(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5319051号
(P5319051)

(45)発行日　平成25年10月16日(2013.10.16)　(24)登録日　平成25年7月19日(2013.7.19)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	39/395	N
A61P 29/00	(2006.01)	A61K	45/00	
A61P 37/02	(2006.01)	A61P	29/00	101

請求項の数 2　(全 128 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2005-500358 (P2005-500358)
(86)(22)出願日	平成15年10月1日 (2003.10.1)
(65)公表番号	特表2006-501862 (P2006-501862A)
(43)公表日	平成18年1月19日 (2006.1.19)
(86)国際出願番号	PCT/US2003/031207
(87)国際公開番号	WO2004/031105
(87)国際公開日	平成16年4月15日 (2004.4.15)
審査請求日	平成18年9月28日 (2006.9.28)
審判番号	不服2010-6261 (P2010-6261/J1)
審判請求日	平成22年3月23日 (2010.3.23)
(31)優先権主張番号	10/265,542
(32)優先日	平成14年10月3日 (2002.10.3)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	10/633,008
(32)優先日	平成15年7月31日 (2003.7.31)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　アシュケナジ，　アビ　ジェイ．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４４０２，　サン　マテオ，　タリータウン　ストリート　１４５６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＡＳＳ抗原およびＪＡＭ－１Ｔの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

慢性関節リウマチを処置するための医薬の製造における、配列番号３２に記載のポリペプチド、配列番号３３に記載のポリペプチドおよび配列番号３４に記載のポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチド、または該ポリペプチドを含むイムノアドヘシンの使用。

【請求項２】

配列番号３２に記載のポリペプチド、配列番号３３に記載のポリペプチドおよび配列番号３４に記載のポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチド、または該ポリペプチドを含むイムノアドヘシンを含む、慢性関節リウマチを処置するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（発明の背景）

（発明の分野）

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

【背景技術】

【０００２】
（関連技術の記述）
炎症性反応は、複雑であり、肥満細胞活性化、神経終末活性化、血小板活性化、白血球活性化および補体活性化によって局所的に産生される種々のシグナル分子によって媒介される。特定のこれらのシグナル分子は、内皮細胞の内面をより、多孔性にし、そして／または、特異的な炭水化物識別を介して、白血球を識別し、そして、誘引する細胞表面分子として作用する選択されたシグナル分子を発現させる。より強い白血球結合は、インテグリンによって媒介され、これは、内皮を介した白血球の移動を媒介する。さらなるシグナル分子は、化学誘引物質として作用し、結合した白血球を誘引物質の供給源に向かって移動させる。他のシグナル分子は、炎症反応の過程で生成され、血液に流出し、骨髄を刺激し、より多くの白血球を生成させ、それらを血流中に放出する。
【０００３】
炎症は、代表的に抗原によって惹起され、これは、実質的に免疫応答を惹起し得る任意の分子であり得る。正常な生理学的条件下で、これらは、外来の分子であるが、生体自体によって生成された分子は、触媒として機能し得、そして、このことは、種々の疾患状態で生じることが知られている。
【０００４】
混合白血球培養または混合白血球反応（ＭＬＲ）におけるＴ細胞増殖は、化合物の免疫系を刺激する能力の確立された徴候である。炎症応答において、応答する白血球は、好中球性、好酸球性、単球性、またはリンパ球性であり得る。感染した組織の組織学的試験は、免疫刺激応答または免疫阻害応答の証拠を提供する。Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ　Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ編、１９９４、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃを参照のこと。
【０００５】
炎症性腸疾患（ＩＢＤ）は、腸疾患（潰瘍性大腸炎（ＵＣ）およびクローン病の両方を含み、これらは、両方とも別個の疾患として分類されるが、共通の特徴を共有し、共通の症状も共有するようである）を集合的に記載するために使用される用語である。診断基準の共通性は、患者が二つの疾患のどちらを有するかを正確に決定することを困難にするが、それぞれの病変の型および位置は、代表的に異なっている。ＵＣ病変は、特徴的に粘膜の表在性潰瘍であり、結腸、直腸の近位に出現する。ＣＤ病変は、特徴的に広範囲の線状の裂溝であり、腸のどこにでも出現し得、時には、胃、食道、および十二指腸にも出現する。
【０００６】
ＩＢＤに対する従来の処置は、通常、抗炎症剤または免疫抑制剤（例えば、スルファサラジン、コルチコステロイド、６－メルカプトプリン／アザチオプリン、またはシクロスポリンが挙げられ、これらは全て、罹患した患者に部分的軽減をもたらす）の投与を含む。しかし、抗炎症／免疫抑制治療がうまくいかない場合、結腸切除術は、最後の防衛線である。外科手術は、診断後の一年以内に約３０％のＣＤ患者に必要であり、従って、手術手順は、年に約５％増加しているようである。残念ながら、ＣＤはまた、高い割合の再発性を有し、約５％の患者が最初の年の後、次の外科手術を必要とする。ＵＣ患者はさらに、実質的に結腸直腸癌を発症する危険性が増加する。おそらくこれは、再増殖後の
上皮に対する傷害の再発周期のためであり、これは、継続的に、新生物形成の形質転換の危険性を増加する。
【０００７】
最近、発見されたジャンクション接着分子（Ｊｕｎｃｔｉｏｎａｌ　Ａｄｈｅｓｉｏｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌｅ（ＪＡＭ））として知られる免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは、種々の起源の内皮細胞および上皮細胞の細胞内接合部で選択的に濃縮されるものとして同定された。Ｍａｒｔｉｎ－Ｐａｄｕｒａ，Ｉ．ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１４２（１）：１１７－２７（１９９８）。ＪＡＭは、二つのＶ型の細胞外、鎖内ジスルフィド環を有するＩ型内在性膜タンパク質である。ＪＡＭは、Ａ３３抗原と実質的に相同

性を有する（図１または図１８）。ＪＡＭに関するモノクローナル抗体は、インビトロで、内皮細胞単層を通る自発性単球移動およびケモカイン誘導性単球移動を阻害することが見出されている。Ｍａｒｔｉｎ－Ｐａｄｕｒａ、前出。ＪＡＭ発現が、大腸炎を有するＣＲＦ２－４－／－マウスの結腸で増加することが最近発見された。ＣＲＦ２－４－／－（ＩＬ－１０Ｒサブユニットノックアウトマウス）は、リンパ球、単球および好中球によって媒介される自発性大腸炎を発症する。数匹のこの動物は、結腸腺癌も発症する。結果として、本明細書中に開示されるポリペプチドは、ヒト疾患（例えば、炎症性腸疾患、他の腸の炎症性疾患ならびに結腸直腸癌）において、またはヒト疾患と関連する他の場所において、発現レベルが上昇するようである。

【０００８】

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

【０００９】

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

【００１０】

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

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

（発明の要旨）

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

【００１２】

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

【００１３】

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

【００１４】

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

【００１５】

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

【００１６】

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

【００１７】

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

【００１８】

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

【００１９】

異なる局面において、本発明は、哺乳動物における炎症性疾患を診断する方法に関し、上記方法は、（ａ）上記哺乳動物から入手した細胞の試験サンプル中、および（ｂ）同一細胞型の既知の正常細胞のコントロールサンプル中のＳＴＩｇＭＡポリペプチド、ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチドまたはＰＲＯ２４５ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出する工程を包含し、ここで、上記コントロールサンプルと比較して、上記試験サンプル中のより高いレベルの上記遺伝子の発現は、上記試験組織細胞が入手された上記哺乳動物における免疫関連障害の存在を示す。

【００２０】

さらなる局面において、本発明は、哺乳動物の炎症性障害を診断する方法に関し、上記

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

【００２１】

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

【００２２】

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

【００２３】

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

【００２４】

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

【００２５】

別の実施形態において、本発明は、薬学的に受容可能なキャリアもしくは賦形剤と混合された、ＳＴＩｇＭＡポリペプチド、ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲＯ１８６８ポリペプチド、またはＳＴＩｇＭＡ抗体、ＰＲＯ３０１抗体、ＰＲＯ３６２抗体、ＰＲＯ２４５抗体もしくはＰＲＯ１８６８抗体を含む組成物を提供する。一つの局面において、この組成物は、さらなる活性成

分を含む。この活性成分は、例えば、さらなる抗体、または細胞障害性剤もしくは化学療法剤であり得る。

【００２６】

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

【００２７】

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

【００２８】

別の局面において、本発明は、単離された核酸分子を提供する。この核酸分子は、以下：（ａ）図２２（配列番号３１）のアミノ酸１～３１０の配列を含むＰＲＯ１８６８ポリペプチドをコードする、ＤＮＡ分子、または（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補体、に対して、少なくとも約８０％の配列同一性を有するＤＮＡを含む。この配列同一性は、好ましくは約８５％、より好ましくは約９０％、最も好ましくは約９５％である。一つの実施形態において、この単離された核酸は、図２２（配列番号３１）のアミノ酸残基１～３１０を有するＰＲＯ１８６８ポリペプチドをコードするＤＮＡを含む。

【００２９】

別の局面において、本発明は、ＡＴＣＣ受託番号（ＡＴＣＣ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｎｕｍｂｅｒ）２０３５５３として保管されるｃＤＮＡの全長コード配列と、少なくとも８０％の核酸配列同一性を有する、単離された核酸を提供する。

【００３０】

本発明は、本発明の核酸を含むベクターおよび細胞に、さらに関する。一つの実施形態において、このベクターは、宿主細胞によって認識されてベクターによって形質転換される制御配列に、作動可能に連結され得る。このようなベクターを含む宿主細胞も、また提供される。例えば、この宿主細胞は、ＣＨＯ、Ｅ．ｃｏｌｉ、酵母、もしくはバキュロウイルス感染昆虫細胞であり得る。ＰＲＯ１８６８ポリペプチドを生成するためのプロセスがさらに提供され、このプロセスは、このポリペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養する工程、およびこの細胞培養物からこのポリペプチドを回収する工程を包含する。

【００３１】

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

【００３２】

なお別の局面において、本発明は、単離されたＰＲＯ１８６８ポリペプチドを提供する。特に、一つの実施形態において、本発明は、図２２（配列番号３１）の残基１～３１０を含むアミノ酸配列を含む、単離されたネイティブ配列ＰＲＯ１８６８を提供する。本発明のさらなる実施形態は、図２２（配列番号３１）のアミノ酸１～Ｘを含む単離されたＰＲＯ１８６８ポリペプチドに指向する（ここで、Ｘは、アミノ酸２３７～２４７のいずれか一つである（ａｎｙ　ｏｎｅ　ｏｒ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄｓ　２３７　ｔｏ　２４７））。

【００３３】

なお別の局面において、本発明は、ＡＴＣＣ受託番号２０３５５３で保管されるｃＤＮＡの全長コード配列にコードされるアミノ酸配列と、少なくとも８０％のアミノ酸配列同

一性を有する、単離されたポリペプチドを提供する。

【００３４】

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

【００３５】

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

【００３６】

別の実施形態において、本発明は、単離された抗体を提供する。この単離された抗体は、以下からなる群から選択されるポリペプチドに特異的に結合する：図２（配列番号１）のアミノ酸残基２８～２３５、図２（配列番号１）のアミノ酸残基２８～約２５８、図２（配列番号１）のアミノ酸残基２８～２９９、もしくは図２（配列番号１）のアミノ酸残基１～２９９を含む、単離されたＰＲＯ３０１ポリペプチド；図３（配列番号２）のアミノ酸残基１～３２１、もしくは図３（配列番号２）で示されるアミノ酸配列のアミノ酸１～Ｘ（ここで、Ｘは、アミノ酸２７１～２８０のいずれか一つである）を含む、単離されたＰＲＯＳ６２ポリペプチド；図２２（配列番号３１）のアミノ酸残基１～３１０、もしくは図２２（配列番号３１）で示されたアミノ酸配列のアミノ酸残基１～Ｘ（ここで、Ｘは、アミノ酸２３７～２４７のいずれか一つ）を含む、単離されたネイティブ配列ＰＲＯ１８６８ポリペプチド；および、配列番号９のアミノ酸１～３１２を含む、単離されたＰＲＯ２４５ポリペプチド。一つの実施形態において、この単離された抗体は、他のポリペプチドもしくはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、このポリペプチドに特異的に結合するか、またはこのポリペプチド上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態において、この抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、もしくは単鎖抗体である。

【００３７】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

（Ｉ．定義）

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

【００３８】

したがって、例えば、ＳＴＩｇＭＡとしては、以下を含むポリペプチドが挙げられる：配列番号２のアミノ酸１～３２１；配列番号２のアミノ酸１～Ｘ（ここで、Ｘは、アミノ酸２７１～２８０のいずれか）；配列番号２のアミノ酸２１～３２１；配列番号２のアミノ酸２１～Ｘ（ここで、Ｘは、アミノ酸２７１～２８０のいずれか）；配列番号３２のア

ミノ酸１～３９９；配列番号３２のアミノ酸２１～３９９；配列番号３３のアミノ酸１～３０５；配列番号３３のアミノ酸２１～３０５；配列番号３４のアミノ酸１～２８０；配列番号３４のアミノ酸２１～２８０；細胞外ドメイン、ならびに一部または全ての膜貫通ドメインが、欠失させられたかもしくは不活性化されている改変体。

【００３９】

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

【００４０】

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

【００４１】

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

【００４２】

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

【００４３】

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

【００４４】

「処置」とは、疾患の病理の発生を予防するかもしくは疾患の病理を変化させる意図で行われる介入である。したがって、「処置」とは、治療的処置と予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）もしくは予防的（ｐｒｅｖｅｎｔａｔｉｖｅ）手段との両方を指す。処置を必要とする人々としては、既に障害を有する人々およびその障害が予防されるべき人々が挙げられる。免疫関連疾患の処置において、治療剤は、免疫応答の構成要素の反応の大き

さを直接的に変化させ得るか、または疾患を、他の治療剤（例えば、抗生剤、抗菌剤、抗炎症剤、化学療法剤など）による処置に対してより感受性にさせ得る。

【００４５】

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

【００４６】

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

【００４７】

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

【００４８】

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

【００４９】

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

【００５０】

本明細書中で使用される場合、「成長阻害剤」とは、細胞（特に本明細書中で同定される任意の遺伝子を、インビトロもしくはインビボで発現もしくは過剰発現する癌細胞）の成長を阻害する化合物もしくは組成物を指す。したがって、成長阻害剤とは、Ｓ期にこのような遺伝子を発現もしくは過剰発現する細胞のパーセンテージを有意に減少させる薬剤である。成長阻害剤の例としては、細胞周期の進行を（Ｓ期以外で）ブロックする薬剤（例えば、Ｇ１期停止およびＭ期停止を誘導する薬剤）が挙げられる。古典的Ｍ期ブロッカーとしては、以下が挙げられる：ビンカアルカロイド（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキソール、およびトポＩＩインヒビター（例えば、ドキソルビシン、エピルビ

シン、ダウノルビシン、エトポシド、およびブレオマイシン）。Ｇ１を停止させるこれらの薬剤はまた、Ｓ期停止に及ぶ（例えば、ＤＮＡアルキル化剤（例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、５－フルオロウラシル、およびａｒａ－Ｃ））。さらなる情報は、Ｔｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ、ＭｅｎｄｅｌｓｏｈｎおよびＩｓｒａｅｌ（編）、第１章、Ｍｕｒａｋａｍｉら（ＷＢ Ｓａｕｎｄｅｒｓ、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、１９９５）による、表題「Ｃｅｌｌ ｃｙｃｌｅ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，ｏｎｃｏｇｅｎｅｓ，ａｎｄ ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ ｄｒｕｇｓ」（特に１３ページ）、に見出され得る。

【００５１】

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

【００５２】

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

【００５３】

「ネイティブ配列ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８」は、天然由来のＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８とそれぞれ同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。このようなネイティブ配列ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８は、自然から単離され得るかまたは組み換え法もしくは合成法によって作製され得る。用語「ネイティブ配列ＰＲＯ３０１」、「ネイティブ配列ＰＲＯ３６２」、「ネイティブ配列ＰＲＯ２４５」および「ネイティブ配列ＰＲＯ１８６８」は、天然に存在する、切断もしくは分泌された形態のＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８のそれぞれ（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然に存在する改変体形態（あるいは、スプライシングされた形態）、および天然に存在する対立遺伝子改変体のＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８のそれぞれ、を特異的に含む。

【００５４】
一つの実施形態において、ネイティブ配列ＰＲＯ３０１は、成熟または全長ネイティブ配列ＰＲＯ３０１であって、図２（配列番号１）のアミノ酸１～２９９を含む（これは、Ｎ末端シグナル配列を含むかまたは含まず、１位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約２３６位～約２５８位に潜在的膜貫通ドメインを含むかまたは含まず、約２５９位～約２９９位に細胞内ドメインを含むかまたは含まない）。
【００５５】
別の実施形態において、ネイティブ配列ＳＴＩｇＭＡポリペプチドは、成熟または全長ネイティブ配列ＰＲＯ３６２であって、図３（配列番号２）のアミノ酸１～３２１を含む（これは、Ｎ末端シグナル配列を含むかまたは含まず、１位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約２７６位～約３０６位に潜在的膜貫通ドメインのいずれかもしくは全てを含むかまたは含まず、約３０７位～約３２１位に細胞内ドメインを含むかまたは含まない）。さらなる実施形態において、ネイティブ配列ＳＴＩｇＭＡポリペプチドは、成熟または全長ポリペプチドであって、配列番号３２（ｈｕＳＴｉｇＭＡ）のアミノ酸１～３９９を含む（これは、Ｎ末端シグナル配列を含むかまたは含まず、１位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約２７７位～約３００位に膜貫通ドメインのいずれかもしくは全てを含むかまたは含まない）。なおさらなる実施形態において、ネイティブ配列ＳＴＩｇＭＡポリペプチドは、成熟または全長ポリペプチドであって、配列番号３３（ｈｕＳＴｉｇＭＡ　ｓｈｏｒｔ）のアミノ酸１～３０５を含む（これは、Ｎ末端シグナル配列を含むかまたは含まず、１位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約１８３位～約２０６位に膜貫通ドメインのいずれかもしくは全てを含むかまたは含まない）。異なる実施形態において、ネイティブ配列ＳＴＩｇＭＡポリペプチドは、成熟または全長ポリペプチドであって、配列番号３４（ｍｕＳＴｉｇＭＡ）のアミノ酸１～２８０を含む（これは、Ｎ末端シグナル配列を含むかまたは含まず、１位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約１８１位～約２０４位に膜貫通ドメインのいずれかもしくは全てを含むかまたは含まない）。
【００５６】
なお別の実施形態において、ネイティブ配列ＰＲＯ２４５ポリペプチドは、成熟または全長ネイティブ配列ＰＲＯ２４５ポリペプチドであって、図１１（配列番号９）のアミノ酸１～３１２を含む（これは、約１位～約３０位にＮ末端シグナル配列を含むかまたは含まず、１位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、潜在的膜貫通ドメインを含むかまたは含まず、細胞内ドメインを含むかまたは含まない）。
【００５７】
なお別の実施形態において、ネイティブ配列ＰＲＯ１８６８ポリペプチドは、成熟または全長ネイティブ配列ＰＲＯ１８６８ポリペプチドであって、図２２（配列番号３１）のアミノ酸１～３１０を含む（これは、Ｎ末端シグナル配列を含むかまたは含まず、１位に開始メチオニンを含むかまたは含まず、約２４２位～約２６６位に潜在的膜貫通ドメインを含むかまたは含まず、約２６７位～約３１０位に細胞内ドメインを含むかまたは含まない）。
【００５８】
「ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２（ＳＴＩｇＭＡ）、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８細胞外ドメイン」、または「ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８　ＥＣＤ」とは、それぞれ、ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２（ＳＴＩｇＭＡ）ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲＯ１８６８ポリペプチドの形態を指す。この形態は、本質的に、それぞれの全長分子の膜貫通ドメインおよび細胞質内ドメインを含まない。通常、ＰＲＯ３０１　ＥＣＤ、ＰＲＯ３６２（ＳＴＩｇＭＡ）ＥＣＤ、ＰＲＯ２４５　ＥＣＤもしくはＰＲＯ１８６８　ＥＣＤは、このような膜貫通ドメインおよび／もしくは細胞質内ドメインを１％以上有さず、そして好ましくは、このようなドメインを０．５％以上有さない。
【００５９】
必要に応じて、ＰＲＯ３０１ポリペプチドＥＣＤは、アミノ酸残基１もしくは約２８～

Ｘを含む（ここで、Ｘは、図２（配列番号１）のアミノ酸２３１～アミノ酸２４１に由来する任意のアミノ酸である）。

【００６０】

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

【００６１】

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

【００６２】

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

【００６３】

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

【００６４】

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

【００６５】

「ＰＲＯ２４５改変体」とは、後述で定義されるような活性ＰＲＯ２４５を意味し、以下に対して少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する：（ａ）ＰＲＯ２４５ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子（ここで、そのネイティブシグナル配列を含むかもしくは含まず、開始メチオニンを含むかもしくは含まず、潜在的膜貫通ドメインを含むかもしくは含まず、そして細胞内ドメインを含むかもしくは含まない）、または（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補体。特定の実施形態において、ＰＲＯ２４５改変体は、全長ネイティブ配列ＰＲＯ２４５に関して図１（配列番号９）に示される推定アミノ酸配列を有するＰＲＯ２４５と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列相同性を有する。このようなＰＲＯ２４５改変体としては、例えば、配列番号９の配列のＮ末端もしくはＣ末端において一つ以上のアミノ酸残基が付加されるかもしくは欠失させられたＰＲＯ２４５ポリペプチドが挙げ

られる。好ましくは、この核酸もしくはアミノ酸配列同一性は、少なくとも約８５％、より好ましくは少なくとも約９０％、そしてなおより好ましくは少なくとも約９５％である。

【００６６】

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

【００６７】

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

【００６８】

「ＰＲＯ１８６８改変体」とは、後述で定義されるような活性ＰＲＯ１８６８ポリペプチドを意味し、以下に対して少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する：（ａ）ＰＲＯ１８６８ポリペプチドをコードするＤＮＡ分子（ここで、そのネイティブシグナル配列を含むかもしくは含まず、開始メチオニンを含むかもしくは含まず、潜在的膜貫通ドメインを含むかもしくは含まず、そして細胞内ドメインを含むかもしくは含まない）、または（ｂ）（ａ）のＤＮＡ分子の相補体。特定の実施形態において、ＰＲ１８６８改変体は、全長ネイティブ配列ＰＲＯ１８６８ポリペプチドをコードする配列番号３１の推定アミノ酸配列を有するＰＲＯ１８６８ポリペプチドと、少なくとも約８０％のアミノ酸配列相同性を有する。このようなＰＲＯ１８６８ポリペプチド改変体としては、例えば、配列番号３１の配列のＮ末端もしくはＣ末端において、一つ以上のアミノ酸残基が付加される

かもしくは欠失させられた、ＰＲＯ１８６８ポリペプチドが挙げられる。通常、ＰＲＯ１８６８ポリペプチド改変体は、配列番号３１のアミノ酸配列と、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、好ましくは、少なくとも約８５％のアミノ酸配列同一性、より好ましくは、少なくとも約９０％のアミノ酸配列同一性、そしてなおより好ましくは、少なくとも約９５％のアミノ酸配列同一性を有する。

【００６９】

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

【００７０】

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

【００７１】

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

【００７２】

「単離された」ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２（ＳＴＩｇＭＡ）ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲＯ１８６８ポリペプチドをコードする核酸分子とは、ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２（ＳＴＩｇＭＡ）ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲＯ１８６８ポリペプチドをコードする核酸の天然供給源に通常関連する、少なくとも一つの夾雑核酸分子から同定および分離された核酸分子である。単離されたＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２（ＳＴＩｇＭＡ）ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲＯ１８６８ポリペプチドをコードする核酸分子は、天然に見出される形態もしくは環境とは異なる。したがって、単離されたＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲ

Ｏ１８６８ポリペプチドをコードする核酸分子は、天然の細胞に存在するようなＤＮＡ４０６２８、ＤＮＡ４５４１６、ＤＮＡ３５６３８もしくはＤＮＡ７７６２４核酸分子のそれぞれから区別される。しかし、単離されたＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲＯ１８６８ポリペプチドをコードする核酸分子は、ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲＯ１８６８ポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲＯ１８６８ポリペプチドをコードする核酸分子を含む（例えば、この核酸分子は、天然の細胞の染色体位置とは異なる染色体位置にある）。

【００７３】

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

【００７４】

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

【００７５】

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

【００７６】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして一般的に、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存する経験的な算出である。一般に。より長いプローブは、適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、一方、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がそれらの融解温度以下の環境に存在する場合に、変性したＤＮＡが再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望される相同性の程度がより高い場合、より高い相対温度が使用され得る。結果として、このことは、より高い相対温度が反応条件をよりストリンジェントにさせ、一方より低い温度が反応条件をよりストリンジェントでなくすることにつながる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーについてのさらなる詳細および説明に関しては、Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉ

ｏｌｏｇｙ、Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、（１９９５）を参照のこと。

【００７７】

本明細書中で定義される、「ストリンジェント条件」もしくは「高ストリンジェンシー条件」は、以下によって同定され得る：（１）洗浄のための低イオン強度および高温の利用（例えば、０．０１５Ｍ塩化ナトリウム／０．００１５Ｍクエン酸ナトリウム／０．１％硫酸ドデシルナトリウム、５０℃）；（２）ハイブリダイゼーション中での変性剤の利用（例えば、７５０ｍＭ塩化ナトリウム、７５ｍＭクエン酸ナトリウムを含むホルムアミド（例えば、０．１％ウシ血清アルブミン／０．１％Ｆｉｃｏｌｌ／０．１％ポリビニルピロリドン／５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液含有５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミド、ｐＨ６．５）、４２℃）；または（３）５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０７５Ｍクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ溶液、超音波処理されたサケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳ、および１０％硫酸デキストランの４２℃での利用、ならびに４２℃での０．２×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）および５５℃での５０％ホルムアミド中、続いて高ストリンジェンシー洗浄条件（ＥＤＴＡ含有０．１×ＳＳＣ、５５℃からなる）による洗浄。

【００７８】

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

【００７９】

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

【００８０】

本発明のポリペプチドの改変体に関する「活性な」もしくは「活性」とは、本発明のネイティブポリペプチドもしくは天然に存在するポリペプチドの生物学的および／または免疫学的活性を保持する、本発明のタンパク質の形態を指す。

【００８１】

本明細書中で開示されたスクリーニングアッセイによって同定され得る抗体、ポリペプチド分子もしくは別の分子（例えば、有機もしくは無機低分子、ペプチドなど）に関する「生物学的活性」とは、部分的に、このような分子の、炎症性細胞の組織への浸潤を変化させる能力、Ｔ細胞増殖を変化させる能力、および細胞によるリンフォカイン放出を変化させる能力を指す。別の好ましい活性は、血管透過性への影響である。

【００８２】

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

【００８３】

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

【００８４】

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

【００８５】

「ネイティブ抗体」および「ネイティブ免疫グロブリン」は、通常、２つの同一な軽（Ｌ）鎖および２つの同一な重（Ｈ）鎖からなる、約１５０、０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、一つの共有ジスルフィド結合（ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ ｂｏｎｄ）によって重鎖に結合し、一方ジスルフィド連結（ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ ｌｉｎｋａｇｅ）の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で異なる。各重鎖および軽鎖は、規則正しく間隔を空けた鎖内のジスルフィド架橋（ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ ｂｒｉｄｇｅ）をまた有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン（$Ｖ_{Ｈ}$）を有し、これに多くの定常ドメインが続く。各軽鎖は、一端に可変ドメイン（$Ｖ_{Ｌ}$）を有し、そのもう一方の端に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一の定常ドメインに並び、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインに並ぶ。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている。

【００８６】

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

【００８７】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部を、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域もしくは可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Ｆａｂ、Ｆａ

ｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖフラグメント；ジアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）；直鎖抗体（Ｚａｐａｔａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７－１０６２［１９９５］）；単鎖抗体分子；および、抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体、が挙げられる。

【００８８】

抗体のパパイン消化は、２つの同一な抗原結合フラグメント（「Ｆａｂ」フラグメントと呼ばれる）を生成する。各々は、単一の抗原結合部位、および残りの「Ｆｃ」フラグメントを有する。名称「Ｆｃ」は、容易に結晶化する能力を反映する。ペプシン処理は、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントをもたらす。これは２つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋し得る。

【００８９】

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

【００９０】

Ｆａｂフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常ドメイン（ＣＨ１）を含む。Ｆａｂ’フラグメントは、重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域由来の一つ以上のシステインを含むいくつかの残基を付加することによって、Ｆａｂフラグメントと異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を生成するＦａｂ’についての、本明細書中での名称である。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体フラグメントは、本来、Ｆａｂ’フラグメントの対であって、その対の間にヒンジシステインを有するフラグメントとして産生された。抗体フラグメントの他の化学結合もまた、公知である。

【００９１】

任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる２つの明らかに異なるの型の一つに割当てられ得る。

【００９２】

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

【００９３】

本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体集団（すなわち、その集団を構成する個別の抗体は、少量で存在し得る、天然に起こり得る突然変異を除いて、同一である）から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して指向する。さらに、代表的に、異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を含む、従来の（ポリクローナル）抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらがハイブリドーマ培養物によって合成され、他の免疫グロブリンにより汚染されないことにおいて、有利である。修飾語句「モノクローナル」とは、実質的に均一な抗体集団から得られるものとして、抗体の特性を示し、そして任意の特定の方法による抗体産生を必要とするものとして解釈されない

。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ、２５６：４９５［１９７５］によって最初に記載された、ハイブリドーマ法によって作製され得るか、または組み換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４、８１６、５６７号を参照のこと）によって作製され得る。「モノクローナル抗体」はまた、Ｃｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３５２：６２４－６２８［１９９１］、およびＭａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ：Ｂｉｏｌ．、２２２：５８１－５９７（１９９１）に記載された技術を用いて、ファージ抗体ライブラリから単離され得る（例えば、米国特許第５，７５０，３７３号、同第５，５７１，６９８号、同第５，４０３，４８４号、および同第５，２２３，０９号もまた参照のこと、これらは、ファージミドおよびファージベクターを用いた抗体の調製を記載する）。

【００９４】

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

【００９５】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最低限の配列を含む、キメラ免疫グロブリン、キメラ免疫グロブリン鎖、またはそれらのフラグメント（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、もしくは抗体の、他の抗原結合下位配列）である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、このヒト化抗体では、レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）由来のいくつかもしくは全ての残基は、非ヒト種（ドナー抗体；例えば、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットもしくはウサギ）のＣＤＲ由来の残基によって置換される。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンの特定のＦｖフレームワーク領域（ＦＲ）の残基は、対応する非ヒト残基によって置換され得る。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも取り込まれたＣＤＲもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含み得る。これらの修飾がなされて、抗体の性能をさらに純化および最大化する。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、および代表的に２つの可変ドメインの実質的に全てを含み、その中で、全てもしくは実質的に全てのＣＤＲ領域が、非ヒト免疫グロブリンのＣＤＲ領域に対応し、そして全てもしくは実質的に全てのＦＲ領域が、ヒト免疫グロブリン配列のＦＲ領域である。ヒト化抗体は、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）（代表的に、ヒト免疫グロブリンの定常領域）の少なくとも一部をまた含む。詳細については、Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ、３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｅｉｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３３２：３２３－３２９［１９８８］；およびＰｒｅｓｔａ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．、２：５９３－５９６（１９９２）を参照のこと。ヒト化抗体は、「霊長類化（ｐｒｉｍａｔｉｚｅｄ）」抗体を含む。この抗体の抗原結合領域は、目的の抗原によって免疫化されたマカクザルによって産生された抗体に由来する。旧世界ザル由来の残基を含む抗体もまた、本発明の範囲内であり得る。例えば、米国特許第５，６５８，５７０号；同第５，６９３，７８０号；同第５，６８１，７２２号；同第５，７５０，１０５号；および同第５，７５６，０９６号を参照のこと。

【００９６】

「単鎖Ｆｖ」もしくは「ｓＦｖ」抗体フラグメントは、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含む。ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、Ｆｖポリペプチドは、V_HドメインとV_Lドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このリンカーは、ｓＦｖに抗原結合のために望ましい構造を形成させ得る。ｓ

Ｆｖの総説については、Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ
Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、ｖｏｌ．１１３、ＲｏｓｅｎｂｕｒｇおよびＭｏｏｒｅ（編）、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、２６９～３１５ページ（１９９４）のＰｌｕｃｋｔｈｕｎを参照のこと。

【００９７】

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

【００９８】

「単離された」ポリペプチド（単離された抗体を含む）は、その天然環境の成分から同定されて、分離および／または回収されたポリペプチドである。その天然環境の夾雑成分は、その抗体の診断もしくは治療用途を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性もしくは非タンパク質性溶質を含み得る。好ましい実施形態において、ポリペプチドは、（１）ローリー法によって決定される場合、その化合物の９５重量％を超えるまで、最も好ましくは９９重量％を超えるまで、（２）スピニングカップシークエネーター（ｓｐｉｎｎｉｎｇ　ｃｕｐ　ｓｅｑｕｅｎａｔｏｒ）の使用によって少なくとも１５残基のＮ－末端もしくは内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで、または（３）クーマシーブルー染色もしくは、好ましくは銀染色を用いた還元もしくは非還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによる均一性まで、精製される。単離された化合物、例えば、抗体もしくは他のポリペプチドは、組み換え細胞内におけるインサイチュでのこの化合物を含む。なぜなら、この化合物の天然環境での少なくとも一つの成分は存在しないからである。しかし通常、単離された化合物は、少なくとも一つの精製工程によって調製される。

【００９９】

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

【０１００】

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

【０１０１】

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

【０１０２】

本明細書中で使用される場合、用語「イムノアドヘシン」とは、異種タンパク質の結合

特異性（「アドヘシン」）と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを組み合わせた、抗体様分子を指す。構造的に、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識部位および抗原結合部位以外（すなわち、「異種」）の、所望の結合特異性を有するアミノ酸配列と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部は、代表的に、少なくともレセプターもしくはリガンドの結合部位を含む、近接するアミノ酸配列である。イムノアドヘシン中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン（例えば、ＩｇＧ－１、ＩｇＧ－２、ＩｇＧ－３もしくはＩｇＧ－４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ－１およびＩｇＡ－２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ、またはＩｇＭ）から得られ得る。

【０１０３】

（ＩＩ．本発明の組成物および方法）

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

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

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

【０１０４】

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

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

【０１０５】

本明細書中で記載される、ネイティブ全長配列ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の改変、またはＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の種々のドメインの改変は、例えば、保存的および非保存的突然変異のための任意の技術および指針（例えば、米国特許第５，３６４，９３４号に示される）を用いて作製され得る。改変は、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８をコードする一つ以上のコドンの置換、欠失もしくは挿入であり得、結果として、ネイティブ配列ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８と比較して、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８のアミノ酸配列の変化をもたらす。必要に応じて、この改変は、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の一つ以上のドメインにおける、少なくとも

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

【０１０６】

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

【０１０７】

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

【０１０８】

（３．ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の改変）

ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の共有結合改変は、この発明の範囲に含まれる。共有結合改変の一つの型は、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の標的されたアミノ酸残基と、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の選択された側鎖またはＮ末端残基もしくはＣ末端残基と反応し得る有機誘導体化剤（ｄｅｒｉｖａｔｉｚｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）とを反応させることを含む。二機能性の薬剤による誘導体化が有用である（例えば、抗ＰＲＯ３０１抗体、抗ＰＲＯ３６２抗体、抗ＰＲＯ２４５抗体もしくは抗ＰＲＯ１８６８抗体それぞれを精製するための方法で使用するための水不溶性の支持マトリックスまたは表面にＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８を架橋するため、およびその逆のため）。一般的に使用される架橋剤としては、例えば、１，１－ビス（ジアゾアセチル）－２－フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（例えば、４－アジドサリチル酸を含むエステル）、ホモ二官能性イミドエステル（３，３’－ジチオビス（スクシンイミジルピロピオネート）のようなジスクシンイミジルエステルを含む）、ビス－Ｎ－マレイミド－１，８－オクタンのような二官

能性マレイミド、およびメチル－３－［（ｐ－アジドフェニル）ジチオ］プロピオイミデートのような薬剤、が挙げられる。

【０１０９】

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

【０１１０】

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

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

【０１１１】

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

【０１１２】

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

【０１１３】

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

【０１１４】
ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の共有結合修飾の別の型は、ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドもしくはＰＲＯ１８６８ポリペプチドを種々の非タンパク質性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、もしくはポリオキシアルキレン）の一つに、例えば、米国特許第４，６４０，８３５号；同第４，４９６，６８９号；同第４，３０１，１４４号；同第４，６７０，４１７号；同第４，７９１，１９２号、または同第４，１７９，３３７号に示された様式で結合することを含む。
【０１１５】
本発明のＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８はまた、別の、異種ポリペプチドもしくはアミノ酸配列に融合されたＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８を含むキメラ分子を形成するように改変され得る。一つの実施形態において、このようなキメラ分子は、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８と、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合物を含む。エピトープタグは、一般的に、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８のアミノ末端もしくはカルボキシル末端に配置される。このようなＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８のエピトープタグ化形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出され得る。また、エピトープタグの供給は、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８を、抗タグ抗体もしくはエピトープタグに結合する別の型のアフィニティーマトリックスを用いたアフィニティー精製によって、容易に精製させ得る。代替の実施形態において、キメラ分子は、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８と免疫グロブリンもしくは免疫グロブリンの特定の領域との融合物を含み得る。キメラ分子の二価形態については、このような融合物は、ＩｇＧ分子のＦｃ領域に対してであり得る。
【０１１６】
種々のタグポリペプチドおよびそれらのそれぞれの抗体は、当該分野で周知である。例としては、ポリ－ヒスチジン（ポリ－ｈｉｓ）タグもしくはポリ－ヒスチジン－グリシン（ポリ－ｈｉｓ－ｇｌｙ）タグ；ｆｌｕ　ＨＡタグポリペプチドおよびその抗体１２ＣＡ５［Ｆｉｅｌｄら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．、８：２１５９－２１６５（１９８８）］；ｃ－ｍｙｃタグおよびそれらに対する８Ｆ９抗体、３Ｃ７抗体、６Ｅ１０抗体、Ｇ４抗体、Ｂ７抗体および９Ｅ１０抗体［Ｅｖａｎら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、５：３６１０－３６１６（１９８５）］；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグおよびその抗体［Ｐａｂｏｒｓｋｙら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、３（６）：５４７－５５３（１９９０）］が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、Ｆｌａｇ－ペプチド［Ｈｏｐｐら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、６：１２０４－１２１０（１９８８）］；ＫＴ３エピトープペプチド［Ｍａｒｔｉｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５５：１９２－１９４（１９９２）］；α－チューブリンエピトープペプチド［Ｓｋｉｎｎｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６６：１５１６３－１５１６６（１９９１）］；およびＴ７遺伝子１０タンパク質ペプチドタグ［Ｌｕｔｚ－Ｆｒｅｙｅｒｍｕｔｈら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８７：６３９３－６３９７（１９９０）］が挙げられる。
【０１１７】
（４．ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の生成および単離）
以下の記述は、ＰＲＯ３０１核酸、ＰＲＯ３６２核酸、ＰＲＯ２４５核酸もしくはＰＲＯ１８６８核酸を含むベクターによって形質転換されたかもしくはトランスフェクトされた細胞を培養することによる、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の生成に主に関連する。もちろん、当該分野で周知の代替法が利用されて、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８を調製し得ることが考

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

【０１１８】

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

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

【０１１９】

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

【０１２０】

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

【０１２１】

このようなライブラリスクリーニング法で同定される配列は、公共のデータベース（例えば、ＧｅｎＢａｎｋもしくは他の私有の配列データベース）に保存されかつ利用可能な他の公知の配列と比較され、整列化され得る。この分子の規定の領域内もしくは全長配列

にわたる配列同一性（アミノ酸レベルもしくはヌクレオチドレベルのいずれか）は、配列アラインメントを通して、相同性を測定するための種々のアルゴリズムを利用するコンピュータソフトウェアプログラム（例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、ＤＮＡｓｔａｒ、およびＩＮＨＥＲＩＴ）を用いて決定され得る。

【０１２２】

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

【０１２３】

（ｂ．宿主細胞の選択および形質転換）

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

【０１２４】

トランスフェクションの方法は、当業者に公知である。例えば、$CaPO_4$および電気穿孔法である。使用される宿主細胞に依存して、形質転換は、このような細胞に適切な標準技術を用いて行われる。Ｓａｍｂｒｏｏｋら（上記）に記載されるような塩化カルシウムを用いたカルシウム処理、または電気穿孔法は、原核生物細胞もしくは実質的な細胞壁障壁を含む他の細胞に一般的に使用される。Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓによる感染は、Ｓｈａｗら、Ｇｅｎｅ、２３：３１５（１９８３）、および１９８９年６月２９日公開のＷＯ８９／０５８５９によって記載されるように、特定の植物細胞の形質転換に使用される。このような細胞壁のない哺乳動物細胞については、Ｇｒａｈａｍおよびｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、５２：４５６－４５７（１９７８）のリン酸カルシウム沈殿法が利用され得る。哺乳動物細胞宿主システム形質転換の一般的な局面は、米国特許第４，３９９，２１６号に記載されている。酵母への形質転換は、代表的に、Ｖａｎ Ｓｏｌｉｎｇｅｎら、Ｊ．Ｂａｃｔ、１３０：９４６（１９７７）およびＨｓｉａｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）、７６：３８２９（１９７９）の方法に従って実行される。しかし、ＤＮＡを細胞に導入するための他の方法、例えば、核への微量注入、電気穿孔法、インタクト細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリカチオン（例えば、ポリブレン、ポリオルニチン）もまた使用され得る。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Ｋｅｏｗｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１８５：５２７－５３７（１９９０）およびＭａｎｓｏｕｒら、Ｎａｔｕｒｅ、３３６：３４８－３５２（１９８８）を参照のこと。

【０１２５】

本明細書中において、ベクター中でＤＮＡをクローニングもしくは発現させるのに適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母もしくはより高等な真核生物細胞が挙げられる。適切な原核生物としては、限定ではないが、グラム陰性生物もしくはグラム陽性生物のような真正細菌（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉのような腸内細菌科）が挙げられる。種々のＥ．ｃｏｌｉ株が、公的に入手可能である。例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｋ１２株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ ３１，４４６）；Ｅ．ｃｏｌｉ Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ ３１，５３７）；Ｅ．ｃｏｌｉ株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ ２７，３２５）およびＫ５ ７７２（ＡＴＣＣ ５３，６

３５）である。

【０１２６】

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

【０１２７】

グリコシル化されたＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の発現のための適切な宿主細胞は、多細胞生物体に由来する。無脊椎細胞の例としては、昆虫細胞（例えば、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ｓ２およびＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ Ｓｆ９）、ならびに植物細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞およびＣＯＳ細胞が挙げられる。より具体的な例としては、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１細胞（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ ＣＲＬ１６５１）；ヒト胚性腎細胞（２９３細胞もしくは浮遊培養での増殖のためのサブクローニングされた２９３細胞、Ｇｒａｈａｍら、Ｊ．Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．、３６：５９（１９７７））；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、ＵｒｌａｕｂおよびＣｈａｓｉｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７：４２１６（１９８０））；マウスセルトーリ細胞（ＴＭ４、Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．，２３：２４３－２５１（１９８０））；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ ＣＣＬ７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ Ｇ２，ＨＢ ８０６５）；およびマウス乳腺腫瘍細胞（ＭＭＴ ０６０５６２，ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１）が挙げられる。適切な宿主細胞の選択は、当該分野の技術の範囲内であると判断される。

【０１２８】

（ｃ．複製可能なベクターの選択と使用）

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

【０１２９】

ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８は、直接的にだけでなく、異種ポリペプチド（成熟タンパク質もしくは成熟ポリペプチドのＮ末端に特異的切断部位を有するシグナル配列もしくは他のポリペプチドであり得る）との融合ポリペプチドとしても、組み換えで生成され得る。一般的に、シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはこれは、ベクターに挿入されるＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８ ＤＮＡの一部であり得る。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、ｌｐｐ、または熱安定性エンテロトキシンＩＩリーダーの群から選択された、原核生物のシグナル配列であり得る。酵母分泌のため、シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、α因子リーダー（ＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓおよびＫｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ”－因子リーダーを含む、後者は、米国特許第５，０１０，１８２号に記載される）、または酸性ホスファターゼリーダー、Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ グルコアミラーゼリーダー（１９９０年４月４日公開のＥＰ３６２，１７９）、または１９９０年１１月１５日公開のＷＯ９０／１３６４６に記載されたシグナルであり得る。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列は、タンパク質の分泌を導くために使用され得る（例えば、同じもしくは近縁の種の分泌ポリペプチドからの

シグナル配列、およびウイルス分泌リーダー）。

【０１３０】

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

【０１３１】

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

【０１３２】

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

【０１３３】

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

【０１３４】

酵母宿主とともに使用するのに適切なプロモーター配列の例としては、３－ホスホグリセレートキナーゼに関するプロモーター［Ｈｉｔｚｅｍａｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２５５：２０７３（１９８０）］または他の解糖酵素［Ｈｅｓｓら、Ｊ．Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｅ Ｒｅｇ．、７：１４９（１９６８）；Ｈｏｌｌａｎｄ、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、１７：４９００（１９７８）］（例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフル

クトキナーゼ、グルコース－６－リン酸イソメラーゼ、３－ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼ）が挙げられる。

【０１３５】

他の酵母プロモーターは、増殖条件によって制御される転写についてのさらなる利点を有する誘導性プロモーターであり、アルコール脱水素酵素２、イソチトクロムＣ、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素に関するプロモーター領域である。酵母発現で使用されるのに適切なベクターおよびプロモーターは、ＥＰ７３，６５７にさらに記載される。

【０１３６】

哺乳動物宿主細胞における、ベクターからのＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８の転写は、例えば、ウイルス（例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス（１９８９年７月５日公開のＵＫ２，２１１，５０４）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス２）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、およびシミアンウイルス４０（ＳＶ４０））のゲノムから得られたプロモーター、異種哺乳動物プロモーター（例えば、アクチンプロモーターもしくは免疫グロブリンプロモーター）から得られたプロモーター、ならびに熱ショックプロモーターから得られたプロモーターによって制御される。提供されるこのようなプロモーターは、宿主細胞システムに適合する。

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

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

（ｄ．遺伝子増幅／発現の検出）

遺伝子増幅および／または発現は、サンプル中で直接的に（例えば、ｍＲＮＡの転写を定量するための、従来のサザンブロッティング、ノザンブロッティング［Ｔｈｏｍａｓ、

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

【０１４０】

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

【０１４１】

（ｅ．ポリペプチドの精製）

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

【０１４２】

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

【０１４３】

（ｆ．細胞相互作用の検出）

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

【０１４４】

（１）フローサイトメトリー／ＦＡＣＳ分析）

ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５もしくはＰＲＯ１８６８間での、特定の細

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

【０１４５】

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

【０１４６】

（２）免疫共沈降）

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

【０１４７】

（５．組織分布）

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

【０１４８】

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

【０１４９】

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

イティブ配列に対してか、または本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡ配列に基づく合成ペプチドに対してか、または本発明のポリペプチドをコードするＤＮＡに融合され、かつ特異的抗体エピトープをコードする外来性配列に対して、調製され得る。抗体を産生するための一般的技術、およびノザンブロッティングおよびインサイチュハイブリダイゼーションのための特定のプロトコールは、以下に提供される。

【０１５０】

（６．抗体結合研究）

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

【０１５１】

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

【０１５２】

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

【０１５３】

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

【０１５４】

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

【０１５５】

（７．細胞ベースのアッセイ）

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

【０１５６】

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

するために使用され得る。本明細書中で同定される遺伝子のコード配列でトランスフェクトされた細胞は、免疫関連疾患の処置に関する薬物の候補を同定するために、さらに使用され得る。

【０１５７】

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

【０１５８】

一つの適切な細胞ベースアッセイは、混合リンパ球反応（mixed lymphocyte reaction；MLR）である（Current Protocols in Immunology、unit3.12；J E Coligan、A M Kruisbeek、D H Marglies、E M Shevach、W Strober編集、National Institutes of Health、John Wiley&Sons、Incにより出版）。このアッセイでは、試験化合物の、活性化Ｔ細胞の増殖を刺激する能力が、アッセイされる。応答（responder）Ｔ細胞の懸濁液が、同種異系刺激性細胞とともに培養され、Ｔ細胞の増殖が、トリチウムチミジンの取り込みによって測定される。このアッセイは、Ｔ細胞反応性の一般的な測定法である。大多数のＴ細胞は活性化状態で反応してＩＬ－２を産生するため、このアッセイにおける応答性の違いは、反応する細胞によるＩＬ－２産生の違いを部分的に反映する。ＭＬＲの結果は、標準的リンフォカイン（ＩＬ－２）検出アッセイによって検証され得る。Current Protocols in Immunology（上記）、３．１５、６．３。

【０１５９】

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

【０１６０】

例えばＭＬＲアッセイによって決定されるような、Ｔ細胞増殖の刺激物質（同時刺激物質）である本発明のポリペプチドおよび本発明の他の化合物は、免疫関連疾患（乏しい、最適以下の、または不適切な免疫機能によって特徴付けられる）の処置に有用である。これらの疾患は、Ｔ細胞（およびＴ細胞介在性免疫）の増殖および活性を刺激すること、および刺激性化合物（例えば、本発明の刺激性ポリペプチド）の投与を通じて哺乳動物における免疫応答を増強することによって処置される。刺激性ポリペプチドは、ＰＲＯ３０１

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

【０１６１】

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

【０１６２】

（８．動物モデル）

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

【０１６３】

接触過敏症は、細胞介在性免疫機能の単純なインビボアッセイである。この手順では、表皮細胞が、遅延型過敏反応を引き起こす外来性ハプテンに曝され、この遅延型過敏反応が測定および定量される。接触過敏症は、初期感作期（ｉｎｉｔｉａｌ　ｓｅｎｓｉｔｉｚｉｎｇ　ｐｈａｓｅ）、続いて誘発期（ｅｌｉｃｉｔａｔｉｏｎ　ｐｈａｓｅ）に関与する。この誘発期は、表皮細胞が、以前に接触した抗原に接触する場合に生じる。腫脹および炎症が生じ、これは、ヒトアレルギー性接触皮膚炎ン優れたモデルとなる。適切な手順は、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（編）Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｏｇａｎ、Ａ．Ｍ．Ｋｒｕｉｓｂｅｅｋ、Ｄ．Ｈ．Ｍａｒｇｕｌｉｅｓ、Ｅ．Ｍ　ＳｈｅｖａｃｈおよびＷ．Ｓｔｒｏｂｅｒ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｉｎｃ．、１９９４、ｕｎｉｔ４．２に詳細に記載される。Ｇｒａｂｂｅ、Ｓ．およびＳｃｈｗａｒｚ、Ｔ、Ｉｍｍｕｎ．Ｔｏｄａｙ　１９（１）：３７－４４（１９９８）もまた参照

のこと。

【０１６４】

対宿主性移植片病は、免疫抑制されたかまたは免疫寛容の患者に免疫応答性細胞が移植された場合に生じる。ドナー細胞は、宿主抗原を認識し、それに応答する。この応答は、生命を脅かす重篤な炎症から下痢および体重減少という軽度な場合まで変動し得る。対宿主性移植片病モデルは、ＭＨＣ抗原および少数の移植片抗原に対するＴ細胞の反応性を評価する手段を提供する。適切な手順は、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（上記）ｕｎｉｔ４．３に詳細に記載される。

【０１６５】

皮膚の同種移植拒絶の動物モデルは、Ｔ細胞の、インビボでの組織破壊を媒介する能力を試験する手段であり、抗ウイルスおよび腫瘍免疫におけるそれらの役割を示す、その測定法である。最も一般的かつ認められたモデルは、マウスの尾の皮膚の移植片を使用する。度重なる実験は、皮膚の同種移植片拒絶が、Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞およびキラー効果器Ｔ細胞によって媒介され、抗体によって媒介されないことを示した。Ａｕｃｈｉｎｃｌｏｓｓ、Ｈ．Ｊｒ．およびＳａｃｈｓ、Ｄ．Ｈ．、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（第二版）、Ｗ．Ｅ．Ｐａｕｌ編、Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ、１９８９、８８９－９９２。適切な手順は、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（上記）ｕｎｉｔ４．４に詳細に記載される。本発明の化合物を試験するために使用され得る他の移植拒絶モデルは、Ｔａｎａｂｅ、Ｍ．ら、Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ（１９９４）５８：２３およびＴｉｎｕｂｕ、Ｓ．Ａ．ら、７：Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９９４）４３３０－４３３８によって記載される同種異系心臓移植モデルである。

【０１６６】

遅延型過敏症の動物モデルはまた、細胞介在性免疫機能のアッセイを提供する。遅延型過敏反応は、Ｔ細胞介在性のインビボ免疫応答であり、抗原による惹起の後、所定の時間が経過するまでピークに達しない炎症によって特徴付けられる。これらの反応はまた、組織特異的自己免疫性疾患（例えば、多発性硬化症（ＭＳ）および実験的自己免疫性脳脊髄炎（ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ ｅｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｅｌｉｔｉｓ；ＥＡＥ、ＭＳのモデル）を引き起こす。適切な手順は、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（上記）ｕｎｉｔ４．５に詳細に記載される。

【０１６７】

ＥＡＥは、Ｔ細胞および単核細胞性の炎症、およびその後の中枢神経系における軸索の脱髄化によって特徴付けられる、Ｔ細胞介在性自己免疫疾患である。ＥＡＥは、一般的に、ヒトのＭＳに関係する動物モデルと考えられる。Ｂｏｌｔｏｎ、Ｃ．、Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｓｃｌｅｒｏｓｉｓ（１９９５）１：１４３。急性モデルおよび再発性－寛解化（ｒｅｌａｐｓｉｎｇ－ｒｅｍｉｔｔｉｎｇ）モデルの両方が、開発されてきた。本発明の化合物は、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（上記）ｕｎｉｔｓ１５．１および１５．２に記載されるプロトコールを用いて、免疫介在性脱髄疾患に対するＴ細胞刺激活性もしくはＴ細胞阻害性活性について試験され得る。ミエリン疾患に関するモデル（このモデルでは、Ｄｕｎｃａｎ、Ｉ．Ｄ．ら、Ｍｏｌｅｃ．Ｍｅｄ．Ｔｏｄａｙ（１９９７）５５４－５６１に記載されるように、中枢神経系に希突起神経膠細胞もしくはシュワン細胞が移植される）もまた参照のこと。

【０１６８】

関節炎に関する動物モデルは、コラーゲン誘発性関節炎である。このモデルは、ヒト自己免疫性慢性関節リウマチの臨床的、組織学的、および免疫学的特性を共有し、ヒト自己免疫性関節炎の容認できるモデルである。マウスおよびラットのモデルは、滑膜炎、軟骨性骨および助軟骨下の骨のびらんによって特徴付けられる。本発明の化合物は、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（上記）ｕｎｉｔｓ１５．５に記載されたプロトコールを用いて、自己免疫性関節炎に対する活性に関して試験され得

る。Ｉｓｓｅｋｕｔｚ、Ａ．Ｃ．ら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９９６）８８：５６９に記載される、ＣＤ１８およびＶＬＡ－４インテグリンに対するモノクローナル抗体を用いたモデルもまた参照のこと。

【０１６９】

喘息のモデルが、記載されており、ここでは、動物をオボアルブミンに感作し、次いでエアロゾルによって送達される同じタンパク質でその動物を惹起することによって、抗原－誘発性の気道の過剰反応、肺の好酸球増加および炎症が、誘発される。いくつかの動物モデル（モルモット、ラット、非ヒト霊長類）が、エアロゾル抗原による惹起でヒトのアトピー性喘息と同様の症状を示す。マウスモデルは、ヒト喘息の特徴の多くを有する。喘息の処置における活性および有効性について本発明の化合物を試験するための適切な手順は、Ｗｏｌｙｎｉｅｃ、Ｗ．Ｗ．ら、Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９８）１８：７７７およびそこで引用される参考文献によって記載される。

【０１７０】

加えて、本発明の化合物が、乾癬様疾患についての動物モデルにおいて試験され得る。証拠は、乾癬に対するＴ細胞の病原性を示唆する。本発明の化合物は、Ｓｃｈｏｎ、Ｍ．Ｐ．ら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．（１９９７）３：１８３によって記載されるｓｃｉｄ／ｓｃｉｄマウスモデルにおいて試験され得る。このモデルでは、マウスは、乾癬に似た組織病理学的皮膚損傷を示す。別の適切なモデルは、Ｎｉｃｋｏｌｏｆｆ、Ｂ．Ｊ．ら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．（１９９５）１４６：５８０に記載されたように調製される、ヒト皮膚／ｓｃｉｄマウスキメラである。

【０１７１】

組み換え（トランスジェニック）動物モデルは、トランスジェニック動物を作製するための標準的技術を用いて、目的の動物のゲノムに本明細書中で同定される遺伝子のコーディング部分を導入することによって、操作され得る。トランスジェニック操作のための標的として働き得る動物としては、限定ではなく、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、および非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、チンパンジーおよびサル）が挙げられる。導入遺伝子をこのような動物に導入するための当該分野で公知の技術としては、前核への微量注入（ＨｏｐｐｅおよびＷａｎｇｅｒ、米国特許第４，８７３，１９１号）；生殖細胞系へのレトロウイルス介在性遺伝子導入（例えば、Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｐｕｔｔｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２、６１４８－６１５［１９８５］）；胚性幹細胞への遺伝子ターゲティング（Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、Ｃｅｌｌ　５６、３１３－３２１［１９８９］）；胚への電気穿孔（Ｌｏ、Ｍｏｌ、Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３、１８０３－１８１４［１９８３］）；精子介在性遺伝子導入（Ｌａｖｉｔｒａｎｏら、Ｃｅｌｌ　５７、７１７－７３［１９８９］）が挙げられる。概説として、例えば、米国特許第４，７３６，８６６号を参照のこと。

【０１７２】

本発明の目的として、トランスジェニック動物は、導入遺伝子をそれらの細胞の一部のみに保有する動物（「モザイク動物」）を含む。これらの導入遺伝子は、単一の導入遺伝子またはコンカテマー（例えば、頭－頭（ｈｅａｄ－ｔｏ－ｈｅａｄ）タンデムもしくは頭－尾（ｈｅａｄ－ｔｏ－ｔａｉｌ）タンデム）のいずれかとして組込まれ得る。特定の細胞型への導入遺伝子の選択的導入はまた、以下、例えば、Ｌａｓｋｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９，６２３－６３６（１９９２）の技術、によって可能である

トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は、標準的技術によってモニタリングされ得る。例えば、サザンブロット分析もしくはＰＣＲ増幅が、その導入遺伝子の組込みを検証するために使用され得る。次いで、インサイチュハイブリダイゼーション、ノザンブロット分析、ＰＣＲ、または免疫細胞化学のような技術を用いて、ｍＲＮＡ発現のレベルが分析され得る。

【０１７３】

動物は、例えば、特定組織への免疫細胞の浸潤を決定するための組織学的検査によって

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

【０１７４】

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

【０１７５】

（９．イムノアジュバント治療）

一つの実施形態において、免疫刺激効果を有する本発明の化合物が、腫瘍（癌）の処置のためのイムノアジュバント治療に使用され得る。Ｔ細胞がヒト腫瘍特異的抗原を認識することが、今ではよく証明されている。腫瘍抗原の一つの群（遺伝子のＭＡＧＥ、ＢＡＧＥおよびＧＡＧＥファミリーによってコードされる）は、全ての成人正常組織でサイレントであるが、腫瘍（例えば、黒色腫、肺腫瘍、頭部および頸部の腫瘍、ならびに膀胱癌）においてはかなりの量で発現される。ＤｅＳｍｅｔ、Ｃ．ら、（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９３：７１４９。Ｔ細胞の同時刺激が、インビトロおよびインビボの両方で、腫瘍の退化および抗腫瘍反応を誘発することが示された。Ｍｅｌｅｒｏ、１．ら、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（１９９７）３：６８２；Ｋｗｏｎ、Ｅ．Ｄ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９７）９４：８０９９；Ｌｙｎｃｈ、Ｄ．Ｈ．ら、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（１９９７）３：６２５；Ｆｉｎｎ、Ｏ．Ｊ．およびＬｏｔｚｅ、Ｍ．Ｔ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９９８）２１：１１４。本発明の刺激性化合物は、アジュバントとして、単独でか、または成長調節剤、細胞傷害剤もしくは化学療法剤と組み合わせて投与され、Ｔ細胞増殖／活性化ならびに腫瘍抗原への抗腫瘍応答を刺激し得る。成長調節剤、細胞傷害剤もしくは化学療法剤は、公知の投与レジメンを用いて、従来の量で投与され得る。本発明の化合物による免疫刺激活性は、成長調節剤、細胞傷害剤もしくは化学療法剤の量を減少させ、それによって患者に対するその毒性を低下させる可能性がある。

【０１７６】
癌は、増殖して腫瘍塊を形成する、正常組織に由来する異常な細胞もしくは新生物細胞の数の増加、これらの新生物細胞による隣接する組織への浸潤、ならびに最終的に血液もしくはリンパ系を介して領域のリンパ節および離れた部位へと広がる悪性細胞の生成（転移）によって特徴付けられる。癌の状態では、細胞は、正常細胞が成長しない状況下で増殖する。癌は、種々の程度の浸潤性および攻撃性によって特徴付けられる多様な形態になる。
【０１７７】
遺伝子発現の変化は、全ての癌の一般的特徴である制御されない細胞成長および脱分化と緊密に関係する。特定のよく研究された腫瘍のゲノムが、通常は腫瘍抑制遺伝子（これは、普段は悪性の細胞成長を防止するように機能する）と呼ばれる劣性遺伝子の発現の減少、および／または特定の優性遺伝子（例えば、癌遺伝子、これは悪性成長を促進するように作用する）の過剰発現を示すことが見出された。これらの遺伝子の変化の各々は、全体で新生物の全表現型を表すいくつかの形質の取り込みの原因であると見える（Ｈｕｎｔｅｒ、Ｃｅｌｌ　６４、１１２９［１９９１］；Ｂｉｓｈｏｐ、Ｃｅｌｌ　６４、２３５－２４８［１９９１］）。
【０１７８】
癌細胞における遺伝子（例えば、癌遺伝子）の過剰発現の周知の機構は、遺伝子の増幅である。これは、先祖細胞の染色体において特定の遺伝子の複数のコピーが生成されるプロセスである。このプロセスは、この遺伝子を含む染色体領域の不定期の複製と、これに続いてこの複製されたセグメントが組み換えられてこの染色体内に戻ることに関与する（Ａｌｉｔａｌｏら、Ａｄｖ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４７、２３５－２８１［１９８６］）。この遺伝子の過剰発現は、遺伝子の増幅に並行する（すなわち、作成されたコピー数に比例する）と考えられている。
【０１７９】
成長因子および成長因子レセプターをコードする癌原遺伝子は、種々のヒト悪性疾患（乳癌を含む）の病原性に重要な役割を果たすことが確認されている。例えば、１８５ｋｄ膜貫通糖タンパク質レセプター（ｐ１８５^{ＨＥＲ２}；ＨＥＲ２）をコードするヒトＥｒｂＢ２遺伝子（ｅｒｂＢ２、ｈｅｒ２もしくはｃ－ｅｒｂＢ－２としても公知）が、上皮成長因子レセプター（ＥＧＦＲ）に関与し、ヒト乳癌の約２５％～３０％で過剰発現されることが見出されている。（Ｓｌａｍｏｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３５：１７７－１８２［１９８７］；Ｓｌａｍｏｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４４：７０７－７１２［１９８９］）。
【０１８０】
癌原遺伝子の遺伝子増幅が、代表的に、癌のより悪性の形態に関与し、そして臨床的結果の予測因子として作用し得る現象であることが報告されている（Ｓｃｈｗａｂら、Ｇｅｎｅｓ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ　Ｃａｎｃｅｒ　１、１８１－１９３［１９９０］；Ａｌｉｔａｌｏら、上記）。したがって、ｅｒｂＢ２の過剰発現は、一般的に、特に腋窩リンパ節に関する原疾患を有する患者における、悪い予後の予測因子として認められており（Ｓｌａｍｏｎら、［１９８７］および［１９８９］、上記；ＲａｖｄｉｎおよびＣｈａｍｎｅｓｓ、Ｇｅｎｅ　１５９：１９－２７［１９９５］；ならびにＨｙｎｅｓおよびＳｔｅｒｎ、Ｂｉｏｃｈｉｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ａｃｔａ　１１９８：１６５－１８４［１９９４］）、そしてホルモン治療ならびに化学療法レジメン（ＣＭＦ（シクロホスファミド、メトトレキサート、およびフルオロウラシル）ならびにアントラサイクリンを含む）への感受性および／または抵抗性に結び付けられている（Ｂａｓｅｌｇａら、Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　１１（３　Ｓｕｐｐｌ　１）：４３－４８［１９９７］）。しかし、ｅｒｂＢ２過剰発現と悪い予後との関連にもかかわらず、タキサンによる処置へ臨床的に反応するＨＥＲ２－陽性患者の確率は、ＨＥＲ２－陰性患者の確率よりも三倍高い（同書）。組み換えヒト化抗ＥｒｂＢ２（抗ＨＥＲ２）モノクローナル抗体（マウス抗ＥｒｂＢ２抗体４Ｄ５のヒト化型、ｒｈｕＭＡｂ　ＨＥＲ２もしくはハーセプチン７と呼ばれる）は、広範な

既存の抗癌治療を受けているＥｒｂＢ２－過剰発現性転移性乳癌を有する患者において、臨床的に活性であった。（Ｂａｓｅｌｇａら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１４：７３７－７４４［１９９６］）。

【０１８１】

（１０．薬物候補についてのスクリーニングアッセイ）

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

【０１８２】

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

【０１８３】

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

【０１８４】

候補化合物が、本明細書中で同定される遺伝子にコードされる特定のタンパク質と相互作用するが、それに結合しない場合、このタンパク質とのその相互作用は、タンパク質－タンパク質相互作用の検出のための周知の方法によってアッセイされ得る。このようなアッセイは、伝統的アプローチ（例えば、架橋結合、免疫共沈降、および勾配もしくはクロマトグラフィーカラムを通した同時精製）を含む。加えて、タンパク質－タンパク質相互作用は、Ｆｉｅｌｄｓおよび共同研究者によって記載された酵母ベースの遺伝子系［ＦｉｅｌｄｓおよびＳｏｎｇ、Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄｏｎ）３４０、２４５－２４６（１９８９）；Ｃｈｉｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８、９５７８－９５８２（１９９１）］を用いることによって、ＣｈｅｖｒａｙおよびＮａｔｈａｎ

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

【０１８５】

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

【０１８６】

（１１．免疫関連疾患の処置のための組成物および方法）

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

【０１８７】

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

【０１８８】

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

【０１８９】

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

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

【０１９０】

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

【０１９１】

（１２．抗体）

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

【０１９２】

（ａ．ポリクローナル抗体）

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

【０１９３】

（ｂ．モノクローナル抗体）

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

【０１９４】

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

中で培養され得る。例えば、親細胞がヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的に、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含有し（「ＨＡＴ培地」）、これらの物質は、ＨＧＰＲＴ欠損細胞の増殖を妨げる。

【０１９５】

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

【０１９６】

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

【０１９７】

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

【０１９８】

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

【０１９９】

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

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

【０２００】

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

【０２０１】

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

【０２０２】

（ｃ．ヒト抗体およびヒト化抗体）

本発明の抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体をさらに含み得る。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$または抗体の他の抗原結合配列）であり、これは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含み、ここで、レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）からの残基は、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラットまたはウサギ）のＣＤＲ（ドナー抗体）からの残基によって置換される。幾つかの場合、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても移入されたＣＤＲまたはフレームワーク配列においても見出されない残基も、含み得る。一般に、ヒト化抗体は、実質的に全ての少なくとも１つの、代表的に２つの可変ドメインを含み、ここで、全てまたは実質的に全てのＣＤＲ領域は、非ヒト免疫グロブリンのＣＤＲ領域に対応し、そして全てまたは実質的に全てのＦＲ領域は、ヒト免疫グロブリン共通配列のＦＲ領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、少なくとも免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の一部を含み、代表的には、ヒト免疫グロブリンのＦｃを含む［Ｊｏｎｅｓら，Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２９（１９８８）、およびＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，２：５９３－５９６（１９９２）］。

【０２０３】

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

【０２０４】

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

ｏｌ．，２２２：５８１（１９９１）］が挙げられる。ＣｏｌｅらおよびＢｏｅｒｎｅｒらの技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製を可能にし得る［Ｃｏｌｅら，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，７７頁（１９８５）；Ｂｏｅｒｎｅｒら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，１４７（１）：８６－９５（１９９１）；米国特許第５，７５０，３７３号］。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物（例えば、マウス）内に導入することによって作製され得、ここで、内在性免疫グロブリン遺伝子は、部分的にまたは完全に不活性化される。誘発の際に、ヒト抗体産生が観察され、これは、あらゆる局面（遺伝子再編成、遺伝子アセンブリ、および抗体レパートリーを含む）で、ヒトにおいて見られる抗体と非常に類似する。このアプローチは、例えば、以下において記載される：米国特許第５，５４５，８０７号；同第５，５４５，８０６号；同第５，５６９，８２５号；同第５，６２５，１２６号；同第５，６３３，４２５号；同第５，６６１，０１６号、ならびに以下の科学刊行物：Ｍａｒｋｓら，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０，７７９－７８３（１９９２）；Ｌｏｎｂｅｒｇら，Ｎａｔｕｒｅ ３６８ ８５６－８５９（１９９４）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ ３６８，８１２－１３（１９９４）；Ｆｉｓｈｗｉｌｄら，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４，８４５－５１（１９９６）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４，８２６（１９９６）；ＬｏｎｂｅｒｇおよびＨｕｓｚａｒ，Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３ ６５－９３（１９９５）。

【０２０５】

（ｄ．二種特異性抗体）

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

【０２０６】

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

【０２０７】

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

【０２０８】

（ｅ．異種結合抗体）

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

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

【０２０９】

（ｆ．エフェクター機能操作）

エフェクター機能の点で本発明の抗体を改変し、例えば免疫関連疾患の処置における抗体の有効性を増強することが望ましい。例えば、システイン残基が、Ｆｃ領域内に導入され、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能にし得る。このように産生されたホモダイマー抗体は、内在化能力を改善してもよく、そして／または補体媒介性細胞殺傷および抗体依存性細胞性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を増加してもよい。Ｃａｒｏｎら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６：１１９１－１１９５（１９９２）およびＳｈｏｐｅｓ，Ｂ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：２９１８－２９２２（１９９２）を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体がまた、ＷｏｌｆｆらＣａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：２５６０－２５６５（１９９３）に記載のように、ヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製され得る。あるいは、抗体は、２つのＦｃ領域を有し、それにより、増強された補体溶解能力およびＡＤＣＣ能力を有するように操作され得る。Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎら，Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ．，３：２１９－２３０（１９８９）を参照のこと。

【０２１０】

（ｇ．免疫結合体）

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

【０２１１】

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

【０２１２】

抗体および細胞毒性剤の結合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製される。これらのカップリング剤としては、例えば、以下が挙げられる：Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオレン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピイミデートＨＣＬ）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例え

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

【０２１３】

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

【０２１４】

（ｈ．免疫リポソーム）

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

【０２１５】

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

【０２１６】

（１３．薬学的組成物）

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

【０２１７】

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

ムクロリド；フェノールアルコール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；例えばメチルパラベンまたはプロピルパラベンのようなアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；およびｍ－クレゾール）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン）；単糖類、二糖類、および他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリンが挙げられる）；ＥＤＴＡのようなキレート剤；糖（例えばショ糖、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール）；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；ならびに／または非イオン性界面活性剤（例えば、ＴＷＥＥＮ^{TM}、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ^{TM}、またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）。

【０２１８】

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

【０２１９】

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

【０２２０】

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

【０２２１】

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

【０２２２】

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

【０２２３】

徐放性調製物が、調製され得る。徐放性調製物の好適な例としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、造形品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸およびγエチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン－ビニルアセテート、ＬＵＰＲＯＮ　ＤＥＰＯＴ^{TM}（乳酸－グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射可能ミクロスフィア）のような分解性乳酸－グリコー

ル酸コポリマー、ならびにポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシブチル酸が挙げられる。エチレン－酢酸ビニルおよび乳酸－グリコール酸のようなポリマーは、１００日にわたって分子を放出し得、特定のヒドロゲルは、より短い期間タンパク質を放出する。カプセルに封入した抗体が、体内に長期間残る場合、これらは、３７℃で湿度に曝された結果として変性し得るかまたは凝集し得、生物学的活性の低下をもたらし、免疫原性を変化し得る。安定化のために、関連の機構に基づいて合理的戦略が工夫され得る。凝集機構が、チオ－ジスルフィド交換を介した分子間Ｓ－Ｓ結合形成であることが見出される場合、安定化は、スルフヒドリル残基を改変し、酸性溶液を凍結乾燥し、水分含量を制御し、適切な付加剤を用い、そして特定のポリマーマトリックス組成物を開発することにより、達成され得る。

【０２２４】

（１４．処置の方法）

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

【０２２５】

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

【０２２６】

ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８（それぞれ配列番号１、配列番号２、配列番号９および配列番号３１）は、接合部接着分子（ＪＡＭ）に対する相同性を共有する（Ｍａｒｔｉｎ－Ｐａｄｕｒａら，Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１９９８ １４２（１）：１１７－２７）。最も重要な同一性は、ＤＮＡ４０６２８（配列番号１）によってコードされるＰＲＯ３０１タンパク質により、６７％で共有される。ＪＡＭは、インビボでＭＣＰ－１、ＭＣＰ－３およびＬＰＳに応答した単球の漸増に関連する。ＪＡＭに対する抗体は、インビボで単球遊出をブロックする。ＪＡＭは、マウス上皮および内皮に、単球遊出のための結合部接着分子として局在する。他の白血球もまた、ＪＡＭを使用し得るが、この説を支持する情報はない。ＪＡＭは、大腸炎を有するマウスの結腸において上昇し、そして結腸病変内への単球または白血球の漸増において役割を果たす可能性が高い。

【０２２７】

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

性皮膚疾患、多形性紅斑および接触皮膚炎）、乾癬、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、食物過敏症および蕁麻疹）、肺の免疫疾患（例えば、好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎）、移植関連疾患（移植片拒絶および対宿主性移植片病を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２８】

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

【０２２９】

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

【０２３０】

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

【０２３１】

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

【０２３２】
全身性硬化症（強皮症）は、未知の病因を有する。疾患の特徴は、皮膚の硬化である；おそらくこれは、活性な炎症性プロセスによって誘導される。強皮症は、局所性または全身性であり得る；血管病変は、共通であり、微小血管系における内皮性の細胞の損傷は、全身性硬化症の発達における初期の重要な事象である；血管損傷は、免疫媒介性であり得る。免疫原性原理は、多くの患者において、皮膚病変における単核細胞浸潤の存在および抗核抗体の存在によって暗示される。ＩＣＡＭ－１は、しばしば皮膚病片における線維芽細胞の細胞表面上でアップレギュレートされ、これらの細胞とのＴ細胞相互作用が、疾患の病因において役割を有し得ることを示唆する。関連する他の器官としては、以下が挙げられる：胃腸管：異常ぜん動／運動をもたらす平滑筋萎縮および線維症；腎臓：腎皮質血流の減少を引き起こす小弓状動脈および小葉間動脈に影響する同心性内皮下内膜増殖（蛋白尿、窒素血症および高血圧を生じる）；骨格筋：萎縮、間質線維症；炎症；肺：間質肺炎および間質線維症；および心臓：収縮性帯壊死、瘢痕／線維症。

【０２３３】
特発性炎症性筋障害としては、皮膚筋炎、多発性筋炎が挙げられ、他は、筋衰弱を生じる未知の病因の慢性筋肉炎症の障害である。筋肉損傷／炎症は、しばしば左右対称であり、進行性である。自己抗体は、殆どの形態に関連する。これらの筋炎特異的自己抗体は、構成要素であるタンパク質およびＲＮＡの機能を指向しかつこれを阻害し、タンパク質合成に関連する。

【０２３４】
シェーグレン症候群は、免疫媒介性炎症およびその後の涙腺および唾液腺の機能的破壊に起因する。疾患は、炎症性結合組織疾患に関連し得るか、またはこれに伴い得る。疾患は、Ｒｏ抗原およびＬａ抗原に対して産生される自己抗体に関連し、これらは両方とも、小ＲＮＡ－タンパク質複合体に関連する。病変は、他の特徴または関連（胆汁性肝硬変（ｂｉｌａｒｙ　ｃｉｒｒｈｏｓｉｓ）、抹消神経障害または感覚神経障害、および明確な紫斑が挙げられる）を有する、乾性角結膜炎、口腔乾燥症を生じる。

【０２３５】
全身性脈管炎としては、一次病変が炎症であり、その後血管を損傷して、冒された血管によって供給される組織に虚血／壊死／変性を生じ、そして幾つかの場合、最終的に末端器官不全を生じる疾患が挙げられる。脈管炎（ｖａｓｃｕｌｉｔｉｄｅｓ）もまた、他の免疫炎症性媒介性疾患（例えば、慢性関節リウマチ、全身性硬化症など、特に免疫複合体の形成にもまた関連する疾患）の二次病変または後遺症として起こり得る。原発性全身性脈管炎群における疾患としては、以下が挙げられる：全身性壊死性脈管炎：結節性多発動脈炎、アレルギー性血管炎および肉芽腫症、多発性血管炎；ウェーゲナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症；および巨細胞性動脈炎。種々の血管炎としては、以下が挙げられる：皮膚粘膜リンパ節症候群（ＭＬＮＳまたは川崎病）、孤立性ＣＮＳ脈管炎、ベーチェット病（Ｂｅｈｅｔ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）、閉塞性血栓血管炎（バーガー病）および皮膚壊死性細静脈炎。列挙した脈管炎の殆どの種類の病原性機構は、管壁における免疫グロブリン複合体の堆積、およびその後のＡＤＣＣ、補体活性化、またはその両方を介した炎症性応答の誘導に主に起因すると考えられる。

【０２３６】
サルコイドーシスは、体内のほぼ任意の組織における類上皮肉芽腫の存在によって特徴付けられる未知の病因の状態である；肺の関連は、最も一般的である。病因は、疾患の部位における活性化マクロファージおよびリンパ系細胞の持続性に関連し、この疾患は、慢性続発症（局所的および全身的活性産物の放出によって生じ、この産物は、これらの細胞型から放出される）を有する。

【０２３７】
自己免疫溶血性貧血としては、自己免疫溶血性貧血、免疫汎血球減少症、および発作性夜間血色素尿症が挙げられ、これらは、赤血球細胞（そして幾つかの場合、血小板を含む他の血液細胞も同様である）の表面上で発現する抗原に反応する抗体の産生の結果であり

、そして補体媒介性溶解および／またはＡＤＣＣ／Ｆｃ－レセプター－媒介性機構を介した、細胞をコートするこれらの抗体の除去の反映である。

【０２３８】

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

【０２３９】

グレーヴズ病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球甲状腺炎、および萎縮性甲状腺炎が挙げられる甲状腺炎は、甲状腺抗原に応答する自己免疫の結果であり、甲状腺に存在し、しばしば甲状腺に特異的であるタンパク質に反応する抗体の産生を伴う。存在する実験モデルとしては、以下が挙げられる：自発的モデル：ラット（ＢＵＦおよびＢＢラット）ならびにニワトリ（肥満ニワトリ系統）；誘導性モデル：サイログロブリン、甲状腺ミクロソーム抗原（甲状腺ペルオキシダーゼ）のいずれかで免疫化した動物。

【０２４０】

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

【０２４１】

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

【０２４２】

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

【０２４３】

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

【０２４４】

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

【０２４５】

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

【０２４６】

アレルギー性疾患としては、喘息；アレルギー性鼻炎；アトピー性皮膚炎；食物過敏症；および蕁麻疹が挙げられ、これらは、Ｔリンパ球依存性である。これらの疾患は、主にＴリンパ球誘導性炎症、ＩｇＥ媒介性炎症またはこの両方の組み合わせによって媒介される。

【０２４７】

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

【０２４８】

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

【０２４９】

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

【０２５０】

前炎症性特性を有する分子の阻害はまた、再灌流傷害；卒中；心筋梗塞；アテローム硬化症；急性肺傷害；出血性ショック；火傷；敗血性ショック；急性気管壊死；子宮内膜症；変性性関節症および膵炎において、治療利益を有し得る。

【０２５１】

ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチドおよびＰＲＯ２４５ポリペプチドは、刺激Ｔリンパ球の増殖の刺激剤として活性である（実施例５）：従って、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２およびＰＲＯ２４５のアンタゴニストは、例えば、ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチドおよびＰＲＯ２４５ポリペプチドの促進作用を阻害することにより、免疫関連疾患（特に、炎症性障害）の処置において有用である。他方、ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチドおよびＰＲＯ２４５ポリペプチドならびにこれらのアゴニストは、炎症性応答の刺激から恩恵を受ける障害の処置に有用である。

【０２５２】

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

【０２５３】

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

【０２５４】

免疫アジュバント治療において、他の治療レジメン（例えば、抗癌剤の投与）が、本発明のタンパク質、抗体または化合物の投与と組み合わせられ得る。例えば、本発明の免疫アジュバントで処置される患者はまた、抗癌剤（化学療法剤）または放射線治療をも受け得る。このような化学療法剤の調製および用量計画は、製造業者の指示に従い得るか、または熟練した医師により、経験的に決定され得る。このような化学療法剤の調製および用量計画はまた、Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｍ．Ｃ．Ｐｅｒｒｙ（編集），Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ（１９９２）にも記載される。化学療法剤は、免疫アジュバントの投与に先行しても続いてもよく、またはこれらと同時に与えられてもよい。さらに、抗エストロゲン化合物（例えば、タモキシフェン）または抗プロゲステロン（例えば、オナプリストン（ｏｎａｐｒｉｓｔｏｎｅ）（ＥＰ６１６８１２参照）が、このような分子について公知の用量で与えられ得る。

【０２５５】

他の免疫疾患関連抗原または腫瘍関連抗原に対する抗体を投与することもまた、所望され得る。これらの抗体としては、ＣＤ２０、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１８、ＥｒｂＢ２、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、または血管内皮因子（ＶＥＧＦ）に結合する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、またはさらに、同じ抗原または２以上の異なる抗原に結合する２以上の抗体が、本明細書中で開示され、患者に同時投与され得る。時々、１以上のサイトカインを患者に投与することもまた、有益であり得る。１つの実施形態において、本発明のポリペプチドまたは他の化合物は、増殖阻害剤と共に投与される。例えば、増殖阻害剤が最初に投与され、その後、本発明のポリペプチドまたは他の化合物が投与され得る。しかし、同時投与または最初の投与もまた、企図される。増殖阻害剤の好適な用量は、現在使用される用量であり、増殖阻害剤と本発明のポリペプチドまたは他の化合物との総合作用（相乗作用）に起因して、より低くてもよい。

【０２５６】

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

【０２５７】

例えば、疾患の型および重症度に依存して、約１μｇ／ｋｇ～１５ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．１～２０ｍｇ／ｋｇ）のポリペプチドまたは抗体が、例えば、１以上の別々の投与または連続輸液による患者への投与のための最初の候補用量である。代表的な１日用量は、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲であり得、上述の因子に依存する。数日以上にわたる反復投与のために、状態に依存して、処置は、疾患症状の所望の抑制が起きるまで、持続される。しかし、他の用量レジメンもまた、有用であり得る。この治療の進行は、従来技術およびアッセイによって、容易にモニタリングされ得る。

【０２５８】

（１５．製造品）

本発明の別の実施形態において、上述の障害の診断または処置に有用な物質を含む製造品が、提供される。製造品は、容器とラベルとを含む。好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジおよび試験管が挙げられる。容器は、種々の物質（例えば、ガラスまたはプラスチック）から形成され得る。容器は、状態の診断または処置のために有用な組成物を保持し、そして滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって穴をあけ得る栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の活性剤は、通常、本発明のポリペプチドまたは抗体である。容器上、または容器に伴うラベルは、この組成物が、最適な状態（特に、免疫関連状態）の診断または処置のために使用されることを示す。製造品は、薬学的に受容可能な緩衝液（例えば、リン酸緩衝化生

理食塩水、リンガー溶液およびデキストロース溶液）を含む第２の容器をさらに含み得る。これは、市場でまたは使用者の視点で望ましい他の物質（他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用指示書を有するパッケージ挿入物）をさらに含み得る。

【０２５９】

（１６．疾患の診断および予後）

細胞表面タンパク質（例えば、特定の免疫関連疾患において過剰発現するタンパク質）は、薬物候補または疾患処置の優れた標的である。免疫関連疾患状態において増幅された遺伝子によってコードされる分泌タンパク質と同じタンパク質は、これらの疾患の診断および予後にさらなる使用を見出す。例えば、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、または別の免疫関連疾患において増幅された遺伝子のタンパク質産物を指向する抗体が、診断または予後として使用され得る。このような抗体およびキャリア（例えば、緩衝液）が、タンパク質産物を検出するための抗体の使用のための指示書を備える好適なパッケージ内の、診断キットに含まれ得る。

【０２６０】

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

【０２６１】

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

【０２６２】

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

【０２６３】

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

【０２６４】

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

【０２６５】

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

【実施例】

【０２６６】

本実施例で参照される市販の試薬は、他に示されない限り製造業者の指示書に従って使用した。以下の実施例、および本明細書全体にわたって、ＡＴＣＣ受託番号によって同定されるこれらの細胞の供給源は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ２０１１０－２２０９である。

【０２６７】
（実施例１）
（ヒトＰＲＯ３０１をコードするｃＤＮＡクローンの単離）
Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔの公式データベースに由来する約９５０個の公知の分泌タンパク質由来の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）配列（存在する場合、分泌シグナル配列を含む）を、ＥＳＴデータベースを検索するために使用した。ＥＳＴデータベースとしては、公式ＥＳＴデータベース（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ）、独自のＥＳＴデータベース（ＬＩＦＥＳＥＱ（登録商標）、Ｉｎｃｙｔｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）が挙げられる。検索を、ＥＳＴ配列の６フレームまでの翻訳に対するＥＣＤタンパク質配列の対照として、コンピュータプログラムＢＬＡＳＴまたはＢＬＡＳＴ２［Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、２６６：４６０－４８０（１９９６）］を使用して実施した。公知のタンパク質をコードしなかった７０（もしくはいくつかの事例では、９０）あるいはそれ以上のＢＬＡＳＴスコアを生じるこれらの対照を、クラスター形成し、そしてプログラム「ｐｈｒａｐ」（Ｐｈｉｌ　Ｇｒｅｅｎ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ、Ｓｅａｔｔｌｅ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ）を用いて共通ＤＮＡ配列に集めた。

【０２６８】
ＤＮＡ３５９３６をコードする共通ＤＮＡ配列を、ｐｈｒａｐを使用して集めた。いくつかの実施形態において、共通ＤＮＡ配列を、その共通配列を上記に列挙したＥＳＴ配列の３つの供給源を使用して可能な限り長く伸長させるために、ｂｌａｓｔおよびｐｈｒａｐの繰り返しサイクルを使用して伸長させた。

【０２６９】
この共通配列に基づいて、オリゴヌクレオチドを合成した：１）ＰＣＲによって、目的の配列を含むｃＤＮＡライブラリーを同定し、そして２）プローブとして使用するために、全長コード配列のクローンを単離する。順方向ＰＣＲプライマーおよび逆方向ＰＣＲプライマー（それぞれ、＊．ｆおよび＊．ｒと表記される）は、２０～３０ヌクレオチドの範囲（代表的に約２４ヌクレオチド）であり得、そして長さが１００～１０００ｂｐのＰＣＲ産物を得るように設計される。プローブ配列（＊．Ｐと表記される）は、代表的に長さが４０～５５ｂｐ（代表的に約５０ｂｐ）である。いくつかの事例において、共通配列が１～１．５ｋｂｐよりも大きい場合に、さらなるオリゴヌクレオチドが合成される。いくつかのライブラリーを全長クローンの供給源についてスクリーニングするために、Ａｕｓｕｂｅｌら，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙのように、ＰＣＲプライマー対を用いて、ライブラリー由来のＤＮＡをＰＣＲ増幅によってスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを使用して、プローブオリゴヌクレオチドとＰＣＲプライマーの一方を必要とするインビボクローニング手順によって、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

【０２７０】
いくつかのライブラリーを全長クローンの供給源についてスクリーニングするために、ライブラリー由来のＤＮＡを、上記のＰＣＲプライマー対を用いて、ＰＣＲ増幅によってスクリーニングした。次いでポジティブライブラリーを使用して、ＰＲＯ３０１遺伝子をコードするクローンを、プローブオリゴヌクレオチドとＰＣＲプライマーの一方を使用して単離した。

【０２７１】
ｃＤＮＡライブラリーの構築のためのＲＮＡを、ヒト胎児腎臓から単離した。ｃＤＮＡクローンを単離するために使用されるｃＤＮＡライブラリーを、市販の試薬（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈなど）を使用する標準的な方法によって構築した。ｃＤＮＡを、ＮｏｔＩ部位を含むオリゴｄＴでプライミングし、ＳａｌＩヘミキナーゼアダプターに対して平滑部で連結し、ＮｏｔＩで切断し、ゲル電気泳動で適当にサイズを合わせ、そして固有のＸｈｏＩ部位およびＮｏｔＩ部位において規定した配向で適切なクローニングベクター（例えば、ｐＲＫＢまたはｐＲＫＤ；ｐ

ＫＲ５Ｂは、ＳｆｉＩ部位を含まないｐＲＫ５Ｄの前駆体である；Ｈｏｌｍｅｓら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５３：１２７８－１２８０（１９９１）を参照のこと）にクローン化した。

【０２７２】

ｃＤＮＡクローンを完全に配列決定した。天然の配列ＤＮＡ４０６２８の全長オリゴヌクレオチド配列は、図５に示される（配列番号１１）。クローンＤＮＡ４０６２８は、ヌクレオチド位置５２～５４で明らかな翻訳開始部位を有する単一のオープンリーディングフレームを含む（図５；配列番号１１）。予測ポリペプチド前駆体は、予測分子量３２５８３ダルトンおよびｐＩ８．２９を有する２９９個のアミノ酸長である。クローンＤＮＡ４０６２８は、ＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ受託番号２０９４３２が割り当てられている。

【０２７３】

全長配列のＢＬＡＳＴおよびＦａｓｔＡ配列アラインメント分析に基づいて、ＤＮＡ４０６２８によってコードされるＰＲＯ３０１は、Ａ３３抗原前駆体に対するアミノ酸配列同一性（３０％）、ならびにコクサッキーおよびアデノウイルスレセプタータンパク質に対するアミノ酸配列同一性（２９％）を示す。

【０２７４】

上記の手順で使用されるオリゴヌクレオチド配列は、以下の通りであった：

【０２７５】

【化１】

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

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

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

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

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

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

（実施例２）

（ヒトＰＲＯ３６２をコードするｃＤＡＮの単離）

Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔの公式タンパク質データベースに由来する約９５０個の公知の分泌タンパク質由来の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）配列（存在する場合、分泌シグナル配列を含む）を、発現配列タグ（ＥＳＴ）データベースを検索するために使用した。ＥＳＴデータベースとしては、公式ＥＳＴデータベース（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ）、独自のＥＳＴ　ＤＮＡデータベース（ＬＩＦＥＳＥＱ（登録商標）、Ｉｎｃｙｔｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）が挙げられる。検索を、ＥＳＴ配列の６フレームまでの翻訳に対するＥＣＤタンパク質配列の対照として、コンピュータプログラムＢＬＡＳＴまたはＢＬＡＳＴ２［例えば、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、２６６：４６０－４８０（１９９６）］を使用して実施した。公知のタンパク質をコードしなかった７０（もしくはいくつかの事例では、９０）あるいは

それ以上のＢＬＡＳＴスコアを生じるこれらの対照を、クラスター形成し、そしてプログラム「ｐｈｒａｐ」（Ｐｈｉｌ　Ｇｒｅｅｎ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ、Ｓｅａｔｔｌｅ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ）を用いて共通ＤＮＡ配列に集めた。

【０２７６】

共通ＤＮＡ配列を、ｐｈｒａｐを使用して、他のＥＳＴ配列に関して集めた。この共通配列を、本明細書中でＤＮＡ４２２５７（配列番号５）と指定する（図４Ｃを参照のこと）。図４Ｃに示されるＤＮＡ４２２５７（配列番号５）共通配列に基づいて、オリゴヌクレオチドを合成した：１）ＰＣＲによって、目的の配列を含むｃＤＮＡライブラリーを同定し、そして２）プローブとして使用するために、ＰＲＯ３６２についての全長コード配列のクローンを単離する。順方向ＰＣＲプライマーおよび逆方向ＰＣＲプライマーは、一般的に、２０～３０ヌクレオチドの範囲であり得、そして多くの場合、長さが約１００～１０００ｂｐのＰＣＲ産物を得るように設計される。プローブ配列は、代表的には、長さが４５～５５ｂｐである。いくつかの事例において、共通配列が約１～１．５ｋｂｐよりも大きい場合、さらなるオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリー由来のＤＮＡを、Ａｕｓｕｂｅｌら，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙのように、ＰＣＲプライマー対を用いて、ＰＣＲ増幅によってスクリーニングした。次いで、ポジティブライブラリーを使用して、プローブオリゴヌクレオチドとプライマー対の一方を使用して、目的の遺伝子をコードするクローンを単離した。

【０２７７】

ＰＣＲプライマー（順方向および逆方向）を合成した：

【０２７８】

【化２】

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

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

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

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

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有する共通ＤＮＡ４２２５７配列から構築した：

ハイブリダイゼーションプローブ（４２２５７．ｐ１）

【０２７９】

【化３】

5’-TGGATGACCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGAT-3’

(配列番号 22)

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

【０２８０】

ｃＤＮＡライブラリーの構築のためのＲＮＡを、ヒト胎児脳組織（ＬＩＢ１５３）から単離した。ｃＤＮＡクローンを単離するために使用されるｃＤＮＡライブラリーを、市販

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

【０２８１】

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

【０２８２】

ＵＮＱ３１７（ＤＮＡ４５４１６－１２５１）の完全ヌクレオチド配列は、図６に示されている（配列番号７）。クローンＵＮＱ３６７（ＤＮＡ４５４１６－１２５１）（配列番号７）は、ヌクレオチド位置１０８２～１０８４で明らかな翻訳開始部位を有する単一のオープンリーディングフレームを含む（図６；配列番号７）。予測ポリヌクレオチド前駆体は、３２１個のアミノ酸長である（図３；配列番号２）。図３に示される全長ＰＲＯ３６２タンパク質は、約３５，５４４ダルトンの推定分子量、および約８．５１のｐＩを有する。図３に示されるような全長ＰＲＯ３６２ポリペプチド（配列番号２）の分析は、約アミノ酸１４９～約アミノ酸１５２でのグリコサミノグリカン付着部位、および約アミノ酸２７６～約アミノ酸３０６の膜貫通ドメインの存在を証明する。クローンＵＮＱ３１７（ＤＮＡ４５４１６－１２５１）は、ＡＴＣＣ受託番号：２０９６２０で受託されている。

【０２８３】

（実施例３）

（ヒトＰＲＯ２４５をコードするｃＤＮＡクローンの単離）

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

【０２８４】

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

【０２８５】

ＰＣＲプライマーの対（順方向および逆方向）を合成した：

【０２８６】

【化４】

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

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

順方向ＰＣＲプライマーおよび逆方向ＰＣＲプライマーは、一般的に、２０～３０ヌクレオチドの範囲であり、そして多くの場合、長さが約１００～１０００ｂｐのＰＣＲ産物を得るように設計される。プローブ配列は、代表的には、長さが４０～５５ｂｐである。いくつかの事例において、共通配列が約１～１．５ｋｂｐよりも大きい場合に、さらなるオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについていくつかのライブラリーをスクリーニングするために、そのライブラリー由来のＤＮＡを、Ａｕｓｕｂｅｌら，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙのように、ＰＣＲプライマー対を用いて、ＰＣＲ増幅によってスクリーニングした。

【０２８７】

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを、以下のヌクレオチド配列を有する共通ＤＮＡ３０９５４配列から構築した：

ハイブリダイゼーションプローブ：

【０２８８】

【化５】

5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCC-3'（配列番号 30）

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

【０２８９】

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

【０２９０】

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

【０２９１】

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

酸長である（図１１）（配列番号９）。クローンＵＮＱ２１９（ＤＮＡ３５６３８）は、１９９７年９月１７日にＡＴＣＣに寄託されており、ＡＴＣＣ受託番号２０９５２６５で譲渡されている。

【０２９２】

（実施例４）

（内皮細胞増殖に関するＶＥＧＦ刺激増殖の阻害）

ウシ副腎皮質毛細血管内皮（ＡＣＥ）細胞（初期培養物由来、最大１２～１４継代）を、３ｎｇ／ｍＬ　ＶＥＧＦが補充された低グルコースＤＭＥＭ、１０％子ウシ血清、２ｍＭグルタミン、１×ｐｅｎ／ｓｔｒｅｐおよびファンギゾン（ｆｕｎｇｉｚｏｎｅ）中の１００μＬ当たり５００細胞／ウェルの密度で、９６ウェルのマイクロタイタープレート（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）にプレートした。コントロールを、同じ様式であるがいくつかはＶＥＧＦを含まずにプレートした。ＰＲＯ３０１およびＰＲＯ２４５ポリペプチドの試験サンプルを、２００ｍｃＬの最終容積に対する１００μｌ容積中に添加した。細胞を、３７℃で６～７日間インキュベートした。培地を吸引し、そして細胞をＰＢＳで１回洗浄した。酸ホスファターゼ反応混合物（１００μＬ、０．１Ｍ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－１００、１０ｍＭ　リン酸ｐ－ニトロフェニル）を添加した。３７℃で２時間のインキュベーションの後、反応を１０ｍｃＬの１Ｎ

ＮａＯＨの添加によって停止させた。ＯＤを、マイクロタイタープレートリーダー上で４０５ｎｍにて測定した。コントロールは、細胞なし、細胞単独、細胞＋ＦＧＦ（５ｎｇ／ｍＬ）、細胞＋ＶＥＧＦ（３ｎｇ／ｍＬ）、細胞＋ＶＥＧＦ（３ｎｇ／ｍｌ）＋ＴＧＦ－β（１ｎｇ／ｍｌ）、および細胞＋ＶＥＧＦ（３ｎｇ／ｍＬ）＋ＬＩＦ（５ｎｇ／ｍＬ）であった。（１ｎｇ／ｍｌでのＴＧＦ－β濃度は、ＶＥＧＦ刺激細胞増殖の７０～９０％をブロックすることが公知である）。

【０２９３】

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

【０２９４】

（表１）

【０２９５】

【表１－１】

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

【０２９６】
【表１－２】

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

（実施例５）
（混合リンパ球反応（ＭＬＲ）アッセイにおける刺激活性）
以下に、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８ポリペプチドが、刺激Ｔ－リンパ球の増殖を刺激し得るか否かを決定するためのアッセイを記載する。リンパ球の増殖を刺激する化合物は、治療的に有用であり、炎症応答の増強（例えば、新形成に対する免疫応答の増強）が有益である。リンパ球の増殖を刺激するこのような化合物に対するアンタゴニストは、治療的に有用であり、炎症応答における低下が有益である。治療剤は、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの形態（例えば、ポリペプチドに対するマウス－ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体）を取り得る。

【０２９７】
このアッセイについての基本的なプロトコルは、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｕｎｉｔ３．１２，Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ，Ａ．Ｍ．Ｋｒｕｉｓｂｅｅｋ，ＤＨ Ｍａｒｌｉｅｓ，ＥＭ ＳｈｅｖａｃｈおよびＷ Ｓｔｒｏｂｅｒ編、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃに記載されている。

【０２９８】
より具体的には、１つのアッセイ改変において、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）が、哺乳類個体（例えば、ヒト志願者）から、ロイコフェレシス（ｌｅｕｋｏｐｈｅｒｅｓｉｓ）（一方のドナーが刺激性ＰＢＭＣを供給し、他方のドナーが応答性ＰＢＭＣを供給する）によって単離される。所望の場合、細胞を、単離後にウシ胎仔血清およびＤＭＳＯ中で凍結させる。凍結細胞は、アッセイ培地（３７℃、５％CO_2）中で一晩解凍され得、次いで、洗浄され、３×１０^{6}細胞／ｍｌのアッセイ培地（ＲＰＭＩ；１０％ウシ胎仔血清、１％ペニシリン／ストレプトマイシン、１％グルタミン、１％ＨＥＰＥＳ、１％非必須アミノ酸、１％ピルビン酸）に再懸濁される。

【０２９９】
刺激物質ＰＢＭＣは、細胞を照射（約３０００Ｒａｄ）することによって調製される。アッセイは、三連のウェル中に以下の混合物をプレートすることによって準備される：１％または０．１％に希釈された１００μｌの試験サンプル；５０μｌの照射された刺激細胞、および５０μｌの応答性ＰＢＭＣ細胞。１００μＬの細胞培養培地または１００ｍｌのＣＤ４－ＩｇＧを、コントロールとして使用する。次いで、ウェルを、３７℃、５％CO_2で４日間インキュベートする。５日目に、各々のウェルをトリチウム化したチミジン（１．０ｍＣ／ウェル；Ａｍｅｒｓｈａｍ）でパルスする。細胞を３回洗浄し、次いで、標識の取り込みを評価する。

【０３００】
ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、およびＰＲＯ２４５ポリペプチドを、アッセイの別の改変において試験した。この改変アッセイにおいて、ＰＢＭＣは、ＢＡＬＢ／ｃマウスおよびＣ５７Ｂ６マウスの脾臓から単離した。この細胞を、アッセイ培地（ＲＰＭＩ；１０％

ウシ胎仔血清、１％ペニシリン／ストレプトマイシン、１％グルタミン、１％ＨＥＰＥＳ、１％非必須アミノ酸、１％ピルビン酸）中の新たに収集した脾臓から切り出し、そしてＰＢＭＣを、Ｌｙｍｐｈｏｌｙｔｅ Ｍ（Ｏｒｇａｎｏ Ｔｅｋｎｉｋａ）上にこれらの細胞をオーバーレイし、２０００ｒｐｍで２０分間遠心分離し、回収し、アッセイ培地中で単核細胞層を洗浄し、そして細胞を1×10^{7}細胞／ｍｌのアッセイ培地に再懸濁することによって単離した。次いで、アッセイを上記のように行った。

【０３０１】

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

【０３０２】

（表２）

【０３０３】

【表２】

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

（実施例６）

（モルモット皮膚への炎症細胞浸潤）

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

【０３０４】

３５０グラム以上の体重を有する無毛のモルモット（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂ）を、ケタミン（７５～８０ｍｇ／ｋｇ体重）およびキシラジン（５ｍｇ／ｋｇ体重）を用いて筋肉内注射で麻酔した。ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２およびＰＲＯ２４５のタ

ンパク質サンプルおよびコントロールタンパク質を、各々の動物の背中に、１つの注射部位当たり１００μｌの容積で皮内注射した。１匹の動物当たり約１６～２４箇所の注射部位が存在した。１ｍＬのエバンスブルー色素（生理的に緩衝化した生理食塩水中の１％）を心内注射した。動物を６時間後に安楽死させ、そして各々の皮膚注射部位の生検を行い、ホルマリン中に固定した。この皮膚を、組織病理学的評価用に調製した。各々の部位を、皮膚への炎症細胞浸潤について評価した。可視的な炎症細胞を有する部位を、ポジティブとして記録した。炎症細胞浸潤を含むサンプルを、炎症誘導性物質として記録した。

【０３０５】

（表３）

【０３０６】

【表３】

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

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

【０３０７】

（実施例７）

（ヒト好中球との相互作用）

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

【０３０８】

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

【０３０９】

ＰＭＮを、微量遠心管中のＰＢＳ中に、１条件当たり２×１０^{6}細胞当量の密度で再懸濁させた。細胞を、氷冷ＰＢＳで２回洗浄し、そして洗浄の間で４００×ｇにてペレット状にした。ＰＭＮ細胞を、ＰＢＳ中の０．５％ＢＳＡ（遮断剤）で４℃にて１時間遮断した。インキュベーションの後、細胞を、遮断剤でさらに２回洗浄した。ＰＭＮは、最後の洗浄後にペレット状にし、そしてＤＮＡ４０６２８タンパク質およびコントロール抗体の両方において、０．１μｇ／ｍｌにて１ｍｌの遮断緩衝液中に再懸濁させた。インキュベーションを、４℃で２時間行った。ＰＭＮ細胞は、氷の上で１５分毎に徐々に懸濁させ、その後洗浄しそして遮断緩衝液中で５回ペレット化し、各洗浄は４℃で５回続け、ペレット化は４００×ｇで行った。その後、遮断緩衝液中で特異的にアルカリホスファターゼ結合体化するヤギＩｇＧ　Ｆｃと抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃの１：１０００希釈物を、ＰＭＮ細胞に適用した。ＰＭＮ細胞を、氷の上で１５分毎に穏やかに混合しながら、４℃で１時間インキュベートした。その後、ＰＭＮ細胞を、遮断緩衝液で５回洗浄し、アルカリホスファターゼについて適切な物質中に再懸濁させ、そしてマイクロタイタープレート上へ４当量の１００μｌアリコート中で分配した。着色はＯ．Ｄ．４０５で読み取った。この結果は図２１に示される。

【０３１０】

（実施例８）
（ドットブロット組織ハイブリダイゼーション）
ヒトＲＮＡマスターブロット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を、製造業者の指示のように、ＤＮＡ４０６２６８ｃＤＮＡプローブ（配列番号７）で標識した１００ｎＭのソラレンビオチンを用いて、ＥＸＰＲＥＳＳＨＹＢ（登録商標）緩衝液（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）中で、６５℃にて一晩ハイブリダイズさせた。ストレプトアビジン－アルカリホスファターゼを使用して、ビオチン化プローブを検出した。そのブロットを、ＣＤＰスター基板（Ａｍｂｉｏｎ）上に展開し、Ｂｉｏｍａｘフィルム（Ｋｏｄａｋ）上で様々な時間の間曝露した。ヒト組織のｃＤＮＡハイブリダイゼーション分析は、ＤＮＡ４０６２８　ｍＲＮＡが、広範な組織中に発現されるが、小脳および脊髄中では発現されないことを示す（図１９）。ＤＮＡ４０６２８　ｍＲＮＡは、結腸、前立腺、胃、卵巣、唾液腺、腎臓、肺、気管および胎盤中で高度に発現される。

【０３１１】
（実施例９）
（遺伝子産物過剰発現）
本実施例は、図２０に示される種々のタンパク質をコードする遺伝子が、ＣＲＦ　２－４　－／－「ノックアウト」マウスの結腸炎の結腸中で過剰発現されることを示す。治療剤は、示された遺伝子産物のアンタゴニスト（例えば、マウス－ヒトキメラ抗体に対するアンタゴニスト、ヒト化抗体に対するアンタゴニスト、またはヒト抗体に対するアンタゴニスト）の形態を取り得る。

【０３１２】
ＣＲＦ　２－４　－／－マウス（Ｓｐｅｎｃｅｒら、Ｊ．Ｅｘｐ．ＭＥｄ．１８７、５７１－５７８（１９９８））は、除去されたＩＬ－１０レセプターをコードする遺伝子のサブユニットを有するＩＬ－１０レセプターノックアウト動物である。このマウスは、マクロファージ活性化についてのＩＬ－１０のダウンレギュレート機能に対して非応答性であり、そしてマクロファージＴＮＦ－α分泌のリポ多糖類誘発に対する応答をダウンレギュレートし得ない。このマウスは、結腸腺癌を導き得る慢性結腸炎を進展させる。特発性結腸炎は、リンパ球、単球および好中球によって媒介される。ＩＬ－１０は、特定の炎症性サイトカインの発現を調節することによって炎症応答を抑制する。

【０３１３】
図２０に示されるタンパク質についてのプローブは、示された遺伝子産物についてのｍＲＮＡテンプレートから生成され、そして５’－ヌクレアーゼアッセイ（例えば、ＴＡＱＭＡＮ^{TM}）およびリアルタイム定量的ＰＣＲ（例えば、ＡＢＩ　ＰＲＩＺＭ　７７００　ＳＥＱＵＥＮＣＥ　ＤＥＴＥＣＴＩＯＮ　ＳＹＳＴＥＭ^{TM}（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ））で使用される。その結果はΔＣＴ単位で記録される。１単位は、１ＰＣＲサイクルまたは標準に対して約２倍の増幅に相当し、２単位は４倍に相当し、３単位は８倍に相当する、などである。定量化は、プライマーおよび図２０に示される試験した炎症関連遺伝子産物由来のＴＡＱＭＡＮ^{TM}蛍光タグ化ｍＲＮＡを使用して達成される。独特の核酸配列を含む可能性が最も高く、少なくともイントロンからスプライスされていると考えられる示された遺伝子産物の領域は、プライマー派生（例えば、３’－非翻訳領域）に好ましい。

【０３１４】
５’－ヌクレアーゼアッセイ反応は、リアルタイムで増幅をモニターするためにＴａｑＤＮＡポリメラーゼ酵素の５’－エキソヌクレアーゼ活性を使用する蛍光ＰＣＲベースの技術である。２つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ＰＣＲ反応に典型的なアンプリコンを生成する。第３のヌクレオチド、またはプローブは、２つのＰＣＲプライマー間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計される。プローブは、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ酵素によって伸長不可能であり、そしてレポーター蛍光色素およびクエンチャー蛍光色素で標識される。レーザーで励起されるレポーター色素からの発光は、

２つの色素がプローブ上にあるように一緒に近接して位置する場合に、クエンチング色素によってクエンチされる。増幅反応の間、プローブは、テンプレート依存性の様式でＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ酵素によって切断される。生じるプローブフラグメントは、溶液中で解離し、放出レポーター色素由来のシグナルが、第２のフルオロフォアのクエンチング効果から解放される。レポーター色素の１分子は、合成された各々の新しい分子から遊離し、そしてクエンチされていないレポーター色素の検出が、データの定量的解釈に基づいて提供される。

【０３１５】

５’－ヌクレアーゼ手順は、リアルタイム定量的ＰＣＲ装置（例えば、ＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ　７７００^{TM}　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ）上で行われる。このシステムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子（ＣＣＤ）カメラおよびコンピュータからなる。このシステムは、サーモサイクラーにおける９６ウェル形式でサンプルを増幅する。増幅の間、レーザーで誘導される蛍光シグナルが、９６ウェル全てに対して光ファイバーケーブルを通してリアルタイムで収集され、ＣＣＤで検出される。このシステムは、機器を作動させデータを分析するためのソフトウェアを備える。

【０３１６】

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

【０３１７】

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

【０３１８】

図２０は、ＪＡＭ　ｍＲＮＡが、結腸炎を有するＣＲＦ２－４　－／－マウスの結腸において３．３倍に増加されていることを示す。

【０３１９】

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

【０３２０】

（実施例１０）

（内皮細胞アポトーシスの誘導）

本発明のポリペプチドが内皮細胞においてアポトーシスを誘導する能力を、ヒト静脈臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ、Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）において試験した。１日目に、細胞を、１０％血清（ＣＳＧ－培地、Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）中、総容積１００μｌの１ウェル当たり２×１０^{4}細胞の密度で、９６ウェルのマイクロタイタープレート（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、サイトスター－Ｔシンチレーションマイクロプレート、ＲＰＮＱ１６０、滅菌、組織培養処理、個別包装）にプレートした。２日目に、それぞれＤＮＡ４０６２８およびＤＮＡ３５６３８によってコードされるＰＲＯ３０１およびＰＲＯ２４５ポリペプチドを、１％、０．３３％および０．１１％の希釈にて三連で添加した。３日目に、ＰＲＯ３０１およびＰＲＯ２４５ポリペプチドがアポトーシスを誘導する能力を、市販のキットであるアポトーシス検出キット（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅｓｏｔａ）を使用して決定した。このキットでは、カルシウム結合タンパク質およびリン脂質結合タンパク質のメンバーであるアネキシンＶが、アポトーシスを検出するために使用され、製造業者によって以下のプロトコルが推奨されている。蛍光標識したアネキシンＶおよびヨウ化プロピジウムを細胞に添加した。４８８ｎｍでの励起光を放射するシングルレーザーを備えるサイトメーターを用いて、分析を行った。この試験に

おいて、生存細胞はいずれの蛍光色素でも染色されず、壊死細胞は両方の蛍光色素で染色され、そしてアポトーシスに罹患している細胞はアネキシンＶ－ＦＩＴＣ試薬でのみ染色される。アネキシンＶ－ＦＩＴＣで生じるシグナルは、ＦＩＴＣシグナル検出器で検出された。結果は、以下の表４に示されている。

【０３２１】

（表４）

【０３２２】

【表４】

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

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

【０３２３】

（実施例１１）

（インビトロ抗腫瘍アッセイ）

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

【０３２４】

約６０個のヒト腫瘍細胞株に由来する細胞を、トリプシン／ＥＤＴＡ（Ｇｉｂｃｏ）で収集し、１回洗浄し、ＩＭＥＭ中に再懸濁させ、そしてそれらの生存度を決定した。細胞懸濁液を、ピペット（１００μＬ容積）によって、別個の９６ウェルマイクロタイタープレートに添加した。６日間のインキュベーション用の細胞密度は、過成長を予防するために２日間のインキュベーション用よりも低かった。播種をして、安定化のために、３７℃での２４時間の予備インキュベーションをした。２倍に希釈した目的の試験化合物を、時

間ゼロにてマイクロタイタープレートウェルに対して１００ｍｌアリコート中に添加した（１：２希釈）。試験化合物を、所定の半対数希釈（１０００～１００，０００倍）にて評価した。インキュベーションを、２日間行い、そして５％CO_2雰囲気および１００％湿度において６日間行った。

【０３２５】

インキュベーションの後、培地を取り出し、そして細胞を４０℃で０．１ｍｌの１０％トリクロロ酢酸中に固定した。そのプレートを脱イオン水で５回リンスし、乾燥させ、１％酢酸に溶解させた０．１ｍｌの０．４％スルホローダミンＢ色素（Ｓｉｇｍａ）で３０分間染色し、１％酢酸で４回リンスして未結合の色素を除去し、乾燥させ、そして染色物を０．１ｍｌの１０ｍＭトリス塩基［トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン］（ｐＨ１０．５）で５分間抽出した。４９２ｎｍでのスルホローダミンＢの吸光度（ＯＤ）を、コンピュータインターフェースの９６ウェルマイクロタイタープレートリーダーを使用して測定した。

【０３２６】

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

ＮＳＣＬ＝非小肺癌
ＣＮＳ＝中枢神経系
Ｌｅｕｋ＝白血病

（表５）

【０３２７】

【表５－１】

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

【０３２８】

【表５－２】

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

（実施例１２）

（ハイブリダイゼーションプローブとしてのＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８の使用）

以下の方法は、ハイブリダイゼーションプローブとしてＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８をコードするヌクレオチド配列の使用を記載する。

【０３２９】

天然の配列ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８（図５～７および６１に示されるような配列、配列番号１１、７、８および３１）のコード配列を含むＤＮＡを、それぞれ、プローブとして使用して、ヒト組織ｃＤＮＡライブラリーまたはヒト組織ゲノムライブラリーにおける相同ＤＮＡ（例えば、それぞれ、天然に存在するＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８の改変体をコードする相同ＤＮＡ）についてスクリーニングした。

【０３３０】

ｃＤＮＡライブラリーＤＮＡまたはゲノムライブラリーＤＮＡのいずれかを含むフィルターのハイブリダイゼーションおよび洗浄を、以下の高ストリンジェンシー条件下で行う。フィルターに対して、放射標識したＰＲＯ３０１由来のプローブ、ＰＲＯ３６２由来のプローブ、ＰＲＯ２４５由来のプローブ、またはＰＲＯ１８６８由来のプローブのハイブリダイゼーションを、５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８、２×デンハート溶液、および１０％硫酸デキストランの溶液中で、４２℃にて２０分間行う。フィルターの洗浄を０．１×ＳＳＣおよび０，１％ＳＤＳの水溶液中で、４２℃にて行う。

【０３３１】

次いで、全長の天然の配列ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８をコードするＤＮＡを有する所望の配列同一性を有するＤＮＡを、当該分野で公知の標準的な技術を使用して同定する。

【０３３２】

（実施例１３）

（Ｅ．ｃｏｌｉにおけるＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８の発現）

本実施例は、Ｅ．ｃｏｌｉにおける組換え発現による、非グリコシル化形態のＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８の調製を示す。

【０３３３】

ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８をコードするＤＮＡ配列は、最初は、選択したＰＣＲプライマーを使用して増幅する。そのプライマーは、選択した発現ベクターにおける制限酵素部位に相当する制限酵素部位を含むべきである。種々の発現ベクターが、使用され得る。適切なベクターの例は、ｐＢＲ３２２（Ｅ．ｃｏｌｉに由来する；Ｂｏｌｉｖａｒら、Ｇｅｎｅ、２：９５（１９７７）を参照のこと）であり、これは、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含む。このベクターを、制限酵素で分解して、脱リン酸化する。その後、ＰＣＲ増幅した配列を、ベクタ

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

【０３３４】

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

【０３３５】

選択したクローンを、液体培養培地（例えば、抗生物質を補充したＬＢブロス）中で一晩増殖させる。その後、この一晩培養物を、より大スケールの培養物を播種するために使用する。次いで、この細胞を、発現プロモーターが作動する間、所望の光学密度まで増殖させる。

【０３３６】

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

【０３３７】

ＰＲＯ３０１は、以下の手順を使用して、Ｅ．ｃｏｌｉにおいてポリＨｉｓタグ化形態で発現した。ＰＲＯ３０１をコードするＤＮＡを、最初に、選択したＰＣＲプライマーを使用して増幅した。このプライマーは、選択した発現ベクターにおける制限酵素部位に相当する制限酵素部位、ならびに効率的かつ信頼性のある転写開始、金属キレートカラムにおける高速精製、およびエンテロキナーゼによるタンパク質分解除去を提供する他の有用な配列を含む。次いで、ＰＣＲ増幅したポリＨｉｓタグ化配列を、発現ベクターに連結し、これを使用して、株５２（Ｗ３１１０　ｆｕｈＡ（ｔｏｎＡ）ｌｏｎ　ｇａｌＥ　ｒｐｏＨｔｓ（ｈｔｐＲｔｓ）ｃｌｐＰ（ｌａｃＩｑ））に基づくＥ．ｃｏｌｉ宿主を形質転換した。形質転換体を、まず、５０ｍｇ／ｍｌカルベニシリンを含むＬＢ中で、３～５のＯ．Ｄ．５００が達成されるまで３０℃で振盪して増殖させた。次いで、培養物を、ＣＲＡＰ培地（３．５７ｇの$(NH_4)_2SO_4$、０．７１ｇのクエン酸ナトリウムＡ２Ｈ２Ｏ、１．０７ｇのＫＣｌ、５．３６ｇのＤｉｆｃｏ酵母抽出物、５００ｍＬ水中の５．３６ｇ　Ｓｈｅｆｆｉｅｌｄハイカーゼ（ｈｙｃａｓｅ）ＳＦ、ならびに１１０ｍＭ　ＭＰＯＳ、ｐＨ　７．３、０．５５％（ｗ／ｖ）グルコースおよび７ｍＭの$MgSO_4$を混合することによって調製される）へ５０～１００倍に希釈し、そして３０℃にて約２０～３０時間振盪して増殖させた。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析による発現を確認するためにサンプルを取り出し、そしてバルク培養物を遠心分離して、細胞をペレットにした。細胞ペレットを精製およびリホールディングするまで冷凍した。

【０３３８】

０．５～１Ｌ発酵物（６～１０ｇのペレット）に由来するＥ．ｃｏｌｉペーストを、７Ｍグアニジン、２０ｍＭトリス、ｐＨ８緩衝液中の１０容積（ｗ／ｖ）に再懸濁させた。固体の亜硫酸ナトリウムおよびテトラチオン酸ナトリウムを添加して、それぞれ、０．１Ｍおよび０．０２Ｍの最終濃度にし、この溶液を４℃で一晩攪拌した。この工程は、亜硫酸化によってブロックされたシステイン残基を有する変性タンパク質を生じる。この溶液を、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｕｌｔｒａｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅで４０，０００ｒｐｍにて３０分間遠心分離した。上清を３～５容積の金属キレートカラム緩衝液（６Ｍグアニジン、２０ｍＭトリス、ｐＨ７．４）で希釈し、そして０．２２ミクロンのフィルターを通して濾過

し、清澄にした。得られた清澄抽出物を、金属キレートカラム緩衝液中で平衡化した５ｍｌのＱｉａｇｅｎ　Ｎｉ－ＮＴＡ金属キレートカラムにロードした。このカラムを、さらに５０ｍＭイミダゾール（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、Ｕｔｒｏｌ　ｇｒａｄｅ）（ｐＨ７．４）を含む緩衝液で洗浄した。タンパク質を、２５０ｍＭイミダゾールを含む緩衝液で溶出した。所望のタンパク質を含む画分をプールし、そして４℃で保存した。タンパク質濃度を、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を使用して２８０ｎｍでの吸光度によって推定した。

【０３３９】

タンパク質を、２０ｍＭトリス（ｐＨ８．６）、０．３Ｍ　ＮａＣｌ、２．５Ｍ尿素、５ｍＭシステイン、２０ｍＭグリシンおよび１ｍＭ　ＥＤＴＡからなる、新たに調製したリホールディング緩衝液中にゆっくりとサンプルを希釈することによってリホールディングした。リホールディング容積は、最終タンパク質濃度が５０～１００μｇ／ｍｌの間であるように選択した。リホールディング溶液を、４℃で１２～３６時間穏やかに攪拌した。このリホールディング反応を、ＴＦＡを０．４％の最終濃度（ｐＨ約３）まで添加することによってクエンチした。タンパク質のさらなる精製の前に、この溶液を０．２２ミクロンのフィルターを通して濾過し、そしてアセトニトリルを２～１０％の最終濃度まで添加した。リホールディングしたタンパク質を、１０～８０％のアセトニトリルの希釈勾配０．１％ＴＦＡの移動緩衝液を使用して、Ｐｏｒｏｓ　Ｒ１／Ｈ逆相カラムでクロマトグラフした。Ａ２８０吸光度を有する画分のアリコートを、ＳＤＳポリアクリルアミドゲルで分析し、同種のリホールディングタンパク質を含む画分をプールした。一般的に、ほとんどのタンパク質のうち適切にリホールディングされた種は、これらの種が逆相樹脂との相互作用から遮断された疎水性の内部を有して最もコンパクトであるので、最も低い濃度のアセトニトリルで溶出される。凝集した種は、通常は、より高いアセトニトリル濃度で溶出される。所望の形態からタンパク質の誤ってホールディングされた形態を解消することに加えて、逆相工程はまたサンプルからエンドトキシンを除去する。

【０３４０】

所望のホールディングされたＰＲＯ３０１タンパク質を含む画分を、それぞれ、プールし、そして溶液に指向された窒素の穏やかな流動を使用してアセトニトリルを除去した。タンパク質を、０．１４Ｍ塩化ナトリウムおよび４％マンニトールを含む２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ６．８）中に、透析によってか、または処方緩衝液中で平衡化し滅菌濾過したＧ２５　Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）樹脂を使用するゲル濾過によって処方した。

【０３４１】

（実施例１４）

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

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

【０３４２】

ベクターｐＲＫ５（１９８９年３月１５日に公開されたＥＰ３０７，２４７を参照のこと）を、発現ベクターとして使用する。必要に応じて、ＰＲＯ３０１ＤＮＡ、ＰＲＯ３６２ＤＮＡ、ＰＲＯ２４５ＤＮＡまたはＰＲＯ１８６８ＤＮＡを、選択した制限酵素でｐＲＫ５に連結し、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）に記載されるような連結方法を使用してＰＲＯ３０１ＤＮＡ、ＰＲＯ３６２ＤＮＡ、ＰＲＯ２４５ＤＮＡまたはＰＲＯ１８６８ＤＮＡの挿入を可能にする。得られたベクターを、それぞれ、ｐＲＫ５－ＰＲＯ３０１、ｐＲＫ５－ＰＲＯ３６２、ｐＲＫ５－ＰＲＯ２４５またはｐＲＫ５－ＰＲＯ１８６８と称する。

【０３４３】

１つの実施形態において、選択した宿主細胞は、２９３細胞であり得る。ヒト２９３細胞（ＡＴＣＣＬ　１５７３）は、培地（例えば、ウシ胎仔血清ならびに必要に応じて栄養成分および／または抗生物質を補充したＤＭＥＭ）中の組織培養プレートにおいてコンフ

ルエンスに増殖する。約１０μｇのｐＲＫ５－ＰＲＯ３０１、ｐＲＫ５－ＰＲＯ３６２、ｐＲＫ５－ＰＲＯ２４５またはｐＲＫ５－ＰＲＯ１８６８を、ＶＡ　ＲＮＡ遺伝子（Ｔｈｉｍｍａｐｐａｙａら、Ｃｅｌｌ、３１：５４３（１９８２））をコードする約１μｇのＤＮＡと混合し、そして５００μｌの１ｍＭトリス－ＨＣｌ、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．２２７Ｍ　$CaCl_2$中に溶解させる。この混合物に、５００μｌの５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３５）、２８０ｍＭ　ＮａＣｌ、１．５ｍＭ　$NaPO_4$を滴下し、２５℃で１０分間沈殿物を形成させる。この沈殿物を懸濁させ、そして２９３細胞に加え、３７℃で約４時間安定させる。この培養培地を吸引し、そしてＰＢＳ中の２ｍｌ　２０％グリセロールを３０秒間添加する。次いで、２９３細胞を無血清培地で洗浄し、新たな培地を加え、細胞を約５日間インキュベートする。

【０３４４】

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

【０３４５】

代替的な技術において、ＰＲＯ３０１ＤＮＡ、ＰＲＯ３６２ＤＮＡ、ＰＲＯ２４５ＤＮＡまたはＰＲＯ１８６８ＤＮＡは、Ｓｏｍｐａｒｙｒａｃら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ、１２：７５７５（１９８１）によって記載される硫酸デキストラン法を使用して一過性に２９３細胞に誘導され得る。２９３細胞を、スピナーフラスコ中で最大密度まで増殖し、そして７００μｇのｐＲＫ５－ＰＲＯ３０１ＤＮＡ、ｐＲＫ５－ＰＲＯ３６２ＤＮＡ、ｐＲＫ５－ＰＲＯ２４５ＤＮＡまたはｐＲＫ５－ＰＲＯ１８６８ＤＮＡを添加する。細胞を、まず、スピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、そしてＰＢＳで洗浄する。ＤＮＡ－デキストラン沈殿物を、細胞ペレット上で４時間インキュベートする。この細胞を、２０％グリセロールで９０秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、そして組織培養培地、５μｇ／ｍｌウシインスリンおよび０．１μｇ／ｍｌウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再導入する。約４日後、この条件培地を遠心分離し、そして濾過して細胞および細片を除去する。その後、発現したＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８を含むサンプルを濃縮し、そして任意の選択した方法（例えば、透析および／またはカラムクロマトグラフィー）によって精製し得る。

【０３４６】

別の実施形態において、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８は、ＣＨＯ細胞において発現され得る。ｐＲＫ５－ＰＲＯ３０１、ｐＲＫ５－ＰＲＯ３６２、ｐＲＫ５－ＰＲＯ２４５またはｐＲＫ５－ＰＲＯ１８６８は、公知の試薬（例えば、$CaPO_4$またはＣＥＡＥ－デキストラン）を使用して、ＣＨＯ細胞中にトランスフェクトされ得る。上記のように、細胞培養物は、インキュベートされ得、そして培地は、培養培地（単独）か、または放射標識（例えば、^{35}Ｓ－メチオニン）を含む培地と交換される。ＰＲＯ３０１ポリペプチド、ＰＲＯ３６２ポリペプチド、ＰＲＯ２４５ポリペプチドまたはＰＲＯ１８６８ポリペプチドの存在の決定後、培養培地は、無血清培地と交換され得る。好ましくは、培養物は、約６日間インキュベートされ、その後、この条件培地が収集される。発現したＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８を含む培地は、その後、濃縮され得、そして任意の選択した方法によって精製される。

【０３４７】

エピトープタグ化ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８はまた、宿主ＣＨＯ細胞で発現され得る。ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５また

はＰＲＯ１８６８は、ｐＲＫ５ベクターからサブクローン化され得る。サブクローン挿入は、インフレームで選択したエピトープタグ（例えば、ポリｈｉｓタグ）を用いてバキュロウイルス発現ベクターへ融合するためのＰＣＲを行い得る。その後、ポリｈｉｓタグ化ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８挿入物は、安定なクローンの選択のための選択マーカー（例えば、ＤＨＦＲ）を含むＳＶ４０駆動（ｄｒｉｖｅｎ）ベクターにサブクローン化され得る。最後に、ＣＨＯ細胞が、ＳＶ４０駆動ベクターと共に（上記のように）トランスフェクトされ得る。標識化は、発現を確認するために、上記のように行われ得る。その後、発現したポリｈｉｓタグ化ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８を含む培養培地は、濃縮され得、そして任意の選択した方法（例えば、Ni^{2+}キレートアフィニティクロマトグラフィー）によって精製され得る。

【０３４８】

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

【０３４９】

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

【０３５０】

ＰＣＲ増幅によって、それぞれのＤＮＡを、Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｏｆ ＭｏｌｅｃｕｌａｒＢｉｏｌｏｇｙ、Ｕｎｉｔ３．１６、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９９７）に記載される標準的技術を使用して、ＣＨＯ発現ベクターにサブクローン化した。ＣＨＯ発現ベクターは、一般的に、目的のＤＮＡに関して適合性の制限部位５＝および３＝を有して、従来のｃＤＮＡのシャトルを可能にするように構築される。ＣＨＯ細胞における発現のために本明細書中で使用されるベクターは、Ｌｕｃａｓら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２４：９（１７７４－１７７９（１９９６）に記載され、そしてＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーを使用して、目的のｃＤＮＡの発現およびジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）を駆動する。ＤＨＦＲ発現は、トランスフェクション後のプラスミドの安定な維持についての選択を可能にする。

【０３５１】

１２μｇの所望のプラスミドＤＮＡを、市販のトランスフェクション試薬Ｓｕｐｅｒｆｅｃｔ[7]（Ｑｉａｇｅｎ）、Ｄｏｓｐｅｒ[7]、またはＦｕｇｅｎｅ[7]（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を使用して、約１０００万個のＣＨＯ細胞に導入した。その細胞を、Ｌｕｃａｓら（前出）に記載されるように増殖させた。約3×10^{-7}細胞を、さらなる増殖および産生のために、以下に記載されるようにアンプル中で凍結させた。

【０３５２】

プラスミドＤＮＡを含むアンプルを、水浴中に置くことによって解凍し、ボルテックスにより混合した。この内容物を、１０ｍＬの培地を含む遠心管にピペットし、そして１０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。上清を吸引し、そして細胞を１０ｍＬの選択培地（５％ ０．２：ｍ ダイアフィルター処理したウシ胎仔血清を含む、０．２：ｍ フィルター処理したＰＳ２０）に再懸濁させた。その後、細胞を、９０ｍＬの選択培地を含む１００ｍＬスピナーにアリコートした。１～２日後、細胞を、１５０ｍＬの選択増殖培地で充填された２５０ｍＬスピナーに移し、３７℃でインキュベートした。さらに２～３日後、２５０ｍＬ、５００ｍＬ、および２００ｍＬのスピナーを、3×10^{5}細胞／ｍＬで播種した。この細胞培地を、遠心分離および産生培地中への再懸濁によって新しい培地と交換した。任意の適切なＣＨＯ培地が利用され得るが、実際には、１９９２年６月１６日発行の米国特許第５，１２２，４６９号に記載される産生培地を使用した。０日目に、３Ｌ産生スピナーを、1.2×10^{6}細胞／ｍＬにて播種し、そして細胞数およびｐＨを決定し

た。１日目に、スピナーからサンプル採取し、そしてフィルター処理した空気との散布を開始した。２日目に、スピナーからサンプルを採取し、温度を３３℃にシフトさせ、そして３０ｍＬの５００ｇ／Ｌグルコースおよび０．６ｍＬの１０％消泡剤（例えば、３５％ポリジメチルシロキサン乳濁液、Ｄｏｗ　Ｃｏｒｎｉｎｇ　３６５　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｇｒａｄｅ　Ｅｍｕｌｓｉｏｎ）を添加した。必要な場合、産生の全体にわたって、ｐＨが７．２付近に保たれるように調節した。１０日後、または生存度が７０％未満に低下した場合に、細胞培養物を、遠心分離によって収集し、そして０．２２：ｍフィルターを通して濾過した。濾液は、４℃で保存するか、または精製用カラムに即座にロードした。

【０３５３】

ポリＨｉｓタグ化構築物について、タンパク質を、Ｎｉ－ＮＴＡカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して精製した。精製前に、イミダゾールを５ｍＭの濃度まで、条件培地に添加した。この条件培地を、２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ７．４）、０．３ＭＮａＣｌおよび５ｍＭイミダゾールを含む緩衝液で平衡化した６ｍｌ　Ｎｉ－ＴＮＡカラムで、４～５ｍｌ／分の流速で、４℃にてポンピングした。ロード後、カラムをさらに平衡緩衝液で洗浄し、そしてタンパク質を、０．２５Ｍイミダゾールを含む平衡緩衝液で溶出した。その後、高度に精製したタンパク質を、１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、０．１４Ｍ　ＮａＣｌ、および４％マンニトールを含む保存緩衝液（ｐＨ６．８）中で、２５ｍｌ　Ｇ２５　Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）カラムを用いて脱塩し、－８０℃で保存した。

【０３５４】

タンパク質のイムノアドヘシン（Ｆｃ含有）構築物を、条件培地から以下のように精製した。条件培地を、２０ｍＭ　リン酸Ｎａ緩衝液（ｐＨ６．８）中で平衡化した、５ｍｌプロテインＡカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）上でポンピングした。ロード後、このカラムを、１００ｍＭクエン酸（ｐＨ３．５）での溶出前に、平衡緩衝液で十分に洗浄した。溶出したタンパク質を、１ｍｌ画分を２７５：ｌの１Ｍトリス緩衝液（ｐＨ９）を含む管に回収することによって、すぐに中和した。その後、高度に精製したタンパク質を、ポリＨｉｓタグ化タンパク質について上記のように保存緩衝液中で脱塩した。同質性を、ＳＤＳポリアクリルアミドゲルおよびエドマン分解によるＮ末端アミノ酸配列決定によって評価した。

【０３５５】

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

【０３５６】

（実施例１５）

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

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

【０３５７】

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

【０３５８】

次いで酵母細胞（例えば、酵母株ＡＢ１１０）を、上記の発現プラスミドを用いて形質

転換し得、そして選択した発酵培地中で培養し得る。形質転換した酵母の上清を、１０％トリクロロ酢酸を用いた沈降により分析し得、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、続いてクマシーブルー染色を用いてゲルを染色することにより分析し得る。

【０３５９】

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

【０３６０】

（実施例１６）

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

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

【０３６１】

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

【０３６２】

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

【０３６３】

次いで、発現されたポリＨｉｓタグ化ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８を、例えば、以下のとおりにNi^{2+}－キレートアフィニティクロマトグラフィーにより精製し得る。抽出物を、組換えウィルス感染Ｓｆ９細胞から、Ｒｕｐｅｒｔら、Ｎａｔｕｒｅ，３６２：１７５－１７９（１９９３）により記載されるように調製する。簡単にいうと、Ｓｆ９細胞を洗浄し、音波破砕緩衝液（２５ｍＬ Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ ７．９；１２．５ｍＭ $MgCl_2$；０．１ｍＭ ＥＤＴＡ；１０％グリセロール；０．１％ ＮＰ－４０；０．４Ｍ ＫＣｌ）に再懸濁し、そして氷上で２０秒間で２回、超音波処理する。超音波処理物を、遠心分離法により清澄にし、そして上清を、ローディング緩衝液（５０ｍＭリン酸塩、３００ｍＭ ＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ ７．８）に５０倍に希釈し、そして０．４５Ｆｍフィルターをとおして濾過される。Ni^{2+}－ＮＴＡアガロースカラム（Ｑｉａｇｅｎから市販される）を、総容積５ｍＬで調製し、２５ｍＬの水で洗浄しそして２５ｍＬのローディング緩衝液で平衡化する。濾過した

細胞抽出物を、０．５ｍＬ／分でカラム上へロードする。このカラムを、ローディング緩衝液を用いて基線A_{280}まで洗浄し、この時点で画分の回収を、開始する。次に、このカラムを、第二の洗浄緩衝液（５０ｍＭリン酸塩；３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ　６．０）を用いて洗浄し、この緩衝液は、非特異的に結合したタンパク質を溶出する。A_{280}の基線に再び達した後、このカラムを、第二の洗浄緩衝液中で０～５００ｍＭのイミダゾールの勾配を用いて進展させた。１ｍＬの画分を、収集し、そしてＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび銀染色またはアルカリホスファターゼ（Ｑｉａｇｅｎ）に結合したNi^{2+}－ＮＴＡを用いたウェスタンブロットにより分析した。溶出されたHis_{10}タグ化ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８を含有する画分は、プールし、そしてローディング緩衝液に対して透析する。

【０３６４】

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

【０３６５】

ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２およびＰＲＯ２４５を、バキュロウィルス感染Ｓｆ９昆虫細胞中で発現した。この発現は実際に、０．５～２Ｌの規模で実施したが、より大きな（例えば、８Ｌ）調製に容易にスケールアップし得る。このタンパク質は、ＩｇＧ構築物（イムノアドヘシン）として発現され、ここでこのタンパク質の細胞外領域を、ヒンジ、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含有するＩｇＧ１定常領域配列ならびに／またはポリ－Ｈｉｓタグ化形態内に融合した。

【０３６６】

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

【０３６７】

第一のウィルス増幅物上清を、使用し、ＥＳＦ－９２１培地（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ＬＬＣ）中で増殖させたＳｆ９細胞の撹拌培養物（５００ｍｌ）におよそ０．１のＭＯＩで感染させた。細胞を、２８℃で３日間インキュベートした。この上清を、収集し、および濾過した。バッチバインディングおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を、撹拌培養物の発現が確認されるまで、（必要な場合）繰り返した。

【０３６８】

トランスフェクトした細胞に由来する条件培地（０．５～３Ｌ）を、遠心分離法により収集して、細胞を除去し、０．２２ミクロンフィルターをとおして濾過した。ポリ－Ｈｉｓタグ化構築物について、このタンパク質の構築物を、Ｎｉ－ＮＴＡカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して精製した。精製前に、イミダゾールを、５ｍＭの濃度になるまで条件培地に添加した。条件培地を、４℃で４～５ｍｌ／分の流速で、２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ７．４）緩衝液（０．３Ｍ ＮａＣＩおよび５ｍＭイミダゾール含有）で平衡化した中の６ｍｌのＮｉ－ＮＴＡカラム上にポンプ注入した。ローディングの後、このカラムを、さらなる平衡緩衝液を用いて洗浄し、そしてこのタンパク質を、０．２５Ｍイミダゾールを含有する平衡緩衝液を用いて溶出した。高度に精製したタンパク質を続いて、２５ｍｌのＧ２５ Ｓｕｐｅｒｆｉｎｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）カラムを用いて、保存緩衝液（１０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、０．１４Ｍ ＮａＣｌおよび４％マンニトールを含有、ｐＨ ６．８）中で脱塩し、そして－８０℃で保存した。

【０３６９】

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

【０３７０】

ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２およびＰＲＯ２４５もまた、類似の手順を使用してバキュロウィルスに感染したＨｉｇｈ－５細胞内で発現された。Ｈｉｇｈ－５細胞を、２７℃で５０％コンフルエンシーになるまで増殖させた（CO_2無し、ペニシリン無しおよびストレプトマイシン無し）。各１５０ｍｍプレートについて、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２またはＰＲＯ２４５を含有する３０μｇのｐＩＥベースのベクターを、１ｍｌのＥｘ－Ｃｅｌｌ培地（培地：Ｅｘ－ｃｅｌｌ ４０１，１／１００ Ｌ－Ｇｌｕ ＪＲＨ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，番号１４４０１－７８Ｐ，注：培地は光感応性）と混合され、そして別々のチューブにおいて、１００μｌのＣＥＬＬＦＥＣＴＩＮ^{TN}（ＧｉｂｃｏＢＲＬ番号１０３６２－０１０）を、１ｍｌのＥｃ－Ｃｅｌｌ培地と混合した。ｐＩＥ１－１ベクターおよびｐＩＥ１－２ベクターを、安定に形質転換した昆虫細胞におけるバキュロウィルスｉｅ１プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計する（Ｃａｒｔｉｅｒ，Ｊ．Ｌ．ら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６８，７７２８－７７３７）（１９９４）。このプラスミドは、マルチクローニングサイトの向きについてのみ異なり、そして未感染昆虫細胞におけるｉｅ１媒介性の遺伝子発現に重要であることが公知である全てのプロモーター配列およびｈｒ５エンハンサーエレメントを含有する。ｐＩＥ１－１およびｐＩＥ１－２は、ｉｅ１翻訳開始点を含み、融合タンパク質を産生するために使用され得る。

【０３７１】

この二つの溶液を、混合しそして室温で１５分間インキュベートした。８ｍｌのＥｘ－Ｃｅｌｌ培地を、２ｍｌのＤＮＡ／ＣＥＬＬＦＥＣＴＩＮ^{TM}混合液に添加し、そしてＥｘ－Ｃｅｌｌ培地により予め洗浄されたＨｉｇｈ－５細胞上に重ねる。このプレートを、室温で１時間、暗所でインキュベートした。ＤＮＡ／ＣＥＬＬＦＥＣＴＩＮ^{TM}混合液を、吸引し、そしてこの細胞を、Ｅｘ－Ｃｅｌｌにより１回洗浄し、過剰なＣＥＬＬＦＥＣＴＩＮ^{TM}を除去した。新たにＥｘ－Ｃｅｌｌ培地（３０ｍｌ）を、添加し、そしてこの細胞を、２８℃で３日間インキュベートした。この上清を、収集し、そしてＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２またはＰＲＯ２４５の発現を、Ｓｆ９細胞について記載した様式と同一の様式でバッチバインディングにより決定した。

【０３７２】
（実施例１７）
（ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８に結合する抗体の調製）
この実施例は、モノクローナル抗体の調製を例示し、この抗体は、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８に特異的に結合し得る。
【０３７３】
モノクローナル抗体を産生するための技術は、当該分野において公知であり、および例えば、Ｇｏｄｉｎｇ（前出）において記載される。使用され得る免疫原としては、精製されたＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８を含有する融合タンパク質、ならびに細胞表面上に組換えのＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８を発現する細胞が挙げられる。免疫原の選択は、過度の実験なしで当業者によりなされ得る。
【０３７４】
マウス（例えばＢＡＬＢ／ｃ）を、完全フロイントアジュバント中に乳化させたＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８の免疫原を用いて免疫化し、そして１～１００μｇの量で皮下または腹腔内に注射する。あるいは、この免疫原を、ＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（Ｒｉｂｉ　Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，　Ｈａｍｉｌｔｏｎ，　ＭＴ）中に乳化し、そして動物の後ろ足の肉球に注射する。次いでこの免疫化マウスを、選択されたアジュバント中に乳化したさらなる免疫原を用いて、１０日～１２日後に追加免疫する。その後また、数週間、このマウスを、さらなる免疫化注射により追加免疫し得る。血清サンプルを、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて試験するため、眼窩後方の採血によりこのマウスから定期的に得て、ＰＲＯ３０１抗体、ＰＲＯ３６２抗体、ＰＲＯ２４５抗体およびＰＲＯ１８６８抗体を検出し得る。
【０３７５】
適切な抗体力価を、検出した後、抗体について「ポジティブ」の動物を、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８の最終の静脈注射により注射し得る。３日～４日後、このマウスを、屠殺し、そして脾臓細胞を、収集する。この脾臓細胞を次いで、選択したマウスの骨髄腫細胞株（例えば、Ｐ３Ｘ６３ＡｇＵ．１（ＡＴＣＣから入手可能、番号ＣＲＬ１５９７））に融合する（３５％ポリエチレングリコールを使用する）。この融合は、ハイブリドーマ細胞を生じ、これは次いで、ＨＡＴ（ヒポキサチン、アミノプテリン、およびチミジン）培地を含有する９６ウェルの組織培養プレートにプレート培養し得、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害し得る。
【０３７６】
このハイブリドーマ細胞を、ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８に対する反応性についてＥＬＩＳＡにおいて選別する。ＰＲＯ３０１、ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５またはＰＲＯ１８６８に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ」ハイブリドーマ細胞の決定は、当該分野の技術範囲内である。
【０３７７】
このポジティブハイブリドーマ細胞を、同系のＢＡＬＢ／ｃマウスへ、腹腔内注射し、そして抗ＰＲＯ３０１、抗ＰＲＯ３６２、抗ＰＲＯ２４５または抗ＰＲＯ１８６８モノクローナル抗体を含有する腹水を産生させ得る。あるいは、このハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコまたはローラーボトル内で増殖させ得る。腹水内に産生されたモノクローナル抗体の精製を、硫安塩析およびその後のゲル排除クロマトグラフィーを使用して達成し得る。あるいは、プロテインＡまたはプロテインＧに対する抗体の結合に基づくアフィニティクロマトグラフィーを、使用し得る。
【０３７８】
ヒトＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８のｃＤＮＡを、コロニーハイブリダイゼーショ

ンにより、ヒト結腸のｃＤＮＡライブラリーから単離した。ＰＲＯ２４５のヒトＩｇＧ１Ｆｃ融合タンパク質（イムノアドヘシン）（ＰＲＯ２４５．Ｆｃ、ＪＡＭ－ＩＴ．ＦｃまたはＪＡＭ２．Ｆｃとまた称される）およびＰＲＯ１８６８（ＰＲＯ１８６８．ＦｃまたはＪＡＭ３．Ｆｃ）を、Ａｓｈｋｅｎａｚｉら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎ．９：１９５（１９９７）に記載されるように調製し、そしてプロテインＡカラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，ＮＪ，ＵＳＡ）で精製した。同一性を、Ｎ－末端の配列分析により証明した。

【０３７９】

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

【０３８０】

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

【０３８１】

（実施例１８）

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

ＰＲＯ１８６８の同定を、ガラスチェンバースライドで増殖したＣＯＳ細胞内に分泌性タンパク質および膜貫通型タンパク質をコードするプールされたｃＤＮＡライブラリーを一過的にトランスフェクトすることにより行った。トランスフェクションの２４時間後、ＰＲＯ２４５融合体またはＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合体を、添加し（０．５μｇ／ｍｌ）、そして３０分間インキュベートした。ＰＲＯ２４５／ＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合体の結合を、測定した（Ｋｌｅｉｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３８７：７１７および３９２：２１０（１９９８））。ＰＲＯ２４５／ＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合体に対して結合する能力についてポジティブであったクローンを、さらなる特徴付けのために選択した。

【０３８２】

（実施例１９）

（軟骨細胞再分化の誘導）

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

【０３８３】

ブタの軟骨細胞を、４～６月齢の雌ブタの中手指節関節の関節軟骨を一晩コラゲナーゼ

消化することにより単離した。次いでこの単離細胞を、１０％ＦＢＳおよび４μｇ／ｍｌゲンタマイシンを含有するＨａｍＦ－１２に２５，０００細胞／ｃｍ^{2}で接種された。この培養培地は、３日ごとに交換し、次いでこの細胞を、１００μｌの同じ培地（血清なし）中に５，０００細胞／ウェルで９６ウェルプレートに接種し、そして１００μｌの試験ＰＲＯ１８６８ポリペプチド、５ｎＭスタウロスポリン（ポジティブコントロール）または培地のみ（ネガティブコントロール）を、最終容量２００μｌ／ウェルとなるように添加した。３７℃で５日間のインキュベーションの後、各ウェルの写真が、撮影されそしてこの軟骨細胞の分化状態を、決定した。アッセイにおけるポジティブな結果は、軟骨細胞の再分化がネガティブコントロールよりもポジティブコントロールにより類似したてイルと決定された場合に生じた（決定された場合）。

【０３８４】

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

【０３８５】

（実施例２０）

（癌性腫瘍におけるＰＲＯ１８６８ポリペプチドの過剰発現）

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

【０３８６】

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

【０３８７】

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

プルと比較した。このプールされた組織から単離されたｍＲＮＡは、これら異なる組織由来の発現遺伝子産物の混合物を示す。このプールされたコントロールサンプルを使用するマイクロアレイのハイブリダイゼーション実験は、２色分析において一次のプロットを生じた。次いで２色分析において生じたこの線の傾斜を、使用し、各実験における（試験：コントロールの検出）の比率を基準化した。次いで種々の実験に由来する基準化された比率を、比較し、遺伝子発現のクラスターを同定するために使用した。従って、プールされた「普遍的なコントロール」サンプルは、単純な２サンプルの比較において相対的な遺伝子発現の決定を有効にするだけではなく、多くの実験にわたる多サンプルの比較も可能にする。

【０３８８】

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

【０３８９】

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

【０３９０】

（実施例２１）

（細胞増殖の誘導）

（Ａ．内皮細胞の増殖）

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

【０３９１】

０日目において、プールされたヒト臍静脈内皮細胞（最大１２～１４回継代の細胞株に由来する）を、１００μｌごとに１０００細胞／ウェルで９６ウェルプレートにプレート培養しそして完全培地［補給物：ヒト内皮増殖因子（ｈＥＧＦ）、ウシ脳抽出物（ＢＢＥ）、ヒドロコルチゾン、ＧＡ－１０００、およびウシ胎児血清（ＦＢＳ，Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ）を加えた内皮細胞増殖培地（ＥＧＭ，Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ）］内で一晩インキュベートした。一日目において、完全培地を、基本培地［１％ＦＢＳを加えたＥＧＭ］により交換し、そして１％、０．１％および０．０１％でＰＲＯ１８６８ポリペプチドを添加した。７日目において、細胞増殖の評価を、ＡＬＡＭＡＲ　ＢＬＵＥ™アッセイ、続くクリスタルバイオレットにより実施した。結果を、コントロール緩衝液を用いて観察された細胞増殖に対する％として表した。

【０３９２】

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

【０３９３】

（Ｂ．ヒト冠状動脈の平滑筋細胞の増殖）

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

【０３９４】

０日目において、ヒト冠状動脈の平滑筋細胞（最大１２～１４回継代の細胞株に由来する）を、１００μｌごとに１０００細胞／ウェルで９６ウェルプレートにプレート培養し

、完全培地［補給物：インシュリン、ヒト内皮増殖因子（ｈＥＧＦ）、ヒト線維芽細胞増殖因子（ｈＦＧＦ）、ＧＡ－１０００、およびウシ胎児血清（ＦＢＳ，Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ）を加えた平滑筋増殖培地（ＳｍＧＭ，Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ）］内で一晩インキュベートした。一日目において、完全培地を、基本培地［１％ＦＢＳを加えたＳｍＧＭ］より交換し、そして１％、０．１％および０．０１％でＰＲＯ１８６８ポリペプチドを添加した。７日目において、細胞増殖の評価を、ＡＬＡＭＡＲ　ＢＬＵＥ™アッセイ、続くクリスタルバイオレットにより実施した。結果を、コントロール緩衝液を用いて観察された細胞増殖に対する％として表した。

【０３９５】

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

【０３９６】

（実施例２２）

（ＰＲＯ　ｍＲＮＡおよびポリペプチドの発現）

（Ａ．インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学）

ＰＲＯ３６２ｍＲＮＡ、ＰＲＯ２４５ｍＲＮＡおよびＰＲＯ１８６８ｍＲＮＡの発現を、種々の型の組織において、インサイチュハイブリダイゼーション、免疫組織化学およびＲＴ－ＰＣＲにより評価した。

【０３９７】

インサイチュハイブリダイゼーションのために、組織を固定し（４％ホルマリン）、パラフィン包埋し、切り出し（３～５μｍの厚さ）、脱パラフィンし、プロテイナーゼＫ（２０μｇ／ｍｌ）を用いて脱タンパク質化（３７℃で１５分間）し、そしてインサイチュハイブリダイゼーションのために処理する。本発明のポリペプチドに対するプローブを、ＰＣＲにより産生した。プライマーは、増幅生成物からセンスプローブまたはアンチセンスプローブのインビトロ転写を可能とするために、Ｔ７ポリメラーゼ開始部位またはＴ３ＲＮＡポリメラーゼ開始部位を含んだ。^{33}Ｐ－ＵＴＰ標識化センスプローブおよびアンチセンスプローブを、一晩ハイブリダイズ（５５℃）し、洗浄（５５℃で２時間０．１×ＳＳＣ）し、ＮＢＴ２核探知（ｎｕｃｌｅａｒ　ｔｒａｃｋ）エマルジョン（Ｅａｓｔｍａｎ　Ｋｏｄａｋ、Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ）に浸漬し、露光し（４℃で４～６週間）その後現像し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンを用いて対比染色した。代表的な一対の明イメージおよび暗イメージを、代表的に示す。

【０３９８】

免疫組織化学染色を、ＤＡＫＯ　Ａｕｔｏｓｔａｉｎｅｒを使用して５ｍｍの厚さの凍結切片上で実施した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ　ａｎｄ　Ｐｅｒｒｙブロッキング溶液（１：１０）を用いてブロッキングした（２０℃で４分間）。ＴＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＤＡＫＯ）中の１０％ＮＧＳを、希釈およびブロッキングに使用した。ＭＡｂ　４Ｆ７２２．２抗ＳＴＩｇＭＡ（抗ＰＲＯ３６２）またはマウスＩｇＧを、０．１３ｍｇ／ｍｌで使用した。ビオチン化ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）を、１：２００で使用し、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ　Ｓｔａｎｄａｒｄ　ＡＢＣ　Ｅｌｉｔｅ　Ｋｉｔ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）を用いて検出した。スライドを、Ｐｉｅｒｃｅ金属増強ジアミノベンジン（ｍｅｔａｌ－ｅｎｈａｎｃｅｄ　ｄｉａｍｉｎｏｂｅｎｚｉｄｉｎｅ）（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を使用して現像した。ＰＲＯ３６２（ＳＴＩｇＭＡ）およびＣＤ６８の発現についての二重免疫組織化学を、マクロファージへのＳＴＩｇＭＡ発現の局在を示すために凍結切片上で実施した。ｍＡｂ　４Ｆ７．２２．２抗ＳＴＩｇＭＡおよび抗ＣＤ６８　ｍＡｂ　ＫＰ－１（ＤＡＫＯ製）を、使用し、そしてフェコエリトリンおよびＦＩＴＣマーカーによりそれぞれ検出した。

【０３９９】

（１．検査した組織）
発現を、ヒトおよび他の哺乳動物に由来する広範な種々の組織および細胞型において調べた。
【０４００】
（ａ．正常組織）
調べた正常なヒト成体組織としては、扁桃腺、リンパ節、脾臓、腎臓、膀胱、肺、心臓、大動脈、冠状動脈、肝臓、胆嚢、前立腺、胃、小腸、結腸、膵臓、甲状腺、皮膚、副腎、胎盤、子宮、卵巣、精巣、網膜および脳（小脳、脳幹、大脳皮質）が挙げられた。正常なヒト胎児組織（Ｅ１２～Ｅ１６週齢の脳、脾臓、腸および甲状腺を含有する）をまた試験した。さらに、発現を、マウスの肝臓において調べた。
【０４０１】
（ｂ．炎症性組織）
インサイチュハイブリダイゼーションにより調べられた炎症性の組織としては、例えば、慢性的な喘息、慢性気管支肺炎、慢性気管支炎／慢性閉塞性肺疾患を伴う肺、慢性リンパ性間質性腎炎を伴う腎臓ならびに慢性炎症および肝硬変（慢性Ｃ型肝炎感染、自己免疫性肝炎またはアルコール性肝硬変に起因する）を伴う肝臓のような慢性炎症性疾患を伴う組織が挙げられた。
【０４０２】
（ｃ．原発性新生物）
ＰＲＯ３６２、ＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８の発現についてインサイチュハイブリダイゼーションにより調べられた原発性ヒト新生物としては、乳癌、肺扁平上皮細胞癌、肺性腺癌、前立腺性腺癌、および結腸腺癌が挙げられた。
【０４０３】
（２．結果）
（ａ．ＰＲＯ３６２の発現）
ＰＲＯ３６２は、マウスの肝臓の凍結切片（図２３）、ヒトの肝臓の凍結切片（図２４）および多数の組織マクロファージ様細胞（結腸マクロファージ（図２５Ａ）、クップファー細胞（図２５Ｂ）、副腎マクロファージ（図２５Ｃ）、ホーフバウアー細胞（図２５Ｄ）、滑膜細胞（図２６）、肺胞マクロファージ、腸固有層における常在マクロファージおよび多くの組織における間隙性マクロファージを含有する）において発現されることが見出された。ＰＲＯ３６２はまた、脳の小膠細胞において顕著に発現された。ＰＲＯ３６２の発現は新形成または炎症性疾患（リウマチ様関節炎（図２７）、炎症性腸疾患、慢性肝炎（図２８）、肺炎、慢性喘息（図２９）、神経膠腫（図３０）および気管支炎を含有する）の存在により活性化された場合、これらの組織において有意に増加した。
【０４０４】
ＰＲＯ３６２の発現をさらに調べるために、免疫組織化学染色を、種々の組織型について実施した。組織マクロファージ（副腎のマクロファージを含有する、肝臓のクップファー細胞、脳の小膠細胞、および胎盤のホーフバウアー細胞）上で実施されたＰＲＯ３６２およびＣＤ６８についての二重免疫組織化学染色を、ＰＲＯ３６２およびＣＤ６８が、同一の組織において発現されるか否かを決定するために実施した。
【０４０５】
ＰＲＯ３６２は、副腎のマクロファージ（図３５）、肝臓のクプファー細胞（図３６）、脳の小膠細胞（図３７）、および胎盤のホーフバウアー細胞（図３８）上においてＣＤ６８と同時発現することを見出した。
【０４０６】
（ｂ．ＰＲＯ２４５の発現）
ＰＲＯ２４５は、上皮組織および炎症性組織に顕著に局在化していることを見出した。
【０４０７】
（ｉ）正常組織
正常成体ヒト組織におけるＰＲＯ２４５　ｍＲＮＡの発現は、扁桃およびリンパ節（図

３１）における高内皮小静脈（ＨＥＶ）、精巣の精細管における上皮の精子形成細胞（図３２ＩおよびＪ）、ならびに胎盤の中間型栄養膜において顕著であった。

【０４０８】

正常ヒト胎児組織におけるＰＲＯ２４５　ｍＲＮＡの発現は、内皮細胞において顕著であったが、より具体的には、小血管および大血管（毛細血管を除く）の血管内皮、腸間膜の血管、腸壁の壁在性血管、ならびに発生段階の腸間膜リンパ節および甲状腺の小血管において見出された。

【０４０９】

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

【０４１０】

（ｉｉ）炎症性組織

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

【０４１１】

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

【０４１２】

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

【０４１３】

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

【０４１４】

（ｉｉｉ）新生物の組織

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

【０４１５】

ＰＲＯ２４５の発現は、精巣上体の血管内皮および精巣癌または精上皮腫における慢性リンパ球性炎症部位内、肺腺癌の慢性リンパ球性炎症部位内の腫瘍病巣の血管内皮細胞、肺扁平上皮細胞癌における慢性リンパ球性炎症部位内の腫瘍病巣における血管内皮細胞、

乳癌の慢性リンパ球性炎症の腫瘍病巣に隣接する血管内皮細胞およびその炎症部位内の血管内皮細胞内、ならびに小動脈、静脈、および軟骨肉腫における毛細血管の血管内皮細胞内に隣接する部位において見出された。

【０４１６】

（ｃ．ＰＲＯ１８６８の発現）

ＰＲＯ１８６８は、ＮＫ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞および樹状細胞上に発現されることが見出された。

【０４１７】

（Ｂ．逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ））

逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）は、逆転写によるＲＮＡからのｃＤＮＡ合成からなるｍＲＮＡの検出および定量のための高感度技術である。ＰＲＯ１８６８の発現を検出するために、ＰＲＯ１８６８　ｍＲＮＡの存在を、ＲＴ－ＰＣＲにより検出した。

【０４１８】

ＰＲＯ１８６８　ｍＲＮＡをＴ細胞株（Ｊ４５およびＭｏｌｔ５）において逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）により有意に検出したが、Ｂ細胞株（ＪＹ、ＲＰＭＩ８８６６およびＲＡＭＯＳ）においては有意に検出しなかった（図３９）。

【０４１９】

（実施例２２）

（特定の細胞型とのＰＲＯ２４５の相互作用）

フローサイトメトリーにより決定されるとおり、末梢血細胞は、顕著にＰＲＯ２４５を発現しない（表６、上半分）。ＰＲＯ２４５が末梢血細胞の別個の一部分と相互作用するか否かを決定するために、多数のＰＲＯ２４５－細胞アッセイを実施した。これらは、ＰＲＯ２４５と相互作用する細胞の磁性選別またはＦＡＣＳ選別を含んだ。末梢血を、以下に記載されるように全ての実験のために得た。

【０４２０】

（Ａ．磁性選別およびフローサイトメトリー）

末梢血白血球とＰＲＯ２４５が相互作用するか否かを決定するために、ビオチン化ＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合タンパク質を、以下に記載されるとおりに生成した。ＰＲＯ２４５と相互作用する末梢血白血球を、ストレプトアビジン結合体化磁性ビーズを使用して単離した。次いで単離細胞を、表面のＣＤ－Ａｇの発現について調べた。ビオチン化ＰＲＯ２４５ヒトＩｇＧ融合体を使用して得られた結果を、ビオチン化ヒトＩｇＧを使用する結果と比較した。

【０４２１】

ビオチン化ＰＲＯ２４５ヒトＩｇＧ融合タンパク質またはヒトＩｇＧ１タンパク質を、ＳｅｒＦ緩衝液（フェノールレッドまたは１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で緩衝した重炭酸ナトリウム（ＨＢＳＳ＋；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を含まないＨＢＳＳ中０．１％　ＮａＮ３（ｗ／ｖ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を添加した１０％　ＦＢＳ（ｖ／ｖ；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ｐＨ　７．４）中で、ＰＢＭＣ（１０μｇ／１０^{7}）と共に４℃で１時間インキュベートした。細胞を、ＳｅｒＦ緩衝液中で洗浄し、そして８０μｌ／１０^{7}細胞で再懸濁した。ストレプトアビジン磁性ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を、２０μｌ／１０^{7}細胞で添加し、そして４℃で１５分間インキュベートし、ＳｅｒＦ緩衝液で洗浄し、５００ｍｌ／１０^{8}細胞に再懸濁し、そしてポジティブ選択を行うＭＡＣＳカラムに通した。ポジティブ選択した細胞は、製造者の指示書どおりに溶出し、ＳｅｒＦ緩衝液で洗浄し、そして条件ごとに２×１０^{5}細胞で表面のＣＤ　Ａｇについてフローサイトメトリーにより分析した。このデータを、フローサイトメトリーのための染色条件ごとに収集した総２×１０^{5}細胞におけるポジティブ染色された細胞の割合を表しているポジティブの割合として表す。

【０４２２】

（１．タンパク質結合）
ＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合体、ヒトＩｇＧ１、またはＰＲＯ３６２－ヒトＩｇＧ融合体を、室温で３０分間、ＰＢＳ中１ｍｇのタンパク質ごとに２００μｇのＥＺ－Ｌｉｎｋスルホ－ＮＨＳ－ＬＣ－ビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いてビオチン化した。ビオチン化は、（終濃度）２００ｍＭ　Ｔｒｉｓ、（ｐＨ　８）の添加によりクエンチされ、そして室温で３０分間インキュベートした。次いでビオチン化タンパク質を、ＰＢＳに対して大量に透析し、そしてＣｅｎｔｒｉｃｏｎ－１０マイクロコンセントレーター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）を用いて２ｍｇ／ｍｌの濃度まで濃縮した。
【０４２３】
Ａｌｅｘａ－４８８（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）タンパク質結合キットを、ＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合体またはヒトＩｇＧ１上へのＡｌｅｘａ－４８８の結合についての製造者の指示書どおりに使用した。
【０４２４】
（２．フローサイトメトリー）
フローサイトメトリーの分析に使用される細胞を、ＳｅｒＦ緩衝液を用いて４℃で３０分間ブロッキングし、そしてＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１４、ＣＤ１９またはＣＤ５６に対する抗体（ＦＩＴＣ、ＰＥもしくはＣｙＣｈｒｏｍｅ（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）のいずれかに結合する）を用いて染色した。
【０４２５】
（３．結果）
末梢血白血球の以下：Ｔ細胞（ＣＤ３＋）、ＣＤ８＋細胞、Ｂ細胞（ＣＤ１９＋）およびＮＫ細胞（ＣＤ５６＋）の４つの細胞群が、ＰＲＯ２４５と顕著に相互作用することを見出した。単一の実験においてＰＲＯ２４５と相互作用することが可能であった細胞の割合は、以下：ＣＤ３＋細胞について２０．９９％、ＣＤ８＋細胞について６．６８％、ＣＤ１９＋細胞について９．６６％、およびＣＤ５６＋細胞について３６．８９％のとおりであった。ヒトＩｇＧコントロールと相互作用することが可能であった細胞の割合は、以下：ＣＤ３＋細胞について２．３９％、ＣＤ８＋細胞について１．７８％、ＣＤ１９＋細胞について４．４２％、およびＣＤ５６＋細胞について６．６９％のとおりであった。
【０４２６】
（Ｂ．ＦＡＣＳ選別およびフローサイトメトリー）
ＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合タンパク質に結合する末梢血細胞を、ＦＡＣＳ選別により選別した。
【０４２７】
ＦＡＣＳ選別のために、細胞を、改変されたＳｅｒＦ緩衝液（５μｇ／ｍｌの抗ＣＤ１６抗体３Ｇ８（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）および２０μｇ／ｍｌのヒトＩｇＧ１（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）を含有するＳｅｒＦ緩衝液）においてＡｌｅｘａ－４８８－結合体化ヒトＩｇＧ１またはＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合タンパク質（１０μｇ／１０^{6}細胞）と共にインキュベートし（４℃で３０分間）、洗浄し、そしてＥｌｉｔｅ　ＥＳＰ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｍｉａｍｉ，ＦＬ）で選別した。これらの条件において、Ａｌｅｘａ－４８８－結合体化ＰＲＯ２４５またはヒトＩｇＧは、バックグラウンドとして使用した。競合アッセイにおいて、コンペティター（２０μｇ／１０^{6}細胞）を、Ａｌｅｘａ－４８８－結合体化ＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合タンパク質またはヒトＩｇＧが導入される前に、ＳｅｒＦ緩衝液中で室温で２０分間、細胞と混合した。次いでこの細胞を、洗浄し、そして上記のとおりフローサイトメトリーにより分析した。
【０４２８】
ＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合タンパク質（ＪＡＭ－ＩＴ．Ｆｃ）と相互作用する細胞の、１２．５％は、ＣＤ３＋Ｔ細胞であり、３２．４％は、ＣＤ８＋Ｔ細胞であり、そして５０．４％は、ＣＤ５６＋ＮＫ細胞であった。ＣＤ１９＋Ｂ細胞は、ＦＡＣＳ選別アッセイにおいては検出されなかった。ＣＤ５６＋ＮＫ細胞の、２２．４％は、ＣＤ３を発現

しそして４０．２％は、ＣＤ８を発現した。ＣＤ８＋Ｔ細胞の、２３．５％は、ＣＤ３を発現し、そして７３．２％は、ＣＤ５６を発現した（図４０）。

【０４２９】

【表６】

表６：末梢血細胞におけるＰＲＯ２４５の発現およびＰＲＯ２４５に対する末梢血細胞の結合

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

（Ｃ．精製した細胞への結合）

精製したＢ細胞、好中球、ＣＤ１４＋単球、末梢血樹状細胞（ＰＢＤＣ）（Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）製）、ネガティブ選択により得られた末梢血ＣＤ５６＋ＮＫ細胞、およびＪ４５（ＣＤ３＋Ｔ細胞株）を、フローサイトメトリーにより、Ａｌｅｘａ－４８８－結合体化ＰＲＯ２４５ヒトＩｇＧ融合タンパク質と相互作用するこれらの能力について分析した。Ａｌｅｘａ－４８８－結合体化ヒトＩｇＧ１タンパク質と相互作用する能力を、コントロールと同時に分析した。

【０４３０】

血液を、静脈の穿刺により健康な成人の志願者から入手し、そして製造者の指示書どおりにＦｉｃｏｌｌ－Ｐｌａｑｕｅ ＰＬＵＳ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して分離した。ＰＢＭＣを、その界面から入手し、冷ＰＢＳ中で洗浄し、必要に応じて溶解し（３０秒間０．２％ＮａＣｌを用いて、そして１．６％ＮａＣｌを用いて中和化）、計数し、そして使用するまで５×１０^{7}細胞／ｍｌで氷上に維持した。フローサイトメトリー分析により、混入のない血小板を、精製したＰＢＭＣ画分に観察した。好中球を、混入するＲＢＣの溶解の後、ペレットから入手した。好中球を、冷ＰＢＳ中で洗浄し、計数し、そして使用されるまで氷上で５×１０^{7}細胞／ｍｌで維持した。末梢血の一部を単離するために、「非接触（ｕｎｔｏｕｃｈｅｄ）」ＭＡＣＳキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡ）を、製造者の指示書に従って使用した。

【０４３１】

精製したＢ細胞、好中球およびＣＤ１４＋単核球は、フローサイトメトリーにより検出されようなＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合タンパク質と相互作用しなかった。しかし、多数の他の細胞型は、ＰＲＯ２４５．Ｆｃと相互作用することを見出した。図４１は、ＣＤ５６＋ＮＫ細胞と相互作用するＰＲＯ２４５．Ｆｃを示す。この相互作用は、抗ＰＲＯ２

４５抗体の添加によりブロッキングされるように特異的であった。ＰＲＯ１８６８（また７７６２４、ＪＡＭ３およびＳＨＡＴｒと称される）が、ＰＲＯ２４５とＣＤ５６＋ＮＫ細胞との相互作用をブロッキングすることを見出した（図４６の下および図５３の右下）。非標識化に加え、Ｈｉｓタグ化ＰＲＯ１８６８（ＪＡＭ３）は、ＰＲＯ２４５．Ｆｃの添加により観察される蛍光の偏位をブロッキングした。一方、図５３（右上）に見られ得るとおり、ＰＲＯ３０１の添加は、ＰＲＯ２４５とＮＫ細胞との相互作用をブロッキングしない。

【０４３２】

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

【０４３３】

さらに、Ｊ４５　Ｔ細胞（これは検出可能なＰＲＯ２４５の表面の発現を有さない）が、ＰＲＯ２４５と相互作用することを見出した（図４３および４４）。Ａｌｅｘａ－４８８結合体化ＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質とＪ４５細胞との間の相互作用を、結合体化ヒトＩｇＧ１（図４４）と比較した場合蛍光のピークの偏位により検出した。この偏位を、抗ＰＲＯ２４５抗体の添加によりブロッキングした（図４４）。Ａｌｅｘａ－４８８結合体化ＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質とＪ４５細胞との間のこの相互作用をまた、非標識化ＰＲＯ１８６８（Ｈｉｓ－ＰＲＯ１８６８タンパク質）により阻害した（図４５）。さらに、抗ＰＲＯ１８６８抗体（ＭａＪＩＲ１）が、ＰＲＯ２４５依存性Ｊ４５接着を阻害することを見出したが、マウスＩｇＧは、接着に影響を及ぼさなかった（図５２）。

【０４３４】

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

【０４３５】

（Ｄ．プレートベースの接着アッセイ）

ＰＲＯ２４５と相互作用することが可能である細胞のプレートベースの分析のために、マイクロタイターウェル（ＮＵＮＣ　Ｍａｘｉｓｏｒ　９６－ウェルプレート；ＶＷＲ，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｂｒｉｓｂａｎｅ，ＣＡ）を、５０μｌ／ウェル（ＨＢＳＳ＋内に）、１０μｌ／ｍｌを室温で２時間（特に断りのない限り）の条件でコーティングした。接着アッセイのために、５０μｌ（１０μｇ／ｍｌ）のヤギ抗ヒトＩｇＧＦｃ特異的抗体（例えば、ＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合タンパク質）を初めにコーティングし、そしてさらなるコーティングの条件の付加の前に室温で１時間、結合／ブロッキング緩衝液（ＢＢＢ；１０％（ｖ／ｖ）ＦＢＳ含有するＨＢＳＳ＋）中において条件の付加前にブロッキングした。細胞（ＢＢＢ中５×１０^{6}細胞／ｍｌ）を、５ｍｇ／ｍｌの２’，７’－ビス－（２－カルボキシエチル）－５（および－６）－カルボキシフルオレセイン、アセチオキシメチルエステル（ＢＣＥＣＦ　ＡＭ）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）で処理し（５％CO_2を用いて３７℃で１０分間）、洗浄し、そして３７℃／５％CO_2において１時間コートされたウェル（ＢＢＢ中に２×１０^{5}細胞／ウェル）に接着させた。

【０４３６】

プレートを、適用された全ての蛍光についてＳｐｅｃｔｒａＭａｘ蛍光プレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）上で読みとり、

３回穏やかに洗浄し（２８－ゲージの針を用いた吸引により）、そして全ての付着性の蛍光を読みとった。付着の割合を、以下の式：（（付着性の総蛍光）／（適用された総蛍光））×１００を使用して計算した。ＢＢＢでコートされたウェルから構成されるブランクのウェルを、ＢＣＥＣＦ　ＡＭ－標識化Ｊ４５細胞に曝した。このブランクのウェルから得た値（付着の割合）を、最終値を誘導するために全ての実験条件から差し引いた。

【０４３７】

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

【０４３８】

（実施例２３）

（ＰＲＯ２４５のためのレセプターの同定）

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

【０４３９】

（Ａ．ＣＤ５６＋ＮＫ細胞およびＪ４５細胞）

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

【０４４０】

（１．ビオチン化）

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

【０４４１】

（２．溶解）

細胞を、４℃で３０分間、溶解緩衝液（７ｍｌの溶解緩衝液あたり１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００および１個のＣｏｍｐｌｅｔｅ－Ｍｉｎｉ　ＥＤＴＡフリープロテアーゼインヒビター錠（Ｒｏｃｈｅ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を含有するＨＢＳＳ＋）を用いて溶解した（10^8細胞／ｍｌ）。溶解産物を、４℃で１時間、２２，０００×ｇで回転させ、そして０．２μｍで濾過した。溶解産物を、４℃で２時間、５μｌ／10^6細胞の組換えプロテインＡビーズ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を用いて予め浄化した。

【０４４２】

（３．免疫沈降）

浄化した溶解産物を、０．２μｍで濾過し、そして５μｇ／10^6細胞のＰＲＯ２４５－ヒトＩｇＧ融合タンパク質またはヒトＩｇＧ１（ＩｍｍｕｎｏＰｕｒｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　ＩｇＧ　Ｐｌｕｓ　Ｏｒｉｅｎｔａｔｉｏｎキット（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用してプロテインＡマトリックスに結合されたもの）のいずれかと共に４℃で２時間インキュベートした。ビーズを、ペレット化し、そして溶解緩衝液を用いて洗浄し、そして１５μｌ／10^6細胞の非還元性のＳＤＳサンプル緩衝液（２ｍＭヨードアセトアミドを含有する、ＤＴＴまたは２－メルカプトエタノールを含有しない標準サンプル緩衝液）の添加により変性し、そして１００℃で３分間、煮沸した。

【０４４３】

（４．ウェスタンブロッティング）

１５μｌ／レーンの濃度でサンプルを、４～２０％のＢｉｏ－Ｒａｄ　Ｔｒｉｓ－ＨＣ

ｌ Ｒｅａｄｙ Ｇｅｌ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）上で分離し、そして４℃で２時間１００ｍＡで、０．２μｍのＰｒｏｔｒａｎニトロセルロース膜（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ ＆ Ｓｃｈｕｅｌｌ，Ｋｅｅｎｅ，ＮＨ）上へ移した。ブロットを、Ｂｌｏｔｔｏ（５％無脂肪乳および０．０５％ＴＷＥＥＮ™２０；Ｂｉｏ－Ｒａｄを含有するＴＢＳ）内で１時間、ブロッキングした。ビオチン化されたサンプルについては、ＨＲＰ－結合体化ストレプトアビジン（Ｐｉｅｒｃｅ）を、室温で３０分間、０．５μｇ／ｍｌで使用した。非ビオチン化であるサンプルについては、抗ＰＲＯ１８６８抗体（ＭａＪＩＲｌ）を、Ｂｌｏｔｔｏ内１０μｇ／ｍｌで使用し、そして室温で３０分間、Ｂｌｏｔｔｏ内１μｇ／ｍｌのＨＲＰ－結合体化ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｃａｌｔａｇ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）の適用前に、２５℃で１時間インキュベートした。ブロットを、ＴＴＢＳ（０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＴＢＳ）を用いて全体的に洗浄した（そしてＥＣＬ Ｐｌｕｓ試薬（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を用いて現像した（Ｋｏｄａｋ ＢｉｏＭａｘ ＭＬフィルム上への感光およびＫｏｄａｋ Ｍ３５Ａ Ｘ－ ＯＭＡＴ Ｆｉｌｍ Ｐｒｏｃｅｓｓｏｒ（Ｅａｓｔｍａｎ Ｋｏｄａｋ）用いた現像の前に）。

【０４４４】

（５．結果）

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

【０４４５】

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

【０４４６】

（６．ＥＬＩＳＡによるＰＲＯ２４５とＰＲＯ１８６８との間の結合の確認）

抗ＰＲＯ１８６８抗体、精製したＰＲＯ２４５およびＰＲＯ１８６８融合タンパク質を使用して、ＰＲＯ２４５とＰＲＯ１８６８との間の相互作用を、プレートベースのアッセイにおいて確認した。プレートに結合したＰＲＯ１８６８－Ｆｃ融合タンパク質（ＪＡＭ３．Ｆｃ）またはコントロールのヒトＰＲＯ３０１－Ｆｃ融合タンパク質（ｈｕＪＡＭ．Ｆｃ）を、０．２５μｇ／ウェルのマウスＩｇＧまたは抗ＰＲＯ１８６８抗体の存在下において、ビオチン化ＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質に曝した（図５０）。ストレプトアビジンＨＲＰを、ＰＲＯ２４５－Ｆｃビオチンに対するＰＲＯ１８６８－Ｆｃ融合タンパク質でコートされたウェルとの間の結合を検出するために使用した。あるいは、ＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合体を、プレート上に捕捉し、そしてビオチン化ＰＲＯ１８６８－Ｆｃ融合体を、ＰＲＯ２４５－ＰＲＯ１８６８の相互作用を検査するために特異的な濃度で使用した（図５１）。さらに、抗ＰＲＯ１８６８抗体および坑－ＰＲＯ２４５抗体によるＰＲＯ２４５とＰＲＯ１８６８との間のこのようなプレートベースの相互作用の阻害を、試験した。

【０４４７】

ＥＬＩＳＡのために、このプレートを、室温で３０分間、ＢＢＢを用いてコートティングする条件の後ブロッキングし、そして室温で１時間、結合する条件を用いてインキュベ

ートした。ＥＤＴＡを必要とする条件については、改変されたＢＢＢ（標準ＨＢＳＳ＋の代わりにＥＤＴＡを含有し、カルシウムおよびマグネシウムを含まないＨＢＳＳ）を、この実験をとおして使用した。プレートを、３回洗浄し、室温で３０分間、１μｇ／ｍｌのストレプトアビジンＨＲＰ（Ｐｉｅｒｃｅ）と共にインキュベートし、そしてテトラメチルベンジジン基質（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を使用して呈色現像を介して評価し、そしてＴｈｅｒｍｏＭａｘ Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ Ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ）上で読みとった。

【０４４８】

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

【０４４９】

（Ｂ．潜在的なレセプターのパネル）

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

【０４５０】

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

する。ポジティブの相互作用を、特定のＰＲＯ１８６８ポリペプチドレセプターまたはレセプターのプールをコードするｃＤＮＡを用いてトランスフェクトされた細胞の蛍光標識の存在、および他のｃＤＮＡまたはｃＤＮＡのプールを用いてトランスフェクトされた同様に調製された細胞の類似の蛍光標識が存在しないことにより判断する。ｃＤＮＡ発現ベクターの規定されたプールが、ＰＲＯ２４５ポリペプチド免疫アドヘシンとの相互作用についてポジティブであると判断される場合、このプールを含有する個々のｃＤＮＡ種を、ＰＲＯ２４５ポリペプチド免疫アドヘシンと相互作用し得るレセプターをコードする特定のｃＤＮＡを決定するためにそれぞれ試験する（このプールは「分析される」）。

【０４５１】

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

【０４５２】

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

【０４５３】

（Ｃ．ＪＡＭファミリータンパク質）

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

【０４５４】

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

【０４５５】

上記の結果に基づく、ＰＲＯ２４５は、ＰＲＯ１８６８と相互作用する。

【０４５６】

（実施例２４）

（慢性炎におけるＳＴＩｇＭＡ（ＰＲＯ３６２）の関与）

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

【０４５７】

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

【０４５８】

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

【０４５９】

（材料および方法）

（細胞）

血液を、静脈の穿刺により健康な成人の志願者から得、そして製造者の指示書どおりにＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ ＰＬＵＳ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して分離した。ＰＢＭＣを、界面から得、冷ＰＢＳ中で洗浄し、３０秒間０．２％ＮａＣｌを用いて溶解し、そして１．６％ＮａＣｌを用いて中和化した。細胞を、計数し、そして使用するまで氷上に維持した。末梢血の一部を単離するために、にＭＡＣＳキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）を、製造者の指示に従って使用した。分化したマクロファージを培養するために、ネガティブ選択された単球を、２０％ウシ胎仔血清および１０％ヒト血清を含有するＨＧＤＭＥＭの６ウェルに培養皿に移動した。培地を、５日で交換した。フローサイトメトリー分析のために、細胞を、氷冷した細胞解離溶液（Ｓｉｇｍａ）を使用して培養皿から解離した。ウエスタンブロット分析のための溶解産物を、ウェルの直接０．５ｍｌの溶解緩衝液を添加することにより調製した。溶解産物を、ＳＤＳおよびβ－メルカプトエタノールを含有するサンプル緩衝液と混合し、Ｔｒｉｓ－グリシンゲル上で泳動し、そしてニトロセルロース膜へ転移した。

【０４６０】

（フローサイトメトリー）

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

【０４６１】

（細胞－細胞接着研究）

全長ＳＴＩｇＭＡを含有するｐＲＫ発現ベクターは、他に記載されるとおりネオマイシン選択およびオートクローン選別を使用して、ヒトジャーカットＴ細胞株において安定して発現した。細胞を、蛍光色素ＢＣＥＣＦ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｏｒｅｇｏｎ）を用いて予め負荷し、そして１０ｎｇ／ｍｌのＴＮＦαを用いてかまたは用いずに処理した単層のヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）でコートティングした９６ウェルＭａｘｉｓｏｒｂプレート（ＣＯＲＮＩＮＧ^{TM}）に添加した。細胞を、インキュベーション緩衝液（１０ ｍＭＣａＣｌ、１０ｍＭ マグネシウムおよび１．５ｍＭ ＮａＣｌを含有するＨＢＳＳ）を用いてこのウェルを負荷し、続いてブロッティング紙の小片上でこのプレートを逆さにすることにより穏やかに洗浄した。３回の洗浄の後、蛍光を、蛍光分

光計において計数した。蛍光の読み出し情報は、ＨＵＶＥＣ細胞に接着し続ける細胞の数を表す。

【０４６２】

（ノーザンブロット分析）

複数の組織のノーザンブロット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）を、製造者の推奨に従ってＡｍｂｉｏｎキット使用してランダムにスプライシングした全長ＳＴＩｇＭＡ　ｃＤＮＡの^{32}Ｐ標識化プローブを用いて精査した。ブロットを、ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｍａｇｉｎｇスクリーンに露光され、そしてＳｔｏｒｍ　ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｍａｇｅｒを用いて分析した。

【０４６３】

（リアルタイムＲｔＰＣＲ分析）

定量的なＰＣＲ分析（ＴＡＱＭＡＮ^{TM}）のために、ヒト組織または原発細胞（１００ｎｇ）に由来する総ｍＲＮＡが、ＳＴＩｇＭＡのコード配列に基づくプライマーと共に推奨された（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）。

【０４６４】

（Ｆｃ－融合タンパク質およびＨｉｓ－融合タンパク質産生）

ヒトＳＴＩｇＭＡを、バキュロウィルス発現ベクターｐＨＩＦ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）へクローン化した。このＨｉｓ－タグ化ＳＴＩｇＭＡ融合タンパク質は、８個のヒスチジンに融合したＳＴＩｇＭＡの細胞外ドメインから構成された。Ｈｉｓタグ化融合タンパク質を、ニッケルアフィニティ樹脂を使用して懸濁液中において増殖したバキュロウィルス感染昆虫細胞の上清から精製した。

【０４６５】

（モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の産生）

ＢＡＬＢｃの雌を、前述のように免疫化し、そして肉球への注射を介した１０μｇのＳＴＩｇＭＡ－Ｈｉｓ８を用いて追加免疫した。単一のクローンを、ＥＬＩＳＡによりＳＴＩｇＭＡ（ＰＲＯ３６２）－Ｈｉｓに対して選別した。スクリーニングしたクローンを、ＪＡＭファミリーメンバーおよびヒトＩｇＧ　Ｆｃに対して試験した。クローンを、単一の細胞密度まで滴定しそして再スクリーニングした。クローン３Ｃ９（ＩｇＧ１）を、ＳＴＩｇＭＡに対して選択的に反応することを見出した。クローンを、腹水の産生のために使用し、そしてプロテインＧ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）上に精製した；タンパク質の濃度を、Ｐｉｅｒｃｅ　ＢＣＡ試薬（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を使用して決定した。

【０４６６】

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

【０４６７】

（インサイチュハイブリダイゼーション）

ＰＣＲプライマー（上流５’－ＴＣＴＣＴＧＴＣＴＣＣＡＡＧＣＣＣＡＣＡＧ（配列番号３５）および下流５’－ＣＴＴＴＧＡＧＧＡＧＴＣＴＴＴＧＡＣＣ（配列番号３６））を、ｈｕＪＡＭ４の７００ｂｐのフラグメントを増幅するために設計した。プライマーは、増幅生成物に由来するセンスプローブまたはアンチセンスプローブ各々のインビトロ転写を可能にするＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ開始点またはＴ３　ＲＮＡポリメラーゼ開始点を含んだ。正常なヒト組織としては、扁桃腺、リンパ節、脾臓、腎臓、肺および心臓が挙げられた。慢性炎症疾患を伴う組織としては、慢性喘息、慢性気管支炎を伴う肺、慢性炎症および慢性Ｃ型肝炎感染による硬変を伴う肝臓が挙げられた。組織を、４％ホルマリン中で固定し、パラフィン包埋し、切り出し（３～５μｍの厚さ）、脱パラフィンし、２０μｇ／ｍｌのプロテイナーゼＫを用いて脱タンパク質化し（３７℃で１５分間）、そして他に記載されるとおりインサイチュハイブリダイゼーションのためにプロセスした。

【０４６８】

（免疫組織化学）
免疫組織化学染色を、ＤＡＫＯ　Ａｕｔｏｓｔａｉｎｅｒを使用して５μｍの厚さの凍結切片上で実施した。内在性のペルオキシダーゼ活性を、Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ　ａｎｄ　Ｐｅｒｒｙブロッキング溶液（１：１０）によりブロッキングした（２０℃で４分間）。ＴＢＳ／０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０中１０％の正常ヤギ血清（ＮＧＳ）を、希釈およびブロッキングに使用した。Ｍａｂ　３Ｃ９を、１μｇ／ｍｌで使用した。スライドを、金属増強ジアミノベンジジン（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）を使用して現像した。切片の免疫蛍光染色のために、切片を、ＰＢＳ／１０％ＮＧＳを用いてブロッキングし、そして２０℃で１時間、ｍＡｂ３Ｃ９と共にインキュベートした。ＦＩＴＳに対して結合化するウサギ－抗マウスＦＩＴＣ標識化二次抗体を、検出試薬として使用した。二重染色の手順のために、続いて切片を、ヒトＣＤ６８に対するＰＥ－結合体化モノクローナル抗体を用いて染色した。

【０４６９】
（結果）
（ヒトＳＴＩｇＭＡの分子クローニング）
ＨｕＳＴＩｇＭＡを、ヒトＪＡＭ１の保存されたＩｇドメインを認識するディジェネレイトプライマーを使用してヒト胎児ｃＤＮＡライブラリーからクローン化した。いくつかのクローンの配列決定は、４００個のアミノ酸のオープンリーディングフレームを明らかにした。Ｂｌａｓｔ検索は、Ｚ３９Ｉｇ（Ｉ型膜貫通型タンパク質（Ｌａｎｇｎａｅｓｅら、Ｂｉｏｃｈｉｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ａｃｔａ　１４９２（２０００）５２２－５２５）との類似性を確固たるものとした。ＳＴＩｇＭＡの細胞以外領域を、２個のＩｇ様ドメイン（Ｎ末端Ｖセットドメインおよび Ｃ末端Ｃ２セットドメインを含む）から構成された。３’プライマーおよび５’プライマーを使用して、ＳＴＩｇＭＡのスプライシング改変体（短ＳＴＩｇＭＡ（膜近位のＩｇＣドメインを欠き、そして５０個のアミノ酸短い））を、クローン化した。

【０４７０】
（マウスのＳＴＩｇＭＡのクローニングおよびヒトＳＴＩｇＭＡとの配列比較）
マウスの発現された配列タグ（ＥＳＴ）のデータベースを、ｈｕＳＴＩｇＭＡ（ＰＲＯ３６２）の全長オープンリーディングフレームおよびｔｂｌａｓｔｎアルゴリズムを使用して検索した。３個のプライマーのＤＮＡ配列決定は、２８０個のアミノ酸の同一の完全オープンリーディングフレームを生じた。３個のプライマー領域に対するプライマーを、マウスの脾臓のライブラリーに由来する全長の転写産物をクローン化するために使用した。このマウスのクローンは、ｈｕ　ＳＴＩｇＭＡのスプライシングされた形態（これはＣ末端のＩｇ様ドメインを欠いた）に類似していた。この細胞外ＩｇＶドメインは、ヒトレセプターとマウスレセプターとの間で９３％の同一性を伴ってよく保存されていた。このマウスの細胞質ドメインは、ヒトの対応物よりも、２０アミノ酸分短い低い保存性であり、そして４０％同一であった。

【０４７１】
（ＳＴＩｇＭＡは、多様な組織における常在マクロファージの一部上に発現し、そしてこの発現は、炎症において増加する）
ｈｕ　ＳＴＩｇＭＡのノーザンブロット分析は、副腎、肺および胎盤において最も高い発現ならびに心臓、脊髄、甲状腺、乳腺およびリンパ節においてより低い発現を伴う１．８ｋｂおよび２．２ｋｂの二つの転写産物（図５７）を示した。全ての組織において、この２．２ｋｂの転写産物は、最も豊富に発現された転写産物であって、おそらく、ＳＴＩｇＭＡの長い形態をコードする。

【０４７２】
（ＴＡＱＭＡＮ^{TM}のリアルタイムＰＣＲ分析）
ＳＴＩｇＭＡを発現する特定の細胞株を同定するために、リアルタイム定量的ＰＣＲおよびＮ末端Ｉｇドメインに特異的なプライマー／プローブを、使用した。少ないが検出可能なｍＲＮＡの発現は、ＰＭＡで処理された骨髄性細胞株のＨＬ－６０および単球株のＴ

ＨＰ－１において見出された。発現は、Ｂ細胞株およびＴ細胞株には存在しなかった（図５８Ａ）。

【０４７３】

（ＳＴＩｇＭＡ（ＰＲＯ３６２）は、分化した単球上に発現する）

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

【０４７４】

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

【０４７５】

（ＳＴＩｇＭＡ（ＰＲＯ３６２）の分子的な特徴付け）

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

【０４７６】

（末梢血の単球上におけるＳＴＩｇＭＡ発現のフローサイトメトリー分析）

循環白血球におけるＳＴＩｇＭＡの発現パターンを決定するために、フローサイトメトリー分析を、ＡＬＥＸＡ^{TM}Ａ４８８に直接的に結合体化したモノクローナル抗ヒトＳＴＩｇＭＡ抗体３Ｃ９を使用して、健康なドナーに由来する血液から単離されたリンパ球で実施した。対染色を、いくつかの免疫細胞の表面抗原に対するＰＥ結合抗体を用いて実施した。ＳＴＩｇＭＡは、全ての白血球（Ｂ細胞－Ｔ細胞－Ｎｋ細胞、単球および顆粒球を含有する）の表面上で非存在であった（図６０）。ＳＴＩｇＭＡはしかし、マクロファージの分化培地において７日間培養された単球上に発現した。

【０４７７】

（単球におけるＳＴＩｇＭＡ発現の調節）

ＳＴＩｇＭＡの発現の調節を研究するために、７日目のマクロファージを、種々の前炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの存在下において培養し、そしてＳＴＩｇＭＡ発現レベルを、リアルタイムＰＣＲまたはフロー分析により測定した。ＳＴＩｇＭＡ　ｍＲＮＡの発現は、ＩＬ－１０およびＴＧＦ－βを用いた２日間のマクロファージの処理後増加し、そしてＩＬ－４、ＩＬ－１３およびＬＰＳによりダウンレギュレートされた（図６１Ａ）。デキサメタゾンを用いた処理は、コントロールの未処理のマクロファージと比較して５倍発現を増加させた。細胞表面に発現されたＳＴＩｇＭＡの調節を測定するために、フローサイトメトリーを、種々のサイトカインおよびデキサメタゾンを用いて５日間処理した末梢血単球で実施した。ＳＴＩｇＭＡを、ＡＬＥＸＡ^{TM}Ａ４８８に結合体化したモノクローナル抗体クローン３Ｃ９を使用して検出した。細胞を、抗ＣＤ－１４抗体を用いて同時染色した。ＳＴＩｇＭＡの表面の増加した発現が、ＩＬ－１０およびＬＰＳを用いた５日間の単球処理の後見出された（図６１Ｂ）。表面のＳＴＩｇＭＡの発現の

劇的な増加は、デキサメタゾンを用いた処理後見出された。

【０４７８】

（ＳＴＩｇＭＡの部分細胞の分布）

ＳＴＩｇＭＡの部分細胞の分布を研究するために、ＭＤＭを、１５日間培養内に保持し、その後固定し、そして、モノクローナル抗体（クローン３Ｃ９）またはポリクローナルウサギ抗体４Ｆ７、続いてＦＩＴＣ結合体化二次抗体およびＰＥ標識化抗ＣＤ６３抗体を用いて染色した。共焦点顕微鏡観察は、核周囲の細胞質におけるＳＴＩｇＭＡの高発現（リソソーム膜タンパク質ＣＤ６３の発現と重なる）を示した（図６３Ａ，Ｂ）。ＳＴＩｇＭＡはまた、先端および後端のマクロファージにおいて発現され、この染色パターンは、ＣＤ６３の染色パターンとは重なっていなかった。

【０４７９】

（正常組織および疾患組織におけるＳＴＩｇＭＡの発現）

組織常在のマクロファージにおけるＳＴＩｇＭＡの発現および慢性炎症疾患を有する組織におけるＳＴＩｇＭＡの発現の変化を、研究した。インサイチュハイブリダイゼーションを使用して、ＳＴＩｇＭＡのｍＲＮＡの発現を、パラホルムアルデヒド固定したヒト組織のパネル上で決定した。高い発現レベルが、肺炎または慢性の喘息患者の肺の剖検から得られた肺胞のマクロファージにおいて見出された（図６３Ａ－Ｄ）。ｍＲＮＡの高発現が、慢性肝炎患者の肝臓におけるクッパー細胞に見出された（図６３Ｅ，Ｆ）。

【０４８０】

これまでの研究（Ｗａｌｋｅｒ，Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ １５７４（２００２）３８７－３９０）において、およびライブラリーのインターネットのスクリーニングにおいて、ＳＴＩｇＭＡ ｍＲＮＡの高発現が、リウマチ様関節炎患者の滑膜に見出された。従って、リウマチ様関節炎、変形性関節症および変性性疾患の患者から得られた滑膜におけるＳＴＩｇＭＡの発現パターンを、研究した。ＳＴＩｇＭＡ ｍＲＮＡの高発現は、変形性関節症の患者から得られた滑膜細胞に見出された（図６４Ａ－Ｄ）。表層の滑膜細胞は、ＳＴＩｇＭＡの高発現を有した（図６４Ｄ）。さらに、ポリクローナル抗体６Ｆ１を、リウマチ様関節炎の患者から得られたヒト滑膜の凍結切片におけるＳＴＩｇＭＡの発現の研究に使用した。ＳＴＩｇＭＡは、滑膜細胞の一部において発現し（２０％～４０％）、そして滑膜における組織マクロファージにおいて発現した（図６５Ａ－Ｃ）。これら細胞は多くの場合、Ａ型マクロファージ様滑膜細胞であった。染色は、コントロールの滑膜には存在しなかった（図６５Ｄ）。

【０４８１】

ＳＴＩｇＭＡタンパク質の発現が、多数の異なる組織におけるマクロファージに見出された。ＳＴＩｇＭＡが安定して発現しているＣＨＯ細胞から調製された凍結切片は、ＳＴＩｇＭＡの膜局在を示す（図６６Ａ）。ＳＴＩｇＭＡタンパク質は肺胞のマクロファージ（図６６Ｂ）、小腸の粘膜固有層における組織球（図６６Ｃ）、胎盤のホーフバウアー細胞（図６６Ｄ）、副腎におけるマクロファージ（図６６Ｅ）および肝臓におけるクップファー細胞（図６６Ｆ）に見出された。

【０４８２】

アテローム硬化症のプラークは、多数のマクロファージまたはマクロファージ形態の細胞（大動脈の管腔壁にしっかりと接着する）を含んだ。マクロファージ－内皮接着におけるＳＴＩｇＭＡの役割を考慮して、アテローム硬化症のプラークにおけるＳＴＩｇＭＡの発現を、研究した。プラークの連続切片を、抗ＣＤ６３（図６７ＡおよびＢ）または抗ＳＴＩｇＭＡ（図６７ＣおよびＤ）を用いて染色した。抗ＣＤ６３および抗ＳＴＩｇＭＡの部分的に重なり合う染色パターンが、血管壁を並べる泡沫細胞に見出され、このことはアテローム硬化症におけるＳＴＩｇＭＡの役割を示す。

【０４８３】

ＳＴＩｇＭＡが、マクロファージに選択的に発現されたか否かを決定するために、免疫蛍光の二重染色を、心臓の間隙性マクロファージで実施した（図６８）。オーバーレイに示されるとおり（図６８Ｃ）、ＳＴＩｇＭＡにポジティブのほとんどの間隙性マクロファ

ージはまた、ＣＤ６８に対してポジティブであった。全てのＣＤ６８ポジティブマクロファージが、ＳＴＩｇＭＡに対してポジティブではなかった。このことは、後者が、組織常在のマクロファージの一部に特異的であったことを示す。

【０４８４】

炎症性腸疾患（ＩＢＤ）症候群におけるｍＲＮＡの発現レベルを量的に測定するために、ｍＲＮＡを、潰瘍性大腸炎、クローン病の患者から、またはＩＢＤの発現のない患者から得た結腸組織から抽出した。リアルタイムＰＣＲを、相対的な発現レベルを測定するために、ＳＴＩｇＭＡに特異的なプライマーを使用して実施した。発現レベルは、コントロール組織と比較した場合、潰瘍性大腸炎患者において１６倍高く、そしてクローン病患者において５倍高かった（図６９Ａ）。同様に、相対的なＲＮＡ等量が、肺組織において決定され、これは慢性的な閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）の患者に由来する組織において最大であることが見出され（正常の１４倍を越える）、そして喘息の患者においては正常と有意に異なることはなかった（図６９Ｂ）。

【０４８５】

Ｉｇスーパーファミリーの分子が、細胞表面の認識および細胞－細胞接着を媒介することは周知である。ＳＴＩｇＭＡ発現は、血管に並ぶ間隙性マクロファージにおいて高かったため、マクロファージ－内皮細胞の接着へのＳＴＩｇＭＡの関与を、研究した。全長ＳＴＩｇＭＡ－長を用いて安定してトランスフェクトしたジャーカット細胞株（図７０Ａ）を、蛍光色素ＢＣＥＣＦを用いて負荷し、そして９６ウェルのｍａｘｉｓｏｒｂプレート（単層のＨＵＶＥＣ細胞が、培養された）のウェルに添加した。接着を、３回の穏やかな洗浄の後、保持された蛍光の量により測定した。ＳＴＩｇＭＡを発現するジャーカット細胞は、コントロールのプラスミドを安定してトランスフェクトしたジャーカット細胞と比較した場合、コントロール内皮およびＴＮＦα刺激された内皮の両者に、より多く接着した（図７０Ｂ）。

【０４８６】

（考察）

この研究は、最初に新規Ｉｇスーパーファミリーメンバーの ＳＴＩｇＭＡ／Ｚ３９Ｉｇの組織分布、発現調節および分子的な特徴付けを記載し、そして組織常在のマクロファージにおけるその選択的な発現を確認した。

【０４８７】

ＳＴＩｇＭＡの発現は、常在マクロファージに見出され、この常在マクロファージは、完全に分化した表現型を有した。ＳＴＩｇＭＡの発現は、慢性炎様、リウマチ様関節炎および炎症性腸疾患を伴う組織において増加した。これらの疾患（多くの場合、Ｔｈ２型疾患として特徴付けられた）におけるＳＴＩｇＭＡ発現の増加は、インビトロにおけるＴｈ２サイトカインによるＳＴＩｇＭＡの発現調節を伴う系であり得る。この増加した発現が、ＳＴＩｇＭＡポジティブマクロファージの増加した存在によるものであるのかまたは炎症性マクロファージにおける増加した発現によるものであるのかは、まだ決定されていない。

【０４８８】

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

【０４８９】

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

【０４９０】

ＳＴＩｇＭＡ発現は、非微生物の炎症性疾患様の潰瘍性大腸炎および慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）において増加したが、ＬＰＳまたは他の細菌性細胞壁の構成要素様のリポタイコ酸および細菌性リポタンパク質で処理された単離マクロファージにおいてはダウンレギュレートされた。ＬＰＳによる長期の処理（２日間を越える）は、ＳＴＩｇＭＡの発現の増加を引き起こした。これは、ＬＰＳ刺激されたマクロファージにより分泌されたＩＬ－１０の自己分泌作用によるものであり得た。ＳＴＩｇＭＡの著しいアップレギュレーション（ｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルの両方で）は、デキサメタゾンによる単球またはマクロファージの処理において観察された。わずかな単球／マクロファージの表面レセプターは、デキサメタゾン処理を受けた発現において増加することが見出された。一つの例が、ＣＤ１６３であるが、デキサメタゾンにより誘導されたＣＤ１６３は、著しく少ない。抗炎症性サイトカインＩＬ１０およびＴＧＦβによるＳＴＩｇＭＡのアップレギュレーションは、かなり興味深いものであった。これはＳＴＩｇＭＡが、グルココルチコステロイドの抗炎症性の役割を媒介し得ることを示す。

【０４９１】

本明細書中に記載されるとおり、ＳＴＩｇＭＡは、ＣＤ６８ポジティブマクロファージの一部に発現された。これは活性化マクロファージを示し得る。ＳＴＩｇＭＡおよびＳＴＩｇＭＡ－Ｆｃ融合タンパク質に対するブロッキング抗体および活性化抗体を使用して、マクロファージのエフェクター機能、接着および移動におけるＳＴＩｇＭＡの役割ならびに慢性炎症疾患におけるＳＴＩｇＭＡの役割を調べ、そして実施例２５に記載する。

【０４９２】

わずかな細胞表面マーカーのみが、分化したマクロファージに特異的に発現された（ＣＤ６８およびＣＤ１６３）。ＣＤ６８は、全てのヒトマクロファージ群に明白に発現したが、この抗原はまた、他の骨髄性細胞およびまた特定の非骨髄性細胞に検出され得た。従って、ＳＴＩｇＭＡは、間隙性の成熟マクロファージの一部に選択的に発現した第一の細胞表面抗原を示した。

【０４９３】

（実施例２５）

（ＤＢＡ－１Ｊマウスのコラーゲン誘導関節炎（ＣＩＡ）におけるＳＴＩｇＭＡ融合タンパク質）

この実験は、疾患の発生およびＣＩＡ（コラーゲン誘導関節炎、リウマチ様関節炎の実験動物モデル系）の進行におけるコントロールのマウスＩｇＧ１とＳＴＩｇＭＡ融合タンパク質とを比較することを目的とした。

【０４９４】

実施例２４において議論したように、ＳＴＩｇＭＡは、マクロファージの一部上に高くかつ特異的に発現し、そして慢性炎を伴う組織においては増加する。マウスＳＴＩｇＭＡは、コラーゲン誘導関節炎のマウスの炎症した関節におけるマクロファージおよび滑膜に高発現する。インビトロにおける研究は、ＳＴＩｇＭＡが、内皮に対するマクロファージの接着に関与することを示した。ＳＴＩｇＭＡ－Ｆｃ融合タンパク質は、自己免疫性疾患の過程に影響を及ぼし、この場合マウスにおけるコラーゲン誘導関節炎は、組織のマクロファージの特性に影響をおよぼすか、または他の細胞（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、上皮細胞、内皮細胞）の免疫反応に影響をおよぼすことによる。これは、関節における炎症、腫脹および長期の骨侵食の緩和を生じ得る。

動物モデル種：マウス

系統：ＤＡＢ－１Ｊ

業者：ＪＡＣＫＳＯＮ

年齢幅：７～８週齢

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

【０４９５】

このマウスは、ＣＩＡの研究のための種として選ばれた。なぜならばＣＩＡは、ヒトＲＡ（リウマチ様関節炎）と類似した臨床的特徴および病理学的特徴を伴う炎症性の多発関節炎である。この動物モデルは、多くの研究所により使用され、ＣＩＡの組織病理学は、滑膜の増殖を伴うＲＡ（パンヌス形成、軟骨の変質／破壊および後に関節の変形を伴う辺縁の骨の侵食まで進行する）において見られる組織病理学に類似している。またマウスは、系統発生的に最も低い哺乳類である。

【０４９６】

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

【０４９７】

（実験設計）

（処置群）

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

【０４９８】

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

【０４９９】

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

【０５００】

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

【０５０１】

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

【０５０２】

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

【０５０３】

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

【０５０４】

（動物の収容および食事）
綿パッドおよび湿らせた飼料を、飼料に近付くことを促すためにおよび快適性のためにケージの床に提供した。
【０５０５】
（拘束のために使用された薬物）
作用させるためのイソフルレン－吸息
（安楽死の方法：）麻酔下で心臓の穿刺（経皮的）による失血
作用させるためのイソフルレン－吸息
（結果）
コラーゲン誘導関節炎マウス（リウマチ様関節炎の動物モデル）へのＳＴＩｇＭＡ融合タンパク質、ｍｕＳＴＩｇＭＡ－Ｆｃの全身性の注射は、ＩｇＧ１を受けたコントロール群のマウス（円）に対するＳＴＩｇＭＡ融合タンパク質を受けた試験群のマウス（四角）におけるＣＩＡの進行に有意な（図７１を参照のこと：ｐ値＝０．０００４）減少を示した。
【０５０６】
（物質の寄託）
以下の物質は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ ２０１１０－２２０９，ＵＳＡ（ＡＴＣＣ）により寄託された。
【０５０７】
【表７】

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

これら寄託は、ｔｈｅ Ｂｕｄａｐｅｓｔ Ｔｒｅａｔｙ ｏｎ ｔｈｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｄｅｐｏｓｉｔ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｕｒｐｏｓｅ ｏｆ Ｐａｔｅｎｔ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅ ａｎｄ ｔｈｅ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎｓ ｔｈｅｒｅｕｎｄｅｒ（Ｂｕｄａｐｅｓｔ Ｔｒｅａｔｙ）の条項の下、行われた。これは、寄託の日から３０年間、寄託物の実行可能な培養の維持を保障する。この寄託物を、Ｂｕｄａｐｅｓｔ Ｔｒｅａｔｙの規約の下、およびＧｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．とＡＴＣＣとの間の同意に従いＡＴＣＣにより利用可能にする。これは、国民に、適切な米国特許の発行または米国特許出願もしくは外国の特許出願のいずれかの公表により寄託の培養の子孫の永久のかつ非制限的な利用可能性を保障し、そして３５ＵＳＣ’１２２およびこれに準拠する委員会規則（８８６ＯＧ６３８への特定の言及を伴う３７ＣＦＲセクション１．１４を含有する）に従って権利を付与されることが米国特許商標局長官により決定された寄託物の培養の子孫の利用可能性を保障する。
【０５０８】
本出願の譲受人は、寄託における培養の物質が、死ぬかまたは失われるかもしくは破壊された場合（適切な条件の下で培養された時）、この物質は、別の同じ物質による届出により直ちに交換されることに同意した。寄託物質の利用可能性は、その国の特許法に従い、いずれかの政府の当局により付与された権利に違反して本発明を実施するための許可証として解釈されるべきではない。

【０５０９】
前述の明細書は、当業者が本発明を実施し得る程度に充分なものであるとみなされる。本発明は、寄託された構築物により範囲が限定されるべきではない。なぜならばこの寄託された実施形態は、本発明の特定の局面の一つの例として意図され、そして機能的に等価である任意の構築物は、本発明の範囲内である。本明細書中の物質の寄託は、それは本明細書中に含まれる書面による明細は、本発明の任意の局面（本発明の最良形態を含有する）の実施を可能とするには十分ではなく、そして特許請求の範囲を特定の例（その範囲が示す）に限定するものとして解釈されることの承認を構成しない。実際、本明細書中に示され、そして記載された改変体に加え本発明の種々の改変体は、前述の記載から当業者に明白となり、そして添付された特許請求の範囲内に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【０５１０】
【図１Ａ】図１は、Ａ３３抗原（配列番号６）と、ＤＮＡ４０６２８（配列番号１）と、ＤＮＡ４５４１６（配列番号２）と、ＤＮＡ３５６３８（配列番号９）と、ＪＡＭ（配列番号１０）とによってコードされるポリペプチドの間での比較を示す。
【図１Ｂ】図１は、Ａ３３抗原（配列番号６）と、ＤＮＡ４０６２８（配列番号１）と、ＤＮＡ４５４１６（配列番号２）と、ＤＮＡ３５６３８（配列番号９）と、ＪＡＭ（配列番号１０）とによってコードされるポリペプチドの間での比較を示す。
【図２】図２は、ネイティブ配列ＰＲＯ３０１ポリペプチドに由来するアミノ酸配列（配列番号１）を示す。このポリペプチドは、２９９アミノ酸長であり、残基１～２７に単一配列を、残基２８～約２３５に細胞外ドメインを、残基９４～２３５にＩｇスーパーファミリー相同性を、残基２３６～約２５８に潜在的膜貫通ドメインを、そして約残基２５９～２９９に細胞内ドメインを有する。
【図３】図３は、図６Ａおよび６Ｂ（ＤＮＡ４５４１６、配列番号７）に示されたヌクレオチド配列のヌクレオチド１１９～１０８１に由来するアミノ酸配列（配列番号２）を示す。図３に下線で示されているのはまた、グリコサミノグリカン（ｇｌｙｃｏｓｏａｍｉｎｏｇｌｙｃａｎ）部位および膜貫通ドメインの位置である。
【図４Ａ－Ｂ】図４Ａは、コンセンサスアセンブリＤＮＡ３５９３６（配列番号３）を示し、そして図４Ｂは、ｃｏｎｓｅｎ０１（配列番号４）を示す。これらの両方は、ＤＮＡ４０６２８（配列番号１１）の単離に用いられる。
【図４Ｃ】図４Ｃは、ｃｏｎｓｅｎ０２（ＤＮＡ４２２５７）（配列番号５）を示す。これは、ＤＮＡ４５４１６（配列番号７）の単離に用いられる。
【図５】図５は、ネイティブ配列ＤＮＡ４０６２８　ｃＤＮＡ（配列番号１１）のヌクレオチド配列を示す。これは、「ＵＮＱ２６４」および／もしくは「ＤＮＡ４０６２８－１２１６」としても規定されたネイティブ配列ＰＲＯ３０１　ｃＤＮＡである。
【図６Ａ】図６Ａおよび図６Ｂは、ヌクレオチド配列ＤＮＡ４５４１６（配列番号７）を示す。これは、「ＵＮＱ３１７」および／もしくは「ＤＮＡ４５４１６－１２５１」としても規定されたネイティブ配列ＰＲＯ３６２　ｃＤＮＡである。開始メチオニンおよび全長ＰＲＯ３６２ポリペプチド（配列番号２）のタンパク質翻訳を、また示す。
【図６Ｂ】図６Ａおよび図６Ｂは、ヌクレオチド配列ＤＮＡ４５４１６（配列番号７）を示す。これは、「ＵＮＱ３１７」および／もしくは「ＤＮＡ４５４１６－１２５１」としても規定されたネイティブ配列ＰＲＯ３６２　ｃＤＮＡである。開始メチオニンおよび全長ＰＲＯ３６２ポリペプチド（配列番号２）のタンパク質翻訳を、また示す。
【図７】図７は、ネイティブ配列ＰＲＯ２４５　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（配列番号８）を示す。ここで、このヌクレオチド配列は。「ＵＮＱ２１９」および／もしくは「ＤＮＡ３５６３８」としても規定される。
【図８】図８は、オリゴヌクレオチド配列ＯＬＩ２１６２（３５９３６．ｆ１）（配列番号１２）、ＯＬＩ２１６３（３５９３６．ｐｌ）（配列番号１３）、ＯＬＩ２１６４（３５９３６．ｆ２）（配列番号１４）、ＯＬＩ２１６５（３５９３６．ｒ１）（配列番号１５）、ＯＬＩ２１６６（３５９３６．ｆ３）（配列番号１６）、ＯＬＩ２１６７（３５９

３６．ｒ２）（配列番号１７）を示す。これらは、ＤＮＡ４０６２８の単離に用いられる。

【図９Ａ】図９Ａおよび図９Ｂは、５個のオリゴヌクレオチドプライマーの配置とともに（下線で示される）、ＤＮＡ４２２５７（ｃｏｎｓｅｎ０２）（配列番号５）の二本鎖表現を示す。これらは、全てＤＮＡ４５４１６（配列番号７）の単離に使用される。図示されるオリゴヌクレオチドは、以下である：４２２５７．ｆ１（配列番号１８）、４２２５７．ｆ２（配列番号１９）、４２２５７．ｒ１（配列番号２０）、４２２５７．ｒ２（配列番号２１）、および４２２５７．ｐ１（配列番号２２）。

【図９Ｂ】図９Ａおよび図９Ｂは、５個のオリゴヌクレオチドプライマーの配置とともに（下線で示される）、ＤＮＡ４２２５７（ｃｏｎｓｅｎ０２）（配列番号５）の二本鎖表現を示す。これらは、全てＤＮＡ４５４１６（配列番号７）の単離に使用される。図示されるオリゴヌクレオチドは、以下である：４２２５７．ｆ１（配列番号１８）、４２２５７．ｆ２（配列番号１９）、４２２５７．ｒ１（配列番号２０）、４２２５７．ｒ２（配列番号２１）、および４２２５７．ｐ１（配列番号２２）。

【図１０Ａ】図１０Ａおよび図１０Ｂは、２つの重なったフラグメント、ＤＮＡ４０６２８とＡ３３　ＨＵＭＡＮ（ヒトＡ３３抗原前駆体）との間の、Ｂｌａｓｔスコア、マッチおよびパーセント同一性アラインメントを示す。それぞれ、図１０Ａは、ＤＮＡ４０６２８（配列番号２３）のコードされた残基２４～２８３と、Ａ３３　ＨＵＭＡＮ（配列番号２４）のコードされた残基１７～２８４とを比較し、図１０Ｂは、ＤＮＡ４０６２８（配列番号２５）のコードされた残基２１～２３９と、Ａ３３　ＨＵＭＡＮ（配列番号２６）のコードされた残基とを比較する。

【図１０Ｂ】図１０Ａおよび図１０Ｂは、２つの重なったフラグメント、ＤＮＡ４０６２８とＡ３３　ＨＵＭＡＮ（ヒトＡ３３抗原前駆体）との間の、Ｂｌａｓｔスコア、マッチおよびパーセント同一性アラインメントを示す。それぞれ、図１０Ａは、ＤＮＡ４０６２８（配列番号２３）のコードされた残基２４～２８３と、Ａ３３　ＨＵＭＡＮ（配列番号２４）のコードされた残基１７～２８４とを比較し、図１０Ｂは、ＤＮＡ４０６２８（配列番号２５）のコードされた残基２１～２３９と、Ａ３３　ＨＵＭＡＮ（配列番号２６）のコードされた残基とを比較する。

【図１１】図１１は、図７（ＤＮＡ３５６３８、配列番号８）のヌクレオチド配列によってコードされるネイティブ配列ＰＲＯ２４５ポリペプチド（配列番号９）に由来するアミノ酸配列を示す。このポリペプチドは、長さ３１２アミノ酸であり、残基１～２８に単一配列を、そして約残基２３７～約２５９に潜在的膜貫通ドメインを有する。

【図１２】図１２は、ＤＮＡ４０６２８（配列番号１）によってコードされるアミノ酸配列とＡ３３抗原（配列番号６）によってコードされるアミノ酸配列との間に、２５．３％の同一性を示す。

【図１３】図１３は、ＤＮＡ４５４１６（配列番号２）によってコードされるアミノ酸配列とＡ３３抗原（配列番号６）によってコードされるアミノ酸配列との間に、２０．８％の同一性を示す。

【図１４】図１４は、ＤＮＡ３５６３８（配列番号９）によってコードされるアミノ酸配列とＡ３３抗原（配列番号６）によってコードされるアミノ酸配列との間に、２４．３％の同一性を示す。

【図１５】図１５は、ＤＮＡ４０６２８（配列番号１）によってコードされるアミノ酸配列とＪＡＭ（配列番号１０）によってコードされるアミノ酸配列との間に、６７．６％の同一性を示す。

【図１６】図１６は、ＤＮＡ４５４１６（配列番号２）によってコードされるアミノ酸配列とＪＡＭ（配列番号１０）によってコードされるアミノ酸配列との間に、２３．３％の同一性を示す。

【図１７】図１７は、ＤＮＡ３５６３８（配列番号２９）によってコードされるアミノ酸配列とＪＡＭ（配列番号１０）によってコードされるアミノ酸配列との間に、３４．２％の同一性を示す。

【図１８】図１８は、Ａ３３　抗原（配列番号６）によってコードされるアミノ酸配列とＪＡＭ（配列番号１０）によってコードされるアミノ酸配列との間に、２６％の同一性を示す。
【図１９】図１９は、実施例８に記載されるドットブロットハイブリダイゼーション法の結果を示す。
【図２０】図２０は、実施例９に記載されるＴＡＱＭＡＮ^{TM}　ｍＲＮＡ発現アッセイの結果を示す。
【図２１】図２１は、実施例７に記載されるような、ＤＮＡ４０６２８によってコードされるタンパク質の、ヒト好中球への結合を示す。
【図２２】図２２は、ＰＲＯ１８６８のアミノ酸配列（配列番号３１）示す。ここで、逆三角は、推定上の単一切断部位を表し、丸は、保存細胞外システインを表し、膜貫通ドメインは、下線を引かれ、そして点線の付加は、潜在的なＮ－グリコシル化部位を表す。このポリペプチドは、長さ３１０アミノ酸であり、残基１～３０に単一配列を、そして約残基２４２～約２６６に潜在的膜貫通ドメインを有する。
【図２３】図２３は、マウス肝臓凍結切片における、ＰＲＯ３６２のインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図２４】図２４は、ヒト肝臓凍結切片における、ＰＲＯ３６２のインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図２５】図２５は、活性化された肺胞マクロファージおよびクップファー細胞における、ＰＲＯ３６２のインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図２６】図２６は、胎盤ホーフバウアー細胞における、ＰＲＯ３６２　ｍＲＮＡのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図２７】図２７は、Ａ型滑膜細胞における、ＰＲＯ３６２　ｍＲＮＡのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図２８】図２８は、脳の小グリア細胞における、ＰＲＯ３６２　ｍＲＮＡのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図２９】図２９は、ヒト喘息組織からの細胞における、ＰＲＯ３６２　ｍＲＮＡのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図３０】図３０は、慢性肝炎組織からの細胞における、ＰＲＯ３６２　ｍＲＮＡのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図３１】図３１は、正常ヒト組織のリンパ節細胞および扁桃高内皮性細静脈（ＨＥＶ）細胞における、ＰＲＯ２４５　ｍＲＮＡのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図３２】図３２は、炎症性および正常なヒト肺組織の細動脈内皮においての、ならびに精巣の正常輸精管における精子形成細胞においての、ＰＲＯ２４５　ｍＲＮＡのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図３３】図３３は、ヒト睾丸癌組織、肺癌組織、および乳癌組織における、ＰＲＯ２４５　ｍＲＮＡのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図３４】図３４は、ヒト乳癌における、ＰＲＯ２４５　ｍＲＮＡのインサイチュハイブリダイゼーションを示す。
【図３５】図３５は、マクロファージにおける、ＰＲＯ３６２の免疫組織化学的分析を示す。
【図３６】図３６は、クップファー細胞における、ＰＲＯ３６２の免疫組織化学的分析を示す。
【図３７】図３７は、小グリア細胞における、ＰＲＯ３６２の免疫組織化学的分析を示す。
【図３８】図３８は、ホーフバウアー細胞ににおける、ＰＲＯ３６２の免疫組織化学的分析を示す。
【図３９】図３９は、Ｔ細胞Ｊ４５株およびＭｏｌｔ４株、ならびにＢ細胞ＪＹ株、ＲＰＭＩ８８６６株およびＲＡＭＯＳ株における、逆転写酵素ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）によって検出された、ＰＲＯ１８６８　ｍＲＮＡのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。

【図４０】図４０は、細胞溶解性Ｔ細胞、ＮＫ－Ｔ細胞およびＮＫ細胞によるＰＲＯ２４５結合をまとめた模式図を示す。
【図４１】図４１は、ＮＫ（ＣＤ５６＋）細胞とＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質との間の結合についての、フローサイトメトリーの結果を示す。
【図４２】図４２は、末梢血液樹状細胞細胞（ＰＢＤＣｓ）とＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質との間の結合についての、フローサイトメトリーの結果を示す。
【図４３】図４３は、Ｊ４５　Ｔ細胞とＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質との間の結合についての、フローサイトメトリーの結果を表すグラフを示す。
【図４４】図４４は、Ｊ４５　Ｔ細胞とＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質との間の結合についての、フローサイトメトリーの結果を示す。
【図４５】図４５は、過剰Ｈｉｓタグ化－ＰＲＯ１８６８の、ＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質へのＪ４５細胞の付着をブロックする能力を示す、フローサイトメトリーの結果のグラフを示す。
【図４６】図４６は、ＮＫ（ＣＤ５６＋）細胞へのＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質をブロックする能力についての、フローサイトメトリーの結果を示す。
【図４７】図４７は、種々の濃度のＰＲＯ２４５でコーティングされたウェルへの、標識Ｊ４５細胞のパーセント付着を表すグラフを示す。
【図４８】図４８は、Ｆｃが交差結合したＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合プロテインＡマトリックスへの、ビオチン化Ｊ４５細胞の免疫沈降を示す。
【図４９】図４９は、ＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質が交差結合したプロテインＡマトリックスを用いた、Ｊ４５細胞およびＰＢＭＣ細胞からのＰＲＯ１８６８の免疫沈降を示す。
【図５０】図５０は、ＰＲＯ１８６８でコーティングされたウェルへのビオチン化ＰＲＯ２４５の結合を表すグラフを示す。
【図５１】図５１は、ＰＲＯ２４５－Ｆｃでコーティングされたウェルへのビオチン化ＰＲＯ１８６８の結合を表すグラフを示す。
【図５２】図５２は、抗ＰＲＯ１８６８抗体による、ＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質へのＪ４５細胞の付着の阻害を表すデータを示す。データは、３つの異なる実験を表す；エラーバーは、ｎ＝６でのＳＤを表す。
【図５３】図５３は、６×Ｈｉｓタグ化ＰＲＯ１８６８タンパク質の、ＣＤ５６＋ＮＫ細胞とＰＲＯ２４５－Ｆｃ融合タンパク質との間の結合と競合する能力を示すフローサイトメトリーの結果を示す。
【図５４】図５４は、種々の条件下での、ＰＲＯ２４５発現ＣＨＯ細胞へのＰＲＯ１８６８の結合を示す。
【図５５】図５５は、ＰＲＯ２４５発現ＣＨＯ細胞（ＣｕＬ８ｒ）への抗ＰＲＯ１８６８抗体の特異的結合を示す。
【図５６】図５６は、ヒトＳＴＩｇＭＡ（ｈＳＴＩｇＭＡ；配列番号３２）およびヒトＳＴＩｇＭＡ　ｓｈｏｒｔ（ｈＳＴＩｇＭＡ　ｓｈｏｒｔ；配列番号３３）のアミノ酸配列、ならびにマウスＳＴＩｇＭＡ（配列番号３４）とのアラインメントを示す。疎水性リーダー配列、膜貫通領域、および潜在的Ｎ－連結グリコシル化部位が示される。ヒトＳＴＩｇＭＡ遺伝子のエキソン－イントロン境界から推定される、Ｉｇドメイン境界が示される。
【図５７】胎盤、肺、心臓、肝臓、および副腎でのヒトＳＴＩｇＭＡ発現を示すノザンブロット分析（Ａ）。ヒト組織が発現するＳＴＩｇＭＡには、１．５ｋｂおよび１．８ｋｂの２つの転写物が存在した。
【図５８】（Ａ）骨髄単球細胞株ＨＬ６０およびＴＨＰ－１ならびに分化したマクロファージにおける、ヒトＳＴＩｇＭＡの発現増加を示すＴＡＱＭＡＮ™　ＰＣＲ分析。低レベルの発現が、ジャーカットＴ細胞株、ＭＯＬＴ３株、ＭＯＬＴ４株、およびＲＡＭＯＳ　Ｂ－細胞株において見られた。（Ｂ）インビトロでの単球分化の間での、ＳＴＩｇＭＡ　ｍＲＮＡの発現増加。ヒト末梢血液から単離された単球を、７日間にわたるプラスチッ

クへの付着によって分化させた。全ＲＮＡを、分化の間の異なる時点で抽出した。（Ｃ）単球からマクロファージへの分化の間での、ＳＴＩｇＭＡタンパク質の発現増加。単球を（Ｂ）に示したように処理し、全細胞溶解物をゲルに流し、ニトロセルロース膜へと移した。この膜を、ヒトＳＴＩｇＭＡへのポリクローナル抗体（４Ｆ７）とともにインキュベートした。このポリクローナル抗体は、４８ｋＤａバンドおよび３８ｋＤａバンド（おそらく、ＳＴＩｇＭＡのｌｏｎｇの形態とｓｈｏｒｔの形態とを表す）を認識した。

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

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

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

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

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

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

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

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

【図６６】ＳＴＩｇＭＡタンパク質は、組織常在性マクロファージのサブタイプで発現さ

れ、その発現は、慢性炎症性疾患で増加する。（Ａ）ＳＴＩｇＭＡは、ＳＴＩｇＭＡを安定に発現するＣＨＯ細胞の膜で発現される。ＳＴＩｇＭＡタンパク質の高発現は、慢性喘息を有する患者から得られた組織の肺胞マクロファージ（Ｂ）において見出される。（Ｃ）ヒト小腸の組織球におけるＳＴＩｇＭＡの発現。切片を、外科手術で切除された、新生物を含み得る組織から得た。（Ｄ）ヒト早期胎盤のホーフバウアー細胞におけるＳＴＩｇＭＡタンパク質の発現。マクロファージにおけるＳＴＩｇＭＡタンパク質の高発現は、副腎（Ｅ）およびヒト肝臓のクップファー細胞（Ｆ）に存在した。色素原としてＤＡＢを用いて、５μｍ厚のアセトン固定された切片上で、染色を行った。画像を、２０倍および４０倍の倍率で撮影した。

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

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

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

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

【図７１】ｍｕＳＴＩｇＭＡＩｇＧ－Ｆｃ融合タンパク質による、コラーゲン誘導性関節炎（ＣＩＡ）マウスモデルの進行の阻害。３回／週で６週間、（ＣＩＡ）マウス（ｎ＝７）の群に１ＯＯμｇのｏｆｍｕＳＴＩｇＭＡ　ＩｇＧ－Ｆｃ融合タンパク質（四角）を与え、一方ＣＩＡマウスコントロール群（ｎ＝８）は、１００μｇのマウスＩｇＧ１（丸）を受容した。マウスを、炎症の徴候について毎日検査して、０－１６のスケールで採点し（詳細は、実施例２５に記載）、その結果をグラフにプロットした（平均±ＳＤ、スチューデントＴ検定、コントロールＩｇＧ１対試験ｍｕＳＴＩｇＭＡタンパク質について、ｐ値＝０．０００４）。

【図１Ａ】

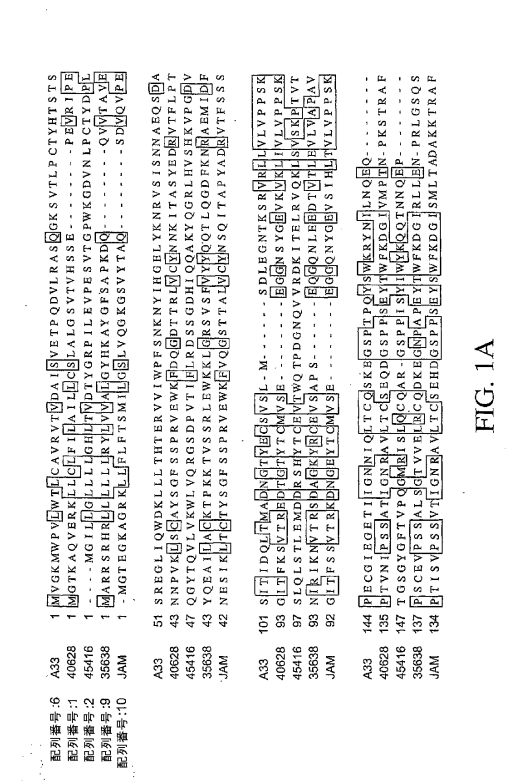


FIG. 1A

【図１Ｂ】

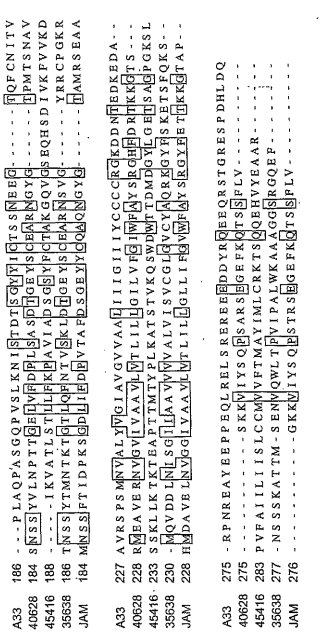


FIG. 1B

【図２】

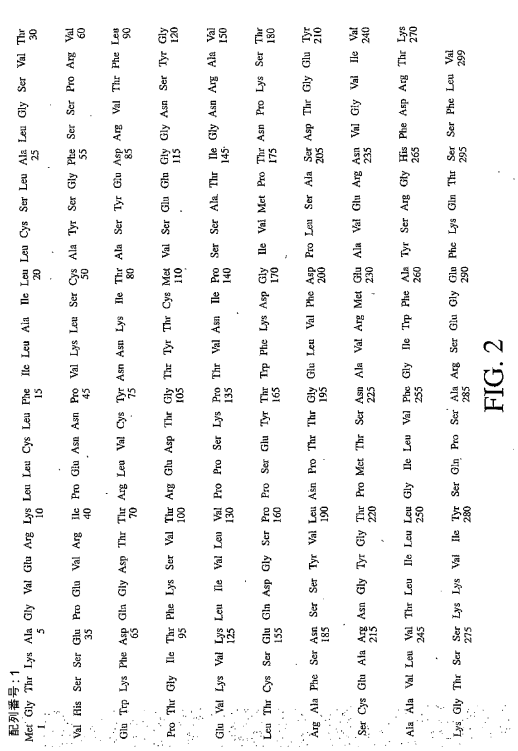


FIG. 2

【図３】

FIG. 3

【図４Ａ－Ｂ】

配列番号：3
DNA35936

```
CTTCTTGCCA ACTGGTATCA CCTTCAAGTC CGTGACACGG GAAGACACTG  50
GGACATACAC TTGTATGGTC TCTGAGGAAG GCGGCAACAG CTATGGGGAG 100
GTCAAGGTCA AGCTCATCGT GCTTGTGCCT CCATCCAAGC CTACAGTTAA 150
CATCCCCTCC TCTGCCACCA TTGGGAACCG GGCAGTGCTG ACATGCTCAG 200
AACAAGATGG TTCCCCACCT TCTGAATACA CCTGGTTCAA AGATGGGATA 250
GTGATGCCTA CGAATCCCAA AAGCACCCGT GCCTTCAGCA ACTCTTCCTA 300
TGTCCTGAAT CCCACAACAG GAGAGCTGGT CTTTGATCCC CTGTCAGCCT 350
CTGATACTGG AGAATACAGC TGTGAGGCAC GGAATGGGTA 390
```

FIG. 4A

配列番号：4
consen01

```
TCTCAGTCCC CTCGCTGTAG TCGCGGAGCT GTGTTCTGTT TCCCAGGAGG  50
CCTTCGGCGG CTGTTGTGCT CAGGTGCGCC TGATCGGCGT GGGGACAAAG 100
GCGCAAGCTC GAGAGGAAAC TGTTGTGCCT CTTCATATTG GCGATCCTGT 150
TGTGCTCCCT GGCATTGGGC AGTGTTACAG TTGCACTCTT CTGAACCTGA 200
AGTCAGAATT CCTGAGAATA ATCCTGTGAA GTTGTCCTGT GCCTACTCGG 250
GCTTTTCTTC TCCCCGTGTG GAGTGGAAGT TTGACCAAGG AGACACCACC 300
AGACTCGTTT GCTATAATAA CAAGATCACA GCTTCCTATG AGGACCGGGT 350
GACCTTCTTG CCAACTGGTA TCACCTTCAA GTCCGTGACA CGGGAAGACA 400
CTGGGACATA CACTTGTATG GTCTCTGAGG AAGGCGGCAA CAGCTATGGG 450
GAGGTCAAGG TCAAGCTCAT CGTGCTTGTG CCTCCATCCA AGCCTACAGT 500
TAACATCCCC TCCTCTGCCA CCATTGGGAA CCGGGCAGTG CTGACATGCT 550
CAGAACAAGA TGGTTCCCCA CCTTCTGAAT ACACCTGGTT CAAAGATGGG 600
ATAGTGATGC CTACGAATCC CAAAAGCACC CGTGCCTTCA GCAACTCTTC 650
CTATGTCCTG AATCCCACAA CAGGAGAGCT GGTCTTTGAT CCCCTGTCAG 700
CCTCTGATAC TGGAGAATAC AGCTGT 726
```

FIG. 4B

【図４Ｃ】

配列番号：5
consen02

```
GCAGGCAAAG TACCAGGGCC GCCTGCATGT GAGCCACAAG GTTCCAGGAG  50
ATGTATCCCT CCAATTGAGC ACCCTGGAGA TGGATGACCG GAGCCACTAC 100
ACGTGTGAAG TCACCTGGCA GACTCCTGAT GGCAACCAAG TCGTGAGAGA 150
TAAGATTACT GAGCTCCGTG TCCAGAAACT CTCTGTCTCC AAGCCCACAG 200
TGACAACTGG CAGCGGTTAT GGCTTCACGG TGCCCCAGGG AATGAGGATT 250
AGCCTTCAAT GCCAGGGTTC GGGGTTCTCC TCCCATCAGT TATATTTGGT 300
ATAAGCAACA GACTAATAAC CAGGGAACCC ATCAAAGTAG CAACCCTAAG 350
TACCTTACTC TTCAAGCCTG CGGTGATAGC CGACTCAGGC TCCTATTTCT 400
GCACTGCCAA GGGCCAGGTT GGCTCTGAGC AGCACAGCGA CATTGTGAAG 450
TTTGTGGTCA AAGACTCCTC AAAGCTACTC AAGACCAAGA CTGAGGCACC 500
TACAACCATG ACATACCCCT TGAAAGCAAC ATCTACAGTG AAGCAGTCCT 550
GGGACTGGAC CACTGACATG GATGGCTACC TTGGAGAGAC CAGTGCTGGG 600
CCAGGAAAGA GCCTGCCTGT CTTTGCCATC ATCCTCATCA TCTCCTTGTG 650
CTGTATGGTG GTTTTTACCA TGGCCTATAT CATGCTCTGT CGGAAGACAT 700
CCCAACAAGA GCATGTCTAC GAAGCAGCCA GGGCACATGC CAGAGAGGCC 750
AACGACTCTG GAGAAACCAT GAGGGTGGCC ATCTTCGCAA GTGGCTGCTC 800
CAGTGATGAG CCAACTTCCC AGAATCTGGG GCAACAACTA CTCTGATGAG 850
CCCTGCATAG GACAGGAGTA CCAGATCATC GCCCAGATCA ATGGCAACTA 900
CGCCCGCCTG CTGGACACAG TTCCTCTGGA TTATGAGTTT CTGGCCACTG 950
AGGGCAAAAG TGTCTGTTAA AAATGCCCCA TTAGGCCAGG ATCTGCTGAC 1000
ATAATTGCCT AGTCAGTCCT TGCCTTCTGC ATGGCCTTCT TCCCTGCTAC 1050
CTCTCTTCCT GGATAGCCCA AAGTGTCCGC CTACCAACAC TGGAGCCGCT 1100
GGGAGTCACT GGCTTTGCCC TGGAATTTGC CAGATGCATC TCAAGTAAGC 1150
CAGCTGCTGG ATTTGGCTCT GGGCCCTTCT AGTATCTCTG CCGGGGGCTT 1200
CTGGTACTCC TCTCTAAATA CCAGAGGGAA GATGCCCATA GCACTAGGAC 1250
TTGGTCATCA TGCCTACAGA CACTATTCAA CTTTGGCATC TTGCCACCAG 1300
AAGACCCGAG GGGAGGCTCA GCTCTGCCAG CTCAGAGGAC CAGCTATATC 1350
CAGGATCATT TCTCTTTCTT CAGGGCCAGA CAGCTTTTAA TTGAAATTGT 1400
TATTTCACAG GCCAGGGTTC AGTTCTGCTC CTCCACTATA AGTCTAATGT 1450
TCTGACTCTC TCCTGGTGCT CAATAAATAT CTAATCATAA CAGCAAAAAA 1500
AAA 1503
```

FIG. 4C

【図５】

```
配列番号：11
GTCTGTTTCCC ACGAGTGCTTT CGGCCGCTGT TGTGTCAGTG GCCTGATCGC GATGGGGACA AAGGCGCAAG TCGAGAGGAA ACTGTTGTGC CTCTTCATAT 100
TGGCGATCCT GTTGTGCTCC CTGGCAATGG GCAGTGGTAC AGTGCACTCT TCTGAACCTG AAGTCAGAAT AATCCTGTGA AGTTGTCCTG CCTACTCGGG 200
TGCCTACTCG GGCTTTTCTT CTCCCCGTGT GGAGTGGAAG TTTGACCAAG GAGACCACGC CAGCTCTGTT TGCTATAATA ACAAGATCAC AGCTTCCTAT 300
GAGGACCGGG TGACCTTCTT GCCAACTGGT ATCACCTTCA AGTCCGTGAC ACGGGAAGAC ACTGGGACAT ACACTTGTAT GGTCTCTGAG GAAGGCGGCA 400
CAGCTATGGG GGAGGTCAAG GTCAAGCTCA TCGTGCTTGT GCCTCCATCC AAGCCTACAG TTAACATCCC CTCCTCTGCC ACCATTGGGA ACCGGGCAGT 500
GCTGACATGC TCAGAACAAG ATGGTTCCCC ACCTTCTGAA TACACCTGGT TCAAAGATGG GATAGTGATG CCTACGAATC CCAAAAGCAC CGTGCCTTCA 600
GCAACTCTTC CTATGTCCT GAATCCCACA ACAGGAGAGC TGGTCTTTGA TCCCCTGTCA GCCTCTGATA CTGGAGAATA CAGCTGTGAG GCACGGAATG 700
TGTATGGGAC ACCCATGACT TCAAATGCTG TGCDCATGGA AGCTGTGGAG CGGATATGTG GGGTCATCGT GGCAGCGGTC CTTGTAACCC TGATTCTCCT 800
CGGAATCTTG GTTTTTGGCA TCTGGTTTGC CTATAGCGGA GGCCACTTTG ACAGAACAAA GAAGGGACT TCGAGTGATA AGGTGATTTA CAGCCAGGCT 900
ATGCCCCAAA GTGAAGGAGA ATTCAAACAG ACCTCGTCAT TCCTGGTGTG AGCCTGCGGC TATCATCTGC ATTTGCCTTA CTCAGGTGCT TTGTAAATAT 1000
TCCGGACTCT GGCCCCTGAT GTCTGTAGTT TCACAGGATG CCTTATTTGT CTTCTACACC CCACAGGGCC CCCTACTTCT TCGGATGTGT TTTTAAATAT 1100
ATCAGCTATG TGCCCCATCC TCCTTCATGC CCTCCCTCCC TTTCCTACCA CTGCTGAGTG GCCTGGAACT TGTTTAAAGT GTTTATTCCC CATTTCTTTG 1200
TGCAACTTCT CCTATGTCCT GAATCCCACA ACAGGAGAGC TGGTCTTTGA GCCCCTGTCA GCCTCTGATA CTGGAGAATA CAGCTGTGAG GCACGGAATG 1300
TGTATGGGAC ACCCATGACT TCAAATGCTG TGCDCATGGA AGCTGTGGAG CGGATATGTG GGGTCATCGT GGCAGCGGTC CTTGTAACCC TGATTCTCCT 1400
CGGAATCTTG GTTTTTGGCA TCTGGTTTGC CTATAGCGGA GGCCACTTTG ACAGAACAAA GAAGGGACT TCGAGTGATA AGGTGATTTA CAGCCAGGCT 1500
ATGCCCCAAA GTGAAGGAGA ATTCAAACAG ACCTCGTCAT TCCTGGTGTG AGCCTGCGGC TATCATCTGC ATTTGCCTTA CTCAGGTGCT TTGTAAATAT 1600
CTCTGCCCTG TCCTCCTGAA TACAAGCTGA CTGACATTGA CTGTGTCTGT GGAAAATGGG AGCTCTTGTT GTGGAGAGCA TAGTAAATTT TCAGAGAACT 1700
TGAAGCCAAA AGGATTTAAA ACCGCTGCTC TAAGCAAAAG AAAACTGGAG GCTGGGCCCA CTGGCTCAGG CCAGAGCCGA GGCAGCCCGA TCGTACAGTG 1800
TCACCTGAGG TCGGGAGTTC GGCATCAGCC TGACCAACAT GGAGAAACCC TACTGGAAAT ACAAAGTTAG CCAGGCATGG TGGTGCATGC CTGTACATCC 1842
AGCTGCTCAG GAGCCTGGCA ACAAGAGCAA AACTCCAGCT CA 1842
```

FIG. 5

【図６Ａ】

FIG. 6A

```
配列番号：7
  1 CCCAGCGGTC CGCCCAGCGG TCCGCCCACG GGTCCGGCCA CGCGTCGCGG CCACCAGAAG TTTGAAGCCTC TTTGGTAGCA GTGAGGCTGA AGAAAGGACA
 61 GGGTCGCGAG GCGGGTGCGC AGGCGGGTGC CCAGCCGGGT GCGCAGGCCC GGTGGTCTTC AAACTCATGT CATCCGACCT CCTCCGACCT TCTTTCTGT
101 GAAGTAAGTC TGGCTGTGAT GGGGATCTTA CTGGGCCTGC TACTCCTGGG GCACCTAACA GTGGACACTT ATGGCCGTCC CATCCTGGAA CTGCCCAGAA
141 CTTCATGGAG ACGGACACTA CCCCTAGAAT GACCCGAAGG ATGAGGACCC CGTGAGTTGT CACCTGTGAA TACCGCGAGG GTAGCACTT CACCCTCTCT
                配列番号：2 M
                MET
181 GTGTACAGG ACCTTGAAAA GGGGATGTGA ATCTTCCCTG CACCTATGAC CCCCTGCAAG GCTACACCCA AGTCTTGGTG AAGTGCCTGG TACAACGTGG
241 CACATTGTCC TGGAACCTTT CCCCTACACT TAGAAGGGAC GTGGATACTG GGGGACGTTC CGATTCGGGT TCAACATCAC ATCTTCGCAC ATCTTCGACC
    V T G P W K G D V N L P C T Y D P L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G
301 CTCAGACCCT GTCACCATCT TTCTACGTGA CTCCTCTCGA GACCATTATCC AGCAGGCAAA GTACCAGGGC CGCCTGCATG TGAGCCACAA GGTTCCAGGA
341 GAGTCTGGAA CAGTGGTGGA AAGATGCCT CTGCCTATAC TCGTCCGTTT CATCGGTCCG GCGGACCTAC ACTCCGTGTT CCAAGGTCCT
    E S G T V E D K D L P V Y T F V S H G M E I
381 GATGCTATCC TCCAATTGAG CACCCTGGAG ATGGATGACC GGAGCCACTA CACGTGTGAA GTCACCTGGC AAACCAA GTCGTGAGAG
421 CTACTAGGG AGGTTAACTC GTGGGACCTC TACCTACTGG CCTCGGTGAT GTGCACACTT CAGTGGACCG TCTGAGGACT ACCGTTGGTT CAGCACTCTC
    D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T C E V T W Q T P D G N Q V V R D
461 ATAGAGTTAC TGAGTCCGTT GTCCAGAAAC TCTCTGTCTC CAAGCCCACA GTGACAACTG GCAGCGGTTA TGGCTTCAGG GTGCCCCAGG GAATGAGGAT
501 TATTCTAATG ACTCGAGGCA CAGGTCTTTG AGAGACAGAG GTTCTGGTGT CACTGTTGAC ACCGGGGTCC CTTACTCCTA
    K I T E L R V Q K L S V S K P T V T T G S G Y G F T V P Q G M R I
541 TAGGCTTCAA TGCCAGGCTC GGGGTTCTCC TCCCATCAGT TATATTTGGT ATAAGCAACA GACTAATAAC CAGGGAACCA TCAAAGTAGC AACCCTAAGT
581 ATCGGAAGTT ACGGTCCGAG CCCCAAGAGG AGGGTAGTCA ATATAAACCA TATTCGTTGT CTGATTATTG GTCCTTGGGT AGTTTCATCG TTGGGATTCA
    S L Q C Q A R G S P P I S Y I W Y K Q Q T N N Q E P I K V A T L S
701 ACCTTACTCT TCAAGCCTGC GGTGATGACC GACTCAGGCT CCTATTTCTG CACTGCCAAG GGCCAGGTTG GCTCTGAGCA GCACAGCGAC ATTGTGAAGT
741 TGGAATGAGA AGTTCGGACG CCACTATCGG CTGAGTCCAA GGATAAAGAC GTGACGGAGT CCTGTCCTCG CGAGACTCGT CGTGTCGCTG TAACACTTCA
801 TTGTGGTCAA AGACTCCTCA AAGCTACTCA AGACCAAGAC TGAGGCACCT ACAACCATGA CATACCCCTT GAAAGCAACA CATCACAGTG AGCAGTCCTG
841 AACACCAGTT TCTGAGGAGT TTCGATGAGT TCTGGTTCAC ACTCCGTGGA TCTTGGTACT GTATGGGAAA CTTTCGTTGT AGATGTCACT TCGTCAGGAC
    V V K D S S K L L K T K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W
```

FIG. 6A

【図６Ｂ】

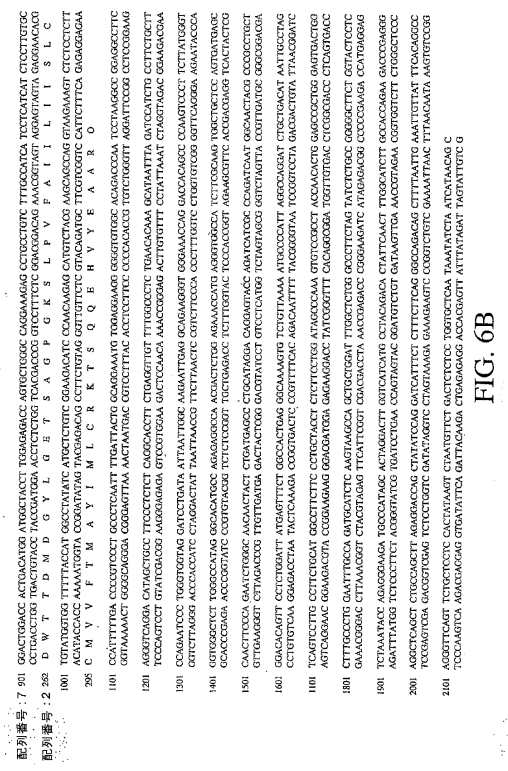


FIG. 6B

【図７】

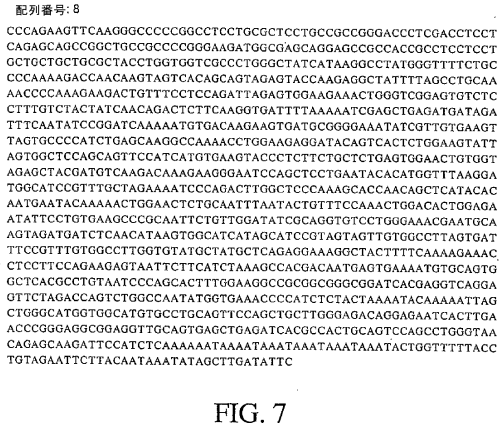


FIG. 7

【図８】

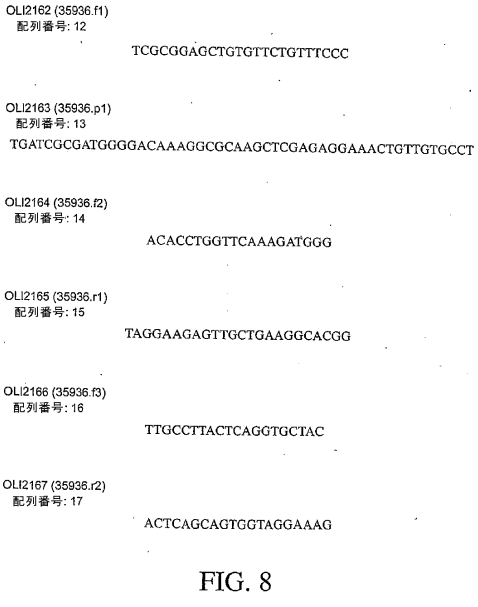


FIG. 8

【図９Ａ】

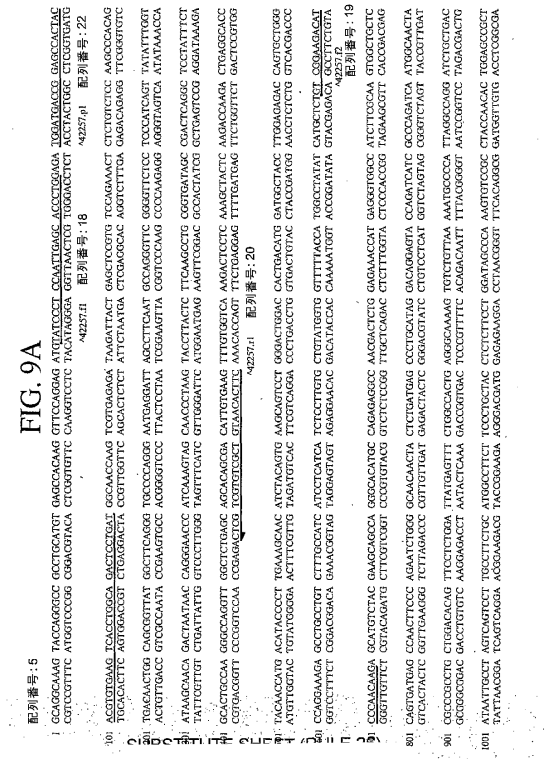


FIG. 9A

【図９Ｂ】

配列番号：5

```
1101 GGGAGTCACT GGCTTTGCCC TGGAATTTGC CAGATGCATC TCAAGTAAGC CAGCTGCTGG ATTTGGCTCT GGGCCCTTCT AGTATCTCTG CGGGGGGCTT
     CCCTCAGTGA CCGAAACGGG ACCTTAAACG GTCTACGTAG AGTTCATTCG GTCGACGACC TAAACCGAGA CCCGGGAAGA TCATAGAGAC GGCCCCCGAA
                                                                                  ^42257.r2   配列番号：21

1201 CTGGTACTCC TCTCTAAATA CCAGAGGGAA GATGCCCATA GCACTAGGAC TTGGTCATCA TGCCTACAGA CACTATTCAA CTTTGGCATC TTGCCACCAG
     GACCATGAGG AGAGATTTAT GGTCTCCCTT CTACGGGTAT CGTGATCCTG AACCAGTAGT ACGGATGTCT GTGATAAGTT GAAACCGTAG AACGGTGGTC

1301 AAGACCCGAG GGGAGGCTCA GCTCTGCCAG CTCAGAGGAC CAGCTATATC CAGGATCATT TCTCTTTCTT CAGGGCCAGA CAGCTTTTAA TTGAAATTGT
     TTCTGGGCTC CCCTCCGAGT CGAGACGGTC GAGTCTCCTG GTCGATATAG GTCCTAGTAA AGAGAAAGAA GTCCCGGTCT GTCGAAAATT AACTTTAACA

1401 TATTTCACAG GCCAGGGTTC AGTTGTGCTC CTCCACTATA AGTCTAATGT TCTGACTCTC TCCTGGTGCT CAATAAATAT CTAATCATAA CAGCAAAAAA
     ATAAAGTGTC CGGTCCCAAG TCAAGACGAG GAGGTGATAT TCAGATTACA AGACTGAGAG AGGACCAGGA GTTATTTATA GATTAGTATT GTCGTTTTTT

1501 AAA
     TTT
```

FIG. 9B

【図９Ａ】

(111) JP 5319051 B2 2013.10.16

【図１０Ａ】

		フレーム	スコア	マッチ	パーセント
A33_human	A33 抗原前駆体 - ホモサピエンス	+1	246	81	30

A33_human--A33 抗原前駆体 - ホモサピエンス (319 aa)
スコア＝246 (86.6 ビット),予測 ＝2.8e-19, P＝2.8e-19
同一性 ＝81/268 (30%), 陽性 ＝131/268 (48%),(121, 17 において),フレーム＝+1

```
DNA40628   121 LALGSVTVHSSEPEVRIPENNPVKLSCAYSGFSSPR---VEW-KFDQGDTTRLVC--YNN
配列番号：23
A33_human   17 VTVDAISVETPQDVLRASQGKSVTLPCTYHTSTSSREGLIQWDKLLLTHTERVVIWPFSN
配列番号：24

DNA40628   283 K--ITAS-YEDRVTFL------PTGITPKSVTREDTGTYTCMVS---EEGGNSYGEVKVK
A33_human   77 KNYIHGELYKNRVSISNNAEQSDASITIDQLTMADNGTYECSVSLMSDLEGNT--KSRVR

DNA40628   427 LIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPPSEYTWFKDGIVMPTNPKSTRAFSN
A33_human  135 LLVLVPPSKPECGIEGETIIGNNIQLTCQSKEGSPTPQYSWKRYNILNQEQP--------

DNA40628   607 SSYVLNPTTGELV-FDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPMTSNAVRMEAVERNVGV---IVA
A33_human  187 ---LAQPASGQRVSLKNISTDTSGYYICTSSNEEGTQFCNITVAVRSPSMNVALYVGIAV

DNA40628   775 AVLVTLILLGILVFGIWFAYSRGHFDRT--KKGTSSKKVIYSQP
A33_human  244 GVVAALIIIGIIIY---CCCCRGKDDNTEDKEDARPNREAYEEP
```

FIG. 10A

【図１０Ｂ】

スコア＝245 (86.2 ビット),予測 ＝3.6e-19, P＝3.6e-19
同一性 ＝83/273 (30%), 陽性＝131/273 (47%),(112, 12 において),フレーム＝+1

```
DNA40628   112 LCSL--ALGSVTVHSSEPEVRIPENNPVKLSCAYSGFSSPR---VEW-KFDQGDTTRLVC
SEQ ID NO: 25
A33_human   12 LCAVRVTVDAISVETPQDVLRASQGKSVTLPCTYHTSTSSREGLIQWDKLLLTHTERVVI
SEQ ID NO: 24

DNA40628   274 --YNNK--ITAS-YEDRVTFL------PTGITFKSVTREDTGTYTCMVSEEGGNSYGEVK
A33_human   72 WPFSNKNYIHGELYKNRVSISNNAEQSDASITIDQLTMADNGTYECSVSLMS-DLEGNTK

DNA40628   421 --VKLIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPPSEYTWFKDGIVMPTNPKSTR
A33_human  131 SRVRLLVLVPPSKPECGIEGETIIGNNIQLTCQSKEGSPTPQYSWKRYNILNQEQP----

DNA40628   595 AFSNSSYVLNPTTGELV-FDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPMTSNAVRMEAVERNVGV--
A33_human  187 -------LAQPASGQPVSLKNISTDTSGYYICTSSNEEGTQFCNITVAVRSPSMNVALYV

DNA40628   766 -IVAAVLVTLILLGILVFGIWFAYSRGHFDRT--KKGTSSKKVIYSQP
A33_human  240 GIAVGVVAALIIIGIIIY---CCCCRGKDDNTEDKEDARPNREAYEEP
```

FIG. 10B

【図１１】

配列番号：9

```
MARRSRHRLLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDQQVVTAVEYQEAILACKTPKKTVSSR
LEWKKLGRSVSFVYYQQTLQGDFKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSEQGQN
LEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSSALSGTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGIRLLENPR
LGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVSKLDTGEYSCEARNSVGYRRCPGKRMQVDDLNISGI
IAAVVVVALVISVCGLGVCYAQRKGYFSKETSFQKSNSSSKATTMSENVQWLTPVIPALW
KAAAGGSRGQEF
```

FIG. 11

【図１２】

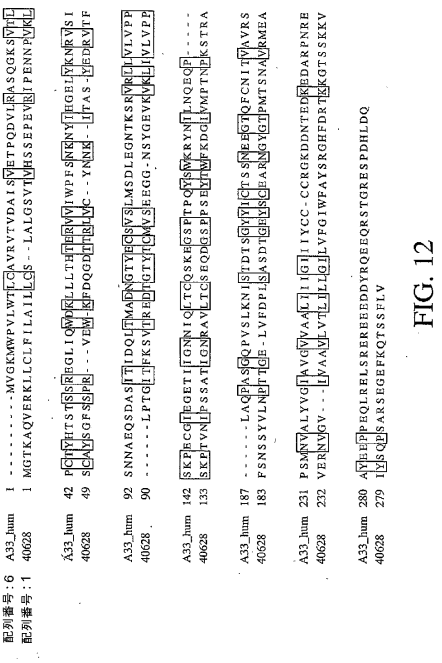


FIG. 12

【図１３】

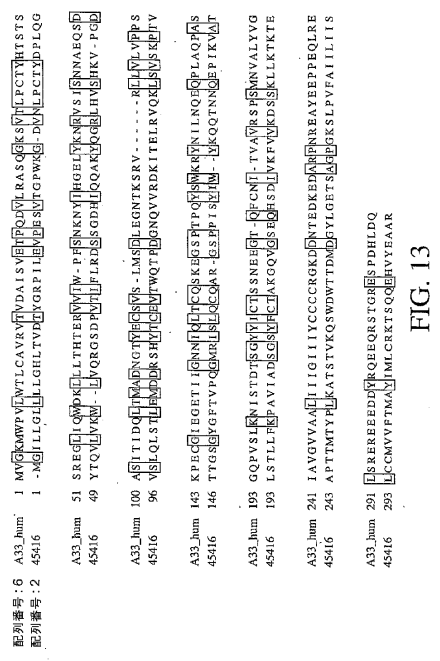


FIG. 13

【図１４】

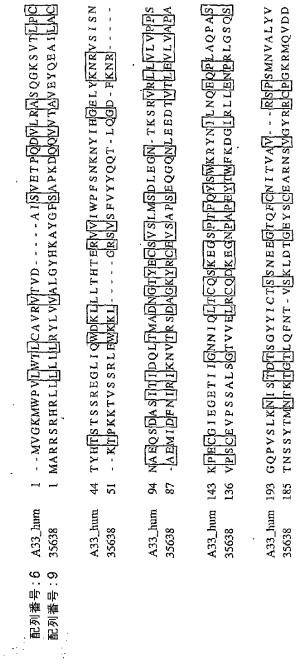


FIG. 14

【図１５】

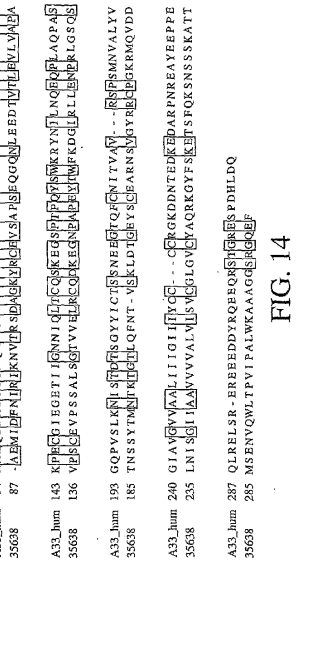


FIG. 15

【図１６】

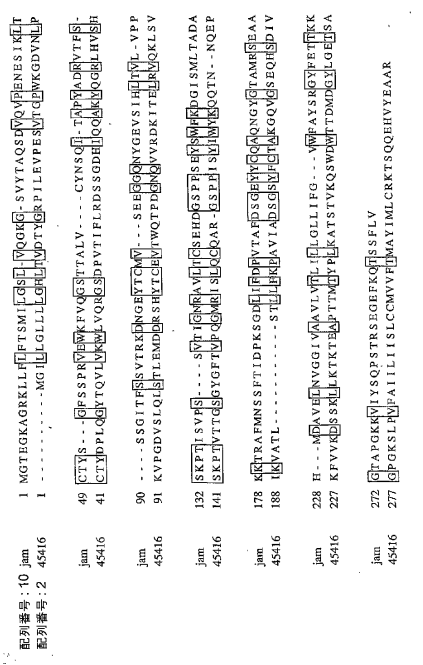


FIG. 16

【図１７】

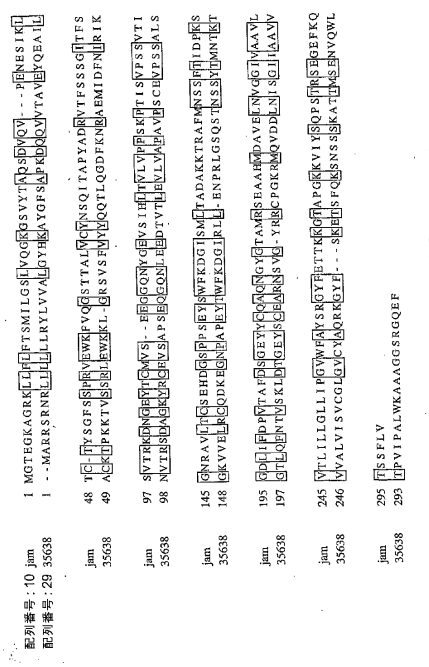


FIG. 17

【図１８】

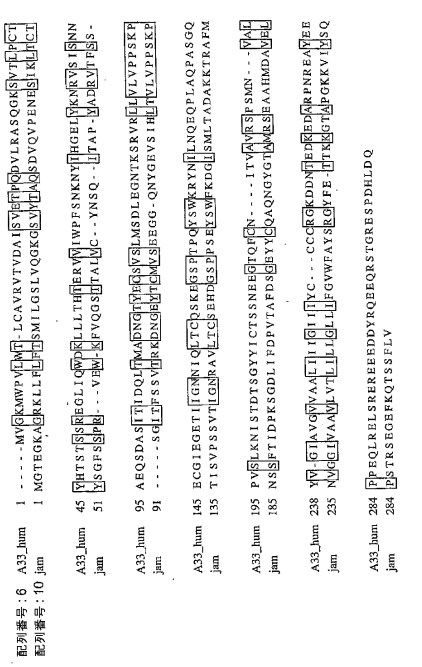


FIG. 18

【図１９】

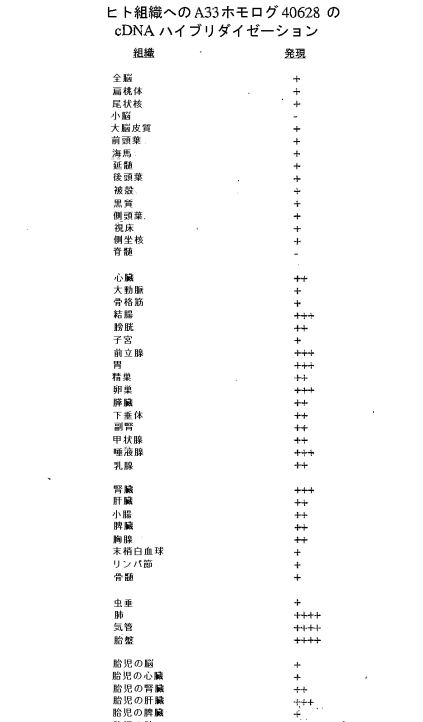


FIG. 19

【図２０】

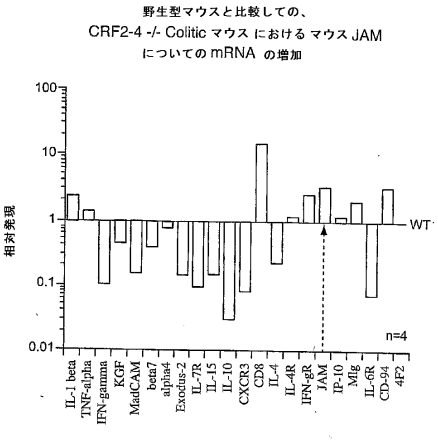


FIG. 20

【図２１】

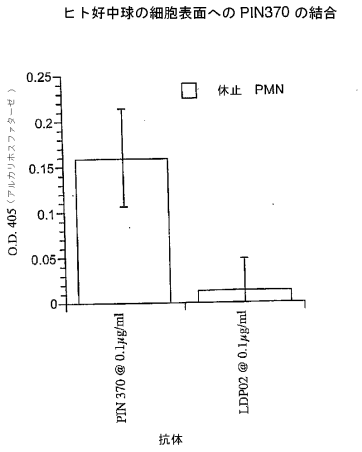
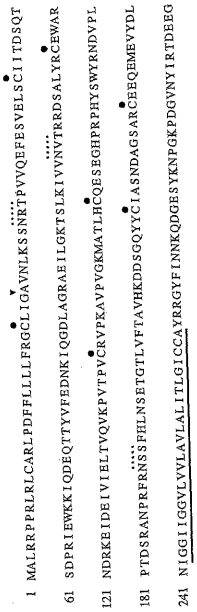


FIG. 21

【図２２】

FIG. 22



【図２３】

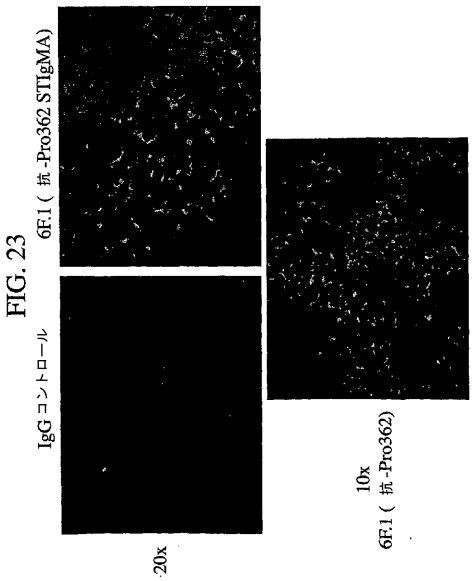
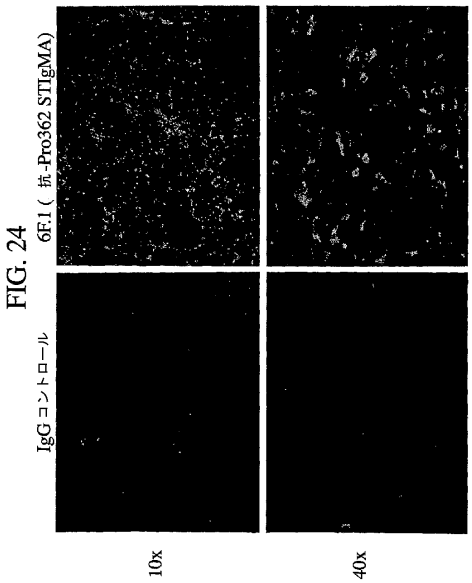
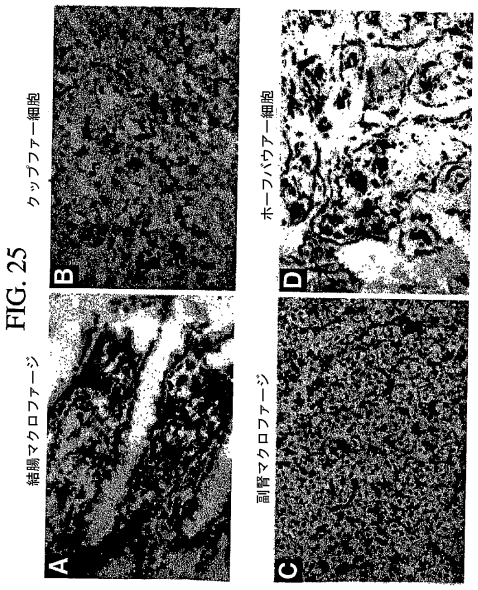


FIG. 23

【図２４】

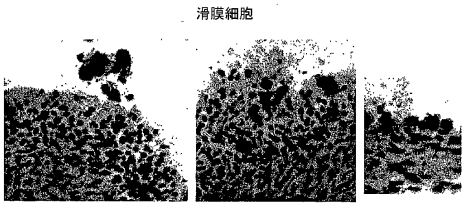


【図２５】

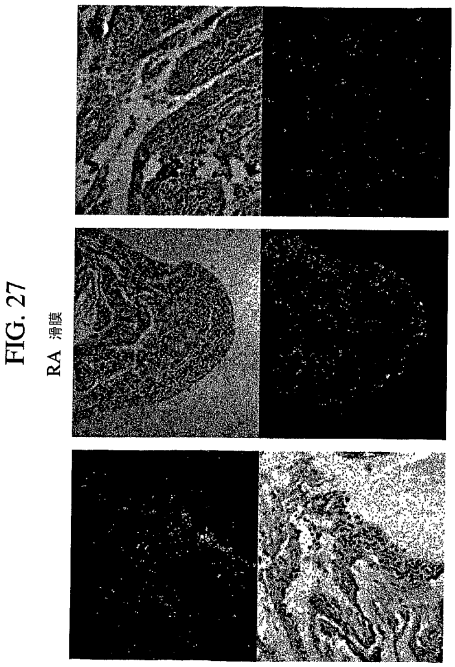


【図２６】

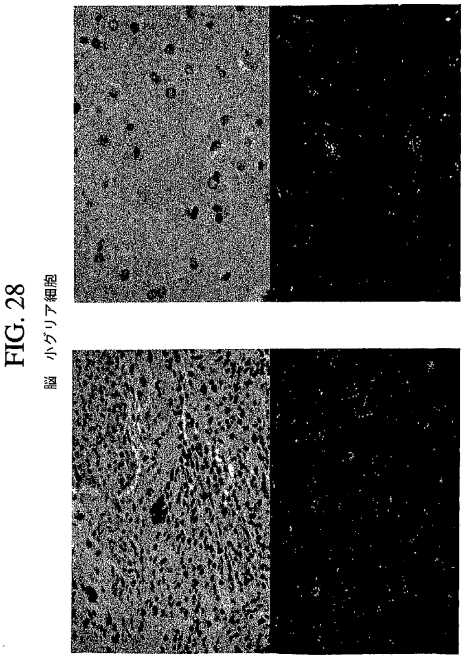
FIG. 26



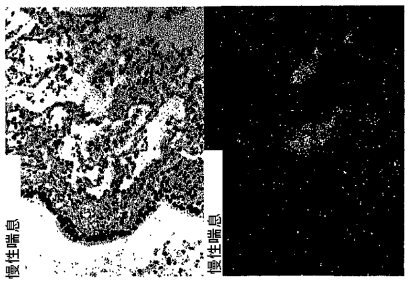
【図２７】



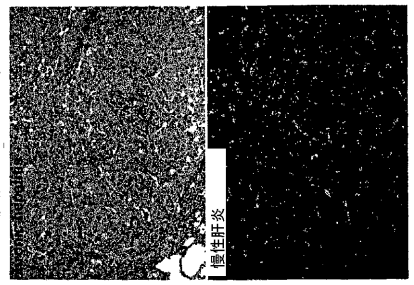
【図２８】



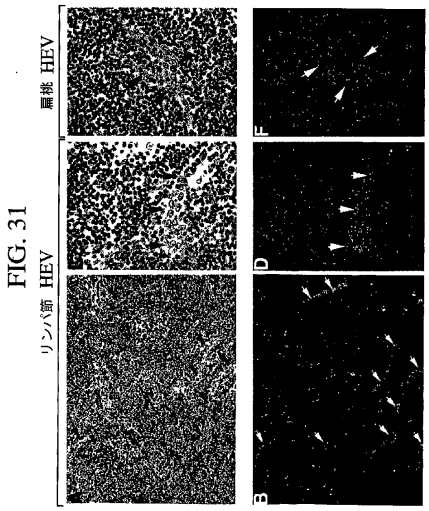
【図２９】



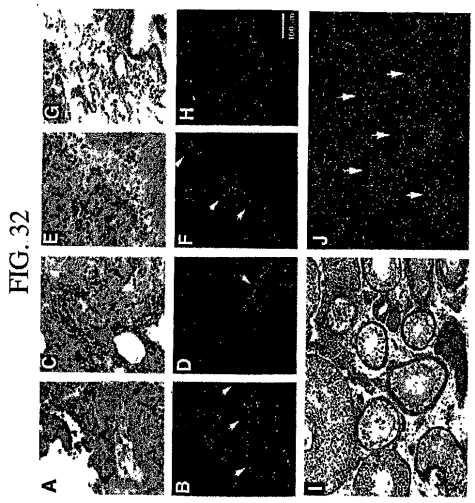
【図３０】



【図３１】

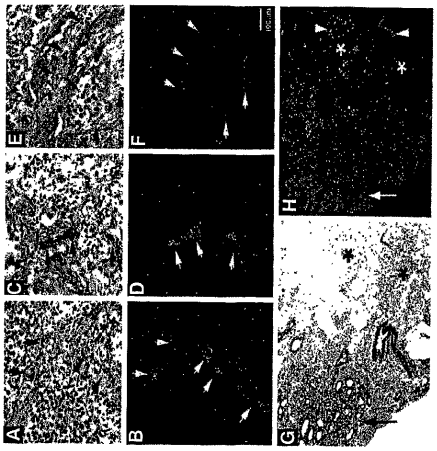


【図３２】



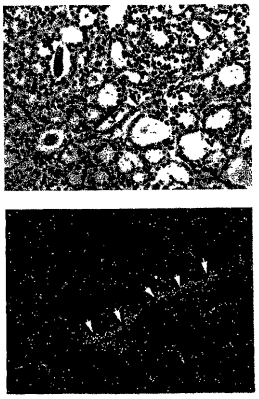
【図３３】

FIG. 33



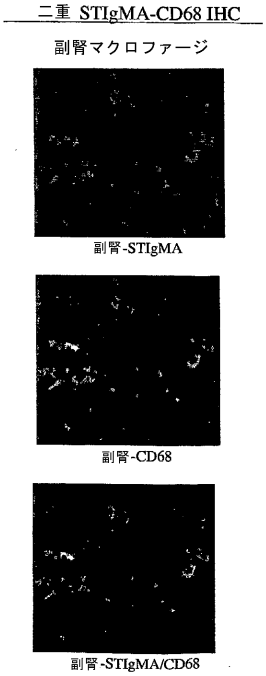
【図３４】

FIG. 34



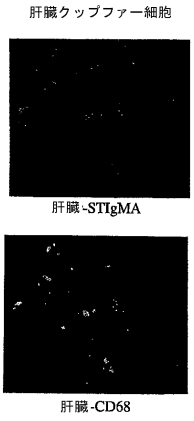
【図３５】

FIG. 35



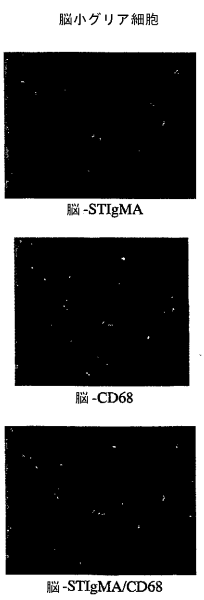
【図３６】

FIG. 36



【図３７】

FIG. 37

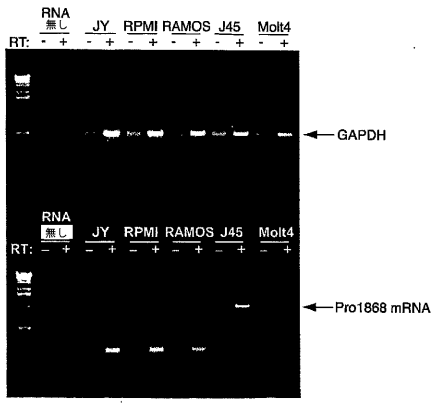


【図３８】

FIG. 38

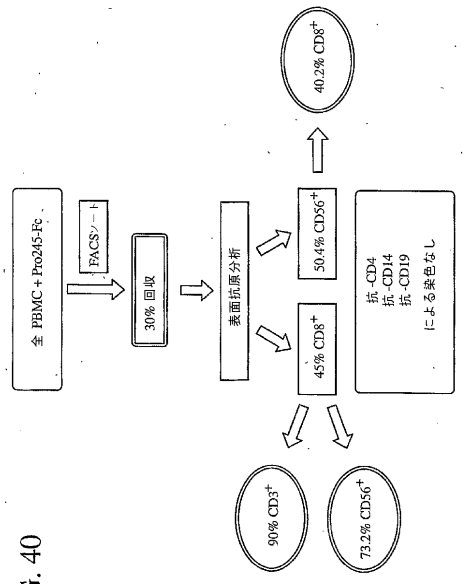
【図３９】

FIG. 39



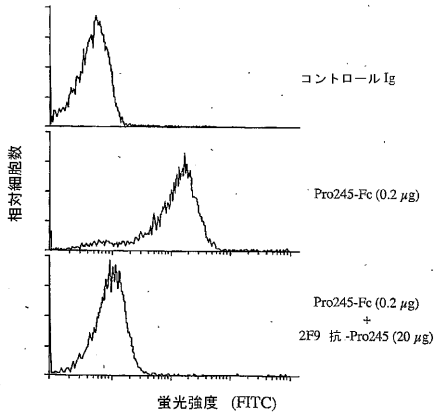
【図４０】

FIG. 40



【図４１】

FIG. 41



【図４２】

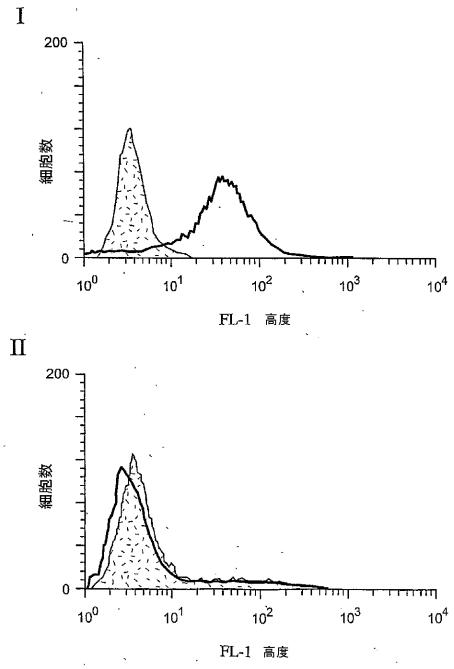
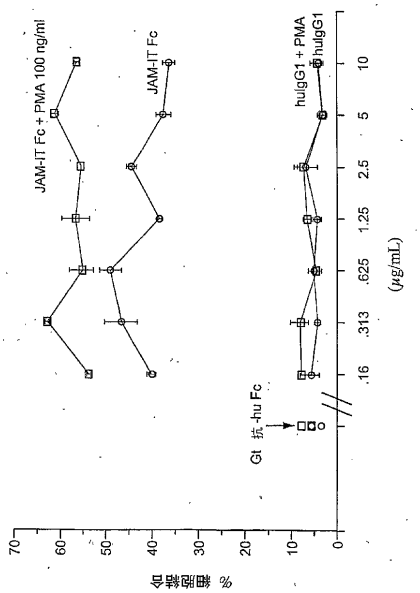


FIG. 42

【図４３】

FIG. 43



【図４４】

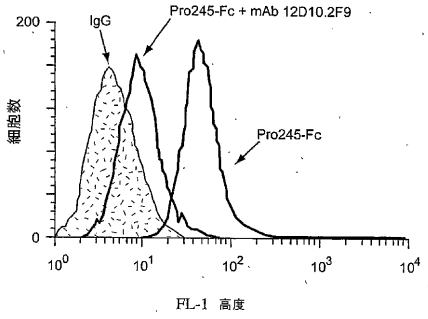


FIG. 44

【図４５】

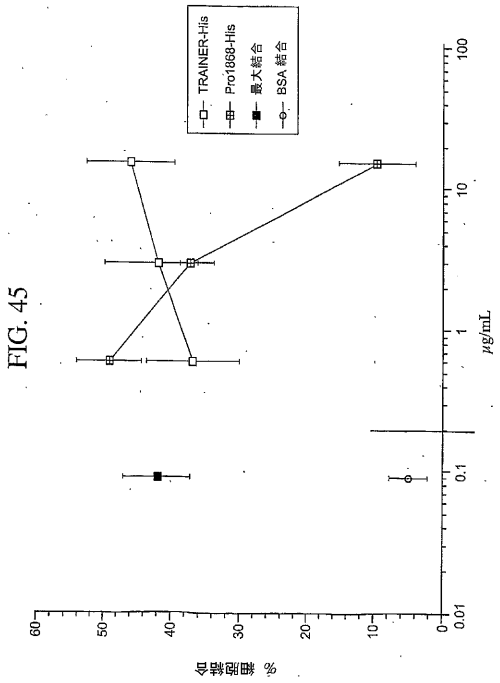


FIG. 45

【図４６】

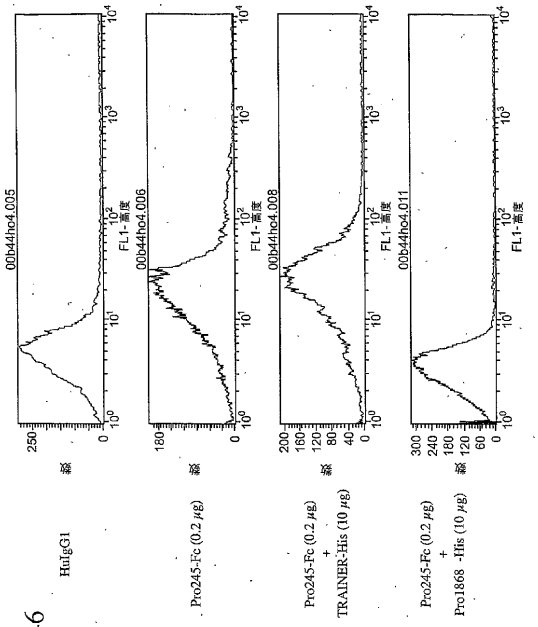


FIG. 46

【図４７】

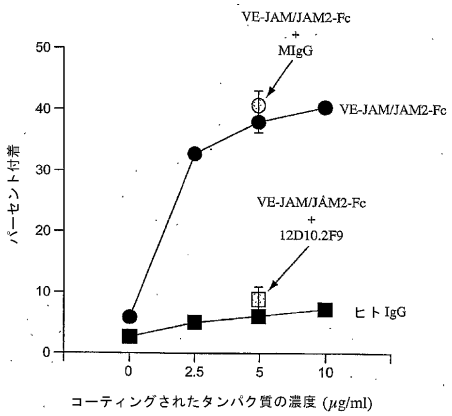


FIG. 47

【図４８】

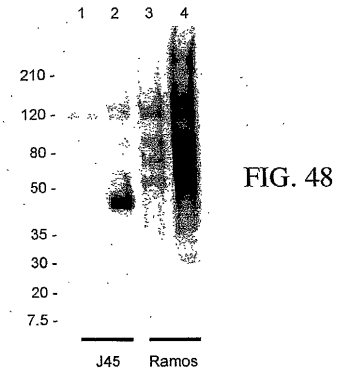


FIG. 48

【図４９】

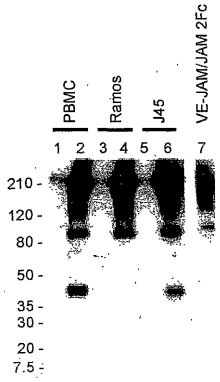


FIG. 49

【図５０】

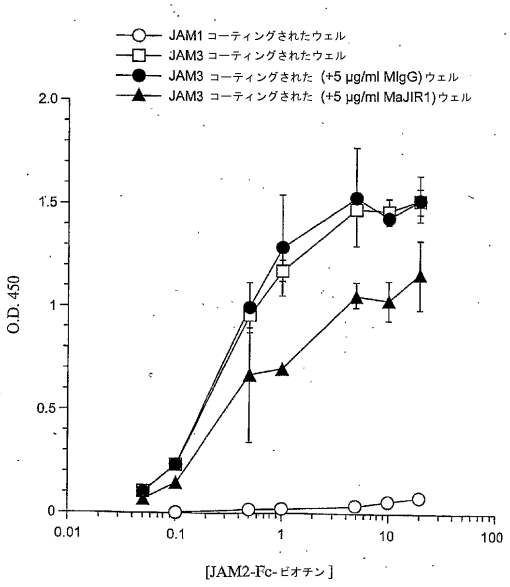


FIG. 50

【図５１】

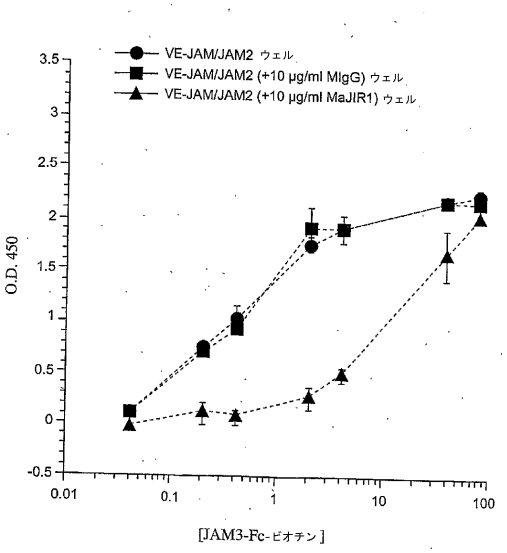


FIG. 51

【図５２】

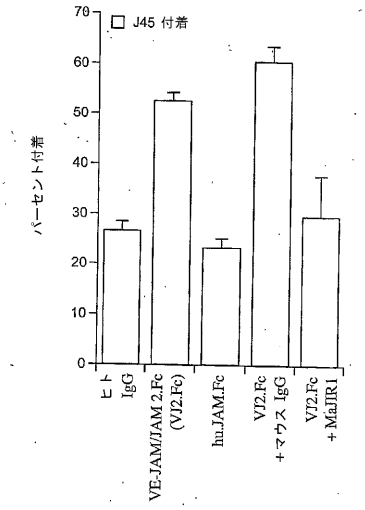


FIG. 52

【図５３】

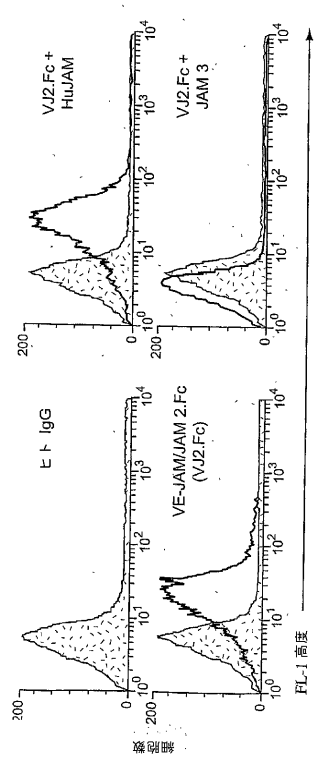


FIG. 53

【図５４】

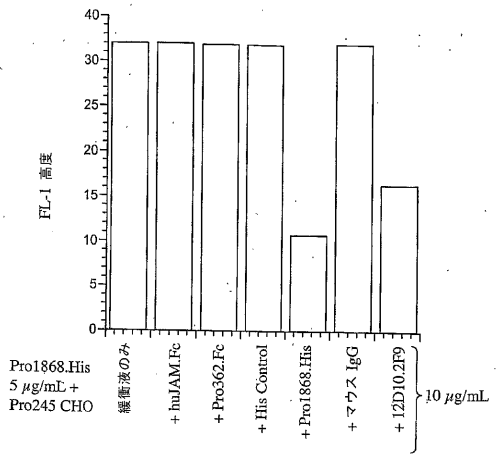


FIG. 54

【図５５】

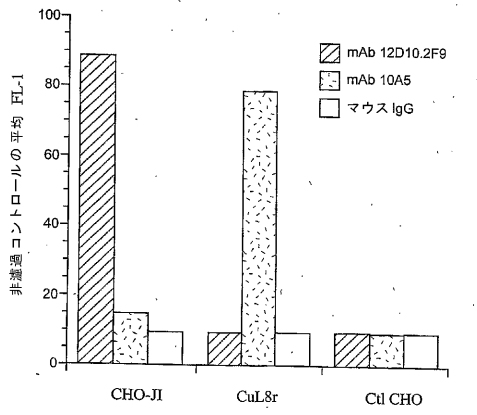


FIG. 55

【図５６】

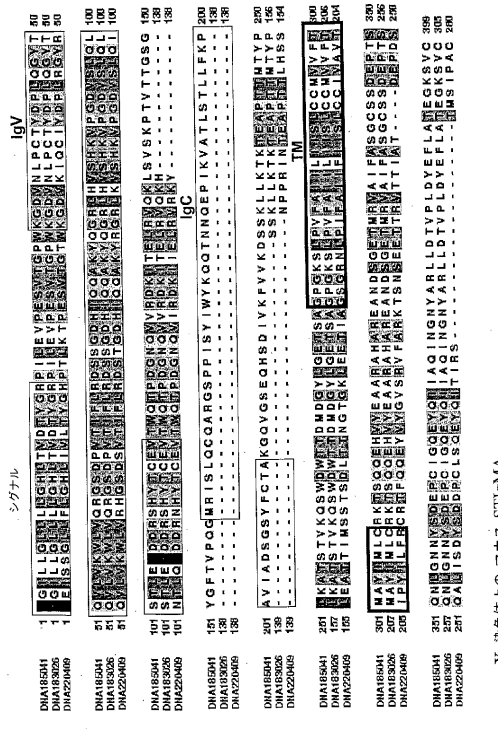


Fig. 56

【図５７】

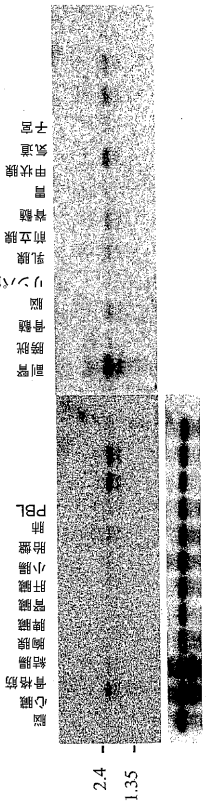


Fig. 57

【図５８】

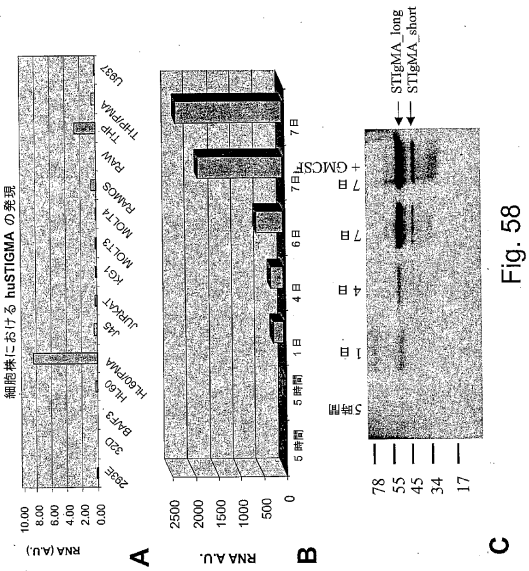


Fig. 58

【図５９】

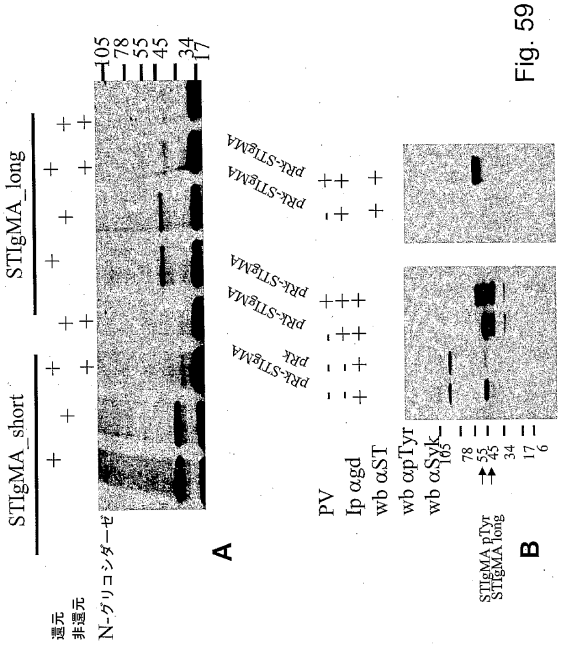


Fig. 59

【図６０】

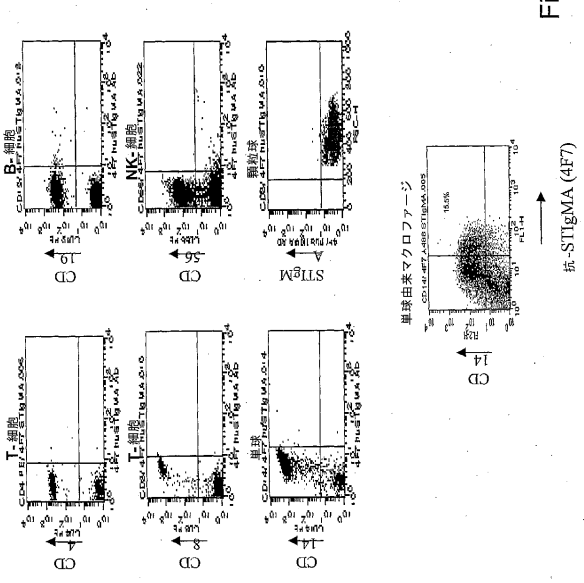


Fig. 60

【図６１Ａ】

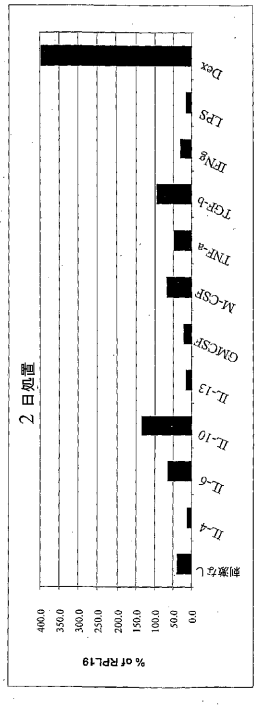


Fig. 61A

【図６１Ｂ】

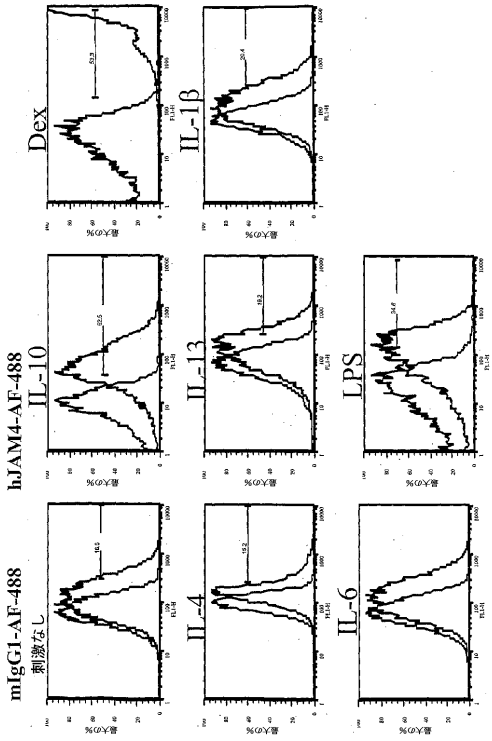


Fig. 61B

【図６２】

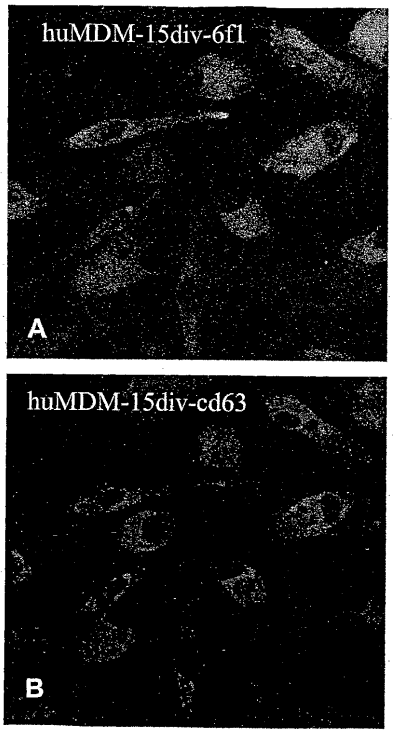


Fig.62

【図６３】

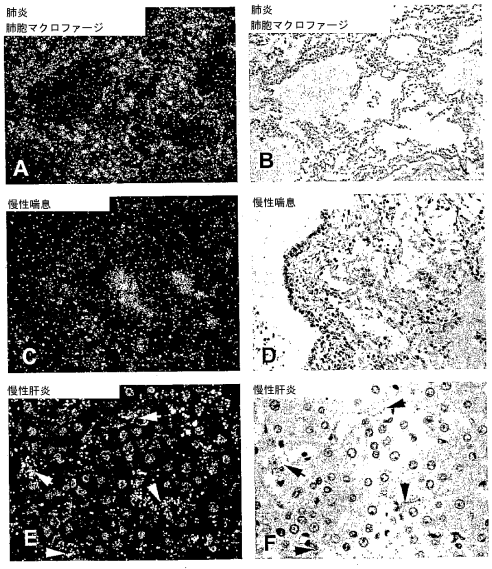


Fig. 63

【図６４】

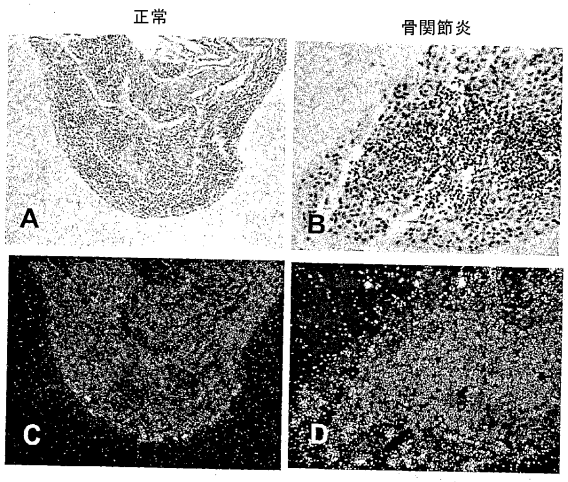


Fig. 64

【図６５】

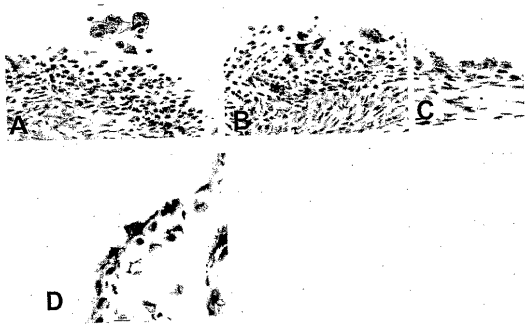


Fig. 65

【図６６】

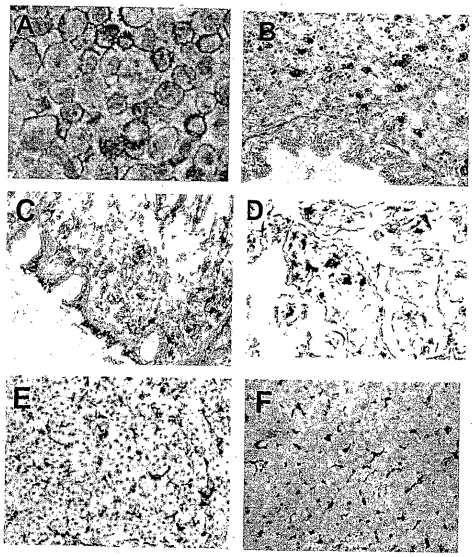


Fig. 66

【図６７】

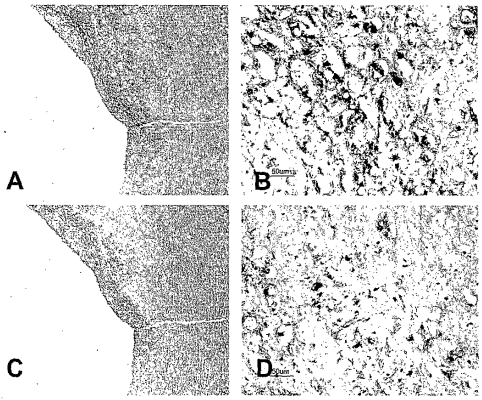


Fig. 67

【図６８】

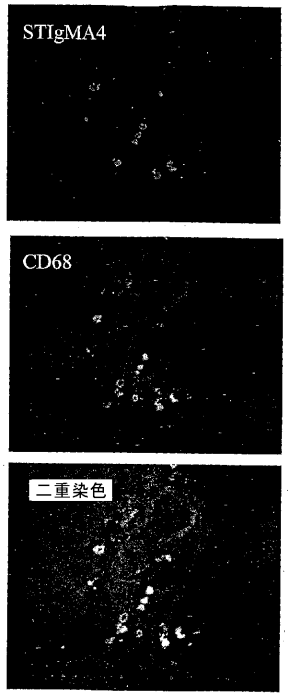


Fig. 68

【図６９】

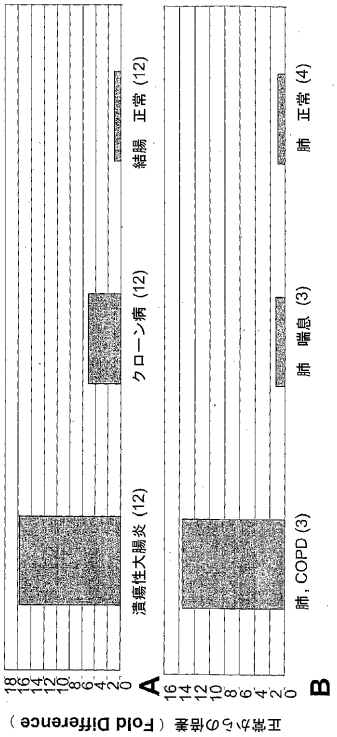


Fig 69

【図７０】

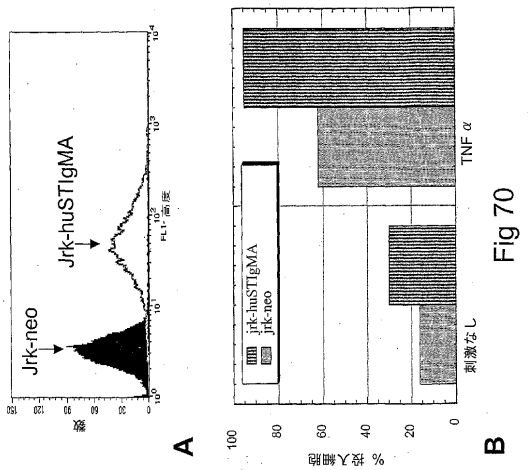
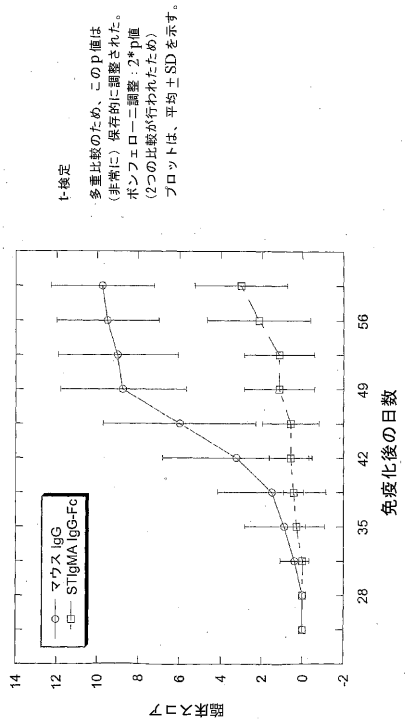


Fig 70

【図７１】

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



【配列表】
0005319051000001.app
0005319051000002.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
A61P 37/06	***(2006.01)***	A61P 37/02	
A61P 37/08	***(2006.01)***	A61P 37/06	
C12N 15/09	*(2006.01)*	A61P 37/08	
		C12N 15/00	ZNAA

(72)発明者 フォン, シャーマン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94502, アラメダ, バシンサイド ウェイ 19
(72)発明者 ゴッダード, オードリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サン フランシスコ, コンゴ ストリート 110
(72)発明者 ガーニー, オースティン エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, デビー レーン 1
(72)発明者 ナピアー, マリー エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲーム, ハイン ロード 1015
(72)発明者 トゥマス, ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94563, オリンダ, ラエ アベニュー 3
(72)発明者 バン ロッケレン, メノ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94127, サン フランシスコ, モリモ ドライブ 261
(72)発明者 ウッド, ウィリアム アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズボロー, サウスダウン コート 35

合議体
審判長 鈴木 恵理子
審判官 冨永 みどり
審判官 田中 晴絵

(56)参考文献 国際公開第01／36432（WO, A1）
国際公開第99／27098（WO, A1）
米国国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）, Accession No. NP_808457, 26−MAR−2003 uploaded, ［検索日：2009. 6. 26］<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?29244314:OLD03:2773940>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-90
PubMed
SwissProt／PIR／GeneSeq
GenBank／EMBL／DDBJ／GeneSeq

专利名称(译)	使用A33抗原和JAM-IT		
公开(公告)号	JP5319051B2	公开(公告)日	2013-10-16
申请号	JP2005500358	申请日	2003-10-01
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
当前申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	アシュケナジアビジェイ フォンシャーマン ゴッダードオードリー ガーニーオースティンエル ナピアーマリーエー トゥマスダニエル バンロッケレンメノ ウッドウィリアムアイ		
发明人	アシュケナジ, アビ ジェイ. フォン, シャーマン ゴッダード, オードリー ガーニー, オースティン エル. ナピアー, マリー エー. トゥマス, ダニエル バン ロッケレン, メノ ウッド, ウィリアム アイ.		
IPC分类号	A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C12N15/09 A61K38/17 A61K39/00 C07B C07B63/00 C07H21/04 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/28 C07K19/00 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/574		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/2803 C07K2317/56 C07K2319/30 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/564 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/57407 G01N33/57492 G01N33/6893 G01N2333/705 G01N2800/065 G01N2800/102 G01N2800/122 G01N2800/127 G01N2800/24		
FI分类号	A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C12N15/00.ZNA.A		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	10/265542 2002-10-03 US 10/633008 2003-07-31 US		
其他公开文献	JP2006501862A5 JP2006501862A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及治疗和诊断病症的组合物和方法，其特征在于存在与炎性疾病和/或癌症相关的抗原。

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