

(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 - 512824**

(P2003 - 512824A)

(43)公表日 平成15年4月8日(2003.4.8)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		31/7105	4 B 0 2 4
31/7105		31/711	4 B 0 6 3
31/711		39/395	4 B 0 6 5
38/00		A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全193数 ) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 531868(P2001 - 531868)

(86) (22)出願日 平成12年10月18日(2000.10.18)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月22日(2002.4.22)

(86)国際出願番号 PCT/US00/28827

(87)国際公開番号 W001/029070

(87)国際公開日 平成13年4月26日(2001.4.26)

(31)優先権主張番号 60/160,542

(32)優先日 平成11年10月20日(1999.10.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ジェネンテック・インコーポレーテッド  
GENENTECH, INC.  
アメリカ合衆国カリフォルニア・94080 - 4  
990・サウス・サン・フランシスコ・ディー  
エヌエー・ウェイ・1

(72)発明者 ドゥ ソーバージュ, フレデリック ジ  
エー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404,  
フォスター シティ, シューティングス  
ター アイル 187

(74)代理人 弁理士 園田 吉隆 ( 外 1 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘルパー T 細胞性疾患の治療のための T 細胞分化の調節

(57)【要約】

本発明は、抗原刺激に应答し、サイトカインを放出した主に T h 1 又は T h 2 細胞によって媒介されるものを含む、免疫関連疾患の治療及び診断の方法に関する。本発明は、更に、遺伝子 T C C R、及びそのアゴニスト又はアンタゴニストの相対的発現レベルに基づく、 T h 1 サブタイプ又は T h 2 サブタイプのいずれかにおける T 細胞の分化を偏らせる方法に関する。本発明は、更に、 T h 1 及び T h 2 媒介疾患を診断することに関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 T細胞とTCCRアンタゴニストの有効量を接触せしめることを含んでなる、Th1サブタイプに代わってTh2サブタイプへのT細胞の分化を促進、刺激、又は増強する方法。

【請求項2】 促進、刺激、又は増強することが哺乳動物で生じ、並びに有効量が治療的有效量である、請求項1の方法。

【請求項3】 哺乳動物へ治療的有效量のTCCRポリペプチドアンタゴニストを投与することを含んでなる、前記哺乳動物のTh1媒介疾患を治療する方法。

【請求項4】 Th1媒介疾患が、自己免疫性炎症疾患及び同種移植の拒絶反応から成る群から選択される、請求項3の方法。

【請求項5】 自己免疫性炎症疾患が、アレルギー性脳脊髄炎、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、炎症性腸疾患及び自己免疫性甲状腺疾患から成る群から選択される、請求項4の方法。

【請求項6】 アンタゴニストが小分子である、請求項3の方法。

【請求項7】 アンタゴニストがアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項3の方法。

【請求項8】 オリゴヌクレオチドがRNAである、請求項7の方法。

【請求項9】 オリゴヌクレオチドがDNAである、請求項7の方法。

【請求項10】 アンタゴニストが生物活性を欠くTCCR変異体である、請求項3の方法。

【請求項11】 アンタゴニストがモノクローナル抗体である、請求項3の方法。

【請求項12】 抗体が、非ヒト相補性決定領域(CDR)残基及びヒトフレームワーク領域(FR)残基を有する、請求項11の方法。

【請求項13】 アンタゴニストが抗体断片又は一本鎖抗体である、請求項3の方法。

【請求項14】 アンタゴニストがTCCRリガンドである、請求項3の方法。

【請求項15】 TCCRポリペプチド又はそのアゴニストの有効量を投与することを含んでなる、T細胞のTh2サブタイプへの分化を阻止、阻害又は弱める方法。

【請求項16】 阻止、阻害又は弱めることが哺乳動物で生じ、有効量が治療的有效量である、請求項15の方法。

【請求項17】 TCCRポリペプチド又はアゴニストの治療的有效量を哺乳動物へ投与することを含んでなる、前記哺乳動物のTh2媒介疾患を治療する方法。

【請求項18】 Th2媒介疾患が、感染症及びアレルギー性疾患から成る群から選択される、請求項17の方法。

【請求項19】 感染症が、リーシュマニア・メジャー、マイコバクテリウム・レブラ、カンジダ・アルビカンス、トキソプラズマ・ゴンディ、RSウイルス及びヒト免疫不全ウイルスから成る群より選択される、請求項18の方法。

【請求項20】 アレルギー性疾患が、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、春季カタルから成る群から選択される、請求項18の方法。

【請求項21】 アゴニストが小分子である、請求項15の方法。

【請求項22】 アゴニストが生物活性を有するTCCR変異体である、請求項15の方法。

【請求項23】 アゴニストがモノクローナル抗体である、請求項15の方法。

【請求項24】 抗体が、非ヒト相補性決定領域(CDR)残基及びヒトフレームワーク領域(FR)残基を有する、請求項23の方法。

【請求項25】 アンタゴニストが抗体断片又は一本鎖抗体である、請求項15の方法。

【請求項26】 アンタゴニストが安定なTCCRECDである、請求項15の方法。

【請求項27】 細胞を抗-TCCR抗体へ暴露し、細胞への抗体の結合を測定することを含んでなる、該細胞におけるTCCRポリペプチドの存在を確定する方法であって、該抗体の該細胞との結合がTCCRポリペプチドの存在を示

す方法。

【請求項28】 (a)哺乳動物から得た組織細胞の試験試料、及び(b)同じ細胞型の既知正常組織細胞のコントロール試料からTCCRポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含んでなる、哺乳動物におけるTh1媒介又はTh2媒介疾患を診断する方法であって、該コントロール試料と比較して、該試験試料でのより低い発現がTh2媒介疾患の存在を示し、該コントロール試料と比較して、該試験試料でのより高い発現がTh1媒介疾患の存在を示す方法。

【請求項29】 TCCRポリペプチドの発現を阻害することができる化合物を同定する方法であって、該候補化合物及び該ポリペプチドの相互作用が可能となる条件及び十分な時間に渡って、これら両成分を接触せしめることを含んでなる方法。

【請求項30】 候補化合物が固体支持体に固定されている、請求項29の方法。

【請求項31】 非固定化成分が検出可能なラベルを有する、請求項30の方法。

【請求項32】 TCCRポリペプチドの生物学的活性を阻害することができる化合物を同定する方法であって、該候補化合物及び該ポリペプチドの相互作用が可能となる条件及び十分な時間に渡って、これら両成分を接触せしめることを含んでなる方法。

【請求項33】 候補化合物が固体支持体に固定されている、請求項32の方法。

【請求項34】 非固定化成分が検出可能な標識を有する、請求項33の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、一般的に、新規なDNAの同定及び単離、該DNAによりコードされる新規なポリペプチドの組換え生産、並びに免疫関連疾患の診断及び治療に関する組成物及び方法、特にT細胞分化及びサイトカイン放出の特徴をTh1サブタイプ及びTh2サブタイプへ調節する方法、並びにサイトカインの放出によって示される疾患の宿主に関する。

**【0002】****(発明の背景)**

免疫関連及び炎症疾患は、完全な複合現象の症状又は結果であり、これらの殆どは複合的に関連した生物学的経路であり、正常な生理機能において、発作又は損傷へ応答すること、発作又は損傷からの回復を開始すること、並びに外来生物に対する先天性及び後天性の防御を増すことにおいて絶対不可欠である。疾患や病理現象は、これら正常な生理学的経路が付加的発作や損傷を、応答の強度と直接に関連しているものとして、異常な制御又は過度の刺激の結果として、自己への反応として、又はこれらの組み合わせの何れかとして生じせしめる場合に起こる。

これら疾患の起源には、殆どにおいて多段階経路及び複数の異なった生物学的系/経路が関与しているが、これらの一つ又は複数の経路の重要なポイントでの介入は、改善的又は治療的效果をもたらすことができる。治療的介入は、有害なプロセス/経路の拮抗作用又は有益なプロセス/経路の刺激の何れかによって生じることができる。

Tリンパ球(T細胞)は、哺乳動物の免疫応答の重要な構成物である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)領域中の遺伝子によってコードされている自己分子と結合する抗原を認識する。該抗原は、MHC分子とともに抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面に表示されうる。T細胞は、宿主哺乳動物の健康へ脅威を与えるこれら改造細胞を除去する。T細胞には、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞(キラーT細胞)が含まれる。ヘルパーT

細胞は、抗原表示細胞上の抗原 - MHC 複合体の認識の後に大々的に増殖する。また、ヘルパー T 細胞は、種々のサイトカイン、すなわち B 細胞、細胞傷害性 T 細胞及び免疫応答に関与する種々の他の細胞の活性化において中心的な役割を担うリンフォカインを分泌する。

### 【0003】

体液性及び細胞性免疫応答の双方における中心的現象は、ヘルパー T 細胞の活性化とクローン性増殖である。ヘルパー T 細胞活性化は、抗原表示細胞の表面における T 細胞レセプター (TCR) - CD3 複合体と抗原 - MHC の相互作用によって始まる。該相互作用は、生成ヘルパー T 細胞が細胞周期 (G0 から G1 への移行) へ入ること、並びに IL-2 及び時には IL-4 のための高親和性レセプターの発現が生じることを含む、生化学現象のカスケードを媒介する。活性化 T 細胞は、記憶細胞 (免疫記憶細胞, メモリー細胞) 又はエフェクター細胞へ増殖及び分化する周期を通して発達する。

哺乳動物の免疫系は、呼応して細菌、ウイルス、毒素及び非宿主基質の侵入から宿主細胞を防御することにおいて機能する多数の特異的な細胞から成る。該免疫系の特異性を主に担う細胞型はリンパ球と呼ばれており、B 及び T 細胞の二つの型がある。T 細胞は胸腺で発達することから命名され、B 細胞は骨髄で発達する。T 細胞には幾つかのサブセット、例えばサプレッサー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞及び T ヘルパー細胞がある。T ヘルパー細胞のサブセットは、免疫の二つの経路を明示する: Th1 及び Th2 である。CD4+ 細胞の機能的サブセットである Th1 細胞は、その細胞性免疫を高める能力によって特徴付けられる。Th1 細胞は、サイトカイン IL-2 及びインターフェロン- $\gamma$  を生産し、IL-10、IL-4、IL-5 及び IL-6 を有しないことによって同定される。

また、Th2 細胞は CD4+ 細胞ではあるが、Th1 細胞とは異なる。Th2 細胞は、抗体生産を担い、サイトカイン IL-4、IL-5、IL-10 及び IL-13 を生産する (Fig 1 を参照のこと)。これらのサイトカインは、Th1 及び Th2 の応答が互いに阻害的にすることにおいて重要な役割を担う。Th2 細胞によって生産される IL-10 がインターフェロン- $\gamma$  の生産を抑制する一方で (Fig 2)、Th1 細胞によって生産されるインターフェロン- $\gamma$  は Th2 細

胞の増殖を阻害する ( F i g 2 )。

【 0 0 0 4 】

共通の前駆体から T h 1 及び T h 2 エフェクター細胞の異なる集団への T ヘルパー細胞の発達と末端分化において、4つのらせん束状構造のサイトカインファミリーのメンバーが (Brazan, J F., 1990, Proc Natl Acad Sci USA, 87:6934-8) 重要な役割を担うことが見出されている。O'Garra, A., 1998, Immunity, 8: 275-83. I L - 1 2 が T h 1 細胞の分化に關与する主要な因子である一方で、I L - 4 は、主に T h 2 細胞の発達に影響を与える。Hsieh, C.S., ら., 1993, Science, 260:547-9 ; Seder, R.A., ら., 1993, Proc Natl Acad Sci USA, 90:10188-92 ; Le Gros, G., ら., 1990, J Exp Med, 172:921-9 ; Swain, S.L., ら., 1991, Immunol Rev, 123:115-44. 従って、I L - 1 2 (Magram, J., ら., 1996, Immunity, 4:471-81)、I L - 1 2 レセプター ( I L - 1 2 R ) 1 鎖 (Wu, C., ら., 1997, J Immunol, 159:1658-65) 又は I L - 1 2 特異的転写因子 S T A T 4 (Kaplan, M. H., ら., 1996, Nature, 382: 174-7) を欠くマウスが障害のある T h 1 応答を有する一方で、I L - 4 (Kuhn, R., ら., 1991, Science, 254:707-10)、I L - 4 レセプター鎖 (Noben-Trauth, N., ら., 1997, Proc Natl Acad Sci USA, 94: 10838-43)、又は I L - 4 特異的転写因子 S T A T 6 (Shimoda, K., ら., 1996, Nature, 380: 630-3) を欠くマウスは T h 2 応答を有しない。

T h - 1 及び T h - 2 細胞のサブタイプは、T h - 0 細胞と名付けられた共通の前駆体に由来すると考えられている。T h - 1 及び T h - 2 サブタイプの完全に相互排除的なサイトカインの生産とは対照的に、T h - 0 細胞は殆ど又はすべてのこれらサイトカインを生産する。T h - 1 及び T h - 2 サブタイプのための異なるサイトカインの放出に関する性質は、エフェクターメカニズム及び細胞傷害性細胞の選択において能動的な役割を担う。T h - 2 細胞によって分泌される I l - 4 、 I l - 5 、 I l - 6 及び I l - 1 0 が、I g E を含む抗体の生産を促進し細胞傷害性細胞の機能を低下させるのみならず、好酸球及びマスト細胞の生産を増加させる一方で、T h - 1 細胞によって分泌される I l - 2 及び  $\gamma$ -インターフェロンは、マクロファージ及び細胞傷害性細胞を活性化する傾向にある。一度確立されると、T h - 1 又は T h - 2 応答パターンは、他のサブセットの生産を阻害するサ

イトカインの生産によって維持される。Th-2細胞によって生産されるIL-10がIL-2及び $\gamma$ -インターフェロンのようなTh-1サイトカインの生産を阻害する一方で、Th-1細胞によって生産される $\gamma$ -インターフェロンは、IL-4及びIL-10のようなTh-2サイトカインの生産を阻害する。

#### 【0005】

Th1及びTh2サブセットによって生産されるサイトカイン間の微妙なバランスの混乱は、宿主の疾患を引き起こす。例えば、Th1サイトカインの過剰生産は、自己免疫炎症性疾患、多発性硬化症及び炎症性腸疾患（例えば、クローン病、限局性腸炎、遠位回腸炎、肉芽腫性腸炎、限局性回腸炎、終末回腸炎）を引き起こす。同様に、Th2サイトカインの過剰生産は、アナフィラキシー性過敏症、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、春季カタル、湿疹、じんま疹及び食物アレルギーを含むアレルギー性疾患を引き起こす。Umetsuら., Soc. Exp. Biol. Med. 215:11-20(1997).

1997年5月19日に出願されたWO97/44455及びSprecherら., Biochem. Biophys. Res. Commun. 246: 82-90(1998)には、ここで取り上げるマウス及びヒトTCR分子とある程度の配列同一性を有するサイトカインレセプター分子について記載されている。先行技術のマウス及びヒトサイトカインレセプターは、胸腺、脾臓、リンパ節及び末梢血白血球を含むリンパ系組織において発現すると言われており、更にはB及びT細胞の双方に存在していて、恐らくは免疫応答の発達及び制御における免疫細胞の増殖、分化及び/又は活性化に関連する機能を有することが示されている。しかしながら、WO97/44455及びSprecherら., 上掲では、TCRの正確な役割及びその相同体でTh1サブタイプとTh2サブタイプへのT細胞分化及びサイトカイン放出特性に関するもの、或いはサイトカインT細胞サブタイプの放出によって関連付けられる疾患の宿主のいずれも確かめられていない。

#### 【0006】

(発明の概要)

本発明では、ヒトの、特にTh1サブタイプ又はTh2サブタイプへのT細胞分化経路における偏向に起因する生理現象（例えば、サイトカイン放出の特徴）

及び疾患を含む、哺乳動物における免疫関連疾患の診断及び治療方法に関する。本発明は、哺乳動物におけるその不在又は不活性化がTh2サブタイプへのT細胞の分化を偏向させるTCR（これまではNPORとして知られていた）をコードする遺伝子とアミノ酸配列の同定に基づいている。Th1又はTh2サブタイプのいずれかへのT細胞の分化を抑制又は高めることによって、ある免疫関連疾患は治療することができる。

更に、本発明は、TCRアンタゴニストの有効量を投与することを含んでなるTh1サブタイプに代わってTh2サブタイプへのT細胞の分化を促進、刺激又は増強する方法に関する。随意的に、この方法は哺乳動物で起こり、有効量とは治療的有效量である。随意的に、TCRアンタゴニストによって誘導されたTh2サブタイプ細胞へのT細胞の分化は、更に抗原刺激によってTh2サイトカイン放出を引き起こす（例えばIL-4、IL-5、IL-10及びIL-13）。Th1サイトカインの過剰生産によって特徴付けられ、分化のTh2サブタイプによる刺激の効果を平衡化すること、並びに生成サイトカインの放出特性に対して応答性の疾患は、自己免疫性炎症疾患（例えば、アレルギー性脳脊髄炎、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎）、自己免疫性甲状腺疾患）及び同種移植の拒絶反応を含む。

#### 【0007】

更に、本発明は、TCR又はアゴニストの有効量を投与することを含んでなる、Th2サブタイプへのT細胞の分化を妨げる、阻害する又は弱める方法に関する（すなわち、Th1サブタイプへの分化を起こす）。随意的に、該方法は哺乳動物でおこなわれ、有効量とは治療的有效量である。随意的に、該TCR又はアゴニストによって誘導された分化は、抗原刺激によってTh1サイトカイン放出特性を引き起こす（例えば、 $\gamma$ -インターフェロン）。Th2サイトカインの過剰生産（又はTh1サイトカインの不十分な生産）によって特徴付けられ、そしてTh2サイトカイン過剰生産の分化のTh1サブタイプによる刺激の効果を平衡化することに対して応答性の疾患は、感染症の治療（例えば、リーシュマニア・メジャー、マイコバクテリウム・レプラ、カンジダ・アルビカンス、ト

キソプラズマ・ゴンディ、RSウイルス及びヒト免疫不全ウイルス)及びアレルギー性疾患(喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、春季カタル)において有効であることが期待される。

一実施態様では、本発明は、TCCRポリペプチドへ結合する単離された抗体に関する(例えば、抗-TCCR)。一側面では、該抗体はTCCRポリペプチドの活性を模倣するか(アゴニスト抗体)、又は逆に該抗体はTCCRポリペプチドの活性を阻害又は中和する(アンタゴニスト抗体)。その他の側面では、該抗体はモノクローナル抗体であり、好ましくは非ヒト相補性決定領域(CDR)残基及び枠組み構造領域(FR)残基を有する。該抗体を標識化され、そして個体支持体へ固定化することが可能である。更なる側面では、該抗体は抗体断片、一本鎖抗体、又は抗イディオタイプ抗体である。

#### 【0008】

その他の実施態様では、本発明は、上記に記載の用途を有する組成物又は薬剤を調製するための本発明のポリペプチド及び抗体の利用に関する。

更なる実施態様では、本発明は、抗-TCCR抗体をコードする核酸、及びそのような核酸を含んでなるベクターと組み換え宿主細胞に関する。より更なる実施態様では、本発明は、該抗体が発現する条件下において、該抗体をコードする核酸で形質転換された宿主細胞を培養すること、及び細胞培地から該抗体を回収することによって該抗体を生産する方法に関する。

更に、本発明は、TCCRポリペプチドの一つ又は複数の機能又は活性を阻害するTCCRポリペプチドのアンタゴニストに関する。あるいは、本発明は、TCCRポリペプチドの一つ又は複数の機能又は活性を刺激又は高めるTCCRアゴニストに関する。好ましくは、該アンタゴニスト及び/又はアゴニストは、TCCR変異体、ペプチド断片、小分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)、リボザイム又は抗体である(上述のモノクローナル、ヒト化、特異的、一本鎖、ヘテロ抱合又は断片)。その上に、潜在的TCCRアンタゴニストは可溶性TCCR細胞外ドメイン(ECD)を包含することができるが、TCCRアゴニストは潜在的TCCRリガンドを包含することができる。

#### 【0009】

更なる実施態様では、本発明は、TCCRポリペプチドをコードする核酸分子とハイブリダイゼーションする単離された核酸、又はその補体に関する。該核酸は、好ましくはDNAであり、そしてハイブリダイゼーションは好ましくはストリンジントな条件下で起こる。当該核酸分子は、ここで同定された増幅遺伝子のアンチセンス分子として作用し、そしてそれぞれの増幅遺伝子の調節において、又は増幅反応でのアンチセンスプライマーとしての利用を見出すことができる。更には、当該配列は、リボザイム及び/又は三重らせん配列の一部として利用することができ、そして増幅遺伝子の制御に利用できる可能性がある。

その他の実施態様では、本発明は、TCCRポリペプチドを含有すると思われる細胞へ抗-TCCR抗体を曝露し、該細胞への抗体の結合を確定することを含んでなる、TCCRポリペプチドの存在を確定する方法に関する。

#### 【0010】

更なるその他の実施態様では、本発明は、(a)哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、及び(b)同じ細胞型の既知の正常組織細胞であるコントロール試料からTCCRポリペプチドをコードする遺伝子の発現を検出することを含んでなる、哺乳動物におけるTh-1媒介又はTh-2媒介疾患の診断方法に関するものであって、コントロール試料に対して試験試料での低い発現レベルは、試験組織細胞が得られた哺乳動物におけるTh-2媒介疾患の存在を示し、コントロール試料に対して試験試料での高い発現レベルは、試験組織細胞が得られた哺乳動物におけるTh-1媒介疾患の存在を示す。

その他の実施態様では、本発明は、(a)抗-TCCR抗体を哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料と接触せしめること、及び(b)該試験試料における、該抗体とTCCRポリペプチドの間の複合体の形成を検出することを含んでなる、哺乳動物における免疫疾患の診断方法に関する。該検出法は、定性的又は定量的でもよく、そして同じ細胞型の既知の正常組織細胞であるコントロール試料において、該複合体の形成をモニターすることと比較して行われうる。該試験試料において形成される大量の複合体は、TCCRの存在及びTh-1媒介疾患を示し、より低い量は、試験組織細胞が得られた哺乳動物におけるTh-2媒介疾患を示す。該抗体は、好ましくは検出可能な標識を有する。光学顕微鏡、フロー

サイトメトリ、蛍光定量法又は当該分野で知られている他の技術によって、複合体の形成をモニターすることが可能である。該試験試料は、通常は、免疫系の異常又は欠損を有すると思われる個体より得られる。

#### 【0011】

その他の実施態様では、本発明は、適切なパッケージ中の抗-TCCR抗体及び担体（例えばバッファー）を含む、診断キットに関する。該キットは、好ましくは、TCCRポリペプチドの検出に抗体を利用するための指示書を含む。

更なる実施態様では、本発明は、

容器；

容器上の標識；及び

容器内に含まれる活性剤を含んでなる組成物；を含んでなる製造品に関し、該組成物は哺乳動物の免疫応答を刺激又は阻害するのに効果的であり、該容器上の該標識は、該組成物を免疫関連疾患の治療に利用することができることを示し、そして該組成物中の該活性剤は、該TCCRポリペプチドの発現及び/又は活性を刺激又は阻害する薬剤である。好ましい側面では、該活性剤はTCCRポリペプチド又は抗-TCCR抗体である。

更なる実施態様は、候補化合物とTCCRポリペプチドの接触を可能にするのに十分な条件と時間の下で、これら二つの化合物を接触せしめることによって、TCCRポリペプチドの発現及び/又は生物活性を調節することが可能な化合物を同定する方法に関する。特別な側面では、該候補化合物又は該TCCRポリペプチドのいずれかを固体支持体へ固定化する。その他の側面では、非固定化成分は検出可能な標識を有する。

#### 【0012】

（好ましい実施態様の詳細な説明）

##### I. 定義

「免疫関連疾患」とは、哺乳動物の免疫系の構成成分が哺乳動物において病的な状態を引き起こし、仲介し、または寄与するような疾患を意味する。また、免疫反応の促進又は処置が、疾患の進行に対して改善的な効果を有するような疾患をも含む。この用語には、免疫媒介炎症誘発性疾患、非免疫媒介炎症誘発性疾患

、感染性疾患、免疫不全性疾患、腫瘍形成等が含まれる。

「Th1 媒介疾患」という用語は、Th1 サブタイプへのT細胞分化における過剰生産又は偏りに起因する場合を含むTh1 サイトカインの過剰生産によって特徴付けられる疾患を意味する。そのような疾患は、例えば、自己免疫性炎症疾患（例えば、アレルギー性筋痛性脳脊髄炎、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、自己免疫性ぶどう膜炎、甲状腺中毒症、強皮症、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、限局性腸炎、末梢回腸炎、肉芽腫性腸炎、限局性回腸炎、終末回腸炎）、自己免疫性甲状腺疾患、悪性貧血）及び同種移植の拒絶反応を含む。

「Th2 媒介疾患」という用語は、Th2 サブタイプへのT細胞分化における過剰生産又は偏りに起因する場合を含むTh2 サイトカインの過剰生産によって特徴付けられる疾患を意味する。そのような疾患は、例えば、感染症疾患による感染の悪化（例えば、リーシュマニア・メジャー、らい菌、カンジダ・アルビカンス、トキソプラズマ・ゴンディ、RSウイルス、ヒト免疫不全ウイルス等）及びアレルギー性疾患、例えばアナフィラキシー性過敏症、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、春季カタル、湿疹、食物アレルギー等を含む。

### 【0013】

他の免疫、免疫関連及び炎症性疾患の例として、その幾つかはTh1 及びTh2 へのT細胞分化の効力（例えば、サイトカイン放出特性）によって媒介され、そして全身性エリトマトーデス、間接リウマチ、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症（強皮症）、特発性炎症誘発性筋疾患、（皮膚筋炎、多発性筋炎）、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿）、自己免疫性血小板減少症（特発的血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症）、甲状腺炎（グレーブ疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、自己免疫炎症性疾患（例えば、アレルギー性筋痛性脳脊髄炎、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、自己免疫性ぶどう膜炎、甲状腺中毒症、強皮症、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、限局性腸炎、末梢回腸炎、肉芽腫性腸炎、限局性回腸炎、終末回腸炎）、

自己免疫性甲状腺疾患、悪性貧血)及び同種移植の拒絶反応、真性糖尿病、免疫性腎臓疾患(糸状体腎炎、尿細管間質性腎炎)、中枢及び抹消神経系の脱髄性疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害又はGuillain-Barre症候群、及び慢性炎症誘発性脱髄性多発神経障害、肝胆道疾患、例えば感染性肝炎(A、B、C、D、E型肝炎及び他の非肝炎性ウイルス)、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症誘発性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン疾患)、グルテン感受性腸疾患、及びフィブrosis疾患、水泡性ヒス疾患を含む自己免疫性又は免疫媒介性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及びジンマシン、肺の免疫学的疾患、例えば好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び高感受性間質性肺炎、移植片拒絶及び移植片対宿主の疾患を含む、移植関連疾患を含む考案に従って治療することができる。感染性疾患には、ウイルス性疾患、例えばエイズ(HIV感染)、肝炎A、B、C、D及びE、ヘルペス等、細菌性感染症、真菌性感染症、原生動物感染症、寄生虫感染症、及びRSウイルス、ヒト免疫不全ウイルス等、及びアレルギー疾患、例えばアナフィラキシー性過敏症、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、春季カタル、湿疹、じんま疹及び食物アレルギー等が含まれる。

#### 【0014】

「治療」とは、疾患の病理の進展阻止又は変更の本発明で実施される介入である。従って、「治療」は治療的処置及び予防的又は保護的手段の両方を指し、標的である病理学的状態又は疾患を予防、和らげ、又は改善することが目的である。治療が必要なものは、既に疾患に罹患しているもの並びに疾患が防止されるべきものを含む。免疫関連疾患(例えば、Th1媒介及びTh2媒介疾患)治療では、治療薬は直接的に疾患の病理成分の応答の大きさを低下又は増加させうるし、或いは疾患を他の治療剤による治療、例えば抗生物質、抗真菌剤、抗炎症剤、化学療法剤等に対してより敏感にしうる。

「有効量」とは、Th1サブタイプ又はTh2サブタイプのいずれかへのT細胞の分化、及び/又はこれらT細胞サブタイプが分泌するサイトカイン放出特性における検出可能な偏りを起こす、誘導する又は招くTCCRポリペプチド、そ

のアゴニスト及び/又はアンタゴニストの最小濃度である。更には、「治療的有効量」とは、Th1媒介又はTh2媒介疾患のいずれかを治療するのに有効なTCCRポリペプチド、そのアゴニスト及び/又はそのアンタゴニストの最小濃度(量)である。

#### 【0015】

「慢性」投与とは、急性の形式とは反対に連続的な形式の剤の投与を意味し、最初の生物学的効果を長期の時間に渡って維持する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ周期的になされる処置である。

免疫関連疾患の「病理」は、患者の良好な全ての現象を含む。これは、限定されるものではないが、異常又は制御不能な細胞成長、抗体生産、自己抗体生産、補体の生産と活性化、正常に機能している隣接細胞への干渉、サイトカイン又は他の分泌物の異常なレベルでの放出、如何なる炎症性又は免疫性応答の抑制又は悪化、炎症性細胞の組織空間への浸潤(好中球の、好酸球の、単球性の、リンパ性の)等を含む。

治療目的で「哺乳動物」と言うときは、ヒト、家及び牧場の動物、及び動物園の動物、運動用の動物、愛玩用動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ等々を含む哺乳動物として分類されるあらゆる動物を意味する。好ましくは哺乳動物はヒトである。

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

#### 【0016】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコー

ス、マンノース又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及びノ又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（商品名）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（商品名）を含む。

ここで用いられる「細胞毒性薬」なる用語は、細胞の機能を阻害又は抑制する及びノ又は細胞破壊を生ずる物質を意味する。この用語は、放射性同位体（例えば、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 及び $Re^{186}$ ）、化学治療薬、及び細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素的活性毒素といった毒素、又はその断片を含むとされる。

#### 【0017】

ここで使用される場合の「成長阻害剤」とは、インビトロ、インビボにおいて細胞の成長を阻害する化合物又は組成物のことを称する。従って、成長阻害剤の例には、S期の遺伝子を過発現させる細胞の割合を著しく減少させるようなものである。成長阻害剤の例には、細胞周期の進行をブロックする薬剤（S期以外の時点において）、例えばG1停止及びM期停止を誘発する薬剤が含まれる。伝統的なM期ブロッカーには、ビンカス（ビクリスチン及びビンブラスチン）、タキソール、トポIIインヒビター、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンが含まれる。G1を停止させるこれらの薬剤、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びara-CがS期停止に溢流する。更なる情報は、Murakamiらにより「細胞分裂周期の調節、オンコジーン、及び抗新生物薬」と題された、癌の分子的基础、Mendelsohn及びIsrael編、第1章(WB Saunders；Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

#### 【0018】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンフォカイン、モノカイン

、及び伝統的なポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)；肝臓成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- 及び- ；ミューラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF - 等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF- あるいはTGF- のような形質転換成長因子(TGF)；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイエチン(EPO)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン、 のようなインターフェロン；マクロファージCSF(M-CSF)のようなコロニー刺激因子(CSF)；顆粒球マクロファージCSF(GM-CSF)及び顆粒球CSF(G-CSF)；IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12等のインターロイキン(IL)；腫瘍壊死因子、例えばTNF- 又はTNF- ；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

#### 【0019】

用語「TCCRポリペプチド」、「TCCRタンパク質」及び「TCCR」は、ここで用いる場合、天然配列TCCR及びTCCRポリペプチド変異体(ここで更に定義する)を含む。TCCRポリペプチドは、ヒト組織型等の種々の供給源から、又は他の供給源から単離しても、組換え及び/又は合成方法により調製してもよい。

「天然配列TCCRポリペプチド」は、天然由来の対応するTCCRポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列TCCRポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合

成手段により生産することもできる。「天然配列TCCRポリペプチド」という用語には、特に、特定のTCCRポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の一実施態様において、天然配列ヒトTCCRは、Fig 3(配列番号: 1)のアミノ酸1~636を含む成熟又は全長天然配列TCCRポリペプチドである。同様に、天然配列マウスTCCRは、Fig 4(配列番号: 2)のアミノ酸1~623を含む。また、Fig 3(配列番号: 1)及びFig 4(配列番号: 2)に開示されているTCCRポリペプチドは、アミノ酸位置1としてここに命名されるメチオニン残基で始まるように示されているが、Fig 3(配列番号: 1)又はFig 4(配列番号: 2)におけるアミノ酸位置1の上流又は下流に位置する他のメチオニン残基をTCCRポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いることも考えられるし可能でもある。

#### 【0020】

「TCCRポリペプチド細胞外ドメイン」又は「TCCRECD」は、膜貫通及び細胞質ドメインを本質的に有しないTCCRポリペプチドの型を意味する。通常、TCCRポリペプチドECDは、約1%未満のそのような膜貫通及び/又は細胞質ドメインを、そして好ましくは約0.5%未満のそのようなドメインを有する。本発明のTCCRポリペプチドについて同定された任意の膜貫通ドメインは、疎水性ドメインのその型を同定するために当該分野において日常的に使用される基準に従い同定されることが理解されるであろう。膜貫通ドメインの厳密な境界は変わり得るが、最初に同定されたドメインのいずれかの末端から約5アミノ酸を越えない可能性が高い。従って、本発明の一実施態様では、ヒトTCCRポリペプチドの細胞外ドメインは、 $X_1$ がFig 3(配列番号: 1)の残基512~残基522のいずれかのアミノ酸残基である、アミノ酸1又は約33~ $X_1$ を含む。同様に、マウスTCCRポリペプチドは、 $X_2$ がFig 4(配列番号: 2)の残基509~519のいずれかのアミノ酸残基である、アミノ酸1又は約25~ $X_2$ を含む。

#### 【0021】

「TCCR変異体ポリペプチド」は、以下に定義するような活性なTCCRポリペプチドを意味し、(a<sub>1</sub>) Fig 3 (配列番号: 1) に示されたヒトTCCRポリペプチドの残基1又は約33~636、; (a<sub>2</sub>) Fig 4 (配列番号: 2) に示されたマウスTCCRポリペプチドの残基1又は約25~623; (b<sub>1</sub>) X<sub>3</sub>がFig 3 (配列番号: 1) アミノ酸残基27~37のいずれかである、Fig 3 (配列番号: 1) に示されているヒトTCCRポリペプチドのX<sub>3</sub>~636; (b<sub>2</sub>) X<sub>4</sub>がFig 4 (配列番号: 2) アミノ酸残基20~30のいずれかである、Fig 4 (配列番号: 2) に示されているマウスTCCRポリペプチドのX<sub>4</sub>~623; (c<sub>1</sub>) X<sub>1</sub>がFig 3 (配列番号: 1) のアミノ酸残基512~522のいずれかである、1又は約33~X<sub>1</sub>; (c<sub>2</sub>) X<sub>2</sub>がFig 4 (配列番号: 2) のアミノ酸残基509~519のいずれかである、1又約25~X<sub>2</sub>; (d<sub>1</sub>) X<sub>5</sub>がFig 3 (配列番号: 1) のアミノ酸残基533~543のいずれかである、X<sub>5</sub> ~636; (d<sub>2</sub>) X<sub>6</sub>がFig 4 (配列番号: 2) のアミノ酸残基527~537のいずれかである、X<sub>6</sub>~623又は(e) Fig 3 (配列番号: 1) 及びFig 4 (配列番号: 2) に示されているアミノ酸配列からその他の特異的に誘導された断片に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。

#### 【0022】

これらのTCCR変異体ポリペプチドは、例えば、Fig 3 (配列番号: 1) 及びFig 4 (配列番号: 2) の配列のN-及び/又はC-末端並びに一又は複数の内部ドメインにおいて一又は複数のアミノ酸残基が付加又は削除されたTCCRポリペプチドを含む。通常、TCCR変異体ポリペプチドは、(a<sub>1</sub>) Fig 3 (配列番号: 1) に示されたヒトTCCRポリペプチドの残基1又は約33~636、; (a<sub>2</sub>) Fig 4 (配列番号: 2) に示されたマウスTCCRポリペプチドの残基1又は約25~623; (b<sub>1</sub>) X<sub>3</sub>がFig 3 (配列番号: 1) アミノ酸残基27~37のいずれかである、Fig 3 (配列番号: 1) に示されているヒトTCCRポリペプチドのX<sub>3</sub>~636; (b<sub>2</sub>) X<sub>4</sub>がFig 4 (配列番号: 2) アミノ酸残基20~30のいずれかである、Fig 4 (配列番号: 2) に示されているマウスTCCRポリペプチドのX<sub>4</sub>~623; (c<sub>1</sub>) X<sub>1</sub>

がFig 3 (配列番号: 1) のアミノ酸残基512~522のいずれかである、1又は約33~ $X_1$ ; ( $c_2$ )  $X_2$ がFig 4 (配列番号: 2) のアミノ酸残基509~519のいずれかである、1又は約25~ $X_2$ ; ( $d_1$ )  $X_5$ がFig 3 (配列番号: 1) のアミノ酸残基533~543のいずれかである、 $X_5$ ~636; ( $d_2$ )  $X_6$ がFig 4 (配列番号: 2) のアミノ酸残基527~537のいずれかである、 $X_6$ ~623又は(e) Fig 3 (配列番号: 1) 及びFig 4 (配列番号: 2) に示されているアミノ酸配列からその他の特異的に誘導された断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有する。

### 【0023】

TCCR変異体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、より多くは少なくとも約20アミノ酸長、より多くは少なくとも約30アミノ酸長、より多くは少なくとも約40アミノ酸長、より多くは少なくとも約50アミノ酸長、より多くは少なくとも約60アミノ酸長、より多くは少なくとも約70アミノ酸長、より多くは少なくとも約80アミノ酸長、より多くは少なくとも約90アミノ酸

長、より多くは少なくとも約100アミノ酸長、より多くは少なくとも約150アミノ酸長、より多くは少なくとも約200アミノ酸長、より多くは少なくとも約250アミノ酸長、より多くは少なくとも約300アミノ酸長、より多くは少なくとも約400アミノ酸長、より多くは少なくとも約500アミノ酸長、より多くは少なくとも約600アミノ酸長、又はそれ以上である。

#### 【0024】

ここで同定されているポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、TCRポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表3(A-Q)に提供されている配列比較プログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、下記の表3(A-Q)に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表3(A-Q)に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

#### 【0025】

ここでの目的のためには、与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対する与えられたアミノ酸配列 A の %アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列 B と、又はそれに対して或る程度の %アミノ酸配列同一性を有する又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる）は次のように計算される：

分率  $X / Y$  の 100 倍

ここで、 $X$  は配列アラインメントプログラム ALIGN-2 の A 及び B のアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、 $Y$  は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さ異なる場合、A の B に対する %アミノ酸配列同一性は、B の A に対する %アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた %アミノ酸配列同一性の計算の例として、表 2 (A - B) は、「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の %アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。

特に断らない限りは、ここでの全ての %アミノ酸配列同一性値は上記のように ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラム NCBI-BLAST2 (Altschul ら, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)) を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2 配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> からダウンロードできる。NCBI-BLAST2 は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62 を含む。

#### 【0026】

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

分率  $X / Y$  の 100 倍

ここで、 $X$  は配列アラインメントプログラム NCBI-BLAST2 の  $A$  及び  $B$  のアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基数であり、 $Y$  は  $B$  の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列  $A$  の長さがアミノ酸配列  $B$  の長さとは異なる場合、 $A$  の  $B$  に対する % アミノ酸配列同一性は、 $B$  の  $A$  に対する % アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0027】

また、「本発明のポリペプチド」という用語には、上記のように実施されるアミノ酸配列同一性比較において、比較された配列中のアミノ酸残基で同一のアミノ酸残基のみではなく、類似の特性を有するアミノ酸残基を含むポリペプチドが含まれる。これらのポリペプチドは「陽性（ポジティブ）」である。関心あるアミノ酸残基に対して陽性値（ポジティブ）をスコアするアミノ酸残基は、関心あるアミノ酸残基と同一であるか、又は関心あるアミノ酸残基が好ましく置換されたもの（下記の表 I に定義）のいずれかである。ここでの目的のために、付与されたアミノ酸配列  $B$  に対する、 $B$  との、又は  $B$  に対抗する付与されたアミノ酸配列  $A$  のポジティブ % 値（別に、付与されたアミノ酸配列  $A$  が、付与されたアミノ酸配列  $B$  に対する、 $B$  との、又は  $B$  に対抗する所定の % ポジティブを有するか、又はこれを含むものとしても呼称することができる）は、次の式：

分率  $X / Y$  の 100 倍

により算出され、ここで、 $X$  は、 $A$  及び  $B$  のプログラム整列において、配列整列プログラム ALIGN-2 によりポジティブ値がスコアされたアミノ酸残基数であり、 $Y$  は  $B$  のアミノ酸残基数の全数である。アミノ酸配列  $A$  の長さはアミノ酸配列  $B$  の長さとは等しくなく、 $B$  に対する  $A$  の % ポジティブは、 $A$  に対する  $B$  の % ポジティブとは等しくないと認識されるであろう。

【0028】

「TCCR 変異体ポリヌクレオチド」又は「TCCR 変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性 TCCR ポリペプチドをコードする核酸分子であり、(a<sub>1</sub>) Fig 3 (配列番号：1) に示されたヒト TCCR ポリペプチドの残基 1 又は約 33 ~ 636、; (a<sub>2</sub>) Fig 4 (配列番号：2) に示されたマ

ウスTCCRポリペプチドの残基1又は約25~623; (b<sub>1</sub>) X<sub>3</sub>がFig 3 (配列番号: 1) アミノ酸残基27~37のいずれかである、Fig 3 (配列番号: 1) に示されているヒトTCCRポリペプチドのX<sub>3</sub>~636; (b<sub>2</sub>) X<sub>4</sub>がFig 4 (配列番号: 2) のアミノ酸残基20~30のいずれかである、Fig 4 (配列番号: 2) に示されているマウスTCCRポリペプチドのX<sub>4</sub>~623; (c<sub>1</sub>) X<sub>1</sub>がFig 3 (配列番号: 1) のアミノ酸残基512~522のいずれかである、1又は約33~X<sub>1</sub>; (c<sub>2</sub>) X<sub>2</sub>がFig 4 (配列番号: 2) のアミノ酸残基509~519のいずれかである、1又は約25~X<sub>2</sub>; (d<sub>1</sub>) X<sub>5</sub>がFig 3 (配列番号: 1) のアミノ酸残基533~543のいずれかである、X<sub>5</sub>~636; (d<sub>2</sub>) X<sub>6</sub>がFig 4 (配列番号: 2) のアミノ酸残基527~537のいずれかである、X<sub>6</sub>~623又は(e) Fig 3 (配列番号: 1) 及びFig 4 (配列番号: 2) に示されているアミノ酸配列からその他の特異的に誘導された断片のアミノ酸配列をコードする核酸配列と、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する核酸を意味する。通常は、TCCR変異体ポリペプチドヌクレオチドは、(a<sub>1</sub>) Fig 3 (配列番号: 1) に示されたヒトTCCRポリペプチドの残基1又は約33~636、; (a<sub>2</sub>) Fig 4 (配列番号: 2) に示されたマウスTCCRポリペプチドの残基1又は約25~623; (b<sub>1</sub>) X<sub>3</sub>がFig 3 (配列番号: 1) アミノ酸残基27~37のいずれかである、Fig 3 (配列番号: 1) に示されているヒトTCCRポリペプチドのX<sub>3</sub>~636; (b<sub>2</sub>) X<sub>4</sub>がFig 4 (配列番号: 2) アミノ酸残基20~30のいずれかである、Fig 4 (配列番号: 2) に示されているマウスTCCRポリペプチドのX<sub>4</sub>~623; (c<sub>1</sub>) X<sub>1</sub>がFig 3 (配列番号: 1) のアミノ酸残基512~522のいずれかである、1又は約33~X<sub>1</sub>; (c<sub>2</sub>) X<sub>2</sub>がFig 4 (配列番号: 2) のアミノ酸残基509~519のいずれかである、1又は約25~X<sub>2</sub>; (d<sub>1</sub>) X<sub>5</sub>がFig 3 (配列番号: 1) のアミノ酸残基533~543のいずれかである、X<sub>5</sub>~636; (d<sub>2</sub>) X<sub>6</sub>がFig 4 (配列番号: 2) のアミノ酸残基527~537のいずれかである、X<sub>6</sub>~623又は(e) Fig 3 (配列番号: 1) 及びFig 4 (配列番号: 2) に示されているアミノ酸配列からその他の特異的に誘導された断片のアミノ酸配列をコード

する核酸配列と、少なくとも約80%の核酸配列同一性、好ましくは少なくとも約81%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約82%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約83%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約84%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約86%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約87%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約88%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約89%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約91%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約92%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約93%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約94%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約96%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約97%の核酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、より好ましくは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有している。

#### 【0029】

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

#### 【0030】

ここで同定されるTCRCコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、対象の発明ポリペプチドコード化配列のヌクレオチドと同

一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegaalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%核酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが表3(A-Q)に提供されている配列比較プログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、表3(A-Q)に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、表3(A-Q)に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標) V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

#### 【0031】

ここでの目的のためには、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する与えられた核酸配列Cの%核酸配列同一性(あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される:

分率 $W/Z$ の100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムALIGN-2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さ異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、表2(C-D)

)は、「比較DNA」と称される核酸配列の「PRO-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示す。

特に断らない限り、ここで使用される全ての%核酸配列同一性値は、ALIGN-2 コンピュータプログラムを使用して上記前に記載したようにして得られる。しかし、%核酸配列同一性はまた、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschulら, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。このNCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードして得るか、あるいは米国国立衛生研究所、ベゼスタ、メリーランドから得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

#### 【0032】

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

分率W/Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ZはDの全核酸残基数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

#### 【0033】

他の実施態様では、TCR変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性TCRポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに開示する全長発明ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列

にハイブリダイゼーションする核酸分子である。発明変異体ポリペプチドは、発明変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

#### 【0034】

「陽性（ポジティブ）」という用語は、上記のように実施されたアミノ酸配列同一性比較の中で、比較された配列において同一のアミノ酸残基ばかりではなく、類似の特性を有しているアミノ酸残基を含む。関心あるアミノ酸残基に対して陽性値をスコアするアミノ酸残基は、関心あるアミノ酸残基と同一であるか、又は関心あるアミノ酸残基が好ましく置換(以下の表Iに定義)されたものである。

#### 【0035】

この目的において、付与されたアミノ酸配列Bに対する、Bとの、又はBに対抗する付与されたアミノ酸配列Aのポジティブ%値(別に、付与されたアミノ酸配列Aが、付与されたアミノ酸配列Bに対する、Bとの、又はBに対抗する所定の%ポジティブを有するか、又はこれを含むものとしても呼称することができる)は、次の式：

分率  $X / Y$  の 100 倍

により算出され、ここで、Xは、A及びBのプログラム整列において、配列整列プログラムALIGN-2によりポジティブ値がスコアされたアミノ酸残基の数であり、YはBのアミノ酸残基の全数である。アミノ酸配列Aの長さはアミノ酸配列Bの長さとは等しくなく、Bに対するAの%ポジティブは、Aに対するBの%ポジティブとは等しくないと認識されるであろう。

#### 【0036】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときには、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、自然に結合する全ての成分と結合していない。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るの

に十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、TCCRポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

#### 【0037】

TCCRポリペプチドをコード化する「単離された」核酸分子は、TCCR-コード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも1つの汚染核酸分子から同定され、分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸分子は、自然に結合する全ての汚染物質と結合していない。単離されたTCCR-コード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在するTCCR-コード化核酸分子とは区別される。しかし、TCCRポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるTCCRを通常発現する細胞に含まれるTCCRコード化核酸分子を含む。

#### 【0038】

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

#### 【0039】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、ポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能

に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフレームにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

#### 【0040】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、特に単一の抗-TCC Rモノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む)、及び多エピトープ特異性を持つ抗-TCC R抗体組成物、単鎖抗-TCC R抗体、及び抗-TCC R抗体の断片を包含する(下記を参照のこと)。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。

#### 【0041】

ハイブリダイゼーション反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補的ストランドがその融点より低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。ハイブリダイゼーション反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

#### 【0042】

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温度、例えば、50 において0.015Mの塩化ナ

トリウム / 0.0015 M のクエン酸ナトリウム / 0.1% のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの ; ( 2 ) ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42 において 50% (v/v) ホルムアミドと 0.1% ウシ血清アルブミン / 0.1% フィコール / 0.1% のポリビニルピロリドン / 50 mM の pH 6.5 のリン酸ナトリウム緩衝液、及び 750 mM の塩化ナトリウム、75 mM クエン酸ナトリウムを用いるもの ; ( 3 ) 42 における 50% ホルムアミド、5 x SSC ( 0.75 M の NaCl、0.075 M のクエン酸ナトリウム )、50 mM のリン酸ナトリウム ( pH 6.8 )、0.1% のピロリン酸ナトリウム、5 x デンハード液、超音波処理サケ精子 DNA ( 50 µg / ml )、0.1% SDS、及び 10% のデキストラン硫酸と、42 における 0.2 x SSC ( 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム ) 中の洗浄及び 55 での 50% ホルムアミド、次いで 55 における EDTA を含む 0.1 x SSC からなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。

#### 【0043】

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989) に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件 (例えば、温度、イオン強度及び % SDS) の使用を含む。中程度の緊縮性条件は、20% ホルムアミド、5 x SSC ( 150 mM の NaCl、15 mM のクエン酸三ナトリウム )、50 mM リン酸ナトリウム ( pH 7.6 )、5 x デンハード液、10% デキストラン硫酸、及び 20 mg / mL の変性剪断サケ精子 DNA を含む溶液中の 37 での終夜インキュベーション、次いで 1 x SSC 中 37 - 50 でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。

#### 【0044】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合した TCCR ポリペプチド、又はそれらのドメイン配列を含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピ

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

#### 【0045】

ここで意図している「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然発生TCCRポリペプチドの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持する本発明のタンパク質の形態を意味し、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生TCCRによって生ずる(阻害性又は刺激性の)生物学的機能であって、本発明の天然又は天然発生ポリペプチドが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力以外のものを意味する。同様に、「免疫学的」活性とは、本発明の天然又は天然発生ポリペプチドが有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を意味する。

#### 【0046】

抗体又はここに開示するスクリーニングアッセイで同定できる他の分子(例えば、有機又は無機小分子、ペプチドなど)の内容における「生物学的活性」は、このような分子の炎症細胞の組織への浸潤を誘導又は阻害する能力、T細胞の増殖又は分化を刺激又は阻害する能力、並びに細胞によるサイトカイン放出を刺激又は阻害する能力を意味する。その他の好ましい活性は、増大した血管透過性又はその阻害である。最も好ましい活性は、Th1/Th2応答の調節である(例えば、Th1応答の低下及び/又はTh2応答の上昇、Th2応答の低下及び/又はTh1応答の上昇)。

#### 【0047】

「調節」又は「調節する」という語句は、Th1及びTh2サブセットへのT細胞の分化によって影響を受ける生理状態のアップレギュレーション、ダウンレギュレーション又は改変を意味する(例えば、サイトカイン放出特性)。この用語の意図される範囲内の細胞プロセスは、限定されないが、特定遺伝子の転写;代謝、増殖、分化、接着、アポトーシス及び生存などの正常な細胞機能、並びに

、形質転換、分化及び転移の阻止といった異常なプロセスを含みうる。

【0048】

「アンタゴニスト」という用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示する天然TCCRポリペプチドの生物学的活性を部分的又は完全に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む（例えば、Th1/Th2細胞機能のダウンレギュレーション）。同様の方法で、「アゴニスト」という用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示する本発明のTCCRポリペプチドの生物学的活性を模倣、増強又は刺激する任意の分子を含む。適したアゴニスト又はアンタゴニスト分子は、特にアゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、小有機分子などを含む。TCCRポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法は、TCCRポリペプチドを候補アゴニスト又はアンタゴニスト分子と接触させ、そしてTCCRポリペプチドと正常に関連している一つ又は複数の生物活性の検出可能な変化を測定することである。

「小分子」とは、ここで、約500ダルトン未満の分子量を有すると定義され、一般的に有機分子である。

【0049】

「抗体」(Abs)及び「免疫グロブリン」(Igs)は同じ構造的特徴を持つ糖蛋白質である。抗体は特定の抗原に対する特異性を示すが、免疫グロブリンは抗体及び抗原特異性を持たない他の抗体様分子の両方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系によって低レベルで、ミエローマによって向上したレベルで生産される。「抗体」という用語は最も広い意味で使用され、例えば、単一の抗-TCCRモノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体)、及び多エピトープ特異性を有する抗-TCCR抗体組成物、一本鎖抗-TCCR抗体、及び抗-TCCR抗体の断片を包含する(下記を参照)。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である集団から得られる抗体を指す。該抗体は、該抗体によって接触されうる本発明のポリペプチドのあらゆるドメインと結合しうる。

例えば、該抗体は、ポリペプチドのあらゆる細胞外ドメインと、そしてポリペプチド全体が分泌されると、抗体が結合することができるポリペプチドのあらゆるドメインと結合することができる。

#### 【0050】

「天然抗体」及び「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン( $V_H$ )を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン( $V_L$ )を、他端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

#### 【0051】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の「高頻度可変領域」又は「相補性決定領域(CDR)」と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。CDRを決定する二つ(2)の技術がある：(1)異種間配列可変性に基づく方法(すなわち、Kabatら、Sequences of proteins of immunological(National Institute of Health, Bethesda, MD 1987)；及び(2)抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づく方法(Chothia, C.ら., Nature 342: 877(1989))。しかしながら、この二つの技術によって異なる残基が描写される限り、ハイブリッドCDRを明らかにするためにこれらの技術を組み合わせることができる。

#### 【0052】

可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ば

れる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つのCDRにより連結されたシート配置を主にとる4つ又は5つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRにより近接して結合せしめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, NIH Publ. No.91-3242, Vol.1, 647-669頁[1991]を参照のこと)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害活性への抗体の関与を示す。

#### 【0053】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体(Zapataら, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995])；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')<sub>2</sub>断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置において各ドメインの3つのCDRが相互作用してV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>に量体の表面に抗原結合部位を決定する。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

#### 【0054】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)も含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。ここで、Fab'-SHは、定常ドメインのシステ

イン残基が遊離のチオール基を持つF a b ' を表す。F ( a b ' )<sub>2</sub>抗体断片は、最初はF a b ' 断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる二つの明らかに異なる型の一方向に分類される。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンの五つの主要なクラス: I g A、I g D、I g E、I g G及びI g Mがあり、それらの幾つかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A及びI g A 2に分類される。イムノグロブリンの異なるクラスに該当する重鎖不変領域は、各々、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 及び $\mu$ と呼ばれる。イムノグロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元構造が良く知られている。

#### 【0055】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対応する。更に、異なる決定基(エピトープ)に対応する異なる抗体を典型的には含む通常の(ポリクローナル)抗体とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対応する。特異性に加えて、他のイムノグロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養によって合成されることで、モノクローナル抗体は有利である。「モノクローナル」との形容は、実質的に均一な抗体集団から得られたという抗体の性質を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerらによって最初にNature 256:495 (1975)に記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法(例えば米国特許第4816567号を参照)によって作ることができる。「モノクローナル抗体」は例えば Clacksonら, Nature 352:624-628 (1991) 及び Marksら, J.Mol.Biol. 222:581-597 (1991)に記載

された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離してもよい。また、ファージミッド及びファージベクターの利用による抗体の調製が記載されている米国特許第5,750,373、5,571,698、5,403,484及び5,223,409を参照のこと。

#### 【0056】

ここで、モノクローナル抗体は特に、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を含み、それは、重鎖又は軽鎖の一部が特定の種から誘導された又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖の残りの部分は他の種から誘導された又は特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である抗体、並びにそれらが所望の生物学的活性を示す限りにおいてそれらの抗体の断片である（米国特許第4,816,567号；Morrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 [1984]）。

#### 【0057】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有する特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそれらの断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合性配列）である。大部分において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であって、そのレシピエントの相補性決定領域（CDR）が、マウス、ラット、ヤギなどのヒト以外の種のCDR（ドナー抗体）に由来する所望の特異性、親和性及び容量を持つ残基で置換されている。幾つかの場合、特にヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）の特定の残基が三次元空間における結合部位及び/又は抗体のコンフォメーションへ影響を与える場合、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）の残基が対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、輸入されるCDR又はフレームワーク配列にも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精密かつ最大化するために施される。一般にヒト化抗体は、CDR領域の全て又は実質上全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質上全てがヒト免疫グロブリン共通配列のものである少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含有する

であろう。また、最適なヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域 (Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含有するであろう。さらなる詳細については、Jonesら, Nature 321: 522 -525 (1986); Reichmannら, Nature 332: 323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593 -596 (1992)を参照のこと。又、随意には、このヒト化抗体は、抗体の抗原結合部位が対象とする抗原でマカクザルを免疫化することによって生産された抗体に由来する「primatized」抗体を含みうる。旧世界ザル(カニクイサル、アカゲサル等)の残基を含有する抗体は、例えば、米国特許第5,658,570号;5,693,780号;5,681,722号;5,750,105号;及び5,756,096号に記載されている。

#### 【0058】

本発明の抗体及びその断片は、結合する抗原に対する抗体又はその断片の親和性を改変するために一つ以上のCDR領域及び/又はフレームワーク領域の配列を変えた抗体である「親和性成熟」抗体をも含む。親和性成熟は、初期抗体に対応する抗原に対する成熟抗体の親和性を結果として増加又は低下させうる。概して、初期抗体はヒト化、ヒト、キメラ又はマウス抗体であり、親和性成熟抗体は初期抗体よりも高い親和性を有する。成熟プロセスの間、任意の標準的方法を利用して、CDR又はフレームワーク領域の一つ以上のアミノ酸残基は異なる残基へ変化する。適切な方法には、良く知られたカセット突然変異誘発法(Wellsら, 1985, Gene 34:315)又はオリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発法(Zollerら, 1987, Nucleic Acids Res., 10:6487-6504)を利用する点変異が含まれる。又、親和性成熟は多くの変異が生産される既知の選択法を利用して実施してもよく、所望する親和性を有する変異は、抗原又はリガンドに対して向上した親和性に基づく変異のプール又はライブラリから選択される。この方法では、既知のファージディスプレイ技術を都合良く利用できる。例えば、米国特許第5,750,373号;米国特許第5,223,409号等を参照のこと。

#### 【0059】

ヒト抗体も本発明の抗体の範囲にある。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリー [Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marksら

, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)] を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することができる。また、Coleら及びBoernerらの技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる (Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77(1985); Boernerら, J. Immunol., 147(1): 86-95(1991); 米国特許第5,750,373号)。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。抗原による免疫活動の惹起によって、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,661,016号、及び次の科学文献: Marksら, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonbergら, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwildら, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

#### 【0060】

「単鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は抗体の $V_H$ 及び $V_L$ ドメインを含み、ここでこれらドメインはポリペプチド鎖中に存在する。一般にFvポリペプチドは、sFvをして抗原結合に対する所望の構造を形成せしめるポリペプチドリンカーを $V_H$ ドメインと $V_L$ ドメイン間に更に含む。sFvのレビューについては、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, 269-315頁 (1994)を参照されたい。

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖( $V_H - V_L$ )内で軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に重鎖可変ドメイン( $V_H$ )が結合している。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成を可能にするリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ド

メインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアポディは、例えば、EP404,097; WO93/11161; 及びHollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

#### 【0061】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するとき、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、それに自然に付随する全ての付随物を持たない。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、本発明のポリペプチドは、(1)ローリー法によって、化合物の重量では95%より高い、そしてもっとも好ましくは重量で99%より高い程度に、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端又は内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、或いは(3)クーマシーブルー又は好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された化合物には、例えば抗体又はポリペプチドで、自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

#### 【0062】

「標識」という語は、ここで用いられる場合、直接的又は間接的に化合物、例えば抗体又はポリペプチドと結合して「標識化」抗体を生成する検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自身によって検出可能でもよく(例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識)、あるいは、酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変換を触媒してもよい。

#### 【0063】

「固相」とは、本発明の抗体が接着できる非水性マトリクスを意味する。ここに包含される固相の例は、部分的又は全体的にガラス(例えば、孔の制御されたガラス)、ポリサッカリド(例えばアガロース)、ポリアクリルアミド、ポリス

チレン、ポリビニルアルコール及びシリコンで形成されたものを含む。或る実施態様では、前後関係に応じて、固相はアッセイ用プレートのウェル；その他では精製用カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィカラム）を含むことができる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような別々の粒子の不連続な固体相も含む。

#### 【0064】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物（例えば、ここで開示される抗-ErbB2抗体及び、随意には化学療法剤）の送達に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々の型の小さな小胞である。リポソームの成分は、通常は生物学的メンバーの脂質配列に類似した2層構造に配列される。

#### 【0065】

ここで用いるように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質（「アドヘシン（付着因子）」）の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列（即ち「異種」）と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン（付着因子）部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1及びIgA-2を含む）、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

#### 【0066】

### II. 本発明の組成物と方法

#### A. 全長TCRポリペプチド

本発明は、部分的に、Th1及びTh2サブタイプへのT細胞分化の調節を含む免疫関連疾患、そしてそれに関連する宿主の疾患の治療へTCRポリペプチドを利用するための新規方法を提供する。特に、TCRポリペプチドをコードするcDNAが同定され単離され、Th1媒介及びTh2媒介疾患の治療におけるその利用が下記においてより詳細に開示されている。各々Fig3（配列番号

：1)及び4(配列番号：2)に示されている一つの天然配列ポリペプチドを、用語hTCCR及びmTCCRが定義する一方で、定義項に提供されている天然配列分子と変異体の両方をTCCRが定義することを記しておく。しかしながら、単純化のために、本明細書において、ここに開示したDNA41419(hTCCR)及び/又はDNA120632(mTCCR)にコードされるタンパク質並びに上記のTCCRの定義に含まれるさらなる天然相同体及び変異体は、それらの起源又は調製形式に関わらず、「TCCR」で呼称する。

#### 【0067】

DNA41419(hTCCR、配列番号：1)及びDNA120632(mTCCR、配列番号：2)にコードされるタンパク質の予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。TCCRポリペプチド及びここに記載のコード化核酸に関して、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

上記にて引用されたALIGN-2配列アラインメントプログラムを用いて、全長天然配列hTCCR(Fig 3、配列番号：1)及びmTCCR(Fig 4、配列番号：2)が、登録番号475327及び7710109を有するDayhoff(GenBank)配列とある程度の配列同一性を有することが見出された。

#### 【0068】

##### B. TCCR変異体

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

#### 【0069】

天然全長配列TCCR又はここに記載したTCCRポリペプチドの種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第5,364,934号に記載されてい

る保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列TCCRと比較してTCCRポリペプチドのアミノ酸配列が変化するTCCRポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも1つのアミノ酸のTCCRポリペプチドの一又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、TCCRポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては1から5のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を下記の実施例に記載するインビトロアッセイの任意のもので活性について試験することにより決定される。

#### 【0070】

TCCRポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、全長天然タンパク質と比較した際に、N-末端又はC-末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、TCCRポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

TCCR断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法是、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素でDNAを消化して所望の断片を単離することによるTCCR断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することを含む。DNA断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、TCCRポリペプチド断片は、Fig 3(配列番号:1)及び

Fig 4 (配列番号: 2) に示されているTCCRポリペプチドと少なくとも1つの生物学的及び/又は免疫学的活性を共有する。

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

【0071】

表1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala(A)	val; leu; ile	val
Arg(R)	lys; gln; asn	lys
Asn(N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp(D)	glu	glu
Cys(C)	ser	ser
Gln(Q)	asn	asn
Glu(E)	asp	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; ルロイソ	leu
Leu(L)	ルロイソ; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr

Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; ルイシ	leu

## 【0072】

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

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

## 【0073】

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

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

## 【0074】

また、隣接配列に沿って一又は複数のアミノ酸を同定するのにスキヤニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキヤニングアミノ酸は比較的

小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

#### 【0075】

##### C・TCCRの修飾

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

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチルへの脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の -アミノ基のメチル化[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミ

ド化を含む。

【0076】

本発明の範囲内に含まれる発明ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、ここで意図されるのは、天然配列ポリペプチドに見られる1又は複数の炭水化物部分の欠失（存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる）、及び/又は天然配列には存在しない1又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってもよい。この変更は、例えば、1又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列ポリペプチド（O-結合グリコシル化部位）への付加、又は置換によってなされてもよい。アミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、ポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

【0077】

本発明のポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、該ポリペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的結合による。これらの方法は1987年9月11日発行のWO87/05330及びAplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981)に示されている。

本発明のポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、又はグリコシル化の標的となるアミノ酸残基をコードするコドンの変異置換によって成される。化学的脱グリコシル化は当該分野において良く知られた技術であり、例えば、Hakimuddinら, Arch. Biochem Biophys., 259:52 (1987)及びEdgelほか, Anal. Biochem., 118:131 (1981)により示されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的開裂は、Thotakuralほか, Meth. Enzymol., 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを使用して達成することができる。

共有結合修飾の他のタイプは、米国特許番号第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号又は第4,179,337号に記載されているように、本発明のポリペプチドを、種々の非タンパク性ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンに結合させることを含む。

また、本発明のTCRCポリペプチドは、その他の、異種ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合した本発明のポリペプチドを含んでなるキメラ分子を形成する方法によって修飾してもよい。

#### 【0078】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドと本発明のポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的には本発明のポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このような本発明のポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によって本発明のポリペプチドを容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(poly-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ;flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Fieldら,Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)];c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evanら, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)];及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体 [Paborskyら, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hoppら, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)];KT3エピトープペプチド [Martinら, Science, 255:192-194 (1992)];-チューブリンエピトープペプチド [Skinnerら, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)];及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuthら, Proc. Natl. A

cad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990) ] を含む。

#### 【0079】

それに換わる実施態様では、キメラ分子は本発明の免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも1つの可変領域に換えて本発明のポリペプチドの可溶化（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG分子のヒンジ、CH<sub>2</sub>及びCH<sub>3</sub>、又はヒンジ、CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>及びCH<sub>3</sub>領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

#### 【0080】

##### D. TCCRの調製

以下の説明は、主として、TCCR核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりTCCRを生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてTCCRを調製することができると考えられる。例えば、TCCR配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい[例えば、Stewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)参照]。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機（Foster City, CA）を用いて、製造者の指示により実施してもよい。TCCRの種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて全長TCCRを生産してもよい。

#### 【0081】

##### 1. 本発明のポリペプチドをコードするDNAの単離

TCCRをコードするDNAは、TCCR mRNAを保有してそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリから得ることができる。従って、ヒトTCCRDNAは、実施例に記載されるよう

に、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリから簡便に得ることができる。またTCRC-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリから又は公知の合成方法（例えば、自動化核酸合成）により得ることもできる。

ライブラリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(本発明のポリペプチドに対する抗体又は少なくとも約20 - 80塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリのスクリーニングは、例えばSambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR法を使用するものである [ Sambrookら, 上掲; Dieffenbachら, PCR Primer : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995) ]。

#### 【0082】

下記の実施例には、cDNAライブラリのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、疑陽性が最小化されるよう十分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリ内のDNAとのハイブリッド形成時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、<sup>32</sup>P標識されたATPのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリッド形成条件は、上掲のSambrook等に示されている。

このようなライブラリスクリーニング法において同定された配列は、GenBank等の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は全長に渡っての(アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの)配列同一性は、この分野で知られた、そしてここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ

酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されなかったmRNAの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrook等に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用し、選択されたcDNA又はゲノムライブラリをスクリーニングすることにより得られる。

### 【0083】

#### 2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したTCR生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及びSambrookら、上掲に見出すことができる。

### 【0084】

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質移入の方法、例えば、 $CaCl_2$ 、 $CaPO_4$ 、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トゥメファシエンスによる感染が、Shawら、Gene, 23:315 (1983)及び1989年6月29日公開のWO 89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingenら, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiaoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、

エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990)及び Mansourら, *Nature*, 336:348-352 (1988)を参照のこと。

#### 【0085】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31,446)；大腸菌X1776 (ATCC31,537)；大腸菌株W3110 (ATCC27,325)及びK5772 (ATCC53,635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、*E. coli*、エンテロバクター、エルビニア(*Erwinia*)、クレブシエラ(*Klebsiella*)、プロテウス(*Proteus*)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス(*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバシリスブチリス(*B. subtilis*)及びバシリリチェニフォルミス(*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD 266,710に記載されたバシリリチェニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompTkan* を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55,244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac)169 degP ompT rbs*

7 i l v G k a nを有する大腸菌W3110株37D6；非カナマイシン耐性d e g P欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4；及び1990年8月7日発行の米国特許第494683号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼポリメラーゼ反応が好ましい。

#### 【0086】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、TCCRポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセスプロンプ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行のEP 139,383)；クルベロミセスホスツ(*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号; Fleerら, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991))、例えばケーラクチス(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourtら, *J. Bacteriol.* 154(2)737 [1983])、ケーフラギリス(*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、ケーブルガリクス(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、ケーウイケラミイ(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178)、ケーワルチイ(*K. waltii*) (ATCC 56,500)、ケードロソフィラルム(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906; Van den Bergら, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990))、ケーテモトレランス(*K. thermotolerans*)及びケーマルキシアナス(*K. marxianus*)；ヤロウイア(*Yarrowia*) (EP 402,226)；ピッチャパストリス(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishnaら, *J. Basic Microbiol.* 28: 265-278 [1988])；カンジダ；トリコデルマレーシア(*Trichoderma reesei*) (EP 244,234)；アカパンカビ (Caseら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979])；シュワニオマイセス(*Schwannomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(*occidentalis*) (1990年10月31日発行のEP 394,538)；及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(*Trichopodium*) (1991年1月10日発行のWO 91/00357)；及びコウジ菌、例えば偽巢性コウジ菌 (Ballanceら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburnら, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yeltonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984])及びクロカビ (Ke

Ily及びHynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985])が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピチア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)からなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記載されている。

#### 【0087】

グリコシル化TCCRの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスポドスペラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。より詳細な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Grahamら, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); チャイニーズハムスター卵巣細胞ノ-DHFR(CHO, Urlaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)) ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

#### 【0088】

##### 3. 複製可能なベクターの選択及び使用

TCCRをコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができる。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一又は複数のシグナル

配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

TCCRは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるTCCR-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1ppあるいは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(酵母菌属(*Saccharomyces*)及びクレイベロマイシス(*Kluyveromyces*) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、白体(*C.albicans*)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行のEP362179)、又は1990年11月15日に公開されたWO 90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

#### 【0089】

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 $\mu$ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、

メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

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

#### 【0090】

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

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzeman ら, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hess ら, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochem

istry, 17:4900(1987)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモーターはEP 73,657に更に記載されている。

#### 【0091】

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

より高等の真核生物による所望のTCCRをコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約10から300塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強するDNAのシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエ

ンハンサーが含まれる。エンハンサーは、TCCRコード化配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、TCCRをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのTCCRの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gethingら, Nature, 293:620-625 (1981); Manteiら, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; 及びEP 117,058に記載されている。

#### 【0092】

#### 4. 遺伝子増幅/発現の検出

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

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意

の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列TCCRポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はTCCR DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

#### 【0093】

##### 5. ポリペプチドの精製

TCCRの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X100)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。TCCRのポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

組換え細胞タンパク又はポリペプチドからTCCRを精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲル濾過；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及び本発明のポリペプチドのエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, *Methodes in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選択される精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び生産される特定のTCCRの性質に依存する。

#### 【0094】

##### 6. 組織分布

本発明のポリペプチドを発現する組織の位置は、種々のヒト組織でのmRNA発現の測定により確認できる。そのような遺伝子の位置によって、本発明のポリペプチドの活性の刺激及び阻害によって最も影響を受ける組織に関する情報が得られる。また、特定の組織中の遺伝子の位置は、下記にて論じる活性遮断アッ

セイのための試料組織を提供する。

上記したように、種々の組織における遺伝子増幅又は遺伝子発現は、mRNAの転写の定量化のための従来のサザンブロット、ノーザンブロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 [1980])、ドットブロット(DNA分析)、又はインサイツハイブリダイゼーションにより、ここに提供する配列にもとづいて適切な標識プローブを用いて測定できる。あるいは、DNA二重鎖、RNA二重鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二重鎖又はDNA-タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識する抗体を用いてもよい。

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

#### 【0095】

##### E. TCCRの用途

###### 1. 一般的用途

TCCRは、WS(G)XWSクラスのサイトカインレセプターであり、IL-12レセプター、G-CSFR及びIL-6レセプターと相同性を有し、IL-12-2レセプターに対して最も高い相同性を有する(26%の同一性)。これらのレセプターは、細胞の成長及び分化、特に血液細胞の成長と分化に関与する細胞を制御することができるシグナルを伝達する。例えば、G-CSFには、化学療法後に好中球を増殖させる臨床学的応用において幅広い用途が見出されている。これらの型のサイトカインレセプターとそれらのアゴニスト/アンタゴニストは、血液学的及び腫瘍学的疾患の治療において重要な役割を担うと思われ

る。TCCRは、Tヘルパー細胞応答、特にTh1及びTh2へのT細胞分化の調節において、一役を担うことが見出されている。従って、TCCRとそのアゴニスト/アンタゴニストは、所望する治療目的による、哺乳動物の免疫応答をTヘルパー-1応答(Th1)又はT-ヘルパー-2(Th2)のいずれかへ偏らせる治療方法において有用でありうる。

#### 【0096】

CD4+T細胞は、応答に關与するすべての他の細胞型の補強、成長及び分化を促進することによって、アレルギー性炎症応答において重要な役割を担う。インターロイキン(IL-4)及びIL-3を含む、マスト細胞の成長、B細胞におけるIgE合成の誘導、及びリンパ球、マスト細胞、及び炎症部分への好塩基球の補強を促進する幾つかのサイトカインを分泌することによって、CD4+細胞はこの機能を果たす。更には、CD4+T細胞は、好酸球及びB細胞の成長と機能を促進するIL-5、並びにマスト細胞の成長と分化を促進し、 $\gamma$ -インターフェロンの生産を阻害するIL-10を生産する。IL-4、IL-5、IL-10及びIL-13の組み合わせは、Th2細胞と呼ばれているCD4+T細胞のサブセットによって生産され、この細胞はアレルギー症の個体において多量に増加して見出される。

Th1細胞は、マクロファージの活性化(IFN- $\gamma$ 、IL-2、腫瘍壊死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ))、並びに細胞性免疫を誘導するのに重要なサイトカインを分泌する。Th2細胞は、体液性免疫及びアレルギー性疾患において重要なサイトカインを分泌する(IL-4、IL-5及びIL-10)。Th1サイトカインがTh2サイトカインの生産を阻害する一方で、Th2サイトカインはTh1サイトカインの生産を阻害する。このネガティブフィードバックループは、免疫応答の間に分極化したサイトカインの生産特性を際立たせる。Th1サイトカインの過剰生産が自己免疫疾患と同種移植の拒絶反応を引き起こすことから、これら「対立する」サイトカイン間の生産の微妙なバランスの維持は重要である。これと同時に、アレルギー性炎症疾患、例えばTh2サイトカインの生産は、喘息及びアレルギー性鼻炎、又は細胞内病原体に対する効果の無い免疫を引き起こす。

#### 【0097】

Umetsu及びDeKruyff, Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 215(1): 11-20(1997)は、感染の疑いは免疫の欠如ではなく、むしろ不適切なサイトカイン特性を分泌するT細胞の発生として説明できることを提案している。非アレルギー性の個体は、IgE合成及びマスト細胞及び好酸球分化を阻害するTh1サイトカインを分泌するT細胞を発生させるので、無症候のままであるが、アレルギー性疾患は、Th2サイトカインを不適切分泌するCD4+T細胞によって起こり得る。別の言い方をすると、アレルギー性鼻炎及び喘息は、病理的異常又は経口/粘膜耐性を表わることができ、正常には「Th2」制御/抑制細胞へ発達するT細胞は、これに代わって、アレルギー性炎症を開始そして強める「Th2」細胞へ発達する。

サイトカインレセプターは、一般的には、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを含んでなる多ドメイン構造によって特徴付けられる。細胞外ドメインは、通常はリガンドとの結合として機能し、膜貫通ドメインはレセプターを細胞膜へ固着させ、そして細胞内ドメインは、通常は細胞内のシグナル伝達に参与しているエフェクターである。しかしながら、リガンド結合及びエフェクター機能は、多量体レセプターの個々のサブユニットに存在しうる。リガンド結合ドメインそのものは、複合ドメインである。多量体レセプターは、一般的には：(1)ホモ二量体；(2)リガンド結合及びエフェクタードメインの両方があるサブユニットを有するヘテロ二量体；及び(3)異なる機能がある構成サブユニットを有する多量体を含む幅広い用語である。サイトカインレセプターは、Urdahl, Ann. Reports Med. Chem. 26: 221-228(1991)及びCosman, Cytokine 5: 95-106(1993)においてさらに概説そして分類されている。

特定の免疫関連用途（例えば、Th1及びTh2細胞媒介生理機能）に加えて、TCRをコードするヌクレオチド配列（又はそれらの補体）には、染色体及び遺伝子マッピング、そしてアンチセンスRNA及びDNAの作製におけるハイブリダイゼーションプローブとしての用途を含む、分子生物学分野における種々の応用がある。また、ここに記載されている組み換え技術によって、TCR核酸はTCRポリペプチドの調製にとって有用である。

#### 【0098】

Fig 3（配列番号：1）及びFig 4（配列番号：2）に記載されている全

長天然配列 T C C R 遺伝子、又はその一部分は、全長 T C C R を単離するため、又は F i g 3 及び 4 ( 各々配列番号 : 1 & 2 ) に開示されている T C C R 配列に対して所望する配列同一性を有するさらに他の c D N A ( 例えば、T C C R の天然発生変異体又は他の種由来の T C C R ) を単離するために、c D N A ライブラリに対するハイブリダイゼーションプローブとして利用することが可能である。随意には、このプローブの長さは約 2 0 から 5 0 塩基である。このハイブリダイゼーションプローブは配列番号 : 1 & 2 のヌクレオチド配列の領域に由来し、これらの領域は、過度の実験をせずに、或いは天然配列 T C C R のプロモーター、エンハンサーエレメント及びイントロンから決定することが可能である。一つの例として、スクリーニング方法には、約 4 0 塩基の選択プローブを合成するための既知の D N A 配列を用いることで T C C R 遺伝子のコード化領域を単離することが含まれる。放射線ヌクレオチド、例えば<sup>32</sup>P又は<sup>35</sup>Sのような、或いは酵素標識、例えばアビジン / ビオチン共役系を経由してプローブと共役しているアルカリフォスファターゼを含む種々の標識によって、ハイブリダイゼーションプローブは標識されうる。本発明の T C C R 遺伝子の配列に対して相補的な配列を有する標識されたプローブは、このプローブがハイブリダイゼーションするメンバーを決定するために、c D N A、ゲノム D N A 又は m R N A のライブラリのスクリーニングへ用いることができる。ハイブリダイゼーション技術は、下記の実施例にさらに詳しく記載されている。ここで開示されている方法を利用して、ここで開示されているあらゆる E S T 又は他の配列断片を、同じようにプローブとして用いることが可能である。

#### 【 0 0 9 9 】

T C C R 核酸の他の有用な断片には、標的 T C C R m R N A ( センス ) 又は T C C R D N A ( アンチセンス ) と結合することができる一本鎖核酸配列 ( R N A 又は D N A のどれか ) を含んでなるアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明によると、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドには、T C C R D N A のコード化領域の断片が含まれる。そのような断片には、一般的に、少なくとも約 1 4 ヌクレオチド、好ましくは約 1 4 から 3 0 ヌクレオチドが含まれる。与えられたタンパク質をコードする c D N A 配列に基づくア

ンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを誘導する能力は、例えばStein及びCohen, Cancer Res. 48: 2659(1988)及びvan der Krolら, Techniques 6:958(1988)に示されている。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらす、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の期外停止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、TCRタンパク質の発現を阻止するのに用いられる。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖-ホスホジエステル骨格(又は他の糖結合、WO 91/06629に記載のもの等)を有するオリゴヌクレオチドをさらに含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが(即ち、酵素分解に耐えうるが)、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

#### 【0100】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、WO 90/10048に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ-(L-リジン)に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤、アルキル化剤又は金属作体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO<sub>4</sub>-媒介DNA形質移入、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン-バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2(M-MuLVから誘

導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター(WO 90/13641参照)を含む。

#### 【0101】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO 91/04753に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO 90/10448に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

また、プローブは、PCR技術に用いて、密接に関連したTCCRコード化配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

#### 【0102】

また、TCCRをコードする核酸配列は、そのTCCRをコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリッド形成プローブの作成にも用いることができる。ここに提供される核酸配列は、インサイツハイブリッド形成、既知の染色体マーカーに対する結合分析、及びライブラリーでのハイブリッド形成スクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

TCCRがレセプターであるために、TCCRのコード化配列は、その他のタンパク質と結合するタンパク質をコードする。従って、本発明のTCCRタンパク質は、結合相互作用に関与する他のタンパク質又は分子を同定するためのアッセイに用いることができる。このような方法により、レセプター/リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。このような結合性相互作用に含ま

れるタンパク質も、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプターTCCRは関連するリガンドの単離にも使用できる。スクリーニングアッセイは、天然TCCR又はTCCRのレセプターの生物学的活性に似たリード化合物の発見のために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングにも用いられ、小分子候補薬剤の同定に特に適したものとす。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く知られ特徴付けられているタンパク質 - タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

#### 【0103】

ここに記載したTCCRポリペプチドは、タンパク質電気泳動目的の分子量マーカーとして用いてもよい。

ここに記載したTCCRポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は染色体同定に有用である。この点において、実際の配列に基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、新規な染色体マーカーの同定の必要性が存在している。本発明の各TCCR核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

また本発明のTCCRポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングに使用でき、本発明のTCCRポリペプチドは一方の組織で他方に比較して異なる発現をする。TCCR核酸分子は、PCR、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

#### 【0104】

##### 2. 抗体結合の研究

本発明のTCCRポリペプチドの活性は、組織細胞上でのTCCRポリペプチドの効果を阻害する抗-TCCR抗体の能力が試験される抗体結合の研究によって更に確認できる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロ抱合体抗体を含み、その調製は以下に記載する。

抗体結合の研究は、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイなどの既知のアッセイ法で実施してよい。Zola, Mono

clonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

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

#### 【0105】

サンドウィッチアッセイは2つの抗体の使用を含み、各々が検出すべきタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチアッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第1の抗体に結合し、その後第2の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の3成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第2の抗体は検出可能部分で標識され（直接サンドウィッチアッセイ）、あるいは検出可能部分で標識された抗-免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接サンドウィッチアッセイ）。例えば、サンドウィッチアッセイの一形態はELISAアッセイであり、この場合の検出可能部分は酵素である。

免疫組織学のために、腫瘍試料は新鮮でも凍結したものでよく、パラフィンに包埋して、例えばホルマリン等の保存剤で固定してもよい。

#### 【0106】

### 3. 細胞ベースアッセイ

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

異なる方法では、ここに記載されたcDNAを特定の免疫関連疾患に關与することが知られているある細胞型の細胞へ形質移入し、これらのcDNAの免疫機能を刺激又は阻害する能力を分析する。適当な細胞は所望の遺伝子で形質移入し、そして免疫機能をモニターすることができる。このような形質移入株化細胞は

、例えばT細胞の増殖又は炎症性細胞の浸潤を調節する免疫機能を阻害又は刺激するポリ - 又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の能力を試験するのに用いることができる。ここに同定した遺伝子のコード化配列で形質移入した細胞は、さらに、免疫関連疾患の治療の候補薬の同定に用いることができる。

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

。

#### 【0107】

一つの適切な細胞ベースアッセイは、混合リンパ球反応(MLR)である。Current Protocols in Immunology, unit3.12; J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Inc. このアッセイでは、活性T細胞の増殖を刺激又は阻害する試験化合物の能力が評価される。レスポンダーT細胞の懸濁液を同種刺激細胞と培養し、T細胞の増殖をトリチウム化チミジンの取り込みによって測定する。このアッセイは、T細胞反応性の一般的な測定法である。活性化によって、T細胞の大多数がIL-2へ応答し、IL-2を生産することから、このアッセイでの応答性の相違の一部は、応答細胞によるIL-2生産の違いを反映する。MLRの結果は、標準的なリンフォカイン(IL-2)検出アッセイによって確かめられる。Current Protocols in Immunology, 上掲, 3.15, 6.3。

MLRアッセイにおける増殖性のT細胞応答は、アッセイされた分子の直接的な分裂促進特性又は外来性の抗原誘導活性化に起因する。本発明のポリペプチドのT細胞刺激性活性の更なる確認は、同時刺激アッセイによって得ることができる。T細胞活性化には、T細胞レセプター(TCR)を通して媒介される抗原特異性シグナルと二番目のリガンド結合による相互作用を通して媒介される同時刺激シグナル、例えばB7(CD80, CD86)/CD28結合相互作用が必要とされる。CD28架橋は、活性化T細胞によるリンフォカインの分泌を増加させる。T細胞活性化は、ネガティブ又はポジティブ効果のあるリガンド結合を通し

て、ネガティブ及びポジティブコントロールの両方を有する。CD28及びCTLA-4はB7と結合するIgスーパーファミリーの関連する糖タンパク質である。B7へのCD28の結合には、T細胞活性化のポジティブ同時刺激効果がある；逆を言えば、B7へのCTLA-4の結合には、ネガティブなT細胞非活性化効果がある。Chambers, C.A.及びAllison, J.P., *Curr. Opin. Immunol.* (1997) 9:396；Schwartz, R.H., *Cell* (1992) 71: 1065；Linsey, P.S.及びLedbetter, J.A., *Annu. Rev. Immunol.* (1993) 11:191；June, C.H.ら., *Immunol. Today* (1994) 15:321；Jenkins, M.K., *Immunity* (1994) 1:405。同時刺激アッセイでは、T細胞同時刺激性又は阻害活性について本発明のポリペプチドをアッセイする。

#### 【0108】

T細胞増殖の刺激剤（同時刺激剤）であり、そしてその上MLR及び度維持刺激アッセイによって決定されたアゴニスト、例えばアゴニスト抗体である本発明のポリペプチドは、本発明の他の化合物と同じく、例えば、貧弱、最適下限又は不十分な免疫機能として特徴付けられる免疫関連疾患の治療に有用である。これらの疾患は、T細胞の増殖及び活性化を刺激すること（例えば、T細胞性免疫、Th1及び/又はTh2サイトカイン生産）、並びに本発明の刺激ポリペプチドのような刺激性化合物の投与を通して哺乳動物での免疫応答を増強することによって治療される。例えば、この刺激性ポリペプチドは、TCRリガンドポリペプチド又はそのアゴニスト抗体でもよい。

本発明での刺激性化合物の直接的用途は、初期T細胞上に発現するリガンド（4-1BBL）と結合し、T細胞活性化と成長の信号を伝達する、腫瘍壊死因子レセプターファミリーのメンバーである4-1BB糖タンパク質をともなう実験において確かめられている。Alderson, M.E.ら., *J. Immunol.* (1994) 24:2219。

アゴニスト刺激性化合物の用途も実験的に確かめられている。アゴニスト抗-4-1BB抗体による治療での4-1BBの活性化は、腫瘍の根絶を促進する。Hellstrom, I.及びHellstrom, K.E., *Crit. Rev. Immunol.* (1998) 18:1。下記により詳しく記載されている免疫吸着剤療法による腫瘍の治療は、本発明の刺激性化合物の用途のもう一つの例である。

## 【0109】

M L R アッセイにおいて阻害することが見出されたタンパク質の活性と拮抗する又はそれを遮断することによって、免疫刺激性又は促進効果も達成される。化合物の阻害活性を打ち消すことは、正味の刺激性効果を生み出す。適切なアンタゴニスト/遮断化合物は、阻害性タンパク質を認識してそれと結合するその抗体又は断片であり、このタンパク質のレセプターとの効果的な相互作用を遮断して、レセプターを通してのシグナル伝達を阻害する。恐らくはC T L A - 4 の結合による阻害シグナルを除くことによってT細胞の増殖を促進する抗-C T L A - 4 抗体を用いる実験において、この効果は確認されている。Walunas, T.L.ら, *Immunity*(1994) 1:405。

一方では、T細胞増殖/活性化及び/又はリンフォカイン分泌の直接的阻害剤である本発明の他の化合物と同様に本発明のポリペプチドは、免疫応答を抑制へ直接に用いることができる。これらの化合物は、免疫応答の程度を減じること、並びに異常に活発な、並外れに最適な、又は自己免疫性の応答によって特徴付けられる免疫関連疾患を治療するのに有用である。本発明のこの化合物の用途は、レセプターB7へのC T L A - 4 の結合がT細胞を不活性化させる上記に記載の実験によって確認できる可能性がある。本発明の直接的阻害性化合物は、類似の方法で機能する。

あるいは、例えば、本発明の刺激ポリペプチドと結合し、これら分子の刺激効果を遮断する抗体は、正味の阻害性効果を生成し、T細胞増殖/活性化及び/又はリンフォカイン分泌を阻害することによってT細胞性免疫応答を抑制するために用いることができる。このポリペプチドの刺激効果を遮断することは、哺乳動物の免疫応答を抑制する。この用途は、抗-I L 2 抗体を用いる実験において確認されている。これらの実験では、抗体I L 2 と結合し、I L 2 のそのレセプターとの結合を遮断することでT細胞阻害効果を達成する。

## 【0110】

## 4. 動物モデル

細胞ベースインビトロアッセイの結果は、インビトロ動物モデル及びT細胞機能向けのアッセイを用いてさらに確かめることができる。免疫関連疾患の発達及

び病理におけるここで同定される遺伝子の役割を更に理解するために、そして抗体、及び小分子アゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。このようなモデルのインビボの性質によって、特にヒト患者における反応を予測できる。免疫関連疾患の動物モデルは、非組換え及び組換え（トランスジェニック）動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植などにより、細胞を導入することによって作成される。

#### 【0111】

移植片対宿主疾患は、免疫担当細胞が免疫抑制又は寛容（トレランス）な患者に移植された際に起こる。ドナー細胞が宿主抗原を認識し、これへ応答する。この応答には、生命を脅かす重篤な炎症から下痢及び体重減少の穏やかな場合にまで変化し得る。移植片対宿主疾患モデルは、MHC抗原及び微量の移植抗原に対するT細胞の反応性を評価する手段を提供する。好適な手法は、上記のCurrent Protocols in Immunology unit 4.3に詳しく記載されている。

皮膚移植片拒絶の動物モデルは、T細胞がインビボ組織破壊を媒介する能力を試験する手段であり、移植片拒絶におけるそれらの役割の基準である。最も普通で許容されるモデルは、マウスの尾の皮膚移植である。繰り返し実験により、皮膚同種移植片拒絶はT細胞、ヘルパーT細胞尾キラー効果T細胞に媒介され、抗体ではないことが示された。Auchincloss, H. Jr.及びSachs, D.H., *Fundamental Immunology*, 2版, W.E. Paul編, Raven Press, NY, 1989, 889-992。好適な手法は、上記のCurrent Protocols in Immunology, unit 4.4に詳細に記載されている。本発明の化合物の試験に使用できる他の移植片拒絶モデルは、Tanabe, M.ら, *Transplantation* (1994) 58: 23及びTinubu, S.A.ら, *J. Immunol.* (1994) 4330-4338に記載されている同種心臓移植モデルである。

#### 【0112】

遅延型過敏症の動物モデルは、同様に細胞媒介免疫機能のアッセイ法を提供する。詳細な型の過敏症反応は、抗原負荷後時間が経過するまでピークに達しない

炎症を特徴とするT細胞媒介免疫反応である。これらの反応はまた、組織特異的自己免疫疾患、例えば多発性硬化症(MS)及び実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE、MSのモデル)を起こす。好適な手法は、上記のCurrent Protocols in Immunology, unit 4.5に詳細に記載されている。

EAEは、T細胞及び単核球炎症、及びその結果生じた中枢神経系の軸索の脱髄によって特徴付けられるT細胞性自己免疫疾患である。EAEは、一般的には、ヒトのMSの関連する動物モデルであると考えられる。Bolton, C., Multiple Sclerosis(1995) 1: 143。急性及び再発性軽減モデルの両方が開発されている。Current Protocols in Immunology, unit 15.1及び15.2に記載のプロトコールを用いて、本発明の化合物は、免疫性脱髄疾患に対するT細胞刺激性又は阻害性活性について試験することができる。Duncan, I.D.ら, Molec. Med. Today(1997) 554-561に記載されている、オリゴデンドログリア又はシュワン細胞が中枢神経系へ移植されるミエリン疾患のモデルも参照のこと。

#### 【0113】

接触過敏症は、細胞性免疫機能の単純な遅延型過敏症インビボアッセイである。この手法では、遅延型過敏症反応を引き起こす外来性ハプテンへの皮膚被爆が測定そして定量化される。接触過敏症には、誘発期が後に続く初期感作期が含まれる。この誘発期は、Tリンパ球が以前に接触した抗原と遭遇する際に起こる。腫れと炎症が起こり、それをヒトアレルギー性接触皮膚炎の優れたモデルにする。好適な手法は、Current Protocols in Immunology, Eds. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach及びW. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unit 4.2に詳しく記載されている。Grabbe, S. 及びSchwarz, T, Immun. Today 19(1): 37-44(1998)も参照のこと。

関節炎の動物モデルはコラーゲン誘発関節炎である。このモデルは、ヒトの自己免疫性慢性関節リウマチと臨床的、組織学的及び免疫学的特徴を共有し、ヒトの自己免疫性関節炎の許容されるモデルである。マウス及びラットモデルは、滑膜炎、軟骨及び肋軟骨下骨の浸食を特徴とする。本発明の化合物は、上記のCurrent Protocols in Immunology, unit 15.5に記載されているプロトコールを用いて、自己免疫性関節炎に対する活性について試験できる。また、Issekutz, A.C.

ら、Immunology (1996) 88: 569に記載されているCD18及びVLA-4インテグリンに対するモノクローナル抗体を用いたモデルも参照のこと。

#### 【0114】

喘息のモデルは記載され、そこでは抗原誘発気道過剰反応性、肺性好酸球増加症及び炎症が、動物をオボアルブミンで感作し、次いで動物にエアロゾルで運ばれる同じタンパク質を負荷することにより誘発される。幾つかの動物モデル（モルモット、ラット、非ヒト霊長類）は、エアロゾル抗原で負荷した際にヒトのアトピー性喘息に似た徴候を示す。マウスモデルは、ヒト喘息の多くの特徴を持つ。本発明の化合物の喘息治療における活性及び有効性を試験するための好適な方法は、Wolyniec, W.W.ら、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., (1998) 18: 777及びその引用文献に記載されている。

さらに、本発明の化合物は、乾癬様疾患の動物モデルでも試験できる。証拠は、乾癬についてのT細胞病原を示唆している。本発明の化合物は、Schon, M.P.ら、Nat. Med. (1997)3: 183によって記載された、マウスが乾癬に類似する組織病原学的皮膚疾患を示すscid/scidマウスモデルでも試験できる。他の好適なモデルは、Nickoloff, B.J.ら、Am. J. Pathol. (1995) 146: 580に記載されたように調製されるヒト皮膚/scidマウスキメラである。

#### 【0115】

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

noら, Cell 57, 717-73 [1989])を含む。概説としては、例えば、米国特許第4,736,866号を参照のこと。

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

#### 【0116】

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

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

#### 【0117】

TCCR又はその修飾型をコードする核酸もトランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物を産生するのに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。用語「ノックアウト」は、例えば相同組み換えの結果として内因性の遺伝子が「ノックアウト」又は除去されているトランスジェニック動物を表すために、当該分野で用いられている。相同組み換えとは、内因性の遺伝子に対して相同的な標的ベクターの領域を表すための専門用語である。これら相同的な領域は互いにハイブリダイゼーションし、共有される相同的な領域によって定められる方向性と位置において、宿主の内因性配列がベクター挿入配列で置き換わることで宿主のゲノムと組み換え結合する。ノックアウト動物

の遺伝子型は、「- / -」に続く遺伝子の名前によって表示される。これによって、「- / +」と称される一つの対立遺伝子のみが「ノックアウト」された（ヘテロ接合型）動物からそれが区別される。動物のすべての細胞において、「ノックアウト」された内因性の遺伝子はもはや発現しない。特定の細胞の詳細な分析によって、除去された遺伝子の機能が同定される。

【0118】

トランスジェニック動物(例えばマウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、TCCRをコードするcDNA又は、確立された技術によりTCCRをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用することができ、ゲノム配列を、TCCRをコードするDNAを発現する細胞を有するトランスジェニック動物を産生するために使用することができる。特にマウス又はラット等のトランスジェニック動物を産生する方法は当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4,736,866号や第4,870,009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのTCCR導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたTCCRをコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はTCCRをコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えば過剰発現を伴う病理的状态に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病状の発病率が低ければ、疾患に対する治療的処置の可能性が示される。

【0119】

あるいは、「ノックアウト」動物は、ここで同定されたポリペプチドをコードする内在性の遺伝子と、動物の胚性細胞へ導入されたそのポリペプチドをコードする改変ゲノムDNAとの間の相同組み換えの結果として、ここで同定されたポリペプチドをコードする欠陥又は改変遺伝子を有するものとして構築することができる。例えば、ある特定ポリペプチドをコードするcDNAは、確立されてい

る技術によって、そのポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに利用できる。ある特定のポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部は、その他の遺伝子、例えば組み込みをモニターするために利用できる選択可能なマーカーをコードする遺伝子によって置き換え又は除去できる。概して、ベクターは無変化のフランキングDNA(5'と3'末端の両方)を数キロベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。ベクターを胚性幹細胞へ(例えば電気穿孔法等によって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する[例えば、Liほか, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間を置いて「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、例えば腫瘍の発達を含む、ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状态及びその病理的状态の発達に対する防御能力によって特徴付けられる。

本発明では、Th1及び/又はTh2免疫応答及びこれによって媒介される疾患のTCRアゴナイゼーション/アンタゴナイゼーションの効果を研究するためにノックアウトマウスが作製された。

#### 【0120】

##### 5. キメラレセプター

更には、未知のリガンドを有するレセプターによるシグナル伝達の効果を確定するために、キメラレセプターを再作製できる。リガンドを単離せずにレセプターの機能を調べる手段として、キメラレセプターは証明されている。Changら., Mol. Cell Biol. 18(2): 896-905(1998)。

#### 【0121】

##### 6. 免疫アジュバンド療法

一実施態様では、本発明の免疫刺激化合物を腫瘍（癌）治療のための免疫アジュバンド療法に利用することができる。T細胞がヒト腫瘍の特異的抗原を認識することは、現在は立証されている。MAGE、BAGE及びGAGEファミリーの遺伝子によってコードされている腫瘍抗原の一群は、すべての成人の正常組織では沈黙しているが、腫瘍、例えばメラノーマ、肺癌、頭頸部腫瘍、及び膀胱癌においてかなりの量が発現している。DeSmet, C.ら., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7149。インビトロとインビボの双方において、T細胞の同時刺激によって腫瘍の退行と抗腫瘍応答が誘導されることが示されている。Melero, I.ら., Nature Medicine(1997)3: 682 ; Kwon, E.D.ら., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1997)94: 8099 ; Lynch, D.H.ら., Nature Medicine(1997)3:625 ; Finn, O.J.及びLotze, M.T., J. Immunol.(1998)21: 114。本発明の刺激性化合物は、アジュバンドとして、T細胞増殖/活性化及び腫瘍抗原への抗腫瘍応答を刺激するために、単独又は成長制御剤、細胞傷害性剤又は化学療法剤とともに投与することができる。既知の投与処方によって、成長制御、細胞傷害性、又は化学療法剤を従来量で投与してもよい。本発明の化合物による免疫刺激活性によって、成長制御、細胞傷害性、又は化学療法剤の減量が可能となり、それによって患者の毒性が潜在的に低下する。

#### 【0122】

##### 7. 候補薬ためのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定されたTCR核酸によってコードされるポリペプチドと結合又は複合化する化合物、又はその生物学的に活性な変異体を同定するように、そうでなければコードされているポリペプチドと他の細胞性タンパク質の相互作用を妨害する化合物を同定するように設計されている。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含み、特に、小分子候補薬の同定に適している。考えられる小分子には、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、(ポリ)ペプチド-免疫グロブリン融合物を含む合成有機又は無機化合物を含み、そして特に限定することなく、ヒト抗体及び抗体断片と並んで、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びそのような抗

体又は断片のキメラ又はヒト化異形を含む抗体を含む。

アッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質 - タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。ここで確認されるすべての候補薬のスクリーニングアッセイには、候補薬とTCCRポリペプチドの相互作用を可能にする条件下及び十分な時間に渡って、これら二つの分子を接触せしめることを必要とするという共通の特性がある。

#### 【0123】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。本発明のTCCRポリペプチドがレセプターであることから、TCCR変異体、そのアンタゴニスト及び/又はそのアゴニストを含む候補薬を同定する目的で、TCCRECD断片もうまく用いられる。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるポリペプチドのレセプター即ち候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、そのペプチドを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

#### 【0124】

候補化合物が相互作用するがTCCRタンパク質に結合しない場合、そのレセプターとの相互作用は、タンパク質 - タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋

、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者等 [ Fields及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chienら, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991) ] に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより、Chevray及びNathans [ Proc.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991) ] に開示されているように監視することができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-lacZリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER(商品名)）は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

#### 【0125】

ここで同定されたTCRCポリペプチドの相互作用を妨害する化合物と、試験が可能な他の細胞内又は細胞外成分を見出すために、通常は、遺伝子の生産物及び細胞内又は細胞外成分を含有し、反応混合物はこれら成分の結合及び相互作用を可能に成らしめる時間と条件の下で調整される。試験化合物が上記の相互作用を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物有り又は無しで実施する。さらに、第3の反応混合物にプラシーボを添加してポジティブ対照としてもよい。対照反応において複合体が形成され、試験化合物を含む反応混合物ではない

ことは、試験化合物が試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害する事を示す。

#### 【0126】

#### 8. 免疫関連疾患治療のための組成物及び方法

免疫関連疾患（例えばTh1-及び/又はTh2-媒介疾患）の治療に有用な組成物は、限定されないが、タンパク質、抗体、小有機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、三重螺旋分子などを含み、免疫機能、例えばT細胞増殖/活性化、リンフォカイン放出、又は免疫細胞浸潤を阻害又は刺激する。

例えば、アンチセンスRNA及びRNA分子は、標的mRNAにハイブリッド形成してタンパク質翻訳を防止することによりmRNAの翻訳を直接阻止する。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリッド形成、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、番号WO 97/33551 (1997年9月18日発行)を参照。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報、番号WO 97/33551, 上掲を参照。

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

#### 【0127】

ここに記載されたTCRポリペプチド、アゴニスト及びアンタゴニスト(T

CCR分子)も、治療薬として用いてもよい。既知の方法に従って、本発明のCCR分子を製剤化して製薬的に有用な組成物を調整することができ、その場合は、TCR分子を製薬的に許容可能な担体媒体との組み合わせで混合する。治療用組成物は、適当な純度を持つ所望のTCR分子を任意の製薬的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A.編, (1980)) と、凍結乾燥した製剤又は水溶液の形態で混合することにより調製することができる。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、好ましくは用いられる投与量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又はTWEEN（商品名）、PLURONICS（商品名）又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0128】

インビボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、後に続く凍結乾燥及び再構成の前に、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

ここで、治療用組成物は一般に、無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを持つ静脈内バッグ又はバイアル内に配される。

投与の経路は周知の方法に従い、例えば静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、関節内又は病巣内経路、局所内投与での注射又は注入、あるいは持続放出系による。

本発明の製薬組成物の用量及び望ましい薬物濃度は、意図する特定の用途に応じて変化する。適切な用量又は投与経路の決定は、通常の内科医の技量の範囲内である。動物実験は、ヒト治療のための有効量の決定についての信頼できるガイ

ダンスを提供する。有効量の種間スケーリングは、Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobiら, 編, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96のMorandi, J. 及びChappell, W. の「The use of interspecies scaling in toxicokinetics」に記載された原理に従って実施できる。

TCCR分子のインビボ投与が用いられる場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり1日に約10ng/kgから100mg/kgまで、好ましくは約1μg/kg/日から10mg/kg/日である。特定の用量及び輸送方法の指針は文献に与えられている；例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、又は第5,225,212号参照。異なる製剤が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又な組織を標的とする投与には他の器官又は組織とは異なる方式で輸送することは必要であることが予想される。

#### 【0129】

TCCR分子の投与を必要とする任意の疾患又は疾病の治療に適した放出特性を持つ製剤でTCCR分子の持続放出が望まれる場合、TCCR分子のマイクロカプセル化が考えられる。持続放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン(rhIFN-)、インターロイキン-2、及びMNrgp120で成功裏に実施されている。Johnsonら, Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Horaら, Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, 「Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polyactide Polyglycolide Microsphere Systems」 Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell 及び Newman編, (Plenum Press: New York, 1995), p. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; 及び米国特許第5,654,010号。

TCCR分子の持続放出製剤は、ポリ-乳酸-コグリコール酸(PLGA)ポリマーを用い、その生体適合性及び広範囲の生分解特性に基づいて開発された。PLGAの分解生成物である乳酸及びグリコール酸は、ヒト身体内で即座にクリアされる。さらに、このポリマーの分解性は、分子量及び組成に依存して数ヶ月から

数年まで調節できる。Lewis, 「Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer」: M. Chasin及び R. Langer (編), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41。

### 【0130】

#### 9. TCCRのアゴニスト及びアンタゴニストの同定

また、本発明は、TCCRポリペプチドの効果(アゴニスト)を模倣又は促進する、或いはTCCRポリペプチドの複数の機能又は活性を阻止又は阻害する化合物を同定するための方法を提供する。好ましくは、そのようなアンタゴニスト及びアゴニストは、TCCR変異体、ペプチド断片小分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)又は抗体(モノクローナル、ヒト化、特異的、一本鎖、ヘテロ抱合又は前述の断片)である。その上に、潜在的TCCRアゴニストには可溶性TCCR細胞外ドメイン(ECD)を含めることができるが、TCCRアンタゴニストには潜在的TCCRリガンドが含まれる。

アンタゴニスト/アゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされるTCCRポリペプチドと結合又は複合化する化合物、又そうでなければコードされているポリペプチドと他の細胞性タンパク質の相互作用を妨害する化合物を同定するように設計されている。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含み、特に、小分子候補薬の同定に適している。

アッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

ここで考えられるすべての候補薬のスクリーニングアッセイには、候補薬とTCCRポリペプチドの相互作用を可能にする条件下及び十分な時間に渡って、これら二つの分子を接触せしめることを必要とするという共通の特性がある。

TCCRアンタゴニスト及びアゴニストを同定するのに有用な適したアッセイの例は、上記の7. 候補薬のためのスクリーニングアッセイの下で既に確認されている。

## 【0131】

アンタゴニストアッセイの更なる例としては、TCCRポリペプチドを特定の活性についてスクリーニングする化合物とともに添加してよく、TCCRポリペプチド存在下での関心ある活性を阻害する化合物の能力が化合物がTCCRポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、TCCRポリペプチド及び膜結合TCCRポリペプチドレセプター又は組換えレセプターを持つ潜在的アンタゴニストを、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。TCCRポリペプチドは、放射性等で標識でき、レセプターに結合したTCCRポリペプチドの数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソートにより同定できる。Coliganら, *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991)。好ましくは、発現クローニングが用いられ、ポリアデニル化RNAがTCCRポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリーがプールに分配され、COS細胞又はTCCRポリペプチド反応性でない他の細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を標識したTCCRポリペプチドに暴露する。TCCRポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフィ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

## 【0132】

アンタゴニストのその他のアッセイでは、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識TCCRポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとTCCRポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリペ

プチド-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、従ってTCCRポリペプチドの作用を競合的に阻害するTCCRポリペプチドの変異形態であってもよい。最終的には、その他の潜在的TCCRアンタゴニストは、入手可能なリガンドと競合することができるTCCRECDであり、効果的に天然TCCRレセプターシグナルを遊離している。

他の潜在的なTCCRポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセンスRNA又はDNAは、標的mRNAにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。

#### 【0133】

例えば、ここでの成熟TCCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード化部分は、約10から40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され(トリプルヘリックス - Leeら, *Nucl. Acid Res.*, 6: 3073 (1979); Cooneyら, *Science*, 241: 456 (1988); Dervanら, *Science*, 251: 1360 (1991)参照)、それによりTCCRポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインビボでmRNAにハイブリダイゼーションしてmRNA分子のTCCRポリペプチドへの翻訳を阻止する(アンチセンス - Okano, *Neurochem.*, 56: 560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression* (CRC Press: ボーカトーン, フロリダ, 1988))。上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に送達され、アンチセンスRNA又はDNAをインビボで発現させて、TCCRポリペプチドの生産を阻害することもできる。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻

訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の - 10 から + 10 位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

潜在的アンタゴニストは、TCCRポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それによりTCCRポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

#### 【0134】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、番号WO 97/33551 (1997年9月18日公開)を参照。

転写阻害に用いられるトリプルヘリックス形成における核酸分子は一本鎖でデオキシヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報、番号WO 97/33551, 上掲を参照。

これらの小分子は、上記で検討したスクリーニングアッセイの一又は複数の任意のものにより及び/又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

#### 【0135】

##### 10. TCCR及び遺伝子治療

また、TCCRポリペプチドをコードする核酸は、遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的有効量の遺伝子産物のインビボ合成を達成するために遺伝子が導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的效果が達成される従来の遺伝子治療と、治療

的に有効なDNA又はmRNAの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、ある種の遺伝子のインビボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている(Zamecnikら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、それらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

#### 【0136】

生存可能な細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した方法は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでの形質移入及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介形質移入である(Dzauら, Trends, in Biotechnology 11, 205-210(1993))。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のカプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいて内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び/又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wuら, J. Biol. Chem. 262, 4429-2232 (1987); 及びWagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Andersonら, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

#### 【0137】

## 11. 抗体

本発明は、抗-TCCR抗体を更に提供する。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異的、及びT細胞の増殖、好産球浸潤等を阻害（アンタゴニスト）又は刺激（アゴニスト）し得る抗体断片を含むヘテロ抱合体抗体が含まれる。

### 【0138】

#### i. ポリクローナル抗体

抗TCCR抗体はポリクローナル抗体を含みうる。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、1つ又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、TCCRポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に結合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

### 【0139】

#### ii. モノクローナル抗体

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

## 【0140】

免疫化剤は、典型的にはTCCRポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) p p. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髓腫細胞である。通常、ラット及びマウスの骨髓腫細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親の形質転換細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジン(「HAT培地」)を含み、この物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

## 【0141】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性であるものが望ましい。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髓腫株であり、これはカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒト異種骨髓腫株化細胞も開示されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeurほか, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

ハイブリドーマ細胞を培養する培地を、TCCRに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合検定法によって測定する

。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキッチャード分析法によって測定することができる。

#### 【0142】

所望のハイブリドーマ細胞が同定されたら、クローンを制限希釈工程を経てサブクローニングし、標準的な方法で増殖させることができる [ Goding, 上掲 ]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及びRPMI-1640培地が含まれる。更に、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えばプロテインAセファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来免疫グロブリン精製方法によって培地又は腹水液から分離又は精製される。

#### 【0143】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作製することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法によって(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができる、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髓腫細胞内にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [ US. Patent No.4816567 ; Morrisonほか, 上掲 ]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインの代わりに置換するか、本発明の抗

体の一つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置換し、キメラ性二価抗体を産生することができる。

#### 【0144】

本発明の抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られてる。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意のポイントで切断される。あるいは、関連したシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

また、インビトロ法は、一価抗体を調製することに適している。抗体の断片、特にFab断片を生成するために抗体を消化することは、当該分野における常套技術によって達成できる。

#### 【0145】

##### iii. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-TCR抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる [ Jonesら, Nature, 321:522-525

(1986); Riechmannら, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Str uct. Biol., 2:593-596 (1992) ]。

#### 【0146】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(winter)及び共同研究者 [ Jonesら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, Science, 239:1534-1536 (1988) ] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

#### 【0147】

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリ [ Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marksら, J. Mol. Biol., 222:581 (1991) ] を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Cole等及びBoerner等の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる [ Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77(1985)及びBoernerら, J. Immunol., 147(1):86-95(1991); U.S. 5,750,373 ]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号;同第5,545,806号;同第5,569,825号;同

第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号、及び次の科学文献: Marksら, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonbergら, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwildら, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)に記載されている。

また、抗体は、上記に記載のような既知の選択及び/又は突然変異誘発法を用いて、親和性が成熟したものであってもよい。好ましい親和性成熟抗体は、成熟抗体が調製される元である初期抗体(一般的には、マウス、ヒト化又はヒト)よりも5倍、より好ましくは10倍、更により好ましくは20又は30倍より高い親和性を有する。

#### 【0148】

##### i v . 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本ケースの場合において、結合特異性の一方は本発明のポリペプチドに対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく。Milstein及びCuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO 93/08829、及びTrauneckerら, *EMBO J.*, 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

#### 【0149】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロ

プリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH<sub>2</sub>及びCH<sub>3</sub>領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH<sub>1</sub>)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSureshら, *Methods in Enzymology*, 121:210(1986)を参照されたい。

WO96/27011に記載された他の方法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのCH<sub>3</sub>領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

#### 【0150】

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')<sub>2</sub>二重特異性抗体)として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, *Science*, 229:81(1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')<sub>2</sub>断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたFab'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。Fab'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりFab'-チオールに再転換し、他のFab'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用するこ

とができる。

大腸菌から F a b 'フラグメントを直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体 F ( a b ' )<sub>2</sub>分子の製造を記述している。各 F a b 'フラグメントは大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒト T 細胞及び E r b B 2 レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

#### 【 0 1 5 1 】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelnyら, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の F a b '部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V L)に重鎖可変ドメイン(V H)を結合してなる。従って、一つの断片のV H及びV Lドメインは他の断片の相補的V L及びV Hドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F v ( s F v )ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら J. Immunol. 147:60(1991)。

#### 【 0 1 5 2 】

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられた T C C R ポリペプチドの2つの

異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗-TCCRポリペプチドのアームは、特定のTCCRポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T細胞レセプター分子(例えばCD2、CD3、CD28、又はB7)等の白血球上のトリガー分子又はFcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFcレセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定のTCCRポリペプチドを発現する細胞に細胞毒性薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はTCCR結合アーム及び細胞毒性薬又は放射性キレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETAと結合するアームを有する。興味の対象となる他の二重特異性抗体はTCCRポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合する。

#### 【0153】

##### v. ヘテロ抱合体抗体

ヘテロ抱合抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロ抱合抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4,676,980号]及びHIV感染の治療のために[W0 91/00360; W0 92/200373; EP 03089]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

#### 【0154】

##### vi. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/

又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性 (ADCC) を有しうる。Caronら, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体はまた、Wolffら, Cancer research 53: 2560-2565 (1993)に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevensonら, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。

### 【0155】

#### v i i . 免疫複合体

本発明はまた、化学治療薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞毒性薬、あるいは放射性同位体（即ち、放射性抱合）に抱合された抗体を含む免疫複合体にも関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（緑膿菌からの）外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン (modeccin) A鎖、 $\alpha$ -サルシン、アレウリテス・フォーディ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチン (dianthin) タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ (Phytolaca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア (momordica charantia) インヒビター、クルシン (curcin)、クロチン (crotin)、サパオナリア・オフィシナリス (sapaonaria officinalis) インヒビター、ゲロニン (gelonin)、ミトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン (restrictocin)、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin) 及びトリコテセン (tricothecene) を含む。様々な放射性ヌクレオチドが放射性抱合抗体の生成に利用可能である。例として、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$  及び  $^{186}\text{Re}$  を含む。

### 【0156】

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチ

ルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら, Science 238: 1098 (1987)に記載されたように調製することができる。カーボン-14-標識1--イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。WO 94/11026を参照のこと。

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトアビジン等)に抱合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬(例えば、放射性ヌクレオチド等)に抱合された「リガンド」(アビジン等)を投与する。

#### 【0157】

##### v i i i . 免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epsteinら, Proc. Natl. acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwangら, Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なりポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martinら, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬(

ドキシソルピシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizonら, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)を参照のこと。

#### 【0158】

##### i x . 抗-T C C R抗体の用途

本発明の抗T C C R抗体は様々な有用性を有している。例えば、抗-T C C R抗体は、T C C Rの診断アッセイ、例えばその特定細胞、組織、又は血清での発現の検出に用いられる。競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドウィッチアッセイ及び不均一又は均一相で行われる免疫沈降アッセイ [ Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158 ] 等のこの分野で知られた種々の診断アッセイ技術が使用される。診断アッセイで用いられる抗体は、検出可能な部位で標識される。検出可能な部位は、直接又は間接に、検出可能なシグナルを発生しなければならない。例えば、検出可能な部位は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 又は $^{125}\text{I}$ 等の放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光又は化学発光化合物、あるいはアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってよい。抗体に検出可能な部位を包含させるためにこの分野で知られた任意の方法が用いられ、それにはHunterら, Nature, 144:945 (1962) ; Davidら, Biochemistry, 13: 1014 (1974) ; Painら, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981) ;及びNygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982)に記載された方法が含まれる。

また、抗-T C C R抗体は組換え細胞培養又は天然供給源からのT C C Rのアフィニティー精製にも有用である。この方法においては、T C C Rに対する抗体を、当該分野でよく知られている方法を使用して、セファデックス樹脂や濾紙のような適当な支持体に固定化する。次に、固定化された抗体を、精製するT C C Rを含む試料と接触させた後、固定化された抗体に結合したT C C R以外の試料中の物質を実質的に全て除去する適当な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、T C C Rを抗体から脱離させる他の適当な溶媒で支持体を洗浄する。

#### 【0159】

##### x . 製薬的組成物

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

TCCRの細胞内部分を標的とする、或いはTCCRがまだ細胞内にある場合にそれを標的とするためには、内在化抗体を利用することが可能である。その上に、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に導入するのに利用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marascoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)参照。

#### 【0160】

活性分子の治療用製剤、好ましくは本発明のポリペプチド又は抗体は、所望される程度の純度を持つ活性成分を、親油性製剤又は水性溶液の形態で、任意の製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される (Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、

トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）及びノ又はトウイーン(TWEEN)（商品名）、プルロニクス(PLURONICS)（商品名）、及びポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0161】

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

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に1以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマイクロエマルジョン中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

インピボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

#### 【0162】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリアクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸及びγ-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユープロ

リドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37%の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

### 【0163】

#### x i . 治療方法

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

本発明のポリペプチド、抗体及び他の化合物によって治療される例示的症状又は疾患には、限定されないが、全身性エリテマトーデス、慢性関節リュウマチ、若年性慢性関節炎、変形性関節症、脊椎関節症、全身性硬化症(強皮症)、特発性炎症誘発性筋疾患(皮膚筋炎、多発性筋炎)、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血(免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿)、自己免疫性血小板減少症(特発的血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症)、甲状腺炎(グレーブ疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)、真性糖尿病、免疫性腎臓疾患(糸状体腎炎、尿細管間質性腎炎)、特発性脱髄性多発神経障害、Guillain-Barre症候群、及び慢性炎症誘発性脱髄性多発神経障害のような中枢及び抹消神経系の脱髄性疾患、感染性肝炎(A、B、C、D、E型肝炎及び他の非肝炎性ウイルス)のような肝胆

道疾患、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症誘発性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン疾患）のような炎症誘発性及び線維性肺疾患、グルテン感受性腸疾患、及びフィッブル疾患、水泡性ヒス疾患を含む自己免疫性又は免疫媒介性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触皮膚炎、乾癬、喘息のようなアレルギー性疾患、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及びジンマシン、好酸球性肺炎のような肺の免疫学的疾患、特発性肺線維症及び高感受性間質性肺炎、移植片拒絶及び移植片対宿主の疾患を含む、移植関連疾患が含まれる。

#### 【0164】

全身性エリテマトーデスでは、疾患の中心媒介物は自己タンパク質/組織に対する自己反応性抗体の生成、及び引き起こる免疫媒介炎症である。抗体は、直接又は間接的のいずれかによって組織傷害を媒介する。Tリンパ球が直接に組織傷害へ関与していることは示されていないが、Tリンパ球は自己反応性抗体の発生において必須である。従って、疾患の発生はTリンパ球へ依存する。腎臓、肺、筋骨格系、粘膜皮膚、眼、中枢神経系、心臓血管系、胃腸管、骨髄及び血液を含む多臓器及び系が、臨床的に病気で冒される。

#### 【0165】

慢性関節リュウマチ(RA)は、主に複数の関節の滑膜に係る慢性全身性自己免疫疾患であり、結果として関節軟骨に傷害が生じる。病原はTリンパ球依存であり、リュウマチ因子、自己IgGに指向する自己抗体の生成を付随し、結果として関節体液及び血液において高レベルに達する免疫複合体が形成される。関節におけるこれらの複合体は、滑膜へのリンパ球及び単球の顕著な浸潤と、続いての顕著な滑膜変化を誘発しうる；多数の好中球の添加により同様の細胞で浸潤されるならば関節空間/体液でもである。影響を受けている組織は、多くの場合対称的なパターンで主に関節である。しかしながら、2つの主な形態の関節外疾患も生じる。一方の形態は進行中の進行性関節疾患及び肺線維症の局部的障害、血管炎、及び皮膚潰瘍を伴う関節外障害の発達である。関節外疾患の第2の形態はいわゆるフェルティール症候群であり、RA疾患経路の末期、時々関節疾患が鎮静した後生じ、好中球減少、血小板減少及び脾肥大の存在に関与する。これは、梗

塞、皮膚潰瘍及び壊疽の形成を伴う多数の器官及び血管炎に付随する。多くの場合、患者では、発病している関節上にある皮下組織にリウマチ様小結節が発達し；小結節は、混合炎症細胞浸潤に包囲された壊死性中心を有する。RAで生じる可能性のある他の徴候には：心外膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、肺線維症を伴う間質性肺炎、乾性角結膜炎、及びリウマチ様小結節が含まれる。

#### 【0166】

若年性慢性関節炎は、多くの場合16才以下で発症する慢性特発性炎症疾患である。その表現型はRAといくつかの類似点があり；リウマチ因子がポジティブである患者の中には若年性リウマチ様関節炎に分類されるものもいる。この疾患は主な3つのカテゴリー：小関節(pauciarticular)、多関節(polyarticular)及び全身性ものに亜分類される。関節炎は重度で局所的な破壊が生じ、関節強直症及び遅延成長に至るおそれもある。他の徴候には慢性前ブドウ膜炎及び全身性アミロイド症が含まれる。

#### 【0167】

脊椎関節症は、一般的にHLA-B27遺伝子生成物の発現に関連した、いくつかの共通した臨床的特徴を有する疾患のグループである。疾患には：強直症、脊椎炎(spondylitis)、ライター症候群(反応性関節炎)、炎症性大腸疾患に関連した関節炎、乾癬に関連した脊椎炎、若年発症脊椎関節症及び未分化脊椎関節症が含まれる。区別する特徴には、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；HLA-B27(血清学的には、クラスI MHCのHLA-B座位にある定義された対立遺伝子)を伴う炎症非対称性関節炎；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に関連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導における鍵として関わるほとんどの細胞はCD8+Tリンパ球であり、クラスI MHC分子により付与される抗原を標的としている細胞である。CD8+T細胞は、MHCクラスI分子により発現した外来ペプチドであるかのように、クラスI MHC対立遺伝子HLA-B27と反応する。HLA-B27のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原エピトープを模倣し、よってCD8+細胞の反応が誘発されると仮定されている。

#### 【0168】

全身性硬化症(強皮症)は病因がよく知られていない。疾患の特徴は皮膚の硬化

であり；これは活性化炎症プロセスにより誘発される。強皮症は局部的又は全身のであり；血管障害が一般的で、微小血管系における内皮細胞傷害は全身性硬化症の発達における初期の重要な事象であり；血管傷害は免疫媒介される。免疫学的基準では、皮膚障害における単核細胞浸潤の存在、多くの患者において抗細胞核抗体の存在を意味する。多くの場合、ICAM-1は皮膚障害における線維芽細胞の細胞表面をアップレギュレーションし、これらの細胞と相互作用するT細胞が疾患の病因における役割を担っていることが示唆される。関連する他の器官には：胃腸管：萎縮症及び線維症があり、結果として異常なぜん動/運動性となっている平滑筋；腎臓：小弓形及び小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎皮質の血流が低下し、タンパク尿、高窒素血尿及び高血圧になる同心性内皮下内膜増殖；骨格筋：萎縮、間質性線維症；炎症：肺：間質性肺炎及び間質性線維症；及び心臓：収縮バンド壊死、瘢痕/線維症が含まれる。

#### 【0169】

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

シェーグレン症候群は、免疫媒介炎症、続く涙腺及び唾液腺の機能破壊によるものである。この疾患は炎症結合組織疾患を伴うか又は伴わない。この疾患は、双方ともが小RNA-タンパク質複合体であるRo及びLa抗原に対する抗体産出に関連している。障害により、結果として乾性角結膜炎、biliary硬変を含む他の徴候又は会合を伴う口内乾燥、末梢又は感覚ニューロパシー、及び明白な紫斑病に至る。

#### 【0170】

全身性血管炎症症は主な障害が炎症で、続いて血管にダメージを受け、結果として影響を受けた脈管により供給される組織に虚血/壊死/変性が生じ、最終的な末端器官ではいくつかのケースで機能障害になるといった疾患である。また、第2の障害として血管炎(vasculitides)、又は他の免疫炎症媒介疾患、例えばリ

ウマチ様関節炎、全身性硬化症等、特に免疫複合体の形成に関連した疾患等の続発症が生じるおそれがある。主な全身性血管炎症症グループの疾患には：全身壊死性血管炎：多動脈炎結節(polyarteritis nodosa)、アレルギー性脈管炎、及び肉芽腫症、多脈管炎：ヴェゲナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症：及び巨細胞動脈炎が含まれる。種々の血管炎には：粘膜皮膚リンパ節症候群(M L N S又は川崎病)、単離したC N S血管炎、ベヘット(Behet's)病、閉塞性血栓性血管炎(バージャー病)及び皮膚壊死性細静脈炎(venulitis)が含まれる。列挙した血管炎のほとんどの種類の病原メカニズムは、主に脈管壁に免疫グロブリン複合体が付着し、続いてA D C C、補体活性又は双方を介して炎症反応が誘発されることによると考えられている。

#### 【0171】

サルコイドーシスは、体内のほとんど任意の組織中に類上皮細胞肉芽腫が存在し、肺ではほとんど一般的に包含されることにより特徴付けられる、病因がよく知られていない病状である。病原には疾患部位に活性マクロファージ及びリンパ球が残留していることに関連しており、続いてこれらの細胞種より放出される局部的又は全身的活性物質の放出の結果として慢性続発症が生じる。

#### 【0172】

自己免疫性溶血性貧血、免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿を含む自己免疫性溶血性貧血は、赤血球細胞(いくつかのケースにおいては、血小板を含む他の血液細胞)表面で発現する抗原と反応する抗体が産出される結果によるものであり、補体媒介溶解及び/又はA D C C / F c -レセプター-媒介メカニズムを介して、その抗体被覆細胞の除去に反映される。

他の臨床的セッティング(setting)における血小板減少性紫斑病及び免疫仲介血小板減少を含む自己免疫性血小板減少では、抗体又は補体が血小板に接合し、続いて補体溶解、A D C C又はF c -レセプター-媒介メカニズムによる除去の結果として生じる。

#### 【0173】

グレース疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎を含む甲状腺炎は、甲状腺内に多くの場合特異的に存在するタンパク質と反

応する抗体の産出を伴う、甲状腺抗原に対する自己免疫反応の結果によるものである。実験用モデルには：内在的モデルラット(BUF及びBBラット)及びチキン(肥満チキン種)；誘導性モデル：チログロブリン、甲状腺ミクロソーム抗原(甲状腺ペルオキシダーゼ)を用いた動物の免疫化が含まれる。

I型真性糖尿病又はインシュリン依存性糖尿病は膵臓小島細胞の自己免疫破壊であり；この破壊は自己抗体及び自己反応性T細胞により媒介される。また、インシュリン又はインシュリン様レセプターに対する抗体は、インシュリン-非-反応性の表現型を産出することができる。

#### 【0174】

糸球体腎炎及び尿細管間質性腎炎を含む免疫仲介腎疾患は、腎抗原に対する自己反応性抗体又はT細胞が産出される結果により直接的に、又は他の非腎抗原に対して反応する、腎臓における抗体及び/又は免疫複合体の沈着の結果により間接的に、腎組織に抗体又はT細胞媒介傷害が生じることによるものである。よって、免疫複合体の形成の結果生じる他の免疫媒介疾患により、間接的続発症等の免疫媒介腎疾患が誘発される。直接的及び間接的免疫メカニズムの双方により、結果として腎組織における障害発達が産出/誘発されるといった炎症反応が生じ、器官機能が損なわれ、いくつかのケースでは腎臓機能不全が進行する。体液及び細胞免疫メカニズムに双方が障害の病原に関与している。

#### 【0175】

多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、特発性脱髄性多発神経障害、又はギラン-バレー症候群；及び慢性炎症脱髄性多発神経障害は、自己免疫基準であり、神経脱髄が生じて、オリゴデンドロサイト又はミエリンに直接的に起因するダメージの結果によるものと考えられている。MSにおいて、疾患の誘発及び進行はTリンパ球に依存すると示唆される証拠がある。多発性硬化症は、Tリンパ球依存性であり、再発性弛緩経路又は慢性進行経路のいずれかを有する脱髄疾患である。病因はよく知られていないが、ウイルス感染、遺伝的素因、環境及び自己免疫性の全てが寄与している。障害はT細胞媒介小膠細胞の優先的湿潤、及びマクロファージの浸潤を含み；CD4+Tリンパ球は障害において優先的な細胞型であった。オリゴデンドロサイトの細胞死及び続く脱髄のメカニズ

ムはよく知られていないが、Tリンパ球の駆動によると思われる。

【0176】

好球性肺炎；特発性肺線維症及び過敏性肺炎のような炎症及び線維症の肺疾患には、調節されない免疫炎症反応が関連している。反応を阻害することは治療的に有益なことである。

水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患は自己抗体により媒介され、Tリンパ球に依存して発生する。

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

喘息；アレルギー性鼻炎；アトピー性皮膚炎；食物過敏症及び蕁麻疹等を含むアレルギー性疾患はT細胞依存性である。この疾患は炎症により誘発されるTリンパ球、及びIgE媒介炎症、又は双方の組合せにより主に媒介される。

拒絶反応及び移植片対宿主疾患(GVHD)を含む移植関連疾患は、Tリンパ球依存性であり；Tリンパ球の機能を阻害することで改善される。

【0177】

免疫及び/又は炎症反応への介在が有益である他の疾患には、限定するものではないがウイルス感染(限定するものではないがAIDS、A型、B型、C型、D型及びE型肝炎、ヘルペス)、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染(MLRを刺激する分子(又は誘導体/アゴニスト)を治療に利用し、感染要因に対する免疫反応性を増強することができる)、MLRを刺激する(分子/誘導体/アゴニスト)を治療に利用し、受け継ぎ、獲得し、感染誘発された(例えばHIV感染)又は医原性(例えば化学療法)免疫欠損疾患の病状に対する免疫反応を増強することができる免疫欠損疾患、及び異常増殖が含まれる。

【0178】

幾つかのヒト癌患者において、腫瘍性細胞上の抗原に対する抗体及び/又はTリンパ球が発生することが示されている。また、免疫応答の増加によって、その特定の腫瘍の拒絶又は退行を引き起こすことができることが、腫瘍形成の動物モデルにおいて示されている。MLRにおけるTリンパ球の応答を高める分子(又はアゴニストの方法で同じレセプターへ影響を与える小分子アゴニスト又は抗体

)を、癌治療へ治療的に用いることができる。また、MLRにおいてリンパ球の応答を阻害する分子は、腫瘍形成の間に、インビボにおいて腫瘍に対する免疫応答を抑制する；このような分子は、腫瘍性細胞そのものによって発現されるか、或いは他の細胞の腫瘍がその発現を誘導できる。このような分子の拮抗効果（抗体、小分子又は他の手段の何れかとともに）は、免疫性腫瘍拒絶反応を高める。

【0179】

その上に、炎症誘発性特性を有する分子の阻害作用は、再灌流傷害；発作；心筋梗塞；アテローム性動脈硬化症；急性肺障害；出血性ショック；火傷；敗血症／敗血性ショック；急性腎尿細管壊死；子宮内膜症；変形性関節疾患及び膵炎にとって治療的に有益である。

本発明の化合物、例えばポリペプチド又は抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入（鼻腔内、肺内の）経路などにより投与される。ポリペプチド及び抗体の静脈内又は吸入投与が好ましい。

【0180】

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

【0181】

また、他の免疫疾患関連又は腫瘍関連抗原に対する抗体、例えばCD20、CD11a、CD18、ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4、又は血管内皮因子(VEGF)に結合する抗体を投与することも好ましい。あるいは、又はその上に、ここで開示される同じ又は二つ以上の異なる抗原と結合する二つ以上の抗体を、患者へ同時投与してもよい。時折、患者にサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、本発明のポリペプチドを、成長阻害剤と同時投与する。例えば、まず最初に成長阻害剤を投与し、続いて本発明のポリペプチドを投与する。しかしながら、同時投与、又は最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は、現在用いられている量であり、成長阻害剤と本発明のポリペプチドとの組み合わせ(相乗)効果により減少させてもよい。

#### 【0182】

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

例えば、1又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のどちらでも、例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1 - 20\text{mg}/\text{kg}$ )のポリペプチド又は抗体が、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。従来技術及びアッセイによって、この治療の進行は容易にモニターされる。

#### 【0183】

##### 12. 製造品

本発明のその他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質を含む製造品が提供される。この製造品は容器とラベルとを含んでなる。好適な容器

は、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの材料から形成されてよい。容器は、状態を診断し治療するのに有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の活性剤は本発明のポリペプチド又は抗体である。容器上又は添付されるラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品はさらに、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容される緩衝液を含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

#### 【0184】

##### 13. 免疫関連疾患の診断及び予後

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

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅又は過剰発現した遺伝子（「マーカー遺伝子産物」）によってコードされたタンパク質の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又はこの分野で知られた他の技術によってモニターできる。過剰発現している遺伝子が細胞表層タンパク質をコードする場合には、これらの技術は特に適している。このような結合アッセイは、上記に記載のように原則的に実施される。

#### 【0185】

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインサイツ検出は、例えば、免疫蛍光又

は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。また、この手法によって、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布の決定を可能にする。当業者には、インサイト検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

#### 【0186】

以下の実施例は例示目的のためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献は、その全体を出典明示によりここに取り入れる。

#### (実施例)

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

特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたような組換えDNA技術の標準的な手法を用いた：Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989; Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coliganら、Current Protocols in Immunology, 1991。

#### 【0187】

##### 実施例1 TCCRの単離及びクローニング

サイトカインレセプター及び/又はWS(G)XWSドメインによって特徴付けられるレセプターは、公的ESTデータベースを調べるために用いられ、そ

の結果としてhTCCR（配列番号：1）及びmTCCR（mTCCR）が単離された。

代わって、Fig 4（配列番号：2）に示されているマウスTCCRは、登録番号7710109としてGenBankに公開されているのと同様に、1996年5月23日に出願したWO97/44455にて公開されている。先行技術の分子もSprecherら., Biochem. Biophys. Res. Commun. 246(1): 80-90(1998)に記載されている。Fig 4（配列番号：2）では、シグナルペプチドは、アミノ酸残基1から約24、膜貫通ドメインは、およそアミノ酸残基514から約532、N-グリコシル化部位はおよそ残基46-49、296-299、305-308、360-361、368-371及び461-464、カゼインキナーゼIリン酸化部位はおよそ残基10-13、93-96、130-133、172-175、184-187、235-238、271-274、272-275、323-326、606-609及び615-618、チロシンキナーゼリン酸化部位はおよそ残基202-209、N-ミリスチル化部位はおよそ残基43-48、102-107、295-300、321-326、330-335、367-342、393-398、525-530及び527-532、アミド化部位はおよそ残基240-243、原核生物膜リポタンパク質脂質付着はおよそ残基516-526、そして成長因子及びサイトカインレセプターファミリーシグネチャー1はおよそ残基36-49において同定されている。顕著な相同性のある領域は：（1）約残基14-51のヒトエリスロポエチン及び（2）残基211-219のマウスインターロイキン-5レセプターに存在する。

#### 【0188】

Fig 3（配列番号：1）に示したヒトTCCRに対して高い相同性を有するポリペプチドは、登録番号4759327としてGenBankからも入手可能な1996年5月23日に出願されたWO97/44455にて公開されている。先行技術の分子もSprecherら., Biochem. Biophys. Res. Commun. 246(1): 80-90(1998)に記載されている。Fig 3（配列番号：1）では、シグナルペプチドは、アミノ酸残基1から約32、膜貫通ドメインは、およそアミノ酸残基517から約538、N-グリコシル化部位はおよそ残基51-54、76-79、302

- 305、311 - 314、374 - 377、382 - 385、467 - 470、563 - 566、N - ミリスチル化部位はおよそ残基107 - 112、240 - 245、244 - 249、281 - 286、292 - 297、373 - 378、400 - 405、459 - 464、470 - 475、531 - 536及び533 - 538、原核生物膜リポタンパク質脂質付着はおよそ残基522 - 532、そして成長因子及びサイトカインレセプターファミリーシグネチャー1はおよそ残基41 - 54において同定されている。また、残基183 - 191に、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) のレセプターの第二サブユニットと顕著な相同性を有する領域が存在する。

ヒトTCCR (配列番号: 1) とマウスTCCR (配列番号: 2) の配列の比較がFig 5に示されている。この比較は、ヒトとマウスの配列の間の62%の配列同一性を明らかにする。

#### 【0189】

#### 実施例2 TCCR「ロックアウト」マウス

##### 1. ターゲティングベクターの調製

「ターゲティングベクター」という用語は、遺伝子除去のために構築される核酸配列を呼ぶための技術用語である。Fig 9Aには、この実施例において単離されたTCCR分子のために利用されたターゲティングベクターが記載されている。特に、ターゲティングベクターは、最初の二つのエクソンを含む2.4kbのXhoI-HindIII断片、及びエクソン9から14を含む6.0kbのEcoRI-BamHI断片を用いて構築された。単離された特異的なTCCR遺伝子は、14のエクソンと13のイントロンを含む。このターゲティングベクターでは、エクソン1及び2は無傷のまま、ゲンタマイシン耐性を付与するpGK-neo遺伝子がエクソン3-8を置換するために用いられている。単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) コード化領域は、エクソン1の5'に置き換わり、ガンシクロビルによる選択を可能にする。このような薬剤選択可能なマーカー、例えばガンシクロビルは、ターゲティングベクターを含む安定な形質移入株化細胞の選択を可能にし、そして内因性の遺伝子から核酸断片を区別する、標的構築物に特有の核酸断片を増幅するポリメラー

ゼ連鎖反応 (PCR) 用のプライマーを作製することを可能にする。この構築物は、ベクターpBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) へ挿入され、そしてDH10B細菌へ形質転換された。単一のコロニーが収集され、大量のターゲティングベクターを調製するために用いられた。

#### 【0190】

##### 2. TCCR-/- 幹細胞の調製

制限エンドヌクレアーゼNot Iによる消化によってターゲティングベクターを直線化し、これを胚性幹細胞 (ES細胞) へ形質移入した。ES細胞は、その発達段階にある胚の生殖細胞系へ組み込んで、ターゲティングベクターを子孫へ伝達する能力によって選ぶ。選択の対象である好ましいES系統は、ESGS系統であるが、D3系統 (ATCC CRL-1934) をも用いてよい。エレクトロポレーションは、0.8 mlのPBSに懸濁した2-5百万個のES細胞を利用しておこなう。細胞へ直線化されたターゲティングベクター (20 µg) を添加し、これを無菌のエレクトロポレーションキュベット (0.4 cm Bio-Rad, Hercules, CA) へ置く。エレクトロポレーションを、500 µF、240ボルトにセットしたエレクトロポレーション装置で実施する。このキュベットの内容物を、410 mlのES培地へ移す。ES培地は、高グルコースDMEM (Gibco 11960-010)、10% FBS (ES細胞試験Gibco 16141-061) 及び1000ユニット/ml ESGROマウスLIF (Gibco 13275-0290) で構成されている。続いて、これらの細胞を2096ウェルシャーレへ等分量を配する。G418, 400 µg/mlが即利用される。ターゲティングベクターの形質移入の後、前出にて言及した薬剤の致死量を用いてES細胞を選択した。ターゲティングベクターを有するES細胞のみが、生存に必要な抗生物質耐性マーカーを有している。次いで、ベクターの正確な組み込みのために、サザンプロット (Fig 10A)、PCR (Fig 10B)、内因性標的遺伝子のmRNA発現の欠如 (Fig 10C) によって、選択されたES細胞コロニーを選択した。上記の判定基準を満たしたESクローンは、次に胚へのマイクロインジェクションに用いられる。

#### 【0191】

### 3. TCCR - / - マウスの注射及びスクリーニング

前段階において、選択されそしてスクリーニングされたES細胞クローンを、当該分野において適した任意の技術、好ましくはマイクロインジェクションによって発育中の胚へ移す。適切なマイクロインジェクション技術については、Hoganら., Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1986に記載されている。後で同定できるという条件ではどの胚を利用してもよいが、マイクロインジェクションのために選択される胚は好ましくは雄であり、ターゲティングベクターを含有するES細胞の遺伝子によってコードされる毛色とは反対の毛色を有する。例えば、白い柔毛の動物のES細胞を、茶/黒柔毛をはやす胚へ注入する。この方法では、成功裏にマイクロインジェクションされた胚は、モザイクの毛色に基づいて成熟した大人として選択される。結果として得られたモザイク動物(創始細胞)はTCCR - / +であり、次いでTCCR - / - マウスを作製するために戻し交配される(他のTCCR - / +子孫と交尾)。TCCR - / - 遺伝子型を確かめるために、0.5mlの溶解緩衝液で一晩に渡って60℃で尾部組織をインキュベーションすることによって得られるテール・クリッピングからDNAを抽出する。溶解緩衝液は、0.5% SDS、100mM NaCl、50mM Tris-HCl (pH 8.0)、7.5mM EDTA (pH 8.0)及び1mg/ml プロテイナーゼK (Boehringer-Mannheim) から成る。一晩のインキュベーションの後、全反応中で混合した75µlの8M 酢酸カリウムと600ml CHCl<sub>3</sub>を室温で10分間、遠心分離する。その水層を取り出して別のエッペンドルフチューブへ配し、これへ600mlの100%エタノールを添加して5分間の遠心分離によってDNAを沈殿させる。このDNAペレットを70%エタノールで洗浄し、空気乾燥させる。残存エタノールを除去した後、DNAペレットを150-200µlの水で再懸濁する。そして、このDNAはサザンブロット法及びPCR分析に用いられる。サザンブロット法では、neo遺伝子をプローブとして用いてもよい; PCRでは、ES細胞のスクリーニングに利用するプライマーが用いられる。

この結果は、Fig 10A、10B及び10Cに報告されており、それらには

TCCR遺伝子が成功裏に除去されたことが示されている。TCCR欠損マウスは、生存能力があり、繁殖力があり、そして顕在性の異常は無かった。詳細な組織学的検査では、明白な欠陥はみられなかった。CD3、CD4、CD8、CD25、CD19、B220、CD40、NK1.1、DX5、F4/80、CD14、CD16、MHCII及びCD45に対する抗体で染色した二重野生型及びノックアウトマウスの胸腺、脾臓、リンパ節及びバイエル板から得た細胞のフローサイトメトリー分析では、二つの遺伝子型の間になんの著しい違いも示されなかった。

### 【0192】

#### 実施例3 TCCR - / - マウスの増幅したアレルギー性気道炎症

喘息は、気管支閉塞及び炎症を誘発する多くのアレルギー性及び非アレルギー性因子の相互作用の結果として生じる複合疾患である。気道炎症の一つの重要な側面は、Th2細胞による気道壁の浸潤である。ここで作製されるTCCR - / - マウスはより大きなTh2応答を有するので、それらは、アレルギー性気道炎症を研究するための有用なモデルである。

動物： 12匹のTCCR - / - マウス及び11匹の野生型同腹子(WT)ランダムに下記の4つのグループへわけた：グループ1 - 非感作TCCR - / - ; グループ2 - 非感作TCCR WT (n = 4) ; グループ3 - 感作TCCR - / - (n = 8) ; 及びグループ4 - 感作TCCR WT (n = 7)。

感作： 15匹のマウス(雄及び雌)を、0日目に腹腔内投与で与えられた0.1ml容量の1mg/ml水酸化アルミニウムゲルに吸収させた300ユニット/mlのチリダニ抗原(Bayer Pharmaceutical)で感作した。非感作コントロールマウス(n = 8)は、0.1mlの0.9%NaCl及び腹腔内投与の1mg/ml水酸化アルミニウムゲルを与えられた。両グループのマウスは、上記に記載のように、抗原(感作されたグループ)又はNaCl(非感作グループ)の腹腔内投与によって7日目に追加免疫された。

### 【0193】

吸入による試み：感作と追加免疫の後、4つのDMA吸入の試みが16日目に始まった。

エアゾール化では、噴霧器中のチリダニの最終濃度は、ダルベッコPBS及び0.1%のTween-20(登録商標)で希釈後は6000ユニット/mlであった。すべての吸入の試みは、Plexiglas(登録商標) pie exposure chamber において投与した。DMAは、最初に、PARIS-2噴霧器を用いて、20分間に渡ってエアロゾル化され、その後、1.5mlで10分間に渡って曝露された。肺の全堆積量は、DMAの~6.5AUであった。

AHR(麻酔): 24日目に、最後のDMAエアロゾールによる試みからおよそ18時間後、マウスをペントバルビタール(25mg/kg)とウレタン(1.8g/kg)の混合物で麻酔し、右頸静脈上の1cmの切開でカテーテル処置した。この頸静脈を自由に解剖し、カテーテル(PE-50へ連結したPE-10)を挿入してそこへ結びつけた。更には、マウスを気管切開した(1cmの頸部切開、気管を自由に解剖してカニューレを挿入してそこへ結びつけた)。次いで、胸動脈の拡張及び気道内圧の測定のために、このマウスをPlexiglas(登録商標)フロープレチスモグラフへ負荷した。170bpmの振動数と9µl/gmに同等のVtで、100%酸素によってこのマウスへ通気した。コンピュータ化(Buxco Electronics)データ獲得プログラムを用いて、呼吸装置(肺耐性及び動的コンプライアンス)を連続的にモニターした。ベースラインの測定の後、200µg/ml MCHをストック濃度とするメタコリン(500µg/kgのMCH分量)の一回につき10秒投与量をマウスは受けた。

#### 【0194】

犠牲: 気道の反応性の測定を完了した後に、血清を得るために、眼窩(球)後洞を経由して血液を採取するのにEDTAチューブを利用した。腹部を開き、下向きの大動脈を切断し、横隔膜を切断した。動物の採血のための時間が経過した後、気管支肺胞洗浄(BAL)がおこなわれた。以前に挿入した気管カニューレを通して、無菌生理的食塩水(30µg/gマウス重量)の同じボラスによって肺を三回洗浄した。このボラスは、およそ70%の総肺容量を満たした。BAL(元の平均が80%)の試料は、4で10分間に渡って1000xgで遠心分離された。上清を移し、直ちに-80で凍結した。この細胞ペレットを2%BSA(Sigman, St Louis, MO)を含む250mlのPBSに再懸濁し、次

いで自動カウンター (Baker Instruments, Allentown, PA) を利用して数え上げ、そしてBAL細胞 /  $\mu\text{l}$  の総数として記録した。次いで、この細胞懸濁物を200細胞 /  $\mu\text{l}$  に調製し、100mlをサイトスピン (cytospin) (Shando, Inc., Pittsburgh, PA) を用いてコーティングされたSuperfrost Plus 顕微鏡用スライド (Baxter Diagnostics, Deerfield, IL) で、10分間に渡って800 x gで遠心分離した。スライドを空気乾燥させ、100%メタノールで1分間に渡って固定化し、Diff-Quik (商品名) (Baxter Health Care, Miami, FL) で染色した。白血球分画を得るために、少なくともスライド当たり200細胞が調べられた。

BALの後、mRNA分析のために、右肺、脾臓及び気管支リンパ節を取り除き、そして液体窒素で凍結した (そして次にドライアイスの上へ置いた)。後に遺伝子型を特定するために、尾部切断部を取り出し、そしてドライアイスで凍結した。実験群間の肺における病理的变化の重症度と性質を検査そして比較するために、マウスの残りの左肺を取り除いた。これは、パラフィンに埋め込まれた10%の中性緩衝ホルマリンへの肺組織の初期固定によって完遂し、3  $\mu\text{m}$ 切片をヘモキシリン及びエオシンで染色した。肺切片は主気管支に沿って取られ、全切片は手探りで調べられ、そして気道及び血管周辺の炎症の重症度に基づいて記録された。0 (炎症及び気道変化が無い) から4 (顕著な炎症及び気道変化) のスケールを用いる気道上皮細胞肥大の程度。

#### 【0195】

IgE ELISA: 全IgE サンドイッチELISAでは、BAL流体又は血清試料は、ELISA緩衝液中で、希釈せずに、或いは1:2から1:20 (BAL) 及び1:25から1:200 (血清) に希釈して用いられた。補足抗体はウサギ抗-マウスIgE (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PBS) であり、プレートを4で24 - 28時間に渡ってコーティングした。標準は、連続的に1:2に希釈されたマウスIgE (PharMingen, San Diego, CA) であり、100 ng / mlの濃度から開始した。検出抗体であるビオチン化Fc RI-IgGを1:2000に希釈して、1 - 1.5時間に渡って用いた。HRP-SA及び酵素展開ステップは、サイトカインアッセイに用いたものと同様である。

結果では、野生型よりもTCCR - / - マウスの肺へのリンパ球の浸潤が極めて増加していることが示されている ( F i g 1 1 ) 。

#### 【 0 1 9 6 】

#### 実施例4 大腸菌におけるTCCRの発現

この実施例は、大腸菌における組み換え発現による所望のTCCRの非グリコシル化形態の調製を例示する。TCCRをコードするDNA配列を、選択されたPCRプライマーを用いて最初に増幅する。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位を持たなければならない。種々の発現ベクターが用いられる。好適なベクターの例は、pBR322 (大腸菌から誘導されたもの ; Bolivarら, Gene, 2:95 (1977)参照) であり、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性についての遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され、脱リン酸される。PCR増幅した配列は、次いで、ベクターに結合させる。ベクターは、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、polyhisリーダー (最初の6つのSTIIコドン、polyhis配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、特定のTCCRコード化領域、ラムダ転写終結区、及びargU遺伝子を含む。

次いで、Sambrookら、上掲に記載されている方法を用いて、ライゲーション混合物を選択した大腸菌の形質転換に使用する。形質転換体を、LBプレートで成長する能力によって同定し、次いで抗生物質耐性クローンが選択する。プラスミドDNAは、を単離し、制限分析及びDNA配列分析によって単離し、確認できる。

選択されたクローンを、抗生物質を添加したLBブロスなどの液体培地で終夜成長させることができる。終夜培地を、続いて大規模培地の播種に用いてもよい。次に細胞を最適光学密度まで成長させ、その間に発現プロモーターが作動する。

#### 【 0 1 9 7 】

数時間の培養の後、細胞を遠心分離によって採集できる。この分野で知られた種々の試薬を用いて、遠心分離で得られた細胞ペレットを可溶化することができ、次いで金属キレート化カラムを用いてタンパク質を緊密に結合させる条件下で

、可溶化TCCRタンパク質を精製できる。以下の手法を用いて、大腸菌においてポリHisタグ形態でTCCRを発現させてもよい。選択したPCRプライマーを用いて、TCCRをコードするDNAを最初に増幅する。プライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、並びに効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、そしてエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いでPCR増幅されたポリ-Hisタグ配列を発現ベクターに結合させ、それを株52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に用いる。形質転換体は、最初に、50 mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中で300 rpmで振盪しながら3-5のOD<sub>600</sub>に達するまで成長させる。ついで培地をCRAP培地(3.57gの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.71gのクエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O、1.07gのKCl、5.36gのDifco酵母抽出物、500 mL水中の5.36gのSheffield hycase SF、並びに110 mMのMPOS、pH 7.3、0.55%(w/v)のグルコース及び7 mMのMgSO<sub>4</sub>の混合で調製)中にて50-100倍希釈し、300 rpmで振盪させながら約20-30時間成長させる。SDS-PAGEによって発現を確認するために試料を取り出し、バルク培地を遠心分離して細胞のペレットとする。精製及びリフォールディング(再折りたたみ)まで、細胞ペレットを凍結させる。

#### 【0198】

0.5~1 Lの発酵(6-10 gペレット)の大腸菌ペーストを、7 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 8緩衝液中で10容量(w/v)で再懸濁させる。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1 M及び0.02 Mとし、この溶液を400 rpmで終夜攪拌する。この工程により、亜硫酸によりブロックされたシステイン残基を持つ変性タンパク質がもたらされる。溶液をBeckman Ultracentrifugeで40,000 rpmで30分間濃縮した。この上清を金属キレートカラムバッファー(6 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 7.4)の3-5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルターを通して濾過して透明化した。条件によって、この透明化抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた5 mLのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに

負荷する。このカラムを、50 mMのイミダゾール (Calbiochem, Utrol grade) を含む添加バッファー、pH 7.4によって洗浄する。タンパク質は、250 mMのイミダゾールを含有するバッファーによって溶離する。所望のタンパク質を含有する分画をプールし、4 で保存した。そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて、280 nmにおける吸収度からタンパク質濃度を見積もった。

#### 【0199】

20 mMのトリス、pH 8.6、0.3 MのNaCl、2.5 Mの尿素、5 mMのシステイン、20 mMのグリシン及び1 mMのEDTAからなる新たに調製したリフォールディングバッファー中で試料を徐々に希釈することによって、タンパク質をリフォールディングさせた。最終的なタンパク質濃度が50 ~ 100 マイクログラム/mlとなるように、リフォールディング容量を選択する。リフォールディング溶液を4 で12 - 36時間に渡ってゆっくりと攪拌する。リフォールディング反応は、最終濃度が0.4% (約pH 3) となるようにTFAを添加することで停止させる。タンパク質の更なる精製の前に、溶液を0.22 ミクロンフィルターによって濾過し、アセトニトリルを最終濃度が2 - 10%となるよう添加した。0.1% TFAの移動バッファーと10 ~ 80%のアセトニトリル勾配での溶離を用いて、リフォールディングしたタンパク質をPoros R1/H逆相カラム上でクロマトグラフにかける。A 280 吸収を持つ分画のアリコートにSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、相同なリフォールディングしたタンパク質を含有する分画をプールした。一般的に、殆どのタンパク質の正しくリフォールディングした種は、最もコンパクトであって、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているために、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。通常、凝集した種は、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。タンパク質の誤ってリフォールディングした形態を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望のリフォールディングTCCRタンパク質を含有する分画をプールし、この溶液に向けた窒素の穏やかな気流を当てることでアセトニトリルを除去する。透析又は調製バッファーで平衡化したG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂でのゲ

ル濾過及び滅菌濾過によって、タンパク質を0.14 Mの塩化ナトリウム及び4%のマンニトールを含む20 mMのHepes、pH 6.8に調製する。

#### 【0200】

#### 実施例5 哺乳動物細胞におけるTCCRの発現

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

発現ベクターとしてベクターpRK5 (1989年3月15日公開のEP 307,247参照)を用いる。場合によっては、TCCR DNAを選択した制限酵素を持つpRK5に結合させ、上掲のSambrook等に記載されたようなライゲーション方法を用いてTCCR DNAを挿入させる。得られたベクターは、pRK5-TCCRと呼ばれる。

一実施態様では、選択された宿主細胞は293細胞とすることができる。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び/又は抗生物質を添加したDMEMなどの培地中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化する。約10 µgのpRK5-TCCRDNAを約1 µgのVARNA遺伝子コード化DNA [Thimmappayaら, Cell, 31:543 (1982)]と混合し、500 µlの1 mMトリス-HCl、0.1 mM EDTA、0.227 M CaCl<sub>2</sub>に溶解させる。この混合物に、滴状の、500 µlの50 mM HEPES (pH 7.35)、280 mMのNaCl、1.5 mMのNaPO<sub>4</sub>を添加し、25°Cで10分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、293細胞に加えて37°Cで約4時間定着させる。培地を吸引し、2 mlの20%グリセロールを含むPBSを30秒間添加する。293細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約5日間インキュベートする。

#### 【0201】

形質移入の約24時間後、培地を除去し、培地(のみ)又は200 µCi/ml <sup>35</sup>S-システイン及び200 µCi/ml <sup>35</sup>S-メチオニンを含む培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15% SDSゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、TCCRポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムにさらす。

形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し（無血清培地で）、培地を選択されたバイオアッセイで試験する。

これに代わる技術において、TCCRは、Sompayracら, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)に記載されたデキストラン硫酸法を用いて293細胞に一過的に導入される。293細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、700  $\mu$ gのpRK5-TCCR DNAを添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、PBSで洗浄する。DNA-デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で4時間インキュベートする。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、5  $\mu$ g/ml ウシインシュリン及び0.1  $\mu$ g/ml ウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入する。約4日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去する。次いで発現されたTCCRを含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって精製する。

#### 【0202】

他の実施態様では、TCCRをCHO細胞で発現させることができる。pRK5-TCCRは、CaPO<sub>4</sub>又はDEAE-デキストランなどの公知の試薬を用いてCHO細胞に形質移入することができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地（のみ）又は<sup>35</sup>S-メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。TCCRポリペプチドの存在を同定した後、培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約6日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現されたTCCRを含む培地を濃縮して、任意の選択した方法によって精製することができる。

また、エピトープタグTCCRは、宿主CHO細胞において発現させてもよい。TCCRはpRK5ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物は、PCRを施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-hisタグTCCR挿入物は、次いで、安定なクローンの選択のためのDHFR等の選択マーカを含むSV40誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、CHO細胞をSV40誘導ベクターで（上記のように）形質移入する。発現を確認するために

、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-h i s タグT C C Rを含む培地は、次いで濃縮し、 $Ni^{2+}$ -キレートアフィニティクロマトグラフィ一等の選択された方法により精製できる。

またT C C Rは、一過性発現法によりC H O及び/又はC O S細胞で、他の安定な発現方法によりC H O細胞で発現させてもよい。

#### 【0203】

C H O細胞における安定な発現は以下の方法を用いて実施されてもよい。タンパク質は、例えば、(1)それぞれのタンパク質の可溶化形態のコード化配列(例えば、細胞外ドメイン)がヒンジC H 2ドメインを含むI g G定常領域配列に融合した、I g G作成物(イムノアドヘシン)、又は(2)ポリ-H i s タグ形態として発現され得る。

P C R増幅に続いて、Ausubelら、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)に記載されているような標準的技術を用いて、対応するD N AをC H O発現ベクターにサブクローニングする。C H O発現ベクターは、対象とするD N Aの5'及び3'に適合する制限部位を有し、c D N Aの便利なシャトル化ができるように作成される。ベクターは、Lucasら、Nucl. Acids res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたようにC H O細胞での発現を用い、対象とするc D N A及びジヒドロフォレートレダクターゼ(D H F R)の発現の制御にS V 4 0初期プロモーター/エンハンサーを用いる。D H F R発現は、形質移入に続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

。所望のプラスミドD N Aの12マイクログラムを、市販の形質移入試薬Superfect(登録商標)(Quiagen), Dospers(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim)約一千万のC H O細胞に導入する。細胞は、上掲のLucasらに記載されているように成長させた。約 $3 \times 10^7$ 細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させる。

#### 【0204】

プラスミドD N Aを含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合する。内容物を10mLの媒質を含む遠心管にピペットして、1000rpm

mで5分間遠心分離する。上清を吸引し、そして細胞を10 mLの選択培地(0.2  $\mu$ m濾過PS20、5%の0.2  $\mu$ m透析濾過ウシ胎児血清を添加)中に懸濁させる。次いで細胞を90 mLの選択培地を含む100 mLスピナーに分ける。1-2日後、細胞を150 mLの選択培地で満された250 mLスピナーに移し、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。さらに2-3日後、250 mL、500 mL及び2000 mLのスピナーを $3 \times 10^5$ 細胞/mLで播種する。この細胞培地を遠心分離によって新鮮培地に交換し、そして生産培地に再懸濁させる。任意の適切なCHO培地を用いてもよいが、実際には1992年6月16日に発行された米国特許第5,122,469号に記載されている生産培地を使用してもよい。3 Lの生産スピナーを $1.2 \times 10^6$ 細胞/mLで播種する。0日目に、細胞数とpHを測定する。1日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施する。2日目に、スピナーをサンプルし、温度を33 $^{\circ}$ Cに変え、500 g/Lのグルコース及び0.6 mLの10%消泡剤(例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)の30 mLとする。生産を通して、pHは7.2近傍に調節し維持する。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して0.22  $\mu$ mフィルターを通して濾過する。濾過物は、4 $^{\circ}$ Cで貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

#### 【0205】

ポリ-Hisタグ作成物については、タンパク質をNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製する。精製の前に、条件培地へイミダゾールを5 mMの濃度にまで添加した。0.3 MのNaCl及び5 mMイミダゾールを含む20 mMのHepes, pH 7.4バッファーで平衡化した6 mLのNi-NTAカラムへ、4-5 mL/分の流速で4 $^{\circ}$ Cで条件培地をポンプ供給する。充填後、さらに平衡バッファーでカラムを洗浄し、0.25 Mイミダゾールを含む平衡バッファーでタンパク質を溶離する。続いて、高度に精製されたタンパク質を10 mMのHepes、0.14 MのNaCl及び4%のマニトールを含む貯蔵バッファー中で25 mLのG25 Superfine (Pharmacia)カラムを用いて脱塩し、-80 $^{\circ}$ Cで貯蔵する。

以下のようにして条件培地からイムノアドヘシン (Fc含有) 作成物を精製する。pH 6.8の20mMのリン酸ナトリウムバッファーで平衡化した5mlのブロテインAカラム (Pharmacia) へ、条件培地をポンプ供給する。充填後、100mMのクエン酸、pH 3.5で溶離する前に、このカラムを平衡バッファーでしっかりと洗浄する。275 $\mu$ lの1Mトリスバッファー、pH 9を含む管に1mlの分画を回収することによって、溶離したタンパク質を即座に中性化する。続いて、上記にてポリ-Hisタグタンパク質に関して記した貯蔵バッファー中で、この高度に精製されたタンパク質を脱塩する。その均一性はSDSポリアクリルアミドゲル、及びエドマン(Edman)分解によるN-末端アミノ酸配列決定によって評価する。

#### 【0206】

#### 実施例6 酵母でのTCCRの発現

以下の方法は、酵母菌中でのTCCRの組換え発現を記載する。

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのTCCRの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。TCCRをコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してTCCRの細胞内発現を指示する。分泌のために、TCCRをコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然TCCRシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌アルファ因子又はインベルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)TCCRの発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

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

続いて組換えTCCRは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。TCCRを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラ

フィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

### 【0207】

#### 実施例7 バキュロウイルス感染昆虫細胞でのTCCRの発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるTCCRの組換え発現を記載する。

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

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

### 【0208】

次に、発現されたポリ-hisタグTCCRは、例えばNi<sup>2+</sup>-キレートアフィニティクロマトグラフィーによって、次のように精製される。抽出物は、Rupertら, Nature, 362:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製する。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mLのHepes、pH7.9; 12.5mMのMgCl<sub>2</sub>; 0.1mM E

D T A ; 1 0 % グリセロール ; 0 . 1 % の N P - 4 0 ; 0 . 4 M の K C l ) 中 に 再 懸 濁 し、氷上で2回20秒間超音波処理する。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー(50 mMリン酸塩、300 mMのNaCl、10%グリセロール、pH 7.8)で50倍希釈し、0.45 μmフィルターで濾過する。Ni<sup>2+</sup>-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5 mLの総容積で調製し、25 mLの水で洗浄し、25 mLの負荷バッファーで平衡する。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5 mLでカラムに負荷する。分画回収が始まる点であるA<sub>280</sub>のベースラインまで、負荷バッファーでカラムを洗浄した。次に、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50 mMリン酸塩; 300 mMのNaCl、10%グリセロール、pH 6.0)で、カラムを洗浄した。A<sub>280</sub>のベースラインに再度到達した後、二次洗浄バッファー中での0から500 mMイミダゾール勾配によって、カラムを展開した。1 mLの分画は、回収され、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)と結合したNi<sup>2+</sup>-NTAでのウェスタンブロットによって分析される。溶離したHis<sub>10</sub>-タグTCCRを含む分画をプールし、負荷バッファーで透析した。

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)TCCRの精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

#### 【0209】

あるいは更に、修飾バキュロウイルス法を用いるHigh 5細胞によって、本発明のTCCR分子を発現してもよい。この方法では、所望の配列をコードするDNAは、Pfu(Stratagene)等の適当な系で増幅されても、又はバキュロウイルス発現ベクターの含まれるエピトープタグの上流(5'-)に融合させてもよい。このようなエピトープタグは、poly-Hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域等)を含む。pIE-1(Novagen)等の市販のプラスミドから誘導されたプラスミドを含む、種々のプラスミドを用いることができる。このpIE-1及びpIE-2ベクターは、安定に形質転換された昆虫細胞におけるバキュロウイルスie1プロモーターからの組換えタンパク質の構成的発現のために設計される。このプラスミドは複数のクローニング部位の方向においてのみ

相違し、未感染昆虫細胞における *i e 1* 媒介遺伝子発現に重要であることが知られた全てのプロモーター配列並びに *h r 5* エンハンサー成分を含む。 *p I E - 1* 及び *p I E - 2* は *i e 1* 翻訳開始部位を含み、融合タンパク質の製造に利用できる。手短には、5' 及び 3' 領域に相補的なプライマーでの PCR によって、P R O ポリペプチドの所望の部分（膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列など）を増幅する。5' プライマーには、隣接する（選択された）制限酵素部位を導入してもよい。次いで、生成物を選択された制限酵素で消化し、発現ベクターへサブクローニングする。例えば、*p I E 1 - 1* の誘導体は、ヒト *I g G ( p b . P H . I g G )* の *F c* 領域又は所望の配列の 8 ヒスチジン（*p b . P H . H i s*）タグ下流（3'-）を含むことができる。好ましくは、確認のために、構築ベクターの配列を確認する。

#### 【0210】

27、CO<sub>2</sub>無し、ペン/ストレップ無しの条件下で、*H i - 5* 細胞を 50% の培養飽和密度まで成長させる。各々の 150 mm プレートについて、配列を含む 30 µg の *p I E* ベースベクターを 1 ml の *E x -*細胞培地（媒質：*Ex -*細胞 401 + 1 / 100 の *L - G l u J R H Biosciences #14401-78P*（注：この媒質は軽感受性））と混合した。別の管において、100 µl のセルフェクチン（*CellFECTIN; Gibco BR L #10362-010*，ボルテックスで混合）を 1 ml の *E x -*細胞培地と混合する。この 2 つの溶液を混合し、室温で 15 分間インキュベーションする。8 ml の *E x -*細胞培地を 2 ml の DNA / セルフェクチン混合物に添加し、*E x -*細胞培地で 1 回洗浄した *H i 5* 細胞上に層形成させた。次いでこのプレートを暗中室温でインキュベートする。次いで DNA / セルフェクチン混合物を吸引し、細胞を *E x -*細胞で 1 回洗浄して過剰のセルフェクチンを除去する。30 ml の新鮮な *E x -*細胞培地を添加し、細胞を 28℃ で 3 日間インキュベートする。その上清を回収し、バキュロウイルス感染ベクターの配列発現を、1 ml の上清の 25 ml のヒスチジンタグタンパク質用の *N i - N T A* ビーズ（*QIAGEN*）のための *I g G* タグタンパク質用のプロテイン A セファロース *C L - 4 B* ビーズ（*Pharmacia*）へのバッチ結合、次いでクマシーブルー染色によって周知の濃度のタンパク質標準と比較する SDS - P A G E 分析により測定する。

## 【0211】

形質移入細胞の条件培地(0.5 - 3 L)を、遠心分離によって細胞を除去して回収し、0.22ミクロンフィルターを通して濾過した。ポリ-His タグ作成物のために、配列を含むタンパク質をNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製した。精製前に、イミダゾールを48 で流速4 - 5 ml /分とする。負荷後、カラムを更なる平衡バッファーで洗浄し、タンパク質が0.25 Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて10 mM H e p e s、0.14 M N a C l 及び4%のマンニトールを含む貯蔵バッファー、pH 6.8 中で25mlのG25 Superfine (Pharmacia) カラムを用いて脱塩し、-80 で貯蔵した。

また、タンパク質のイムノアドヘシン(Fc含有)作成物を、以下のようにして条件培地から精製してもよい。20 mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH 6.8 で平衡化した5 mlのプロテインAカラム(Pharmacia)へ、条件培地をポンプ供給する。負荷後、カラムを平衡バッファーでしっかりと洗浄した後、100 mMのクエン酸、pH 3.5 で溶離した。1 mlの画分を275 µlの1 M トリスバッファー、pH 9 を含む管に回収することによって、溶離したタンパク質を即座に中性化した。続いてpoly-His タグタンパク質のために上記の貯蔵バッファー中で、高度に精製されたタンパク質を脱塩した。その均一性は、SDS ポリアクリルアミドゲル及びエドマン(Edman)分解によるN-末端アミノ酸配列決定によって評価する。

## 【0212】

## 実施例8 TCCRに結合する抗体の調製

この実施例は、TCCRに特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

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

完全フロイントアジュバントに乳化したTCCR免疫原でBa1b/c等のマ

ウスを免疫化し、そして皮下又は腹腔内に1 - 100マイクログラムで注入する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。次いで、10から12日後に、免疫化したマウスを選択したアジュバント中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗-TCCR抗体の検出のためのELISAアッセイによる試験のために、レトロオービタル出血によってマウスから血清試料を周期的に採取してもよい。

### 【0213】

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物へTCCRの最後の静脈内注射を注入をすることができる。3から4日後に、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出す。次いで、ATCCから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)融合させた。

次いで、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するために、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートへプレートできるハイブリドーマ細胞が、この融合で生成される。

ハイブリドーマ細胞は、TCCRに対する反応性に関してELISAでスクリーニングされる。TCCRに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ(陽性)」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

抗-TCCRモノクローナル抗体を含む腹水を生成させるために、陽性ハイブリドーマ細胞を同系のBalb/cマウスに腹腔内注入できる。あるいは、組織培養フラスコ又はローラーボトルで、ハイブリドーマ細胞を成長させることができる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィ-を用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテインA又はプロテインGへの結合に基づくアフィニティクロマトグラフィ-を利用できる。

### 【0214】

### 実施例9 特異的抗体を用いたTCCRポリペプチドの精製

天然又は組換えTCCRポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ-TCCRポリペプチド、成熟TCCRポリペプチド、又はプレ-TCCRポリペプチドは、対象とするTCCRポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは、抗-TCCRポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させることによって作成される。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムによる沈殿又は固定化プロテインA (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.) による精製のいずれかによって、免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテインAによるクロマトグラフィーによって、マウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、CnBr-活性化セファロース(商品名) (Pharmacia LKB Biotechnology) 等のクロマトグラフィー樹脂へ共有結合的に付着している。この抗体は樹脂へ結合し、樹脂はブロックされ、そして誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

#### 【0215】

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のTCCRポリペプチドを含有する細胞からの分画を調製することによって、TCCRポリペプチドの精製に利用される。洗浄剤の添加或いはこの分野で公知の他の方法によって、微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分分画の可溶化によって、この調製物は誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化TCCRポリペプチドは、成長する培地にその有用量が細胞が分泌される。

可溶化TCCRポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、TCCRポリペプチドの好ましい吸着を可能にする条件下でカラムを洗浄する(例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー)。次いで、抗体/TCCRポリペプチド結合を分解する条件下(例えば、約2-3といった低pHバッファー、高濃度の尿素又はチオシアン酸イオン等のカオトロップ)でカラムを溶離し、TCCRポリペプチドを回収される。

#### 【0216】

### 実施例10 薬剤スクリーニング

あらゆる種々の薬剤スクリーニング技術でTCCRポリペプチド又はその結合断片を使用することによって、化合物のスクリーニングにとって特に有用である方法が用いられてもよい。そのような試験に用いられるTCCRポリペプチド又は断片は、溶液中で自由状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、細胞内にあってもよい。薬剤スクリーニングの1つの方法では、TCCRポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸によって安定に形質移入される真核生物又は原核生物宿主細胞が用いられる。そのような形質移入細胞に対して、競合的結合アッセイによって、薬剤はスクリーニングされる。そのような細胞は、生存可能又は固定化形態のいずれかで、標準的な結合アッセイに使用できる。例えば、TCCRポリペプチド又はその断片と試験される薬剤の間における複合体の形成を測定してよい。あるいは、試験される薬剤によって生じる、TCCRポリペプチドとその標的細胞又は標的レセプター間の複合体形成の減少を調べることができる。

従って、本発明は、TCCRポリペプチド関連疾患又は障害に影響を与えうる薬剤又は任意の他の試薬ためのスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、この分野で良く知られている方法によって、その試薬をTCCRポリペプチド又は断片に接触させ、(i)試薬とTCCRポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は(ii)TCCRポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在についてアッセイすることを含む。これらのような競合結合アッセイでは、概して、TCCRポリペプチド又は断片が標識される。適切なインキュベーションの後、遊離型のTCCRポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、遊離型又は未複合標識の量が、特定の試薬がTCCRポリペプチドと結合する、或いはTCCRポリペプチド/細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

#### 【0217】

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適切な結合親和性を持つ化合物のためのハイスループットスクリーニング法を提供し、1984年9月13日に公開されたWO84/03564に詳細に記載されている。要約すると、多数の異なる小型ペプチド試験化合物を、プラスチックピン等の固体支

持体又は幾つかの他の表面上で合成する。TCCRポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はTCCRポリペプチドと反応し、そして洗浄される。結合したTCCRポリペプチドは、この分野で良く知られた方法によって検出される。また、上記の薬剤スクリーニング技術の利用にあたって、精製したTCCRポリペプチドをプレート上に直接被覆することができる。さらには、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するために、非中和抗体を使用できる。

また、本発明では、TCCRポリペプチドに結合可能な中和抗体がTCCRポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイも考慮する。この方法では、TCCRポリペプチドと一つ以上複数の抗原決定基を共有する任意のペプチドの存在を検出するために、抗体を利用できる。

#### 【0218】

##### 実施例11 合理的薬剤設計

合理的薬剤設計の目的は、対象とする生物学的活性ポリペプチド（例えば、TCCRポリペプチド）又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例の任意のものが、TCCRポリペプチドのより活性で安定な形態薬剤、或いはインビボでTCCRポリペプチドの機能を促進又は阻害する薬剤の創作に利用できる（参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)）。

1つの方法において、TCCRポリペプチド、又はTCCRポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造が、x線結晶学により、コンピュータモデル化により、最も典型的には2つの方法の組み合わせにより決定される。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、TCCRポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、TCCRポリペプチドの構造に関する有用な情報が、相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることもある。両方の場合において、関連する構造情報は、類似TCCRポリペプチド様分子の設計或いは効果的なインヒビターの同定に利用される。合理的な薬剤設計の有用な例には、Braxton及びWells, Biochemistry, 31: 7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、或いはAthauda

ら, J.Biochem., 113: 742-746 (1993)に示されているような天然ペプチドのインヒビター、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する分子が含まれる。

#### 【0219】

また、上記のような機能アッセイによって選択された標的特異的な抗体を単離し、その結晶構造を解明することもできる。原理的には、この方法は、後に続く薬剤設計が基礎をおくことのできるファーマコア(pharmacore)を生成する。機能的で、薬理的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体(抗-ids)を生成することによって、タンパク質結晶学を迂回することができる。鏡像の鏡像として、抗-idsの結合部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。次いで、化学的又は生物学的に製造したペプチドのバンクからペプチドを同定及び単離するのに、抗-idを利用できる。単離されたペプチドは、ファーマコアとして機能するであろう。

本発明によって、X線結晶学などの分析実験を実施するのに十分な量のTCCRポリペプチドが入手可能である。さらに、ここに提供したTCCRポリペプチドアミノ酸配列の知識は、X線結晶学に代わって、又はそれに加えて、コンピュータモデル化技術を用いるものにガイダンスを提供する。

#### 【0220】

表2(A-D)は、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いた%アミノ酸配列同一性(表2(A-B))及び%核酸配列同一性(表2(C-D))を決定するために、下記の方法を使用する仮説的な例を示し、「PRO」は対象とする仮説的PROポリペプチドのアミノ酸配列を示し、「比較タンパク質」は対象とする「PRO」ポリペプチドが比較されるポリペプチドのアミノ酸配列を示し、「PRO-DNA」は対象とする仮説的PRO-コード化核酸配列を示し、「比較DNA」は対象とする「PRO-DNA」核酸分子が比較される核酸分子のヌクレオチド配列を示し、「X」、「Y」及び「Z」は各々異なる仮説的アミノ酸残基を示し、「N」、「L」及び「V」は各々異なる仮説的ヌクレオチドを示す。

#### 【0221】

##### 実施例12 免疫応答におけるTCCRの役割

T細胞応答： 抗-KLH応答のために、マウスを、1mg/mlの結核菌株

H37Ra (Difco Laboratories, Detroit, MI) を含有する、CFAと1:1割合の乳化物である100 µg KLHの生理的食塩水により後部足蹠において免疫した。9日後、膝窩リンパ節を取り出し、細胞懸濁液を調製した。このリンパ節細胞を、5% FCSを補充添加した種々の濃度のKLMを含むDMEM培地で培養した(ウェル当たり $5 \times 10^5$ )。5日間培養の最後の18時間に1 µCiの $[^3\text{H}]$ -チミジン(ICN, Irvine, CA)を添加することで増殖を測定し、液体シンチレーションカウンティングによって放射能の取り込みをアッセイした。T細胞によるサイトカイン生産のアッセイは、望ましい量のKLMを含む最終容量が200 mlの96ウェルプレートで、KLMによる初回抗原刺激を受けた野生型又はTCR欠損マウスのいずれかの $5 \times 10^5$ の流入領域リンパ節細胞を培養することでおこなった。96時間の培養後に、各ウェルから150 µlの培養上澄み液を取り除き、Pharmingen (San Diego, CA)の抗体を奨励された条件で用いるELISA法によってサイトカインのレベルを測定した。

#### 【0222】

T細胞分化のインビトロ誘導：脾臓のCD4<sup>+</sup>T細胞、及び野生型又はTCR欠損同腹子のリンパ節を、抗-CD4磁気ビーズ(MACS)によって精製した。精製T細胞( $10^6$ 細胞/ml)を、照射された(3000 rad)同質野生型又はノックアウトAPC( $10^6$ /ml)及びConA(2.5 µg/ml, Boehringer Mannheim, Germany)の下で、或いは5 µg/mlの抗-CD3及び1 µg/mlの抗-CD28抗体でコーティングしたプレート上にプレートすることによって活性化した。この培養培地には、Th1分化のためにIL-2(20 U/ml)、IL-12(3.5 ng/ml, R&D Systems)及び500 ng/mlの抗-IL-4抗体(Pharmingen)を、Th2分化のためにIL-2(20 U/ml)、IL-4( $10^3$  U/ml, R&D Systems)及び500 ng/mlの抗-IFN抗体(Pharmingen)を補充添加した。3日後に、ConA(2.5 µg/ml)の下で又は5 µg/mlの抗-CD3抗体でコーティングしたプレート上のいずれかにおいて、細胞をRNA抽出のために溶解せしめるか、或いは $10^6$ 細胞/mlにて十分に洗浄、数を数える、及び再刺激した。24時間後には、上澄みを回収し、そしてサイトカインの存在について分析した。

## 【0223】

全及びOVA特異的免疫グロブリンレベル： 12週齢又はより高齢な免疫されていないマウスを出血させ、ELISAによる免疫グロブリンの種々のアイソタイプの存在に関して血清を分析した。抗-OVA特異的抗体に関しては、6週齢野生型又はTCCR欠損マウスを100 $\mu$ gのOVAを含む完全フロインドアジュバントで免疫し(腹腔内)、21日後に、100 $\mu$ gのOVAを含む不完全フロインドアジュバントを与えて免疫活動を惹起した(腹腔内)。7日後に、免疫が惹起されたマウスを出血させ、OVA-特異的抗体の存在に関して血清を分析した。

## 【0224】

リアルタイムPCR分析： マウス脾細胞は、FACSによってTヘルパー細胞(CD4ポジティブ、F4/80ネガティブ、97%純粋)、B細胞(CD19ポジティブ、97%純粋)、ナチュラルキラー細胞(NK1.1ポジティブ、99%純粋)、及びマクロファージ(F4/80ポジティブ、>95%純粋)に、MACSによって細胞傷害性T細胞(CD8ポジティブ、85%純粋)に分けられる。全RNAをQiagen RNeasyカラムで抽出し、含有するDNAを除くためにDNase Iによって消化した。Taqman 18を用いて、TCCRに関してRNAを詳しく調べた。すべての反応は複製し、リボゾームのハウスキーピング遺伝子であるrp119へ標準化された。RTコントロール反応が含まれず、すべての試料がDNAを含まないことを示した。すべてのプライマー及びプローブの配列が、Fig 19に示されている。

野生型及びTCCR-欠損マウスをキーホールリンペットヘモシニアン(KLH)で免疫し、インビトロでのKLHをともなうインビトロ刺激後のサイトカイン生産に関して、9日後に回収した流入領域リンパ節を評価した(Fig 16A及びB)。これらのマウスにおけるKLHで免疫活動が惹起され、その一方でIL-4の生産がかなり増加した場合に、TCCR欠損細胞のIFNを生産する能力はかなり弱められた。TCCR欠損インビボ初回刺激リンパ球細胞の抗原誘導による増殖及びIL-5の生産は、正常であった(Fig 16C及びD)。IFN生産に関する本質的な欠陥を持たないと思われるTCCR欠損マウスのLPS刺

激に基づいて、IFN生産の正常なレベルは測定された。これらの結果は、TCCR欠損マウスは、Th1応答を高める能力が低下していることを示している。Th1応答の損失は、Th2応答の増加をともない、これは、IL-12等のTh1サイトカインを欠いているマウスに観察されているものと類似している (Magram, J., ら., 1996, *Immunity*, 4: 471-81; Wu, C., ら., 1997, *Immunol.*, 159: 1658-65)。

#### 【0225】

細胞免疫性応答を制御する役割に加えて、IFNは免疫グロブリン(Ig)のアイソタイプ制御にも関与している。特に、INFは、IgG2a抗体の生産を、より低いIgG3抗体の生産を増大させることが知られている (Snapper, C. M., & Paul, W. E., 1987, *Science*, 236: 944-7; Huang, S., ら., 1993, *Science*, 259: 1742-5)。Th1細胞による減少したIFNの生産と一致して、他のすべての免疫グロブリンのアイソタイプのレベルは正常である一方で、TCCR欠損マウスは全血清のIgG2a濃度が低下していた (Fig 17A)。さらには、インビボでのオボアルブミン(OVA)による免疫活動の惹起に基づいて、TCCR欠損マウスは、OVA-特異的IgG2aの力価をかなり低下させた (コントロールの~20%; Fig 17B)。

例えばリステリア・モノサイトゲネス (*L. monocytogenes*) のような細胞内病原体に対する防御として、Th1応答は重要である。Th1応答の制御におけるTCCRのインビボでの役割を更に確立するために、TCCR欠損マウス及びコントロールの同腹子を、ほぼ致死量に近いリステリア・モノサイトゲネス ( $3 \times 10^4$  コロニー形成単位 (CFU)) で感染させた。細菌力価を感染の3日又は9日後に測定し、TCCR欠損マウスの肝臓において  $10^6$  倍まで高くなっていることが見出された (Fig 17C)。

#### 【0226】

次に、インビトロにおけるTh1応答の分化の媒介におけるTCCRの役割を調査した。Th1又はTh2細胞発生のいずれかに有利である条件下で、照射APCの存在のもと、TCCR欠損マウス及び野生型のCD4+はインビボで分化した。3-4日の培養後、細胞は洗浄され、ConAで再刺激され、そして24

時間後に、サイトカインの存在に関して、上澄み液を分析した。Th1細胞へ分化すると、TCR欠損リンパ球は、野生型同腹子より80%少ないIFNを生産した(Fig 18A)。対照的に、IL-4及び抗-IFN抗体の存在下で生育したTCR欠損リンパ球は、僅かに多くのIL-4を生産した。同様な結果が、CD4<sup>+</sup>CD45Rb<sup>high</sup>天然T細胞で得られた。この結果は、二つの理由から、T細胞に本来備わっているものである：第一に、野生型又はTCR欠損マウスに由来するAPCの存在下でT細胞が分化した場合に、同じような結果が得られた。二番目には、プレート固定化抗-CD3/CD28を利用してT細胞分化が生じるAPC遊離系において、この結果は再現可能であった(Fig 18B)。また、IFN生産の減少は、細胞内FACS染色によって測定されるIFN生産細胞の数の減少に相関する。IL-12レセプターの両サブユニットが、通常は活性T細胞で発現していたので、観察されたTh1欠損がIL-12レセプターにおける欠陥の結果であるとは思われなかった。IL-12が更に、野生型及びTCR欠損マウスからのConA刺激T細胞の増殖を促進できるので、これらマウスには、IL-12シグナル伝達経路に欠陥が無いものと思われる(Fig 18C及びD)。

表3(A-Q)は、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムの完全なソースコードを提供する。このソースコードはUNIXオペレーティングシステムで使用するために日常的にコンパイルでき、ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを提供する。

【0227】

## 表2A

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

% アミノ酸配列同一性=

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で一致するアミノ酸残基の数) を  
(PROポリペプチドの全アミノ酸残基の数) で割る =

5 ÷ 15 = 33.3%

【0228】

**表2B**

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

% アミノ酸配列同一性=

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で一致するアミノ酸残基の数)を  
(PROポリペプチドの全アミノ酸残基の数)で割る=

$$5 \div 10 = 50\%$$

**【0229】**

**表2C**

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ=14ヌクレオチド)
比較DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(長さ=16ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性=

(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で一致するヌクレオチドの数)を  
(PRO-DNA核酸配列の全ヌクレオチドの数)で割る=

$$6 \div 14 = 42.9\%$$

**【0230】**

**表2D**

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ=12ヌクレオチド)
比較DNA	NNNNLLLVV	(長さ=9ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性=

(ALIGN-2によって決定した二つの核酸配列間で一致するヌクレオチドの数)を  
(PRO-DNA核酸配列の全ヌクレオチドの数)で割る=

$$4 \div 12 = 33.3\%$$

**【0231】**

表3A

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

【 0 2 3 2 】

## 表3B

```

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

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

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

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

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

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

char *ofile; /* output file name */
char *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path pp[2]; /* holds path for seqs */
char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

表3C

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2(1<<('D':'A'))(1<<('N':'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25(1<<('E':'A'))(1<<('Q':'A'))
};

main(ac, av)                                main
{
    int      ac;
    char     *av[];

    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &lcn0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &lcn1);
    xbm = (dna)?_dbval : _pbval;
    endgaps = 0;                                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";                        /* output file */
    nw();                                       /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();                               /* get the actual jmps */
    print();                                  /* print stats, alignment */
    cleanup(0);                               /* unlink any tmp files */
}

```

Page 1 of nw.c

【 0 2 3 4 】

## 表3D

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;      /* keep track of delx */
    int       *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;              /* score for each type */
    int       ins0, ins1;       /* insertion penalties */
    register  id;               /* diagonal index */
    register  ij;               /* jmp indx */
    register  *col0, *col1;     /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;          /* index into seqs */
    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

Page 2 of nw.c

【 0 2 3 5 】

表 3E

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongong del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

```

表 3F

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
    if (xx == len0 && yy < len1) {
        /* last col
        */
        if (endgaps)
            col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
        if (col1[yy] > smax) {
            smax = col1[yy];
            dmax = id;
        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

Page 4 of nw.c

【 0 2 3 7 】

表 3G

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */
#include "nw.h"
#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */
extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */
print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

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

```

print

Page 1 of nwprint.c

【 0 2 3 8 】

## 表 3H

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                                             /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;                                  /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double    pct;
    register    n0, n1;
    register char    *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--; }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--; }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++; }
    }
    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (lcn0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

表31

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {(void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
    ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}

if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);

if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base": "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base": "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n"); }

static int nm; /* matches in core -- for checking */
static int lmax; /* lengths of stripped file names */
static int ij[2]; /* jmp indx for a path */
static int nc[2]; /* number at start of current line */
static int ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
static int siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[ ]
 */
static
pr_align()
{
    int nn; /* char count */
    int more;
    register i;
    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr\_align

Page 3 of nwprint.c

【 0 2 4 0 】

## 表 3J

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = ' ';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr\_align

dumpblock

Page 4 of nwprint.c

【 0 2 4 1 】

表3K

...dumpblock

```

(void)putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[] holding seq line */
char nline[P_LINE];
register i, j;
register char *pn, *px, *py;
for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
    *pn = ' ';
for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
    if (*py == ' ' || *py == '-')
        *pn = ' ';
    else {
        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
            j = (i < 0)? -i : i;
            for (px = pn; j /= 10, px--)
                *px = j%10 + '0';
            if (i < 0)
                *px = '-';
        }
        else
            *pn = ' ';
        i++;
    }
}
*pn = '\0';
nc[ix] = i;
for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void)putc(*pn, fx);
(void)putc('\n', fx);}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;

```

nums

putline

## 表 3L

```

int          i;
register char *px;
for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);
/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == '' && *(po[0]) == '') ||
        !*out[1] || (*out[1] == '' && *(po[1]) == ''))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

Page 6 of nwprint.c

【 0 2 4 3 】

表3M

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

stripname

## 表 3N

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_malloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>
char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;
int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i) /* cleanup */
{
    int i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len) /* getseq */
{
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */

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

```

Page 1 of nwsubr.c

【 0 2 4 5 】

## 表30

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}
char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
{
    char *msg; /* program, calling routine */
    int nx, sz; /* number and size of elements */

    char *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}
/*
* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
*/
readjmps()                                          readjmps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;
    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
        }
    }
}

```

Page 2 of nwsubr.c

【 0 2 4 6 】

## 表 3P

...readjumps

```

if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
    (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
    dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
}
else
    break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}
/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

Page 3 of nwsubr.c

【 0 2 4 7 】

表3Q

```

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

    char    *mktemp();

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

```

【配列表】

## Sequence Listing

<110> Genentech, Inc.  
 De Sauvage, Frederic  
 Grewal, Iqbal  
 Gurney, Austin L

<120> TYPE I CYTOKINE RECEPTOR TCCR

<130> P1748R1PCT

<141> 2000-10-18

<150> US 60/160,542  
 <151> 1999-10-20

<160> 16

<210> 1  
 <211> 636  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 1  
 Met Arg Gly Gly Arg Gly Ala Pro Phe Trp Leu Trp Pro Leu Pro  
   1                  5                  10                  15  
 Lys Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Trp Val Leu Phe Gln Arg Thr  
                   20                  25                  30  
 Arg Pro Gln Gly Ser Ala Gly Pro Leu Gln Cys Tyr Gly Val Gly  
                   35                  40                  45  
 Pro Leu Gly Asp Leu Asn Cys Ser Trp Glu Pro Leu Gly Asp Leu  
                   50                  55                  60  
 Gly Ala Pro Ser Glu Leu His Leu Gln Ser Gln Lys Tyr Arg Ser  
                   65                  70                  75  
 Asn Lys Thr Gln Thr Val Ala Val Ala Ala Gly Arg Ser Trp Val  
                   80                  85                  90  
 Ala Ile Pro Arg Glu Gln Leu Thr Met Ser Asp Lys Leu Leu Val  
                   95                  100                  105  
 Trp Gly Thr Lys Ala Gly Gln Pro Leu Trp Pro Pro Val Phe Val  
                   110                  115                  120  
 Asn Leu Glu Thr Gln Met Lys Pro Asn Ala Pro Arg Leu Gly Pro  
                   125                  130                  135  
 Asp Val Asp Phe Ser Glu Asp Asp Pro Leu Glu Ala Thr Val His  
                   140                  145                  150  
 Trp Ala Pro Pro Thr Trp Pro Ser His Lys Val Leu Ile Cys Gln  
                   155                  160                  165  
 Phe His Tyr Arg Arg Cys Gln Glu Ala Ala Trp Thr Leu Leu Glu  
                   170                  175                  180  
 Pro Glu Leu Lys Thr Ile Pro Leu Thr Pro Val Glu Ile Gln Asp  
                   185                  190                  195  
 Leu Glu Leu Ala Thr Gly Tyr Lys Val Tyr Gly Arg Cys Arg Met  
                   200                  205                  210  
 Glu Lys Glu Glu Asp Leu Trp Gly Glu Trp Ser Pro Ile Leu Ser  
                   215                  220                  225

	Phe	Gln	Thr	Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	Lys	Asp	Val	Trp	Val	Ser	Gly	
					230					235					240	
5	Asn	Leu	Cys	Gly	Thr	Pro	Gly	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	Leu	Leu	Trp	
					245					250					255	
	Lys	Ala	Pro	Gly	Pro	Cys	Val	Gln	Val	Ser	Tyr	Lys	Val	Trp	Phe	
					260					265					270	
10	Trp	Val	Gly	Gly	Arg	Glu	Leu	Ser	Pro	Glu	Gly	Ile	Thr	Cys	Cys	
					275					280					285	
	Cys	Ser	Leu	Ile	Pro	Ser	Gly	Ala	Glu	Trp	Ala	Arg	Val	Ser	Ala	
					290					295					300	
15	Val	Asn	Ala	Thr	Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Thr	Asn	Leu	Ser	Leu	Val	
					305					310					315	
20	Cys	Leu	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Arg	Ser	Val	Ala	Val	Ser	Ser	
					320					325					330	
	Ile	Ala	Gly	Ser	Thr	Glu	Leu	Leu	Val	Thr	Trp	Gln	Pro	Gly	Pro	
					335					340					345	
25	Gly	Glu	Pro	Leu	Glu	His	Val	Val	Asp	Trp	Ala	Arg	Asp	Gly	Asp	
					350					355					360	
	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	Asn	Trp	Val	Arg	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn	Leu	
					365					370					375	
30	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	Gly	Asn	Phe	Thr	Val	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	
					380					385					390	
	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	
					395					400					405	
	Ser	Val	Trp	Gly	Phe	Arg	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Gly	Pro	
					410					415					420	
40	Thr	Leu	Trp	Arg	Leu	Gln	Asp	Ala	Pro	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Ile	
					425					430					435	
	Ala	Trp	Gly	Glu	Val	Pro	Arg	His	Gln	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Thr	
					440					445					450	
45	His	Tyr	Thr	Leu	Cys	Ala	Gln	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Val	Cys	
					455					460					465	
	Met	Asn	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Asp	Leu	
					470					475					480	
	Pro	Trp	Gly	Pro	Cys	Glu	Leu	Trp	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	Ile	Ala	
					485					490					495	
55	Gly	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Leu	Pro	Asp	
					500					505					510	
	Asn	Thr	Leu	Arg	Trp	Lys	Val	Leu	Pro	Gly	Ile	Leu	Phe	Leu	Trp	
					515					520					525	
60	Gly	Leu	Phe	Leu	Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	
					530					535					540	
	Arg	Cys	Tyr	His	Leu	Arg	His	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	Trp	Val	Trp	
					545					550					555	
65	Glu	Lys	Val	Pro	Asp	Pro	Ala	Asn	Ser	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	His	
					560					565					570	

	Met Glu Gln Val Pro Glu Ala Gln Pro Leu Gly Asp Leu Pro Ile	575	580	585
5	Leu Glu Val Glu Glu Met Glu Pro Pro Pro Val Met Glu Ser Ser	590	595	600
	Gln Pro Ala Gln Ala Thr Ala Pro Leu Asp Ser Gly Tyr Glu Lys	605	610	615
10	His Phe Leu Pro Thr Pro Glu Glu Leu Gly Leu Leu Gly Pro Pro	620	625	630
	Arg Pro Gln Val Leu Ala	635		
15	<210> 2			
	<211> 623			
	<212> PRT			
20	<213> Mus musculus			
	<400> 2			
	Met Asn Arg Leu Arg Val Ala Arg Leu Thr Pro Leu Glu Leu Leu	1	5	10
25	Leu Ser Leu Met Ser Leu Leu Leu Gly Thr Arg Pro His Gly Ser	20	25	30
	Pro Gly Pro Leu Gln Cys Tyr Ser Val Gly Pro Leu Gly Ile Leu	35	40	45
30	Asn Cys Ser Trp Glu Pro Leu Gly Asp Leu Glu Thr Pro Pro Val	50	55	60
	Leu Tyr His Gln Ser Gln Lys Tyr His Pro Asn Arg Val Trp Glu	65	70	75
35	Val Lys Val Pro Ser Lys Gln Ser Trp Val Thr Ile Pro Arg Glu	80	85	90
40	Gln Phe Thr Met Ala Asp Lys Leu Leu Ile Trp Gly Thr Gln Lys	95	100	105
	Gly Arg Pro Leu Trp Ser Ser Val Ser Val Asn Leu Glu Thr Gln	110	115	120
45	Met Lys Pro Asp Thr Pro Gln Ile Phe Ser Gln Val Asp Ile Ser	125	130	135
	Glu Glu Ala Thr Leu Glu Ala Thr Val Gln Trp Ala Pro Pro Val	140	145	150
50	Trp Pro Pro Gln Lys Ala Leu Thr Cys Gln Phe Arg Tyr Lys Glu	155	160	165
55	Cys Gln Ala Glu Ala Trp Thr Arg Leu Glu Pro Gln Leu Lys Thr	170	175	180
	Asp Gly Leu Thr Pro Val Glu Met Gln Asn Leu Glu Pro Gly Thr	185	190	195
60	Cys Tyr Gln Val Ser Gly Arg Cys Gln Val Glu Asn Gly Tyr Pro	200	205	210
	Trp Gly Glu Trp Ser Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr Pro Phe Leu	215	220	225
65	Asp Pro Glu Asp Val Trp Val Ser Gly Thr Val Cys Glu Thr Ser	230	235	240

	Gly	Lys	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu	Val	Trp	Lys	Asp	Pro	Arg	Pro	Cys
					245					250					255
5	Val	Gln	Val	Thr	Tyr	Thr	Val	Trp	Phe	Gly	Ala	Gly	Asp	Ile	Thr
					260					265					270
	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Val	Pro	Cys	Cys	Lys	Ser	Pro	Val	Pro	Ala
					275					280					285
10	Trp	Met	Glu	Trp	Ala	Val	Val	Ser	Pro	Gly	Asn	Ser	Thr	Ser	Trp
					290					295					300
	Val	Pro	Pro	Thr	Asn	Leu	Ser	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Pro	Glu	Ser
15					305					310					315
	Ala	Pro	Cys	Asp	Val	Gly	Val	Ser	Ser	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Gly
					320					325					330
20	Ile	Lys	Val	Thr	Trp	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Lys	Pro	Leu	Glu	Tyr
					335					340					345
	Val	Val	Asp	Trp	Ala	Gln	Asp	Gly	Asp	Ser	Leu	Asp	Lys	Leu	Asn
					350					355					360
25	Trp	Thr	Arg	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Pro	Gly
					365					370					375
	Glu	Phe	Lys	Gly	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Val
30					380					385					390
	Tyr	Ser	Gly	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Trp	Gly	Phe	Arg
					395					400					405
35	Glu	Glu	Leu	Val	Pro	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala	Val	Trp	Arg	Leu	Pro
					410					415					420
	Asp	Asp	Pro	Pro	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Ala	Trp	Gly	Glu	Val	Pro
					425					430					435
40	Arg	His	Gln	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Thr	His	Tyr	Thr	Phe	Cys	Ile
					440					445					450
	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Ser	Gln
45					455					460					465
	Thr	Gln	Thr	Ala	Thr	Leu	Pro	Asn	Leu	His	Ser	Gly	Ser	Phe	Lys
					470					475					480
50	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Ser	Thr	Val	Ala	Gly	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly
					485					490					495
	Pro	Asp	Leu	Ser	Leu	His	Leu	Pro	Asp	Asn	Arg	Ile	Arg	Trp	Lys
					500					505					510
55	Ala	Leu	Pro	Trp	Phe	Leu	Ser	Leu	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Met	Gly
					515					520					525
	Cys	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Arg	Cys	Leu	Gln	Ala	Arg	Cys
60					530					535					540
	Leu	His	Trp	Arg	His	Lys	Leu	Leu	Pro	Gln	Trp	Ile	Trp	Glu	Arg
					545					550					555
65	Val	Pro	Asp	Pro	Ala	Asn	Ser	Asn	Ser	Gly	Gln	Pro	Tyr	Ile	Lys
					560					565					570
	Glu	Val	Ser	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Lys	Asp	Gly	Pro	Ile	Leu	Glu
					575					580					585



aaactcaact gggtcggct tccccctggg aacctcagtg ctctgttacc 1250  
 agggaatttc actgtcgggg tcccctatcg aatcactgtg accgcagtct 1300  
 5 ctgcttcagg cttggcctct gcatcctcog tctgggggtt caggaggaa 1350  
 ttagcacccc tagtggggcc aacgctttgg cgactccaag atgccccctc 1400  
 10 agggaccccc gccatagcgt ggggagaggt cccaaggcac cagcttcgag 1450  
 gccacctcac ccactacacc ttgtgtgcac agagtggaac cagccccctc 1500  
 gtctgcatga atgtgagtgg caacacacag agtgtcacc tgctgacct 1550  
 15 tccttgggggt cctgtgagc tgtgggtgac agcatctacc atcgtggac 1600  
 agggccctcc tggccccatc ctccggcttc atctaccaga taacaccctg 1650  
 20 aggtgaaaag ttctgccggg cctcctatc ttgtggggct tgttctctgt 1700  
 ggggtgtggc ctgagcctgg ccacctctgg aaggtgctac cacctaaggc 1750  
 acaaagtgtc gccccgctgg gtctgggaga aagtctctga tcctgccaac 1800  
 25 agcagttcag gccagcccca catggagcaa gtacctgagg ccagccccct 1850  
 tggggacttg cccatcctgg aagtggagga gatggagccc ccgcccgtta 1900  
 30 tggagtctc ccagcccccc caggccaccg ccccgttga ctctgggtat 1950  
 gagaagcact tcctgcccac acctgaggag ctgggccttc tggggcccc 2000  
 caggccacag gttctggcct gaaccacacg tctggctggg ggctgccagc 2050  
 35 caggctagag ggatgctcat gcaggttgca cccagtcct ggattagccc 2100  
 tcttgatgga tgaagacact gaggactcag agaggctgag tcacttacct 2150  
 40 gaggacacc agccaggcag agctgggatt gaaggacccc tatagagaag 2200  
 ggcttggccc ccatggggaa gacacggatg gaaggtggag caaaggaaaa 2250  
 tacatgaaat tgagagtggc agctgcctgc caaaatctgt tccgctgtaa 2300  
 45 cagaactgaa tttggacccc agcacagtgg ctcacgctg taatcccagc 2350  
 actttggcag gccaaagtgg aaggatcact tagagctagg agtttgagac 2400  
 50 cagcctgggc aatatagcaa gacccctcac tanaaaaaata aaacatcaaa 2450  
 aacaaaaaca attagctggg catgatggca cacacctgta gtccgagcca 2500  
 cttgggaggc tgaggtggga ggatcgggtg agcccaggag ttcgaagctg 2550  
 55 caggacctc tgattgcacc actgcactcc aggctgggta acagaatgag 2600  
 accttatctc aaaaataaac aaactaataa aaaaaaaaaa aaaaaa 2646  
 <210> 4  
 60 <211> 2005  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 4  
 65 tcggttctat cgatggggcc atgaaccggc tccgggttgc acgcctcac 50  
 ccggtggagc ttctgctgtc gctgatgtcg ctgctgctcg ggacgcggcc 100

ccacggcagt ccaggccac tgcagtgcta cagcgtcggc cccctgggaa 150  
 tcctgaactg ctctgggaa cctttgggcg acctggagac tccacctgtg 200  
 5 ctgtatcacc agagtcagaa ataccatccc aatagagtct gggaggtgaa 250  
 ggtgccttcc aaacaaagt gggtgaccat tccccgggaa cagttacca 300  
 10 tggctgacaa actcctcatc tgggggacac aaaagggacg gcctctgtgg 350  
 tcctctgtct ctgtgaacct ggagacccaa atgaagccag acacacctca 400  
 gatcttctct caagtggata tttctgagga agcaaccctg gaggccactg 450  
 15 tgcagtgggc gccgcccgtg tggccaccgc agaaagctct cacctgtcag 500  
 ttccggtaaa aggaatgcca ggctgaagca tggaccggc tggagccca 550  
 20 gctgaagaca gatgggctga ctctgttga gatgcagaac ctggaacctg 600  
 gcacctgcta ccaggtgtct gcccgctgcc aggtggagaa cggatatcca 650  
 tggggcgagt ggagttcgcc cctgtccttc cagacgccat tcttagatcc 700  
 25 tgaagatgtg tgggtatcgg ggaccgtctg tgaacttct ggcaaacggg 750  
 cagccctgct tgtctggaag gacccaagac cttgtgtgca ggtgacttac 800  
 acagtctggt ttggggctgg agatattact acaactcaag aagaggtccc 850  
 30 gtgctgcaag tccccgtcc ctgcatggat ggagtggtct gtggtctctc 900  
 ctggcaacag caccagctgg gtgctccca ccaacctgtc tctggtgtgc 950  
 35 ttggctccag aatctgcccc ctgtgacgtg ggagtgagca gtgctgatgg 1000  
 gagcccaggg ataaagtgga cctggaaaca agggaccagg aaaccattgg 1050  
 40 agtatgtggt ggactgggct caagatggtg acagcctgga caagctcaac 1100  
 tggaccgctc tccccctgg aaacctcagc acattgttac caggggagtt 1150  
 caaaggaggg gtcccctatc gaattacagt gactgcagta tactctggag 1200  
 45 gattagctgc tgcacctca gtttgggat tcagagagga gttagtacc 1250  
 cttgctgggc cagcagtttg gcgacttcca gatgacccc cagggacacc 1300  
 tgtttagacc tggggagaag taccaagaca ccagctcaga ggcagggta 1350  
 50 ctactacac cttctgcata cagagcagag gcctctccac tgtctgcagg 1400  
 aacgtgagca gtcaaaccca gactgccact ctgcccacc ttcactcggg 1450  
 55 ttocctcaag ctgtgggtga cgggtgccac cgttgagga cagggcccac 1500  
 ctggteccga cctttcactt cacctaccag ataataggat caggtggaaa 1550  
 gctctgcctt ggtttctgtc cctgtggggg ttgcttctga tggctgtgg 1600  
 60 cctgagcctg gccagtacca ggtgcctaca ggccaggtgc ttactctggc 1650  
 gacacaagtt gcttccccag tggatctggg agagggttcc tgatcctgcc 1700  
 65 aacagcaatt ctgggcaacc ttacatcaag gaggtgagcc tgcccacc 1750  
 gcccaggac ggaccatcc tggaggtgga ggaagtggag ctacagcctg 1800

ttgtggagtc ccctaaagcc tctgcccga ttactctgg gtatgagaaa 1850  
 cacttctctgc ccacaccaga ggagctgggc cttctagtct gatctgctta 1900  
 5 cggctagggg ctgtaccct atcttgggct agacgttcta gagtcgaccg 1950  
 cagaagcttg gccgccatgg cccaacttgt ttattgcagc ttataatgtt 2000  
 aaata 2005  
 10 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 15 <400> 5  
 tggctctctcc tggcaacagc 20  
 20 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 25 <400> 6  
 agccaagcac accagagaca 20  
 30 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 7  
 cagctgggtg cctcccacca a 21  
 35 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 40 <400> 8  
 atccgcaagc ctgtgactgt 20  
 45 <210> 9  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 9  
 tcgggccagg gtgttttt 18  
 50 <210> 10  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 55 <400> 10  
 ttcccgggct cgttgccg 18  
 60 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 65 <400> 11  
 tcgcgtctct gggaagct 18  
 <210> 12  
 <211> 24

```

<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 12
5      ttttaagccaa tgtatccgag actg 24

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
10     <213> Mus musculus

<400> 13
      cgccagcgtc ctcctcgtgg 20

15     <210> 14
      <211> 21
      <212> DNA
      <213> Mus musculus

20     <400> 14
      caagcatttg catcgctatc a 21

      <210> 15
      <211> 19
      <212> DNA
25     <213> Mus musculus

      <400> 15
30     aatgcctttt gccggaagt 19

      <210> 16
      <211> 24
      <212> DNA
      <213> Mus musculus

35     <400> 16
      acgaattgag aacgtgccca ccgt 24

40

```

### 【図面の簡単な説明】

【F i g 1】 CD4 + T細胞のTh1及びTh2細胞への分化、その分化への作用を担う初期サイトカイン、抗原刺激によって各々のサブセットの分化から放出される初期サイトカイン、並びに放出されたサイトカインの特性により媒介される生理学的効果の図示。

【F i g 2】 Th1及びTh2 T細胞サブタイプによって放出されるサイトカイン間の相互関係を表す負のフィードバック回路の図示。

【F i g 3】 ヒトTCCR (hTCCR) のアミノ酸配列 (配列番号: 1) を示す。この配列は、1996年5月23日に出願のWO97/44455で公開され、更には登録番号4759327でGeneBankより入手可能である。この配列は、更に、Sprecherら., Biochem. Biophysic. Res. Commun. 246(1):82-90(1998)に記載されている。配列番号: 1では、アミノ酸残基1から32にシグ

ナルペプチド、約アミノ酸残基517から約538に膜貫通ドメイン、約残基51-54、76-79、302-305、311-314、374-377、382-385、467-470、563-566にN-グリコシル化部位、約残基107-112、240-245、244-249、281-286、292-297、373-378、400-405、459-464、470-475、531-536及び533-538にN-ミリストイル化部位、約残基522-532に原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位、そして約残基41-54に成長因子及びサイトカインレセプターファミリーシグネチャー1が同定されている。また、残基183-191には、ヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)のレセプターの二番目のサブユニットと顕著な相同性のある領域がある。

【Fig 4】 マウスTCCR(mTCCR)のアミノ酸配列を示す(配列番号:2)。この配列も1996年5月23日に出願のWO97/44455で公開され、更には登録番号7710109でGenBankより入手可能である。この配列は、更に、Sprecherら., Biochem. Biophysic. Res. Commun. 246(1):82-90(1998)にも記載されている。配列番号:2では、アミノ酸残基1から24にシグナルペプチド、約アミノ酸残基514から約532に膜貫通ドメイン、約残基46-49、296-299、305-308、360-361、368-371及び461-464にN-グリコシル化部位、約残基10-13、93-96、130-133、172-175、184-187、235-238、271-274、272-275、323-326、606-609及び615-618にカゼインキナーゼIIリン酸化部位、約残基202-209にチロシンキナーゼリン酸化部位、約残基43-48、102-107、295-300、321-326、330-335、367-342、393-398、525-530及び527-532にN-ミリストイル化部位、残基約240-243にアミド化部位、約残基516-526に原核生物膜リポタンパク質脂質付着部位、そして約残基36-49に成長因子及びサイトカインレセプターファミリーシグネチャー1が同定されている。顕著な相同性の領域としては:(1)約残基14-51のヒトエリスロポエチン及び(2)残基211-219のマウスインターロイキ

ン - 5 レセプターが存在する。

【F i g 5】 h T C C R (配列番号：1) と m T C C R (配列番号：2) の比較を示す。同一アミノ酸は陰影され、最適アラインメントのために導入したギャップはダッシュで示されている。予測されるシグナルペプチドの切断部位は矢印で示されている。潜在的なN - グリコシル化部位は星印で示されている。W S Xモチーフ、膜貫通ドメイン及びb o x 1モチーフは囲い込まれている。

【F i g 6】 成人及び胎児組織での発現の特徴を示す、ヒトT C C Rのノーザンブロット。成人では、h T C C Rは、肺で弱い発現があるだけでなく、末梢血リンパ球 (PBL's)、脾臓においてもシグナルがあるが、胸腺において最も高く発現する。胎児組織では、T C C Rは、肺及び腎臓において弱い発現を示す。T C C Rの発現の特徴は、それが、特に胸腺細胞での血液細胞の発達と増殖に関与している可能性があることを示す。

【F i g 7 (A - B)】 T C C R - / - マウスのT細胞の表現型及び数の検討。F i g 7 Aは、T C C R - / - マウスから取得したC D 4 + / C D 8 + T細胞のF A C S分析の等高線プロットで、野生型との比較。F i g 7 Bは、C D 4 + / C D 8 + / T c R + のF A C S分析の等高線プロット。T C C R - / - マウスのT細胞の数の間に顕著な違いがないことは、T細胞の増殖に障害がないことを示す。

【F i g 8 (A - B)】 ヒトT細胞におけるT C C Rの発現を示す。F i g 8 Aは、ヒトT C C R、及びヒトT細胞上にある皿状のT細胞表層マーカであるC D 2のF A C S分析による等高線プロット。F i g 8 Bは、ヒトT C C R及びヒトB細胞上のB細胞マーカであるC D 20のF A C S分析による等高線プロット。両図の最も左のプロットは、適切な蛍光色素共役二次抗体を表す。累積的に、F i g 8 A及びF i g 8 Bは、T C C RはヒトT細胞のサブセットに見出され、殆どのB細胞には存在しないことを示している。

【F i g 9 (A - C)】 相同組み換えを利用するT C C R遺伝子ターゲティング法の図示。F i g 9 Aでは、固いブロックで印したT C C Rエキソンを有する野生型対立遺伝子、並びに介在線でイントロンを示す。「E」及び「B」は、それぞれエンドヌクレアーゼE c o R I及びB a m H Iの切断部位を示す。F

Fig 9 Bは、TCCRのエキソン3 - 8がプラスミドベクターpGK - neoのネオマイシン耐性遺伝子で置き換えられた、ターゲティングベクターを示す。単純疱疹ウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子は、エキソン1の5'へ挿入され、この遺伝子はガンシクロビルによる選択圧に対する耐性を付与する。Fig 9 Cは、外来遺伝子とターゲティングベクター間の相同組み換えがおこった後の、最終標的又は「ノックアウト」対立遺伝子の図解。

【Fig 10 (A - C)】 サザンブロット、PCR反応のゲル電気泳動イメージ及びノーザンブロットを示し、それぞれにおいてTCCRターゲティングベクターによる形質移入が確認される。Fig 10 Aでは、ネオマイシン/ガンシクロビル剤選択に対して耐性であるES細胞からゲノムDNAを取り出し、これをTCCRに対して特異的な放射線標識プローブでハイブリダイゼーションした。左から二番目のレーンでは、10 Kb及び12 Kb断片の双方の存在によって、TCCR対立遺伝子の一つが除かれていることが示されている。Fig 10 Bは、TCCR<sup>-/-</sup>マウス尻尾のゲノムDNAのPCR増幅による反応生産物を示す。PCRプライマーは、野生型TCCR対立遺伝子と組み換え現象に起因する標的（「ノックアウト」）対立遺伝子が見分けられるように設計された。レーン1及び2（左より数えて）は、TCCRの野生型を表すバンドのパターンを示す。レーン3はTCCR<sup>-/-</sup>マウスのPCRバンドを示し、レーン5及び6はTCCRヘテロ接合性マウス(+/-)を示す。Fig 10 Cは、TCCRに対して特異的なプローブによってハイブリダイゼーションしたノーザンブロットである。レーン1はTCCR<sup>-/-</sup>マウスから、そしてレーン2は野生型からのものである。TCCR<sup>-/-</sup>マウスのどのシグナルの欠如も、TCCRの機能的な全長mRNAが生産されていないことを示す。

【Fig 11 (A - B)】 TCCR<sup>-/-</sup>マウスにおけるアレルギー性気道炎症の増加を示す。Fig 11 Aは、肺に浸潤する白血球の数の測定によって、チリダニ抗原(DMA)で感作されたTCCR<sup>-/-</sup>マウスがより多くのTh2応答を産することを示す。

【Fig 12 (A - B)】 IFN- $\gamma$ の生産の測定による、TCCR<sup>-/-</sup>マウスにおけるTh1/Th2応答の示すグラフ表示。Fig 12 Aでは、Th1

経路において分化を引き起こすIL-12と、TCCR<sup>-/-</sup>マウスから分離したT細胞をインキュベートする。これらの細胞のIFN- $\gamma$ 、IL-4及びIL-5の生産をアッセイした。TCCR<sup>-/-</sup>マウスのIFN- $\gamma$ の生産がかなり低いことが、Fig 12 Aの薄い斜線棒によって示されている。これは、TCCR<sup>-/-</sup>マウスにおける、かなり弱ったTh1応答を示す。Fig 12 Bは、Th2経路において分化を引き起こすIL-4とインキュベートしたT細胞のグラフ表示。これは、TCCR<sup>-/-</sup>マウスT細胞と野生型コントロール細胞の間には、サイトカインの生産に違いがないことを示している。

【Fig 13】 TCCR<sup>-/-</sup>マウスにおいて生産されるIgレベルのグラフ表示。IgサブタイプIgG1、IgG2、IgG2b、IgG3、IgM及びIgAのレベルが調べられた。薄い斜線棒で示されているように、TCCR<sup>-/-</sup>マウスは、野生型より少ないIgG2aを生産した。その他のIgGレベルには、顕著な違いは無かった。IgG2aはTh1細胞によって生産され、TCCR<sup>-/-</sup>マウスにおけるその著しい欠如は、ここで示された他のアッセイで観察されるTh1応答の減少を支持する。

【Fig 14】 前もってオボアルブミンで免疫したTCCR<sup>-/-</sup>マウスから生産されたIgGレベルのグラフ表示。第1日目と第21日目に、マウスへ100  $\mu$ gのOVAを注射し、次いで26日目に採血した。IgG1及びIgG2aのレベルは、野生型と比較してホモ接合型のノックアウトで測定した。グラフの左側に示すように、IgG1レベルは野生型とノックアウトでは同等であるが、IgG2aのレベルは野生型に比べてTCCR<sup>-/-</sup>ノックアウトマウスで極めて低く、これはTCCR<sup>-/-</sup>マウスの弱いTh1応答を反映している。

【Fig 15 (A - B)】 マウス脾細胞のどの細胞型においてTCCRの発現が在るのかを示すグラフ表示。Fig 15 Aは、CD4、CD8、CD19、NK1.1及びF4/80細胞における発現レベルを示し、CD4 T細胞とナチュラルキラー細胞において最も高いレベルであることを示している。Fig 15 Bは、Th0、Th1及びTh2細胞での発現レベルを示し、Th0において最も高い発現であり、CD4細胞の分化によりTh1及びTh2細胞の双方において下方制御されることが示されている。TCCRの発現は、リアルタイムPCR

R法によって検出され、リボゾームのハウスキーピング遺伝子である *rpl19* へ標準化された。Heid, C.A., ら., 1996, *Genome Res.*, 6:986-94。

【Fig 16 (A - D)】 抗原の誘導による、TCCR欠損マウスのリンパ節細胞からのサイトカインの生産及び増殖のグラフ表示。完全フロイントアジュバント (CFA) に含まれるKLHで野生型及びTCCR欠損マウスを免疫した。9日後にリンパ節を収集し、これを指示されたようにKLHの存在下で培養し、リンパ節の (Fig 16 A) IFN、 (Fig 16 B) IL-4、 (Fig 16 C) IL-5を生産する或いは (Fig 16 D) 増殖させる能力を分析した。データは、各グループの五匹の動物から得られた平均 + / - 標準偏差値で示されている。両KLH濃度でのWTとKOの間のIFN $\gamma$ レベルのための対応のないT検定では、 $P < 0.004$ 。

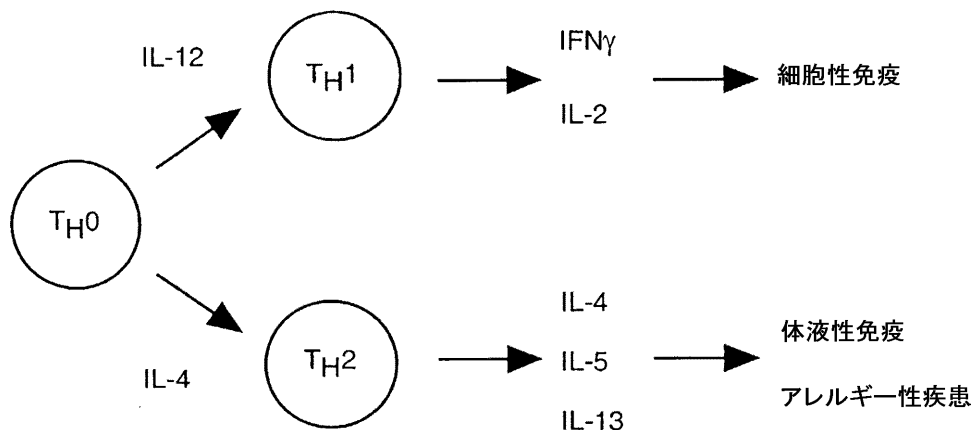
【Fig 17 (A - C)】 IgGサブクラス濃度及びリステリア症菌に対する感受性への効果に関するグラフ表示。血清を野生型及びTCCR欠損マウスから収集し、全IgGサブクラス濃度をELISA法によって測定した (Fig 17 A)。OVA/CFAのOVA特異的IgG1及びIgG2aによって、マウスを初回刺激した。CFAに含まれるOVAで免疫された野生型及びTCCR欠損マウスから血清を収集し、OVA特異的ELISA法によってIgG1 (1 : 320000希釈) 及びIgG2a (1 : 5000希釈) のレベルを測定した (Fig 17 B)。五匹のTCCR欠損マウス又は野生型同腹子を、 $3 \times 10^4$  CFUのリステリア症菌で皮下感染させた。3又は9日後に、肝臓を取り出し、細菌力価を測定した (Fig 17 C)。データは、各グループの五匹の動物から得られた平均 + / - 標準偏差値で示されている。両時点でのWTとKOの間の対応のないT検定では、 $P < 0.001$ 。

【Fig 18 (A - D)】 インビトロでのTh細胞分化及び増殖の誘導についてのグラフ表示。或いは抗CD3及び抗CD28を刺激とする、ConA及び照射野生型APCの存在下において、野生型又はTCCR欠損マウスの脾臓より精製したCD4+ T細胞は、Th1又はTh2細胞 (Fig 18 A) へ分化した (Fig 18 B)。IFN及びIL-4の生産は、ELISA法によって測定した。データは、5匹のマウス / 1グループのプールの平均値 + / - 標準偏差

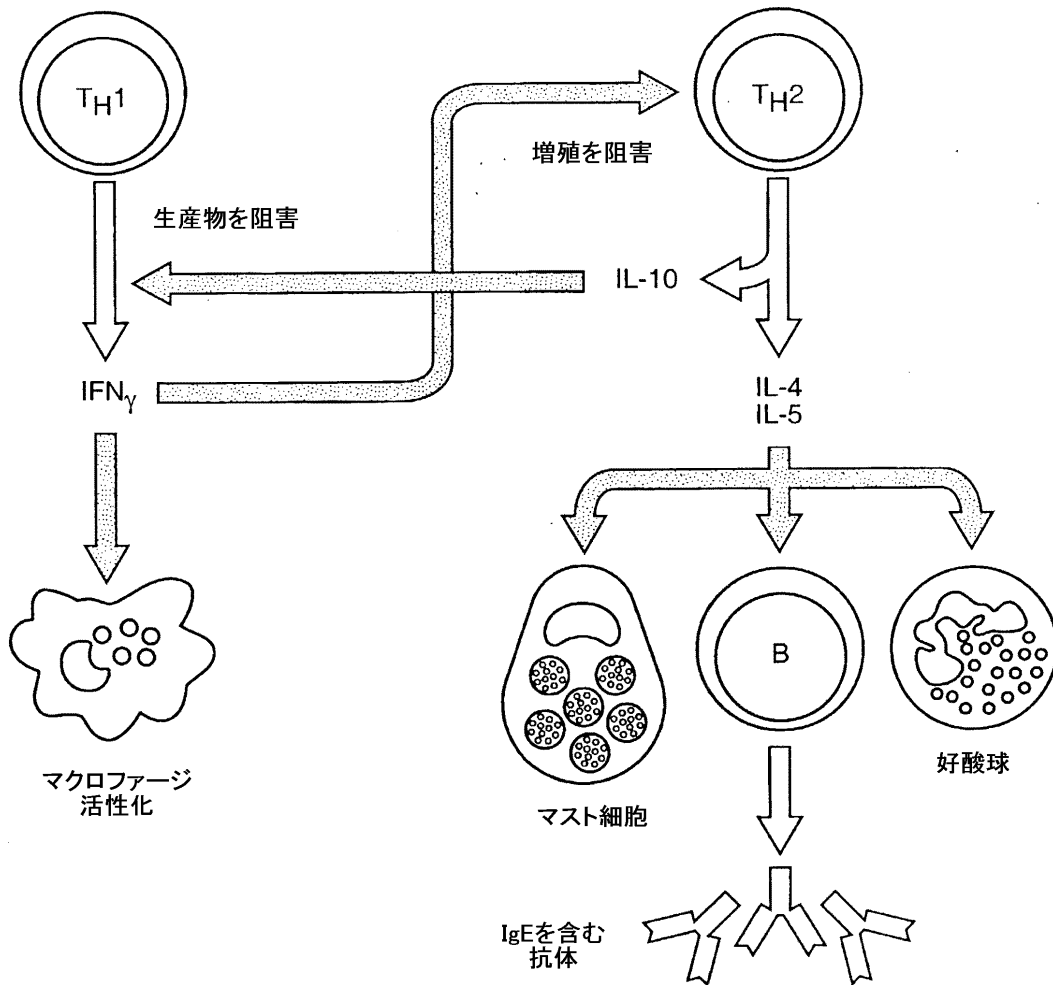
で示す。NDは非検出。Fig 18 Cは、野生型及びTCCR欠損マウスの脾細胞のIL-12誘導化増殖を示す。指示されたように、IL-12濃度が増加した下で、ConA活性化脾細胞を24時間に渡ってインキュベートした。最後の6時間で、 $[^3\text{H}]$ -チミジンを取り込ませることによって細胞の増殖を測定した。Fig 18 Dは、非刺激（白棒）及びConA刺激（黒棒）脾細胞のIL-12R mRNAレベルを示す。脾臓T細胞を72時間に渡ってConAで刺激し、IL-12R及びIL-12R2のmRNAレベルを、リアルタイム定量PCR（Taqman）によって測定した。倍数増加は、野生型非刺激細胞のRNAレベルに比例している。

【Fig 19】 Taqman（タックマン）分析に用いられたプライマーとプローブを示す配列番号：NOS：5 - 16の配列を示す。

【図1】



【図2】



【図3】

MRGGRGAPFWLWPLPKLALLPLLWVLFQTRPQGSAGPLQCYGVGPLGDLNCSWEPLGD  
 LGAPSELHLQSQKYRSNKTQTVAVAAGRSWVAIPREQLTMSDKLLVWGKAGQPLWPPV  
 FVNLETQMKPNAPRLGPDVDFSEDDPLEATVHWAPPTWPSHKVLICQFHYRRCQEAAWT  
 LLEPELKTIPVVEIQDLELATGYKVYGRCRMEKEEDLWGEWSPILSFQTPPSAPKDV  
 WVSGNLCGTPGGEEPPLLWKAPGPCVQVSYKVVFWVGGRELSPEGITCCCSLIPSGAEW  
 ARVSAVNATSWEPLTNLSLVCLDSASAPRSVAVSSIAGSTELLVTWQPGPGEPLHVVD  
 WARDGDPLEKLNWVRLPPGNLSALLPGNFTVGVPIRITVTAVSASGLASASSVWGFREE  
 LAPLVGPTLWRLQDAPPGTPAIWGEVPRHQLRGHLTHYTLCAQSGTSPSVCMNVSGNT  
 QSVTLPLDLPWGPCELWVTASTIAGQPPGPIILRLHLPDNTLRWKVLPGILFLWGLFLLG  
 CGLSLATSGRCYHLRHKVLPWWVEKVPDPANSSSGQPHMEQVPEAQPLGDLPILEVEE  
 MEPPPVMESSQPAQATAPLDSGYEKHFLPTPEELGLLGPPRPQVLA

## 【 図 4 】

MNRLRVARLTPLELLLSLMSLLLGTTRPHGSPGPLQCYSVGPLGILNCSWEPLGDLETTPV  
LYHQSQKYHPNRVWEVKVPSKQSWVTIPREQFTMADKLLIWGTQKGRPLWSSVSVNLETQ  
MKPDTPQIFSQVDISEEATLEATVQWAPPVWPPQKALTCQFRYKECQAEAWTRLEPQLKT  
DGLTPVEMQNLEPGTCYQVSGRCQVENGYPWGEWSSPLSFQTPFLDPEDVWVSGTVCETS  
GKRAALLVWKDPRPCVQVTYTVWFAGDITTTQEEVPCCKSPVPAWMEWAVVSPGNSTSW  
VPPTNLSLVCLAPESAPCDVGVSSADGSPGIKVTWKQGTRKPLEYVVDWAQDGDSDLKLN  
WTRLPPGNLSTLLPGEFKGGVPYRITVTAVYSGGLAAAPSV\*GFREELVPLAGPAVWRLP  
DDPPGTPVVAWGEVPRHQLRGQATHYTFICIQSRGLSTVCRNVSSQTQTATLPNLHSGSFK  
LWVTVSTVAGQPPGPDLSLHLPDNRIRWKALPWFLSLWGLLLMGCGLSLASTRCLQARC  
LHWRHKLLOQWIWERVPDPANSNSGQPYIKEVSLPQPPKDGPILEVEEVELQPVVESPKA  
SAPIYSGYEKHFLLPTPEELGLLV

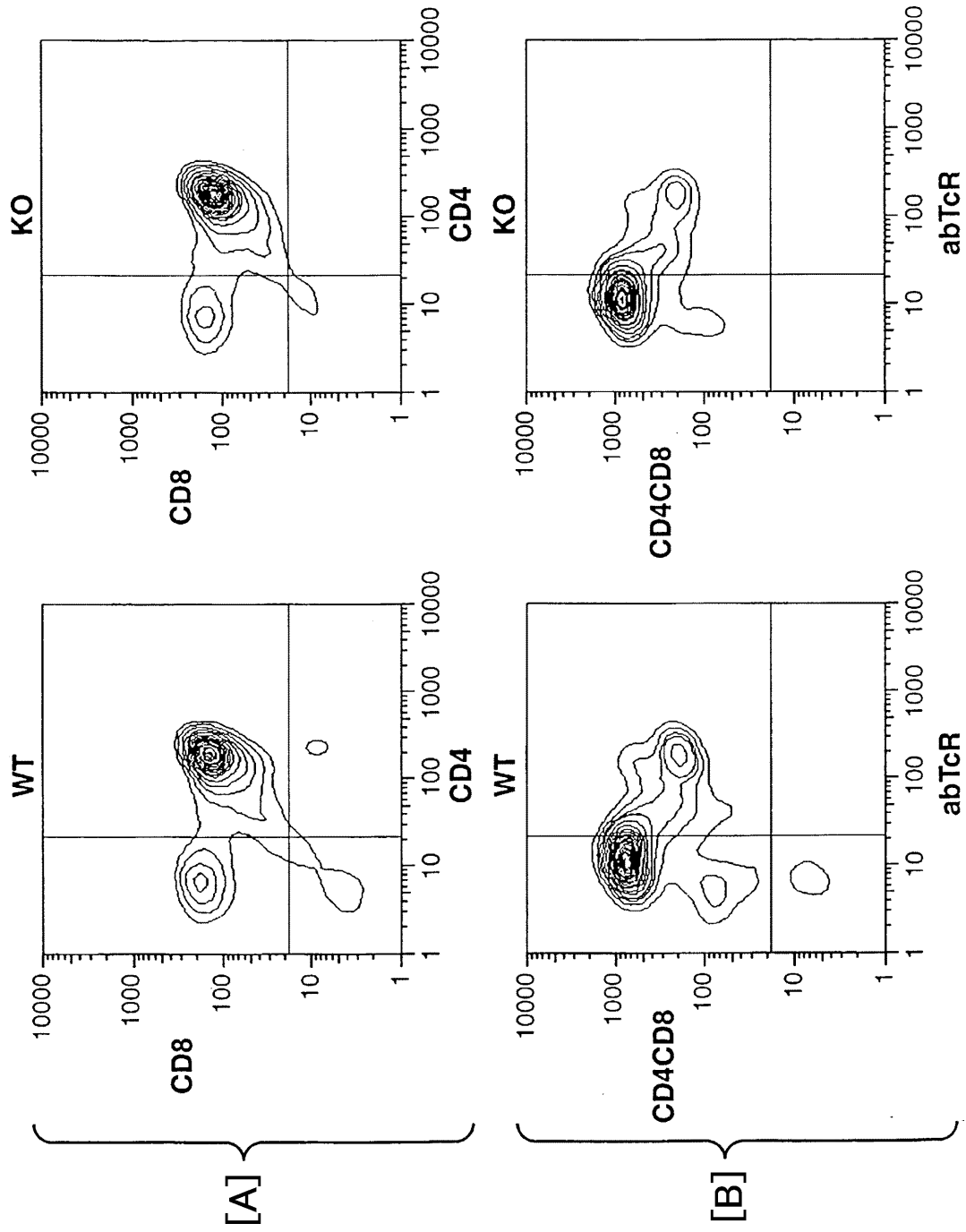
【 5 】

h-TCCR	1	MRGGRGAPFWLWPLPKLALLPLLLWVLFQRTTRPQGSAGPLQCYGVGPLGLDL
m-TCCR	1	-----MNRRLRVARLTPLELLLSLMSLLGLTRPHGSPGLQCYSVGFLGIL
h-TCCR	51	NCSWEPLGDLGAPSELHLQSQKYRSNKQTVAVAAGRSWVAIPPREQLTMS
m-TCCR	46	NCSWEPLGDLLETPLVLYHQSQKXHPNRVWEVKVPSKQSWVTIPREQFTMA
h-TCCR	101	DKLLVWGTKAGQPIWPPVFNLETKMKNAPRRLGPDVDFSEDDPPEATVH
m-TCCR	96	DKLLIWTGQKCRPLWSVSVNLETKMPPDTPIFSQVDISEEATLEATVQ
h-TCCR	151	WAPPYTPSHKVLICQFHYRRQCQEAATLLEPELKTIPLTPVEIQDLLELAT
m-TCCR	146	WAPPVWPPQKALTCQFRYKECQAEAWTRLEPQLKTDGLTPVEMQNLEPGT
h-TCCR	201	GKVVYGRCRMKEEDLWGEWSPILSFQTPPSAPKDVWVSGNLCGTPGGEE
m-TCCR	195	CYQVSGRCQVENGYP-WGEWSPILSFQTPFLDPEDEVVSGTVCETSGKRA
h-TCCR	251	PLLWKAAPGPCVQVSYKVFVWVGRELSPGIGITCCCSLIPSGAEWARVSA
m-TCCR	245	ALLVWKDFRPCVQVYTYTVWFAGADITTTQEEVPCCKSPVPANMEWAVVSP
h-TCCR	301	VNATSWEPLEFNLSLVCLDSASAPRSVAVSSIAGSTELLVTWQPGGEPLE
m-TCCR	295	GNSTSWVPTNLSLVCLAPEASAPCDVGVSSADGSPGIKVTWKQGTGRKPLE
h-TCCR	351	HVVDWARDDGDPLEKLNWVRLPFGNLSALLPGNFTVGVYRITVTAVSASG
m-TCCR	345	YVVDWAQDGDSDLKLNWTRLPFGNLSLLPGEFKGGVYRITVTAVYSSG
h-TCCR	401	LASASVWGFREELAPLVGPTLWRLQDAPPGTPIAIAWGEVPRRHQLRGHLT
m-TCCR	395	LAAAPSVWGFREELVPLAGPAVWRLPDDEPGTPIVVAWGEVPRRHQLRGQAT
h-TCCR	451	HYTLCAQSGTSPVCMNVSGNTQSVTLPLDIPWGPCCELWVTASTIAGQGGPP
m-TCCR	445	HYTFCIQSRGLSTVCRNVSQTQTATLPLNLSHSGSFKLLWVTVSTVAGQGGPP
h-TCCR	501	GPILRLHLPDNTLIRWKVLPGLFLWGLFLLGCGLSLATS-----GRCYHLR
m-TCCR	495	GPDLLSLHLPDNRIRWKA LPWFLSLWGLLLMGGGLSLASTRCLQARCLHWR
h-TCCR	547	HKVILPRMIVWEKVPDPANSSSQPHMEQVPEAQPLGLDLPILLEVEEMEPFV
m-TCCR	545	HKLLPQMIWERVDPANSNNSGQPIYIKEVSLPQPKPKDGPILLEVEEVLQPV
h-TCCR	597	MESSQPAQATAPLD SGYEKHFLLPTPEELGLLGPPRRPQVLA
m-TCCR	595	VES-----PKASAPIYSGYEKHFLLPTPEELGLLV

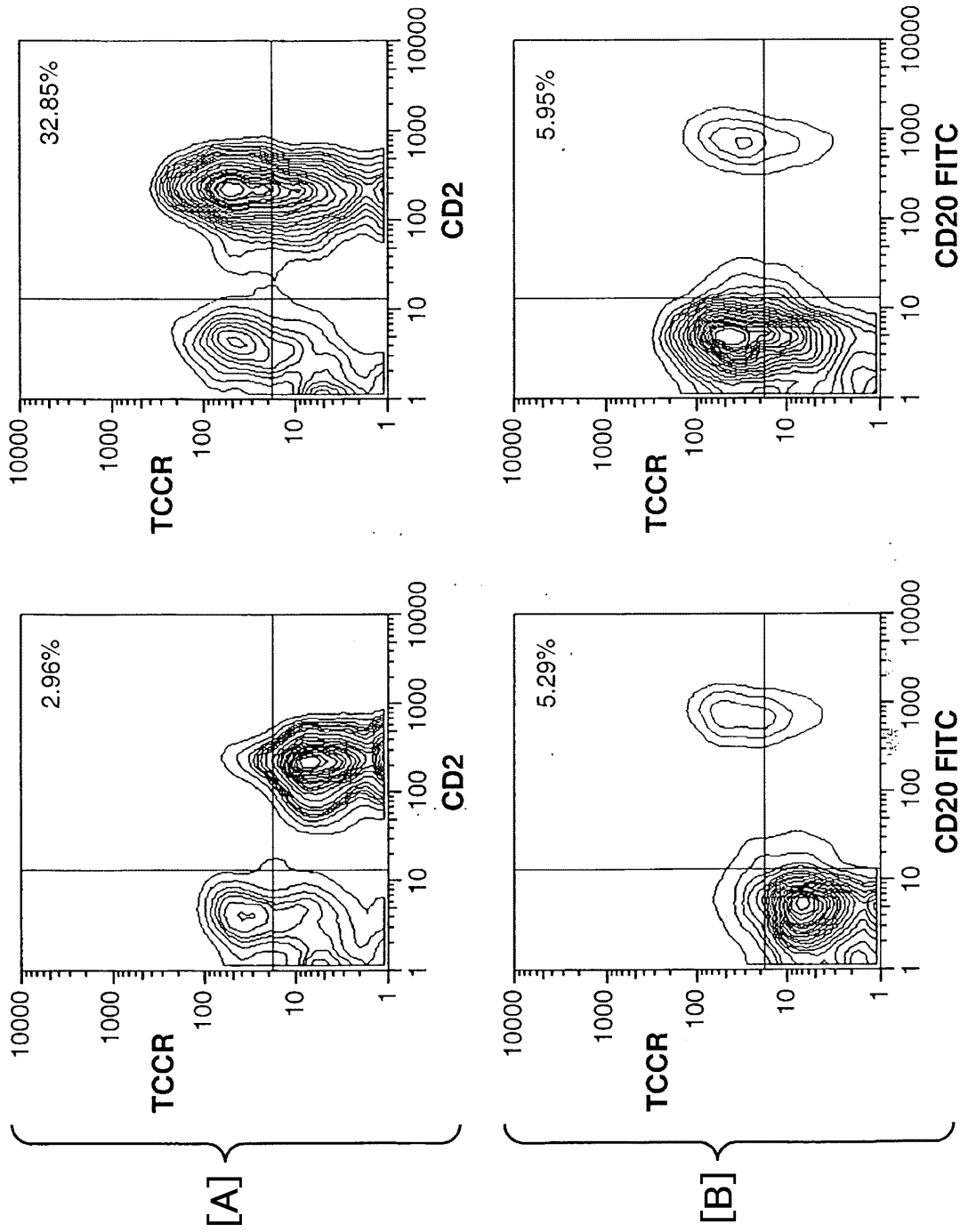
【 6 】

PBLs	成人
大腸	成人
Sm. Int.	成人
卵巢	成人
精巢	成人
前立腺	成人
胸腺	成人
脾臟	成人
心臟	成人
腦	成人
胎盤	成人
肺	成人
肝臟	成人
SK.肌肉	成人
腎臟	成人
膀胱	成人
腎臟	胎兒
肝臟	胎兒
肺	胎兒
腦	胎兒
心臟	胎兒

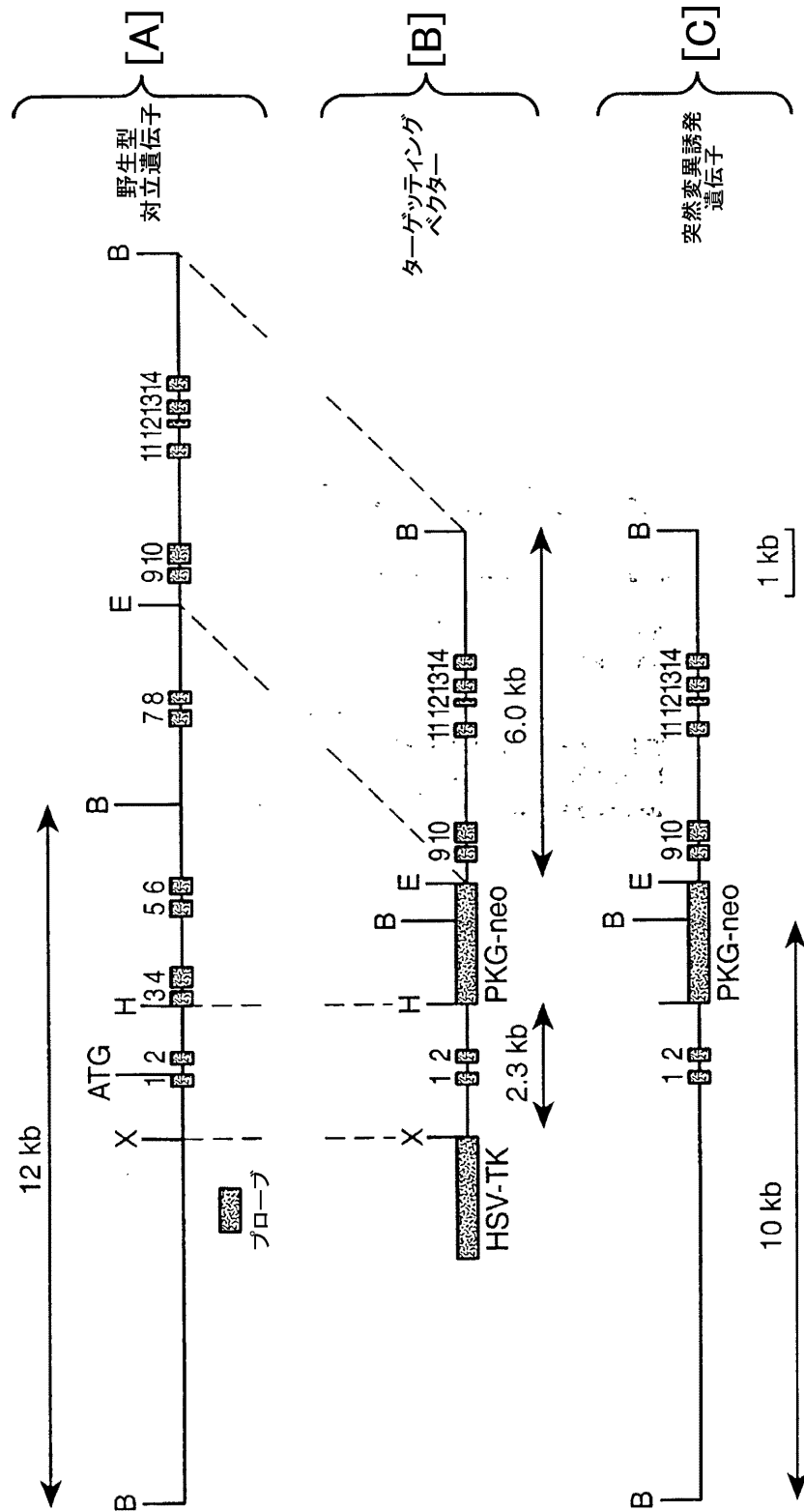
【図7】



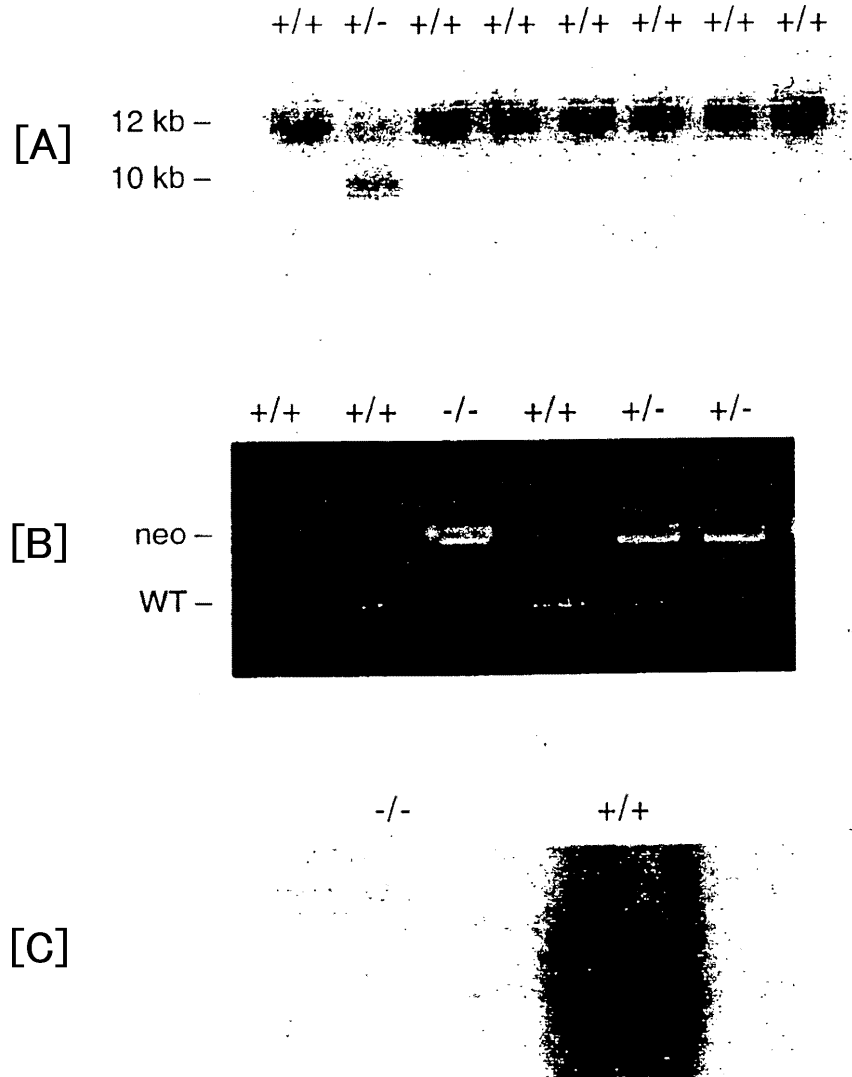
【図8】



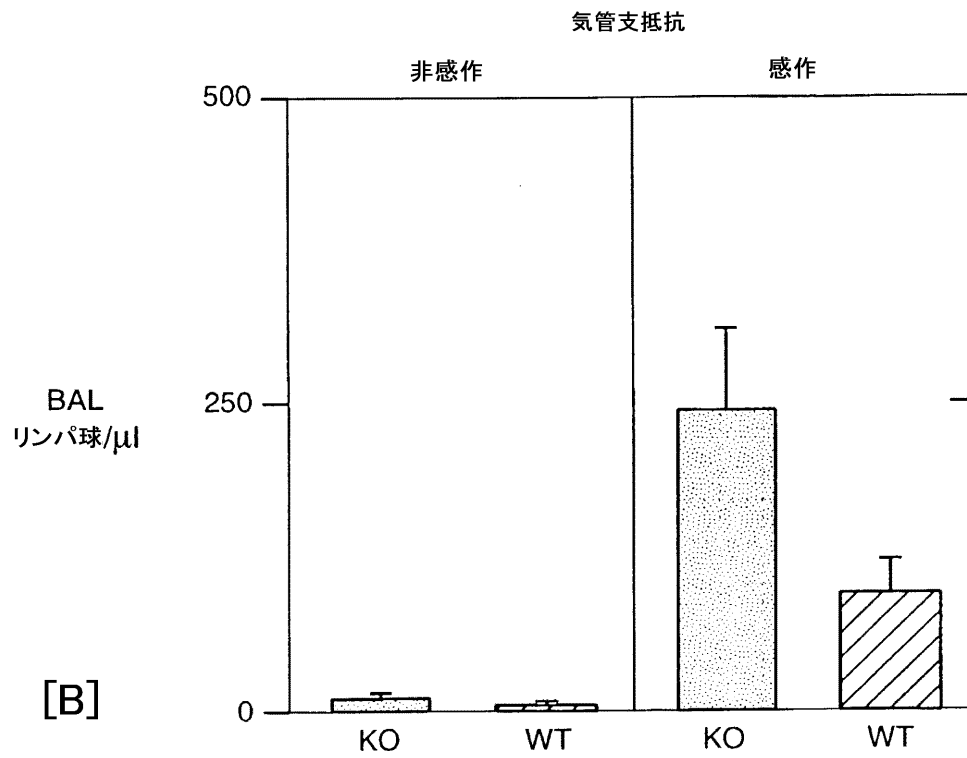
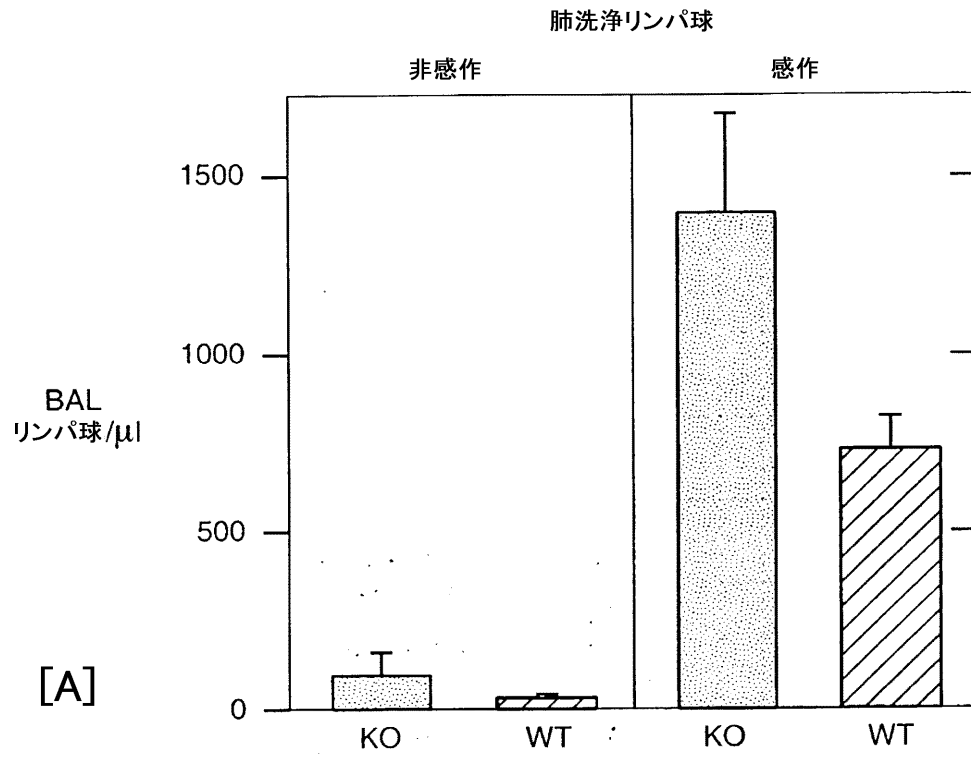
【図9】



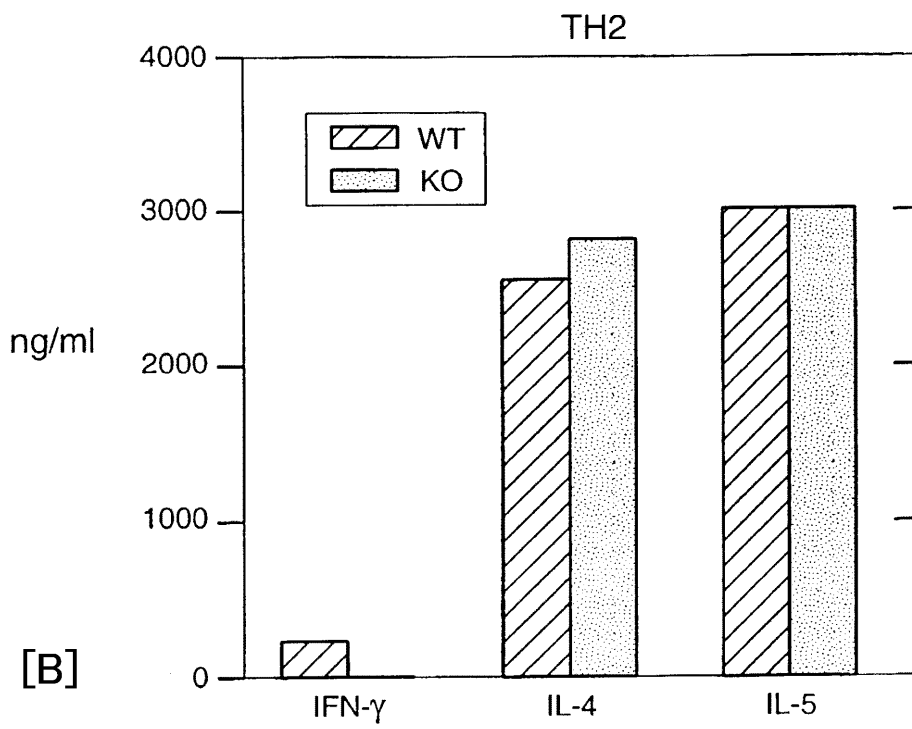
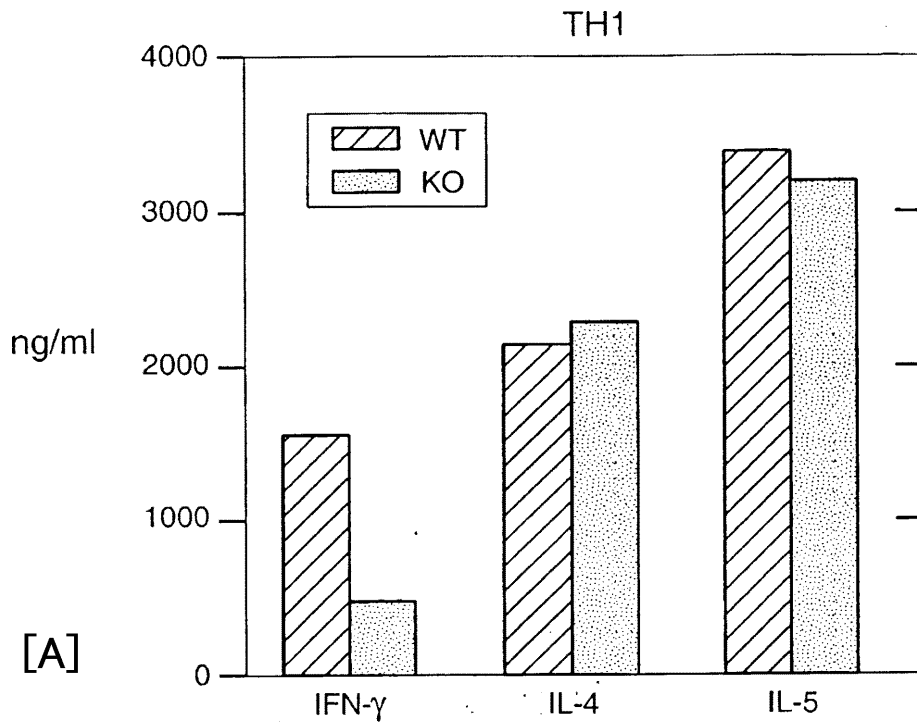
【図10】



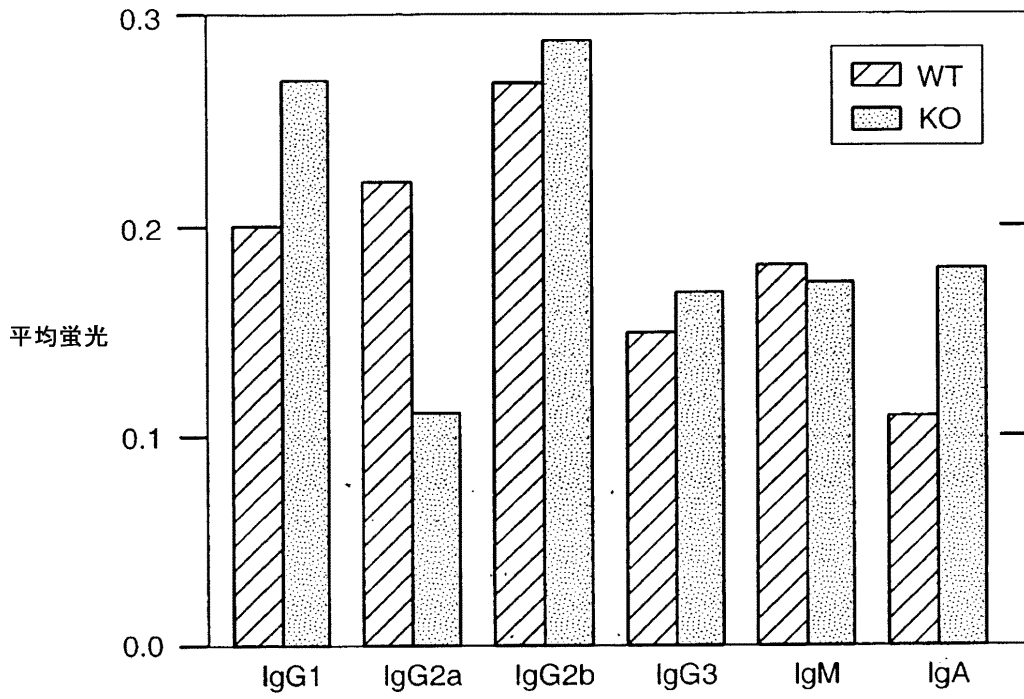
【図11】



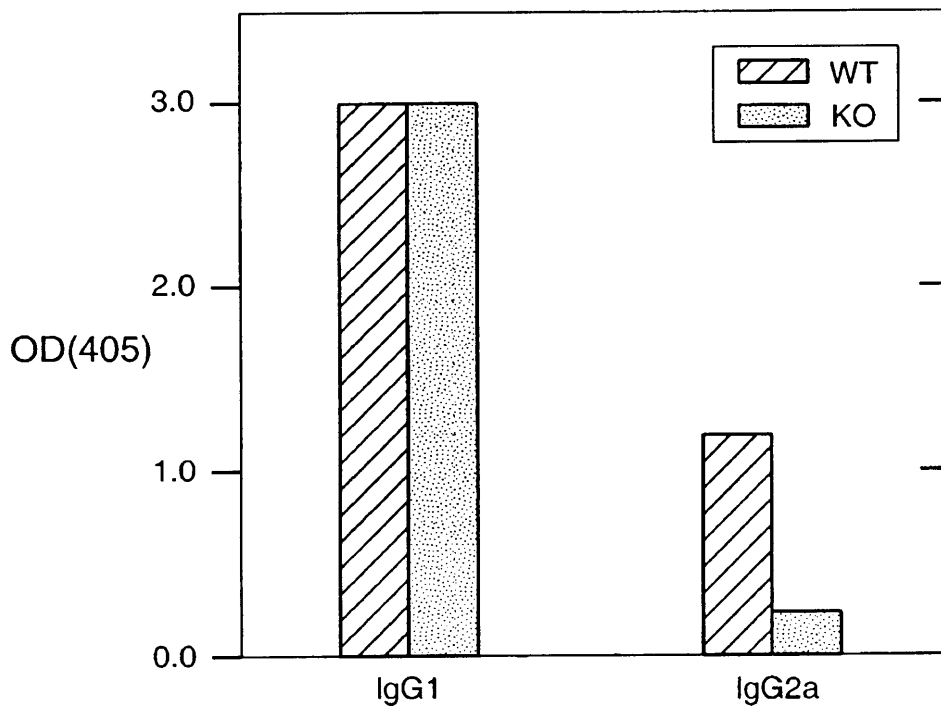
【図12】



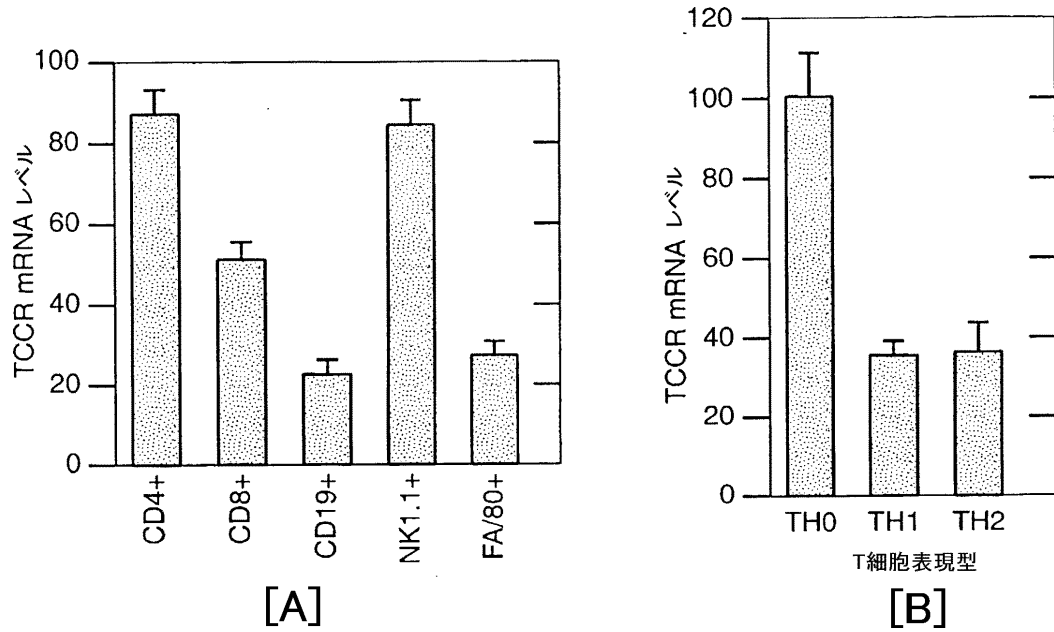
【图13】



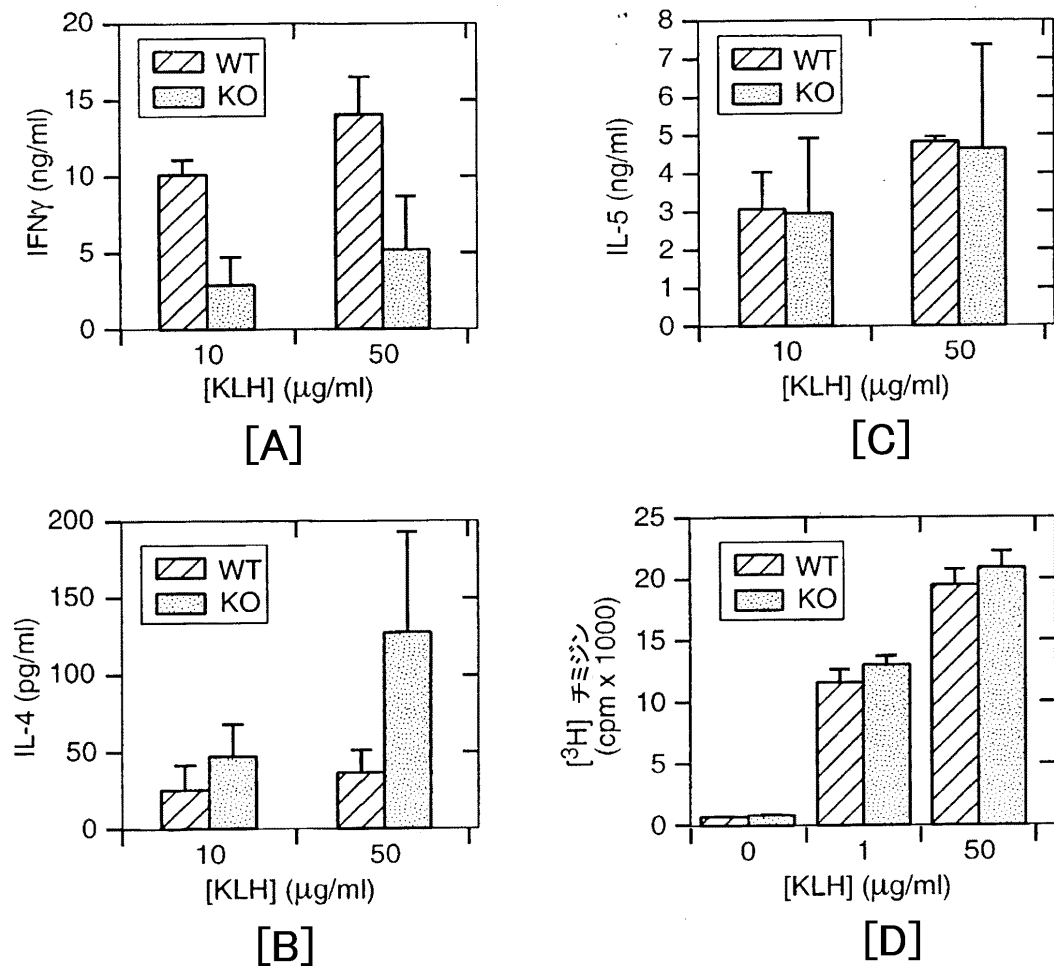
【图14】



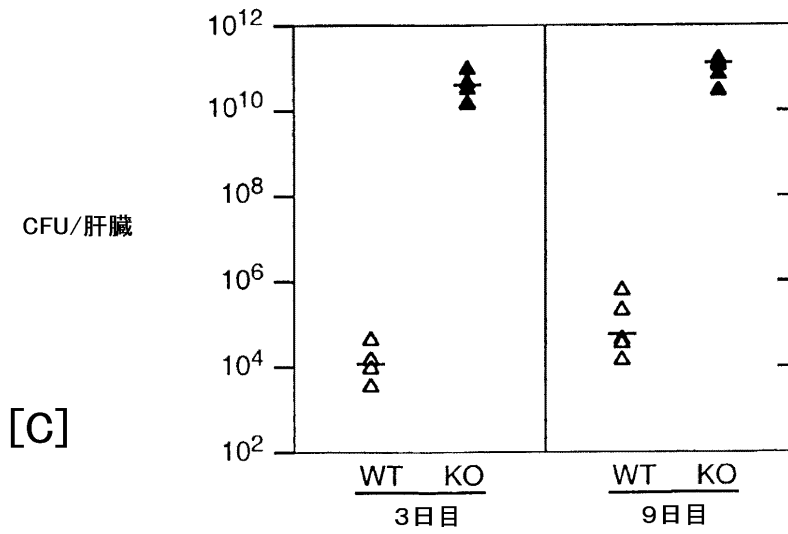
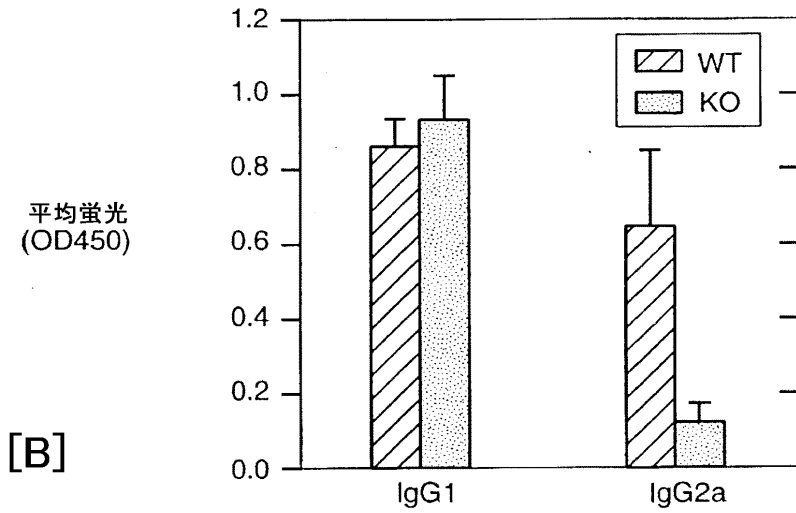
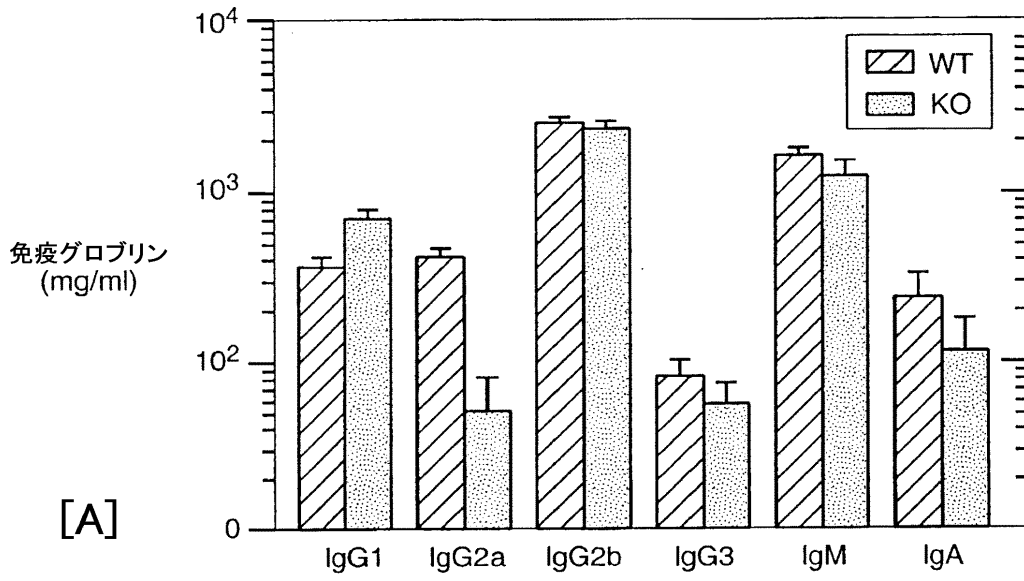
【図15】



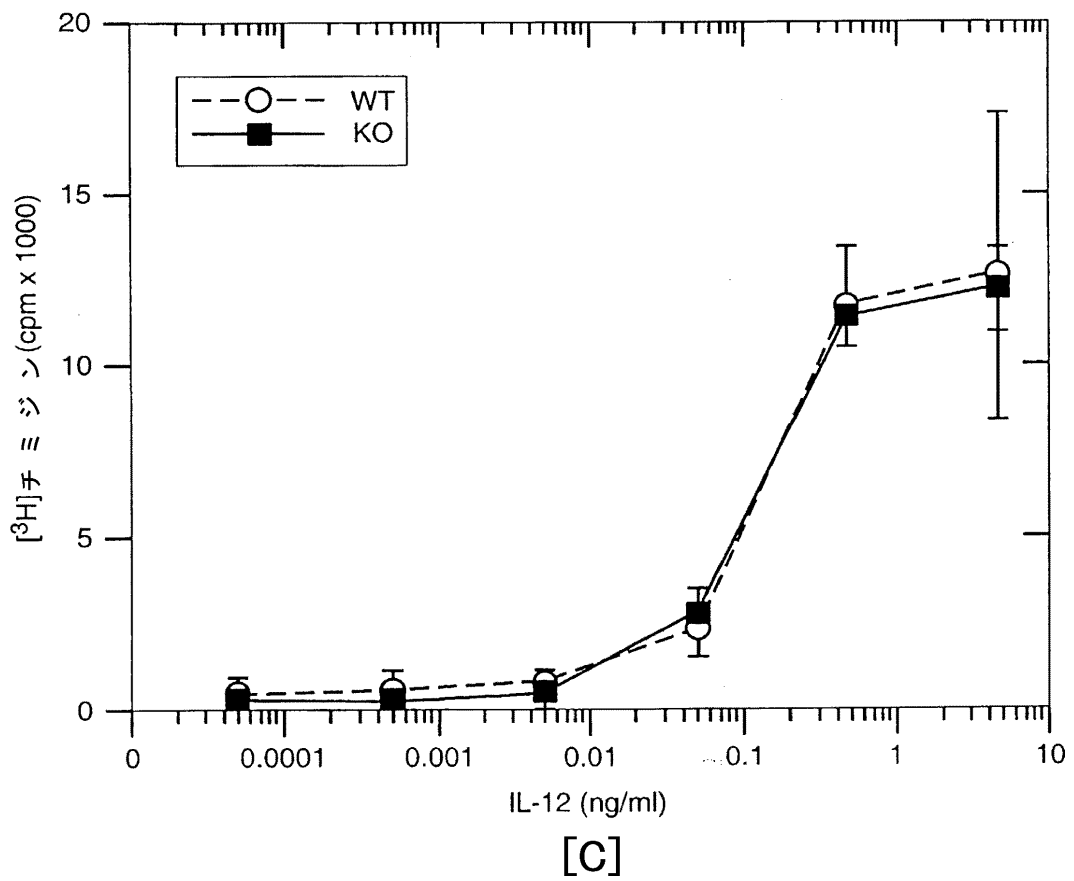
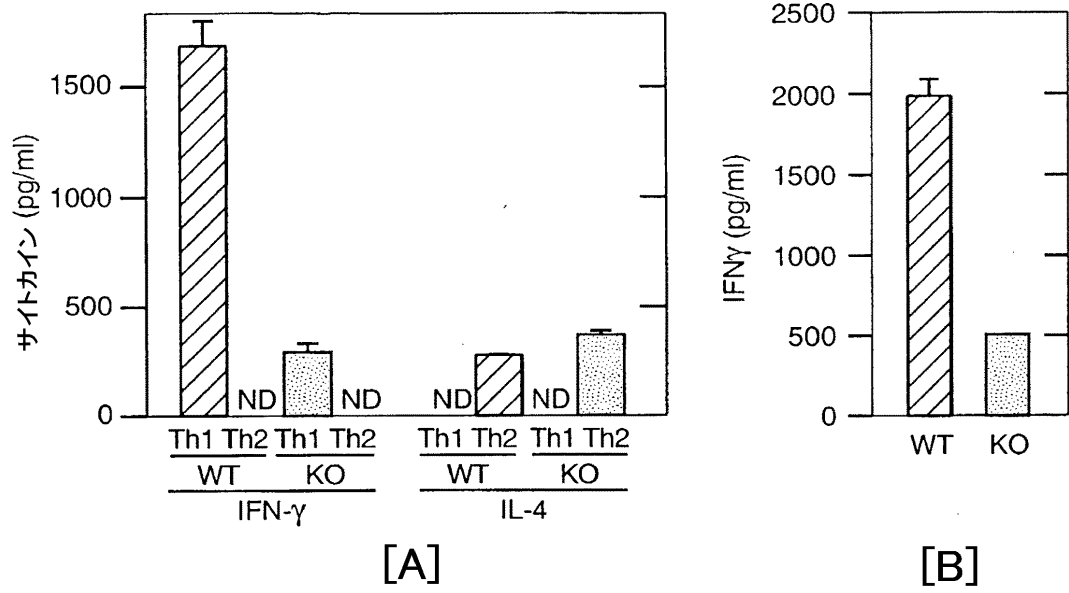
【図16】



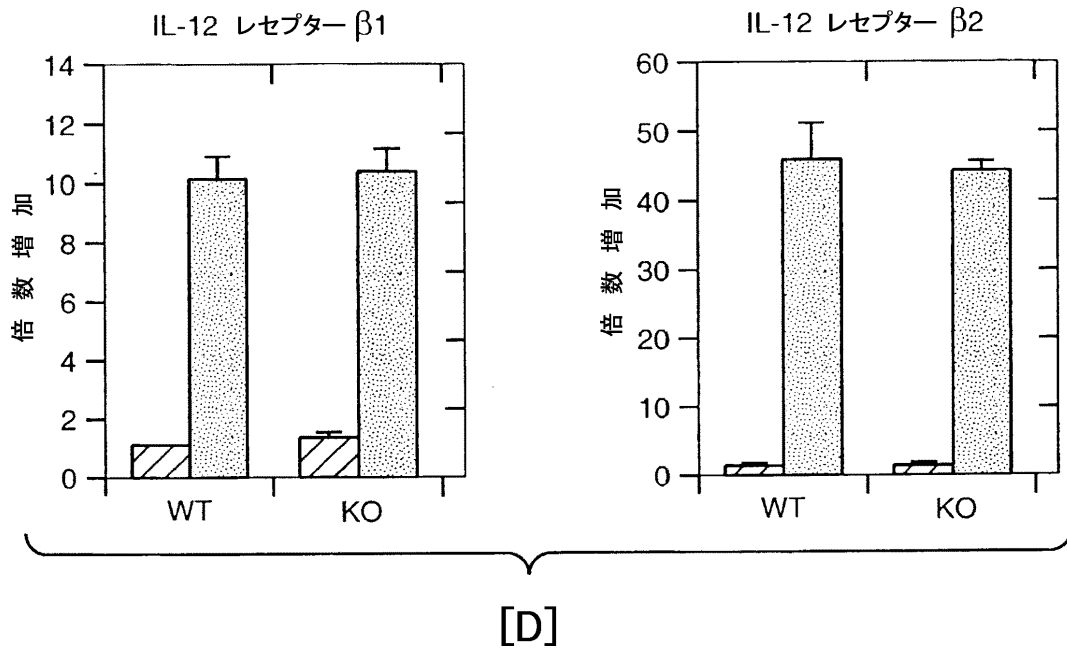
【図17】



【図18A-C】



【図18D】



【図19】

プライマー/プローブ	配列	配列番号
mTCCR, センス, タックマン	TGGTCTCTCCTGGCAACAGC	5
mTCCR, アンチセンス, タックマン	AGCCAAGCACACCAGAGACA	6
mTCCR, タックマンプローブ	CAGCTGGGTGCCTCCCACCAA	7
mRPL19, センス, タックマン	ATCCGCAAGCCTGTGACTGT	8
mRPL19, アンチセンス, タックマン	TCGGGCCAGGGTGTTTTT	9
mRPL19, タックマンプローブ	TTCCCGGGCTCGTTGCCG	10
mIL12Rb1, センス, タックマン	TCGCGTCTCTGGGAAGCT	11
mIL12Rb1, アンチセンス, タックマン	TTTAAGCCAATGTATCCGAGACTG	12
mIL12Rb1, タックマンプローブ	CGCCAGCGTCCTCCTCGTGG	13
mIL12Rb2, センス, タックマン	CAAGCATTTGCATCGCTATCA	14
mIL12Rb2, アンチセンス, タックマン	AATGCCTTTTGCCGGAAGT	15
mIL12Rb2, タックマンプローブ	ACGAATTGAGAACGTGCCACCGT	16

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/28827		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/715 C07K16/28 A61P37/02		
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 C07K		
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) EPD-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 44455 A (ZYMOGENETICS INC) 27 November 1997 (1997-11-27) cited in the application page 19, line 30 -page 20, line 29 claims 1-43	1-34
A	C. SPRECHER ET AL: "Cloning and Characterization of a novel Class I Cytokine Receptor" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 246, no. 1, 1998, pages 82-90, XP002174914 cited in the application abstract page 90, left-hand column	1-34
-/-		
<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:		'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
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		'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
'E' earlier document but published on or after the international filing date		'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.
'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)		'&' document member of the same patent family
'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		
Date of the actual completion of the international search 16 August 2001	Date of mailing of the international search report 29/08/2001	
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 Siatou, E	

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/28827
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANNE O'GARRA: "Cytokines Induce the Development of Functionally Heterogeneous T Helper Cell Subsets" IMMUNITY, vol. 8, March 1998 (1998-03), pages 275-283, XP002174915 the whole document	1-34
A	ROMAGNANI S ET AL: "Human Th1 and Th2 cells: Functional properties, mechanisms of development and role in diseases" ALLERGOLOGIE, GUSTAV VERLAG, MÜNCHEN-DEISENHOFEN, DE, vol. 19, no. 4, 1996, pages 175-179, XP002092593 ISSN: 0344-5062 the whole document	1-34
A	CONSTANT S L ET AL: "INDUCTION OF TH1 AND TH2 CD4+ T CELL RESPONSES: THE ALTERNATIVE APPROACHES" ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC, US, vol. 15, 1997, pages 297-322, XP002060443 ISSN: 0732-0582 the whole document	1-34

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box I.1

Although claims 1-14, 15 only as far as in vivo methods are concerned, and 16-26 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claim 28 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## Continuation of Box I.2

Present claims 1-6 and 14 relate to methods of treatment using an extremely large number of possible compounds acting as TCCR antagonists. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds and methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the methods using the compounds disclosed in claims 7-13.

Present claims 15-21 relate to methods of treatment using an extremely large number of possible compounds acting as TCCR agonists. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds and methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the methods using the compounds disclosed in claims 22-26.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/28827

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9744455 A	27-11-1997	US 5792850 A	11-08-1998
		AU 3009397 A	09-12-1997
		EP 0910635 A	28-04-1999
		JP 2000512492 T	26-09-2000
		US 5925735 A	20-07-1999
		US 6080406 A	27-06-2000

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 K	39/395	A 6 1 P	3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P	1/04		5/14	4 C 0 8 6
	3/10		11/06	
	5/14		17/00	
	11/06		25/00	
	17/00		27/02	
	25/00		29/00	
	27/02		31/00	
	29/00		31/10	
	31/00		31/12	
	31/10		31/18	
	31/12		33/02	
	31/18		37/06	
	33/02		37/08	
	37/06		43/00	1 0 5
	37/08	C 1 2 Q	1/68	Z
	43/00	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 N	5/06		33/50	Z
	5/10		33/53	D
C 1 2 Q	1/68		33/58	Z
G 0 1 N	33/15	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/50		5/00	B
	33/53			E
	33/58	A 6 1 K	37/02	

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

- (72)発明者 ドゥ ソーバージュ, フレデリック ジ  
 エー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404,  
 フォスター シティ, シューティング  
 スター アイル 187
- (72)発明者 グリュワール, イクバル  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94065,  
 レッドウッド シティ, タークスヘ  
 ッド レイン 323
- (72)発明者 ガーニー, オースティン, エル  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002,  
 ベルモント, デビー レイン 1

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA40 BA13 BB03  
 BB20 CA18 CB01 CB17 CB20  
 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36  
 DA77 FA16 FA37 FB02 FB03  
 FB04 FB07 FB12

4B024 AA01 AA11 BA63 BA80 CA01  
 CA02 CA07 CA11 CA20 DA02  
 DA03 DA06 DA12 EA04 GA11  
 HA03 HA11 HA17

4B063 QA01 QA19 QQ53 QQ79 QR08  
 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56  
 QR62 QS16 QS25 QS34 QS36  
 QX01 QX02

4B065 AA91X AA93X AB01 AB10  
 AC20 BA01 BA30 BB40 BC01  
 CA44 CA46

4C084 AA02 AA13 BA01 BA22 BA44  
 CA53 DC50 NA14 ZA01 ZA02  
 ZA33 ZA68 ZB02 ZB11 ZB13  
 ZC06 ZC35

4C085 AA14 CC21 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04  
 NA14 ZA01 ZA02 ZA33 ZA68  
 ZB02 ZB11 ZB13 ZC06 ZC35

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003512824A5</a>	公开(公告)日	2007-12-13
申请号	JP2001531868	申请日	2000-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
当前申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ドゥソーバージュフレデリックジェー グリユワールイクバル ガーニーオースティンエル		
发明人	ドゥ ソーバージュ, フレデリック ジェー グリユワール, イクバル ガーニー, オースティン, エル		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K31/711 A61K39/395 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/06 A61P17/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/10 A61P31/12 A61P31 /18 A61P33/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/58 C12N5/10 C12N5/06 A61K38/00		
CPC分类号	A61K38/00 A01K2217/075 C07K14/715 A61P1/04 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33 /02 Y02A50/41		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K31/7105 A61K31/711 A61K39/395.N A61P1/04 A61P3/10 A61P5 /14 A61P11/06 A61P17/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.105 C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50. Z G01N33/53.D G01N33/58.Z C12N5/00.B C12N5/00.E A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CA18 2G045 /CB01 2G045/CB17 2G045/CB20 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 2G045/FB07 2G045 /FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063 /QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA91X 4B065 /AA93X 4B065/AB01 4B065/AB10 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/BA30 4B065/BB40 4B065/BC01 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA44 4C084 /CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA02 4C084/ZA33 4C084/ZA68 4C084/ZB02 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZC06 4C084/ZC35 4C085/AA14 4C085/CC21 4C085/EE01 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA33 4C086/ZA68 4C086/ZB02 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZC06 4C086/ZC35		
优先权	60/160542 1999-10-20 US		
其他公开文献	JP4931310B2 JP2003512824A		
摘要(译)			

本发明涉及治疗和诊断免疫相关疾病的方法，包括主要由Th1或Th2细胞介导的那些疾病，这些细胞响应抗原刺激而释放细胞因子。本发明还涉及基于基因TCR及其激动剂或拮抗剂的相对表达水平来偏向Th1亚型或Th2亚型中的T细胞分化的方法。本发明进一步涉及诊断Th1和Th2介导的疾病。