

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 518138

(P2003 - 518138A)

(43)公表日 平成15年6月3日(2003.6.3)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード* (参考)
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 6 3
33/50		33/50	Z 4 C 0 8 4
33/53		33/53	D 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全128数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 547554(P2001 - 547554)

(86)(22)出願日 平成12年12月18日(2000.12.18)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月20日(2002.6.20)

(86)国際出願番号 PCT/US00/34503

(87)国際公開番号 W001/046698

(87)国際公開日 平成13年6月28日(2001.6.28)

(31)優先権主張番号 60/172,979

(32)優先日 平成11年12月20日(1999.12.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/186,626

(32)優先日 平成12年3月3日(2000.3.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ケモセントリックス インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9407
 0、サン カルロス、インダストリアル ロ
 ード 1539

(72)発明者 スコール、トーマス ジェイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9402
 5、メンロ パーク、ミル アベニュー 2
 050

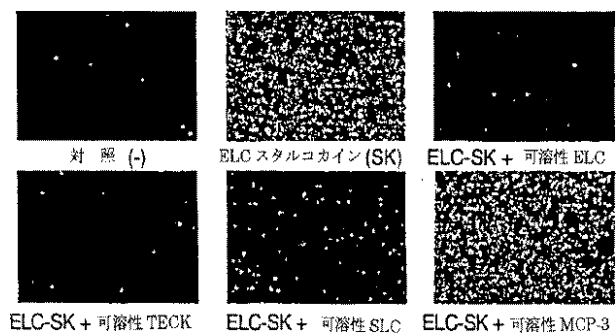
(74)代理人 弁理士 清水 徹男 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 テザード・リガンド及び使用方法

(57)【要約】

本発明は、受容体リガンド相互作用を分析するための方法、試薬及び装置、細胞及び細胞集団における受容体発現のプロファイルの決定、並びに診断及び薬物スクリーニング方法を提供する。本発明は、リガンド・ドメイン、スターク・ドメイン、及び任意に、固定化ドメインを有する固定化テザード・リガンド融合タンパク質を用いる。



【特許請求の範囲】**【請求項1】**

アレーに組織化された複数の異なる固定化テザード・リガンド融合タンパク質を含むアッセイ装置であって、該リガンド・スターク融合タンパク質が：

(a) リガンド・ドメイン、及び

(b) スターク・ドメイン、

を含む装置。

【請求項2】

アレーに組織化された複数の異なる固定化テザード・リガンド融合タンパク質を含むアッセイ装置であって、該リガンド・スターク融合タンパク質が：

(a) リガンド・ドメイン；

(b) 中間スターク・ドメイン；及び

(c) 固定化ドメイン、

を含み、ここで、該リガンド・ドメイン及び該スターク・ドメインは天然タンパク質においては会合しない装置。

【請求項3】

固定化テザード・リガンド融合タンパク質がムチン誘導スターク配列を含む請求項2の装置。

【請求項4】

固定化テザード・リガンド融合タンパク質がフラクタルカイン・ムチン反復領域配列を含む請求項2の装置。

【請求項5】

少なくとも幾つかの固定化テザード・リガンド融合タンパク質がケモカインをコードするリガンド・ドメインを含む請求項2の装置。

【請求項6】

受容体とリガンドとの相互作用を同定するための方法であって、

(a) 受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ；及び

(b) 該細胞及び融合タンパク質の結合を検出する、

ことを含み、ここで、融合タンパク質への細胞の結合は受容体と融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドとの相互作用に相関する方法。

【請求項7】

テザード・リガンドが請求項1のアッセイ装置に固定されている請求項6の方法。

【請求項8】

細胞が組換え受容体を発現する請求項6の方法。

【請求項9】

細胞が7回膜貫通受容体を発現する請求項6の方法。

【請求項10】

細胞がケモカイン受容体又はサイトカイン受容体を発現する請求項9の方法。

【請求項11】

細胞がオーファン受容体を発現する請求項6の方法。

【請求項12】

受容体と1つを上回るリガンドとの相互作用が検出される請求項6の方法。

【請求項13】

受容体とリガンドとの相互作用のモジュレータを同定するための方法であって

、

(a) 受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を試験化合物の不在下において固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ融合タンパク質への細胞の結合を測定し；

(b) 受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を試験化合物の存在下において固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ融合タンパク質への細胞の結合を測定し；及び

(c) (a) 及び (b) における結合のレベルを比較する、
ことを含み、ここで、試験化合物の存在下における細胞の結合の減少はその試験化合物が受容体と該融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドとの相互作用の阻害剤であることを示し、試験化合物の存在下における細胞の結合の増加はその試験化合物が受容体と融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当

するリガンドとの相互作用のエンハンサであることを示す方法。

【請求項14】

テザード・リガンドが請求項1のアッセイ装置上に固定されている請求項13の方法。

【請求項15】

受容体がケモカイン受容体である請求項13の方法。

【請求項16】

細胞集団中の細胞における受容体発現のプロフィールを検出するための方法であって：

(a) 該細胞集団を固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、及び

(b) 融合タンパク質への該細胞集団の細胞の結合を検出する、
ことを含み、ここで、融合タンパク質への細胞集団中の細胞の結合は融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドに結合する受容体の発現に相關する方法。

【請求項17】

工程(a)が集団を複数の異なる融合タンパク質と接触させることを含み、かつ工程(b)がゼロ、1又は2以上の融合タンパク質への細胞の結合を検出することを含む請求項16の方法。

【請求項18】

ゼロ、1又は2以上のテザード・リガンド融合タンパク質への前記集団の細胞の結合を検出することを含む請求項17の方法。

【請求項19】

テザード・リガンドが請求項1のアッセイ装置上に固定されている請求項17の方法。

【請求項20】

集合が不均一である請求項16の方法。

【請求項21】

集団が滑液、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄(BAL)液、又は血液から得られる

請求項20の方法。

【請求項22】

アレー内の各テザード・リガンド融合タンパク質への結合のレベルを定量することをさらに含む請求項16の方法。

【請求項23】

アレーの各セクタで結合する細胞を特徴付けることをさらに含む請求項23の方法。

【請求項24】

(a) 疾患を患うことが疑われる患者から細胞集団を得、
(b) 該集団について受容体プロフィールを決定し；及び
(c) 該受容体プロフィールを該疾患状態のプロフィール特性と比較する、
ことを含む診断方法。

【請求項25】

(a) 疾患を患うことが疑われる患者から細胞集団を得、
(b) 該集団についての受容体プロフィールを、
(i) 該細胞集団を請求項1の装置と接触させ；及び
(ii) 該集団の細胞が結合するアレー化テザード・リガンド融合タンパク質のサブセットと同定し、それにより受容体プロフィールを決定する；
ことによって決定し、
(c) 該受容体プロフィールを該疾患状態のプロフィール特性と比較する、
ことを含む診断方法。

【請求項26】

前記受容体プロフィールの決定がアレーの各セクターで結合する細胞を特徴付けることをさらに含む請求項25の方法。

【請求項27】

特徴付けを免疫染色によって達成する請求項26の方法。

【請求項28】

アレーの各セクタでの細胞の結合を定量することをさらに含む請求項25の方法。

【請求項29】

疾患が炎症もしくはアレルギー性疾患、又は自己免疫疾患である請求項24の方法。

【請求項30】

集団が滑液、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄(BAL)液、又は血液から得られる請求項24の方法。

【請求項31】

患者に対する薬物又は治療の効果を検出するための方法であって：

- (a) 患者に由来する細胞集団の受容体プロファイルの第1の決定を行い；
 - (b) 薬物又は治療を患者に施し；
 - (c) 患者に由来する細胞集団の受容体プロファイルの第2の決定を行い、
 - (d) (a) 及び (c) における受容体プロファイルを比較して患者における受容体発現細胞に対する薬物又は治療の効果を決定する、
- ことを含む方法。

【請求項32】

患者に対する薬物又は治療の効果を検出するための方法であって：

- (a) 患者に由来する細胞集団の受容体プロファイルの第1の決定を、
 - (i) 該細胞集団を請求項1の装置と接触させ；及び
 - (ii) 該集団の細胞が結合するアレー化テザード・リガンド融合タンパク質のサブセットを同定し、それにより受容体プロファイルを同定する、ことによって行い；
 - (b) 薬物又は治療を患者に施し；
 - (c) 患者に由来する細胞集団の受容体プロファイルの第2の決定を行い、
 - (d) (a) 及び (c) において観察される受容体プロファイルを比較して患者における受容体発現細胞に対する薬物又は治療の効果を決定する、
- ことを含む方法。

【請求項33】

アレー内の各テザード・リガンド融合タンパク質への結合のレベルを定量することをさらに含む請求項32の方法。

【請求項34】

アレーの各セクターで結合する細胞を特徴付けることをさらに含む請求項32の方法。

【請求項35】

特徴付けを免疫染色によって達成する請求項34の方法。

【請求項36】

受容体とリガンドとの相互作用のモジュレータを同定するための方法であって、

(a) 受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を試験化合物の存在下において固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ融合タンパク質への結合のレベルを決定し、

(b) 受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を試験化合物の不在下において固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ；かつ融合タンパク質への結合のレベルを決定し、並びに

(c) (a) 及び (b) における固定化テザード・リガンド融合タンパク質への結合のレベルを比較する、

ことを含み、

ここで、該リガンド・スターク融合タンパク質は：

- (i) リガンド・ドメイン；
- (ii) 中間スターク・ドメイン；及び
- (iii) 固定化ドメイン、

を含み、

該リガンド・ドメイン及び該スターク・ドメインは天然タンパク質においては会合せず、並びに

試験化合物の存在下における細胞の結合の減少は該試験化合物が受容体と該融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドとの相互作用の阻害剤であることを示し、かつ試験化合物の存在下における細胞の結合の増加は該試験化合物が受容体と該融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドとの相互作用のエンハンサであることを示す方法。

【請求項37】

スターク・ドメインがリガンドに対してカルボキシ末端側であり、かつ固定化ドメインがスターク・ドメインに対してカルボキシ末端側である請求項31の方法。

【請求項38】

細胞が組換え受容体を発現する請求項31の方法。

【請求項39】

細胞がケモカイン受容体を発現する請求項31の方法。

【請求項40】

細胞がオーファン受容体を発現する請求項38の方法。

【請求項41】

受容体と1つを上回るリガンドとの相互作用が検出される請求項36の方法。

【請求項42】

少なくとも2種類の異なる固定化リガンド融合タンパク質を含むキットであって、該少なくとも2種類の異なる固定化リガンド融合タンパク質が同じ基体上には固定されていないキット。

【請求項43】

融合タンパク質がビーズ又はスライド上に固定される請求項42のキット。

【請求項44】

テザード・リガンド融合タンパク質であって、該リガンド・ドメイン及び該スターク・ドメインが天然タンパク質においては会合しないテザード・リガンド融合タンパク質。

【請求項45】

リガンド・ドメインがケモカイン配列以外である請求項44のテザード・リガンド融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、受容体 - リガンド相互作用を特徴付け、そのような相互作用のモジュレータを同定し、かつ細胞及び細胞集団の受容体発現プロフィールを特徴付けるための試薬及び方法に関する。本発明は生体医用科学において用途が見出される。

【0002】**関連出願との相互参照**

本願は、2000年3月3日出願の U.S.S.N. 60/186626 に対する優先権を主張する。

【0003】**発明の背景**

細胞間の伝達は多細胞生物における成長、分化、代謝、及び生物学的応答（例えば、免疫応答）の生成に関与する基本プロセスである。しばしば、細胞 - 細胞シグナル伝達には細胞外受容体又は細胞接着分子が介在する。これらの膜関連分子は他のタンパク質、例えば、ペプチドホルモンのような可溶性因子、細胞外マトリックス、及び他の細胞によって提示される細胞表面分子と相互作用する。幾つかの場合において、シグナル伝達は細胞 - 細胞接触（例えば、細胞上の2つの表面タンパク質間の接触）を含む。そのような相互作用の例は、Tリンパ球表面上のT細胞受容体と抗原提示細胞表面上のMHC / 抗原複合体との結合である。異なるタイプの細胞 - 細胞シグナル伝達には、標的細胞上の特異的受容体との相互作用によって標的細胞の活性の変化を導く可溶性ポリペプチドが介在する。可溶性ポリペプチドが介在する細胞 - 細胞シグナル伝達の実例かつ重要な例は、哺乳動物系におけるケモカインの活性である。

【0004】

ケモカインは、炎症応答、白血球輸送、血管形成、並びに細胞の遊走及び活性化に関連する他の生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たすサイトカインのークラスである。化学走性及び炎症のメディエータとして、ケモカインは病理学

的状态において役目を果たす。例えば、ケモカインMCP-1の濃度は、他の関節疾患の患者よりも関節リュウマチの患者の滑液において高い。

【0005】

公知のケモカインは、典型的には、システインモチーフの配置に基づいて4つのサブファミリーのうちの1つに割り当てられる。例えば、いわゆるアルファ-ケモカインにおいては、4つのシステイン(アミノ末端から始まる)のうちの最初の2つが介在性アミノ酸によって分離される(すなわち、モチーフC-X-Cを有する)。ベータ-ケモカインは最初の2つのシステインの間に介在性アミノ酸が存在しないことを特徴とする(すなわち、モチーフC-Cを有する)。より小さいガンマ-ケモカイン・ファミリーは単一のC残基(ガンマ)を特徴とする。デルタ-ケモカイン・ファミリーは3つの残基で分離されたシステインの対を特徴とする(すなわち、モチーフCX₃Cを有する)。唯一のCX₃Cケモカイン(フラクタルカイン)は、長ムチン様スターク(stalk)につながれたケモカインドメインを含む1型膜タンパク質である。フラクタルカイン、別名ニューロタクチンは、長ムチン様スタークにつながれたアミノ末端にケモカインドメインを含んでいる。ケモカインに関する最近の総説については、Ward et al., 1998, *Immunity* 9:1-11 及び Baggiolini et al., 1998, *Nature* 392:565-568、並びにそれらに引用される参考文献を参照のこと。

【0006】

幾つかのケモカインの活性(例えば、前遊走(promigratory)効果)には、標的白血球表面上の細胞表面受容体のアレーへの結合が介在する。これらの受容体は7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体クラス(代わりに7TM又はGPCRと呼ばれる)のものである。C-Cケモカインの幾つかの7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体がクローン化されている:MIP-1、RANTES、MCP-2、MCP-3、及びMIP-5を認識するC-Cケモカイン受容体-1(Neote et al., 1993, *Cell*, 72:415-415); MCP-1、2、3及び4又は5の受容体であるCCR2; RANTES、MCP-2、3、4、MIP-5及びエオタキシンの受容体であるCCR3; MIP-1、MIP-1及びRANTESの受容体であるCCR5; CMDC又はTARCの受容体であるCCR4; LAR

Cの受容体であるCCR6；並びにSLC及びMIP-3の受容体であるCCR7 (Sallusto et al., 1998, Immunol. Today 19:568 及び Ward et al., 1998, Immunity 9:1-11 において概説されている)。

【0007】

生物学的機能における受容体（例えば、ケモカイン受容体）とそれらのリガンドとの相互作用の重要性のため、そのような相互作用を特徴付けるための迅速かつ有効な方法の必要性が存在する。

【0008】

発明の要約

一側面において、本発明はアレー状に組織された複数の異なる固定化テザード (tethered) リガンド融合タンパク質を有するアッセイ装置を提供し、ここで、リガンド-スターク融合タンパク質はリガンド・ドメイン及びスターク・ドメインを含む(「アッセイ装置」)。一態様において、リガンド-スターク融合タンパク質はリガンド・ドメイン、中間スターク・ドメイン、及び固定ドメインを有する(「アッセイ装置」)。一態様において、リガンド・ドメイン及びスターク・ドメインは天然タンパク質においては会合しない。様々な態様において、固定化テザード・リガンド融合タンパク質はムチン誘導スターク配列、フラクタルカイン・ムチン反復領域配列、及び/又はケモカインをコードするリガンド・ドメインを含む。

【0009】

別の側面において、本発明はテザード・リガンド融合タンパク質を提供し、ここで、リガンド・ドメインはケモカイン配列以外である。

【0010】

別の側面において、本発明は受容体とリガンドとの間の相互作用を同定するための方法であって、受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ細胞とテザード・リガンド融合タンパク質との結合を検出することによる方法を提供し、ここで、細胞の融合タンパク質への結合は受容体と融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドとの相互作用に相関する。一態様において、テザード・リガンド

は前記アッセイ装置上に固定される。様々な態様において、細胞は組換え受容体（例えば、オーファン受容体）を発現する。一態様において、細胞はケモカイン受容体を発現する。一態様においては、受容体と2つ以上のリガンドとの相互作用が検出される。

【0011】

別の側面において、本発明は受容体とリガンドとの間の相互作用のモジュレータを同定するための方法であって、受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を試験化合物の不在下で固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ細胞の固定化テザード・リガンド融合タンパク質への結合を測定し、受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を試験化合物の存在下で固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ細胞の固定化テザード・リガンド融合タンパク質への結合を測定し；並びに結合のレベルを比較することによる方法を提供し、ここで、試験化合物の存在下における細胞の結合の減少はその試験化合物が受容体と該融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドとの相互作用の阻害剤であることを示し、試験化合物の存在下における細胞の結合の増加はその試験化合物が受容体と融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドとの相互作用のエンハンサであることを示す。一態様において、テザード・リガンドは前記アッセイ装置上に固定されている。一態様において、受容体はケモカイン受容体である。

【0012】

別の側面において、本発明は細胞集団中の細胞における受容体発現のプロフィールを検出するための方法であって、細胞集団を固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつテザード・リガンド融合タンパク質への細胞集団の細胞の結合を検出することによる方法を提供し、ここで、テザード・リガンド融合タンパク質への細胞集団中の細胞の結合は融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドに結合する受容体の発現に相関する。一態様において、テザード・リガンドは前記アッセイ装置に固定されている。一態様において、接触工程はその集団を複数の異なる融合タンパク質と接触させることを含み、かつ検出工程はゼロ、1又は2以上の融合タンパク質への細胞の結合を検出する。一態

様において、この集合は不均一であり、例えば、集団は滑液、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄（BAL）液、又は血液から得られる。一態様において、この方法は、アレー内の各テザード・リガンド融合タンパク質への結合のレベルを定量すること、又はアレーの各セクタで結合する細胞を特徴付けること（例えば、免疫染色により）を含む。

【0013】

別の側面において、本発明は診断方法を提供する。この方法は、疾患を患うことが疑われる患者から細胞集団を得る工程、その集団について受容体プロフィールを決定する工程、及び該受容体プロフィールをその疾患状態のプロフィール特性と比較する工程を含む。一態様において、受容体プロフィールの決定は、細胞集団を固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ該集団の細胞によって結合されるテザード・リガンド融合タンパク質を同定し、それにより受容体プロフィールを決定することによって行う。一態様において、テザード・リガンドは前記アッセイ装置上に固定される。様々な態様において、この方法を決定することは、例えば免疫染色により、アレーの各セクタでの細胞の結合を定量し、又はアレーの各セクターで結合する細胞を特徴付けることも含む。様々な態様において、疾患は炎症もしくはアレルギー性疾患、又は自己免疫疾患である。様々な態様において、集団は滑液、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄（BAL）液、又は血液から得られる。

【0014】

別の側面において、本発明は、患者に対する薬物又は治療の効果を決定するための方法であって、患者に由来する細胞集団の受容体プロフィールの第1の決定を行い、薬物又は治療を患者に施し、患者に由来する細胞集団の受容体プロフィールの第2の決定を行い、並びに得られた受容体プロフィールを比較して患者における受容体発現細胞に対する薬物又は治療の効果を決定することによる方法を提供する。一態様において、この決定は、該細胞集団を固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ該集団の細胞が結合するアレー化テザード・リガンド融合タンパク質のサブセットを同定し、それにより受容体プロフィールを同定することによって行う。一態様においては、テザード・リガンドは前記ア

ッセイ装置上に固定されている。様々な態様において、この方法を決定することは、例えば免疫染色により、アレーの各セクタでの細胞の結合を定量し、又はアレーの各セクターで結合する細胞を特徴付けることも含む。様々な態様において、集団は滑液、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄（BAL）液、又は血液から得られる。

【0015】

別の側面において、本発明は受容体とリガンドとの間の相互作用のモジュレータを同定するための方法であって、受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を試験化合物の存在下において固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ融合タンパク質への結合のレベルを決定し、受容体又はそれらのリガンド結合性部分を発現する細胞を試験化合物の不在下において固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ；かつ融合タンパク質への結合のレベルを決定し、並びに結合のレベルを比較することによる方法を提供し、ここで、リガンド・スターク融合タンパク質はリガンド・ドメイン、中間スターク・ドメイン、及び固定化ドメインを含み、並びに試験化合物の存在下における細胞の結合の減少はその試験化合物が受容体と融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドとの相互作用の阻害剤であることを示し、かつ試験化合物の存在下における細胞の結合の増加はその試験化合物が受容体と融合タンパク質のリガンド・ドメインに相当するリガンドとの相互作用のエンハンサであることを示す。一態様において、リガンド・ドメイン及びスターク・ドメインは天然タンパク質においては会合しない。一態様において、スターク・ドメインはリガンドに対してカルボキシ末端であり、かつ固定化ドメインはスターク・ドメインに対してカルボキシ末端である。

【0016】

別の側面において、本発明は本明細書に記載される方法のいずれかにおけるテザード・リガンド融合タンパク質の使用を提供する。

【0017】

詳細な説明

1. 定義

本発明の実施において読者を補助するため以下の定義を提供する。本明細書で用いられる場合：

「受容体」という用語は当該技術分野における通常の意味を有し、第2のタンパク質を特異的に結合するタンパク質を指す。通常（すなわち、幾つかの態様において）、膜貫通ドメイン、細胞外ドメイン及び細胞内ドメインを特徴とする膜間連タンパク質である。このような受容体は「膜関連受容体」と呼ばれる。他の態様においては、「受容体」という用語は他のタイプのポリペプチド結合性タンパク質、例えば、接着分子、可溶性結合性タンパク質を指すのに用いられる。本明細書で用いられる場合、「受容体」という用語が免疫グロブリンを指すことがないのは明らかであろう。

【0018】

「リガンド」という用語は受容体タンパク質に結合するペプチド又はポリペプチドを指す。典型的には、リガンドは細胞-細胞シグナル伝達又は他の細胞もしくは細胞外マトリックスへの細胞の接着に関与する。

【0019】

「特異的結合」という用語は、2つの分子、例えば、リガンド及び受容体の間の結合であって、多くの他の様々な分子の存在下でさえも別の特定の分子（受容体）と会合するタンパク質（リガンド）の能力、すなわち、分子の不均一混合物中で他者に対する1つの分子の優先的な結合を示す能力を特徴とする結合を指す。受容体に対するリガンドの特異的結合は、検出可能に標識されたりリガンドの受容体への結合の、過剰の非標識リガンドの存在下における減少によっても立証される。

【0020】

「オーファン受容体」という用語は、それに対する天然同族リガンドが知られていない推定受容体ポリペプチドを指す。典型的には、オーファン受容体は、タンパク質又は遺伝子の配列及び構造に基づく公知受容体に対する相同性（配列同一性）に基づいて識別される。

【0021】

「融合タンパク質」という用語は、本明細書で用いられる場合、複合ポリペプ

チド、すなわち、通常は一緒になって単一のアミノ酸配列に融合することはない2つ以上（例えば、3つ）の異なるポリペプチドから構成される単一の連続アミノ酸配列を指す。融合タンパク質は、一般には、組換え核酸法により、すなわち、組換え遺伝子融合産生物（融合は第1ポリペプチド領域をコードするセグメント及び第2ポリペプチド領域をコードするセグメントを含む）の転写及び翻訳の結果として、又は当該技術分野において公知の化学合成法によって調製することができる。したがって、例えば、単一の天然タンパク質（例えば、フラクタルカイン）は融合タンパク質ではない。

【0022】

「組換え」という用語は、細胞に関して用いられる場合、細胞が異種核酸を複製するか、又は異種核酸によってコードされるペプチドもしくはタンパク質を発現することを示す。組換え細胞は、その細胞の未変性（非組換え）形態内に見出されない遺伝子を含むことができる。組換え細胞は、その細胞の未変性形態に見出される遺伝子であって、（例えば、受容体の発現を高めるため）人工的な手段によって修飾され、かつ再導入された遺伝子を含むこともできる。また、この用語は、細胞に内在性の核酸であって、その細胞から除去することなく修飾されている核酸を含む細胞をも包含する；このような修飾には、遺伝子置換、部位特異的突然変異、及び関連技術によって得られるものが含まれる。

【0023】

「組換え発現カセット」又は単に「発現カセット」という用語は、核酸構築体であって、そのような配列に適合する宿主内で構造遺伝子の発現をもたらす得る核酸要素で組換え的又は合成的に産生される核酸構築体である。発現カセットは、少なくともプロモーターを、及び任意に転写終止シグナルを含む。典型的には、組換え発現カセットは転写しようとする核酸（例えば、所望のポリペプチドをコードする核酸）、及びプロモーターを含む。本明細書に記載されるように、発現をもたらすのに必要であるか、又はそれに役立つさらなる要素を用いることもできる。転写終止シグナル、エンハンサ、及び遺伝子発現に影響を及ぼす他の核酸配列を発現カセットに含めることもできる。「発現ベクター」は、用いられる発現系に必要な挿入コーディング配列の転写及び翻訳に必要な要素を含むベクタ

ーである（例えば、発現カセットを含むベクター）。

【0024】

「組換えポリヌクレオチド」又は「組換えポリペプチド」は、それぞれ、2種類以上の供給元核酸又はポリペプチドに由来する核酸又はアミノ酸配列を含む非天然ポリヌクレオチド又はポリペプチドである。

【0025】

「ケモカイン」（「CK」と略す）という用語は、炎症応答、白血球輸送、血管形成、並びに細胞の遊走及び活性化に関連する他の生物学的プロセスに關与するサイトカインのークラスである。公知ケモカインは、典型的には、システインモチーフの配置に基づいて4つのサブファミリー（ 、 、 、及び ）のうちの1つに割り当てられる。ケモカインの非包括的なリストが表2に記載される。

【0026】

「受容体結合可能タンパク質」という用語は、ポリペプチド・リガンドを参照する場合、しばしば完全長天然タンパク質よりは短い、同族受容体（すなわち、天然リガンドを結合する受容体）に結合するのに十分なリガンドの一部を指す。

【0027】

2. 序論

本発明は、受容体 - リガンド相互作用のようなタンパク質 - タンパク質相互作用の分析に有用な試薬、装置、及び方法を提供する。本発明は、本明細書に記載されるように、そのような受容体 - リガンド相互作用のモジュレータを同定するための試薬及び方法、並びに他の方法を提供する。一態様において、本発明はケモカイン間、例えば、ヒトケモカイン、及び公知もしくはオーファン・ケモカイン受容体の間の相互作用を同定し、かつ特徴付けるのに用いられる。

【0028】

本発明の一側面においては、以下に詳細に記載されるように、受容体を発現する細胞を1種類以上のテザード・リガンドと接触させ、存在するのであれば、特異的結合を検出及び分析する。このような接触、検出及び分析は、時折、「追求（interrogation）」と呼ばれる。本発明によって用いられる「テザード・リガンド」は、少なくとも2つ、通常は少なくとも3つの異なるドメイン：リガンド

・ドメイン、スターク・ドメイン、及び任意に、固定化ドメインを有する融合タンパク質である。細胞は予め定義された受容体タンパク質を発現する組換え細胞（オーファン受容体を発現する細胞を含む）であってもよく、又は生物学的資源（例えば、患者又は非ヒト動物に由来する組織）から単離された細胞であってもよい。

【0029】

受容体を発現する細胞と本発明のテザード・リガンド融合タンパク質との結合を検出するアッセイは様々な方法で行うことができる。

【0030】

一態様においては、1種類以上のテザード・リガンドと1種類以上の受容体発現細胞との相互作用を検出し、かつ特徴付ける。特に、この相互作用に対する1種類以上の試験化合物の効果をアッセイすることができる。

【0031】

例えば、本発明のテザード・リガンド融合タンパク質（すなわち、単一種）を表面（例えば、スライド、プレート、ビーズ、ディップスティックのような固体表面）上に固定し、試験化合物又は細胞集団と接触させることができる。

【0032】

本発明の別の態様においては、複数（すなわち、少なくとも3つ、典型的には少なくとも10、しばしば少なくとも15）の異なるテザード・リガンド（すなわち、異なるリガンド・ドメインを有する）をアレー状に固定する。このアレーを、テザード・リガンドのリガンド・ドメインを特異的に結合することが知られるか、又はそれが疑われる受容体を発現する組換え細胞によって追求することができる。これらの細胞とアレーのテザード・リガンドとの相互作用に対する試験化合物の効果を決定することができる。（診断、スクリーニング、又は他の目的で）このアレーを天然細胞の集団によって追求し、その集団の受容体プロフィールを決定することもできる。特に、本発明のテザード・アレーはオーファン受容体のリガンド結合プロフィールを決定するのに有用である。

【0033】

本発明は様々なタンパク質 - タンパク質相互作用の特徴付けにその用途が見出

される。特に、本発明は7回膜貫通受容体（例えば、ケモカイン受容体）と推定リガンド（例えば、ケモカイン）との相互作用の特徴付けに有用である。しかしながら、下記から明らかなように、本発明は7回膜貫通受容体の特徴付けに限定されるものではない。

【0034】

3. テザード・リガンド

前述のように、本発明の方法及び装置は「テザード・リガンド」を用いる。テザード・リガンドはリガンド・ドメイン、スターク・ドメイン、及び通常は、固定化ドメインを有する融合タンパク質である。スターク・ドメインはリガンド・ドメインと固定化ドメインとの間に位置する（すなわち、これは「中間部」である）。スターク・ドメイン配列は他のドメインの一方もしくは両方と隣接していてもよいが、典型的には、少なくとも幾つかの追加（例えば、リンカー）配列が介在する。典型的には、リガンド・ドメインは融合タンパク質のアミノ末端側に位置し、固定化ドメインはカルボキシ末端側に位置する（それらの間にスターク・ドメインを伴う）。図1は例示テザード・リガンドの図を示す。

【0035】

代替態様においては、リガンド・ドメインが融合タンパク質のカルボキシ末端側に位置し、固定化ドメインがアミノ末端側に位置する。後者の配向はリガンド・ドメインが細胞内タンパク質、又は膜貫通タンパク質の細胞内ドメインの配列を有する場合に有用である。

【0036】

本発明のテザード・リガンドの産生において有用な技術（例えば、融合タンパク質を含む組換えタンパク質のクローン化及び発現）は当該技術分野において公知であり、例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory 及び1999及び2000補遺を含む、Ausubel et al., Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York に記載されている。例えば、様々な（例えば、少なくとも2種類の）、融合タンパク質のコード化に用いられるアミノ酸コーディングセグメントを互いにイン・フレームでクローン化し

て融合タンパク質をコードする。

【0037】

テザード・リガンドの構造及び産生をより詳細に説明する。

【0038】

3.1 リガンド・ドメイン

テザード・リガンドのリガンド・ドメインは関心のあるタンパク質又はペプチド・リガンドの配列を有し、それは細胞外リガンドであっても細胞内リガンドであってもよい。

【0039】

細胞外リガンドは膜関連受容体の細胞外ドメインが天然に結合するポリペプチド・リガンドである；例示的な細胞外ドメインにはケモカイン（ケモカイン受容体が結合する）；他のサイトカイン、インターフェロン（インターフェロン受容体が結合する）、ドーパミン（ドーパミン受容体が結合する）が含まれる。多くの他のものが当業者に明らかではあるが、例示的な細胞外受容体を表1に列挙する。テザード・リガンドの特に有用なクラスはケモカインに相当するリガンド・ドメインを有するものである。ケモカイン・ドメインを有するテザード・リガンドは、時折、「スタルコカイン」と呼ばれ、例えば、リガンド・ドメイン内にTARC配列を有するテザード・リガンドについては「TARC - スタルコカイン」と呼ばれる。

【0040】

ケモカイン及びサイトカインは当該技術分野において公知である。例示的なサイトカインを表2に列挙する。これらの、及び他のサイトカインを説明する参考文献は R&D Systems Catalog (1999) 及び (2000) R&D Systems Inc., 614 McKinley Place N.E. MN 55413, <http://www.mdsystems.com> の R & D オンライン・カタログ（例えば、1999年10月10日）（これらの両者は全ての目的で参照することによって組み込まれる）；CFB (Cytokine Facts Book, 1994, Academic Press Ltd.), Chemokine Facts Book, 1997, Academic Press Ltd.（全ての目的で参照することによって組み込まれる）、及び GeneBank タンパク質配列データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) において提供されている。

リガンド・ドメインが、それが対応する細胞内又は細胞外リガンドの完全な配列を必ずしも含む必要がないことは理解されるであろう；様々な態様において、リガンド・ドメインは天然リガンドの少なくとも1つの受容体結合可能部分を含む。

【0041】

【表1】

表 1

例示的受容体

受容体のクラス	サブクラス&例	GenBank 受付番号
ケモカイン受容体	1. CCR1 2. CCR2 3. CCR3 4. CCR4 5. CCR5 6. CCR6 7. CCR7 8. CCR8 9. CCR9 10. CCR10 11. CCR11 12. CXCR1 (IL-8R alpha) 13. CXCR2 (IL-8R beta) 14. CXCR3 (GPR9)	NM001295 NM000647 NM001837 AB023892 NM000579 NM004367 NM001838 NM005201 NM006641 AF233281 NM016602 L19591 NM001557 NM001504

	15. CXCR4 16. CXCR5 17. XCR1 18. CX ₃ CR1 19. CMV US28 20. HHV8ORF74 21. Duffy Ag	NM003467 AJ002211 NM005283 U20350 L20501 AF179931 AF030521
他の受容体クラス	ペプチド アンジオテンシン アンジオテンシン1型 アンジオテンシン2型 ボンベシン ブラジキニン C5a アナフィラトキシン Fmet-leu-phe インターロイキン-8 インターロイキン-8A型 インターロイキン-8B型 エンドセリン メラノコルチン メラニン細胞刺激ホルモン 副腎皮質刺激ホルモン メラノコルチンホルモン ニューロペプチドY ニューロテンシン オピオイド オピオイドD型 オピオイドK型 オピオイドM型 オピオイドX型 ソマトスタチン ソマトスタチン1型 ソマトスタチン2型 ソマトスタチン3型 ソマトスタチン4型 ソマトスタチン5型 タキキニン サブスタンスP(NK1) サブスタンスK(NK2) ニューロメジンK(NK3) トロンピン バソプレッシン様 バソプレッシン オキシトシン ガラニン 活性化プロテイナーゼ オレキシン ケモカイン/走化性因子様 ホルモンたんぱく質 卵胞刺激ホルモン ルトロピン-絨毛性ゴナドトロピンホルモン 甲状腺刺激ホルモン ウイルス性 クラスA オーフアン/他 「Burkiff's リンパ腫受容体」 Mas プロトオンコジーン RDC1 EDG GPR	

	RBS11 BONZO ケモカイン受容体様2 G10D GP40様 APJ様
	成長因子受容体 ホルモン受容体 クラス1サイトカイン受容体 ヘマトポエチン・ファミリー受容体
	IL-6 (gp30を共有) IL-6 IL-11 CNTF LIF オンコスタチンM ガルジオトロピン1
	GM-CSF (β 鎖を共有) GM-CSF IL-3 IL-5
	IL-2 (γ 鎖を共有) IL-2 IL-4 IL-7 IL-9 IL-15
	IL-13 (α 鎖を共有) IL-13 IL-14
	IL-12 G-CSF エリスロポエチン 成長因子 プロラクチン
	IFN- α / β ファミリー IFN-γ IL-10
	TNF-α TNF-β (LT-α) LT-α/LT-β ヘテロマー NGF Fasリガンド CD40リガンド TRAIL
	IL-1α IL-1β IL-1受容体 アンタゴニスト
	TGF-β 骨形成タンパク質 proteins

【0042】

【表2】

表 2
例示サイトカイン

1. TNF-alpha	39. アクチビン	78. IL-13
2. CD27L	40. TRAIL	79. TWEAK
3. TGF-beta	41. TALL-1	80. GITRL
4. TNF-beta	42. IL-15	81. リンホタクチン
5. CD30L	43. IL-5	82. BRAK
6. IL-2	44. IL-1beta	83. PARC
7. VEGF (VEGF-A)	45. IL-10	84. エオタキシン
8. EGF	46. IGF-II	85. エオタキシン-2
9. HB-EGF	47. MSP	86. MPlF-1
10. IL-6	48. FGF- 塩基性	87. HCC-1
11. SCF	49. BDNF	88. HCC-4
12. BMPs	50. エリスロポエチン	89. SCYA26
13. リンホトキシン-ベータ	51. PDGF-AB	90. MIP-1alpha
14. CD40L	52. VEGF-D	91. MIP-1beta
15. IL-7	53. ベタセルリン	92. MIP-1delta
16. VEGF-B	54. G-CSF	93. I-309
17. TGF-alpha	55. CNTF	94. 6-Ckine
18. SMDF	56. ミドカイン	95. RANTES
19. LIF	57. インヒビン	96. MCP-1
20. Flt-3 リガンド	58. TRANCE	97. MCP-2
21. GDNFs	59. 4-1BBL	98. MCP-3
22. Fas リガンド	60. IL-4	99. MCP-4
23. April	61. GM-CSF	100. TARC
24. IL-9	62. IL-18	101. MIP-3alpha
25. IL-3	63. IL-17	102. MIP-3beta
26. IL-1alpha	64. IL-16	103. TECK
27. IFN-gamma	65. IL-12	104. MDC
28. IGF-I	66. FGF-3-19	105. IL-8
29. HGF	67. ニューロトロピン	106. GCP-2
30. FGF- 酸性	68. アンジオポエチン (1-4)	107. MIG
31. NGF	69. PDGF-BB	108. SDF-1
32. トロンボポエチン	70. PlGF	109. I-TAC
33. PDGF-AA	71. ヘレグリン	110. PF4
34. VEGF-C	72. レプチン	111. ENA-78
35. アンフィレグリン	73. オンコスタチンM	112. IP-10
36. IL-11	74. プレイオトロピン	113. NAP-2
37. カルジオトロピン-1	75. MIS	114. GRO
38. M-CSF	76. LIGHT	115. BLC/BCA-1
	77. OX40L	

【0043】

幾つかの代替態様においては、「受容体」は膜関連受容体の細胞外ドメインではなく、異なるタンパク質結合性部分、例えば、細胞内タンパク質のタンパク質結合性ドメイン又はタンパク質ドメインである。例えば、本発明において用いら

れる「受容体 - リガンド対」はCCR1の細胞内ドメイン（「受容体」）及びGタンパク質（「リガンド」）であり得る。この場合、「リガンド」はGタンパク質ドメインであり、スターク・ドメイン（例えば、フラクタルカイン・ムチン領域配列）との融合タンパク質として発現する。「受容体」はCCR1の細胞内ドメインであり、これは単一膜貫通受容体（例えば、キナーゼ・ドメインが欠失したEGF受容体）とのアミノ末端融合タンパク質として発現し得る。これは、CCR1細胞内ドメインが、例えば、細胞外（すなわち、細胞の表面上）に発現することを可能にする。したがって、Gタンパク質テザード・リガンドをその表面上に固定化することにより、CCR1細胞内ドメインを発現する細胞を追求することができる。細胞内リガンド（細胞内タンパク質を結合するタンパク質、又は細胞内タンパク質ドメイン）の別の例は、Gタンパク質結合グルタミン酸受容体を結合するGタンパク質である。

【0044】

3.2 スターク・ドメイン

テザード・リガンド融合タンパク質のスターク・ドメインは、部分的には、そのテザード・リガンド融合タンパク質が固定されている基体の上方のかなりの距離に上昇させることによってリガンド・ドメインを提示するように機能をする。特定の機構によって結びつけようとするものではないが、表面の上方のかなりの距離にリガンドを提示することは受容体発現細胞において提示される受容体とのリガンドの結合を増加させるものと信じられる。

典型的には、融合タンパク質のスターク・ドメインの長さは少なくとも約50アミノ酸残基、少なくとも約75アミノ酸残基、少なくとも約100アミノ酸残基、しばしば少なくとも約150残基、頻繁には少なくとも約200残基である。典型的には、スターク・ドメインは約200残基ないし500残基であり、通常約200残基ないし300残基である。一般には、ポリペプチドのリガンド・ドメインはそのテザード・リガンドが固定されている表面から少なくとも約20nm（例えば、約20nmないし約60nm）、又は少なくとも約30nm離して（すなわち、その上方に）提示される。態様においては、リガンド・ドメイン・ペプチドは表面の上方約30 - 40nmに提示される。リガンド・ドメインの

伸長の測定は、典型的には、重金属シャドーイングの後に電子顕微鏡によって行われる（例えば、Fong et al., 2000, J Exp Med 188:1413-19 を参照）。

【0045】

リガンド・ドメインを表面から離して上昇させることに加えて、スターク・ドメインの柔軟性がリガンド・ドメインに様々な方向を取らせ、それが受容体との強力な相互作用の可能性を高め、他のリガンドの固定化又は提示方法、例えば、標準ELISAと比較して予期せぬ利点を有するものと信じられる。典型的には、スターク・ドメインはリガンドを上昇させるのに十分な剛性を有するが、リガンド・ドメインに様々な方向を取らせる柔軟性を有するように選択される。

【0046】

一態様において、スターク・ドメインはフラクタルカイン・ポリペプチドから誘導される（Bazan et al., 1997, Nature 385:640-644 ; WO 97/27299 も参照のこと）。フラクタルカインは、長ムチン様スタークにつながれたケモカイン・ドメインを含む天然1型膜タンパク質である。ヒト・フラクタルカインcDNA（Genbank 受付番号 U84487）は24残基の推定シグナルペプチドを有する397残基の膜タンパク質、76残基のケモカイン・ドメイン、O-グリコシル化セリン及びトレオニン残基のモチーフに富む17変性ムチン様反復を含む241残基のスターク領域、19残基の膜貫通セグメント、及び37残基の細胞質ドメインをコードする。

【0047】

したがって、例示的態様においては、スターク領域は表3A又は3Bに示される配列を有する。他の態様においては、スターク領域はフラクタルカイン・スターク領域に由来する少なくとも1つのムチン反復セグメント、例えば、表4に示されるヒト配列を含む。関連する態様において、スターク領域はフラクタルカイン・スターク領域の少なくとも10、少なくとも25、又は少なくとも50の隣接残基、例えば、表3A又は3Bに示されるものを有する（例えば、それらの部分配列又は相互作用）。

【0048】

表3A

ヒト・フラクタルカイン・ムチン反復領域

I GEVKPRITTPAAGGMDES VVLEPEATGESSSLEPTPSSQEAQRALGT SPELPTGVT
 GSSGTRL PPTPKAQDGGPVGTELFRVPPVSTAATWQSSAPHQGPSLWAEAKTS
 EAPSTQDPSTQASTASSPAPEENAPSEGQRVWGQGQSPRPENSLEREEMGPVP
 AHTDAFQDWGPGSMAHVS VVPVSSEGTPSREPVASGSWTPKAEEP IHATMDPQR
 LGVLITPVP (配列番号3)

【0049】

表3B

ヒト・フラクタルカイン・ムチン反復配列残基100-336

GGTFEKQ IGEVKPRITTPAAGGMDES VVLEPEATGESSSLEPTPSSQEAQRALGT
 PELPTGVTGSSGTRL PPTPKAQDGGPVGTELFRVPPVSTAATWQSSAPHQGPSL
 WAEAKTSEAPSTQDPSTQASTASSPAPEENAPSEGQRVWGQGQSPRPENSLERE
 EMGPVPAHTDAFQDWGPGSMAHVS VVPVSSEGTPSREPVASGSWTPKAEEP IHA
 TMDPQRLGVLITPVPDAQA (配列番号4)

【0050】

表4

ムチン反復ドメイン

- | | |
|-----------------------------|----------|
| 1 . I G E V K P R T T P | (配列番号5) |
| 2 . G G M D E S V V L E P | (配列番号6) |
| 3 . T G E S S S L E P T P | (配列番号7) |
| 4 . L G T S P E L P T G | (配列番号8) |
| 5 . T G S S G T R L P P T P | (配列番号9) |
| 6 . V G T E L F R V P P V S | (配列番号10) |
| 7 . A A T W Q S S A P H Q | (配列番号11) |
| 8 . P G P S L W A E A K T S | (配列番号12) |
| 9 . E A P S T Q D P S T | (配列番号13) |
| 10 . Q A S T A S S P A P | (配列番号14) |
| 11 . V W G Q G Q S P R P | (配列番号15) |
| 12 . S L E R E E M G P V P | (配列番号16) |

- 13 . A H T D A F Q D W G (配列番号 17)
 14 . P G S M A H V S V V P (配列番号 18)
 15 . E G T P S R E P V A (配列番号 19)
 16 . S G S W T P K A E E P (配列番号 20)
 17 . Q R L G V L I T P V P (配列番号 21)

【0051】

関連する態様において、テザード・リガンドのスターク領域は非ヒト種、例えば、マウス (Lloyd et al, 1997, Nature 387:611-617 を参照 ; Genbank 受付番号 A F 0 1 0 5 8 6) 及び他の哺乳動物 (例えば、ブタ、ウシ、ヒツジ、ラット、ウサギ、及び非ヒト霊長類) のフラクタルカインに由来する配列を有する。

【0052】

関連する態様において、スターク・ドメインは他のムチン・ファミリーのメンバー、例えば、MUC型ムチンから誘導される。MUC型ムチンは、多数がグリコシル化され、かつ呼吸器管、消化管、及び生殖管の上皮において発現する構造的に関連する分子、例えば、MUC1 (GenBank 受付番号 A F 1 2 5 5 2 5)、MUC2 (L 2 1 9 9 8)、MUC3 (A F 1 1 3 6 1 6)、MUC4 (A J 0 0 0 2 8 1)、MUC5AC (U 8 3 1 3 9)、MUC5B (A J 0 0 1 4 0 2)、MUC6 (U 9 7 6 9 8)、MUC7 (L 1 3 2 8 3)、MUC8 (U 1 4 3 8 3)、MUC9 (オビダクチン) (A W 2 7 1 4 3 0) のファミリーである。他の態様においては、スターク・ドメインは M A d C A M - 1、G l y C A M - 1、C D 3 4 に由来する配列 (例えば、Girard & Springer 1995 ; Van Klinken et al., 1988, Anal Biochem 265:103-16 を参照)、E - セレクチン、P - セレクチン、もしくは L - セレクチン、又はウイルス糖タンパク質スパイク (例えば、ウイルス起源、例えば、インフルエンザ、単純ヘルペス、ヒト免疫不全、又はタバコモザイクウイルスの糖タンパク質) に由来するコンセンサス反復を有する。特に、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼタンパク質 (受付番号 0 9 1 7 4 4)、とりわけ、アミノ酸 36 ないし 90 を含む (すなわち、HFKQYECSSPNNQVIPCQPTIIERNITEIVYLTNTTIEKEICPKLVEYRNWSKP (配列番号 22) 及びそれらの連鎖を含む) 高頻度可変性スターク領域がスタークにとって固定化リガン

ドを提示するのに有用である。

【0053】

さらなるスターク配列を、下記実施例1に記載されるアッセイではあるが実施例1のフラクタルカイン・ドメインの代わりにその新規スターク配列を用いるアッセイを用いて（本発明の方法において用いるための適合性について）試験することができる。簡単に述べると、新規の適切なスターク領域配列を同定するため、潜在的な提示スタークをコードする配列を発現ベクター〔例えば、pcDNA3.1/Myc-His(-)B (Invitrogen™ Corp, Carlsbad, CA) もしくは他の適切なベクター（例えば、pcDNA3.1/Myc-His(-)A/C (Invitrogen™ Corp.)）又は類似のベクター〕に、例えば、EcoRI連結PCR断片としてクローン化し、アミノ末端にELCリガンドを、かつカルボキシ末端に6xHis配列を有する融合タンパク質を形成する。すなわち、スターク・エンコーディング配列を上流の、DLC-スタルコカインのフラクタルカイン・ドメインに用いられたものと同様の位置（すなわち、ELC結合モチーフとポリヒスチジン固定化ドメインとの間）に挿入する。例えば実施例1に記載されるように、得られるプラスミドを哺乳動物細胞（例えば、293細胞）内で発現させ、テザード・リガンド・タンパク質を発現させる。その後、テザード・リガンドを、以下に記載されるように、CCR10を発現する細胞の結合に介在する能力についてアッセイする。このアッセイの変形は当業者には明らかであろう。

【0054】

3.3 固定化ドメイン

様々な態様において、固体基体へのタンパク質の固定化を促進するため、融合タンパク質は固定化ドメインを有する。しばしば、固定化ドメインは短い（すなわち、10残基未満）エピトープ・タグ（すなわち、抗体、典型的には、モノクローナル抗体によって認識される配列）、例えば、ポリヒスチジン（Bush et al, 1991, J. Biol Chem 266:13811-14）、SEAP（Berger et al, 1988, Gene 66:1-10）、又はM1及びM2フラグ（例えば、米国特許第5,011,912号；第4,851,341号；第4,703,004号；第4,782,137号を参照）である。本発明の幾つかの態様において、テザード・リガンドは別個の固定化ドメインを持たない。その代わり

に、スターク・ドメインが基体に直接結合し、そのスターク・ドメインは抗スターク（すなわち、ムチン）配列抗体により、又は幾つかの他の固定化方法によって固定される。

【0055】

3.4 テザード・リガンドの産生

前述のように、融合タンパク質を構築及び発現させるための方法は公知である。融合タンパク質は、一般には、Ausubel et al., 前出、Kroll et al., 1993, DNA Cell Biol. 12:441、及び Imai et al., 1997, Cell 91:521-30 に記載されている。

【0056】

本発明のテザード・リガンド融合タンパク質は、(1) 所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列をコードするベクター（例えば、プラスミド、ファージ又はファージミド）を構築し、(2) そのベクターを適切な発現系（例えば、原核動物、昆虫、哺乳動物、又は細胞非含有発現系）に挿入し、(3) 融合タンパク質を発現させ、かつ(4) 任意に、融合タンパク質を精製することによって作製する。

【0057】

(1) 一態様において、テザード・リガンド融合タンパク質の発現は、コーディング配列を適切な発現系（すなわち、用いられる発現系に必要な挿入コーディング配列の転写及び翻訳に必要な要素、例えば、エンハンサ、プロモーター、転写ターミネータ、複製起点、適切な開始コドン（例えば、メチオニン）、読み取り枠、及び翻訳調節シグナル（例えば、リボソーム結合部位、終止コドン及びポリアデニル化配列）を含むベクター）に挿入することを含む。用いられるベクター系及び宿主に応じて、いかなる数の適切な転写及び翻訳要素（構成及び誘導プロモーターを含む）をも用いることができる。

【0058】

テザード・リガンド融合タンパク質のコーディング配列は、本明細書の他所に記載されるように、リガンド、スターク及び固定化ドメインを含む。各ドメインのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは当該技術分野において公知の様

々な方法で得ることができる；典型的には、これらのポリヌクレオチドは、熟練者によって決定され、又は、より頻繁には、公に入手可能な（例えば、GenBankにより）配列に基づいて設計されるプライマーを用いる、クローン化プラスミド、cDNAライブラリ、及びRNAの逆転写によって産生されるcDNAのPCR増幅によって得られる。典型的には、融合構築体の産生におけるクローン化及び操作を促進するため、これらのプライマーはリンカー領域（例えば、制限部位を含む配列）を含む。リガンド、スターク、及び固定化領域に対応するポリヌクレオチドはイン・フレームで結合して融合タンパク質コーディング配列を産生する。

【0059】

本発明のテザード・リガンド・タンパク質は分泌タンパク質又は非分泌タンパク質として発現させることができる。好ましくは、融合タンパク質を分泌させる。天然リガンドがシグナルペプチド（例えば、ケモカイン・リガンド）を含む場合、分泌は融合遺伝子内にシグナル配列エンコーディングDNAを含めることによって容易に達成することができる。その代わりに、リガンドが自然状態では分泌しない場合、異種又は人工シグナルペプチドを融合タンパク質に含める（例えば、Luil et al, 1993, PNAS USA, 90:8957-61 を参照）。

【0060】

(2) テザード・リガンド融合タンパク質ベクターは様々な方法によって細胞（例えば、細菌、酵母、昆虫、及び哺乳動物細胞）に導入することができる。本発明の核酸発現ベクター（典型的には、dsDNA）は公知法、例えば、塩化カルシウム形質転換（細菌系用）、電気穿孔法、リン酸カルシウム処理、リポソーム介在形質転換、注入及び微量注入、バリスティック法、ピロゾーム、免疫リポソーム、ポリカチオン：核酸結合体、裸のDNA、人工ビリオン、ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22（Elliot and O'Hare, Cell 88:223）への融合、DNAの作用物質増強取り込み、及び当該技術分野において公知の他の方法によって選択された宿主に移すことができる。前出の Ausubel を参照のこと。

【0061】

(3) テザード・リガンドの発現に適する様々な発現系が当該技術分野におい

て公知である。有用な細菌発現系には、大腸菌 (*E. coli*)、桿菌 (例えば、枯草菌)、他の腸内細菌 (例えば、サルモネラ、セラチア、及び様々なシュードモナス種) 又は他の細菌宿主 (例えば、ストレプトコッカス・クレモリス (*Streptococcus cremoris*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ロイコノストック・シトロボラム (*Leuconostoc citrovorum*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、乳酸菌 (*Lactobacillus lactis*)、ビフィドバクテリウム・ビフィズム (*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・ブレベ (*Bifidobacterium breve*)、及びビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)) が含まれる。原核生物において有用なテザード・リガンド融合タンパク質発現構築体には、組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターが含まれ、典型的には、プロモーター配列を含む。例証的なプラスミドは誘導性プロモーター、例えば、*lac*プロモーター、Bluescript7ファージミド (Stratagene, La Jolla, CA) もしくはpSport1 (Gibco BRL) のハイブリッド*lacZ*プロモーター; ファージ・ラムダ・プロモーター系; トリプトファン (*trp*) プロモーター系; 及び*ptrp-lac*ハイブリッド等を含む。細菌発現構築体は、任意に、リボゾーム結合部位及び転写終止シグナル調節配列を含む。発現に有用な特定のベクターの実例には、例えば、pTrcHis2 (Invitrogen, San Diego, CA) が含まれる。

【0062】

テザード・リガンド融合タンパク質が酵母において発現する場合、プラスミド及び酵母人工染色体 (YAC) ベクターを含む多くの適切なベクターが利用可能である。ベクターは、典型的には、記述されるように、発現制御配列、例えば、構成もしくは誘導性プロモーター (例えば、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、PGH、及び3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖酵素)、並びに複製起点、終止配列等を含む。ピッチア (*Pichia*) において用いるのに適するベクターには、pPICZ、His6/pPICZB、pPICZalpha、pPIC3,5K、pPIC9K、pA0815、pGAP2A、B及びC、pGAP2alphaA、B、及びC (Invitrogen, San Diego, CA) 並び

に当該技術分野において公知であるか、又は開発される多くの他のものが含まれる。一態様においては、ベクターHis6/pPICZB (Invitrogen, San Diego, CA) を酵母ピッチア・パストリス (*Pichia pastoris*) におけるHis6 - テザード・リガンド融合タンパク質の発現に用いる。サッカロミセス属において有用なベクターの例はpYES2 (Invitrogen, San Diego, CA) である。

【0063】

テザード・リガンド融合タンパク質の発現のために本発明によって提供される他の発現系は昆虫系である。好ましい系はバキュロウイルス・ポリヘドリン・プロモーターを用いる。そのような系の1つにおいては、スポドプテラ・フルギペルダ細胞又はトリコプルシア (*Trichoplusia*) 幼生において外来遺伝子を発現させるのにオートグラフィア・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) をベクターとして用いる。関心のある遺伝子をコードする配列をウイルスの非必須領域、例えば、ポリヘドリン遺伝子にクローン化し、ポリヘドリン・プロモーターの制御下におくことができる。例えばテザード・リガンド融合タンパク質をコードする、配列の挿入の成功はポリヘドリン遺伝子を不活性化し、コートタンパク質を欠く組換えウイルスを産生する。次に、この組換えウイルスをS・フルギペルダ細胞又はトリコプルシア幼生の感染に用い、次いで、そこでテザード・リガンド融合タンパク質配列を発現させる (一般的な方法については、Smith et al., 1983, J. Virol., 46:584; Engelhard et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:3224-7 を参照)。バキュロウイルスの発現に有用なベクターには、pBlueBacHis2A、B及びC、pBlueBac4.5、pMe1BacB並びに当該技術分野において公知であるか、又は開発される多くの他のものが含まれる。昆虫細胞において有用なテザード・リガンド融合タンパク質発現構築体の実例が下記実施例6に示される。

【0064】

本発明は、哺乳動物及び哺乳動物細胞における発現系も提供する。前述のように、多量のテザード・リガンド融合タンパク質ポリペプチドを産生させるためにテザード・リガンド融合タンパク質ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞 (例えば、ヒト細胞) において発現させることができ、これは当該技術分野において公知で

あり、かつ下記 § 5 . 1 . 1 に記載されるものが含まれる。

【 0 0 6 5 】

最適発現時間は、分泌されたタンパク質を（例えば、通常のエピトープ・タグ、例えば、ポリヒスチジンを用いる）検出用ウェスタンブロット分析によって分析することにより好都合に決定される。

【 0 0 6 6 】

(4) 分泌されたテザード・リガンド融合タンパク質を細胞培地から精製することが時折望ましいものであり、一般には、非分泌タンパク質は使用前に精製する必要がある。精製は様々な方法を用いて行うことができ、この方法には、例えば、ポリヒスチジン・トラクト (tract) (例えば、His₆) を含む癒合タンパク質の金属キレート・アフィニティクロマトグラフィー、プロテインAドメインもしくは断片（これは、固定化免疫グロブリンでの精製を可能にする）、及び FLAG 伸長 / アフィニティ精製システム (Immunex Corp, Seattle, WA) において用いられるドメインが含まれる。

【 0 0 6 7 】

融合タンパク質はあらゆる適切な条件（例えば、凍結）下で貯蔵することができ、かつ完全性を保存することができ、例えば、保存された幾つかのスタルコカインは長期貯蔵及び反復凍結・解凍に感受性であるように思われた。過剰の分解を回避するため、タンパク質溶液を等分し、 - 2 0 又は - 8 0 で長期間貯蔵した。スタルコカインを含む上清にプロテアーゼ阻害剤を添加することで分解のレベルが低下し、品質が高まった。

【 0 0 6 8 】

3 . 4 . 1 活性アッセイ

所望であれば、融合タンパク質を試験してそれが単離リガンドの生物学的活性を保持することを確認することができる。例えば、ケモカイン・リガンドの場合、実施例に記載されるように、テザード・リガンドを用いて（例えば、固定化の前に）標準結合及び化学走性アッセイを行うことができる。

【 0 0 6 9 】

4 . 固定化及びアレーの調製

4.1 基体上への固定化

幾つかの態様においては、本発明のテザード・リガンド（例えば、スタルコカイン）を固体表面上に固定する。テザード・リガンドを結合させる基体は様々な形態、例えば、マイクロタイターディッシュ、試験管、ディップスティック、微量遠心管、ビーズ、回転可能なディスク等のいずれであってもよい。適切な材料にはガラス、プラスチック（例えば、ポリエチレン、PVC、ポリプロピレン、プロスチレン等）、タンパク質、紙、炭水化物、及び他の固体支持体が含まれる。用いることができる他の材料にはセラミック、金属、非金属、半導体材料、セメント等が含まれる。

【0070】

前述のように、融合タンパク質をアレーとして組織化する。「アレー」という用語は、本明細書で用いられる場合、固定された融合タンパク質の順序付けられた配置を指し、そこでは特定の異なる融合タンパク質（すなわち、異なるリガンド・ドメインを有する）が基体上の異なる予め決定された部位に位置する。アレー上の特定の融合タンパク質の位置は既知であるため、その位置への受容体結合性細胞の結合はその細胞が提示する受容体（1つもしくは複数）及び融合タンパク質のリガンド（例えば、ケモカイン）ドメインの特異的結合に相関し得る。

【0071】

ビーズ上の（個々の、又は群をなしての）融合タンパク質の固定化は別の特に有用なアプローチである。一態様においては、個々のテザード・リガンド融合タンパク質をビーズ上に固定し、同族受容体を発現する細胞に結合させ、得られる複合体を未結合細胞から分離する。一態様においては、識別可能なビーズの混合物を用いる。識別可能なビーズは、サイズ、磁気特性、色（例えば、FACSを用いて）又はアフィニティ・タグ（例えば、プロテインAでコートしたビーズはIgGアフィニティ法を用いることによりプロテインAでコートしていないビーズから分離することができる）に基づいて互いに分離することができるビーズである。一態様によると、各々の識別可能なビーズをリガンド融合タンパク質の種類又は特定の組合せと会合させる。特定のテザード・リガンド融合タンパク質に結合する細胞を決定することができる；同様に、試験化合物（すなわち、結合のア

ゴニスト及びアンタゴニスト)の効果を決定することができる。

【0072】

4.2 固定化のための基体及び方法

タンパク質を固定する方法は当該技術分野において公知であり、共有結合及び非共有結合法が含まれる。方法の選択は、部分的には、選択される基体及び検出システムに依存することは理解されるであろう。

【0073】

4.2.1 非共有結合固定化

適切な固定化法の1つは抗体介在固定化である。この方法によると、テザード・リガンドの「固定化ドメイン」の配列に特異的な抗体自体を(例えば、吸着により)基体上に固定する。このアプローチの利点の1つは、単一抗体を基体に結合させ、(同じ固定化ドメインを共有する)幾つかの異なるテザード・リガンドの固定化に用いることができることである。例えば、ポリヒスチジンからなる固定化ドメイン(Bush et al, 1991, J. Biol Chem 266:13811-14)は抗ヒスチジンモノクローナル抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN)によって結合させることができ;分泌アルカリホスファターゼ(「SEAP」)からなる固定化ドメイン(Berger et al, 1988, Gene 66:1-10)は抗SEAP(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)によって結合させることができ;FLAGエピトープからなる固定化ドメインは抗FLAGによって結合させることができる。他のリガンド-抗リガンド固定化法も適切である(例えば、プロテインA配列からなる固定化ドメイン(Harlow and Lane, 1988, ANTIBODIES A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)はIgGによって結合させることができ;及びストレプトアビジンからなる固定化ドメインはビオチンによって結合させることができる(Harlow & Lane, 前出; Sigma Chemical Co., St Louis, MO)。

【0074】

抗体介在固定化法を用いる場合、ガラスが特に有用な基体である(例えば、顕微鏡品質のガラススライド)。アレーが望ましい場合、ガラス基体に疎水性(例えば、テフロン)マスクを用いて印刷してウェルを形成することができる。14

・5 cm²スライド当たり3、10及び21ウェルの「作業領域」を有する予め印刷されたスライドガラスを、例えば、SPI Supplies、West Chester、PAから入手することができる：米国特許第4,011,350号も参照のこと。特定の用途においては、96ウェル・フォーマットで印刷された大フォーマット(12.4 cm × 8.3 cm)スライドガラスが用いられる；このフォーマットは、自動液体取り扱い機器の使用及び様々なタイプ(蛍光、比色、シンチレーション)の96ウェル・フォーマット・プレートリーダーの利用を促進する。しかしながら、より高い密度を用いることができる(例えば、cm²当たり1を上回るテザード・リガンド)。しばしば、テザード・リガンド・アレーは少なくとも約3、少なくとも約5、少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20又はそれを上回る異なるリガンドを含む。

【0075】

典型的には、吸着によって抗体を基体(例えば、ガラス基体)に結合させる。適切な吸着条件は当該技術分野において公知であり、バッファ(PBS、又は50ないし300 mM Tris、MOPS、HEPES、PIPES、酢酸バッファ)中、pH 6.5ないし8.4ないし3.7で1時間ないし24時間を上回る0.5 - 50 µg/ml(例えば、10 µg/ml)mAbのインキュベーションが含まれる。

【0076】

抗体介在固定化は、リガンド・ドメインが追加の方向をとることを可能にする抗体ヒンジ領域の柔軟性のため、他の固定化法を上回る利点を提供する。

【0077】

通常、融合タンパク質は受容体発現性細胞と接触させる前に固定するが、幾つかの態様においては、固定化が接触工程に続く。

【0078】

4.2.2 共有結合固定化

前述のように、テザード・リガンドは非特異的結合によって共有結合又は非共有結合させることができる。融合タンパク質と表面との共有結合が望ましい場合、表面は通常多官能性であるか、又は多官能化することができる。表面上に存在

することができ、かつ連結に用いられる官能基には、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン性基、ヒドロキシル基、メルカプト基等が含まれ得る。多様な化合物を様々な表面に連結する方式が公知であり、文献において十分に説明されている。

【0079】

5. スタルコカインの追求及びスタルコカイン・アレー

本発明によると、受容体（例えば、ケモカイン受容体）を発現する細胞を1以上のテザード・リガンド融合タンパク質（例えば、個別のリガンド又は異なるテザード・リガンドのアレー）と、リガンド及び（存在するのであれば）同族受容体の間の結合が生じる条件下で接触させる。

【0080】

典型的には、結合条件は、受容体 - リガンド相互作用が生じるか、又は生じることが期待される生理学的条件である。したがって、一態様においては、緩衝溶液（例えば、PBS、TBS等）中で細胞をテザード・リガンドと接触させる。

【0081】

結合は、典型的には、14 ないし37（例えば、室温）で0.5ないし10時間（典型的には、0.5ないし3時間、例えば、1.5時間）、穏やかに攪拌しながら、又は攪拌なしに進行させる。結合に好ましい細胞濃度は0.5 - $5 \times 10^5 / \text{ml}$ の範囲（例えば、 $1 - 2 \times 10^6 / \text{ml}$ ）であるが、この範囲外の濃度を用いることもできる（例えば、患者サンプルに由来する希な細胞の場合）。

【0082】

幾つかの態様においては、アレー又は個別のテザード・リガンドと共にインキュベートする前に細胞を前処理する。例えば、細胞を蛍光標識抗体（例えば、抗CD3細胞マーカー）で修飾するか、又はCalcein（Molecular Probes、Eugene、OR）のような蛍光色素で細胞内標識するか、又は放射性同位体を用いて標識することができる。このような標識はテザード・リガンド（例えば、アレー上の部位）への細胞の結合の定量化に加えて、結合性細胞の特徴付けを容易にする。例えば、Tリンパ球上で発現するケモカイン受容体を分析する実験において、P

BMCを単離し、T細胞をフルオレセイン標識抗CD4及びローダミン標識抗CD8で染色することができる。典型的には、細胞を30分間染色し、PBSで3×洗浄し、PBS中にml当たり 1×10^6 細胞で再懸濁させる。次に、これらの細胞を本明細書に記載されるテザード・リガンド・アレーと接触させ、室温で1時間結合させる。次いで、スライドを洗浄して未結合細胞を除去し、蛍光プレートリーダーを用いて付着細胞を検出する。T細胞の共存同定を用いてフルオレセイン・タグ及びローダミン・タグを別々に検出する。

【0083】

各々の細胞型が結合するテザード・ケモカイン、及び2つのシグナルの比の分析により、特定のテザード・リガンドに局在する細胞型を決定することができる（すなわち、細胞を特徴付け、細胞を定量することができる）。（例えば、多発性硬化症又は関節リウマチの患者に由来する）細胞の不均一集団を染色することにより、例えば診断の目的で、特定の受容体又は受容体の組合せを発現する細胞の下位集団を同定することができることは明らかであろう。同様に、このプロトコルは薬物の開発において有用である（例えば、テザード・ケモカインへの個々のT細胞の結合パターンを変化させる化合物のスクリーニング）。

【0084】

5.1 受容体を発現する組換え細胞を用いる追求

一態様においては、受容体を発現する組換え細胞（すなわち、関心のある受容体タンパク質をコードする発現ベクターで一時的に、又は安定にトランスフェクトした細胞）を用いて本発明の方法を実施する。

【0085】

5.1.1 細胞発現組換え受容体タンパク質

アッセイにおいて用いられる組換え発現受容体タンパク質は様々な結合性タンパク質、例えば、7回膜貫通Gタンパク質結合受容体クラス（例えば、ケモカイン受容体）、受容体チロシンキナーゼ（例えば、EGF受容体、インシュリン受容体、IGF-1受容体、NGF受容体、PDGF受容体、M-CSF受容体、FGF受容体、VEGF受容体）及び前記表2に列挙されるあらゆるリガンド又はリガンドクラスを受容体のいずれであってもよい。例示的受容体が表1に示さ

れる。配列データベースへのリンクを含む7回膜貫通受容体のさらなる説明が <http://swift.embl-heidelberg.de/7tm/phylo/phylo.html> に見出される。多くのさらなるタンパク質結合性受容体が文献及び/又はGenBankにおいて説明されている。この情報を用いて、当業者は様々な受容体を発現する細胞を定型的な技術を用いて調製することができる。

【0086】

関心のある受容体を発現する形質転換細胞株及び/又は様々な受容体をコードする発現ベクターが公知である(例えば、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard Manassas、VA 20110-2209; <http://www.atcc.org/>を参照)。その代わりに、遺伝子のDNA配列又は受容体をコードするcDNAを提供することで、組換えタンパク質を発現させるための定型的な方法を用いて受容体を発現させることができる。通常、完全長又は天然受容体配列を発現させる必要がないことは理解されるであろう; リガンドを結合することができる部分、変種又は断片で十分である。

【0087】

通常、関心のある受容体コーディング配列を「組換え発現カセット」発現ベクターにクローン化し、適切な宿主細胞に導入(例えば、トランスフェクト)する。

【0088】

受容体は、膜結合受容体タンパク質の発現が可能な様々な細胞型(例えば、昆虫等)において発現させることができるが、本発明において用いられる受容体は、典型的には、哺乳動物細胞において発現させる。

【0089】

受容体の発現に有用な宿主細胞には、これらに限定されるものではないが、組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系、哺乳動物細胞発現系等が含まれる。例えば、前出のAusubelらを参照のこと。哺乳動物宿主細胞においては、多くの発現系、例えば、pCMV-myc(Clonetech、Palo Alto CA)のような構成性発現ベクター、pTRE2(Clonetech、Palo Alto CA)(テトラサイクリン誘導を用いる)のような誘導性発現ベクター、受容

体及び薬物耐性遺伝子を駆動することが可能な bicistronic ベクター pIRES (Clonetech、Palo Alto CA) 等を利用することができる。加えて、挿入配列の発現を調節するか、又は望まれる特別な方式で遺伝子産生物を修飾及び処理する（例えば、タンパク質産生物の修飾（例えば、グリコシル化）及び処理（例えば、開裂）はそのタンパク質の機能にとって重要なものであり得る）宿主細胞株を選択することができる。この目的のため、遺伝子産生物の一次転写、グリコシル化、及びホスホリル化を適切に処理するための細胞機構を有する真核生物宿主細胞を用いることができる。そのような宿主細胞には、これらに限定されるものではないが、SV40で形質転換したサル腎臓CV1 (COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚性腎臓株 (293；Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977))；ベイビー・ハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10)；CHO (ATCC CCL 61及びCRL 9618)；マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；ミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL 1587)；ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa、ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL 34)；バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065)；マウス乳房腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 51)；TRI細胞 (Mather. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-46 (1982))；MDCK細胞 (ATCC CCL 34及びCRL 6253)；HEK 293細胞 (ATCC CRL 1573)；並びにWI-38細胞 (ATCC CCL 75；ATCC：American Type Culture Collection、Rockville、MD) が含まれる。ポリペプチドの発現への哺乳動物組織細胞の使用は、Winnacker, FROM GENES TO CLONES (VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987) に一般に論じられている。

【0090】

組換えタンパク質の長期の高収率産生には安定な発現が好ましい。例えば、受容体を安定に発現する細胞株を加工することができる。ウイルスの複製起点を含

む発現ベクターを用いるよりも、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等）によって制御された受容体エンコーディングDNA、及び選択可能マーカーで宿主細胞を形質転換することができる。適切であるならば、コドンの用法を非ヒト細胞又は非哺乳動物細胞における発現用に変更することができる。外来DNAの導入に続いて、加工細胞を富化培地において1 - 2日間成長させ、次いで選択培地に切り替えることができる。組換えプラスミド中の選択可能マーカーはこの選択に対する耐性を付加し、細胞がそのプラスミドをそれらの染色体に安定に組み込み、かつ成長して病巣を形成することを可能にし、次にその病巣をクローン化し、細胞株内に広げることができる。この方法は、細胞表面上に受容体タンパク質を発現する細胞株の加工に有利に用いることができる。多くの選択系を用いることができ、これには、これらに限定されるものではないが、それぞれ *t^k*、*h g p r t^r* または *a p r t^r* 細胞において用いることができる単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン - グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026)、及びアデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) 遺伝子が含まれる。また、代謝拮抗剤耐性を、メトトレキサートに対する耐性を付与する *d h f r* (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527) ; マイコフェノール酸に対する耐性を付与する *g p t* (Mulligan & Berg, 1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072) ; アミノグリコシド G - 418 に対する耐性を付与する *n e o* (Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1) ; 及びハイグロマイシンに対する耐性を付与する *h y g r o* (Santerre et al., 1984, Gene 30:147) の選択の基礎として用いることもできる。さらなる選択可能な遺伝子も記述されており、すなわち、細胞がトリプロファンに代わってインドールを利用することを可能にする *t r p B* ; 細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする *h i s D* (Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047) ; オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤、2 - (ジフルオロメチル) - DL - オルニチン、

D F M Oに対する耐性を付与するODC（オルニチンデカルボキシラーゼ）（Mc Conlogue L., 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.）及びグルタミンシンセターゼ（Bebbington et al., 1992, Biotech 10:169）である。その代わりに、細胞（例えば、ネズミ胚性幹細胞）にDNAを導入するのに有利な部位への相同組換えを用いることもできる。

【0091】

テザード・リガンド又はテザード・リガンド・アレーを組換え細胞で追求する場合、アッセイの前に細胞を1 - 2日サブクローン化する（「分裂させる」）ときに良好なシグナルが生じることが観察されている。

【0092】

5.1.2 オーフアン受容体の特徴付け

一態様において、本発明の試薬及び方法はオーファン受容体に結合するリガンドの同定に有用である。公知のリガンドを持たない、様々な予想生物学的機能を有する多くの推定受容体が存在する。本発明によると、本明細書に記載されるようにクローン化オーファン受容体を組換えで発現させ、様々なテザード・リガンドへのオーファン受容体発現細胞の結合を試験する。結合のプロフィールに基づき、リガンド（1種類もしくは複数種類）を受容体に割り当てることができる。

【0093】

通常、当業者は、配列相同性又は他の特徴に基づいてオーファン受容体を特定のクラスの受容体に割り当てることができる。そのような場合、オーファン受容体に相当するテザード・リガンドを、通常は、又は最初は、このクラスの受容体を結合することが知られるか、又はそう信じられるリガンドで追求することは認められるであろう。例えば、CXCケモカイン受容体との相同性を有するオーファン受容体は、最初に、CXCケモカイン受容体と相互作用することが知られるリガンドで追求する。同様に、1以上のクラスのケモカイン受容体との相同性を有するオーファン受容体は、通常、又は最初に、ケモカイン・リガンドで追求する。

【0094】

5.2 細胞集団での追求

様々な態様において、本発明は細胞集団の受容体（例えば、ケモカイン受容体）プロフィールを分析するための方法を提供する。「受容体プロフィール」又は「受容体発現のプロフィール」という用語（交換可能に用いられる）は、アッセイにおいて検出されるような、細胞型（例えば、細胞株もしくは精製細胞型）上の、又は不均一細胞集団（例えば、患者に由来する細胞サンプル）中の細胞表面提示された受容体（すなわち、膜結合細胞外受容体）の補集合を指す。したがって、一組のケモカイン受容体のアッセイにおいて、細胞株の「受容体プロフィール」という用語はその細胞株の細胞によって提示されるケモカイン受容体の組を指す（提示される他の受容体、例えば、成長因子受容体は問わない）。同様に、細胞の不均一混合物の「受容体プロフィール」という用語は、全ての細胞が同じ受容体の組を提示し得るとは限らないものの、その集団の細胞によって提示される受容体の組を指す。以下に論じられるように、細胞集団の受容体プロフィールには、幾つかの受容体の各々を結合する集団における細胞の数及び/又は型に関する情報も含まれ得る。

【0095】

細胞集団の受容体プロフィールの決定は、患者（又は医用モデルを含む非ヒト動物）における診断又は疾患の予後；個体の集合のプロフィール作成；患者に対する薬物又は治療の効果の評価等を含む様々な用途において有用である。

【0096】

5.2.1 診断及び予後

異なる型の細胞は異なる細胞外受容体を発現する。さらに、あらゆる特定の細胞型によって発現される受容体は、その細胞の発達段階、細胞環境、及び場所に応じて変化し得る。例えば、ウイルス感染細胞は同様の非感染細胞とは異なる受容体を発現することがある。さらに、特定の位置での特定の受容体を発現する細胞（すなわち、特定の受容体プロフィールを有する細胞集団）の有無は個体の健康状態を示すものである。例には、炎症部位での白血球及び他の細胞の存在、並びにサンプル中の悪性細胞の存在が含まれる。

【0097】

したがって、本発明は、疾患を患うことが疑われる患者から細胞集団を得、かつその集団の受容体プロフィールを本明細書に記載されるアッセイ法（すなわち、細胞集団を1以上の固定化テザード・リガンド融合タンパク質と接触させ、かつ集団中の細胞が結合するリガンドを同定する）を用いて決定する診断方法を提供する。その後、受容体プロフィールを疾患状態のプロフィール特性及び健常状態のプロフィール特性と比較し、診断はその比較に基づく。

【0098】

細胞集団の例には、限定することなしに、（1）疾患組織及び液体に由来する細胞、（2）患者集団に由来する細胞、（3）疾患又は治療が進行する間の様々な時期に患者から採取された細胞が含まれる。したがって、一態様においては、疾患を患う個体に由来する組織又は液体、例えば、関節リウマチを患う個体に由来する滑液；多発性硬化症及びアルツハイマー病を患う個体に由来する脳脊髄液、喘息、サルコイドーシス、結核、成人呼吸促進症候群、並びに他の炎症性及び感染性疾患を患う個体に由来する気管支肺胞洗浄（BAL）液、胎児細胞、組織、及び（例えば、筋肉、骨髄、リンパ節、肝臓、脳等の組織からの）生検から細胞を得る。本発明の試薬及び方法を、集団において発現する受容体（例えば、ケモカイン受容体、すなわち「CKR」）の集団を決定し、それを正常（例えば、非疾患）組織において発現するCKRと比較するのに用いる。正常かつ非疾患組織は同じ被検体に由来するものであっても、2もしくは数体の異なる被検体に由来するものであってもよい。異なるように発現したCKRは治療処置のための特定の分子疾患標的を定義する。

【0099】

細胞は様々な疾患のいずれかを患う患者から得ることができ、この疾患には、限定されることなく、炎症、感染及び癌に関連する疾患及び状態、例えば；（1）炎症もしくはアレルギー性疾患、例えば、全身アナフィラキシーもしくは過敏性応答、薬物アレルギー、昆虫刺傷アレルギー；炎症性腸疾患、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、回腸炎及び腸炎；腫瘍疾患；乾癬及び炎症性皮膚疾患、例えば、皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触性皮膚炎、蕁麻疹；血管炎；脊椎関節症；強皮症；呼吸器アレルギー性疾患、例えば、喘息、アレルギー

一性鼻炎、過敏性肺疾患等、(2)自己免疫疾患、例えば、関節炎(リウマチ様及び乾癬性)、多発性硬化症、全身エリテマトーデス、糖尿病、糸球体腎炎等、(3)移植片拒絶(同種移植片拒絶及び移植片対宿主病を含む)、並びに(4)望ましくない炎症性応答を阻害すべきである他の疾患(例えば、アテローム性動脈硬化症、筋肉炎);癌、血管形成もしくは血管新生が役割を果たす疾患(新生物疾患、網膜症及び黄班変性症)、感染性疾患及び免疫抑制性疾患が含まれる。

【0100】

1以上のリガンドに結合する細胞を定量化及び/又は特徴付けることにより(例えば、計数、分類、免疫染色等により)、集団に関するさらなる情報が得られる。

【0101】

5.2.2 薬物の評価

本発明の試薬及び方法は、患者に対する薬物又は治療の効果を監視するのにも有用である。個体又は非ヒト動物に由来する細胞を、疾患の治療の前後、又は疾患の進行の開始前後、病原体に露出する前後、免疫の前後等に得、それらの結果を比較することによって受容体発現のプロフィールの変化をアッセイする。(例えば、計数、分類、免疫染色等によって)1以上のリガンドに結合する細胞の定量化及び/又は特徴付けにより、その集団に関するさらなる情報を得る。薬物の評価は治療の過程で繰り返し行うことができる。

【0102】

5.2.3 集団のプロフィール作成

別の関連態様においては、本発明の方法を個体の集団の「プロフィール作成」に用いる。例示的態様においては、個体を特定の受容体プロフィールを発現する個体のコホート、又は(例えば、特定の細胞上に)特定の受容体を発現する個体のコホートにグループ分けするため、特定の個体集団に由来する細胞(例えば、血液細胞又は白血球)の受容体プロフィール(例えば、CCRプロフィール)を決定することが有用である。例えば、(例えば、喘息における好酸球の活性を遅延させる治療のため)好酸球上で発現するCCR3へのエオタキシンの結合を阻害するCCR3アゴニストについての臨床試験を計画するため、CCR3の存在

について一般集団内の個体の大サンプルのプロフィールを作成することが有用である。エオタキシン - スタルコカインに結合する好酸球が欠乏する集団のサブセットを同定し、臨床試験から排除することができる。同様に、CCR3の発現は他の特徴又はマーカー（例えば、性別、年齢、又は遺伝的もしくは倫理的変種）と相関し得る。

【0103】

5.3 膜調製品での追求

関心のある受容体を発現する組換え又は天然細胞での追求に加えて、膜調製品をそのような細胞及び/又は細胞ホモジネートから得、本発明のアッセイにおいて用いることができる。膜調製品は定型的な方法、例えば、低張溶解及び遠心を用いて調製することができる（例えば、Dairaghi et al, 1999, J. Biol. Chem. 274:21569-74を参照）。

【0104】

6. 検出方法

テザード・リガンド及びアレーに結合する細胞は幾つかの方法で検出及び定量することができる。細胞は、前染色の有り無しにかかわらず、視覚的に（すなわち、顕微鏡を用いて）観察（及び計数）することができる。その代わりに、自動及び半自動検出システム（例えば、蛍光定量的画像プレートリーダー、シンチレーションカウンタ、「96ウェル」プレートリーダー）を、特に受容体結合性細胞が検出可能な標識で標識されているとき、特定のテザード・リガンド（例えば、アレー上の部位）に関連するシグナルの測定に用いることができる。本明細書で用いられる場合、「検出可能な標識」は当該技術分野における通常の意味を有し、（例えば、物理的又は化学的特性のため）検出するか、分子の存在の指示するか、又は共有結合もしくは他の方法で会合する別の分子の結合を可能にするのに用いられ、又は用いることができる原子（例えば、放射性核種）、分子（例えば、フルオレセイン）、もしくは複合体を指す。本発明における使用に適する検出可能な標識には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的又は化学的手段によって検出可能なあらゆる組成物が含まれる。本発明において有用な標識には、標識ストレプトアビジン結合体で標識するためのビオチン

、磁気ビーズ（例えば、Dynabeads™）、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、Texas red、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、強化緑色蛍光タンパク質、リサミン（lissamine）、フィコエリトリン、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、FluorX [Amersham]、SyBR Green I 及び II [Molecular Probes] 等）、放射標識（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、又は³²P）、酵素（例えば、ヒドロラーゼ、特に、アルカリホスファターゼのようなホスファターゼ、エステラーゼ及びグリコシダーゼ、又はオキシドレダクターゼ、特に、セイヨウワサビペルオキシダーゼのようなペルオキシダーゼ、並びにE L I S Aにおいて通常用いられる他のもの）、基質、補因子、阻害剤、化学発光基、色素産生剤、及び比色用標識、例えば、コロイド状金又は着色ガラスもしくはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等）ビーズが含まれる。そのような標識の使用を教示する特許には、米国特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；及び第4,366,241号が含まれる。このような標識を検出する手段は当業者に公知である。

【0105】

一態様においては、受容体及びテザード・リガンドの会合を、<http://www.ece.neu.edu/edsnu/zavracky/mfl/programs/relay/relay.html> に記載されるマイクロスイッチ技術を用いて検出する。

【0106】

所望であれば、検出の前に、（例えば、グルタルアルデヒドのような架橋剤を用いて）細胞を固定することができる。

【0107】

前述のように、本発明に従って細胞をテザード・リガンドと接触させる前、又は後に、受容体担持細胞を染色することが時折好都合である。例証態様の1つにおいては、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）標識抗CD20抗体をB細胞のマーク付けに用い、ローダミン標識抗CD3をT細胞のマーク付けに用いる。UV照明下での可視化及び定量並びに正しい波長フィルタ・セットによって異なる細胞型が識別される。

【0108】

7. データ解析

本発明のテザード・リガンド及びアレーへの受容体担持細胞の結合の解析方法は、本開示のガイダンスに従い、当業者には明らかであろう。典型的には、テザード・アレーへの受容体発現細胞株の結合の解析は、計数、蛍光、又はシンチレーションによって細胞の結合を定量した後に行う。通常、結合を3回行い、その値の平均（平均値）を解析に用いる。

【0109】

最初に、非特異的結合の基線を決定する。非結合性テザード・リガンド（例えば、サブクラスのテザード・ケモカイン及び試験ケモカイン受容体を結合しない）が適切な基線の役割を果たすウェルの測定。非リガンド含有固定化スターク（すなわち、リガンド・ドメインを欠く「テザード・リガンド」）についての結合を測定することにより、さらなる適切な基線を決定することができる。加えて、トランスフェクション・プロトコルによって処理はされているがテザード・リガンドを作製することができるいかなるプラスミド（例えば、親ベクターpcDNA3.1）をも含まない細胞株の上清を含む、偽トランスフェクトした対照を用いることができる。幾つかの態様においては陽性対照を用いることもできる（例えば、特定の受容体担持細胞に結合することが知られるテザード・リガンド）。適切な陽性対照は、少なくとも基線より約2倍多く、しばしば基線より約10倍多く、頻繁には少なくとも基線より約100倍多い結合を示す。

【0110】

真正の結合（例えば、トランスフェクトされた細胞及びテザード・リガンドによって生じる結合）は競合アッセイによって検証することができる。一態様においては、可溶性形態のリガンド（例えば、テザード・リガンドのリガンド・モチーフに相当する）又は可溶性（非固定化）形態のテザード・リガンドを、受容体を発現する細胞株に、前インキュベーション期間（例えば5ないし20分、典型的には15分）、過剰に添加する。結合に対する効果は前述のように決定する。真正の結合は可溶性リガンドの添加によって阻害される。時には、用いられる細胞株上に発現する内在性受容体が結合に介在することがある。これを検出するのに、平行解析における対照としての親（すなわち、非組換え）細胞株の使用が用

いられる。

【0111】

8. 結合アゴニスト及びアンタゴニスト

様々な態様において、本発明は、リガンドと受容体との、幾つかのリガンドと受容体との、又は幾つかのリガンドと幾つかの受容体との相互作用を調節する試験化合物の能力を同定するための方法を提供する。

【0112】

一態様においては、テザード・リガンドのアレー又は1以上の個々のテザード・リガンドのいずれかを用いる本発明の結合アッセイを試験化合物の存在下又は不在下において行う。試験化合物の存在下におけるテザード・リガンド(1つもしくは複数)への受容体担持細胞の結合の減少は、その試験化合物が本発明のアンタゴニストとして作用していることを示す。試験化合物の存在下におけるテザード・リガンド(1つもしくは複数)への受容体担持細胞の結合の増加は、その試験化合物が本発明のアゴニストとして作用していることを示す。リガンド受容体相互作用は(例えば、細胞代謝に対する)生理学的効果を有するため、本発明のモジュレータはその効果を調節することが期待され、そのようなモジュレータは、例えば医薬組成物を製造するのに、しばしば治療上有用である。

【0113】

前で言及される試験化合物は、天然及び合成、有機及び無機の両者の、多種多様な化合物のいずれであってもよく、これらにはポリマー(例えば、オリゴペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチド)、小分子、抗体、糖、脂肪酸、ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体、天然構造の類似体(例えば、ペプチド模倣体、核酸類似体等)、並びに多くの他の化合物が含まれる。典型的には、試験化合物は、例えば約1 ngないし約1 g/ml、より頻繁には1 µg/mlないし1 mg/mlの範囲の、様々な濃度で添加される。典型的には、試験作用物質は、例えば1 ピコモル濃度ないし1 モル濃度、より頻繁には1 ナノモル濃度ないし1 ミリモル濃度の範囲の、様々なモル濃度で添加される。典型的には、試験作用物質は、例えば約1 十億分率ないし約1 百分率、より頻繁には約1 百万分率ないし約1 千分率の範囲の、様々な濃度で添加される。

【0114】

一態様においては、「試験化合物」は、受容体が相互作用する、テザード・リガンドの可溶性形態のリガンド部分である。例えば、ケモカイン、ELC、TECK及びSLCが、ELCリガンド・ドメインを有するテザード・リガンド（すなわち、ELC-スタルコカイン）へのCCR10発現性細胞の結合を阻害する（すなわち、競合により）ことが示されている。実施例1を参照のこと。より頻繁には、「試験化合物」は「合成試験化合物」、通常は非ポリペプチド化合物であり、すなわち、天然ポリペプチドの配列は持たない。

【0115】

試験作用物質の調節活性の評価において、試験作用物質を、細胞（1つもしくは複数）及びテザード・リガンド（1つもしくは複数）を接触させる前に受容体担持細胞（1つもしくは複数）と共にインキュベートすることができ；細胞（1つもしくは複数）及びテザード・リガンド（1つもしくは複数）を接触させた後に添加することができ；細胞（1つもしくは複数）及びテザード・リガンド（1つもしくは複数）を接触させるのと同時に添加することができる。試験作用物質を動物に、又はイン・ビトロもしくはエキソ・ビボ細胞もしくは組織に投与し、特定の標的組織又は動物モデルにおける細胞集団の結合の効果をアッセイすることもできる。

【0116】

本発明の一態様においては、特定のテザード・リガンドと特定の受容体との相互作用に対する試験作用物質（1種類もしくは複数種類）の効果を試験する。このアプローチは、例えば、受容体（例えば、オーファン受容体）と特定のリガンドとの見かけの相互作用の検証、及び特定の受容体-リガンド相互作用を阻害する作用物質の高スループット・スクリーニング（それにより、受容体又はリガンドの生物学的機能を調節する）に有用である。高スループット・スクリーニングの方法は公知である（例えば、Williams, 2000, Curr. Opin. Biotechnology 11:42-46、及びそこに引用される参考文献を参照）。

【0117】

別の態様においては、本発明のアレーを、複数のリガンドへの細胞集団の結合

プロフィールに対する試験作用物質の効果をアッセイするのに用いる。

【0118】

9. キット

本発明の一側面では、(1)本発明のテザード・リガンド・アレー、又は(2)例えば別々のバイアル内の、本発明のテザード・リガンド融合タンパク質の1つもしくは複数(例えば、少なくとも2つ、少なくとも5つ、もしくは少なくとも10の異なるテザード・リガンドの組合せ)、又は(3)テザード・リガンド融合タンパク質のうちの少なくとも2つが異なる固体基体(例えば、プレート、スライド、ビーズ等)、例えば、異なる基体(例えば、異なるビーズ)に固定化されている、1つ、2つもしくは複数のテザード・リガンド融合タンパク質を含むキットが提供される。

【0119】

10. 実施例

以下の例を請求される発明の説明のために提供するが、それを限定するものではない。

【0120】

実施例1

この例は、オーファン受容体のリガンド特異性の決定への本発明の使用を示す。

A. 略語

E L C、E B 1 1 リガンド・ケモカイン；S L C、二次リンパ - 組織ケモカイン；T E C K、胸腺発現ケモカイン；H E K 2 9 3、ヒト胚性腎臓 2 9 3 細胞；P E I、ポリエチレンイミン；C C R、C C ケモカイン受容体。

【0121】

B. 材料及び方法

ヒト、ウイルス及びネズミ組換えケモカインは R&D Systems (Minneapolis, MN ; http://cytokine.mdsystems.com/cyt_cat/cyt_cat.html) から入手した。¹²⁵I 標識 E L C 及び T E C K は Amersham から入手した。完全長 C C R 1 0 発現構築体は、F L A G エピトープ・タグ及びプロラクチン・シグナル配列を有

する pIRESpuro 発現ベクター (Clontech、Palo Alto、CA) に作製し、HEK 293 細胞内に安定なトランスフェクタントを産生させるのに用いた。CCR10 及びスタルコカインの一時的及び安定なトランスフェクションは、Superfect 試薬 (Qiagen、Valencia、CA) を製造者のプロトコルに従って用いて行った。安定にトランスフェクトした細胞を 2 µg/ml プロマイシン中で7日間選択することによって産生させ、抗FLAG M1 (Sigma、St. Louis、MO) 及び2' 抗マウスPE 結合体 (Coulter Immunotek、Miami、FL) を用いるFLAG エピトープのFACS分析により発現を確認した。

【0122】

C. CCR10 タンパク質の安定な発現

「CCX CKR」又は「CCR10」と呼ばれる新規ヒトケモカイン受容体のクローン化及び特徴付けが Gosling et al., 2000, "Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK" J Immunol. 164:2851-6 に記載されており、これは参照することによりその全体が全ての目的のために本明細書に組み込まれる。CCR10のコーディング配列は図2に示される。

【0123】

CCR10 cDNAによってコードされるタンパク質の、潜在的なケモカイン結合プロフィールを含む機能的特性を入手するため、CCR10に加えて追加されたN末端Flag エピトープをコードする発現プラスミドを構築した。これは、最も高度に発現する安定なトランスフェクタントの、抗Flag mAbを用いる検出及び選択を可能にした。M1 Flag エピトープ・タグ付加CCR10を安定に発現するヒト胚性腎臓293 (HEK293) 細胞をFACSによって確認し、さらなる分析のために選択した (HEK293 - CCR10細胞)。

。

【0124】

D. スタルコカインへの結合による受容体の追求

CCR10へのリガンドの結合を決定するため、HEK293 - CCR10細胞をケモカイン「スタルコカイン」(SK)、すなわち、別々のケモカイン・ド

メインが伸長されたスターク構造の末端に繋がれるように操作された分子の追求に用いた。スタルコカインの追求は、まず抗His係留抗体 (anti-His anchoring antibody) でコートし (PBS中に10 μ g/ml、RTで一晩)、それを洗浄して「ブロック」 (PBS中の2% FBS / 0.5% BSA) した8ウェル・チャンバー・スライドを用いて行い; 250 μ lのHEK293細胞スタルコカイン上清で処理し (37 $^{\circ}$ Cで1時間) 500,000のHEK293-CCR10トランスフェクタントと共にインキュベートした (RTで1.5時間)。可溶性ケモカインとの競合による結合の阻害を、細胞を5-10 μ g/mlの組換えケモカインと共にインキュベートすることにより行った。全ての場合において、PBSで洗浄することにより非結合細胞を除去した; 残留する結合細胞を1% グルタルアルデヒドで固定し、光画像化 (photoimaged) してカウントした。一次スクリーニングとして、この結合で推定受容体-リガンド相互作用が明らかとなった。

【0125】

CCR10発現性細胞はELCスタルコカインに非常に良く結合した (ELC-SK; 図3A)。さらに、ELC-SK介在結合は競合体としての可溶性未変性ELCの存在下において消失した (図3A、最上列)。可溶性SLCに加えて可溶性TECKの存在下においてHEK293-CCR10細胞のELC-SK介在結合の大きな減少も観察されたが、可溶性MCP-3の存在下では観察されなかった (図3A、最下列)。これらの実験は幾つかの独立した試験で行って定量したが、その一例が図3Bに示されており、再現性が高いことが見出された。さらに、濃度が漸増する非標識ELCの存在下における伝統的な相同競合アッセイにおいて放射標識ELCを用いた。その結果から、ELCがHEK293-CCR10細胞にかなり結合するが、野生型 (wt) HEK293細胞には結合しないことが明らかになった (図3C)。冷TECKを用いる放射標識TECKの相同競合においてもほぼ同一の結果が得られた (図示せず)。まとめると、スタルコカイン・ベースの結合及び放射標識リガンド結合/相同競合アッセイにより、CCR10がケモカインの新規補体に結合する新規ケモカイン受容体であることが示された。

【0126】

CCR10に結合するリガンドのスペクトルには、ELC、SLC、及びTECKが高親和性で、BLC及びvMIPIIが低親和性で含まれる。

【0127】

実施例2

この例は、スタルコカインの構築及び発現、並びに固定化スタルコカインへの受容体発現性細胞の結合を説明する。

A. スタルコカイン発現プラスミドの調製

1. CKリガンド配列の増幅

ケモカイン(「CK」)コーディング配列を、表5に示されるように、刊行文献に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて生成した。増幅したCKコーディング配列を、ヒト・フラクタルカイン・スターク領域コーディング配列及びc末端エピトープ・タグ(ポリヒスチジン)をコードする発現ベクターにクローン化した。PCR反応の出発物質には、表に示されるように、予めクローン化したプラスミド、cDNAライブラリ、及びRNAの逆転写によって産生されたcDNAが含まれていた。

【0128】

増幅は、クローン化のための独自制限エンドヌクレアーゼ部位(ほとんどの場合においてはEcoR1、あるいはEcoRVもしくはSmaI)を含むオリゴヌクレオチドを用いて行った。増幅されたケモカイン断片は開始メチオニンコドン及びリーダー・ペプチド配列を含んでおり、その結果分泌産生物が生じた。

【0129】

例えば、全MCP2ケモカインをコードするポリヌクレオチドをPCR増幅によって生成した。これらの増幅オリゴヌクレオチドは各々EcoRI部位を含んでいた。PCR断片は未処理ケモカイン全体(リーダー配列に加えて成熟タンパク質)をコードする領域を含み、これは開始メチオニンのコドン、リーダー配列、及び停止コドンまでの全ケモカイン・コーディング配列を含んでいたが、停止コドンは含んでいなかった(アミノ酸1(met)ないし109(pro)を含む、Genbank受付番号X99886)。

【0130】

ケモカイン・ドメイン配列の増幅に続き、そのDNA断片を、ヒト・フラクタルカイン・ムチン・スターク配列（以下に記載）をコードする、pcDNA3.1とベースとする改変ベクターのEcoRI（又はEcoRV部位）にサブクローン化した。図4を参照のこと。リガンド・モチーフはこの断片のPCR合成用のオリゴヌクレオチドの構築によってイン・フレームとなるように設計し、構築体の配列はDNA配列決定によって決定する。

【0131】

【表5】

表 5

ケモカイン	正プライマー	逆プライマー	組織源
MDC GenBank 受付番号 U83171	5'-GGT GAA TTC ATG GCT CGC CTA CAG ACT GC (SEQ ID NO:23)	3'-GGT GAA TTC TTG GCT CAG CTT ATT GAG AAT CA (SEQ ID NO:24)	ヒト未成熟樹状細胞 RNAからのRT-PCR
HCC1 GenBank 受付番号: Z49270	5'-GGT GAA TTC ATG AAG ATC TCC GTG GCT GCC (SEQ ID NO:25)	3'-GGT GAA TTC GTT CTC CTT CAT GTC CTT GAT ATA G (SEQ ID NO:26)	ヒト胎盤cDNA ライブラリからのPCR
SLC GenBank 受付番号 AF001979, AB002409	5'-GGT GAA TTC ATG GCT CAG TCA CTG GCT CTG (SEQ ID NO:27)	3'-GGT GAA TTC TGG CCC TTT AGG GGT CTG TG (SEQ ID NO:28)	ヒトESTクローン からのPCR
MIG GenBank 受付番号 NM 002416	5' GGT GAA TTC ATG AAG AAAA GT GGT GTT CTT TTC C (SEQ ID NO:29)	3' GGT GAA TTC TGT AGT CTT CTT TTG ACG AGA ACG (SEQ ID NO:30)	ヒト胎児脳 mRNAの逆転写
IP10 GenBank	5' GGT GAA TTC ATG AAT CAA ACT GCG ATT	3' GGT GAA TTC AGG AGA TCT TTT AGA CAT	ヒトcDNAプール

受付番号 NM 001565	CTG A (SEQ ID NO:31)	TTC CTT G (SEQ ID NO:32)	
H174 / I-TAC GenBank accession number AF002985	5' GTG GAA TTC ATG AGT GTG AAG GGC ATG GC (SEQ ID NO:33) →	3' GGT GAA TTC AAA ATT CTT TCT TTC AAC TTT TTT GA (SEQ ID NO:34)	ヒト胎盤 cDNA ライブラリ
Eotaxin1 GenBank accession number U46573	5' GGT GAA TTC ATG AAG GTC TCC GCA GCA CTT C (SEQ ID NO:35)	3' GGT GAA TTC TGG CTT TGG AGT TGG AGA TTT TTG (SEQ ID NO:36)	ヒト EST
TARC GenBank accession number NM 002987	5' GGT GAA TTC ATG GCC CCA CTG AAG ATG CT (SEQ ID NO:37)	3' GGT GAA TTC AGA CCT CTC AAG GCT TTG CAG (SEQ ID NO:38)	未成熟樹状細胞 mRNA の逆転写
MIP3alpha GenBank accession number U77035	5' GGT GAA TTC ATG TGC TGT ACC AAG AGT TTG C (SEQ ID NO:39)	3' GGT GAA TTC CAT GTT CTT GAC TTT TTT ACT GAG G (SEQ ID NO:40)	ヒト EST
ELC GenBank accession number U77180, NM 006274	5' GGT GAA TTC ATG GCC CTG CTA CTG GCC CT (SEQ ID NO:41)	3' GGT GAA TTC ACT GCT GCG GCG CTT CAT CT (SEQ ID NO:42)	ヒト EST
TECK GenBank accession number NM 005624	5' GGT GAA TTC ATG AAC CTG TGG CTC CTG GC (SEQ ID NO:43)	3' GGT GAA TTC CAG TCC TGA ATT AGC TGA TAT CAG (SEQ ID NO:44)	ヒト胎盤 cDNA ライブラリ
PARC GenBank accession number AB012113	5' GGT GAA TTC ATG AAG GGC CTT GCA GCT GC (SEQ ID NO:45)	3' GGT GAA TTC GGC ATT CAG CTT CAG GTC GC (SEQ ID NO:46)	ヒト胎盤 cDNA ライブラリ
SLC GenBank accession number AF001979	5' GGT GAA TTC ATG GCT CAG TCA CTG GCT CTG (SEQ ID NO:47)	3' GGT GAA TTC TGG CCC TTT AGG GGT CTG TG (SEQ ID NO:48)	ヒト EST
I309 GenBank accession number AA931884	5' GGT GAA TTC ATG CAG ATC ATC ACC ACA GCC C (SEQ ID NO:49)	3' GGT GAA TTC TTT TCT TTT TGA CGG GCA GTG C (SEQ ID NO:50)	ヒト EST
MIP1alpha GenBank accession number AA031820	5' GGT GAA TTC ATG CAG GTC TCC ACT GCT GC (SEQ ID NO:51)	3' GGT GAA TTC GGC ACT CAG CTC TAG GTC GCT (SEQ ID NO:52)	ヒト cDNA プール
MCP-4 GenBank accession number U59808	5' GGT GAA TTC ATG AAA GTC TCT GCA GTG CTT CTG (SEQ ID NO:53)	3' GGT GAA TTC AGT CTT CAG GGT GTG AGC TTT CC (SEQ ID NO:54)	ヒト脳 mRNA の 逆転写
MCP1 GenBank accession number AA024753	5' GGT GAA TTC ATG AAA GTC TCT GCC GCC CTT (SEQ ID NO:55)	3' GGT GAA TTC AGT CTT CGG AGT TTG GGT TTG C (SEQ ID NO:56)	ヒト EST
MCP2 GenBank accession number NM005623	5' GGT GAA TTC ATG AAG GTT TCT GCA GCG CT (SEQ ID NO:57)	3' GGT GAA TTC TGG CTT CAG ATT TTG AAA TAT TTG (SEQ ID NO:58)	未成熟樹状細胞 mRNA の逆転写
SDF1a GenBank accession number L36034	5' GGT GAATTC ATG AAC GCC AAG GTC GTG G (SEQ ID NO:59)	3' GGT GAA TTC CTT GTT TAA AGC TTT CTC CAG GT (SEQ ID NO:60)	ヒト EST

MCP5	5' GGT GAT ATC ATG AAG ATT TCC ACA CTT CTA TGC C (SEQ ID NO:61)	3' GGT GAT ATC GCC TAG ACA TGA AGG TTC AAG GAT G (SEQ ID NO:62)	
HCC2	5' GGT GAA TTC ATG AAG GTC TCC GTG GCT GC (SEQ ID NO:63)	3' GGT GAA TTC TAT TGA GTA GGG CTT CAG CTT T (SEQ ID NO:64)	
クローン391	5' GGT GAA TTC ATG AAG GTC TTC TCC TTG GTC ATG (SEQ ID NO:65)	3' GGT GAA TTC CGT TGA GGT GTT GCT CAG CTT C (SEQ ID NO:66)	
BCA1	5' GGT GAT ATC ATG AAG TC ATC TCG ACA TCT CTG (SEQ ID NO:67)	3' GGT GAT ATC GGG AAT CTT TCT CTT AAA CAC TGG (SEQ ID NO:68)	
PF4a	5' GGT GAA TTC ATG AGC TCC GCAGCC GGG TTC (SEQ ID NO:69)	3' GGT GAA TTC ACT CTC CAA AAG TTT CTT AAT TAT TTT (SEQ ID NO:70)	
PBP-like1	5' GGT GAA TTC ATG CCA CCC TGC AGC TGT G (SEQ ID NO:71)	3' GGT GAA TTC TAA AGC CAT TGT GAA TAT GAT CTG (SEQ ID NO:72)	
EOTAXIN 2	5' GGT CCC GGG ATG GCA GGC CTG ATG ACC AT (SEQ ID NO:73)	3' GGT CCC GGG GCA GGT GGT TTG GTT GCC AG (SEQ ID NO:74)	
MIP1beta	5' GGT GAA TCC ATG AAG CTC TGC GTG ACT GTC C (SEQ ID NO:75)	3' GGT GAA TTC GTT CAG TTC CAG GTC ATA CAC GTA (SEQ ID NO:76)	
MIP-3	5' GGT GAA TTC ATG AAG GTC TCC GTG GCT GC (SEQ ID NO:77)	3' GGT GAA TTC ATT CTT CCT GGT CTT GAT CCG T (SEQ ID NO:78)	
MRP-1	5' GGT GAA TTC ATG AGA AAC TCC AAG ACT GCC A (SEQ ID NO:79)	3' GGT GAA TTC AGC AAT GAC CTT GTT CCC AGA T (SEQ ID NO:80)	
リンホタクチン (LYNT)	5' GGT GAA TTC ATG ATA CTT CTC ATC CTG GCC C (SEQ ID NO:81)	3' GGT GAA TTC GCC AGT CAG GGT CAC AGC TG (SEQ ID NO:82)	
HCC4	5' GGT GAA TTC ATG AAG GTC TCC GAG GCT GC (SEQ ID NO:83)	3' GGT GAA TTC CTG GGA GTT GAG GAG CTG GG (SEQ ID NO:84)	
MIP-1gamma	5' GGT GAA TTC ATG AAG CCT TTT CAT ACT GCC C (SEQ ID NO:85)	3' GGT GAA TTC TTG TTT GTA GGT CCG TGG TTG T (SEQ ID NO:86)	
IL-8	5' GGT GAT ATC ATG ACT TCC AAG CTG GCC G (SEQ ID NO:87)	3' GGT GAT ATC TGA ATT CTC AGC CCT CTT CAA A (SEQ ID NO:88)	

ENA-78	5' GGT GAA TTC ATG AGC CTC CTG TCC AGC CG (SEQ ID NO:89)	3' GGT GAA TTC GTT TTC CTT GTT TCC ACC GTC C (SEQ ID NO:90)	
GROgamma	5' GGT GAT ATC ATG GCC CAC GCC ACC CTC TC (SEQ ID NO:91)	3' GGT GAT ATC GTT GGT GCT CCC CTT GTT CAG (SEQ ID NO:92)	
GRObeta	5' GGT GAT ATC ATG GCC CGC GCC ACG CTC TC (SEQ ID NO:93)	3' GGT GAT ATC GTT GGA TTT GCC ATT TTT CAG C (SEQ ID NO:94)	
NAP-2	5' GGT GAT ATC ATG AGC CTC AGA CTT GAT ACC ACC (SEQ ID NO:95)	3' GGT GAT ATC ATC AGC AGA TTC ATC ACC TGC C (SEQ ID NO:96)	
GROalpha	5' GGT GAT ATC ATG GCC CGC GCT GCT CTC TC (SEQ ID NO:97)	3' GGT GAT ATC GTT GGA TTT GTC ACT GTT CAG CAT C (SEQ ID NO:98)	
vMIP	5' GGT GAA TTC ATG GCC CCC GTC CAC GTT TT (SEQ ID NO:99)	3' GGT GAA TTC ATG GAC ACC AAG GGC ATC CT (SEQ ID NO:100)	

【0132】

B. スターク発現カセット

発現ベクター-pcDNA-FRACのポリリンカー領域のEcoR1又はEcoRV部位にC K リガンド・コーディング配列をクローン化した。このベクターは、抗体の繫索及び配列の精製に用いられるmyc エピトープ及びポリヒスチジン・コーディング領域に融合するヒト・フラクタルカイン・スターク・コーディング領域の上流にポリリンカーを含む。このコーディング領域はCMVプロモーターの制御下にある。

【0133】

ベクター-pcDNA3.1(-)/Myc-HisバージョンB (Invitrogen) [以下、「pcDNA3.1」]のEcoRI及びHindIII制限部位にフラクタルカイン・ムチン・スターク・コーディング配列(ヒト・フラクタルカイン(Genebank受付番号U84487)のアミノ酸100ないし336(包括的)に相当)を挿入することによりpcDNA-FRACを構築した。得られたベクター(pcDNA3.1-FRAC)を様々なケモカイン・リガンドの発現に用いた。これは、PCR増幅リガンド配列をこのベクターのスターク・ドメインの上流に、それとイン・フレームで挿入することにより達成した。得られたベクター(及びコードされるタンパク質)は、一般に、「ケモカイン-FRAC」、例えば、「MDC-FRAC」、「TARC-FRAC」等と呼ばれる。

【0134】

pcDNA3.1に由来する多クローン化部位ポリリンカー領域の領域はケモカイン・リガンド・ドメインの最後のアミノ酸とフラクタルカイン・ムチン・スターク領域の最初のアミノ酸（グリシン）との間に存在する。ケモカインをコードするPCR断片をポリリンカーに挿入することでそのコーディング領域がイン・フレームとなり、融合タンパク質の適正な完全長翻訳が生じる。ポリリンカー領域は、ケモカイン・ドメインのクローン化に用いられる制限部位に応じて、様々なアミノ酸をコードする。例えば、EcoR1連結ケモカイン・ドメインをpcDNA3.1-FRACのEcoR1部位にクローン化する場合、リンカー領域は追加アミノ酸グルタメート - フェニルアラニンをコードする。別の例として、EcoRV連結ケモカイン・ドメインをEcoRV部位にクローン化する場合、リンカー領域は追加アミノ酸アラニン - グルタメート - フェニルアラニンをコードする。さらに別の例として、SmaI連結ケモカイン・ドメインをEcoRVドメインに（平滑末端ライゲーションとして）クローン化する場合、リンカー領域は追加アミノ酸アラニン - イソロイシン - プロリン - アラニン - グルタメート - フェニルアラニンをコードする。

【0135】

標準プロトコル及びQiagen精製システムを用いて精製プラスミドをミリグラム量で生成させることで最終的なプラスミドを大量に調製する。プラスミドは10 mM Tris、1 mM EDTA中に20 で保存した。

【0136】

C. 細胞培養物におけるスタルコカインの発現

スタルコカイン合成を、イン・ビトロ細胞培養物において、スタルコカイン発現プラスミドで一時的にトランスフェクトしたHEK293 (ATCC No. CRL-1573) 又は293T (Pear et al, 1993, PNAS 80:8392-6) 細胞株を用いて行った。トランスフェクションに先立ち、これらの細胞株を、抗生物質を含む10% FBSを補足したDMEMにおいて60%集密で成長させた。トランスフェクションの当日、以下のプロトコルによって細胞をトランスフェクトした：

【0137】

細胞をPBSで洗浄した。17 µgのプラスミドDNAを825 µlの「Opti-MEM」還元血清培地 (Life Technologies, Rockville, MD) に再懸濁させた。

Superfect試薬 (Qiagen) をプラスミドに添加して混合し、室温で20分間インキュベートした。次に、それを細胞に添加し、37℃、5%CO₂で3時間インキュベートした。次いで、細胞をPBSで洗浄し、10%FBS及び抗生物質を含む完全DMEM培地を添加した。一晩培養した後、培地を吸引して2.5%FBS及び抗生物質を含むDMEMと置き換えた。

【0138】

24、48、72にトランスフェクトした細胞から上清を回収した。トランスフェクトした培養物に新鮮な培地を補足し、次の回収時間まで上記の通りインキュベートした。上清を遠心してあらゆる培養残滓を除去した後、新鮮な管に移した。アリコートを幾つか作製し、それらのサンプルを必要になるまで-20℃で保存する。幾つかの実験においては、保存に先立ち、プロテアーゼ阻害剤カクテルを清浄化上清に添加した。

【0139】

ポリヒスチジン・アフィニティークロマトグラフィーを用いてスタルコカインの精製を行った。大規模トランスフェクションを行い、培養後の上清を透析してあらゆる小分子混入物を除去した。上清をニッケルカラムに2回通してイミダゾールで溶出し、溶出液をPBSに透析して分析した。通常、意義のある精製が合理的な回収率で達成された。この物質をウェスタン分析によって未精製スタルコカインと比較し、合計タンパク質を決定した。精製した物質は、典型的には、純度50-75%であった。

【0140】

精製は幾つかの理由で有用である：スタルコカインの安定性に対する有害効果を有し得る混入分子を除去し、アッセイにおける等量の物質の容易な比較を可能にし、かつテザード・リガンド・アレーの調製における品質管理を促進する。

【0141】

D. ウェスタンブロット法による発現の監視

融合タンパク質をウェスタンブロット分析によって分析し、融合タンパク質の予想される長さ及びポリヒスチジン・テールの存在（これは、カルボキシ末端が正しい読み取り枠内に存在することを確認する）を確認する。多くの場合、アミ

ノ末端ケモカイン・ドメインも、正しい枠内で作製されるタンパク質とのみ反応するケモカイン特異的抗体を用いて調べるウェスタンブロット分析によって追求する。

【0142】

細胞トランスフェクションの成功はウェスタンブロット法を用いて監視した。典型的には、 $10\ \mu\text{l}$ の上清を還元剤(DTT)を含む変性溶液と混合し、 100 に5分間加熱した。その後、タンパク質サンプルを $10 - 20\%$ アクリルアミドトリシン・ゲル上へのせ、 100V で45分間電気泳動した。ゲルの内容物を、標準移行プロトコルを用いてニトロセルロース膜に移した。移行効率は予め染色した分子量マーカーの移行の完了によって決定した。この膜をTris緩衝生理食塩水、BSA及びTween-20でブロックした。次に、その膜を一次抗体、例えば、抗HIS抗体又はケモカイン・ドメインを認識する抗体と共に1時間インキュベートした。一次抗体を、穏やかに攪拌しながら5分間、TBSで3回連続して洗浄することで洗い流した。その後、膜を一次抗体のFcドメインを認識する二次抗体と共に1時間インキュベートした。この二次抗体には、次の可視化のためのセイヨウワサビペルオキシダーゼ酵素が共有結合している。二次抗体を洗い流した後、可視バンドが生じるまで発色基質DABと共にインキュベートすることによって膜を可視化し、次いで水で洗浄することによって停止させた。図5を参照のこと。

【0143】

E. スタルコカイン活性

発現したスタルコカイン融合タンパク質のケモカイン・モチーフの機能的活性を2つの方法によって評価した：走化性及び標識ケモカインの置換。

【0144】

図6は、放射標識トレーサー・ケモカインのその同族受容体への結合を用いる、スタルコカインによる競合を示す置換アッセイを示す。CCR4を発現するCEM細胞を、Dairaghi et al, 1999, J. Biol. Chem. 274:21569-74に記載されるように、放射標識MDC又はTARCを用いる結合アッセイにおいて用いた。

【0145】

簡単に述べると、CEM細胞を、競合分子、例えば、可溶性MDC-FRAC（フラクタルカイン・スターク及びMDCリガンド・ドメインを有するスタルコカイン）又はTARC-FRAC（フラクタルカイン・スターク及びTARCリガンド・ドメインを有するスタルコカイン）を発現する上清の存在下で放射標識ケモカイン「トレーサー」（MDC又はTARC）に添加した。これらの細胞及びトレーサーをインキュベートして濾過により回収し、結合したトレーサーを捕獲した。その後、その物質をカウントした。「合計」は競合なしに結合するトレーサーの量である。「MDC-SK」は可溶性MDC-FRAC融合タンパク質の存在下における結合の量であり、「TARC-SK」はTARC-FRAC融合タンパク質の存在下における結合の量であり、「ConSup」は対照上清（いかなるスタルコカインをも発現しないCEN細胞からのならし培地）との競合を指し、「MDC-CK」は可溶性MDCケモカインとの競合であり、かつバックグランド結合を示した。

【0146】

明らかのように、実験上清の存在下においてMDC又はTARCトレーサーのいずれかのCEM細胞への結合のかなりの阻害が存在する。この阻害の一部は対照上清中に存在する他の要素によるものであるが、組換えMDC-FRAC又はTARC-FRACに特異的な有意のさらなる減少が存在する。MDC-CK阻害はバックグランド結合及び達成することができる競合の最大レベルを示す。

【0147】

走化性アッセイを、ケモカイン・リガンドの受容体を有することが知られる細胞型に対して行った（Bacon et al, 1988, Br J Pharmacol 95:966-74）。

【0148】

図7は、CEM細胞をINDO-1AM（Molecular Probes, Eugene, OR）と共に「ロード」し、Dairaghi et al, 1997, J. Biol. Chem. 272:28206-209に記載されるカルシウム流動分析に処したアッセイを示す。

【0149】

簡単に述べると、CCR4を発現するCEM細胞を蛍光計に入れ、全時間にわたって蛍光の変化を監視した。CCR4の2種類の天然リガンドはMDC及びT

A R Cである。T A R C - フラクタルカインもしくはM D C - フラクタルカイン（融合タンパク質上清）、又は対照上清を以下の時間で添加した：実験1、対照上清を50秒で、T A R K - F R A Cを80秒で添加した；実験2、対照上清を50秒で、M D C - F R A Cを80秒で添加した。対照上清はいかなるカルシウムの流入も生じなかったが、それに対してT A R C - F R A C又はM D C - F R A Cは適度の流入を生じた。この実験は、ケモカイン・リガンド融合タンパク質がシグナル伝達を生じ得ることを示す。

【0150】

F．固体表面へのスタルコカインの結合

スタルコカインを抗ヒスチジンm A b sへの結合によってガラス及びポリスチレン表面に固定した。ガラス基板は、8ウェル・チャンバ・スライド、又は疎水性テフロン・マスクで印刷してウェルを生成したガラススライドのいずれかのスライドの形態であった。

【0151】

一組の実験においては、P B S中の $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗h i s抗体（R&D Systems、Minneapolis、MN） $250 \mu\text{l}$ を5枚の8ウェル・チャンバ・スライド（Lab-Tek II、Nalge Nunc International、Rochester、NY）の各ウェルに加え、室温で一晩（典型的には16時間）インキュベートした。続いて、各ウェル内の液体を吸引し、 $500 \mu\text{l}$ のP B Sで1回、約5分間洗浄した。その後、それらのウェルを $250 \mu\text{l}$ のブロッキング溶液（2%ウシ胎児血清、P B S中0.5%のB S A）を添加することで「ブロック」（あらゆる追加のタンパク質結合部位をブロック）し、室温（例えば、 20°C ）で1時間インキュベートした。各ウェル内の液体を吸引し、ケモカイン - スターク - 固定化ドメイン融合タンパク質（S D F 1 a - F R A C、フィネタキシ - F R A C、C C L 2 7 - F R A C、I 3 0 9 - F R A C、M I P 3 a - F R A C、E L C - F R A C、S L C - F R A C、M D C - F R A C、T A R C - F R A C、もしくはB R A K - F R A C） $250 \mu\text{l}$ 又は対照上清を2つのウェルに加えた。各スライドは対照上清（偽トランスフェクトした細胞に由来）を有する2つのウェル及び陽性対照S D F 1 a（遍在性ケモカイン受容体C X C R 4を結合する）を有する2つのウェルを含

んでいた。他の4つのウェルは実験サンプル用であった。上清を室温（典型的には20℃）で1時間インキュベートした後、37℃でさらに1時間インキュベートした。上清を吸引し、各ウェルを500µlのPBSで1回、5分間洗浄した。これで、スライドはアッセイのための細胞の添加の準備ができた。

【0152】

2枚の96ウェル大フォーマット・ガラススライドを用いる第2の実験の組においては、PBS中の10µg/ml抗hls抗体（R&D Systems、Minneapolis、MN）50µlを各ウェルに添加し、室温で一晩（典型的には16時間）、加湿チャンバ内でインキュベートした。続いて、各ウェル内の液体を吸引し、500µlのPBSで1回、約5分間洗浄した。その後、それらのウェルを50µlのプロッキング溶液（2%ウシ胎児血清、PBS中0.5%のBSA）を添加することで「ブロック」（あらゆる追加のタンパク質結合部位をブロック）し、室温（20℃）で1時間インキュベートした。各ウェル内の液体を吸引し、図5に示される32のケモカイン-スターク-固定化ドメイン融合タンパク質のうちの1つを含む上清50µlを3つのウェルに加えた。各スライドは対照上清（偽トランスフェクトした細胞に由来）を有する3つのウェル及び陽性対照SDF1a（遍在性ケモカイン受容体CXCR4を結合する）を有する3つのウェルを含んでいた。他のウェルは実験サンプル用であった。上清を室温（典型的には20℃）で1時間、加湿チャンバ内でインキュベートした後、37℃でさらに1時間、こちらも加湿チャンバ内でインキュベートした。上清を吸引し、各ウェルを500µlのPBSで1回、5分間洗浄した。これで、スライドはアッセイのための細胞の添加の準備ができた。

【0153】

G. 細胞培養物におけるケモカイン受容体の発現

関心のある受容体、例えば、CCR1、CCR4、CCR6、CCR7、CCR8、CXCR4、CMV-US28の発現を駆動する哺乳動物発現ベクターを含む、トランスフェクトしたマウス・ミエローマNSO細胞（R&D Systems（Minneapolis、MN）からの贈り物）を含む幾つかの型の細胞を本発明のスタルコカインに対する結合アッセイにおいて用いた。この実験の結果を表6にまとめる。

【0154】

表6

細胞型	幾つかの公知リガンド	スタルコカイン形態への結合
CCR1 - NSO	Ckb8 - 1、MCP3	無、有
CCR4 - NSO	MDC、TARC	有、有
CCR6 - NSO	MIP3a	有
CCR7 - NSO	ELC、SLC	有、無
CCR8 - NSO	1309、vMIP1	有、有
CCR10 - NSO	ELC	有
CXCR4 - NSO	FK、vMIPII	有

*全ての場合において陰性対照（非結合性スタルコカイン）を実施した。

Ckb8 - 1（別名、MPIF1）、ELC（MIP3ベータと同じ）、SLC（6Ckine）。FK = フラクタルカイン

【0155】

H. 受容体発現性細胞及びスタルコカイン・アレーの接触

実験の1つにおいて、CCR1 - NSO細胞を増殖させ、回収し、 2×10^6 細胞/mlでPBSに再懸濁させた。この細胞懸濁液250 μ lを、2つのウェルを前述のようにCKb8 - 1 FRAC、MCP3 - FRAC、SDFIa - FRAC（陽性対照）、又は偽トランスフェクトした上清（陰性対照）の各々でコートした8ウェル・チャンバ・スライドの各ウェルに加えた。これらのスライドを室温で1.5時間インキュベートした後、上清を穏やかに吸引した。（供給者によって提供される装置を用いて）スライドのチャンバ部分を除去し、PBSを収容するペトリ皿に1cmの深さまで穏やかに浸漬することによってスライドを洗浄した。これを合計で3回繰り返し、スライドを1%グルタルアルデヒド溶液（PBS中）に室温で5分間浸漬した。細胞を検査し、顕微鏡によって視認計数した。細胞はMCP3には結合したが、CKb8テザード・リガンドには結合しなかった。

【0156】

I. 置換及び競合分析

実験の1つにおいて、CCR4-NSO細胞を結合競合の試験に用いた。回収したCCR4-NSO細胞をPBS中にml当たり 2×10^6 細胞で再懸濁させた。500 μ lの細胞アリコートのエッペンドルフ管に移し、5 μ gの組換えヒト・ケモカイン(MDC又はTARC、R&D Systems、Minneapolis、MN)を添加し(最終濃度は10 μ g/mlであった)、簡単に混合して室温で10分間インキュベートした。続いて、250 μ lの細胞を、前述のようにMDC-FRAC又はTARC-FRACで予めコートされている8ウェル・チャンバ・スライドの各々2つのウェルに添加した。可溶性ケモカインで前処理していない250 μ lの細胞をさらなるウェルに添加した。これらのスライドを室温で1.5時間インキュベートした後、上清を穏やかに吸引した。(供給者によって提供される装置を用いて)スライドのチャンバ部分を除去し、PBSを収容するペトリ皿に1cmの深さまで穏やかに浸漬することによってスライドを洗浄した。これを合計で3回繰り返し、スライドを1%グルタルアルデヒド溶液(PBS中)に室温で5分間浸漬した。細胞を検査し、顕微鏡によって視認計数した。期待通り、細胞はMDC-FRAC及びTARC-FRACの両者に結合した。期待通り、両方の場合において、可溶性MDC又はTARCとの競合で結合がバックグラウンド・レベルまで減少した。

【0157】

別の実験において、小分子化合物をvMIPII-FRAC及びUS28-NSOの結合に関して試験した。ケモカイン受容体US28とvMIPIIとの結合の阻害剤として従来同定されている3種類の小有機化合物も、本発明を用いて、vMIPII-FRAC及びUS28発現性NSO細胞の間の結合と競合し、かつそれを阻害することが観察された。

【0158】

実施例3

この例は、受容体の結合特異性を決定するための、スタルコカインのアレーへのケモカイン受容体の結合を説明する。

【0159】

ケモカイン要素のパネルへのCCR10の結合を追求するため、テザード・リ

ガンドのアレーを調製する。表5に列挙されるリガンド・ドメインの少なくとも約3つ、少なくとも約5つ、少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20又は全てを用いてp c - F R A Cベースのスタルコカインを調製する。前述のように抗ポリヒスチジン抗体で一晩、予めコートし、1時間ブロックした一対の96ウェル・スライド上にスタルコカインのアレーを調製する。各スタルコカインを3つのウェルに30 μ lの容積で入れ、加湿チャンバ内、37 $^{\circ}$ Cで1.5時間インキュベートする。陰性対照も3通りインキュベートし、これには(1)偽トランスフェクトした上清、(2)固定化スターク領域(ケモカイン・ドメイン無し)、及び(3)PBSが含まれる。(遍在的に発現するケモカイン受容体であるCXCR4に結合する)SDF1 α スタルコカインを陽性対照として用いる。陽性及び陰性対照の組の各々を各プレート上でインキュベートする。

【0160】

上清を吸引し、ウェルをPBSで2回洗浄する。スタルコカインと共にインキュベートする間、CCR10細胞株を調製する。この細胞株を培養フラスコからトリプシン処理し、PBSで2回洗浄する。これらの細胞をPBSのml当たり細胞100万個の濃度で再懸濁させてプレートの各ウェルに添加し、室温で攪拌することなく1.5時間インキュベートする。液滴を部分的に吸引し(表面上に静止する細胞を乱さないよう注意を払いながら、約5 μ lを残す)、PBS(約150ml、深さ1cm)を収容するトレーに徐々に入れた。96ウェルプレートの4端の各々を、3つの連続するウェルの各々の内部の液面まで徐々に持ち上げる。結合した細胞をSybrGreen 1(Molecular Probes、Eugene、OR)で30分間、PBS中に1対5000の希釈率で染色する。96ウェルプレートを取り除き、過剰の液体を排出させ、480nm励起、530nm発光のフィルターセットを有するPackard Fluorescentプレートリーダーにおいてカウントする。さらなる分析のため、これらの結果をExcelファイルに移す。

【0161】

本明細書で引用される全ての参考文献は、個々の刊行物又は特許出願の各々が参照することによりそれらの全体が全ての目的のために組み込まれることが明確に、かつ個別に意図されていたのと同じ程度まで、参照することによりそれら全

体が全ての目的のために本明細書に組み込まれる。

【0162】

当業者には明らかなように、本発明の多くの変形及び変種をその精神及び範囲から逸脱することなくすることができる。本明細書で説明される特定の態様は例としてのみ提供されるものであり、本発明は、請求の範囲の権利が及ぶ等価物の全範囲と共に、添付の請求の範囲の文言によってのみ限定される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、テザード・リガンドの構造を示す。

【図2】

図2は、ヒトCCR10のヌクレオチド配列（配列番号1）及びヒトCCR10ポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図3A】

図3は、スタルコカイン（stalkokaine）への結合によるCCR10の同定を示す。図3AはHEK293-CCR10細胞による固定化スタルコカイン（SK）の追求を示し、ここで、「対照」はスタルコカインを含まないウェルへのHEK293-CCR10細胞のバックグラウンド結合を示し（係留抗体のみが存在する）；「ELC-スタルコカイン（SK）」は係留抗体によって固定されているELC-スタルコカインを含む場所へのHEK293-CCR10細胞の強い結合を示し；「ELC-SK+可溶性ELC」、「可溶性TECK」、又は「可溶性SLC」は過剰濃度の示されるような可溶性組換え「未変性形態」ケモカインの存在下における結合の消失を示し；「ELC-SK+可溶性MCP-3」は多くの非競合性ケモカインの代表としてのMCP-3の存在下において結合の減少がないことを示す。野生型HEK293細胞はいずれの部位への結合も示さなかった（図示せず）。

【図3B】

図3Bは、代表的な実験からの、可溶性ケモカインの存在下及び不在下におけるELC-スタルコカインへのHEK293-CCR10細胞の結合の定量を示す。

【図3C】

図3Cは、濃度が増加する冷ELCの存在下において放射標識ELCを用いる、HEK293-CCR10細胞(黒塗りの四角)又は野生型HEK293細胞(白抜きの四角)のいずれかに対する相同競合結合アッセイの結果を示す。

【図4】

図4は、ELC-スタルコカインをコードする発現プラスミドの模式図を示す。プラスミドの全ての詳細が示されているわけではない(例えば、pA部位、ポリリンカー、Ori、選択マーカーは示されない)。

【図5】

図5は、32の異なるスタルコカインのウェスタンブロット分析を示す。個々のスタルコカイン構築体の各々を293Tにトランスフェクトさせ、スタルコカインを含む上清を電気泳動、次いで抗ポリヒスチジン抗体を用いるウェスタンブロット分析にかけた。各レーンにおいて等容積の上清を分析した。発現レベルはMCP3の場合の強い堆積から低レベルの堆積(IL-8)まで変化した。プロテアーゼ阻害剤を添加することによってスタルコカイン堆積の増強を達成することができる。グリコシル化のため、可溶性スタルコカインの見かけの分子量は典型的な35kDaから約90kDaに増加した。部分的なグリコシル化は中間の分子量を生じ、それはシグナルの非常に広いバンド又はスミアによって示された。MWマーカー=97.4、68、43、29、18.4、14.3kDa。

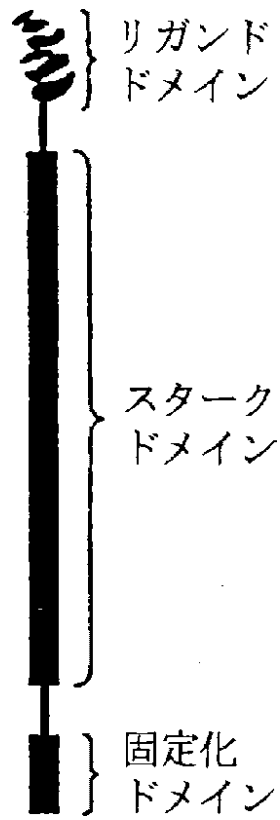
【図6】

図6は、スタルコカインによる、放射標識トレーサー・ケモカインのその同族受容体への結合での競合示す置換アッセイを示す。

【図7】

図7は、受容体依存様式でのカルシウム・シグナル伝達の誘導を示す、TARCC-スタルコカイン又はMDC-スタルコカインと接触させたCCR4受容体を発現するCEM細胞を用いるカルシウム代謝アッセイを示す。

【図1】

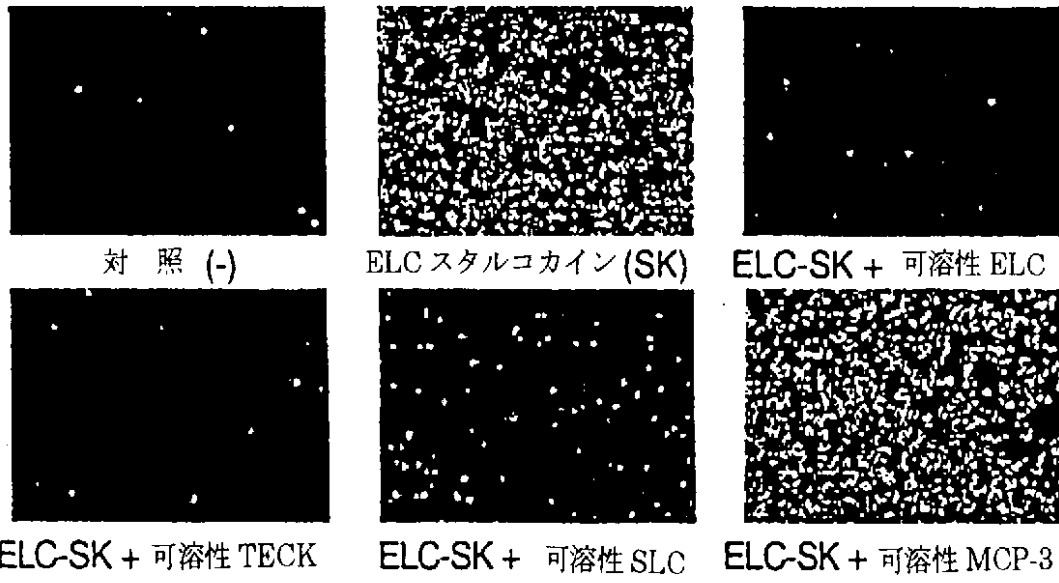


【 2 】

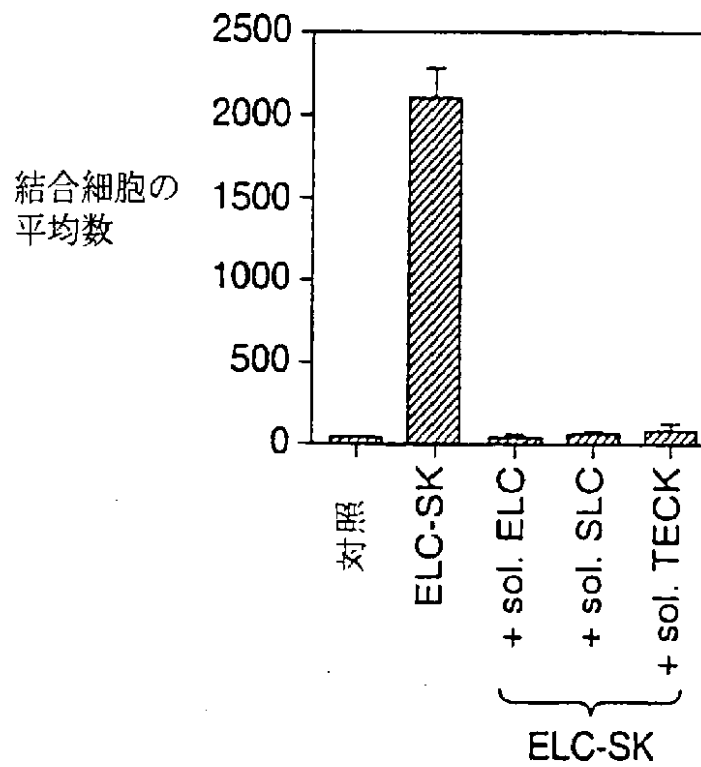
10 20 30 40 50 60 70 80 90
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
ATGCTGTTGCG AACGACGACA GTCGACGACGAT TGTGACGACGAT AGTACGACGAT AGTACGACGAT TGTGACGACGAT
M A L E Q N Q S T D Y Y Y B E N E H N G T Y D Y S Q Y E L I
180
TGTGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
C I K B D V R E F A K V F L P V F L T I V P V I G L A Q N S
270
ATGCTGTTGCG AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
M V V A I Y A Y Y K K Q R T K T D V Y I L N L A V A D L L L
360
GTCGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
L F T L P F W A V N A V H G W V L G K I H C K I T S A L Y T
450
GTCGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
L N F V S G M Q P L A C I S I D R Y V A V T K V P S Q S G V
540
GTCGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
G K P C W I I C P C V W M A A I L L S I P Q L V P Y T V N D
630
AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
N A R C I P I F P R Y L G T S M K A L I Q M L E I C I G F V
720
GTCGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
V P F L I H G V C Y F I T A R T L M K M P N I K I S R P L K
810
GTCGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
V L L T V V I V P I V T Q L P Y N I V K P C K A I D I I Y S
900
GTCGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
L I T S C N M S K R H D I A I Q V T E S I A L F H S C L N P
990
AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
I L Y V F M Q A S F K N Y V M K V A K K Y G S W R R Q R Q S
1080
GTCGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC
V E E F P F D S E G E T E P T S T F S I
1147
GTCGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC AACGACGACGAC

(SEQ. ID NO: 1 & 2)

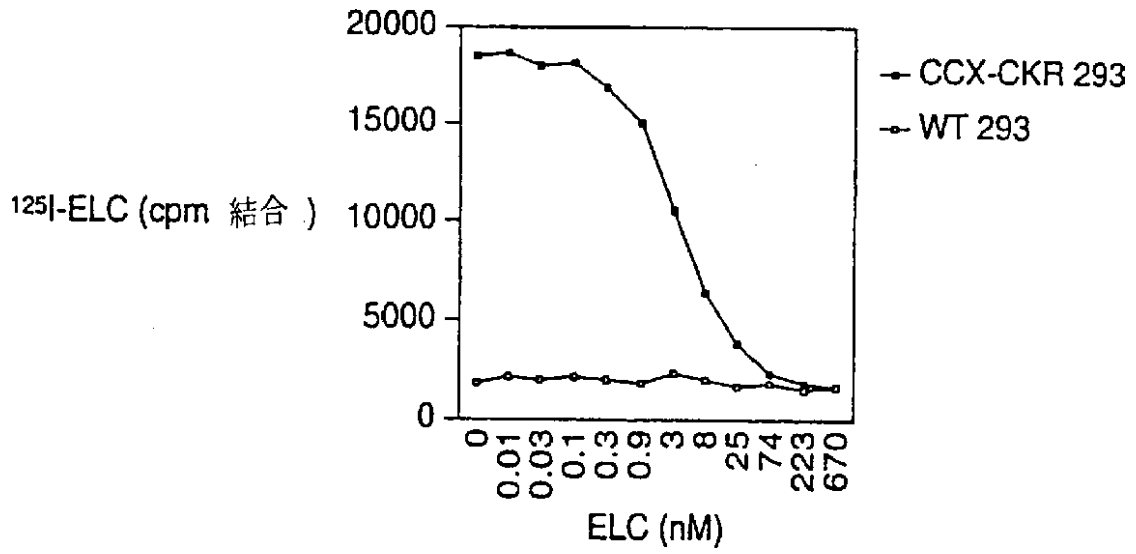
【図3A】



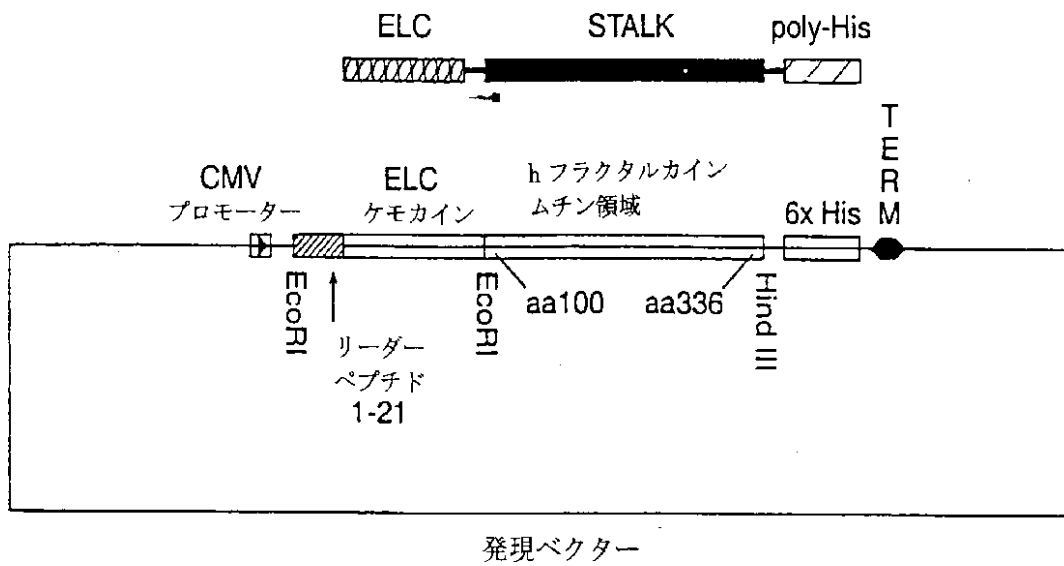
【図3B】



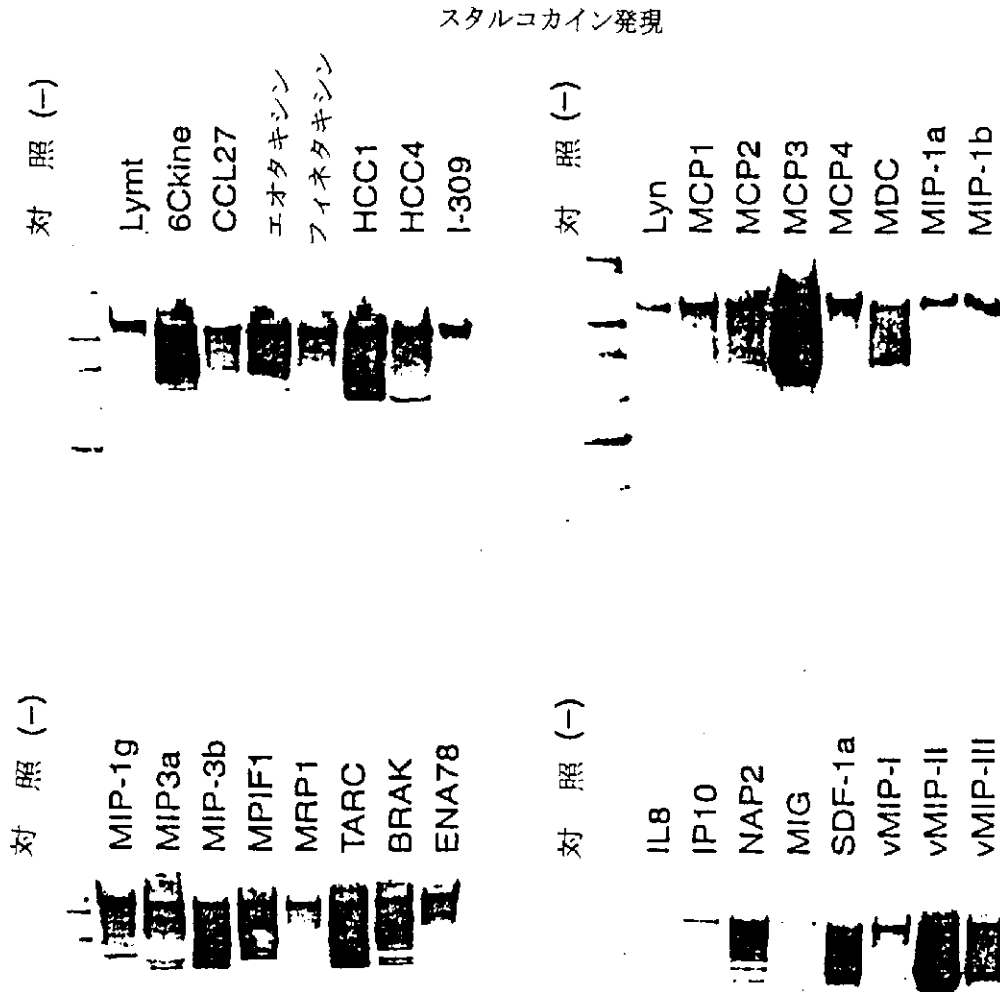
【図3C】



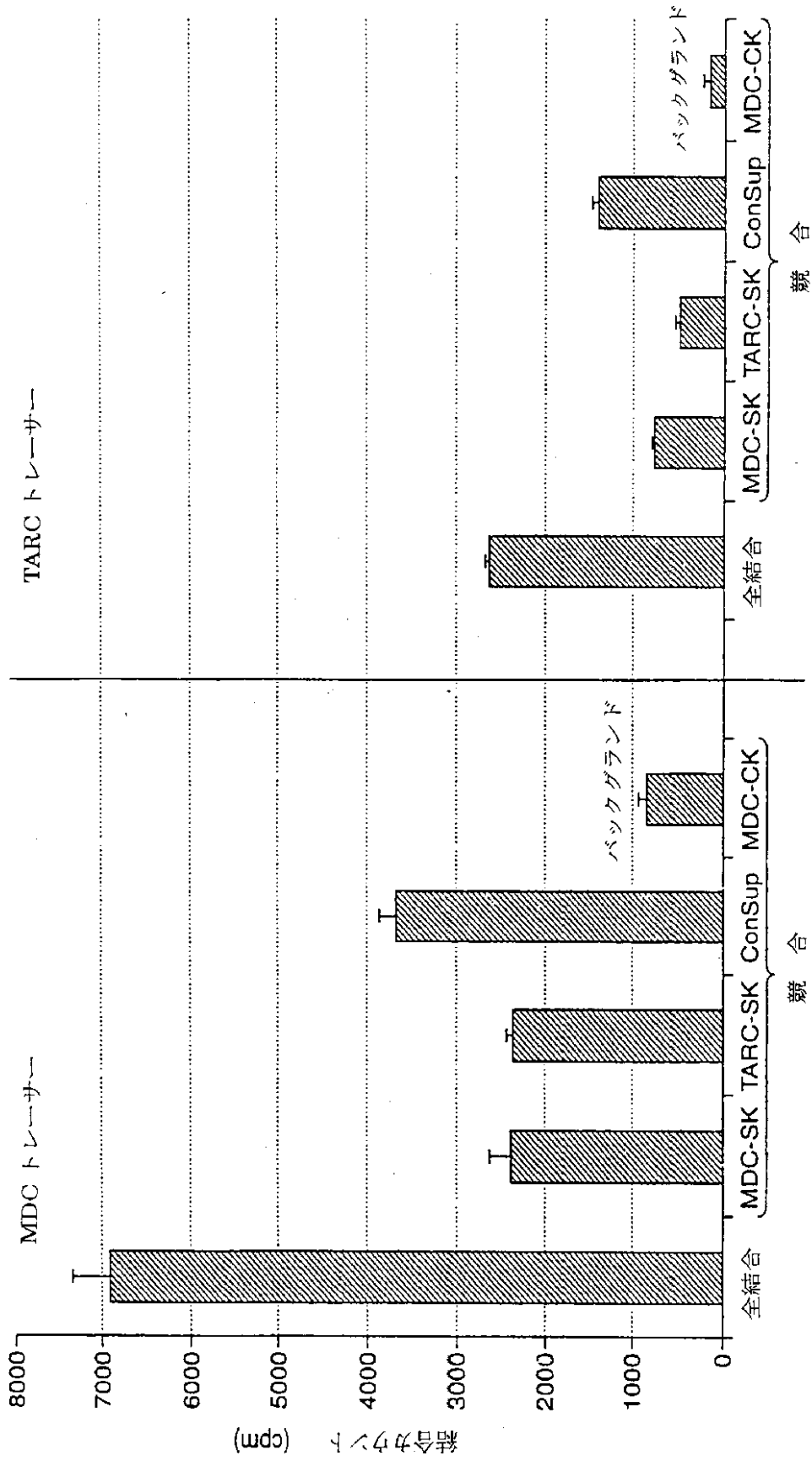
【図4】



【図5】



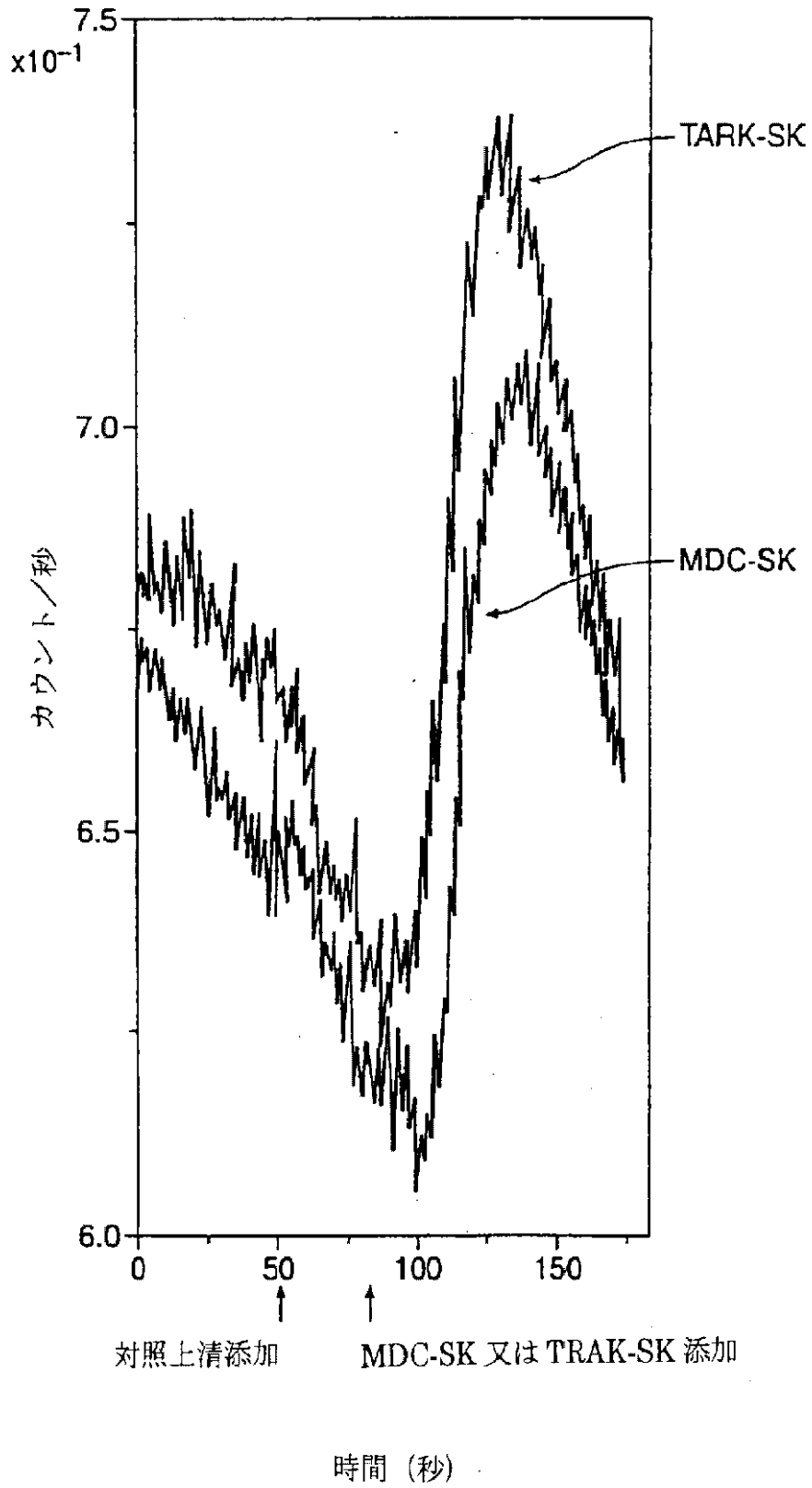
【図6】



条件

図6

【図7】



【手続補正書】**【提出日】**平成14年7月8日(2002.7.8)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0062**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0062】**

テザード・リガンド融合タンパク質が酵母において発現する場合、プラスミド及び酵母人工染色体(YAC)ベクターを含む多くの適切なベクターが利用可能である。ベクターは、典型的には、記述されるように、発現制御配列、例えば、構成もしくは誘導性プロモーター(例えば、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、PGH、及び3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖酵素)、並びに複製起点、終止配列等を含む。ピッチア(Pichia)において用いるのに適するベクターには、pPICZ、His6/pPICZB、pPICZalpha、pPIC3,5K、pPIC9K、pA0815、pGAP2A、B及びC、pGAP2alphaA、B、及びC(Invitrogen、San Diego、CA)並びに当該技術分野において公知であるか、又は開発される多くの他のものが含まれる。一態様においては、ベクターHis6/pPICZB(Invitrogen、San Diego、CA)を酵母ピッチア・パストリス(Pichia pastoris)におけるHis6(SEQ ID No: 101)-テザード・リガンド融合タンパク質の発現に用いる。サッカロミセス属において有用なベクターの例はpYES2(Invitrogen、San Diego、CA)である。

【手続補正2】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0066**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0066】**

(4)分泌されたテザード・リガンド融合タンパク質を細胞培地から精製することが時折望ましいものであり、一般には、非分泌タンパク質は使用前に精製す

る必要がある。精製は様々な方法を用いて行うことができ、この方法には、例えば、ポリヒスチジン・トラクト (tract) (例えば、His₆; SEQ ID No: 101) を含む癒合タンパク質の金属キレート・アフィニティクロマトグラフィー、プロテインAドメインもしくは断片 (これは、固定化免疫グロブリンでの精製を可能にする)、及びFLAG伸長/アフィニティ精製システム (Immunex Corp, Seattle, WA) において用いられるドメインが含まれる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、テザード・リガンドの構造を示す。

【図2】

図2は、ヒトCCR10のヌクレオチド配列 (配列番号1) 及びヒトCCR10ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号2) を示す。

【図3A】

図3は、スタルコカイン (stalkokaine) への結合によるCCR10の同定を示す。図3AはHEK293-CCR10細胞による固定化スタルコカイン (SK) の追求を示し、ここで、「対照」はスタルコカインを含まないウェルへのHEK293-CCR10細胞のバックグラウンド結合を示し (係留抗体のみが存在する); 「ELC-スタルコカイン (SK)」は係留抗体によって固定されているELC-スタルコカインを含む場所へのHEK293-CCR10細胞の強い結合を示し; 「ELC-SK+可溶性ELC」、「可溶性TECK」、又は「可溶性SLC」は過剰濃度の示されるような可溶性組換え「未変性形態」ケモカインの存在下における結合の消失を示し; 「ELC-SK+可溶性MCP-3」は多くの非競合性ケモカインの代表としてのMCP-3の存在下において結合の減少がないことを示す。野生型HEK293細胞はいずれの部位への結合も示さな

かった(図示せず)。

【図3B】

図3Bは、代表的な実験からの、可溶性ケモカインの存在下及び不在下におけるELC-スタルコカインへのHEK293-CCR10細胞の結合の定量を示す。

【図3C】

図3Cは、濃度が増加する冷ELCの存在下において放射標識ELCを用いる、HEK293-CCR10細胞(黒塗りの四角)又は野生型HEK293細胞(白抜きの四角)のいずれかに対する相同競合結合アッセイの結果を示す。

【図4】

図4は、ELC-スタルコカインをコードする発現プラスミドの模式図を示す。プラスミドの全ての詳細が示されているわけではない(例えば、pA部位、ポリリンカー、Ori、選択マーカーは示されない)。6xHis=SEQ ID No: 101.

【図5】

図5は、32の異なるスタルコカインのウェスタンブロット分析を示す。個々のスタルコカイン構築体の各々を293Tにトランスフェクトさせ、スタルコカインを含む上清を電気泳動、次いで抗ポリヒスチジン抗体を用いるウェスタンブロット分析にかけた。各レーンにおいて等容積の上清を分析した。発現レベルはMCP3の場合の強い堆積から低レベルの堆積(IL-8)まで変化した。プロテアーゼ阻害剤を添加することによってスタルコカイン堆積の増強を達成することができる。グリコシル化のため、可溶性スタルコカインの見かけの分子量は典型的な35kDaから約90kDaに増加した。部分的なグリコシル化は中間の分子量を生じ、それはシグナルの非常に広いバンド又はスメアによって示された。MWマーカー=97.4、68、43、29、18.4、14.3kDa。

【図6】

図6は、スタルコカインによる、放射標識トレーサー・ケモカインのその同族受容体への結合での競合示す置換アッセイを示す。

【図7】

図7は、受容体依存様式でのカルシウム・シグナル伝達の誘導を示す、TAR C - スタルコカイン又はMDC - スタルコカインと接触させたCCR4受容体を発現するCEM細胞を用いるカルシウム代謝アッセイを示す。

【手続補正書】

【提出日】平成15年1月31日(2003.1.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0162

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0162】

当業者には明らかなように、本発明の多くの変形及び変種をその精神及び範囲から逸脱することなくすることができる。本明細書で説明される特定の態様は例としてのみ提供されるものであり、本発明は、請求の範囲の権利が及ぶ等価物の全範囲と共に、添付の請求の範囲の文言によってのみ限定される。

「配列表」

SEQUENCE LISTING

<110> Schall, Thomas J.

Talbot, Dale

Miao, Zhenhua

Wei, Zheng

ChemoCentryx, Inc.

<120> Tethered Ligands and Methods of Use

<130> 019934-001210PC

<140> WO PCT/US00/34503

<141> 2000-12-18

<150> US 60/172,979

<151> 1999-12-20

<150> US 60/186,626

<151> 2000-03-03

<150> US 09/721,908

<151> 2000-11-24

<160> 101

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1147

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> nucleotide sequence for human CCR10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1053)

<400> 1

```

atg gct ttg gaa cag aac cag tca aca gat tat tat tat gag gaa aat 48
Met Ala Leu Glu Gln Asn Gln Ser Thr Asp Tyr Tyr Tyr Glu Glu Asn
  1           5           10           15
gaa atg aat ggc act tat gac tac agt caa tat gaa ctg atc tgt atc 96
Glu Met Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Ser Gln Tyr Glu Leu Ile Cys Ile
          20           25           30
aaa gaa gat gtc aga gaa ttt gca aaa gtt ttc ctc cct gta ttc ctc 144
Lys Glu Asp Val Arg Glu Phe Ala Lys Val Phe Leu Pro Val Phe Leu
          35           40           45
aca ata gtt ttc gtc att gga ctt gca ggc aat tcc atg gta gtg gca 192
Thr Ile Val Phe Val Ile Gly Leu Ala Gly Asn Ser Met Val Val Ala
          50           55           60
att tat gcc tat tac aag aaa cag aga acc aaa aca gat gtg tac atc 240
Ile Tyr Ala Tyr Tyr Lys Lys Gln Arg Thr Lys Thr Asp Val Tyr Ile
          65           70           75           80
ctg aat ttg gct gta gca gat tta ctc ctt cta ttc act ctg cct ttt 288
Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Leu Leu Phe Thr Leu Pro Phe

```

	85	90	95	
tgg gct gtt aat gca gtt cat ggg tgg gtt tta ggg aaa ata atg tgc				336
Trp Ala Val Asn Ala Val His Gly Trp Val Leu Gly Lys Ile Met Cys				
	100	105	110	
aaa ata act tca gcc ttg tac aca cta aac ttt gtc tct gga atg cag				384
Lys Ile Thr Ser Ala Leu Tyr Thr Leu Asn Phe Val Ser Gly Met Gln				
	115	120	125	
ttt ctg gct tgt atc agc ata gac aga tat gtg gca gta act aaa gtc				432
Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Val Ala Val Thr Lys Val				
	130	135	140	
ccc agc caa tca gga gtg gga aaa cca tgc tgg atc atc tgt ttc tgt				480
Pro Ser Gln Ser Gly Val Gly Lys Pro Cys Trp Ile Ile Cys Phe Cys				
	145	150	155	160
gtc tgg atg gct gcc atc ttg ctg agc ata ccc cag ctg gtt ttt tat				528
Val Trp Met Ala Ala Ile Leu Leu Ser Ile Pro Gln Leu Val Phe Tyr				
	165	170	175	
aca gta aat gac aat gct agg tgc att ccc att ttc ccc cgc tac cta				576
Thr Val Asn Asp Asn Ala Arg Cys Ile Pro Ile Phe Pro Arg Tyr Leu				
	180	185	190	
gga aca tca atg aaa gca ttg att caa atg cta gag atc tgc att gga				624
Gly Thr Ser Met Lys Ala Leu Ile Gln Met Leu Glu Ile Cys Ile Gly				
	195	200	205	
ttt gta gta ccc ttt ctt att atg ggg gtg tgc tac ttt atc aca gca				672
Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Met Gly Val Cys Tyr Phe Ile Thr Ala				
	210	215	220	
agg aca ctc atg aag atg cca aac att aaa ata tct cga ccc cta aaa				720
Arg Thr Leu Met Lys Met Pro Asn Ile Lys Ile Ser Arg Pro Leu Lys				
	225	230	235	240
gtt ctg ctc aca gtc gtt ata gtt ttc att gtc act caa ctg cct tat				768

Val Leu Leu Thr Val Val Ile Val Phe Ile Val Thr Gln Leu Pro Tyr
 245 250 255
 aac att gtc aag ttc tgc cga gcc ata gac atc atc tac tcc ctg atc 816
 Asn Ile Val Lys Phe Cys Arg Ala Ile Asp Ile Ile Tyr Ser Leu Ile
 260 265 270
 acc agc tgc aac atg agc aaa cgc atg gac atc gcc atc caa gtc aca 864
 Thr Ser Cys Asn Met Ser Lys Arg Met Asp Ile Ala Ile Gln Val Thr
 275 280 285
 gaa agc atc gca ctc ttt cac agc tgc ctc aac cca atc ctt tat gtt 912
 Glu Ser Ile Ala Leu Phe His Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Val
 290 295 300
 ttt atg gga gca tct ttc aaa aac tac gtt atg aaa gtg gcc aag aaa 960
 Phe Met Gly Ala Ser Phe Lys Asn Tyr Val Met Lys Val Ala Lys Lys
 305 310 315 320
 tat ggg tcc tgg aga aga cag aga caa agt gtg gag gag ttt cct ttt 1008
 Tyr Gly Ser Trp Arg Arg Gln Arg Gln Ser Val Glu Glu Phe Pro Phe
 325 330 335
 gat tct gag ggt cct aca gag cca acc agt act ttt agc att taa 1053
 Asp Ser Glu Gly Pro Thr Glu Pro Thr Ser Thr Phe Ser Ile
 340 345 350
 aggtaaaact gctctgcctt ttgcttggat acatatgaat gatgccttcc cctcaaata 1113
 aacatctgcc ttattctgaa aaaaaaaaaa aaam 1147

<210> 2

<211> 350

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> human CCR10

<400> 2

Met Ala Leu Glu Gln Asn Gln Ser Thr Asp Tyr Tyr Tyr Glu Glu Asn
 1 5 10 15
 Glu Met Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Ser Gln Tyr Glu Leu Ile Cys Ile
 20 25 30
 Lys Glu Asp Val Arg Glu Phe Ala Lys Val Phe Leu Pro Val Phe Leu
 35 40 45
 Thr Ile Val Phe Val Ile Gly Leu Ala Gly Asn Ser Met Val Val Ala
 50 55 60
 Ile Tyr Ala Tyr Tyr Lys Lys Gln Arg Thr Lys Thr Asp Val Tyr Ile
 65 70 75 80
 Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Leu Leu Phe Thr Leu Pro Phe
 85 90 95
 Trp Ala Val Asn Ala Val His Gly Trp Val Leu Gly Lys Ile Met Cys
 100 105 110
 Lys Ile Thr Ser Ala Leu Tyr Thr Leu Asn Phe Val Ser Gly Met Gln
 115 120 125
 Phe Leu Ala Cys Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Val Ala Val Thr Lys Val
 130 135 140
 Pro Ser Gln Ser Gly Val Gly Lys Pro Cys Trp Ile Ile Cys Phe Cys
 145 150 155 160
 Val Trp Met Ala Ala Ile Leu Leu Ser Ile Pro Gln Leu Val Phe Tyr
 165 170 175
 Thr Val Asn Asp Asn Ala Arg Cys Ile Pro Ile Phe Pro Arg Tyr Leu
 180 185 190
 Gly Thr Ser Met Lys Ala Leu Ile Gln Met Leu Glu Ile Cys Ile Gly
 195 200 205
 Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Met Gly Val Cys Tyr Phe Ile Thr Ala
 210 215 220
 Arg Thr Leu Met Lys Met Pro Asn Ile Lys Ile Ser Arg Pro Leu Lys

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Fractalkine Mucin-Repeat Sequence Residues 100-336

<400> 4

Gly Gly Thr Phe Glu Lys Gln Ile Gly Glu Val Lys Pro Arg Thr Thr

1 5 10 15

Pro Ala Ala Gly Gly Met Asp Glu Ser Val Val Leu Glu Pro Glu Ala

20 25 30

Thr Gly Glu Ser Ser Ser Leu Glu Pro Thr Pro Ser Ser Gln Glu Ala

35 40 45

Gln Arg Ala Leu Gly Thr Ser Pro Glu Leu Pro Thr Gly Val Thr Gly

50 55 60

Ser Ser Gly Thr Arg Leu Pro Pro Thr Pro Lys Ala Gln Asp Gly Gly

65 70 75 80

Pro Val Gly Thr Glu Leu Phe Arg Val Pro Pro Val Ser Thr Ala Ala

85 90 95

Thr Trp Gln Ser Ser Ala Pro His Gln Pro Gly Pro Ser Leu Trp Ala

100 105 110

Glu Ala Lys Thr Ser Glu Ala Pro Ser Thr Gln Asp Pro Ser Thr Gln

115 120 125

Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro Ala Pro Glu Glu Asn Ala Pro Ser Glu

130 135 140

Gly Gln Arg Val Trp Gly Gln Gly Gln Ser Pro Arg Pro Glu Asn Ser

145 150 155 160

Leu Glu Arg Glu Glu Met Gly Pro Val Pro Ala His Thr Asp Ala Phe

165 170 175

Gln Asp Trp Gly Pro Gly Ser Met Ala His Val Ser Val Val Pro Val

180 185 190

Ser Ser Glu Gly Thr Pro Ser Arg Glu Pro Val Ala Ser Gly Ser Trp

	195		200		205										
Thr	Pro	Lys	Ala	Glu	Glu	Pro	Ile	His	Ala	Thr	Met	Asp	Pro	Gln	Arg
	210		215		220										
Leu	Gly	Val	Leu	Ile	Thr	Pro	Val	Pro	Asp	Ala	Gln	Ala			
225			230		235										

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 5

Ile	Gly	Glu	Val	Lys	Pro	Arg	Thr	Thr	Pro
1			5						10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 6

Gly	Gly	Met	Asp	Glu	Ser	Val	Val	Leu	Glu	Pro
1				5						10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 7

Thr Gly Glu Ser Ser Ser Leu Glu Pro Thr Pro

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 8

Leu Gly Thr Ser Pro Glu Leu Pro Thr Gly

1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 9

Thr Gly Ser Ser Gly Thr Arg Leu Pro Pro Thr Pro

1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 10

Val Gly Thr Glu Leu Phe Arg Val Pro Pro Val Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 11

Ala Ala Thr Trp Gln Ser Ser Ala Pro His Gln

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 12

Pro Gly Pro Ser Leu Trp Ala Glu Ala Lys Thr Ser

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 13

Glu Ala Pro Ser Thr Gln Asp Pro Ser Thr

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 14

Gln Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro Ala Pro

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 15

Val Trp Gly Gln Gly Gln Ser Pro Arg Pro

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 16

Ser Leu Glu Arg Glu Glu Met Gly Pro Val Pro

1

5

10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<220>

<223> Mucin Repeat Domain

<400> 17

Ala His Thr Asp Ala Phe Gln Asp Trp Gly

1

5

10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 18

Pro Gly Ser Met Ala His Val Ser Val Val Pro

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 19

Glu Gly Thr Pro Ser Arg Glu Pro Val Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 20

Ser Gly Ser Trp Thr Pro Lys Ala Glu Glu Pro

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mucin repeat domain

<400> 21

Gln Arg Leu Gly Val Leu Ile Thr Pro Val Pro

1 5 10

<210> 22

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:influenza virus
neuraminidase protein hypervariable stalk region

<400> 22

His Phe Lys Gln Tyr Glu Cys Ser Ser Pro Pro Asn Asn Gln Val Ile

1 5 10 15

Pro Cys Gln Pro Thr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Thr Glu Ile Val Tyr

20 25 30

Leu Thr Asn Thr Thr Ile Glu Lys Glu Ile Cys Pro Lys Leu Val Glu

35 40 45

Tyr Arg Asn Trp Ser Lys Pro

50 55

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MDC forward primer

<400> 23

ggagaattca tggctcgctt acagactgc

<210> 24

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MDC reverse primer

<400> 24

ggtgaattct tggctcagct tattgagaat ca 32

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HCC1 forward primer

<400> 25

ggtgaattca tgaagatctc cgtggctgcc 30

<210> 26

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HCC1 reverse primer

<400> 26

ggtgaattcg ttctccttca tgccttgat atag 34

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SLC forward primer

<400> 27

ggtgaattca tggctcagtc actggctctg

30

<210> 28

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SLC reverse primer

<400> 28

ggtgaattct ggccctttag gggctctgtg

29

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIG forward primer

<400> 29

ggtgaattca tgaagaaaag tgggtgttctt ttcc

34

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIG reverse primer

<400> 30

ggtgaattct gtagtcttct ttgacgaga acg 33

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:IP10 forward primer

<400> 31

ggtgaattca tgaatcaaac tgcgattctg a 31

<210> 32

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:IP10 reverse primer

<400> 32

ggtgaattca ggagatcttt tagacatttc cttg 34

<210> 33

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

- <223> Description of Artificial Sequence:H174/I-TAC forward primer
<400> 33
gtggaattca tgagtgtgaa gggcatggc 29
- <210> 34
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:H174/I-TAC reverse primer
<400> 34
ggtgaattca aaattctttc tttcaacttt tttga 35
- <210> 35
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Eotaxin1 forward primer
<400> 35
ggtgaattca tgaaggtctc cgcagcactt c 31
- <210> 36
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Eotaxin 1 reverse primer
<400> 36

ggagaattct ggctttggag ttggagattt ttg 33

<210> 37

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:TARC forward primer

<400> 37

ggagaattca tggccccact gaagatgct 29

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:TARC reverse primer

<400> 38

ggagaattca gacctctcaa ggctttgcag 30

<210> 39

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIP3alpha forward primer

<400> 39

ggagaattca tgtgctgtac caagagtttg c 31

<210> 40

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIP3alpha reverse primer

<400> 40

ggtgaattcc atgttcttga ctttttact gagg 34

<210> 41

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:ELC forward primer

<400> 41

ggtgaattca tggccctgct actggccct 29

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:ELC reverse primer

<400> 42

ggtgaattca ctgctgcggc gcttcatct 29

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:TECK forward primer

<400> 43

ggtgaattca tgaacctgtg gctcctggc 29

<210> 44

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:TECK reverse primer

<400> 44

ggtgaattcc agtcctgaat tagctgatat cag 33

<210> 45

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PARC forward primer

<400> 45

ggtgaattca tgaaggcct tgcagctgc 29

<210> 46

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PARC reverse primer

<400> 46

ggtgaattcg gcattcagct tcaggtcgc 29

<210> 47

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SLC forward primer

<400> 47

ggtgaattca tggctcagtc actggctctg 30

<210> 48

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SLC reverse primer

<400> 48

ggtgaattct ggcccttag gggctctgtg 29

<210> 49

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:I309 forward primer

<400> 49

ggtgaattca tgcagatcat caccacagcc c

31

<210> 50

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: I309 reverse primer

<400> 50

ggtgaattct tttctttttg acgggcagtg c

31

<210> 51

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MIP1alpha forward primer

<400> 51

ggtgaattca tgcaggtctc cactgctgc

29

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MIP1alpha reverse primer

<400> 52

ggtgaattcg gcactcagct ctaggtcgct

30

<210> 53

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MCP-4 forward primer

<400> 53

ggtgaattca tgaagtctc tgcagtgctt ctg 33

<210> 54

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MCP-4 reverse primer

<400> 54

ggtgaattca gtcttcaggg tgtgagcttt cc 32

<210> 55

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MCP1 forward primer

<400> 55

ggtgaattca tgaagtctc tgccgccctt 30

<210> 56

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MCP1 reverse primer

<400> 56

ggtgaattca gtcttcggag tttgggttg c

31

<210> 57

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MCP2 forward primer

<400> 57

ggtgaattca tgaaggttc tgcagcgct

29

<210> 58

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MCP2 reverse primer

<400> 58

ggtgaattct ggcttcagat tttgaaatat ttg

33

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SDF1a forward primer

<400> 59

ggtgaattca tgaacgcca ggtcgtgg

28

<210> 60

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SDF1a reverse primer

<400> 60

ggtgaattcc ttgtttaag ctttctccag gt

32

<210> 61

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MCP5 forward primer

<400> 61

ggtgatatca tgaagatttc cacacttcta tgcc

34

<210> 62

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MCP5 reverse primer

<400> 62

ggtgatatcg cctagacatg aaggttcaag gatg 34

<210> 63

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HCC2 forward primer

<400> 63

ggngaattca tgaaggtctc cgtggctgc 29

<210> 64

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HCC2 reverse primer

<400> 64

ggngaattct attgagtagg gcttcagctt t 31

<210> 65

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Clone 391 forward primer

<400> 65

ggagaattca tgaaggtcctt ctccttggtc atg 33

<210> 66

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Clone 391 reverse primer

<400> 66

ggagaattcc gttgaggtgt tgctcagctt c 31

<210> 67

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:BCA1 forward primer

<400> 67

ggatgatca tgaagtcac tcgacatctc tg 32

<210> 68

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:BCA1 reverse primer

<400> 68

ggatgatcgg ggaatctttc tcttaaacc tgg 33

<210> 69

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PF4a forward primer

<400> 69

ggtgaattca tgagctccgc agccgggttc

30

<210> 70

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PF4a reverse primer

<400> 70

ggtgaattca ctctcaaaa gtttcttaat ttttt

36

<210> 71

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PBP-like1 forward primer

<400> 71

ggtgaattca tgccaccctg cagctgtg

28

<210> 72

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PBP-like 1 reverse primer

<400> 72

ggtgaattct aaagccattg tgaatatgat ctg 33

<210> 73

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Eotaxin 2 forward primer

<400> 73

ggtcccggga tggcaggcct gatgacat 29

<210> 74

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Eotaxin 2 reverse primer

<400> 74

ggtcccgggg caggtggttt ggttgccag 29

<210> 75

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIP1beta forward primer

<400> 75

ggtgaatcca tgaagctctg cgtgactgtc c 31

<210> 76

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIP1beta reverse primer

<400> 76

ggtgaattcg ttcagttcca ggtcatacac gta 33

<210> 77

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIP-3 forward primer

<400> 77

ggtgaattca tgaaggtctc cgtggctgc 29

<210> 78

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIP-3 reverse primer

<400> 78

ggtgaattca ttcttcctgg tcttgatccg t

31

<210> 79

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MRP-1 forward primer

<400> 79

ggtgaattca tgagaaactc caagactgcc a

31

<210> 80

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MRP-1 reverse primer

<400> 80

ggtgaattca gcaatgacct tgttcccaga t

31

<210> 81

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Lymphotactin (LYNT)
forward primer

<400> 81

ggagaattca tgatacttct catcctggcc c

31

<210> 82

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Lymphotactin (LYNT)
reverse primer

<400> 82

ggagaattcg ccagtcaggg tcacagctg

29

<210> 83

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HCC4 forward primer

<400> 83

ggagaattca tgaaggtctc cgaggctgc

29

<210> 84

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HCC4 reverse primer

<400> 84

ggagaattcc tgggagttga ggagctggg

29

<210> 85

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIP-1gamma forward primer

<400> 85

ggtgaattca tgaagccttt tcatactgcc c 31

<210> 86

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:MIP-1gamma reverse primer

<400> 86

ggtgaattct tgtttgtagg tccgtggtg t 31

<210> 87

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:IL-8 forward primer

<400> 87

ggtgatatca tgacttcaa gctggccg 28

<210> 88

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:IL-8 reverse primer

<400> 88

ggtgatatct gaattctcag ccctcttcaa a

31

<210> 89

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:ENA-78 forward primer

<400> 89

ggtgaattca tgagcctcct gtccagccg

29

<210> 90

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:ENA-78 reverse primer

<400> 90

ggtgaattcg ttttccttgt ttccaccgtc c

31

<210> 91

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GROgamma forward primer

<400> 91

ggtgatatca tggcccacgc cacgctctc 29

<210> 92

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GROgamma reverse primer

<400> 92

ggtgatatcg ttggtgctcc ccttggtcag 30

<210> 93

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GRObeta forward primer

<400> 93

ggtgatatca tggcccgcgc cacgctctc 29

<210> 94

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

- <223> Description of Artificial Sequence:GRObeta reverse primer
<400> 94
ggtgatatcg ttggatttgc catttttcag c 31
- <210> 95
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:NAP-2 forward primer
<400> 95
ggtgatatca tgagcctcag acttgatacc acc 33
- <210> 96
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:NAP-2 reverse primer
<400> 96
ggtgatatca tcagcagatt catcacctgc c 31
- <210> 97
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:GROalpha forward primer
<400> 97

ggtgatatca tggcccgcgc tgctctctc

29

<210> 98

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GROalpha reverse primer

<400> 98

ggtgatatcg ttggatttgt cactgttcag catc

34

<210> 99

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vMIP forward primer

<400> 99

ggtgaattca tggcccccggt ccacgtttt

29

<210> 100

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vMIP reverse primer

<400> 100

ggtgaattca tggacaccaa gggcatcct

29

<210> 101

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:6XHis, His-6
polyhistidine tract

<400> 101

His His His His His His

1

5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/34503

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C12N15/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEN J ET AL: "TETHERED LIGAND LIBRARY FOR DISCOVERY OF PEPTIDE AGONISTS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 270, no. 40, 6 October 1995 (1995-10-06), pages 23398-23401, XP002910821 ISSN: 0021-9258 abstract; figure 1 ---	1-23, 36-45
Y	DOORBAR, J. AND WINTER G.: "Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display." J. MOL. BIOL., vol. 244, 1994, pages 361-369, XP001000952 page 363, column 2 --- ---	1-23, 36-45
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 July 2001		Date of mailing of the international search report 19. 10. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hardon, E

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/34503
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHAN PO-YING ET AL: "VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 33, 1993, pages 24655-24664, XP000999393 ISSN: 0021-9258 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-23, 36-45
Y	<p>WO 98 49557 A (ELLIS WALTHER; B E SAFE INC (US); POWERS LINDA (US)) 5 November 1998 (1998-11-05) page 15, line 15 - line 19; claim 12</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-23, 36-45
Y	<p>WO 97 17375 A (CHIRON DIAGNOSTICS CORP; PIRAN URI (US); CHANG STEVE C S (US); RIO) 15 May 1997 (1997-05-15) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-23, 36-45
Y	<p>EP 0 626 450 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 30 November 1994 (1994-11-30) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-23, 36-45
Y	<p>WO 97 27299 A (SCHERING CORP) 31 July 1997 (1997-07-31) cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-23, 36-45
Y	<p>WO 94 19694 A (JOHNSON CHARLES R; SHOEMAKER KEVIN R (US); CASS ROBERT T (US); GIE) 1 September 1994 (1994-09-01) abstract; claims 1,2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-23, 36-45
Y	<p>US 5 817 527 A (RIORDAN WILLIAM J ET AL) 6 October 1998 (1998-10-06) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-23, 36-45
Y	<p>BAZAN J F ET AL: "A NEW CLASS OF MEMBRANE-BOUNDED CHEMOKINE WITH A CX3C MOTIF" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 385, no. 6617, 13 February 1997 (1997-02-13), pages 640-644, XP002030092 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-23, 36-45
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/34503

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	GOSLING J ET AL: "Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (2000 MAR 15) 164 (6) 2851-6., XP000961005 the whole document	1-23, 36-45
P,X	--- DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; SCHALL, THOMAS J.: "Novel technology for the identification of specific inhibitors of orphan chemokine receptors" Database accession no. PREV200000222786 XP002171801 abstract & ABSTRACTS OF PAPERS AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 219, no. 1-2, 26 - 30 March 2000, pages MEDI-339, -----	1-23, 36-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/34503**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-23, 36-45

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-5, 36-45

assay device comprising a plurality of different immobilized "tethered" (attached) ligand fusion proteins organized in an array, wherein the ligand fusion protein contains a "stalk" (spacer), and related matter (independent claims 1 and 36; and dependent claims), and tethered ligand fusion protein comprising a stalk (independent claim 44, and dependent claim 45).

2. Claims: 6-23

method for identifying an interaction between a receptor and a ligand comprising contacting a cell expressing a receptor with an immobilized "tethered" ligand fusion protein (no stalk, no array), and related matter (independent claims 6, 13 and 16; and dependent claims).

3. Claims: 24-35

method for diagnosis, and method for detecting the effect of a drug, said method comprising "determining a receptor profile" (independent claims 24 and 31; and dependent claims),

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/34503

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9849557 A	05-11-1998	AU 7164998 A WO 9849557 A1	24-11-1998 05-11-1998
WO 9717375 A	15-05-1997	US 5817527 A AU 7327796 A EP 0859793 A1 WO 9717375 A1 JP 2000500441 T	06-10-1998 29-05-1997 26-08-1998 15-05-1997 18-01-2000
EP 0626450 A	30-11-1994	EP 0626450 A2 JP 7147987 A US 5851791 A	30-11-1994 13-06-1995 22-12-1998
WO 9727299 A	31-07-1997	AU 1825097 A EP 0876487 A1 JP 11503030 T WO 9727299 A1	20-08-1997 11-11-1998 23-03-1999 31-07-1997
WO 9419694 A	01-09-1994	US 5576220 A US 5585275 A AU 6393994 A JP 8507602 T WO 9419694 A1 AU 4844593 A WO 9405394 A1	19-11-1996 17-12-1996 14-09-1994 13-08-1996 01-09-1994 29-03-1994 17-03-1994
US 5817527 A	06-10-1998	AU 7327796 A EP 0859793 A1 WO 9717375 A1 JP 2000500441 T	29-05-1997 26-08-1998 15-05-1997 18-01-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	
// A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/02		A 6 1 P 37/02	
37/08		37/08	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
(31)優先権主張番号	0 9 / 7 2 1 , 9 0 8		
(32)優先日	平成12年11月24日(2000 . 11 . 24)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(81)指定国	EP (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	タルボット、デイル アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94127、サンフランシスコ、ブレントウッド アベニュー 67		
(72)発明者	ミアオ、ツェンファ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95129、サンノゼ、レインボウ ドライブ 2、7070		
(72)発明者	ウェイ、ツェング アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94063、レッドウッド シティ、デュア- ン ストリート 12、75		
Fターム(参考)	2G045 AA40 DA36 FB03 4B024 AA11 BA21 CA04 DA03 EA04 GA11 HA01 4B063 QA01 QQ08 QR48 QS33 4C084 AA17 NA14 ZB072 ZB132 4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 EA50 FA74		

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003518138A5	公开(公告)日	2008-02-28
申请号	JP2001547554	申请日	2000-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	化疗CENTRIX公司		
申请(专利权)人(译)	化疗CENTRIX公司		
当前申请(专利权)人(译)	化疗CENTRIX公司		
[标]发明人	スコールトーマスジェイ タルボットデイル ミアオツエンファ ウェイツェング		
发明人	スコール、トーマス ジェイ タルボット、デイル ミアオ、ツエンファ ウェイ、ツェング		
IPC分类号	C07K14/47 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N15/09 A61K45/00 A61P37/02 A61P37/08		
CPC分类号	C07K2319/00 C07K14/521 C07K14/7158 G01N33/5088 G01N2500/00 G01N33/531 G01N33/6863		
FI分类号	C07K14/47 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P37/02 A61P37/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/DA03 4B024 /EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB132 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045 /CA40 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/172979 1999-12-20 US 60/186626 2000-03-03 US 09/721908 2000-11-24 US		
其他公开文献	JP2003518138A JP4777570B2		

摘要(译)

本发明提供了用于分析受体-配体相互作用，确定细胞和细胞群中受体表达的概况以及诊断和药物筛选方法的方法，试剂和装置。本发明使用具有配体结构域，Stark结构域和任选地固定结构域的固定的控系配体融合蛋白。