精製した。条件培地を、20 mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH 6.8で平衡化した5 mLのプロテインAカラム(Pharmacia)へポンプ注入した。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100 mMのクエン酸、pH 3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1 mLの画分を275 µLの1 Mトリスバッファー、pH 9を含む管に収集することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性はSDSポリアクリルアミドゲルとエドマン(Edman)分解によるN-末端アミノ酸配列決定により評価した。

30

ここに開示したPROポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【0129】

実施例5：酵母菌でのPROの発現

以下の方法は、酵母菌中でのPROの組換え発現を記載する。

第一に、ADH2/GAPDHプロモーターからのPRO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。PRO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PROの細胞内発現を指示する。分泌のために、PRO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PRO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、例えば酵母菌因子又はインペルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)PROの発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

40

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

続いて組換えPRO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。

ここに開示したPROポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

50

【0130】

実施例6：バキュロウイルス感染昆虫細胞でのPRO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PROの組換え発現を記載する。

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

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウイルスDNA(Pharmingen)を、Spodoptera frugiperda(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)中にリポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて同時トランスフェクションすることにより作成される。28℃で4~5日インキュベートした後、放出されたウイルスを収集し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilley等, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)に記載されているように実施した。

【0131】

次に、発現されたポリ-hisタグPRO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換えSf9細胞から調製した。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mLのHepes, pH 7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー(50mMリン酸塩、300mMのNaCl、10%グリセロール、pH 7.8)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、分画収集が始まる点である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、pH 6.0)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の分画を収集し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に複合した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PROを含む画分をプールして負荷バッファーで透析した。

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)PRO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。

ここに開示したPROポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現された。

【0132】

実施例7：PROに結合する抗体の調製

この実施例は、PRO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。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上記のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、精製PRO、PROを含む融合タンパク質、細胞表面に組換えPROを発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくすることができる。

10

20

30

40

50

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 - 1 0 0 マイクログラムで注入した P R O 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 (R i b i I m m u n o c h e m i c a l R e s e a r c h , ハミルトン, モンタナ) に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで 1 0 から 1 2 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 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 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 (3 5 % ポリエチレングリコールを用いて)、A C T T 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株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、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 9 6 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 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 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 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ボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテイン A 又はプロテイン G への親和性に基づくアフィニティークロマトグラフィーを用いることもできる。

【 0 1 3 3 】

実施例 8 : 特異的抗体を用いた P R O ポリペプチドの精製

天然又は組換え P R O 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-P R O ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-P R O ポリペプチドは、対象とする P R O 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 P R O 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 (P h a r m a c i a L K B B i o t e c h n o l o g y , P i s c a t a w a y , 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、C n B r - 活性化セファロース (商品名) (P h a r m a c i a L K B B i o t e c h n o l o g y) 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 P R O 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 P R O 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 P R O 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 P R O 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 P R O ポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下 (例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー) で洗浄される。次いで、カラムは、抗体 / P R O ポリペプチド結合を分解する条件下 (例えば、約 2 ~ 3 とした低 p H、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、P R O ポリペプチドが収集される。

【 0 1 3 4 】

実施例 9 : 薬物スクリーニング

10

20

30

40

50

本発明は、PRO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として特に有用である。そのような試験に用いられるPROポリペプチド又は断片は、溶液中の自由状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、或いは細胞内に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの一つの方法では、PROポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定にトランスフェクションされる真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのようなトランスフェクション細胞に対して、競合的結合アッセイによってスクリーニングされる。生存可能又は固定化形態のいずれかによって、このような細胞は標準的な結合アッセイで使用できる。例えば、PRO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PRO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。

従って、本発明は、PRO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PRO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)PROポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について、検定することを含む。これらの競合結合アッセイでは、PROポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、自由なPROポリペ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PROポリペプチドに結合する又はPRO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WO 84/03564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ポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はPROポリペプチドと反応して洗浄される。結合したPRO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PRO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。

また、本発明は、PROポリペプチドに結合可能な中和抗体がPROポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイも考慮する。この方法において、抗体は、PROポリペプチドで、一つ又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

【0135】

実施例10：合理的薬物設計

合理的薬物設計の目的は、対象とする生物学的活性ポリペプチド(例えば、PRO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、PROポリペプチドのより活性で安定な形態又はインヒビターでPROポリペプチドに機能を促進又は阻害する薬物の創作に使用できる(参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991))。

一つの方法において、PROポリペプチド、又はPRO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、最も典型的には二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、PRO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、PRO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PRO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., 11

3:742-746 (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。

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の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-idsは、次いで、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。

10

本発明によって、X線結晶学などの分析実験を実施するために十分な量のPROポリペプチドが入手可能である。さらに、ここに提供したPROポリペプチドアミノ酸配列の知識は、X線結晶学に代わる又はそれに加わるコンピュータモデル化技術で用いられるガイダンスを提供する。

【0136】

上記の文書による明細書は、当業者による本発明の実施を十分可能にするものであると考えられる。本発明は、寄託された実施品が本発明のある態様の一つの例証として意図されているため、寄託された作成物により範囲が制限されるのではなく、機能的に均等であるあらゆる作成物は本発明の範囲内にある。本明細書中の材料の寄託は、本明細書内に記載された説明が、その最良の態様を含む本発明の任意の態様の実施を可能にするのに不十分な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特許請求の範囲を制限するものであると解釈するべきではない。実際に、本明細書で示され記載されたものに加えて、本発明の様々な変更が、上記の説明により当業者には明白であり、添付の特許請求の範囲に含まれる。

20

【図面の簡単な説明】

【0137】

【図1】本明細書で「DNA304790」と命名するクローンである天然配列PRO71202cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号1) を示す。

【図2】図1に示す配列番号1のコード化配列から得られるアミノ酸配列 (配列番号2) を示す。

30

【図3】本明細書で「DNA258961」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号3) を示す。

【図4】本明細書で「DNA259323」と命名するクローンである天然配列PRO53256cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号4) を示す。

【図5】図4に示す配列番号4のコード化配列から得られるアミノ酸配列 (配列番号5) を示す。

【図6】本明細書で「DNA257697」と命名するクローンである天然配列PRO52254cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号6) を示す。

【図7】図6に示す配列番号6のコード化配列から得られるアミノ酸配列 (配列番号7) を示す。

40

【図8】本明細書で「DNA304791」と命名するクローンである天然配列PRO71203cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号8) を示す。

【図9】図8に示す配列番号8のコード化配列から得られるアミノ酸配列 (配列番号9) を示す。

【図10】本明細書で「DNA258959」と命名するクローンである天然配列PRO52892cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号10) を示す。

【図11】図10に示す配列番号10のコード化配列から得られるアミノ酸配列 (配列番号11) を示す。

【図12】本明細書で「DNA304792」と命名するクローンである天然配列PRO71204cDNAのヌクレオチド配列 (配列番号12) を示す。

50

【図13】図12に示す配列番号12のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号13)を示す。

【図14】本明細書で「DNA260010」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列(配列番号14)を示す。

【図15】本明細書で「DNA268707」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列(配列番号15)を示す。

【図16】本明細書で「DNA304793」と命名するクローンである天然配列PRO71205cDNAのヌクレオチド配列(配列番号16)を示す。

【図17】図16に示す配列番号16のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号17)を示す。

【図18】本明細書で「DNA257797」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列(配列番号18)を示す。

【図19】本明細書で「DNA304794」と命名するクローンである天然配列PRO71206cDNAのヌクレオチド配列(配列番号19)を示す。

【図20】図19に示す配列番号19のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号20)を示す。

【図21】本明細書で「DNA287258」と命名するクローンである天然配列PRO52174cDNAのヌクレオチド配列(配列番号21)を示す。

【図22】図21に示す配列番号21のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号22)を示す。

【図23】本明細書で「DNA304795」と命名するクローンである天然配列PRO71207cDNAのヌクレオチド配列(配列番号23)を示す。

【図24】図23に示す配列番号23のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号24)を示す。

【図25】本明細書で「DNA260158」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列(配列番号25)を示す。

【図26】本明細書で「DNA304796」と命名するクローンである天然配列PRO71208cDNAのヌクレオチド配列(配列番号26)を示す。

【図27】図26に示す配列番号26のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号27)を示す。

【図28】本明細書で「DNA304797」と命名するクローンである天然配列PRO71209cDNAのヌクレオチド配列(配列番号28)を示す。

【図29】図28に示す配列番号28のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号29)を示す。

【図30】本明細書で「DNA304798」と命名するクローンである天然配列PRO71210cDNAのヌクレオチド配列(配列番号30)を示す。

【図31】図30に示す配列番号30のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号31)を示す。

【図32】図32A-Bは、本明細書で「DNA287281」と命名するクローンである天然配列PRO69553cDNAのヌクレオチド配列(配列番号32)を示す。

【図33】図32A-Bに示す配列番号32のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号33)を示す。

【図34】本明細書で「DNA257714」と命名するクローンである天然配列PRO52268cDNAのヌクレオチド配列(配列番号34)を示す。

【図35】図34に示す配列番号34のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号35)を示す。

【図36】本明細書で「DNA304799」と命名するクローンである天然配列PRO52633cDNAのヌクレオチド配列(配列番号36)を示す。

【図37】図36に示す配列番号36のコード化配列から得られるアミノ酸配列(配列番号37)を示す。

10

20

30

40

50

【図38】図38A - Bは、本明細書で「DNA304800」と命名するクローンである天然配列PRO69458cDNAのヌクレオチド配列（配列番号38）を示す。

【図39】図38A - Bに示す配列番号38のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号39）を示す。

【図40】本明細書で「DNA304801」と命名するクローンである天然配列PRO71211cDNAのヌクレオチド配列（配列番号40）を示す。

【図41】図40に示す配列番号40のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号41）を示す。

【図42】本明細書で「DNA257338」と命名するクローンである天然配列PRO51927cDNAのヌクレオチド配列（配列番号42）を示す。

【図43】図42に示す配列番号42のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号43）を示す。

【図44】本明細書で「DNA287659」と命名するクローンである天然配列PRO69903cDNAのヌクレオチド配列（配列番号44）を示す。

【図45】図44に示す配列番号44のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号45）を示す。

【図46】本明細書で「DNA269148」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列（配列番号46）を示す。

【図47】本明細書で「DNA304802」と命名するクローンである天然配列PRO71212cDNAのヌクレオチド配列（配列番号47）を示す。

【図48】図47に示す配列番号47のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号48）を示す。

【図49】本明細書で「DNA304803」と命名するクローンである天然配列PRO71213cDNAのヌクレオチド配列（配列番号49）を示す。

【図50】図49に示す配列番号49のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号50）を示す。

【図51】本明細書で「DNA257606」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列（配列番号51）を示す。

【図52】本明細書で「DNA304804」と命名するクローンである天然配列PRO71214cDNAのヌクレオチド配列（配列番号52）を示す。

【図53】図52に示す配列番号52のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号53）を示す。

【図54】本明細書で「DNA304805」と命名するクローンである天然配列PRO69531cDNAのヌクレオチド配列（配列番号54）を示す。

【図55】図54に示す配列番号54のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号55）を示す。

【図56】本明細書で「DNA304806」と命名するクローンである天然配列PRO71215cDNAのヌクレオチド配列（配列番号56）を示す。

【図57】図56に示す配列番号56のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号57）を示す。

【図58】本明細書で「DNA304807」と命名するクローンである天然配列PRO71216cDNAのヌクレオチド配列（配列番号58）を示す。

【図59】図58に示す配列番号58のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号59）を示す。

【図60】本明細書で「DNA304808」と命名するクローンである天然配列PRO71217cDNAのヌクレオチド配列（配列番号60）を示す。

【図61】図60に示す配列番号60のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号61）を示す。

【図62】本明細書で「DNA174145」と命名するクローンである天然配列PRO35770cDNAのヌクレオチド配列（配列番号62）を示す。

10

20

30

40

50

【図63】図62に示す配列番号62のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号63）を示す。

【図64】本明細書で「DNA304809」と命名するクローンである天然配列PRO71218cDNAのヌクレオチド配列（配列番号64）を示す。

【図65】図64に示す配列番号64のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号65）を示す。

【図66】本明細書で「DNA281432」と命名するクローンである天然配列PRO66272cDNAのヌクレオチド配列（配列番号66）を示す。

【図67】図66に示す配列番号66のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号67）を示す。

【図68】本明細書で「DNA262708」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列（配列番号68）を示す。

【図69】本明細書で「DNA257789」と命名するクローンである天然配列PRO52338cDNAのヌクレオチド配列（配列番号69）を示す。

【図70】図69に示す配列番号69のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号70）を示す。

【図71】本明細書で「DNA257363」と命名するクローンである天然配列PRO51950cDNAのヌクレオチド配列（配列番号71）を示す。

【図72】図71に示す配列番号71のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号72）を示す。

【図73】本明細書で「DNA304810」と命名するクローンである天然配列PRO71219cDNAのヌクレオチド配列（配列番号73）を示す。

【図74】図73に示す配列番号73のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号74）を示す。

【図75】本明細書で「DNA259680」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列（配列番号75）を示す。

【図76】本明細書で「DNA263464」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列（配列番号76）を示す。

【図77】本明細書で「DNA304811」と命名するクローンである天然配列PRO71220cDNAのヌクレオチド配列（配列番号77）を示す。

【図78】図77に示す配列番号77のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号78）を示す。

【図79】本明細書で「DNA304992」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列（配列番号79）を示す。

【図80】本明細書で「DNA304813」と命名するクローンである天然配列PRO71222cDNAのヌクレオチド配列（配列番号80）を示す。

【図81】図80に示す配列番号80のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号81）を示す。

【図82】本明細書で「DNA257455」と命名するクローンである天然配列PRO52035cDNAのヌクレオチド配列（配列番号82）を示す。

【図83】図82に示す配列番号82のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号83）を示す。

【図84】本明細書で「DNA304814」と命名するクローンである天然配列PRO52650cDNAのヌクレオチド配列（配列番号84）を示す。

【図85】図84に示す配列番号84のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号85）を示す。

【図86】本明細書で「DNA304815」と命名するクローンである天然配列cDNAのヌクレオチド配列（配列番号86）を示す。

【図87】本明細書で「DNA304816」と命名するクローンである天然配列PRO23781cDNAのヌクレオチド配列（配列番号87）を示す。

10

20

30

40

50

【図 88】図 87 に示す配列番号 87 のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 88）を示す。

【図 89】本明細書で「DNA304817」と命名するクローンである天然配列 PRO71224 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 89）を示す。

【図 90】図 89 に示す配列番号 89 のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 90）を示す。

【図 91】本明細書で「DNA290812」と命名するクローンである天然配列 PRO70559 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 91）を示す。

【図 92】図 91 に示す配列番号 91 のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 92）を示す。

【図 93】本明細書で「DNA304818」と命名するクローンである天然配列 PRO71225 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 93）を示す。

【図 94】図 93 に示す配列番号 93 のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 94）を示す。

【図 95】本明細書で「DNA154627」と命名するクローンである天然配列 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 95）を示す。

【図 96】本明細書で「DNA260031」と命名するクローンである天然配列 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 96）を示す。

【図 97】本明細書で「DNA304819」と命名するクローンである天然配列 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 97）を示す。

【図 98】本明細書で「DNA260167」と命名するクローンである天然配列 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 98）を示す。

【図 99】本明細書で「DNA304820」と命名するクローンである天然配列 PRO47351 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 99）を示す。

【図 100】図 99 に示す配列番号 99 のコード化配列から得られるアミノ酸配列（配列番号 100）を示す。

【図 101】本明細書で「DNA304821」と命名するクローンである天然配列 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 101）を示す。

【図 102】本明細書で「DNA106195」と命名するクローンである天然配列 cDNA のヌクレオチド配列（配列番号 102）を示す。

10

20

30

【 図 1 】

FIGURE 1

GGCACGAGGGGTCACGGGGCCGGCCCTTAAACCGTGTGGTGGAGCACCTCCCTCCGAGCCGGCA
ACGGAAATGGAGTAAGGAGAGCCCTGACCTGCCACGGGGATGAGCATGGAATTAAGCAATCTTTGTC
CCATCTGGAGCCGAGAGCCCTGAGGGCCATGGGGGCTGGAGAGACGGCTTGGAAACGGAGAGACTGG
GGAGAAATCAGCTGACATCTCCATGGCCGAGCAACCATATGCCAGAGGAGATGAGCTGGAGATGGCAA
AAATTCAGCTCCCGGAGATCTTGGTCCCGGAGACTGAGCTCAGCTCAGTTCATGATGGATGACATCAGCT
CGAAGCAGATCATGGACTTGAAGCAGGAGCTGACGACATGGTGGCCATCCCGAAGAAAGAAACCAACTG
AGAACGAGAGAGGATGAGCTAATCCAGAGATGACACAACTGGTGGAGAGAGAGACTTCCGTGGACGATG
CGAGGTCGAGGGTTAAGGGGACAGAGAGAGAGAGAAATGGCTGATTCCTGGAAATCAGTTAAACCTC
TGACAAAGTAAACCAATCTCCAGCCAGTCCGGGACGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
TGGCCAGAGGGGCTGGCTGATGAG
GGTCCCTGGCCATGGGACCCCGCCACCCCTCTGCTTTATAGCCCAATTCACCGGGGCGGAGAGCT
CTCCAGGACAGAGGGGTTGAAGGACCGCTGACTGCTCCAGAGGACATGGCCAGCGGAGGGGCGGCTGGCC
ACCTGTACAGAGTGTAGCAGGAGCTCTCTCAGCTGCTGCTCCAGAGCATGGCCAGAGCTGGAGAGAG
TCTGTCTACCTGTTATCCAAACCCAGGAAAGGCTCCCTCCAAAGAGCATATCTCCACTCTCTAGCTGT
ATCAACCCAGCTGTGATGAACTGGGAGGGGCTCCCTCCAGAGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CTAGCCACTGTGGGACGTTCCCACTCCACCTCCTAGCTGTCTCAGAGCTAGGACATGGGACAGGCTC
CCCTCCCTGTCTCTCCAGCACTGTGGCTTGGAGGCTCCAGAGCTAGGACATGGGACAGGCTC
CFATAGAGTCCAGAGGGGCTCTGTAAAGATCGACTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CCGACTCTGTGTGGGACAGTCACTGAGCAGAGCAGGCTCATTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TGGAGGGGCTGGCTGGATCCAGTGTGACAGAGAGGACAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
CAGACGTTGAGAGATGGGACCGAGATGAGTGTGACTGCTCCAGCTCCAGCTCCGAGGAGGAGGAGGAGG
CCAGCAGGAGTGGCTTTCCAGCCGACAGGAGGCTTTGAAAGAGACAGCAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TGACCAGATGTGTCCCTCATTGGTGGCAGTGTGACTGCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TACATTTGCAACAGCCCGGCTGAGGCTGTGACTCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
TAGTGTGACTACTCAGAGTGTGATGTGACTGCTCCAGCTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TTTTAAAGTTTTTACTTTTTTCTTGTATGGAAGTATGACTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AAGTATGAGAGTTTTCTTAAAGAAAAA

【 図 2 】

FIGURE 2

HEGVTGARFVKTLGAGATSLPARNNGVGPDPSTFPRGSAELKQSLSTHELEKPLRRYGAVERTAWRLEK
RNQLDIISMAETMMPBEIELEMAIKRLREVLVRESELEFMDIQLECKDINDLQELQNLVAIPEKERTKLQ
KQREDELQIKHLKVRQRFVLDVAEVEFLREQEBDEKEMDFLRILKPLDKVTKSPASSRAEKAEFPFSKPTV
AKTGLALIKCCGATQCNIM

【 図 6 】

FIGURE 6

GGCACGAGAAAAACATAAGCAGAACTAAAAAAMTATGATGACTATAATCCAAAGCAGGTACCTCTAA
CCACAAITTTTCAITTTTAAATTTTCTTCATGGCTTCTTGTGGCTCACCCATGCGAGTTTGTGATTT
GTGACAACTTTATGTGTTTTTAAATGTTTTTGGCAAACTTGGTTTTCCGAGACCTCTTCTCAGAGGCT
CAGTTTTACGCTTCTACGAGTGGCTATTTTCAAGTGGGACAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TGGGACAGAGAGAGGCTGCTGCTGCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TGATGACAGGACAAATAGAAACACGGGACAACTTCTCCAGAGAAAGGTTGGCTTATGACTTCAATGCTCC
TCTCTCCACCCAGGACAGCTGCTCCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ACTTGGGTTGGCACTTCCCACTCCCTCAAGAGTCCGATGGCCCGAGCTTGGCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CGCTACCGTGAACGATACAGGGGAGTACTTCTGCACTATACACACTCCCTGATGGGACCTACCTAGGAGAA
TCTTCCIGAGGCTTAGAAAGCTCAGTGGCTGAGCAGGCTGAGGCTTCCAGATCTCCTTGGAGCAGTGG
CGGACGCTGGTGGTCTCTCCAGCAGGATCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TCAATCTGAGAGGAGTACCTCAGGAGAAATCAGCTGACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
CAGGAGCTGTCTCAGGAGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TGCATCTACTTCAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CAGAGCAGTCTCTGAGAGTACTTTTGTCTGCTATATAGATGAAATTAAGAGCAGGCTGCTGCTGCTGCT
AGTGTCTGGT
CTCATTTCCCTTGGCTTTCTGCTTCTTCCATTTGGCTATGAGCAGGCTAGGCTGATACCTGGATCTTGA
TCATAAATGCAAAATAAAAATATCTTGGCTGTTTAAAAA

【 図 7 】

FIGURE 7

MRWCLLLNAQQLRQAPLASGMMTGTIETGNSAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTVNNEQDQLLAINCNLGM
HISPSFKRVAFQFGLGLLQSLVNDTGEYFCIHYTDPDGTIYRIFLEVLSSVAEHGAFQIPLLGAARIL
VICTAVLIVVALTRKKALRIHVSQGLRKSACQEWSPSAPPSSCVQAAAPAGLCEQGEDCABLHY
FNVLSYRSLGNCFFTFETG

【 図 3 】

FIGURE 3

CATTTTAAACTTTTTTTTTTAAATTTTTTTGGTAGCTAGGTTTTAATTTGTTTAAATTTAATTTGACTT
TTATTTTCCACTCTTTTCCAGCCAGTCAAGTAAATTTGCTGTTTCCATTTTAAAGTCTACTTTGAACTCT
TCTTTTGGTGTGTTTTTGTCTTTATACAACTCAGACATTTTGAATTTGTTTCAAGATTTCTGCTGACT
ACTTATGTTGACTTTTAAATTTTACTACTGTCGACGACCAATGACATTTTACTGCTGCTGGGCTTAA
ATTAACTTAGCTTAGGATTTCTGATTTTCAAGACATAAAGATTTGGCAAACTCTCTTACAGACTTAAAC
AGTTTTAAAGTTCATTTTATACATCTAATACATAATACCTTCTTACGCAATTAATGATTTCTTGGATAAG
ATAATATTCAAAAAATTTGGGACAAAAAATGCACTTTCTGCTCATATATATATAGATGCTAAAAATTT
TTAATTTCTTGTGTTTATTTTGGTACATGATACAGATTTCTGCTGACAGTTTTGATGTTTTTTTTAA
AAAATTTGATTTGTTAAAGTCCCTGGAAATTTCTAATAAATACTCA

【 図 4 】

FIGURE 4

AAATATCTGGTGGGAAAGAACTGTAGTACAGATTTGGGATGGGAAATCTGTGTGTTTCTGCCACAT
GATCCAGCTTTGCTATCAAAAGGTAGAGATGTCAGAGACTTTGATTAATGAAATGGGCTTCCAGCAAT
GTTCTAAATGTCAGCAAAATAAAACTTTCTGTATATCTGAGGAAAGAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TGCAGACCAATCAAGAGGCACTTGTGCTGCTGCTGAGCAATTTGCTGAGATTTGGGATTTCCAGCTCA
TCTAGGCTTGGCAATTTGAGTGTGACAGAGCTGCTGAGCTTGGGATTAATGATGATGATGATGATGATG
GAGAGAGAAAGGCACTGACAGAGACTGTTGATACCTCAGGAAATGCTTCAAGTTTTGGCTTTTTCTCAG
CAGTGTAAATAGCAATTTCTGACCAACACAGATGGCAAGTTTTGCAACAGACTGCAACACCCCTTAA
TTCTGCTGATAAATTTAATGATTAAGCTGATTTGATTAAGGATTTACTATCTGGAATGTTCAAAGA
GCTCTTATATAAATACAACTATTAAATCAAAATAAAAATACCGAGCT

【 図 5 】

FIGURE 5

KVNGKERVAFEFWDGKLVLPHPDFSAIKRVEDVQELVDNBLGQVQVPEKCNKIKFLVISG

【 図 8 】

FIGURE 8

GTGCTGGGCGAAGCCAGAGGCTTTCGACTGAGCCGAGCCAGGCTTAAATCAAGGAC
TGTCTTTCAGGCTTCTTGGCAGTGTATTCAGCAGTGAAGTTGCAAAAGATTAAGGAGAAAGCAGTGT
CTCAGAAACCTGTAGAGAACAAAGACAGTGGAGCTTGGAGGCGCTGCTACTTCAAGCAGAGCAGCA
GCAGCAGATGATTAACATGTTTCAAGATTTGGAAATGAGGACTGATGTTCCCGATTTTAAAGGCAAGTGC
TAATGATATTAGAGAAATTTGGATGATCTCGAAGGTAAGTGAACAGGAGAAAGGATTTCTTAAATC
CAGAACATGGGCGAGCTGAGGAAACAGATTTGAGCTTATGATGAGTGAAGAAATCTAAATTCAGGCC
ATATAAATAAAGCCTGACTGCTTGTGTTTTAACTGTCTTTTACATGACTTTTGTCTTAAATGTTCT
CCAGCTATGATGTTTTGATTTGAGTTGAGGAAATTTGAGATGAAATTTTAAATGATGATTTTAAAT
ATTSAGGAGCTAAATGCTACTTTATTAAGGATTTACTTGTCCCGCAGCCCTGAGTGAATTAAGATCAG
TATACACTTACTTACTGTTGGCTTTTTTGTATCATAGAGTTTGTGCTTTTTAAGCCAAAGTACATTT
TATAGACTTTTATGTTCACTCAGCTTTTCAAAATAAAGGATTTGATTTCACTGATTTAATGATTTTGGT
TGTGAACTTATATGATTTTTCTCTTCCAAATGCTTGGCTTGTGCTTCCACCCCAATGGTT
TCTACTTTTTTATTACTTCTTTTCTTAAATGATTTAACTTCTCATGTTCACTTCTGATCTGATCTTAT
TCTTTCTTGTATGATGATGATGATTTTGGAAAGTCAAGTAAATCTCAAAATGATTTCTCAATAGATACTA
TATGAGAACTACATACCGAATCTACTGATTTCAATTAATGACAGTCTCAATTTGATAACCAATGGCTTGT
GAAACTGAGCAGGTTTTGTTTACCCATGATTTCTGTGATTTGCTGATGCTGCAAGAAATAGGACTTA
GATGAGATGCTGACTTGTCTTCACTTATAAATGATTTTCACTGATTTGATGATGATGATGATGATGATG
CACTGACTGATTTAATAAATTTGAGACTTTAABAAAAA

【 図 9 】

FIGURE 9

MPKSELYSGSSGSDSDVDKRLKRRQVAPKPVKQIGETSPALSSSQSSSSRDAMFQIGHRVTVSR
DFKRVLIDIREYMDPEGENKFRGKGISLNFQHSQLEKQISDIDAVRKL

【 2 4 】

FIGURE 24

MNRNRIASSLGGDQVFSKIKKIKKRNMAERKLEAVLNVALVPSIMLQVLYRNDVSSFFQOIRSSLSNPP
LFQYKYLAINMHYVGVILSVLWLLTLPKQHLQVLYLFLTALLVAGHQISRDVYRSELEFAYGPMYLEPLSMNR
FTTALIGLQVCTLCSCVMKCTKILWFSAHMLPLARCLVLEFTTVIINKFAMITFGLVLYFLGSHLLVYFNL
ARSAFRELQVQVEVYGLLALGSLWNLQVYVLEWVWHLVLAQIVSFTSTROFASREHLLFLFLSLRACCS
FYSILIGLWVFSVVALGVLLKCYLIGSRFRWDPMMNRHGTSEVLLIAYVQGLLEIOWVHRPESLIIILF
IUVASLQSMLEIADPVLALQSRNKSIMKFRFVAVSLQFLVLPFPAVMNMIQFPHMDHLLIIISSLTLTL
QVLTGLEVYVLFVWEREERKPVENDDIVYVYNGYRLLFLVLAQVAVYSETIIGENTVMGMSIIFHSYV
VNLRAQLGNKFSLLARDVANKIKSLPATAKEQLERHNDICAIQYQDMKSAVITPCHFFHAGCLKNWLYVQETCP
LCHCHLKNSSQLPGLQTEVLPQFHAGAFQNVMEQGETPEFPGHTRITRIGSRDNNVEIARRPQNEGFADPK
EYFHSKAEHHPVESA

【 2 5 】

FIGURE 25

TGCTTCCACCAACGTAACAATTTATAAGCAAGAGATGAGAAAAGGATTAITGGAAATGACTGAATAA
TGAGGAGCTTGGGSAATAGAACAAAGTTGTAAGTCGTAACTGACCCATCTTACTCACTGTAATCAAGTACA
GTGAAAGGATGAAATAAGAAAGAGTGTAGTAAATAACCTGTGGACCAACCTGAACTAAATGAGTGTGTT
TAGGGTCTCTTCCCACTGAACAGAGATTTATCCCTCCATCTCCCTTGAAGAGAGCCCTATGTAAGCTT
TGGCTACTCATTAAGATAAATCTTAATAGATAAATCGAAATCCCTTGAATCAATGAAGACAGTGTCA
TAAAGGTTTGTGCAAGTGTCTCTTATGTGCCATGTGAATAAGATCTCTTAGCTCCCAAGTAAAGG
CTCTTCAGAGGGCACTTAGAGATGT

【 2 8 】

FIGURE 28

GGAGCTCAGGGCCACATCCGCACTCCGCGCCCTCCAGGAGCAAGGTCAGAGGGCTGGTGAAT
AGGATGCCCTTCTGTCACTGTCTTACAGCCTGGTTTGGCTCAAGGACAGTGTGTCTGCACAGCACAA
GTGCAAGTGTGACCCAGATGAAGAAGCAAGCTGTACACACCTGCTTCTTAAATGCTCTGCAAAATGCC
CAGGAAGCCCTCATTGTGACATGGCAGAAAAGAGTGTAAAGCCAGAAAACATGCTCACTTCAGOGAAGAC
CAITGGGTGTGATCCAGCTGCTTATGAGCAAGATTAACATTTACCCAGTGGACTCCAAAATCAACATC
ACCTCTG9MATAICCCCTGGAGATGAAAGGCTTACATGTGTCTTCAATACCTTGTGTTTGGCAAGATC
TCAGAAACGGCTGCTCCAGCTTANETACRSCCACAATATGCTTCACTACAAAATCTCTGGAGCACACTA
AATACACTGCTGCTCCAGCTCCGCCCAAGCCCATGCTGCTTCCGAGAGCTCCCTGGTAGGGATTAAGAA
AGTACAGTACTGCTGTCTACCCCAATGGACACCTCTGTACAGCACTCCATATCAAGACCTTAAGAT
CAGTGGGAGAGGGAGTACTCCGAGGTGCTGCACTGGGGAGTGTGACCCGACTTAAAGCAACCGTCAACAA
GGCTATTGGTTTTAGTTCGCTATTTGTAAGCAITGTTTCCCTGGTAATCTCTGCTCAATCTCAATCTTA
CTGTATGGAAAGCTCAGCGAATCAGGACCGAAGCCCTTAAAGTACACAGCACCTGAAAGTGAATCCCT
GGTCTACTTGAATTTGACACAGAGAAAAGCAGGAGAAAAGGGGCCATCTCCRAAGACCTGAAGAGACAAA
GAGGTGGAGCGAAGCCCTAAGGATCCCAAGCTTTTACTGCCATCTGAGCTACTCAGTGTITGAAATCCCAAG
AGGACTCAGTITACTCTGAGCTGTGTAGGACTGTATTTGAAAGCAATGCCAIGTATGIGTIDGAAAG
GGCACTGAGCTATGATATCAGAGCCTGAGCTCAACAGCTGACTGCTGGGGAGCTCTGTGTAGT
CAGTTTACTCATTCAAAAGTAAAGSAAITGAGCAAAATTTGCCAATAGCTTAAACTTAATTAABAT
GYAATTCAGAAAAGGAGGAAATAGCAAAAGGGGAGGAAATTTAGGAGAGAGAGAGAGAGATACAGAGAG
CTTACCTTGGCTTCTGTGATTTACATCTCTTCTTCTGATGTTCTTAGGCTATAGAGTCTGTTCCCAATC
ATTTGGATATGAGTCCAGTCTCTGCTTACTGCTTTGCTAATAGCTGAGCTGAGAGTCTTGGTACTGCTG
TCTTCTCATGCTCTTATAGATTTACTCAACAAATAAGAGCTGAAATTAATGTAAGTAACTAGCAATCT
TACTTATCTAATTAATTTTATATAGCTAAGATAATATTTGATGCTTAGCAATAGCTACATTTTTGAG
AAGCATGCCCTCCCTGCTGCTTGTCTTATAGAGTACCCAGCCCTAATTTAGCCATCTTAAATPAGCCATAT
ATATGAAATACATATAGAAACAGCTTTGGAGATTTCTCTTATACAGATCAGCCAACTTCAATGCTTGT
CTCCTGCTGCTCTTTTCCATGCTTACTTCTTCTAATAGCTGAGCTGAGAGTGTGTTTTGCTGTAAATGGAAT
GTTCTAAGATATGTTCCAGCTAGTGGAGATGTGATCTTAAATACATAAATTTGCTTTTTGCTGAT
CTTCTGTTCTGCTGTATCACTGAGCTTGGCTAGGATAAAGTGTAGTGTGTTTTGCTGTAAATGGAAT
TATATATATATATAGCAAGATTTTCAATGTTAATTTAATCTGATTTGCTTATATATTTGATGAAAATTT
GAACAAATTAAGGTTGAGTCCCAAAAAGAAAAA

【 2 9 】

FIGURE 29

MERLIVMNFCHLSTSLWVAVAVLCAQVQVYQDEPQIYFASLACSLQAGALIVTKKKNVSPENN
VFCENKGVLPQNKDKINTTGLQNSTTFFNIIIEBECNCLNFTWFGKLSLSTACTVYVQVYVSLYK
FSDHLNITCSATARFVWPKVRSIEMSTVLSLNFSTVSLIKDKPKQVQVEVICQMLHLCVDFD
KQTVNKGYNFVSPILLSIVSILVLLSILLYWKRHRNDQRP

【 2 6 】

FIGURE 26

GGAGAACAGCTTGGAGCATATTAGATGCACTGCTGAGTCAAGTGGCTGATCTGAGAACCTCTGGGGAGTT
CATTTCGCAAGTTGGAGAACGAGTATGGCCGCTGACTGGCCACTGTCTGGACAGCTTGTCTGTCTTCTG6
ACAGCTGAACACTTGAAACAGGCTTGAAGCATGAAAAACCCCGCTGTCCCTGACACAGCTCACTTCCCT
GGTGTGCTCCAGCCGAGATGAGATCTCAAGCGCAGATGAAGAGCGGGTCTCTTTCCAGCATGAGT
AGTCCCTGACCACTGAGAACCAACCCCTGACCTGAGTGAAGAACAGAGAGAACACTGACAGCAGATGCTGC
CCGCTTGTGCAATGCAAGCCAGAGCAGATCCAGAGCTTGAATAAATGTGTCAAACTCTTGGAGAAAAT
CAGCAAGAGAGGAGGAGAAATCAGAGAGTGGAGGCTTCCGGGCGAAGCAACAGACTTTAACTTACAGACATA
TGCTTGGTGGCAGCTGTGGCTTGGGAAAGGACIATCTAATGGAGACTTCAAGCAGCTGTCTTGGCA
GGCAGCCACCCAGGAGCTGGAGCAGCTTCTGAGGAACTTCAAGACTTCAAGACTTCAAGACTTCAAGACTT
AAGCCGACAGCCAGCTTCTGAGTGGGTACALATGGCTCAGCGGCTCAACAGGAAATGCTCAAGTGGAAAT
AAAACAACATCAAGTGGCTTCCATGCTTCCCTACAGCGGCTTCCCTGCGGTTTATTGTGCTATCC
TCTAAGGCGCAGGTTGAAGAGCTTCTGGCCAGGAGAAAAGAAATGCCCTGACCTGCTGCTGAGTAAAGCT
GGGCTGCTCTCTTCCATCTCTAAGGCGCAACTGGCTTTTACTGTCAATGATCATAAAGTCCCTATC
CTTATCCCACTTATACACAGAGGCTTCTCAGGAGTGGCTTCCAGCAGCAGCACTATGGGAGAGGTTT
TCTCTAAGCAGCAAGAAAAGCCCTTCCCTGATTCATGTTTCTTATTTGGAGGAGAGGAAATGACACT
ACACTGCCATCAGGTTTATGACTCAATGAGTGGCCACTTCTGACTTGGCCAGGATTTCTTCAAGA
AAAGACTTCTTCTTCTTCAAGCTTGGCCCAATGGTGGACAGAAATGATGTTGGAGGGGCAAGCC
CAGTACTTGGCTGCTTATTAAGATTAAGCAAAATGATTTAGACATTAAGACTTCAAGCTTCTTCTGATC
TCTTITTTGGCATGGAGGGGTTGAGTCAAGAGTGGAGCAAGGATCTCTTCAATAAGTATTAAT
TGAAAAAATAAATAA

【 2 7 】

FIGURE 27

MPQTEGRVPSHFVFDRLKTPDFEYEQKLTDAARIADAROFQISLAKMCSMLLERTSKERRESEGG
GLRPNKQTFNPDTNALVAARVAGLNLNRPSSSGPQAGPQAGTILAGTSLQVQMAPSQQPMLSGV
QMAAGQKMPGKINIKRSAMHPYQRESLGFILATPRLRKKWLLQPEKKNMLQLM

【 3 0 】

FIGURE 30

AGCGAAGTGTGGTGTCCAGGAAATACAAACATAAAGCCCTTGCACOGITGCAATAGACTAAAGTGAARACA
AATCTGAAAGAGATGAGTATTTACAGACATTTGAGCGCAGCTCAGAGGTTCAAAGTTTCTGTGGAATCAGC
TGCCCTTGGCTTTCTACTTCTACTACTGTGGCCGAGAAAAGAGTGAACCCATTAAGAGAGTGGGA
CAAGAAAAAATACTAATTTAGTTCAGTCTGCTTGTCTATCCAGAGGCTCCGCCAGACCCGGAGTGGGA
GGAGATGCTTGGCTGTGGACCCCTGAGCAGCATAACTGTCACAAAGCAGAGTGGAGCAGAGGAGTGGCA
AAACTGGTTTCTTCTTCAATCCAGAGAAAGTGAATACCAACTGCAAGTATCTTCAAGTTGAAAT
CCCTTGCAGAGGAAAGTGAATCCAGTGTGAGCCGCTTCTCAGCAGCCTAGCAAAACAGAGTCTTCTT
GTTGAGAGTGGAAAGAGGAGTGAFTGTAAGTGGAGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
TTTTCAAGGGAAAGGTTCCAGAGGCTTGGAAAGCACTTCCACCCAGAACTTCAAGAGAGAGAGTGA
AACTTCTCAAGTCTGTTACTTGAATGTGACCAATTTCTGAAGAGTTCAGTGGAGTGGAGTCTTGA
AAGTCTGTTCAACATGAAACTTAAACTATATAGTCTGCTGGAGTGTGGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
TGTGATTTGATGAGAGATCAGAGAAACCAAGCTTTATTTCAAGTACATTTGACACCCACTGCAAGTGT
GGATACATGGTGGCAGTGAACATGATCCAACTACAGCTTCAAGTTCAGTGGTCTTAAATGGTGGCTA
CAGAGTGAATCACTGCCACCCATTTCAATGATGAGAGCTGTTCCAGTACTGGAAAGTGGGCTTCT
TGACTGAGAGATATCGGAAAGGAAAGAGAACAGAAATTCAGAAACAGGATTAATCAGAAATGAGCAGAG
TGGCTATTTGGAGACTTCAAGCCTTCTCAGAGTITGGAGCAATATGCTGTTTCTCCAGTGAARAAAGA
GGTCCAGTGGACTTGGTGTGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
ACTCAAGGCCAGAGTGGATTAAGAGCTTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
TACTTGAAGAGGAGCAGCGAGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
GGGGGGTGGTCCAGGAGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
TTCCCAAGGCTTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
ACCGTCCAGCAGCAGTGGTAAACTGTTTCAACATGGGTTCTATATATTTCAAGTGGAGGAAAGCT
ACATTAACCTTTGAAATAAATAAGTGAATAGCTTCAACTAAGACTTCTGACTTAAAGCAGATATATC
ACATGCTGCTGGCAATATGCTATGGTACCCAAATTAAGCCCAAGTGGAGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
CACATTTAGTGTTTAGTACTATTTTCTGCTGAGTCAAGACTTCAAGACTTCAAGACTTCAAGACTTCAAGACT
TGGAGTTTCACTTGGAGGAGGAGGAGTAAATTAATTTCTTCTTCAAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
TGGCTGGTGGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
AGCATTAAGTATACAGTCTGCTTAAATAGTGGCTTCAAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGT
GAAATAAATAACAGATGATGATAAATAAATAAATAA

【 3 1 】

FIGURE 31

MKMLFQICRQLRSEKFSVESALVAFSTSSYSGGRKKVNFVEYDQKYSNLVQSVLSRQVATGQVVEED
ALLQGFVSKHKLQSEDRVFNQNFYFNPERSDKPNASDPVPLKPLQRNIVSVPVLOQTMKQVFLLE
RWKRMILLELQEDGFKYESTNVLQGRKHEALESLSPQETLKEBENLRSQYIESVQVHLKDVSVRALES
VQHEMLTIGLLOVAVYQGRKLVLDNKTSEKPKFQISTDNEPLVAVYAGMNDHNTSFPQVQGLIIVAVK
GSPHHPHMBARLCSQVNTKWLRLLEYTERKKNQNKQRFYSE

FIGURE 32A

ATGSCCTCAGGACCGGAGGATTCGGAGGGGGGGGGGGGGGCAAGATCCGGACCGCGGTGCCACCGGGGCA
ATTAGCCTTACCGACGGGGGCAACAGCATAGGAGATCTTAGCAGGTTACAGAACTGTGTAAGATATTT
GTCCAGGGGTTTCAAGATATCTCACAGAAAGAGATGATGAGCAGTGTTCACAGACCAACGAGGTTT
CCACCTCGCCAGAAATAAAGAGACCATCTGGTATATGCGATGAGGAGAGCTCTAATATTCGATGAGGAGA
ATCACACTGAGCAGCAGTCAAGATACACAGAAAGACCTTCACACACTAGTACTGCTTCARATTCAGAGTGTG
TTACAGAGGCTCTCTTCATGAGGAGCATTGAAATTTTCAGATTTGGATTCGATTCAGATTCAGAGTGTGAG
TCTACACTCTGGGCACTCCAAATGAGGAGTTCGGGATTTCCCTGTAAAGAAATTAAGATCTACCTCCTCAG
CATAGATGTAACACTACACACTACAGGAGGTTTCTTCAAGAGCTCTGATAGAAATATACCTGTTTCAAG
AGCTCTCATGTCACCTCTGCTGGTCCGAAAGTGAAGTCTCACTCACTCTCACAGACACTGCCACCAGC
TMAAAAAACAGCAGTCAACTGCTGGTTCGGAGAACTTCCOCTCAGTTCGGAAATCTTCATCTTTAAA
ACCGTACGCTGGAATTTCCCTTTTATCTGGAAAACACATCGGTGGGACACAGCTGCTGAAGACAG
TCTAAACTAGAAATACACTTACAGGACCAATTTAGAACAAATGAAGCTAAGCACTCACTGCAACAATCT
TAGGTGTGACAGGTTACAGCCTGGGCAATATTCAGCTTTAGAGAGATGTCAGAGCCCTTAGCGGATGCA
AAAGAAATCCATCTTCTTCTCTCTGAAATCTCTCTTTAGAGAGTGGATAGATACACAGATTT
CAGGCCAAAGGAAAGGTTGGATTCCTAATCTCTCTTTAGAGAGTGGATAGATACACAGATTT
GCACAAATGGAAGTGTATTTTAAACCTCTCTGCTCTCTGAGAGCTTAAAGCCCAAGCCACTTCTAFA
GATACAACTCGACTGATATGAAABAAATGACACCCCGACAAATAGAACAAACAGAGAAAGTGGCTTT
TCAATCCAAATTCAGTTCCTCAGCCAAATGTTTATCTCTGAGATGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAG
CGAAGAGACAGCAGCTTGTCTCTTAAACCTCTGAGAGAGGAGAAATGGAATGCAATATACGAAATC
TCTCACCGATCACAGTCTCAGCTCACTTAAATTTAGTTCCTGAGATCACAACCTCTCTCTCAATCA
CCCATCAATCTCTCAAGATTAACAAGAGGTAAGATGCACTCCGACAGCAGTGGAGTCCGATCTT
AAATTTTCACTCAATCTAATACTAGAGCAATGATACCTCACTCACTTATGATTTCAATTTAGT
GTGCTGTGCAAAACAGCAGACTTCTGGTCTCTGATGATTTAGAACAAATATAAGTACTGACCTCA
CATGCTACCTGAGCAGTCAAAATTTAGAGAGACACTGAGATGAGAGGAGTCTTAAAGCTTCA
GAACTCTGAGAGAGAGTGTCTCAATTTCTGAAAGCCCTGGGTTTCAGACTCTCAAGATTTGAAGATTT
CTCTCAGCCAGCCAGGAGTCAAGTCTTAAATTTAGAGAGGAGTCTTAAAGCTTCAAGTCTTCAAGTCT
GGTTTGGGAGGTTTAAAGAGTGGTCACTAGGAGGAGTGTGATCACTCTCAAGCAAAATGAGAGAC
AACAAATGAGTGGAGGAGTCTTCAAGTGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGG
TGGGATGAGTACCTGTAGTGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGG
GGACTGTGAGGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGT
AGCTGCACTGTAACACTGAGCTTAGGATTTGAGGAGTAAATTTAAAGGCGCAATGAGTACTGAGGAGTCA
GTATGCTGTGTTTAAATGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGG
CCTGCTCAAGTACTGAGTACTGCT
CCGAGGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGG
AGTCCAAAGCAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGT
TCATCTCAAAATTTGGTGTCTCACT
TTGGAGATCAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGT
AAATTTCTAAACCAATAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGT
AGTAAAGTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTT
GGGATCTAATCTTGAAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGG
ACAGGTTTAACTTGAAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGG
GGAACTAGAAACACAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGT
CTCTCCCAAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGT
GGAGGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGG
GAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGG
GAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGG
CAACTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGT
CAACTGTGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGTGTGAGG

【 3 3 】

FIGURE 33

MASSGAGVGGGGGKIRTRCHQGFKPYQGGQQHQLSLRVSTVKNVPIVGMQRVYFNKNEVDVCSSTDTSEV
FRNPNKEDHLYADEBSNIDRITPEPAVNTREPTSTASNYNDVLRPSLERSHNFSLIESALPQCF
STSSAFPVIGSGFLVKEIKDSIQHDDNISTGFSRSDKDIIVSKNLSLPLSPEARSBSHLSQHTS
SKKPAFNLSPATLSPSLGNSSILKTSGLSDSPFYPKTTTGGAAAVRQLRNPVYQAPVROMKQLSAGS
YGVTSSTARRIISLERMSFLADAKRIPESIVSFLNSFLDSSGIDTDFQAKREKVDSPVYVORIMPFKPVSI
ATNRSVYFKPLSTPSEGFRTNDRIDRNCSTGTENKMFQGNREGESESYFNFSLPANGLSVGGGGGQNR
RERNFVAKSLEBESMVPVLEKLSLSTSSSLPFFHFSPTITTSFSPFINSQALNFWQHSSTSSPMF
KPSSTVNSTANLWLPSEIGTFFVVPVAKTLELGGSSLELISSSSAHVTTVNSKCKTPEDECEPPFRE
ELKEGSLVLDLKSFPASPIKDSVAOPTATSPVYVYRALSFSBSGICFGESELSGSSQCDTCLQNVD
NKCIAQAKLSPRDTAKQTEIETPKSKSLTASAGTGGDFKFPVITGNDICLIVNKEFAICVCAETPKF
GTCVRRALTLVVSSEATMFSSSSCTVTGTLGDFKFRIGSWECVCCVNNEDNKVCSNKEKFGSSV
PSSSSVPLVSLGGSLGLEKFKPEGSWOCLELVONKADSTKICLCAEASAKFGTSGFPGFDTSSSNSAAS
SSFPKGVSSSSPGLTSTGNKFGDQGGFKLIVSSDSSINSMSBGFKSFIDGFKGVSSBSPKBEVKKD
SKNDNFKPLSGLSNFVSLTFFQFVSNLQESKREKESLSSSAGSFGTGVINSTRPAPANTIVISNRSFNL
GTIEKASVAPFTCKISEKREMEFATNGEFPVGNVPASLSASVSVLQVIBENKQBFVTSILVFGKADNE
EYKQPVVFSQMSGTRENSKSTTSFPMKFSKSEKQPMATAFGAGTSTTADQGANVVSFELMSSSS
SPATSSAGGTFGSSSTSSNPVATVFGQSSNEVSSAPENASSTSSQLSLQDQSLATTSSTGATVWVFF
FGASNNNTTGGFGEATISSNSSSSFFVGFQSAFASAPFAGANOTVFGQSQGASQNFVFGFSSSSTAL
FPTGSGAPPFTVGSSSQPPVFGQSPQSPAGTSSNNSAFQGSSTINFNFNNSPFGVFTGANSSTPA
ASAQPSGGGFFNQSPPAFTVGSNKNVSSSSTGFSRGRKATVRRK

FIGURE 32B

AGTACACCGCCACTCTGCTGGTGGGATATTTGGTAGTCCACTCTTCCATCCACTGTGGCTACC
TTTGTGTTGGAGCTCCAGCAATCTGTGAGCAGCTGCTGCTTGGTAACTGCTGAATCCAGCAGCTCAG
TCTTTGCTAATTTTCAAGATAGCAACTAGCAACACATCCAGCAGCAGTCAAGCTTGTCTTT
GGTCCAGGAGCAGCAGTAAATATACACACTCTGGTTCGGCTTTGGAGCCCAACACACTAGCTCTGCA
GGATCTCTTTGATTGGAGCTGGAGCTCCAGAACATCTCCAGTCCAGCAATTTGGTCTACAGCAACCCCA
ACATTTGGCAAAAGTCAAGGTGGCAGCAGGCGCAATCCGCCAGGCTTGGAGTATATCATCTCCAGCACTA
TTTCCACTGGTTCAGCTGCACCTCACTTTGGGAGTGTGAGCAGTACAGCAGTCCAGGCTGGTGTGGA
CAGCAACTAGTCACTGCTGCTTGGCTTGGCAACACTTCAATCTAGTTCGGCTTCCAGTTGGCAACAGC
ACTCAAAATTTCACTTCAACAAACAGCTCCATCAGGAGTGTACATTTGGTGAATTTAGCAGCAGCTGCA
GCTCCAGCCAGCCTTCAAGCTGGGGGGCTTCCATTTAACAGCTCCAGCAGCATTACAGTGGGTCAAAT
GGGAAAATGTGCTCTCTCTTGGAACTCATCTCTGGTCCAAAGTAAAGCTGCTTAGCAGCAGGAAA
TAAAGGTCACTTGGTGTGACTCAATTTAACAACAGCTGGTCCGCTTCAGATGCTGATGCTACTTGTG
TGCCTGGGTATCCGAGTCAAGTCCCTAAGACTTATTATTGGAAATTTCCCTCTCTCTTTGGTGA
CAGAGCCCCCTCTCCAGCTCTTTTAAATAAATATGATGATGAGCTGGTCACTGATCTTCAGCA
AAATTTTAAATAGTCCAGGATTTCACTGATTTGCAATAGTGTGAGTCCAGGAGTAAAGCTGGGTCAGG
TGAATGGCTTTGATGAACTCTTTCTCACCACTTATGCTGGTGAATAGCTTCAAGTCAAGCTGGTGAAT
GAAATTAATCTGAGAACTTCTATAGATAGATTTCTGTATAGATAGAGGCTTGAACCGATATTCTTA
TGTGAGTTTGTGGTGTATGTGTGAGTGTGAGTGGGTGTATGCTGATGAGGCTTAACTTTTGTATAGGAA
AGCTGATTAAGAAATGGCTGGTAAAGCTTGTAGATTTCACTCTCACTTCAATTTATATATATAGCTAT
TCTATATTTCACTTCTCACTGCTTGGCTTTTCAATTTATATTAAGAACTGTGATAAATCAATTT
TGTTCGTGACTTTTGGCTTAACTAACTGTGAGCTTGAATTTGAAATTTGGTGTAGAGATTTTGTGTT
GTTCGTGAGTCTTCTGAGTTTAAATTAATTAAGTAACTGAACTTGGCTTAACTTTTGGAAATCT
TTAAABAAAATTTGGGATCTTAAAGTGAATTTTGGTCTTCTGACAGGATTTTGTGAGGAGTGTGAGG
AGATTTAAATTAAGCACTATTTTAAATTAATTAAGTCTGTGTGGCTTTTGGATTAAGGAA
AAAGTTAAATTAAGCACTGTTTAACTGATTAATTAAGTAACTGAACTGGGATTAATGCTCAATTAATA
AAATTAAGCACT

【 3 4 】

FIGURE 34

CGCTAAGCGTCCCGGGCTCCCTCCCGACGAGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GCAATAGAGTGGTGAATCCGGGCTCGGGGCTCCCTCCGCTCCCGCCGAGCCGAGGATCCCGAGCCTCTG
GGGGCAAGGGGAGCTGAGCCCGCTGGAGACAGAGAGAGGGTTGGAGCAGCCCTTAGGGCCCTCCGGGG
AGAGCTGTGCTCAGCGGGGCGAGAGGCGCAAGTGCATCACTTATAGCACAATAATAACCGGAGAAATG
AGATACAAAGAAATGGGAGGAGGAGCTGGCCACCTGGAAAGTGAAGAGCAGCAAGCAAGCACTAAACCGTTC
ACTGGTCCCGAGAGGCTAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AATCTAATAGCAGCAAAAGTAAAGGAGGAGTGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AAABAAATAGGCAATCAAGAGCAGAGCCAAATTAAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GAGAGCACTTAGAGAGCTACGCAATCAAAACCTGGCTTGAAGCAACTGCAAGCAAGTCCGACGCA
GAGTGCCTTCAAGTGTGTTTGTGGCCACAACTTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
TAAAGGCAAGAAAGCAAGAAATGGCAAAATGAGGATGAAACATCAAAAGAGTGAATGCTTTAGCTGG
AAGCCAGCAGCAGCAAGCAAGAAAGGCAAAATCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
ACCGCTCAAGGCAAAAGTCAACCGAGTGGCTGAGCACTGAGAGCTTGGAAATGAATAGAGCGGTAA
GCTGGGATATAAGAAATTTGACTCTCACTCTGCTTGGCTTCACTCACTGAGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TTTCTAAATGGAATTTGTGAGGCTCACTGTTTACTTAAATTTCACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AGGAGTGGAGGCTTCT
TACTCCCGGAGATGCTCACTTATTTCTTAAATTAAGTAAATTAAGTAAATTAAGTAAATTAAGTAAATTA
GAGGACTTGTGATCTTCACTGCTTGGCTTTTCAATTTATTAAGAACTGTGATAAATCAATTTTGTTCG

【 3 5 】

FIGURE 35

MNPNRVVNSGLGASPAEPTROPQDPSGQEGSLPVEDQRELEAPKPSRESVHAGQRRTSAYTLIAPNIN
RNEIKLAEQLEANLEKREKQNRKPVHLVPRLLGSSQSETEVRQQLQMLQSKYQKLEKRESVRIKKEAE
AELQKMAIKREKNSLEKREKQNRKPVHLVPRLLGSSQSETEVRQQLQMLQSKYQKLEKRESVRIKKEAE
RDLSEKPNRKLQKREKQNRKPVHLVPRLLGSSQSETEVRQQLQMLQSKYQKLEKRESVRIKKEAE
SGNSMGI

【 36 】

FIGURE 36

```

NGTGTCTCCGATCCCGGATGTCAGGCGCTCCGCTGGCTAGTCTGACCTCCGCCAGGCAAAAGGAAAGC
TGAAACCTTCAACACTCTCCAAAGCAAGTGAATATACACGCGCTATCTCCAGTGGCACCGGAGCAATG
TGGACACACATAATGCTGCTCTCTTGGACACTGTCAAATGTAAAGGAGCTTACTTTTATACAAATGCGTAA
TCCAAAGTGGTTTGGTACAGGCGCTCAAACAATGGTTGCAITATCTGCTGCCAGTGTGTGCAAAAGGAA
AGGAGGGCAATGGATGCTCACTCCACCCCAAGGAGACTCTCCGCAATAAGCAAGGCAAGCAGTGTTCATTC
AGGAGGGTTTTTCATCCAGTCCACAGCTCAGGAGACTCCGGAATAAGGAAAGGAGGCTGATCCTTTGCAAGAC
AAATCTATTAGTCTTTATCAACGATTCAGAGAGCAATTTAGACAGTATGGAAGTCTGATTCGCTGATCTA
ATACTCTGCTGTTGGTTTGGAAACATTTTATATGACGCTTGAAGAGCTGAAATGCTGCTTCTTTCTGAA
CTCATGGTACCTGGAGCTGGTGAAGCTGTAAGCTGTAAGACTCCAGAGCTGGAAATGCCCTACAGCAATGCT
TGTTTTAAAGTGGACAGCTGCTGGTACCTGCTGACTTTGGGAGGAACTCTCTCACTGTGAAGTATCTGCGC
AGTCAAGCTTACATGCTCACGCCCAACCCGCAAGGAGTCTCTGAGGAGAGTGGAGAGCAAGAGGACTT
ATCACAGCAAAATGGAGAACCAAAAGATGACTCACTGAAAAGTTCAGAGAACCAAGAAAGTTCCTTT
AGGAAAGAGTGGAAAGGCTCTTATAGCAGTATAGAAATCTCCGACTTAAACCTTTGAAACTATGG
GCAAGATACATGCTGCTGATTTTGGTTAGTGGCGAATATACAGTCTCTGAGGGTTAAAGAAATGA
AAATACCTTTTAAAGTTAAATACACTGAAAAAICAGTGTATTAACAAGGAAAGAAATGAGCCAGTTTAAAG
ATTGGCACTAGTAGCAGTAAATGAGCAGTGTATGCTTAGAGAGTCACTCTTTTCAAGGCTTCAGAGC
CACACTTGATTTCTGTTTGGTCAAGCTGTAATGACACACTAGGAGCTGACTCTTGGATTCAGAGTGTGA
CCATAAAATAGTCTGTTAATAAGGATCTTAAATTTATGTTATCTATAGATTTAAGTATTTCAAGTGT
AATTTGGACCAAGCTGCTGATCAAGCTGCTGTAATAGGAGTGTGTCTTCTATAAACAGCAATAGAG
GCACTTACCTACAGTAAATCTTATATGAGAAATAGAAATAGGATCCAGTATATGTAATAGAGT
TACTGATTCAGTAAAGAAAGGAGCCCTTAAATATTTTACCTGAGCTCTGATAAATTTTAAAG
GCAATATATATGCTGATGCTTCTTCAAGTGTGATTTAGTGTGCTCACTCAACATAAATCTGCTGTG
TGAAACCAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

【 37 】

FIGURE 37

```

MQNWNVPTVRLRLRRLTLEPHNAGLGHGCKVPSILLLNNAESKVVLVQGFQKWLHLSAQCVAKREPLDHP
PQGVLRHKQKQHVFSFRVSSAATQTEERKEBEPDLQKSIYLQRFKKTFRQYKVLVPHLITGVGVFF
TFYAAAGVNVVFFLELGLDPSVSLIKNSQSGNBLTALFKIATPARYTVTLGGTSVTVRYLRSHGYMSTP
PVKRYLQDRMBETKELITKEMBEKRLRTELQRETRVSVKKNV

```

FIGURE 38B

```

AACCTCTCCTCGATTCAGCAATTCCTTCTGCTCAGCTCCCAAGTAGCTGAGACTAGACCCACCCAC
CACACCGGCTAAATTTGATTTTTCAGTAGAGAGGGGTTTCCGCCAATTGGCCGTTGGCTTGAATCTCG
CCCTCAAGCAATCCGCTACCTCAGCTCCCAAGTCTAGGTTTACAGGCAATAGCCTGAGCCGACCCCTAG
TTCAGTATCTTTATGTAATATAAACAATCTGCAACATATGATATCATATGAGAGTACTTATGCAATCTTT
ATTAGTGGTGAAGTGTCTCATGATTTATGGCTCTGAAATTCCTCATATGAAATGCTATCACACACCTTA
CTTTCTGCTCGTTTATACATGCTTTCGCTATTAAGAGTATATCCCTGCTGTTATATTTCTTCATTC
TGTATTCGCTTAAATTTGATGATGCTTCTATTAACAAGTGTGTTTTCTCTTAAAGAAAAA
AAAA

```

【 39 】

FIGURE 39

```

METSASGTFAIRLLKLCQDNPVSHVCSFVSISSALAMVLLGAGKNTATQMAQLSINTEEDIHRAFQSLIT
EVNKAGTQYLLRATNRLLGKTCQFLTFKESCQLFYHAELEKLSFIPAAEESRKHINWVSRKTEKIEELLFG
SSIDAEITRVLVMAIYFKGWNEPDETTIFREMFYKINQEQPVMQVGEATFKLAVGSEVRAQLLELYARKE
LSLLVLPQGVVLSVSESLTEKLRATNKPDCMSTIEVLLKFLKLEQDYMESVLRHLGIVDAFQGRADL
SAMSAREDLCLSKFVHKSFVYVNEEGTEAAAASCVTVAVCCRESGPFRCADHFFLFIHNRRANSILFCRFS
E

```

FIGURE 38A

```

GGCAGAGGCTGGCCCTCGGGGCTGGGCTGACGGCTGAGGAGCCGGCAGGAGACCGGGGAGGCTGGACTAG
GTGGCAGGCGCTGCATCAGAAACTCTTCTAATGCAAGTGGTCTTTGGCATTGGCTTTAAAGATAGCTGT
GTCAAGATAACCTTGGCAACAGTCTTCTGTTCTCCTGTGAGCATCTCTCTCGCTGGCAGATGTTCTCCGTAG
GGCAAGGGAAACCCGCAACCCAGTGGCCAGGCACTGCTTTAAACACAGAGAGGACATTCATCGGGTCT
TCCAGTCTCTTCTACTGAGTGAACAGGCTGACACAGTACTGCTGAGAGCGCCCAACAGGCTCTTGGAG
AGAAACTTGTAGTCTCTCAAGCTTTAAGAAATCTGCTTCAATCTCAACAGTGTAGCTGAGGAGGACTT
CCTTTATCAGAGCTGCAAGAGTCCAGGAACACACACAGCTGGTCTCAAAGAAACCGAAGTAAATGT
AAGAGTGTTCGGGGTAGCTCAITGATGAGAAACAGGCTGGTCTTCTCAITGGCACTTACTTCAAAGAA
AGTGGAAITGAACCTTTGCAAAACATCAACAGGGAAGTGGCTTTAAATAAACAGAGGAGCAAGGCGAG
TGCAGATGATGATCAAGAGGCAAGTTCAGCTGCGCACGCTGGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CCATCCCAAGAGGAGCTGAGCTGCTGGTGGTCTGCTGCTGCAAGCGCTGGAGCTGAGGCTGAGGAAAAA
GTCTCAGTTTGAAGAACTCAAGCTGAGCAAGGCAAGCTGATGAGAGTACTGAGGTTGAATCTCTCTC
CAAAATTAACATCAAGAGGATTAAGATGAAATCTGCTGCTGGGATTTGGGAAATGTTGATGCTCTCCAC
AGGCAAGGCTGACTTTCGCAATGACAGGAGAGGAGACTGTGCTGCTCAAGTTTGGCAGAGGATTTG
TGGAGTGAATGAAAGAGGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CTGCCCGAGTTCGTGCTGACACCTTCTCTTCTCTCATCAGGCAACAGAGGCAAGGACTTCTGTTCT
GTGGCAGTCTCATGGCAAAAAGGCTGACTTACGCTGACCTGCGCATTTCCTCTCTGTTGCCAGAT
CCCCACTACAGCTCAAGAGGATGGGCTTAAAGGCAAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTCATGTTTTGCCAGTAAATCAATGATCTCCACACTGCTTATCTGCTTCTAATCAGATCTTGAAGAAATG
ACCATATGATTCCTGTTGATTAATATGAGTCCAAATCCCATAGGATGGCAGCAAGTCTCTTAGAAT
CCCATGCAATCACTCTGGGAGCCTGCTGCTTCTGCTGACTGCGAATCACTCTTAAACCCGAGCTCAGTG
GTAAATGATGGCTAGATATGCTACTTATATAGTTCCTGGTGTCTGAGCTTAAAGAAAGTTGAAAG
TGACATTTATATTTATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGAGGAGCTGAGG
TGCAGTGGCTGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTAGCTGGACTACAGGCGCCGCAACAGCCGCGCTAAATTTTTGATTTTTAGTAGAGCGGGGTTACCC
TGTAGCCAGAGTGGTGTGATCTCTGACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GCTGAGCCAGCCCGGCTTATTTTTATTTTTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCAACAGATGAC
CAACACTGCTTTGGACTGGGAGCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GCCAAGTATATGATTTTGAAGTACAGGCTGAGTGTGATGCTTCACTTCCAGTAAATGATCACTCTTAA
TAGGATCACTCTTTTTATGATATGATTTCTTCTACCTTACAGTAAATGATCACTCAACCTTAAAG
TCACTTCAAAATCTCTTTGAGAGTTTCTCTTCTGCGCAACAGAGTACATTTGAGCTCTCTTGTACT
TGGAGGGCACTCTCTGCTGAGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGATAGTCTGCTCAACCA
AAGTTGGACTCTGCTTACATATCGGGTCCCTCATAGTGCAGTAAAGTGTGATATATAGAGCT
ATGTAATTAATTTTTTAAAGTGGATGACTGACTGAGTTTTTTTTTTTTTAAAGAAATTTTTTTATGAGTAAACTT
CACATACATAAATTAGATTTTTAAAGTGGAGTTCAGTGGACTTATGATTTGTAATGATTTGCAATAC
ACCACCTTTTTAAAGTTCGAAABAAATGCTCTCTCTTAAAGAAACCCATCCCATTAAGGATGACTCT
CATCTCTCCTCCGCGCCGCAACCCCAACCAATGCTTCTGCTGATGTTTATCTATCTTCTGCTAT
TTTTATTAATGAAATGATGAGCCTTTGCTGCTGCTGCTTCTCATGATGACAAATTTTGGAGATTTAT
ATTATGAGTACGATATACACTCTTATTTAAGGCAAAATGATATGATTTTATGAGTAAATTAAT
TATCACTTACTTATGAGTACTTGGTGTCTCTGACTTTGGCTATGAGGATGCTGCTATGAAATGTT
TGTGACTGATTTGTTGAACTGCTTTTGTACTTCTTCTGAGTATATCAGGAGTGGCTGCGGCA
TATGTAATCTATGTTTACTTTTTTGGAGAGACAGAACTGCTTCCACAGAGTGGACCAATCCAGATTC
CGCAGGATGATGAGAAATCCAAATTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CACTTACAGTACAACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AGCAGCTTTAAAGTTCGAAABAAATGCTCTCTTAAAGAAACCCATCCCATTAAGGATGACTCT
TAGTGGCTGAGACTAAATGATGAAATGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AAGTAAGACATTTGTTGTTTTTAAAGTACAGTACAGTGTGATGAAAGCTTAAAGAGGAGTAAAGAA
AAGTGAATACATTTAGAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TTTTTTTTTTTTTGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG

```

【 40 】

FIGURE 40

```

GGCAGAGGAGCAGGAGGACTCCAAATGCGTCTGCTGAGTGTCCGCGCCAGTACAGTGAAGACAG
AAACTCTGGAGTCAACTGGGGAGGCTGCGAAGCTGATCTGATGCGGGACTCAAGTGGCAATTTCC
GGAGCTTCAAAGAGTACTACGCTACTCAACAGTACTCAATGTAAGAGAGGAGGAGCACTCGGGGAT
ACCATGCTGCTGCGACTGACTGCTCTTAGACTTCTTCTTCCATCAAGCACTCAAGAGGAGGAGGAGG
AAATGAGGAGCAGACTCTGCAACCCCGCCAGCAGCTTGGCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
AACTCAATGCTGCTGATCTCTCATATCCTAA TAGGAAATTAAGCTCAAAATAAAGCAATGAGTAA
AA

```

【 41 】

FIGURE 41

```

MASVGECPAPVFKDKLLEVLKGLFSLWLRDFSPSGIFGAPQRYVRYNYKINVKRGSIGITMVLAVL
EYSEFYSKHLKHELRKLNH

```

【 4 2 】

FIGURE 42

AGCCGGCTGCAACCTGCGGGGGGGCTCCGCTACGGGACGGCCCTCAGTGGCTTCTCCACAGCCACCTCCGG
AGGGATCTGGCTGAGGGGAATGGAGTGTCACTGCCCGGGCTTTGCCCAATCTTGTGGGCACTGAGGG
GGGACTACAGCTGCGAGGATTTGGGGTCTACCTGTGCTTTCAGAGCAGTGTGGAGAGCTTGGAGGGG
ATGGCAGAGGGCTCCTCCCTAGTGTACTCCAGTGTCCAGAGATTTGGATGGAAATTCATAGTAGA
CCTGTAACTTTAATACATCAAGTACTTCCCGGATTTGGTAAAGAGGAGTTCACACACAAAATAGAT
CTACATGGCTAGTGGGGACATGAGAGTACAGAGATGACGAGGTCAGTGCAGATCAGAGATTCATCT
CATGAAAGACGGAGTCTGACTCCTCTCTGTATTAGAAATGTGACTTCCCAACAGCAGCACCATTGTGAA
CGAAGAAAGATCAGTCTCTCTCCCAAGCAGTCCGGCTCTCAAAAAGCATCCCAAAATGGTTCCATAGG
AGTCTGGGACACGACAGAAACAGTACTGACTCAGTCAAGTGGTGGTGTAGACACTGGGGAGATGGTG
TTGTATTAGAAATGGCAAAAGAGGAGCTGGAAATTAAGAGCTCAGACAGGCTGACACTAAATGCGATAC
ACTGATTTGTGTAGCCCTCCATTTTACTGACAGCCAAATACATATTTGGGAGGATTTTGGATCTGGC
CGAAGCAATACCTTACACCCAGCAAGAAAGAGTGTAGGTGGGAGGGGATTTGGTCCAGTGTGTTT
CGAGGATCTGGATCTAATAAACAGGAATATCCGTTGTCTGATGGCATACTATTCTGACTGAGAGAA
GCAATGTACTACTTTGTACTCTTTGAAATAGCACTTAAATGTAGAGATCTCAGTGGCTTATGCTAGG
TTATCAAAATGTGGTCTGTAGCAATTTGAATTTATCTGGAAAGAAATCTCCCTCCCTCTCATGGTAGCTAGT
GCCAGAGTGGGAAACGGGATGCTAATAGTGTCTTACAGATGATGATGGTGTATTGGGATGAGAAAT
CCACCAGATGGGAGAGATATCCACAAATTTTATAGCACAAAATATATAGATTTTCCAGATATATGAA
ACACAGATCTGGCAGTCACTTTTCAAGAGAGGGGCTTACAGAGATTTAGATTTGGAAATAGAGATTTCTCT
ACTTCAGAAAGAAATGAGAAAGGCTTGGAGCCCGCCGGAGTGTCTACACTATTCCCAAGACCCCTT
ATTGAAATCTCCGGAGAGAGAGAGAAAGATGGGATGTAGACTTTCAGTGTCTAAGAGTAAATCTATC
ACCAATCTGCACAGCTGCACAGACATTTCCCAAGACAGCTGTAGTCACTGATCCAACTCCCAAGATGGAT
GAGCTGGATTTCCCTATCCACCCCTCTGGCAGCAGCTGACTGGATCTGATCCAGAAATCCAAATGGCTG
TGAATGTACTCTCCCTGAAACCATAGCATGCTACTTTCAGAGTACTGTACTCTCCCTCTCTCCAGTCA
AGGCCACTCTCTCATTTGTAGATGCACTAACAATGTTAGGATATTGCACTGTAGGCTTTTAAAGACCAA
AGGTACTGAAATGGTTTTTTTAAATAGTACAACTCTAGCAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGTTT
ACCAGAGTTTGTAAATTTGTTTGTATGGGGAGTGGCTTTTCCACAGCTAGTCTTTTCCGAAATGG
GTGGAAATTTGGCCTGGGACTTTTCACTTTGCACTATTCTACACACTCAGTAAATTCAGAGTAT
AATGTTGACTTTAATAATGGTGTAAATGGAAATGTCAGAGCTTTTATAGTGTGATGCAAAATPAATTT
AGTGTCTTCTCAAAATTTCCCTCCAGTCAATTTGTATGTTTCCCTGATAGAGCAAAAGTATTTATC
TTGGCTTATCAAAATGATCAGATGAGATTTAATGCCATTTCTACAGTCTGATTTCCAGAAATGGAGTTC
ACCTTTAGAGTGTGATCACAACAGAGGAGTGTAAATGGCAGTGGTATTTATTCAGATTCCTACCTTAA
TCGTTCACAGATATTTATTTACTAGTCTTTTTTTTCTTAAAGATTTAGGATTTAGGAAATGAGGTTTGTCT
CTCATTTACTAAATGATTTAACTTGAATTTTTTATCAAAAATAAATTCATTTGTTTTAAAAAATAAAAAA
AAAA

【 4 3 】

FIGURE 43

MILPLMVAQSGERECHIVVLTDDDDVDDDEYFPQWGEYSQIYSTKLRFYKFIENRDVAKSVLKERGLKX
IRLIGCYPTIREKVKREGREYEVYVYVORPFIIRMSWEKEKGRSHVDFOCVKSKSITNLAATAAADIPQDLV
VMHPTQVDELILFIIHPSGNSDLDPDQNFPU

【 4 4 】

FIGURE 44

ATTTGACTGGCAAAATGGCCAGATTTTCAGGATGCAAGTGGATCTTAAGTGGTCAAGTGGAGGAGG
AAAGGGATCCGCGAGTCCGAAATTTGAAATGGAGGGAGGAGAAATGTTGTCTCCCTGATCCAGATTTCCA
GGAGGAAATGAACTCCCGATTTCCCGCAATGATGATGTTTTCACCTTAACCTCAACACCACTAGATCTG
CATATGATGAGCTCAATTTGCTGATAAATTTAGAAACAGAACTAGAGTTGGAAACAGCAGCTGATATCG
AGGCGAAAGGCTCAGAGTAAAGAAAGAGCCCTCAAAATGAGAAAGAGAGGCTGGGGATTTAGACATGGAC
ATGACGGCTTCAGCTAGAGAGGAGCGGCTCCAGATTTGAAAGAGAAATGAGTTCAGATATCAATTCAG
AGAAACCGCTTGGAAATGAACTTGTCAAGGAGAAATCATGCTTCAACACAGGACATAGAAACAGAGA
AGTTAAACTTTGAGGAGAGCTTGCAGCTGGAAAGATAGGCTGAGTTTTGAAATTTGAAATTTGAAATGG
TTCAGTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTT
TTTTCCAGGCTTCCCTTTAGCAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTG
TGGATAGCTGGTTTTCTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TAGTATAAAGAGCTGTGCTTACAGTAAACAGTATAGCAAAATCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ATTACATAGAGCTGTGATTTGCTGTGATACCCAGATTTTAACTTATGCTAATAAATTTAGCCAGAGT
CTCATCTGGGTAGATTTTGGCTTCAGAAAGCAATTTGCTGATGCTGAGACATTTGGTTCGAAACCTG
GGTGGGAAAGGTTGCTACTGTGCAATGCACTCTCCCAACCCCGCCACTCAGTAAAGATTTTCCAA
CCCAAAATCATAGTCTGAGGTTGAGAAACCTGCTCCAGCTTACTGTATACCTTATAGCTATGTTTTAT
AGTTTGAATTTAAACTCAGATTTTATGCGGTTAGTACTTAAATGGCAAAAGCTTTAACTATGAAATG
TTACTGTGTGATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTT
AGCCTTCCAGATTCAGAAACATACAGAGACATCAGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTGAAATTTG
TTTTCCACTAATAATCTTTGAAAGCAGAGCCAAATTTAAAGCTTTAGTCTCTTTTCCATGATGTTCTT
AGTTTGGTCAAAAATGCTCATTTCAGTAAATGACTGAAATTTAATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TACCAGTAAAAAATGGTACTTTAGCTCAGTGTGAAACCCATGACTGATGTTTGAATTTAAATAGTATA
ATAGCAGCCTTTGGAGTAGGGGTTAGTGGGAGAGATGCTCCGATCAAAATTAATGATGTTTTGAAATTAI
GATAGTGGTATGATTTGAAATTTGAAAGAGCCTTATTAACATATCTAACCTAATATGAGCAAAATTTGAG
AGTTGATCTGTGTTATTCTGAAATGAAAGCTCAGAGAGTGCACAGATTAATGGCTATCTTCTATATG
TAGTAAATTTGCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTT
CCAAAGGCTTCTG
TACACCTAAATTTGAAATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ATACAGCTCCTCTGTGAGTATTACTTAAATTTGCAATTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TGCAATTTGAGGATGGTATGCAAGGAAATAACTTCTGTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTT
TCTTATCTGAAATTAATGCTTCTACATAGAAAT

【 4 5 】

FIGURE 45

MLSVIFDGRRENLFDFPHIDFFLTNLSRNSAIDPHLLNINERKLEKLEKRLDIEARLIQVKEKRLQIK
ERLRLHMEHRLQIEXERLQIEXERLQIEXERLQIEXERLQIEXERLQIEXERLQIEXERLQIEXERLQI
QNFLESEKLIQEXERLQVKEKRLQIEXERLQI

【 4 7 】

FIGURE 47

GCCGGACCTTCAACAAGGGCTTATTAATCTCAAGCTGGGGCCCTGGAAGCAGTGGAGTGGGGCTAAT
GCTCCCTACGGGTGAAGAGCCTGTGGATCCCGCTCCGAGGCTTCAAGCTCTCTCTGAGCCGCTGCCCT
GTTACACAGCTGAGCTGACGACGCTGTGGCAGAGTAAACTTCAGATGATCAATATCACTGAAACACATGC
ATGCTTTGGATGTAATTAACCTGCACTGTGATTCATGATCAGACAGTGTCTACTATTGATGCTGCTG
GAAGAAATTTGAAATTTACAGTAAATGCTGGACACTGCTTGGAAAGCAGGAGAGGTTTCCAGCTTCCATAG
ATTTGACACATGTCAGACCCGCTTTTGTGCACTACTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
GACTGGAGATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
ATGAAAGCTTTGGGATCTTTAATAATTCAGATTTCTCAGTCAAAGCTGAAAGACATTTAGTACTG
CCCTACTCTCGAATAGGAAAGAGGATTTGATGAAAGGAGTGTGTTCTAATGTTCTTGGAGTGGGCTCA
CTATCAGTAAAGAAATCAGAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
CACATTTGCTGATTTGAGCCTGATGGAAATGCTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
CTGGTAAAGCTTTGAAAGAAATGATGATGAGATATATGAGAGAAATCAAGAACCTCTGATTTACTGGCAC
AGACTGAAAGATTTGACAGTAAACATGCTTCCAGAGACAGTACTAAGGAGGACATCAATACAGTTTT
TGCCTGATCAGTCAATGATGATGAGGATCAGCAGTTTTTAGAGGAAACTCTTCTCATTTGATGATG
AAAGCAGTACAGTAAATAAAGAGATTAAGCTTGGAGATTTCTGATTAAGAGATTAAGAGCTGAGCTG
GCCAGCTGATTTGGGATTAACAGGGGAACTTAAAGATTTGAGGATTTGAGGATTTGAGGATTTGAGGAT
GTTTGAATGATTTGACTCTGAAAGCTGAACTCAAATCCAGATTAAGAAACCACTTCCATGCTCAGAGT
TAGAAGATGATGATTTTCTTGAAGAGCTTCCAGTTTATGAGATTTGAGGATTAATTAATAACTACT
ATGTTGATGATTTGAAAGCAGCAGTACTTCTTCTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TGGCCTGATGATTTGATGCTTCTTGGCAACCACTCCAGCAAAAGATGATGATGAGGAGCAGTCCGCA
CTTCTGATGCTTTAGGATGCTCAGCAGTCAAGAGAGCAAAAATTTTGGCTGCTCCAAATTTACTGCT
ATGACGCCCTTTGAGTGGCTTGGAGATTTCTAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ACGAAAGAGGAGCAGCAGTAAAGAGGTTGCTTAGCAGCAAGTTCAGAGCTTGAAGAACTTGAATTTT
TAGGATTTGAGCAGCAAGTAAAGAGATTTGTTCTTACTACAAAACCTCTTTTAAATTAATTAATTAAG
AGATTTAATTTACTACATATTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGG
ATG

【 4 6 】

FIGURE 46

CTCGAAATTAACCTCACTAAGGGAAACAAAGCTGGAGCTCAGCCGGTGGCGGGCTCTAGAACTAGTGG
TCCCGGGCTCGCGAATTCGGCAGAGGGCAAAATCCCAATATAATTTCTACTAGTAAAGATTTGAAAT
AACTAAACAAAATGATAGAGCTGAGACGAAATTTGATTTCTTACAGAAATCATAGAAATTTCTCTCTC
TTTTAAGTGAACATAAGACTTAAGTGTATTTGACCAAGAGATATTTAGATGATATCATCTTTGGCAG
GTAATCTCTAGAACCTTTCATGTACTTTCCATCAGGGAGGGAAAGAAATGAAATAAATTTTACTATA
TTTTCTTAAATAATCATCTGTCACACTCTTCCAGTTTTTAAATACTCAITGATATATGCTACATTTT
GCTTGTGGCTTTTGAAGCACTTCCAGTCCAAATGCTTGGAGTAAATGATTTTAACTTCCCTAGAGT
TCTTTTAGGGTTTTTATGGTTTTTAAATGAGATGATATATATTAATCTACAGCAAGGAAATGATG
TTGCAATTTTACTAGCTACTGATATATTTGTAACACTTCTTACTTGGGATTTTTTATTTGGTAC
CATTCACATTTACTTACTCTTGGCAGCTTCCAGAGTACTTTGCCATAATAGCACTTAAGGAGTTTCC
TCTTTTATTCCTTTAATTAATCCNAATGCTGAAGAAACATCCCTACATGAGCCCTTTTGTACATATA
AGGCT

【 48 】

FIGURE 48

NDLSTRALLLITLPRKMEVAVNACSIRYKRELLDPHPEYKLSLEPLFCYOLELDAVAVKFLRDDQYTLLEHHM
AFGMYNYLHCDSSWQDYYVYIDLTRHMLTDLVMDLALGPPVFRPRLPTDLCADNRLCASIFSSSTVTLSDG
TGRLYVIGTEGERSNSAKWELFMFERELGDFPIIHSISLLNAREHSIALLLAIKEBELDMKSGSFYLSLEWVT
ISKKNQDKKYEIKRDLRGLKSVHYHAAPEPBGIMHVSYSKSTFVQAGQDLLENMDDI SEKIKEPLYM00
TEDDLTVIRLPEDSITREDIQIFLDHINIVLKHDFLEGLKSSIDHESSTWIKENSLELSLKNNEGLTW
FELVIGDQKGLRSDAQCAALREKMLHLSBELMNFDEKPECNAGLEBEDI FEESSSLRDFGNLTKTH
VNLGSDNYLFSVLDPKENPFCILRHVDVALWQPHSKQDDMBEIHATFNALGYVAQSRKDKFFFCADPNYSY
AALCECLRRVFIYQPAFMSVLYLNKRGGVQVAVKQVAVSLENDPILGFQATNERLFLVITRMFLIKRVNE
N

【 50 】

FIGURE 50

MDRNPSPFPFPPGROKREEEVAGGDCIGSTVSKHWLFCVLSGLIQVSPENTKSSDDEQLTELDEEMENIC
RVNDEMDRVDYALFLOEFNRFDFINVLAKSKCFRLKEICVGLIGNMACFQECVSISSDNLGQVLLHCLYDSD
PFLLETSRILLCLGQNEVAFVWVWETQEHFAIDICIFMSSSTWVLLKVVSPWVKRFLDGLKMLLEWRN
GAQFLDQOEBSEKQVFLVPCLEBAKQVRSNEMWLDVYMHILQLLTVDDGLQAIYHCPDSCDINWLE
DLVCHFCOSDDSPFLQEQKTVLAVSFLSALYASQTKQYLIKRVKDLPLDLSLIRVQNMCCQKPEMSA
ESNIEETRKLTDQDDPHKILKLDLICEFLSNLFIQALTKETVAGVQKESQKSSAFQNLFPYSPVEEPI
KILREVDKALADDERKFNFLKRVQT

【 49 】

FIGURE 49

GGCCITCAAGCGGGGAGCGCAAGCTAGGACCGCAACCCCTCGCCGCGCCGCCGGGTCCGCAACAAG
AGGAGGAGGAGGAGGTGGCCGGTGGAGACTGCAATAGGAGGACCGGTCTACAGAAACACTGGCTCTCGGGCTC
TCAGCGGACTCATCCAGATTGTAGCCCTGAAACACCAAACTAGCTCAGATGATGAGGAGCAGCTGAGCGAGC
TTGATGAAAGAAATGGAGAAATGAAATTTGCAAGATAGGAAATGCAATGGATGAGGACGTGGCTTTATTTCTCC
AGAATTTATGCTCTCGATGATATTCATGGAGTACTGGCCAGTCCAGTGTCTCGATTAGAGAAATCTGCTG
TSGAATTTAGSTAAATLGGCTTTCCAGAGATATGTTGTCCATCAGCAGGATTAATAAATCTTGGGCAAGG
TGTATTTGCACTTTGTATGATTCGACCCCACTACTGCTGCGAAGCAGCAGGTTGTTCTACTTGGCTTT
CCAGCAAGCTGACAGTGTGGTGTGAAAGATCCAGAGACATCCAGCTTTATGATAGCAATTTGCTTCA
TTATGTCAGATTCACAAATTTGACTTCTGCTGGTGAAGTGGGGAGGTTTGGCAAGCTCTTTGATTTGGATG
AGAATCAATGATGAAATGGTCAAAATGGGCTGCTGACGCTCTGGACACCCCGAAGAGCTTGAAGAC
ACCCAGTGTTCGGCTTTGCTCTATATCTTGAAGTCCAAACAGTACGTTCTGAAAATCCAGAATGGCTTG
ATGTTTACATGCAATTTTACACTGCTTACTACTAGTGGATGAGAAATTCAGCAATTTACATTTCTCTGACA
CTGGAAAAGCAITTTGAAATTTACTTTTGGACTGCTGCAATGAAITCTGCCAGTCTGATGATCCACCACTCA
TCTTCAGACAGAAAAGGCTGCTGCTGCTGTTTTCAGTGTGCTGCACTATGCTCCACAGACTGAGC
RAGATCTTAAGAGATGAAAGTAGATCTCTCTATATGACAGCTCTATCGGGTCTTACAAAATATGGAC
AGTGTGAGAAAACAGGACTTGGCAGCTTACACAGGAGAACTAAAGGACTTAAAGACTTAAACCAAGATG
AATTTCCACTGAAACTTAAAGGATTTTAAAGTAACTTTCTTAAATTTTTCAGCAATTAACAGGAA
CGTGTCTCAGGAGTAAAGAGGAGCCAGTGGACAAACAGAGTCTCTCTGATTCAAAACCTTCTTCTT
TCTATAGCCCTGCGTGAAGATTTTAAATCTTACCTGAGTGTATAGGCGCTGCTGATGATCTGGAAA
AAACTTCCAGATTGAGGTTGAGCTTAAACCTGAAITGGATTTACTTCTGACAGAAATAAACTTTATT
TTCTCTACGACAAAAA

【 51 】

FIGURE 51

TTTTTTTAGGCTGTAAAAATGGTAGTCTGCTGTTATTTTCAGTTCCTGSAATGCTCTTGAATGATG
ATTCCAGGCTTCTCTCTCCGCAAGGACTGCTGATGATGTTATTCACATCAATCTTGAATGTTCTTCAI
CTCTTAATAAGTAGTGAATAATTTAAATTAATCAACAGAGCAATTAGTACTTTAAATAATCTAGTAGAA
GACTTTTAGAGTAGTACAGGATGTTTGTGCAATGAGAAACAAATAGCCCTATGATTCAGTGAT
TTTAAAAAATTTTCCCAAGCAATTTTAAACTTTCAGTTCAGGAGAGAAAGAAATTTGACCTTCT
AACAATTTATTTT

【 52 】

FIGURE 52

AGAGCGGGTGCAGGTGGTGCAGCGGTTGCTCATCTGAGTCTGACGCTTCTCGTITGCTCAACC
AGCCTTCAGACAGAGAGGAGGAGACTAATGGGCTGTGATAGGAGGATGAAAGATGATACAGAGAGTACT
CCAAATTTGCATATCTGAACTGAAATGCCACAGTTCTGAAAAGGTTGATGCCCTCAGAAATTTGTCACATC
ATTCTGCTCATCTTACGAGCTCTGATAGAGAGGAGGAGCCAGGATGAAATTTCTCCAGGAGCTGTCTGAG
CTTCACAGAGGAGAGGTTGCTGACTGACAGGCGCCCACTGAGAGTGTGGGCTGTATCTCCCATC
CTCAEATACITTTGGCTTCACTGTTGATTTTCCAGCAGAGCCATGACACAGATGATGATCAGGCTTTG
TAGGACTTATTTTCTGTTTCAATAGAGATAGAACACAGAGACTTCCGGGCTACTCTGACTTCTTCCAT
CCATAGAGGCCAAAGATCTGACTTCCCTCATGCTCCAGGACTCTGAGCTCCAGCCACACTTCCCA
TTGAGGCGCAGAAAGAGGAGGATGATGAGAGATGAAATCCCAATCCATATGATACCTCATGCTCATCTG
GAAAGTGTCTTGAATCAGACTAGCTGCCAAGATCTGTCAGGAGGAGGAGGATGCGTATAGAGGGA
TCCACAGCCTTACACTTGGACTAGTAAACAGATCATAATGGCTCAGTGTTCACAGAAATCTGTCGACT
AGTGTCCGAGTCCAGCGGCTCTCTACAGTGGTGGAGGACACTGGAGCAAAACACAGCAATTTGCAAG
AATTCACAGAAAGGAGGAGGATTTGCAAGAACTTTCTCTTGAATAATTCAGGAGCAAAATGGGAAA
GATGAAATTCAGGATGAAAGTACTTAGCTAAATCAATTTCAAGAAAGAAACTTGGAGACTCATTTTAC
CTGACTTCAAGCTTACTTAACTTGTATGATTAACAGAGTATGATGAGTATGAGTATGAGGAGGAGGAGG
ATGAAAGTACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TTCATGAGG
ACCTTACTTAACTTCACTTACTTATAAATTTAACTGAAATGATACAGGACTTAAATGATACATAAA
CTAGTAACTTTGAAAAGCCACAGGAGAAATCTCAGGATTTGGCTAGGTGACAGTCTTGGACTTTG
CCCCGAAAGCACAATTAAGAGCAAAATCTGATATATGGACTTCTCAAAATTTAAAACTTGTGATTAAG
AAGGAAAGGATAGCTACAGATGAGTGAATTTGCAAACTATATCTGATCAATTTGAAATATAAAGT
TACTAAAATCTCACTGAGTCAAGGCTAGGACTCATCTGTAATCAACACTTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GGAGCTTCAATGAGGCTCAGACAGCTATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TAAAAATTTACTGGGCTCAGACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AGGAGTTGAGGCTGGCTGAGCTGTGATCACACCACACTTCAACTGTGACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AAAAAAGAGG
AGTCTTTCAGTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
GATGCAAAATGAAACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AATACTGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AAGGTTATGATTTCTTATCAGTAAACATATTTTATCAGTAAACATTAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CTGGAGCTTACTTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
ATAGCCCAACTGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
ACTGCTTGGAGTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
AAAAAAGG
GATGAGG
TGACGAGG
TGATATGAGG
TGTAAATCTGGTACTGAGTAAAGTCTGATCTAGTACTGAGTAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG

【 53 】

FIGURE 53

MVQVQVAVQVHLESDFLVCLNHLSTEKEVMGLCIGELNDTRSDSKFYATGEMRTVAEKVDVRIVHII
SVIILRSQKRDVEISPEQSAASBEAERLAELTGRPMRVVWYHSHPHIIVMESHVDVQAMVQMDQGFV
GLFSCFLBKNITKRVLTCTQSIQAKRSSESLHGRDFVSSQHSISEQKEEYERIEIPIHIVPHVIG
KVCLESVAVELFKLCOBEQDARRRHSLSHLDVTKLHNQSVFKLNLCQMSAVSGPFLQWLEDRLEQOQHLQ
LQKEEEMQELSSIE

【 66 】

FIGURE 66

CACGAGTTCTCGAGAGTCTGCTCTCTCCATACCAAGCGCTGCTCTGGCAGAGTGGTGGAGCGAGCAAA
TCCTGCCCGCCCGGGATATACAGAGTTTGGCCGGACCTTGGAGCATAACCGAGAGAGTGGAGGCCAGCA
CSACAGCACACACTATGCGCGCTAAGACGGATATATAGGAACCTTAGTGAATTTGGCCCGTACCCCTCAGACAAA
TGTCTCGAGGTCAGTTGGGGATATATGTTTCAATGGCAACCCCAATATAGGACCTAATGACAGCCCAAT
CAGGCGGGTATCTCTTTTGAACAATCATTTCTCAACAGACTACCCCTTCAACACCACTAAGTTGCAATTAACA
ACAGAAATTTATCTCCAAATATTAACAGTATGGCAGCATTTCTCGATATCTAAGATCACAGGCTGGCGCT
GCTTAAACAATTTAAAGTTCTTTTACCATTTTCTACCTCTATGATGCCAAAACCCAGATGGCCCTTAGTGG
CCAGGATTCACAGGACTATTAABACAGCAGAGTAMGTCACAGAAATCTCGGGAAATGGACTCAGAGATP
GGCATCTGCTACTTAAGTCAGAGAACCTGCATTAAGCCTGGAATAAATCTTAATTAATCTTCTCTTTT
TGAATTTCTATCGGCGTCCCTCCTACAGACCTCCACTTTTAAATTTATTTATTTTGTACCTCCOACTT
CAITTCAGCTCATCTGAGAGACTTAGTCTTCCAGCTTTGGCAATACTGCTTTAAGAACCTTAAGATA
GTTACAGAGAACAGTTGCCAGAGCTCAGAAATTTAAAAAATAAGTGGAGCTGTTATATGGCCCAATG
TCTTCACTAATCTGTTATGAGACTAAACCATCTCCACTGCTCAACATGCTGAAGAAATCATCTGAGGGG
GAGGAGATGGATGCTCAGTTGGTCAACAAAGGATACAGCATATCTAGCAGCATCCATCTTTGTTAAGCT
TCCACTGTTAGAGATTTGAGGTTTACATGATGCTTTATGCTCAACTGATGGCTGGAGATTTGGTATGGA
TTTAAACATCAGACAGAACAGAAATGATGATTTTAAAGCATGTAATTAAGAGAAATGACCTGTTCTGTTCTA
CGAGAAATGGAAATGGATCAACACCCCTGTTATTCABAATAAGGCTCAACATTTTCAATTTCTT
AAATTTGAGAGGCTTGGACTATTAATTAATCTTCCAAATGACTGTTAAATAAGCCTGAATATGTA
TGAAGTTGCTAATGGATGATGACTAAATGACTCTCTAGTAAATGATTTATTTCTCAATAAATGCTG
ATAACCAAAAAA

【 68 】

FIGURE 68

GGCAGGAGTGAATTTCTACTCCACITGACTGGANCCACCAAGGAGGAACTGCTCTTTACCACAGACT
TCTGTATCTTTTAGGTCGATGATTTCTTGGTGGTCACTGACTCCAGACTCAGTCAATTTTCTTCAAT
ACACATCTTTTACATCTTCTCCACAGCTTCTAGACTGTTCTATCTCTCCATCTGCTCTATGAT
CTCTTCCACCACTTCAATTTCCAGATAGACTTGAAGTGTGTTTAAAAGCRAAACTCTTTCACACCAAT
CCATTAATGCTTCCACTGGCTTTGAAACCAACCCAGGCTTTAAGGCTATGATCTCTTACCACTGATC
TCAGACTGACTGCACTGGCAATACACCCCTGGCTCAGCTCTTCCAGCACTGTTCTCCACAGGCAAGA
ACCTATGCTGACTGCTCAATTAATAAATCTGCTTGGCCAGGCAAGTGGCTTATACCTAATCTAGCAC
TTTGGAGCCAGGAGGATGACTGAGCCAGGATACACAGCAGCTTGGGCTCAATAGAGACCTTGGCTC
TACTAAAAA

【 67 】

FIGURE 67

MAKRINKELSLDARDFPQCSAGEVGDMPHQATIMGPNDSFYGGVFLTIHFPIDYFPPKPVAFTRIHY
PNINSNGSICLDLILSQWSEFALTIKVKLLSICSLDQNFDDPLVFEIARIYKIDBDKYNRISREWYQKYM

【 70 】

FIGURE 70

MGEFKVERVFFNYVPSGIRCVANNQSNRIAVSRDGTVEIYNLSANYQKFFPHESRATFALCWAEGORLF
SAGINGEIMEDLQALNIKYNDAFGGPIWMSMASPSGSQLVGGEDGSKVQLQIPDKQIFERNFDRQSRILS
LSWHPSETHIAAGSIDIVSVFVKSSGAVHHMIVDQYQVWVSRKRCIVWGFVAFSLDGLIISVDNAGKRVQWDSAT
GTLVKSLLIANADVQSIAVADQDSFVYGTAGTIVFHFQVIVFVSNSSKQVRIKFTQHTHDMRTVAHSPAL
TSGSTDIHFVFIKSEVVMYDAAIKITFHRKLLSCKNQLLFFPANHLELRISSTVATKNGDTLPL
SKWADHLEHKTREPMETKCSISPCSEJANVSTVREFLVRNVEHDMKSLKRVKMPALFSLQILFSEST
KLFVANSQALHIVLSSGSEFHLBAPQSGTVEAMLCVSNFDPGNLAAAGTSVGVHVNFKGLKHCITFPAY
NFFVTAMALAPNINMLIARSDQVFEYSIPDKQYTDWNRVQSGFHHLGRDTPITHISEPFRKPMHLLHD
AYMFCILDKLELNDKTLINFFPPTNEDSVIRRHRTAHAFKISKIYKLELFDLDRLLVAVERPLDDIIAQL
PPPDKKKKFGT

【 69 】

FIGURE 69

GGGGCGAGAGAGGCGAGCACCGGMAAGGGAGCTGGGGCCCTGGGATGCGAATTAAGCTCCATOGAGTA
GCTTCTTAAATTAAGTTCCATCAGGAATCCCGTGGTGGCTTAGAATAACCAAGTCAACAGAGTTGGCTGTTCA
CGACAGATGGCAGCTGGAAATTAATACCTTACAGCAACTACTTACAGGAAATTTTCCAGGCTCATGAG
TCTGGGCTACAGAGCTTGGTGGTGGCAGAAAGCACAGGACTCTTAGTCTGGGCTCAATGGCSAGATTAIG
GAGTATGATTTACAGGCTTAAACATCAAGATGCTATGAGTGCCTTTGGAGGACCTATTTGGACAGTGGCTGCC
AGCCCACTGGCTCAACCTTTGGTGGTGTGAGAGTGAATCTGTGAAGTAACTTTCAAATACCCAGACAAA
ATCCAGTTGAAAGAAATTTGATCGGCGAAGAGTCCGCTCTGAGTCTCAGCTGGCATCCCTCTGSTRACCCAC
ATGGAGCTGGTCCATAGACTACATATGTTGTTTGAAGTCAAAACAGGACCCGCTTCAAGAGAGHHTTSG
GACAGSGATAATGGGCTGCTTAAAGGAGTGCATGGTGGGGTCCCTCTCTCCGATGGCCTATC
ATAGTGTGACTCTGCTGGAGTSCAGTCTTGGGACTCAGCCATGGGAGCTTGTGAAGACCCATCTTCCATC
GCTATCTGAGCTGCACTTCCCTGCTGACTGCAACAGAGACAGACTTCCGTTGGGCGAGCGGAGGAAACA
GTCTCCATTTCCAGCTGGCTCTGCACTTAAAGCAGTGGAGAGCAGTGGGTCGGCAAAAACCGTCCAG
CATCACACTAGACTGCGACTTGGCCACAGCCCAAGCCGCTGATCTGAGGCACTGACACCCACTTA
GTCTTCTGCTCTCATGAGAGGTTGGAAATGAAGATACGATGCCCTCTCCGAAAAATCACCTTCCCCCA
CGATGCTCATCTCTGCTCAAAAAGAGGAGCTTCTCCTCTCCAGTTTGGCTCATCACTAGAACTTTGGCGA
CTGGGATCCACAGTTGCAACAGGCAAGATGGGATCTCTTCCACTCTAAAAATGACAGATCAITTTACTGCAC
CTAAGACAGAGGCTCTTGAACATATCTGTAGCTGATCTCCCAATGGGAAATGGATGCTATTTTACATA
GTTCTGGGTTTCTCTATCGGCTGATATGACATGACAGACTAGGCTCAAAAGGTTCCAAATGCCA
GGATTCCTGCTTCCGCTTCCGATTTGTTTCTAGATTCACAAAGGCTCTTTGACATCAATCAGAGTA
GCTCTGCATATGTTGAGCTGTCAAGGAGAACTTCAAGCCCTGATGCTTCCAGCTCAGTCCGAGACAGTG
GAGGCAATGCTCTTTGGGACTGCTCAGATGGAAATGGCTGCTGATCAGTACAGTACCGACTGCTGAGTCCAT
GTCTACAGATAAAGCTAAAGCTTCACTCCAGGCTGCTGCTCAATTTCCAGTACTGATGGCTATT
GCCCCAAATCCAAACAGCTTGTCTATGCTATTCGACAGGAGTATTTGAGTACAGACTCCAGAGAAACAG
TATACAGATGGAGCCGAGCTCCAGGAAGAGGCTTCCACACCTTGGCTCCAAAGGATCTCTTATCACA
CACATCAGTTTCAATCCAAAGACCGATGCACTCTTCCATGATGCTTACATGTTCTGATCAITGACAG
TCAITGGCCCTTCCAAATGACAAACCTTACTCTTAAACCTATTTCCACAGAAATGAAATGATGATGAG
AGGCGCACGCTCACTTTTAAATTTTAAAGATAAAGGCTCTACTTCAAGGATCTTTTGGATGAGAA
AGACTCTGAGCTAGAAAGGCTCTGATGATGATTTGCTGCTCCAGCCACCCATTAAGAGAGAAATTT
GGAACTTAAACAGGCACTGCTGCTGCTCTTGAACCTTCAACCTGCTGCTTTTCAACAATCATGATAT
AAAAAAGTATTTCTG

【 71 】

FIGURE 71

GGGCGCCCGGCGCCACGCCCGGAAAGCGCGGCGCAGACAGCGCGGCGCTGGAGCCCGCGCCGACTGGAGG
CGTTGGCGGAGCCCTTGAAGGCAAGCGGAGACAAAGCCCGGCACTCCGCTCCTCCAGGCGCCAGCGC
CTCTCGCCACCGGCGGCGAGCGGCGCGGAGCGCGCGCCAGGCGAGCGGCGCAGCAGAGGAAAGAAC
GCTGCTTCACTCTCGCGCGGCTGTGGAGGACAGTGGTGTCTATTTCACTGCTCAGTATAGATCAATTA
GACAGGTTGAGCTCTCAGATTAAGTCTCCGAGACTTACTCTTCCAGGCTCACTTGGGACATTAAGTGG
ASCITGATGTTGGGACCACTACCTGGACACTGACTCTTGGCTCTGATGCTGCTTCCAGAGAGGAG
ACCAATGCTCTTTTAGGCTTGGTCCAAATTTGGTGGATGGACCTCAGGCTGATACTTCTGATG
TTACTCCAAAGCCAAAGAGCAATTAAGCTTTTCTGCTCAACAGCAATTTGTCALATTTTCTGAGCTGG
CTCTGAGCTTTTACCAAAATTCCTAAATGATCCTAATGATGTTAAAGCCGAATGACGCTAAGACAGAA
AGTGGAGGCTTAAAGCAATGATTAAGTCTGCTGCTTACGCTTACAGCAGGAGGCTTCTGAGGCTT
CTATAGAGATAACTGCCCTGATGCTGGATTTCCGAAACTATATCTGCTTGTCTTATTAAGAGTTTAA
GAGTATCGAAAGAGCTCAATGACTCTTCCGAAATGGACTGAGAAAAATCCACAGTTTTGTGACT
TATGGCACTGCTGCTTTTAAAGGCTGCTCTGCTGCTTATCCACAGAGTCAATAGAGGAGGCT
CCGGAGAGGCGCACCAAGTACACTCTTTTCCAGCAGCGCGGCTGCTTTCCGAGAGGAGGCTACTTGG
CTTTATAGAGACTGTGTCAGCTTATCCGCGAGATCCAAATGACTGCTGCTGCTTCAAGCTTAAAGT
AATGTTACTCTGTAGAGACTACTGCTGAGCAGCGGAAATTTGCTCTGAACTAAAGCTGAAATAGAG
CTTCCGAAATTTTCCGCTTATGATTTTAAAGTGTGAGCTGAAAGAGGAGGCTAATAAATCTG
TCAATACCTGTGGACATTTCCCTTGGATTCATGCTTTCTGGAGGTTTAAATCAATAGCTTAAATG
AATTAATACTTTTACTTAAAGGATCAGGTTAAGCAGCACTAATTAATCAATGCTTAAATTTAA
GTATAAAAAA

【 9 3 】

FIGURE 93

GGAGTCGTTGTTGTTGCTTTTGGAGCTGTGGGGCGGCTTCGTGGGCGGAACCTTAAAGATAGCCGCRAAG
GCTGAAATGGTGATTAAGAAAGATGGCTCCCTGGGGCCAAAATCTGTCATCAAAATGATATTATTTGGC
GACTCAATTTGCCAGCGGACAGCTTTCTAAGAGAAACGATTAACCTGATAGAGGCTGGGTGACCTTTGGAGATA
ATGTAATAATTCACAGGTTGACCTCTTACACACAGCTTATATGATTTTGGAGAGCTTGGACAAATCCAG
CGAGACTGATGAAATCGTGAAGCAAAATCAAAATCGAAGGCTCCAGAGCAACCCCTACCTGAGTGTACT
GATGATATAAATAATGATGAAAGACAGATCTGTTPAATTAAGAGGCTCCCAACTGATGCACACTTGTATGAC
ATAAAGAAATGGTATGAGATAAAGTCAAGTACTAAATATTAGATGAGAGAAACATTGCAATAGAACTTTAAG
GGATCAATTTTGGTTGTTGATAGCATTGAACTGCTAAGAAATTTGTAGAGACCCCTGGCCAGAAGTACAAA
GAAACAGACCTGCTAATCTTTCAAGSACGATTACTTCCAAAATAAATGAGAAAGAAAACAAAATAAAGTG
GAACATAAATTAAGAGCTAAACAGAGGAGAGGCAAAACAAAAGTTAGAAAGATGCTGAAATGAAATCTCTA
GAGAAAGAAATGGATGCTTGGTGAATTTCCGGGTTTATGATGATGACAGCTGTAGGAAATTTACACATA
CTTTTCAAAATGATGTAATAAATAAATGATGATGCTTCTGAGAGGCAAAAGAGGGGATAATCTTATTAA
GAAAGGCAAGAGAGGCTTGGTAAAGCAAGATGCAATAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
ACTTGGGAACTGATGAGAGGAGCTGAAAGAGAGCTGAGAAATAATGAGAGGCAACAGAAATCCCTA
ACAATAAGAGCTAAAGGCTGATGATTTAAGAGAAAGAAAGGTAATAAAGCTGCCAGCTGGCTGGT
AAGGAAAGATACAGTTTCAAGGCAAGAAACGAAATTTGCTAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
GGTCACTGAGCTGTAAGAAAGAGCAAGAGAGAAACAGACAGAAAGAAAGCTGCTCAAAACACAGAAACA
GAAATGGTCTGAGAGACAGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TTTGGGGGCTTTTAAAGAAAGAAACGAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
GTTGTTAAGCTGCTTTTGTATGAGAAATGAGATTTCTTGAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ATTCAATAACAAAGAAAGATGCTTCAATTAATTTGCTTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ATAAATAATGAT

【 9 5 】

FIGURE 95

TTTTAACTTGCACAGGTTTTTATTTTTGCTTTATATCATACAGTGTGTGAAACCTAAAGAAATACATTTTC
TCTTCAATTTGGATGATGATATAAATAAATTTTGTGGACTGACACACACACACATGCTTCTTGGCTA
TGTCTGCTTGAATCAAGCTGTCCTGACAGAGGCTGACAGACATGAAATGATGATGATGATGATGATGAT
AGAAATTAAGCAAAATGATTTGCAAGAAACCCAGTGAAGAGGATGATTTTCAATCCAGAGGCTGATG
CTGTAACAGGCAATTTCCGGGATATCCAGTCTTGTGATGCTGGGACTCCATTACCAACTTCTCTTCT
TAATGCTCAAGGCAATTCACAAAGGCTGCTTAAAGAAAGCCAGACCACTCCAGAGCTGTAGGGTTCATG
AAGATGGGACTTTTTTTTTTGAAGCAAGAG

【 9 4 】

FIGURE 94

MAFNGDNEMAALEAKICHQIEYFDFNLRPKFLKQIKLQEGWVLEIMKFNRLNLTDFNVI EALSKS
KAEIMEISDKTKIRSPKLEFVDEYKNDVNRVYIKGPTDATTDD IREKLEDKQVNLQMRLELHKAF
KSLIFVFDSESAKKFVETFGQYKEDLLLFKDYFARKNEKQNKVEKALAKQEQAKQLBEDMSEKS
LEEKIGLCLFSGDLDQTCBEDLHLLFNHGEIKNIDFVGAKEGILFKEKAEALGAKDANNLNQLLNHE
VTNEVLEGEVEKALKIKLEQQESLAKWKGRFRGRGRGNRAQESGKGVQFQKTKRFSDEHDEHDE
NGATGPKARRETDREEPASQKQTEMGAGDQ

【 9 6 】

FIGURE 96

CCTTACAGCAAAATCACTACTGACATTTTACTAGAAATGATGCTCCATGAGGGGGGATTTGTTTGT
TACCATGGTGTTTTGTATGATGAGAACTGCTTACATAGTATGCTCAAAAATTTTTTGTAAATGAA
AAGTGAATCAITGTTTCCAGTGTAGACAGATAGGATATGTTGTTGAAATGAAACAGCAAGTGTGAC
CCCAAAAATGGCAAGTGAATAAAGAAACATTTCTGAAGAACTGTTGATCTGATCCAGCACTTTGGGA
GCTGGGGCAGTTG

【 9 7 】

FIGURE 97

GGCGAATCTCGGGGGGAGGCGCTGGAGAGCTGCACACGGCCCAAAATCTAGCAGTGCBAAGAAAGGA
TAAAGAGATTCAAGGTGGAAGATGATTTGATGCCGATCTGACAGTATGAAAGAAAGACACCAAAGGCTCC
TCCAGGAGATGGTCCAGACCCGAGGAGAGATCTGAGAGTGAAGGAAATCCAGCTGCTCCAGAAAGCA
ACAGATAGCAGTGGGTCAGAAAGGTTGACCTGCACTCCAGTTGCTGGAGGGCATGSCACAGCTCCACTGA
CCTGGATCTCTGCTATTAATGAAAGACAGCTGCTAAAGAGCCGACAGTGTAGCAAAACAAATCAAGAA
ACTGAGTCAACATCAATTTCTGCTCCGCAAAAGAGCCGGATTTTCTGAGCAATGAAATGATGAGATG
TCAGACATGCTGCTGACCTATGCTTAAAGATGAGAGACATTTCTGAGTTCAGAAAGGCAAAAG
GAATTTATAATACTGTAAGAGAGAGAGAGCTACAGAAAGAGCCACAGCTGAAAGGCGCGCTTCTCT
CTCTGAGAGAGGCGAGCTGCAAGATGCTGAGTGCACAGCTGAGATGCTGACCCCTCGAGGCAAGTGC
CAGACGCTTCAGAGCAATACAGACATTCGCCAGGCTGACACTGACAGGCAAGCTGCCCTGAGGTC
CATCCACTGGAGGAGATGGGACGACCTCTAGAGGCGCTGAGGCAAGACTGATGACACTACGCGCTCTC
GGAGAACTGATGTTGATGATGAGAAAGATGCGAGGCTGGAATCTACTGAGGAACTCAGAGAGCTGAC
GGCGAAAGAGCTGTAGCTCCGAGAGAGCTTCCCGAGAGCTCTCCGAGAGGCAACAGAAAGAGG
AGCTTGGCAAAACAGGAGTCTGGAGAGAGCCAGGCGCTGGCGCCCGCCAGGGTGTATTCAATCAAGA
CAGTGGCTCAGAGAAATCTGGGGAGSACCCACAGACAGCCCGCTGCTGAGGAGCAACCCGGGCTGCTCTC
AGCCCGCTCAGGCGCTGATCAGCCAGGAGGATTTTCTCAAGCAGCCAGGAGAGGATCCCGGCTC
TCTCTCTGCTGAGGAGGAGCTTCTGATGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TAGCACTGATGATTTTTTATGATTAATCTGTTTGAATAAAGATGAACCTGTTTGGCAATGAGAGCTCCA
TTTTATGAGGGGCGAGTGGAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

【 9 9 】

FIGURE 99

ATGCACACCGTGGCTACGTCGGGACCAACCGGCTCTGGGGGGACCGCCAAAGCCTCCGGCTGCCGGGCTGT
GGCCCAACGCTCGAGAGGCGGCTGCTTCCGCGGGGCGGTGAGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCG
GGCTGATGCTGCTGGGCTGTTGGGAACTCGCTGCTCATCTAGCTCATCTGCCGCCAAGGCAATGGGAGC
GTACCAACTTCTACATCCCAACTGCGGGCCAGGAGCTGACTTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CTGCTGTACCGGCTGCCGGCTGGTCTGGGCACTTATGTCGAATGCTCACTACATCCAGAGGCTGCTG
GTGAGCCCACTGTGGCTCTGACCCGCAAGTGTGAGACCCCTGGTACGCTGAGCGGTTCCCGCTGGCGCC
CTGACCGCGGCAAGCCCGCTGGGCTGAGCTGACCTGAGCTGACCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT
CCGCTG
GAGCGGCTG
GCTG
GCAAGGCGCGAGGCGGCTGCGGGCAAGGCTCGGGCTGCTGGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TGGGCGCCCTACAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GCTACCGGCTTAAAGCTGGGCTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGGGCTG
CCGAGACTTGGAGCCCGGAGCCGACAGCGGAGCTGACCGGCTGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGAAGCCAGGAGGAGCTGGGCTGCGGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG

【 9 8 】

FIGURE 98

GAGTCTAGACAGGATGAGGCTCAGTGGGACACAGCAGGTTTCTGCTTCCAGATCAACACAGTACCA
TGGACTGACTCTTCCATCTCAGGCACTGCTGCTTCCGATCAATTTTCAAGTGAAGCTTACTCCGCAAGAGA
CTCAACACTCAGCAGGAGGAGGATTTCCCTAACAACAAACCTTACGACTTTTCACTCTTTTTTTTTCTT
TTTGTATGATGGGATTTTGTATGATTAATCTGTTTGAATAAAGATGAACCTGTTTGGCAATGAGAGCTCCA
TAAAGCTATCTTATTAAGTCTTCTGCTCCAGGCTTGCATGCTTCAATACAAATAAAGATGATGATTTT
GAAATAAATAACTTGCACATTTACAGAAATGCAATAAAGCAAAAGCAATTTTCACTGATTTTCCCTTCC
TCTTACTGGGATCTTCTTAAAGGATGATTTTACAGCAATTTGATAATGATGATGATGATGATGATGATGAT
GCTAATGAAACATATATTTAAAGSTACAGGCTGCTGCTGCACTTCTTATGATCACTAAATGATGATG
TAAAGATGATGATGATTTTAAAGGCTTATCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TGGTGTCTATGATGATTTTGAAGAAACCTTTGCT

【 1 0 0 】

FIGURE 100

MHTVATSGFNASWAPANASGCPGGANASDGPVSPRAVDANLWLPFAALMLLGLVGNLVIYVCRHKMPRT
VFNFIANLAAATVYFLCCVFFTALLYFLGVLVDFMCKFVNYIQGVQATCTTAMSDRNVTVYVFLPRA
LNRNFFLALVLSLHWGSAVSHVFLVLRSPGFRAVCSBAFNSALEFAPALNLLALYLLPILATACYA
LNRHLGRVNRPADSALQGVLRMGRNRAVSVLNRVLLRACWPIQLVLIQALFAGSWSHPSIA
AVALKTRWCMYSNSLNLPLVAPLSSHFDGRVRCPCAPRRPRRPRRPFSDPAFLRHLRHSFAPARA
QHGSSGLAARGLCVLGNAPL

【 101 】

FIGURE 101

```

GGTAGCTCACCGTTACCCAGTATGCTTCATCTCCAAACCAANCAACAGCTACAGTTCAAACGGGAGGCCCC
AGGGGATGTGAGGAGTGAAGGCTTTGAGGAAATGGCGCTCTCTCAGCCATCTCGGCCCTCTCTTTTCAG
TCTTGACAAAACAGGTTAATTTGATCCCAACCGGATCAGCTTTCTCTCTAAACCTCTAGGCCCTCTT
ACCTGCTCTGACCTAATGCTCARGAAGCTCTCTACTGCGCCAGAGCTCAGCTTTGGCACTCTGCGCTGA
GCAGCTCTCATCCCGGTTTCCCTTACGCTCTCTTCTGATGACCCAGCACAGCGGGCTCCATGGAGGCTCTGT
CCAGCAGCCATCCCGAGCAGCAGCTCTGAGGAACTGCGAGGCTGAGGACCACTCTGCTCAGAACTATGT
GATCATCTAAAAGGGGGAGCTGGCTCCACCTATGTTCCATGGATCGGACCAAGATTTAGACATCTGAT
GAGTGACAACTTCTGACACACCACCACCAATATATCTATCAGCATCATAAAGTATCTCTTAAACACTGAT
CTTGGCGGAGCGAAGCTCTTATTCAGCAGTTTGTGGAAAGCAGTAATGCTTGC2AAACGGTGTGTCATTCA
GCATTTAAGTGGAGACTATGCAATTTCAAGTAAATTTGACAGATATGACTGTGCTCTGTGTTTGTTCAGAT
TCTTCAAGTAAATAGCTTATATCAAAAGTGGCTCTAAATAGAAAAGTCTGCTGCTGTTTGTCTTAT
GGAAAACCTGTAATTCAGGATATCTTTCATTTGATCCAGGCTTGTGTTCTACTTCTGTAATACATACAAI
GC2AAAAAATAAAAAA

```

【 102 】

FIGURE 102

```

AACCTAATTAATATAGCTTTATTCATCTTTCAGAGATGGCAATTAGCCTAGAAAATACATCAAAAGATGAAC
TGATTTTGGCTGAAAACGTCACCAAGTTTAATGCTCAGACATTTTAAATAGACAGATGTAATTTCTAATA
TATACCAATTCGATCACACACCAATTTTATGTTCTGGAGTGAACCTGGAGTATTTTGGCTAAGACTTCTCATI
CTTAAAACCTAGCTTTGGCAGTTACAAATGTTGAGAAATTCAGCACAAAAGCAACCTTAGCCAGCCTTTTATTT
TATTTTTTAAATCTTATTTAACCCTCAAGTTCCTTTGCGACCAATAGCACTTAGGTGGCTTACCTGT
AGAAGGCTGCACTTTCAGCGGGGGGACTTTAATTCACATXCCACCACCTC

```

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 クラーク, ヒラリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 4, サン フランシスコ, ハークネス アベニュー 4 9 5

(72) 発明者 ハント, ブリスデル
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 0, サン フランシスコ, ドロレス ストリート 1 1 3 3, 1 6 号

(72) 発明者 ジャックマン, ジャネット ケー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 9, ハーフ ムーン ベイ, パトリック ウェイ 9 4

- (72)発明者 ショエンフェルド, ジル アール.
 アメリカ合衆国 オレゴン 97520, アッシュランド, スプリング クリーク ドライブ
 680
- (72)発明者 ウィリアムズ, ピー. ミッキー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94019, ハーフ ムーン ベイ, アルト アヴェニュー
 509
- (72)発明者 ウッド, ウィリアム アイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズボロ, サウスダウン コート 35
- (72)発明者 ウー, トーマス ディ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94110, サン フランシスコ, エルシー ストリート
 113

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03 FB07
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA05 DA12 EA04 GA11 HA11
 4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QR32 QR40 QR77
 4B064 AG01 AG26 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA72X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA17 BA01 BA02 BA22 NA14 ZA022 ZA202
 ZA342 ZA552 ZA592 ZA662 ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA962 ZB072
 ZB082 ZB132 ZB152 ZC352
 4C085 AA13 AA14
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20
 EA22 FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2006521082A5	公开(公告)日	2006-11-02
申请号	JP2004536419	申请日	2003-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ボーダリーサラシー クラークヒラリー ハントプリスデル ジャックマンジャネットケー ショエンフェルドジルアール ウィリアムズピーミッキー ウッドウィリアムアイ ウートーマスディ		
发明人	ボーダリー, サラ シー. クラーク, ヒラリー ハント, プリスデル ジャックマン, ジャネット ケー. ショエンフェルド, ジル アール. ウィリアムズ, ピー. ミッキー ウッド, ウィリアム アイ. ウー, トーマス ディ.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K45/00 A61K39/395 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P25/00 A61P7/06 A61P37/02 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/02 A61P1/16 A61P1/04 A61P11/00 A61P17/06 A61P37/08 A61P11/06 A61P27/16 A61P37/06 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K14/47 C07K19/00 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12P21/08		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/02 A61P27/16 A61P29/00 C07K14/435		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 A61K45/00 A61K39/395.N A61K39/395.D A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P25/00 A61P7/06 A61P37/02 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/02 A61P1/16 A61P1/04 A61P11/00 A61P17/06 A61P37/08 A61P11/06 A61P27/16 A61P37/06 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K14/47 C07K19/00 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68.Z G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR77 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA202 4C084/ZA342 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/FA72 4H045/FA74		
優先権	60/410340 2002-09-11 US		
	JP2006521082A		

摘要(译)

本发明涉及含有新蛋白质的组合物和使用这些组合物诊断和治疗免疫相关疾病的方法。