

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-220612

(P2010-220612A)

(43) 公開日 平成22年10月7日(2010.10.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08 Z N A	4 B 0 2 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B 0 6 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C 0 8 5
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-51579 (P2010-51579)	(71) 出願人	505222646
(22) 出願日	平成22年3月9日 (2010.3.9)		ザイモジェネティクス, インコーポレイ
(62) 分割の表示	特願2003-580498 (P2003-580498)		テッド
	の分割		アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
原出願日	平成15年3月24日 (2003.3.24)		イーストレイク アベニュー イースト
(31) 優先権主張番号	60/366,842		1 2 0 1
(32) 優先日	平成14年3月22日 (2002.3.22)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100121072
			弁理士 川本 和弥
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 I L - T I F 抗体および炎症において使用する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 IL-TIFポリペプチド特異的抗体による炎症誘発活性の阻害方法。

【解決手段】 IL-TIFは、炎症プロセスおよびヒト疾患に関与するサイトカインである。IL-TIFに対する抗体を産生する方法、及びその使用に関し、抗IL-TIF抗体および結合パートナー、並びに、IL-TIFに関連するヒト炎症性疾患においてこのような抗体および結合パートナーを使用してIL-TIFをアンタゴナイズする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリペプチドに対する抗体を産生する方法であって：

以下の群に由来するポリペプチドを動物に接種する段階であって、該ポリペプチドは、動物の免疫応答を誘発して抗体を産生させる、段階：

(a) 30～144のアミノ酸を有するポリペプチドであって、配列番号：3のアミノ酸番号23(Gly)～アミノ酸番号779(Thr)までの連続するアミノ酸の配列と同一であるポリペプチド；

(b) 配列番号：3のアミノ酸番号23(Pro)～アミノ酸番号167(Ile)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(c) 配列番号：3のアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号167(Ile)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：2のアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号179(Ile)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(e) 配列番号：3のアミノ酸番号29(Arg)～アミノ酸番号34(Asn)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(f) 配列番号：3のアミノ酸番号121(His)～アミノ酸番号126(Asp)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(g) 配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)～アミノ酸番号139(Thr)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(h) 配列番号：3のアミノ酸番号137(Lys)～アミノ酸番号142(Lys)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(i) 配列番号：3のアミノ酸番号145(Glu)～アミノ酸番号150(Lys)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(j) 配列番号：3のアミノ酸番号41(Thr)～アミノ酸番号53(Leu)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(k) 配列番号：3のアミノ酸番号80(Met)～アミノ酸番号91(Val)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(l) 配列番号：3のアミノ酸番号103(Met)～アミノ酸番号116(Arg)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(m) 配列番号：3のアミノ酸番号149(Ile)～アミノ酸番号162(Leu)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(n) 配列番号：3のアミノ酸番号28(Cys)～アミノ酸番号35(Phe)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；および

(o) 配列番号：3のアミノ酸番号52(Ser)または55(Asp)～アミノ酸番号59(Asp)または62(Leu)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(p) 配列番号：3のアミノ酸番号94(Pro)または95(Gln)～アミノ酸番号100(Gln)または103(Met)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(q) 配列番号：3のアミノ酸番号113(Leu)～アミノ酸番号118(Ser)または119(Thr)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(r) 配列番号：3のアミノ酸番号123(Glu)～アミノ酸番号126(Asp)または128(His)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(s) 配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)または144(Gly)～アミノ酸番号147(Gly)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(t) 配列番号：34のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(u) 配列番号：35のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(v) 配列番号：36のアミノ酸配列を有するポリペプチド；ならびに、

動物から抗体を単離する段階；を含み、

該抗体は、特異的にIL-TIFポリペプチドに結合し；かつ配列番号：2または配列番号：3のポリペプチドの炎症誘発性の活性を阻害する、方法。

【請求項2】

10

20

30

40

50

請求項1記載の方法によって産生される抗体であって、配列番号：2または配列番号：3のポリペプチドに結合する抗体。

【請求項3】

請求項2記載の抗体であって、以下の群より選択される抗体：(a)ポリクローナル抗体、(b)マウスのモノクローナル抗体、(c)(b)に由来するヒト化抗体、(d)抗体断片、および(e)ヒト・モノクローナル抗体。

【請求項4】

(a)配列番号：3のアミノ酸番号23(Pro)～アミノ酸番号167(Ile)で示されるアミノ酸配列；

(b)配列番号：3のアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号167(Ile)で示されるアミノ酸配列；および、

(c)配列番号：2のアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号179(Ile)で示されるアミノ酸配列の群より選択されるアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドに特異的に結合し、且つ

配列番号：2もしくは配列番号：3のIL-TIFポリペプチドの炎症誘発性の活性を阻害する、減弱させる、または中和する、抗体または抗体断片。

【請求項5】

放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチド・タグ、磁性粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項2記載の抗体。

【請求項6】

造血細胞および造血細胞前駆体のIL-TIFで誘導される増殖または分化を阻害するための方法であって、骨髄または末梢血細胞を、可溶性サイトカイン受容体の非存在下で培養した骨髄または末梢血細胞と比較して、骨髄または末梢血細胞中の造血細胞の増殖または分化を減少させるために十分な請求項2記載の抗体の量を含む組成物と共に培養する段階を含む、方法。

【請求項7】

造血細胞および造血細胞前駆体がリンパ球様細胞である、請求項6記載の方法。

【請求項8】

リンパ球様細胞がマクロファージまたはT細胞である、請求項7記載の方法。

【請求項9】

IL-TIFで誘導される炎症を減少させる方法であって、炎症を有する哺乳動物に、炎症を減少させるのに十分な量の請求項2記載の抗体の組成物を投与する段階を含む、方法。

【請求項10】

以下の段階を含む、炎症を有する哺乳動物の炎症反応を抑制する方法：

(1)血清アミロイドAタンパク質のレベルを測定する段階；

(2)許容される薬学的媒介物中に請求項2記載の抗体を含む組成物を投与する段階；

(3)血清アミロイドAタンパク質の投与後レベルを測定する段階；

(4)段階(3)の血清アミロイドAタンパク質のレベルと、段階(1)の血清アミロイドAタンパク質のレベルを比較する段階であって、該血清アミロイドAタンパク質レベルの増加または減少が無いことにより、炎症反応の抑制が示される段階。

【請求項11】

放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチド・タグ、磁性粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項4記載の抗体。

【請求項12】

IL-TIFで誘導される造血細胞および造血細胞前駆体の増殖または分化を阻害するための方法であって、骨髄または末梢血細胞を、可溶性サイトカイン受容体の非存在下で培養した骨髄または末梢血細胞と比較して骨髄または末梢血細胞中の造血細胞の増殖または分化を減少させるのに十分な量の請求項4記載の抗体を含む組成物と共に培養する段階を含む、方法。

【請求項13】

造血細胞および造血細胞前駆体がリンパ球様細胞である、請求項12記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

リンパ球様細胞がマクロファージまたはT細胞である、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

IL-TIFで誘導される炎症を減少させる方法であって、炎症を有する哺乳動物に、炎症を減少させるのに十分な量の請求項4記載の抗体の組成物を投与する段階を含む、方法。

【請求項 16】

以下の段階を含む、炎症を有する哺乳動物の炎症反応を抑制する方法：

- (1) 血清アミロイドAタンパク質のレベルを測定する段階；
- (2) 許容される薬学的媒介物中に請求項4記載の抗体を含む組成物を投与する段階；
- (3) 血清アミロイドAタンパク質の投与後レベルを測定する段階；
- (4) 段階(3)の血清アミロイドAタンパク質のレベルと、段階(1)の血清アミロイドAタンパク質のレベルとを比較する段階であって、該血清アミロイドAタンパク質レベルの増加または減少が無いことにより、炎症反応の抑制が示される、段階。

10

【請求項 17】

患者の癌を検出するための方法であって：

患者から組織または生体試料を得る段階；

請求項1記載の抗体と組織または生体試料を、該抗体が組織または生体試料中のその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートする段階；

組織または生体試料中の結合した抗体を視覚化する段階；および、

患者からの組織または生体試料中の結合した抗体のレベルを正常な対照組織または生体試料と比較する段階を含み、

20

正常対照組織または生体試料と比較して、患者の組織または生体試料に結合した抗体のレベルが増大していることにより、患者の癌が示される、方法。

【請求項 18】

以下の段階を含む、IL-TIFまたは血清アミロイドAが役割を果たす炎症性疾患に罹患している哺乳動物を治療する方法：

炎症が減少されるように、該哺乳動物にIL-TIFまたは血清アミロイドAのアンタゴニストを投与する段階であって、該アンタゴニストが、IL-TIFのポリペプチドまたはポリペプチド断片(配列番号：3)に特異的に結合する抗体または結合ポリペプチドの群より選択される段階。

30

【請求項 19】

疾患が慢性の炎症性疾患である、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

疾患が以下の群より選択される慢性の炎症性疾患である、請求項19記載の方法：

- (a) 炎症性腸疾患；
- (b) 潰瘍性大腸炎；
- (c) クローン病；
- (d) 関節炎；および
- (e) 乾癬。

【請求項 21】

疾患が急性の炎症性疾患である、請求項18記載の方法。

40

【請求項 22】

疾患が以下の群より選択される急性の炎症性疾患である、請求項21記載の方法：

- (a) 内毒血症；
- (b) 敗血症；
- (c) 毒素ショック症候群；および
- (d) 感染症。

【請求項 23】

抗体が、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチド・タグ、磁性粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項18記載の方法。

50

【請求項 2 4】

以下の群より選択されるヒトIL-TIF(配列番号：3)のエピトープに結合するモノクローナル抗体を含む抗体であって、配列番号：2または配列番号：3のヒトIL-TIFポリペプチドの炎症誘発性の活性を中和する抗体：

(a) 配列番号：3のアミノ酸番号28(Cys)～アミノ酸番号35(Phe)のアミノ酸配列を有するエピトープ；

(b) 配列番号：3のアミノ酸番号52(Ser)または55(Asp)～アミノ酸番号59(Asp)または62(Leu)のアミノ酸配列を有するエピトープ；

(d) 配列番号：3のアミノ酸番号113(Leu)～アミノ酸番号118(Ser)または119(Thr)のアミノ酸配列を有するエピトープ；

(e) 配列番号：3のアミノ酸番号123(Glu)～アミノ酸番号126(Asp)または128(His)のアミノ酸配列を有するエピトープ；

(f) 配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)または144(Gly)～アミノ酸番号147(Gly)のアミノ酸配列を有するエピトープ；

(g) 配列番号：3のアミノ酸番号49(Lys)～アミノ酸番号77(Cys)のアミノ酸配列を有するエピトープ；

(h) 配列番号：3のアミノ酸番号89(Glu)～アミノ酸番号101(Pro)のアミノ酸配列を有し、N末端またはC末端にCysをさらに含むエピトープ；および、

(i) 配列番号：3のアミノ酸番号132(Asn)～アミノ酸番号145(Glu)のアミノ酸配列を有し、N末端またはC末端にCysをさらに含むエピトープ。

【請求項 2 5】

放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチド・タグ、磁性粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項24記載の抗体。

【請求項 2 6】

以下の群より選択される請求項24記載の抗体：(a)マウスのモノクローナル抗体、(b)(a)に由来するヒト化抗体、(c)抗体断片、および(d)ヒト・モノクローナル抗体。

【請求項 2 7】

以下の群より選択されるハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を含む抗体：

(a)ハイブリドーマクローン266.16.1.4.4.1(ATCC [#####])；

(b)ハイブリドーマクローン266.5.1.2.2.3 (ATCC [#####])；

(c)ハイブリドーマクローン267.17.1.1.4.1 (ATCC [#####])；

(d)ハイブリドーマクローン267.4.1.1.4.1(ATCC [#####])；

(e)ハイブリドーマクローン266.12.6.1.3.2.1(ATCC [#####])；および

(f)ハイブリドーマクローン266.19.1.10.5.2 (ATCC [#####])。

【請求項 2 8】

放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチド・タグ、磁性粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項27記載の抗体。

【請求項 2 9】

以下の群より選択される請求項27記載の抗体：(a)マウスのモノクローナル抗体、(b)(a)に由来するヒト化抗体、および(c)抗体断片。

【請求項 3 0】

IL-TIF活性に関連する被検者の病的症状を治療する方法であって、請求項27記載の抗体の有効な量を投与する段階を含み、これにより該病的症状を治療する方法。

【請求項 3 1】

病的症状が慢性の炎症性症状である、請求項30記載の方法。

【請求項 3 2】

慢性の炎症性症状が以下の群より選択される、請求項31記載の方法：

(a)炎症性腸疾患；

(b)潰瘍性大腸炎；

10

20

30

40

50

- (c)クローン病；
- (d)関節炎；および
- (e)乾癬。

【請求項33】

病的症状が急性の炎症性症状である、請求項30記載の方法。

【請求項34】

急性の炎症性症状が以下の群より選択される、請求項33記載の方法：

- (a)内毒血症；
- (b)敗血症；
- (c)毒素ショック症候群；および
- (d)感染症。

10

【請求項35】

IL-TIF活性に関連する被検者の病的症状を治療する方法であって、請求項24記載の抗体の有効な量を投与する段階を含み、これにより該病的症状を治療する方法。

【請求項36】

病的症状が慢性の炎症性症状である、請求項35記載の方法。

【請求項37】

慢性の炎症性症状が以下の群より選択される、請求項36記載の方法：

- (f)炎症性腸疾患；
- (g)潰瘍性大腸炎；
- (h)クローン病；
- (i)関節炎；および
- (j)乾癬。

20

【請求項38】

病的症状が急性の炎症性症状である、請求項35記載の方法。

【請求項39】

急性の炎症性症状が以下の群より選択される、請求項38記載の方法：

- (e)内毒血症；
- (f)敗血症；
- (g)毒素ショック症候群；および
- (h)感染症。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願についての参照

本出願は、2002年3月22日に出願の米国仮出願第60/366,842号に関する。35U.S.C. § 119 (e)(1)条の下で、本出願は該仮出願の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

サイトカインは、一般に造血性の系統の細胞の増殖もしくは分化を刺激し、または体の免疫炎症反応機構に参与する。

40

【0003】

造血に影響を与えるサイトカインの例は、赤血球細胞の発生を刺激するエリスロポエチン(EPO)；巨核球系の細胞の発生を刺激する trombopoietin (TPO)；および好中球の発生を刺激する顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)を含む。これらのサイトカインは、貧血、血小板減少症、および好中球減少症に罹患しているか、または癌のために化学療法を受けている患者における正常な血液細胞レベルの回復に有用である。

【0004】

インターロイキンは、炎症を含む免疫応答を媒介するサイトカインのファミリーである

50

。インターロイキンは、種々の炎症性病理学を媒介する。免疫応答の中心は、T細胞であり、多くのサイトカインおよび抗原に対する適応免疫を生ずる。T細胞によって産生されるサイトカインは、1型および2型として分類されている(Kelso, A. Immun. Cell Biol. 76 : 300-317, 1998 (非特許文献1))。1型サイトカインは、IL-2、IFN- γ 、LT- α を含み、炎症反応、ウイルスの免疫、細胞内の寄生生物免疫、および同種異系移植片拒絶反応に關与する。2型サイトカインは、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 およびIL-13を含み、体液性の反応、蠕虫免疫、およびアレルギー応答に關与する。1型と2型の間で共有されるサイトカインは、IL-3、GM-CSFおよびTNF- α を含む。1型および2型を産生するT細胞群は、優先して異なるタイプの炎症を起こした組織に遊走することを示唆するいくつかの証拠がある。

10

【0005】

さらに、サイトカインの影響を受ける炎症は、ヒトの急性疾患並びに慢性疾患において現れる。たとえば、増強された炎症性状態は、毒素ショック症候群、敗血症、内毒血症、炎症性腸疾患(IBD)、乾癬、喘息、クローン病、リウマチ様関節炎、並びに多くのその他の疾患において明らかである。多くの例において、慢性の炎症性状態は、このような疾患の側面を衰弱させること、疾患を引き延ばすこと、および損傷を増大して慢性的に炎症を起こした組織となることに直接關与している。従って、抗炎症薬が求められている。

【0006】

示されたサイトカイン・ファミリーのインビボでの活性は、その他のサイトカイン、サイトカイン・アゴニスト、およびサイトカイン・アンタゴニストの莫大な臨床的可能性、および必要性を示す。たとえば、示された炎症誘発性サイトカイン・ファミリーのインビボでの活性は、炎症誘発性分子のアンタゴニストの莫大な臨床的可能性、および必要性を示す。本発明は、中和抗ヒトIL-TIF抗体を含む、炎症誘発性のサイトカインのIL-TIFに対する抗体を提供すること、並びに炎症性疾患における抗IL-TIF抗体の使用、並びに關連した組成物および方法を提供することにより、これらの要求に立ち向かう。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Kelso, A. Immun. Cell Biol. 76 : 300-317, 1998

【発明の概要】

30

【0008】

発明の記載

本発明は、これらおよび本明細書の開示から当業者には明らかであるその他の用途のために、このようなポリペプチドを提供する。

【0009】

1つの局面において、本発明は、(a)30~144のアミノ酸を有するポリペプチドであって、配列番号：3のアミノ酸番号23(Gly)~アミノ酸番号779(Thr)までの連続するアミノ酸の配列と同一であるポリペプチド；(b)配列番号：3のアミノ酸番号23(Pro)~アミノ酸番号167(Ile)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(c)配列番号：3のアミノ酸番号1(Met)~アミノ酸番号167(Ile)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(d)配列番号：2のアミノ酸番号1(Met)~アミノ酸番号179(Ile)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(e)配列番号：3のアミノ酸番号29(Arg)~アミノ酸番号34(Asn)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(f)配列番号：3のアミノ酸番号121(His)~アミノ酸番号126(Asp)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(g)配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)~アミノ酸番号139(Thr)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(h)配列番号：3のアミノ酸番号137(Lys)~アミノ酸番号142(Lys)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(i)配列番号：3のアミノ酸番号145(Glu)~アミノ酸番号150(Lys)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(j)配列番号：3のアミノ酸番号41(Thr)~アミノ酸番号53(Leu)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(k)配列番号：3のアミノ酸番号80(Met)~アミノ酸番号91(Val)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；(l)配列番号：3のアミノ酸番号103(Met)~アミノ酸番号116(Arg)のアミノ酸配列を有

40

50

するポリペプチド；(m)配列番号：3のアミノ酸番号149(Ile)～アミノ酸番号162(Leu)のアミノ酸配列を有するポリペプチド；および、(n)ジェームソン-ウルフ・プロットから推定される配列番号：3のアミノ酸配列のエピトープを含有するポリペプチド；からなる群より選択されるポリペプチドであって、動物の免疫応答を誘発して抗体を産生させる該ポリペプチドを動物に接種する段階と；動物から抗体を単離する段階とを含む、ポリペプチドに対する抗体を産生する方法であって、該抗体は、特異的に配列番号：2または配列番号：3のポリペプチドに結合し；かつ配列番号：2または配列番号：3のポリペプチドの炎症誘発性の活性を阻害するものである方法を提供する。

【0010】

もう1つの局面において、本発明は、上記に開示した方法によって産生される抗体であって、配列番号：2または配列番号：3のポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。1つの態様において、抗体は、上記に開示したとおりであって、抗体は、(a)ポリクローナル抗体、(b)マウスのモノクローナル抗体、(c)(b)に由来するヒト化抗体、(d)抗体断片、および(e)ヒト・モノクローナル抗体からなる群より選択される。

10

【0011】

もう1つの局面において、本発明は、(a)配列番号：3のアミノ酸番号23(Pro)～アミノ酸番号167(Ile)で示されるアミノ酸配列；(b)配列番号：3のアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号167(Ile)で示されるアミノ酸配列；および、(c)配列番号：2のアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号179(Ile)からなる群より選択されるアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドに特異的に結合し；かつ配列番号：2または配列番号：3のポリペプチドの炎症誘発性の活性を阻害する抗体または抗体断片を提供する。1つの態様において、上記の抗体または上記した方法によって産生される抗体であって、抗体は、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチド・タグ、磁性粒子、薬物、または毒素をさらに含む。

20

【0012】

もう1つの局面において、本発明は、造血細胞および造血細胞性の前駆のIL-TIFで誘導される増殖または分化を阻害するための方法であって、骨髄または末梢血細胞を、可溶性サイトカイン受容体の非存在下で培養した骨髄または末梢血細胞と比較して、骨髄または末梢血細胞中の造血細胞の増殖または分化を減少させるのに十分な量の上記開示された抗体または上記開示された方法によって産生された抗体を含む組成物と共に培養する段階を含む方法を提供する。1つの態様において、造血細胞および造血細胞前駆体のIL-TIFで誘導される増殖または分化を阻害するための方法は、上記開示したとおりであって、造血細胞および造血前駆体細胞はリンパ球様細胞である。もう1つの態様において、造血細胞および造血細胞前駆体のIL-TIFで誘導される増殖または分化を阻害するための方法は、上記開示したとおりであって、リンパ球様細胞はマクロファージまたはT細胞である。

30

【0013】

もう1つの局面において、本発明は、IL-TIFで誘導されるか、またはIL-9で誘導される炎症を減少させる方法であって、炎症を有する哺乳動物に、炎症を減少させるのに十分な量の、上記開示された抗体または上記開示された方法によって産生された抗体の組成物を投与する段階を含む方法を提供する。

40

【0014】

もう1つの局面において、本発明は、炎症を有する哺乳動物の炎症反応を抑制する方法であって：(1)血清アミロイドAタンパク質のレベルを測定する段階；(2)許容される薬学的媒介物中に上記記載した抗体または上記記載した方法によって産生された抗体を含む組成物を投与する段階；(3)血清アミロイドAタンパク質の投与後レベルを測定する段階；(4)段階(3)の血清アミロイドAタンパク質のレベルと、段階(1)の血清アミロイドAタンパク質のレベルとを比較する段階であって、該血清アミロイドAタンパク質レベルの増加または減少が無いことにより、炎症反応の抑制が示される段階を含む方法を提供する。

【0015】

もう1つの局面において、本発明は、患者の癌を検出するための方法であって：患者か

50

ら組織または生体試料を得る段階；上記記載した抗体または上記記載した方法によって産生された抗体と組織または生体試料を、抗体が組織または生体試料中のその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートする段階；組織または生体試料中の結合した抗体を視覚化する段階；および患者からの組織または生体試料中で結合した抗体のレベルを正常対照組織または生体試料と比較する段階であって、正常対照組織または生体試料と比較して、患者の組織または生体試料に結合した抗体のレベルが増大していることにより、患者の癌が示される段階を含む方法を提供する。

【0016】

もう1つの局面において、本発明は、IL-TIFまたは血清アミロイドAが役割を果たす炎症性疾患に罹患している哺乳動物を治療する方法であって：炎症が減少されるように、哺乳動物にIL-TIFまたは血清アミロイドAのアンタゴニストを投与する段階を含み、該アンタゴニストは、IL-TIF(配列番号：3)のポリペプチドもしくはポリペプチド断片に特異的に結合する抗体または結合ポリペプチドからなる群より選択される方法を提供する。もう1つの態様において、炎症性疾患に罹患している哺乳動物を治療する方法は、上記の通りであって、疾患は慢性の炎症性疾患である。もう1つの態様において、炎症性疾患に罹患している哺乳動物を治療する方法は、上記の通りであって、疾患は以下からなる群より選択される慢性の炎症性疾患である：炎症性腸疾患；潰瘍性大腸炎；クローン病；関節炎；および乾癬。もう1つの態様において、炎症性疾患に罹患している哺乳動物を治療する方法は上記の通りであって、疾患は急性の炎症性疾患である。もう1つの態様において、本方法は上記の通りであって、疾患は、以下からなる群より選択される急性の炎症性疾患である：内毒血症；敗血症；毒素ショック症候群；および感染症。もう1つの態様において、炎症性疾患に罹患している哺乳動物を治療する方法は上記の通りであって、抗体は、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチド・タグ、磁性粒子、薬物、または毒素をさらに含む。

【0017】

もう1つの局面において、本発明は、以下の群から選択されるヒトIL-TIF(配列番号：3)のエピトープに結合するモノクローナル抗体を含む抗体であって：(a)配列番号：3のアミノ酸番号28(Cys)～アミノ酸番号35(Phe)のアミノ酸配列を有するエピトープ；(b)配列番号：3のアミノ酸番号52(Ser)または55(Asp)～アミノ酸番号59(Asp)または62(Leu)のアミノ酸配列を有するエピトープ；(c)配列番号：3のアミノ酸番号94(Pro)または95(Gln)～アミノ酸番号100(Gln)または103(Met)のアミノ酸配列を有するエピトープ；(d)配列番号：3のアミノ酸番号113(Leu)～アミノ酸番号118(Ser)または119(Thr)のアミノ酸配列を有するエピトープ；(e)配列番号：3のアミノ酸番号123(Glu)～アミノ酸番号126(Asp)または128(His)のアミノ酸配列を有するエピトープ；(f)配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)または144(Gly)～アミノ酸番号147(Gly)のアミノ酸配列を有するエピトープ；(g)配列番号：3のアミノ酸番号49(Lys)～アミノ酸番号77(Cys)のアミノ酸配列を有するエピトープ；(h)配列番号：3のアミノ酸番号89(Glu)～アミノ酸番号101(Pro)のアミノ酸配列を有し、N末端またはC末端にさらにCysを含むエピトープ；および、(i)配列番号：3のアミノ酸番号132(Asn)～アミノ酸番号145(Glu)のアミノ酸配列を有し、N末端またはC末端にさらにCysを含むエピトープ；且つ、配列番号：2または配列番号：3のヒトIL-TIFポリペプチドの炎症誘発性の活性を中和する抗体を提供する。1つの態様において、抗体は、上記に開示したとおりであって、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチド・タグ、磁性粒子、薬物、または毒素をさらに含む。もう1つの態様において、抗体は、上記に開示したとおりであって、以下からなる群より選択される：(a)マウスのモノクローナル抗体、(b)(a)に由来するヒト化抗体、(c)抗体断片、および(d)ヒト・モノクローナル抗体。

【0018】

もう1つの局面において、本発明は、以下からなる群より選択されるハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を含む抗体を提供する：(a)ハイブリドーマクローン266.16.1.4.4.1(ATCC [#####])；(b)ハイブリドーマクローン266.5.1.2.2.3 (ATCC [#####])

##]); (c)ハイブリドーマクローン267.17.1.1.4.1 (ATCC [#####]); (d)ハイブリドーマクローン267.4.1.1.4.1(ATCC [#####]); (e)ハイブリドーマクローン266.12.6.1.3.2.1(ATCC [#####]); および、ハイブリドーマクローン266.19.1.10.5.2 (ATCC [#####])。1つの態様において、抗体は、上記に開示したとおりであって、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチド・タグ、磁性粒子、薬物、または毒素をさらに含む。もう1つの態様において、抗体は、上記に開示したとおりであって、以下からなる群より選択される：(a)マウスのモノクローナル抗体、(b)(a)に由来するヒト化抗体、および(c)抗体断片。

【0019】

もう1つの局面において、本発明は、IL-TIF活性に関連する被検者の病的症状を治療する方法であって、上記の抗体の有効な量を投与することを含み、これにより該病的症状を治療する方法を提供する。1つの態様において、方法は上記に開示したとおりであって、該病的症状は、慢性の炎症性症状である。もう1つの態様において、方法は上記に開示したとおりであって、該慢性の炎症性症状は、以下を含有する群から選択される：炎症性腸疾患；潰瘍性大腸炎；クローン病；関節炎；および乾癬。もう1つの態様において、方法は上記に開示したとおりであって、該病的症状は、急性の炎症性症状である。もう1つの態様において、方法は上記に開示したとおりであって、該急性の炎症性症状は、以下からなる群より選択される：内毒血症；敗血症；毒素ショック症候群；および感染症。

10

【0020】

もう1つの局面において、本発明は、IL-TIF活性に関連する被検者の病的症状を治療する方法であって、上記の抗体の有効な量を投与する段階を含み、これにより該病的症状を治療する方法を提供する。1つの態様において、方法は上記に開示したとおりであって、該病的症状は、慢性の炎症性症状である。もう1つの態様において、方法は上記に開示したとおりであって、該慢性の炎症性症状は、以下からなる群より選択される：炎症性腸疾患；潰瘍性大腸炎；クローン病；関節炎；および乾癬。もう1つの態様において、方法は上記に開示したとおりであって、該病的症状は、急性の炎症性症状である。もう1つの態様において、方法は上記に開示したとおりであって、該急性の炎症性症状は、以下からなる群より選択される：内毒血症；敗血症；毒素ショック症候群；および感染症。

20

【0021】

本発明のこれらおよびその他の局面は、以下の発明の詳細な説明を参照することにより明らかとなると思われる。本発明を詳細に記載する前に、次の用語を定義することで本発明の理解を助けることができる：

30

【0022】

本明細書において使用される「親和性タグ」という用語は、第2のポリペプチドの精製もしくは検出を提供する、または基質への第2のポリペプチドの付着のための部位を提供するために、第2のポリペプチドに付着することができるポリペプチドセグメントを示す。主に、抗体もしくは他の特異的結合剤が利用できるいずれかのペプチドまたはタンパク質が、親和性タグとして使用され得る。親和性タグは、ポリ-ヒスチジン系、すなわちプロテインA(Nilssonら、EMBO J. 4：1075, 1985；Nilssonら、Methods Enzymol. 198：3, 1991)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(Smith and Johnson, Gene 67；31, 1988)、Glu-Glu親和性タグ(Grussenmeyerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82：7952-4, 1985)、物質P、Flag(商標)ペプチド(Hoppら、Biotechnology 6：1204-10, 1988)、ストレプトアビジン結合ペプチド、または他の抗原性エピトープもしくは結合ドメインを含む。一般的に、Fordら、Protein Expression and Purification 2：95-107, 1991を参照されたい。親和性タグをコードするDNAは、商品供給者(たとえば、Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ；Eastman Kodak, New Haven, CT；New England Biolabs, Beverly, MA)から入手できる。

40

【0023】

「対立遺伝子変異体」という用語は、同じ染色体の遺伝子座を占める遺伝子の2つ以上の遺伝子の代替形態のいずれかを示すものとして本明細書において使用される。対立遺伝

50

子変異は、天然には突然変異を介して生じ、集団内の表現型の多型をもたらし得る。遺伝子突然変異は、サイレントである(コードされたポリペプチドに変化がない)か、または変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。また、対立遺伝子変異体の用語は、本明細書において使用されるものとして、遺伝子の対立遺伝子変異体によりコードされるタンパク質を示す。

【0024】

「アミノ末端」および「カルボキシ末端」という用語は、ポリペプチド内の位置を示すものとして本明細書において使用される。その状況が可能である場合、これらの用語は、近接する位置または相対的位置を示すために、ポリペプチドの特定の配列または一部に関して使用される。たとえば、ポリペプチド内の参照配列のカルボキシ末端側に位置する一定の配列は、その参照配列のカルボキシ末端に隣接して位置するが、必ずしも完全なポリペプチドのカルボキシ末端の必要はない。

10

【0025】

「相補体/抗相補体対」という用語は、適切な条件下で、非共有的に結合された安定した対を形成する非同成分を示す。たとえば、ビオチンおよびアビジン(またはストレプトアビジン)は、相補体/抗相補体対のプロトタイプのメンバーである。他の典型的な相補体/抗相補体対は、受容体/リガンド対、抗体/抗原(またはハプテンもしくはエピトープ)対、センス/アンチセンスのポリヌクレオチド対などを含む。その後、相補体/抗相補体対の解離が所望される場合、その相補体/抗相補体対は、好ましくは $<10^9 \text{ M}^{-1}$ の結合親和性を有する。

20

【0026】

「抗イデオタイプ抗体」とは、免疫グロブリンの可変領域ドメインと結合する抗体である。本明細書において、抗イデオタイプの抗体は、抗Zcytor 16抗体の可変領域と結合し、従って、抗イデオタイプ抗体は、Zcytor 16のエピトープを模倣する。

【0027】

「抗体断片」とは、たとえば、 $\text{F(ab}')_2$ 、 F(ab)_2 、 Fab' 、 Fab などの抗体の一部である。構造に関係なく、抗体断片は、無処置の抗体により認識される抗原と同じ抗原に結合する。たとえば、抗Zcytor 16モノクローナル抗体断片は、Zcytor 16のエピトープと結合する。

【0028】

また、「抗体断片」という用語は、特定の抗原に結合する、合成のまたは遺伝子操作されたポリペプチド、たとえば軽鎖可変領域を含有するポリペプチド、重鎖および軽鎖の可変領域を含有する「Fv」断片、軽鎖および重鎖の可変領域がペプチドリリングーによって結合されている組換え一本鎖ポリペプチド分子(「svFvタンパク質」)、並びに超可変領域を模倣するアミノ酸残基を含有する最少認識単位を含む。

30

【0029】

「キメラ抗体」とは、嚙歯類抗体に由来する種々のドメインおよび相補性決定領域を含む組換えタンパク質であるが、抗体分子の残りの部分は、ヒト抗体に由来する。

【0030】

「ヒト化抗体」とは、マウスのモノクローナル抗体の相補性決定領域がマウス免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変鎖からヒト可変ドメインに移されている組換えタンパク質である。ヒト・タンパク質に結合または中和するものなどの、マウス抗体に由来するヒトに治療的に使用するためのヒト化抗体の構築も、当技術分野における技術の範囲内である。

40

【0031】

「ポリヌクレオチド分子の相補体」という用語は、相補的塩基配列および対照配列と比較して逆の向きを有するポリペプチド分子である。たとえば、配列

5' ATGCACGGG 3'

は、

50

5' CCCGTGCAT 3'

に対して相補的である。

【 0 0 3 2 】

「発現ベクター」という用語は、その転写をもたらす追加のセグメントに機能的に連結された目的のポリペプチドをコードするセグメントを含む、線状または環状DNA分子を示すために使用される。このような追加のセグメントは、プロモーターおよびターミネーター配列、および1つまたは複数の複製の起点、1つまたは複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、その他を含む。発現ベクターは、一般的に、プラスミドもしくはウイルスDNAに由来し、または両者の要素を含むことができる。

10

【 0 0 3 3 】

「単離された」という用語は、ポリヌクレオチドに適用される場合、ポリヌクレオチドがその天然の遺伝的環境から除去され、従って、他の無関係なまたは所望しないコード配列を有さず、遺伝子操作されたタンパク質産生系内で使用するために適した形態で存在することを示す。このような単離された分子は、これらの天然の環境から分離されたものであり、cDNAおよびゲノムクローンを含む。単離されたDNA分子は、通常関係しないその他の遺伝子を含まないが、しかしプロモーターおよびターミネーターなどの天然に存在する5'および3'未翻訳領域を含むことができる。関連する領域の同定は、当業者には明らかであろう(たとえば、Dyanan and Tijan, Nature 316 : 774-78, 1985を参照されたい)。

【 0 0 3 4 】

「単離された」ポリペプチドまたはタンパク質とは、その天然の環境以外の条件、たとえば血液および動物組織とは別の条件下で見出されるポリペプチドまたはタンパク質である。好ましい形態において、単離されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に動物起源の他のポリペプチドを実質的に含まない。高度に精製された形態、すなわち95%以上の純度、より好ましくは99%以上の純度でポリペプチドを提供することが好ましい。この状況下で使用される場合、「単離された」の用語は、ダイマー形態または他のグリコシル化され、もしくは誘導体化された形態などの他の物理的形態の同じポリペプチドの存在を排除しない。

20

【 0 0 3 5 】

「機能的に連結された」とは、DNAセグメントに適用される場合、セグメントが、それらの企図された目的のために一致して機能し、たとえば転写がプロモーターで開始して、コードセグメントを介してターミネーターに進行するように配列されることを示す。

30

【 0 0 3 6 】

「相同分子種」という用語は、異なる種に由来するポリペプチドまたはタンパク質の機能的な対応物である、1つの種から得られたポリペプチドまたはタンパク質を示す。相同分子種間の配列の相違は、種分化の結果である。

【 0 0 3 7 】

「パラログ(Paralogs)」とは、生物によって製造される、異なっているがしかし構造的に関連するタンパク質である。パラログは、遺伝子重複を介して生じられると思われる。たとえば、 α -グロビン、 β -グロビン、およびミオグロビンは、お互いにパラログである。

40

【 0 0 3 8 】

「ポリヌクレオチド」とは、5'末端から3'末端に読み取られるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖重合体である。ポリヌクレオチドは、RNAおよびDNAを含み、天然源から単離され、インビトロで合成され、または天然および合成分子の組み合わせから調製されることができる。ポリヌクレオチドのサイズは、塩基対(略語「bp」)、ヌクレオチド(「nt」)、またはキロ塩基(「kb」)として表される。ここで、後者の2つの用語は、一本鎖または二本鎖であるポリヌクレオチドを記載してもよい。この用語が二本鎖分子に適用される場合、これは全体の長さを示すために使用され、「塩基対」の用語に等しいことが理解されるであろう。二本鎖ポリヌクレオチドの二本の鎖は、長さにおいてわずかに異なり、その末端が酵素切断の結果として互い違いになること

50

は、当業者により理解されており；従って、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドは一对になることができない。

【0039】

「ポリペプチド」とは、天然または合成的に産生された、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基の重合体である。約10以下のアミノ酸残基のポリペプチドが、通常「ポリペプチド」といわれる。

【0040】

本明細書において使用される「プローブおよび/またはプライマー」とは、RNAまたはDNAであることができる。DNAは、cDNAまたはゲノムDNAのいずれかであることができる。ポリヌクレオチド・プローブおよびプライマーは、一本鎖または二本鎖DNAまたはRNA、一般に合成オリゴヌクレオチドであるが、クローン化されたcDNAまたはゲノム配列またはその相補体から生成されることができる。分析用プローブは、一般に、少なくとも20ヌクレオチドの長さであるが、いくらか短いプローブ(14~17ヌクレオチド)を使用することができる。PCRプライマーは、少なくとも5ヌクレオチドの長さ、好ましくは15またはそれ以上のnt、より好ましくは20~30ntである。短いポリヌクレオチドは、遺伝子の小さな領域を分析のためにターゲットされる場合に使用することができる。遺伝子の全体的な分析のためには、ポリヌクレオチド・プローブは、全エキソンまたはそれ以上を含んでもよい。プローブは、Molecular Probe, Inc., Eugene, OR、およびAmersham Corp., Arlington Heights, ILなどの多くの供与源から市販されている、酵素、ビオチン、放射性核種、蛍光団、化学ルミネセンス、常磁性粒子などの検出可能なシグナルを提供するために、当技術分野において周知の技術を使用してラベルすることができる。

10

20

【0041】

「プロモーター」という用語は、RNAポリメラーゼの結合および転写の開始を提供するDNA配列を含む遺伝子の部分を示すものとして本明細書において使用される。プロモーター配列は通常、遺伝子の5'非コード領域に見出されるが、必ずしもそうではない。

【0042】

「タンパク質」という用語は、1つまたは複数のポリペプチド鎖を含む高分子である。また、タンパク質は、炭水化物基などの非ペプチド成分を含むことができる。炭水化物および他の非ペプチド置換基は、タンパク質が産生される細胞により付加され、細胞型によって変化するであろう。タンパク質は、本明細書において、これらのアミノ酸バックボーン構造より定義され；炭水化物基などの置換基は、一般に特定されないが、それにもかかわらず存在することができる。

30

【0043】

「受容体」という用語は、生物活性分子(すなわち、リガンド)に結合し、細胞上でリガンドの効果を媒介する細胞関連タンパク質を示す。膜結合型の受容体は、細胞外リガンド結合ドメインおよび一般的にシグナル伝達に関与する細胞内エフェクタードメインを含む、マルチペプチド構造によって特徴づけられる。受容体へのリガンドの結合は、細胞におけるエフェクタードメインとその他の分子(群)との間の相互作用を引き起こす受容体におけるコンホメーション変化をもたらす。この相互作用は、次に細胞の代謝の変化を誘導する。受容体-リガンド相互作用に結びついた代謝イベントは、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、環状AMP産生の上昇、細胞カルシウムの代謝、膜脂質の代謝、細胞付着、イノシトール脂質およびリン脂質の加水分解を含む。一般に、受容体は：膜結合、サイトゾルもしくは核；単量体(たとえば、甲状腺刺激ホルモン受容体、ベータ受容体)または多量体(たとえば、PDGF受容体、成長ホルモン受容体、IL-3受容体、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、エリスロポエチン受容体、およびIL-6受容体)であることができる。

40

【0044】

「分泌シグナル配列」という用語は、それが合成される細胞の分泌路を介してより大きなポリペプチドを、より大きなポリペプチドの成分として方向づけるポリペプチド(「分泌ペプチド」)をコードするDNA配列を示す。より大きなポリペプチドは、通常、切断されて、分泌経路を介して移動する間に分泌ペプチドを除去する。

50

【 0 0 4 5 】

「スプライス変異体」という用語は、本明細書において使用されるものとして、遺伝子から転写されたRNAの代替の形態を示す。スプライス変異は、転写されたRNA分子内の、または通常少ないが、別々に転写されたRNA分子間の代替のスプライシング部位の使用を介して天然に生じ、同じ遺伝子から転写されたいくつかのmRNAを生じることができる。スプライス変異体は、変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。また、スプライス変異体の用語は、遺伝子から転写されたmRNAのスプライス変異体によってコードされるタンパク質を示すために、本明細書において使用される。

【 0 0 4 6 】

不正確な分析方法(たとえば、ゲル電気泳動)によって決定された重合体の分子量および長さは、おおよそその値であることが理解されるであろう。そのような値が「約」Xまたは「およそ」Xとして表される場合、その言及されたXの値は、正確には±10%であることが理解されるであろう。

【 0 0 4 7 】

本明細書に引用されるすべての文献は、それらの全体が参照として組み込まれる。

【 0 0 4 8 】

IL-TIFポリヌクレオチドは、T細胞、活性化されたT-およびB-細胞、並びにリンパ組織に発現される。ヒトIL-TIFヌクレオチド配列は、配列番号：1に表される。また、IL-TIFは、「IL-22」とも命名されている。

【 0 0 4 9 】

配列番号：1の解析によりは、IL-TIFサイトカイン・ポリペプチドをそこから翻訳するための2つの可能性のある開始メチオニン残基が明らかにされる。2つの推定IL-TIFポリペプチド・アミノ酸配列は、配列番号：2(配列番号：1のヌクレオチド21で開始Metを有する179アミノ酸ポリペプチド)および配列番号：3(配列番号：1のヌクレオチド57で開始Metを有する167アミノ酸ポリペプチド)に示してある。IL-10およびその他のサイトカインに対するIL-TIF配列の類似性、並びに強力なシグナル配列の存在に基づいて、これらの配列の両方がIL-TIFポリペプチドをコードするが、配列番号：3は、完全に機能的な分泌サイトカイン・ポリペプチドをコードする。

【 0 0 5 0 】

配列番号：3に示した推定アミノ酸配列の配列解析により、22アミノ酸残基の分泌シグナル配列(配列番号：3のアミノ酸残基1(Met)~21(Ala))、および146アミノ酸(配列番号：3のアミノ酸残基22(Ala)~167(Ile))の成熟ポリペプチドを含む167のアミノ酸のポリペプチドが示される。N末端の配列は、配列番号：3の残基22(Ala)または配列番号：2の34(Ala)で始まる成熟したものを示す。

【 0 0 5 1 】

一般に、サイトカインは、4つのヘリックス構造を有することが予測され、第1および第4ヘリックスがリガンド-受容体相互作用において最も重要である。第1および第4ヘリックスは、ファミリーのメンバーの中でより高度に保存されている。配列番号：3に示したヒトIL-TIFアミノ酸配列を参照し、ヒトIL-TIF、ヒトIL-10、ヒトzcyto10(国際公開公報第US98/25228号)(a.k.a. IL-20)、およびヒトMDA7(Genbankアクセッション番号Q13007)のアミノ酸配列のアラインメントは、IL-TIFのヘリックスAが、配列番号：3のアミノ酸残基41(Thr)~53(Leu)によって定義され；ヘリックスBは、配列番号：3のアミノ酸残基80(Met)~91(Val)によって定義され；ヘリックスCは、配列番号：3のアミノ酸残基103(Met)~116(Arg)によって定義され；および、ヘリックスDは、配列番号：3のアミノ酸残基149(Ile)~162(Leu)によって定義されることを示唆する。構造上の解析は、A/Bループが長く、B/Cループが短く、およびC/Dループが長いことを示唆する。このループ構造は、アップ-アップ-ダウン-ダウン(up-up-down-down)ヘリックスの構成で生じる。4つのシステイン残基は、IL-10とIL-TIFの間で保存されており、配列番号：3のアミノ酸残基8、28、77、および120と一致している。対応するシステイン配置は、さらに4つのヘリックス束状構造の証明である。

【 0 0 5 2 】

本明細書に記載されているIL-TIFポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基、および配列をコードする対応するポリヌクレオチドは、配列番号：1に示したとおりである。また、さらに、本明細書に記載されている対応するIL-TIFポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基、および配列は、配列番号：2および配列番号：3に示したとおりである。

【 0 0 5 3 】

また、4つのヘリックスの束状サイトカインは、これらの成分のヘリックスの長さによって分類される。「長いヘリックス」形態のサイトカインは、一般に24~30残基の間のヘリックスからなり、IL-6、織毛好中球因子(CNTF)、白血病抑制因子(LIF)、およびヒト増殖ホルモン(hGH)を含む。「短いヘリックス」形態のサイトカインは、一般に18~21残基の間のヘリックスからなり、IL-2、IL-4、およびGM-CSFを含む。IL-TIFは、短いヘリックス形態のサイトカイン群の新たなメンバーであると考えられている。CNTFおよびIL-6を使用する研究では、CNTFヘリックスがIL-6の相当するヘリックスに対して交換することができ、キメラに対してCNTF-結合特性を与えることが示された。したがって、4つのヘリックスのサイトカインの機能的ドメインは、配列の同一性にかかわらず、構造上の相同性に基づいて決定され、キメラにおいても機能的な完全性を維持することができると思われる(Kallenら、J. Biol. Chem. 274 : 11859-11867, 1999)。同様の方法を用いて、IL-TIFにおいて受容体結合特異性を与えている推定上の領域は、残基53~60、残基85~91、および残基121~140を含む配列番号：3のアミノ酸残基の領域を含む。これらの領域は、特にその他の短いヘリックス形態のサイトカインとのキメラ分子を調製して、受容体結合特異性を決定し、かつ調整するために有用である。さらに、IL-TIFの構造についての知識は、本発明の抗体の調製に使用するためのIL-TIFのエピトープおよび機能的なドメイン・ポリペプチド断片を同定するために、当業者に有用である。

【 0 0 5 4 】

zcytor16(配列番号：32、および配列番号：33)(共に所有するWIPO刊行物国際公開公報第01/40467号)、zcytor11(配列番号：18、および配列番号：19)(共に所有する米国特許第5,965,704号)、並びにCRF2-4(Genbankアクセッション番号Z17227)を含むIL-TIFの受容体が同定されている。さらに、いくつかのIL-TIF応答性の株化細胞(Dumontierら、J. Immunol. 164 : 1814-1819, 2000 ; Dumoutier, L. ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97 : 10144-10149, 2000 ; Xie MHら、J. Biol. Chem. 275 : 31335-31339, 2000 ; Kotenko SVら、J. Biol. Chem. 276 : 2725-2732, 2001)、並びにIL-TIF受容体サブユニットのzcytor11を発現するものが同定された。さらに、共に所有するzcytor16受容体は、IL-TIFに結合し、その活性に拮抗することが示され(配列番号：3)(共に所有するWIPO刊行物国際公開公報第01/40467号) ; マウスIL-TIF(IL-TIF)配列は、Dumontierら、J. Immunol. 164 : 1814-1819, 2000に示されており、および独立してクローン化されて、本明細書においてマウスIL-TIFと名付けられ、katu配列番号：37に示してあり、配列番号：38に示したポリペプチド配列に対応する。さらに、共に所有するzcytor11(米国特許第5,965,704号)およびCRF2-4受容体も、IL-TIFに結合する(WIPO刊行物国際公開公報第00/24758号 ; Dumontierら、J. Immunol. 164 : 1814-1819, 2000 ; Spencer, SDら、J. Exp. Med. 187 : 571-578, 1998 ; Gibbs, VC and Pennica Gene 186 : 97-101, 1997 (CRF2-4 cDNA) ; Xie, MHら、J. Biol. Chem. 275 : 31335-31339, 2000 ; およびKotenko, SVら、J. Biol. Chem. 276 : 2725-2732, 2001を参照されたい)。さらに、IL-10 受容体は、IL-TIFの受容体として含まれていてもよく、CRF2-4と同義であると考えられている(Dumoutier, L. ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97 : 10144-10149, 2000 ; Liu Yら、J. Immunol. 152 : 1821-1829, 1994 (IL-10R cDNA))。これらの受容体は、IL-TIFの、およびこれに対するアンタゴニストの使用に関して、本明細書において考察してある。

【 0 0 5 5 】

本発明は、本明細書に開示されたIL-TIFポリペプチドをコードするDNAおよびRNA分子を含むポリヌクレオチド分子を使用する。当業者は、遺伝子コドンの縮重から見て、かなりの配列変異がこれらのポリヌクレオチド分子において可能であることを容易に認識するで

あろう。配列番号：4は、配列番号：3のIL-TIFポリペプチドをコードする全てのDNAを含む縮重DNA配列である。当業者は、配列番号：4の縮重配列も、Tに対してUに置換することによって配列番号：3をコードする全てのRNA配列を提供することを認識するであろう。したがって、配列番号：4のヌクレオチド1または66～ヌクレオチド501を含むポリヌクレオチドをコードするIL-TIFポリペプチド、およびこれらのRNA相当物が、本発明によって想定される。表1は、縮重ヌクレオチド位置を示すために、配列番号：4内に使用される1文字コードを示す。「解」は、コード文字により示されるヌクレオチドである。「相補体」とは、相補的ヌクレオチドのためのコードを示す。たとえば、コードYは、CまたはTのいずれかを示し、その相補体RはAまたはGを示し、AはTに対して相補的であり、およびGはCに対して相補的である。

10

【0056】

(表1)

ヌクレオチド	解	相補体	解
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

20

30

【0057】

所与のアミノ酸のためのすべての可能なコドンを含む、配列番号：4に使用される縮重コドンを表2に示してある。

【0058】

(表2)

アミノ酸	1文字コード	コドン	縮重コドン	
Cys	C	TGC TGT	TGY	
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN	
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN	
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN	
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN	
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN	10
Asn	N	AAC AAT	AAY	
Asp	D	GAC GAT	GAY	
Glu	E	GAA GAG	GAR	
Gln	Q	CAA CAG	CAR	
His	H	CAC CAT	CAY	
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN	
Lys	K	AAA AAG	AAR	
Met	M	ATG	ATG	20
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH	
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN	
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN	
Phe	F	TTC TTT	TTY	
Tyr	Y	TAC TAT	TAY	
Trp	W	TGG	TGG	
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR	30
Asn Asp	B		RAY	
Glu Gln	Z		SAR	
Any	X		NNN	

【 0 0 5 9 】

当業者であれば、いくらかのあいまいさが、それぞれのアミノ酸をコードするすべての可能なコドンの代表である縮重コドンの決定において導入されることを理解するであろう。たとえば、セリン(WSN)のための縮重コドンは、ある環境下で、アルギニン(AGR)をコードすることができ、そしてアルギニン(MGN)のための縮重コドンは、ある環境下で、セリン(AGY)をコードすることができる。類似する関係が、フェニルアラニンおよびロイシンをコードするコドン間に存在する。従って、縮重配列によって包含されるいくつかのポリヌクレオチドは、変異体アミノ酸配列をコードすることができるが、当業者は、配列番号：3のアミノ酸配列について参照することにより、そのような変異体配列を容易に同定することができる。変異体配列は、本明細書に記載したとおりに機能性について容易に試験することができる。

【 0 0 6 0 】

また、当業者は、異なった種が「優先的なコドン使用」を示すことも理解するであろう。一般的には、Granthamら、Nuc. Acids Res. 8 : 1893-912, 1980 ; Haasら、Curr. Bio l. 6 : 315-24, 1996 ; Wain-Hobsonら、Gene 13 : 355-64, 1981 ; GrosjeanおよびFier a, Gene 18 : 199-209, 1982 ; Holm, Nuc. Acids Res. 14 : 3075-87, 1986 ; Ikemura

40

50

、J. Mol. Biol. 158 : 573-97, 1982を参照されたい。本明細書において使用されるものとして、「優先的なコドン使用」または「優先的なコドン」という用語は、一定の種の細胞に最も頻繁に使用され、従ってそれぞれのアミノ酸をコードする可能なコドンの有利な1つまたはいくつかの代表をのタンパク質翻訳コドンをいう技術的用語である(表2を参照されたい)。たとえば、アミノ酸トレオニン(Thr)は、ACA、ACC、ACG、またはACTによりコードされるが、しかし哺乳類細胞においては、ACCが最も通常に使用されるコドンであり；他の種においては、たとえば、昆虫細胞、酵母、ウイルスまたは細菌においては、異なったThrコドンが好ましい。特定の種のための優先的なコドンは、当技術分野において既知の種々の方法によってポリヌクレオチドに導入することができる。組換えDNA中への優先的なコドン配列の導入は、たとえば特定の細胞型または種内でタンパク質の翻訳をより効果的にすることによって、そのタンパク質の産生を増強する。従って、配列番号：4に開示される縮重コドン配列は、当技術分野において通常使用され、本明細書において開示される種々の細胞型および種においてポリペプチドの発現を最適化するための鋳型として作用する。優先的なコドンを含む配列は、種々の種における発現について試験し、かつ最適化して、本明細書に開示される機能性について試験することができる。

10

【0061】

DNAおよびRNAを調製するための方法は、当技術分野において周知である。一般的には、RNAは、多量のIL-TIF RNAを産生する組織または細胞から単離される。このような組織および細胞は、ノーザンプロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 5201, 1980)、逆転写PCR(RT-PCR)によって、または標的の細胞または組織に対する活性について、種々の細胞タイプからの条件培地をスクリーニングすることによって同定される。一旦、活性またはRNA産生細胞もしくは組織が同定されると、全RNAは、グアニジウムイソチオシナネート抽出、続くCsCl勾配での遠心分離による単離によって調製することができる(Chirgwinら、Biochemistry 18 : 52-94, 1979)。ポリ(A)⁺ RNAは、Aviv and Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 : 1408-1412, 1972)の方法を使用して全RNAから調製される。相補的DNA(cDNA)は、既知の方法を用いて、ポリ(A)⁺ RNAから調製する。他の方法では、ゲノムDNAを単離することができる。次いで、IL-TIFポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定し、たとえばハイブリダイゼーションまたはPCRによって単離する。

20

【0062】

IL-TIFをコードする全長クローンは、従来クローン化手順によって得ることができる。相補的DNA(cDNA)クローンが好ましいが、いくつかの用途(たとえば、トランスジェニック動物における発現)に関しては、ゲノムクローンを使用し、または少なくとも1つのゲノムイントロンを含むcDNAクローンを修飾することが好ましい。cDNAおよびゲノムクローンを調製するための方法は周知であり、当業者のレベルの範囲内であり、ライブラリーをプローブもしくはプライミングするための、本明細書に開示された配列またはその一部の使用を含む。発現ライブラリーは、IL-TIF断片、または他の特定の結合パートナーに対する抗体によりプローブすることができる。

30

【0063】

また、本明細書に開示されるIL-TIFポリヌクレオチド配列は、IL-TIF遺伝子の5'非コード領域をクローン化するためのプローブまたはプライマーとして使用することができる。ノーザンプロット法およびRT PCR(実施例2および3を参照されたい)によってIL-TIFに対して観察される組織特異的な発現からみて、この遺伝子領域は、造血性およびリンパ性特異的な発現を提供すると思われる。したがって、IL-TIF遺伝子由来のプロモーターエレメントは、たとえば、トランスジェニック動物または遺伝子治療で治療される患者において、異種遺伝子の組織特異的な発現を指示するために使用することができる。また、5'フランキング配列のクローニングは、米国特許第5,641,670号に開示されたように、「遺伝子活性化」によってIL-TIFタンパク質の産生を容易にする。簡単には、細胞における内因性のIL-TIF遺伝子の発現を、少なくともターゲティング配列、制御配列、エキソン、および不対のスプライドナー部位を含むDNA構築物をIL-TIF遺伝子座に導入することによって変更する。ターゲティング配列は、内因性のIL-TIF遺伝子座と構築物の相対的組換えを

40

50

可能にするIL-TIF 5'非コード配列であり、これによって構築物内の配列は、操作可能な状態で内因性のIL-TIFコード配列に結合される。この方法で、内因性のIL-TIFプロモーターをその他の制御配列で置換して、または補って、増強された、組織特異的な、またはそれ以外に制御された発現を提供することができる。

【0064】

その他の種に由来する対応IL-TIFポリペプチドおよびポリヌクレオチド(相同分子種)を単離することができる。特に関心対象は、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコ、ウマ、およびその他の霊長類ポリペプチドを含むその他の哺乳類種からのIL-TIFポリペプチドである。ヒトIL-TIFの相同分子種は、本発明を当技術分野において周知の従来クロン技術と組み合わせることによって提供される情報および組成物を使用して、たとえば、開示された配列に基づく縮重プローブを使用することによって、または本明細書に開示された代表的なヒトIL-TIF配列から設計したプライマーを使用するPCRによって、クローン化することができる(Mullis、米国特許第4,683,202号)。さらなる方法の範囲内において、cDNAライブラリーを、宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするために使用することができ、関心対象のcDNAの発現は、IL-TIFポリペプチドに対する抗体によって、結合研究または活性アッセイ法で検出することができる。また、同様の技術をゲノムクローンの単離に適用することもできる。実施例5は、IL-TIF相同分子種がマウス・ゲノムDNAに存在することを示す。

【0065】

ヒトIL-TIFのマウス相同分子種のポリヌクレオチド配列が同定されており、配列番号：37に示し、対応するアミノ酸配列を配列番号：38に示してある。配列番号：37のDNA配列によってコードされるマウスIL-TIFポリペプチドの解析により、33アミノ酸残基(配列番号：38の残基1(Met)～残基33(Ala))の予測される分泌シグナルペプチド、および146アミノ酸(配列番号：38の残基34(Leu)～残基179(val))の成熟ポリペプチドを含む179アミノ酸(配列番号：38)をコードするオープンリーディングフレームが明らかとなった。IL-TIFヘリックスAは、配列番号：38のアミノ酸残基53～65によって定義され；ヘリックスBは、配列番号：38のアミノ酸残基92～103によって定義され；ヘリックスCは、配列番号：38のアミノ酸残基115～124によって定義され；および、ヘリックスDは、配列番号：38のアミノ酸残基161～174によって定義される。マウスIL-TIFの4つの保存されたシステイン残基は、ヒト配列で保存されており、配列番号：38のアミノ酸残基20、40、89、および132に対応する。さらに、マウス配列において、配列番号：38に示すように、別の開始メチオニン残基が部位8および13に存在するが、残基33(Ala)の後のシグナルペプチドの切断により、上記の通りに146アミノ酸の成熟した配列をさらに生じるであろう。マウスIL-TIFの成熟配列は、Leu34(配列番号：38に示したとおり)で開始し、これはヒト配列のAla22(配列番号：3に示したとおり)に対応する。マウスとヒトの間には、配列番号：3と配列番号：38に対応する全てのアミノ酸配列を通じて約78%の一致性がある。上記の%同一性は、Ktup=1、ギャップ・オープニング・ペナルティー=12、ギャップ・エクステンション・ペナルティー=2、および置換マトリックス=BLOSUM62、並びにデフォルトとして設定される他のFASTAパラメーターを有するFASTAプログラムを用いて決定した。上記に記載されるマウスIL-TIFのポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基および配列をコードする、その対応するポリヌクレオチドは、配列番号：37に示した通りである。

【0066】

当業者であれば、配列番号：1に開示された配列が、ヒトIL-TIFの単一对立遺伝子を表すこと、およびその対立遺伝子変異および選択的スプライシングが予測されることを認識するであろう。この配列の対立遺伝子変異体は、標準的な手順にしたがって、異なる個体からcDNAまたはゲノムライブラリーをプロービングすることによってクローン化することができる。配列番号：1に示したDNA配列の対立遺伝子変異体は、サイレント突然変異を含むそれらの変異体、および突然変異がアミノ酸配列変更を生じるこれらの変異体を含み、配列番号：3の対立遺伝子変異体であるタンパク質と同じように、本発明の範囲内である。IL-TIFポリペプチドの性質を保持する、もう1つのスプライスされたmRNAから生成され

10

20

30

40

50

るcDNAは、このようなcDNAおよびmRNAによってコードされるポリペプチドと同じように、本発明の範囲内に含まれる。これらの配列の対立遺伝子変異体およびスプライス変異体は、当技術分野において既知の標準的な方法に従って、異なった個人または組織からのcDNAまたはゲノムライブラリーをプローブすることによってクローン化することができる。

【0067】

さらに、配列番号：1のヌクレオチド配列を有する核酸分子に、配列番号：1のヌクレオチド87～587のヌクレオチド配列を有する核酸分子に、または、配列番号：1に相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるIL-TIFコードする核酸分子の単離は、十分に当業者の技術の範囲内である。たとえば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubelら、(eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc. 1987); BergerおよびKimmel (eds.), Guide to Molecular Cloning Techniques, (Academic Press, Inc. 1987); 並びにWetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26 : 227 (1990))を参照されたい。

10

【0068】

本発明の抗体または結合ポリペプチドを調製するために、配列番号：3のポリペプチド、またはこれらの相同分子種と実質的に類似する配列同一性を有するIL-TIFポリペプチドを使用してもよい。「実質的に類似する配列同一性」の用語は、配列番号：3で示される配列、またはこれらの相同分子種に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%以上の配列同一性を有するポリペプチドを示すために本明細書において使用される。また、本発明は、配列番号：3のアミノ酸残基1～167、もしくは23～167の配列に、または配列番号：2のアミノ酸残基1～179、もしくは35～179と、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。本発明は、このようなポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む。パーセント同一性を決定するための方法は、以下に記載してある。

20

【0069】

パーセント配列同一性は、従来の方法によって決定される。たとえば、Altschulら、Bull. Math. Bio. 48 : 603 (1986)、およびHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 (1992)を参照されたい。簡単には、2種のアミノ酸配列が、10のギャップ・オープニング・ペナルティー、1のギャップ・エクステンション・ペナルティー、および表3(アミノ酸は、標準の1文字コードによって示される)に示されるようなHenikoffおよびHenikoff (ibid)の「BLOSUM62」評点マトリックスを用いて、そのアラインメント・スコアを最適化するように整列させる。

30

同一の適合の総数

$\frac{\text{同一の適合の総数}}{\text{[より長い配列の長さ+2つの配列を整列させるために、より長い配列に導入されたギャップの数]}} \times 100$

【0070】

(表3)

ンし、これによりアミノ酸の挿入および欠失ができる。FASTA 解析のための好ましいパラメーターは：Ktup=1、ギャップ・オープニング・ペナルティー=12、ギャップ・エクステンション・ペナルティー=2、および置換マトリックス=BLOSUM62。これらのパラメーターは、Appendix 2 of Pearson, 1990, Meth. Enzymol. 183: 63(1990) に説明されるように、スコアリング・マトリックスを調節することによってFASTAプログラム中に導入することができる。また、FASTAは、上記に開示されるような割合を用いて、核酸分子の配列同一性を決定するためにも使用することができる。ヌクレオチド配列の比較のためには、ktup値は、デフォルトとして設定される他のFASTAパラメーターで、1~6、好ましくは3~6、最も好ましくは3であり得る。

【0073】

実質的に類似する配列同一性を有する変異体IL-TIFポリペプチドまたはポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、または付加を有するものとして特徴づけられる。これらの変化は、軽微な性質、すなわち保存的なアミノ酸置換(表4を参照されたい)および有意にポリペプチドの折りたたみもしくは活性に影響を及ぼさないその他の置換；小さな欠失、典型的には1~約30のアミノ酸の；およびアミノ末端メチオニン残基、約20~25残基までの小さなリンカーペプチド、または親和性タグなどのアミノ末端もしくはカルボキシ末端の伸張であることが好ましい。したがって、本発明は、配列番号：3の対応する領域と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも90%、およびより好ましくは95%以上同じである配列を含む、約110~180のアミノ酸残基のポリペプチドを含む。親和性タグを含むポリペプチドは、IL-TIFポリペプチドと親和性タグの間にタンパク分解性の切断部位を含むことができる。好ましいこのような部位は、トロンピン切断部位およびXa因子の切断部位を含む。

【0074】

(表4)

10

20

保守的アミノ酸置換

塩基性:	アルギニン	
	リジン	
	ヒスチジン	
酸性:	グルタミン酸	
	アスパラギン酸	10
極性:	グルタミン	
	アスパラギン	
疎水性:	ロイシン	
	イソロイシン	
	バリン	
芳香族:	フェニルアラニン	
	トリプトファン	
	チロシン	20
小さい:	グリシン	
	アラニン	
	セリン	
	スレオニン	
	メチオニン	

【 0 0 7 5 】

構造の完全性を維持するために重要である領域またはドメインを含むアミノ酸残基の決定により、決定することができる。これらの領域内で、変化に対して多少耐性があり、分子の全体の三次構造を維持する特異的な残基を決定することができる。配列構造を解析するための方法は、高いアミノ酸またはヌクレオチドの同一性を有する多くの配列、二次構造性向、二成分パターン、相補パッキング、および埋まっている極性相互作用のアラインメントを含むが、これらに限定されない(Barton, *Current Opin. Struct. Biol.* 5: 372-376, 1995、およびCordesら、*Current Opin. Struct. Biol.* 6: 3-10, 1996)。一般に、分子に対する修飾を設計するまたは特異的な断片を同定するときに、構造の決定は、修飾された分子の活性を評価することを伴う。

【 0 0 7 6 】

アミノ酸配列の変化は、生物活性に必須の高次構造の破壊を最小にするように、IL-TIFポリペプチドに作製される。たとえば、IL-TIFポリペプチドが1つまたは複数のヘリックスを含むときに、アミノ酸残基の変化は、高次構造の変化が、重要ないくつかの機能、たとえば活性部位またはその結合パートナーに対する分子の結合を弱める分子の、ヘリックスの形態およびその他の成分を崩壊させないように作製される。アミノ酸配列変化の効果は、たとえば、上記したようなコンピュータ・モデリングによって予測すること、または結晶構造の解析によって決定することができる(たとえば、Lapthornら、*Nat. Struct. Biol.* 2: 266-268, 1995を参照されたい)。当技術分野において周知のその他の技術では、標準的な分子(たとえば、未変性タンパク質)と変異体タンパク質の折りたたみを比較する。たとえば、変異体および標準的な分子のシステイン・パターンの比較を行うことができる。還元およびアルキル化を使用する質量分析および化学修飾により、ジスルフィド結合と関係しているか、またはこのような結合のないシステイン残基を決定するための方法を

提供する(Beanら、Anal. Biochem. 201 : 216-226, 1992 ; Gray, Protein Sci. 2 : 173 2-1748, 1993 ; およびPattersonら、Anal. Chem. 66 : 3727-3732, 1994)。修飾された分子が標準的分子と同じシステイン・パターンを有さない場合、一般に折りたたみは影響を受けるであろうと考えられる。折りたたみの測定のための、周知かつ許容されるもう一つの方法は、円形二色解析(circular dichroism : CD)である。修飾された分子および標準的な分子によって作製されるCDスペクトルを測定し、比較することは、ルーチンである(Johnson, Proteins 7 : 205-214, 1990)。結晶学は、折りたたみおよび構造を解析するための周知のもう一つの方法である。また、核磁気共鳴(NMR)、消化によるペプチドマッピングおよびエピトープマッピングも、タンパク質およびポリペプチドの間で折りたたみおよび構造的な類似を解析するための既知の方法である(Schaananら、Science 257 : 961-964, 1992)。

10

【 0 0 7 7 】

配列番号 : 3で示したように、IL-TIFタンパク質配列のホップ/ウッズ親水性プロフィールを作製することができる(Hoppら、Proc. Natl. Acad. Sci. 78 : 3824-3828, 1981 ; Hopp, J. Immun. Meth. 88 : 1-18, 1986、およびTriquierら、Protein Engineering 11 : 153-169, 1998)。本プロフィールは、スライドする6残基ウィンドウ(sliding six-residue window)に基づく。埋まったG、S、およびT残基並びに曝露されたH、Y、およびW残基は、無視した。たとえば、IL-TIFにおいて、親水性の領域は、以下を含む : (1) 配列番号 : 3のアミノ酸番号29(Arg) ~ アミノ酸番号34(Asn) ; (2) 配列番号 : 3のアミノ酸番号121(His) ~ アミノ酸番号126(Asp) ; (3) 配列番号 : 3のアミノ酸番号134(Gln) ~ アミノ酸番号139(Thr) ; (4) 配列番号 : 3のアミノ酸番号137(Lys) ~ アミノ酸番号142(Lys) ; および、(5) 配列番号 : 2のアミノ酸番号145(Glu) ~ アミノ酸番号150(Lys)。

20

【 0 0 7 8 】

当業者であれば、IL-TIFポリペプチドのアミノ酸配列において修飾を設計するときに、またはIL-TIFに対する抗体の生成のためのエピトープを選択する際に、全体な構造的および生物学的なプロフィールを崩壊させないように、親水性または疎水性を考慮することを認識するであろう。Val、Leu、およびIleを含有する群、またはMet、Gly、Ser、Ala、Tyr、およびTrpからなる群より選択される疎水性の残基は、置換のための特に関心対象のものである。たとえば、置換に耐性な残基は、配列番号 : 3に示したとおりのこのような残基を含むことができる。配列番号 : 3の位置8、27、77、および120のシステイン残基は、置換に比較的不耐性であると考えられる。

30

【 0 0 7 9 】

また、必須アミノ酸の一致性は、IL-10、zcyto10、およびIL-TIFとMDA7の間の配列類似性の解析から推定することができる。すでに記載した「FASTA」解析などの方法を用いて、高い類似性の領域をタンパク質のファミリー内で同定し、アミノ酸配列の保存された領域について解析するために使用する。構造に基づいて変異体IL-TIFポリヌクレオチドを同定するためのその他のアプローチは、上記のように、潜在的な変異体IL-TIF遺伝子をコードする核酸分子が、配列番号 : 1のヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズすることができるかどうかを決定することである。

【 0 0 8 0 】

IL-TIFポリペプチドの必須アミノ酸を同定するその他の方法は、部位特異的突然変異誘発またはアラニン-精査突然変異誘発などの当技術分野において既知の手順である(CunninghamおよびWells, Science 244 : 1081 (1989), Bassら、Proc. Natl Acad. Sci. USA 88 : 4498 (1991), CoombsおよびCorey, " Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering, " in Proteins : Analysis and Design, Angeletti (ed.), pages 259-311 (Academic Press, Inc. 1998))。後者の技術では、分子の活性に重要であるアミノ酸残基を同定するために、下記に開示したように、単一のアラニン突然変異を分子のあらゆる残基に導入させて、生じる変異体分子の生物活性について試験する。また、Hiltonら、J. Biol. Chem. 271 : 4699 (1996)を参照されたい。

40

【 0 0 8 1 】

50

また、本発明は、活性をブロックまたはアンタゴナイズする抗体およびIL-TIFに結合するポリペプチドを作製する際に使用するポリペプチドを作製するために、IL-TIFポリペプチドの機能的な断片、IL-TIFポリペプチドの抗原性エピトープ、エピトープを含む部分、およびこのようなIL-TIFポリペプチドの機能的な断片、抗原性エピトープ、エピトープを含む部分をコードする核酸分子を使用することを含む。「機能的な」IL-TIFまたはこれらの断片は、本明細書で定義されるものとして、その増殖または分化活性によって、分化した細胞の機能を誘導もしくは阻害するその能力によって、または抗IL-TIF抗体、細胞、またはIL-TIF受容体(可溶型もしくは固定型)に特異的に結合するその能力によって、特徴づけられる。本明細書において先に述べたとおり、IL-TIFは、配列番号：3に示すように、ヘリックスA(アミノ酸残基41~53)、ヘリックスB(アミノ酸残基80~91)、ヘリックスC(アミノ酸残基103~116)、およびヘリックスD(アミノ酸残基149~162)を含む4つのヘリックスの束状構造によって特徴づけられる。したがって、本発明は、(a)上記したヘリックスの1つまたは複数を含むポリペプチド分子；および(b)これらのヘリックスの1つまたは複数を含む機能的な断片、を含む融合タンパク質を使用することをさらに想定する。融合タンパク質のその他のポリペプチド部分は、IL-10、zcyto10、MDA7、IL-15、IL-2、IL-4、およびGM-CSFなどのもう一つの4つのヘリックスの束状構造サイトカインによって、または融合タンパク質の分泌を容易にする非天然のおよび/または無関係な分泌性のシグナルペプチドによってもたらされてもよい。

10

【0082】

IL-TIFポリペプチドをコードする核酸分子の機能的な断片を得るために、核酸分子のルーチン欠失解析を行うことができる。例示として、配列番号：1のヌクレオチド配列を有するDNA分子またはこれらの断片を、一連の入れ子状態(nested)の欠失を得るためにBa131ヌクレアーゼによって消化することができる。次いで、これらのDNA断片を適当なリーディングフレームで発現ベクターに挿入し、発現されたポリペプチドを単離して、IL-TIF活性、または抗IL-TIF抗体もしくはIL-TIF受容体を結合する能力について試験する。エキソヌクレアーゼ消化の1つの変形例は、所望のIL-TIF断片の産生を特定するために、欠失または終止コドンを導入するためのオリゴヌクレオチド定方向突然変異誘発を使用することである。または、IL-TIF遺伝子の特定の断片は、ポリメラーゼ連鎖反応法を使用して合成することができる。

20

【0083】

機能的なドメインを同定するための標準的な方法は、当業者に周知である。たとえば、インターフェロンの末端のいずれかまたは両方の切断についての研究は、Horisberger and Di Marco, *Pharmac. Ther.* 66 : 507 (1995)によって要約されている。さらに、たとえば、タンパク質の機能解析のための標準的な技術は、Treuterら、*Molec. Gen. Genet.* 240 : 113 (1993) ; Contentら、" Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon," in *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems*, Cantell (ed.), pages 65-72 (Nijhoff 1987) ; Herschman, " The EGF Receptor," in *Control of Animal Cell Proliferation 1*, Boyntonら、(eds.) pages 169-199 (Academic Press 1985) ; Coumilleauら、*J. Biol. Chem.* 270 : 29270 (1995) ; Fukunagaら、*J. Biol. Chem.* 270 : 25291 (1995) ; Yamaguchiら、*Biochem. Pharmacol.* 50 : 1295 (1995) ; 並びに Meiselら、*Plant Molec. Biol.* 30 : 1 (1996)によって記載されている。

30

40

【0084】

多くのアミノ酸の置換は、Reidhaar-OlsonおよびSauer (*Science* 241 : 53 (1988))、またはBowieおよびSauer (*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86 : 2152 (1989))によって開示されたものなどの既知の突然変異誘発およびスクリーニングの方法を使用して作製および試験することができる。簡単には、これらの著者は、ポリペプチドの2つ以上の位置を同時にランダム化し、機能的なポリペプチドを選択し、次いで、変異誘発されたポリペプチドをシーケンスしてそれぞれの位置において許容される置換のスペクトルを決定するための方法を開示する。使用することができるその他の方法は、ファージディスプレイ(たと

50

えば、Lowmanら、Biochem. 30 : 10832 (1991)、Ladnerら、米国特許第5,223,409号、H use、国際刊行物国際公開公報第92/06204号)、並びに領域定方向突然変異誘発(Derbyshireら、Gene 46 : 145 (1986)、およびNerら、DNA 7 : 127, (1988))を含む。

【0085】

また、Stemmer, Nature 370 : 389 (1994)、Stemmer, Proc. Natl Acad. Sci. USA 91 : 10747 (1994)、および国際刊行物国際公開公報第97/20078号によって開示されるように、開示されたIL-TIFヌクレオチドおよびポリペプチド配列の変異体は、DNA混合によって作製することができる。簡単には、変異体DNA分子を、親DNAのランダムな断片化に続く、PCRを使用する再構築によるインビトロ相同的組換えで、ランダムに導入された点突然変異を生じることによって作製される。さらなる多様性をプロセスに導入するために、この技術は、対立形質の変異体または異なる種に由来するDNA分子などの親DNA分子のファミリーを使用して修飾することができる。所望の活性についての選択またはスクリーニングに続いて、突然変異誘発およびアッセイをさらに繰り返すことによって、望ましい突然変異の選択、一方で同時に有害な変化に対しても選択することによる配列の迅速な「進化」がもたらされる。

10

【0086】

宿主細胞内にクローン化されて、変異誘発されたポリペプチドの活性を検出するために、本明細書に開示された突然変異誘発方法をハイスループットの、自動化されたスクリーニング法と組み合わせることができる。生物学的に活性ポリペプチド、または抗IL-TIF抗体もしくは可溶性IL-TIF受容体と結合するポリペプチドをコードする変異誘発されたDNA分子を宿主細胞から回収して、現代の設備を使用して迅速にシーケンスすることができる。これらの方法は、関心対象のポリペプチドの個々のアミノ酸残基の重要性について迅速な分析ができ、未知の構造のポリペプチドに適用することができる。

20

【0087】

加えて、多機能分子を提供するために、本発明の有用な抗体および結合ポリペプチド、IL-TIFタンパク質(または、これらのポリペプチド断片)をその他の生理活性の分子、特にその他のサイトカインに結合させることができる。たとえば、抗IL-TIF抗体および結合パートナーをこれらの生物学的性質を増強または延長するために、その他のサイトカインと結合させることができる。

【0088】

したがって、本発明は、IL-TIFのヘリックスの1つまたは複数を含む部分がもう一つのポリペプチドに融合された一連のハイブリッド分子を使用することを想定する。融合は、好ましくは組換え産生系においてキメラ分子を発現できるDNAレベルで、スプライシングによってなされる。次いで、生じる分子の改善された溶解度、改善された安定度、延長されたクリアランス半減期、改善された発現および分泌レベル、並びに薬動学などの性質について試験する。このようなハイブリッド分子は、成分タンパク質またはポリペプチドの間にさらなるアミノ酸残基(たとえば、ポリペプチド・リンカー)をさらに含んでもよい。

30

【0089】

天然に存在しないアミノ酸は、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、アロ-トレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、3-および4-メチルプロリン、3,3-ジメチルプロリン、tert-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、並びに4-フルオロフェニルアラニンを含むが、これらに限定されない。天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質中に導入するためのいくつかの方法が当技術分野において既知である。たとえば、ナンセンス突然変異が化学的にアミノアシル化されたサブレッサー-tRNAを使用して抑制されるインビトロシステムが使用されることができる。アミノ酸を合成し、tRNAをアミノアシル化するための方法は、当技術分野において既知であ

40

50

る。ナンセンス突然変異を含むプラスミドの転写および翻訳は、大腸菌S30抽出物および市販の酵素および他の試薬を含む無細胞系で実施される。タンパク質は、クロマトグラフィーによって精製される。たとえば、Rovertsoら、*J. Am. Chem. Soc.* 113 : 2722 (1991) ; Ellmanら、*Methods. Enzymol.* 202 : 301 (1991) ; Chungら、*Science* 259 : 806 (1993) ; およびChungら、*Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90 : 10145 (1993)を参照されたい。

【 0 0 9 0 】

第2の方法において、翻訳は、突然変異誘発されたmRNAおよび化学的にアミノアミル化されたサプレッサートRNAのマイクロインジェクションによって、アフリカツメガエル卵母細胞において行われる(Turcattiら、*J. Biol. Chem.* 271 : 19991 (1996))。第3の方法において、大腸菌細胞を、置換する予定である天然のアミノ酸(たとえば、フェニルアラニン)の不在下で、および所望の天然に存在しないアミノ酸(たとえば、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、または4-フルオロフェニルアラニン)の存在下で培養する。天然に存在しないアミノ酸は、その天然の対応物の代わりにタンパク質中に導入される。Koideら、*Biochem.* 33 : 7470 (1994)を参照されたい。天然に存在するアミノ酸残基は、インピトロでの化学的修飾によって天然に存在しない種に転換することができる。化学的修飾は、置換の範囲をさらに拡張するために部位特異的突然変異誘発と組み合わせることができる(WynnおよびRichards, *Protein Sci.* 2 : 395(1993))。

【 0 0 9 1 】

限定された数の非保存アミノ酸、遺伝子コードによってコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、および不自然なアミノ酸が、IL-TIFアミノ酸残基により置換してもよい。

【 0 0 9 2 】

また、本発明は、本明細書に記載されているIL-TIFポリペプチドのエピトープを含んだ部分を含むポリペプチド断片またはペプチドを提供する。このような断片またはペプチドは、全タンパク質が免疫原として使用されたときに、抗体反応を誘発するタンパク質の一部である「免疫原性エピトープ」を含んでいてもよい。免疫原性エピトープを含むペプチドは、標準的な方法を使用して同定することができる(たとえば、Geysenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 3998, (1983)を参照されたい)。

【 0 0 9 3 】

対照的に、ポリペプチド断片またはペプチドは、抗体が特異的に結合することができるタンパク質分子の領域である「抗原性エピトープ」を含んでいてもよい。一定のエピトープは、直線状または連続した範囲のアミノ酸から成り、このようなエピトープの抗原性は、変性剤によって破壊されない。タンパク質のエピトープを模倣することができる比較的短い合成ペプチドをタンパク質に対する抗体の産生を刺激するために使用することができることは、当技術分野において既知である(たとえば、Sutcliffeら、*Science* 219 : 660, (1983)を参照されたい)。従って、本発明の抗原性エピトープを有するペプチドおよびポリペプチドは、本明細書に記載されるポリペプチドと結合する抗体を生じさせるために有用である。最も抗原性の強い領域を決定するために、Hopp/Woods親水性プロファイルを使用することができる(Hoppら、1981, *ibid.*、およびHopp、1986, *ibid.*)。IL-TIFにおいて、これらの領域は、以下を含む：(1)配列番号：3のアミノ酸番号29(Arg)～アミノ酸番号34(Asn)；(2)配列番号：3のアミノ酸番号121(His)～アミノ酸番号126(Asp)；(3)配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)～アミノ酸番号139(Thr)；(4)配列番号：3のアミノ酸番号137(Lys)～アミノ酸番号142(Lys)；および、(5)配列番号：2のアミノ酸番号145(Glu)～アミノ酸番号150(Lys)。さらに、たとえば、DNASTAR Proteanプログラム(DNASTAR Inc., Madison, WI)を使用して、Jameson-Wolfプロットによって予測されるIL-TIF抗原エピトープは、好ましい抗原として役立ち、当業者によって決定することができる。このような抗原は、(1)配列番号：3のアミノ酸番号28(Cys)～アミノ酸番号35(Phe)；(2)配列番号：3のアミノ酸番号52(Ser)または55(Asp)～アミノ酸番号59(Asp)または62(Leu)；(3)配列番号：3の

アミノ酸番号94(Pro)または95(Gln)～アミノ酸番号100(Gln)または103(Met)；(4)配列番号：3のアミノ酸番号113(Leu)～アミノ酸番号118(Ser)または119(Thr)；(5)配列番号：3のアミノ酸番号123(Glu)～アミノ酸番号126(Asp)または128(His)；および(6)配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)または144(Gly)～アミノ酸番号147(Gly)を含む。その他の抗原には、huIL-TIF-1(配列番号：34；配列番号：3のアミノ酸番号49(Lys)～アミノ酸番号77(Cys)を含む)またはhuIL-TIF-2(配列番号：35；配列番号：3のアミノ酸番号89(Glu)～アミノ酸番号101(Pro)を含む)またはhuIL-TIF-3(配列番号：36；配列番号：3のアミノ酸番号132(Asn)～アミノ酸番号145(Glu)を含む)を含む。

【0094】

抗原性エピトープを有するペプチドおよびポリペプチドは、好ましくは配列番号：3の少なくとも4～10個のアミノ酸、少なくとも10～15個のアミノ酸、または約15～約30個のアミノ酸を含む。このようなエピトープを含んだペプチドおよびポリペプチドは、本明細書に記載されるものとして、IL-TIFポリペプチドを分解することによって、または化学的なペプチド合成によって作製することができる。さらに、エピトープは、ランダムペプチドライブラリーのファージディスプレイによって選択することができる(たとえば、Lane およびStephen, Curr. Opin. Immunol. 5: 268, (1993)；およびCorteseら、Curr. Opin. Biotechnol. 7: 616, (1996)を参照されたい)。エピトープを含む小さなペプチドからエピトープを同定し、そして抗体を産生するための標準的な方法は、たとえば、Mole, 「Epitope Mapping」Methods in Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), Pages 105-116 (The Humana Press, Inc., 1992)；Price, 「Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies」Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritter and Ladyman (eds.), page 60-84 (Cambridge University Press 1995), およびColigan ら、(eds.), Current Protocols in Immunology, pages 9.3.1-9.3.5 and pages 9.4.1-9.4.11 (John Wiley & Sons, 1997)によって記載される。

【0095】

変異体IL-TIFポリヌクレオチドの特定のヌクレオチド配列に関係なく、ポリヌクレオチドは、その炎症誘発性の活性、増殖性または分化性の活性、分化した細胞の機能を誘導もしくは阻害するその能力によって、または抗IL-TIF抗体もしくはIL-TIF受容体に特異的に結合する能力によって特徴づけられるポリペプチドをコードする。より詳細には、変異体IL-TIFポリヌクレオチドは、配列番号：3で示すポリペプチドの活性の少なくとも50%、および好ましくは70%、80%、または90%以上を示すポリペプチドをコードする。

【0096】

変異体および融合タンパク質を含む任意のIL-TIFポリペプチドについては、当技術分野の当業者は、上記の表1および2に記載された情報を使用して、その変異体をコードする完全縮重ポリヌクレオチド配列を容易に作製することができる。

【0097】

本発明は、種々のその他のポリペプチド融合体(および、1つまたは複数のポリペプチド融合体を含む関連した多量体タンパク質)をさらに提供する。たとえば、IL-TIFポリペプチドは、米国特許第5,155,027号および第5,567,584号に開示したように、融合して二量体化タンパク質として調製することができる。この点に関しては、好ましい二量体化タンパク質は、免疫グロブリンの定常領域ドメインを含む。免疫グロブリン-IL-TIFポリペプチド融合体は、遺伝子操作された細胞に発現させることができる(種々の多量体のIL-TIF類似体を産生させるために)。特定の細胞、組織、または巨大分子にこれらをターゲットするために、補助的なドメインをIL-TIFポリペプチドに融合させることができる。たとえば、IL-TIFポリペプチドまたはタンパク質は、その標的細胞の表面上の受容体に特異的に結合するリガンドに対してIL-TIFポリペプチドを融合することにより、予め定められた細胞種にターゲットさせることができる。このような方法で、ポリペプチドおよびタンパク質は、治療的または診断の目的のためにターゲットさせることができる。IL-TIFポリペプチドは、精製およびターゲティングドメインのための親和性タグなどの、2つ以上の部分

に融合させることができる。また、ポリペプチド融合は、1つまたは複数の切断部位を、特にドメイン間に含むことができる。Tuanら、Connective Tissue Research 34 : 1-9, 1996を参照されたい。

【0098】

本明細書に論議される方法を使用して、当技術分野の当業者は、配列番号：3のアミノ酸残基1~167または23~167に対して実質的に同様の配列同一性を有する種々のポリペプチド、またはこれらの機能的な断片および融合体を、同定および/または調製することができ、このようなポリペプチドまたは断片もしくは融合体は、炎症、増殖、分化を刺激する、増強する、もしくは促進する、分化した細胞機能を誘導する、またはIL-TIF受容体またはIL-TIF抗体を結合する能力などの野生型タンパク質の性質を保持する。

10

【0099】

本発明の抗体または結合ポリペプチドの作製に使用するために、全長ポリペプチド、機能的な断片、抗原エピトープ、IL-TIFポリペプチドのエピトープを含む部分、および融合ポリペプチドを含むIL-TIFポリペプチドは、従来技術に従って遺伝子操作した宿主細胞に産生させることができる。適切な宿主細胞は、外来DNAによって形質転換またはトランスフェクトされ、かつ培養で増殖することができ、細菌、真菌細胞、および培養された高等真核細胞を含む。真核細胞、特に多細胞生物の培養細胞が好ましい。クローン化されたDNA分子を操作し、外来DNAを種々の宿主細胞に導入するための技術は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988、および Ausubelら、eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987によって開示されている。

20

【0100】

一般に、IL-TIFポリペプチドをコードするDNA配列は、発現ベクター内で、一般に転写プロモーターおよびターミネーターを含む、その発現のために必要とされるその他の遺伝子エレメントに操作可能な状態で結合されている。また、ベクターは、通常1つまたは複数の選択可能なマーカーおよび1つまたは複数の複製開始点を含むと考えられるが、当業者であれば、特定の系内で選択可能なマーカーが別々のベクター上で提供されてもよいこと、および外来DNAの複製は、宿主細胞ゲノムへ組込むことによって提供されてもよいことを認識するであろう。プロモーター、ターミネーター、選択可能なマーカー、ベクター、およびその他のエレメントの選択は、当技術分野の当業者のレベルの範囲内のルーチンの設計事項である。このようなエレメントの多くは、文献に記載されており、商業的な供給元を通して入手可能である。

30

【0101】

宿主細胞の分泌経路にIL-TIFポリペプチドを向けるために、分泌シグナル配列(リーダー配列、プレプロ配列、またはプレ配列としても知られる)を発現ベクターに供給する。分泌シグナル配列は、IL-TIFのものであってもよい(たとえば、配列番号：3のアミノ酸1(Met)~21(Ala))、または分泌される別のタンパク質(たとえば、t-PA)に由来するか、もしくは新規に合成されてもよい。分泌シグナル配列は、操作可能な状態でIL-TIF DNA配列に結合され、すなわち2つの配列は、正しいリーディングフレームで接続され、宿主細胞の分泌経路中に新しく合成されたポリヌクレオチドを方向づけるように配置される。分泌シグナル配列は通常、関心対象のポリペプチドをコードするDNA配列の5'側に位置するが、一定の分泌シグナル配列は、関心対象のDNA配列の他の場所に位置することもできる(たとえば、Welchら、米国特許第5,037,743号；Hollandら、米国特許第5,143,830号を参照されたい)。

40

【0102】

培養哺乳類細胞は、本発明の範囲内の適切な宿主である。外来DNAを哺乳類宿主細胞に導入するための方法は、当技術分野において周知である。たとえば、Wiglerら、Cell 14 : 725, 1978；Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7 : 603, 1981；Graham and Van der Eb, Virology 52 : 456, 1973；Neumannら、EMBO J. 1 : 841-5, 1982；Hawley-Nelsonら、Focus 15 : 73, 1993；Ciccaroneら、Focus 15 : 80, 1993；およびM

50

iller and Rosman, *BioTechniques* 7: 980-90, 1989; WangおよびFiner, *Nature Med.* 2: 714-6, 1996を参照されたい。培養哺乳類細胞における組換えポリペプチドの産生は、Levinsonら、米国特許第4,713,339号; Hagenら、米国特許第4,784,950号; Palmiterら、米国特許第4,579,821号; およびRingold、米国特許第4,656,134号に開示される。適切な培養哺乳類細胞は、COS-1(ATCC番号CRL 1650)、COS-7(ATCC番号CRL1651)、BHK(ATCC番号CRL 1632)、BHK 570(ATCC番号CRL 10314)、293(ATCC番号CRL 1573; Grahamら、*J. Gen. Virol.* 36: 59-72, 1977)、およびチャイニーズハムスター卵巣(たとえば、CHO-K1; ATCC番号CCL 61)株化細胞を含む。さらなる適切な株化細胞が当技術分野において既知であり、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、Manassas, VAなどの公共保管所から入手可能である。一般に、SV-40またはサイトメガロウイルス由来のプロモーターなどの、強力な転写プロモーターが好ましい。たとえば、米国特許第4,956,288号を参照されたい。その他の適切なプロモーターは、メタロチオネイン遺伝子(米国特許第4,579,821号および第4,601,978号)およびアデノウイルス主要後期プロモーター由来のものを含む。

10

【0103】

薬物選択は、外来DNAが挿入された培養哺乳類細胞を選択するために一般に使用される。このような細胞は、通常「形質転換体」と称する。選択剤の存在下で培養され、これらの子孫に関心対象の遺伝子を渡すことができる細胞は、「安定形質転換体」と称する。好ましい選択可能なマーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性を付与する遺伝子である。選択は、ネオマイシン型薬物、たとえばG-418などの存在下で実施される。「増幅」と呼ばれる方法である選択システムは、関心対象の遺伝子の発現レベルを高めるためにも使用される。増幅は、低レベルの選択剤の存在下で形質転換体を培養し、次いで、導入された遺伝子産物を高レベルで産生する細胞を選択するために選択剤の量を高めることによって実施される。好ましい増幅可能な選択マーカーは、メトトレキサートに対する耐性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼである。その他の薬物耐性遺伝子(たとえば、ヒグロマイシン耐性、多剤耐性、ピューロマイシン アセチルトランスフェラーゼ)を使用することもできる。緑色蛍光タンパク質などの変更された表現型を導入する他のマーカー、またはCD4、CD8、クラスI MHC、胎盤アルカリホスファターゼなどの細胞表面タンパク質を、FACSソーティングまたは磁気ビーズ分離技法などの手段により、トランスフェクトされていない細胞とトランスフェクトされた細胞とを分類するために使用することができる。

20

【0104】

当技術分野において既知の植物細胞、昆虫細胞、およびトリ細胞を含むその他の高等真核細胞を宿主として使用することもできる。植物細胞に遺伝子を発現するためのベクターとしてのアグロバクテリウム・リゾジェンシス(*Agrobacterium tumefaciens*)の使用は、Sinkarら、*J. Biosci. (Bangalore)* 11: 47-58, 1987によって概説されている。昆虫細胞の形質転換およびその中における外来ポリペプチドの産生は、Guarinoら、米国特許第5,162,222号およびWIPO刊行物国際公開公報第94/06463号によって開示される。昆虫細胞は、組換えバキュロウイルスに感染することができ、一般にオートグラファ・カリホルニカ(*Autographa californica*)核多角体病ウイルス(AcNPV)に由来する。King, L.A. and Possee, R.D., *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, London, Chapman & Hall; O'Reilly, D.R.ら、*Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, New York, Oxford University Press., 1994; および、Richardson, C. D., Ed., *Baculovirus Expression Protocols*を参照されたい。組換えバキュロウイルスを作製する第2の方法は、Luckow(Luckow, V.A.ら、*J Virol* 67: 4566-79, 1993)によって記載されているトランスポゾンに基づいた系を利用する。Hill-Perkins, M.S. and Possee, R.D., *J. Gen. Virol.* 71: 971-6, 1990; Bonning, B.C.ら、*J. Gen. Virol.* 75: 1551-6, 1994; 並びに、Chazenbalk, G.D., およびRapoport, B., *J. Biol. Chem.* 270: 1543-9, 1995を参照されたい。さらに、ベクターは、発現されたIL-TIFポリペプチド、またはポリペプチド断片のCもしくはN末端で、エピトープ・タグをコードするDNAとインフレームでの融合体、たとえばGlu-Gluエピトープ・タグを含むことができる(Grussenmeyer, T.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7952-4, 1985)。また、一般には、Glick and Pasternak, Mo

30

40

50

lecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C., 199; 並びにKing, L.A. and Possee, R.D., *ibid.*; O'Reilly, D. R.ら、*ibid.*; Richardson, C.D., *ibid.*)を参照されたい。

【0105】

酵母細胞を含む真菌細胞も、本発明の抗体を作製するために使用されるIL-TIFポリペプチドおよびポリペプチド断片を作製するために、本発明の範囲内で使用することができる。これに関して、特に関心対象の酵母種は、サッカロマイセス・セレビスシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、ピヒア・パストリス(*Pichia pastoris*)、およびピヒア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)を含む。外因性DNAによりS. セレビスシアエ細胞を形質転換し、そしてそれから組換えポリペプチドを生成するための方法は、たとえば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号; Kawasakiら、米国特許第4,931,373号; Brake、米国特許第4,870,008号; Welchら、米国特許第5,037,743号; およびMurrayら、米国特許第4,845,075号; Kingsmanら、米国特許第4,615,974号; およびBitter、米国特許第4,977,092号によって開示される。また、米国特許第4,990,446号; 第5,063,154号; 第5,139,936号および第4,661,454号を参照されたい。たとえば、Gleesonら、*J. Gen. Microbiol.* 132: 3459-65, 1986、およびCregg、米国特許第4,882,279号を参照されたい。コウジカビ属(*Aspergillus*)細胞を、McKnightら、米国特許第4,935,349号の方法に従って利用してもよい。アクレモニウム・クリソゲナム(*Acremonium chrysogenum*)を形質転換するための方法は、Suminoら、米国特許第5,162,228号によって開示される。パンカビ属(*Neurospora*)を形質転換するための方法は、Lambowitz、米国特許第4,486,533号によって開示される。

10

20

【0106】

組換えタンパク質の産生のための宿主としてのピヒア・メタノリカの使用は、WIPO刊行物国際公開公報第97/17450号、国際公開公報第97/17451号、国際公開公報第98/02536号、および国際公開公報第98/02565号に開示される。

【0107】

また、大腸菌、パチルス、およびその他の属の株を含む原核生物の宿主細胞は、本発明の範囲内の有用な宿主細胞である。これらの宿主を形質転換し、その中にクローン化された外来DNA配列を発現するための技術は、当技術分野において周知である(たとえば、Sambrookら、*ibid*を参照されたい)。

【0108】

本発明で使用するためには、IL-TIFポリペプチドおよびポリペプチド断片は、汚染性高分子、特にその他のタンパク質および核酸に対して、80%の純度、より好ましくは90%の純度、より好ましくは95%の純度に精製することが好ましく、特に99.9%以上の薬学的に純粋な状態であり、感染性および発熱性の薬剤がないことが好ましい。好ましくは、精製されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に動物起源の他のポリペプチドを実質的に有さない。

30

【0109】

発現された組換えIL-TIFポリペプチド(またはキメラIL-TIFポリペプチド)は、分画および/または従来の精製法および媒体類を使用して精製することができる。硫酸アンモニウム沈殿および酸またはカオトロピック剤抽出を試料の分画のために使用してもよい。典型的な精製段階は、ヒドロキシアパタイト、サイズ排除、FPLCおよび逆相高性能液体クロマトグラフィーを含む。適切なクロマトグラフィー用媒体は、誘導体化されたデキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特別なシリカなどを含む。PEI、DEAE、QAEおよびQ誘導体が好ましい。典型的なクロマトグラフィー用媒体は、フェニル-セファロースFF(*pharmacia*)、Toyopearl プチル650(*Toso Haas, Montgomeryville, PA*)、オクチル-セファロース(*Pharmacia*)などの、フェニル、プチル、またはオクチル基により誘導体化されたもの; またはAmberchrom CG71 (*Toso Haas*)などのポリアクリル樹脂を含む。適切な固体支持体は、ガラスビーズ、シリカ基材の樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、架橋されたアガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋されたポリアクリルアミド樹脂およびそれらが使用される条件下で不溶性である同様のものを含む。これらの支持

40

50

体は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基および/または炭水化物成分によるタンパク質の付着を可能にする反応性基で修飾してもよい。カップリング化学物質の例は、臭化シアン活性化、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化、エポキシド活性化、スルフヒドリル活性化、ヒドラジド活性化、およびカルボジイミドカップリング化学のためのカルボキシルおよびアミノ誘導体を含む。これらのおよびその他の固体媒体は、当技術分野において周知かつ広く使用されており、商業的供給者から入手できる。支持媒体に受容体ポリペプチドを結合するための方法は、当技術分野において周知である。特定の方法の選択は、ルーチンの設計事項であり、部分的には、選ばれた支持体の性質によって決定される。たとえば、Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988を参照されたい。

10

【0110】

IL-TIFポリペプチドおよびポリペプチド断片は、これらの物性を利用することによって単離することができる。たとえば、固定された金属イオン吸着(IMAC)クロマトグラフィーは、ポリヒスチジン・タグを含むヒスチジンに富んだタンパク質を精製するために使用することができる。簡単には、まず、ゲルが二価金属イオンにより荷電され、キレートが形成される(Sulkowski, Trends in Biochem. 3: 1-7, 1985)。ヒスチジンに富んでいるタンパク質が、使用される金属イオンに依存して、異なった親和性を有するこのマトリックスに吸着され、競合的溶出、pHの低下、または強いキレート化剤の使用により溶出されるであろう。その他の精製方法は、レクチン親和性クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによってグリコシル化されたタンパク質の精製(Methods Enzymol., Vol. 182, 「Guide to Protein Purification」M. Deutscher編、Acad. Press, San Diego, 1990, pp.529-39)および可溶性IL-TIF受容体の使用を含む。本発明のさらなる態様において、関心対象のポリペプチドと親和性タグ(たとえば、マルトース-結合タンパク質、免疫グロブリンドメイン)の融合体を、精製を促進するために構築してもよい。

20

【0111】

さらに、当技術分野において記載されている方法を使用して、ポリペプチド融合体、またはハイブリッドIL-TIFタンパク質は、その他のヒト・サイトカインファミリータンパク質(たとえば、インターロイキンもしくはGM-CSF)、または異種タンパク質のものと組み合わせIL-TIFの領域もしくはドメインを使用して構築される(Sambrookら、ibid.、Altschulら、ibid.、Picard, Cur. Opin. Biology, 5: 511-5, 1994、およびその中の参照)。これらの方法により、関心対象のポリペプチドのより大きなドメインまたは領域の生物学的な重要性を決定できる。このようなハイブリッドは、反応速度、結合を変え、細胞増殖性の活性を変え、基質特異性を収縮もしくは拡大し、またはポリペプチドの組織および細胞局在を変えてもよく、未知の構造のポリペプチドに適用することができる。

30

【0112】

融合タンパク質は、融合タンパク質のそれぞれの構成要素を調製し、化学的にこれらを結合させることによって、当技術分野の周知の方法によって調製することができる。または、融合タンパク質の両方の構成要素を適当なリーディングフレームにコードするポリヌクレオチドを、既知の技術および本明細書に記載した方法によって表したものを使用して作製することができる。たとえば、生物学的な機能を与えるヘリックスの一部または全体を、IL-10、zcyto10、MDA7、IL-15、IL-2、IL-4、およびGM-CSFなどの別のファミリーメンバーに由来する機能的に相当するヘリックスとIL-TIFとの間で交換してもよい。このような成分は、分泌シグナル配列、ヘリックスA、B、C、D、および4つのヘリックス束状構造サイトカインを含むが、これらに限定されない。このような融合タンパク質は、構築される融合に応じて、IL-TIFポリペプチドまたはその他の既知の4つのヘリックス束状構造サイトカインファミリータンパク質と同じかまたは同様の生物学的な機能的なプロフィールを有すると思われる。さらに、本明細書に開示したように、このような融合タンパク質は、その他の性質を示してもよい。

40

【0113】

IL-TIFポリペプチドとこれらが融合されるポリペプチドの間の相当するドメインを交換

50

するために、標準的な分子生物学およびクローニング技術を使用することができる。通常、関心対象のドメイン、たとえばIL-TIFのヘリックスA~D、または本明細書に記載されているその他のドメインをコードするDNA部分は、本明細書に記載されているように、さらなるポリペプチド(たとえば、IL-10、もしくはzcyto10、MDA7などの、別のサイトカインに由来するドメインもしくは領域)をコードする少なくとも1つのその他のDNA部分に対して、インフレームに操作可能な状態で結合して、適切な発現ベクターに挿入される。通常、DNA構築物は、全ての融合タンパク質、またはこれらの機能的な部分をコードする単一の構築物を作製するために、ポリペプチドの対応する領域をコードする個別のDNA部分がインフレームに操作可能な状態で結合されるように作製される。たとえば、DNA構築物は、N末端からC末端に、シグナル・ポリペプチドに続いて、ヘリックスA、続いてヘリックスB、続いてヘリックスC、続いてヘリックスDを含む成熟した4つのヘリックス束状構造サイトカイン融合タンパク質を含む融合タンパク質、またはたとえば、別の4つのヘリックス束状構造サイトカインファミリータンパク質に由来の相当する領域に交換された上記のものいづれかをコードするであろう。このような融合タンパク質は、本明細書に記載されているように、発現し、単離し、活性をアッセイすることができる。さらに、このような融合タンパク質は、本明細書に記載されているように、使用するための、たとえば抗IL-TIF抗体を作製するために動物に接種するためのIL-TIFポリペプチドの断片を発現させ、分泌させるために使用することができる。たとえば、分泌シグナル配列をヘリックスA、B、C、もしくはD、またはこれらの組み合わせに操作可能な状態で結合し(たとえば、本明細書に記載されたヘリックスA-B、B-C、C-D、A-C、A-D、B-D、またはIL-TIFポリペプチド断片を含む操作可能な状態で結合されたポリペプチド)、IL-TIFポリペプチドの断片を分泌させることができ、これを本明細書に記載されているように精製して、本明細書に記載されているように、抗IL-TIF抗体を産生するために動物に接種する抗原として役立てることができる。

10

20

30

40

50

【0114】

また、IL-TIFポリペプチドまたはこれらの断片は、化学合成で調製されてもよい。IL-TIFポリペプチドは、単量体または多量体；グリコシル化されたかまたはグリコシル化されていない；ペグ化された(pegylated)か、またはペグ化されていない；ものであってもよく、および最初のメチオニンアミノ酸残基を含んでもよいし、含まなくてもよい。たとえば、ポリペプチドは、固相ペプチド合成によって、たとえば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963によって記載されているように調製することができる。

【0115】

IL-TIF分子の活性は、IL-TIF受容体を発現する細胞の増殖、および/またはこれに対する結合を測定する種々のアッセイ法を使用して測定することができる。IL-TIF依存性な細胞の変化は、特に興味をもたれる。IL-TIF依存性であるように設計される適切な株化細胞は、IL-3依存性なBaF3株化細胞(Palacios and Steinmetz, Cell 4: 727-734, 1985; Ma they-Prevotら、Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986)、FDC-P1 (Hapelら、Blood 64: 786-790, 1984)、およびMO7e (Kissら、Leukemia 7: 235-240, 1993)を含む。成長因子依存性な株化細胞は、発行された方法に従って確立することができる(たとえば、Greenbergerら、Leukemia Res. 8: 363-375, 1984; Dexterら、in Baumら、Eds., Experimental Hematology Today, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980)。たとえば、本明細書に記載されているように、IL-TIFヘテロ二量体の受容体zcytor11/CRF2-4を発現するBaF3細胞は、IL-TIF、IL-TIF受容体結合断片、およびIL-TIF変異体の活性をアッセイするために使用することができる。zcytor11およびCRF2-4を同時発現するBaF3安定株化細胞(IL-TIF受容体)は、IL-3を含まない培地中でIL-TIFタンパク質に対して用量依存性な増殖反応を示す。

【0116】

IL-TIFは、造血および免疫機能の恒常性に関与する細胞の増殖の刺激、活性化、分化、および/または誘導、または特定化された細胞機能の阻害のために有用である。特に、IL-TIFポリペプチドは、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、単球、およびマクロファージを

含むが、これらに限定されない造血系細胞の増殖の刺激、活性化、分化、誘導、または特定化された細胞機能の阻害のために有用である。造血細胞の増殖および/または分化は、培養細胞を使用してインビトロで、または適切な動物モデルにIL-TIF分子を投与することによってインビボで測定することができる。本発明の抗体または結合ポリペプチドは、このような活性のアンタゴニズムまたは阻害を示すことによって評価することができる。細胞の増殖または分化を測定するアッセイ法は、当技術分野において周知である。たとえば、増殖を測定するアッセイ法は、ニュートラルレッド色素に対する化学受容性(Cavanaughら、Investigational New Drugs 8 : 347-354, 1990、参照として本明細書に組み入れられる)、放射標識されたヌクレオチドの取り込み(Cookら、Analytical Biochem. 17 : 1-7, 1989、参照として本明細書に組み入れられる)、5-プロモ-2'-デオキシウリジン(BrdU)の増殖細胞のDNAへの取り込み(Porstmannら、J. Immunol. Methods 82 : 169-179, 1985、参照として本明細書に組み入れられる)、およびテトラゾリウム塩の使用(Mosmann, J. Immunol. Methods 65 : 55-63, 1983 ; Alleyら、Cancer Res. 48 : 589-601, 1988 ; Marshallら、Growth Reg. 5 : 69-84, 1995 ; および Scudieroら、Cancer Res. 48 : 4827-4833, 1988 ; 全てが参照として本明細書に組み入れられる)などのアッセイ法を含む。分化を測定するアッセイ法は、たとえば、組織、酵素活性、機能的な活性、または形態学的な変化の段階特異的な発現に関連した細胞表面マーカーの測定を含む(Watt, FASEB, 5 : 281-284, 1991 ; Francis, Differentiation 57 : 63-75, 1994 ; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989 ; 全てが参照として本明細書に組み入れられる)。

10

20

【 0 1 1 7 】

IL-10は、その他のサイトカインの産生を阻害し、活性化したBリンパ球の増殖および分化を誘導し、HIV-1複製を阻害し、ガンマインターフェロンに対する拮抗的效果を示すサイトカインである。IL-10は、180 の回旋によって関連した2つのヘリックスのポリペプチド領域から形成される二量体として存在するように見える。たとえば、Zdanovら、Structure : 3 (6) : 591-601 (1996)を参照されたい。IL-10は、活性化したTh2 T細胞、B細胞、ケラチノサイト、および単球/マクロファージの産物であり、Th1 T細胞の応答を調整することができることが報告された。このような調整は、Th1 T細胞によるサイトカイン合成を阻害することによって達成されてもよい。たとえば、Husら、Int. Immunol. 4 : 563 (1992)およびD' Andreaら、J. Exp. Med. 178 : 1042 (1992)を参照されたい。また、IL-10は、ナチュラルキラー細胞および単球/マクロファージによるサイトカイン合成を阻害することが報告された。たとえば、前述のHusら、およびFiorentinoら、J. Immunol. 146 : 3444 (1991)を参照されたい。加えて、IL-10は、インシュリン依存性糖尿病に関して保護作用を有することが見出された。同様に、IL-10に対してポリペプチド構造および一部の配列類似性を共有するサイトカインとして、IL-TIFは、これらの上記の開示された活性を有することができ、IL-10活性に使用されるアッセイ法をIL-TIF活性のアッセイ法に適用することができる。

30

【 0 1 1 8 】

IL-TIFは、ウイルスの送達系を使用して、インビボにおいてアッセイすることができる。このための典型的なウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)を含む。アデノウイルスは、2本鎖DNAウイルスで、異種核酸送達のための現在もっとも研究された遺伝子導入ベクターである(総説については、T. C. Beckerら、Meth. Cell Biol. 43 : 161-89, 1994 ; およびJ. T. Douglas and D. T. Curriel, Science & Medicine 4 : 44-53, 1997を参照されたい)。アデノウイルス系は、いくつかの利点を提供する : (i)アデノウイルスは、比較的大きなDNAインサートを収容することができ ; (ii)高力価に増殖することができ ; (iii)哺乳類細胞種の広い範囲に感染し ; 並びに(iv)遍在的、組織特異的、および調節可能なプロモーターを含む多くの異なるプロモーターと共に使用することができる。また、アデノウイルスは、血流において安定するので、これらを静脈内注射によって投与することができる。

40

【 0 1 1 9 】

50

アデノウイルスゲノムの一部を欠失するアデノウイルスベクターを使用すると、インサートは、直接的ライゲーションによって、または同時トランスフェクトされたプラスミドとの相動的組換えによって、ウイルスDNAに組み込まれる。典型的な系において、必須E1遺伝子は、ウイルスベクターから欠失されており、E1遺伝子が宿主細胞(典型的には、ヒト293株化細胞である)によって提供されない限り、ウイルスは複製しないと考えられる。無処理の動物に静脈内に投与したときに、アデノウイルスは、主に肝臓をターゲットする。アデノウイルスの送達系がE1遺伝子の欠失を有する場合、ウイルスは、宿主細胞において複製することができない。しかし、宿主の組織(たとえば、肝臓)は、異種タンパク質を発現し、プロセスする(および、分泌シグナル配列が存在する場合は、分泌する)。分泌されたタンパク質は、高度に血管新生化された肝臓において循環に入り、感染した動物に対する効果を決定することができる。

10

【0120】

さらに、ベクターに対する免疫応答を減少または排除することを試みて、種々のウイルス遺伝子の欠失を含むアデノウイルスのベクターを使用することができる。このようなアデノウイルスは、E1が欠失されており、加えてE2AまたはE4の欠失も含む(Lusky, M.ら、J. Virol. 72: 2022-2032, 1998; Raper, S.E.ら、Human Gene Therapy 9: 671-679, 1998)。加えて、E2bの欠失は、免疫応答を減少させることが報告されている(Amalfitano, A.ら、J. Virol. 72: 926-933, 1998)。さらに、全てのアデノウイルスゲノムを欠失させることによって、異種DNAの非常に大きなインサートを収容することができる。ウイルス遺伝子のすべてが欠失されている、いわゆる「グートレス(gutless)」アデノウイルスの発生は、異種DNAの大きいインサートの挿入に特に好都合である。総説については、Yeh, P. and Perricaudet, M., FASEB J. 11: 615-623 1997を参照されたい。

20

【0121】

アデノウイルス系は、また、インビトロでのタンパク質産生のために使用することができる。細胞が急速に分裂していない条件下で、アデノウイルスに感染した細胞を培養することによって、細胞は、その延長期間にタンパク質を産生することができる。たとえば、BHK細胞を細胞製造所でコンフルエンスに培養し、次いで、関心対象の分泌タンパク質をコードするアデノウイルスのベクターに曝露させる。次いで、細胞を無血清条件下で培養し、これにより、有意な細胞分裂を伴わずに感染細胞を数週間生存させることができる。または、アデノウイルスベクターを感染した293細胞を、比較的高い細胞密度で接着細胞として、または懸濁培養中で培養して、有意な量のタンパク質を産生させることができる(Garnierら、Cytotechnol. 15: 145-55, 1994を参照されたい)。いずれのプロトコルでも、発現され、分泌された異種タンパク質は、細胞に発現されたタンパク質の性質に応じて、細胞培養上清、可溶化液、または膜画分から繰り返し単離することができる。感染した293細胞の産生プロトコルの範囲内で、非分泌タンパク質を効率的に得てもよい。

30

【0122】

IL-TIF受容体について観察される組織分布からみて、アゴニスト(天然のリガンド/基質/補因子/その他を含む)および/またはアンタゴニストは、インビトロおよびインビボの両方における適用に莫大な可能性を有する。IL-TIFアゴニストとして同定される化合物は、造血および免疫機能の恒常性に関与する細胞の増殖、増殖、活性化、分化および/または分化した細胞機能の誘導もしくは阻害に有用である。したがって、アゴニストは、生体外でまたは培養において、T細胞、B細胞、血小板、およびリンパ性および骨髄球性のシステムのその他の細胞の増殖および/または発生を促進する際に特に有用である。

40

【0123】

本発明の抗体および結合パートナーなどのアンタゴニストは、これらがIL-TIFによって誘導される炎症を減少させることができるので、急性および慢性の炎症を発症する疾患を診断し、治療するために有用である。また、アンタゴニストは、リガンド-受容体の相互作用の部位を特徴づけるための調査試薬としても有用である。アンタゴニストは、炎症を減少または除去するために有用であり、造血の調節に関与する細胞の増殖、増殖、活性化、および/または分化の阻害に関与するであろう。IL-TIF活性の阻害剤(IL-TIFアンタゴ

50

ニスト)は、抗IL-TIF抗体を含む、結合ポリペプチド、および可溶性IL-TIF受容体、並びにその他のペプチド性および非ペプチド性の薬剤(リボザイムを含む)を含む。

【0124】

また、IL-TIFは、その活性の阻害剤(アンタゴニスト)を同定するために使用することができる。IL-TIFの活性を阻害する化合物を同定するために、試験化合物を本明細書に開示したアッセイ法に加える。本明細書に開示したアッセイ法に加えて、試料は、受容体結合、IL-TIF依存性の細胞の反応の刺激/阻害、またはIL-TIF受容体発現する細胞の増殖を測定するためにデザインされた種々のアッセイ法の範囲内で、IL-TIF活性の阻害について試験することができる。

【0125】

IL-TIFポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖定常領域、典型的には2つの定常領域ドメインを含み、かつ可変領域を欠いているFc断片を有する融合体として発現することができる。このような融合体を調製するための方法は、米国特許第5,155,027号および第5,567,584号に開示されている。このような融合体は、典型的には、Fc部がジスルフィドで互いに接着され、かつ2つの非Igポリペプチドが互いに近接して配列されている多量体分子として分泌される。このタイプの融合体は、(たとえば、二量体化、安定度およびインビボ半減期の増大、親和性精製リガンド、インビトロアッセイ法のツール、アンタゴニストのために)使用することができる。アッセイ法に使用するためには、キメラをFc領域を介して支持体に結合して、ELISA形式で使用する。Fc融合体は、異なる薬物動態および変えられた作用を有する、好ましい治療的なタンパク質を表してもよい。

【0126】

本発明の抗IL-TIFおよび結合パートナーを単離するのを助けるために、リガンド結合受容体(または抗体、補体/抗補体対の1つのメンバー)を使用するアッセイ法系またはこれらの結合断片、および商業的に入手可能なバイオセンサー機器(BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ)を都合よく使用してもよい。このような受容体、抗体、補体/抗補体対のメンバー、または断片は、受容体チップの表面上へ固定される。この装置の使用は、karlsson, J. Immunol. Methods 145: 229-40, 1991、およびCunningham and Wells, J. Mol. Biol. 234: 554-63, 1993 によって開示される。受容体、抗体、メンバー、または断片は、アミンまたはスルフィドリル化学を使用して、流動細胞内の金フィルムに結合されるデキストラン繊維に共有結合される。試験試料が細胞に通される。リガンド、エピトープ、または補体/抗補体対の反対のメンバーが試料に存在する場合、それぞれ固定された受容体、抗体、またはメンバーに結合し、金フィルムの表面プラズモン共鳴の変化として検出される媒体の屈折率の変化を引き起こす。このシステムは、オン-およびオフ-速度の決定を可能にし、これにより結合親和性が計算されて、結合の化学量の評価が可能にされる。または、リガンド/受容体の結合は、SELDI(商標)技術を使用して解析することができる(Ciphergen, Inc. Palo Alto, CA)。さらに、上記したBIACORE技術は、異なるモノクローナル抗体がIL-TIFポリペプチド上の同じまたは異なるエピトープに結合するかどうかを決定する競合実験に使用することができ、従って、本発明の抗IL-TIF抗体を中和するエピトープマッピングの補助に使用される。

【0127】

また、リガンド結合受容体ポリペプチドは、当技術分野において既知のその他のアッセイ系内で使用することができる。このような系は、結合親和性の決定のためのスキャッチャード分析(Scatchard, Ann. NY. Acad. Sci. 51: 660-72, 1949を参照されたい)および熱量測定アッセイ(Cunninghamら、Science 253: 545-48, 1991; Cunninghamら、Science 245: 821-25, 1991)を含む。

【0128】

また、IL-TIFポリペプチドは、IL-TIFエピトープ、ペプチド、またはポリペプチドに結合する本発明の抗体を調製するために使用することができる。IL-TIFポリペプチドまたはこれらの断片は、動物に接種し、免疫応答を誘発するための抗原(免疫原)として役立つ。このような抗体は、本明細書に記載されているように、炎症誘発性のIL-TIFの生物作用を

10

20

30

40

50

遮断するために使用することができ、種々の疾患の抗炎症性の薬物療法として有用である。当業者であれば、IL-TIFポリペプチド(たとえば、配列番号：3)の少なくとも6、好ましくは少なくとも9、およびより好ましくは少なくとも15~約30の隣接するアミノ酸残基の配列を含む抗原性のエピトープを含むポリペプチドを認識するであろう。IL-TIFポリペプチドの大部分、すなわちアミノ酸配列の全長の30~100残基を含むポリペプチドが含まれる。また、抗原または免疫原性のエピトープは、本明細書に記載されているように、付着されたタグ、アジュバント、およびキャリアを含むことができる。適切な抗原は、配列番号：3のアミノ酸番号23~アミノ酸番号167、またはこれらの隣接する9~144、もしくは30~144アミノ酸断片によってコードされるIL-TIFポリペプチドを含む。その他の適切な抗原は、本明細書に記載されているように、4つのヘリックス束状構造のヘリックスを含む。抗原として使用する好ましいペプチドは、本明細書に記載されているように、当技術分野の当業者によって疎水性プロットから予測されるものなどの親水性ペプチドである。たとえば、適切な親水性のペプチドは、以下を含む：(1)配列番号：3のアミノ酸番号29(Arg)~アミノ酸番号34(Asn)；(2)配列番号：3のアミノ酸番号121(His)~アミノ酸番号126(Asp)；(3)配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)~アミノ酸番号139(Thr)；(4)配列番号：3のアミノ酸番号137(Lys)~アミノ酸番号142(Lys)；および、(5)配列番号：2のアミノ酸番号145(Glu)~アミノ酸番号150(Lys)。さらに、たとえば、DNASTAR Protean プログラム(DNA STAR, INC., Madison, WI)を用いて、Jameson-Wolf plot によって予測されるIL-TIF抗原エピトープは、好ましい抗原として役立ち、当業者によって決定され、また本明細書に記載されている。このような抗原は、(1)配列番号：3のアミノ酸番号28(Cys)~アミノ酸番号35(Phe)；(2)配列番号：3のアミノ酸番号52(Ser)または55(Asp)~アミノ酸番号59(Asp)または62(Leu)；(3)配列番号：3のアミノ酸番号94(Pro)または95(Gln)~アミノ酸番号100(Gln)または103(Met)；(4)配列番号：3のアミノ酸番号113(Leu)~アミノ酸番号118(Ser)または119(Thr)；(5)配列番号：3のアミノ酸番号123(Glu)~アミノ酸番号126(Asp)または128(His)；および(6)配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)または144(Gly)~アミノ酸番号147(Gly)を含む。その他の抗原には、huIL-TIF-1(配列番号：34；配列番号：3のアミノ酸番号49(Lys)~アミノ酸番号77(Cys)を含む)またはhuIL-TIF-2(配列番号：35；配列番号：3のアミノ酸番号89(Glu)~アミノ酸番号101(Pro)を含む)またはhuIL-TIF-3(配列番号：36；配列番号：3のアミノ酸番号132(Asn)~アミノ酸番号145(Glu)を含む)を含む。

10

20

30

【0129】

これらの抗原(または免疫原)を動物に接種することによって発生する免疫応答に由来する抗体は、本明細書に記載されているように、単離し、精製することができる。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を調製し、単離するための方法は、当技術分野において周知である。たとえば、Current Protocols in Immunology, Cooliganら、(eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995；Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989；およびHurrell, J.G.R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982 を参照されたい。

【0130】

当業者に明らかなように、ポリクローナル抗体は、種々の温血動物、たとえばウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、トリ、ウサギ、マウス、およびラットを、IL-TIFポリペプチドまたはこれらの断片により接種することにより作製することができる。IL-TIFポリペプチドの免疫性は、ミョウバン(水酸化アルミニウム)などのアジュバント、またはフロイント完全もしくは不完全アジュバントの使用により高めることができる。また、免疫化のために有用なポリペプチドは、免疫グロブリン・ポリペプチドまたはマルトース結合タンパク質とIL-TIFまたはその一部の融合体などの融合体ポリペプチドを含む。ポリペプチド免疫原は、十分な長さの分子またはその一部であってもよい。ポリペプチド部分が「ハプテン様」である場合、そのような部分は、免疫化のために、高分子キャリア(カサガイヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)または破傷風トキソイドなど)に都合よく連結または結合されていてもよい。

40

50

【0131】

本明細書において使用される「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、親和性精製されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、並びにF(ab')₂およびFabタンパク質分解性断片などの抗原結合断片を含む。キメラ抗体、Fv断片、一本鎖抗体などの遺伝的に操作された無処理の抗体または断片、並びに合成抗原結合ペプチドおよびポリペプチドも含まれる。非ヒト抗体は、ヒトのフレームワークおよび不変領域に非ヒトCDRを移植することによって、または完全な非ヒト可変ドメインを組み込むことによって(選択的に、暴露された残基の置換によってヒト様の表面でこれらのドメインを「おおう(cloaking)」ことによって(その結果物は「張り合わされた」抗体である))ヒト化してもよい。多くの場合、ヒト化された抗体は、適切な結合特性を増強するために、ヒト可変領域フレームワークドメイン内に非ヒト残基を保持していてもよい。ヒト化抗体を通して、生物学的半減期が高められ、ヒトへの投与に基づく有害な免疫反応の可能性が低められる。さらに、ヒト抗体は、WIPO刊行物国際公開広報第98/24893号に開示されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むように構築されたトランスジェニック非ヒト動物において産生される。好ましくは、これらの動物における内因性免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによって不活性化されるかまたは排除される。

10

【0132】

抗体は、1)これらが閾値レベルの結合活性を示す場合、および2)これらが関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しない場合、特異的に結合すると考えられる。閾値レベルの結合は、本明細書における抗IL-TIF抗体が、対照(非IL-TIF)ポリペプチドに対する結合親和性よりも少なくとも10倍高い親和性で、IL-TIFポリペプチド、ペプチド、またはエピトープに結合するかどうかを決定する。好ましくは、抗体は、 10^6M^{-1} またはそれ以上、好ましくは 10^7M^{-1} またはそれ以上、より好ましくは 10^8M^{-1} またはそれ以上、および最も好ましくは 10^9M^{-1} またはそれ以上の結合親和性(Ka)を示す。抗体の結合親和性は、たとえばスキャッチャード(Scatchard)分析(Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949)を用いて、当業者によって容易に決定されることができる。

20

【0133】

抗IL-TIF抗体が関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しないかどうかは、たとえば、標準的なウエスタンブロット分析を用いて、IL-TIFポリペプチドであるが、しかし関連するポリペプチドが知られていないもの検出する抗体によって示される(Ausubelら、ibid.)。既知の関連するポリペプチドの例は、既知の相同分子種、およびパラログ、並びにタンパク質ファミリーの類似する既知メンバーなどの従来技術に開示されているものである。また、スクリーニングは、非ヒトIL-TIFおよびIL-TIF変異体ポチペプチドを使用することができる。さらに、抗体は、IL-TIFポリペプチドに対して特異的に結合する集団を単離するために、既知の関連するポリペプチドに「対してスクリーンする」ことができる。たとえば、IL-TIFに対して生じさせた抗体は、不溶性マトリックスに付着された関連するポリペプチドに吸着され；IL-TIFに対して特異的な抗体は、適切な緩衝液条件下でマトリックスを通して流れるであろう。スクリーニングにより、既知の密接に関連するポリペプチドに対して交差反応しないポリクローナルおよびモノクローナル抗体の単離が可能になる(Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooliganら、(eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995)。特異的抗体のスクリーニングおよび単離は、当技術分野において周知である。Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoffら、Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjaminら、Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984を参照されたい。特異的に結合する抗IL-TIF抗体は、当技術分野の多くの方法により検出することができ、下記に開示してある。

30

40

【0134】

当業者に既知の種々のアッセイを、IL-TIFタンパク質またはポリペプチドに結合する抗

50

体を検出するために利用することができる。典型的なアッセイは、Antibodies : A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 に詳細に記載されている。このようなアッセイ法の代表的な例は、次のものを含む：同時免疫電気泳動、放射性免疫アッセイ法、放射性免疫沈殿、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ドットプロット法、またはウエスタンプロットアッセイ法、阻害または競争アッセイ法、およびサンドイッチアッセイ法。さらに、野生型、対、変異体のIL-TIFタンパク質またはポリペプチドに結合する抗体をスクリーンすることもできる。

【0135】

本明細書に作製するまたは有用な抗体を選択するための他の技術は、インビトロで、IL-TIFタンパク質またはペプチドにリンパ球を暴露し、およびファージまたは同様のベクター(たとえば、固定もしくはラベルされたIL-TIFタンパク質またはペプチドの使用による)の抗体表示ライブラリーを選択することを含む。IL-TIFポリペプチド結合ドメインを有する可能性のあるポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ(ファージディスプレイ)または大腸菌などの細菌上に表示されるランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、ランダム突然変異誘発およびランダムポリヌクレオチド合成などを介した多くの手段で得ることができる。これらのランダム・ペプチド・ディスプレイ・ライブラリーは、リガンドもしくは受容体、生物学的もしくは合成巨大分子、または有機もしくは無機物質などのタンパク質もしくはポリペプチドであり得る既知の標的物と相互作用するペプチドについてスクリーニングするために使用することができる。このようなランダム・ペプチド・ディスプレイ・ライブラリーを作製し、スクリーニングするための技術は、当技術分野において既知であり(Ladnerら、米国特許第5,223,409号；Ladnerら、米国特許第4,946,778号；Ladnerら、米国特許第5,403,484号およびLadnerら、米国特許第5,571,698号)、並びにランダム・ペプチド・ディスプレイ・ライブラリーおよびこのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、たとえばClontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA)およびPharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ)から商業的に入手可能である。ランダム・ペプチド・ディスプレイ・ライブラリーは、IL-TIFに結合するタンパク質を同定するために、本明細書に開示されるIL-TIF配列を用いてスクリーニングすることができる。IL-TIFポリペプチドと相互作用するこれらの「結合ポリペプチド」は、細胞を標識するために；親和性精製により相同体ポリペプチドを単離するために使用することができる；これらは、薬物、毒素、放射性核種などに直接的にまたは間接的に結合することができる。また、これらの結合ポリペプチドは、発現ライブラリーをスクリーニングして、活性を中和するため、たとえばリガンドと受容体の間の相互作用または受容体に対するウイルス結合を遮断するためなどの分析方法にも使用することができる。また、結合ポリペプチドは、IL-TIFポリペプチドの循環レベルを決定するための；根本的な病理学的または疾病のマーカーとして可溶性IL-TIFポリペプチドを検出または定量するための、診断アッセイ法にも使用することができる。また、これらの結合ポリペプチドは、IL-TIFの結合およびシグナル伝達をインビトロおよびインビボで遮断するために、IL-TIF「アンタゴニスト」として使用することができる。これらの抗IL-TIF結合ポリペプチドは、IL-TIF活性またはタンパク質結合を阻害するために有用である。

【0136】

IL-TIFに対する抗体は、IL-TIFを発現する細胞をタギングするために；アフィニティー精製によってIL-TIFを単離するために；IL-TIFポリペプチドの循環レベルを決定するための診断アッセイ法のために；根本的な病理学または疾病のマーカーとして可溶性IL-TIFを検出または定量するために；FACSを使用する分析方法において；発現ライブラリーをスクリーニングするために；抗イディオタイプ抗体を生成するために；並びにインビトロおよびインビボでIL-TIF活性を遮断するための中和抗体またはアンタゴニストとして使用されてもよい。適切な直接的タグまたはラベルは、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子などを含み；間接的なタグまたはラベル

10

20

30

40

50

は、中間体としてのビオチン-アビジンまたは他の補体/抗-補体対の使用を特徴とする。また、抗体は、本発明書において、薬物、トキシン、放射性核種などに直接的にまたは間接的に結合することができ、これらの複合体はインビボ診断または治療用途のために使用することができる。さらに、IL-TIFまたはその断片に対する抗体は、アッセイ法、たとえば当技術分野において既知のウエスタンブロット法または他のアッセイ法において、変性されたIL-TIFまたはその断片を検出するためにインビトロで使用されてもよい。

【0137】

いくつかの抗ヒトIL-TIF中和モノクローナル抗体が作製されており、該中和抗体を発現するハイブリドーマがATCCに寄託されている。ヒトIL-TIFに対する中和モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマは、ブダペスト条約の下でオリジナルの寄託として、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC; Manassas VA)特許保管所に寄託し、以下のATCCアクセッション番号を与えられた: 266.16.1.4.4.1(ATCC [#####]); 266.5.1.2.2.3(ATCC [#####]); 267.17.1.1.4.1(ATCC [#####]); 267.4.1.1.4.1(ATCC [#####]); 266.12.6.1.3.2.1(ATCC [#####]); 266.19.1.10.5.2(ATCC [#####])。このような抗体は、本明細書に記載されているように、ヒト化および修飾することができ、乾癬、乾癬性関節炎、IBD、大腸炎、内毒血症を治療するために、並びに本明細書に記載されているその他の治療的な適用に、治療的に使用することができる。

10

【0138】

また、抗体またはポリペプチドは、本明細書において、薬剤、毒素、放射性核種などに直接的にまたは間接的に結合することができ、これらの複合体はインビボ診断または治療のために使用することができる。たとえば、本発明のポリペプチドおよび抗体は、IL-TIFを認識する抗体または結合ポリペプチドは、対応する抗-相補的分子(たとえば、それぞれ受容体または抗原)を発現する組織もしくは器官を同定し、または処理するために使用されることができる。より具体的には、IR-TIFポリペプチドもしくは抗IL-TIF抗体、またはその生物活性断片もしくは一部は、検出可能なもしくは細胞毒性の分子に結合させて、抗-相補的分子を発現する細胞、組織、または器官を有する哺乳類に送達することができる。

20

【0139】

適切な検出可能分子は、ポリペプチドまたは抗体に直接的にまたは間接的に結合されていてもよく、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子などを含む。適切な細胞毒性分子は、ポリペプチドまたは抗体に直接的にまたは間接的に結合されていてもよく、細菌もしくは植物毒性(たとえば、ジフテリア毒素、ブソイドモナス内毒素、リシン、アプリンなど)、およびヨウ素-131、レニウム-188、またはイットリウム-90などの治療用放射性核種(ポリペプチドもしくは抗体に直接的に結合されるか、またはキレ-ト成分により間接的に結合される)を含む。また、ポリペプチドまたは抗体は、アドリアマイシンなどの細胞毒性薬物に結合されてもよい。検出可能または細胞毒性の分子の間接的な結合に関しては、検出可能または細胞毒性の分子を相補的/抗相補的対のメンバーにより結合させることができ、ここで他のメンバーが結合ポリペプチドまたは抗体部分に結合される。これらの目的のためには、ビオチン/ストレプトアビジンが典型的な相補的/抗相補的対である。

30

40

【0140】

もう1つの態様において、ポリペプチド-毒素融合タンパク質または抗体-毒素融合タンパク質は、ターゲットされる細胞もしくは組織の阻害または除去のために(たとえば、癌細胞または組織を処理するために)使用することができる。代わりに、ポリペプチドが複数の機能ドメイン(すなわち、活性化ドメインまたは受容体結合ドメイン、およびターゲットされるドメイン)を有する場合、検出可能分子、細胞毒性分子、または相補的分子を関心対象の細胞または組織型に向けるためには、ターゲットされるドメインのみを含む融合タンパク質が適している。たとえば、単一のドメインのみを含む融合タンパク質が相補的分子を含む場合、抗-相補的分子を検出可能または細胞毒性の分子に結合させることができる。従って、このようなドメイン-相補的分子の融合タンパク質は、一般的な抗-相

50

補検出可能/細胞毒性の分子の複合体の細胞/組織特異的な送達のための一般的なターゲティング媒体を表す。このようなサイトカイン毒素融合タンパク質は、標的組織をインビボで死滅させるために使用することができる。

【0141】

もう1つの態様において、IL-TIF-サイトカイン融合タンパク質または抗体-サイトカイン融合タンパク質は、標的組織(たとえば、白血病、リンパ腫、肺癌、大腸癌、黒色腫、膵癌、卵巣癌、血液、および骨髄癌、またはIL-TIF受容体が発現されるその他の癌)をインビボでの死滅させるために使用することができる(一般的には、Hornickら、Blood 89: 4437-4447, 1997を参照されたい)。記載された融合タンパク質は、所望の作用部位におけるサイトカインのターゲティングを可能にし、これによりサイトカインの高められた局部濃度を提供する。適切なIL-TIFポリペプチドまたは抗IL-TIF抗体は、望ましくない細胞または組織(すなわち、腫瘍または白血病)をターゲットし、融合されたサイトカインは、エフェクター細胞による改良された標的細胞溶解を媒介する。たとえば、この目的のための適切なサイトカインは、インターロイキン2および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含む。

10

【0142】

さらにもう1つの態様において、IL-TIFポリペプチドまたは抗IL-TIF抗体が血管細胞または組織をターゲットする場合、このようなポリペプチドまたは抗体は、放射性核種との複合体、特に再狭窄を減少するために線放射の放射性核種との複合体であってもよい。このような治療手段により、放射性治療を投与する臨床家に対する脅威がより少なくなる。たとえば、イリジウム-192を含浸させたりボンを、必要とされる放射線量が送達されるまで患者のステントした血管に配置すると、偽薬リボンを受けた対照群よりも、減少した組織増殖および大きな管腔直径を示した。さらに、血管再生およびステント血栓症は、投与群において有意に低かった。同様の結果は、本明細書に記載されているように、放射性核種を含む生理活性複合体のターゲティングでも予測される。

20

【0143】

本明細書に記載されている生理活性ポリペプチドまたは抗体の複合体は、静脈内に、動脈内に、もしくは管内に送達することができ、または企図された作用点に局所的に導入されてもよい。

【0144】

さらに、炎症は、侵入する薬剤をかわすための生物体による保護反応である。炎症は、多くの細胞性および体液性のメディエータが関与するカスケードイベントである。一方、炎症反応の抑制は、宿主を免疫不全のままにすることができるが;しかし、チェックをはずしたままにした場合、炎症は、慢性の炎症性疾患、(たとえば、乾癬、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患、大腸炎など)、感染性ショック、および多臓器不全を含む深刻な合併症に至り得る。重要なことに、これらの多様な疾病状態は、共通の炎症性メディエータを共有する。炎症によって特徴づけられる総体的な疾患は、ヒト罹患率および死亡率に対して大きな影響を有する。したがって、本明細書に記載されている抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドなどの抗炎症性の抗体および結合ポリペプチドは、喘息およびアレルギーから自己免疫および感染性ショックまで、非常に多くのヒトおよび動物の疾患に重要な治療的能力を有し得ることは、明らかである。したがって、本明細書に記載されている抗炎症抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドの使用は、本明細書に記載されているIL-TIFアンタゴニストとして、特に関節炎、内毒血症、炎症性腸疾患、乾癬、関連した疾患などの疾患において治療的に使用することができる。

30

40

【0145】

1. 関節炎

骨関節炎、リウマチ様関節炎、傷害の結果としての関節炎関節などを含む関節炎は、本発明の抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドなどの抗炎症性の抗体および結合ポリペプチドの治療的使用からの利益を得るであろう一般的な炎症性の症状である。たとえば、リウマチ様関節炎(RA)は、全身に影響を及ぼす全身性疾患であり、関節炎で最も一般的な形態

50

のうちの1つである。これは、膜裏打ち関節の炎症によって特徴づけられ、これが、疼痛、硬直、暖かさ、発赤、および腫脹を引き起こす。炎症細胞は、骨および軟骨を消化する可能性のある酵素を放出する。リウマチ様関節炎の結果として、炎症を起こした関節の裏打ち、滑膜は、骨および軟骨に侵入しかつ損傷を与えて、その他の生理的な効果の中で、関節の劣化および激痛を引き起こし得る。関与した関節は、その形状およびアラインメントを失って、疼痛および動作の喪失を生じ得る。

【0146】

リウマチ様関節炎(RA)は、特に炎症およびその後の組織損傷によって特徴づけられる免疫を媒介した疾患であり、重篤な障害および死亡率の増大を引き起こす。種々のサイトカインは、リウマチ様関節において局所的に産生される。多くの研究で、IL-1およびTNF-(2つのプロトタイプの炎症誘発性のサイトカイン)が滑膜の炎症に、および進行性の関節破壊に関与する機構に重要な役割を果たすことが証明された。実際に、RAの患者にTNF-およびIL-1阻害剤を投与すると、臨床的および生物学的な炎症の徴候の劇的な改善、並びに骨浸食および軟骨破壊の放射線学的徴候の減少に至った。しかし、これらの促進の結果にもかかわらず、患者のかなりの割合が、これらの薬剤に应答しないことは、その他のメディエータも関節炎の病態生理に関与することを示唆している(Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2): 135-149, 2002)。これらのメディエータのうちの1つは、IL-9またはIL-TIFであることができ、従って抗IL-TIF抗体または結合パートナーなどのIL-TIFに結合し、または阻害する分子は、リウマチ様関節炎およびその他の関節炎疾患の炎症を減少するための有用な治療として役立つことができる。

10

20

【0147】

当技術分野において既知のリウマチ様関節炎のためのいくつかの動物モデルがある。たとえば、コラーゲン誘導される関節炎(CIA)モデルでは、マウスがヒト・リウマチ様関節炎に非常に似ている慢性の炎症性関節炎を発病する。CIAは、RAと同様の免疫学的および病理学的特徴を共有するので、このことにより、これが潜在的なヒト抗炎症化合物をスクリーニングするための理想的なモデルとなる。CIAモデルは、生じるためには、免疫応答および炎症反応の両方に依存するマウスの周知のモデルである。免疫応答は、コラーゲンに应答したB細胞およびCD4+ T細胞の相互作用を含み、これは抗原として与えられて、抗コラーゲン抗体の産生を引き起こす。炎症段階は、これらの抗体のいくつかはマウスの天然のコラーゲンに交差反応し、補体カスケードを活性化する結果として、炎症のメディエータによる組織反応の結果である。CIAモデルを使用することの利点は、病原の基本的機構が既知であるということである。タイプIIコラーゲンの関連したT細胞およびB細胞エピトープが同定され、免疫を媒介した関節炎に関連した種々の免疫学的な(たとえば、遅延型過敏症および抗コラーゲン抗体)、炎症性の(たとえば、サイトカイン、ケモカイン、およびマトリックスを分解する酵素)のパラメーターが決定され、したがって、CIAモデルにおいて試験化合物の有効性を評価するために使用することができる(Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3: 407-20, 1999; Williamsら、*Immunol.* 89: 9784-788, 1992; Myersら、*Life Sci.* 61: 1861-78, 1997; およびWangら、*Immunol.* 92: 8955-959, 1995)。

30

【0148】

これらのCIAモデル・マウスに対するzcytor16-Fc4またはその他のzcytor16の可溶性および融合タンパク質などのポリペプチドを含む可溶性zcytor16の投与は、疾患の症状を改善し、経過を変えるためのzcytor16の使用を評価するために使用した。zcytor16のリガンドのIL-TIFは、リウマチ様関節炎の病原に関係するSAAの産生を誘導するので、zcytor16は、インビトロでおよびインビボで、IL-TIFおよびSAA活性を阻害することが可能なことが証明され、zcytor16-Fc4またはその他のzcytor16の可溶性および融合タンパク質などのポリペプチドを含むzcytor16の全身的または局所的な投与により、RAの炎症反応を抑制することができる可能性がある。10 µgのzcytor16-Fcの注射(週に3回で4週間)は、有意に疾患スコア(パウ(paw)スコア、炎症または疾患の起こりやすさ)を減らした。その他の潜在的な薬物療法は、Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、または本発明の抗IL-TIF抗体もしくは結合パートナーなどを含む。

40

50

【0149】

1つのグループが、抗マウスIL-TIF抗体が対照マウスと比較してマウスCIAモデルの症状を減少する可能性があり、したがってIL-TIFに対する抗体がヒト疾患を治療する際に有益であろうことを概念的に示した。単一のマウスIL-TIF特異的ラット・モノクローナル抗体(P3/1)の投与によって予防的に導入されたとき、またはCIA誘導された関節炎がモデルに誘導された後に、動物の関節炎の症状が減少した(WIPO刊行物 02/068476 ; 2002年9月9日に発行された)。したがって、本発明の中和抗ヒトIL-TIF抗体を含む本発明の抗IL-TIF抗体は、乾癬、乾癬性関節炎、関節炎、内毒血症、炎症性腸疾患(IBD)、大腸炎、および本明細書に開示したその他の炎症性の症状などの特定のヒト疾患の治療においてIL-TIFを中和するために使用することができる。

10

【0150】

2. 内毒血症

内毒血症は、細菌およびその他の感染症因子、敗血症、毒素ショック症候群などの感染因子、または日和見感染罹患した免疫無防備状態の患者においてなどから共通に生じる重篤な症状である。本発明の抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドなどの治療的に有用な抗炎症性の抗体および結合ポリペプチドは、ヒトおよび動物の内毒血症を防止し、治療する際の助けとなりうる。Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、または抗IL-TIF抗体もしくは結合パートナーは、内毒血症の炎症および病理学的効果を減少するために有用な治療として役立ち得る。

20

【0151】

リポ多糖(LPS)誘導された内毒血症は、感染症の際に病理学的効果を生じる炎症誘発性のメディエータの多くに関与し、齧歯類でのLPS誘導された内毒血症は、潜在的な炎症誘発性または免疫調節性の薬剤の薬理効果を研究するために広く使用され、かつ許容されるモデルである。LPS(グラム陰性菌において産生される)は、感染性ショックの病原の主要原因因子である(Glausnerら、Lancet 338 : 732, 1991)。ショック様の状態は、LPSの動物への単回投与によって実験的に実際に誘導することができる。LPSに応答する細胞によって産生される分子は、直接的または間接的に病原体をターゲットすることができる。これらの生物反応は、宿主に病原体が侵入することから保護するが、これらによって危害も生じるであろう。したがって、先天性免疫の強力な刺激は、重篤なグラム陰性の細菌感染症の結果として生じ、サイトカインおよびその他の分子の過剰な産生、発熱、低血圧、播種性血管内血液凝固、および多臓器不全によって特徴づけられる致命的な症候群の敗血症のショック症候群の発生を引き起こす(Dumitruら、Cell 103 : 1071-1083, 2000)。

30

【0152】

これらのLPSの毒作用は、大部分が多く炎症性メディエータの放出を引き起こすマクロファージ活性化に関する。中和抗TNF抗体の投与によるLPS毒性の予防によって示されるように、これらのメディエータの中で、TNFは重要な役割を果たすと思われる(Beutlerら、Science 229 : 869, 1985)。大腸菌LPSのC57B1/6マウスへの耳注射により、循環するIL-6、TNF- α 、IL-1、および急性期タンパク質(たとえば、SAA)を注射後の約2時間に有意な増大を生じることは、よく確立されている。これらのメディエータに対する免疫は、死亡率の減少を生じさせることができるため、LPSの毒性は、これらのサイトカインによって受動的に媒介されるように見え(Beutlerら、Science 229 : 869, 1985)。感染性ショックの予防および/または治療のための潜在的な免疫処置戦略は、抗TNF mAb、IL-1受容体アンタゴニスト、LIF、IL-10、およびG-CSFを含む。

40

【0153】

これらのLPS誘導されたモデルに対するzcytor16-Fc4またはその他のzcytor16の可溶性および融合タンパク質などのポリペプチドを含む可溶性zcytor16の投与は、LPS誘導された疾患の症状を改善し、経過を変えるためのzcytor16の使用を評価するために使用された。モデルでは、LPS注射によるIL-TIFの誘導およびzcytor16ポリペプチドによる疾患治療の可能性を示した。LPSは、炎症誘発性のIL-TIF、SAA、またはおそらく内毒血症の病理学に関与するその他の炎症誘発性因子の産生を誘導するので、IL-TIF活性、SAA、またはそ

50

の他の炎症誘発性の因子のそのアンタゴニストzcytor16ポリペプチドによる中和は、内毒素のショックなどにおいて見られる内毒血症の症状を減少するために使用することができる。その他の潜在的な薬物療法は、Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、または本発明の抗IL-TIF抗体もしくは結合パートナーなどを含む。

【0154】

3. 炎症性腸疾患、IBD

米国において、約500,000人の人々は、大腸および直腸(潰瘍性大腸炎)のいずれか、または小腸および大腸の両方(クローン病)に影響を及ぼし得る炎症性腸疾患(IBD)に罹患している。これらの疾患の病因は不明であるが、これらには患部組織の慢性的な炎症を含む。Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、または抗IL-TIF抗体もしくは結合パートナーは、IBDおよび関連した疾患の炎症および病理学的効果を減少するための有用な治療として役立つことができる。

10

【0155】

潰瘍性大腸炎(UC)は、共通に大腸と呼ばれている大腸の炎症性疾患であり、大腸の粘膜または最奥の裏打ちの炎症および潰瘍形成によって特徴づけられる。この炎症は、大腸に頻繁に空にして下痢を生じさせる。症状は、便通のゆるみ、並びに関連する異常な痙攣、発熱、および重量の減少を含む。UCの正確な原因は知られていないが、最近の調査では、体の天然の防御が、体が異なると考えて(「自己免疫反応」)体の中のタンパク質に対して作動することが示差される。おそらく、これらが腸内の細菌タンパク質に似ているので、これらのタンパク質は、炎症プロセスを生じまたは刺激して、大腸の裏打ちを破壊し始める。大腸の裏打ちが破壊されるので、潰瘍は、粘質、膿汁、および血液の放出を形成する。疾患は、通常直腸領域で開始され、結局全ての大腸に拡大するであろう。炎症のたび重なる発症により、瘢痕組織を有する小腸および直腸の壁の肥厚に至る。大腸組織の死滅または敗血症は、重篤な疾患を生じるであろう。潰瘍性大腸炎の症状は、重篤さを変化させ、これらの開始期は、段階的または突然であるかもしれない。発作は、呼吸感染またはストレスを含む多くの因子によって生じるであろう。

20

【0156】

現在利用できるUCのための治療はないが、治療は、大腸裏打ちの異常な炎症プロセスを抑制することに焦点が当てられている。副腎皮質ステロイド免疫抑制薬(たとえば、アザチオプリン、メルカプトプリン、およびメトトレキセート)およびアミノサリチル酸(aminosalicylates)を含む治療薬を、疾患を治療するために利用できる。しかし、副腎皮質ステロイドおよびアザチオプリンなどの免疫抑制薬の長期服用は、骨細り、白内障、感染、並びに肝臓および骨髄効果を含む深刻な副作用を生じ得る。現在の治療が良好でない患者において、手術も選択可能である。手術は、全ての大腸および直腸の除去を含む。

30

【0157】

部分的に慢性潰瘍性大腸炎を模倣することができるいくつかの動物モデルがある。最も広く使われているモデルは、2,4,6-トリニトロペンシルホン酸/エタノール(TNBS)で誘導される大腸炎モデルであり、これは、大腸に慢性炎症および潰瘍形成を誘導する。TNBSが内直腸滴下を介して感受性のマウスの大腸に導入されると、結腸の粘膜にT細胞を媒介した免疫応答を誘導し、この場合、全ての大腸の壁にT細胞およびマクロファージの高密度の浸潤によって特徴づけられる大量の粘膜炎症を引き起こす。さらに、この組織病理学的な写真は、進行性の重量減少(消耗性)、観血的な下痢、直腸脱出症、および大腸壁肥厚の病像を伴う(Neurathら、Intern. Rev. Immunol. 19: 51-62, 2000)。

40

【0158】

もう一つの大腸炎モデルは、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を使用し、観血的な下痢、重量減少、大腸の短化、および好中性の浸潤を伴って粘膜の潰瘍形成によって明らかにされる急性の大腸炎を誘導する。DSS誘導される大腸炎は、リンパ様過形成、局所の腺窩損傷、および上皮性潰瘍形成を伴う、粘膜固有層への炎症細胞の浸潤によって組織学的に特徴づけられる。これらの変化は、上皮でのDSSの毒作用のために、粘膜固有層細胞の食作用並びにTNF- およびIFN- の産生によって発病すると考えられる。これらを共通に

50

使用するにもかかわらず、ヒト疾患に対する関連性についてのDSSの機構に関するいくつかの問題は、未解決のままである。DSSは、SCIDマウスなどのT細胞が不足する動物において観察されるので、T細胞非依存的なモデルと考えられる。

【0159】

TNBSまたはDSSモデルに対するzcytor16-Fc4またはその他のzcytor16の可溶性および融合タンパク質などのポリペプチドを含む可溶性zcytor16の投与は、胃腸疾患の症状を改善し、経過を変えるためのzcytor16の使用を評価するために使用されることができる。我々は、RT-PCRによって、DSS-マウスの大腸組織のIL-TIFの発現増加、および腸管細胞株のIL-1とのIL-TIFの相乗的な活性を観察した。これは、IL-TIFが大腸炎の炎症反応に役割を果たしているであろうことを示し、zcytor16ポリペプチドを投与することによるIL-TIF活性の中和は、IBDの潜在的な治療手段である。その他の潜在的な薬物療法は、Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、または本発明の抗IL-TIF抗体もしくは結合パートナーなどを含む。

10

【0160】

4. 乾癬

乾癬は、7,000,000人以上のアメリカ人に影響を及ぼす慢性的な皮膚症状である。新たな皮膚細胞が異常に成長するときに乾癬は起こり、古い皮膚が十分に迅速に落ちなかった場合に皮膚の炎症を起こし、ふくれ、鱗状のパッチを生じる。プラーク乾癬(最も一般的な形態)は、銀の白いスケールで頂上をおおわれた皮膚(「傷害」)の炎症を起こしたパッチによって特徴づけられる。乾癬は、少数のプラークに限定されてもよく、または皮膚、最も一般的には頭皮、小膝、肘、および躯幹の上にもみられる中程度～広範な領域を含んでもよい。乾癬は、非常に見えるものであるにもかかわらず、接触伝染病ではない。疾患の病因は、患部組織の慢性的な炎症を含む。Zcytor16ポリペプチド、可溶性のzcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、または抗IL-TIF抗体もしくは結合パートナーは、乾癬、その他の炎症性皮膚病、皮膚および粘膜のアレルギー、並びに関連した疾患の炎症および病理学的効果を減少するために有用な治療として役立つことができる。

20

【0161】

乾癬は、T細胞を媒介した炎症性の皮膚疾患であり、かなりの不快感を引き起こし得る。治療法がなく、あらゆる年齢の人々に影響を及ぼす疾患である。乾癬は、欧州および北アメリカの人口の約2パーセントに影響を及ぼす。軽度の乾癬を伴う個々は、局所的な薬剤でこれらの疾患をおさえることができることが多いが、世界中の1,000,000人以上の患者は、紫外線または全身的な免疫抑制薬の治療が必要である。残念なことに、紫外線および多くの治療による毒性の不便並びにリスクは、これらの長期服用を制限する。さらに、患者は、免疫抑制療法を止めた直後に、通常乾癬が再発し、一部のケースでは、リバウンドがある。

30

【0162】

IL-20は、IL-20トランスジェニックマウスの異常な表皮分化を含む、皮膚異常を伴って新生児の死亡を引き起こす新規のIL-10相同体である(Blumberg Hら、Cell 104: 9-19, 2001)。IL-20受容体は、乾癬の皮膚において劇的にアップレギュレートされる。IL-TIFは、受容体サブユニット(zcytor11)をIL-20受容体と共有し、IL-TIF遺伝子組換えマウスは、同様の表現型を示すので、IL-TIFも、乾癬などの炎症性皮膚病に關与するの可能性がある。皮下または局所的のいずれかによるzcytor16ポリペプチドの投与により、強力に炎症および症状を減少するであろう。その他の強力な薬物療法学は、Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、または抗IL-TIF抗体もしくは本発明の結合パートナーなどを含む。

40

【0163】

IL-TIFは、IL-9の存在下において誘導されることが示されており、Th1-タイプの免疫応答、および炎症の促進に關与していると思われる。IL-9は、種々の方法で増殖、活性化、分化、および/または免疫機能の誘導を刺激し、喘息、肺肥満細胞症、およびその他の疾患、並びにSTAT経路の活性化に關係する。IL-TIFまたはIL-9機能のアンタゴニストは、こ

50

のようなヒト疾患に対して有益に使用することができる。本発明は、このような新規のIL-TIFのアンタゴニストを提供する。

【0164】

IL-TIFは、血清アミロイドA(SAA)、1-抗キモトリプシン、およびハプトグロビンなどの急性期反応物質の産生のアップレギュレートに参与することが示されており、IL-TIF発現がインビボでのリポ多糖(LPS)の注射によって増大されることは、IL-TIFが炎症反応に参与することを示唆している(Dumoutier, Lら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000)。SAAなどの、急性期タンパク質の産生は、炎症が有益である短期間の生存機構であると考えられるが；しかし、より長期間の急性期タンパク質の維持は、慢性的な炎症に参与し、人の健康に有害であり得る。総説については、Uhlar, CMおよびWhitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265: 501-523, 1999、並びにBaumann H. and Gauldie, J. Immunology Today 15: 74-80, 1994を参照されたい。さらに、急性期タンパク質SAAは、いくつかの慢性的な炎症性疾患の病原に関係し、アテローム性動脈硬化症およびリウマチ様関節炎に関係し、アミロイド症において沈着するアミロイドAタンパク質に対する前駆体である(Uhlar, CM and Whitehead, 前記)。したがって、IL-TIFは、炎症誘発性の分子として作用し、SAAの産生を誘導するので、アンタゴニストは、IL-TIFによって誘導される急性期反応タンパク質に関係する炎症性疾患およびその他の疾患を治療するために有用である。このようなアンタゴニストは、本発明によって提供される。たとえば、IL-TIFで誘導されるか、またはIL-9で誘導される炎症の減少の方法は、炎症を減少するために十分な抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドの組成物の量を、炎症を有する哺乳類に投与することを含む。さらに、炎症を有する哺乳類の炎症反応を抑制する方法は：(1)血清アミロイドAタンパク質のレベルを決定すること；(2)薬学的に許容される媒体中に本明細書に記載されている抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドを含む組成物を投与すること；(3)血清アミロイドAタンパク質の投与後レベルを決定すること；(4)段階(1)の血清アミロイドAタンパク質のレベルを段階(3)の血清アミロイドAタンパク質のレベルと比較することを含むことができ、血清アミロイドAタンパク質レベルの増加がないことまたは減少することは、炎症反応を抑制することを表す。

10

20

【0165】

ヒト乾癬の病変部においてIL-TIFの過剰発現が示され、IL-TIFがヒト乾癬に参与することを示唆している。さらに、本明細書に記載されているように、トランスジェニックマウスでのIL-TIFの過剰発現では、乾癬の表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の関与を示し、および加えて、正常マウスへのIL-TIFの注射では、乾癬の表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の関与を示し、これは可溶性受容体アンタゴニストzcytor16によって消失した。このようなインビボでのデータは、炎症誘発性のIL-TIFが乾癬に参与することをさらに示唆する。したがって、本発明の抗ヒト-IL-TIFモノクローナル抗体などのIL-TIF活性に対するアンタゴニスト、並びに可溶性受容体およびこれらに対する抗体は、炎症性疾患の治療的な治療に、特に乾癬の治療におけるIL-TIFに対するアンタゴニストとして有用である。さらに、本発明の抗ヒト-IL-TIFモノクローナル抗体などのIL-TIF活性に対するアンタゴニスト、並びに可溶性受容体およびこれらに対する抗体は、その他の炎症性疾患の治療的な治療に、たとえばアトピー性皮膚炎、IBD、大腸炎、内毒血症、関節炎、リウマチ様関節炎、および乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、感染性ショック、多臓器不全、喘息または気管支炎などの炎症性肺傷害、細菌性肺炎、乾癬、湿疹、アトピー性皮膚炎および接触皮膚炎、並びに潰瘍性大腸炎およびクローン病など炎症性の腸疾患の治療においてIL-TIFに対するアンタゴニストとして有用である。

30

40

【0166】

さらに、本発明の抗IL-TIF抗体は、本明細書に記載されている多くの炎症性疾患と関係する重量減少に対して、並びに癌(たとえば、化学療法および悪液質)および感染症のために、予防および治療に使用することができる。たとえば、重篤な重量減少は、敗血症、MS、RA、および腫瘍モデルのためのモデルに関係した鍵となるマーカーである。加えて、重量減少は、癌、感染症、および炎症性疾患を含む多くのヒト疾患の鍵となるパラメーター

50

である。重量減少は、本明細書に記載されているIL-TIFアデノウイルスを注射したマウスにおいて示された。可溶性zcytor11受容体およびこれに対する抗体などの抗IL-TIF抗体およびIL-22アンタゴニスト、並びにzcytor16受容体は、本明細書に記載されているIL-TIFアデノウイルスを注射したマウスの重量減少をこれらが予防および治療する能力について試験することができる。予防薬を決定する方法またはこのようなIL-22アンタゴニストのための食事療法は、当技術分野において既知であり、本明細書に記載されている方法を使用して決定することができる。

【0167】

IL-TIFは、急性期反応の誘導を含む炎症反応の誘導に係る(Dumoutier, L.ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000)。したがって、本発明の特定の態様は、乾癬、関節炎、膵炎、I型糖尿病(IDDM)、膵癌、膵炎、グラーブ病、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病、大腸癌および腸癌、憩室症、自己免疫疾患、敗血症、毒素ショック症候群、内毒血症、器官または骨髄の移植；外傷、手術、または感染による炎症；アミロイド症；脾腫大；移植片対宿主病；並びに炎症の阻害、免疫抑制、造血細胞、免疫細胞、炎症性細胞、もしくはリンパ球系の細胞、マクロファージ、T細胞(Th1およびTh2細胞を含む)増殖の減少、病原体もしくは抗原に対する免疫反応の抑制、またはIL-TIFもしくはIL-9サイトカイン産生の阻害が要求されるその他の例などの炎症性および免疫性の疾患または症状のアンタゴニストとしての抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドの使用に向けられる。

【0168】

さらに、本明細書に記載されている抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、以下に有用である：

1)急性の炎症、外傷の結果としての炎症、組織傷害、手術、敗血症または感染、および喘息、炎症性腸疾患(IBD)、慢性大腸炎、脾腫大、リウマチ様関節炎、回帰性の急性の炎症の発症(たとえば結核)などの慢性の炎症性疾患の治療において、並びにアミロイド症、およびアテローム性動脈硬化症、カースルマン病、喘息、および急性期反応の誘導と関係するその他の疾患の治療において、IL-TIFを直接アンタゴナイズするか、またはIL-TIF受容体を経たシグナリングを遮断するために、

2)zcytor16を経た免疫細胞(たとえばリンパ球、単球、白血球)のシグナリングを防止または阻害するために、IDDM、多発性硬化症(MS)、全身性エリテマトーデス(SLE)、重症筋無力症、リウマチ様関節炎、およびIBDなどの自己免疫疾患の治療において、IL-TIFを直接アンタゴナイズするか、またはIL-TIF受容体を経たシグナリングを遮断するために、(Hughes Cら、J. Immunol 153: 3319-3325, 1994)。または、zcytor16を含む受容体に対するモノクローナル抗体(MAb)などの抗体は、また、自己免疫疾患を治療するために不必要な免疫細胞を減少させるためのアンタゴニストとして使用することができる。喘息、アレルギー、およびその他のアトピー性疾患は、たとえば、免疫応答を阻害するための、または問題のある細胞を減少させるための抗IL-TIFモノクローナル抗体に対して、MAbで治療してもよい。本発明の抗体および結合パートナーを使用するIL-TIF受容体を経たシグナリングの遮断または阻害は、また、膵臓、腎臓、下垂体、およびニューロンの細胞の疾患に利益があってもよい。IDDM、NIDDM、膵炎、および膵癌は、利益を得るかもしれない。抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、拮抗性のMAbが癌増殖を阻害し、免疫を媒介した死滅を標的とする癌のMAb治療のための標的として役立つであろう(Holliger P and Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998)。また、Mabs IL-TIFは、糸球体硬化症、膜状の神経障害、アミロイド症(これは、その他の組織の中で腎臓にも影響を及ぼす)、腎臓の動脈硬化、種々の起源の糸球体腎炎、腎臓の繊維増殖性(fibroproliferative)疾患、並びにSLE、IDDM、II型糖尿病(NIDDM)、腎臓腫瘍、およびその他の疾患と関係する腎臓機能障害などの腎症を治療するために有用であろう。

【0169】

本明細書に記載されている可溶性zcytor16単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体ポリペプチドは、上記の通りの、自己免疫疾患、アトピー性疾患、NIDDM、膵炎、および腎臓機能障害、並びに炎症性疾患の治療におけるIL-TIF活性の中和/遮断に使用する

ることができる。

【0170】

本発明の抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、IL-TIFサイトカインのアンタゴニストとして有用である。このような拮抗的効果は、IL-TIFの直接の中和または結合によって達成することができる。拮抗的使用に加えて、本発明の抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、リガンドを体内の異なる組織、器官、および細胞に輸送するために、IL-TIFに結合し、IL-TIFサイトカインのための担体タンパク質として作用させることができる。したがって、本発明の抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、組織、特異的な免疫細胞、または腫瘍などの特異的な部位に可溶性受容体リガンド複合体を向ける分子、ポリペプチド、もしくは化学的部分に、融合または結合することができる。たとえば、急性の感染または一部の癌では、IL-TIFの作用による炎症および局所的な急性期応答タンパク質の誘導により、利益が生じるであろう。したがって、本発明の抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、特にIL-TIFの作用を向けるために使用することができる。Cosman, D. *Cytokine* 5 : 95-106, 1993 ; および Fernandez-Botran, R. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 9 : 497-513, 2000を参照されたい。

10

【0171】

さらに、本発明の抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、IL-TIFを安定化するために、分解もしくはクリアランスからリガンドを安定化することによって、または体内で作用部位にリガンドをターゲットすることによって、リガンドの生物学的利用能、治療の長期化、および/または有効性を増大するために使用することができる。たとえば、天然に存在するIL-6 / 可溶性IL-6R複合体は、IL-6を安定化し、gp130受容体を介してシグナルを送ることができる。前記Cosman, D. および前記Fernandez-Botran, R.を参照されたい。さらに、抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、リガンド / 抗体の複合体を含むようにIL-TIFなどの同族のリガンドと結合させることができる。このような複合体は、たとえば、zcytor11またはCRF2-4などの随伴(companion)受容体サブユニットを提示する細胞からの反応を刺激するために使用されてもよい。zcytor16 / リガンド複合体の細胞特異性は、単独で投与されたリガンドについて見られるものとは異なってもよい。さらに、複合体は、半減期、用量 / 反応、および器官または組織特異性などに影響を及ぼす異なった薬物動態学的性質を有してもよい。したがって、Zcytor16/L-TIF複合体は、免疫応答を増強するか、もしくはメサングウム細胞を刺激するために、または肝細胞を刺激するためにアゴニスト活性を有していてもよい。または、シグナリング・サブユニットを発現する組織のみで、IL6 / IL6R複合体に対する応答に類似して、複合体とのヘテロ二量体化が影響を受けてもよい(Hirota H.ら、*Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 92 : 4862-4866, 1995 ; Hirano, T. in Thomason, A. (Ed.) " *The Cytokine Handbook* " , 3rd Ed., p.208-209)。IL12およびCNTFに対する可溶性受容体 / サイトカイン複合体は、同様の活性を示す。

20

30

【0172】

IL-TIFは、免疫系において役割を果たす細胞を含む、重要な免疫学的機能を有することが知られている組織から単離した。IL-TIFリガンドは、CD3+選択された、活性化した末梢血細胞に発現されている。これは、IL-TIF発現が、T細胞の活性化後に調節され、および増大するであろうことを示唆する。さらに、IL-TIFポリペプチドは、TもしくはB細胞、TもしくはB前駆細胞、NK細胞、またはNK前駆細胞の増殖 / 膨張および/または分化の状態に対して影響を及ぼすであろう。さらに、IL-TIFは、インビボでT細胞およびB細胞の増殖および/または分化を生じさせることができる。造血性前駆体の増殖を刺激し、かつ成熟細胞を活性化する因子は、一般に既知である。NK細胞は、IL-2単独に反応するが、増殖および活性化には、一般にさらなる成長因子が必要である。たとえば、IL-7 およびSteel因子(c-kitリガンド)は、NK前駆体の形成のために必要とされることが示されている。IL-15 +IL-2を、IL-7およびSteel因子と組み合わせると、さらに有効であった(Mrozekら、*Blood* 87 : 2632-2640, 1996)。しかし、NK細胞および/またはNK原体の特異的なサブセットの増殖のためには、未確認のサイトカインが必要であるかもしれない。(Robertsonら、*Blood* 76 : 2451-2438, 1990)。IL-TIF およびIL-15を含む組成物は、以前に記載された因子

40

50

および因子の組み合わせよりも強力な組成物として、NK原体およびNK細胞を刺激するであろう。同様に、IL-TIFを含む因子のこのような組み合わせは、また、T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞などのその他の造血性細胞およびリンパ球タイプに影響を及ぼすであろう。本発明の抗体または結合ポリペプチドは、このような活性の拮抗作用または阻害を示すことによって使用またはアッセイすることができる。

【0173】

大部分の4ヘリックス束状構造サイトカイン並びに活性化されたリンパ球によって産生されるその他のタンパク質は、細胞の分化、活性化、動員、および体の全体にわたる細胞の恒常性に重要な生物学的役割を果たす。治療的な有用性は、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス(SLE)、および糖尿病などの自己免疫疾患を含む免疫調節を必要とする疾患の治療を含む。IL-TIFは、炎症の調節に重要でもよく、したがって、本発明のアンタゴニスト抗体などの効果器は、リウマチ様関節炎、喘息、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、クローン病、乾癬、膵炎、および敗血症を治療するために有用である。腫瘍細胞の殺傷の媒介においてもIL-TIFの役割があり、したがって、卵嚢癌、肺癌、黒色腫、および大腸癌などの癌の治療に有用にある。IL-TIFは、減少の移植片の拒絶に重要な免疫系の抑制において、強力な治療薬であってもよい。IL-TIFは、移植片-v

10

【0174】

また、IL-TIFは、自己の骨髄培養においてなど、生体外で使用することもできる。簡単には、化学療法または臓器移植の前に患者から骨髄を取り除き、任意に1つまたは複数のその他のサイトカインと組み合わせて、IL-TIFで処理する。次いで、化学療法後に骨髄の回復速度を上げるために、または移植後にサプレス移植片対宿主疾患を抑制するために、処理した骨髄を患者に戻す。加えて、IL-TIFは、骨髄または末梢血前駆体(PBPC)細胞の生体外で増殖させるために使用することもできる。治療前に、骨髄を幹細胞因子(SCF)で刺激して、末梢循環に初期の前駆細胞を放出させることができる。これらの前駆体を末梢血から収集し、および濃縮することができ、次いで、任意にIL-10、zcyto10、MDA7、SCF、IL-2、IL-4、IL-7またはIL-15を含む(しかし、これらに限定されない)1つまたは複数のその他のサイトカインと組み合わせて、IL-TIFで培養に処理し、高密度リンパ様培養中に分化させ、かつ増殖させることができ、次いでこれを化学療法または移植後に患者に戻すことができる。

20

30

【0175】

または、IL-TIFは、感染症に対する免疫を高める際に、HIV+患者などの免疫無防備状態の患者を治療する際に、またはワクチンを改善する際に、重要な免疫系を活性化してもよい。特に、T細胞、B細胞、NK細胞、またはこれらの前駆体などのIL-TIF刺激または増殖は、ウイルス感染の治療において、および抗新生物の因子として、治療的な価値をもたらす。NK細胞は、転移性の腫瘍細胞の排除の主要な役割を果たすと考えられ、転移および固形腫瘍をもつ患者では、NK細胞活性のレベルの減少を有する(Whitesideら、Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230: 221-244, 1998)。

【0176】

IL-TIFアデノウイルスを注射したマウスのさらなる解析により、アルブミンレベルが対照アデノウイルスを注射した動物と比較して減少すること、およびグルコースレベルが有意に下がることを明らかにする。しかし、肝酵素(ALTおよびAST)は、対照アデノウイルスを注射したマウスについて見られたものと同様のレベルである。IL-TIFは、肝細胞機能の特異的に阻害し、または変化させるのであろう。または、過剰なIL-TIFは、肝臓に対して有害な作用を引き起こすウイルス感染と共同作用するのであろう。したがって、アンタゴニスト(抗体、突然変異蛋白質、可溶性受容体)は、ウイルス病を治療するために有用であろう。特に、以下などの肝臓をターゲットする特にウイルス病: B型肝炎、C型肝炎、およびアデノウイルス。その他の組織におけるウイルス病、たとえばウイルス性髄膜炎およびHIV関連疾患は、IL-TIFに対するアンタゴニストによって治療されるであろう。

40

【0177】

50

IL-TIFアデノウイルスを注射したマウスは、重量減少、可動性の減少および毛づくろいの障害、並びに循環リンパ球の減少を示す。これらの変化は、感染性ショックおよびその他の炎症性の症状の間に見られるものの典型である。これらの効果は、IL-TIFによって直接に、またはIL-1、TNF、およびIL-6などの炎症誘発性のサイトカインのレベルの上昇によって間接的に誘導引き起こされてもよい。IL-TIFに対するアンタゴニストは、感染性ショック、成人呼吸窮迫症候群、内毒血症、および髄膜炎を治療するために有用であろう。IL-TIFアンタゴニストから利益を得るであろうその他の疾患には：出血性ショック、播種性血管内血液凝固症候群、心筋虚血症、脳卒中、移植臓器の拒絶反応、肺線維症、炎症性痛覚過敏、および悪液質が含まれる。

【0178】

IL-TIFアデノウイルスを注射したマウスは、末梢血リンパ球数の減少を示す。これは、末梢血リンパ球に対するIL-TIFの直接的阻害作用である可能性が高い。拮抗性のIL-TIFは、特にこれらが細菌性、ウイルス性、または寄生性の病原体を根絶するために必要なときに、リンパ球の維持および増殖を促進する。したがって、拮抗性のIL-TIFは：結核、特発性間質性肺炎、肺炎、髄膜炎菌性疾患、AIDS、HIV関連の肺疾患、肝炎、ウイルス性髄膜炎、マラリア、および赤痢(志賀赤痢菌)を有する患者の利益になるであろう。

【0179】

IL-TIFのリンパ球阻害作用は、自己免疫を減少するため、リンパ腫腫瘍、特に非ホジキンリンパ腫、およびリンパ性白血病の増殖を阻害するために使用されてもよい。また、IL-TIFは、リンパ球を阻害し、器官移植患者に対する移植許容性を促進するために使用されてもよい。腎臓および骨髄移植は、適切な適応症である。

【0180】

IL-TIFアデノウイルスを注射されたマウスは、有意な血小板数の増大を示す。血小板機能障害と関係する軽度の出血障害(MBDs)は、比較的一般的であり(Bachmann, Seminars in Hematology 17: 292-305, 1980)、ベルナル スーリエ遺伝的症候群(血小板GPIbの欠損)、グランツマン血小板無力症(GPIIbおよびGPIIIaの欠損)、先天性無フィブリノーゲン血症(血漿および血小板中のフィブリノーゲンレベルの減弱するまたは不存在)、およびグレイ血小板遺伝的症候群(a-顆粒の非存在)を含む血小板機能の多くの先天性の障害である。加えて、血小板分泌、貯蔵プール欠損、血小板アラキドン酸経路の異常状態、血小板シクロオキシゲナーゼおよびトロンボキサンシンターゼの欠損、並びに血小板活性化の欠損と関係する多くの障害がある(Rao and Holmsen, Seminars in Hematology 23: 102-118, 1986)。

【0181】

IL-TIFは、動物のインビボで血小板および好中球を増大することが示されており、再生不良性貧血、脊髄形成異常性の遺伝的症候群、化学療法、または先天性血球減少症によって誘導されるものなどの血球減少症の治療などにおいて、血小板および好中球のレベルを増大することが望ましい場合に治療的に使用することができる。また、タンパク質は、血小板減少症の治療などにおいて、血小板産生を増大するために有用である。血小板減少症は、症状の発症に単独でまたは協調して作用するであろう多様な疾患および臨床状態の群と関係する。低下した血小板数により、たとえば血小板産生の欠損、異常な血小板分布、大量の輸液のために希釈による損失、または血小板の異常な破壊を生じ得る。たとえば、癌治療において使用される化学療法剤は、骨髄の血小板前駆細胞の発生を抑制する可能性があり、生じる血小板減少症により化学療法が制限され、輸血を必要とするであろう。加えて、特定の悪性のもものでは、血小板産生および血小板分布を障害し得る。また、悪性細胞を死滅させるために使用される放射線療法は、血小板前駆細胞も死滅させる。また、血小板減少症は、薬物、新生児の同種免疫、または血小板輸血同種免疫によって誘導される種々の血小板の自己免疫性の障害を生じ得る。IL-TIFは、輸血の必要を減少し、または取り除く、これにより、血小板同種免疫の発病率を減少することができる。血小板の異常な破壊は、以下によって生じる：(1)血管移植片または外傷を与えられた組織での血小板消費量の増大；または(2)たとえば、薬物で誘導される血小板減少症、特発性血小板減少

10

20

30

40

50

性紫斑病 (ITP)、自己免疫疾患、白血病およびリンパ腫などの血液学的な障害、または骨髄を含む転移癌と関連する免疫機構。IL-TIFのその他の徴候は、たとえば、AZTを伴うHIV感染の化学療法または治療によって生じる再生不良性貧血および薬物で誘導される骨髄抑制を含む。

【 0 1 8 2 】

血小板減少症は、経鼻-経口領域または消化管からの粘膜出血、並びに創傷潰瘍、または注射部位からの毛細血管出血などの出血の増大として現れる。

【 0 1 8 3 】

ヒト乾癬性の傷害においてIL-TIFの過剰発現が示され、IL-TIFがヒト乾癬に關与することを示唆している。さらに、本明細書に記載されているように、トランスジェニックマウスでのIL-TIFの過剰発現では、乾癬の表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の關与を示し、および加えて、正常マウスへのIL-TIFの注射では、乾癬の表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の關与を示し、これが、可溶性受容体アンタゴニストzcytor16によって消失した。このようなインビボでのデータは、炎症誘発性のIL-TIFが乾癬に關与することをさらに示唆する。したがって、本発明の抗ヒト-IL-TIFモノクローナル抗体などのIL-TIF活性に対するアンタゴニスト、並びに可溶性受容体およびこれらに対する抗体は、炎症性疾患の治療的な治療に、特に乾癬の治療におけるIL-TIFに対するアンタゴニストとして有用である。さらに、本発明の抗ヒト-IL-TIFモノクローナル抗体などのIL-TIF活性に対するアンタゴニスト、並びに可溶性受容体およびこれらに対する抗体は、その他の炎症性疾患の治療的な治療に、たとえばアトピー性皮膚炎、IBD、大腸炎、内毒血症、関節炎、リウマチ様関節炎および乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、感染性ショック、多臓器不全、喘息または気管支炎などの炎症性肺傷害、細菌性肺炎、乾癬、湿疹、アトピー性皮膚炎および接触皮膚炎、並びに潰瘍性大腸炎およびクローン病など炎症性の腸疾患の治療において、IL-TIFに対するアンタゴニストとして有用である。

【 0 1 8 4 】

IL-TIFを過剰発現するIL-TIFトランスジェニック子犬またはIL-20を過剰発現するIL-20トランスジェニック子犬で見出される皮膚表現型の減少または除去によって疾患モデルのインビボにおける有効性を示すために、子宮内の中和抗IL-TIFまたはIL-20抗体の投与を使用することができる。中和モノクローナル抗体(mAbs)での子宮内治療用の技術には先例がある。1つの場合では、B細胞のB-1サブセットの発生が、B細胞特異的な分子のCD19に対して特異的なmAbで妊娠雌性マウスを処理することによって劇的に影響を受けた(たとえば、Krop I.ら、Eur. J. Immunol. 26(1) : 238-42, 1996)。Kropらは、500 μgのラット抗マウスCD19 mAb(または、ラットのアイソタイプマッチされた対照抗体)のPBS溶液を、妊娠9日に開始して、その後に出生までの一日おきに、妊娠マウス腹腔内に一定時刻に注射した。また、10日齢で、子犬には500 μgのこれらの抗体を注射した。もう一つの場合では、Tanakaらは、子宮内でIL-2受容体鎖に対するモノクローナル抗体によって処理すると、Thy-1+樹状表皮細胞の発生を完全に抑制することが見出された。IL-2受容体の2つの異なるサブユニット、すなわち鎖(IL-2R_α)および鎖(IL-2R_β)は、胎児の胸腺個体発生を介してほぼ互いに排他的に発現する。IL-2R_β(IL-2Rのシグナル伝達成分)に対する中和mAbを投与することによってIL-2R_βをブロックすることにより、完全かつ選択的なThy-1+皮膚樹状表皮細胞の消失を生じた。その他のいかなるT細胞サブセットの発生も、損なわれなかった。これは、IL-2が胎児Vガンマ5+細胞およびこれらの子孫の発生に重要な役割を果たしていることを示した(Tanaka, T.ら、Int Immunol. 4(4) : 487-9, 1992を参照されたい)。加えて、Schattmann GCらは、PDGF-Aが子宮内の系を使用する通常のマウスの心血管の発生に必要とされることを示した。いくつかの証拠が、血小板由来増殖因子A鎖(PDGF-A)が通常の前心血管の発生に必要とされることを示唆する。マウス脱落膜への抗PDGF-A中和抗体の導入により、18~24時間の期間にインビボでPDGF-Aリガンド-受容体の相互作用の選択的な破壊を子宮内で生じ、PDGF-Aが、心血管の発生に必要とされるかどうか、およびそれが必要とされる時の評価ができた(Schattmann GCら、Dev. Biol. 176(1) : 133-42, 1996を参照されたい)。これらの結果、並びに当技術分野において記載

10

20

30

40

50

されたその他の結果は、中和mAbsが子宮内で強い効果を引き出すことができるという証拠を提供する。同様に、疾患モデルのインビボにおいて、それぞれIL-20およびIL-22(IL-TIF)を過剰発現するIL-20およびIL-22(IL-TIF)遺伝子組換え子犬において見出された皮膚表現型を減少させまたは除去するために、モノクローナル抗体でIL-20またはIL-22(IL-TIF)を中和することの有効性を示すデータを示すことができた。これらのトランスジェニックマウスは、本明細書に記載されているように、少なくとも一部には表皮の肥厚によって、「光る」皮膚の外見を伴って生まれる。かなり低レベルのトランスジェニックサイトカインを発現するIL-20 TG子犬は、回復し、生き残って飼育されるが、IL-TIF TGマウスは、出生直後、一般に5日齢の前に死ぬ。

【0185】

薬学的用途のためには、IL-TIFは、従来法に従って非経口的、特に静脈内または皮下送達のために処方される。静脈内投与は、大量瞬時投与、徐放により、たとえばミニポンプまたはその他の適切な技術を用いて、または1~数時間の典型期間にわたる注入によってなされると考えられる。一般に、薬学的製剤は、塩類溶液、緩衝食塩水、5%のデキストロス水溶液等の薬学的に許容される媒体と組み合わせて造血性タンパク質を含む。製剤はさらに、1つまたは複数の媒介物、保存剤、溶解剤、緩衝剤、バイアル表面上のタンパク質損失を妨げるためのアルブミン等を含むことができる。加えて、造血性のIL-TIFは、その他のサイトカイン、特に幹細胞因子、IL-3、IL-6、IL-11、またはGM-CSFなどの早期に作用するサイトカインと組み合わせてもよい。このような併用療法を利用するとき、サイトカインは、単一の製剤において組み合わせてもよく、または別々の製剤で投与されてもよい。処方の方法は、当技術分野において周知であり、Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990に開示されており、参照として本明細書に組み入れられる。治療用量は、一般的に、0.1~100mg/kg患者の体重/日、好ましくは0.5~20mg/kg/日の範囲であり、正確な用量は、処理される病状の性質および重症度、患者の特徴等を考慮して、許容される標準に従って臨床医により決定される。用量の決定は、当業者のレベル内である。タンパク質は、一般的には化学療法もしくは骨髄移植体後に28日までの期間にわたって、または $>20,000/\text{mm}^3$ 、好ましくは $>50,000/\text{mm}^3$ の血小板数が達成されるまで投与される。より一般的には、タンパク質は、1週以下にわたって、しばしば1~3日の期間にわたって投与される。一般に、IL-TIFの治療的に有効な量は、リンパ性または骨髄球性の前駆細胞の増殖および/または分化の臨床的に有意な増大を生じ、成熟細胞(たとえば血小板または好中球)の循環レベルの増大が現れるであろう十分な量である。したがって、少なくとも $20,000/\text{mm}^3$ 、好ましくは $50,000/\text{mm}^3$ の血小板数に達するまで、血小板障害の治療を続ける。また、IL-TIFは、IL-3、-6、および-11; 幹細胞因子; エリスロポエチン; G-CDFおよびGM-CDFなどのその他のサイトカインと組み合わせて投与することができる。併用療法の措置の範囲内で、その他のサイトカインの1日量は、一般にEPO、150U/kg; GM-CDF、5~15lg/kg; IL-3、1~5lg/kg; およびG-CDF、1~25lg/kg。EPOとの併用療法は、たとえば、低EPOレベル貧血性の患者で示されている。

【0186】

また、IL-TIFは、自己の骨髄培養またはより肝臓培養など、生体外で用することができる。たとえば、簡単には、骨髄を化学療法の前に患者から取り除き、選択的に1つまたは複数のその他のサイトカインと組み合わせてIL-TIFで処理する。次いで、骨髄の回復速度を上げるために、化学療法後に、処理した骨髄を患者に戻す。加えて、IL-TIFは、また、骨髄または末梢血前駆体(PBPC)細胞の生体外での増殖のために使用することができる。末梢循環中に初期の前駆細胞を放出するために、化学療法治療の前に、幹細胞因子(SCF)またはG-CSFによって骨髄を刺激することができる。これらの前駆体を回収し、末梢血から濃縮し、次いで培養液中においてIL-TIFで、任意にSCF、G-CSF、IL-3、GM-CSF、IL-6、またはIL-11を含む(しかし、これらに限定されない)1つまたは複数のその他のサイトカインと組み合わせて処理して、高密度巨核球に分化および増殖させ、次いで、これを高投与量化学療法後に患者に戻すことができる。このような生体外の用途は、全身投与が患者に

10

20

30

40

50

よって許容されない例において、特に望ましい。したがって、本発明は、ヒトを含む哺乳類の血小板および好中球の産生を刺激するための方法を提供する。本発明は、哺乳類、生体外の組織試料、または細胞培養液中の血小板および好中性の産生を刺激するための方法を提供する。本方法は、(a)配列番号：3のアミノ酸残基22～アミノ酸残基167のアミノ酸配列を含むタンパク質；(b)(a)の対立形質変異体；および(d)(a)または(b)の種相同体からなる群より選択される造血性タンパク質であって、該タンパク質は、薬学的に許容される媒体と組み合わせて、骨髓球性もしくはリンパ様の前駆体の増殖または分化、または血小板の産生を刺激する造血性タンパク質の治療的に有効な量を、哺乳類、生体外の組織資料、または細胞培養液に投与することを含む。

【0187】

さらに、血小板および好中球の増大は、血液病または上記の通りの化学療法を受けている患者だけでなく、正常な状態下でも、創傷部位において望まれる。インビボで血小板レベルを増大するIL-TIFなどのポリペプチドは、一般的なカット、やけど、断裂、摩耗などの治癒において手当するために、ゲル、メッシュ、湿布、液体等を含む形態の製剤に使用することができる。さらに、皮膚、筋肉等、手術後などでの内部にさえ、治癒が要求される任意の例において、このような適用を適用することができる。

【0188】

また、IL-TIFは、細胞分化の機構を解明するために、および成熟細胞の系統を決定するためになど、造血細胞の分化および発生のインビトロ実験のための有益なツールであり、また細胞培養中の増殖薬としての有用性が見出されるであろう。

【0189】

分化は、進行性かつ動的なプロセスであり、多能性の幹細胞で始まり、末期に分化した細胞で終わる。系統にコミットメントされずに再生することができる多能性の幹細胞は、一組の分化マーカーを発現し、細胞系統にコミットメントされたときに失われる。前駆細胞は、一組の分化マーカーを発現し、細胞が成熟に向かって細胞系統路を進行する場合に、発現され続けてもよく、またはされなくてもよい。成熟細胞により排他的に発現される分化マーカーは、通常、細胞生成物、細胞生成物を生成するための酵素、および受容体などの機能的性質のものである。細胞集団の分化の段階は、細胞集団に存在するマーカーの同定によりモニターされる。筋細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、クロンドロサイト、腺維芽細胞、および網様細胞は、通常の間葉幹細胞に起因すると思われる(Owenら、Ciba Fdn. Symp. 136: 42-46, 1988)。間葉幹細胞のマーカーは、いまだ十分には同定されておらず(Owenら、J. of Cell Sci. 87: 731-738, 1987)、その結果、同定は通常、前駆体および成熟細胞段階で行われる。IL-TIFは、間葉幹細胞および単球または他の前駆体細胞を、インビボおよびエクスピボの両方で単離するための研究のために有用である。

【0190】

分化を測定するアッセイ法はたとえば、組織、酵素活性、機能的活性または形態学的変化の段階特異的発現に関連する細胞 - マーカーを測定することを含む(Watt, FASEB, 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; これら全ては、参照により本明細書に組み込まれる)。または、IL-TIFポリペプチド自体は、組織の段階特異的な発現に関連する追加の細胞表面または分泌されたマーカーとして役立つ。IL-TIFポリペプチドの直接的な測定、またはそれが分化するにつれての組織における発現のその減少は、組織の分化のためのマーカーとして作用することができる。それゆえ、本発明の抗体は、本明細書に記載したように、癌および炎症性疾患のマーカーとして診断に使用することができる。

【0191】

同様に、組織におけるIL-TIFポリペプチド、またはその発現の減少の直接的な測定により、組織または細胞においてこれらが腫瘍の進行を受けていることを決定することができる。前癌性または癌性の症状における細胞の侵襲性および運動性の上昇、またはIL-TIFの発現の増加もしくは減少は、正常な組織と比較して、腫瘍進行における形質転換、侵襲性

10

20

30

40

50

、および転移についての診断として役立つことができる。進行または転移の腫瘍段階の知識は、所与の個々の癌患者のために、最も適切な治療または処理の攻撃性を選択する上で医師を助けるであろう。発現(mRNAまたはタンパク質のいずれかの)の増加および減少を測定する方法は、当技術分野において周知であり、本明細書に記載されており、IL-TIF発現に適用することができる。たとえば、細胞運動性を調節するポリペプチドの出現または消出は、前立腺癌の診断および予後を助けるために使用することができる(Banyard, J. and Zetter, B.R., *Cancer and Metast. Rev.* 17: 449-458, 1999)。細胞運動性、活性化、増殖、または分化のエフェクターとして、IL-TIFの発現の増加または減少は、前立腺癌およびその他の癌の診断に役立つであろう。それゆえに、本明細書に論議したように、本抗体は、それゆえに癌および炎症性疾患のためのマーカーとして診断に使用することができる。

10

【0192】

さらに、腫瘍の進行および転移に対するIL-TIFの活性および効果をインビボで測定することができる。いくつかの同系マウスモデルが、腫瘍進行に対するポリペプチド、化合物、または他の処理の影響を研究するために開発されてきた。これらのモデルにおいては、培養継代された腫瘍細胞が、腫瘍ドナーと同じ株のマウス中に移植される。細胞は、レシピエントマウスにおいて類似する特徴を有する腫瘍中で増殖し、転移も、そのモデルのいくつかにおいて生じる。我々の研究のための適切な腫瘍モデルは、中でも、ルイス肺癌腫(ATCC番号CRL-1642)およびB16黒色腫(ATCC番号CRL-6323)を含む。これらは、インビトロで容易に培養され、操作される、C57BL6マウスと同系の通常使用される腫瘍系統である。これらの細胞系のいずれかの移植に起因する腫瘍は、C57BL6マウスの肺に転移することができる。ルイス肺癌腫モデルは、最近、脈管形成の阻害剤を同定するためにマウスに使用されている(O'Reilly MSら、*Cell* 79: 315-328, 1994)。C57BL6/Jマウスを、組換えタンパク質、アゴニスト、もしくはアンタゴニストの毎日の注射、または組換えアデノウイルスの1回の注射のいずれかを介して実験剤により処理する。この処理の3日後に、 $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞を背面の皮膚下に移植する。または、細胞自体を、タンパク質が全身的によりもむしろ腫瘍部位でまたは細胞内で合成されるように、移植の前にIL-TIFを発現するものなどの組換えアデノウイルスに感染させてもよい。マウスは、通常5日以内に眼に見える腫瘍を発生する。腫瘍は、3週間までの間に増殖し、この間に、これらは対照の処理グループにおいて $1500 \sim 1800\text{mm}^3$ のサイズに達することができる。腫瘍サイズおよび体重を実験を通して注意してモニターする。屠殺の時点で、腫瘍を肺および肝臓と共に除去して計量する。肺の重量は、転移性腫瘍負荷量と相関することが示された。さらなる測定として、肺表面転移を計数する。切除した腫瘍、肺、および肝臓は、当技術分野において既知の、および本明細書に記載される方法を使用して、組織学的試験、免疫組織化学、およびインサイチュウ・ハイブリダイゼーションのために調製される。従って、腫瘍が血管構造を回復し、かつ転移を受ける能力に対する、問題の発現されたポリペプチド、たとえばIL-TIFの影響を評価することができる。さらに、アデノウイルスの使用とは別に、移植された細胞には、IL-TIFを一過性にトランスフェクトすることができる。安定したIL-TIF形質転換体の使用、並びにインビボでのIL-TIF発現を活性化する誘発性プロモーターの使用は、当技術分野において既知であり、転移のIL-TIF誘発を評価するために、この系に使用することができる。さらに、精製されたIL-TIFまたはIL-TIFならし培地をこのマウスモデルに直接注射することができ、従って、この系に使用される。一般的な文献については、O'Reilly MSら、*Cell* 79: 315-328, 1994; およびRusciano Dら、*Murine Models of Liver Metastasis. Invasion Metastasis* 14: 349-361, 1995を参照されたい。

20

30

40

【0193】

IL-TIF遺伝子は、ヒト染色体、第12染色体上に存在し、したがって、第12染色体の異常があるか、または変異が起こったかどうかを決定するために使用することができる。IL-TIFゲノムDNA(Genbankアクセッション番号AC007458)の一部を含むヒトゲノムDNAの断片の注釈に基づくと、IL-TIFは、第12染色体の12q15領域に位置している。IL-TIF遺伝子座位において検出可能な染色体異常は、異数性、遺伝子コピー数変化、異型接合性(LOH)の減

50

少、転位置、挿入、欠失、制限部位の変化、および再配列を含むが、これらに限定されない。このような異常は、制限断片長多型(RFLP)、PCR技術を使用するショート・タンデム・リピート(short tandem repeat : STR)解析、および当技術分野において既知のその他の遺伝連鎖分析技術などの分子遺伝学的技術を使用することによって、IL-TIFポリヌクレオチドを使用して検出することができる(Sambrookら、ibid. ; Ausubelら、ibid. ; Marian, Chest 108 : 255-65, 1995)。

【 0 1 9 4 】

遺伝子の位置についての正確な知識は、多くの目的のために有用であり得るし、本系は、1)配列が既存のコンテイングの一部であるかどうかを決定して、YACs、BAC、またはcDNAクローンなどの種々の形態の、さらに周囲の遺伝子配列を得ること；2)同じ染色体領域に連鎖を示す遺伝性疾患の可能性のある候補遺伝子を提供すること；および3)特定の遺伝子がどのような機能を有するかを決定する際に補助となるであろう、マウスなどのモデル生物を相互参照することを含む。

10

【 0 1 9 5 】

IL-TIFは、第12染色体の12q15領域に位置する。もう一つのT細胞発現サイトカインのインターフェロン-ガンマ(IFN- γ)は、この遺伝子座(12q14)の近くにマップされ、12q14-15遺伝子座は、T細胞発現サイトカインのための重要な領域であることを示唆する。さらに、IFN- γ の変異は、免疫不全と関係する(たとえば、Tzoneva, Mら、Clin. Genet. 33 : 454-456, 1988を参照されたい)。IL-TIFの変異は、免疫不全、自己免疫疾患、リンパ球癌、またはその他の免疫性機能障害などのヒト疾患を引き起こす可能性も高い。さらに、癌などのヒト疾患状態と関係したIL-TIF遺伝子座にマップされる遺伝子がいくつかある。12q13-q15領域は、共通の区切り点としての12q15とともに、種々の悪性および良性の固形腫瘍(唾液の腺腫および子宮平滑筋腫を含む)に関与する。さらに、高移動度タンパク質アイソフォームI-C(HMGIC)は、12q15にマップされ、良性の脂肪腫およびその他の腫瘍に関与する。同様に、IL-TIFは、12q15にマップされるので、IL-TIF機能の損失と腫瘍の形成または進行の間には、関係が存在し得る。さらに、12q13-15の転位置は、軟部組織腫瘍、多くの脂肪腫症、および悪性ミクソイド(mixoid)脂肪肉腫において一般的である。IL-TIFポリヌクレオチド・プローブは、これらの癌感受性マーカーと関係する異常状態または遺伝形質を検出するために使用することができる。12q15領域の変異によって生じる癌についての豊富な証拠があり、IL-TIFも、この染色体の遺伝子座にマップされるので、IL-TIFの変異も、リンパ球癌またはその他の腫瘍などの癌に直接関与または関係しているのであろう。

20

30

【 0 1 9 6 】

診断薬は、疾患の型の決定および適当な関連する療法、または遺伝学的カウンセリングの補助において医師を助けることができるであろう。それ自体、本発明の抗IL-TIF抗体、ポリヌクレオチド、およびポリペプチドは、IL-TIFのポリペプチド、mRNA、または抗IL-TIF抗体の検出に使用し、従ってマーカーとして役立てることができ、本明細書に記載するように、当技術分野において既知の、および本明細書に記載された方法を使用して、検出または遺伝病もしくは癌に直接使用することができる。さらに、IL-TIFポリヌクレオチド・プローブは、多くの脂肪腫症および悪性ミクソイド(mixoid)脂肪肉腫などの染色体12q15欠失およびヒト疾患に関係する転位置、または悪性の染色体配列換またはその他の癌に関与すると思われる、腫瘍またはその他の12q15突然変異の悪性進行と関係するその他の転位置(上記の)と関係する異常状態または遺伝形質を検出するために使用することができる。同様に、IL-TIFポリヌクレオチド・プローブを使用して、染色体12q15トリソミーに関連する異常または遺伝子型、およびヒト疾患に関連する染色体喪失を検出することができる。さらに、その他の遺伝子座の中で、肩甲骨腓骨(Scapuloperoneal)脊髄性筋萎縮症(12q13.3-q15)、ムコ多糖症(12q14)、チトクロムCYP27B1(12q14)およびその他の変異の結果としての仮性ビタミンD欠乏症佝僂病のためのものにはヒト疾病状態において全て顕著であり、並びにヒトゲノムのこの領域にマップされる。オンラインのヒトのメンデルの遺伝(Online Mendelian Inheritance of Man : OMIM(商標), National Center for Biotech

40

50

hnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD) 遺伝子マップ、および周囲の遺伝子座上の第3染色体のこの領域については、公的に利用できるWWWサーバー (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmap?chromosome=12q15>) を参照されたい。これらのすべては、IL-TIF遺伝子と同じ染色体領域への連鎖を示す遺伝性疾患についての可能性ある候補体遺伝子として役立つ。したがって、IL-TIFポリヌクレオチド・プローブは、これらの欠損と関係する異常状態または遺伝形質を検出するために使用することができる。

【0197】

上記のように、IL-TIF遺伝子の中の欠損は、遺伝性のヒト疾病状態を生じるかもしれない。本発明のポリペプチド、アンタゴニスト、アゴニスト、ポリヌクレオチド、および抗体などの本発明の分子は、IL-TIF遺伝子欠損に関連する検出、診断予防、および治療を助ける。加えて、IL-TIFポリヌクレオチド・プローブは、病気にかかったまたは病気にかかっていない個体間で、IL-TIF染色体の遺伝子座の対立形質の相違を検出するために使用することができる。従って、IL-TIFは、IL-TIF配列は、医学的なDNAプロファイリングにおける診断として使用することができる。本発明の抗体または結合ポリペプチドは、IL-TIFの異常を生じる遺伝病に関連したIL-TIFの異常な活性または過剰発現をアンタゴナイズさせ、または阻害するために使用することができる。

【0198】

一般に、患者における遺伝子異常性または異常型を検出するために遺伝子連鎖分析に使用される診断方法は、当技術分野において既知である。診断における、PCRに基づく方法の参照のためには、一般的に、次の文献を参照されたい：Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc, 1993), Cotter (ed.), *molecular Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek and Walaszek (eds.), *Tumor Marker Protocols* (Humana Press, Inc. 1998), Lo (ed.), *Clinical Application of PCR* (Humana Press, Inc. 1998), およびMeltzer (ed), *PCR in Bioanalysis* (Humana Press, Inc. 1998)。

【0199】

また、「トランスジェニックマウス」と称される、IL-TIF遺伝子を発現するように構築されたマウス、および「ノックアウトマウス」と称される、IL-TIF遺伝子機能の完全な欠如を示すマウスを作製してもよい(Snouwaertら、*Science* 257: 1083, 1992; Lowellら、*Nature* 366: 740-742, 1993; Capecchi, M.R., *Science* 244: 1288-1292, 1989; Palmiter, R.D.ら、*Annu. Rev. Genet.* 20: 465-499, 1986)。たとえば、偏在的に、または組織特異的もしくは組織限定的なプロモーター下でIL-TIFを過剰発現するトランスジェニックマウスは、過剰発現が表現型を引き起こすかどうかを決定するために使用することができる。たとえば、野生型IL-TIFポリペプチド、そのポリペプチド断片、または変異体の過剰発現は、正常な細胞プロセスを変えてしまうかもしれず、IL-TIF発現が機能的に関連する組織を同定する表現型を生じ、かつIL-TIF、そのアゴニストまたはアンタゴニストのための治療標的物を示すであろう。たとえば、設計する好ましいトランスジェニックマウスは、成熟IL-TIFポリペプチド(配列番号: 3のアミノ酸残基23(Pro)~167(Ile))を過剰発現するものである。さらに、このような過剰発現により、ヒト疾患と同様の表現形を示すであろう。同様に、ノックアウトIL-TIFマウスは、IL-TIFがインビボで絶対的に必要とされる場合を決定するために使用することができる。ノックアウトマウスの表現型は、本明細書に記載されているものなどのIL-TIFアンタゴニストが有するであろうインビボでの効果を予測することができる。ヒトまたはマウスIL-TIF cDNAは、ノックアウトマウスを作製するために使用することができる。これらのマウスは、インビボ系においてこれによってコードされるIL-TIF遺伝子およびタンパク質を研究するために使用されてもよく、対応するヒト疾患、たとえば炎症性疾患のインビボモデルとして使用することもできる。加えて、このようなマウスは、本発明の拮抗的分子の抑制性および抗炎症性の効能を試験するために使用することができる。さらに、本明細書に記載したIL-TIFアンチセンスポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドまたはIL-TIF向けたりボザイムのトランスジェニックマウスでの発現は、上記したトランスジェニックマウスに類似して使用することができる。同様に、精製されたIL-TIFタンパク質の投与によって、研究を行ってもよい。

【0200】

さらに、本明細書に記載されているように、トランスジェニックマウスでのIL-TIFの過剰発現では、乾癬の表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の関与を示し、および加えて、正常マウスへのIL-TIFの注射では、乾癬の表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の関与を示し、これが、可溶性受容体アンタゴニストzcytor16によって消失した。このようなインビボでのデータは、炎症誘発性のIL-TIFが乾癬に関与することをさらに示唆する。したがって、本発明の抗ヒト-IL-TIFモノクローナル抗体などのIL-TIF活性に対するアンタゴニスト、並びに可溶性受容体およびこれらに対する抗体は、炎症性疾患の治療的な治療に、特に乾癬の治療におけるIL-TIFに対するアンタゴニストとして有用である。さらに、本発明の抗ヒト-IL-TIFモノクローナル抗体などのIL-TIF活性に対するアンタゴニスト、並びに可溶性受容体およびこれらに対する抗体は、その他の炎症性疾患の治療的な治療に、たとえばアトピー性皮膚炎、IBD、大腸炎、内毒血症、関節炎、リウマチ様関節炎および乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、感染性ショック、多臓器不全、喘息または気管支炎などの炎症性肺傷害、細菌性肺炎、乾癬、湿疹、アトピー性皮膚炎および接触皮膚炎、並びに潰瘍性大腸炎およびクローン病など炎症性の腸疾患の治療においてIL-TIFに対するアンタゴニストとして有用である。

10

【0201】

薬学的な使用のためには、本発明の抗体および結合ポリペプチドは、従来法に従って非経口的、特に静脈内または皮下送達のために処方される。静脈内投与は、大量瞬時投与または1~数時間の典型期間にわたる注入によってなされると考えられる。一般に、薬学的製剤は、塩類溶液、緩衝食塩水、5%のデキストロース水溶液等の薬学的に許容される媒体と組み合わせてIL-TIFタンパク質を含む。製剤はさらに、1つまたは複数の媒介物、保存剤、溶解剤、緩衝剤、バイアル表面上のタンパク質損失を妨げるためのアルブミン、等を含むことができる。処方の方法は、当技術分野において周知であり、たとえば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 19th ed., 1995に開示されており、参照として本明細書に組み入れられる。治療用量は、一般的に、0.1~100 µg/kg患者の体重/日、好ましくは0.5~20mg/kg/日の範囲であり、正確な用量は処理される病状の性質および重症度、患者の特徴等を考慮して、許容される標準に従って臨床医により決定される。用量の決定は、当業者のレベル内である。タンパク質は、急性の治療のためには1週間以上または未満、しばしば1~3日の期間にわたって投与されてもよく、または慢性治療において、数ヶ月または数年以上使用してもよい。一般に、IL-TIFの治療的に有効な量は、造血性または免疫機能の臨床的に有意な変化を生じさせるために十分な量である。

20

30

【0202】

また、本発明は、抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドが重合体に結合されている化学的に修飾された抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチド組成物を想定する。例示的なIL-TIFポリペプチドは、機能的な膜貫通ドメインを欠いている可溶性ポリペプチド、たとえば配列番号:2のアミノ酸残基22~231、または28~231から成るポリペプチドである。典型的には、重合体は、抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドが水性環境などの生理学的環境において沈殿しないよう水溶性である。適切な重合体の例は、アシル化のための活性エステルまたはアルキル化のためのアルデヒドなどの単一の反応基で修飾されたものである。この場合、重合化の程度は調節することができる。反応性アルデヒドの例は、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、またはモノ-(C1-C10)アルコキシ、またはこれらのアリアルオキシ誘導体である(たとえば、Harrisら、米国特許第5,252,714号を参照されたい)。重合体は、分岐していてもまたは分岐でなくてもよい。さらに、抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドを生成するために重合体の混合物を使用することができる。

40

【0203】

50

治療のために使用することができる抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、薬学的に許容される水溶性ポリマー成分を含むことができる。適切な水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)、モノメトキシ-PEG、モノ-(C1-C10)アルコキシ-PEG、アリアルコキシ-PEG、ポリ-(N-ビニルピロリドン)PEG、トレシルモノメトキシPEG、PEGプロピオンアルデヒド、bis-スクシンイミジルカーボネートPEG、プロピレングリコールホモポリマー、酸化ポリプロピレン/酸化エチレンコポリマー、ポリオキシエチル化されたポリオール(たとえば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、デキストラン、セルロースまたは他の炭水化物基材のポリマーを包含する。適切なPEGは、約600~約60,000、たとえば5,000、12,000、20,000および25,000の分子量を有することができる。IL-TIF接合体はまた、このような水溶性ポリマーの混合物も含むことができる。

10

【0204】

抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドの1つの例は、抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチド部分並びに抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチド部分のN末端に結合された酸化ポリアルキル部分を含む。PEGは、1つの適切な酸化ポリアルキルである。例示として、抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、PEG、すなわち「PEG化」として知られている方法により修飾することができる。IL-TIFのPEG化は、当技術分野において既知のPEG化反応のいずれかによって行うことができる(たとえば、欧州特許第0154316号、Delgadoら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249 (1992), Duncan and Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290 (1994)、およびFrancisら、Int J. Hematol 68: 1 (1998)を参照されたい)。たとえば、PEG化は反応性ポリエチレングリコール分子によるアシル化反応またはアルキル化反応によっておこなうことができる。他のアプローチにおいては、抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドは、PEGの末端ヒドロキシまたはアミノ基が活性化されたリンカーにより置換されている活性化されたPEGを縮合することによって形成される(たとえば、Karasiwiczら、米国特許第5,382,657号を参照されたい)。

20

【0205】

アシル化によるPEG化は、典型的には、抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドとPEGの活性エステル誘導体との反応を必要とする。活性化されたPEGエステルの例は、N-ヒドロキシスクシンイミドにエステル化されたPEGである。本明細書において使用されるものとして、「アシル化」の用語は、抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドと水溶性ポリマー間のタイプの結合を含む：アミド、カルバメート、ウレタンなど。アシル化によってPEG化された抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドの調製方法は、典型的には、(a)抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドとPEG(PEGのアルデヒド誘導体の反応性エステルなど)とを、1つまたは複数のPEG基が抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドに結合する条件下で反応させて、(b)反応生成物を得る段階を含む。一般的に、アシル化反応のための最適な反応条件は、既知のパラメーターおよび所望する結果に基づいて決定されるであろう。たとえば、PEG：抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドの比が高いほど、ポリPEG化された抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチド生成物の%が高くなる。

30

【0206】

アシル化によるPEG化の生成物は、典型的には、リシン-アミノ基がアシル結合を介してPEG化された、ポリPEG化された抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチド生成物である。典型的には、生じる抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドは、少なくとも95%モノ-、ジ-またはトリ-ペグ化されるが、高度のPEG化を有するいくつかの種が、反応条件に依存して形成されるであろう。PEG化された種は、透析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーなどの標準的な精製方法を用いて、結合されていない抗IL-TIF抗体および結合ポリペプチドから分離することができる。

40

【0207】

アルキル化によるPEG化は、一般的に、還元剤の存在下で、抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドと、PEGの末端アルデヒド誘導体との反応を含む。PEG基は好ましくは、-CH₂-NH基を通してポリペプチドに結合される。

【0208】

50

モノPEG化された生成物を生成するための還元性アルキル化を介した誘導体化は、誘導体化のために利用できる異なったタイプの一級アミノ基の異なった反応性を利用する。典型的には、反応は、リシン残基の ϵ -アミノ基とタンパク質のN-末端残基の α -アミノ基との間のpKa差異を利用できるpHで行われる。このような選択的誘導体化によりアルデヒドなどの反応性基を含む水溶性ポリマーのタンパク質への結合が調節される。ポリマーとの接合は、リシン側鎖アミノ基などのその他の反応性基の有意な修飾を伴わずに、タンパク質のN末端で優先的に生じる。本発明は、抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチド抱合体の実質的な調製物を提供する。

【0209】

モノポリマー抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチド接合体分子の実質的に均質な集団を作製するための還元アルキル化は、(a)抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドのアミノ末端での ϵ -アミノ基選択的な修飾を可能にするために適切なpHで、還元アルキル化条件下で反応性PEGと抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドとを反応させる段階、および(b)反応生成物を得る段階を含む。還元アルキル化のために使用される還元剤は、水溶液中で安定であり、好ましくは、還元アルキル化の初期段階において形成されるSchiff塩基のみを還元できるはずである。例示的な還元剤は、硼水素化ナトリウム、シアノ硼水素化ナトリウム、ジメチルアミンボラン、トリメチルアミンボラン、およびピリジンボランを含む。

【0210】

モノポリマー抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチド接合体の実質的に均質な集団に関しては、還元アルキル化反応条件は、抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドのN末端への水溶性ポリマーの成分の結合を可能にする条件である。このような反応条件では、N末端での ϵ -アミノ基とリシンアミノ基との間のpKa差異を提供する。また、pHは、使用されるポリマー：タンパク質の比にも影響を及ぼす。一般的に、pHが低い場合、N末端 ϵ -基が反応性であるほど、最適な条件を達成するためにより多くのポリマーが必要とされるので、タンパク質に対して大過剰のポリマーが要求される。pHが高い場合、ポリマー：より多くの反応性基が利用できるため、抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドは、多い必要はない。典型的には、pHは、3~9、または3~6の範囲内であろう。この方法は、抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチド含有ホモダイマー、ヘテロダイマー、またはマルチマー可溶性受容体接合体を製造するために使用することができる。

【0211】

考慮すべきもう1つの因子は、水溶性ポリマーの分子量である。一般的に、ポリマーの分子量が高いほど、より少数のポリマー分子がタンパク質に結合されるであろう。PEG化反応に関しては、典型的な分量は、約2kDa~約100kDa、約5kDa~約50kD、または約12kDa~約25kDaである。水溶性ポリマー：抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドのモル比は、一般的に、1：1~100：1の範囲であろう。典型的には、水溶性ポリマー：抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチドのモル比は、ポリPEG化に関して、1：1~20：1であり、そしてモノPEG化に関しては、1：1~5：1であろう。

【0212】

ポリペプチドおよび水溶性ポリマー部分を含む接合体を製造するための一般的な方法は、当技術分野において既知である。たとえば、Karasiewiczら、米国特許第5,382,657号、Greewalら、米国特許第5,738,846号、Nieforthら、Clin. Pharmacol. Ther. 59：636 (1996)、Monkarshら、Anal. Biochem. 247：434 (1997)を参照されたい。この方法は、抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチド含有ホモダイマー、ヘテロダイマー、またはマルチマー可溶性受容体接合体を製造するために使用することができる。

【0213】

抗IL-TIF抗体または結合ポリペプチド(または抗IL-TIF抗体断片、抗体融合体、ヒト化された抗体など)を含む薬学的組成物は、液体、エアロゾル、または固体の形態で投与することができる。液体の形態は、注射可能な溶液および経口的懸濁液により例示される。典型的な固体の形態は、カプセル、タブレット、および徐放性の形態を含む。後者の形態は、ミニ浸透圧ポンプおよび植込錠により例示される(Bremerら、Pharm. Biotechnol. 10

10

20

30

40

50

: 239(1997); Ranade, 「Implants in Drug Delivery」Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger(eds.), pages 95-123(CRC Press 1995); Bremerら, 「Protein Delivery with Infusion Pumps」Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren(eds.), pages 239-254(Plenum Press 1997); Yeweyら, 「Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant」Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren(eds.), pages 93-117(Plenum Press 1997)。そのほかの固体形態は、クリーム、ペースト、その他の形態の適用などを含む。

【0214】

リポソームは、治療用ポリペプチドを被検者に静脈内、腹腔内、胞膜内、筋肉内、皮下に、もしくは経口投与、吸入、または鼻内投与を介して送達するための1つの手段を提供する。リポソームは、水性コンパートメントを取り囲む1つまたは複数の脂肪二重層を含む微視的小胞である(一般的に、Bakker-Woudenbergら、Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12(Suppl. 1): S61(1993), Kim, Drugs 46: 618 (1993)、およびRanade, 「Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers」Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger(eds.), pages 3-24(CRC Press 1995)を参照されたい)。リポソームは、細胞膜に組成が類似し、その結果、安全に投与することができ、生物分解性である。製造法に応じて、リポソームは、1層または多層であることができ、リポソームは、0.02 μm ~ 10 μm より大きな直径範囲で大きさを変更することができる。種々の薬剤をリポソーム内：二重層中の疎水性因子の区画および内側の水性空間内の親水性因子の区画内に、カプセル化することができる(たとえば、Machyら、Liposomes In Cell Biology And Pharmacology(John Libbey 1987)、およびOstroら、American J. Hosp. Pharm. 46: 1576(1989)を参照されたい)。さらに、リポソームの大きさ、二重層の数、脂肪組成、な並びにリポソームの変化および表面特性を変化させることによって、カプセル化された薬剤の治療的有効性を制御することができる。

【0215】

リポソームは、事実上あらゆるタイプの細胞に吸着し、次いでカプセル化された薬剤をゆっくり放出することができる。または、吸収されたリポソームは、食細胞である細胞による食作用を受ける。食作用に引き続いて、リポソームの脂質は、リソソーム内で分解され、カプセル化された薬剤が放出される(Scherphofら、Ann. N.Y. Acad. Sci. 446: 368 (1985))。静脈内投与後、小さいリポソーム(0.1 ~ 1.0 μm)は、細網内皮系の細胞により取り上げられて、典型的には肝臓および脾臓に主として位置するが、3.0 μm よりも大きなリポソームは、肺の中に沈着する。細網内皮系の細胞による、より小さいリポソームのこの優先的な吸収は、化学療法剤をマクロファージに、および肝臓の腫瘍に送達ために使用されてきた。

【0216】

細網内皮系は、大用量のリポソーム粒子での飽和、または薬理学的手段による選択的なマクロファージの不活性化を含むいくつかの方法により回避することができる(Claassenら、Biochim. Biophys. Acta 802: 428 (1984))。さらに、リポソーム膜へのグリコリピド-またはポリエチレングリコール-誘導体化リン脂質の組み込みは、細網内皮系による吸収を有意に減少させることが示された(Allenら、Biochim. Biophys. Acta 1068: 133 (1991); Allenら、Biochim. Biophys. Acta 1050: 9 (1993))。

【0217】

また、リン脂質組成を変化させるか、またはリポソームの中に受容体または脂質を挿入することによって、特定の細胞または器官をターゲットするように、リポソームを調製することができる。たとえば、高含量の非イオン性界面活性剤で調製されたリポソームを使用して、肝臓をターゲットすることができる(Hayakawaら、日本国特許第04-244,018号; Katoら、Biol. Pharm. Bull. 16: 960 (1993))。これらの製剤は、大豆ホスファチジルコリン、 α -トコフェロール、およびエトキシ化水素化ヒマシ油(HCO-60)をメタノール中で混合し、この混合物を真空下に濃縮し、次いで混合物を水で再構成することによって調製した。また、大豆由来ステリルグリコシド混合物(SG)およびコレステロール(Ch)を有す

るジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)のリポソーム処方物は、肝臓をターゲットすることが示された(Shimizuら、*Biol. Pharm. Bull.* 20 : 881 (1997))。

【0218】

または、抗体、抗体抗体、炭水化物、ビタミン、および輸送タンパク質などの、種々のターゲティングリガンドをリポソームの表面に結合させることができる。たとえば、リポソームを分枝型ガラクトシル脂質で変性してアシアログリコプロテイン(ガラクトース)受容体(これらの受容体はもっぱら肝細胞表面上に発現される)をターゲットすることができる(Kato and Sugiyama、*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14 : 287 (1997) ; Murahasiら、*Biol. Pharm. Bull.* 20 : 259 (1997))。同様に、Wuら、*Hepatology* 27 : 772 (1998)は、アシアロフェツインを使用するリポソームのラベリングがリポソーム血漿半減期を短縮し、肝細胞によるアシアロフェツインラベルされたりポソームの吸収を増強することを示した。一方で、分枝型ガラクトシル脂質を含むリポソームの肝臓蓄積は、アシアロフェツインの前注射により阻害することができる(Murahasiら、*Biol. Pharm. Bull.* 20 : 259 (1997))。ポリアコニチル化されたヒト血清アルブミンリポソームは、肝細胞に対してリポソームをターゲティングするためのもう一つのアプローチを提供する(Kampsら、*Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 94 : 11681 (1997))。その上、Gehoら、米国特許第4,603,044号は、肝臓の分化した代謝細胞に関連する肝胆管受容体に対する特異性を有する、肝細胞特異的リポソーム小胞送達系を記載している。

【0219】

組織ターゲティングに対するさらに一般的なアプローチでは、ターゲット細胞により発現されるリガンドに対して特異的なビオチニル化抗体でターゲット細胞をプレラベルする(Harasymら、*Adv. Drug Deliv. Rev.* 32 : 99 (1998))。遊離抗体を血漿排除した後、ストレプトアビジン結合リポソームを投与する。もう一つのアプローチでは、ターゲティング抗体をリポソームに直接的に付着させる(Harasymら、*Adv. Drug Deliv. Rev.* 32 : 99 (1998))。

【0220】

タンパク質のマイクロカプセル化の標準的な技術を使用して、抗IL-TIF中和抗体およびIL-TIF結合活性を有する結合パートナーをリポソーム内にカプセル化することができる(たとえば、Andersonら、*Infect. Immun.* 31 : 1099 (1981)、Andersonら、*Cancer Res.* 50 : 1853 (1990)、およびCohenら、*Biochim. Biophys. Acta* 1063 : 95 (1991)、Alvingら、「Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies」*Liposome Technology*, 2nd Edition, Vol. III, Gregoriadis(ed.), page 317(CRC Press 1993)、Wassefら、*Meth. Enzymol.* 149 : 124 (1987)を参照されたい)。前述したように、療法的に有効なリポソームは、種々の成分を含有していてもよい。たとえば、リポソームは、ポリ(エチレングリコール)の脂質誘導体を含んでいてもよい(Allenら、*Biochim. Biophys. Acta* 1150 : 9 (1993))。

【0221】

治療用タンパク質の高い全身的レベルを維持するために、分解性ポリマーの微小球が設計された。ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLG)、ポリ無水物、ポリ(オルトエステル)、非生物分解性エチルビニルアセテートポリマーなどの分解性ポリマーから微小球を調製し、この中で、タンパク質はポリマーに捕捉される(Gombotz and Pettit、*Bioconjugate Chem.* 6 : 332 (1995) ; Ranade、「Role of Polymers in Drug Delivery,」*Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger(eds.), pages 51-93(CRC Press 1995) ; Roskos and Maszkiewicz、「Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery」*Protein Delivery : Physical Systems*, Sanders and Hendren(eds.), pages 45-92(Plenum Press 1997) ; Bartusら、*Science* 281 : 1161(1998) ; Putney and Burke、*Nature Biotechnology* 16 : 153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2 : 548(1998))。また、ポリエチレングリコール(PEG)で被覆されたナノ球(nanosphere)は、治療用タンパク質の静脈内投与のための担体を提供することができる(たとえば、Grefら、*Pharm. Biotechnol.* 10 : 167 (1997)を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0222】

本発明は、また、化学的に修飾された抗IL-TIF抗体および結合パートナー、たとえば前述したように、ポリマーに結合された抗-抗IL-TIF抗体を想定する。

【0223】

その他の投与形態も、当業者により、たとえば、Ansel and Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro(ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995)、およびRanade and Hollinger, Drug Delivery Systems(CRC Press 1996)により考案され得る。

【0224】

本発明は、本明細書に記載されているペプチドまたはポリペプチドを含む組成物を想定する。このような組成物は、キャリアをさらに含むことができる。キャリアは、従来の有機または無機のキャリアであることができる。キャリアの例は、水、緩衝液、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、とうもろこし油などを含む。

【0225】

本発明は、以下の非限定の実施例によってさらに例示される。

【0226】

実施例実施例1 IL-TIFの同定およびクローニング

IL-TIFポリヌクレオチドは、ノーザン解析に基づき組織からPCR法により(実施例2、下記)ならびにさらにヒト混合リンパ球反応(MLR)cDNAを用いたPCR反応でオリゴヌクレオチドZC 25,840 (配列番号:5)およびZC 25,841 (配列番号:6)を用いてPCR法により得られた。サーマルサイクラーの条件は、下記の実施例2に記述されているとおりとした。得られた1082 bpの完全長の配列は、配列番号:1に開示されており、対応するアミノ酸配列は、配列番号:2および配列番号:3に示されている。完全長の新規サイトカインをIL-TIFと名付けた。

【0227】

実施例2 IL-TIFの組織分布

ヒトIL-TIFの組織分布を決定するため、Clontech(Palo Alto, CA)のHuman Multiple Tissue Blot(MTN1、MTN2およびMTN3)を使用してノーザン解析を行った。237 bpのcDNAプローブは、PCR法によって得た。オリゴヌクレオチドZC 25,838 (配列番号:7)およびZC 25,839 (配列番号:8)をプライマーとして使用した。Marathon cDNA Kit(Clontech)および実験手順書を用いて自家合成した、Marathon cDNAを鋳型として使用した。ヒトゲノムDNA(Clontech)に加えて、以下のヒト組織特異的cDNAも同様に使用した: リンパ節、骨髄、CD4+、CD8+、脾臓、およびMLR。サーマルサイクラーの条件は、次の通りとした: 94 で2分を1サイクル; 94 で15秒、62 で20秒、および72 で30秒を35サイクル; 72 で7分を1サイクル; その後、4 に保持。ゲノムDNA反応に加えて、CD4+およびMLR反応では、予想通りのバンドサイズ(237 bp)が4%アガロースゲルで観測された。バンドを切り出し、製造元の使用説明書に従ってGel Extraction Kit(Qiagen, Chatsworth, CA)を使用して精製した。cDNAは、製造元の仕様書に従ってRediprime II DNA標識キット(Amersham, Arlington Heights, IL)を使用して放射活性物質で標識した。プローブは、NUCTRAPプッシュカラム(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)を用いて精製した。EXPRESSHYB(Clontech, Palo Alto, CA)溶液をプレハイブリダイゼーション用におよびハイブリダイズ用の溶液として使用した。ハイブリダイゼーションは、 2×10^6 cpm/mlの標識プローブを用い、55 で一晩行われた。次に、プロットを $2 \times$ SSCおよび0.1% SDS溶液中、室温で洗浄し、次いで $2 \times$ SSCおよび0.1% SDS溶液中、65 で洗浄し、その後、 $0.1 \times$ SSCおよび0.1% SDS溶液中、65 で洗浄した。プロットは、Biomax MSフィルム(Kodak, Rochester, NY)に5日間露光させた。現像後、MTNプロットに転写産物によるシグナルは観測されなかった。

【0228】

8個のハウスキーピング遺伝子に対して標準化された、種々の組織由来のRNAを含んだRN

10

20

30

40

50

A Master Dot Blot(Clontech)も同様に、上述のようにプロービングかつハイブリダイズした。ゲノムDNAでシグナルが観測された。リンパ節でかすかなシグナルがならびに胎児肝臓、骨格筋、および胎盤で非常にかすかなシグナルが観測されたが、これらのシグナルがバックグラウンドを有意に超えるものであったかどうかは結論付けられなかった。

【0229】

実施例3 RT-PCR法を用いたIL-TIF発現細胞の同定

特定のヒト細胞型を単離し、RT-PCR法によりIL-TIF発現をスクリーニングした。B細胞は、新鮮なヒト扁桃から、100 μm径ナイロン製細胞濾過器(Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ)に通し、機械的に破壊させて単離した。B細胞懸濁液は、VarioMACS VS+磁気カラムおよびCD19マイクロビーズ(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)を用いたポジティブ選択により、製造元の使用説明書に従ってCD19+ B細胞に対して濃縮した。T細胞は、ヒトの血漿交換された血液試料から単離された。CD3+ T細胞は、CD3マイクロビーズとVarioMACSポジティブ選択カラムにより精製され、単球は、VarioMACSネガティブ選択カラム(Miltenyi)により、製造元の使用説明書に従って精製された。各集団の試料を蛍光抗体細胞ソーティング(FACS) (Bectin Dickinson, San Jose, CA)解析により染色かつ解析して、濃縮の割合および得られた収率を決定した。CD19+ B細胞は約96%精製され、CD3+ T細胞は約95%精製され、そして単球は約96%精製された。

【0230】

当技術分野において標準的な方法を用い、休止しているかまたは活性化された3種の細胞型の全てから、RNAを調製した。休止している細胞から、上述のカラム調製物より直接的にRNAを調製した。CD19+およびCD3+細胞は、5 ng/ml PMA(Calbiochem, La Jolla, CA)および0.5 μg/ml イオノマイシン(Calbiochem)を含有するRPMI + 10% FBS培地中、細胞を500,000個/mlとして、4時間および24時間培養することで活性化させた。単球は、10 ng/ml LPS(Sigma St. Louis MO)および10 ng/ml rhIFN-g(R & D, Minneapolis, MN)を含有するRPMI + 10% FBS培地中、24時間培養することで活性化させた。細胞を収集し、PBSで洗浄した。製造元の使用説明書に従ってRNeasy Midiprep(商標) Kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて、RNAを細胞沈殿物から調製し、製造元の手順書に従ってSuperscript II(商標) Kit (GIBCO BRL, Grand Island, NY)を用いて、第一鎖cDNAを合成した。

【0231】

オリゴZC 25,838(配列番号:7)およびZC 25,840(配列番号:5)をPCR反応で使用して、上述の試料を、IL-TIF伝達暗号に相当する473 bpの断片対してスクリーニングした。PCR増幅はTaqポリメラーゼ(BRL Grand Island NY)で行い、反応条件は次の通りとした: 94 で15秒、62 で20秒、72 で30秒を35サイクル; 72 で7分を1サイクル; および4 に浸漬。各反応容量50 μlのうち5 μlを0.9%アガロース 0.5×TBEゲル上で泳動して、得られた産物を同定した。下記表5に結果を記述する。PCR産物は、(-)を産物なし、(+)を予想されたPCR産物が目に見えた、(++)をPCR産物の存在がさらに増大した、(+++)を最大のシグナルとしてスコア化した。

【0232】

(表5) RT-PCR法を用いたIL-TIF発現細胞

cDNAの起源	活性化	PCR産物
CD3+細胞	0時間休止	+
	4時間活性化	+++
CD19+細胞	4時間活性化	++
	24時間活性化	+
単球	24時間活性化	-

10

20

30

40

50

【 0 2 3 3 】

これらの結果から、IL-TIF伝達暗号は、休止しているCD3+ T細胞に存在することおよび細胞分裂の活性化にともない増加することが示唆された。また、4時間活性化されたヒトCD19+ B細胞により発現され、24時間活性化されたB細胞では発現が減少するように思われる。活性化された単球では、明らかな伝達暗号は認められなかった。

【 0 2 3 4 】

実施例4 活性化T細胞ライブラリーにおけるhIL-TIF伝達暗号の同定A. CD3+選択ライブラリーの構築のためのベクター

CD3+選択ライブラリーの構築のためのベクターはpZP7NXとした。pZP7NXベクターは、以下のようにして以前に構築された： pZP7ベクター中のDHFR選択マーカのコード領域を、制限酵素NcoIおよびPstI(Boehringer Mannheim)を用いたDNA消化により除去した。消化したDNAを1%アガロースゲル上で泳動し、切り出し、そして製造元の使用説明書に従ってQiagen Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いてゲル精製した。ゼオシン選択マーカのコード領域に相当するDNA断片を、プライマー-ZC 13,946(配列番号:9)およびZC 13,945(配列番号:10)、ならびに鑄型としてpZeoSV2(+)を用いてPCR法により増幅した。プライマー-ZC 13,946(配列番号:9)には制限部位PstIおよびBclIが付加されており、プライマー-ZC 13,945(配列番号:10)には制限部位NcoIおよびSfuIが付加されている。PCR断片を、制限酵素PstIおよびNcoIで切断し、同じ二つの制限酵素で切断後にゲル精製して調製された、pZP7ベクターにクローニングした。このベクターをpZP7Zと名付けた。次に、ベクターpZP7Zを制限酵素BclIおよびSfuIでDNA消化して、ゼオシンのコード領域を除去した。消化したDNAを1%アガロースゲル上で泳動し、切り出し、そして精製し、その後、同じ制限酵素(BclIおよびSfuI)でpZem228ベクターから切断されたネオマイシンのコード領域のDNA断片と連結させた。

【 0 2 3 5 】

DHFR選択マーカのコード領域が、pZem228ベクター由来のネオマイシン選択マーカのコード領域に置換された、この新しいベクターをpZP7Nと名付けた。XhoI部位を含むスタッファー断片をpZP7Nに加えて、高効率のcDNA指向性クローニングに適したベクターを作製した；この新しいベクターをpZP7NXと呼んだ。cDNAに対するベクターを調製するため、pZP7NX 20 µgをEcoRI(Life Technologies Gaithersberg, MD) 20単位およびXhoI(Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) 20単位を用いて37 °Cで5時間消化し、次いで68 °Cに15分間置いた。次に、消化産物を0.8%低融点アガロース 1×TAEゲル上で泳動して、ベクターからスタッファーを分離した。ベクターのバンドを切り出し、製造元の推奨事項に従って「 -アガラーゼ」(New England Biolabs, Beverly, MA)で消化した。下記のCD3+選択cDNAライブラリーを連結するための準備として、エタノール沈殿後、消化したベクターを水に再懸濁させて45 ng/mlとした。

【 0 2 3 6 】

B. 初代ヒト活性化CD3+選択細胞のcDNAライブラリーの調製

イオノマイシン/PMA中で刺激した初代ヒトCD3+選択細胞およそ 1.5×10^8 個を、37 °Cで13時間培養した後、遠心により単離した。Qiagen社(Valencia, CA)の「RNeasy Midi」キットを用いて、総RNAを細胞沈殿物から単離した。CPG社(Lincoln Park, NJ)の「MPG mRNA精製キット」を用いて、mRNAを総RNA 225 µgから単離した。mRNA 3.4 µgを単離し、以下の手順を用いて二本鎖cDNAに変換した。

【 0 2 3 7 】

刺激したヒトCD3+選択細胞から第一鎖cDNAを以下のように合成した。濃度0.34 µg/µlのオリゴd(T)-選択ポリ(A) CD3+ RNA 9 µlおよび制限部位XhoIを含む、1 µg/µl第一鎖プライマー-ZC 18,698(配列番号:11) 1 µgを混合し、65 °Cで4分間加熱し、氷上で冷やして冷却させた。RNA-プライマー混合物に、第一鎖用緩衝液(5×SUPERSCRIPT(登録商標)緩衝液；Life Technologies) 9 µl、100 mM ジチオスレイトール4 µlならびに各10 mMのdATP、dGTP、dTTPおよび5-メチル-dCTPを含有するデオキシヌクレオチド三リン酸溶液(Pharmacia Biotech社) 2 µlを添加して、第一鎖cDNA合成を開始させた。反応混合物を45

で4分間インキュベートした後、200 U/ μ l SuperscriptII(登録商標)、RNase H-逆転写酵素(Life Technologies) 8 μ lを添加した。反応物を45 で45分間インキュベートした後、インキュベーション温度を2分毎に1 の上昇率で50 とし、この温度に10分間、反応物を保持した。あらゆる二次構造を変性させてcDNAのさらなる伸長を可能とするため、反応物を次いで2分間で70 まで加熱し、それから4分間で55 まで低下させ、その後、SuperscriptII(登録商標)RT 2 μ lを添加してさらに15分間インキュベートした後、1分間に1 づつ70 まで上昇させた。取り込まれなかったヌクレオチドはcDNAから、2度、グリコーゲン・キャリア2 μ g、2.0 M酢酸アンモニウムおよび2.5倍容量のエタノールの存在下で沈殿させ、続けて70%エタノール 100 μ lで洗浄することで除去した。第二鎖合成で使用するため、cDNAを水98 μ lに再懸濁させた。

10

【0238】

第二鎖合成は、DNAヘアピン形成をもたらす第二鎖合成の第一鎖プライム化を促進させる条件の下で、第一鎖cDNAに対して行われた。第二鎖反応には、第一鎖cDNA 98 μ l、5 \times ポリメラーゼI緩衝液(100 mM Tris:HCl, pH 7.5, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 50 mM (NH₄)₂SO₄) 30 μ l、100 mMジチオスレイトール2 μ l、各10 mMのデオキシヌクレオチド三リン酸を含有する溶液6 μ l、5 mM b-NAD 5 μ l、3 U/ μ l大腸菌(E.coli)DNAリガーゼ(New England Biolabs社) 1 μ lおよび10 U/ μ l大腸菌(E.coli)DNAポリメラーゼI(New England Biolabs社) 4 μ lが含まれた。反応物を室温でアセンブルさせて、室温で2分間インキュベートした後、3.8 U/ μ l RNase H(Life Technologies) 4 μ lを添加した。反応物を15 で2時間インキュベートした後、室温で15分間インキュベートした。1M TRIS pH7.4 10 μ lを反応物に添加し、フェノール/クロロホルムで2回およびクロロホルムで1回抽出し、次いでTE(10 mM TRIS pH 7.4, 1 mM EDTA) 50 μ lで有機層から逆抽出し、先方の水層とプールして0.3 M酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿させた。沈殿物を70%エタノール 100 μ lで洗浄し、風乾させて、水40 μ lに再懸濁させた。

20

【0239】

ヘアピン構造の一本鎖DNAは、マングベーンヌクレアーゼを用いて切断した。反応混合物には、第二鎖cDNA 40 μ l、10 \times マングベーンヌクレアーゼ緩衝液(Life technologies) 5 μ l、1 \times マングベーンヌクレアーゼ緩衝液で1 U/ μ lに希釈したマングベーンヌクレアーゼ(Pharmacia Biotech社) 5 μ lが含まれた。反応物を37 で45分間インキュベートした。1 M Tris: HCl, pH 7.4 10 μ lを添加して反応を停止させた後、続いて上述のようにフェノール/クロロホルムおよびクロロホルムによる抽出を行った。抽出後、cDNAを0.3 M酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿させた。沈殿物を70%エタノール100 μ lで洗浄し、風乾させて、水38 μ lに再懸濁させた。

30

【0240】

再懸濁させたcDNAをT4 DNAポリメラーゼで平滑末端化した。水38 μ lに再懸濁させたcDNAを、5 \times T4 DNAポリメラーゼ緩衝液(250 mM Tris:HCl, pH 8.0, 250 mM KCl, 25 mM MgCl₂) 12 μ l、0.1 Mジチオスレイトール2 μ l、各10 mMのデオキシヌクレオチド三リン酸を含有する溶液6 μ lおよび1 U/ μ l T4 DNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim社) 2 μ lと混合した。15 で45分インキュベーション後、TE 30 μ lを添加して反応を停止させた後、続いて上述のようにフェノール/クロロホルムおよびクロロホルムによる抽出を行い、そしてTE 20 μ lで逆抽出した。DNAをPellet Paint(商標) (Novagen)キャリア2 μ lおよび0.3 M酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿させて、水11 μ lに再懸濁させた。

40

【0241】

上述のcDNAの5'末端にEco RIアダプタを連結させて、発現ベクターへのクローニングを可能とさせた。cDNA 11 μ lおよび65 pmole/ μ l Eco RIヘミリン酸化アダプタ(Pharmacia Biotech社) 4 μ lを5 \times リガーゼ緩衝液(Life Technologies) 5 μ l、10 mM ATP 2 μ lおよび1 U/ μ l T4 DNA リガーゼ(Life Technologies) 3 μ l、10 \times ライゲーション緩衝液(Promega社) 1 μ l、水 9 μ lと混合した。1 \times 緩衝液でさらに希釈して、ペレット・ペイント(pellet paint)が沈殿するのを防ぐことができた。反応物を水浴中、9時間にわたり10 から22 までの温度上昇率で9時間インキュベートし、続いて25 で45分間インキュベ

50

ートした。反応は、68 °Cで15分間のインキュベーションにより停止させた。

【0242】

発現ベクターへのcDNAの指向性クローニングを容易にするため、cDNAをXhoIで消化し、結果として5'側にEcoRI接着末端および3'側にXhoI接着末端を有するcDNAが得られた。cDNAの3'末端のXhoI制限部位は、ZC 18698プライマーを用いて以前に導入されていた。制限酵素による消化は、上述のライゲーション混合物35 μl、10×H緩衝液(Boehringer Mannheim社) 6 μl、2 mg/ml BSA(Biolabs社) 1 μl、水17 μlおよび40 U/μl XhoI(Boehringer Mannheim) 1.0 μlを含む反応混合物中で行われた。消化は37 °Cで1時間行われた。68 °Cで15分間のインキュベーションにより反応を停止させ、続いて上述のようにエタノール沈殿し、洗浄し、乾燥させて、水30 μlに懸濁させた。

10

【0243】

再懸濁したcDNA溶液を5分間で65 °Cまで加熱して、氷上で冷却し、5×ゲル・ローディング色素(Research Genetics社) 5 μlを添加し、cDNAを0.8%低融点アガロース 1×TAEゲル(SEA PLAQUE GTG(商標)低融点アガロース; FMC社)にロードして電気泳動した。混入しているアダプタと下記の長さが0.6 KbのcDNAをゲルから切り出した。電極を逆にして、溶融アガロースを添加してその溝穴を満たし、緩衝液を変えて、cDNAを、もとのレーン近傍に濃縮されるまで電気泳動した。濃縮されたcDNAを含むゲル領域を切り出し、マイクロチューブ中に入れて、15分間に65 °Cまで加熱させてアガロースを融解させた。試料を45 °Cに平衡化した後、1 U/μl T4 DNAリガーゼI(Biolabs社) 2 μlを添加し、混合物を45 °Cで90分間インキュベートしてアガロースを消化した。インキュベーション後、10分の1容量の3 M酢酸ナトリウムを試料に添加して、混合物を氷上で15分間インキュベートした。試料を14,000 ×gにて室温で15分間遠心して、未消化のアガロースを取り除き、cDNAをエタノール沈殿させ、70%エタノールで洗浄し、風乾させて、水40 μlに再懸濁させた。ベクターに対するcDNAの最適比率を決定するため、いくつかのライゲーション反応を組み立ててエレクトロポレーションを行った。簡単に言えば、5×T4リガーゼ緩衝液(Life Technologies) 2 μl、10 mM ATP 1 μl、EcoRI-XhoIで消化したpZP7NX 1 μl、0.25 U/μlに希釈されたT4 DNAリガーゼ(Life Technologies) 1 μl、水で10 μlとして、cDNA 0.5、1、2または3 μlを4つの個別のライゲーション反応物中に混合して、22 °Cで4時間、68 °Cで20分間インキュベートし、酢酸ナトリウム-エタノール沈殿させ、洗浄し、乾燥させて10 μlに再懸濁させた。各ライゲーション反応物から1 μlだけをDH10b ElectroMax(商標)エレクトロコンピテント細菌(Life Technologies) 40 μlに、0.1 cm径のキュベット(Biorad)とGenepulser(Biorad)を用い、パルスコントローラを2.5 KV、251 F、200 μsに設定してエレクトロポレーションを行った。これらの細胞をすぐにSOCブロス(Manniatissら、前掲)1 mlに再懸濁させ、続いて保存剤として50%グリセロール-SOC溶液500 μlに再懸濁させた。これらの「グリセロール・ストック」をいくつかの分割単位(アリコート)として-70 °Cで凍結させた。それぞれの一定分量(アリコート)を融解し、アンピシリンを100 μg/mlとして添加したLB寒天プレート上に連続的にプレーティングした。コロニー数から、pZP7NXベクターに対するCD3+ cDNAの最適比率が45 ngに対して1 μlであることが示唆された; このライゲーション反応により、450万個の一次コロニーが得られた。

20

30

【0244】

C. 活性化T細胞ライブラリーにおけるIL-TIF伝達暗号のPCR法による同定

オリゴZC 25,838(配列番号:7)およびZC 25,840(配列番号:5)を用いてPCRを行い、IL-TIFクローンに相当する473 bpの産物が存在するかどうか上記のライブラリーをスクリーニングした。PCR増幅はTaqポリメラーゼ(BRL Grand Island NY)を用いて、次の条件で行った: 94 °Cで15秒、62 °Cで20秒、72 °Cで30秒を30サイクル; 72 °Cで7分を1サイクル; および4 °Cに浸漬。各反応容量50 μlのうち5 μlを0.9%アガロース 0.5×TBEゲル上で泳動して、得られた産物を同定した。下記表6に結果を記述する。PCR産物は、(-)を産物なし、(+)を予想されたPCR産物が目に見えた、(++)をPCR産物の存在がさらに増大した、(+++)を最大のシグナルとしてスコア化した。

40

【0245】

50

(表6) 活性化T細胞ライブラリーにおけるIL-TIF伝達暗号の同定

鋳型	PCR産物
1 ng 活性化ライブラリー	+
10 ng 活性化ライブラリー	++
100 ng 活性化ライブラリー	+++
100 ng ベクター対照	-
鋳型なしの対照	-

10

【0246】

これらの結果から、活性化CD3+ T細胞でIL-TIF cDNAおよび従って伝達暗号の存在が示唆される。

【0247】

実施例5 サザンプロット解析

EVO Mammalian Group/EcoRI Southern Blots (Quantum Biotechnologies社、Montreal, Canada)を用いてサザンプロットを行い、オルソログなIL-TIF配列の存在について判定した。IL-TIFプローブは、Prime-It II Random Primer 標識キット(Stratagene, La Jolla, CA)を用い、実施例2に記述されているようにして、IL-TIF断片25 ngを標識することにより作製した。ハイブリダイゼーションは、 5×10^5 cpm/mlのプローブとともにExpresshy b (Clontech)を用い、65 °Cで一晩の条件で行った。45 °Cの0.2×SSC、0.1% SDSでストリンジェントな洗浄を行った。プロットをX線フィルムに-80 °Cで一晩露光しそれから解析した。

20

【0248】

その結果、マウスゲノムDNAに対して約7および20 kbに見られる薄いバンドとともにヒトゲノムDNA試料で約1 kbの濃いバンドが示され、IL-TIFの推定上のマウス相同体の存在が実証された。

【0249】

マウスのcDNA配列は、標準的な方法を用いてクローニングされた。その配列が配列番号:37に示されており、対応するポリペプチド配列が配列番号:38に示されている。

30

【0250】

実施例6 IL-TIFの染色体位置および配置

IL-TIFは、「Stanford G3 Radiation Hybrid Mapping Panel」(Research Genetics社、Huntsville, AL)の商用版を用いて第12染色体にマップされた。「Stanford G3 RH Panel」には、ヒト全ゲノムからなる83個の放射線ハイブリッドクローンのそれぞれ由来のDNAと、さらに2個の対照DNA(RMドナーおよびA3レシピエント)が含まれる。公に利用可能なWWWサーバー(<http://shgc-www.stanford.edu>)により、マーカーおよび遺伝子の染色体局在化が可能となる。

【0251】

IL-TIFを「Stanford G3 RH Panel」でマップするため、反応液20 μlを、PCRに適合した96-ウェル・マイクロタイター・プレート(Stratagene, La Jolla, CA)の中に用意して、「RoboCycler Gradient 96」サーマル・サイクラー(Stratagene)に入れて使用した。85個のPCR反応液はそれぞれ、10×KlenTaq PCR反作用緩衝液(CLONTECH Laboratories社、Palo Alto, CA) 2 μl、dNTP混合物(各2.5 mM, PERKIN-ELMER, Foster City, CA) 1.6 μl、センス・プライマー-ZC 26,414(配列番号:12) 1 μl、アンチセンス・プライマー-ZC 26,415(配列番号:13) 1 μl、「RediLoad」(Research Genetics社、Huntsville, AL) 2 μl、50×Advantage KlenTaqポリメラーゼ混合物(Clontech Laboratories社) 0.4 μl、個々のハイブリッドクローンまたは対照由来のDNA 25 ngおよび総容量を20 μlとするための脱イオン水で構成された。反応液に等量のミネラルオイルを重層して密封した。PCRサイ

40

50

クラーの条件は、次の通りとした：最初に94 で5分の変性を1サイクル、94 で45秒の変性、66 で45秒のアニーリングおよび72 で1分15秒の伸長を35サイクル、続いて最後に72 で7分の伸長を1サイクル。反応物を2%アガロースゲル(EM Science, Gibbstown, NJ)上での電気泳動により分離し、エチジウムブロマイドを用いた染色により可視化した。

【0252】

その結果、IL-TIFは第12染色体マーカー-SHGC-17533に対して、LODスコアが12を超えかつそのマーカーからの距離cR_10000が0となってその連鎖が示された。周辺の遺伝子およびマーカーを使用したところ、IL-TIFは染色体領域12q14~q24.3に位置付けられる。

【0253】

実施例7 CEE-タグ付(tagged) IL-TIFを作製するためのコンストラクト

Kozak配列およびIL-TIFの、その停止コドンを除くコード領域を含んだPCR断片が産生されるように、オリゴヌクレオチドを設計した。これらのオリゴヌクレオチドは、5'末端にKpnI部位および3'末端にBamHI部位を有するように設計し、C末端にGlu-Glu(配列番号:14)のタグが付いたタンパク質の哺乳動物発現用の本発明者らの標準ベクター-pHZ200-CEEへのクローニングを容易とした。pHZ200ベクターにはMT-1プロモーターが含まれる。

【0254】

PCR反応はTurbo Pfuポリメラーゼ(Stratagene)を用いて行い、IL-TIF cDNA断片を増幅させた。PCR反応には、ヒトIL-TIFの鋳型ポリヌクレオチド(配列番号:1)約20 ng、ならびにオリゴヌクレオチドZC28590(配列番号:16)およびZC28580(配列番号:17)を使用した。PCR反応の条件は、次の通りとした：95 で5分；95 で60秒、55 で60秒、および72 で60秒を30サイクル；ならびに72 で10分；その後、4 に保持。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動により分離し、QiaQuick(商標)(Qiagen)ゲル抽出キットを用いて精製した。単離された、約600 bpのDNA断片を、KpnIおよびBamHI(Boehringer-Mannheim)で消化し、上述のようにゲル精製し、KpnIおよびBamHIで予め消化しておいたpHZ200-CEEに連結した。

【0255】

ライゲーション反応物の約1 μ lを、製造元の使用方法に従ってDH10B ElectroMax(商標)コンピテント細胞(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)にエレクトロポレーションし、100 μ g/mlアンピシリンを含有するLBプレート上にプレーティングし、一晚インキュベートした。コロニーを選び取り、オリゴヌクレオチドZC28,590(配列番号:16)およびZC28,580(配列番号:17)を用いて、上述のPCR条件で、PCR法によりスクリーニングした。次に、挿入断片を含むコロニーを配列決定して、誤りのないIL-TIFの挿入断片であるか確認した。配列解析により検証された、正しいpHZ200-IL-TIF-CEEコンストラクトの大量調製(Maxiprep)を行った。

【0256】

実施例8 IL-TIF-CEEポリペプチドのトランスフェクションおよび発現

BHK 570細胞(ATCC番号CRL-10314)を、100 mm径の培養皿あたり、無血清(SF)のDMEM培地(DMEM, Gibco/BRL高グルコース)(Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 6.4 ml中に、細胞を約 1×10^6 個としてプレーティングした。細胞に上述の(実施例7)IL-TIF-CEEを含む発現プラスミドを、製造元の使用説明書に従って無血清(SF)DMEM中で、Lipofectin(商標)(Gibco BRL)を用いてトランスフェクトした。

【0257】

細胞を37 で約5時間インキュベートし、その後DMEM/10%ウシ胎児血清(FBS)(Hyclone, Logan, UT) 10 mlを添加したこの培養皿を37 、5% CO₂で一晩インキュベートし、翌日、DMEM/10% FBS培地を選択培地(1 μ Mメトトレキセート(MTX)を加えた5% FBS/DMEM)と交換した。

【0258】

トランスフェクションから約7~10日後に、細胞またはコロニーのプールを機械で12-ウェルプレートの5 μ M MTXを加えた5% FCS/DMEM 1 ml中に選び取って、それからコンフルエントとなるまで増殖させた。その後、細胞を、10 μ M MTXを加えた5% FCS/DMEM中で少

10

20

30

40

50

なくとも14日間インキュベートした。その後、陽性を示しているクローン性のコロニーおよびプール由来の培養上清をSDS-PAGEおよびウエスタン解析により、発現レベルについて試験した。高発現性のクローンまたはプールを選び取って、細胞により発現されるIL-TIF-CEEを精製する(実施例9)ための培養上清を十分に産生させるため増殖させた。

【0259】

実施例9 BHK 570細胞からのIL-TIF-CEEの精製

特に断りのない限り、操作は全て4で行った。以下の手順は、C末端のGluGlu(EE)タグ(配列番号:14)を含むIL-TIFポリペプチドを精製するために利用した。プロテアーゼ阻害剤の溶液を、IL-TIF-CEEを含有する濃縮した培養上清(実施例8)に、最終濃度が2.5 mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA, Sigma Chemical社 St. Louis, MO)、0.003 mMロイペプチン(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN)、0.001 mMペプスタチン(Boehringer-Mannheim)および0.4 mMペファブロック(Pefabloc)(Boehringer-Mannheim)となるまで添加した。

【0260】

約100 mlの抗-EE(抗体)G-セファロース(下記のように調製した)充填剤(column)をWaters AP-5.5 cm x 10 cmのガラスカラム中に流し込んだ。このカラムを流速充填し、BioCad Sprint(PerSeptive BioSystems, Framingham, MA)に取り付けて、リン酸緩衝生理食塩水(PBS) pH 7.4で平衡化した。濃縮した培養上清を0.2ミクロン(μm)の無菌濾過膜に通し、pHを7.4に調整し、それから約1 ml/分の流速で終夜、カラムに添加した。カラムをリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4)の10カラム容量(CV)で洗浄し、0.1 mg/ml EEペプチド(Anaspec, San Jose, CA)を含有するPBS (pH 6.0) 200 mlにより、5 ml/分の流速で栓(plug)溶出させた。使用したEEペプチドは、配列EYMPME(配列番号:14)を有する。溶出クロマトグラフィーの全体にわたり、分画液5 mlを回収し、280および215 nmの吸光度を監視した; 素通りおよび洗浄液のプールも確保して分析した。EEポリペプチドの溶出ピークの分画を、SDS-PAGE 銀染色法およびHRP結合抗-EE抗体を用いたウエスタン・プロット法により、標的タンパク質について分析した。関心のあるポリペプチドの溶出分画をプールし、製造元の使用説明書に従って10,000ダルトンの分子量分画膜の遠心式濃縮器(Millipore, Bedford, MA)を用いて60 mlから5.0 mlまで濃縮した。

【0261】

IL-TIF-CEEポリペプチドを遊離型EEペプチドおよび混入しているあらゆる同時精製タンパク質から分離するため、プールした濃縮分画を、平衡化した1.5 x 90 cm Sephadex S200 (Pharmacia, Piscataway, NJ)カラムでのサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。この分画は、BioCad Sprintを用いて、1.0 ml/分の流速でPBSに溶解させて添加した。クロマトグラフィーの全体にわたり、分画液1.5 mlを回収し、280および215 nmの吸光度を監視した。ピークの分画をSDS-PAGE 銀染色法により特徴付けて、最も精製された分画だけをプールした。この材料を精製IL-TIF-CEEポリペプチドとした。

【0262】

この精製材料を最後にActiClean Etox (Sterogene)カラム4 mlにかけて、残存しているすべての内毒素を除去した。この試料をPBSで平衡化した重力カラムに4回通し、次にカラムを単一容量のPBS 3 mlで洗浄して、この洗浄液を「清浄化」試料とプールした。次いで、この材料を0.2ミクロン(μm)の無菌濾過膜に通し、分注するまで-80 に保存した。

【0263】

ウエスタンプロット後、クマシーブルーおよび銀染色したSDS-PAGEゲルでは、IL-TIF-CEEポリペプチドは、二本の強いバンドと二本の弱いバンドであった。精製材料のタンパク質濃度は、BCA分析法(Pierce, Rockford, IL)により行い、標準的な手順に従って、タンパク質を分注し、-80 に保存した。ウエスタンプロット解析では、全てのバンドがウサギ抗IL-TIF-ペプチド抗体と免疫反応性であった(実施例16)。四本のバンドは、IL-TIFポリペプチドの異なる糖鎖型に相当している可能性がある。

【0264】

抗-EE(抗体)セファロースを調製するため、500 ml容量のNalgene 0.45ミクロン(μm)フィルターユニットを用いて、ベッド容量100 mlのプロテインG-セファロース(Pharmacia,

10

20

30

40

50

Piscataway, NJ)を、0.02%アジ化ナトリウムを含有するPBS 100 mlで3回洗浄した。ゲルを6.0倍容量の200 mM トリエタノールアミン溶液, pH 8.2 (TEA, Sigma, St. Louis, MO)で洗浄し、抗体900 mgを含有する等量のEE抗体溶液を添加した。4 で一晩インキュベーション後、上述の200 mM TEA 5倍容量で樹脂を洗浄することで未結合抗体を除去した。この樹脂を2倍容量のTEAに再懸濁させ、適用な容器に移し替えて、TEAに溶解したジメチルピミリミド-2塩酸塩(dimethylpimilimidate-2HCl) (Pierce, Rockford, IL)を、終濃度36 mg/mlのプロテインG-セファローズゲルに添加した。ゲルを室温で45分間揺り動かし、それから液体を上述のフィルターユニットを用いて除去した。次に、ゲルの非特異部位を、200 mM TEAに溶解した20 mMエタノールアミン溶液の5倍容量と室温で10分間インキュベートすることでブロッキングした。次に、ゲルを、0.02%アジ化ナトリウムを含有するPBS 5倍容量で洗浄し、この溶液に入れて4 で保存した。

【0265】

実施例10 タグなし(Non-tagged) IL-TIF組換えアデノウイルスの作製

ヒトIL-TIF(配列番号:1; 配列番号:2)のタンパク質コード領域は、FseIおよびAsclI認識部位がそれぞれ5'および3'末端に付加されたプライマーを用いてPCR法により増幅された。PCRプライマーZC26665(配列番号:20)およびZC26666(配列番号:21)を、完全長のIL-TIF cDNAを含むpINCY鑄型プラスミドとともに、次のPCR反応のなかで使用した: 95 で5分を1サイクル; 続けて95 で0.5分、58 で0.5分、および72 で0.5分を18サイクル; 続けて72 で7分; 続けて4 に浸漬。TAE緩衝液に入れた1.2%(低融点) SeaPlaque GTG (FMC, Rockland, ME)ゲルに、PCR反応産物を添加した。IL-TIF PCR産物をゲルから切り出し、このゲル片を70 で融解させ、等量のTris緩衝フェノールで2回抽出し、エタノール沈殿させた。

【0266】

540 bpのIL-TIF PCR産物をFseIおよびAsclI酵素で消化した。このcDNAを1%低融点SeaPlaque GTG(商標)(FMC, Rockland, ME)ゲルで単離した後、ゲルから切り出し、このゲル片を70 で融解させ、等量のTris緩衝フェノールで2回抽出し、エタノール沈殿させた。このcDNAを水10 μ lに再懸濁させた。

【0267】

このIL-TIF cDNAを、改変型pAdTrack CMV (He, T-C.ら、PNAS 95: 2509~2514, 1998)のFseI-AsclI部位にクローニングした。このコンストラクトには、GFPマーカ-遺伝子が含まれる。GFPを発現させるCMVプロモーターをSV40プロモーターと置換し、SV40ポリアダニル化シグナルをヒト増殖ホルモンのポリアダニル化シグナルと置換した。さらに、野生型のポリリンカーをFseI、EcoRV、およびAsclI部位と置換した。pAdTrack CMVのこの改変型をpZyTrackと名付けた。ライゲーションは、Fast-Link(商標) DNAライゲーションおよびスクリーニングキット(Epicentre Technologies, Madison, WI)を用いて行った。IL-TIF挿入断片を含むクローンは、標準的な少量調製(mini prep)による解析により同定した。クローニングされたIL-TIF cDNAを配列決定して、PCR反応の間に誤りが導入されていないことを検証した。プラスミドを直鎖化するため、pZyTrack IL-TIFプラスミド約5 μ gをPmeIで消化した。この直鎖化プラスミド約1 μ gをスーパーコイル状のpAdEasy(Heら、前掲) 200 ngとともに、BJ5183細胞に同時形質転換した。この同時形質転換は、Bio-Rad Gene Pulserを2.5 kV、200 および25 mFaで用いて行われた。同時形質転換物の全てを25 μ g/mlカナマイシンを含有するLBプレート4枚にプレティングした。一番小さいコロニーを選び取り、LB/カナマイシン中で増殖させて、組換えアデノウイルスDNAを標準的なDNAの少量調製(miniprep)手順により同定した。組換えアデノウイルスDNAのFseI-AsclIによる消化が、IL-TIFの存在により確認された。組換えアデノウイルスの少量調製(miniprep)DNAをDH10Bコンピテント細胞に形質転換し、キット使用説明書に従ってQiagen maxi prepキットを用いて、DNAを調製した。

【0268】

組換えDNAによる293a細胞のトランスフェクション

組換えアデノウイルスDNA約5 μ gを、20~30 UのPacIを含有する反応容量100 μ l中に

て37℃で3時間、PacI酵素(New England Biolabs)で消化した。消化したDNAを等量のフェノール/クロロホルムで2回抽出し、エタノールで沈殿させた。DNA沈殿物を脱イオン水5 µlに懸濁させた。トランスフェクションの前日に播種し、60~70%のコンフルエントとなるまで増殖させた。T25フラスコのQBI-293A細胞(Quantum Biotechnologies社、Montreal, Qc. Canada)に、PacIで消化したDNAをトランスフェクトした。PacI消化DNAを無菌HBS溶液(150 mM NaCl, 20 mM HEPES)で総容量50 µlまで希釈した。別のチューブのなかで、DO TAP(Boehringer Mannheim, 1 mg/ml) 25 µlをHBS溶液で総容量100 µlまで希釈した。このDNA溶液をDOTAP溶液に添加し、ピペットで吸い上げたり吐き出したりして穏やかに混合し、室温に15分間静置した。293A細胞から培地を除去し、1 mMピルビン酸ナトリウム(GibcoBRL)、0.1 mM MEM非必須アミノ酸液(GibcoBRL)および25 mM HEPES緩衝液(GibcoBRL)を含有する無血清のMEM (Gibco BRL)培地5 mlで洗浄した。無血清MEM 5 mlを293A細胞に添加して、37℃に保持した。T25フラスコの293A細胞にDNA/脂質混合物を1滴ずつ滴下し、穏やかに混ぜて37℃で4時間インキュベートした。4時間後、DNA/脂質混合物を含有する培地を吸い出して、5%ウシ胎児血清を含有する完全MEM 5 mlと置換した。トランスフェクトした細胞を、緑色蛍光タンパク質(GFP)発現とフォーカス形成、即ち、ウイルスプラークについて監視した。

10

【0269】

293A細胞に組換えアデノウイルスDNAをトランスフェクションしてから7日後に、細胞はGFPタンパク質を発現し、フォーカスを形成し始めた。これらのフォーカスはウイルス「プラーク」であり、細胞スクレーパーを用いて293A細胞の全てを回収するようにして、未精製のウイルス溶菌液を回収した。この溶菌液を50 mlのコニカルチューブに移した。細胞から大部分のウイルス粒子を放出させるため、ドライアイス/エタノール槽と37℃の湯浴槽のなかで凍結/融解サイクルを3回行った。

20

【0270】

組換えアデノウイルス(rAdV)の増幅

未精製の溶菌液を増幅(一次(1°)増幅)して、zsig45 rAdV溶菌液の作業用「ストック」を得た。293A細胞がほぼコンフルエント(80~90%)となった10 cm径プレート10枚を20時間前に用意し、未精製のrAdV溶菌液200 mlを各10 cm径プレートに添加して、白色顕微鏡下でCPEをおよび蛍光顕微鏡下でGFP発現を調べながら48~72時間監視した。293A細胞の全てでCPE(細胞変性効果)が示された時点で、この一次(1°)ストック溶菌液を回収して、未精製のrAdV溶菌液について記述されているように凍結/融解サイクルを行った。

30

【0271】

zsig46 rAdVの二次(2°)増幅液は、次のように得た: 293A細胞の15 cm径の組織培養皿20枚を、この細胞が80~90%コンフルエントとなるように準備した。5% MEM培地のほとんど20 mlを除去し、各培養皿に一次(1°)増幅rAdV溶菌液300~500 mlを植菌した。48時間後、293A細胞はウイルス産生により溶解され、この溶菌液を250 mlのポリプロピレン製の遠心ボトルに回収して、rAdVを精製した。

【0272】

rAdV/cDNA精製

細胞を全て溶解させるため、界面活性剤NP-40を未精製溶菌液の入ったボトルに、終濃度が0.5%となるまで添加した。ボトルを回転台に置き、ボトルを落とさないようにして可能な限り速く10分間撹拌した。細胞残渣は、20,000×Gで15分間遠心して沈殿させた。上清を250 mlのポリカーボネイト製の遠心ボトルに移して、0.5倍容量の20% PEG8000/2.5M NaCl溶液を添加した。このボトルを氷上で一晚振盪した。このボトルを20,000×Gで15分間遠心し、上清を漂白溶液のなかに捨てた。スピンマークの両側のボトルの壁面に沿った二本の垂直線の白色沈殿物が沈殿したウイルス/PEGである。無菌の細胞スクレーパーを用いて、ボトル2本から得たこの沈殿物をPBS 2.5 mlに再懸濁させた。このウイルス溶液を2 mlの微量遠心チューブに入れて、遠心機中、14,000×Gで10分間遠心して、さらに細胞残渣を除去した。2 mlの微量遠心チューブの上清を15 mlのポリプロピレン製のスナップキャップ付チューブに移して、塩化セシウム(CsCl)で密度を1.34 g/mlに調整した。ウイル

40

50

ス溶液の体積を推定し、CsCl を1 mlあたり0.55 g添加した。CsClが溶解すると、この溶液1 mlの重量は1.34 gとなった。この溶液をポリカーボネイト製の肉厚遠心管3.2ml (Beckman)に移し、TLA-100.4ローターを使ってBeckman Optima TLX微量超遠心機中で、80,000rpm (348,000 × G)にて25 で3~4時間遠心した。ウイルスは白色のバンドを形成した。ワイドボア・ピペットチップを使い、このウイルスバンドを回収した。

【0273】

勾配によって得られたウイルスは、細胞に対して使用可能とされる前に除去する必要があるCsClを大量に含んでいる。Sephadex G-25M (Pharmacia)が予め充填されたPharmacia PD-10カラムを使用して、ウイルス調製物を脱塩した。カラムはPBS 20 mlで平衡化した。ウイルスを添加して、カラムのなかに流し込んだ。カラムにPBS 5 mlを加えて、8~10滴からなる分画を集めた。各分画の50倍希釈液の光学密度を、分光光度計にて260 nmで決定した。分画7~10に、明らかな吸収のピークがあった。これらの分画をプールし、25倍希釈液の光学密度(OD)を決定した。OD値をウイルス濃度に換算するのに次式を用いた： $(260 \text{ nmのOD値})(25)(1.1 \times 10^{12}) = 1 \text{ mlあたりのウイルス粒子}$ 。IL-TIF rAdVの25倍希釈液のOD値は0.134であったので、ウイルス濃度 3.7×10^{12} ウイルス粒子/mlが得られた。

10

【0274】

ウイルスを保存するため、この精製ウイルス液にグリセロールを終濃度15%まで添加し、穏やかにしかし効果的に混合し、分注して-80 に保存した。

【0275】

50% CPEの組織培養感染量(TCID₅₀) ウイルス滴定法

20

Quantum Biotechnologies社(Montreal, Qc. Canada)により開発された実験手順に従って、組換えウイルスの感染価を測定した。簡単に言えば、96-ウェル組織培養プレート2枚に、各組換えウイルスを測定するため、2%ウシ胎児血清を含有するMEM中に1ウェルあたり293A細胞 1×10^4 個を播いた。24時間後、各ウイルスの10倍希釈液を 1×10^{-2} から 1×10^{-14} まで、2%ウシ胎児血清を含有するMEM中で作製した。各希釈液100 μlをそれぞれについて20ウェルに入れた。37 で5日後、細胞変性効果(CPE)が陽性か陰性かウェルを測定して、「プラーク形成単位/ml」(PFU)値を算出する。

【0276】

使用したTCID₅₀式は、上記のQuantum Biotechnologies社の手順に従った。力価(T)は、使用したウイルスを 10^{-2} から 10^{-14} まで希釈したプレートから決定し、感染から8日後に測定した。各希釈段階で、ウェル総数あたりのCRE陽性ウェルの比率(R)を決定する。

30

【0277】

非希釈ウイルス試料の力価の算出：ファクター「F」 $= 1+d(S-0.5)$ ；式中「S」は比率(R)の総和であり；「d」は希釈系列のLog10であり、例えば、10倍希釈系列の場合、「d」は1に等しい。非希釈試料の力価は、 $T = 10^{(1+F)} = \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ である。TCID₅₀/mlをpfu/mlに変換するには、力価(T)計算の指数から0.7を引く。IL-TIFアデノウイルスは、力価 2.8×10^{11} pfu/mlを有していた。

【0278】

実施例11 IL-TIFポリペプチドのインピボでの影響

マウス(雌、C57B1、8週齢；Charles River Labs, Kingston, NY)を三群に分けた。第0日に、親アデノウイルスまたはIL-TIFアデノウイルス(実施例10)を、第一群(n=8)および第二群(n=8)に、それぞれ、尾静脈経由で、各マウスが容量約0.1 ml中に粒子約 1×10^{11} 個の用量を受けるとして投与した。第三群(n=8)は処置を受けなかった。第12日に、マウスの体重を測定し、そのマウスから採血した。試料を完全血球検査(CBC)および血液生化学検査について分析した。好中球および血小板総数の統計学的に有意な上昇が、親アデノウイルス処置群と比べてIL-TIFアデノウイルス投与群の血液試料で検出された。同様に、第12日目に、リンパ球総数が親アデノウイルス処置群と比べてIL-TIFアデノウイルス投与群では有意に減少したが、第21日までに正常レベルにまで回復した。さらに、IL-TIFアデノウイルス処置マウスは体重が減少したが、親アデノウイルス処置マウスは体重が増加した。好中球および血小板総数の上昇、ならびに体重減少は、対照群と比べてもなお有意であ

40

50

る。肝臓化学検査により、グロブリンの濃度増加およびアルブミンの濃度減少が示されたが、このことはTNF-aにより誘導される炎症応答の観測結果と一致する。

【0279】

この結果から、IL-TIFは造血、即ち、インビボでの血液細胞形成に影響を及ぼすことが示唆された。従って、IL-TIFは、異なる、血液の前駆細胞、始原細胞または幹細胞に影響を及ぼす生物活性を有し、特定系列におけるある種の分化血液細胞を結果的に増加させるかまたは減少させる可能性があると思われる。例えば、IL-TIFは、リンパ球を減少させるように思われたが、これはリンパ球様細胞を生じさせる委任前駆細胞の阻害による可能性が高い。この所見は、骨髄系幹細胞の増殖および/または成長に対するIL-TIFの阻害効果(実施例23)と一致し、IL-TIFが貧血症、感染症、炎症、および/または免疫疾患に、これらの過程に關与する血液細胞に影響を及ぼすことで關与している可能性があるという考えを支持するものであった。抗IL-TIF抗体、結合パートナー、または可溶性受容体アンタゴニストのような、IL-TIFに対するアンタゴニストは、これらの疾患で治療薬(therapeutic reagent)として利用できると思われる。IL-TIFは、末梢血または肝臓のような他の血管新生化組織中の血小板の放出および生存に直接的に影響を及ぼす可能性もある。すなわち、造血のループ(幹細胞の分化、増殖)を介して機能するほか、IL-TIFは、末梢血またはいくつかの標的組織および器官で血小板および好中球の放出、安定化または減少に直接的に影響を及ぼす可能性がある。IL-TIFは同様に、末梢血中の顆粒球の数にも影響を及ぼした。造血の骨髄外部位(例えば、肝臓)も同様に、IL-TIF作用の標的である。

10

【0280】

さらに、マウスでIL-TIFアデノウイルスを用いたこれらの実験から、IL-TIFを過剰発現させると、インビボで好中球および血小板のレベルを増加させることが示唆された。好中球および血小板の増加は、本明細書に記述される特定の治療用途には望ましいが、これらの細胞の反応性の増加または慢性的な上昇は、心疾患に關与している可能性があると思われる。IL-TIFに対するアンタゴニスト、例えば、抗体またはその可溶性受容体は、これらの疾患で治療薬(therapeutic reagent)として利用することができると思われる。これはK562細胞で見られた所見(実施例12)と矛盾するように思われるが、特定タンパク質の異なる活性がインビボと対比してインビトロで觀察されることは珍しいことではない。動物システムの全体でIL-TIFに対する応答に關与する他の因子(例えば、サイトカインおよび修飾遺伝子)が存在しているということが考えられる。それでもなお、これらのデータから、造血におけるIL-TIFの關与が強く支持される。従って、IL-TIFおよびその受容体は、炎症、免疫不全症、感染症、貧血症、造血器腫瘍およびその他のガンなどのような、さまざまな疾患の診断および治療に適した試薬/標的である。

20

30

【0281】

実施例12 IL-TIFポリペプチドは細胞傷害試験でK562細胞の増殖を阻害する

K-562細胞株(CRL-243, ATCC)は、細胞傷害試験のインビトロ標的として非常に高感度な細胞株として広範囲に及ぶ用途を得ている。K-562芽球細胞は、赤血球系、顆粒球系および単球系の認識可能な前駆細胞に自発的に分化する、多能性の、造血器悪性腫瘍細胞である(Lozzio, BBら、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166: 546 ~ 550, 1981)。

【0282】

K562細胞を、96-ウェル組織培養集団(Costar)のウェルあたり、ピルビン酸塩および10%血清(HyClone)を添加したフェノール不含DMEM増殖培地(Life Technologies)中に、細胞を5,000個としてプレATINGした。翌日、ヒト組換えIL-TIF(実施例19)、BSA対照またはレチノイン酸(K562細胞に細胞傷害性であることが知られている)を添加した。72時間後、広く使用されている、ミトコンドリア活性および細胞増殖の指標である生体染色MTT(Sigma, St Louis, MO)を終濃度0.5 mg/mlとして細胞に添加した。MTTは、ミトコンドリア脱水素酵素により紫色のホルマザン誘導体に変換される。4時間後、変換されたMTTは、ウェルに等量の酸性イソプロパノール(0.04 N塩酸の無水イソプロパノール溶液)を添加することで可溶化した。吸光度は、650 nmでバックグラウンドを除去して、570 nmで測定した。この実験設定では、吸光度は細胞の生存を反映する。表7に示される結果は、細胞傷害%とし

40

50

て表されている。

【0283】

(表7)

作用薬	濃度	細胞傷害%
BSA 対照	1ug/ml	1.3
レチノイン酸	100uM	62
IL-TIF	100ng/ml	16.2
IL-TIF	300ng/ml	32

10

【0284】

この結果から、IL-TIFが骨髄系幹細胞に影響を及ぼす可能性が示唆された。骨髄系幹細胞は、万能血液幹細胞の娘細胞である。これら骨髄系幹細胞は、赤血球、単球(または遊走マクロファージ)、好中球、好塩基球、および好酸球の前駆細胞である。K-562芽球細胞は、赤血球系、顆粒球系および単球系に分化するので、これらの細胞は骨髄系幹細胞のモデルと考えられる。従って、この結果から、IL-TIFは前骨髄球腫瘍細胞株の増殖および/または成長に対して阻害活性を有することが実証された。このようにIL-TIFは、貧血症、感染症、炎症、および/または免疫疾患に関与する可能性があると思われた。さらに、抗体または可溶性の受容体アンタゴニストのような、IL-TIFに対するアンタゴニストは、骨髄系幹細胞に対するIL-TIFの活性を遮断するために、または貧血症、感染症、炎症、および/もしくは免疫疾患のような疾患の治療薬(therapeutic reagent)として利用できる可能性があると思われた。さらに、IL-TIFは腫瘍細胞に対して細胞傷害性を示すので、IL-TIFを抗腫瘍薬として直接的にまたは他のサイトカインと組み合わせて使用することができる。

20

【0285】

実施例13 ノーザンブロットおよびPCR法による組織パネルでのヒトzcytor16の組織分布

A. ノーザンブロットおよびドットブロットによるヒトzcytor16の組織分布

共通して所有する、ヒトzcytor16(配列番号:32、および配列番号:33)(世界知的所有権機関(WIPO)公開番号 国際公開公報第01/40467号)は、天然に発現される可溶性IL-TIF受容体アンタゴニストである。ノーザンブロット解析は、Human Multiple Tissue Northern Blot I、II、III(Clontech)および自家作製U-937ノーザンブロットを用いて行った。U-937はヒトの単球系前駆細胞株である。cDNAプローブは、オリゴZC25,963(配列番号:24)およびZC28,354(配列番号:25)を用いて作製した。PCR条件は次の通りとした: 94 で1分; 94 で15秒、60 で30秒、72 で30秒を30サイクルおよび最後に72 で5分伸長。1% TBEゲルにて364 bpの産物をゲル電気泳動によりゲル精製し、このバンドをかみそりの刃で切り出した。QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いて、cDNAをアガロースから抽出した。製造元の仕様書に従って、ランダムプライム標識システムの、Rediprime II (Amersham)を用い、この断片94 ngを³²P-dCTPで放射性標識した。取り込まれなかった放射活性物質は、製造元の使用説明書に従いNuc-Trapカラム(Stratagene)を用いて除去した。ブロットをExpressHyb (Clontech)溶液中で65 にて3時間プレハイブリダイズした。ブロットを、標識プローブ1.0 × 10⁶ cpm/ml、0.1 mg/mlサケ精子DNAおよび0.5 μg/mlヒトcot-1 DNAを含有するExpresshyb溶液中で65 にて一晩ハイブリダイズさせた。ブロットを2 × SSC、0.1% SDS溶液中、室温で数回溶液を変えながら洗浄し、次いで0.1 × SSC、0.1% SDS溶液中、55 で30分間、2回洗浄した。約1.6 kbおよび3.0 kbの大きさの転写産物が、脾臓および胎盤で検出されたものの、調べたそれ以外の組織では検出されなかった。同じ大きさの転写産物に加えてさらに約1.2 kb転写産物が、U-937細胞株で検出された。

30

40

【0286】

B. PCR法による組織cDNAパネルでの組織分布

50

PCR法によりヒト組織由来のcDNAパネルをzcytor16発現についてスクリーニングした。このパネルは自家で作製し、94種のマラソンによるcDNAが含まれた。種々の正常およびガン性のヒトの組織および細胞株由来のcDNA試料は、下記表8に示されている。cDNAは、自家ライブラリーから得たまたはマラソンによるcDNAは、自家のRNA調製物(Clontech製品によるRNA、またはInvitrogen製品によるRNA)から得た。マラソンによるcDNAは、marathon-Ready(商標)キット(Clontech, Palo Alto, CA)を用いて作製し、QCはクラスリン・プライマー-ZC21195(配列番号:26)およびZC21196(配列番号:27)を用いて試験し、クラスリンのバンドの強さに基づいて希釈した。パネル試料の品質を保証するため、品質管理(QC)に関して三つの試験を行った：(1)ライブラリーに使用したRNAの品質を評価するため、自家cDNAを、個々のcDNAライブラリーのベクター配列に特異的なベクターオリゴを用いたPCR法により、挿入断片の平均サイズについて調べた；(2)パネル試料のcDNA濃度の標準化は、5'側のベクターオリゴZC14,063(配列番号:28)および3'側の チューブリン特異的オリゴプライマー-ZC17,574(配列番号:29)または3'側のG3PDH特異的オリゴプライマー-ZC17,600(配列番号:30)を用いて、完全長の チューブリンまたはG3PDHのcDNAを増幅する標準的なPCR法により行った；ならびに(3)試料を配列決定に出して、リボソームまたはミトコンドリアDNAの混入の可能性がないか調べた。パネルは、ヒトのゲノムDNA(Clontech, Palo Alto, CA)の陽性対照試料を含んだ96-ウェルの形式で構成した。各ウェルには、cDNA約0.2~100 pg/ μ lが含まれた。PCR反応は、オリゴZC25,963(配列番号:24)およびZC27,659(配列番号:25)、Advantage 2 DNA Polymerase Mix (Clontech)ならびにRediload dye (Research Genetics社、Huntsville, AL)を用いて行った。増幅は次のように行った：94 で2分を1サイクル、94 で20秒、58 で30秒および72 で1分を30サイクル、続いて72 で5分を1サイクル。PCR反応産物の約10 μ lを、2%アガロースゲルを用いた標準的なアガロースゲル電気泳動にかけた。いずれの組織または細胞株でも、正しいと予想されるDNA断片サイズが観察されなかった。zcytor16の発現を示すその後の実験から、このパネルで得られた否定的な結果は、使用したプライマーが原因であった可能性が高いことが示唆された。

10

20

【 0 2 8 7 】

(表8)

組織/細胞株	# 試料	組織/細胞株	# 試料
副腎	1	骨髄	3
膀胱	1	胎児脳	3
骨髄	1	島細胞	2
脳	1	前立腺	3
頸部	1	RPMI #1788 (ATCC # CCL-156)	2
結腸	1	精巣	4
胎児脳	1	甲状腺	2
胎児心臓	1	WI38 (ATCC # CCL-75)	2
胎児腎臓	1	ARIP (ATCC # CRL-1674 -ラット)	1
胎児肝臓	1	HaCat - ヒト角化細胞	1
胎児肺	1	HPV (ATCC # CRL-2221)	1
胎児筋肉	1	副腎	1
胎児皮膚	1	前立腺 SM	2
心臓	2	CD3+ 選択 PBMC の イオノマイシン + PMA 刺激	1
K562 (ATCC # CCL-243)	1	HPVS (ATCC # CRL-2221) - 選択後	1
腎臓	1	心臓	1
肝臓	1	下垂体	1
肺	1	胎盤	2
リンパ節	1	唾液腺	1
黒色腫	1	HL60 (ATCC # CCL-240)	3
脾臓	1	血小板	1
下垂体	1	HBL-100	1
胎盤	1	腎臓メサングウム	1
前立腺	1	T 細胞	1
直腸	1	好中球	1
唾液腺	1	MPC	1

10

20

30

40

骨格筋	1	Hut-102 (ATCC # TIB-162)	1
小腸	1	内皮細胞	1
脊髄	1	HepG2 (ATCC # HB-8065)	1
脾臓	1	繊維芽細胞	1
胃	1	E. Histo	1
精巣	2		
胸腺	1		
甲状腺	1		
気管	1		
子宮	1		
食道腫瘍	1		
胃腫瘍	1		
腎臓腫瘍	1		
肝臓腫瘍	1		
肺腫瘍	1		
卵巣腫瘍	1		
直腸腫瘍	1		
子宮腫瘍	1		

10

20

30

40

50

【 0 2 8 8 】

PCR法によりヒト組織由来のさらなるパネルをzcytor16の発現についてスクリーニングした。このパネルは自家で作製し、77種のマラソンによるcDNAが含まれた。種々の正常およびガン性のヒトの組織および細胞株由来のcDNA試料は、下記表9に示されている。PCR反応は別として、測定法は、上記に従って行った。PCR反応は、オリゴZC25,963(配列番号:24)およびZC25,964(配列番号:31)、Advantage 2 DNA Polymerase Mix (Clontech)ならびにRediload dye (Research Genetics社、Huntsville, AL)を用いて行った。増幅は次のように行った: 94 で1分を1サイクル、94 で10秒、60 で30秒および72 で30秒を38サイクル、続いて72 で5分を1サイクル。正しいと予想されるDNA断片サイズが、骨髄、胎児心臓、胎児腎臓、胎児筋肉、胎児皮膚、心臓、乳腺、胎盤、唾液腺、骨格筋、小腸、脊髄、脾臓、腎臓、胎児脳、食道腫瘍、子宮腫瘍、胃腫瘍、卵巣腫瘍、直腸腫瘍、肺腫瘍およびRPMI-1788(Bリンパ球細胞株)で観測された。zcytor16の発現は、このパネルで試験された他の組織および細胞株では観測されなかった。zcytor16の発現様式により、zcytor16が正常組織では発現されないが、腫瘍組織では発現されるような、ある種の組織特異的腫瘍、特に、例えば、卵巣ガン、胃ガン、子宮ガン、直腸ガン、肺ガンおよび食道ガンでの発現が示される。当業者であれば、天然リガンドのIL-TIF、および受容体結合性のIL-TIF断片を、ガン、または生検、組織、もしくは組織学的試料中のガン組織、特に、例えば、卵巣ガン、胃ガン、子宮ガン、直腸ガン、肺ガンおよび食道ガン組織を検出するための診断に利用できることを認識するものと思われる。これらの分子のそのような診断的利用は、当技術分野において周知であり、本明細書に記述されている。

【 0 2 8 9 】

さらに、IL-TIF受容体の一つであるzcytor16の発現様式により、ある種の特定組織ならびに組織特異的腫瘍での発現が示されるため、天然リガンドのIL-TIFを含む結合パートナ

ーを同様に、特定組織(正常なまたは異常な)、ガン、またはIL-TIF受容体が発現されている、生検、組織、もしくは組織学的試料中のガン組織、特に、例えば、卵巣ガン、胃ガン、子宮ガン、直腸ガン、肺ガンおよび食道ガン組織を検出するための診断に利用することができる。IL-TIFを同様に、その受容体、例えば、zcytor16およびzcytor11(共通して所有する、米国特許第5,965,704号)が発現される、その他の組織を標的化するのに利用することができる。さらに、このような結合パートナーを化学療法薬、毒性成分などに結合させて、腫瘍または病変組織の部位に治療薬を標的化することができるものと思われる。このような診断および標的療法での利用は、当技術分野において周知であり、本明細書に記述されている。

【0290】

市販の第一鎖cDNAパネル(Human Blood Fractions MTC Panel, Clontech, Palo Alto, CA)を同様に、上記のように測定した。このパネルには、以下の試料が含まれていた：単核球、活性化単核球、休止CD4+細胞、活性化CD4+細胞、休止CD8+細胞、活性化CD8+細胞、休止CD14+細胞、休止CD19+細胞および活性化CD19+細胞。活性化CD4+細胞および活性化CD19+細胞では、zcytor16の発現が示されたが、休止CD4+細胞および休止CD19+細胞を含む、それ以外の試験細胞ではその発現が示されなかった。

【0291】

(表9)

組織	#試料	組織	#試料
副腎	1	膀胱	1
骨髄	3	脳	2
頸部	1	結腸	1
胎児脳	3	胎児心臓	2
胎児腎臓	1	胎児肝臓	2
胎児肺	1	胎児皮膚	1
心臓	2	胎児筋肉	1
腎臓	2	肝臓	1
肺	1	リンパ節	1
乳腺	1	黒色腫	1
卵巣	1	膵臓	1
下垂体	2	胎盤	3
前立腺	3	直腸	1
唾液腺	2	骨格筋	1
小腸	1	脊髄	2
脾臓	1	子宮	1
胃	1	脂肪細胞ライブラリー	1
精巣	5	島細胞	1
胸腺	1	前立腺 SMC	1
甲状腺	2	RPMI 1788	1
気管	1	WI38	1
食道腫瘍	1	肺腫瘍	1
肝臓腫瘍	1	卵巣腫瘍	1
直腸腫瘍	1	胃腫瘍	1
子宮腫瘍	2	CD3+ライブラリー	1
HaCATライブラリー	1	HPVライブラリー	1
HPVSライブラリー	1	MG63ライブラリー	1
K562	1		

10

20

30

40

【 0 2 9 2 】

C. RT-PCR法によるヒト組織および細胞株RNAパネルでの組織分布

RT-PCR法によりヒト細胞株由来のRNAパネルをzcytor16の発現についてスクリーニングした。このパネルは自家で作製し、下記表10～13に示される、種々の正常およびガン性のヒトの組織および細胞株由来の84種のRNAが含まれた。RNAは、RNAeasy MidiまたはMini Kit(Qiagen, Valencia, CA)を用いて、自家のまたは購入した組織および細胞株から調製した。パネルは、試料あたりRNA 100 ngとし96-ウェルの形式で構成した。RT-PCR反応は、オリゴZC25,963(配列番号:24)およびZC25,964(配列番号:31)、Rediload dyeならびにSUPE RSCRIPTワンステップRT-PCRシステム(Life Technologies, Gaithersburg, MD)を用いて行

50

った。増幅は次のように行った：55 で30分を1サイクル、続いて94 で15秒、59 で30秒、72 で30秒を40サイクル、それから最後に72 で5分の伸長で終了。PCR反応産物8~100 µlを、4%アガロースゲルを用いた標準的なアガロースゲル電気泳動にかけた。正しいと予想される184 bpのcDNA断片サイズが、細胞株U-937、HL-60、ARPE-19、HaCat#1、HaCat#2、HaCat#3、およびHaCat#4；膀胱、乳ガン、ガンに隣接した正常乳房、気管支、結腸、潰瘍性結腸炎の結腸、十二指腸、子宮内膜、食道、胃食道、心臓左心室、心室、回腸、腎臓、肺、リンパ節、リンパ腫、乳腺腫、乳腺、卵巣ガン、膵臓、耳下腺および皮膚(parotid and skin)、脾臓リンパ腫ならびに小腸で観測された。zcytor16の発現は、このパネルで試験した他の組織および細胞株では観測されなかった。

【0293】

zcytor16は、正常組織でPCR法により検出可能に発現される：例えば、消化器系、例えば、食道、胃食道、膵臓、十二指腸、回腸、結腸、小腸；女性生殖器系、例えば、乳腺、子宮内膜、乳房(ガン組織に隣接した)；ならびにその他の系、例えば、リンパ節、皮膚、耳下腺、膀胱、気管支、心室、および腎臓。さらに、zcytor16は、いくつかのヒト組織でPCR法により検出可能に発現される：例えば、女性生殖組織と関連する腫瘍、例えば、乳腺腫、卵巣ガン、子宮ガン、その他の乳ガン；ならびにリンパ腫、胃腫瘍、および肺腫瘍のようなその他の組織。zcytor16の発現は、女性生殖器官の正常組織で、およびこれらの器官と関連するいくつかの腫瘍で見られる。従って、IL-TIFのような、zcytor16のリガンド、またはその受容体結合断片は、zcytor16が過剰発現されている可能性がある、これらの腫瘍に対するマーカーとして役立ち得る。zcytor16が陽性のいくつかのガンは、外胚葉/上皮由来(乳腺腫、およびその他の乳ガン)である。故に、IL-TIFのような、zcytor16のリガンド、またはその受容体結合断片は、消化器系および女性生殖器官(例えば、子宮内膜組織、円柱上皮)の上皮組織、ならびに上皮組織を含むガンのような、上皮組織に対するマーカーとして役立ち得る。さらに、好ましい態様として、IL-TIF、またはその受容体結合断片は、その受容体zcytor16が正常組織では発現していないが、腫瘍組織では発現している、ある種の組織特異的腫瘍、特に、例えば、卵巣ガン、胃ガン、子宮ガン、結腸ガン、肺ガンおよび食道ガンに対するマーカーとして役立ち得る。診断を目的とした本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体の利用は、当技術分野において周知であり、本明細書に開示されている。

【0294】

(表10)

10

20

30

組織	#試料	組織	#試料
副腎	6	十二指腸	1
膀胱	3	子宮内膜	5
脳	2	子宮内膜ガン	1
脳髄膜腫	1	胃ガン	1
乳房	1	食道	7
乳ガン	4	胃食道	1
ガンに隣接した正常乳房	5	心大動脈	1
気管支	3	心臓左心室	4
結腸	15	心臓右心室	2
結腸ガン	1	心室	1
ガンに隣接した正常結腸	1	回腸	3
潰瘍性結腸炎の結腸	1	腎臓	15
		腎臓ガン	1

10

20

【 0 2 9 5 】

(表 1 1)

組織/細胞株	#試料	組織/細胞株	#試料
293	1	HBL-100	1
C32	1	Hs-294T	1
HaCat#1	1	Molt4	1
HaCat#2	1	RPMI	1
HaCat#3	1	U-937	1
HaCat#4	1	A-375	1
WI-38	1	HCT-15	1
WI-38 + 2 um イオノマイシン #1	1	HT-29	1
WI-38 + 2 um イオノマイシン #2	1	MRC-5	1
WI-38+5umイオノマイシン#1	1	RPT-1	1
WI-38+5umイオノマイシン#2	1	RPT-2	1
Caco-2,	1	WM-115	1
Caco-2 (分化)	1	A-431	1
DLD-1	1	WERI-Rb-1	1
HRE	1	HEL-92.1.7	1
HRCE	1	HuH-7	1
MCF7	1	MV-4-11	1
PC-3	1	U-138	1
TF-1	1	CCRF-CEM	1
5637	1	Y-79	1
143B	1	A-549	1
ME-180	1	EL-4	1
前立腺上皮	1	HeLa 229	1
U-2 OS	1	HUT 78	1

10

20

30

T-47D	1	NCI-H69	1
Mg-63	1	SaOS2	1
Raji	1	USMC	1
U-373 MG	1	UASMC	2
A-172	1	AoSMC	1
CRL-1964	1	UtSMC	1
CRL-1964+酪酸	1	HepG2	1
HUVEC	1	HepG2- IL6	1
SK-Hep-1	1	NHEK#1	1
SK-Lu-1	1	NHEK#2	1
Sk-MEL-2	1	NHEK#3	1
K562	1	NHEK#4	1
BeWo	1	ARPE-19	1
FHS74.Int	1	G-361	1
HL-60	1	HISM	1
Malme.3M	1	3AsubE	1
FHC	1	INT407	1
HREC	1		

10

20

【 0 2 9 6 】

(表 1 2)

組織	#試料	組織	#試料
肝臓	10	肺	13
リンパ節	1	肺ガン	2
リンパ腫	4	ガンに隣接した正常肺	1
乳腺腫	1	筋肉	3
乳腺	3	神経芽細胞腫	1
メリノリオーマ(melinorioma)	1	網	2
骨原性肉腫	2	卵巣	6
膵臓	4	卵巣ガン	2
皮膚	5	耳下腺	7
肉腫	2	唾液腺	4

30

40

【 0 2 9 7 】

(表 1 3)

組織	#試料	組織	#試料
小腸	10	子宮	11
脾臓	3	子宮ガン	1
脾臓リンパ腫	1	甲状腺	9
胃	13		
胃ガン	1		

10

【0298】

実施例14

ノーザンブロットおよびPCR法による組織パネルでのヒトzcytor11の組織分布A. PCR法による組織パネルでのヒトzcytor11の組織分布

PCR法によりヒト組織由来のcDNAパネルをzcytor11の発現についてスクリーニングした。共通して所有する、ヒトzcytor11(配列番号:18、および配列番号:19)(米国特許第5,965,704号)は、IL-TIFの受容体である。このパネルは自家で作製し、94種のマラソンによるcDNAが含まれた。種々の正常およびガン性のヒトの組織および細胞株由来のcDNA試料は、上記表9に示されている。PCR反応は別として、その方法は、実施例13に示した。PCR反応は、オリゴZC14,666(配列番号:22)およびZC14,742(配列番号:23)、Advantage 2 cDNA polymerase mix (Clontech, Palo Alto, CA)ならびにRediload dye (Research Genetics社、Huntsville, AL)を用いて行った。増幅は次のように行った: 94 で2分を1サイクル、94 で15秒、51 で30秒および72 で30秒を40サイクル、続いて72 で7分を1サイクル。正しいと予想されるDNA断片サイズが、膀胱、脳、頸部、結腸、胎児脳、胎児心臓、胎児腎臓、胎児肝臓、胎児肺、胎児皮膚、心臓、腎臓、肝臓、肺、黒色腫、卵巣、膵臓、胎盤、前立腺、直腸、唾液腺、小腸、精巣、胸腺、気管支、脊髄、甲状腺、肺腫瘍、卵巣腫瘍、直腸腫瘍、および胃腫瘍で観測された。zcytor11の発現は、このパネルで試験された他の組織および細胞株では観測されなかった。

20

【0299】

市販の第一鎖cDNAパネル(Human Blood Fractions MTC Panel, Clontech, Palo Alto, CA)を同様に、上記のように測定した。このパネルには、以下の試料が含まれていた: 単核球、活性化単核球、休止CD4+細胞、活性化CD4+細胞、休止CD8+細胞、活性化CD8+細胞、休止CD14+細胞、休止CD19+細胞および活性化CD19+細胞。活性化CD8+および活性化CD19+細胞を除く全ての細胞で、zcytor11の発現が示された。

30

【0300】

B. RT-PCR法によるヒト細胞株および組織パネルでのZcytor11の組織分布

RT-PCR法によりヒト細胞株由来のRNAパネルをzcytor11の発現についてスクリーニングした。このパネルは自家で作製し、上記表10~13に示される、種々の正常およびガン性のヒトの組織および細胞株由来の84種のRNAが含まれた。RNAは、RNAeasy MidiまたはMini Kit(Qiagen, Valencia, CA)を用いて、自家のまたは購入した組織および細胞株から調製した。パネルは、試料あたりRNA 100 ngとし96-ウェルの形式で構成した。RT-PCR反応は、オリゴZC14,666(配列番号:22)およびZC14,742(配列番号:23)、Rediload dyeならびにSUPERSCRIPTワンステップRT-PCRシステム(Life Technologies, Gaithersburg, MD)を用いて行った。増幅は次のように行った: 50 で30分を1サイクル、続いて94 で15秒、52 で30秒、72 で30秒を45サイクル、それから最後に72 で7分の伸長で終了。PCR反応産物8~10 μlを、4%アガロースゲルを用いた標準的なアガロースゲル電気泳動にかけた。正しいと予想されるcDNA断片サイズが、副腎、膀胱、乳房、気管支、正常結腸、結腸ガン、十二指腸、子宮内膜、食道、胃ガン、胃食道ガン、心室、回腸、正常腎臓、腎臓ガン、肝臓、肺、リンパ節、膵臓、耳下腺、皮膚、小腸、胃、甲状腺、および子宮で観測された。zcytor11の発現を示す細胞株は、A-431、分化したCaCO2、DLD-1、HBL-100、HCT-15、HepG2、H

40

50

epG2+IL6、HuH7、およびNHEK#1~4であった。zcytor11の発現は、このパネルで試験した他の組織および細胞株では観測されなかった。

【0301】

さらに、IL-TIF受容体の一つであるzcytor11の発現様式により、ある種の特定組織での発現が示されるため、天然リガンドのIL-TIFを含む結合パートナーを同様に、特定組織(正常なまたは異常な)、ガン、または生検、組織、もしくは組織学的試料の、特に、IL-TIF受容体が発現されている組織中のガン組織を検出するための診断に利用することができる。IL-TIFを同様に、その受容体、例えば、zcytor16およびzcytor11が発現される、その他の組織を標的化するのに利用することができる。さらに、このような結合パートナーを化学療法薬、毒性成分などに結合させて、腫瘍または病変組織の部位に治療薬を標的化す

10

【0302】

zcytor11(上記)およびzcytor16(実施例13、および実施例15)の発現様式から、IL-TIF、および故にIL-TIFアンタゴニストを作用させる標的組織および細胞種が示された。zcytor11の発現は、三つの生理学系：消化器系、女性生殖系、および免疫系でzcytor16の発現とおおむね重複していた。さらに、この受容体(zcytor11)の発現様式から、zcytor16のようなIL-TIFアンタゴニストは、少なくとも二つの領域のヒト疾患；炎症(例えば、IBD、クローン病、膵炎)およびガン(例えば、卵巣ガン、結腸ガン)に対する治療用途があることが示唆された。すなわち、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体を使用して、炎症、およびサイトカインによる、zcytor11受容体発現細胞とのIL-TIFの相互作用効果を拮抗することができる。

20

【0303】

さらに、zcytor11の発現は、潰瘍性結腸炎組織、IL-6により誘導されたHepG2肝細胞株、活性化されたCD8+ T細胞およびCD19+ B細胞で下方制御されているまたは存在していないように思われた。しかし、zcytor16は、活性化CD19+ B細胞で上方制御される(実施例12)ように思われ、一方でzcytor11は、休止CD19+ 細胞に比べて、活性化CD19+ 細胞で下方制御される(上記)。この場合、zcytor11およびzcytor16の発現は、逆の相関関係がある。これらのRT-PCR実験から、CD19+ 末梢血細胞、Bリンパ球は、IL-TIFの受容体、すなわちzcytor11およびzcytor16を発現することが実証される。さらに、B細胞では、zcytor11およびzcytor16の発現制御が示される。有糸分裂促進剤で活性化されたBリンパ球では、zcytor11の発現が減少し、zcytor16の発現が増加する。このことから、B細胞および同じく他の細胞に対するIL-TIFの活性を抑制する役割を果たすと思われるフィードバック阻害が示される。可溶性zcytor16は、B細胞に対するIL-TIFの効果を無効化するアンタゴニストとして機能するものと思われる。これは、B細胞が中心的存在である疾患：全身性紅斑性エリテマトーデス(SLE)、重症筋無力症、免疫複合体病、およびIL-TIFにより悪化されるB細胞ガンを含む自己免疫疾患に有効であると思われる。同様に、B細胞が疾患病変の一因となる自己免疫疾患は、zcytor16療法の標的となるとと思われる：多発性硬化症、炎症性腸疾患(IBD)および関節リウマチが、その実例である。zcytor16療法は、IgEの産生が疾患の病因の一因となる、喘息、アレルギーおよびアトピー性皮膚炎を含むアトピー性疾患においてIgEを産生しているB細胞を抑制するまたは阻害するのに有効であると思われる。

30

40

【0304】

悪性B細胞腫瘍では、上述の「フィードバック阻害」の喪失が示される可能性がある。zcytor16の投与により、IL-TIFシグナル伝達経路の制御が回復されて、B細胞腫瘍の増殖が阻害されるものと思われる。外科的切除または化学療法後にzcytor16を投与するのは、悪性B細胞腫瘍患者の微小残存病変を処置するのに有効である可能性がある。調節の喪失により、zcytor11の持続発現または発現増加がもたらされる可能性がある。従って、zcytor11を標的とする治療用モノクローナル抗体の標的とすることができる。

【0305】

実施例15 インサイチュー・ハイブリダイゼーション法によるzcytor16発現細胞の同定

50

特定のヒト組織を単離して、インサイチュー・ハイブリダイゼーション法によりzcytor 16の発現についてスクリーニングした。調製し、切片にして、インサイチュー・ハイブリダイゼーション法にかけた、種々のヒト組織には、軟骨、結腸、虫垂、腸、胎児肝臓、肺、リンパ節、リンパ腫、卵巣、膵臓、胎盤、前立腺、皮膚、脾臓および胸腺が含まれた。組織は、標準的な方法を用いて、10%緩衝ホルマリン液中で固定し、パラフィンでブロックを作製した。組織は4~8ミクロンで切片にした。組織は標準的な実験手順を用いて調製した(The Laboratory of Experimental Pathology (LEP)の「Development of non-isotopic in situ hybridization」, NIEHS, Research Triangle Park, NC; ウェブアドレスhttp://dir.niehs.nih.gov/dirlep/ish.html)。簡単に言えば、組織切片をHistoClear (National Diagnostics, Atlanta, GA)で脱パラフィン化し、次いでエタノールで脱水した。次に、これらの切片をプロテイナーゼK (50 µg/ml) (Boehringer Diagnostics, Indianapolis, IN)により、37 °Cで2~7分間消化した。このステップに続いて、組織のアセチル化および再水和を行った。

10

【0306】

一本のインサイチュー用のプローブを、ヒトのzcytor16配列(配列番号:32のヌクレオチド1~693)に対して設計し、標準的な方法を用いて、配列番号:32を含むプラスミドから単離した。T3 RNAポリメラーゼを使用して、アンチセンス・プローブを作製した。プローブは、製造元の使用説明書に従ってIn Vitro transcription System (Promega, Madison, WI)を用い、ジゴキシゲニン(Boehringer)で標識した。

【0307】

インサイチュー・ハイブリダイゼーションは、ジゴキシゲニン-標識zcytor16プローブ(上記)で行った。スライドにプローブを、濃度1~5 pmol/mlとして、62.5 °Cで12~16時間加えた。スライドをその後、55 °Cにて2×SSCおよび0.1×SSC中で洗浄した。シグナルは、製造元の使用説明書に従って、チラミッドシグナル増幅(TSA) (TSA, インサイチュー間接キット; NEN)を用いて増幅し、Vector Red基質キット(Vector Lab)で可視化した。次に、スライドをヘマトキシリン(Vector Laboratories, Burlingame, CA)で対比染色した。

20

【0308】

試験したいくつかの組織で、シグナルが観測された: 末梢組織中のリンパ節、形質細胞および他の単核細胞が強陽性となった。リンパ小節中の大部分の細胞が陰性であった。リンパ腫試料では、陽性シグナルが有糸分裂のおよび多核の細胞に見られた。脾臓では、陽性シグナルが濾胞周辺の散在性単核細胞に見られ、陽性であった。胸腺では、陽性シグナルが皮質および髄質の両方の散在性単核細胞に見られ、陽性であった。胎児肝臓では、強いシグナルが類洞腔の単核細胞の混合集団に見られた。一部の肝細胞も同様に、陽性であったかもしれない。炎症性虫垂では、パイエル板および浸潤部位の単核細胞が陽性であった。腸では、一部の形質細胞および神経節細胞が陽性であった。正常肺では、zcytor16は、間質組織およびリンパ系の肺胞上皮および単核細胞で発現していた。肺ガン組織では、強いシグナルが集合リンパ節の周辺の主として形質細胞および他の単核細胞で観測された。卵巣ガンでは、上皮細胞が強陽性であった。一部の間質細胞、たいがい単核細胞も同様に陽性であった。正常の卵巣ではシグナルが観測されなかった。正常および膵炎両方の膵臓試料の腺房細胞および腸間膜の単核細胞が陽性であった。初期(8週)の胎盤では、シグナルが栄養膜で観測された。皮膚では、真皮表面の炎症性浸潤巣の一部の単核細胞が陽性であった。角化細胞も同様に、弱陽性となった。前立腺ガンでは、間質組織の散在性単核細胞が陽性であった。関節軟骨では、軟骨細胞が陽性であった。正常の卵巣および結腸腺ガンを含む、試験したその他の組織は、陰性であった。

30

40

【0309】

要約すると、インサイチューのデータは、zcytor16に対する上述の発現データと一致していた。Zcytor16の発現は、単核細胞で主に観測され、一部の上皮細胞も同様に陽性であった。これらの結果から、免疫細胞でのzcytor16発現の存在が確認され、炎症、自己免疫疾患、または他の免疫機能、例えば、IL-TIFを含むがこれに限定されない炎症誘発性サイトカインを結合する際の役割が示される。さらに、zcytor16発現の検出を、例えば、組織

50

学的試料中の単核細胞に対するマーカーとして利用することができる。

【0310】

Zcytor16は、正常組織(リンパ節、脾臓、胸腺、膵臓および胎児肝臓、肺)、および異常組織(炎症を起こしている虫垂、肺ガン、卵巣ガン、膵炎、炎症を起こしている皮膚、および前立腺ガン)を含む、単核細胞で発現される。リンパ節、腸、および肺ガンの形質細胞は、zcytor16が陽性であることは注目に値する。形質細胞は、抗体合成に關与する免疫学的に活性化されたリンパ球である。さらに、IL-TIFは、活性化T細胞で発現される。さらに、zcytor16の発現は、活性化されたCD4+およびCD19+細胞でのみ検出される(しかし、休止しているCD4+およびCD19+細胞では検出されない)(実施例13)。従って、zcytor16を、単核白血球および限られた種類の活性化白血球、例えば、活性化されたCD4+およびCD19+のような、特定のリンパ球に対するマーカーとしておよび特定のリンパ球を単離する際の標的として利用することができる。

10

【0311】

さらに、活性化されたCD4+およびCD19+細胞のような活性化免疫細胞でのzcytor16の発現の存在により、zcytor16は、外来性の侵入物：例えば、微生物および細胞残屑に対する生体の免疫防御反応に關与している可能性があること、そして炎症およびガン形成の間の免疫応答に關与する可能性があることが示された。

【0312】

さらに、本明細書に記述したように、肝細胞(内胚葉由来の上皮)、肺の肺胞上皮(内胚葉由来の上皮)、および卵巣ガン上皮(中胚葉由来の上皮)のような、上皮形態のいくつかの組織がzcytor16の発現に対して陽性であった。zcytor16の上皮発現は、肝臓および肺の炎症反応および/またはガンの状態に変化する可能性がある。従って、IL-TIF、またはその受容体結合断片のような、zcytor16のリガンドは、炎症またはガンによる、これらの組織での変化を監視するためのマーカーとして使用できる可能性があると思われる。さらに、zcytor16のインサイチュウ発現解析から、正常の卵巣上皮はzcytor16の発現が陰性であるが、卵巣ガン上皮では強陽性であることが示され、IL-TIFポリペプチド、またはその受容体結合断片を、卵巣ガンおよび卵巣ガン腫の診断や治療のための診断マーカーおよび/または治療標的として利用できるという証拠がさらに得られた。

20

【0313】

Zcytor16は同様に、膵臓の腺房細胞(正常のおよび膵炎の組織)、胎盤の栄養膜(外胚葉由来)、軟骨の軟骨細胞(中胚葉由来)、および腸の神経節細胞(外胚葉由来)のような、他の組織でも検出された。従って、zcytor16は、これらの器官の対応細胞の分化および/または正常な機能に關与している可能性がある。従って、zcytor16の潜在的な有用性には、正常な代謝および妊娠、骨形成/恒常性、および腸などの生理機能の維持が含まれる。

30

【0314】

実施例16 huIL-TIF 抗ペプチド抗体

ポリクローナル抗ペプチド抗体は、雌のNew Zealand白ウサギ二羽にペプチドhuIL-TIF-1(配列番号:34)またはhuIL-TIF-2(配列番号:35)またはhuIL-TIF-3(配列番号:36)を免疫して調製した。ペプチドは、製造元の使用説明書に従ってApplied Biosystems Model 431Aペプチド合成機(Applied Biosystems社、Foster City, CA)を用いて合成した。次いで、ペプチドhuIL-TIF-1、huIL-TIF-2、およびhuIL-TIF-3を、システイン残基を介してキャリアタンパク質のマレイミド活性化スカシ貝ヘモシアニン(KLH)(Pierce, Rockford, IL)に結合した。各ウサギに、複合ペプチド200 µgをフロイント完全アジュバント(Pierce, Rockford, IL)とともに初回腹腔内(IP)注射し、その後、3週間ごとに複合ペプチド100 µgをフロイント不完全アジュバントとともにブースタ(IP)注射した。3回目のブースタ注射の投与から7~10日後、動物を出血させて、血清を採取した。その後、3週間ごとにウサギをブースト(追加免疫)し、出血させた。

40

【0315】

huIL-TIFペプチドに特異的なウサギ血清は、抗体の標的(抗原)として抗体を調製するのに使用したペプチド1 µg/mlを用い、ELISA法による力価試験で特徴付けた。huIL-TIF-1

50

ペプチド(配列番号:34)に対するウサギ二羽の血清は、その特異ペプチドに対して、希釈率 $1:5 \times 10^6$ (1: 5,000,000)の力価を有する。

【0316】

huIL-TIF-1ペプチド特異的抗体は、EPOXY-SEPHAROSE 6B 1 gあたり各ペプチド10 mgを用いて調製したEPOXY-SEPHAROSE 6Bペプチドカラム(Pharmacia LKB)を用いて、ウサギ血清からアフィニティー精製し、その後PBS中で一晚透析した。ペプチド特異的huIL-TIF抗体は、抗体の標的として適当なペプチド1 $\mu\text{g/ml}$ を用い、ELISA法による力価試験で特徴付けた。huIL-TIF-1ペプチド特異的抗体は、その適当な抗体標的に対し、ELISA法で500 pg/mlの検出下限値(LLD)を有する。huIL-TIF-1ペプチド特異的抗体は、還元性(reducing)ウエスタンブロット解析で完全長の組換えタンパク質(BV産生)を認識した。

10

【0317】

実施例17 ヒトIL-TIFトランスジェニックプラスミドの構築

配列を確認済みのヒトIL-TIFのコード領域を含むZytrackベクター約10 μg をFseIおよびAscIで消化した。その後、ベクターをエタノール沈殿し、沈殿物をTEに再懸濁させた。放出された540 bpのヒトIL-TIF断片は、消化したベクターを1.2% SeaPlaqueゲル上で泳動させて、断片を切り出すことにより単離した。DNAは、QiaQuick (Qiagen)ゲル抽出キットを用いて精製した。

【0318】

次に、ヒトIL-TIF断片を、本発明者らの標準的なトランスジェニックベクターであり、予めFseIおよびAscIで消化したpTG12-8に連結した。トランスジェニックマウスで、関心のある遺伝子を発現させるために設計した、pTG12-8プラスミドには、MT-1 5'側DNA 10 kbおよびMT-1 3'側DNA 7 kbが隣接した発現カセットが含まれている。この発現カセットには、MT-1プロモーター、ラットのインスリンIIイントロン、所望のクローンを挿入するためのポリリンカー、およびヒト増殖ホルモンのポリA配列が含まれる。

20

【0319】

ライゲーション反応液の約1 μl を、製造元の使用方法に従ってDH10B ElectroMax (登録商標)コンピテント細胞(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)にエレクトロポレーションし、100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを含有するLBプレート上にプレATINGし、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。コロニーを選び取り、100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを含有するLB培地中で増殖させた。この選び取ったクローンから少量調製(Miniprep)でDNAを調製し、FseI/AscIで制限消化し、続いてアガロースゲル電気泳動して、ヒトIL-TIF挿入断片をスクリーニングした。正しいpTG12-8ヒトIL-TIFコンストラクトの大量調製(Maxiprep)を行った。

30

【0320】

5'および3'側隣接配列、MTプロモーター、ラットのインスリンIIイントロン、ヒトIL-TIF cDNAならびにヒト増殖ホルモンのポリA配列を含むSalI断片を調製し、マウス受精卵細胞中にマイクロインジェクションするために使用した。

【0321】

第二のトランスジェニックコンストラクトは、リンパ球特異的なトランスジェニックベクター-pKF051に、ヒトIL-TIF cDNAを含むFseI/AscI断片を、上述のようにサブクローニングすることで作製した。pKF051トランスジェニックベクターは、p1026X (Iritani, B. M. ら、EMBO J. 16: 7019~31, 1997)に由来し、T細胞特異的なIckプロモーター、B/T細胞特異的な免疫グロブリンE μ 重鎖エンハンサー、所望のクローンを挿入するためのポリリンカー、および不活性な増殖ホルモンタンパク質をコードする(3'側イントロンおよびポリアデニル化シグナルを与える)変異型hGH遺伝子を含む。

40

【0322】

大量調製(Maxi-prep)DNAをNotIで消化し、Ick近位プロモーター、免疫グロブリンE μ エンハンサー、ヒトIL-TIF cDNA、および変異型hGH遺伝子を含む、この断片を、マウス受精卵細胞へのマイクロインジェクションに使用できるように調整した。

【0323】

マウスIL-TIFトランスジェニックプラスミドの構築

50

トランスジェニックコンストラクトを同様に、マウスIL-TIFに対して作製した。オリゴヌクレオチドは、Kozakコンセンサス配列および正確なマウスIL-TIFコード領域を含むPCR断片が産生されるように設計した。これらのオリゴヌクレオチドは、5'末端をFseI部位でおよび3'末端をAsclI部位で消化して、IL-TIFを発現させるためのEuLCKプロモーターを含むリンパ球特異的なトランスジェニックベクターpKF051へのクローニングを容易とした。

【0324】

PCR反応は、鑄型マウスIL-TIF(配列番号:37) 200 ngならびにオリゴヌクレオチドZC37, 125 (配列番号:39)およびZC37,126 (配列番号:40)で行った。PCR反応は、Advantage(商標) cDNAポリメラーゼ(Clontech)を用い、以下の条件下で行った:95 で5分; 95 で60秒、60 で60秒、および72 で90秒を15サイクル; ならびに72 で7分。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動で分離し、QiaQuick (Qiagen)ゲル抽出キットを用いて精製した。単離された、540 bpのDNA断片を、上述のように、FseIおよびAsclI (Boehringer-Mannheim)で消化し、エタノール沈殿して、pKF051にクローニングした。pKF051マウスIL-TIFの正しいクローンであることを配列決定法により検証し、注射するため、このクローンの大量調製(maxiprep)を上述のように行い、調製した。

10

【0325】

実施例18 IL-TIF-CEEのパキユロウイルス発現

昆虫細胞でIL-TIF-CEEポリペプチドを発現させるため、発現ベクターIL-TIF-CEE/pZBV32Lを調製した。C末端GLU-GLUタグ(配列番号:14)を有するIL-TIFポリペプチドを発現させるため、IL-TIF-CEE/pZBV32Lを設計した。このコンストラクトを使用して、シグナルペプチドが切断された後のIL-TIFのN末端アミノ酸配列を決定することができた。

20

【0326】

A. IL-TIF-CEE/pZBV32Lの構築

BamHIおよびXbaI制限部位をそれぞれ、5'および3'末端に含有する561 bpのIL-TIF断片は、プライマーZC28,348 (配列番号:41)およびZC28,345 (配列番号:42)を用いて、IL-TIF cDNAを含むプラスミドからPCR増幅により産生させた。PCR反応の条件は、次の通りとした: 94 で5分を1サイクル; 94 で90秒、62 で120秒、および72 で180秒を35サイクル; 72 で10分を1サイクル; その後、4 に浸漬。この断片をゲル電気泳動(1%アガロース)により可視化した。このバンドを切り出し、その後QIAquick(商標) Gel Extraction Kit (Qiagen, カタログ番号28704)を用いて抽出した。このcDNAをBamHIおよびXbaIを用いて消化し、その後、ベクターpZBV32Lに連結した。pZBV32LベクターはpFastBac1(商標) (Life Technologies)発現ベクターの改変型であり、pFastBac1のポリヘドロニン・プロモーターを除去して、後期活性化塩基性タンパク質プロモーター(Basic Protein Promoter)、およびGlu-Gluタグのコード配列と置換しているほか、停止シグナルをマルチクローニング領域の3'末端に挿入した。制限消化したIL-TIFの挿入断片およそ68 ngおよび対応するpZBV32Lベクターおよそ100 ngを16 で一晩、連結させた。このライゲーション混合物を水で10倍に希釈し、希釈したライゲーション混合物1 fmolを2 mmギャップのエレクトロポレーション・キュベット(BTX, モデル番号620)のなかで、400 、2 Vおよび25 μ Fのエレクトロポレーションにより、ElectoMAX(商標) DH12s(商標)細胞(Life Technologies, カタログ番号18312-017)に形質転換した。形質転換細胞をSOC培地(2% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 10 ml 1M NaCl, 1.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄および20 mM グルコース) 450 μ lに希釈し、希釈液100 μ lを、100 μ g/mlアンピシリンを含有するLBプレート上にプレーティングした。PCR法によりクローンを解析した。二つの陽性クローンを選択して増殖させ、QIAprep(登録商標)Spin Miniprep Kit (Qiagen, カタログ番号27106)を用いて精製した。各陽性クローン2 μ lをDH10Bac(商標)Max Efficiency(登録商標)コンピテント細胞(GIBCO-BRL カタログ番号10361-012) 20 μ lに、42 のヒートブロック中で、45秒間のヒートショックにより形質転換した。形質転換したDH10Bac(商標)細胞をSOC培地(2% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 10 ml 1M NaCl, 1.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄および20 mMグルコース) 980 μ lに希釈して、100 μ lを、50 μ g/mlカナマイシン、7 μ g/mlゲンタマイシン、10 μ g/mlテトラサイクリン、40 μ g/mL

30

40

50

IPTGおよび200 $\mu\text{g/mL}$ Bluo Galを含有するルリア寒天(Luria Agar)プレート上にプレートのリングした。プレートを37 で48時間インキュベートした。カラーセクション(色選択)を利用して、転移したウイルスDNAを有する細胞(「バクミド」と呼ばれる)を同定した。色が白色であったコロニーを解析のために選び取った。PCR法によりコロニーを解析し、増殖のため陽性コロニー(所望のバクミドを含む)を選択し、QIAprep(登録商標) Spin Miniprep Kit (Qiagen, カタログ番号27106)を用いて精製した。プライマー-ZC447 (配列番号:43)およびZC976 (配列番号:44)を用い、PCR法によって、バクミドの転移性因子に対するプライマーによりDNAを増幅することで、クローンを正しい挿入断片についてスクリーニングした。PCR反応の条件は、次の通りとした: 94 で5分を1サイクル; 94 で60秒、50 で90秒、および72 で180秒を30サイクル; 72 で10分を1サイクル; その後、4 に浸漬。PCR産物を1%アガロースゲル上で泳動して、挿入断片サイズを調べた。正しい挿入断片を有するクローンを使用して、Spodoptera Frugiperda (Sf9)細胞にトランスフェクトした。

【0327】

B. トランスフェクション

Sf9細胞を6-ウェルプレートに1ウェルあたり細胞 1×10^6 個として播き、27 で1時間接着させた。バクミドDNA 5 μl をSf-900 II SFM (Life Technologies) 100 μl に希釈した。Lipofectamine(商標) Reagent (Life Technologies、カタログ番号18324-012) 20 μl をSf-900 II SFM 100 μl に希釈した。バクミドDNAと脂質の溶液を穏やかに混ぜて、室温で30~45分間インキュベートした。細胞の入ったウェルから培地を吸引し、細胞を新鮮なSf-900 II SFM培地 2 mlで1回洗浄した。Sf-900 II SFM 800 μl を脂質-DNA混合液に加えた。洗浄用の培地を吸引し、DNA-脂質混合液を細胞に添加した。細胞を27 で一晩インキュベートした。DNA-脂質混合液を吸引し、Sf-900 II SFM培地 2 mlを各プレートに添加した。プレートを27 、湿度90%で、96時間インキュベートし、その後、ウイルスを集菌した。

【0328】

C. 増幅

Sf9細胞を6-ウェルプレートに1ウェルあたり細胞 1×10^6 個として播いた。ウェルにトランスフェクション・プレートから得たウイルス液50 μl を入れて、プレートを27 、湿度90%で、96時間インキュベートし、その後、ウイルスを集菌した。

【0329】

Sf9細胞は、密度が約 1×10^6 細胞/mlとなるまで、125 mlの振盪フラスコに入れたSf-900 II SFM 50 ml中で増殖させた。次いで、この細胞に上記のプレートから得たウイルスストック液100 μl を感染させて、27 で3日間インキュベートし、その後、ウイルスを集菌した。

【0330】

実施例19 Sf9細胞からのIL-TIF-CEEの精製

バキュロウイルスで発現された、C-末端Glu-Glu (EE)タグ(配列番号:14)を含むIL-TIFポリペプチドを精製するため、以下の手順を用いた。IL-TIF-CEEを発現しているSf9細胞(実施例18)の培養上清を、0.22 μm 径のSteriflip(商標)フィルター(Millipore)を用いて濾過し、培地50 mlあたりComplete(商標)プロテアーゼ・インヒビター・カクテル錠(Boehringer)を1錠加えた。濃縮した培養上清の標的タンパク質の総濃度は、SDS-PAGEおよび抗EE抗体(自家で作製)、次いでHRP結合抗mIg二次抗体を用いたウエスタンブロット解析により決定した。

【0331】

バッチ精製は、抗EE抗体(プロテインGセファロース/抗EE抗体のビーズ)で処理したProtein G Sepharose(登録商標) 4 Fast Flow (Pharmacia) 250 μl を、Sf9培養上清40 mlに加えることにより行った。IL-TIF-CEEを捕捉するため、培地-ビーズ混合物を4 で一晩振盪させた。ビーズを培地から、Beckman GS6R遠心機中、1000 RPMで10分間、遠心除去した。ビーズは、以下の手順により洗浄した(各洗浄の後に遠心および吸引ステップを行った)

: 細胞溶解用緩衝液(150 mM塩化ナトリウム、50 mM Tris pH 8.0および1% NP-40) 1 mlで1回; 洗浄用緩衝液(650 mM塩化ナトリウム、50 mM Tris pH 8.0、および1% NP-40) 1 mlで1回; 細胞溶解用緩衝液1 mlで1回。次いで、ビーズを細胞溶解用緩衝液500 μ lに懸濁させ、N末端配列決定法にかけた。

【0332】

実施例20 N末端アミノ酸配列解析:

Applied Biosystemsより入手した試薬を用い、標準的な自動N末端ポリペプチド配列決定法(エドマン分解)を行った。N末端配列解析は、Model 494 Protein Sequencer System (Applied Biosystems社、Foster City, CA)で行った。データ解析は、Model 610A Data Analysis System for Protein Sequencing、バージョン2.1a(Applied Biosystems)で行った。

10

【0333】

Protein G Sepharose/抗EE抗体のビーズ(実施例19)に捕捉されるように、精製したヒトIL-TIF-CEE試料を加えた。製造元の使用説明書に従ってNovex SDS PAGEシステム(4~12% Bis-Tris MES NuPAGE; Invitrogen)により、SDS PAGEで泳動する前に、ビーズを還元用SDS PAGEサンプルバッファーに入れ、沸騰している湯浴に入れた。標準的な方法により、ゲルをNovex PVDF膜(Invitrogen)に電氣的に転写し、クマシーブルーで染色した。対応する抗EE抗体によるウエスタンブロット解析を行い、N末端のタンパク質配列決定法のためのIL-TIFのバンドを同定した。使用したHRP結合マウス抗EE IgG抗体は、自家で作製した。

20

【0334】

分泌型IL-TIFポリペプチドのN末端配列解析によって、配列番号:3に示される22位(Ala)のIL-TIF前駆体配列を成熟型の開始部位とする、シグナル配列の予想切断部位が確認された。

【0335】

実施例21 CRF2-4受容体を発現するBaF3細胞(BaF3/CRF2-4細胞)およびzcytor11受容体とともにCRF2-4受容体を発現するBaF3細胞(BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞)の構築

下記の、CRF2-4発現ベクター30 μ gを用いて、完全長のCRF2-4受容体を発現するBaF3細胞を構築した。CRF2-4受容体を発現するBaF3細胞をBaF3/CRF2-4と称した。これらの細胞は対照として使用し、この細胞に完全長のzcytor11受容体(配列番号:18および配列番号:19)(米国特許第5,965,704号)をさらにトランスフェクトして、下記のIL-TIF活性のスクリーニング系を構築するために使用した。この細胞測定系を利用して、IL-TIF活性を評価することができかつIL-TIF変異体の活性を容易にスクリーニングすることができる。

30

【0336】

A. CRF2-4受容体を発現するBaF3細胞の構築

CRF2-4の完全長cDNA配列(Genbankアクセッション番号Z17227)を、標準的な方法により、Daudi細胞株のcDNAライブラリーから単離し、それから発現ベクターpZP7Pにクローニングした。

【0337】

マウス骨髄由来のインターロイキン-3(IL-3)依存性前リンパ球細胞株であるBaF3細胞(PalaciosおよびSteinmetz, Cell 41: 727~734, 1985; Mathey-Prevotら、Mol. Cell. Biol. 6: 4133~4135, 1986)は、完全培地(10% 熱不活化ウシ胎児血清、2 ng/mlマウスIL-3(mIL-3)(R & D, Minneapolis, MN)、2 mM L-glutaMax-1(商標)(Gibco BRL)、1 mMピルビン酸ナトリウム(Gibco BRL)およびPSN抗体(GIBCO BRL)を添加したRPMI培地(JRH Bioscience社、Lenexa, KS))で維持した。エレクトロポレーションの前に、製造元の使用説明書に従ってQiagen Maxi Prepキット(Qiagen)を用いて、CRF2-4/pZP7Pを調製かつ精製した。エレクトロポレーションのため、BaF3細胞を無血清RPMI培地で1回洗浄し、次いで無血清RPMI培地に細胞密度を 10^7 細胞/mlとして再懸濁させた。再懸濁させたBaF3細胞1 mlをプラスミドDNA CRF2-4/pZP7P 30 μ gと混合し、別の使い捨てエレクトロポレーション・チャンパー(GIBCO BRL)に移した。室温で15分間のインキュベーション後、細胞に、エレクトロポレーション装置(CELL-PORATOR(商標); GIBCO BRL)による2回の連続ショック(800 μ Fad

40

50

/300 V.; 1180 μ Fad/300 V.)を与えた。5分の回復時間の後、エレクトロポレーションした細胞を完全培地50 mlに移し、インキュベーター中に15~24時間(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)置いた。その後、細胞を遠沈させ、ピューロマイシン耐性プールを単離するため、T-162フラスコ中の2 μ g/mlピューロマイシン含有完全培地50 mlに再懸濁させた。トランスフェクトされたBaF3細胞(本明細書ではBaF3/CRF2-4細胞と称される)のプールについて、下記のようにシグナル伝達能の測定を行った。さらに、下記のように、これらの細胞にzcytor11受容体をさらにトランスフェクトした。

【0338】

B. CRF2-4およびzcytor11受容体を発現するBaF3細胞の構築

完全長のzcytor11受容体を発現するBaF3/CRF2-4細胞は、zcytor11のcDNA(配列番号:18)を含む発現ベクター30 μ gを用いて、上記の実施例21Aに従い構築した。回復後、形質移入体は、200 μ g/mlゼオシンおよび2 μ g/mlピューロマイシンを用いて選択した。zcytor11受容体を発現するBaF3/CRF2-4細胞は、BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞と名付けた。これらの細胞を使用して、IL-TIF活性をスクリーニングした(実施例22)。

【0339】

実施例22 Alamar Blue増殖測定法によるBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を使用したIL-TIF活性のスクリーニング

A. Alamar Blue増殖測定法によるBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を使用したIL-TIF活性のスクリーニング

精製されたIL-TIF-CEE(実施例9)を使用して、下記のように増殖活性の存在について試験した。

【0340】

BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を遠沈し、上記の実施例21Aに記載された、但しmIL-3が入っていない完全培地(以降、「mIL-3不含培地」と称する)で洗浄した。細胞を遠沈し、3回洗浄して、mIL-3の除去を確実にした。次に、細胞を血球計中で計測した。細胞は、mIL-3不含培地を用い、1ウェルあたり容量100 μ l中、1ウェルあたり細胞5000個として96-ウェル形式でプレATINGした。

【0341】

mIL-3不含培地で濃度50、10、2、1、0.5、0.25、0.13、0.06 ng/mlに希釈したIL-TIF-CEEタンパク質を用いて、BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞の増殖について評価した。希釈したタンパク質100 μ lをBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞に添加した。全測定容量は200 μ lとした。測定用プレートを37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で3日間インキュベートし、その時点で、Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL)を1ウェルあたり20 μ lで添加した。プレートを再度、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で24時間インキュベートした。Alamar Blueにより、生細胞数に基づいた蛍光読み出しが得られ、従って陰性対照と比較した細胞増殖が直接測定される。プレートを再度、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で24時間インキュベートした。プレートは、Fmax(商標)プレートリーダー(Molecular Devices Sunnyvale, CA)にて、SoftMax(商標)Proプログラムを用いて、波長544(励起)および590(発光)で測定した。結果から、IL-TIF-CEEに対するBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞の用量依存的な増殖反応が確認された。測定された、この反応は、上端50 ng/mlではバックグラウンドに対して約15倍となり、下端0.06 ng/mlでは2倍の誘導にまで下がった。BaF3野生型細胞、およびBaF3/CRF2-4細胞は、IL-TIF-CEEに反応して増殖しなかったことから、IL-TIFは、CRF2-4/zcytor11ヘテロ二量体受容体に特異的であることが示された。

【0342】

実施例23 IL-TIFを発現するトランスジェニックマウス

A. マウスIL-TIFを発現するトランスジェニックマウスの作製

DNA断片は、リンパ球特異的なE μ LCKプロモーターの5'および3'側隣接配列、マウスIL-TIF(配列番号:37; 配列番号:38に示されるポリペプチド)、ラットのインスリンIIイントロン、IL-TIF cDNAならびにヒト増殖ホルモンのポリA配列を含むトランスジェニックベクターから標準的な方法を用いて調製し、標準的なマイクロインジェクション手順による、受精したB6C3f1(Taconic, Germantown, NY)マウス卵母細胞へのマイクロインジェクショ

10

20

30

40

50

ンに使用した。Hogan, B.ら、Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994を参照されたい。

【0343】

リンパ球特異的なE μ LCKプロモーターを有するマウスIL-TIFのトランスジェニックマウス25頭は、産子154頭の中から同定した。トランスジェニック産子のうち11頭は生後数時間内に死亡し、光った外観のトランスジェニック産子9頭は誕生した日に剖検し、2頭は生体まで成長させた。1頭の生体マウスでは、発現レベルが低かった。剖検された産子から組織試料を調製し、下記のように組織学的に調べた。

【0344】

新生産子の光った外観は、皮膚の硬直と関連性があるように思われ、それらはあたかも乾ききっていて、適当な哺育の低下をもたらした。それらの動作は、概して硬直するようになった。

【0345】

B. トランスジェニックマウスの遺伝子型および発現解析

上述の、E μ Lckプロモーターで駆動されるマウスIL-TIF形質転換系からの、新生産子は、第一日(生まれた日)に異常について観察し、組織採取のために屠殺した。産子には全て、固有の耳標番号が与えられ、屠殺時には、光沢がある皮膚の表現型を有すると指定されたものに留意した。産子12頭のうち、6頭は光沢がある皮膚の表現型を有することが観察され、その2頭は「重度の」表現型と指定された。重度の表現型は、皮膚が特に光沢がありかつ非常に乾燥した、移動性がほとんどない小さな産子と定義された。皮膚を各産子の左側面から採取し、Tissue-Tek包埋培地中で凍結させた。

【0346】

発現データは回収されなかったが、遺伝子型の決定から、光沢がある皮膚は形質転換状態のよい指標であることが確認された。凍結皮膚ブロックをクリオスタットで7ミクロンに切断し、CD3、CD4、CD8、マウスマクロファージ、B細胞、CD80、およびMHCクラスIIの存在について調べるために染色した。染色手順には、組織への市販抗体の結合、ペルオキシダーゼ標識二次抗体による検出、および染色を可視化するための色素原DAB反応が含まれた。

【0347】

トランスジェニック動物には、MHCクラスIIおよびCD80(それぞれ抗原提示細胞および樹状細胞を染色する)がより多く存在することが分かった。マクロファージのマーカーも同様に、野生型動物の細胞に比べて重度のおよび重度でないトランスジェニック動物の細胞の多くで検出されたが、これらの細胞の分布は、真皮上層にかなり集中していた。重度の表現型に分類された動物は、これらのマーカーの三つ全てが最も強く染色され、野生型と比べた場合、細胞の強度と数の劇的な増加が示された。この可変性は、これらのトランスジェニック動物の創始産子のIL-TIFの発現レベルの相違によるものである可能性がある。MHCクラスII陽性細胞は、緩くすき間のある集団として配列された真皮下層に位置していたが、CD80陽性細胞は、真皮下方の、筋層/脂肪層の中のまたはそのすぐ上部に主に存在していた。これらの二つの細胞集団は、重複していないように思われる。その他のマーカーは全て、全動物で同じ染色であった。肥満細胞のトルイジンブルー染色により、野生型とトランスジェニック動物との間でわずかな相違～相違がないことが明らかになった。

【0348】

C. トランスジェニックマウスから得た組織の顕微鏡による評価: EuLckプロモーターを有するIL-TIF TGは新生児期の致死性の組織像を有する

誕生の日に、IL-TIFトランスジェニック動物を含む同腹仔から得た産子を人道的に安楽死させ、全身を10%緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定した。トランスジェニック産子6頭および非トランスジェニック産子2頭をさらなる精密検査にかけた。トランスジェニック動物6頭のうちの4頭は、安楽死の時点で光沢がある皮膚を有することが示された。固定した組織を5切片に切り取った(頭部の縦断面ならびに胸部の上と下および腹部の上と下の横断面)。切片をパラフィン包埋し、日常的に処理し、5 μ mに切断して(Jung 2065 Supercut mi

10

20

30

40

50

crotoxin, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)、H&E(ヘマトキシリンとエオシン)で染色した。染色された組織は、委員会(ACVP)により認定された獣医病理学専門医により、光学顕微鏡(Nikon Eclipse E600, Nikon社、Melville, NY)の下で評価された。

【0349】

顕微鏡検査で、トランスジェニック産子のうちの2頭の表皮は、対照を含む他のマウス6頭の表皮よりも厚くなっていることが観察された。その他の異常は、どのマウスの皮膚および他の組織でも見られなかった。胸部および腹部の対応領域から得た代表的な皮膚領域は、40×対物レンズでおよび顕微鏡に取り付けられたCoolSnapデジタルカメラ(Roper Scientific社、San Diego, CA)で画像化した。次いで、表皮の厚さを、組織形態計測ソフトウェア(Scion Image for Windows(NIH Image), Scion社、Frederick, MD, v. B4.0.2)を用いて測定した。表14に示した、この結果は、以下の通りであった：

10

【0350】

(表14)

遺伝子型/表現型	平均的な胸部の皮膚厚み (μm)	平均的な腹部の皮膚厚み (μm)
非トランスジェニック/正常	5.2	5.4
トランスジェニック/光沢なし	5.0	6.7
トランスジェニック/光沢あり	8.2	7.4
トランスジェニック/全て	7.1	7.1

20

【0351】

統計学的有意性を決定するにはマウスの数が不十分であった；しかし、トランスジェニック動物、特に光沢がある皮膚を有する動物は、光沢がないトランスジェニック動物および非トランスジェニック対照動物よりも厚い表皮を有する傾向があった。光沢があるトランスジェニック動物は、光沢がないトランスジェニック動物よりもIL-TIFの発現レベルがより高い可能性がある；しかし、これらのマウスに対して、発現レベルは決定されなかった。

30

【0352】

実施例24 IL-TIFポリペプチドのインビボ効果

A. IL-TIFアデノウイルスで感染されたマウスはSAAを誘導を示す

マウス(雌、C57B1、8週齢；Charles River Labs, Kingston, NY)を三群に分けた。IL-TIFポリペプチド(配列番号:3)を発現するアデノウイルスは、標準的な方法を用いて予め作製した。第0日に、親アデノウイルスまたはIL-TIFアデノウイルスを、第一群(n=8)および第二群(n=8)に、それぞれ、尾静脈経由で、各マウスが容量約0.1 ml中に粒子約 1×10^{11} 個の用量を受けるとして投与した。第三群(n=8)は処置を受けなかった。第12日に、マウスの体重を測定し、そのマウスから採血した。試験の第20日に、マウスを屠殺し、体重を記録し、解析のため血液および組織を採取した。

40

【0353】

全血液試料を完全血球検査(CBC)および血液生化学検査について分析した。第12日および第20日の両時点で、好中球および血小板総数の統計学的に有意な上昇が、親アデノウイルス処置群と比べてIL-TIFアデノウイルス投与群の血液試料で検出された。同様に、第12日目に、リンパ球総数が親アデノウイルス処置群と比べてIL-TIFアデノウイルス投与群では有意に減少したが、第21日目には、その逆の効果が観測された。さらに、IL-TIFアデノウイルス処置マウスは体重が減少したが、親アデノウイルス処置マウスは体重が増加した。グルコースは、両時点において、親アデノウイルス処置群と比べてIL-TIFアデノウイルス投与群の血液試料で有意に減少した。血清アルブミンも同様に、両時点で有意に減少した。血中尿素窒素濃度は、第20日の時点で有意に低下していた。血清グロブリン濃度は、

50

両時点において、親アデノウイルス処置群と比べてIL-TIFアデノウイルス投与群で有意に高くなった。顕微鏡的に、IL-TIFに起因する、観測された組織形態学的変化の一つは、腎臓の尿細管再生であった。マウスでよく見られたが、この群の動物では発生率および重症度が増加していた。腎症は、皮質尿細管上皮細胞の好塩基性多巢領域を特徴とする。

【0354】

結果の検証およびさらなる試料の収集のため、実験計画は上述の実験と同一の、さらなる実験を行った。この試験では、体重は3日ごとに記録し、血液はアデノウイルス投与から3日後のマウスから採血し、第10日目(群あたりn=4)および第20日目(群あたりn=4)に、血液および組織採取のためにマウスを屠殺した。好中球および血小板総数の上昇がこの場合も先と同様に、親アデノウイルス処置群と比べてIL-TIFアデノウイルス投与群の血液試料で検出された。この効果は、好中球では第3日目まで明らかであったが、血小板総数は第10日目まで有意差がなかった。同様に、第3日および第10日目に、リンパ球総数が親アデノウイルス処置群と比べてIL-TIFアデノウイルス投与群では有意に減少したが、これらは、前回の調査におけるのと同じく第20日には上昇していなかった。この場合も先と同様に、IL-TIFアデノウイルス投与マウスは、試験研究の間に、体重が減少したが、対照ウイルス処置マウスおよび未処置マウスは、体重が増加した。血液生化学検査の指標は、前回の調査と一致していた。IL-TIFアデノウイルス処置と関連した、腎臓の尿細管再生の組織学的所見が、この調査でも同様に確認された。これは、IL-TIFアデノウイルス投与マウス(第20日目)における中程度のタンパク尿のさらなる所見と一致していた。

【0355】

この結果から、IL-TIFは造血、即ち、インビボでの血液細胞形成に影響を及ぼすことが示唆された。従って、IL-TIFは、異なる血液幹細胞に影響を及ぼす生物活性を有し、それによって特定系列におけるある種の分化血液細胞を結果的に増加させるかまたは減少させることができると思われる。例えば、IL-TIFは、リンパ球を減少させるように思われるが、これはリンパ球様細胞を生じさせる委任前駆細胞の阻害による可能性が高く、IL-TIFが貧血症、感染症、炎症、および/または免疫疾患に、これらの過程に関与する血液細胞に影響を及ぼすことで関与している可能性があるという考えを支持するものである。抗体またはその可溶性受容体zcytor16のような、IL-TIFに対するアンタゴニストは、これらの疾患で治療薬(therapeutic reagent)として利用できると思われる。

【0356】

さらに、マウスでIL-TIFアデノウイルスを用いたこれらの実験から、IL-TIFを過剰発現させると、インビボで好中球および血小板のレベルを増加させることが示唆される。動物システムの全体でIL-TIFに対する応答に関与する他の因子(例えば、サイトカインおよび修飾遺伝子)が存在しているということが考えられる。それでもなお、これらのデータから、造血におけるIL-TIFの関与が強く支持される。従って、IL-TIF、抗IL-TIF抗体、ならびにzcytor16および可溶性zcytor11/CRF2-4のような、その受容体は、炎症、免疫不全症、感染症、貧血症、造血器腫瘍およびその他のガンなどのような、さまざまな疾患の診断および治療に適した試薬/標的である。

【0357】

体重減少、急性期タンパク質SAAの出現、ならびに血清グルコース、アルブミンおよび尿素窒素の減少により証明される代謝攪乱とのIL-TIF発現の関連性から、IL-TIFは特定の炎症反応において初期に作用するサイトカインであることが示唆される。IL-TIFアデノウイルス投与マウスは、IBD、潰瘍性大腸炎、関節炎、乾癬、喘息などで観察されるような、慢性的な炎症状態を示す可能性がある。ある種の有害な炎症過程は、抗IL-TIF抗体のような、IL-TIFに対するアンタゴニスト、ならびにzcytor16および可溶性zcytor11/CRF2-4などのような、その受容体を使用することで阻害される可能性があるように思われる。

【0358】

B. IL-TIFは炎症誘発性サイトカインである：アデノ-IL-TIFマウスにおけるSAAの血清濃度：

マウスSAA免疫測定キット(Mouse SAA Immunoassay Kit)および実験手順(Biosource Int

10

20

30

40

50

ernational, California, USA)を用いてELISA法を行い、IL-TIF-アデノマウスのSAA濃度を決定した。希釈した標準液および未知試料を、HRP抗マウスSAA抗体とともに、抗マウスSAA抗体で予めコーティングされている測定用プレートにプレーティングした。キットの使用説明書に従い、プレートを37℃で1時間インキュベートし、それから洗浄した。TMBを用いて室温で15分間、プレートを発色させ、2 M H₂SO₄で反応を停止させた。Spectromax 190 (Molecular Devices, California, USA)を用いて、450 nmの吸光度を測定した。得られるデータは、Softmax Pro (Molecular Devices, California, USA)およびExcel (Microsoft社、Washington, USA)を使って解析した。

【0359】

IL-TIF-アデノウイルスを感染したマウスは、親アデノウイルス対照と比べ、10倍を超えて、mSAA濃度がかなり上昇していた。

【0360】

C. IL-TIFアデノウイルス感染マウスのフローサイトメトリー解析

アデノウイルスによるIL-TIFインビボ発現の効果を解析するため、本発明者らは、感染後10日目および20日目に、IL-TIFアデノウイルス感染C57BL/6マウスから末梢血、脾臓、および骨髓を単離した。血液約100 μlをヘパリン添加チューブに採血し、次いで低張溶解(3.6% NaCl 1.5 mlを添加する前に、細胞を脱イオン水(dH₂O)4.5 ml中で約5秒間、溶解させた)により赤血球細胞を枯渇させた。脾臓を二枚のすり板スライドガラスの間で押しつぶし、開放された細胞をNytex膜(細胞濾過器)に通して、沈殿させた。骨髓は、一本の大腿骨を乳鉢と乳棒で破碎して、細胞濾過器(Falcon)に細胞を通過させることにより得た。細胞をFACS洗浄用緩衝液(WB=HBSS/1% BSA/10 mM hepes)に再懸濁させ、トリパンブルーで計測して、各種の生細胞1×10⁶個を5 mlのポリスチレンチューブ中に分注した。細胞を洗浄し、沈殿させ、次いで特定の免疫細胞小集団を同定するために使用される種々の細胞表面マーカーを認識する、蛍光標識(FITC、PE、およびCyChrome)モノクローナル抗体(PharMingen, San Diego, CA)の混合物と氷上で20分間インキュベートした。これらのマーカーには、以下が含まれる(本発明者らが試験した三群が記載されている)。血液染色の場合: CD3、Gr1、およびB220; 脾臓染色の場合: CD62L、CD44、およびCD3; CD21、CD23、およびB220; IgD、IgM、およびB220; CD11b、Gr1、およびCD8; 骨髓染色の場合: CD11b、Gr1、CD3; IgD、IgM、およびB220。細胞をWB 1.5 mlで洗浄し、沈殿させ、次いでWB 0.4 mlに再懸濁させて、CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson, Mountain View, CA)を用いてFACSscanで解析した。

【0361】

本発明者らは、IL-TIF-アデノ処置マウスの血液中の好中球の画分が、第10日目に4~13倍に、第20日目に2~3倍に上昇することを発見した。第10日目に、この相違により、血液中のリンパ球と単球の画分の同時減少がもたらされた。骨髓では、本発明者らは、第10日の時点でB細胞の総数は約1.5倍に減少したが、成熟循環B細胞の割合は増加し、未成熟B細胞の総数はわずかに低下した。第20日の時点で、本発明者らは成熟循環B細胞の画分のわずかな増加を実際に見つけたが、これらの相違の多くは明白ではなかった。脾臓では、B細胞の総数は、試験両日でわずかに減少(1.5~2倍)していたが、第20日には、辺縁帯B細胞(CD21+CD23-B220+)の画分は2倍にまで増加し、濾胞B細胞(CD21+CD23+B220+)の数は2倍に低下していた。辺縁帯B細胞は、B細胞有糸分裂促進剤(例えば、LPS)に対し、より多く見られる濾胞B細胞よりも感受性が高いので、病原体に対する防御の最前線にいると考えられ、辺縁帯B細胞は、その同系の抗原(cognate antigen)に遭遇すると、瞬時に抗体分泌細胞に分化する。IL-TIFは、濾胞B細胞の辺縁帯B細胞への変換を促進するか、またはより未成熟な濾胞細胞を選択的に減少させることが可能である。骨髓で見られたB細胞数の変化は、プレ/プロB細胞および/または成熟B細胞の分化促進、血液/脾臓からの循環B細胞の流入増加、ならびに恐らく未成熟B細胞の末梢への移出の同時増加を反映している可能性がある。成熟BM B細胞の実際数は増加していないので、IL-TIFはその増殖を促進させない可能性がある。または、IL-TIFは未成熟B細胞の分化を阻害し、それにより成熟B細胞の相対発現量の増加を阻害している可能性がある。

【0362】

D. Zcytor16/Fc4はインビボでIL-TIF活性を無効化する：SAA ELISA測定から、IL-TIFにより誘導されるSAA発現はzcytor16-Fc4注入により阻害されることが示される：

zcytor16がIL-TIFによるSAA誘導を阻害できるかどうか評価するため、マウス(雌、C3H/HEJ、8週齢；Jackson Labs, Bar Harbor, ME)を各3頭からなる5群に分けて、下記表15に示されるタンパク質のIP注射により処置した：

【0363】

(表15)

群 #	IL-TIF	Zcytor16
群 1:	-	-
群 2:	-	100 µg
群 3:	3 µg	-
群 4:	3 µg	20 µg
群 5:	3 µg	100 µg

10

【0364】

zcytor16注入は、IL-TIF注入の15分前までに行った。どちらのタンパク質注入も腹腔内経路により行った。血液試料は、処置前に、その次に処置から2時間および6時間後に各マウスから採血した。SAAおよびIL-TIFの測定のため、各試料から血清を調製した。

20

【0365】

前述のようにELISA法を行い、IL-TIFおよびIL-TIFの可溶性受容体である、本明細書に記載のzcytor16-Fc4で処置したマウスにおけるSAA濃度を決定した。IL-TIF 3 µgとともに濃度20~100 µgのzcytor16-Fc4で処置したマウスでは、IL-TIF単独で誘導されたSAA濃度がバックグラウンド濃度にまで低下することが示されたことから、zcytor16はIL-TIFのSAA誘導活性をインビボで阻害することが実証された。

30

【0366】

実施例25 炎症性腸疾患モデルマウスにおけるIL-TIFの発現

炎症性腸疾患(IBD)は、多因子性疾患であり、潰瘍性大腸炎(UC)およびクローン病(CD)の二種類に分類される。これらの疾患の病因は現在のところ不明であり、臨床症状は異なる。UCは結腸に限定され、症状には、出血性下痢、体重減少および腹痛が含まれる。UCの肉眼的特徴には、微小点状の潰瘍(punctuated ulcer)および結腸の短縮が含まれる。対照的に、クローン病は、腸の他の部分にも影響を及ぼす可能性がある。症状には、下痢(これはUCで見られるよりも頻度は低いものの出血性である)、微熱および苦痛が含まれる。肉眼的特徴には、狭窄、深い潰瘍、亀裂および瘻孔をともなう腸の繊維化および狭窄が含まれる。

40

【0367】

これらのヒト疾患を擬態するいくつかのモデル動物を利用することができる。新薬のスクリーニングを目的として一般に使用される大腸炎モデルの三つは、2,4,6-トリニトロペンゼンスルホン酸(TNBS)によるラットモデル、マウスT細胞移入モデル、およびデキストラン硫酸ナトリウム、またはDSSによるマウスモデルである。DSSモデルは、疾患活動指数スコア化システム(S. N. S. Murthy, Treatment of Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis by Intracolonic Cyclosporin, Digestive Diseases and Sciences, Vol. 38, No. 9 (September 1993), pp.1722~1734)を用いて、Dr. S. Murthyによるモデルから得られた。

【0368】

本研究では、マウスに、DSSをその飲料水に入れて6日間与えると急性結腸炎が生じた。

50

この動物は、体重減少および出血性下痢を示し、UC患者の症状を擬態していた。DSS傷害の機構は十分に特徴付けられていないが、DSSは非特異的な炎症性免疫反応を誘導し、腸に対する環境効果を擬態するものと考えられる。細胞に対して毒性があり得る、 H_2S が産生される可能性がある。さらに、管腔の細菌フローラの変化が起こる。活性化された単球、マクロファージおよび肥満細胞が結腸内に実証された。三つの動物モデルの全ての媒介物質には、炎症性プロスタグランジン、ロイコトリエン代謝産物およびサイトカインが含まれる。

【0369】

A. 方法

Charles River Laboratoriesから入手したSwiss Webster雌マウスで、DSSの摂取により大腸炎を誘発させた。このマウスは、調査開始時に10週齢および11週齢であった。マウスに6日間、4% DSSを飲料水に入れて与えた(処置マウス)、または通常の飲料水だけを与えた(対照マウス)。便の質、潜血および体重減少を含む測定を組み合わせた、疾患活動指数の臨床スコア(DAI)を使用した。DAIは各マウスに対し、DSS処置の1日後から開始して毎日得た。6日後、処置マウスの飲料水からDSSを除いた。マウスは全て、調査開始から2、7、または10日の時点で屠殺されるまで、DAI臨床スコアにより監視した。第2日目および第7日目のそれぞれで、DSS処置マウス4頭および対照マウス1頭を屠殺した。第10日目に、DSS処置マウス4頭および対照マウス2頭を屠殺した。屠殺後の動物全てに対し、結腸の長さを測定した。結腸の切片を組織学的分析用の10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、mRNA抽出のために凍結した。

10

20

【0370】

B. 組織学的スコア化および疾患活動指数(DAI)スコア化

組織学的指数スコアは、参考文献1の方法に従って得られた。おおむね、結腸の切片は、陰窩スコア、過形成上皮、陰窩のねじれおよび炎症について病理学者により盲目でスコア化された。

【0371】

毎日、各マウスを体重減少、便の堅さおよび腸内出血に基づく臨床スコアに関して採点した。より高い得点は、体重減少、下痢および出血の量の増加に割り当てた。各マウスの1日のスコア(得点)は、3回の結果/観測結果から得た平均得点とした。

【0372】

30

C. 結果

第7日目および第10日目で、DSS処置マウスの結腸の長さは、未処置対照よりも幾分短かったが、この結果は、有意ではなかった可能性がある(統計を適用して確認されていない)。臨床DAIスコアは、このモデルを用いた過去の調査で見られたのと同じ、DSS処置マウスの疾患症状の増加を反映していた。潜血はおおよそ第4日目および第5日目に最も多く、一方、軟便は第6日目および第7日目にいっそう多かった。組織病理学的な結果から、屠殺日の全て、特に第7日目(ピーク)および第10日目で、疾患スコアが対照とは異なっていたことが示される。組織病理学的なスクリーニングスコアは：対照=0.5、第2日目のDSS処置マウス=8.8、第7日目のDSS処置マウス=21、第10日目のDSS処置マウス=18であった。臨床的および組織病理学的なスコアから、DSS処置マウスには、未処置対照と比べて顕著な結腸疾患があったことが示される。凍結組織試料は、下記のようにmRNA測定のため、後に使用した。

40

【0373】

D. RT-PCR法によるマウスIBD結腸試料におけるIL-TIF RNAの組織発現

炎症性腸疾患モデルにおけるマウスIL-TIF RNA(配列番号:37)の相対発現を測定するため、DSS処置マウスの遠位結腸を採取し、液体窒素中で素早く凍結させた。この実験では、マウスをDSSで処置し、処置後の2、7および10日目に試料を採取した。正常未処置マウスから試料を同様に採取した。その後、製造元の使用説明書に従って標準的なRNeasy Midiprep(商標) Kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて、RNAを試料から単離した。

【0374】

50

RT-PCR反応には、「Superscript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq」(Life Technologies, Gaithersburg, MD)を使用した。各反応液25 μ lは、以下から構成された：2 \times 反応緩衝液12.5 μ l、(20 pmol/ μ l)ZC39,289(配列番号:45) 0.5 μ l、(20 pmol/ μ l)ZC39,290(配列番号:46) 0.5 μ l、RT/Taqポリメラーゼ混合物0.4 μ l、RNase-free水10 μ l、総RNA(100 ng/ μ l) 1.0 μ l。増幅は、次のように行った：50 で30分を1サイクル、続いて94 で30秒、58 で30秒、72 で60秒を35サイクル、次いで最後に72 で7分の伸長で終了。PCR反応産物の8~10 μ lを、2%アガロースゲルを用いた標準的なアガロースゲル電気泳動にかけた。正しいと予想されるcDNA断片サイズが、次のように観測された：第2日目の両試料にかすかなバンドが存在していた。第7日目の3試料のうちの2つは強いバンドを生じ、その上、第7日目の3番目の試料は非常に強いバンドを生じた。第10日目の3試料は強いバンドを生じた。最後に、「正常」対照の2試料ではバンドが生じなかった。これらの結果から、IBD、UC、およびCDと関連するものを含め、結腸でのある種の炎症反応にIL-TIFの上方制御が存在する可能性が示唆される。このデータは下記表16に要約されており、表中、相対発現を次のようにスコア化した：0 = バンドなし、1 = かすかなバンド、2 = 強いバンド、3 = 非常に強いバンド。

10

【0375】

(表16)

組織	相対発現(0-3)
正常結腸	0
正常結腸	0
処置後第2日目	1
処置後第2日目	1
処置後第7日目	3
処置後第7日目	2
処置後第7日目	2
処置後第10日目	2
処置後第10日目	2
処置後第10日目	2

20

30

【0376】

実施例26 hzcytor11/hCRF2-4ヘテロ二量体を作製するための構築物

分泌型hzcytor11/hCRF2-4ヘテロ二量体を発現する細胞株を構築した。この構築物では、hzcytor11(配列番号:47)の細胞外ドメインをIgG 1(Fc4)(配列番号:64)の重鎖に、C末端のGlu-Gluタグ(配列番号:60)で融合し、もう一方は、CRF2-4(配列番号:48)の細胞外ドメインをFc4に、C末端のHisタグ(配列番号:61)で融合させた。ヘテロ二量体のhzcytor11およびhCRF2-4アームの両方に対し、8アミノ酸からなるGly-Serスペーサー(配列番号:49)を受容体の細胞外部分とFc4のN末端との間に遺伝子工学的に作製した。さらに、トロンピン切断部位をFcドメインとC末端タグとの間に遺伝子工学的に作製して、タグの潜在的なタンパク質分解除去を可能とした。

40

【0377】

ヘテロ二量体のhzcytor11/Fc4-CEE部分の構築のため、hzcytor11の細胞外部分は、Fc4に融合されたヒトhzcytor11(hzcytor11/IgG)を含むベクターから、5'末端にEcoRI制限部位および3'末端にBamHI制限部位がそれぞれ設計されたオリゴZC39335(配列番号:50)およびZC39434(配列番号:51)を用い、次のような条件下でPCR増幅した：94 で60秒、57 で60

50

0秒、および72 で120秒を25サイクル；ならびに72 で7分。PCR産物は、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製し、EcoRIおよびBamHI(Boehringer-Mannheim)で消化し、電気泳動により分離し、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いて精製した。hzcytor11 EcoRI/BamHI断片は、予めEcoRIおよびBamHIで消化しておいたpZP-9 hzcytor7/Fc4-TCS-CEEに連結した。このベクターは、hzcytor7(米国特許第5,945,511号)の細胞外部分がCEEタグ(配列番号:59)でFc4(配列番号:64)に融合されており、EcoRIおよびBamHIで消化すると、hzcytor7の細胞外部分が取り除かれて、hzcytor11の置換が可能となる。得られた連結物の少量調製物(miniprep)を正しいサイズのEcoRI/BamHI挿入断片についてスクリーニングし、陽性となった少量調製物(miniprep)を配列決定して、PCR反応の正確性について確認した。hzcytor11/Fc4-CEE融合ポリペプチドのポリペプチド配列は、配列番号:62に示されている。

10

【0378】

ヘテロ二量体のhCRF2-4/Fc4-cHIS部分の構築のため、hCRF2-4の細胞外部分は、pZP-9 CRFから、オリゴZC39,319(配列番号:52)およびZC39,325(配列番号:53)を用い、次のような条件下でPCR増幅した: 94 で60秒、57 で60秒、および72 で120秒を30サイクル；ならびに72 で7分。PCR産物を上述のように精製し、それからEcoRIおよびBamHIで消化した。PCR産物には内在的なEcoRI部位が一箇所存在していたので、消化すると二本のバンドが得られた: 0.101 kBのEcoRI/EcoRI断片および0.574 kBのEcoRI/BamHI断片。0.574(kB)のEcoRI/BamHI断片は、予めEcoRIおよびBamHIで消化しておいたベクターpHZ-1 DR1/Fc4-TCS-cHISに連結した。このベクターは、hDR-1の細胞外部分がC-HISタグ(配列番号:61)でFc4に融合されており、EcoRIおよびBamHIで消化すると、hDR-1の細胞外部分が取り除かれて、hCRF2-4の置換が可能となる。得られた連結物の少量調製物(miniprep)を正しいサイズのEcoRI/BamHI挿入断片についてスクリーニングし、陽性となった少量調製物(miniprep)をEcoRI消化し、さらなる構築のためにバンドを精製した。このEcoRIで消化した少量調製物(miniprep)に0.101 kBのEcoRI/EcoRI断片を連結し、KpnI/NdeI制限消化により、挿入断片の方向が適切なクローンをスクリーニングした。正しいサイズの挿入断片を有するクローンをDNA配列決定にかけて、PCR反応の正確性について確認した。hzcytor11/Fc4-CEE融合ポリペプチドのポリペプチド配列は、配列番号:62に示されている。

20

【0379】

hzcytor11/Fc4-cEEおよびhCRF2-4/Fc4-cHISそれぞれ約16 μgを、製造元の使用説明書に従って、Lipofectamine (Gibco/BRL)を用いてBHK-570(ATCC番号CRL-10314)細胞に同時にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、1 μMメトトレキサート(MTX) (Sigma, St. Louis, MO)および0.5 mg/ml G418(Gibco/BRL)を含有するDMEM + 5% FBS (Gibco/BRL)中で10日間選択した。得られた形質転換体のプールを再度、10 μM MTXおよび0.5 mg/ml G418中で10日間選択した。

30

【0380】

実施例27 zcytor11/CRF2-4ヘテロ二量体受容体の精製

培養上清のzcytor11/CRF2-4ヘテロ二量体を0.2 μm径のフィルターに通して濾過し、0.02% (w/v)アジ化ナトリウムを添加した。この培養上清を1分あたり10~20 mlでPoros Protein A 50カラムに直接添加した。添加後、カラムをPBSで洗浄し、結合したタンパク質を0.1 Mグリシン pH 3.0で溶出させた。タンパク質を含む溶出画分をpH 7.2に調整し、YM30 Stirred Cell Membrane (Millipore)を用いて80 ml未満に濃縮した。

40

【0381】

プロテインAカラムからの溶出液80 mlを318 ml容量のSuperdex 200 HiLoad 26/60カラム(Pharmacia)に添加した。カラムから1分あたり3 mlのPBS pH 7.2で溶出させた。タンパク質を含む画分をプールして、凝集物をなくした。Superdex 200からのプール液を、固形の塩化ナトリウム(NaCl)およびイミダゾールを用いて0.5 M NaCl、10 mMイミダゾールに調整し、pHを水酸化ナトリウムで7.5に調整した。調整したタンパク質溶液を1時間あたり2カラム容量(CV)で200 ml容量のNiNTAカラム(Qiagen)に添加した。結合タンパク質は、カラムをPBS洗浄した後、5濃度段階のイミダゾール: 40 mM、100 mM、150 mM、250 mM、500

50

mMで溶出させた。各段階のイミダゾールで溶出された分画をプールし、N末端配列決定法により分析した。配列決定法により決定された、ヘテロ二量体を含むプールをプールし、YM30 Stirred Cell Membrane (Millipore)を用いて50 mlに濃縮した。NiNTAカラムからの溶出液50 mlを318 ml容量のSuperdex 200 HiLoad 26/60カラム(Pharmacia)に添加した。カラムから1分あたり3 mlのPBS pH 7.2で溶出させた。SEC MALS分析法で測定できるように、タンパク質を含む画分をプールして、凝集物をなくした。

【0382】

精製されたタンパク質をN末端配列決定法、アミノ酸分析法およびSEC-MALS法により分析した。結合親和性および生物活性を測定した。

【0383】

実施例28 Alamar Blue増殖測定法でBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を使用したCRF2-4/Zcrtor11-Fc4活性とのZcytor16-Fc4活性の比較

本明細書に記載のBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を遠沈させ、PBSで2回洗浄してmIL-3の除去を確実にし、それから3回目の遠心を行い、完全培地(RPMI 1640、10% FBS、1% GlutaMAX、1%ピルビン酸ナトリウム)、但しmIL-3が入っていない培地(以降、「mIL-3不含培地」と称する)に再懸濁させた。細胞は、mIL-3不含培地を用い、1ウェルあたり容量100 μ l中、1ウェルあたり細胞5000個として96-ウェル形式でプレーティングした。

【0384】

IL-TIFタンパク質(配列番号:3)をmIL-3不含培地で200 pg/mlに希釈した。プレートの最上列に、Zcrtor16-Fc4融合タンパク質(本明細書に記載の)をmIL-3不含/IL-TIF培地で1 μ g/mlに希釈し、それから各ウェルに容量100 μ lを残すようにして、96-ウェルプレートの残りの7列に下側方向へ連続的に倍々希釈した。次いで、これに細胞100 μ lを添加して、総測定容量200 μ l中、IL-TIFの終濃度を全ウェルで100 pg/ml、およびZcytor16-Fc4の終濃度を約1、0.5、0.25、0.125、0.063、0.31、0.016、および0.008 μ g/mlとした。プレートの最上列に、CRF2-4/zcytor11-Fc4をmIL-3不含/IL-TIF培地で8 μ g/mlに希釈し、それから各ウェルに容量100 μ lを残すようにして、96-ウェルプレートの残りの7列に下側方向へ連続的に倍々希釈した。次いで、これに細胞100 μ lを添加して、総測定容量200 μ l中、IL-TIFの終濃度を全ウェルで100 pg/ml、およびCRF2-4/zcytor11-Fc4の終濃度を約8、4、2、1、0.5、0.25、0.125および0.063 μ g/mlとした。測定用プレートを37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で4日間インキュベートし、その時点で、Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL)を1ウェルあたり20 μ lで添加した。プレートを再度、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で16時間インキュベートした。Alamar Blueにより、生細胞数に基づいた蛍光読み出しが得られ、従って陰性対照と比較した細胞増殖が直接測定される。プレートは、波長530(励起)および590(発光)で、Wallac Victor. 2 1420 Multilabel Counter(Wallac, Turku, Finland)にて測定した。結果から、Zcytor16-Fc4による、BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞に対するIL-TIFの増殖作用の強力な用量依存的阻害が示された。CRF2-4/zcytor11-Fc4により、IL-TIFのずっと弱い阻害が示された。IL-TIF単独は、細胞をバックグラウンドに比べて13倍刺激した。Zcytor16は、濃度0.025~1 μ g/mlでこの増殖を完全に阻害し、8 ng/mlに至るまでの残りの全濃度で増殖を部分的に阻害した。CRF2-4/zcytor11-Fc4は唯一、最高濃度8 μ g/mlで増殖を完全に阻害することができ、0.125~4 μ g/mlで増殖を部分的に阻害し、最低濃度63 ng/mlでは阻害はほとんど検出されなかった。

【0385】

実施例29 Zcytor16はマウスのコラーゲン誘導関節炎(CIA)モデルでIL-6およびSAA濃度を減少させる

A. マウスのコラーゲン誘導関節炎(CIA)モデル

10週齢の雌のDBA/1Jマウス(Jackson Labs)を、1群あたりマウス13頭からなる3群に分けた。開始の21日前、動物にフロイント完全アジュバントで製剤化された、1 mg/mlニワトリII型コラーゲン(製造Chondrex, Redmond, WA) 50~100 μ lを皮下注射し、3週間後の第0日目に、この動物に、凍結乾燥分注品(Sigma, St. Louis, MO)から250 μ g/mlとして調製した、大腸菌(E. coli)0111:B4由来LPSを100 μ l(25 μ g)注射した。Zcytor16は、第0

10

20

30

40

50

日目から第25日目まで4週間、1週につき3回、腹腔内注射として投与した。最初の2群は、1用量につき1動物あたり zcytor16 100 または 10 μg を受け、3番目の群は、媒介物対照の P BS (Life Technologies, Rockville, MD) を受けた。動物は LPS を注射後に関節炎の症状を示し始め、2~3週間以内にほとんどの動物が炎症を起こした。疾患の程度は、動物の手足の厚さを測定するためのキャリパーを用いて、臨床スコア (0~3) を各手足に割り当てることにより各手足で評価した：下記に詳述されるように、0=正常、0.5=足指/足指(複数)に炎症あり、1=手足に軽度の炎症あり、2=手足に中等度の炎症あり、および3=手足に重度の炎症あり。

【0386】

疾患の監視：

動物は2回目のコラーゲン注射後すぐに、手足の炎症の徴候を示し始める可能性があり、2回目のコラーゲン注射の前に足指の炎症の徴候を持ち始めるものさえいるかもしれない。ほとんどの動物は、追加注射の2~3週間以内に関節炎を発症するが、より長い時間を必要とするものもいる可能性がある。このモデルにおける疾患発生率は、通常95~100%であり、動物40頭を用いた研究では、通常、無応答動物(観察から6週間後に決定)0~2頭が見られる。留意すべきは、炎症が始まるのと同時に、一定ではないが軽度の手足または足指の炎症がよく一時的に起こる可能性があることである。このため、著しく、持続的な手足の腫れが発生するまでは、動物が確定した疾患を有するとは考えられない。

【0387】

動物は全て毎日観察して、その手足の疾患の状態について評価したが、これは各手足に定量的な臨床スコアを割り当てることにより行った。毎日、各動物に、その臨床的な疾患状態に従って4本の手足にスコアを付けた。臨床スコアを決定するため、手足には3つの区域、つまり足指、手足自体(前肢末梢関節または足部)、および手首または足関節があるものと見なすことができる。関節の腫れ、割れた爪、または発赤に対する全足指の観察、いずれかの手足の浮腫または発赤の何らかの証拠の記録、腱または骨の明確な解剖学的境界の喪失の記録、および浮腫または発赤に対する手首または足首の評価、および炎症が足の上方近くに及んでいるかどうかの記録を含めて、これらの区域に対する炎症の程度および重症度について記録した。手足の1、2、または3のスコアは、第一に重症度の全体的な印象、および第二にいくつかの区域が関与するかに基づいた。臨床的なスコア化に使用した尺度は、下記に示されている。

【0388】

臨床スコア：

- 0 = 正常
- 0.5 = 一つまたは複数の足指が関与、しかし炎症を起こしているのは足指のみ
- 1 = 手足(1区域)に関する軽度の炎症、1本の足指または複数本の足指を含む
- 2 = 手足の中等度の炎症ならびにいくつかの足指および/または手首/足首(2区域)を含む
- 3 = 手足、手首/足首、およびいくつかのまたは全ての足指(3区域)の重度の炎症

【0389】

疾患の確定は、一晚(連続して2日間)持続する、2またはそれ以上にランク付けされる、手足の炎症の定量スコアとして定義される。いったん疾患が確定されたら、データを記録し、動物の「疾患の確定」の初日と表記する。

【0390】

実験の間中、血液を採血して、抗コラーゲン抗体の血清濃度を監視した。第21日目に動物を安楽死させ、血清および完全血球検査のため、血液を採血した。各動物から、組織学的解析のため、病気に冒された手足1本を10% NBFに回収し、mRNA解析のため、1本を液体窒素中で凍結させて-80 に保存した。また、後のRNA解析のため、脾臓1/2、胸腺1/2、腸間膜リンパ節1/2、肝葉1つおよび左腎からRNAを採取し、組織学的解析のため、脾臓1/2、胸腺1/2、腸間膜リンパ節1/2、残りの肝臓、および右腎を10% NBFに回収した。免疫グロブリンおよびサイトカイン測定のため、血清を採血して-80 で凍結した。

10

20

30

40

50

【0391】

zcytor16を受けている1処置群では手足の炎症の発症および進行の遅れがあったかもしれないが、手足のスコアおよび測定データを解析した場合、群間で、統計学的に有意な差は認められなかった。体重変化、CBCパラメータ、または抗コラーゲン抗体濃度に関して、群間で、有意差は認められなかった。これらの初期の結果から、zcytor16は、体重、赤血球もしくは白血球、または抗体産生に副作用をもたらすことなく、炎症を減少させることができる可能性が示唆される。投薬、作用機序、および有効性のさらなる調査が進行中である。

【0392】

B. マウスCIAモデルにおける抗コラーゲンELISAデータ

血清試料は、コラーゲン誘導関節炎のマウスモデル(上記の実施例29A)から、LPSによる誘発日(第0日)に対して第0、7、14、21および28日に採取した。ELISA法により、血清試料を抗コラーゲン抗体の力価についてスクリーニングした。抗コラーゲン抗体の濃度に対するzcytor16処置の効果は、100 μ gまたは10 μ g処置群では、PBS対照と比べて統計学的に有意ではなかった。下記は、抗コラーゲンELISAの方法および材料の説明である。

【0393】

抗コラーゲンELISAに使用した試薬は、Maxisorp96-ウェル・マイクロタイター・プレート(NUNC, Rochester, NY)、チキンII型コラーゲン(Chondrex, Redmond, WA)、Super Block(Pierce, Rockford, IL)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合ヤギ抗マウスIgG+A+M(H+L)(Zymed, South San Francisco, CA)およびo-フェニレンジアミン二塩酸塩基質(Pierce, Rockford, IL)であった。全測定で使用した緩衝液は、ELISA B希釈用緩衝液(PBS + 0.1% BSA + 0.05% Tween (Sigma, St. Louis, MO))、ELISA C洗浄用緩衝液(PBS + 0.05% Tween)およびNovoD現像用緩衝液(0.063 Mクエン酸ナトリウム、0.037 Mクエン酸)、過酸化水素水(Sigma)ならびに1 M硫酸(VWR, Tukwilla, WA)であった。

【0394】

眼窩採血により末梢血およそ100 μ lを血清分離管(Becton Dickinson)に採取した。血清を遠心(2~3分、16,000 \times g、4~6)により採取し、分析されるまで-20 に保存した。抗コラーゲンIgG抗体濃度を測定するため、10 μ g/mLチキンII型コラーゲン(Chondrex, Redmond WA)でNUNCプレートの表面を覆い、4 で一晩インキュベートした。プレートをELISA C液で洗浄し、Super Block(Pierce, Rockford, IL)でブロッキング(5分、室温)し、ELISA C液で洗浄した。希釈した血清試料(5 \times ELISA B液で5000倍~625,000倍に希釈)をELISA Aプレートに三重で添加し、プレートを4 で一晩インキュベートした。インキュベーション後、プレートをELISA C液で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG Fc抗体(Zymed, ELISA B液で2000倍希釈)を添加した。プレートをインキュベート(室温、90分)し、ELISA C液でもう一度洗浄し、o-フェニレンジアミン二塩酸塩基質液(NovoD 10 mL + OPD 1錠 + 10 μ l + 過酸化水素水10 μ L, Pierce)を用いて、HRP活性により発色させた。反応は1 M硫酸で停止させた。25,000倍希釈の血清試料の相対光学密度測定値は、Spectra MAX 190を用いて、490 nmで得た。データは、SoftMax Proソフトウェア(Molecular Devices社、Palo Alto, CA)を用いて解析した。

【0395】

C. マウスCIAモデルにおけるIL-6およびSAA分析

第0日の血清試料は、LPS 25 μ gの腹腔内投与から4時間後にCIAマウス(上記の実施例29A)から収集した。Biosource International(Camarillo, CA)から購入した市販のELISAキットにより、製造元の使用説明書に従って、試料をIL-6および血清アミロイドA(SAA)濃度についてスクリーニングした。

【0396】

zcytor16 100 μ g、zcytor16 10 μ gおよびPBS対照にさらしたマウス群で、IL-6濃度はそれぞれ、9651 \pm 1563 pg/ml、10,865 \pm 1478 pg/mlおよび15,006 \pm 2,099 pg/mlであった。zcytor16用量100 μ gにさらされたCIAマウス群のIL-6濃度はPBS対照マウスと比べて、p = 0.0351となり有意に低かった。統計学的有意性は、フィッシャーのPLSDを用い

10

20

30

40

50

、有意水準5%で計算した(ABACUS Concepts社、Berkeley, CA)。

【0397】

さらに、zcytor16 100 μg 、zcytor16 10 μg およびPBS対照群にさらしたマウス群で、SAA濃度はそれぞれ、 $381 \pm 40 \mu\text{g/ml}$ 、 $348 \pm 37 \mu\text{g/ml}$ および $490 \pm 50 \mu\text{g/ml}$ であった。zcytor16用量10 μg にさらされたCIAマウス群のSAA濃度はPBS対照マウスと比べて、 $p = 0.0257$ となり有意に低かった。統計学的有意性は、フィッシャーのPLSDを用い、有意水準5%で計算した(ABACUS Concepts社、Berkeley, CA)。

【0398】

実施例30 DSSマウスモデルにおけるIL-TIF受容体Zcytor11の発現

定量的RT-PCR法を行い、DSSによるIBDマウス(実施例25)の結腸におけるマウスzcytor11の発現レベルを測定した。RNAは、正常マウスの結腸からおよび処置日数2、7および10日のDSS処置マウスの遠位結腸から単離した。RT-PCR法は、Applied Biosystems 7700 TaqManによる機器および実験手順を用いて行った。簡単に言えば、Applied Biosystemsガイドラインに従い「Primer Express」ソフトウェアを使用して、マウスzcytor11配列に対するプライマー(ZC39776(配列番号:54)およびZC39777(配列番号:55))およびFAM/TAMRA標識TaqManプローブ(ZC38752(配列番号:56))を設計した。RNA 25 ngを、PE/Applied Biosystems TaqMan EZ RT-PCR Core試薬ならびに前記のプライマーおよびプローブとともに、各反応液に添加した。RT-PCR反応は、以下の条件下、二重で行った: 50 で2分、60 で30分、95 で5分; 94 で20秒および60 で1分を40サイクル。発現量を既知の分子数のマウスzcytor11 合成RNA転写産物の標準曲線と比較して、発現を、反応あたりのマウスzcytor11分子の絶対数として報告した。予備実験データから、マウスzcytor11の発現は、正常のマウス結腸の発現レベルと比べると、第7日目および第10日目のDSS誘導IBDマウスの遠位結腸でわずかに減少していることが示唆される。

【0399】

実施例31 軽度の内毒素血症モデルにおけるIL-TIFおよび炎症誘発性の指標: LPSによる内毒素血症マウスモデル

A. LPSによる内毒素血症マウスモデル: LPSによる内毒素血症マウスモデルにおける炎症誘発性サイトカインおよび体温の評価

インビボ実験を設計して、軽度の内毒素血症のマウスLPSモデルにおけるzcytor16の効果について調べた。このモデルを一次評価するため、本発明者らは、炎症誘発性サイトカインおよび体温を測定して、このモデルに対する関連データを収集した。

【0400】

簡単に言えば、6ヶ月齢のBalb/c(CRL)雌マウスに、無菌PBSに溶解したLPS(Sigma) 25 μg を腹腔内(IP)注射した。血清試料は、0、1、4、8、16、24、48および72時間の各時点に対し、マウス8頭の群から採血した。血清試料を炎症性サイトカイン濃度について測定した。IL-1b、IL-6、TNFa、IL-10および血清アミロイドタンパク質(SAA)の濃度は、Biosource International (Camarillo, CA)から購入した市販のELISAキットを用いて測定した。

【0401】

LPS注射から1時間後に、TNFa濃度は最高に達して4000 pg/mlとなり、IL-10濃度は341 pg/mlとなった。LPS注射から4時間後に、IL-6、IL-1bおよびIL-10はそれぞれ、6,100 pg/ml、299 pg/mlおよび229 pg/mlであった。血清中のSAA濃度は、LPS注射から4時間後までに0.405 mg/mlとなった。血清中のSAA濃度は、LPS注射から24時間後まで3.9 mg/mlに増加し続けたが、血清中のSAA濃度が1~2 mg/mlを超えると、SAAと他の血清成分との間の相互作用のため、既存のELISAキットで正確にまたは再現性よく測定するのは困難である。これらの結果から、IL-TIF(実施例31B)のほかに、炎症誘発性サイトカインが、このモデルで実際に産生されることが示唆された。従って、以下の基準が、軽度の内毒素血症のLPSモデルに対する生物学的マーカーとして樹立された: LPS注射から1時間後のTNFa血清濃度、LPS注射から4時間後のIL-6血清濃度ならびにLPS注射から4時間および8時間後のSAA血清濃度。

10

20

30

40

50

【0402】

個々の動物群の体温は、72時間の実験の間、外科的に埋め込まれた遠隔計測装置により監視された。マウスの体温はLPS注射から30分後、37.07 ~ 34.98 に、最大で2 まで低下した。

【0403】

LPS注射の30分前にzcytor16-Fc融合タンパク質100 μgを注射すると、4時間および8時間の時点でのSAA誘導が約50%に著しく低下するが、zcytor16-Fc 10 μgでは有意な効果はなかった。TNF- およびIL-6濃度の有意な変化は認められない。Zcytor16-Fcを注射すると、1時間の時点で、循環好中球の総数が減少した。zcytor16-Fcの投与により、SAA誘導におけるzcytor18活性を無効化できることが示された。

10

【0404】

B. Alamar Blue増殖測定法でBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を使用したLPSによる内毒素血症マウスモデルのマウス血清中のIL-TIF活性の検出

本明細書に記載のBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を遠沈させ、PBSで2回洗浄してmIL-3の除去を確実にし、それから3回目の遠心を行い、完全培地(RPMI 1640、10% FBS、1% GlutaMAX、1%ピルビン酸ナトリウム)、但しmIL-3が入っていない培地(以降、「mIL-3不含培地」と称する)に再懸濁させた。次に、細胞を血球計中で計測した。細胞は、mIL-3不含培地を用い、1ウェルあたり容量100 μl中、1ウェルあたり細胞5000個として96-ウェル形式でプレーティングした。

【0405】

上記の実施例31Aに記載の実験より得たLPSによる内毒素血症マウスの血清を、プレートの最上列に、mIL-3不含培地で2%に希釈し、それから各ウェルに容量100 μlを残すようにして、96-ウェルプレートの残りの7列に下側方向へ連続的に倍々希釈した。次いで、これに細胞100 μlを添加して、総測定容量200 μl中、血清の終濃度を1%、0.5%、0.25%、0.125%、0.063%、0.031%、0.016%、および0.018%とした。測定用プレートを37 °C、5% CO₂で4日間インキュベートし、その時点で、Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL)を1ウェルあたり20 μlで添加した。Alamar Blueにより、生細胞数に基づいた蛍光読み出しが得られ、従って陰性対照と比較した細胞増殖が直接測定される。プレートは、波長530(励起)および590(発光)で、Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter(Wallac, Turku, Finland)にて測定した。

20

30

【0406】

結果から、0時間、1時間、8時間、および16時間の時点でバックグラウンド・レベルを超える著しい増殖は示されなかった。4時間の時点の血清試料では、バックグラウンドを超える増殖の4倍増加~10倍を超える増加が示されたことから、IL-TIFがこれらの試料に存在していることが示唆された。

【0407】

C. LPSによる内毒素血症マウスモデル: zcytor16の効果を評価する実験

マウスでLPS 25 μgの単回IP投与により誘発された炎症誘発性サイトカインに及ぼすzcytor16処置能について試験した。全ての試料をSAA、IL-TIFおよび循環好中球の総数について分析した。各群の一部について、特定のサイトカイン濃度を分析した(1時間の試料をTNF- についてスクリーニングし、4時間の試料をIL-6について分析した)。動物を下記の表17に示される時点で屠殺し、分析のため白血球および血清を採取し、分注した。

40

【0408】

BI/6雌マウス(CRL)72頭に、下記の表17に記載される通り、zcytor16を単回IP投与した。対照マウスはC57BI/6(CRL)とした。

【0409】

30分後、内毒素血症のカスケードを開始させるため、これらのマウスに100 μlとしたLPS(Sigma) 25 μgを別にIP注射した。各群のマウスを下記の表17に記載の対応時点で屠殺し、循環好中球の総数を測定するために全血50 μlを採取して、残りは血清を得るために遠沈し、本明細書に記載の種々の測定用に分注した。

50

【0410】

(表17)

群	頭数	処置	LPS	屠殺	試料
	8	100 μ g zcytor16 IP	処置(tx)から30分後にIP投与25 μ g	1時間	血清として分注 CBC用の血球
	8	10 μ g zcytor16 IP	処置(tx)から30分後にIP投与25 μ g	1時間	血清として分注 CBC用の血球
	8	200 μ l PBS IP	処置(tx)から30分後にIP投与25 μ g	1時間	血清として分注 CBC用の血球
	8	100 μ g zcytor16 IP	処置(tx)から30分後にIP投与25 μ g	4時間	血清として分注 CBC用の血球
	8	10 μ g zcytor16 IP	処置(tx)から30分後にIP投与25 μ g	4時間	血清として分注 CBC用の血球
F	8	200 μ l PBS IP	処置(tx)から30分後にIP投与25 μ g	4時間	血清として分注 CBC用の血球
G	8	100 μ g zcytor16 IP	処置(tx)から30分後にIP投与25 μ g	8時間	血清として分注 CBC用の血球
H	8	10 μ g zcytor16 IP	処置(tx)から30分後にIP投与25 μ g	8時間	血清として分注 CBC用の血球
J	8	200 μ l PBS IP	処置(tx)から30分後にIP投与25 μ g	8時間	血清として分注 CBC用の血球
K	5	対照	なし	LPS前	血清として分注 CBC用の血球

10

20

30

【0411】

D. Zcytor16/Fc4はインピボでSAA誘導を無効化する：LPSによる内毒素血症マウスモデルでLPSにより誘導されるSAA発現がzcytor16-Fc4注射により阻害されることを示すSAA ELISA:

A:

zcytor16がLPSによる内毒素血症マウスモデルでSAA誘導を阻害できるかどうか評価するため、上記の実施例31Cの表17に示されるように、LPS注射の30分前に、マウスにZcytor16を注射した。

40

【0412】

4時間および8時間の試料のSAA濃度を測定するためのELISAは、製造元の使用方法に従いMouse SAA Immunoassay Kit (BioSource International, California)を用いて行った。4時間の時点では、Zcytor16 100 μ gまたは10 μ gで処置したマウスは、PBS注射マウスと比べてSAA濃度の用量依存的な、統計学的に有意な減少を示した。8時間の時点では、100 μ gで処置したマウスは、PBS注射マウスと比べてSAA濃度の統計学的に有意な減少を示し続けた。このことから、Zcytor16が存在すると、インピボでLPSによるSAA誘導を阻害できることが示唆される。

【0413】

実施例32 FlagTBxZcytor16のパキウイルス発現

50

発現ベクター-pzBV37L:egtNF(tbx)sCytor16を設計かつ調製して、昆虫細胞でFlagTBXzCytor16ポリペプチドを発現させた。

【0414】

FlagTBXzCytor16の発現

発現ベクター-pzBV37L:egtNF(tbx)sCytor16を設計して、上流6アミノ酸のトロンピン切断部位およびこの酵素切断部位の上流にN末端Flagエピトプタグを有するzCytor16ポリペプチドを発現させた。このコンストラクトを使用して、シグナルペプチドの切断後に、可溶性受容体配列のすぐ上流に酵素プロセッシング部位を有するflagタグ付(tagged)zCytor16を発現させることができる。

【0415】

A. pzBV37LegtNF(tbx)sCytor16の構築

5'および3'末端にそれぞれBspelおよびXbaI制限部位を含む、698 bpのFlagTBXzCytor16配列断片は、鋳型を含むzCytor16 cDNAから、2ラウンドのPCR増幅により作製した。プライマー-ZC40,940(配列番号:57)およびZC40,943(配列番号:58)を第一ラウンドで使用し、プライマー-ZC40942(配列番号:559)およびZC40,943(配列番号:58)を第二ラウンドで使用した。第一ラウンドのPCRの場合、反応条件は次の通りとした:容量100 μ lの反応にExpand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)を使用し、94 $^{\circ}$ Cで2分を1サイクル; 94 $^{\circ}$ Cで15秒、50 $^{\circ}$ Cで30秒、および72 $^{\circ}$ Cで60秒を35サイクル; 72 $^{\circ}$ Cで5分を1サイクル; その後4 $^{\circ}$ Cに浸漬。第一ラウンドの反応混合液5 μ lをゲル電気泳動(1% NuSieveアガロース)により可視化した。正しいサイズのPCR産物の存在が確認されたら、鋳型として第一ラウンドの反応液1 μ lを用い、第二ラウンドのPCRを行った。第二反応の条件は、第一反応と同じとした。第二ラウンドのPCR反応液5 μ lをゲル電気泳動(1% NuSieveアガロース)により可視化した。反応混合液の残りは、製造元の使用説明書に従ってQiagen PCR精製キットにより精製し、水30 μ lに溶出した。このcDNAを容量35 μ l中、BspelおよびXbaI(New England Biolabs, Beverly, MA)を37 $^{\circ}$ Cにて適当な緩衝液の条件で用いて消化した。消化したPCR産物のバンドは、1%アガロースTAEゲル中を泳動させて、切り出し、QIAquick(商標) Gel Extraction Kit (Qiagen, カタログ番号28704)を用いて精製し、水30 μ lに溶出した。消化したFlagTBXzCytor16 PCR産物をベクター-pzBV37LのMCSに、BspelおよびXbaI部位で連結した。pZBV37Lベクターは、pFastBac1(商標) (Life Technologies)発現ベクターの改変型であり、pFastBac1のポリヘドロニン・プロモーターを除去して、後期活性化塩基性タンパク質プロモーター(Basic Protein Promoter)およびMCS上流のEGTリーダーシグナル配列と置換されている。制限酵素消化したFlagTBXzCytor16のPCR断片5 μ lおよび対応するpZBV37Lベクター50 ngを、適当な緩衝液の条件で、容量20 μ l中、16 $^{\circ}$ Cで一晩、連結させた。ライゲーション混合物5 μ lを2 mmギャップのエレクトロポレーション・キュベット(BTX, モデル番号620)のなかで、400 μ s、2 Vおよび25 μ Fのエレクトロポレーションにより、ElectoMAX(商標) DH12s(商標)細胞(Life Technologies, カタログ番号18312-017) 50 μ lに形質転換した。形質転換細胞をSOC培地(2% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 10 ml 1M NaCl, 1.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄および20 mMグルコース) 350 μ lに希釈して、37 $^{\circ}$ Cで1時間増殖させ、希釈液50 μ lを、100 μ g/mlアンピシリンを含有するLBプレート上にプレーティングした。PCR法によりクローンを解析した。陽性クローンを選択し、プレーティングし、配列決定にかけた。適当な配列が確認されたら、陽性クローンのDNA 25 ngをDH10Bac(商標)Max Efficiency(登録商標)コンピテント細胞(GIBCO-BRL カタログ番号10361-012) 100 μ lに、42 $^{\circ}$ Cのヒートブロック中で、45秒間のヒートショックにより形質転換した。形質転換したDH10Bac(商標)細胞をSOC培地(2% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 10 ml 1M NaCl, 1.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄および20 mMグルコース) 900 μ lに希釈して、37 $^{\circ}$ Cで1時間増殖させ、100 μ lを、50 μ g/mlカナマイシン、7 μ g/mlゲンタマイシン、10 μ g/mlテトラサイクリン、40 μ g/ml IPTGおよび200 μ g/ml Blue Galを含有するルリア寒天(Luria Agar)プレート上にプレーティングした。プレートを37 $^{\circ}$ Cで48時間インキュベートした。カラーセクション(色選択)を利用して、転移したウイルスDNAを有する細胞(「バクミド」と呼ばれる)を同定した

10

20

30

40

50

。色が白色であったコロニーを解析のために選び取った。PCR法によりコロニーを解析し、増殖のため陽性コロニー(所望のバクミドを含む)を選択した。プライマー-ZC447(配列番号:34)およびZC976(配列番号:7)を用い、PCR法によって、バクミドの転移性因子に対するプライマーによりDNAを増幅することで、クローン正しい分子量の挿入断片についてスクリーニングした。PCR反応の条件は、次の通りとした: 94 で2分を1サイクル; 94 で10秒、50 で30秒、および72 で120秒を25サイクル; 72 で5分を1サイクル; その後、4 に浸漬。PCR産物を1%アガロースゲル上で泳動して、挿入断片サイズを調べた。正しい挿入断片を有するクローンを増殖させて、バクミドDNAを単離かつ精製した。このバクミドDNAを使用して、Spodoptera Frugiperda (Sf9)細胞にトランスフェクトした。

【0416】

B. トランスフェクション

Sf9細胞を6-ウェルプレートに1ウェルあたり細胞 1×10^6 個として播き、27 で1時間接着させた。バクミドDNA 約5 μ gをSf-900 II SFM (Life Technologies) 100 μ lに希釈した。Lipofectamine(商標) Reagent (Life Technologies、カタログ番号18324-012) 20 μ lをSf-900 II SFM 100 μ lに希釈した。バクミドDNAと脂質の溶液を穏やかに混ぜて、室温で45分間インキュベートした。Sf-900 II SFM 800 μ lを脂質-DNA混合液に加えた。ウェルから培地を吸引し、DNA-脂質混合液1 mlを細胞に添加した。細胞を27 で一晩インキュベートした。DNA-脂質混合液を吸引し、Sf-900 II SFM培地 2 mlを各プレートに添加した。プレートを27 、湿度90%で、およそ7日間インキュベートし、その後、ウイルスを集菌した。

【0417】

C. 増幅

Sf9細胞を6-ウェルプレートに1ウェルあたり、SF-900II 2 ml中、細胞 1×10^6 個として播いた。ウェルにトランスフェクション・プレートから得たウイルス液500 μ lを入れて、プレートを27 、湿度90%で、96時間インキュベートし、その後、ウイルスを集菌した(一次増幅)。

【0418】

第二ラウンドの増幅は、次のように進めた: Sf9細胞を6-ウェルプレートに1ウェルあたり、SF-900II 2 ml中、細胞 1×10^6 個として播いた。ウェルに一次増幅プレートから得たウイルス液100 μ lを入れて、プレートを27 、湿度90%で、144時間インキュベートし、その後、ウイルスを集菌した(二次増幅)。

【0419】

さらに増幅ラウンドを実施した(第3ラウンドの増幅)。Sf9細胞は、密度が約 1×10^6 細胞/mlとなるまで、250 mlの振盪フラスコに入れたSf-900 II SFM 50 ml中で増殖させた。次いで、この細胞に上記のプレートから得たウイルスストック液1 mlを感染させて、27 で4日間インキュベートし、その後、ウイルスを集菌した。

【0420】

このウイルスストック液を増殖阻害曲線により力価決定し、MOI 1を示した力価培養液を合計48時間、続けて増殖させた。N末端Flagエピトープに特異的な一次モノクローナル抗体およびHRP結合ヤギ抗マウス二次抗体を用いて、上清をウエスタンブロット法により解析した。結果として、約30 kDaのバンドが示された。上清をまた、活性分析にかけた。

【0421】

次に、大量のウイルスストック液を以下の方法により作製した: Sf9細胞は、密度が約 1×10^6 細胞/mlとなるまで2800 mlの振盪フラスコに入れたSf-900 II SFM中で増殖させた。次いで、この細胞に第3ラウンドの増幅から得たウイルスストック液5 mlを感染させて、27 で96時間インキュベートし、その後、ウイルスを集菌した。

【0422】

より大規模の感染を成し遂げて、下流の精製のための材料を供給した。

【0423】

実施例33 皮膚に対するIL-TIFポリペプチドのインビボ効果

10

20

30

40

50

A. IL-TIFによる表皮肥厚症

マウス(雌、C3H/HEJ、8週齢; Jackson Labs, Bar Harbor, ME)を6頭かならる3群と4頭かならる1群に分けた。ヒトBHK細胞により産生されたIL-TIFは、小型浸透圧ポンプ(mini-osmotic pump)を介した持続注入により投与して、ポンプに含まれるIL-TIFの濃度に釣り合った局所および定常状態の血清濃度を実現した。Alzet小型浸透圧ポンプ(モデル2002; Alza社, Palo Alto, CA)に、無菌条件下で、ポンプ内濃度が群1のマウスの場合は2 mg/mL、群2のマウスの場合は0.2 mg/mL、群3のマウスの場合は0.02 mg/mL、または群4のマウスの場合は0 mg/mL(希釈液のみ)となるようにリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.0)で希釈したIL-TIFタンパク質(A601F, 0.22 mL)を注入した。ポンプは、背部皮膚の1cmの切開部からマウスの皮下に埋め込み、切開皮膚を無菌的創縫合で閉じた。これらのポンプは、14日間にわたって1時間あたり0.5 μ lの比率でその内容物を輸送するように設計されている。この名目注入率を用いて投与量を算出すると、群1~4それぞれに対し、24 μ g/日、2.4 μ g/日、0.24 μ g/日および0 μ g/日となった。

10

【0424】

14日間の終了時点で、マウスを安楽死させ、各マウスからポンプ域周辺の皮膚試料およそ1 cm角を採取した。この皮膚を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。ホルマリン固定した皮膚試料をパラフィン包埋し、日常的に処理し、5 μ mに切断して、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。この組織は、ACVP委員会により認定された獣医病理学専門医により、盲目的に顕微鏡検査された。組織学的な変化が認められた。以下の採点法を用い、表皮肥厚症(即ち、表皮肥厚)の重症度を主観的な方法でスコア化した: 0-正常、1-最低限の表皮肥厚症、2-軽度の表皮肥厚症、3-中等度の表皮肥厚症および重度の表皮肥厚症。さらに、選択群の皮膚をCoolSnapデジタルカメラ(Roper Scientific社, San Diego, CA)で画像化し、表皮の厚さを、組織形態計測ソフトウェア(Scion Image for Windows, v. 4.02, Scion社, Frederick, MD)を用いて測定した。

20

【0425】

IL-TIFを2.4、および24 μ g/日で投与すると、対照群の皮膚で観察されるよりも一貫して高い表皮肥厚の平均スコア(sを参照されたい)から示されるように、表皮肥厚が引き起こされた。さらに、IL-TIF処置マウスでは同様に、単核球が表皮に浸潤していた。これらの浸潤は、媒介物による処置マウスでは観察されなかった。

30

【0426】

群単位での表皮の厚さからなる表皮肥厚スコアおよび皮膚の厚さからなる測定値(一般的な画素単位での)は、次の通り、下記表18に示されている:

【0427】

(表18)

群#	ポンプ	平均表皮肥厚	厚さ測定値
	n=		
1	6	IL-TIF 24 μ g/日	3.0 ND
2	6	IL-TIF 2.4 μ g/日	2.4 67.5
3	6	IL-TIF 0.24 μ g/日	2.2 ND
4	4	PBS 注入	1.8 45.6

40

【0428】

B. IL-TIFによる表皮肥厚症に対するzcytor16の効果

マウス(雌、C3H/HEJ、8週齢; Jackson Labs, Bar Harbor, ME)を各8頭かならる8群に分けた。IL-TIFは、実施例32aに示されるように、小型浸透圧ポンプ(mini-osmotic pump)を介した持続注入により投与した。Alzet小型浸透圧ポンプ(モデル2001; Alza社, Palo Alto, CA)に、無菌条件下で、ポンプ内濃度が群1~2のマウスの場合は0.22 mg/mL、群3~4のマウスの場合は0.45 mg/mL、群5~6のマウスの場合は0.9 mg/mL、または群7~8のマウス

50

の場合は0 mg/mL(希釈液のみ)となるようにリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.0)で希釈したIL-TIFタンパク質(A#601F, 0.22 mL)を注入した。これらのポンプは、14日間にわたって1時間あたり0.5 μ lの比率でその内容物を輸送するように設計されている。この名目注入率を用いて投与量を算出すると、群1~2では10 μ g/日、群3~4では5 μ g/日、群5~6では2.5 μ g/日および群7~8では0 μ g/日となった。IL-TIFが所定投与量の各群のペアに対し、片方の群には、腹腔内経路により(本明細書に記載の)ヒトzcytor16 Fcタンパク質0.1 mgを3回(第1、3、および5日目)注射した。他方の群には、同じやり方で媒介物(PBS)を注射した。

【0429】

調査の第8日目に、マウスを安楽死させ、各マウスからポンプ域周辺の皮膚試料およそ1 cm角を採取した。この皮膚を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。ホルマリン固定した皮膚試料をパラフィン包埋し、日常的に処理し、5 μ mに切断して、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。この組織は、ACVP委員会により認定された獣医病理学専門医により、盲目的に顕微鏡検査された。本調査は、前実施例とは異なるやり方でスコア化した。基底層から顆粒層までの、表皮中の層の数を決定した。この結果に基づき、切片を次のようにスコア化した: 0-正常(2~3層)、1-軽度の肥厚(3~4層)、2-中等度の肥厚(4~6層)および重度の肥厚(6層を超える)。

【0430】

IL-TIFを2.5、5、10 μ g/日で投与すると、表皮肥厚が引き起こされた(表19を参照されたい)。さらに、IL-TIF処置動物では同様に、単核球が表皮に浸潤していた。これらの浸潤は、媒介物による処置対照では観察されなかった。zcytor16 100 μ gを同時投与(3回注射)すると、1日あたりIL-TIF 5 μ gで処置したマウスの表皮肥厚の量が減少した。

【0431】

群単位での表皮の厚さからなる表皮肥厚スコアは、次の通り、下記表19に示されている:

(表19)

群#	n = <u>ポンプ</u>	<u>注射</u>	<u>平均表皮肥厚</u>
1	8	IL-TIF 2.5 μ g/日	媒介物100 μ L (3回注射) 1.1
2	8	IL-TIF 2.5 μ g/日	zcytor16 100 μ g (3回注射) 0.8
3	8	IL-TIF 5 μ g/日	媒介物100 μ L (3回注射) 2.0
4	8	IL-TIF 5 μ g/日	zcytor16 100 μ g (3回注射) 0.6
5	8	IL-TIF 10 μ g/日	媒介物100 μ L (3回注射) 2.0
6	8	IL-TIF 10 μ g/日	zcytor16 100 μ g (3回注射) 1.9
7	8	媒介物	媒介物100 μ L (3回注射) 0.0
8	8	媒介物	zcytor16 100 μ g (3回注射) 0.0

表皮肥厚および免疫浸潤も同様に、ヒトの乾癬皮膚で観察された。IL-TIFを皮下注射して観察された皮膚の表現型から、乾癬の病因におけるIL-TIFの潜在的役割がさらに示唆された。zcytor16-FcはIL-TIFにより誘発される皮膚の表現型を無効化できるという事実から、抗IL-TIF中和抗体のような他のIL-TIFアンタゴニストまたは乾癬およびIL-TIFによる他の炎症疾患の治療のための可溶性受容体の潜在的有用性が示唆される。

【0432】

C. IL-TIFによる表皮肥厚症に対する抗IL-TIF抗体の効果

IL-TIFに対する抗体がIL-TIFのインビボ活性を阻害する活性は、IL-TIFタンパク質の皮下注入により引き起こされる表皮肥厚症の組織学的指標を用い、同じ方法で評価される。このモデルの例としては、上記の実施例33(A)および33(B)に記載されるように、C3H/HEJ

マウスの皮下に小型浸透圧ポンプ(mini-osmotic pump)を埋め込む。IL-TIFへの暴露の間に、マウスに、IL-TIFに対する精製モノクローナル抗体を注射して処置するかまたは対照として媒介物を同様に注射する。IL-TIFの注入時間の終了時点で、組織学的解析のため、ポンプ域から皮膚が試料採取されるものと思われる。zcytor16の可溶性の受容体IL-TIFアンタゴニストと同様、IL-TIFアンタゴニストである本発明の中和抗体は、IL-TIFにより引き起こされる表皮肥厚および免疫細胞の浸潤の減少を示すこと、およびそれ故、乾癬や他のIL-TIFによる炎症疾患に対する治療薬としてのIL-TIFアンタゴニストとして有用であることが予想される。

【0433】

実施例34 IL-TIFはヒトの乾癬の皮膚試料で亢進される

A. RNA試料:

正常の皮膚試料ならびに乾癬患者の皮膚試料を得た。後者には、安定なブランク状乾癬の病変皮膚および隣接する非病変皮膚が含まれた。RNAは、従来法によりヒトの皮膚試料から単離した。RNA試料の完全性および品質は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn Germany)で調べた。

【0434】

B. 定量的RT-PCR法のためのプライマーおよびプローブ

ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems社, Foster City, CA)を用いたリアルタイム定量RT-PCR法が以前に報告されている(Heid, C. A.ら、Genome Research 6: 986~994, 1996; Gibson, U.E.M.ら、Genome Research 6: 995~1001, 1996; Sundaresan, S.ら、Endocrinology 139:4756~4764, 1998を参照されたい)。この方法には、レポーター蛍光色素およびクエンチャー蛍光色素の両方を含む遺伝子特異的プローブの利用が取り入れられている。プローブが無傷である場合、レポーター色素の発光は、クエンチャー色素が近接することで打ち消される。さらなる遺伝子特異的なフォワードおよびリバースプライマーを用いたPCR伸長の間に、プローブは、rTth DNAポリメラーゼの5'から3'核酸分解活性により切断され、これによりプローブからレポーター色素が放出されて、蛍光発光の増加が生じる。

【0435】

IL-TIF発現のリアルタイム定量RT-PCR法に使用したプライマーおよびプローブは、プライマー設計ソフトウェアPrimer Express(商標) (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて設計した。ヒトIL-TIFに対するプライマーは、ゲノムDNAの増幅をなくすため、イントロン-エクソン結合をまたぐようにして設計した。フォワードプライマー-ZC42459(配列番号:65)およびリバースプライマー-ZC42458(配列番号:66)を濃度800 nMとしてPCR反応(以下)で使用して、72 bpの産物を合成した。対応するIL-TIFプローブZC42460(配列番号:67)は、ZymoGenetics社で合成かつ標識された。IL-TIFプローブは、レポーター蛍光色素(6-カルボキシ-フルオレセイン)(FAM) (PE Applied Biosystems)で5'末端をおよびクエンチャー蛍光色素(6-カルボキシ-テトラメチル-ローダミン)(TAMRA) (PE Applied Biosystems)で3'末端を標識した。

【0436】

C. リアルタイム定量RT-PCR法

IL-TIF mRNAの相対濃度は、TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents Kit (PE Applied Biosystems)を用い、総RNA試料を分析することにより決定した。IL-TIF転写産物を流出させて、定量に使用する標準曲線を作成した。この曲線は、IL-TIFの全伝達暗号の総コピー数 $10^8 \sim 10^3$ に及ぶ10倍連続希釈からなり、標準曲線の各点は3重分析とした。皮膚の総RNA試料を同様に、ヒトIL-TIFの転写レベルおよび内部対照としてhGUSのレベルについて3重で分析した。総量25 μ l中、以下を含有するTaqMan EZ RT-PCR反応(PE Applied Biosystems)に各RNA試料をかけた: DEPC処理水(DNase/RNaseなし)に溶解した総RNA 約25 ng; 適当なプライマー(約800 nMのZC42459(配列番号:65)およびZC42458(配列番号:66)); 適当なプローブ(約100 nM ZC42460(配列番号:67)); 1x TaqMan EZ緩衝液; 3 mM酢酸マンガン; 300 μ Mの各d-CTP、d-ATP、およびd-GTPならびに600 μ M d-UTP; rTth DNA ポリメラーゼ(0.1

10

20

30

40

50

U/μl); およびAmpErase UNG (0.01 U/μl)。PCR温度サイクリング条件は、次の通りとした: 50 で2分を1サイクルの最初のUNG処理ステップ; 続いて60 で30分を1サイクルの逆転写(RT)ステップ; 続いて95 で5分を1サイクルのUNG不活化ステップ; 続いて94 で20秒および60 で1分の増幅を40サイクル。

【0437】

相対的なIL-TIF RNAレベルは、製造元のPE Biosystems (ユーザー向け機関紙#2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997)に報告されているように標準曲線法を使って決定した。hGUSの測定結果を使用して、IL-TIFレベルを標準化した。データは、下記表20に示されている。

【0438】

(表20)

皮膚試料	IL-TIF
正常部	0
非病変部	0
病変部	1149

【0439】

正常患者の皮膚試料または非病変部の皮膚試料では、IL-TIFのmRNAは検出されなかった。対照的に、乾癬患者の病変皮膚では、IL-TIFの伝達暗号が劇的に亢進していた。これらのデータは、ヒトの乾癬とのIL-TIFの疾患的な結びつきを強く支持するものである。

【0440】

ヒトの乾癬病変部でIL-TIFの過剰発現が示されたことから、IL-TIFはヒトの乾癬に関与していることが示唆される。さらに、本明細書に記載されるように、形質転換マウスでIL-TIFを過剰発現させると、乾癬の表現型を示す表皮肥厚と免疫細胞の関与が示された、そしてさらに正常マウスにIL-TIFを注射すると、乾癬の表現型を示す表皮肥厚と免疫細胞の関与が示されたが、これらは可溶性の受容体アンタゴニストzcytor16により取り除かれた。このようなインビボのデータから、炎症誘発性のIL-TIFが乾癬に関与していることがさらに示唆される。従って、本発明の抗ヒトIL-TIFモノクローナル抗体のような、IL-TIF活性に対するアンタゴニスト、ならびに可溶性受容体およびその受容体に対する抗体は、炎症疾患の治療上の処置に、とりわけIL-TIFに対するアンタゴニストとして乾癬の治療に有用である。さらに、本発明の抗ヒトIL-TIFモノクローナル抗体のような、IL-TIF活性に対するアンタゴニスト、ならびに可溶性受容体およびその受容体に対する抗体は、その他の炎症疾患の治療上の処置に、例えばIL-TIFに対するアンタゴニストとしてアトピー性皮膚炎、IBD、結腸炎、内毒素血症、関節炎、関節リウマチ、および乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血性ショック、多臓器不全、喘息または気管支炎のような炎症性肺傷害、細菌性肺炎、乾癬、湿疹、アトピー性および接触性皮膚炎、ならびに潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患の治療に有用である。

【0441】

実施例35 ヒトIL-TIFポリクローナル抗体

抗IL-TIFポリクローナル抗体は、New Zealand白ウサギ2羽に、BHK細胞から産生された、精製した成熟型組換えヒトIL-TIFポリペプチド(配列番号:3のアミノ酸残基22(アラニン)から167(イソロイシン))(IL-TIF-BHK)を免疫することで調製した。各ウサギに、精製タンパク質200 μgをフロイント完全アジュバントとともに初回腹腔内(IP)注射し、その後、3週間ごとにペプチド100 μgをフロイント不完全アジュバントとともにブースタIP注射した。2回目のブースタ注射(計3回注射)の投与から7~10日後、動物を出血させて、血清を採取した。その後、3週間ごとに動物をブースト(追加免疫)し、出血させた。

【0442】

ヒトIL-TIF特異的ポリクローナル抗体は、CNBr-SEPHAROSE 1 gあたり、特異抗原で精製

10

20

30

40

50

した組換えタンパク質のヒトIL-TIF-BHK 10 mgを用いて調製され、続いて一晚PBS中にて20倍に透析濃縮された、CNBr-SEPHAROSE 4Bプロテインカラム(Pharmacia LKB)を用い、免疫ウサギ血清からアフィニティー精製した。ヒトIL-TIF特異的抗体は、抗体の標的として、精製した組換えタンパク質のヒトIL-TIF-BHK 500 ng/mlを用い、ELISA法により特徴付けた。ウサギ抗ヒトIL-TIFアフィニティー精製抗体の検出下限(LLD)は、その特異的な精製組換え抗原のヒトIL-TIF-BHKに対して280 pg/mlである。

【0443】

ヒトIL-TIF特異的ポリクローナル抗体を、BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞に対する精製組換えヒトIL-TIF-BHKの細胞増殖活性(実施例22)を遮断するその能力についてさらに特徴付けた(「中和アッセイ」)。ヒトIL-TIF特異的ポリクローナル抗体の50倍モル過剰で、細胞増殖を阻害するのに十分であった。

10

【0444】

実施例36 抗ヒトIL-TIFモノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Sprague-Dawley雌ラット(Charles River Laboratories, Wilmington, MA) 4頭に、BHK細胞から産生された、精製した成熟型組換えヒトIL-TIFポリペプチド(配列番号:3のアミノ酸残基22(アラニン)から167(イソロイシン))(IL-TIF-BHK)を免疫することで調製した。各ラットに、精製ヒト組換えIL-TIFタンパク質100 µgをフロイント完全アジュバント(Pierce, Rockford, IL)とともに初回腹腔内(IP)注射し、その後、2週間ごとに精製組換えタンパク質50 µgをフロイント不完全アジュバントとともにブースタIP注射した。3回目のブースタ注射の投与から7~10日後、動物を出血させて、血清を採取した。

20

【0445】

ヒトIL-TIF特異的ラット血清試料は、500 ng/mlビオチン化ヒトIL-TIF-BHKおよび500 ng/mlビオチン化マウスIL-TIF、ビオチン化大腸菌(*E. coli*)muIL-TIF (R+D Systems, Minneapolis, MN)抗体標的を用い、ELISA法により特徴付けた。ラット3頭の血清試料は、特異的抗体標的のビオチン化ヒトIL-TIF-BHKに対して希釈率100,000倍および特異的抗体標的のビオチン化大腸菌(*E. coli*)muIL-TIFに対して希釈率10,000倍の力価を有していた。

20

【0446】

脾臓細胞およびリンパ節細胞を、高力価ラット2頭から収集し、SP2/0(マウス)ミエローマ細胞に、PEG 1500を用いて、2回の別の融合手順(脾臓細胞とミエローマ細胞との融合比率が4対1、「Antibodies A Laboratory Manual」、E. HarlowおよびD. Lane, Cold Spring Harbor Press)で融合させた。融合後に10日増殖させた後、ビオチン化組換えタンパク質のヒトIL-TIF-BHKおよびビオチン化組換えタンパク質の大腸菌(*E. coli*)muIL-TIFを別個の抗体標的として用いたELISA法により、特異的抗体を産生するハイブリドーマのプールを同定した。両ELISA法で陽性となったハイブリドーマのプールを、BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞に対する精製組換え大腸菌(*E. coli*)muIL-TIFの細胞増殖活性(実施例22)を遮断するその能力についてさらに分析した(「中和アッセイ」)。

30

【0447】

ELISA法のみでまたはELISA法と「中和アッセイ」で陽性結果を示すハイブリドーマのプールを、少なくとも2回、限界希釈法によりクローン化した。

40

【0448】

組織培養の培地から精製したモノクローナル抗体を、マウスおよびヒトの血清試料に入れた組換えおよび天然のヒトIL-TIFを定量測定するELISA法でその有用性について特徴付けた。選択した2個の抗体は、定量測定で、検出限界が100%ヒト血清に入れた組換え大腸菌(*E. coli*) huIL-TIF約1 ng/mlとなった。

【0449】

組織培養の培地から精製したモノクローナル抗体を、BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞に対する精製組換え大腸菌(*E. coli*)huIL-TIFまたは大腸菌(*E. coli*)muIL-TIFの細胞増殖活性(実施例22)を遮断するその能力について特徴付けた(「中和アッセイ」)。この方法で、6個の「中和」モノクローナル抗体を同定した。上記のヒトIL-TIFに対する中和モノクローナ

50

ル抗体を発現するハイブリドーマは、ブダペスト条約に基づく原型の寄託として、American Type Tissue Culture Collection(ATCC; Manassas VA)の特許寄託機関に寄託され、以下のATCCアクセッション番号が与えられた: 266.16.1.4.4.1(ATCC [#####]); 266.5.1.2.2.3(ATCC [#####]); 267.17.1.1.4.1(ATCC [#####]); 267.4.1.1.4.1(ATCC [#####]); 266.12.6.1.3.2.1(ATCC [#####]); 266.19.1.10.5.2(ATCC [#####])。

【0450】

実施例37 組織試料におけるIL-TIFタンパク質インビボ発現の免疫組織化学解析

A. 概要

IL-TIFタンパク質の発現および局在の免疫組織化学(IHC)解析は、ヒトIL-TIF-BHKに対して作製されたラットのモノクローナル抗体(Mab 266.19.1.10.5.2)(実施例36)を用いて、以下の組織試料で行われた: Human multi-Normal GridおよびTumor Grid; ヒトの膵炎、肺および腎臓疾患試料; ヒトの乾癬の皮膚試料; INC IL-TIF TG (ラットのインスリン・プロモーターから発現された)および野生型(WT)マウスの膵臓; muIL-TIF-EuLCK TGおよび野生型(WT)マウスの皮膚試料; ならびにDSS(野生型(WT)およびIL-TIF ノックアウト(KO))マウスの結腸試料。さらに、モノクローナル抗体MAB 266.19.1.10.5.2 (ラット抗huIL-TIF-BHK) 対 ポリクローナル抗体(ウサギ抗ヒトIL-TIF FL-BHK) (実施例35)の染色パターンを比較した。

【0451】

ラット抗ヒトIL-TIFモノクローナル抗体のMab 266.16.1.4.4.1、および試験したMab 266.19.1.10.5.2 (実施例36)は、大部分のBHK/ヒトIL-TIF細胞(50%を超える)を染色するが一部のBHK/マウスIL-TIF細胞(1~5%)を染色することが示された。これを使用して、ヒト患者および動物モデルの両試料でIL-TIFの組織の分布および発現について調べ、さらにこれを使用して、その染色パターンをウサギ・ポリクローナル抗体と比較し、その結果について確認した。

【0452】

B. 材料および方法

ヒト起源およびマウス動物モデルからの、ホルマリン固定されかつパラフィン包埋された細胞および組織は、5 μmに切断された。細胞には、陽性対照および陰性対照としてそれぞれ、ヒトまたはマウスIL-TIFを発現するBHK細胞および野生型BHK細胞が含まれた。ヒト組織には、種々の正常ヒト組織(例えば、脳、下垂体、副腎、乳房、腎臓、心臓、胃、小腸、大腸、胎児肝臓、肝臓、皮膚、膵臓、肺、扁桃腺、卵巣、精巣、前立腺、子宮、胎盤、甲状腺および脾臓)の50切片が含まれるMulti-tissue control slide (NormalGrid(商標); Biomed, Foster City, CA); 種々のヒト腫瘍(例えば、肺腺腫、肝腺腫、腎腺腫、結腸腺腫、乳腺腫、甲状腺腫、胃腺腫、前立腺腫、膵腺腫、卵巣腺腫、リンパ腫、黒色腫、ユーイング肉腫、類上皮肉腫、MFH肉腫、横紋筋肉腫、カルチノイド、未分化ガン、中皮腫、奇形腫(teretoma)および精上皮腫)の50切片が含まれるMulti-tissue control slide (TumorGrid(商標); Biomed, Foster City, CA); CHTN (Cooperation Human Tissue Network, Cleveland, Ohio)から得た肺ガン; NDRI (National Disease Research Interchange, Philadelphia, PA)から得た正常膵臓、慢性膵炎を伴う膵臓、慢性血管周囲炎を伴う肺、多巣性糸球体硬化症か、膜性増殖性糸球体腎炎か、または硬化性糸球体間質性線維症を伴う腎臓; ならびにヒトの乾癬の皮膚試料が含まれた。マウス組織には、炎症性腸疾患の動物モデル(本明細書に開示のDSSモデル、Swiss Webster雌マウス)から得た結腸ならびに媒介物または4% DSSを飲料水に入れて7日間処置した、zcyto10野生型(WT)およびノックアウト(KO)結腸炎動物モデル(DSSマウス、野生型およびzcyto10ノックアウト雌マウス)から得た結腸; およびmIL-TIF-EuLCK TGならびにmIL-TIF-INS対照およびTG動物を含むトランスジェニック(TG)動物モデルから得た皮膚試料が含まれた。組織学的検査のため、ブロック/スライドあたり1切片をヘマトキシリンとエオシン(H&E)で染色し、IL-TIFタンパク質の発現および局在を目的として、その次の切片を免疫組織化学的に染色した。

【0453】

免疫組織化学のため、細胞および組織切片をChemMate(商標) Capillary Gap Plus顕微

鏡スライド(BioTek, Winooski, Vermont)に載せて、60 のオーブンで60分間乾燥させ、キシレン中に5分を3回、100%エタノール中に4分、100%エタノール中に3分、および95%エタノール中に2分の標準的な条件により脱パラフィンした。次に、組織切片を、37 でペプシン(NeoMarkers Fremont CA)を用いる、20分間の酵素による抗原決定基の修復工程にかけ、続いて製造元の使用説明書(Zymed, South San Francisco, CA)に従ってアビジン/ビオチン-ブロッキングステップを行った。染色のため、TechMate 500(商標)自動免疫染色装置およびアビジン-ビオチン複合体検出システム(Ventana Biotek Systems, Tucson, AZ)を用いた免疫ペルオキシターゼ(IP)免疫組織化学法を採用した。TechMate 500(商標)自動免疫染色装置には、毛管現象の原理が採用され、IP法には、「サンドイッチ」法と呼ばれる免疫染色の一種が利用された。切片を5%正常ヤギ血清(Vector, Burlingame CA)のPBS溶液で10分間、予めブロッキングし、続いて緩衝液1(Signet, Dedham MA)で1回洗浄し、それから800倍希釈したIL-TIFに対する一次抗体(MAB 266.19.1.10.5.2、ラット抗huIL-TIF-BHK (実施例36)、2.04 mg/mlに精製したポリクローナル抗血清(PAS))と室温で30分間インキュベートし、続いて緩衝液1で5回洗浄した。一次抗体は、TechMate 500(商標)抗体希釈用緩衝液(Ventana)で希釈した。二次結合抗体として、5%正常ヤギ血清および2.5%脱脂粉乳のPBS溶液に加えて200倍希釈したビオチン化ヤギ抗ラットIgG (Vector)を室温で25分使用し、続いて緩衝液1で1回洗浄し、緩衝液2と3(Signet)で1回洗浄した。次いで、組織切片を7分間の3%過酸化水素液(HP)によるブロッキング(Ventana)に3回かけ、続いて緩衝液2と3で3回洗浄した。免疫ペルオキシターゼによる標識は、過酸化物DABキット(Ventana)で行い、アビジン-ビオチン複合体(ABC)と30分間インキュベートし、続いて緩衝液2と3で5回洗浄し、ジアミノベンジジン(DAB)と4分間×4回インキュベートし、続いて緩衝液2と3で2回洗浄し、1回水洗した(Signet, カタログ番号2340)。次いで、組織をメチル・グリーン(Dako, カタログ番号S1962)で10分間、対比染色し、続いて緩衝液2と3で2回洗浄し、3回水洗した。対照には、ラット一次抗体のアイソタイプ対照(Zymed)を一次抗体に換えて用いた、非免疫一次血清が含まれた。

【0454】

免疫染色はOlympus BH-2顕微鏡を用いて観察し、画像はCoolSNAP HQデジタルカメラ(Roper Scientific, Tucson, AZ)により捕捉した。

【0455】

C. 結果

陽性および陰性対照の細胞株: ラット抗huIL-TIF-BHKモノクローナル抗体MAB 266.19.1.10.5.2により、ヒトIL-TIF発現BHK細胞(+++)とマウスIL-TIF発現BHK細胞(+)の両方で陽性染色像が示され、野生型BHK細胞(-)では染色像が示されなかった。一次抗体に換えてラットのアイソタイプの陰性対照で染色した陽性および陰性BHK細胞株の全てで、染色像が示されなかった(-)ことから、この抗体がIL-TIFリガンドに特異的であることが示唆された。この抗体は、ヒトおよびマウスIL-TIFの両方に対する免疫交差反応性を有する。

【0456】

ヒト組織: Human multi-Normal GridおよびTumor Grid; 膵臓、肺および腎臓の疾患試料;

ならびにヒトの乾癬の皮膚試料について調べた。これらのヒト組織には、1) Multi-tissue control slide (NormalGrid(商標))/正常ヒト組織上の脳、下垂体、副腎、乳房、腎臓、心臓、胃、小腸、大腸、胎児肝臓、肝臓、皮膚、膵臓、肺、扁桃腺、卵巣、子宮、精巣、胎盤、甲状腺および脾臓; 2) Multi-tissue control slide (TumorGrid(商標))/ヒト異常組織/腫瘍上の肺腺腫、肝腺腫、腎腺腫、甲状腺腫、胃腺腫、前立腺腫、膵腺腫、卵巣腺腫、リンパ腫、黒色腫、ユーイング肉腫、類上皮肉腫、MFH肉腫、横紋筋肉腫、カルチノイド、未分化ガン、中皮腫、奇形腫、および精上皮腫; 3) CHTNおよび/またはNDRIから得た正常膵臓、慢性膵炎を伴う膵臓、慢性血管周囲炎を伴う肺、肺ガン、多巣性系球体硬化症を伴う腎臓、膜性増殖性系球体腎炎を伴う腎臓、硬化性系球体間質性線維症を伴う腎臓; 4)が含まれた。

マウス組織: INC IL-TIF TGおよびWTマウスの脾臓について調べた。INC IL-TIF TGの脾臓の島全体の散在性細胞では、モノクローナル抗体(Mab) MAB 266.19.1.10.5.2で、強い陽

性染色像(+++)が示され、WTの臍臓では染色像が示されなかった(-)。

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の比較: 抗IL-TIFポリクローナル抗体は、高感度であるが特異性は低いことが示され、その一方、モノクローナル抗体MAB 266.19.1.10.5.2は、特異性は高いが感度が低い。このモノクローナル抗体では、ヒトIL-TIF発現BHK細胞(+++)に対し、マウスIL-TIF発現BHK細胞(+)に対し、種々のヒトおよびマウス組織試料(+)で、およびINC mIL-TIF TGマウスの島(+++)で陽性染色像が示された。形質転換体の島にはいっそう高い割合(野生型に対し)で、陽性染色像が含まれた。形質転換体の島の染色は、おおむね島全体に分布していた(+++)が、野生型の島の染色は、おおむね島の辺縁に限定されていた(+)。しかし、この抗体ではまた、WT BHK陰性対照細胞に対する非特異的な染色が示された(+)。MAB 266.19.1.10.5.2では、ヒトIL-TIF発現BHK細胞(+++)に対し、マウスIL-TIF発現BHK細胞(+)に対し、およびINC mIL-TIF TGマウスの島(+++)で陽性染色像が示された。形質転換体の島の染色は、おおむね島全体に分布していた(+++)が、野生型の島では、陰性染色像が示された(-)。

10

【0457】

上記の内容から分かるように、本発明の特定の態様について、説明を目的として本明細書に記述してきたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、種々の変更をなすことが可能である。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲による場合を除いて限定されることはない。

【図面の簡単な説明】

20

【0458】

【図1】ヒトIL-TIFポリペプチド(hIL-TIF)(配列番号:3)およびマウスIL-TIFポリペプチド(mIL-TIF)(配列番号:38)の複数のアランメントである。図中の「:」は、マウスおよびヒト配列の間で同一であるアミノ酸を示し、図中の「.」は、保存された置換のアミノ酸を示す。ヒトとマウスの配列間には、全配列にわたって78.4%の一致性がある(167アミノ酸の重複)。

【図1】

	10	20	30	40		
hIL-TIF	NGTLATSOLLALLVQGGAAAPISSHCRLOKSNFQQPYITNRTFMLA					
	X:.....					
mIL-TIF	MAVLQKSMFSLSMGTLAASCLLLTALWAQEAVALPVNTRCKLEVSNFQQPYIVNRTFMLA					
	10	20	30	40	50	60
hIL-TIF	50	60	70	80	90	100
	KEASLADNNTDVRLEGEKLFHGVMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPOSDFQPYMQEVVP					
					
mIL-TIF	KEASLADNNTDVRLEGEKFRGVNAKQCYLMKQVLNFTLEDVLLPOSDFQPYMQEVVP					
	70	80	90	100	110	120
hIL-TIF	110	120	130	140	150	160
	FLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLDIVKKGESGEIKATGELDLFMSLRNACI					
X					
mIL-TIF	FLTKLSNQLSSCHISGDDONIQKVVRRKLVKKGESGEIKATGELDLFMSLRNACV					
	130	140	150	160	170	

【配列表】

2010220612000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年4月8日(2010.4.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者の癌を検出するための方法であって：

以下の群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体または抗体断片と、患者から得られた組織または生体試料を、該抗体または抗体断片が組織または生体試料中のその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートする段階；

(a)配列番号：3のアミノ酸番号28(Cys)～アミノ酸番号35(Phe)のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(b)配列番号：3のアミノ酸番号52(Ser)または55(Asp)～アミノ酸番号59(Asp)または62(Leu)のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(c)配列番号：3のアミノ酸番号94(Pro)または95(Gln)～アミノ酸番号100(Gln)または103(Met)のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(d)配列番号：3のアミノ酸番号113(Leu)～アミノ酸番号118(Ser)または119(Thr)のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(e)配列番号：3のアミノ酸番号123(Glu)～アミノ酸番号126(Asp)または128(His)のアミノ酸配列からなるポリペプチド；および

(f)配列番号：3のアミノ酸番号134(Gln)または144(Gly)～アミノ酸番号147(Gly)のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

組織または生体試料中の結合した抗体または抗体断片を視覚化する段階；および、

患者からの組織または生体試料中の結合した抗体または抗体断片のレベルを正常な対照組織または生体試料と比較する段階を含み、

正常対照組織または生体試料と比較して、患者の組織または生体試料に結合した抗体または抗体断片のレベルが増大していることにより、患者の癌が示される、方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	A 6 1 P 31/00	
C 1 2 N 5/0786 (2010.01)	A 6 1 P 31/04	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 0 7 K 14/00	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	2 0 2 G
	C 1 2 N 5/00	2 0 2 N
	C 1 2 N 5/00	2 0 2 L
	C 1 2 N 5/00	1 0 2

- (72)発明者 シュー ウェンフェン
 アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル 2 5 ス プレイス ノースイースト 8 8 0 9
- (72)発明者 カインズボーゲル ウェイン
 アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル 2 4 ス アベニュー ノースイースト 6 0 1 4
- (72)発明者 ヒューズ スティーブン ディー .
 アメリカ合衆国 ワシントン州 ケンモア 1 8 7 ス ストリート ノースイースト 5 5 3 0
- (72)発明者 チャンドラセッカー ヤスミン エイ .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サラトガ グラニテ コート 1 4 9 4 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA26 BA56
 4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
 4B065 AA94X AB04 BA30 CA24 CA25 CA44
 4C085 AA13 AA14 AA19 AA25 BB11 BB17 BB18 CC02 CC03 CC05
 CC21 DD62 EE01 GG01
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 DA76 EA22 EA24 FA74

专利名称(译)	抗il-tif抗体及其在炎症中的使用方法		
公开(公告)号	JP2010220612A	公开(公告)日	2010-10-07
申请号	JP2010051579	申请日	2010-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	津莫吉尼蒂克斯公司		
申请(专利权)人(译)	ZymoGenetics公司, 公司		
[标]发明人	シューウェンフェン カインズボーゲルウェイン ヒューズステイーブンディー チャンドラセツカーヤスミンエイ		
发明人	シュー ウェンフェン カインズボーゲル ウェイン ヒューズ ステイーブン ディー. チャンドラセツカー ヤスミン エイ.		
IPC分类号	C12P21/08 C07K16/18 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/574 A61K39/395 A61P29/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P31/00 A61P31/04 C07K14/00 C12N5/077 C12N5/0786 C12N5/0783 C12N5/10 C07K16/24		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P7/00 A61P9/10 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21 /04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/244 C07K2317/34 A61K39/3955		
FI分类号	C12P21/08.ZNA C07K16/18 C12N15/00.C G01N33/53.D G01N33/574.A A61K39/395.D A61K39/395.U A61P29/00 A61K39/395.C A61K39/395.L A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P31/00 A61P31/04 C07K14/00 C12N5/00.202.G C12N5/00.202.N C12N5/00.202.L C12N5/00.102 C12N15/12 C12N5/077 C12N5/0783 C12N5/0786 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA26 4B024/BA56 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064 /CC24 4B064/DA01 4B065/AA94X 4B065/AB04 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/AA25 4C085/BB11 4C085/BB17 4C085/BB18 4C085 /CC02 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA24 4H045 /FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/366842 2002-03-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：抑制IL-TIF多肽特异性抗体引起的炎症。IL-TIF是一种涉及炎症过程和人类疾病的细胞因子。产生针对IL-TIF的抗体的方法及其用途包括抗IL-TIF抗体和结合伴侣，以及在与IL-TIF相关的人类炎症性疾病中使用此类抗体和结合伴侣的IL-TIF。对抗TIF。[选择图]无

A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T