

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4308217号  
(P4308217)

(45) 発行日 平成21年8月5日(2009.8.5)

(24) 登録日 平成21年5月15日(2009.5.15)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	

請求項の数 8 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-84234 (P2006-84234)  
 (22) 出願日 平成18年3月24日 (2006.3.24)  
 (62) 分割の表示 特願平7-530337の分割  
 原出願日 平成7年5月18日 (1995.5.18)  
 (65) 公開番号 特開2006-217918 (P2006-217918A)  
 (43) 公開日 平成18年8月24日 (2006.8.24)  
 審査請求日 平成18年3月24日 (2006.3.24)  
 (31) 優先権主張番号 08/246, 242  
 (32) 優先日 平成6年5月19日 (1994.5.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506066766  
 アンスティチュ ナシオナル ドウ ラ  
 サントウ エ デュ ラ ルシエルシュ  
 メディカル  
 フランス国 エフ-75654 パリ セ  
 デックス 13, リュ ドウ トルビア  
 ック 101  
 (73) 特許権者 506066777  
 サントウル ナシオナル ドウ ラ ルシ  
 エルシュ シアンティ フィック セーエ  
 ールエヌエス  
 フランス国 エフ-75794 パリ セ  
 デックス 16, リュ ミッシェル-ア  
 ンジュ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニック関節炎マウス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

実質的に以下のアミノ酸配列からなるタンパク質を含む、自己抗原に対する免疫原性反応を誘導するための組成物:

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-  
 Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号 1]、または  
 配列番号 1 において 1 個の置換、付加もしくは欠失を含む配列。

【請求項 2】

前記タンパク質がヒト由来である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

請求項 1 から 2 のいずれかに記載のタンパク質をコードする単離されたDNAを含む、自己抗原に対する免疫原性反応を誘導するための組成物。

【請求項 4】

滑膜性関節の慢性炎症および変形の表現型を有する、関節炎モデルマウスであって、該マウスが、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の組成物中のタンパク質のアミノ酸配列に由来の合成オリゴペプチドを含む組成物で免疫されたマウス由来のリンパ球を移植することにより生成される、関節炎モデルマウス。

【請求項 5】

滑膜性関節の慢性炎症および変形の表現型を有する、関節炎モデルマウスであって、該関節炎モデルマウスが、請求項 4 に記載の関節炎モデルマウス由来のリンパ球の移入によ

り生成される、関節炎モデルマウス。

【請求項 6】

タンパク質を含む、自己抗原に対する免疫原性反応を誘導するための組成物を生成するための方法であって、該方法は発現ベクターを含有する微生物を培養することを包含し、該発現ベクターが、請求項 3 に記載の単離された DNA 配列および該 DNA 配列を該微生物で発現させる手段を含む、方法。

【請求項 7】

タンパク質を含む、自己抗原に対する免疫原性反応を誘導するための組成物を生成するための方法であって、該方法はウイルス発現ベクターを培養することを包含し、該発現ベクターが、請求項 3 に記載の単離された DNA 配列および該 DNA 配列を該ウイルス発現ベクターが複製され得る宿主細胞で発現させる手段を含む、方法。

10

【請求項 8】

ヒトを包含する個々の動物が慢性関節リウマチを発症させる強い危険性を有するか否かを決定するためのキットであって、該キットが、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の組成物、陽性コントロール、T 細胞反応性を検出するための手段、および指示書を含み、該タンパク質に対する T 細胞反応性について、個々の動物由来の単離された T 細胞が試験される、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

(発明の分野)

本発明は、関節炎を発症させるために遺伝子操作されたトランスジェニック非ヒト動物に関し、そしてそれ故慢性関節リウマチのようなヒト関節炎疾患のための動物モデルを提供する。より詳細には、本発明は、トランスジェニック動物の T 細胞レセプター (TCR) 集団が、(a) TCR および TCR サブユニットをコードするトランスジーンを含み、そして (b) トランスジェニック動物において T 細胞を自己抗原と反応させる TCR のコピーから実質的になる、トランスジェニック動物に関する。さらに特定すると、本発明は、TCR をコードするトランスジーンから実質的になる限定された TCR レパートリーが、トランスジェニック動物の発育の間に作用して、再現可能な、そしてそれ故予想可能な様式で重篤な関節炎症状が発症したトランスジェニック動物に至る一連の事象を開始させる、トランスジェ

30

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

動物は、免疫系と総称される分子および細胞防御の複雑な系列を有する。この免疫系は、潜在的に有害な外来性細胞または内因性であるが異常な細胞(それぞれは、例えば、細菌またはウイルスのような病原体、およびガン細胞または病原体に感染した細胞により代表される)を認識および攻撃するが、内因性の正常細胞は攻撃せず、むしろ許容する。免疫系は、外来性生体分子または異常な生体分子により刺激された場合、外来性生体分子または異常な生体分子が結合する病原体、あるいはガン細胞または病原体に感染した細胞を中和および破壊するように設計された一連の活性を受ける。総合して、免疫応答として知られているこれらの活性は、細胞性免疫応答、体液性(抗体仲介)免疫応答、または細胞性免疫応答および体液性免疫応答の要素を含む免疫応答からなり得る。

40

【0003】

体液性免疫応答は、特異的な外来性生体分子または異常な生体分子と結合し、そして免疫系の他の要素をそこに誘引する抗体、糖タンパク質により仲介される。抗体は、トリ滑液嚢または哺乳動物の骨髄で発生するが、他の器官、特に、脾臓へ移動し、そこで成熟する B 細胞、リンパ球により産生される免疫グロブリン (Ig) 分子である。Robertson, M., Nature 301:114(1983)。細胞性免疫応答は、動物の胸腺内で成熟する T 細胞、リンパ球の活動の結果である。Tizard, 163頁。

50

## 【 0 0 0 4 】

T細胞の活動は、動物内のT細胞の異なるサブ集団の間で顕著に変化する。細胞傷害性T細胞は、外来性細胞(移植拒絶)または内因性であるが異常な細胞(例えば、ガン細胞または細胞内の寄生体(例えばウイルスおよび細菌)に感染した細胞)を認識し、そして破壊する。ヘルパーT細胞は、抗体の産生および細胞傷害性活性を促進しかつ統制するために、生体分子と相互作用し、そしてB細胞および細胞傷害性T細胞の両方の挙動にそれぞれ影響を与える生体分子を産生する。Mosier, D.E., *Science* 158:1573-1575(1967)。サブレッサーT細胞および記憶T細胞を含むT細胞の他のクラスがまた存在する。Miedema, F. および Melief, C.J.M., *Immunol. Today* 6:258-259(1983); Tizard, I.R., *Immunology: An Introduction*, Saunders, Philadelphia(1988), 225-228頁。T細胞のクラスは、異なるT細胞がその表面に異なるCDタンパク質を提示することに基づいて、ある程度まで区別される。未成熟T細胞は、CD4タンパク質およびCD8タンパク質の両方を提示し(すなわち、未成熟T細胞はCD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>である)、成熟ヘルパーT細胞はCD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup>であり(すなわち、CD4タンパク質を提示するが、CD8タンパク質を提示しない)、そして成熟細胞傷害性T細胞はCD4<sup>-</sup>8<sup>+</sup>である(すなわち、CD8タンパク質を提示するが、CD4タンパク質を提示しない)。Smith, L., *Nature* 326:798-800(1987); Weissman, I.L., および Cooper, M.D., *Sci. American* 269:65-71(1993)。

10

## 【 0 0 0 5 】

適切に機能するために、動物免疫系のT細胞およびB細胞は、極めて大量の「非自己」分子組成物、すなわち、外来性組成物または内因性であるが異常に発現された組成物のいずれかを正確かつ確実に同定しなければならない。免疫系による認識および同定は分子レベルで起こる。免疫応答を生じる能力を有する分子組成物である抗原は、エピトープとして知られている1つまたはそれ以上の分子サイズの同定特徴から構成される。例えば、100のアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するポリペプチド抗原は、何十ものエピトープを含み得、ここで、各エピトープは約3~約15のアミノ酸を含有するポリペプチドの一部により同定される。ポリペプチドだけに由来し得るエピトープの数は、約1000万であると見積もられる。Tizard、25頁。

20

## 【 0 0 0 6 】

動物のT細胞またはB細胞に遭遇する抗原は、正常な内因性(すなわち、自己)抗原(これに対する免疫応答は動物に傷害性である)と結び付けられるか、または外来性または異常(非自己)抗原(これに対して免疫応答は備えられるべきである)と結び付けられるように同定されるに違いない。このプロセスは、ヒトの戦いにおける「敵か味方か」という識別に比喩される。免疫系が侵入する病原体または腫瘍細胞を、非自己として結び付けて抗原を識別しない場合、これらの「敵」はこの系の防御から逃れる。免疫系は動物の内因性抗原を非自己として間違って識別する場合、これらの内因性抗原を含む動物体の一部は、免疫系の「味方による攻撃」に直面する。動物の免疫系が間違って別の細胞・分子に対して細胞および分子「戦争」をしかける後者の場合は、動物体の正常な部分が、一般に「自己免疫疾患」として知られている。

30

## 【 0 0 0 7 】

抗原を識別する免疫系の手段の一部として、個々のT細胞およびB細胞は、T細胞またはB細胞の表面に提示され、そして特異的抗原に結合する抗原レセプターを産生する。個々のT細胞により産生されかつその表面に提示されるT細胞レセプター(TCR)は、重(TCR<sub>H</sub>)および軽(TCR<sub>L</sub>)ポリペプチドサブユニットを含む。各TCR<sub>H</sub> およびTCR<sub>L</sub> サブユニットはカルボキシ末端定常領域およびアミノ末端可変領域を有し、このカルボキシ末端定常領域のアミノ酸配列は、T細胞毎に変化せず、このアミノ末端可変領域のアミノ酸配列は、T細胞毎に変化する。TCR<sub>H</sub> およびTCR<sub>L</sub> サブユニットが互いに会合する場合、TCR<sub>H</sub> およびTCR<sub>L</sub> ポリペプチドサブユニットの可変領域は結合して、TCRの固有の抗原結合部分を形成する。Davis, M.M. および Bjorkman, P.J., *Nature* 334:395-404(1988)。同様に、個々のB細胞は、Ig分子を含む抗原レセプターを産生し、そして提示する。このIg分子は、Ig重鎖およびIg軽鎖として知られている2つの抗体サブユニットのそれぞれの可変領域に、独

40

50

特なアミノ酸配列に起因する固有の抗原結合部分を有する。各 B 細胞膜は20,000 ~ 200,000の同一のIg分子を含む。Tizard,78-80頁および202頁。

【 0 0 0 8 】

各個々の T 細胞または B 細胞は同一の抗原レセプターを提示するが、異なる抗原レセプターの動物コレクションはかなり多様である。Ig重鎖の可変領域、またはTCR 鎖の可変領域は、可変セグメント(V)、多様性セグメント(D)および連結セグメント(J)という3つの遺伝子セグメントによりコードされる。Ig軽鎖の可変領域、またはTCR 鎖の可変領域は、VおよびJ遺伝子セグメントによりコードされる。多くの異なるV、DおよびJ遺伝子セグメントをコードする複数のDNA配列は、生殖系列DNAに発現されないコピーとして存在する；そのアナログ(但し、TCRサブユニットの可変遺伝子セグメントの異なるコレクション)もまた存在する。動物の発育の間では、種々の可変領域をコードする遺伝子は、免疫系の個々の細胞において、V、DおよびJ遺伝子セグメント、またはVおよびJ遺伝子セグメントのランダムな連結により生成される。Ig重鎖またはTCR サブユニットのランダムに構成された可変領域を生成するDNA再編成のプロセスは、V-D-J連結と呼ばれる；Ig軽鎖またはTCR サブユニットの再編成された可変領域を生成する類似のプロセスは、V-J連結と呼ばれる。Sakano,H.ら , Nature 280:288-294(1979) ; Early, P.ら , Cell 19:981-992(1980); Alt, F.W.ら , Science 238:1079-1087(1987) ; Harlow, E.およびLane , D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988), 10-18頁 ; Davis, M.M.およびBjorkman, P.J., Nature 334:395-404(1988)。さらに、点変異が、体細胞変異と呼ばれるプロセスにより、可変領域の全体に導入される。Bernard,O.ら , Cell 15:1133-1144(1978)。

10

20

【 0 0 0 9 】

機能的に再編成されたIgまたはTCRサブユニット遺伝子は、V-D-JまたはV-J連結によるDNA再編成および/または体細胞変異により、終止コドンまたはフレームシフト変異の導入のため、生合成の間に早まって停止されるリーディングフレームをそこで生じない遺伝子の一つである。免疫系の各 T 細胞または B 細胞は、固有の機能的に再編成された可変領域が存在するそれぞれの抗原レセプターをコードする遺伝子を発現するため、それぞれが固有の抗原認識領域を有するレセプターを産生する多くの異なる T 細胞または B 細胞が生成される。T細胞に提示される異なる抗原レセプターの全カタログは動物TCRレパートリーと呼ばれている。Bevan,M.J., Science 264:796-797(1994)。

30

【 0 0 1 0 】

成熟 T 細胞または B 細胞において、細胞抗原レセプターへの抗原の結合は細胞を活性化させる。すなわち、細胞を刺激して細胞性免疫応答または体液性免疫応答を生じることに関連する活性を受ける。対照的に、未成熟な T 細胞または B 細胞においては、提示されたTCRまたは B 細胞抗原レセプターへの抗原の結合は、それぞれ、ネガティブ選択またはクローン排除と呼ばれるプロセスによる細胞の排除を引き起こす。クローン排除は、健康な野生型動物の正常な発育の間で起こり、そして動物の正常な内因性(自己)抗原を許容するように、すなわち、動物の自己抗原を非免疫原性抗原として扱うように免疫系を学習させる機構である。免疫系が自己抗原の許容性を達成または保持することに失敗すると、ヒトを含む動物において自己免疫疾患に至り得る自己免疫応答(すなわち、自己抗原への自己免疫応答)が生じる。自己免疫疾患は、非自己抗原に対する適切な免疫応答が免疫エフェクター生体分子(例えば、自己抗体)または自己抗原と交差反応する細胞の産生をもたらす際に生じ得る。ヒト自己免疫疾患は、多発性硬化症(MS)および全身性紅斑性狼瘡(SLE)のような身体的精神的障害状態を含む。概説に関しては、Steinman,L., Sci. American 269:107-114(1993)を参照のこと。

40

【 0 0 1 1 】

B細胞は可溶性抗原に直接に結合し得るが、T細胞は、抗原提示細胞(APC)として一般に知られている特異的なクラスの他の細胞に抗原が提示される場合のみ、抗原に应答する。APC(例えば、マクロファージおよび樹状細胞)は、MHC(主要組織適合複合体)タンパク質として知られている糖タンパク質により、ポリペプチド由来の抗原を提示する。MHCは、A

50

PCの表面に提示される。Bevan, M.J.ら, *Science* 264:796-797(1994)。MHCタンパク質は一般に抗原に結合する; TCR:Ag:MHC複合体の特異性決定基は、(1)TCRの可換部分の独特なポリペプチド配列および(2)抗原の独特なポリペプチド配列である。しかし、MHCにより提示されるオリゴペプチド抗原は、ある程度までMHC分子内に埋められ、そして抗原のTCR認識は適切なクラスのMHC分子に関してしか起こらない。Janway, C.A., *Sci. American* 269:73-79(1993)。この現象は、MHC制限と呼ばれ、T細胞の抗原認識および生理学には非常に重要である。Zinkernagel, R.M.およびDoherty, P.C., *Nature* 248:701-702(1974)。

#### 【 0 0 1 2 】

MHCタンパク質をコードする遺伝子は多様である; しかし、個々の動物において細胞毎に変化するIgおよびTCRとは違って、MHC抗原は、個々の動物毎に、または関連する個々の動物グループ毎に変化する。マウスの同系交配株によるマウスにより代表される家族性グループのメンバーは、互いに類似するMHC抗原を共有するが、マウスの他の株由来の個体とは共有しない。Snell, G.D., *Science* 213:172-178(1981)。変異体MHC分子は異なる抗原に結合し得るため、T細胞が認識し得(すなわち、MHC環境で結合する)、そして応答し得る抗原は、マウスの異なる株の間で変化する。ヒトでは、特定のMHC変異体分子は自己免疫疾患とより深く関連する。なぜなら、これらのMHC変異体分子は、自己抗原を結合する(そしてそれ故T細胞に提示する)際に、より競争的であると推定されるからである。Vaughan, *Immunological Diseases*, 3版、II巻、Samter, M.編、1029-1037頁(1978); Steinman, L., *Sci. American* 269:107-114(1993)。

#### 【 0 0 1 3 】

関節炎は、多くのヒト自己免疫疾患の苦痛を伴う発現である。関節炎の病因は、ほとんど知られていない。滑膜性関節の炎症病変は、SLEのような一般的な自己免疫疾患に存在するが、慢性関節リウマチ(RA)または反応性関節炎(ReA)のような特定の自己免疫疾患においてより高い頻度で存在する。他方で、原発性関節疾患であるRAは、全体的に正常な免疫学的環境に存在する。RAは、パンヌスとして知られている血管が高度に発達する組織への1つまたはそれ以上の滑膜の発生により特徴付けられる慢性炎症性疾患である。パンヌスは数個の異なるタイプの細胞からなり、これには、常在性滑膜繊維芽細胞、および炎症エフェクターおよび伝達物質生体分子を産生し得る浸潤性単核細胞が包含される。パンヌスは周囲の組織への浸潤性増殖を示し、対応する関節軟骨および骨の進行性破壊を伴う。Harris, E.D., Jr., *Textbook of Rheumatology*, Kelly, W.ら, 編、W.B. Saunders Co., Philadelphia, 905-942頁(1989)。

#### 【 0 0 1 4 】

慢性関節リウマチの症状は、1つまたはそれ以上の関節の膨張およびそれに伴う疼痛から、四肢の1つまたはそれ以上の関節に影響を与える比較的軽度の早朝硬直までに及ぶ。重度の場合は、慢性炎症の結果、慢性疼痛および罹患した四肢の物理的変形を伴って、関節の軟骨および骨の破壊および変形が生じる。慢性疼痛および変形は、関節の運動性の喪失および罹患した個体の生活の質に対して、明らかに深刻な結果を有する。一般に、50%のRA患者は、十分に正常な生活を過ごし得る; 約25%は、部分的に生活不能となり、かつ生活不能が徐々に進行する; そして約25%は、非常に限定された生活を過ごす。低い比率(10%未満)のRA患者は全体的に生活不能となる。Christian, C.L.およびPaget, S.A., *免疫疾患における「慢性関節リウマチ」*、II巻、3版、Samter, M.編、Little, Brown and Co., 1061-1076頁(1978)。

#### 【 0 0 1 5 】

RAは頻繁に起こるヒト疾患であり、先進国の人口の1%近くが罹患しており、これには、遺伝的傾向の複雑な要素がある。Wordsworth, P., *Current Opinion in Immunology* 4:766-769(1992)。RAはまた家畜、特に、イヌに観察される。Tizard, 527-528頁。いくつかの研究は、ヒトの場合、RAは男性よりも女性のほうが2~3倍も多いことを示す。Christian, C.L.およびPaget, S.A., *免疫疾患における「慢性関節リウマチ」*、II巻、3版、Samter, M.編、Little, Brown and Co., 1061-1076頁(1978)。女性ホルモンエストロゲンは、インターフェロンの生成を間接的に誘発するDNA配列を刺激することが示唆されてい

10

20

30

40

50

る。インターフェロンは、滑膜性関節内層中のヒトMHC分子の出現(そこは、MHC分子が通常発見されていない)を刺激する。Fox, H.S.ら, *J. Immunol.* 146:4362-4367(1991)。

【0016】

慢性関節リュウマチの病因は現在知られておらず、そして明らかな証拠のない状態で議論の的となっている。この疾患は以下のように発症する。組織学的には、罹患した関節は、炎症性サイトカインを産生する造血系細胞(リンパ球、マクロファージ、および/または好中球)により浸潤される。滑膜内層は、それ自体増殖性であり、そして炎症性細胞とともに軟骨および骨を浸食および侵襲する肉芽腫様「パンヌス」を形成する。炎症の浸出および増殖プロセス由来の酵素は、軟骨、骨、靭帯および腱中の種々の基質を加水分解して、滑膜性関節の構造的変形を生じる。RAが進行するにつれ、浸潤性好中球はリンパ結節および明中心を形成し得るCD4<sup>+</sup>リンパ球により補充され得るか、または部分的に置換され得る。IgGクラスの抗体に関連するIgMクラスの自己抗体であるリュウマチ因子は、全ての患者でなく、いくつかの患者の血清中に存在する。Christian, C.L.およびPaget, S.A., 免疫疾患における「慢性関節リュウマチ」、II巻、3版、Samter, M.編、Little, Brown and Co., 1061-1076頁(1978)。

10

【0017】

RAの病因の終結事象は比較的良く理解されているか、または少なくとも記載されているが、RAの開始および早期事象の細胞および分子的原因は詳細に記載されていない。例えば、細胞傷害性および体液性免疫応答の両方は、既に知られたRAモデルに記載されている。Chiocchia, G.ら, *J. Immunol.* 145:519-525(1990)。実際、RAが、二次炎症の結果を伴う自己抗原への免疫応答を代表するか、またはマクロファージ機能の一次調節異常を代表するかどうか、議論的である。Firestein, G.S.およびZwaifler, N.J., *Arthritis and Rheumatism* 33:768-773(1990); Lanchbury, J.S.およびPitzalis, C., *Current Opinion in Immunology* 5:918-924(1993)。いくつかの候補自己抗原がRAについて提案されているが、結果的に1つも同定されていない。Sano, H.ら, *J. Cell Biol.* 110:1417-1426(1990)。

20

【0018】

RAの現在の動物モデルは、以下の免疫学的モデルを含む。概説に関して、Schwartz, R.S., *Fundamental Immunology*, 3版、Paul, W.E.編、Raven Press, N.Y., 1064-1067(1993)を参照のこと。

【0019】

1. コラーゲン誘発型関節炎(CIA)は主に自己抗体に依存するようである。これは、II型コラーゲン(関節軟骨において一般的なタイプである)によるラットまたはマウスの免疫化により、またはII型コラーゲンに対する抗体の投与により誘発される。コラーゲン特異的Tヘルパー細胞もまたこの疾患を誘導し得る。IgG抗体は、滑液で濃縮され、そして関節で沈積物を形成し、炎症を生じると推定される。類似のウサギモデルは存在するが、あまり良く特徴付けされていない。Jasin, H.E., *Fed. Proc. (USA)* 32:147-152(1973)。

30

【0020】

2. アジュバント(adjutant)型関節炎は、ラットの感受性株においてオイル中のMycobacterium tuberculosisの注入により誘発される。結果として、関節炎症および関節膨張は、四肢の遠端部に主に存在し、これは一時的であり、そして21日間後に消え、後に破壊が残る。Pearson, C.M., *J. Chronic Dis.* 16:863-874(1963)。この場合、この疾患は、疾患ラットからTリンパ球集団または系を有する天然の動物に移され得る。M. tuberculosisを用いる免疫化により誘発されるT細胞および/または抗体は、微生物および軟骨中のプロテオグリカン構造の間で交差反応し得るようである。同様に、プリスタン誘発型関節炎(PIA)は、鉱油中の薬剤プリスタンの注入により誘発される。Potter, M.およびWax, J.S., *J. Immunol.* 127:1591-1595(1981)。

40

【0021】

3. Lpr/fas型関節炎は、アポトーシスによる細胞死の誘発に関与するfas遺伝子の変異を有するMRL/lpr株のマウスに存在する。この欠失の結果として、主としてTリンパ球の異常な集団から構成される大量のリンパ増殖がこれらのマウスに生じる。関節の進行性炎

50

症を含むいくつかの自己免疫発現が生じる。Cheng, J.ら, *Science* 263:1759-1762(1994)。

【 0 0 2 2 】

これらのモデルはいずれも十分に満足されていない。CIA、アジュバント型関節炎およびPIAでは、動物は、軟骨、骨の生体分子と交差反応する免疫応答を生じる抗原で人工的に免疫化される；例えば、3種類の関節炎の全てはII型コラーゲンに対して免疫系許容性を仕込むことにより処置され得る。Thompson, H.S.G.およびStaines, N.A., *Clin. Exp. Immunol.* 64:581-586(1985)；Zhang, Z.J.ら, *J. Immunol.* 145:2489-2493(1990)；Thompson, S.J.ら, *Immunol.* 79:152-157(1993)。しかし、軟骨関連構造の破壊は、恐らく二次効果としてRAの後期に起こる。したがって、これらのモデルは、免疫系における一次または早期事象が関節炎に至る一連の自己免疫事象を生じる関節炎を反映しないようである。Lp r/fas型関節炎は、二次関節炎の結果のみを有するリンパ増殖性疾患であり、RAの全体的に正常な免疫学的環境と明らかに異なるセッティングである。自己免疫疾患の起こりがちなバックグランドにCIAの方法を取り入れた動物モデルは、より重篤な関節炎症状を生じるが、上記欠点の両方を蒙る。Watson, W.C.ら, *J. Exp. Med.* 172:1331-1339(1990)。

10

【 0 0 2 3 】

さらに、上記免疫学的方法はいずれも、動物が再現可能な、そしてそれ故予想可能な様式で重篤な症状を発症し、それ故RAにおける早期免疫事象の特徴付けおよび操作を可能にする動物モデルを提供していない。最近、トランスジェニック動物を作成する能力は、自己免疫疾患を含むヒト疾患をより正確に反映する動物モデルを開発する機会を提供している。Watson, J.D.ら, "The Introduction of Foreign Genes Into Mice," in *Recombinant DNA*, 2版, W.H. Freeman & Co., New York(1992), 255-272頁；Lee, M.-S.およびSarvetnick, N., *Curr. Op. Immunol.* 4:723-727(1992)。トランスジェニック動物は、非自然手段により(すなわち、人工操作により)、動物に天然に存在していない1つまたはそれ以上の遺伝子(例えば、外来性遺伝子、遺伝子操作された内因性遺伝子など)を導入した動物である。トランスジーンとして知られている非自然的に導入された遺伝子は、外来性DNA配列(すなわち、宿主動物のゲノムに通常見出されていない配列)を包含し得る。あるいは、またはさらに、遺伝子の発現の正常なインピボ様式を変えるか、またはこの遺伝子によってコードされる内因性遺伝子産物の生物学的活性を変えるかまたは除去するために、トランスジーンは、インピトロで再編成または変異された、異常な内因性DNA配列を包含し得る。Watson, J.D.ら, "The Introduction of Foreign Genes Into Mice," in *Recombinant DNA*, 2版, W.H. Freeman & Co., New York(1992), 255-272頁；Gordon, J.W., *Intl. Rev. Cytol.* 115:171-229(1989)；Jaenisch, R., *Science* 240:1468-1474(1989)；Rosant, J., *Neuron* 2:323-334(1990)。

20

30

【 0 0 2 4 】

免疫系を研究する過程において、科学者らは、数種類のトランスジェニックTCR動物、すなわち、特定のTCRまたはTCRサブユニットの発現を導くトランスジーンを含む動物を作成した。Kirmpenfort, P.ら, *EMBO Journal* 7:45-50(1988)；Teh, H.S.ら, *Nature* 335:29-233(1988)；Bluthmann, H.ら, *Nature* 334:156-159(1988)；Uematsu, Y.ら, *Cell* 52:831-841(1988)；Steinmetz, M.ら, *Genome* 31:652-655(1989)；Berg, L.J.ら, *Cell* 58:1035-1046(1989)；Uematsu, Y.ら, *Eur. J. Immunol.* 22:603-606(1992)；Borgulya, P.ら, *Cell* 69:529-537(1992)。Katz, J.D.ら, *Cell* 74:1089-1100(1993)。トランスジェニックTCR「ノックアウト」(機能の喪失)対立遺伝子のマウスへの導入により、T細胞が実質的に涸渇される動物が得られる。Kirmpenfort, P.J.A.およびBern, A.J.M., 米国特許第5,175,384号(1992年12月29日)。動物のT細胞に変化した特異性を与えるトランスジェニックTCR対立遺伝子の導入により、さらに精妙な生物学的効果が得られる。しかし、コラーゲン誘発型関節炎を誘発し得るT細胞クローン由来のトランスジェニックTCR対立遺伝子のマウスへの導入は、得られるトランスジェニック動物において関節炎を生じない。Mori, L.ら, *J. Exp. Med.* 176:381-388(1992)。

40

【 0 0 2 5 】

50

上記および本明細書の他の箇所で議論された参考文献は、単に本出願の出願日前の開示を提供し、そして、本発明者らが先行発明より以前に本出願を行う必要があるとは考えられない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

先行技術の状態を考慮すれば、自己免疫性関節炎、特に、慢性関節リュウマチにおける早期免疫的事象を特徴付けかつ制御するために、動物が再現可能な、そしてそれ故予想可能な様式で重篤な関節炎症状を発症する動物モデルが必要である。したがって、本発明の目的は、自己免疫性関節炎を発症させるために遺伝子操作されたトランスジェニック非ヒト動物を提供することである。これは、トランスジェニック動物のT細胞レセプター(TCR)集団が、(a)TCR およびTCR サブユニットをコードするトランスジーンを含み、そして(b)トランスジェニック動物の発育の間にT細胞を自己抗原と反応させて、再現可能な、そしてそれ故予想可能な様式で重篤な関節炎症状が発症したトランスジェニック動物に至る一連の自己免疫事象を開始させるTCRのコピーから実質的になることにより達成される。

10

【0027】

本発明の目的はまた、トランスジェニック非ヒト関節炎動物を作製するための材料および方法を提供することであり、これらのいくつかは、治療用抗関節炎組成物を調製するために使用され得る。

20

【0028】

本発明のさらなる目的は、トランスジェニック非ヒト関節炎動物を用いて、目的の種々の組成物(動物およびヒト遺伝子、ならびにそれらによりコードされる遺伝子産物を含む)の抗関節炎能力または関節炎誘発能力を評価する方法を提供することである。

【0029】

さらに、本発明の目的は、トランスジェニック非ヒト関節炎動物のB細胞またはT細胞由来のハイブリドーマ、およびハイブリドーマおよびこれらが由来するB細胞およびT細胞によりトランスジーン関連結節炎と関連して産生される特異的生体分子を提供することである。

30

【0030】

さらに、本発明の目的は、ヒトを含む動物に対して内因性であり、ポリペプチド関節炎誘発自己抗原を含む単離されたタンパク質、この単離されたタンパク質を精製または産生する方法、およびこの単離されたタンパク質またはこれから誘導される組成物を用いてヒトおよび動物の関節炎疾患を処置する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0031】

(発明の要旨)

本発明は、例えば、以下を提供する。

(項目1)

1つまたはそれより多い滑膜性関節の慢性炎症および変形の表現型を有するトランスジェニック関節炎マウスであって、その表現型は、そのマウスの体細胞および生殖細胞に含有されるトランスジーンにより付与され、ここでそのトランスジーンが、機能的に再編成されたT細胞レセプターのサブユニットおよびサブユニットの発現を指向する、トランスジェニック関節炎マウス。

40

(項目2)

トランスジェニックマウスであって、そのマウスは、そのマウスの体細胞および生殖細胞に含有されるトランスジーンを有し、ここでそのトランスジーンが、T細胞レセプターのサブユニットおよびサブユニットの発現を指向し、そのサブユニットおよびサブユニットは結合して、以下の(a)、(b)、または(c)を認識するT細胞レセプターを形成する、トランスジェニックマウス：

50

( a ) 以下のアミノ酸配列を含むポリペプチド :

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-

Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号 1] ;

( b ) 1つまたはそれより多い内因性ポリペプチド関節炎生成性自己抗原を含むタンパク質 ; または

( c ) ( a ) のポリペプチドと ( b ) のタンパク質との両方。

( 項目 3 )

上記トランスジーンが以下の ( a )、( b )、および ( c ) を含む、請求項 2 に記載のマウス :

( a ) ハイブリドーマR28の機能的に再編成されたTCR 遺伝子由来の可変領域を含む T 細胞レセプター サブユニットをコードする第 1 のDNA配列 ;

( b ) ハイブリドーマR28の機能的に再編成されたTCR 遺伝子由来の可変領域を含む T 細胞レセプター サブユニットをコードする第 2 のDNA配列 ; および

( c ) その第 1 のDNA配列およびその第 2 のDNA配列をインピボで発現する手段。

( 項目 4 )

1つまたはそれより多い滑膜性関節の慢性炎症および変形の表現型を有するマウスであって、そのマウスが、以下の ( a )、( b )、および ( c ) を含むウイルスベクターを導入することにより生成される、マウス :

( a ) ハイブリドーマR28の機能的に再編成されたTCR 遺伝子由来の可変領域を含む T 細胞レセプター サブユニットをコードする第 1 のDNA配列 ;

( b ) ハイブリドーマR28のTCR 遺伝子由来の可変領域を含む T 細胞レセプター サブユニットをコードする第 2 のDNA配列 ; および

( c ) その第 1 のDNA配列およびその第 2 のDNA配列をインピボで発現する手段。

( 項目 5 )

請求項 3 または 4 のいずれかに記載のマウスであって、ここで

( a ) 上記第 1 のDNA配列が、配列番号 2、配列番号 4、およびそれらの等価物からなる群から選択され ;

( b ) 上記第 2 のDNA配列が、配列番号 3、配列番号 5、およびそれらの等価物からなる群から選択され ;

( c ) 上記第 1 のDNA配列を発現する上記手段が、ハイブリドーマR28の機能的に再編成されたTCR 遺伝子由来のTCRV プロモーター領域から本質的になり、そして上記第 2 のDNA配列を発現する上記手段が、ハイブリドーマR28の機能的に再編成されたTCR 遺伝子由来のTCR V プロモーター領域から本質的になる、マウス。

( 項目 6 )

上記マウスが、1つまたはそれより多い内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原を提示する主要組織適合性複合体分子をコードする主要組織適合性複合体遺伝子座をさらに含む、請求項 3 または 4 のいずれかに記載のマウス。

( 項目 7 )

上記主要組織適合性複合体遺伝子座がNODマウス系統由来の主要組織適合性複合体遺伝子座である、請求項 6 に記載のマウス。

( 項目 8 )

上記マウスが、1つまたはそれより多い内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原を提示する主要組織適合性複合体分子をコードする主要組織適合性複合体遺伝子座をさらに含む、請求項 5 に記載のマウス。

( 項目 9 )

上記主要組織適合性複合体遺伝子座がNODマウス系統由来の主要組織適合性複合体遺伝子座である、請求項 8 に記載のマウス。

( 項目 10 )

以下のアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも1つのエピトープを共有するマウス

10

20

30

40

50

タンパク質であって、

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-  
Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号 1]

ここで、そのタンパク質が、トランスジェニック関節炎マウス中のポリペプチド関節炎生成自己抗原を含む、タンパク質。

(項目 1 1)

以下のアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも 1 つのエピトープを共有する哺乳動物タンパク質であって、

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-  
Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号 1]

ここでそのタンパク質が、それが単離された哺乳動物種中のポリペプチド関節炎生成自己抗原を含み、そして請求項 1 0 に記載のタンパク質に由来するアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である、少なくとも 15 アミノ酸の連続した伸長部をさらに含む、タンパク質。

(項目 1 2)

上記哺乳動物種がヒトである、請求項 1 1 に記載のタンパク質。

(項目 1 3)

請求項 1 0 から 1 2 のいずれかに記載のタンパク質をコードする単離された DNA 配列。

(項目 1 4)

1 つまたはそれより多い滑膜性関節の慢性炎症および変形の表現型を有するマウスであって、そのマウスが、請求項 1 0 から 1 2 のいずれかに記載のタンパク質のアミノ酸配列に由来の 1 つまたはそれより多い合成オリゴペプチドを含む組成物で、幼齢時に免疫することにより生成される、マウス。

(項目 1 5)

1 つまたはそれより多い滑膜性関節の慢性炎症および変形の表現型を有するマウスであって、そのマウスが、請求項 1 から 9、または 1 4 のいずれかに記載のマウス由来のリンパ球の移入により生成される、マウス。

(項目 1 6)

タンパク質を生成する方法であって、発現ベクターを含有する微生物を培養する工程を包含し、その発現ベクターが、請求項 1 3 に記載の単離された DNA 配列およびその DNA 配列をその微生物で発現させる手段を含む、方法。

(項目 1 7)

タンパク質を生成する方法であって、ウイルス発現ベクターを培養する工程を包含し、その発現ベクターが、請求項 1 3 に記載の単離された DNA 配列およびその DNA 配列をそのウイルス発現ベクターが複製され得る宿主細胞で発現させる手段を含む、方法。

(項目 1 8)

不死化細胞とトランスジェニック関節炎マウスから単離された抗体産生細胞との融合により生成されるハイブリドーマ細胞であって、ここでその抗体産生細胞およびそのハイブリドーマ細胞が、請求項 1 0 から 1 2 のいずれかに記載のタンパク質を認識する抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞。

(項目 1 9)

請求項 1 8 に記載のハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体。

(項目 2 0)

トランスジェニック関節炎マウスの抗原提示細胞により提示されるオリゴペプチド抗原を認識する単一特異性抗体。

(項目 2 1)

ヒトを包含する動物が慢性関節リウマチを発症させる強い危険性を有するか否かを決定する方法であって、その方法が、請求項 1 9 に記載のモノクローナル抗体または請求項 2 0 に記載の単一特異性抗体を用いて、その動物由来の生体液をイムノアッセイする工程を包含する、方法。

(項目 2 2)

10

20

30

40

50

ヒトを包含する個々の動物が慢性関節リウマチを発症させる強い危険性を有するか否かを決定する方法であって、その方法が、請求項 10 から 12 のいずれかに記載のタンパク質に対する T 細胞反応性について、個々の動物由来の単離された T 細胞を試験する工程を包含する、方法。

(項目 23)

請求項 19 に記載のモノクローナル抗体または請求項 20 に記載の単一特異性抗体を含む、アフィニティーカラム。

(項目 24)

請求項 10 から 12 のいずれかに記載のタンパク質を生成する方法であって、その方法は、ヒトを包含する動物由来の生体試料を請求項 23 に記載のアフィニティーカラムに通す工程を包含し、ここでそのタンパク質がそのカラムに保持される、方法。

10

(項目 25)

以下の工程を包含する方法により生成されるタンパク質であって、その方法は、ヒトを包含する 1 つまたはそれより多い動物由来の生体試料を請求項 23 に記載のアフィニティーカラムに通す工程を包含し、ここでそのタンパク質が

(a) そのカラムに保持され；そして

(b) そのタンパク質が単離される動物種中のポリペプチド関節炎生成自己抗原を含む、

タンパク質。

(項目 26)

20

上記動物種がヒトである、請求項 25 に記載のタンパク質。

(項目 27)

組成物の抗関節炎能を決定する方法であって、以下の工程：

(a) 炎症、不治の関節破壊、および肢節変形が生じる前に、既知用量のその組成物を第 1 のトランスジェニック関節炎マウスに投与する工程；

(b) その第 1 のトランスジェニック関節炎マウスにおいて不治の関節破壊および肢節変形の発生を検出する工程；および

(c) その第 1 のトランスジェニック関節炎マウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の発生時間と、その組成物に曝されていない第 2 のトランスジェニック関節炎マウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の発生時間とを比較する工程であって、

30

ここで、その第 2 のトランスジェニック関節炎マウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の発生時間に対するその第 1 のトランスジェニック関節炎マウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の発生時間の統計学的に有意な遅延が、その組成物の抗関節炎能を示す、工程、

を包含する、方法。

(項目 28)

組成物の抗関節炎能を決定する方法であって、以下の工程：

(a) 不治の関節破壊および肢節変形が生じる前に、既知用量のその組成物を第 1 のトランスジェニック関節炎マウスに投与する工程；

(b) その第 1 のトランスジェニック関節炎マウスにおいて不治の関節破壊および肢節変形の程度をモニターする工程；および

40

(c) その第 1 のトランスジェニック関節炎マウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の程度と、その組成物に曝されていない第 2 のトランスジェニック関節炎マウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の程度とを比較する工程であって、

ここで、その第 2 のトランスジェニック関節炎マウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の程度に対するその第 1 のトランスジェニック関節炎マウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の程度の統計学的に有意な減少が、その組成物の抗関節炎能を示す、工程、

を包含する、方法。

(項目 29)

50

組成物の関節炎生成能を決定する方法であって、以下の工程：

( a ) 不治の関節破壊および肢節変形が生じる前に、既知用量のその組成物を第 1 のKRNトランスジェニックマウスに投与する工程；

( b ) その第 1 のKRNトランスジェニックマウスにおいて不治の関節破壊および肢節変形の発生を検出する工程；および

( c ) その第 1 のKRNトランスジェニックマウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の発生時間と、その組成物に曝されていない第 2 のKRNトランスジェニックマウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の発生時間とを比較する工程であって、

ここで、その第 1 のKRNトランスジェニックマウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の発生時間に対するその第 2 のKRNトランスジェニックマウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の発生時間の統計学的に有意な遅延が、その組成物の関節炎生成能を示す、工程、

を包含する、方法。

( 項目 3 0 )

組成物の関節炎生成能を決定する方法であって、以下の工程：

( a ) 不治の関節破壊および肢節変形が生じる前に、既知用量のその組成物を第 1 のKRNトランスジェニックマウスに投与する工程；

( b ) その第 1 のKRNトランスジェニックマウスにおいて不治の関節破壊および肢節変形の程度をモニターする工程；および

( c ) その第 1 のKRNトランスジェニックマウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の程度と、その組成物に曝されていない第 2 のKRNトランスジェニックマウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の程度とを比較する工程であって、

ここで、その第 2 のKRNトランスジェニックマウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の程度に対するその第 1 のKRNトランスジェニックマウスにおける不治の関節破壊および肢節変形の程度の統計学的に有意な増加が、その組成物の関節炎生成能を示す、工程、

を包含する、方法。

( 項目 3 1 )

上記組成物が、循環系注入または経口摂取により投与される化合物を含む、請求項 2 7 から 3 0 のいずれかに記載の方法。

( 項目 3 2 )

上記組成物が、生または弱毒化の単離されたまたは組換え細菌またはウイルスの循環系注入により投与されるポリペプチドを含み、ここで、そのポリペプチドが、注入前に、その細菌またはウイルスの表面に存在する、請求項 2 7 から 3 0 のいずれかに記載の方法。

( 項目 3 3 )

上記組成物が、マウス内で複製可能な単離されたまたは組換え細菌またはウイルスの循環系注入により投与されるポリペプチドを含み、そしてそのポリペプチドが、そのポリペプチドをコードするDNA配列の遺伝子発現によりマウス内で産生される、請求項 2 7 から 3 0 のいずれかに記載の方法。

( 項目 3 4 )

上記組成物が、抗炎症性が期待される組成物、抗炎症性が活性な組成物、およびそれ自体は炎症に対して効果を有さないが炎症事象から生じる組織破壊を制限する組成物からなる群から選択される、請求項 2 7 から 3 0 のいずれかに記載の方法。

( 項目 3 5 )

上記第 1 のKRNトランスジェニックマウスがKRNトランスジェニックNODマウスである、そして上記第 2 のKRNトランスジェニックマウスがKRNトランスジェニックNODマウスである、請求項 2 9 または 3 0 に記載の方法。

( 項目 3 6 )

慢性関節リウマチの初期徴候を示す個体において慢性関節リウマチに関連した重篤な症状の発生を遅延させる方法であって、請求項 1 0 から 1 2 のいずれかに記載のタンパク質に

10

20

30

40

50

由来する合成オリゴペプチドを、経口摂取を介して投与する工程を包含する、方法。

(項目37)

配列番号5に記載のアミノ酸配列を含む可変領域を含むT細胞レセプターのサブユニットをコードする、単離されたDNA配列。

(項目38)

配列番号7に記載のアミノ酸配列を含む可変領域を含むT細胞レセプターのサブユニットをコードする、単離されたDNA配列。

(項目39)

配列番号5に記載のアミノ酸配列に由来する少なくとも5つの連続したアミノ酸を含む、合成オリゴペプチド。

10

(項目40)

配列番号7に記載のアミノ酸配列に由来する少なくとも5つの連続したアミノ酸を含む、合成オリゴペプチド。

(項目41)

請求項13に記載の単離されたDNA配列およびそのDNA配列をインピボで発現させる手段を含む発現ベクター。

(項目42)

請求項37または38に記載の単離されたDNA配列およびそのDNA配列をインピボで発現させる手段を含む発現ベクター。

(項目43)

20

上記DNA配列をインピボで発現させる上記手段が、ハイブリドーマR28の機能的に再編成されたTCR遺伝子由来のTCRVプロモーター領域またはハイブリドーマR28の機能的に再編成されたTCR遺伝子由来のVプロモーター領域を含む、請求項42に記載の発現ベクター。

【0032】

本発明は、実質的にトランスジーンによってコードされるTCRからなる制限されたTCRレパトリーを有するトランスジェニック非ヒト動物が、慢性関節リュウマチの重篤な古典的症候群を選択的に含む表現型を有するという予期しない発見に基づく。関節炎動物のTCRレパトリーは(限られているものの)、機能的に持続可能である。関節炎動物の制限されたTCRレパトリーは、TCRのクラスの実質的部分に存在し、TCRは、内因性ポリペプチド性関節炎生成抗原のエピトープを認識する。好ましい実施態様において、本発明はトランスジェニック関節炎マウスに関し、ここで関節炎の表現型は、マウスのゲノムへのTCRおよびサブユニットをコードするトランスジーン挿入により存在し、TCRおよびサブユニットは、トランスジェニック動物のT細胞中で結合してTCRを形成する。TCRは、ウシ臍臓リボヌクレアーゼ(BPR)のアミノ酸41~61に相当し、そしてアミノ酸配列

30

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-

Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号1]

を有するオリゴヌクレオチドの1つ以上のエピトープおよび/またはBPR由来オリゴペプチドの抗原と実質的に交差反応性である、内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原の1つ以上のエピトープを含む抗原を認識する。

40

【0033】

1つの局面において、本発明は関節炎のための動物モデルを提供する。罹患した個体において、関節炎は身体的障害、および疼痛を伴うため、ならびに社会に対するその経済的影響のため、信頼性があり、そして再現性のある有益な関節炎の動物モデルを得ることが所望される。本発明のトランスジェニック動物モデルは、信頼性があり、そして再現性がある方法で動物が重篤な関節炎の症候群を発症させるモデルを提供する。本発明のトランスジェニック動物モデルの信頼性および再現性は、以前に公知の関節炎の動物モデルにおいては見出されていない。

【0034】

関連する局面において、本発明は、以下を提供する：(1)TCRおよびサブユニッ

50

トをコードするトランスジーンの特異的トランスジェニック非ヒト動物での発現により、制限されたTCRレパートリーを有する、トランスジェニック非ヒト動物を生産するための方法、および(2)本発明の特異的トランスジェニック動物を作製するための手段、これは、抗原を認識するTCRの形成を指示するためにトランスジェニック動物のT細胞において およびサブユニットの可変領域および定常領域をコードするDNA配列を発現し得る単離されたDNA分子を包含する。抗原は、ウシ膵臓リボヌクレアーゼのアミノ酸41~61に相当し、そしてアミノ酸配列

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-  
Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号1]

を有するオリゴヌクレオチドの1つ以上のエピトープおよび/または内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原の1つ以上のエピトープを含む抗原を認識する。本発明のTCR可変領域のアミノ酸配列に由来するオリゴペプチドは、治療用組成物を設計するために使用される。

10

【0035】

別の局面において、本発明は、(1)組成物をそれらの抗関節炎の(治療の)可能性について試験し、そして(2)組成物をそれらの関節炎生成の(有害な)可能性について評価するために、本発明の動物モデルを使用する方法を提供する。

【0036】

本発明の特異的トランスジェニック動物はまた、内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原(PASA)を認識する免疫系細胞および生体分子の供給源としても有用である。本発明の特異的トランスジェニック関節炎マウスのリンパ球に由来するハイブリドーマは、PASAを含む内因性タンパク質を特異的に認識する免疫原性エフェクター生体分子を産生する。これらの免疫系細胞および生体分子は、ヒトを含む動物においてPASA含有タンパク質の濃度および分布をアッセイするために使用される。

20

【0037】

本発明の1つ以上のマウスまたは細胞株、またはそれにより産生される免疫学的エフェクター生体分子を利用して、本発明はさらに、ヒトを含む動物由来のPASAを含有する内因性タンパク質を同定および精製する方法を提供する。したがって、別の局面において、本発明は、PASAを含む単離された内因性タンパク質を提供し、そして関連する局面において、本発明はPASAを含有する単離された内因性タンパク質に由来するオリゴペプチドを提供する。ヒトを含む動物由来の生物学的体液から、ならびに組換えDNA技術で発現することにより、PASAを含有する単離された内因性タンパク質を産生する手段および方法がまた提供される。

30

【0038】

さらに別の局面において、本発明は慢性関節リュウマチのための治療用組成物を提供し、これは、PASAを含有する単離された内因性タンパク質、PASAを含有する内因性タンパク質のポリペプチド配列に由来するアミノ酸配列を含む1つ以上の単離されたオリゴペプチド、またはハイブリドーマR28により発現されるTCRサブユニットの可変領域のアミノ酸配列に由来する1つ以上の合成ポリペプチドを含有する。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0039】

(発明の詳細な説明)

(用語および記号)

本開示の目的のために、特に記載しない限り、本明細書中では以下の略語、定義、遺伝学的名称、および制限酵素認識配列を使用する。

【0040】

【表 1】

表 1. 略語			
Ag	=	抗原	
APC	=	抗原提示細胞	
BPR	=	ウシ臍臓リボヌクレアゼ	
CD	=	クラスターの分化	
cDNA	=	相補的デオキシリボ核酸	
D	=	多様性 (遺伝子セグメント)	10
DNA	=	デオキシリボ核酸	
EAE	=	実験的アレルギー性脳脊髄炎	
ES	=	胚幹	
FCS	=	ウシ胎児血清	
HLA	=	ヒトリンパ球抗原	
HPLC	=	高速液体クロマトグラフィー	
Ig	=	免疫グロブリン	20
J	=	連結 (遺伝子セグメント)	
MHC	=	主要組織適合性複合体	
mRNA	=	メッセンジャーリボ核酸	
MS	=	多発性硬化症	
NOD	=	非肥満糖尿病 (マウスの株)	
PASA	=	ポリペプチド関節炎生成自己抗原	
PCR	=	ポリメラーゼ連鎖反応	
RA	=	慢性リウマチ関節炎	30
RNA	=	リボ核酸	
RNase	=	リボヌクレアゼ	
ReA	=	反応性関節炎	
REN	=	制限エンドヌクレアゼ	
TCR	=	T細胞レセプター	
Tg	=	トランスジェニック	
tRNA	=	転移RNA	
V	=	可変 (遺伝子セグメント)	40

## (用語解説)

アフィニティークロマトグラフィー：固定化基質が、クロマトグラフされる混合物の特異的な成分に対して親和性を有するクロマトグラフィー。

## 【0041】

アミノ酸配列：アミノ末端 (N-末端) からカルボキシ末端 (C-末端) の順序で与えられるポリペプチドの配列。「ポリペプチド配列」、「ペプチド配列」、タンパク質配列」、または「一次タンパク質配列」と同意語。

## 【0042】

動物：(1) 特に記載しない限り、個体および集団で、発生の全ての段階 (胚段階およ

び胎児段階を含む)で、ヒト除き；そして(2)発生の任意の段階(胚段階および胎児段階を含む)における個々の動物を含む、他の全ての脊椎動物を包含する。「非ヒト動物」は「動物」と同じ意味を有する。

## 【0043】

動物モデル：ヒト疾患を正確に模倣し、そして治療の可能性のある組成物または有害である可能性のある組成物が、疾患に対するそれらの効果について評価され得る非ヒト動物。

## 【0044】

抗体：抗原に曝露される際、抗原に特異的に結合し得るB細胞により合成されるタンパク質分子。免疫グロブリン(Ig)と同意語。

10

## 【0045】

抗原：(1)動物における免疫応答、(2)免疫動物の免疫系の抗原認識成分を特異的に相互作用する物質の分子または組成物。

## 【0046】

自己抗原：自己免疫疾患における抗原である動物中の物質の正常な内因性分子または組成物。

## 【0047】

生体分子：生体器官により産生される分子。「生物学的分子」と同意語。

## 【0048】

生化学的合成：ある生体分子の合成的産生。ここで他の生体分子が産生において利用される。

20

## 【0049】

生合成：生体器官による生体分子の産生。

## 【0050】

キャリア：ハプテンに対する免疫応答を生じるために、ハプテンとの組み合わせに必要とされる分子。

## 【0051】

化学合成：あらゆる他の生体分子の非存在下で、かつ他の生体分子の使用を必要としない、生体分子の合成的生成。

## 【0052】

クロマトグラフィー：種々の手段により固定相(液体または固体)の領域を通り抜ける混合物(固体または液体)の均一で連続した流れにより、混合物の成分の異なる移動を可能にすることを特徴とする、プロセス。

30

## 【0053】

検出可能な標識：生体分子の検出を可能にするために生体分子に結合し得る化学部分。これは、放射性標識、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、またはアルカリホスファターゼ、ストレプトアビジン、ビオチン)、抗体により認識されるエピトープ、およびそれらの等価物からなる群より選択され得る。

## 【0054】

検出可能に標識された：生体分子が、検出可能な標識に共有結合的に付着した生体分子の状態。

40

## 【0055】

疾患：(1)本質的に妊娠を除くが、妊娠に関連する自己免疫疾患は包含しない、そして(2)正常な生理学的機能を損なう生物または部分の任意の異常な状態であって、具体的には感染、先天的欠陥、環境ストレスの結果としての状態。

## 【0056】

DNA配列：5'から3'へ読むDNAの鎖の隣接するヌクレオチド塩基の配列。

## 【0057】

酵素：特異的な化学反応を触媒するタンパク質で、しばしば1つ以上の生体分子を基質および/または産物として含む。非生物由来の触媒とは異なり、酵素は構造特異性を有す

50

る基質を認識し得る、すなわち、いくつかの酵素は、L-およびD-エナンチオマー対のうち1つのみの化学反応を認識し得、したがって触媒し得る。

【0058】

エピトープ：動物の免疫系の抗原認識成分と特異的に相互作用する、抗原の部分。ポリペプチド性抗原において、エピトープは近接のアミノ酸の短い配列に対応し得る；抗原の残りはキャリアと称される。抗原決定基と同意語。

【0059】

発現ベクター：人工のDNA配列または人工的に改変された天然に存在するDNA配列。この中に外来遺伝子または異常な遺伝子が、ベクターに適切な宿主生物においてそれらを発現するために挿入され得る。

10

【0060】

外来または異常な：健康な、野生型動物に対して非内因性。「外来抗原、または内因性であるが異常な抗原」は、免疫応答がまさに生じる生体分子を意味し、侵襲性病原体由来の生体分子およびガン細胞または感染細胞に存在する動物によりコードされる生体分子（「非自己」と同意語）の両方を含む。「外来または異常な遺伝子」は、動物のゲノムに対して内因性でないDNA配列、または、それらが由来する内因性DNA配列が有さない特性（例えば、遺伝子の位置、発現の制御、コピー数）を有するように再編成され、変異され、またはそうでなければ遺伝子操作される動物由来のDNA配列を意味する。

【0061】

遺伝子：構造遺伝子（例えば、標準的な遺伝子コードにしたがってポリペプチド配列をコードするリーディングフレーム（表2））；および発現エレメント（例えば、構造遺伝子の転写に必要とされるプロモーター、ターミネーター、エンハンサーなど）からなるDNA配列。

20

【0062】

遺伝子操作される：遺伝子の変化を導入するために意図されたヒト操作に供すること。

【0063】

ハプテン：（1）それ自身では動物における免疫応答を誘導し得ず、（2）ハプテンが結合するキャリアと組み合わせ、動物における免疫応答を誘導し得、そして（3）免疫動物の免疫系の抗原認識成分と特異的に相互作用する小分子。

【0064】

宿主動物：（1）天然に存在するまたは遺伝子操作された細胞内寄生体による動物の細胞の侵入；または（2）ヒト操作による外来または異常な遺伝子の細胞内への導入の結果として導入される外来および/または異常な遺伝子を有する動物。

30

【0065】

免疫動物：免疫量の抗原を有して存在し、それに対する体液性および/または細胞介在性免疫応答を生成する動物。

【0066】

アイソシゾマー：同じ認識配列をそれぞれ有することにより機能的に等価である一組の制限酵素。

【0067】

哺乳動物：（1）特に記載しない限り、個体および集団で、発生の全ての段階（胚段階および胎児段階を含む）で、ヒトを除き；そして（2）脊椎動物の哺乳動物のメンバーである全ての他の動物を包含し、発生の任意の段階（胚段階および胎児段階を含む）における個々の動物を含み、自己調節体温、毛髪、および雌においては授乳哺乳器官により区別される。

40

【0068】

モノクローナル抗体：ハイブリドーマにより産生される、唯一の単離された抗体分子。

【0069】

単一特異性抗体：（1）短い、単離された合成抗原、または（2）短い、単離されたキャリア結合ハプテンにおいて見出される単一のまたは数個のエピトープに対して、免疫学

50

的に応答して産生されるポリクローナル抗体。

【0070】

ポリクローナル抗体：全てが特定の抗原を認識する種々雑多の異なる抗原を包含する組成物。

【0071】

ポリペプチド：アミノ酸残基のポリマー

タンパク質：機能的な、3次元形態に編成された1つ以上のポリペプチドを含む生体分子。

【0072】

組換え合成：生体分子をコードする遺伝物質の自然な導入により、特定の生体分子を指示する生物における合成。

10

【0073】

制限エンドヌクレアーゼ：DNA中の特異的な認識配列各存在位置でDNAを切断するエンドヌクレアーゼ。「制限酵素」と同意語。

【0074】

トランスジーン：動物において天然に存在しない遺伝子。すなわち、人為的な手段により（すなわち、ヒト操作により）、動物に導入される外来または異常な遺伝子。

【0075】

トランスジェニック動物：人為的な手段により（すなわち、ヒト操作により）、1つ以上のトランスジーンが導入されている動物。

20

【0076】

【表 2】

表 2 遺伝子コード

第 1 位 (5'末端)	第 2 位				第 3 位 (3'末端)
U	U	C	A	G	U C A G
	Phe	Ser	Tyr	Cys	
	Phe	Ser	Tyr	Cys	
	Leu	Ser	終止	終止	
	Leu	Ser	終止	Trp	
C	Leu	Pro	His	Arg	U C A G
	Leu	Pro	His	Arg	
	Leu	Pro	Gln	Arg	
	Leu	Pro	Gln	Arg	
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U C A G
	Ile	Thr	Asn	Ser	
	Ile	Thr	Lys	Arg	
	Met	Thr	Lys	Arg	
G	Val	Ala	Asp	Gly	U C A G
	Val	Ala	Asp	Gly	
	Val	Ala	Glu	Gly	
	Val	Ala	Glu	Gly	

10

20

30

本開示を通して、ポリペプチドおよび核酸配列に存在する、アミノ酸残基およびヌクレオチド残基の略号は、それぞれ、米国特許法施行規則（37.C.F.R.）§ 1.822（1993年7月1日に改定された）に記載の通りである。

【 0 0 7 7 】

【表 3】

表 3. REN 認識配列	
REN	認識配列
BamHI EcoRI EcoRV	GGATCC GAATTC GATATC
KpnI NdeI NruI NotI	GGTACC CATATG TCGCGA GCGGCCGC
PstI SacII SalI XhoI XmaI	CTGCAG CCGCGG GTCGAC CTCGAG CCCGGG

(発明の詳細な説明)

本発明は、T細胞レセプターの実質的に制限されたレパートリーを有する非ヒト動物が、慢性関節リュウマチの重篤な古典的症狀を選択的に含む表現型を示すという予期しない発見に基づく。関節炎動物のTCRレパートリーは(例え、制限されていても)、機能的に存続可能である。関節炎動物の制限されたTCRレパートリーはTCRの実質的部分に存在し、TCRは内因性ポリペプチド性関節炎生成自己抗原の1つ以上のエピトープを認識する。好ましい実施態様において、TCRのサブユニットおよびサブユニットをコードするトランスジーン動物のゲノムへの挿入の結果、関節炎動物の制限されたTCRレパートリーを生ずる。TCRのサブユニットおよびサブユニットは、得られるトランスジェニック動物のT細胞中で組み合わされてTCRを形成する。TCRは、ウシ臍臓リボヌクレアーゼ(BPR)のアミノ酸41~61に相当し、そしてアミノ酸配列

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-  
Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号1]

を有するオリゴペプチドの1つ以上のエピトープ、および/またはBPR由来オリゴペプチドの抗原と実質的に交差反応性である、内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原を含有するタンパク質の1つ以上のエピトープを含む抗原に結合する。

【0078】

本発明の非ヒト動物は、ウシ臍臓リボヌクレアーゼのアミノ酸41~61および/または内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原(PASA)の1つ以上のエピトープを認識および/または結合するT細胞レセプターの抗原認識サブユニットのトランスジェニックな発現の結果として、関節炎表現型を有する任意の動物を包含する。このような非ヒト動物としては、脊椎動物(例えば、齧歯類、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、両生類、八虫類など)が挙げられる。好ましい非ヒト動物は、非ヒト哺乳動物種の動物から、最も好ましくは、ラットおよびマウスを含む齧歯類由来の動物から、最も好ましくはマウスから選択される。

【0079】

本発明のトランスジェニック動物は、人為的な手段により(例えば、人間の操作により)、その動物において天然には存在しない1つ以上の遺伝子(例えば、外来遺伝子、遺伝子操作された内因性遺伝子など)が導入されている動物である。人為的に導入される遺伝子はトランスジーンとして公知であり、その動物と同じ種または異なる種由来であり得るが、トランスジーンによって与えられる配置および/または染色体座は、動物において天然には見出されない。トランスジーンは外来DNA配列、すなわち宿主動物のゲノムにおいて通常見られない配列を包含し得る。あるいはまたはさらに、正常な遺伝子のインビボ

10

20

30

40

50

での発現パターンを変更するために、あるいは内因性遺伝子によりコードされる遺伝子産物の生物学的活性を変更または排除するために、トランスジーンはインビボで再編成または変異される点で異常である内因性DNA配列を含み得る。Watson, J.D.ら、「The Introduction of Foreign Genes Into Mice」, Recombinant DNA, 第2版、W.H. Freeman & Co., New York (1992), 255-272頁; Gordon, J.W., Intl. Rev. Cytol. 115:171-229 (1989); Jaenisch, R., Science 240:1468-1474 (1989); Rossant, J., Neuron 2:323-334 (1990)。

#### 【0080】

本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、トランスジーンを非ヒト動物の生殖系列に導入することにより作製される。種々の発生段階の胚の標的細胞が本発明のトランスジーンを導入するために用いられる。胚の標的細胞の発生段階に依存して異なる方法が使用される。

10

#### 【0081】

1. 接合体のマイクロインジェクションは、本発明を実施する間、動物のゲノムにトランスジーンを組み込むために好ましい方法である。接合体は前核融合またはそれに続く細胞分裂を受けていない受精卵であり、トランスジェニックDNA配列のマイクロインジェクションのために好ましい標的細胞である。マウス雄前核は、直径約20マイクロメートルの大きさ、1~2ピコリットルのトランスジェニックDNA配列を含有する溶液の生殖可能な注入を可能にする特徴に達する。トランスジーンを導入するための接合体の使用は、ほとんどの場合、注入されるトランスジェニックDNA配列が最初の細胞分裂の前に宿主動物のゲノムに組み込まれるという利点を有する。Brinsterら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:4438-4442 (1985)。その結果、得られるトランスジェニック動物(創始動物)の全細胞は、トランスジェニック対立遺伝子と称される特定の遺伝子座で、組み込まれたトランスジーンを安定に有する。トランスジェニック対立遺伝子はメンデル遺伝を示す: トランスジェニック動物と非トランスジェニック動物との交配の結果生じる子孫の半分は、メンデルの独立の法則(Mendel's rules of random assortment)にしたがってトランスジェニック対立遺伝子を遺伝する。

20

#### 【0082】

2. ウイルス性組み込みが本発明のトランスジーンを動物に導入するためにまた使用され得る。胚盤胞として公知の発生段階まで、発生胚をインビトロで培養する。この際、割球が適切なレトロウイルスで感染され得る。Jaenisch, R., Proc. Natl. Sci. (USA) 73:1260-1264。割球の感染は、透明帯を酵素的に除去することにより増強される。Hoganら、Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1986)。トランスジーンは、典型的に、複製欠損であるがウイルスに結合性のDNA配列(このようなウイルス配列に結合するトランスジェニックDNA配列を含む)の取り込み能力を残存するウイルスベクターを介して、宿主動物のゲノムに導入される。Jahnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:6927-6931 (1985); Van der Puttenら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:6148-6152 (1985)。トランスフェクションは、トランスジーンを含有するウイルスベクターを産生する単層の細胞上での割球の培養により容易にかつ効率よく得られる。Vander Puttenら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:6148-6152 (1985); Stewartら、EMBO Journal 6:383-388 (1987)。あるいは、感染は、胞胚腔(blastocoele)のような後期の段階で実施され得る。Jahner, Dら、Nature 298:623-628 (1982)。任意の事象において、ウイルス性組み込みによって生成される大部分のトランスジェニック創始動物は、トランスジェニック対立遺伝子についてモザイクである; すなわち、トランスジーンはトランスジェニック創始動物を形成する全ての細胞のサブセットのみに組み込まれる。さらに、多数のウイルス性組み込み事象が単一の創始動物において生じ得、将来の世代の子孫において分離する多数のトランスジーン対立遺伝子を生成する。この方法による生殖系列細胞へのトランスジーンを導入は、可能であるが、おそらく低頻度で生じる。Jahner, Dら、Nature 298:623-628 (1982)。しかし、一旦トランスジーンがこの方法により生殖系列細胞に導入されると、全ての動物細胞において(すなわち、体細胞および生殖系列細胞の両方において)、トランスジェニック対立遺伝子が存在する子孫が生産され得る。

30

40

50

## 【 0 0 8 3 】

3。胚の幹 (ES) 細胞はまた、本発明のトランスジーンを動物に導入するための標的細胞として供し得る。ES細胞はインビトロで培養される移植前の胚から得られる。Evans, M. J. ら、Nature 292:154-156 (1981) ; Bradley, M. O. ら、Nature 309:255-258 (1984) ; Gossler ら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83:9065-9069 (1986) ; Robertson ら、Nature 322:445-448 (1986)。トランスジーンで形質転換されているES細胞は、動物胚盤胞と組み合わせられ得、その後ES細胞は胚に定着し (colonize)、そして得られる動物の生殖系列に寄与し、その動物はキメラである (2つ以上の動物に由来する細胞からなる)。Jaenisch, R.、Science 240:1468-1474 (1988)。さらに、一旦トランスジーンがこの方法により生殖系列細胞に導入されると、全ての動物細胞において (すなわち、体細胞および生殖系列細胞の両方において)、トランスジェニック対立遺伝子が存在する子孫が生産され得る。

10

## 【 0 0 8 4 】

トランスジーンの初めの導入はラマルクの (非メンデル) 事象 (Lamarckian (non-Mendelian) event) であるが、本発明のトランスジーンは生殖系列細胞に安定に組み込まれ、そしてメンデル座 (Mendelian loci) として、トランスジェニック動物の子孫に伝えられる。別のトランスジェニック技術により、ある細胞はトランスジーンを有し、そして他の細胞は有さないモザイクなトランスジェニック動物が生じる。生殖系列細胞がトランスジーンを有しないモザイクなトランスジェニック動物では、トランスジーンの子孫への伝達は生じない。それにも関わらず、モザイクなトランスジェニック動物はトランスジーンに関連する表現型を示し得る。

20

## 【 0 0 8 5 】

トランスジーンは、ヒト疾患についての動物モデルを提供するために動物に導入され得る。このような動物モデルを生じるトランスジーンとしては、例えば、ヒトの遺伝子疾患における先天性代謝異常に関連する変異遺伝子産物をコードするトランスジーン、およびヒトの病原体 (すなわち、細菌、ウイルス、または他の病原性微生物) に対する罹患性を与えるために必要とされるヒトの因子をコードするトランスジーンが挙げられる。Leder, P. ら、米国特許第5,175,383号 (1992年12月29日) ; Kindt, T. J. ら、米国特許第5,183,949号 (1993年2月2日) ; Small, J. A. ら、Cell 46:13-18 (1986) ; Hooper, M. ら、Nature 326:292-295 (1987) ; Stacey, A. ら、Nature 332:131-136 (1988) ; Windle, J. J. ら、Nature 343:665-669 (1990) ; Katz, J. D. ら、Cell 74:1089-1100 (1993)。疾患に感染しやすくなったトランスジェニック動物は、疾患を誘導する組成物を同定するために、および疾患を誘導することが公知である組成物の病原性の可能性を評価するために使用され得る。Berns, A. J. M. 米国特許第5,174,986号 (1992年12月29日)。

30

## 【 0 0 8 6 】

適切な株背景において、本発明のトランスジーンは、トランスジェニック動物に対してそれらが発生するにつれて重篤な関節炎の表現型を与える。トランスジェニックの遺伝子型は、メンデル式に生殖的に子孫に伝達されるが、トランスジェニックの表現型 (すなわち、関節炎) が十分に発現する能力は、異なる遺伝的背景において変化し得る。本発明を実施するにおいて、株の特定の遺伝的背景のために、トランスジェニックの遺伝子型が有害な関節炎表現型を、検出可能なまたは有意な程度まで発現しない株に属する宿主動物中で、本発明のトランスジーンを維持することが望ましい。トランスジーンをメンデル座として維持および遺伝するが、有害なトランスジェニック表現型の発現を減少または阻害されるトランスジェニック動物系統は、トランスジェニック維持系統として公知である。

40

## 【 0 0 8 7 】

本発明を実施する間、トランスジェニック維持系統の動物は、トランスジーンが有害な関節炎表現型を十分に発現する遺伝的背景を有する動物と交配される。本発明のトランスジーンが遺伝した、したがって関節炎を発症する子孫は、本発明のトランスジーンの配列に相当するか、または本発明のトランスジーンによりコードされる独特の配列を含有する生体分子の存在について、子孫由来の遺伝物質を分析することにより、トランスジーンが遺伝しない同腹子から区別される。例えば、本発明のトランスジーンにより単独にコード

50

されるポリペプチドを含む生体液は、このポリペプチドの存在についてイムノアッセイされ得る。トランスジェニック子孫を同定する、より単純で信頼性のある手段は、動物の末端（例えば、尾）から組織サンプルを得る工程、および本発明のトランスジーンの特徴的な部分単数または複数）のDNA配列に対応する核酸配列の存在についてサンプルを分析する工程を包含する。このような核酸配列の存在は、例えば、トランスジーンの特徴的な部分に対応するDNA配列を用いるハイブリダイゼーション（「サザン」）分析、基質としてサンプル中のDNA配列およびトランスジーンDNA配列に由来するオリゴヌクレオチドを用いるPCR反応の産物の分析などにより決定され得る。

【0088】

多様なT細胞レセプター（それぞれが、独特の可変領域を有する および を有する）の動物のコレクションを、TCRレパートリーという。野生型の非抑制免疫系を有する個々の動物（ヒトを含む）において、TCRレパートリーは、免疫系に何百万の異なる抗原を正確に同定する能力を与える。分子遺伝学的技術（例えば、PCR増幅および機能的に再編成されたTCR遺伝子の可変領域をコードするDNA分子の配列決定）は、個々の動物のTCRレパートリーを試験するために使用され得る。Uematsu, Y., *Immunogenet.* 34:174-178 (1991)。同様の方法で、特定の組織または生体液におけるTCRレパートリーが試験され得る。

【0089】

【数1】

Oskenberg, J.R., § , *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:988-992 (1989);

Oksenberg, J.R., § , *Nature* 345:344-346 (1990) および erratum, *Nature*

353:94 (1991); Uematsu, Y., § , *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88:534-538

(1991); Panzara, M.A., § , *Biotechniques* 12:728-735 (1992).

機能的に再編成されたTCRサブユニットをコードする本発明のトランスジーン動物への導入により、TCRレパートリーが実質的にトランスジーンにより発現されたTCRからなる動物が生じる。トランスジェニックTCR動物において、TCRサブユニットについての内因性遺伝子は、対立遺伝子排除として知られる現象により発現されない。Alt, F.W.ら、*Cell* 21:1-12 (1980); Early, P. および Hood, L., *Cell* 24:1-3 (1981)。トランスジェニックマウスにおける機能的に再編成されたTCR 遺伝子の発現は、明らかに、完全なV-D-J連結を阻害することにより、明らかに内因性TCR 遺伝子の発現を防止する。Weaver, D.ら、*Cell* 42:117-127 (1985); Krimpenfort, P.ら、*EMBO Journal* 7:745-750 (1988); Uematsu, Y.ら、*Cell* 52:831-841 (1988)。可変領域を欠損する機能的に再編成されたTCR 鎖のトランスジェニック発現は、内因性TCR 対立遺伝子を抑制し、したがって正常なT細胞の成熟をブロックする。Krimpenfort, P.ら、*Nature* 341:742-746 (1988); Krimpenfort, P. J. A.ら、米国特許第5,175,384号（1992年12月29日）。しかし、機能的に再編成されたTCR 鎖の発現は、内因性TCR 遺伝子の再編成および発現を必ずしも妨げない。Bluthmann, H.ら、*Nature* 334:156-159 (1988); Borgulya, P.ら、*Cell* 69:529 (1992)。したがって、動物における機能的に再編成されたTCR 遺伝子、および可変領域を含む機能的に再編成されたTCR 遺伝子の両方のトランスジェニック発現により、機能的に存続可能な（制限されているものの）TCRレパートリーを有するトランスジェニック動物を生じる。したがって、本発明のトランスジェニック動物では、2つのトランスジーンにコードされるTCRサブユニットからなるTCRが、他のタイプのTCRよりも優勢である。

【0090】

本発明のトランスジーンは、ゲノム供給源由来のDNA配列、またはmRNA鋳型由来のcDNA分子の調製物を単離または増幅することにより、あるいは化学合成または生化学合成により、あるいはそれらを組み合わせることにより得られ得る。本発明のトランスジーン構造部分は、エキソンを含み、エキソンは特定のTCRの サブユニットおよび サブユニットのリーディングフレームの部分を含み、TCRをコードしないイントロンにより隔てられている。イントロンは成熟mRNA分子から除去され、そしてイントロンに対応するアミノ酸配列は、成熟mRNA配列により指示される生合成により生じるタンパク質中には出現しない

10

20

30

40

50

。Chambon, P., Sci. American 244:60-71 (1981)。本発明のトランスジーン構造部分は、可変領域を含む、TCRのサブユニットおよびサブユニットをコードする。この可変領域は、会合したTCR分子において、ウシ脾臓リボヌクレアーゼ(BPR)のアミノ酸41~61に相当し、そしてアミノ酸配列

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-  
Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号1]

を有するオリゴペプチドの1つ以上のエピトープ、および/またはBPR由来オリゴペプチドのエピトープと実質的に交差反応性である、内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原を含有するタンパク質の1つ以上のエピトープを含む抗原に結合する可変領域を構成する。

【0091】

発現されるためには、本発明のトランスジーン構造部分は、機能的編成においてプロモーターと結合されなくてはならない。プロモーターは天然に存在するプロモーターである必要はない。異なるタイプのプロモーターが、異なるレベルの発現を指示し、本発明のトランスジェニック動物において関節炎の程度を調節するために使用され得る。構成的プロモーターが使用されることが望ましい場合、SV40初期プロモーターのようなウイルスプロモーターが好ましい。他のプロモーターは、半構成的または半誘導性であり得、すなわちトランスジェニック動物に特定の誘導性組成物を投与することにより増加され得る基底レベルの発現を有する。真に誘導性プロモーター(すなわち、特定の誘導性組成物が存在する場合にのみ機能するプロモーター)は、発現の厳密なコントロールが所望される場合に用いられ得る。さらなるプロモーター関連調節エレメントは、本発明のトランスジーン

の発現を増強、減少、あるいは一時的にまたは組織学的に制限するために含有され得る。これらの手段によって、本発明のトランスジェニック関節炎動物において生じる関節炎の生化学的特徴、細胞性の特徴、免疫学的特徴、および生物学的特徴は、それらの有用な変異体を生成するために操作または制御され得る。

【0092】

本発明もまた実施し得る免疫学的方法は、ウシ脾臓リボヌクレアーゼのアミノ酸41-61を含むポリペプチド、またはポリペプチド性関節炎生成自己抗原(PASA)を含む単離されたタンパク質、あるいは本発明の単離されたPASA含有タンパク質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を有する合成ポリペプチドでの非ヒト動物の免疫を包含する。あるいは、本発明のトランスジェニック関節炎動物由来のT細胞を非トランスジェニック動物へ移す

ことが、そこでの自己免疫応答を確立するために使用され得る。しかし、これらの免疫学的方法により生成される関節炎動物は、本発明のトランスジェニック関節炎動物よりも再現性および疾患の進行の予測性の程度が低い関節炎の症状を示す。

【0093】

本発明の他の特徴および利点は、実施例および請求の範囲から明らかである。

【実施例】

【0094】

以下の実施例は、本発明を説明するためにのみ供されるものであり、そして本発明を何らかの方法で限定すると解釈されるべきではない。

【0095】

(実施例1: R28TCRサブユニットをコードするトランスジーン構築)

本実施例は、R28細胞によって提示されるT細胞レセプターのおよびサブユニットをコードする単離されたDNA配列ならびにこれに由来するトランスジーン構築物の産生を記述する。

【0096】

(ハイブリドーマR28由来のTCRサブユニットをコードするDNA配列)

R28(非公式にはRNase37ともいう)は、ウシ脾臓RNase(BPR)のアミノ酸41位~61位に対応するオリゴペプチドを注射されたB10.A(4R)マウスに由来するマウスT細胞ハイブリドーマである。Peccoud, J.ら、EMBO Journal 9:4215-4223(1990)。インビトロにおいて、R28に提示されるTCRは、MHC A<sup>k</sup>分子を提示するAPCによって提示される場合、BPR由来オリゴ

10

20

30

40

50

ペプチドに応答する。変異体MHCA<sup>k</sup>分子を提示するAPCを使用する場合、R28は、特徴づけられていないペプチド抗原を、交差反応的に認識する。このペプチド抗原はウシ胎児血清中に存在するか、またはその合成がウシ胎児血清によって促進されるかのいずれかである。しかし、このペプチド抗原はBPRでもBPR由来オリゴペプチドでもない。DeLlabona, P.ら、Eur. J. Immunol. 21:209-213(1991)。

#### 【 0 0 9 7 】

Igサブユニットの多くの異なるV、DおよびJセグメントをコードするDNA配列は、生殖系列DNAにおいて多数の非発現コピーに存在する；TCRサブユニットのセグメントの異なるが類似する集まり(collection)もまた存在する。例えば、マウスゲノムにおいて、TCRサブユニット遺伝子座は、直列に配置されたほぼ同一の2つのC領域を含む。これら領域の各々の前には、1個のDセグメントおよび6個のJセグメントが存在する；TCR座はまた、20~30個のVセグメントを含む。Davis, M.M. およびBjorkman, P.J.、Nature 334:395-402(1988)。動物の発育の間、(TCRについては)異なるV、DおよびJ遺伝子セグメントのランダムな連結、または(TCRについては)異なるVおよびJ遺伝子セグメントのランダムな連結によって、免疫系の個々の細胞において多様な可変領域が作成される。同時または同時期に、1つまたはそれ以上のヌクレオチドが遺伝子セグメントの接合点で挿入され、このことが可変領域をコードする遺伝子セグメントにおいてさらなる多様性を生み出す(特に、TCR可変領域の場合)。Sakano, H.ら、Nature 280:288-294(1979)；Early, P.ら、Cell 19:981-992(1980)；Davies, M.M. およびBjorkman, P.J.、Nature 334:395-402(1988)。

#### 【 0 0 9 8 】

TCRの鎖および鎖の両方の機能的に再編成された可変および連結領域を、標準的な手順にしたがってクローン化および配列決定した。機能的に再編成されたTCRまたはIgサブユニット遺伝子は、DNA再編成が機能的なTCRまたはIgサブユニット、すなわち、V-D-J連結事象(大きなサブユニット)またはV-J連結事象(小さなサブユニット)、および/または体細胞変異によって、リーディングフレームが変化しているか、または停止コドンがリーディングフレーム中に導入されているので、生合成の間、成熟前には終止しないサブユニットをコードする発現された遺伝子を生じているものである。TCRサブユニットの可変領域はT細胞ごとに变化するが、定常領域は同じままである。したがって、TCRサブユニットおよびTCRサブユニットの可変領域のアミノ酸配列の決定は、これらサブユニットの定常領域の既知のアミノ酸配列と組み合わせさせて、独特な機能的TCR分子を規定する。Kappler, J.ら、Cell 35:295-302(1983)；Sim, G.K.ら、Nature 312:771-775(1984)；Acuto, O. およびReinherz, E.L.、New England J. Med. 312:1100-111(1985)；Yague, J.ら、Nucleic Acids Res. 16:11355-11364(1988)。

#### 【 0 0 9 9 】

R28由来のTCRのサブユニットの可変領域をコードするDNA配列の解析により、TCR可変配列がV1に由来し、そしてTCR可変配列がV6に由来することが明らかになる(図1、パネルAおよびB)。TCR可変領域の独特なアミノ酸配列[配列番号5]およびTCR可変領域の独特なアミノ酸配列[配列番号7]は、治療用組成物の設計に有用である(下記参照)。R28TCRサブユニットの可変領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列[配列番号4および6]に対する等価物は、標準的な遺伝コード(表2)にしたがって、等価な、すなわち、互いに同じアミノ酸残基をコードするコドンを置換することによって生成される。

#### 【 0 1 0 0 】

(トランスジーン の 構造)

2つのDNAフラグメント(プラスミドpaKRNおよびpbKRN由来)を使用してKRNトランスジェニック株を作成した。両方のプラスミドは、ハイブリドーマR28から最初に誘導されたDNA配列を含む。Peccoud, J.ら、EMBO Journal 9:4215-4223(1990)。TCRの鎖および鎖の両方の機能的に再編成された可変および連結領域を、カセットベクターの適切な部位に挿入した。このカセットベクターは、機能的に再編成されたTCR可変領域のTCRサブユニット遺伝子への適切な挿入を可能にするよう設計される。TCRサブユニット遺伝子は、トラン

スジェニックマウスへの導入の際に、マウス発現配列に作動可能に連結される。

【0101】

得られたプラスミドpaKRNおよびpbKRNの構造を、それぞれ、図1Aおよび1Bに、各TCRサブユニットの可変領域をコードする機能的に再編成された遺伝子フラグメントの正確なヌクレオチド配列とともに示す。各プラスミドは、特定のTCRサブユニットおよびマウスにおけるコード配列の発現に必要なシグナルをコードするDNA配列を含む。サブユニットの遺伝子はpaKRNに含まれる；pbKRNはサブユニットの遺伝子を含む。具体的には、paKRNは、TCR V プロモーター領域、R28から単離されたV 4可変領域および連結セグメントをコードするエキソン、成熟mRNAには存在しないイントロン、C 定常領域をコードするエキソン、および3'側に隣接するDNA配列(ポリアデニル化シグナルおよび他の3'側発現シグナルを含む)を含む。プラスミドpbKRNは、基本的には、同じ構造を有し、そしてTCR V プロモーター領域、R28から単離されたV 6可変領域および連結セグメントをコードするエキソン、成熟mRNAには存在しないイントロン、C 定常領域をコードするエキソン、ならびに3'側に隣接するDNA配列(ポリアデニル化シグナルおよび他の3'側発現シグナルを含む)を含む。

10

【0102】

プラスミドpaKRNまたはpbKRNのいずれかを含む*Escherichia coli*細胞を、ブダベスト条約の下に、Collection Nationale de Culture de Micro-organismes(CNCM) of the Institut Pasteur(28, Rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)に、1994年5月18日に寄託し、そしてそれぞれ受託番号I-1413およびI-1414が割り当てられた。本出願に対する特許証の発行後に、ブダベスト条約ならびに適用され得る米国特許法および施行規則に従い、CNCMより請求人はこれらプラスミドの入手が可能になる。これらの寄託は、本発明を実施するためのライセンスではなく、寄託が米国または他のいかなる国の特許法の要件を満たすために必要であることの承認を意図しない。

20

【0103】

(実施例2：トランスジェニックTCRマウス株の構築)

本実施例はトランスジェニックマウスの構築を記述する。このトランスジェニックマウスは、実質的に、KRNトランスジェニック対立遺伝子によりコードされるTCR サブユニットとTCR サブユニットとからなるTCR集団(population)を有する。KRNトランスジェニックマウスは、機能的に生存可能ではあるが制限されたTCRレパトリーを有する。

30

【0104】

(マウスゲノムへのトランスジーン導入)

マイクロインジェクションにおける使用に適したDNA分子を作成するために、原核宿主細胞におけるプラスミドpaKRNおよびpbKRNの維持のためだけに必要なこれらプラスミドのDNA配列を除去することが必要であった。このことを、制限エンドヌクレアーゼSall(paKRN)またはKpnI(pbKRN)でこれらのプラスミドを処理すること、および予備的なアガロースゲル電気泳動および電気溶出によって、それぞれ、関連するSallまたはKpnI制限フラグメント(図1)を単離することによって達成した。制限フラグメントをフェノール-クロロホルムで2回抽出し、エタノールで沈澱させ、そして再懸濁した。

40

【0105】

TCR トランスジーンおよびTCR トランスジーンを含む単離された制限フラグメントを、トランスジェネシス(transgenesis)の標準的な手順にしたがって、B6 x SJLF2胚に注射した。Hogan, B.ら、Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1 ~ 332頁(1986)。マウス受精卵を、数時間前に雄と交尾した過剰排卵の雌性B6 x SJL F1の卵管から卵丘として回収した。TCR トランスジーンおよびTCR トランスジーンを、各受精卵の最も接近しやすい前核に注射した。マイクロインジェクトした卵を、母体としての1日偽妊娠(one-day pseudopregnant) Swiss雌里親の卵管に移植し、そして出産まで保持させた。

【0106】

誕生から数週間後、トランスジェニック創始体(founder)を、子の尾生検から単離され

50

たDNA分子を用いてサザンハイブリダイゼーションによって同定した。創始体マウスは、TCR サブユニットおよびTCR サブユニットの両方の遺伝子の組み込まれたコピー (integrated copy) を含むゲノムを有し、そしてこの創始体マウスをC57B1/6マウスと交配して、KRNトランスジェニックマウス株を確立した。

【 0 1 0 7 】

(トランスジーンの伝達)

トランスジーンの本 Mendel の法則による伝達 (Mendelian transmission) を、トランスジェニックマウスを非トランスジェニックマウスと交配することにより達成する。代表的には、C57B1/6マウスとの戻し交配であるが、他の系統も使用する。トランスジーン陽性子孫を、V<sub>H</sub> 6セグメントに対する試薬を用いる末梢血リンパ球のサイトフルオリメトリック分析 (下記参照)、または核酸ハイブリダイゼーションアッセイによって、型どおりに同定する。ハイブリダイゼーションアッセイには、それぞれの同腹子からの生物学的サンプルを得る (代表的には、そのマウスの尾の末端0.5~1.0cmを物理的に分離することによる) 工程、尾のサンプルをホモジェナイズまたは抽出する工程、それらに由来するDNA分子を精製または増幅する工程、得られたDNA分子をEcoRV制限エンドヌクレアーゼで消化する工程、制限されたDNA配列を電気泳動的に分離する工程、制限され、分離されたDNA配列をフィルターに移し結合させる工程、およびフィルターに結合したDNA配列を、検出可能に標識した核酸プローブでハイブリダイズする工程が含まれる。ここで、この核酸プローブは、paKRN由来の約0.7kbのXmaI-NotIフラグメントからなる (図1A)。さらに、またはあるいは、pbKRN由来の約0.5kbのXhoI制限フラグメントを、検出可能に標識し、そしてトランスジェニック子孫のためのプローブとして使用し得る。

【 0 1 0 8 】

同腹のKRN子孫のハイブリダイゼーションアッセイの代表例を図2に示す。トランスジーン伝達の伝達は Mendel の法則に従う；子孫の半数がトランスジーンについて陽性である。

トランスジーンおよび トランスジーンは、マウス染色体上で極近傍に連鎖しており、そしてそれぞれのトランスジェニックDNA配列のマイクロインジェクション後に、同時に組み込まれたようである。TCRの トランスジーンおよび トランスジーンを含む染色体座をKRNトランスジェニック対立遺伝子と呼ぶ。

【 0 1 0 9 】

(KRNトランスジェニック対立遺伝子の発現)

いくつかの種類 (line) の証拠により、 トランスジーンおよび トランスジーンが、ともに、トランスジェニックマウスのリンパ球において高い比率で発現すること、およびトランスジーンによりコードされたTCRサブユニットからなるT細胞レセプターが、トランスジェニック動物において、圧倒的な数の制限されたTCRレパートリーであることが示される。

【 0 1 1 0 】

(TCR の発現) トランスジーンによりコードされるTCR サブユニットの発現を、2つの方法により示した。

【 0 1 1 1 】

第1に、TCR レパートリーの無作為サンプリングを達成するために、リンパ節細胞由来のTCR 転写物を、縮重オリゴヌクレオチドを使用するPCR反応によりひとまとめに増幅した。Candeais, S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:6167-6170 (1991)。増幅した転写物に対応するPCR産物を、M13バクテリオファージベクター中にクローン化し、そしてTCR サブユニットに対応するcDNA配列を含むプラークを、検出可能に標識した、C<sub>H</sub>1に特異的な核酸プローブを用いるハイブリダイゼーションによって明らかにした。ここで、このC<sub>H</sub>1に特異的な核酸プローブは、以下に示される、共有されるC<sub>H</sub>1定常領域由来のDNA配列を含む：

TTTGTGGTATTGGAAGGGCCAGAGCACAGAAGTACACG [配列番号8]。

TCR のcDNAクローンの中で、トランスジーンがコードする転写物に対応するクローンを、検出可能に標識した、トランスジーンに特異的な核酸プローブを用いるハイブリダイゼ

10

20

30

40

50

ーションによって検出した。このトランスジーンに特異的な核酸プローブは、paKRN(図1A)に由来する約0.7kbのXmaI-NotIフラグメントからなり、そしてpaKRNに含まれる機能的に再編成されたV-J連結領域に対応し、TCR 可変領域をコードするトランスジーンに由来するcDNA配列と特異的にハイブリダイズする。C に特異的なプローブを用いるハイブリダイゼーションによって検出されたクローンのうち、97%はまた、トランスジーンに特異的なプローブを用いるハイブリダイゼーションによって検出された。この結果は、トランスジーンがコードするTCR サブユニットに対応するmRNA配列が、トランスジェニック動物における大多数のTCR 転写物を説明することを示す。

#### 【0112】

第2に、抗イディオタイプ血清を、トランスジェニックリンパ節細胞を用いる免疫化によって正常マウスに惹起した。抗イディオタイプ血清はポリクローナル抗体を含む。このポリクローナル抗体は、KRNトランスジェニックマウス由来の支配的なTCRの可変領域中またはその近傍に見出されるエピトープを認識する。

#### 【0113】

ハイブリドーマR28のTCRに対する抗イディオタイプ血清の特異性を、この血清が、Tハイブリドーマ、およびR28または他のT細胞(例えば、KLy11.10、TrisおよびBDC2.5)由来のTCRの鎖および鎖を発現するトランスフェクトされた細胞を特異的に認識および染色したことを示すことによって立証した。CD4<sup>+</sup>リンパ球を、標準的な方法にしたがって、野生型マウスおよびKRNトランスジェニックマウスから単離した。Wysocki, L.J. および Sato, V.L., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75:2844-2848 (1978); Wasik, M.A. および Morimoto, C., J. Immunol. 144:3334-3340 (1990); Harriman, G.R. ら, J. Immunol. 145:4206-2414 (1990); Koulova, L. ら, J. Immunol. 145:2035-2043 (1990)。CD4<sup>+</sup>リンパ球を、飽和用量の抗イディオタイプ血清とともに、4 で15分間インキュベートし、洗浄し、そして検出可能に標識した(すなわち、FITCへの結合により蛍光的にタグを付した)ヤギ抗マウス抗体とともに、45分間4 でインキュベートした。洗浄後、細胞を、1%ホルムアルデヒドで固定し、そして自動蛍光活性化セルソーター(例えば、Becton-Dickinson社のFACScan<sup>(R)</sup>)を通過させることによって分析した。Kung, P.C. および Goldstein, G., 米国特許第4,381,295号(1983年4月26日)、第4,364,932号および第4,364,936号(共に、1982年12月21日)。サイトフルオリメトリック分析により、抗イディオタイプ血清が、トランスジェニックマウスにおいて大部分のCD4<sup>+</sup>リンパ球と反応するが、コントロールの動物由来のCD4<sup>+</sup>リンパ球とは低強度でしか反応しないことを示す(図3、パネルA)。

#### 【0114】

(TCR の発現) KRNマウスにおけるTCR 鎖のトランスジーンを発現を、CD4<sup>+</sup>リンパ球のサイトフルオリメトリック分析によって立証した。RR4.7モノクローナル抗体(Pharming社(San Diego, CA)から市販; カタログ番号01361C)を使用した。このモノクローナル抗体は、機能的に再編成されたトランスジーンに存在するV遺伝子セグメント(V6)によってコードされるアミノ酸配列を認識する。RR4.7モノクローナル抗体との反応によって示されるように、V6は、トランスジェニックマウスにおいて本質的にすべてのCD4<sup>+</sup>リンパ球に存在した(図3、パネルB)。このアッセイを使用して、混ざった同腹子の中のトランスジーン陽性動物を同定し得る。

#### 【0115】

R28 TCRの鎖および鎖からなるTCRによって与えられる抗原特異性を、末梢リンパ節細胞において検出し得る。リンパ節T細胞を、以下のアミノ酸配列を有するBPR由来オリゴペプチドおよびMHC分子を発現するAPCの存在下でインキュベートした場合、細胞の強力な増殖を検出した:

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号1]。

#### 【0116】

(実施例3: トランスジェニック関節炎マウスの単離および特徴付け)

本明細書中で記載する関節炎の新規なトランスジェニックモデルは、この目標に対して

10

20

30

40

50

行われた努力の結果ではなかった。T細胞レパトリーの選択に付随する根本的な免疫学の問題に取り組むために、トランスジェニックマウスのKRN株を、マウスに、遺伝子を導入することによって構築した。この遺伝子は、ウシ膵臓RNAaseに反応性のマウスT細胞ハイブリドーマ由来の抗原に対するT細胞レセプター(TCR)のサブユニットおよびサブユニットをコードする。KRNトランスジーンを最初に導入されるマウスの系統C57B1/6の遺伝的背景において、このトランスジーンは異常な表現型を与えなかった。もちろん、それらの制限されたTCRレパトリーのために、これらマウスは、少なくとも、研究室環境において低い頻度で遭遇する病原体に対して適切な免疫応答を高める能力が減少し得る。

#### 【0117】

次いで、C57B1/6KRNトランスジェニックマウスを、同系交配のNOD系統のマウスと偶発的に交配させた。驚くことに、この交配によるトランスジーン陽性子孫は、すべて、ヒトのRAに関連する重篤な症状(すなわち、四肢関節の慢性炎症および変形)を発症する。NODKRNトランスジェニック動物におけるこの疾患の浸透度は100%である。すなわち、図5に示されるように、KRNトランスジーン対立遺伝子を受け継ぐいずれのNODマウスも関節炎を発症する。雄も雌と同様に影響を受ける。トランスジェニックマウスがNOD背景を有さない場合、関節炎を発症せず(図5、KRN×B6)、そしてこのようなマウスをトランスジーン維持動物として使用する。

#### 【0118】

(関節炎の臨床経過)

関節炎遺伝子型の浸透度に必要とされるKRNトランスジーンおよびNOD由来MHC遺伝子を有するマウスにおける関節炎の進展(下記参照)を、関節炎動物の足首関節の太さのカリパス測定(calliper measurement)、すなわち、炎症プロセスの開始および展開(evolution)と良く相関する測定値を与える簡単なアッセイによって追跡した。トランスジェニック関節炎マウスは関節の炎症の徴候を示す。この徴候は、3週齢と4週齢との間で鮮明に始まり、この時期以前には、臨床徴候は明らかではない(図4B)。遠位関節(distal joint)は、膝または肘より影響されるようである。この関節は、赤く腫れ上がる;変形は2~3週間後に始まり、肢の運動性が減少するという予想される結果を伴う(図4A参照)。この状態は数週間持続する。10~12週間後、炎症の症状はいくらか治まるが、主要な後遺症である変形は持続する。

#### 【0119】

関節炎がもたらす運動性の重大な減少のために、NOD KRNトランスジェニックマウスは養育が下手である。しかし、NOD KRNトランスジェニックの親から同腹子を得ることは可能である。実際、関節炎の動物を、C57B1/6背景のマウス(この場合、関節炎の症状は発現しない)においてKRNトランスジーンを維持し、そしてトランスジーン陽性マウスをNODマウスと交配させることによって作成する。この交配から得られるすべてのKRNトランスジーン陽性の子孫動物は、関節炎を発症し、そして症状の発生の前に核酸ハイブリダイゼーションまたはサイトフルオリメトリック分析によって同定される。

#### 【0120】

(ラジオグラフィー)

ラジオグラフィー(x線像影)を、個々のNODKRNトランスジェニック動物および非トランスジェニック同腹子について、トランスジェニック動物における疾患の発生後種々の時間に実施した。骨および軟骨の侵食は、膝および足首で明瞭に見える(図6)。これは、外部から見るのが可能なひどい変形を反映する(図4のパネルAと比較せよ)。骨腫症(osteophytosis)を伴う骨接合が広がっている。より高齢の動物では、関節の顕著な再編成が存在する。これは外部から見るのが可能な変形に一致する。x線写真では、脊柱もまたいくらか影響を受けているようである。

#### 【0121】

(組織病理学)

正常なマウスまたは関節炎(KRNトランスジェニックNOD)マウスの関節を、標準的で通常の病理学技術に従いヘマトキシリン-エオシンを用いて染色した後、脊椎、膝または足の

10

20

30

40

50

関節の脱石灰化パラフィン切片の組織学的検査によって検査した。Stevens, A., Theory and Practice of Histological Techniques, Bancroft, J.D. および Stevens, A. 編、第3版、Churchill Livingstone, Edinburgh, New York、107～118頁(1990)。トランスジェニック関節炎マウスには、RA患者において平行して発症する関節の炎症の非常に明らかな徴候がある：関節における、大きな滑膜細胞(synoviocyte)の数重にも重ね合わさった層を伴う滑膜過形成、多形性細胞の浸潤(顆粒球、リンパ球、形質細胞)、フィブリン性滲出物。軟骨の侵食、破壊および再吸収は、疾患の2～3週間後に優勢である。また、病変は遠位関節で支配的であり、膝では明らかであるがより低い活性であり、そして臀部では非常に離散的である。脊椎もまた、炎症性浸潤物によって影響されるが、その影響は穏やかである。3週齢前には組織学的病変は存在しない。

10

## 【0122】

炎症または浸潤が検査した他の器官では検出されなかったことに注目することは重要である。要するに、トランスジェニック関節炎マウスにおける自己免疫応答は重篤であるが、RAのように、滑膜組織、特に軟骨に限定される。したがって、本発明のトランスジェニック関節炎動物モデルは、RAの以前に記述された動物モデルとは異なり、ヒトRAの特色づける特徴を忠実に再現する。

## 【0123】

(KRN表現型の要件)

トランスジェニック関節炎の最初の観察は、F1マウスにおいてなされた。このF1マウスは、C57B1/6背景にKRNトランスジェニック対立遺伝子を有するマウスと同系交配NOD/Ltマウスとの間での交配から生ずる。得られたKRNトランスジェニックNOD動物は、ゲノム中の各遺伝子座に混ざり合った対立遺伝子を有する。この混ざり合った対立遺伝子は、等しく寄与するNOD/Lt親からの対立遺伝子とC57B1/6親からの対立遺伝子とからなる。KRNトランスジェニック対立遺伝子は、C57B1/6背景に存在する場合、いかなる関節炎の症状も生じさせないので、NODゲノム由来の遺伝要素(すなわち、1またはそれ以上の対立遺伝子)は、KRNトランスジェニック対立遺伝子による関節炎の誘導に寄与する。

20

## 【0124】

必要なNOD対立遺伝子を同定するために、非NODKRNトランスジェニックマウスを、B6.NH-2<sup>n<sup>o</sup>d</sup>系統のマウス(H.Kikutani博士の寄贈)と交配させた。B6.NH-2<sup>n<sup>o</sup>d</sup>系統は、NOD系統マウスとB6系統マウスとに由来するキメラ系統である。B6.NH-2<sup>n<sup>o</sup>d</sup>マウスにおいて、すべての遺伝子座は、NOD系統マウスに由来するMHC座を除いて、B6と同じ対立遺伝子を有する。関節炎疾患は、非NODKRNトランスジェニックマウスとB6.NH-2<sup>n<sup>o</sup>d</sup>マウスとの交配からの後代(progeny)において発現した。この後代は、KRNトランスジェニックマウスとNODマウスとのコントロール交配の場合と同様に、同じ罹患率および特徴を有する(図5、それぞれ、KRN×B6.NH-2<sup>n<sup>o</sup>d</sup>およびKRN×NOD)。これに対し、KRNトランスジェニックマウスとB6マウスとの間の交配の子孫は、関節炎ではなく(図5 KRN×B6)、試験した他の遺伝的組み合わせでは(すなわち、B10.D2、B10.M、B10.S、B10.BR、B10.A、およびB10.A(4R)系統由来のKRNトランスジェニックマウスの交配では)関節炎疾患は見られなかった。

30

## 【0125】

したがって、KRNトランスジェニック対立遺伝子から生じる関節炎疾患は、異なるマウス系統の特定のMHC座によって提供される遺伝要素のために、十分に発現される。特に、NOD系統マウスのMHC座はKRN表現型の十分な発現を生じる。他の系統のマウスのMHC座、または他の動物(ヒトを含む)のMHC座は、KRN表現型を可能にする能力についてマウスモデルにおいて試験可能である(下記参照)。したがって、本発明は、本発明の実施に使用し得るさらなる非NOD由来MHC座を同定および単離する方法を提供する。

40

## 【0126】

(トランスジェニック関節炎マウスの免疫学)

KRNトランスジェニックNODマウスにおいて関節炎を導くトランスジェニック対立遺伝子の真の性質は、この疾患および(類推による拡張によって)RAにおけるTリンパ球の決定的役割を暗示する。確かに、トランスジェニック関節炎マウスの中枢T細胞集団および末梢

50

T細胞集団の拡大したクローン排除が、この動物の発育の間に生じる。クローン排除のメカニズムは、誕生の頃非常に活性である；CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞は、この時期の末梢リンパ様器官には、もしあっても、ほとんどない。年齢と共にT細胞の脱落は、いくらか和らぐ傾向があり、そしてCD4<sup>+</sup>リンパ球は、約3週齢の動物において脾臓およびリンパ節に現れる。

#### 【0127】

トランスジェニック関節炎マウスの免疫系のB細胞成分は、ほとんど影響を受けない。B細胞の数および分布は相対的に正常である。しかし、循環性IgGのアイソタイプには不均衡がある。KRNトランスジェニックNODマウスにおけるIgG1アイソタイプは顕著に増加している。リュウマチ様因子(すなわち、IgG抗体の定常領域に対する抗体)は、トランスジェニック関節炎マウスにおいて検出されていない。しかし、2ヶ月または3ヶ月後、多くのKRNトランスジェニックNODマウスの脾臓およびリンパ節は、おそらくは、この動物の定常的な炎症状態にตอบสนองして、全体的に肥大している。

10

#### 【0128】

(実施例4：抗関節炎組成物を評価する方法)

本発明のトランスジェニック関節炎マウスにおける関節炎の信頼できそして再現性の性質、およびヒト慢性関節リュウマチに対するその明らかな関係のために、本発明のトランスジェニック動物は、開発途中の抗関節炎組成物の安全性および効力を推測するために使用される。抗関節炎組成物は、臨床発現の開始に先立って、またはこの疾患は進展しているが治療不可能な関節の破壊および変形は起きる前に投与される。

20

#### 【0129】

(治療的な免疫介入)

KRNトランスジェニックNOD関節炎マウスを、抗CD4抗体(ヒトにおいてRAの症状を軽減する見込みがいくらかあると示されている組成物)で処置した。Moreland, L.W.ら、Arthritis Rheum. 36:307-319(1993)。処置された動物および非処置コントロール動物における関節炎の進展を、3日ごとにマウスを臨床的に検査することによってモニターした。図7に示されるように、トランスジェニック関節炎マウスを2週齢からの抗CD4抗体で処置することにより、病理学的発現の出現が予防された。

#### 【0130】

本発明の動物モデルは、他の可能性のある抗関節炎組成物を評価するために使用される。可能性のある抗関節炎組成物には、グルココルチコイド、リンホカイン、インターフェロン、サイトキニンと抗体との接合体、CDタンパク質、MHCタンパク質、CDタンパク質およびMHCタンパク質の誘導体、ならびにMHC分子による抗原提示、MHC提示抗原のTCR認識、および/またはMHC分子とCDタンパク質との間の相互作用に影響する合成化合物または単離されたエフェクター生体分子が含まれるが、これらに限定されない。本発明のトランスジェニック関節炎動物は、予想可能な様式で関節炎の症状を発症するので、本発明の動物モデルにおいて試験される抗関節炎組成物の種々の効果を、以前可能であった様式より厳格な様式で試験し得る。

30

#### 【0131】

抗関節炎組成物は、炎症を予防することによって、炎症応答を制限することによって、または炎症に続いて生じる組織の破壊を制限することによってその効果を達成し得る。抗関節炎組成物を本発明のトランスジェニック動物に規定された生後の時点に投与することにより、この組成物が関節炎の初期段階または後期段階でその効果を発揮するかが明らかになる。例えば、炎症を予防する抗関節炎組成物は、炎症応答が始まった後に投与された場合、続発性の組織破壊を予防する抗関節炎組成物とは異なり、効果的ではない。

40

#### 【0132】

抗関節炎組成物の効力を、本発明のトランスジェニック関節炎動物において、炎症および/または治療不可能な関節破壊および四肢の変形の開始時期および/またはその程度の統計学的に有意な遅延を引き起こすことに関して評価する。本発明のトランスジェニック関節炎動物の細胞性免疫学的パラメータ(例えば、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>細胞の数および分布また

50

は特定のTCRまたはIg分子の数または分布)の変化を、抗関節炎組成物への応答において、治療的免疫介入の基礎となるメカニズムを解明するために測定する。

【0133】

(遺伝子治療)

抗関節炎の可能性のある遺伝子産物(ポリペプチドを含む)をコードするDNA配列を含有するトランスジーンを、マウスのゲノムに導入する。抗関節炎トランスジェニック創始体動物の子孫を、抗CD4または別の抗関節炎剤で処置したトランスジェニック関節炎マウスと交尾させることによって、本発明のトランスジェニック抗関節炎動物モデルに、候補となる抗関節炎トランスジーンを導入する。このことによって、トランスジェニック関節炎マウスに、活発に交尾プロセスを企てるに十分な運動性を与える。あるいは、候補となる抗関節炎トランスジーンを、NOD系統のマウス個体のゲノムに導入し、そしてNOD創始体の子孫を、非関節炎KRNトランスジェニックマウスと交尾させ、そして一重トランスジェニック子孫および二重トランスジェニック子孫における関節炎症状の発症をモニターし、そして比較する。抗関節炎性DNA配列は、抗関節炎性DNA配列の非存在下で関節炎を発症するトランスジェニック関節炎動物において発現した場合、炎症を減少させるか、遅らせるか、または生じさせないものであるか、または炎症に続く続発性の組織破壊を制限または排除するものである。

10

【0134】

(実施例5：関節炎生成組成物の評価方法)

マウスのNOD系統由来のMHC遺伝子座を有するKRNトランスジェニックマウスでは、全てのトランスジェニックマウスが関節炎になる。KRNトランスジェニック対立遺伝子が関節炎を誘導できないマウスの系統由来のMHC遺伝子座を有するKRNトランスジェニックマウスを用いて、関節炎生成能について組成物を評価した。KRNトランスジェニック対立遺伝子の関節炎の可能性を増大する組成物は、本発明の動物モデルにおいて関節炎生成性である。このような組成物は、グルココルチコイド、リンホカイン、インターフェロン、サイトトキシンと抗体との結合物、CDタンパク質、MHCタンパク質、CDタンパク質およびMHCタンパク質の誘導體、およびMHC分子による抗原提示、MHC提示抗原のTCR認識、および/またはMHC分子とCDタンパク質との間の相互作用に影響する合成化合物または単離されたエフェクター生体分子を包含するが、これらに限定されない。ヒトの雌においてより優勢であり得、したがってそこでRAの増加した発病率に関係することが示唆されている(Fox, H.S.ら, J. Immunol. 146: 4362-4367 (1991))単離されたエフェクター生体分子(例えば、インターフェロン)を、他の性差に起因する影響を除去するために、本発明の雄および雌の両方のトランスジェニック非ヒト動物において試験する。

20

30

【0135】

関節炎生成組成物はまた、MHCタンパク質をコードするトランスジーンを含む。ここで、トランスジーンにより発現されるDNA配列は、ヒトを含む動物のMHC遺伝子座に由来する。いくつかのMHCタンパク質が、自己免疫疾患の発生に影響し、そして特異的な変異体MHC対立遺伝子が、特定のヒト自己免疫疾患のより高い危険性と相関することが示されている。ヒトにおいては、MHC抗原がHLA(ヒトリンパ球抗原)タンパク質として知られ、例えば、HLA-DR4対立遺伝子を有する個体は、他のHLA変異体を有する個体よりも6倍も慢性関節リウマチになりやすい。Steinman, L., Sci. American 269: 106-114 (1993)。エルジニア関節炎および硬直性脊椎炎は、HLA-B27対立遺伝子と相関が高い。Vaughan, J.H., Immunological Diseases, 第II巻, 第3版, Samter, M. 編, Little, Brown and Company, 1029-1037頁(1978)。

40

【0136】

トランスジェニックマウスを用いた実験により示されたように、マウスT細胞レポーターは、ヒトMHC遺伝子産物(HLAタンパク質)を完全に使用し得る。Kievits, F.ら, Nature 329: 447-449 (1987)。ヒト由来の特定のHLA分子をコードするDNA配列が単離され、そしてマウスゲノム内への導入およびマウス細胞内での発現が可能であるように遺伝的に操作される。マウスにおけるヒトMHC遺伝子産物の利用は、<sub>2</sub>-マイクログロブリンタンパ

50

ク質分子の共存を必要とし；したがって、ヒト  $\beta_2$ -マイクログロブリンをコードするDNA配列が、同様に遺伝的に操作される。Kievits, F.ら, Nature 329: 447-449 (1987)。トランスジーンは、マウスのゲノムに導入され、そして二重トランスジェニック (MHCおよび  $\beta_2$ -マイクログロブリン) 元祖の子孫を非関節炎KRNトランスジェニックマウスと交配する。二重トランスジェニック (MHCおよび  $\beta_2$ -マイクログロブリン) および三重トランスジェニック (MHC、  $\beta_2$ -マイクログロブリン、およびKRN) の子孫を、MHC、  $\beta_2$ -マイクログロブリン、およびKRNトランスジーン DNA配列に由来するプローブを用いて、上記のハイブリダイゼーションアッセイにより同定する。三重トランスジェニックの子孫における関節炎症状の発生および進展をモニターし、そして二重トランスジェニックおよび非トランスジェニックの同腹子のそれと比較する。

10

## 【0137】

関節炎生成DNA配列は、トランスジェニック関節炎動物において発現される場合、その動物は関節炎生成DNA配列の非存在下では関節炎を進展させず、KRN表現型の部分的または全体的な発現をもたらすDNA配列である。本発明の方法により試験され得るDNA配列は、ヒトHLA-B27、HLA-DR4、およびヒトMHCタンパク質をコードする他の遺伝子 (ヒト  $\beta_2$ -マイクログロブリンをコードするトランスジーンと組み合わせて) (Kievits, F.ら, Nature 329: 447-449 (1987)) のDNA配列、ならびに、試験されるMHC対立遺伝子に寄与する動物種に適切な  $\beta_2$ -マイクログロブリン遺伝子と組み合わせた、長期間の可動性の保証が必要とされる動物 (例えば、競走馬) 由来のMHC対立遺伝子を包含するが、これらに限定されない。本発明の動物モデルは、特定のMHC対立遺伝子と種々の形態のヒト関節炎との間で観察される相関の基礎をなす細胞機構および分子機構を決定するための基礎を提供する。例えば、HLA-B27によりコードされるヒトMHCタンパク質は、ヒトにおけるいくつかのタイプの関節炎と関係しており (Vaughns、前出)、そしてマウスにおいてトランスジェニックで発現する場合、マウスTCRに対する抗原を提示し得る (Kievitsら、前出)。このアプローチは、少なくともも機構的な意味で、特定のヒトMHC対立遺伝子と関節炎疾患との間の相関を決定するよりも満足がいく。

20

## 【0138】

関節炎生成組成物の能力は、本発明のトランスジェニック関節炎動物における、関節炎発生の時点で統計的に有意な増進を生じること、および/または炎症程度の増大、および/または不治の関節破壊および四肢の変形に関して評価される。あるいは、またはさらに、関節炎生成組成物の能力は、本発明のKRNトランスジェニック非関節炎動物における関節炎または関節炎症状の発病率の統計的に有意な増大に関して評価される。関節炎生成組成物に応答して、本発明のトランスジェニック動物の細胞性免疫学的パラメーター (例えば、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>細胞の数およびおよび分布、あるいは特定のTCRまたはIg分子の数および分布) の変化が、治療的免疫介入 (immunointervention) の基礎をなす機構を解明するために測定される。

30

## 【0139】

(実施例6：内因性ポリペプチド性関節炎生成自己抗原に結合する免疫系成分の単離)

本実施例は、本発明のトランスジェニック関節炎マウスにおいてトランスジーンにコードされたTCRにより認識されるペプチド抗原を単離する方法を記載する。これらのポリペプチドは、本発明のトランスジェニック関節炎動物の免疫系から、ポリペプチド性関節炎生成自己抗原 (PASA) を含有するマウスタンパク質の1つ以上のエピトープと特異的に結合する細胞およびエフェクター生体分子を単離するために用いられる。単離された細胞およびエフェクター生体分子は、PASA含有タンパク質をヒトを含む他の動物種から単離するために用いられる (実施例7)。

40

## 【0140】

(関節炎動物においてAPCにより提示されるオリゴペプチド) 今後の実施例に不可欠なものは、関節炎の病因の間、本発明のトランスジーンにコードされるTCRに提示される内因性ポリペプチド抗原の同定である。このために、抗原提示細胞 (APC) が、関節炎症状の進展の前およびその間の種々の時点でトランスジェニック関節炎マウスから単離される。

50

特に興味深いのは、誕生近くのクローン欠失の活発な期間に胸腺に存在するAPCであるが、しかしAPCはまた、他の組織およびマウスの一生の他の時点から単離される。ヘパリン処理した静脈血を、本発明のトランスジェニック関節炎マウスから得、そして多形核血球細胞(PMBC)をそこから、例えば、Ficoll-Hypaque密度勾配遠心により単離する。PMBC調製物は、組織培養フラスコ中で37℃にて2時間プラスチックに付着させることにより、単球および/またはマクロファージを涵濁させる。付着細胞をかきとることにより回収し、ウシ胎児血清(FCS)を含有しない適切な緩衝化培地に再懸濁する(これは、ウシ胎児血清は、R28のTCRにより認識され得る抗原を含有するためである)。DeLabona, P.ら, *Eur. J. Immunol.* 21:209-213 (1991)。再懸濁した細胞を、APCの供給源として用いる。Koulova, L.ら, *J. Immunol.* 145: 2035-2043 (1990)。

10

## 【0141】

APCを0.025%トリプシンで処理してオリゴペプチドの採集を増強する。MHC分子と会合するオリゴペプチドを、Slingluff, C.L.ら, *J. Immunol.* 150: 2955-2963 (1993)の方法にしたがって単離し、そして逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分画するが、しかし他の分離技術も用いられ得る。Lehninger, A.L., *Biochemistry*, 第2版, 95~121頁。関係するペプチドを含有するHPLC画分を、非関節炎NODマウスから単離したAPCの存在下で、インターロイキン2の産生により測定したR28ハイブリドーマ細胞の活性化により同定する。Miedema, F.およびMelief, C.J.M. *Immunol. Today* 6: 258-259 (1985)。活性を含むHPLC画分をプールし、そして意図される次の使用に十分な純度の画分を生成するために必要に応じて再度クロマトグラフィーを行う。しかし、比較的粗製の画分でさえ、内因性ポリペプチド性関節炎生成自己抗原(PASA)に特異的なエフェクター生体分子を産生するハイブリドーマを同定するために十分である。

20

## 【0142】

十分に均質な材料が生成されるならば、次いでR28刺激性HPLC画分のオリゴペプチドが、反復エドマン分解を含むがこれに限定されない標準的な方法により配列決定される。Lehninger, A.L., *Biochemistry*, 第2版, 95-121頁 (1978)。あるいは、タンデム質量分析(TMS)を用いて最も豊富なペプチドの配列を同定する。Cox, A.L.ら, *Science* 264: 716-719 (1994)。TMSは、ポリペプチド中のアミノ酸残基のIleとLeuとを区別できないが、TMSは、IleまたはLeuを代わりに含有する一対のオリゴペプチドを設計するために用いられ得るアミノ酸配列データを生成する。TMS由来のアミノ酸配列を含有するオリゴペプチドは、標準的な方法(StewartおよびYoung, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockland, Illinois (1985))にしたがって化学的に合成され、そして反応混合物から逆相HPLCにより精製される。単離された合成オリゴペプチドを、非トランスジェニックNODマウスから単離されたAPCの存在下でR28ハイブリドーマを刺激するそれらの能力について試験し、そしてこの方法で実際のR28刺激性オリゴペプチドの配列を決定する。これらのアミノ酸配列は、内因性PASA含有タンパク質に由来する短いポリペプチドフラグメントに相当する。

30

## 【0143】

(ハイブリドーマの生成)

脾臓および胸腺を関節炎トランスジェニックマウス(例えば、KRN-トランスジェニックNODマウス)から死後に単離する。リンパ球(TまたはB細胞)を、関節炎の進展中の種々の時点で1つ以上のトランスジェニック動物の単離された脾臓または胸腺から調製する。個々の抗体産生TまたはB細胞を、インビボで不死細胞と融合する。得られる安定に増殖する融合細胞株(ハイブリドーマ)(これらはそれぞれ、独特な抗原結合(可変)領域を有するTCR(T細胞)または抗体(B細胞)を発現する)を、標準的なリンパ球培養技術により培養する。Harlow, E.およびLane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 139-281頁 (1988); Ausubel, F.M.ら, 編, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第2巻, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, 11.4.1-11.11.5頁 (1993)。

40

## 【0144】

50

T細胞ハイブリドーマを、ウシ臍臓リボヌクレアーゼ(BPR)のアミノ酸41~61に対応し、かつ以下のアミノ酸配列を有するオリゴペプチドの存在下または非存在下で、NODマウスから調製したAPCによる活性化についてスクリーニングする(インターロイキン2の分泌として測定する)

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-  
Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys[配列番号1]

あるいは、T細胞ハイブリドーマを、BPR由来オリゴペプチドおよびAPCの存在下で、野生型または調節可能なA<sup>k</sup> MHC遺伝子を用いたトランスフェクトに起因する変異型A<sup>k</sup>MHC分子を示す活性化についてスクリーニングする。Dellabona, P.ら, Eur. J. Immunol. 21: 209-213 (1991)。いずれのタイプのAPCも、PASA含有タンパク質に由来する粗オリゴペプチドまたは合成オリゴペプチドと二者択一で用いられる(上記を参照のこと)。いずれの場合でも、R28ハイブリドーマ細胞を、ポジティブコントロールとして用いる。この方法で同定および単離されたT細胞ハイブリドーマはTCRサブユニットを発現し、このTCRサブユニットは、本発明のトランスジーンにコードされるものと同様であるか、またはトランスジェニック関節炎マウスにおいて産生されそして変化した結合特性を有するその変異体のいずれかである。

【0145】

B細胞ハイブリドーマを、BPR由来オリゴペプチドおよび/またはPASA含有タンパク質に由来する粗オリゴペプチドまたは合成オリゴペプチドを認識するモノクローナル抗体の産生についてスクリーニングする(上記を参照のこと)。所望のB細胞ハイブリドーマを、BPR由来オリゴペプチドおよび/またはPASA含有タンパク質に由来する粗オリゴペプチドまたは合成オリゴペプチドを抗原として用いて、ELISAアッセイにより同定する。同定されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を必要であれば精製する。Harlow, E. および Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 139-281頁(1988); Ausubel, F.M.ら, 編, Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, 11.4.1-11.11.5頁(1993)。

【0146】

(単一特異性抗体)

内因性PASA含有タンパク質に由来する粗オリゴペプチドまたは合成オリゴペプチド(上記を参照のこと)を用いて、単一特異性抗体を生成し、次の実施例で用いる。

【0147】

「ポリクローナル抗体」は、全てが特定の抗原を認識する、異なる抗体の一群を含有する組成物をいう。種々の方法で有用であるが、ポリクローナル抗体は、それらの不均質な組成により制限を受ける。例えば、免疫応答を誘導するために用いた抗原以外の抗原に対するいくつかのポリクローナル抗体の交差反応性が、通常観察される。ポリクローナル抗体の特異性は、単一の選択したエピトープに対応する、単離されたあるいは合成の抗原またはハプテンを用いることにより特定のエピトープに限定され得る。抗原、またはキャリアと結合したハプテンを用いて、動物中に体液性免疫応答を生成する。得られるポリクローナル抗体は、選択されたエピトープに特異的であり、そして「単一特異性抗体」または「抗ペプチド抗体」といわれる。特に、合成オリゴペプチドを、抗原またはハプテンとして用いて、単一特異性抗体を作成し、このオリゴペプチドの配列に相当するかまたは類似する配列を含むタンパク質をアッセイまたは単離するために用い得る。

【0148】

内因性PASA含有タンパク質に由来する粗オリゴペプチドまたは合成オリゴペプチド(上記を参照のこと)を用いて、標準的方法にしたがって単一特異性抗体を生成する。Wilkins, T.D.ら、米国特許第4,879,218号(1989年11月7日); Harlow, E. および Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 53-137頁(1988); Ausubel, F.M.ら, 編, Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, 11.12.1-11.15.4頁(1993)

10

20

30

40

50

).

【 0 1 4 9 】

(実施例7：ポリペプチド関節炎生成自己抗原(PASA)を含有するタンパク質の単離)

本発明のトランスジェニック関節炎マウスの発育中に、再現可能なしたがって予測し得る方法で、伝授される免疫学的事象が、重篤な関節炎症状に進展するトランスジェニック動物で最高潮に達する免疫学的事象のカスケードの引き金となる。KRNトランスジェニック対立遺伝子は、特定のTCRを有する個体マウスにおいて大部分のT細胞にあり、そして特定の系統のマウスに由来する抗原提示MHCタンパク質が、発現されるトランスジェニック表現型に必要であるため、関節炎の比較的初期に生じる重要な免疫学的事象が、T細胞による内因性自己抗原の認識である可能性がある。これらの内因性自己抗原を、本明細書では一般に内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原(PASA)という。これらのPASAを含有するマウスタンパク質は、ヒトRAの発生に根源的に重要なヒトタンパク質に相当すると考えられる。ヒトPASA含有タンパク質、ならびにヒトPASA含有タンパク質に由来する合成化合物および誘導体化合物は、ヒトにおける関節炎の診断、予防、または治療に有用である(後の実施例を参照のこと)。本発明のトランスジェニック関節炎動物は、PASA含有タンパク質またはこのようなタンパク質をコードするDNA配列をヒトを含む多くの動物供給源から単離され得る手段を提供する。

10

【 0 1 5 0 】

(免疫検出によるPASA含有タンパク質の精製)

前述の実施例のモノクローナル抗体または単一特異性抗体を、正常マウスおよび関節炎マウス、ならびにタンパク質精製に十分な材料がより容易に得られるより大きな動物(例えば、ヒツジ、イヌ、ウシ、ウマなど)におけるPASA含有タンパク質の体内分布を同定するために、標準的方法にしたがって公知の免疫組織学的技術でプローブとして用いる。必要であれば、発育の種々の段階の動物をこのように検査する。Ausubel, F.M.ら、編, Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, 14.0.1-14.6.13頁(1993)。

20

【 0 1 5 1 】

比較的高濃度のPASA含有タンパク質を有する組織を死後の動物から取り出し、そしてPASA含有タンパク質の供給源としてその精製のために用いる。精製アッセイとして、前述の実施例に記載のR28細胞の活性化を用いる。タンパク質精製の標準的方法を用いる。Lehninger, A.L. Biochemistry, 第2版, 95-121頁。さらに、またはあるいは、結合剤として前記実施例のモノクローナル抗体または単一特異性抗体を含有するアフィニティーカラムを用いる。Harlow, E. および Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., 511-552頁(1988)。精製PASA含有タンパク質を、部分的タンパク質分解および反復エドマン分解を含むがこれらに限定されない標準的方法により配列決定する。Lehninger, A.L., Biochemistry, 第2版, 95~121頁(1978)。

30

【 0 1 5 2 】

(PASA含有タンパク質をコードするDNA配列)

APCに結合するPASA由来オリゴペプチドのアミノ酸配列、またはPASA含有タンパク質のアミノ酸配列、あるいはその両方を、遺伝コード(表2)とともに用いて、PASA含有タンパク質をコードする遺伝子に特異的にハイブリダイズし得る合成オリゴヌクレオチドの構築のために対応するDNA配列を設計する。Lathe, R., J. Mol. Biol. 183: 1-12 (1985)。オリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、PASA含有タンパク質アミノ酸配列をコードするDNA制限フラグメントを検出する; 次いで制限フラグメントを適切なベクターにクローン化する。Ruter, W.J.ら、米国特許第4,440,859号(1984年4月3日)。あるいは、オリゴヌクレオチドをPCR反応におけるプライマーとして用いて、PASA含有タンパク質をコードするDNA配列を増幅する。Mullis, K.B.ら、米国特許第4,965,188号(1990年10月23日)。特に、逆PCRを用いて、最少量のアミノ酸配列情報から最大量のPASA含有タンパク質コード配列情報を生成する。Ochman, H.ら, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich, H.A. 編, Stockton Press, London, 105-111頁(1989)。次いでP

40

50

CR産物を、適切なベクターにクローン化してから配列決定するか、または直接配列決定する。Gyllensten, U. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich, H.A. 編, Stockton Press, London, 45-60頁 (1989)。PASA含有タンパク質を産生するために、このタンパク質をコードするDNA配列を適切な発現ベクターにクローン化し、次いでこれをそれらの同起源の宿主細胞に導入し、ここでPASA含有タンパク質の指示された生合成が行われる。Rutter, W.J. ら、米国特許第4,440,859号(1984年4月3日)。

【0153】

(実施例8：治療組成物)

前述の実施例のPASA含有タンパク質および本発明のトランスジーンのTCRサブユニットの可変領域を用いて、ヒトを含む関節炎動物の処置に有用ないくつかの組成物を作成する。

10

【0154】

(TCRオリゴペプチドを用いた免疫)

機構は不明確なままであるが、TCRサブユニットの可変領域に相当する合成オリゴペプチドを用いた免疫は、実験的なアレルギー性脳髄膜炎(EAE)を予防または好転させることが示されている。EAEは、MBPを用いた動物の自己免疫により誘導され、そしてMSの臨床的症状(例えば、髄鞘脱落および麻痺)を生成する。Howell, W.M. ら, Science 246: 668-670 (1989); Vanderbark ら, Nature 341: 541-544 (1989)。TCR由来オリゴペプチドを用いたMSを患うヒトの処置の試験的な試みが、現在進行中である。Oksenberg, J.R. ら, J. Neurol. Sci. 115(補遺): S29-S37 (1993)。

20

【0155】

本発明のTCR可変領域アミノ酸配列がマウスハイブリドーマから単離されたが、自己免疫疾患に関連するTCRの著しい関連性が種系統に渡り、免疫系の分子成分が、ヒトの治療用組成物をマウスTCR分子に由来させ得るように、十分保存されていることを示唆する。例えば、何人かのMS患者は、HLAレセプター(HLA-DR2分子)の一部に結合するミエリン塩基性タンパク質(MBP)のフラグメントを認識するTCRにより過剰提示(over-represented)されるTCR集団を有する。3アミノ酸の配列(MBP:HLA-DR2複合体を認識するために明らかに必要とされる)が、これらのTCRに存在した。Oksenberg, J.R. ら, Nature 362: 68-70 (1993)。MBPの同じフラグメントは、MS、EAEの動物モデルで優勢なTCRのクラスにより認識される。EAE動物で優勢であるTCRは、MSヒトにおけるTCRに見出された同じ3つのアミノ酸の配列を有する。Gold, D.P. ら, J. Exp. Med. 174: 1467-1476 (1991); Hashim, G. ら, J. Immunol. 146: 515-520 (1991); Offner, H. ら, J. Immunol. 146: 4165-4172 (1991); Vainiene, M. ら, J. Neurosci. Res. 31:413-420 (1992); Offner, H. ら, J. Immunol. 148: 1706-1711 (1992); Gold, D.P. ら, J. Immunol. 148: 1712-1717 (1992); Offner, H. ら, J. Immunol. 151: 506-517 (1993)。

30

【0156】

R28由来のTCRサブユニットの可変領域のアミノ酸配列[配列番号5および7]を用いて、ヒトを含む非マウス動物において治療的価値を有する合成オリゴペプチドを設計する。配列番号5および7由来のアミノ酸を含むオリゴペプチドを、標準的な方法(StewartおよびYoung, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockland, Illinois (1985))にしたがって化学的に合成し、そして逆相HPLCにより反応混合物から精製する。最も効果的な抗関節炎オリゴペプチドは、実施例4に記載のアッセイにより同定される。

40

【0157】

(経口トレランス治療)

自己免疫は、例えば皮下注射により動物に自己抗原を直接提示することによりもたらされ得るが、トレランスは、経口摂取により動物に抗原を提示することにより達成され得る。このプロセス(経口トレランス治療と呼ばれる)は、いくつかの自己免疫応答影響を攻撃するサイトカインを分泌するT細胞を活性化するのである。Strobel, S. ら, Immunology 56: 577-564 (1985); Mowat, A.M., Immunology 56: 253-260 (1985); Mowat, A.M. ら,

50

Adv.Exp.Med.Biol. 216A: 709-720(1987);Lamont,A.G.ら, Immunology 63: 737-739 (1988); Mowat,A.M.ら, Immunology 64:141-145 (1988)。抗原の増強されたトレランスをもたらす経口摂取により提示される抗原は、トレロジェンと呼ばれる。Thompson,H.S.ら,Clin.Exp.Immunol. 72: 20-25 (1988); Thompson,H.S.G.およびStaines,N.A.,Clin.Exp.Immunol. 64: 581-586 (1985); Thompson,H.S.およびStaines,N.A.,Immunol.Today 11: 396-399 (1991)。

【 0 1 5 8 】

自己免疫疾患に対する経口トレランス治療は、EAE動物にミエリン塩基性タンパク質を給餌することにより最初に示された。Bitar,D.M.およびWhitacre,C.C.,Cell Immunol. 112: 364-370 (1988); Fuller,K.A.ら, J.Neuroimmunol. 28: 15-26 (1990);Whitacre,C.C.ら, J. Immunol. 147: 2155-2163 (1991)。経口トレランス治療は、動物モデルにおいて、関節炎、特に、コラーゲンが誘導された関節炎(CIA)を抑制するのに効果的であることが示されている。Thompson,H.S.およびStaines,N.A.,Clin.Exp.Immunol. 64: 581-586 (1986);Nagler-Anderson,C.ら,Proc..Natl.Acad.Sci.(USA) 83: 7443-7446 (1986)。II型コラーゲンのアミノ酸配列に由来する合成オリゴペプチドもまた、トレロジェンとして効果的である。Myers,L.K.ら,J.Exp.Med. 170: 1999-2010 (1989)。合成ポリペプチドであるトレロジェンは、トレロジェン原性に必要なエピトープ(単数および複数)をさらに規定するために操作され得る。Meyers,L.K.ら,J.Immunol. 149: 1439-1443 (1992);Meyers,L.K.ら, J.Immunol. 150: 4652-4658(1993); Meyers,L.K.ら, J.Immunol. 151: 500-505 (1993)。

【 0 1 5 9 】

本発明のトランスジェニック関節炎マウスにおいてAPCに結合するオリゴペプチドのアミノ酸配列、またはPASA含有タンパク質のアミノ酸配列を用いて、経口トレランス治療のための合成オリゴペプチドの配列を設計する。ヒトの治療のためには、好ましくはヒトPASA含有タンパク質由来のアミノ酸配列を用いる。選択されたアミノ酸配列を含有するオリゴペプチドを、標準的な方法(StewartおよびYoung,Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockland, Illinois (1985))にしたがって化学的に合成し、そして逆相HPLCにより反応混合物から精製する。最も効果的な抗関節炎オリゴペプチドを、関節炎動物に対するオリゴペプチドの投与手段として経口摂取を用いて実施例4に記載のアッセイにより同定する。

【 0 1 6 0 】

(MHCアンタゴニスト)

EAEにおいて、人工的に導入された「自己」抗原とそれに由来する合成オリゴペプチドとの間のインビボの競合が、自己免疫応答の誘導を調節するために用いられ得る。これらのMHCアンタゴニストは、明らかにAPCのMHC分子により結合され、そしてT細胞に対して提示されるが、当初の抗原からの化学変化のため、T細胞を活性化するためにそれらに対して十分に刺激的ではない。Zamvil,S.S.およびSteinman,L.Annu.Rev.Immunol. 8: 579-621 (1990);Steinman,L. Adv.Immunol. 49: 357-379。関節炎において最高潮に達する後の免疫学的事象の原因となるT細胞の活性化は、疾患の経過に対してそれと並行した効果で遅延または阻害される。

【 0 1 6 1 】

本発明のトランスジェニック関節炎マウスにおけるAPCに結合するオリゴペプチドのアミノ酸配列、またはPASA含有タンパク質のアミノ酸配列を用いて、MHCアンタゴニストとして供される合成オリゴペプチドの配列を設計する。ヒトの治療のためには、好ましくはヒトPASA含有タンパク質由来のアミノ酸配列を用いる。選択されたアミノ酸配列を含有するオリゴペプチドを、標準的な方法(StewartおよびYoung,Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockland, Illinois (1985))にしたがって化学的に合成し、そして逆相HPLCにより反応混合物から精製する。最も効果的な抗関節炎オリゴペプチドを、実施例4に記載のアッセイにより同定する。

【 0 1 6 2 】

10

20

30

40

50

(発明の有用性)

上記の本発明の実施態様は、単独で、または互いに組み合わせ、あるいは他の補足的な方法および/または組成物と組み合わせ、以下に列挙されるような目的に用いられ得る。

【0163】

(1)潜在的な抗関節炎治療用組成物を、トランスジェニック関節炎マウスにおける時間的および/または組織学的な関節炎の進行に対する組成物の効果を測定することによりそれらの効率について評価し得る。評価される潜在的な抗関節炎治療用組成物は、化学的化合物、トレロジェン、抗炎症剤、遺伝子治療剤、および遺伝的に操作された微生物または細胞を包含するが、これらに限定されない。詳細は実施例4を参照のこと。

10

【0164】

(2)潜在的な関節炎生成(関節炎誘導性)組成物を、トランスジェニック関節炎マウスにおける時間的および/または組織学的な関節炎の進行に対する組成物の効果を測定することにより、または非関節炎KRNトランスジェニックマウスにおけるKRNトランスジーン対立遺伝子の浸透度を強めるそれらの能力を測定することにより、それらの危険性について評価する。評価される潜在的な関節炎生成組成物は、化学的化合物、トレロジェン、抗炎症剤、遺伝子治療剤、および遺伝的に操作された微生物または細胞を包含するが、これらに限定されない。詳細は実施例5を参照のこと。

【0165】

(3)関節炎トランスジェニックマウス由来のB細胞またはT細胞が単離され、そして不死細胞に融合して、内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原(PASA)を認識するモノクローナル抗体を産生するB細胞ハイブリドーマ、またはPASA含有タンパク質の提示により活性化されるT細胞ハイブリドーマを作成する。ハイブリドーマモノクローナル抗体は、(a)ヒトを含む個々の動物を慢性関節リウマチを進展させるそれらの危険性について評価するため、および/または(b)ヒトを含む動物由来のPASA含有タンパク質を単離するために用いられる。詳細は実施例6を参照のこと。

20

【0166】

(4)トランスジェニック関節炎マウスに由来する抗原提示細胞(APC)が集団で調製され、そしてそれらと関連するポリペプチド抗原が単離される。トランスジェニック関節炎マウスにおける限定されたTCRレパートリーのため、大部分のT細胞は、内因性ポリペプチド関節炎生成自己抗原に仕向けられる。APC関連抗原を認識するモノクローナル抗体または単一特異性抗体が調製され、そしてヒトを含む動物からPASA含有タンパク質を単離するために用いられる。さらにまたはあるいは、APC関連ペプチドのアミノ酸配列が決定され、そしてPASA含有タンパク質をコードする遺伝子(組換えDNA技術によりPASA含有タンパク質を産生するために用いられる)を単離するために用いられるオリゴヌクレオチドプローブおよび/またはプライマーを設計するために用いられる。詳細は実施例6および実施例7を参照のこと。

30

【0167】

(5)ヒトを含む動物において、経口トランス治療を含む抗関節炎治療に有用な組成物、特に合成オリゴペプチドが、(a)単離された本発明のPASA含有タンパク質または(b)本発明のTCRサブユニットの可変領域[配列番号5および7]のアミノ酸配列から誘導可能である。詳細は実施例8を参照のこと。

40

【図面の簡単な説明】

【0168】

【図1A】図1はKRNトランスジェニックマウスを構築するために使用されるプラスミドを示す。図1のパネルAはpaKRNを示し、これは原核ベクターである、pEMBL18由来のDNA配列(太線)、およびハイブリドーマR28の機能的に再編成されたTCR対立遺伝子由来の約16kbのDNA配列を含む。TCRサブユニットのエキソン(コード配列)を点刻し(stippled)、そしてそれらの転写の方向を矢印で示す;非コード領域(イントロンおよびエキソンに接する配列)を細線で示す。TCRサブユニットの可変領域をコードするエキシ

50

NA配列を挿入図 (inset) に示す ; 可変領域のコード配列を中断するが、成熟mRNAにおいて削り取られる短いイントロンは、明瞭にするためにプラスミドの図に示されていないことに注意されたい。

【図1B】図1はKRNトランスジェニックマウスを構築するために使用されるプラスミドを示す。図1のパネルBは、pbKPNを示し、これは、原核生物のベクターであるpTZ18 (太線) 由来のDNA配列、およびハイブリドーマR28の機能的に再編成されたTCR 対立遺伝子由来の約18kbのDNA配列を含む。他の記号は、TCR サブユニットをコードするエクソンを斜線にした以外は、図1のパネルAと同様である。

【図2】図2は、KRNトランスジェニック動物と非トランスジェニック動物との交配から生産された子孫間での、KRNトランスジェニック対立遺伝子のDNA配列の存在についての核酸ハイブリダイゼーション (「サザン」) アッセイを示す。KRNトランスジェニック雌 (黒丸) を非トランスジェニック雄 (白四角) と交配させ、そして得られた子孫の尾から単離したDNAサンプルを検出可能に標識したトランスジーン特異的DNA配列でプローブした。

10

【図3-1】図3は、野生型マウス (左) おけるT細胞レセプターの発現のサイトフルオメトリック (cytofluorimetric) 分析の結果とKRNトランスジェニックマウス (右) の試験から得られた結果とを比較する。図3のパネルAでは、マウスのリンパ節由来の細胞を、ハイブリドーマR28のTCR およびTCR サブユニットの整列部分からなるエピトープに関するポリクローナル抗体で染色した。図3のパネルBでは、ハイブリドーマR28のTCR サブユニットの遺伝子および他の機能的に再編成されたTCR 遺伝子において使用される可変領域のV<sub>6</sub>部分に特異的なモノクローナル抗体で、細胞を染色した。

20

【図3-2】図3は、野生型マウス (左) おけるT細胞レセプターの発現のサイトフルオメトリック (cytofluorimetric) 分析の結果とKRNトランスジェニックマウス (右) の試験から得られた結果とを比較する。図3のパネルAでは、マウスのリンパ節由来の細胞を、ハイブリドーマR28のTCR およびTCR サブユニットの整列部分からなるエピトープに関するポリクローナル抗体で染色した。図3のパネルBでは、ハイブリドーマR28のTCR サブユニットの遺伝子および他の機能的に再編成されたTCR 遺伝子において使用される可変領域のV<sub>6</sub>部分に特異的なモノクローナル抗体で、細胞を染色した。

【図4A】図4は、トランスジェニック関節炎マウスにおける関節炎の臨床症状およびこのマウスでの関節炎の進行形態を示す。図4のパネルAでは、非トランスジェニック同腹子の後肢の隣に、トランスジェニックKRN x NOD関節炎マウスの後肢を示す。

30

【図4B】図4は、トランスジェニック関節炎マウスにおける関節炎の臨床症状およびこのマウスでの関節炎の進行形態を示す。図4のパネルBは、トランスジェニックKRN x NOD関節炎マウスとそれらの非トランスジェニック同腹子の足関節の太さを年令順に測定した結果を示す図である。

【図5】図5は、異なる遺伝学的背景において、KRNトランスジェニック対立遺伝子により誘導される関節炎の表現型を示す。3つの交配が示される ; 各場合においてマウスのB6株に由来する雄KRNトランスジェニック動物 (黒四角) を種々の株背景の非トランスジェニック雌動物 (白丸) と交配した。図5の一番上のパネルにおいて示される交配では、非トランスジェニック雌動物は、マウスのB6株由来であり、そして子孫において関節炎は観察されない。図5の中央のパネルにおいて示される交配では、非トランスジェニック雌動物は、マウスのNOD株に由来し、そして関節炎表現型の完全な浸透度が生じる。このことは全てのトランスジェニック子孫が関節炎を発症した事実により明らかにされた。図5の一番下のパネルにおいて示される交配では、非トランスジェニック雌動物がNOD株のMHC遺伝子座 (B6.H2<sup>n<sup>od</sup></sup>) を含むコンジェニック (cogenic) ゲノムを有する場合に、関節炎表現型の完全な浸透度がまた観察された。

40

【図6】図6は、トランスジェニックKRN x NOD関節炎マウスの後肢のラジオグラフ (X線画像) (右パネル) と非トランスジェニック、非関節炎同腹子の後肢のラジオグラフ (左パネル) とを対比する。

【図7】図7は、トランスジェニック関節炎マウスにおける関節炎の発生を防止する際の抗CD-4モノクローナル抗体の効果、未処置のコントロールトランスジェニック関節炎

50

マウスでの関節炎の発生と比較して示す。関節炎の進行は3日毎の動物の臨床試験により決定した。

【0169】

(配列表)

【表4-1】

### 配列表

#### (1)一般情報：

(i)出願人：アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サントゥ エ ドゥ ラ  
ルシエルシュ メディカル 10

サントゥル ナショナル ドゥ ラ ルシエルシュ シアンティフ  
イック

ユニベルシットゥ ルイ ハストゥール, ストラスブール 1  
イー, アール, スキップ アンド サンズ, インコーポレイテッ  
ド

20

(ii)発明者：ブノワ, セ.  
マティス, デ.  
コースホフ, ブイ.

(iii)発明の名称：トランスジェニック関節炎マウス

(iv)配列数：9 30

#### (v)連絡住所：

(A)名称：スターン, ケスラー, ゴールドステイン アンド  
フォックス

(B)番地：ニュー ヨーク アベニュー 1100, スウィート 600

(C)市：ワシントン

(D)州：ディー, シー.

40

(E)国：アメリカ合衆国

(F)郵便番号：20005

(vi)コンピューター読み出し形態：

## 【表 4 - 2】

(A)媒体型：フロッピーディスク	
(B)コンピューター：IBM PC 互換用	
(C)OS：PC-DOS/MS-DOS	
(D)ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.25	
(vii)現在の出願データ：	
(A)出願番号：PCT/US95/05970	10
(B)出願日：1995年5月18日	
(C)分類：	
(viii)先願データ：	
(A)出願番号：08/246,242	
(B)出願日：1994年5月19日	
(C)分類：	20
(ix)代理人/事務所情報：	
(A)名称：ゴールドステイン, ジョージ エイ.	
(B)登録番号：29,021	
(C)照会/記録番号：1383.008PC00	
(x)電話回線情報：	30
(A)電話：(202) 371-2600	
(B)テレファックス：(202) 371-2540	
(2)配列番号1の情報：	
(i)配列の特色：	
(A)長さ：21アミノ酸	40
(B)型：アミノ酸	

## 【表 4 - 3】

(D)トポロジー：不明

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号 1：

Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His Glu Ser Leu Ala Asp Val Gln Ala

1                    5                    10                    15

Val Cys Ser Gln Lys

20

10

(2)配列番号 2 の情報：

20

(i)配列の特色：

(A)長さ：721塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：不明

(D)トポロジー：不明

(ii)配列の種類：DNA(genomic)

30

(xi)配列：配列番号 2：

CCCGGGAGAA TACCACTCTG AAGATGAACA CTCCTCCAGT TTTAGTGACT GCGATGCTGC 60

TGTCATGCT TGGTTAAGTT AGCGACTTAC CACTCTCTCT TTCTTCTATA ATGTTAGAAT 120

ATATTTAATC TATGAAATTT GTCCTTGCTA TAACACAGAT ATCCTCTTCT TCCTCCAGGG 180

40

【表 4 - 4】		
ATGAGAAAGA CCCACGGAGG TTCAGTGACC CAGAAACAAG GTCAAGTGAC CCTTTCAGAA	240	
GATGACTTCC TATTTATAAA TTGCACTTAT TCTACCACAA CGTACCCAAC TCTTTTCTGG	300	
TATGTCCAAT ATCCTGGACA AGGTCCACAG CTCCTTCTGA AAGTCACAAC TGCCAACAAC	360	
AAGGGAATCA GCAGAGGCTT TGAAGCTACA TATGAGAAAG GGACCACGTC CTTCCACTTA	420	10
CAGAAAGCCT CAGTGCAGGA GTCAGACTCA GCCGTGTACT TCTGTGCTCT GGCCCCCTCC	480	
AATACCAACA AAGTCGTCTT TGGAACAGGG ACCAGATTAC AAGTATTACC AAGTAAGTTC	540	
TGAGACAGTG AAGCAATTTG AAAAGGTGTT TTCTATAAAT TCCAGCTTTG GCTGGATGTC	600	20
CAGGCCGCC TTCCTAGCAC TGCATTCATT CTGCAGCTAC CCTCCATGCC TCTAGCTGTT	660	
GTGTCCATGG GAGAGCAGGG TGTCATTTCC CAGGTAAACC TTCTGTAAAC GCGGCCGCTT	720	
A	721	

(2)配列番号3の情報：

30

(i)配列の特色：

- (A)長さ：583塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：不明
- (D)トポロジー：不明

## 【表 4 - 5】

(ii)配列の種類：DNA(genomic)

(xi)配列：配列番号 3：

CTCGAGCCAA AGTATGAACA AGTGGGTTTT CTGCTGGGTA ACCCTTTGTC TCCTTACTGT	60	
AGGTAAGGCT CTGGGCTCTC TGGGTTCTCG TTGCCGAGTG CACATCTTAA CCCCCCTGCC	120	10
CTGGGTAGCA GTGCCAAACC CCTTCCAGAC TGATTCTTTT TCTTTTCCAG AGACCACACA	180	
TGGTGATGGT GGCATCATT CTCAGACACC CAAATTCCTG ATTGGTCAGG AAGGGCAAAA	240	
ACTGACCTTG AAATGTCAAC AGAATTTCAA TCATGATACA ATGTACTGGT ACCGACAGGA	300	20
TTCAGGGAAA GGATTGAGAC TGATCTACTA TTCAATAACT GAAAACGGCG ATCTATCTGA	360	
AGGCTATGAT GCGTCTCGAG AGAAGAAGTC ATCTTTTCT CTCACTGTGA CATCTGCCCA	420	
GAAGAACGAG ATGGCCCTTT TTCTCTGTGC CAGCAGTATA TCCACAAACA ACCAGGCTCC	480	
GCTTTTGGG GAGGGGACTC GACTCTCTGT TCTAGGTAAA CTATGGGACC AACTGGTGG	540	30
GACCATTGTC CTTTGGACCT GGAGTGTCTC TGTAACCCCG CGG	583	

(2)配列番号 4 の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：403塩基対

(B)型：核酸

40



## 【表 4 - 7】

65	70	75	80		
AGC AGA GGC TTT GAA GCT ACA TAT GAG AAA GGG ACC ACG TCC TTC CAC				288	
Ser Arg Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Glu Lys Gly Thr Thr Ser Phe His					
85	90	95			
TTA CAG AAA GCC TCA GTG CAG GAG TCA GAC TCA GCC GTG TAC TTC TGT				336	10
Leu Gln Lys Ala Ser Val Gln Glu Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys					
100	105	110			
GCT CTG GCC CCT TCC AAT ACC AAC AAA GTC GTC TTT GGA ACA GGG ACC				384	
Ala Leu Ala Pro Ser Asn Thr Asn Lys Val Val Phe Gly Thr Gly Thr					
115	120	125			20
AGA TTA CAA GTA TTA CCA A				403	
Arg Leu Gln Val Leu Pro					
130					

## (2)配列番号5の情報:

30

## (i)配列の特色:

- (A)長さ: 134アミノ酸
- (B)長さ: アミノ酸
- (D)トポロジー: 直鎖状

## (ii)配列の種類: タンパク質

40

## (xi)配列: 配列番号5:



## 【表 4 - 9】

(i)配列の特色：

(A)長さ：462塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：不明

(D)トポロジー：不明

(ii)配列の種類：DNA(genomic)

10

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：CDS

(B)存在位置：1..462

(D)その他の情報：/ラベル=peptide

(xi)配列：配列番号6：

20

ATG AAC AAG TGG GTT TTC TGC TGG GTA ACC CTT TGT CTC CTT ACT GTA 48  
 Met Asn Lys Trp Val Phe Cys Trp Val Thr Leu Cys Leu Leu Thr Val  
 1 5 10 15

GAG ACC ACA CAT GGT GAT GGT GGC ATC ATT ACT CAG ACA CCC AAA TTC 96  
 Glu Thr Thr His Gly Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys Phe 30  
 20 25 30

CTG ATT GGT CAG GAA GGG CAA AAA CTG ACC TTG AAA TGT CAA CAG AAT 144  
 Leu Ile Gly Gln Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln Asn  
 35 40 45

TTC AAT CAT GAT ACA ATG TAC TGG TAC CGA CAG GAT TCA GGG AAA GGA 192 40





## 【表 4 - 1 2】

Ile Ser Thr Asn Asn Gln Ala Pro Leu Phe Gly Glu Gly Thr Arg Leu

115

120

125

Ser Val Leu Gly Lys Leu Trp Asp Gln Thr Gly Gly Thr Ile Val Leu

130

135

140

Trp Thr Trp Ser Val Ser Val Thr Pro Arg

145

150

10

## (2)配列番号8の情報:

## (i)配列の特色:

(A)長さ:40塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:不明

(D)トポロジー:不明

20

(ii)配列の種類:DNA(genomic)

(xi)配列:配列番号8:

30

TTTGTGGTA TTGGAAGGGG CCAGAGCACA GAAGTACACG

40

## (2)配列番号9の情報:

## (i)配列の特色:

(A)長さ:26アミノ酸

(B)型:アミノ酸

40

## 【表 4 - 1 3】

(C)鎖の数：不明

(D)トポロジー：不明

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号 9 :

10

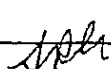
Pro Thr Gly Pro Leu Gly Pro Lys Gly Gln Thr Gly Glu Leu Gly Ile  
1                    5                    10                    15

Ala Gly Phe Lys Gly Glu Gln Gly Pro Lys  
                  20                    25

【表5 - 1】

寄託された微生物に関する表示

(PCT規則13規則の2)

<p>A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。          ページ <u>14</u> , 行 <u>9</u></p>	
<p>B. 寄託物の表示 <span style="float:right">その他の寄託物が追加の用紙に記載されている <input checked="" type="checkbox"/></span></p> <p>寄託機関の名称          COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES</p> <p>寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)          INSTITUT PASTEUR          28, Rue du Docteur Roux          F-75724 PARIS CEDEX 15          FRANCE</p>	
<p>寄託日          18 May 1994 (18.05.94)</p>	<p>受託番号          1-1413</p>
<p>C. 追加の表示 (なければ空白のまま) <span style="float:right">この情報は追付の用紙に続く <input type="checkbox"/></span></p> <p>E.coli/paKRN</p>	
<p>D. 表示がなされた指定国 (全ての指定国に対する表示でない場合)</p>	
<p>E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)</p> <p>下記の表示物は、進んで国際事務局に提出する。          (表示物の一般的性質、例えば「受託番号」の指定)</p>	
<p>受理官庁記入欄</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理された。</p> <p>認定官           Sigfried Hostad          International Division RO/US          (703) 305-3682</p>	<p>国際事務局記入欄</p> <p><input type="checkbox"/> この用紙は、以下の日付で国際事務局により受理された。</p> <p>認定官</p>

10

20


30

40

【表5 - 2】

寄託された微生物に関する表示

(PCT規則)3規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。 ページ <u>14</u> . 行 <u>17</u>	
B. 寄託物の表示 <span style="float: right;">その他の寄託物が追加の用紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES	
寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む) INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
寄託日 18 May 1994 (18.05.94)	寄託番号 1-1414
C. 追加の表示 (なければ空白のまま) <span style="float: right;">この情報は追加の用紙に続く <input type="checkbox"/></span>	
E.coli/pbKRN	
D. 表示がなされた指定国 (全ての指定国に対する表示でない場合)	
E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま) 下記の表示物は、追って国際事務局に提出する。 (表示物の一般的性質、例えば「受託番号」の特定)	
受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理された。	<input type="checkbox"/> この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された。
認定官 	認定官
Sigfried Hostad International Division RO/US (703) 305-3682	

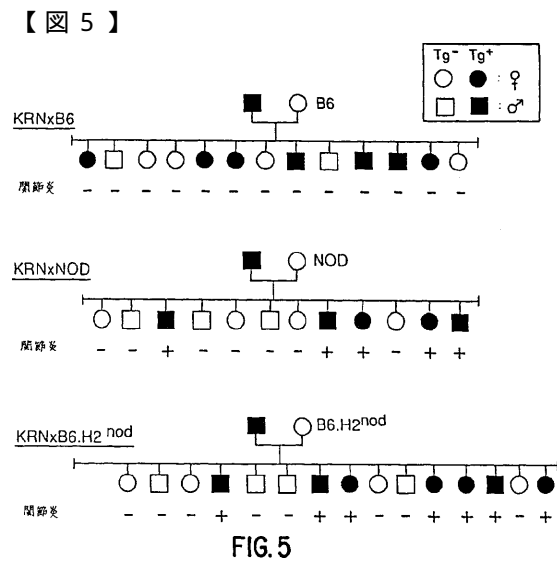
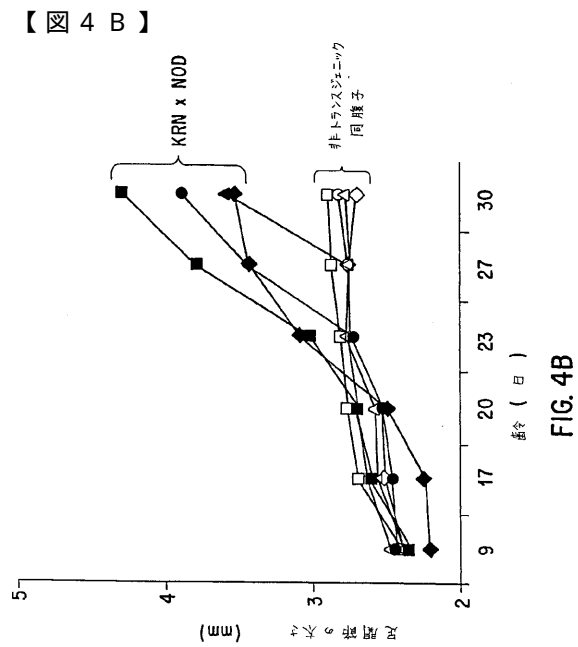
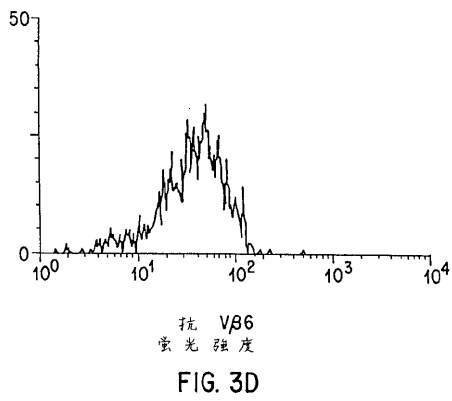
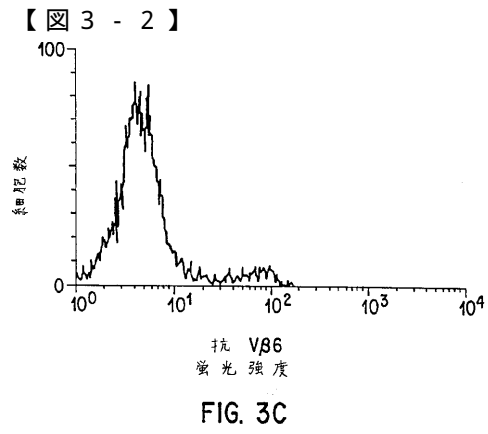
10

20

30

40





【 図 6 】

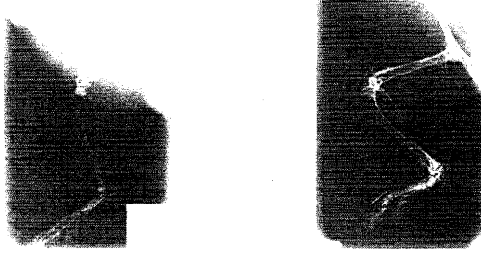


FIG.6A

FIG.6B

【 図 7 】

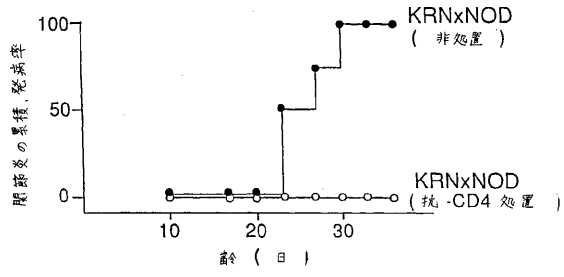


FIG. 7

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)		C 1 2 Q 1/04
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00 1 0 1

(73)特許権者 506066788

ユニベルシットゥ ルイ パストゥール, ストラスブール 1  
 フランス国 エフ - 6 7 0 7 0 ストラスブール セデックス, ボイ ポステール 1 0 3 2 /  
 エフ, リュ プレーズ パスカル 4

(73)特許権者 506066799

イー . アール . スキップ アンド サンズ, エルエルシー  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 5 4 0, プリンストン, ルート 2 0 6 アンド プロ  
 ビンスライン ロード

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 クリストフ オー . ブノワ

フランス国 エフ - 6 7 0 0 0 ストラスブール, リュ デ アルバルデュ 2

(72)発明者 ディアンヌ ジ . マティス

フランス国 エフ - 6 7 0 0 0 ストラスブール, リュ デ アルバルデュ 2

(72)発明者 バレリー コースホフ

アメリカ合衆国 コロラド 8 0 2 0 6, デンバー, ジャックソン ストリート 1 4 0 0,  
 ナショナル ジューウィッシュ センター フォー イミュノロジー アンド レスピラトリー  
 メディシン

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表平 1 0 - 5 0 4 7 0 1 ( J P , A )

EMBO J., 1990, Vol. 9, No. 13, p. 4215-4223

Int Immunol., Apr. 1994, Vol. 6, No. 4, p. 593-602

J. Immunol., 1988, Vol. 141, No. 12, p. 4124-4128

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S ( S T N )

C A ( S T N )

R E G I S T R Y ( S T N )

专利名称(译)	转基因关节炎小鼠		
公开(公告)号	<a href="#">JP4308217B2</a>	公开(公告)日	2009-08-05
申请号	JP2006084234	申请日	2006-03-24
[标]申请(专利权)人(译)	安妮菊研究所国立德拉圣周二Deyuraru壳邦医疗 特鲁猴子国立拉尔外壳格哈德·青色科学 海胆铃坐特鲁搭桥之旅斯特拉斯堡1		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu全国德拉Santu等德拉RECHERCHE医疗 Saruturu全国德拉RECHERCHE青色科学 Uniberushittu路易斯·巴斯德，斯特拉斯堡1 E.伯爵.Sukibbu & Sons公司		
当前申请(专利权)人(译)	Ansutichu全国德拉Santu等德拉RECHERCHE医疗 Santuru全国德拉RECHERCHE Shianti菲克保存耶鲁NS Uniberushittu路易斯·巴斯德，斯特拉斯堡1 E.伯爵.Sukibbu父子，LLC		
[标]发明人	クリストフオーブノワ ディアンヌジマティス バレリーコースホフ		
发明人	クリストフ オー. ブノワ ディアンヌ ジ. マティス バレリー コースホフ		
IPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A01K67/027 C12P21/02 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/04 A61P29/00 A61K49/00 C07K14/705 C07K14/725 C12N5/10 C12N9/22 C12N15/00 C12N15/02 C12N15/12 C12N15/85 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A01K67/0275 A01K67/0278 A01K2207/15 A01K2217/00 A01K2217/05 A01K2227/105 A01K2267/0325 A01K2267/0368 A61P29/00 C07K14/705 C07K14/7051 C12N9/22 C12N15/8509		
FI分类号	A61K37/02 A61K48/00 A01K67/027 C12P21/02.C C07K14/47 C12N15/00.ZNA.A C12Q1/04 A61P29/00.101 A61K38/00 A61K38/10 A61K38/16 C07K16/18 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/85.P C12N15/85.Z C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/12 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/DA01 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/NA14 4C084/ZB152 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA21		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一		
优先权	08/246242 1994-05-19 US		
其他公开文献	JP2006217918A		

## 摘要(译)

要解决的问题：提供一种动物模型，以可重复且可预测的方式发展严重的关节炎症状，以便迅速表征和控制免疫现象，例如自体免疫性关节炎，尤其是慢性类风湿性关节炎。解决方案：本发明涉及具有一种或多种滑膜关节炎和疟原虫表型的慢性炎症的转基因小鼠，其中通过引入包括以下 (a)，(b) 和 (c)，(a) 的病毒载体来产生小鼠。编码T细胞受体 $\alpha$ 亚基的第一DNA序列，其含有源自杂交瘤R28的功能重排的TCR $\alpha$ 基因的可变区，(b) 编码T细胞受体 $\beta$ 亚基的第二DNA序列，包括源自杂交瘤的T细胞受体 $\beta$ 基因的可变区。R28和 (c) 在体内表达第一DNA序列和第二DNA序列的方法。Z

第 1 位 (5'末端)	第 2 位				第 3 位 (3'末端)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	终止	终止	A
	Leu	Ser	终止	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G